

汉防己甲素聚乳酸微球的安全性评价[△]

胡泽丽*,程国华#,庞廷媛,陈娟,汪小乐(广州医学院附属肿瘤医院药剂科,广州 510095)

中图分类号 R965.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2012)15-1361-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2012.15.07

摘要 目的:评价汉防己甲素聚乳酸微球(TET-MC)的安全性。方法:采用液中干燥法制备TET-MC,对TET-MC进行急性毒性、血管刺激性、肌肉刺激性、过敏性试验。结果:小鼠静脉注射TET-MC的半数致死量为 $158.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$;未观察到TET-MC对实验动物有血管刺激性、过敏性,但有轻微的肌肉刺激性。结论:汉防己甲素微球化后毒性降低,应用于受试动物安全性较好。

关键词 汉防己甲素;微球;急性毒性;安全性

Safety Evaluation of Tetrandrine Poly-lactic Acid Microspheres

HU Ze-li, CHENG Guo-hua, PANG Ting-yuan, CHEN Juan, WANG Xiao-le (Dept. of Pharmacy, The Affiliated Tumor Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510095, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To evaluate the safety of Poly-lactic acid microspheres (TET-MC). METHODS: The in-liquid drying was used to prepare TET-MC. The acute toxicity LD_{50} test, venous and muscular stimulation test, allergic test in vitro were conducted. RESULTS: The value of LD_{50} for mice with intravenous injection was $158.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. There was slight muscle stimulating, but no veins stimulating, allergic reactions. CONCLUSION: Toxicity of TET is decreased by microsphere and TET-MC is basically safe.

KEY WORDS Tetrandrin; Microspheres; Acute toxicity; Safety

汉防己甲素(Tetrandrine, TET)是从防己科植物的干燥块根中提取出来的一种双苄基异喹啉类生物碱,有抗心肌缺血、

抑制血小板聚集、解痉、镇痛、镇静、抗炎、抗溃疡等药理作用。临床上TET对矽肺、风湿痛有一定疗效,常与低剂量放射

4 讨论

狼毒体外抗肿瘤药效研究颇多,但存在几个问题:一是没有系统对比狼毒大戟和月腺大戟的体外抗肿瘤活性;二是多采用动物瘤株进行研究,存在人和动物的种属差异问题;三是多采用粗提物直接外加于体外培养细胞,这样一些非生理环境如中药粗制剂的杂质、电解质或鞣质所引起的培养液渗透压和pH等的改变会影响细胞的生长,导致一些假阳性的结果出现^[2]。

采用血清药理学方法,取含药血清作用于体外培养人肿瘤细胞株可以克服以上的一些不足,较好地反映出狼毒体外抗肿瘤药活性。通过系统对比狼毒大戟和月腺大戟的体外抗肿瘤活性,可以看出其不同点,为中药狼毒药材标准制订提供参考。

研究结果表明,狼毒大戟与月腺大戟对于人肝癌细胞BEL-7402体外增殖抑制活性有很大区别,狼毒大戟作用活性明显强于月腺大戟。2010年版《中国药典》笼统将其收录定义为同一药材似有不妥,对其进行系统对比研究很有必要,能达到正本清源,为标准制订提供实验依据的目的。

