

姜黄素固体脂质纳米粒干粉吸入剂的体外释药、体内急性毒性及对哮喘模型小鼠炎症反应的影响[△]

李楠*,李旭,刘伟伟,李锡晶,刘洪斌[#](天津市医药科学研究所,天津 300020)

中图分类号 R943;R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)03-0332-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.03.11

摘要 目的:研究姜黄素(Cur)固体脂质纳米粒(SLN)干粉吸入剂(DPI)的体外释药性能、小鼠体内急性毒性及对哮喘模型小鼠炎症反应的影响。方法:采用喷雾干燥法将微乳法制备的Cur-SLN混悬液微粉化后与乳糖(200目)等充分混匀制成Cur-SLN-DPI。采用动态膜透析法考察体外释药情况,比较Cur原料药、Cur-SLN、Cur-SLN-DPI分别在3种释放介质[含1.0%十二烷基硫酸钠(SDS)的磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4)、含0.2%聚山梨酯80的PBS(pH 7.4)、生理盐水-20%乙醇溶液]中释放5、15、30 min和1、1.5、3、6、8、12、18、24、36、48 h的释放曲线,并筛选合适的释药模型。按急性毒性试验要求考察尾静脉注射最大剂量2 000 mg/kg Cur-SLN-DPI对KM小鼠的影响。将KM小鼠随机分为正常对照组、模型组、阳性药物组(布地奈德3 mg)和Cur-SLN-DPI高、低剂量组(100、50 mg/kg),每组7只,以卵蛋白(OVA)为致敏原复制哮喘模型,每周1、3、5雾化OVA激发哮喘前30 min雾化给药,连续3周。末次激发24 h内,计数肺泡灌洗液(BALF)中白细胞总数、淋巴细胞数、中性粒细胞数和嗜酸性粒细胞数,观察支气管和肺组织的病理学变化。结果:与Cur原料药比较,Cur-SLN和Cur-SLN-DPI均具有缓释作用,且Cur-SLN-DPI在3种释放介质中的缓释更平稳,释药特征均符合Weibull模型。尾静脉注射2 000 mg/kg Cur-SLN-DPI对小鼠无明显的急性毒性。与正常对照组比较,模型组小鼠BALF中白细胞总数、淋巴细胞数、中性粒细胞数、嗜酸性粒细胞数均明显增加($P < 0.01$),支气管黏膜上皮被覆假复层纤毛柱状细胞,周围炎症细胞浸润严重,肺淤血,中度间质性肺炎;与模型组比较,各给药组小鼠BALF中上述细胞数均明显降低($P < 0.01$),Cur-SLN-DPI低、高剂量组小鼠气管病变均改善,肺部淤血减轻,且高剂量组减轻更明显。结论:Cur-SLN-DPI具有体外缓释作用,对小鼠无明显急性毒性,可改善哮喘模型小鼠的气管炎症反应和肺部淤血程度。

关键词 姜黄素;固体脂质纳米粒;干粉吸入剂;体外释药性能;急性毒性;抗炎;小鼠

Drug Release *in vitro* and Acute Toxicity *in vivo* of Curcumin Solid Lipid Nanoparticles Dry Powder Inhaler and Its Effects on Inflammatory Response in Asthmatic Model Mice

LI Nan, LI Xu, LIU Weiwei, LI Xijing, LIU Hongbin (Tianjin Institute of Pharmaceutical Science, Tianjin 300020, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study *in vitro* drug release and acute toxicity *in vivo* of Curcumin (Cur) solid lipid nanoparticles (SLN) dry powder inhaler (DPI) and its effects of inflammatory response in asthmatic model mice. **METHODS:** Cur-SLN-DPI was obtained with spray-drying method by micronizing the Cur-SLN suspension prepared by the microemulsion method and thoroughly mixing with lactose (200 mesh) etc. The drug release *in vitro* was investigated by dynamic membrane dialysis. Accumulative release rates (Q) of Cur raw material, Cur-SLN and Cur-SLN-DPI in 3 kinds of release mediums [phosphate buffer solution (PBS, pH 7.4) containing 1.0% sodium dodecyl sulfate (SDS), PBS (pH 7.4) containing 0.2% tween 80, normal saline-20% ethanol solution] were compared 5, 15, 30 min and 1, 1.5, 3, 6, 8, 12, 18, 24, 36, 48 h after releasing. Drug release model was fitted. The effects of intravenous injection of maximal dose 2 000 mg/kg Cur-SLN-DPI via tail vein on KM mice were investigated by acute toxicity test. KM mice were randomly divided into normal control group, model group, positive drug group (budesonide 3 mg), Cur-SLN-DPI high-dose and low-dose groups (100, 50 mg/kg), with 7 mice in each group. The ovalbumin (OVA) was used as sensitizer to induce asthma model; the model mice were given relevant medicine with aerosol administration 30 min before aerosol administration of OVA inducing asthma on Monday, Wednesday and Friday per week, for consecutive 3 weeks. Within 24 h after last induction, total number of leukocyte, the number of lymphocyte, neutrophil and eosinophil were counted in broncho alveolar lavage fluid (BALF); the pathological changes of bronchus and lung tissue were observed. **RESULTS:** Compared with Cur raw material, Cur-SLN and Cur-SLN-DPI showed good sustained-release effect, and Cur-SLN-DPI had more stable sustained release in 3 kinds of release mediums. The characteristics of drug release conformed to the Weibull model. Intravenous injection of 2 000 mg/kg Cur-SLN-DPI via tail vein had no significant acute toxicity in mice. Compared with normal control group, total number of leukocyte, the number of lymphocyte, neutrophil and

