

# 染料木素甲氧基封端的聚乙二醇-乳酸羟基乙酸共聚物胶束在小鼠体内的组织分布研究<sup>Δ</sup>

何礼<sup>1\*</sup>, 金虹<sup>1</sup>, 韩瑞伟<sup>1</sup>, 阎雪莹<sup>2#</sup> (1. 四川中医药高等专科学校药学院, 四川 绵阳 621000; 2. 黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)11-1496-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.11.14

**摘要** 目的: 研究染料木素甲氧基封端的聚乙二醇-乳酸羟基乙酸(MePEG-PLGA)共聚物胶束在小鼠体内的组织分布特征。方法: 采用高效液相色谱法测定染料木素在小鼠血浆及各组织(心、肝、脾、肺、肾)中的浓度。色谱柱为Dikma Diamonsil C<sub>18</sub>, 流动相为甲醇-水(60:40, V/V), 流速为1.0 mL/min, 检测波长为260 nm, 柱温为35 ℃, 进样量为10 μL。48只小鼠分为乳剂组和胶束组, 每组24只, 分别按40 mg/kg剂量尾静脉注射染料木素乳剂或染料木素MePEG-PLGA共聚物胶束, 检测给药后5、30、90 min血浆及各组织(心、肝、脾、肺、肾)中染料木素的含量, 比较两组AUC<sub>0-90 min</sub>和平均驻留时间(MRT)。结果: 胶束组小鼠给药后5、30、90 min血浆中染料木素的含量均高于乳剂组, 给药后5、30 min肝组织中染料木素的含量均低于乳剂组。与乳剂组比较, 胶束组小鼠血浆中染料木素的AUC<sub>0-90 min</sub>明显增加、MRT明显延长( $P < 0.01$ ), 肝组织中染料木素的AUC<sub>0-90 min</sub>明显降低、MRT明显缩短( $P < 0.05$ ), 肾组织中染料木素的AUC<sub>0-90 min</sub>明显增加( $P < 0.05$ ), 其他差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论: 染料木素制成MePEG-PLGA共聚物胶束后, 可增加血浆中染料木素的分布, 降低其在肝组织中分布, 从而可能会提高治疗效果并降低药物肝毒性。

**关键词** 染料木素; 甲氧基封端的聚乙二醇-乳酸羟基乙酸共聚物胶束; 小鼠; 组织分布

## Tissue Distribution Study of Genistein-loaded MePEG-PLGA Copolymer Micelle in Mice

HE Li<sup>1</sup>, JIN Hong<sup>1</sup>, HAN Ruiwei<sup>1</sup>, YAN Xueying<sup>2</sup> (1. School of Pharmacy, Sichuan College of TCM, Sichuan Mianyang 621000, China; 2. College of Pharmacy, Heilongjiang University of TCM, Harbin 150040, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study *in vivo* tissue distribution of genistein-loaded MePEG-PLGA copolymer micelle in mice. METHODS: HPLC method was used to determine the concentrations of genistein in plasma and tissues (heart, liver, spleen, lung, kidney) of mice. The determination was performed on Dikma Diamonsil C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of methanol-water (60:40, V/V) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 260 nm, and the column temperature was 35 ℃. The sample size was 10 μL. 48 mice were divided into emulsion group and micelle group, with 24 mice in each group. They were given 40 mg/kg genistein emulsion or genistein-loaded MePEG-PLGA copolymer micelle via tail vein. The contents of genistein in plasma and tissues (heart, liver, spleen, lung, kidney) were detected 5, 30, 90 min after medication. AUC<sub>0-90 min</sub> and mean residence time (MRT) were compared. RESULTS: The content of genistein in micelle group was higher than emulsion group 5, 30, 90 min after medication, and the content of genistein in liver tissue was lower than emulsion group 5, 30 min after medication. Compared with emulsion group, AUC<sub>0-90 min</sub> and MRT of genistein in plasma of mice in micelle group were increased significantly ( $P < 0.01$ ); AUC<sub>0-90 min</sub> and MRT of genistein in liver tissue were decreased significantly ( $P < 0.05$ ). AUC<sub>0-90 min</sub> of genistein in renal tissue was increased significantly ( $P < 0.05$ ), without statistical significance of other differences ( $P > 0.05$ ). CONCLUSIONS: genistein-loaded MePEG-PLGA copolymer micelle can increase the distribution of genistein in plasma, reduce the distribution of it in liver tissue so as to improve therapeutic efficacy and reduce drug hepatotoxicity.