血清药理学方法也存在诸多待解决的问题,如无确定的最佳给药方案、最佳的采血时间,无法做到体外培养体系内药

物浓度与血药浓度相等而又不影响细胞生长等。这些都有可能对实验结果造成影响,从而出现假阴性结果^[7]。但在同样实验条件下,两种含药血清所得的结果对于对比其药理活性的不同是有参考价值的。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[S]. 2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:269.
- [2] 赵万红,曹永孝,袁泽飞.中药血清药理学的方法学探讨[J].中药新药与临床药理,2002,13(2):122.
- [3] Iwama H, Amagaya S, Ogi-hain Y. Effect of shosaikoto, a Japanese and Chinese traditional herbal medicinal mixture on the mitogenic activity of lipopolysaccharide: a new pharmacological testing method [J]. *J Ethnopharmacol*, 1987, 21(1):45.
- [4] 李仪奎.中药药理实验方法学[M].上海:上海科学技术出版社,2006:50.
- [5] 杨军,丁敏,张太君,等.血清药理学方法观察复方斑蝥胶囊对人肝癌细胞SMMC-7721增殖的影响[J].中国药房,2005,16(4):262.
- [6] 段玉清,周密,张海晖,等.莲房原花青素对黑色素瘤B16细胞的抑制作用[J].中国药学,2009,44(2):103.
- [7] 张红敏,谢春光,陈世伟.含药血清体外药理试验的评价[J].中国中西医结合杂志,2004,24(8):741.

(收稿日期:2011-05-12 修回日期:2011-12-08)

[△]广州市科技三项项目(2006Z3-E4121)

* 硕士研究生。研究方向:药物新剂型。电话:020-83595032-3056。E-mail: huzeli871001@163.com

通讯作者:主任药师,教授。研究方向:临床药学,药物新剂型。电话:020-83595032-3057。E-mail: ghcheng661203@126.com

合并治疗肺癌,为放射治疗肿瘤增效药物^[1]。TET iv有局部刺激性,而以无毒可生物降解的聚乳酸为载体,制成肺靶向制剂能提高肺部药物浓度,减轻局部刺激性和全身毒副作用。因此,以聚乳酸为载体,采用液中干燥法制备肺靶向微球平均粒径为80.3%,载药量为46.9%^[2],同法制备聚乳酸空白微球(PLA-MC)。为评价TET聚乳酸微球(TET-MC)的安全性,笔者按照国家食品药品监督管理局(SFDA)2005年颁布编号为[H]GDT4-1“化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则”的要求进行制剂安全性的评价。

1 仪器与材料

1.1 仪器

RW20DZM.n 型强力流线型搅拌机(德国 IKA 公司);5810 型台式高速离心机(德国 Eppendorf 公司);TC-120 型智能程控生物组织自动脱水机、TB-718 型生物组织自动包埋机(孝感市泰维电子设备有限公司);HM450 型电脑程控式切片机(德国 Microm GmbH 公司);CFM-500 型倒置荧光显微镜摄像系统(德国 Zeiss 公司)。

1.2 试药

TET 原料药(西安山川生物技术有限公司,批号:20100409);TET 注射液(江西银涛药业有限公司,批号:H20053840);聚乳酸(济南岱罡生物科技有限公司,分子量:10 000);TET-MC(载药量:46.9%,批号:20110415)、PLA-MC(批号:20110507)、卵白蛋白均为笔者自制;弗氏完全佐剂(美国 Sigma 公司,规格:F5881-10 mL)。

1.3 动物

SPF 级昆明种小鼠 150 只,♀♂ 兼半,体重 18~22 g;新西兰兔 18 只,♀♂ 兼半,体重 2.0~2.5 kg;SD 大鼠 32 只,♀♂ 兼半,220~240 g,以上动物均由广东省医学实验动物中心提供(动物生产许可证号:SCXK(粤)2008-0002)。