[△] 基金项目:天津市自然科学基金资助项目(No.18JCQNJC13500)

* 硕士研究生。研究方向:纳米给药系统。电话:022-27235075。

E-mail:coco10190286@sina.com

[#] 通信作者:研究员,硕士生导师,博士。研究方向:肝胆胰外科疾病的中西医结合药理学。电话:022-27313851。E-mail:jtss@sina.com

eosinophil were increased significantly ($P<0.01$); bronchial mucosal epithelium was covered with pseudostratified ciliated columnar cells, with severe infiltration of inflammatory cells, pulmonary congestion and moderate interstitial pneumonia. Compared with model group, the number of above cells in BALF of mice were decreased significantly in administration group ($P<0.01$); tracheal lesions of mice were improved in Cur-SLN-DPI low-dose and high-dose groups; pulmonary congestion of them were alleviated, and that of high-dose group was alleviated more significantly. CONCLUSIONS: Cur-SLN-DPI shows sustained-release effect *in vitro* and has no obvious acute toxicity to mice. Cur-SLN-DPI can improve the inflammatory response of the airway and the degree of pulmonary congestion in asthmatic model mice.

KEYWORDS Curcumin; Solid lipid nanoparticles; Dry powder inhaler; Release properties *in vitro*; Acute toxicity; Anti-inflammation; Mice

支气管哮喘(以下简称“哮喘”)是由多种细胞包括气道的炎性细胞、结构细胞和细胞组分(Cellular elements)参与的气道慢性过敏反应炎症性疾病,以反复发作性的喘息、气急、胸闷或咳嗽为特征^[1-2]。治疗哮喘的药物可分为控制药物和缓解药物。控制药物是需长期每天使用的药物,主要通过抗炎作用使哮喘维持在临床控制状态,如吸入糖皮质激素、长效 β_2 受体激动药(LABA,需与吸入激素联合应用)、缓释茶碱和色甘酸钠等。缓解药物是通过迅速解除支气管痉挛从而缓解哮喘症状的药物^[3]。糖皮质激素因其有效的抗炎作用^[4],成为治疗哮喘的首选药物,其给药途径包括吸入、口服和静脉应用等^[5],但长期应用可出现明显的甚至是不可逆的副作用。还有部分哮喘患者对激素不敏感,出现糖皮质激素抵抗现象^[6]。

姜黄素(Curcumin, Cur)是一种已知的具有多种药理活性的多酚类化合物,毒性低、不良反应少^[7]。体外试验发现, Cur可抑制淋巴细胞过敏性炎症细胞因子反应;体内动物实验表明,其在以结构改变和气道重塑为特征的慢性哮喘小鼠模型中是有效的。有研究表明 Cur可以减轻哮喘的病理变化及口咽部念珠球菌病(OPC)的风险,且可有效抑制哮喘模型小鼠气道高反应性和T辅助细胞因子[如白细胞介素4(IL-4)、IL-5和IL-13]的水平^[8-10];鼻内给予 Cur可防止炎症细胞向气道积聚、平滑肌结构改变和与慢性哮喘相关的气道重塑,如支气管周围和气道平滑肌增厚、上皮衬里脱落和卵蛋白(OVA)诱导的慢性哮喘模型小鼠的黏液分泌^[11]。提示 Cur可能对治疗慢性哮喘和降低 OPC的发生具有潜在影响。

Cur的生物利用度极低且难溶于水,在中性和碱性环境中易水解^[12],因此如何提高其溶解度、生物利用度和体内稳定性成为提高 Cur等难溶性药物临床应用效果的关键。前期笔者采用微乳法制备了 Cur固体脂质纳米粒(Cur-SLN),又将其微粉化后与乳糖等混匀,即得 Cur-SLN干粉吸入剂(Cur-SLN-DPI)。经测定其平均粒径为 $3.35\ \mu\text{m}$ 、临界相对湿度为70%、休止角为 24.03° 、水分为4.57%、主药含量为100.13%、含量均匀度为3.647、排空率为95.17%、体外有效部位沉积率为28.73%^[13-15]。本研究在前期明确制备 Cur-SLN-DPI工艺的基础上,对 DPI的体外释药性能、在小鼠体内的急性