**KEYWORDS** Genistein; MePEG-PLGA copolymer micelle; Mice; Tissue distribution

染料木素(Genistein)又称5,7,4-三羟基异黄酮、染料木黄酮、金雀异黄素,是从葛根、槐花、染料木和广豆根等豆科植物中提取得到的一种异黄酮类活性成分。大量研究证实,染料木素具有雌激素作用、抗氧化作用

Δ 基金项目:黑龙江省教育厅研究生创新科研项目(No.YJSCX2011-459HLJ);四川中医药高等专科学校科研项目(No.17ZRYB01)

\* 讲师,硕士。研究方向:中药单体有效成分新剂型与药理学。电话:0816-2383871。E-mail:heli\_stu@126.com

# 通信作者:教授,硕士生导师,博士。研究方向:药物新剂型与新药开发。电话:0451-82195748。E-mail:15159267@qq.com

及清除自由基、抑制蛋白酪氨酸激酶活性、诱发细胞程序性凋亡、抑制血管生成等作用<sup>[1-4]</sup>。目前国内用于治疗骨质疏松的一类新药染料木素胶囊已获准进入临床Ⅱ期试验,美国国立癌症研究中心将其作为肿瘤预防剂进行临床研究<sup>[5-6]</sup>。然而染料木素在生物药剂学中属于生物药剂学分类系统(BCS)中的Ⅱ类化合物,在水中溶解度仅为0.13 μg/mL<sup>[7]</sup>,且存在较强的首关效应,直接口服后在体内生物利用度低,极大地限制了其临床应用。

在聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)纳米的改性研

究中应用最多的是聚乙二醇(PEG)的衍生物,PLGA 和 PEG 均已被美国 FDA 批准用于药物输送系统,将疏水性的 PLGA 和亲水性的甲氧基封端的聚乙二醇(MePEG)嵌合在一起合成的高分子嵌段聚合物甲氧基封端的聚乙二醇-乳酸羟基乙酸(MePEG-PLGA)对难溶性药物具有增溶效果,其抗血液稀释能力突出,是一种缓释、高效且安全的长循环纳米药物载体。本研究组为了提高染料木素溶解度和生物利用度,以 MePEG-PLGA 为载体成功制备了染料木素 MePEG-PLGA 共聚物胶束的冻干制剂<sup>[8-10]</sup>。本文在此基础上,通过尾静脉注射染料木素 MePEG-PLGA 共聚物胶束,采用高效液相色谱法测定给药后不同时间小鼠血浆及各组织(心、肝、脾、肺、肾)中染料木素的浓度,考察染料木素 MePEG-PLGA 共聚物胶束在小鼠体内的分布特性,为其进一步研究开发和临床应用提供参考依据。染料木素的化学结构式见图 1。

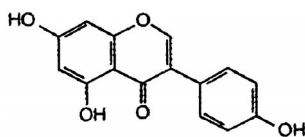


图 1 染料木素的化学结构式

Fig 1 Chemical structures of genistein

## 1 材料

### 1.1 仪器

LC-2010 AHT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司);R-205B 型旋转蒸发器和 W202B 型数控恒温浴锅(上海申胜生物技术有限公司);Scientz-II D 型超声波细胞破碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);QL-901 型旋涡混合器(江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

染料木素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111704-200501,纯度:≥98%),染料木素原料药(西安小草植物科技有限责任公司,批号:XC100310,纯度:≥98%);MePEG-PLGA [济南岱罡生物科技有限公司,批号:102106,MePEG 相对分子质量为 4 000,MePEG-PLGA(1:3,m/m),丙交酯-乙交酯(75:25,m/m)];高纯度大豆卵磷脂(德国德固赛公司,批号:120404);注射用大豆油(铁岭北亚注射用油有限公司,批号:20111206);肝素钠注射液(批号:1710071-C172,规格:2 mL:1.25 万 u)和医用甘油(批号:2014-1164)均购自北京奥博星生物技术有限公司;泊洛沙姆 188 和泊洛沙姆 407(上海协泰化工有限公司,批号:2864-12、1065-35);甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