2 方法^[3]与结果

2.1 急性毒性实验

以生理盐水为分散介质配制供试样品。实验分为 3 个大组,每组设定 5 个剂量,根据预实验结果,将 TET 注射液①、②、③、④、⑤(65.00、52.00、41.60、33.28、26.24 mg·kg⁻¹)组、PLA-MC①、②、③、④、⑤(800.00、640.00、512.00、409.60、327.68 mg·kg⁻¹)组、TET-MC①、②、③、④、⑤(250.00、200.00、160.00、128.00、102.40 mg·kg⁻¹)组剂量间距调整为 0.8。取禁食 12 h 昆明种小鼠 150 只,按体重、性别随机均分为 15 组,分别尾 iv 相应药物。给药后连续观察 6 h,如无异常则终止持续观察,改为每天观察 1 次,观察到给药后第 14 天。记录各组小鼠的死亡情况、体重变化。对实验过程中因濒死而处死的小鼠、死亡的小鼠和实验结束时仍存活的小鼠均进行大体解剖,观察主要脏器变化,变化若有异常均记录并进行组织病理学检查。采用 Bliss 法计算小鼠的半数致死量(LD₅₀)与 95%可信限。小鼠尾 iv 高剂量(65 mg·kg⁻¹)TET 注射液,小鼠立即出现躁动不安,呼吸困难,惊厥、抽搐死亡,死亡多发生于 5 min 内,其它剂量组小鼠部分抽搐死亡,未死亡的小鼠 14 d 后仍活动正常;尾 iv 高剂量 TET-MC(800 mg·kg⁻¹)、PLA-MC(250 mg·kg⁻¹)后,小鼠立即呼吸困难、死亡,其它剂量组部分小鼠呼吸急促后死亡,部分小鼠数分钟后缓解,14 d 后仍活动正常。死亡小鼠经解剖,肉眼观察肺部有瘀血,其余器官未见明显变化。小鼠一次性尾 iv 药物后的 LD₅₀测定结果见表 1。

2.2 血管刺激性实验

表 1 小鼠一次性 iv 药物后的 LD₅₀测定结果

Tab 1 The LD₅₀ level of different drugs in mice after one time intravenous administration

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	对数剂量 (LgD)	动物数 /n	死亡数 /n	LD ₅₀ /mg·kg ⁻¹	95%可信限 /mg·kg ⁻¹
TET 注射液①组	65.00	1.813	10	10		
TET 注射液②组	52.00	1.716	10	7		
TET 注射液③组	41.60	1.619	10	5	41.60	36.70~47.20
TET 注射液④组	33.28	1.522	10	3		
TET 注射液⑤组	26.24	1.425	10	0		
PLA-MC①组	800.00	2.903	10	10		
PLA-MC②组	640.00	2.806	10	7		
PLA-MC③组	512.00	2.709	10	4	523.20	461.00~593.70
PLA-MC④组	409.60	2.612	10	3		
PLA-MC⑤组	327.68	2.515	10	0		
TET-MC①组	250.00	2.398	10	10		
TET-MC②组	200.00	2.301	10	7		
TET-MC③组	160.00	2.204	10	4	158.90	137.90~183.80
TET-MC④组	128.00	2.107	10	3		
TET-MC⑤组	102.40	2.010	10	1		

新西兰兔 12 只,随机分为 2 组,每组 6 只,采用同体左右侧自身对比法,观察血管刺激性。第 1 组左耳 iv TET-MC 混悬液(8 mg·kg⁻¹),右耳 iv 等容生理盐水作为阴性对照;第 2 组左耳 iv TET 注射液(8 mg·kg⁻¹),右耳 iv 等容生理盐水作为阴性对照。给药体积 1 mL,每天 1 次,连续 3 d,每天给药前和末次给药后 48 h 对兔和注射部位进行肉眼观察,观察结束后每组各处死一半兔,于注射处 1 cm 左右取一段血管,立即放入 10% 的甲醛溶液中固定,进行常规病理组织学检查。留存一半兔继续进行 14 d 的恢复期观察,观察期结束后按同样的方法处死、取材进行组织学检查。各组给药后,除由注射操作原因引起的红肿外,局部血管注射部位均无明显充血、肿胀等现象。病理组织切片显示,新西兰兔耳缘 iv 部位未见损伤性病变,静脉管壁完整,未见炎症反应等病变,表明 TET 注射液和 TET-MC 在实验剂量下无明显的血管刺激性。耳缘静脉病理组织切片见图 1。