毒性反应及其对哮喘模型小鼠炎症反应的影响进行初步研究,以期 Cur-SLN-DPI的临床应用提供依据。

1 材料

1.1 仪器

LC-2010 高效液相色谱仪(日本岛津公司); XW-80A 涡旋混合仪(上海医科大学仪器厂); RE-5285A 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); HWS-24 电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司); XW-80A 定时恒温磁力搅拌器(上海沪西分析仪器厂); RC12AD 智能溶出度仪(天津市天大天发科技有限公司); YC-015 实验型喷雾干燥机(上海雅程仪器设备有限公司); 胶囊型干粉吸入器(上海信谊天平药业有限公司); PHS-3C 精密 pH 计(上海精密科学仪器有限公司); JWC-201D 超声雾化器(鞍山市同信医用仪器); MEK-6318K 全自动血细胞分析仪(日本光电工业株式会社); Nikon Ci-L 显微镜(日本尼康仪器有限公司); HMIAS-2000 高清晰度数码显微图像分析系统(北京利金阳科技发展有限公司)。

1.2 药品与试剂

Cur 对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110823-201004,纯度:99.0%); Cur 原料药(陕西森弗天然制品有限公司,批号:JHS170807,纯度:95.0%); 硬脂酸、无水乙醇(天津市化学试剂批发公司,批号:20170802、20170310); 聚山梨酯 80(天津市光复精细化工研究所,批号:20160510); 乳糖(山西百威昂药业有限公司,批号:10564845); OVA(国药集团化学试剂有限公司,批号:20161025,蛋白质含量: $\geq 80.0\%$); 吸入用布地奈德混悬液(澳大利亚阿斯利康公司,批号:LOT322573,规格:2 mL:1 mg); 十二烷基硫酸钠(SDS,天津市化学试剂供销公司,批号:170422); 磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氢氧化钠等试剂均为分析纯。

1.3 动物

SPF 级 KM 小鼠, δ , 4~6 周龄, 体质量 20~22 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK(京)2016-0011, 动物购入后, 适应性饲养 1 周后用于实验, 本实验通过天津市医药科学研究所实验动物伦理审查委员会同意。

2 方法与结果

2.1 Cur-SLN-DPI的制备

称取过200目筛的处方量Cur,加入硬脂酸于65℃融化;加适量相同温度的质量比为1:4的聚山梨酯80-乙醇溶液及蒸馏水,涡旋1min即得Cur微乳。在电磁搅拌下(1000 r/min)将热微乳以1滴/5s的速度滴入2℃温度的冷水中,当微乳全部加入后继续以2℃保温搅拌15min,即得Cur-SLN。用喷雾干燥法将其制成Cur-SLN干粉,采用等量递增法与乳糖等充分混匀后灌装于4号胶囊,即得Cur-SLN-DPI,经测Cur含量约6.47%(m/m)。

2.2 体外释放研究

2.2.1 色谱条件 色谱柱:迪马C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-5%醋酸(55:45, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:426 nm;柱温:35℃;进样量:20 μL。

2.2.2 溶液的制备 ①Cur对照品溶液:取Cur对照品适量,甲醇定容配制质量浓度为7.92 mg/mL的对照品溶液。②释放介质1:制备含1.0%SDS的磷酸盐缓冲液(PBS),pH为7.4。③释放介质2:制备含0.2%聚山梨酯80的PBS,pH为7.4。④释放介质3:制备生理盐水-20%乙醇溶液。

2.2.3 方法学考察 按方法学相关操作进行考察,结果显示,空白释放液对Cur的测定无干扰;Cur的峰面积(A)与质量浓度(c, μg/mL)的回归方程为: $A=85\ 922c-4\ 179.6(R^2=0.999\ 3)$,Cur质量浓度在0.396~7.92 μg/mL范围内与峰面积呈良好的线性关系;准确度试验中平均回收率为99.88%(n=3);精密度试验中峰面积的RSD=0.85%(n=5);24 h稳定性试验中峰面积的RSD=0.36%(n=5);重复性试验中Cur含量的RSD=1.26%(n=5)。

2.2.4 体外Cur释放测定 采用动态膜透析法来评价SLN的体外释放曲线^[6],按照2015年版《中国药典》(四部)溶出度与释放度测定方法(通则0931第二法浆法)^[7],测定Cur原料药、Cur-SLN混悬液及Cur-SLN-DPI的体外释放度。取5 mL Cur-SLN(含Cur约2 mg)、2 mg Cur原料药分散到5 mL甲醇中,另取Cur-SLN-DPI(含Cur约2 mg),分别分散到溶出介质中。分别将其置于预先处理好的透析袋内,两端封口,分别投入至“2.2.2”项下3种释放介质中,平行操作3份。释放介质体积为900 mL,设定转速为(50±1) r/min,温度为(37±0.5)℃。分别于释放5、15、30 min和1、1.5、3、6、8、12、18、24、36、48 h各取出5 mL释放介质,并以37℃保温的释放介质同体积补液保持恒定的释放体积。取出液经0.45 μm微孔滤膜过滤后,取续滤液20 μL,进样测定,计算Cur累积释放度,绘制释放曲线。3种样品在不同释放介质中的释放曲线见图1。