### 1.3 动物

昆明种小鼠,♀♂各半,体质量(20±2)g,黑龙江中医药大学药物非临床研究实验室提供,实验动物生产合格证号:SCXK(黑)2016-0004。

## 2 方法与结果

### 2.1 胶束和乳剂的制备

2.1.1 染料木素 MePEG-PLGA 共聚物胶束 分别称取 21 mg 染料木素原料药,110 mg MePEG-PLGA 置于锥形瓶中,加入丙酮-乙醇(3:2,V/V)的混合有机溶剂 10 mL,50 ℃水浴使其完全溶解。在 500 r/min 的机械搅拌条件下,将所得混合溶液以 3 滴/s 的速度滴入预先配好的 20 mL 含 1% 泊洛沙姆 188 的水溶液中,滴定结束后继续搅拌 10 min,将所得产物在 40 ℃下减压除去有机溶剂,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,加 3% 海藻糖作为冻干保护剂,混匀,冻干后保存。

2.1.2 染料木素乳剂的制备 精密称取高纯度大豆卵磷脂 0.60 g、注射用大豆油 5 g,置于烧杯中,60 ℃左右恒温搅拌约 10 min,加入染料木素原料药 50 mg,加热搅拌使温度达到 70 ℃并保持恒定,得油相。精密称取医用甘油 1.25 g、泊洛沙姆 407 1.00 g,置于烧杯中,加入 45 mL 注射用水,加热搅拌使之澄清,继续加热搅拌使温度达到 70 ℃并保持恒定,得水相。在 70 ℃恒定温度下,将油相缓慢加入到水相中并不断搅拌,加完后继续搅拌 10 min,制得初乳。初乳用超声波细胞粉碎机冰水浴探头超声 15 min(超声 2 s,间歇 2 s,功率:750 W),制得染料木素乳剂。

### 2.2 色谱条件

色谱柱:Dikma Diamonsil C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-水(60:40,V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:260 nm;柱温:35 ℃;进样量:10 μL。

### 2.3 血浆和组织样品处理

2.3.1 血浆样品处理 精密吸取 100 μL 血浆样品,置于 1.5 mL 离心管中,加入 400 μL 甲醇沉淀血浆蛋白,涡旋混合 1 min,10 000 r/min(离心半径 9.5 cm)离心 10 min,吸取全部上清液过 0.22 μm 微孔滤膜,按“2.2”项下色谱条件进样分析。

2.3.2 组织样品处理 取小鼠完整心、肝、脾、肺、肾组织后,用生理盐水洗净组织表面残血,滤纸吸干,精密称定组织样品质量后置于手动组织匀浆器中,按质量比为 1:2 加入生理盐水,手动匀浆。精密移取 100 μL 小鼠各组织(心、肝、脾、肺、肾)匀浆液,置于 1.5 mL 离心管中,加入 400 μL 甲醇沉淀组织匀浆液中血浆蛋白,涡旋混合 1 min,10 000 r/min(离心半径 9.5 cm)离心 10 min,吸取全部上清液过 0.22 μm 微孔滤膜,按“2.2”项下色谱条件进样分析。

### 2.4 方法学验证

2.4.1 专属性考察 取小鼠空白血浆、空白血浆+0.2 μg/mL 染料木素对照品溶液、静脉注射药物后 90 min 的小鼠血浆样品,按“2.3”项下方法进行处理后,再按“2.2”项下色谱条件进样分析,记录色谱图。结果,染料木素的保留时间为 10.6 min,基线噪音较小,血浆中代谢物峰及其他内源性物质均不干扰染料木素的测定。同法考察心、肝、脾、肺、肾组织中染料木素的专属性,结果均表明各组织中其他内源性物质不干扰染料木素的测定(图