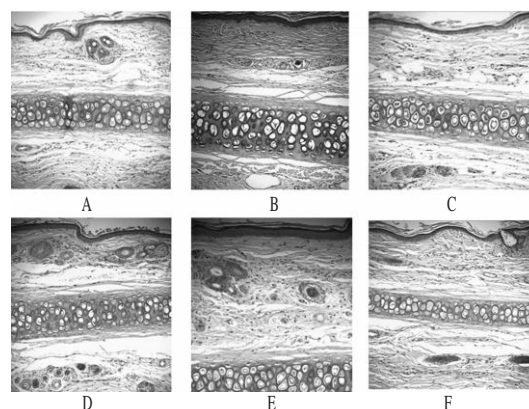


图 1 耳缘静脉病理组织切片图(100×)

A. 生理盐水组(48 h); B. TET 注射液组(48 h); C. TET-MC 混悬液组(48 h); D. 生理盐水组(14 d); E. TET 注射液组(14 d); F. TET-MC 混悬液组(14 d)

Fig 1 Pathohistological photograph of ear vein (100×)

A. normal saline group (48 h); B. TET injection group (48 h); C. TET-MC suspension group (48 h); D. normal saline group (14 d); E. TET injection group (14 d); F. TET-MC suspension group (14 d)

2.3 肌肉刺激性实验

新西兰兔6只,采用自体左右侧对比法,观察肌肉刺激性。第1组左腿股四头肌im TET注射液(8 mg·kg⁻¹),右腿股四头肌im等容生理盐水作阴性对照;第2组左腿股四头肌im TET-MC混悬液(8 mg·kg⁻¹),右腿股四头肌im等容生理盐水作为阴性对照。给药体积1 mL,每天1次,连续3 d。注射后观察新西兰兔状态,14 d后解剖取出股四头肌,纵向切开,观察注射部位局部刺激反应及可逆反应的程度,取材进行组织学检查。病理组织切片显示,给药14 d后阴性对照组兔肌肉组织正常,未见炎症损伤;TET注射液组有炎症反应及肌肉组织纤维化;TET-MC组可见微球分布于肌肉中,微球周围有炎症反应,肌纤维有冲断的现象,表明TET注射液、TET-MC都有一定的肌肉刺激性。肌肉组织病理切片见图2。

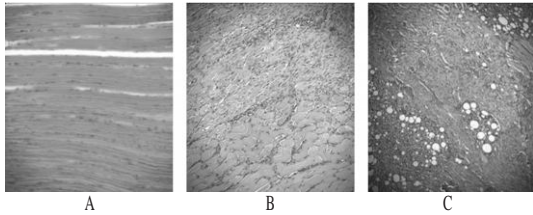


图2 肌肉组织病理切片图(14 d, 100×)

A.生理盐水组;B.TET注射液组;C.TET-MC混悬液组

Fig 2 Pathohistological photograph of muscular (14 d, 100×)

A.normal saline group; B.TET injection group; C. TET-MC suspension group

2.4 被动皮肤过敏性实验(PCA)

SD大鼠8只,均分为4组,分别为阴性对照(生理盐水)、阴性对照(卵白蛋白)和TET-MC高、低剂量(30、10 mg·kg⁻¹)组。每组定时、无菌、间日sc供试液1 mL,共3次,ip 弗氏完全佐剂0.5 mL/只,末次致敏后10 d心脏采血,2 000 r·min⁻¹离心10 min⁻¹,分离血清,-20℃贮藏,备用。

另取相应大鼠,分组同上,每组6只,♀♂各半,乙醚浅麻醉,背部预先脱毛4点(脊柱两侧),每点面积约为3×4 cm²,同时配制各组血清iv生理盐水稀释液(1/2、1/4、1/8、1/16),备用。每只大鼠于脱毛处某一点sc 0.1 mL一种上述血清。被动致敏24 h后,各组iv与致敏剂量相同的激发抗原加等量0.5%伊文思蓝染料共1 mL,进行激发。30 min后麻醉处死各组大鼠,剪取背部皮肤,测量皮肤内层的斑点大小,直径>5 mm者判断为阳性。不规则斑点的直径为长径与短径之和的一半。