由图1结果显示,释放介质1、2、3中Cur原料药均释放较快,12 h均已完全释放,累积释放度分别为97.16%、

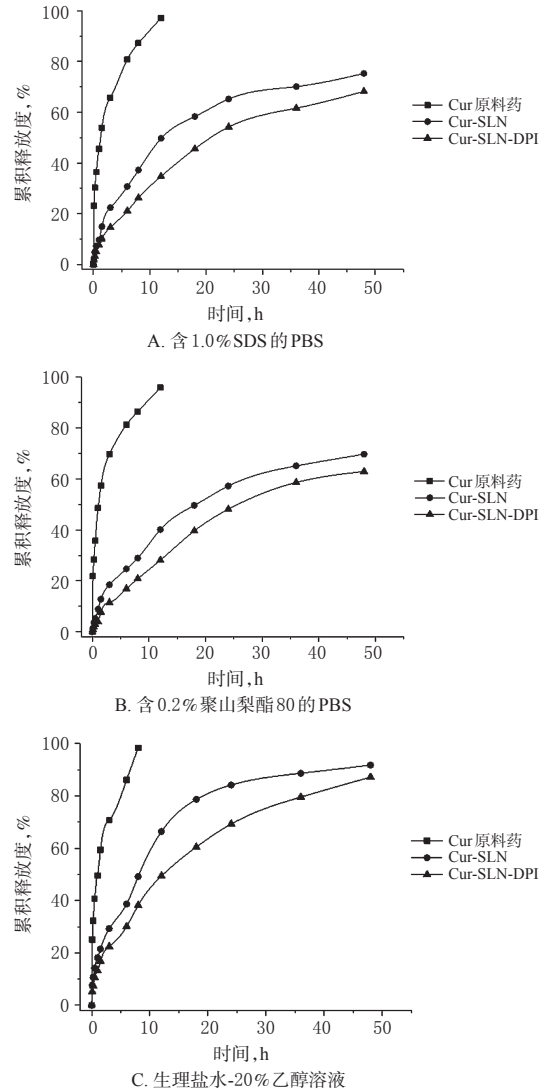


图1 3种样品在不同释放介质中的释放曲线(n=3)
Fig 1 Release curve of 3 kinds of samples in different release medium(n=3)

95.81%、98.37%;Cur-SLN 12 h的累积释放度分别为49.71%、40.13%、66.47%,Cur-SLN-DPI 12 h内的累积释放度分别为34.72%、28.11%、49.41%。此外Cur-SLN和Cur-SLN-DPI前期药物释放均较快,1 h的累积释放度分别为9.67%、8.90%、18.20%和7.57%、3.89%、13.21%,均出现突释现象,随后Cur-SLN-DPI缓释更平稳,猜测可能是Cur-SLN固化后与乳糖混合,阻止药物的扩散,提示Cur-SLN固化后制备成DPI能明显降低Cur原料药的缓释速率。

2.2.5 释药模型 对Cur-SLN-DPI在3种释放介质中的累积释药曲线分别以零级动力学方程、一级动力学方程、Higuchi方程和Weibull方程进行拟合,筛选合适的释药模型,Q为累积释放度,t为释放时间,R²越接近1表明拟合效果越好。Cur-SLN-DPI在不同释放介质中的释药模型拟合结果见表1。

由表1结果可见,三种释放介质中Weibull模型拟合度最高(分别是R²=0.997 7、0.997 5、0.996 3),可见

表1 Cur-SLN-DPI在不同释放介质中的释药模型拟合结果

Tab 1 Fitted drug release model of Cur-SLN-DPI in different release medium

释放介质	释药模型	拟合结果	R ²
含1.0%SDS的PBS	零级动力学	$Q=1.4944t+8.3807$	0.9123
	一级动力学	$\ln(1-Q)=-70.8975-0.0596t$	0.9918
	Higuchi	$Q=10.5771t^{1/2}-2.1154$	0.9922
	Weibull	$\ln\ln[1/(1-Q)]=0.0421\ln t+81.7840$	0.9977
含0.2%聚山梨酯80的PBS	零级动力学	$Q=1.4223t+5.6050$	0.9358
	一级动力学	$\ln(1-Q)=-71.7875-0.0451t$	0.9962
	Higuchi	$Q=9.9129t^{1/2}-3.9865$	0.9871
	Weibull	$\ln\ln[1/(1-Q)]=0.0424\ln t+73.0797$	0.9975
生理盐水-20%乙醇溶液	零级动力学	$Q=1.8389t+14.2017$	0.8944
	一级动力学	$\ln(1-Q)=-85.8787-0.0750t$	0.9751
	Higuchi	$Q=13.1520t^{1/2}-0.9321$	0.9933
	Weibull	$\ln\ln[1/(1-Q)]=0.0283\ln t+124.8730$	0.9963

Cur-SLN-DPI的体外释放过程更符合Weibull模型。

2.3 小鼠急性毒性试验

2.3.1 分组 小鼠适应性喂养3 d,隔夜禁食后,随机分成3组,即正常对照(KS)组、空白固体脂质纳米粒干粉(KN)组和Cur-SLN-DPI组,每组13只,10只为正式观察动物,3只为备用动物。