略),说明本方法具有较高的专属性。色谱图见图2。

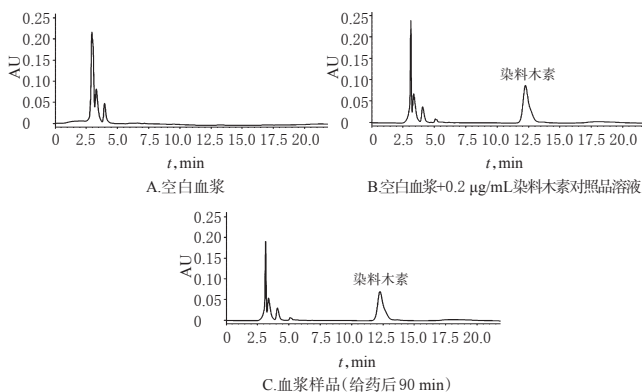


图2 高效液相色谱图  
Fig 2 HPLC chromatogram

2.4.2 线性关系考察 精密吸取小鼠空白血浆和各组织(心、肝、脾、肺、肾)匀浆液各 100 µL,依次加入不同质量浓度的染料木素对照品溶液 200 µL,使血浆和各组织匀浆液中所含染料木素的质量浓度相当于 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4、12.8 µg/mL,按“2.3”项下方法进行处理后,再按“2.2”项下色谱条件进样分析,记录峰面积。以样品中染料木素的质量浓度为横坐标(x)、峰面积为纵坐标(y),进行回归分析,求得线性回归方程。结果表明,血浆和各组织中染料木素检测质量浓度的线性范围均为 0.1~12.8 µg/mL。血浆和各组织中染料木素的线性关系考察结果见表1。

表1 血浆和各组织中染料木素的线性关系考察结果  
Tab 1 Linear range of genistein in plasma and each tissues

样品	回归方程	r	线性范围 µg/mL
血浆	$y=80\ 799x+9\ 737$	0.9991	0.1~12.8
心	$y=80\ 860x+8\ 401$	0.9992	0.1~12.8
肝	$y=73\ 245x-3\ 087$	0.9993	0.1~12.8
脾	$y=90\ 327x-1\ 473$	0.9997	0.1~12.8
肺	$y=91\ 852x+1\ 482$	0.9992	0.1~12.8
肾	$y=981\ 273x+1\ 721$	0.9994	0.1~12.8

2.4.3 检测限与定量下限考察 按 2015 年版《中国药典》(二部)<sup>[11]</sup>中关于检测限与定量下限的要求,将染料木素自线性范围的最低质量浓度 0.1 µg/mL 向下逐级稀释,按“2.2”项下色谱条件进样分析。结果显示,信噪比为 3 时染料木素的检测限为 0.03 µg/mL,信噪比为 10 时染料木素的定量下限为 0.1 µg/mL。

2.4.4 精密度试验 分别精密吸取小鼠空白血浆和各组织(心、肝、脾、肺、肾)匀浆液 100 µL,分别加入不同质量浓度的染料木素对照品溶液 200 µL,制成染料木素质量浓度分别为 0.2、1.6、10 µg/mL 的样品溶液,按“2.3”项下方法进行处理后,再按“2.2”项下色谱条件进样分析。每份样品连续进样 5 次,根据回归方程计算染料木素的浓度,考察日内精密度;连续进样 5 d 考察日间精密度,结果见表 2。

2.4.5 准确度试验和提取回收率试验 精密吸取小鼠

表2 精密度试验结果(n=5)

Tab 2 Results of precision tests (n=5)

样品	加入量, µg/mL	日内		日间	
		测得量( $\bar{x}\pm s$ ), µg/mL	RSD, %	测得量( $\bar{x}\pm s$ ), µg/mL	RSD, %
血浆	0.2	0.2±0.01	4.50	0.19±0.01	4.21
	1.6	1.57±0.03	1.91	1.58±0.07	4.43
	10	10.18±0.19	1.86	10.22±0.22	2.15
心	0.2	0.19±0.01	4.21	0.19±0.01	4.73
	1.6	1.57±0.02	1.27	1.61±0.03	1.86
	10	10.62±0.18	1.76	10.36±0.22	2.12
肝	0.2	0.21±0.01	3.33	0.21±0.01	3.81
	1.6	1.63±0.03	1.84	1.57±0.04	2.55
	10	10.17±0.21	2.06	10.02±0.26	2.59
脾	0.2	0.21±0.01	3.81	0.21±0.01	4.29
	1.6	1.59±0.04	2.52	1.63±0.05	3.07
	10	10.06±0.42	4.17	10.04±0.35	3.48
肺	0.2	0.19±0.01	3.68	0.19±0.01	4.21
	1.6	1.61±0.06	3.73	1.59±0.07	4.40
	10	9.86±0.38	3.85	9.92±0.37	3.73
肾	0.2	0.21±0.01	3.81	0.19±0.01	3.68
	1.6	1.62±0.02	1.23	1.58±0.06	3.79
	10	10.15±0.34	3.35	10.12±0.46	4.55