结果,阳性对照组蓝斑直径均>5 mm,TET-MC高、低剂量和生理盐水组蓝斑直径均<5 mm,表明被动皮肤过敏结果为阴性。SD大鼠PCA实验结果见表2。

4 讨论

采用液中干燥法制备TET-MC,粒径为7~15 μm的占80.3%。研究表明^[4],TET-MC菌检合格,在室温条件下稳定性良好。小鼠尾iv TET注射液,LD₅₀为41.6 mg·kg⁻¹,与文献^[6]报道33.30 mg·kg⁻¹接近,说明本方法可行,TET微球化后LD₅₀提高,毒性明显降低。

表2 SD大鼠PCA实验结果($\bar{x} \pm s$ $n=6$)

Tab 2 Results of PCA test of SD rats($\bar{x} \pm s$ $n=6$)

组别	致敏鼠数/n	阳性反应鼠数(蓝斑直径)/只(mm)			
		1:2	1:4	1:8	1:16
阴性对照组	6	0(1.0±0.3)	0(1.0±0.1)	0	0
阳性对照组	6	6(26.0±3.2)	6(18.0±2.1)	6(14.4±2.3)	6(10.0±1.8)
TET-MC低剂量组	6	0(1.0±0.7)	0(0.6±0.2)	0	0
TET-MC高剂量组	6	0(1.0±0.6)	0(1.0±0.2)	0	0

TET临床iv剂量为2.85~4.29 mg·kg⁻¹,血管刺激性预实验时按2.85 mg·kg⁻¹剂量换算成新西兰兔给药剂量14 mg·kg⁻¹给药,给药后出现兔立即死亡的现象,最后采用8 mg·kg⁻¹的给药剂量。

iv 7~12 μm的微球通常被肺毛细血管以机械滤过方式截留,集中于肺部表现肺部靶向性。在进行急性毒性实验时,TET-MC高剂量(250 mg·kg⁻¹)组小鼠迅速死亡,病理解剖时发现肺部有瘀血。导致死亡的原因可能有:TET-MC混悬液在贮藏期间容易发生聚集、融合及药物渗漏,导致微球抱成团粒径增大,小鼠脑部或血管栓塞死亡;一次性注射微球过多,大量集中于肺部导致局部栓塞。提示TET-MC应现配现用,使用前尽量混匀,同时应该提高载药量,减少微球用量。肌肉刺激性实验中TET-MC混悬液有炎症反应,可能的原因是聚乳酸的降解是一个复杂的过程,聚乳酸的降解过程中局部酸性积累导致聚乳酸存在部位出现非感染性炎症,甚至局部严重水肿^[6]。

总之,对TET-MC的安全性研究结果表明,小鼠尾iv TET-MC混悬液LD₅₀为158.9 mg·kg⁻¹,该微球制剂无溶血性,未见血管刺激性,有轻微的肌肉刺激性,未产生过敏反应,在本实验条件下TET-MC基本安全。

参考文献

- [1] 陈志蓉.汉防己甲素的临床应用概述[J].海峡药学,2008,20(8):119.
- [2] 程国华,王娟.均匀设计法优化汉防己甲素肺靶向微球的处方及制备工艺[J].中国医院药学杂志,2003,23(7):390.
- [3] 国家食品药品监督管理局.化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则(第二稿)[Z].2005.
- [4] 程国华,罗佳波.汉防己甲素微球的稳定性研究[J].中药材,2005,28(5):429.
- [5] 李凤前,陆彬,陈文彬.肺靶向汉防己甲素缓释微囊的安全性评价[J].中国现代应用药学,2002,19(6):478.
- [6] Bergsma JE, Rozema FR, Bos RR, et al. Foreign-body reactions to resorbable poly-(l-lactide) bone plates and screws used for the fixation of unstable zygomatic fractures [J]. J Oral Maxillofac Surg, 1993, 51(6):666.

(收稿日期:2011-07-16 修回日期:2011-11-23)

《中国药房》杂志——全国中文核心期刊,欢迎投稿、订阅