2.3.2 给药 KS组小鼠尾静脉注射生理盐水。KN组

小鼠采用急性毒性试验方法中的最大给药量法给予KN生理盐水溶液,浓度为80 mg/mL,尾静脉注射25 mL/kg。Cur-SLN-DPI组小鼠按照急性毒性试验方法中序贯法^[18]规定限度试验进行,因为限度剂量为2 000 mg/kg,所以将Cur-SLN-DPI配制成80 mg/mL的溶液,尾静脉注射25 mL/kg。单次给药,连续观察14 d。

2.3.3 死亡情况与一般状态 各组小鼠注射即刻未见小鼠死亡,KN组小鼠注射后自发活动、梳理毛发活动与KS组无差异,而Cur-SLN-DPI组小鼠则出现自发活动、梳理毛发活动明显减少,多为俯卧状态,部分小鼠出现行动迟缓、进食量明显减少的情况。注射2 h~14 d期间,各组小鼠均未见死亡,且Cur-SLN-DPI组小鼠注射即刻出现的不良反应于注射4 h后逐渐减轻,24 h后完全消失。

2.3.4 体质量及其增长率 分别称量各组小鼠给药前和给药后3、7、14 d的体质量并记录进行t检验。结果显示,给药前和给药后3 d,各组小鼠体质量差异均无统计学意义($P>0.05$);给药后7 d,与KS组比较,Cur-SLN-DPI组小鼠体质量及其增长率均明显降低($P<0.05$);给药后14 d,Cur-SLN-DPI组小鼠体质量恢复正常,与KN组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。各组小鼠不同时间的体质量变化结果见表2。

表2 各组小鼠不同时间的体质量变化结果($\bar{x}\pm s, n=10$)

Tab 2 Results of changes in body weight of mice in each group at different time points($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	给药前体质量,g	给药后3 d		给药后7 d		给药后14 d	
		体质量,g	增长率,%	体质量,g	增长率,%	体质量,g	增长率,%
KS组	20.686±0.527	27.457±0.934	32.756±3.828	33.020±1.325	59.269±6.347	38.030±2.054	83.469±10.550
KN组	20.600±0.513	27.960±1.514	35.666±4.908	32.936±1.503	59.954±6.049	36.836±1.922	78.961±9.802
Cur-SLN-DPI组	20.779±0.503	27.042±1.219	30.793±5.128	31.020±2.228*	50.402±9.805*	36.320±2.573	76.082±10.867

注:与KS组比较,* $P<0.05$

Note: vs. KS group, * $P<0.05$

2.3.5 脏器观察 给药后14 d,处死小鼠,取心、肝、肺、肾和脾脏,肉眼观察各组小鼠脏器体积、颜色、质地均正常;光学显微镜下观察苏木精-伊红(HE)染色切片显示,与KS组比较,Cur-SLN-DPI组和KN组小鼠脏器均未见明显异常。3组小鼠不同脏器的病理图见图2。

2.4 改善哮喘小鼠炎症反应

2.4.1 分组 小鼠适应性喂养3 d,隔夜禁食后,按体质量随机分为5组,即正常对照组、模型组、阳性药物组(吸入布地奈德混悬液)和Cur-SLN-DPI高、低剂量组,每组10只。

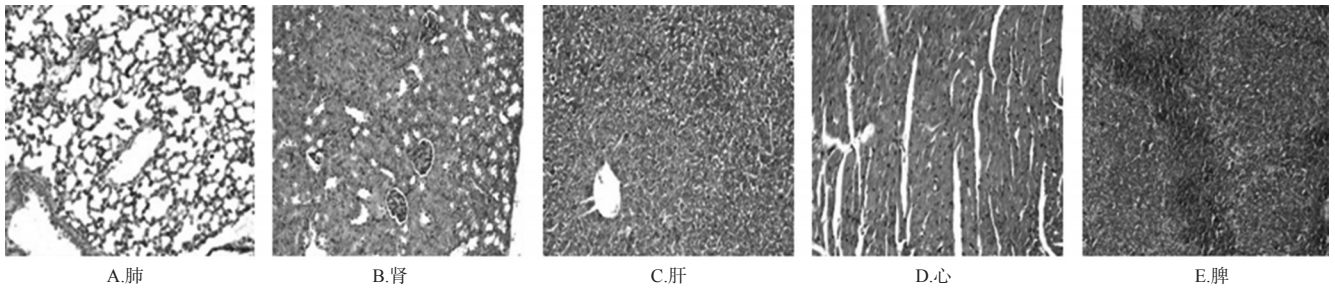
2.4.2 造模与给药 除正常对照组小鼠腹腔注射0.5 mL pH 7.4的PBS外,其他4组小鼠均于造模第1、7、14天腹腔注射0.2 mL pH 7.4的PBS(含OVA 20 μg及氢氧化铝凝胶2 mg)致敏,从第21天起,除正常对照组小鼠单独用等量pH 7.4的PBS雾化外,其余各组小鼠均采用2.5%OVA溶液雾化吸入激发哮喘发作(1.5 mL/min,30 min/次,每周1、3、5给药,连续3周),每次OVA雾化前30 min,各组小鼠雾化吸入相应药物,阳性药物组吸入布