空白血浆和各组织(心、肝、脾、肺、肾)匀浆液各 50 µL,分别加入不同质量浓度的染料木素对照品溶液 200 µL,制备成染料木素质量浓度分别为 0.2、1.6、10 µg/mL 的样品溶液,按“2.3”项下方法进行处理后,再按“2.2”项下色谱条件进样分析,记录峰面积,每个浓度 5 个样品。另取质量浓度为 0.2、1.6、10 µg/mL 的染料木素对照品溶液,按“2.2”项下色谱条件进样分析,记录峰面积,每个浓度 5 个样品。以样品溶液测得量与加入量的比值计算准确度,以样品溶液中染料木素峰面积与相应浓度对照品溶液中染料木素峰面积之比计算提取回收率,结果见表 3。

表3 准确度和提取回收率试验结果(n=5)

Tab 3 Results of recovery and extraction recovery test (n=5)

样品	加入量, µg/mL	准确度试验			提取回收率试验		
		测得量( $\bar{x}\pm s$ ), µg/mL	准确度, %	RSD, %	对照品溶液测得量( $\bar{x}\pm s$ ), µg/ml	提取回收率, %	RSD, %
血浆	0.2	0.19±0.01	95.00	4.21	0.17±0.01	85.00	4.71
	1.6	1.64±0.06	102.50	3.66	1.25±0.08	78.13	6.40
	10	9.77±0.46	97.70	4.71	8.12±0.51	81.20	6.28
心	0.2	0.18±0.01	95.00	5.00	0.16±0.01	80.00	5.63
	1.6	1.53±0.03	95.63	1.96	1.33±0.06	83.13	4.51
	10	9.67±0.14	96.70	1.45	7.68±0.36	76.80	4.69
肝	0.2	0.19±0.01	95.00	3.68	0.16±0.01	80.00	5.00
	1.6	1.61±0.04	100.63	2.48	1.39±0.06	86.88	4.32
	10	9.78±0.14	97.80	1.43	7.69±0.43	76.90	5.59
脾	0.2	0.21±0.01	105.00	4.29	0.17±0.01	85.00	4.71
	1.6	1.54±0.07	96.25	4.55	1.22±0.08	76.25	6.57
	10	9.66±0.21	96.60	2.17	7.64±0.27	76.40	3.53
肺	0.2	0.19±0.01	95.00	4.21	0.15±0.01	75.00	4.67
	1.6	1.54±0.04	96.25	2.59	1.31±0.05	81.88	3.82
	10	9.58±0.25	95.80	2.61	7.55±0.34	75.50	4.50
肾	0.2	0.19±0.01	95.00	4.74	0.16±0.01	80.00	6.25
	1.6	1.58±0.06	98.75	3.79	1.27±0.04	79.38	3.15
	10	10.47±0.38	104.70	3.64	7.62±0.49	76.20	6.43

2.4.6 稳定性试验 按“2.4.4”项下方法操作制备染料



木素质量浓度分别为0.2、1.6、10  $\mu\text{g/mL}$  的样品溶液,各3份,考察其冻融稳定性及室温稳定性。考察冻融稳定性时,将3种质量浓度的样品溶液置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境冰冻,然后取出,室温融化,反复2次,每次冻融时间间隔24 h,第2次室温融化后按“2.3”项下方法进行处理,再按“2.2”项下色谱条件进样测定。考察室温稳定性时,将3种质量浓度的样品溶液在室温下放置8 h后,按“2.3”项下方法进行处理,再按“2.2”项下色谱条件进样测定。结果,3种质量浓度的样品溶液中染料木素浓度的RSD均小于10% ( $n=3$ ),表明样品溶液在反复冻融2次和室温放置8 h内的稳定性均符合相关要求。

### 2.5 染料木素胶束在小鼠体内的组织分布

取小鼠48只,随机分为乳剂组和胶束组,每组24只,试验前12 h禁食,不禁水,按40 mg/kg(按预实验及相关文献<sup>[12]</sup>确定)的剂量尾静脉注射染料木素乳剂或染料木素 MePEG-PLGA 共聚物胶束。分别于给药后5、30、90 min 时间点(按预实验确定)各取8只小鼠,摘眼球取血0.5 mL 置于肝素化离心管中,再断颈处死后立即解剖,取出小鼠完整心、肝、脾、肺、肾,用生理盐水洗净组织表面残血,滤纸吸干后精密称质量,按“2.3”项下方法进行处理,再按“2.2”项下色谱条件进样分析,记录峰面积,代入相应回归方程计算不同时间点小鼠血浆和各组织中染料木素的浓度。两组小鼠给药后不同时间点血浆和各组织中染料木素的浓度分布见图3。

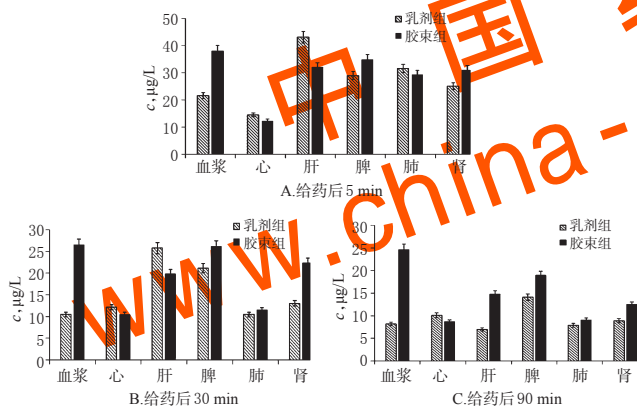


图3 两组小鼠给药后不同时间点血浆和各组织中染料木素的浓度( $n=8$ )

Fig 3 Content of genistein in plasma and each tissues of mice in 2 groups at different time points ( $n=8$ )

由图3可以看出,胶束组小鼠给药后5、30、90 min 血浆中染料木素的浓度均高于乳剂组,给药后5、30 min 肝组织中染料木素的含量均低于乳剂组,至于90 min 肝组织中染料木素的含量均高于乳剂组,可能是因为胶束在90 min 左右突然释放了药物所致,其体原因有待后续深入研究。提示染料木素 MePEG-PLGA 共聚物胶束可提高染料木素在血液中的浓度,有助于提高染料木素的治疗效果;注射后30 min 内肝中染料木素的浓度较低,有

利于降低染料木素的肝毒性。

采用3P97模型嵌合通用程序进行拟合,计算两组小鼠血浆及各组织中染料木素的 $\text{AUC}_{0-90\text{ min}}$ 和平均滞留时间(MRT),采用SPSS 17.0软件进行统计分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 $t$ 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。两组小鼠血浆和各组织中染料木素的 $\text{AUC}_{0-90\text{ min}}$ 和MRT结果见表4。

表4 两组小鼠血浆和各组织中染料木素的 $\text{AUC}_{0-90\text{ min}}$ 和MRT结果( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Tab 4  $\text{AUC}_{0-90\text{ min}}$  and MRT of genistein in plasma and each tissues of mice in 2 groups ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

样品	$\text{AUC}_{0-90\text{ min}}, \mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{g}$		MRT, min	
	乳剂组	胶束组	乳剂组	胶束组
血浆	914.54 $\pm$ 12.76	2 264.98 $\pm$ 14.05**	19.77 $\pm$ 0.14	40.32 $\pm$ 1.03**
心	1 088.46 $\pm$ 24.68	858.54 $\pm$ 2.07	16.45 $\pm$ 0.28	14.36 $\pm$ 0.06
肝	1 923.49 $\pm$ 31.49	1 312.06 $\pm$ 11.78*	17.07 $\pm$ 0.11	10.51 $\pm$ 0.02*
脾	1 635.07 $\pm$ 10.15	1 826.79 $\pm$ 21.57	9.01 $\pm$ 0.08	9.79 $\pm$ 0.01
肺	1 108.46 $\pm$ 9.37	1 288.63 $\pm$ 8.79	12.14 $\pm$ 0.15	13.79 $\pm$ 0.04
肾	1 096.83 $\pm$ 6.44	1 676.88 $\pm$ 6.33*	16.44 $\pm$ 0.16	19.38 $\pm$ 0.25