地奈德6 mL(每周1、3、5给药,连续3周);Cur-SLN-DPI高、低剂量组吸入Cur-SLN-DPI 100、50 mg/kg(每周1、3、5给药,连续3周),给药剂量均按预实验结果设置。

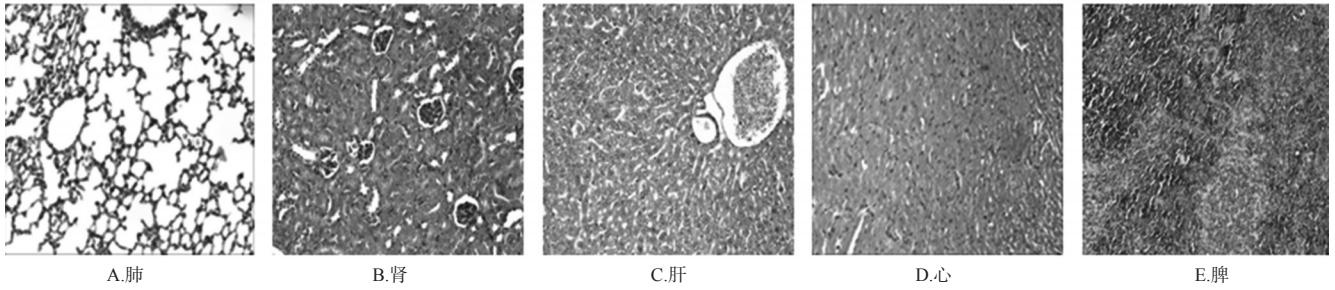
2.4.3 支气管肺泡灌洗液(BALF)白细胞分类计数 各组小鼠于末次雾化激发24 h内,放血处死小鼠,收集血液,气管插管后以0.8 mL PBS进行肺泡灌洗,重复3次,合并3次BALF,3 000 r/min离心10 min,收集上清液,沉淀加1 mL PBS重悬,采用全自动血细胞分析仪进行白细胞分类计数。单因素方差分析结果显示,与正常对照组比较,模型组小鼠BALF中白细胞总数、淋巴细胞数、中性粒细胞数、嗜酸性粒细胞数均明显增加($P<0.01$),说明模型建立成功。与模型组比较,各给药组小鼠BALF中白细胞总数、嗜酸性粒细胞数、中性粒细胞数、淋巴细胞数均明显减少($P<0.01$),其中以Cur-SLN-DPI高剂量组效果最佳。各组小鼠BALF中炎症细胞计数结果见表3。

2.4.4 支气管及肺组织病理变化 取支气管和肺组织10%中性福尔马林中固定,常规脱水、透明、浸蜡、包埋

KS组:



KN组:



Cur-SLN-DPI组:

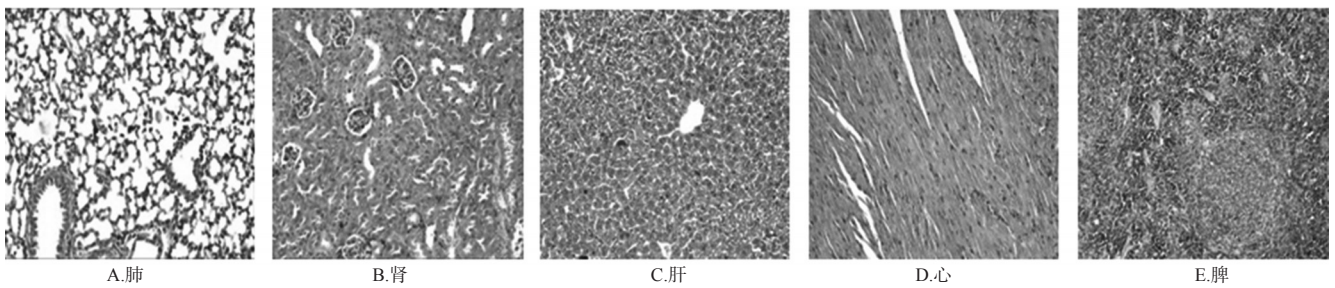


图2 3组小鼠不同脏器的病理图(HE, ×100)

Fig 2 Pathological charts of different organs of mice in 3 groups(HE, ×100)

表3 各组小鼠BALF中炎症细胞计数结果($\bar{x} \pm s, \times 10^9 L^{-1}$)

Tab 3 The number of inflammatory cells in BALF of mice in each group($\bar{x} \pm s, \times 10^9 L^{-1}$)

组别	n	白细胞总数	淋巴细胞数	中性粒细胞数	嗜酸性粒细胞数
正常对照组	7	4.557 ± 1.852	2.771 ± 1.588	0.114 ± 0.038	1.671 ± 0.618
模型组	7	26.371 ± 4.455**	16.91 ± 2.910**	0.771 ± 0.160**	8.657 ± 4.946**
Cur-SLN-DPI高剂量组	10	6.970 ± 4.705 ^{ΔΔ}	5.610 ± 3.887 ^{ΔΔ}	0.180 ± 0.162 ^{ΔΔ}	1.180 ± 0.951 ^{ΔΔ}
Cur-SLN-DPI低剂量组	10	9.827 ± 5.200 ^{ΔΔ}	7.490 ± 3.867 ^{ΔΔ}	0.270 ± 0.164 ^{ΔΔ}	2.100 ± 1.405 ^{ΔΔ}
阳性药物组	9	13.956 ± 8.166 ^{ΔΔ}	9.856 ± 6.053 ^{ΔΔ}	0.389 ± 0.169 ^{ΔΔ}	3.722 ± 2.041 ^{ΔΔ}

注:与对照组比较, ** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$

Note: vs. normal control group, ** $P < 0.01$; vs. model group, $\Delta\Delta P < 0.01$

后切片,切片厚度为4 μm,石蜡切片脱蜡至水,HE染色观察各组小鼠支气管和肺组织的病理变化。结果显示,与正常对照组比较,模型组小鼠支气管黏膜上皮被覆假复层纤毛柱状细胞变性,脱落,缺失;肺内支气管黏膜上皮被覆假复层纤毛柱状细胞均可见变性,脱落,血管充盈,周围大量炎性细胞(淋巴细胞为主)浸润严重;肺淤血,中度间质性肺炎。Cur-SLN-DPI低剂量组小鼠支气管细胞变性轻微,黏膜下少量炎性细胞(淋巴细胞为主)浸润;肺淤血,轻度间质性肺炎。Cur-SLN-DPI高剂量组

小鼠气管病变改善与Cur-SLN-DPI低剂量相近,肺部淤血较低剂量减轻。各组小鼠气管和肺组织的病理图见图3。

3 讨论

缓释制剂的体外释放度是指在介质中释放药物的程度,其在体内的释药速度和释药规律直接影响药物疗效。为模拟生物体内的释放条件,通常选择pH为7.4的PBS或生理盐水作为释放介质,但Cur难溶于水,无法满足体外释放要求的漏槽条件,故本研究在释放介质中加入了表面活性剂,促进其在介质中的溶解度满足漏槽条件。同时由于Cur在碱性条件下稳定性差,笔者通过前期预试验观察发现Cur在生理盐水-20%乙醇溶液中能保持72 h内稳定,因此选择配制生理盐水-20%乙醇溶液作为第3种释放介质,即可满足稳定性又能满足漏槽条件。本研究结果显示,Cur-SLN和Cur-SLN-DPI均存在突释和缓释阶段,突释阶段主要是来自于SLN制备过程中溶液中的游离药物分子和吸附在纳米粒表面的游离药物脱吸附产生的共同效应,而在生理盐水-20%乙醇溶液中表现出更大的突释范围是由于相较于表面活性剂,Cur更易溶于乙醇。缓释阶段纳米粒的释放趋于平缓,将SLN固化制成DPI具有更好的缓释性能,此阶