注:与乳剂组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$

Note: vs. emulsion group, \* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$

由表4结果可以看出,与染料木素乳剂比较,染料木素 MePEG-PLGA 共聚物胶束可显著增加染料木素在血浆中的 $\text{AUC}_{0-90\text{ min}}$ ,显著延长其MRT;可显著减少染料木素在肝组织中的 $\text{AUC}_{0-90\text{ min}}$ ,显著缩短其MRT( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

血液样品含有大量的蛋白质,直接进样会使色谱柱阻塞,柱压升高,因此需要进行适当的前处理去除蛋白。目前常用的方法有蛋白沉淀法(PPT)、液-液萃取法(LLE)、固相萃取法(SPE)等。笔者首先尝试使用甲醇和乙腈作为沉淀试剂的PPT法,发现使用甲醇作为沉淀剂可得到较好效果,并且PPT法简单易行,因此选择甲醇作为沉淀剂去除蛋白质。由于国内外尚无染料木素注射制剂上市,且染料木素在水中几乎不溶,无法直接溶解在生理盐水中进行大鼠的尾静脉注射,根据参比制剂选择原则,实验中将染料木素制成乳剂作为参比制剂与染料木素 MePEG-PLGA 共聚物胶束进行比较。

普通纳米载药系统静脉注射进入体内后易被单核巨噬系统(MPS)中的巨噬细胞快速识别并吞噬,肝和脾是MPS丰盈的器官,因而普通纳米制剂大多天然靶向这些器官,而对治疗非MPS部位组织器官疾病疗效则显著降低。聚合物胶束是一种由两亲嵌段共聚物在适当条件下自发形成的核-壳纳米载体,其中疏水嵌段构成内核,亲水嵌段形成外壳,这样的胶束结构不仅可以很好地分散在水介质中,而且其内核可为脂溶性的药物提供疏水微环境,因此将染料木素制备为胶束可有效改善其溶解度。同时胶束具有长循环性,其亲水性和柔韧性外壳与纳米级的粒径能够有效减少与免疫球蛋白的作用,防止微粒聚集,可大大降低胶束被识别并被吞噬的机会,提高其在非MPS中的分布,延长载药系统在血液循

# 丹皮酚对强直性脊柱炎模型小鼠 Wnt 和 BMP/Smad 信号转导通路的影响<sup>Δ</sup>

吴琪<sup>1\*</sup>, 吴倩<sup>2</sup>, 周晓红<sup>3</sup>, 吴玲慧<sup>4</sup> (1.湖北中医药大学临床技能实训中心, 武汉 430061; 2.上海市东方医院南院血液透析室, 上海 200123; 3.湖北中医药大学针灸骨伤学院, 武汉 430061; 4.咸宁市妇幼保健院儿童保健中心计划免疫科, 湖北咸宁 437000)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)11-1500-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.11.15

**摘要** 目的:研究丹皮酚对强直性脊柱炎(AS)模型小鼠分泌型糖蛋白(Wnt)和骨形态发生蛋白(BMP)/细胞信号转导分子(Smad)通路的影响,探讨丹皮酚防治AS的机制。方法:将40只小鼠随机分为正常组、模型组、柳氮磺吡啶组(阳性对照,9 mg/kg)和丹皮酚组(3 mg/kg),每组10只。除正常组外的其余各组小鼠均采用完全弗氏佐剂+蛋白聚糖腹腔注射法复制AS模型。各给药组小鼠在成模后灌胃相应药物,正常组和模型组小鼠灌胃等体积蒸馏水,每天给药1次,连续20 d。末次给药后处死小鼠,透射电镜下观察各组小鼠骶髂关节滑膜细胞超微病理结构变化,采用酶联免疫吸附法检测小鼠血清中肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、Wnt信号通路病理性骨化相关因子(DKK-1)含量,实时荧光定量聚合酶链式反应法检测小鼠滑膜组织中骨形态发生蛋白2(BMP-2)、细胞内核心结合因子 $\alpha$ 1(Cbfa1)、Smad1 mRNA表达。结果:与正常组比较,模型组小鼠血清中TNF- $\alpha$ 含量明显增加、DKK-1含量明显减少,滑膜组织中BMP-2、Cbfa1和Smad1 mRNA表达水平明显升高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ );电镜下可见模型组小鼠滑膜细胞增生,排列紊乱,分泌活性细胞器分泌亢进,细胞间隙增宽。与模型组比较,柳氮磺吡啶组和丹皮酚组小鼠血清中TNF- $\alpha$ 含量均明显减少,丹皮酚组小鼠血清中DKK-1含量明显增加,滑膜组织中BMP-2、Cbfa1和Smad1 mRNA表达水平明显降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ );电镜下可见丹皮酚组小鼠滑膜细胞线粒体、溶酶体、粗面内质网的形态明显改善。结论:丹皮酚防治AS的机制可能与降低血清中TNF- $\alpha$ 含量、升高血清中DKK-1含量,下调滑膜细胞中BMP-2、Cbfa1和Smad1 mRNA表达,抑制Wnt和BMP/Smad骨化相关信号转导通路逆转滑膜细胞成骨分化有关。

**关键词** 丹皮酚;强直性脊柱炎;分泌型糖蛋白;骨形态发生蛋白/细胞信号转导分子;小鼠

环中的滞留时间,有效提高其生物利用度。

染料木素 MePEG-PLGA 共聚物胶束增加了药物在血浆中的蓄积量而降低了在肝中的蓄积量,其原因可能在于 MePEG-PLGA 共聚物胶束的亲水外壳可以使胶束体系在一定程度上避免某些器管网状内皮系统的识别和摄取。本研究有望为染料木素的临床应用提供一种疗效更佳、更安全的新制剂。

## 参考文献

- [1] LAI WX, YANG YJ, CUI L. Research progress of anti-osteoporotic effects of genistein[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2016, 32(10):1345-1348.
- [2] ZHENG X, LEE S, CHUN OK. Soy isoflavones and osteoporotic bone loss: a review with an emphasis on modulation of bone remodeling[J]. *J Med Food*, 2016, 19(1):1-6.
- [3] 苏文, 刘艳平, 李忠魁, 等. 染料木素诱导人胃癌 BGC-823 细胞凋亡及其分子机制的研究[J]. *中草药*, 2007, 38(6): 874-878.
- [4] 郑秋玲, 聂少平, 李文娟, 等. 染料木素对人宫颈癌细胞株 HeLa 增殖的影响[J]. *中国药理学通报*, 2013, 29(11):

- [5] SIMONS AL, RENOUF M, MURPHY PA, et al. Greater apparent absorption of flavonoids is associated with lesser human fecal flavonoid disappearance rates[J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(1):141-144.
- [6] 赖文秀, 杨亚军, 崔燎. 染料木素抗骨质疏松研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(10):1345-1348.
- [7] 孟庆杰, 包琳琳, 潘五九, 等. 染料木素固体分散体的制备及其性质研究[J]. *中国药房*, 2016, 27(10):1406-1408.
- [8] 何礼, 韩瑞伟, 唐晓飞, 等. 正交设计联用星点设计-效应面法优化染料木素胶束的制备处方[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(22):12-16.
- [9] 何礼, 韩瑞伟, 唐晓飞, 等. 染料木素胶束的体外释药研究[J]. *中国药房*, 2012, 23(17):223-225.
- [10] 何礼, 韩瑞伟, 唐晓飞, 等. 染料木素 MePEG-PLGA 共聚物胶束的制备及其药动学研究[J]. *中国现代应用药学杂志*, 2012, 29(6):477-482.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:二部[S]. 2015年版. 北京:中国医药科技出版社, 2015:556-557.
- [12] 白永涛, 文红梅, 彭彬, 等. UPLC法测定大鼠血浆中染料木素浓度及其药代动力学参数[J]. *中药新药与临床药理*, 2010, 21(5):512-514.

<sup>Δ</sup> 基金项目:湖北省教育厅科学研究计划资助项目(No. Q20162011)

\*高级实验师, 博士。研究方向:骨关节病的中医药防治。电话:027-68889070。E-mail:wuqi111@163.com

(收稿日期:2017-11-22 修回日期:2018-04-08)

(编辑:邹丽娟)