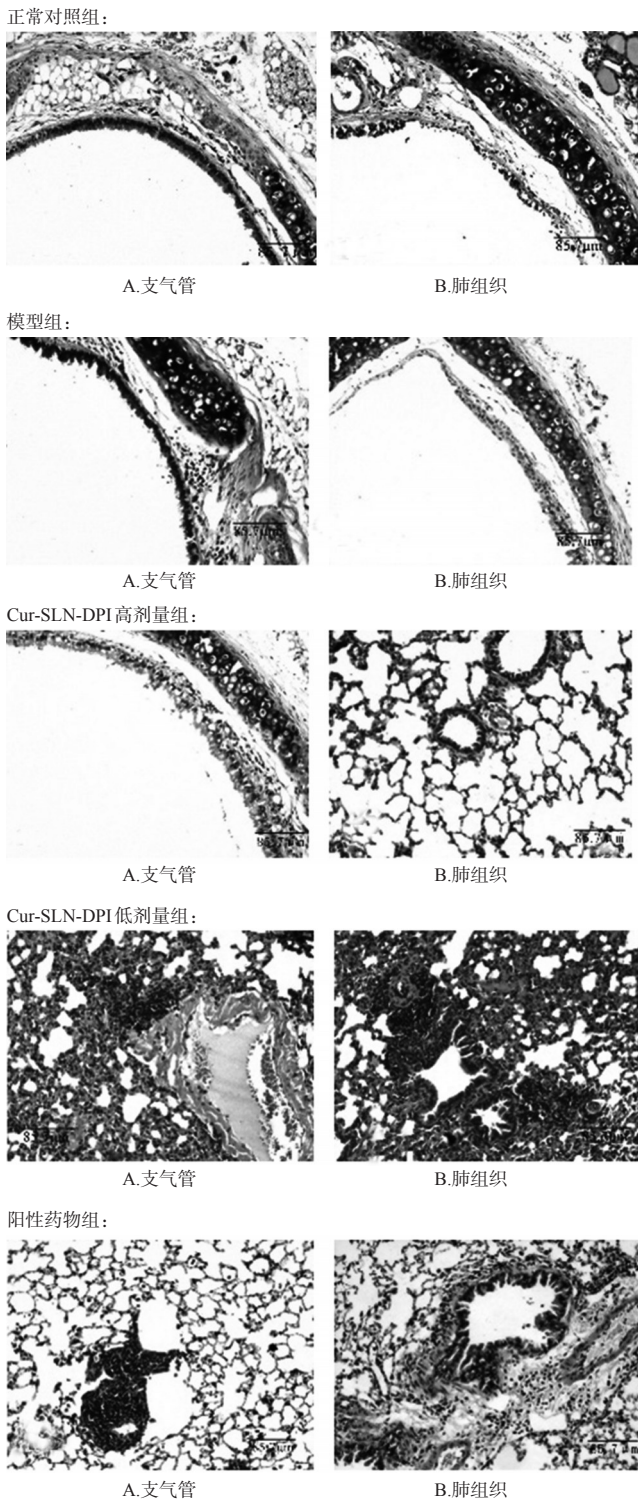


图3 各组小鼠气管和肺组织的病理图(HE, ×100)

Fig 3 Pathological charts of trachea and lung tissue of mice in each group(HE, ×100)

段所释放出的药物可能来自于脂质骨架溶解所释放出的药物和溶剂经微孔渗入纳米粒中溶解药物,而后释放到介质等两种途径。

普通吸入制剂给药后,药物沉积在肺部并被迅速吸收,容易引起局部药物浓度过高,对肺部产生一定的毒副作用,且药物代谢较快,需频繁用药,患者依从性差。

同时药物经肺递送需避免肺部的防御机制^[19]。该防御机制阻止小颗粒在肺部沉积,且在颗粒沉积后立即将其清除。因此如何持续、稳定地释放药物是吸入制剂临床应用的关键。纳米制剂的直径通常为10~1 000 nm,因此凭借其微小的粒径可以轻易地躲避肺巨噬细胞的吞噬,从而增加药物的吸收,此外药物在体内缓慢持续释放,在降低给药剂量的同时还达到了良好的治疗效果^[20-21]。这也可以再次印证体外释放度的结果, Cur-SLN 固化后释放更为平缓,可在获得良好治疗效果的同时降低局部的毒副作用。

对于毒性可能很小的受试药物可采用限度试验来评价其急性毒性。一般使用10~20只动物,连续观察14 d。若没有出现动物死亡情况,即该药物的最小致死剂量(MLD)大于限度剂量。若有动物死亡情况,死亡数少于50%,则判定LD₅₀值大于限度剂量;死亡数多于50%,应当重新设计限度剂量重新研究,或用其他设计方案评价急性毒性^[18]。本研究中选择试验药物的剂量为2 000 mg/kg进行急性毒性研究发现,未出现动物死亡情况,所以推测 Cur-SLN-DPI 的 MLD 值大于限度剂量 2 000 mg/kg。但载体的长期使用可能会使其在肺部聚集,而黏膜纤毛并不能及时清除这些载体,因此,SLN 作为药物载体肺部给药的安全性还有待更深入地研究。

参考文献

- [1] LIN R, GUAN R, LIU X, et al. Significant rise of the prevalence and clinical features of childhood asthma in Qingdao China: cluster sampling investigation of 10 082 children[J]. *BMC Public Health*, 2014. DOI: 10.1186/1471-2458-14-1002.
- [2] CHEN ZH, WANG PL, SHEN HH. Asthma research in China: a five-year review[J]. *Respirology*, 2013. DOI: 10.1111/resp.12196.
- [3] 张改, 王莹. 支气管哮喘治疗的研究进展[J]. *科技信息*, 2014(9): 262-263.
- [4] BARNES PJ. Glucocorticosteroids: current and future directions[J]. *Br J Pharmacol*, 2011, 163(1): 29-43.
- [5] 叶翔. 支气管哮喘的最新治疗研究进展[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2014, 22(7): 5-7.
- [6] CHEE C, SELLAHEWA L, PAPPACHAN JM. Inhaled corticosteroids and bone health[J]. *Open Respir Med J*, 2014, 8(Suppl 1): 85-92.
- [7] 薛海英, 蒋国英, 张宝辉. 姜黄素对哮喘小鼠气道炎症和肺内诱导型一氧化氮合酶的影响[J]. *解剖科学进展*, 2018, 24(2): 163-165.
- [8] KARAMAN M, FIRINCI F, BAGRIYANIK A, et al. Effects of curcumin on lung histopathology and fungal burden in a mouse model of chronic asthma and oropharyngeal candidiasis[J]. *Arch Med Res*, 2011, 42(2): 79-87.
- [9] JANG DJ, KIM ST, LEE K, et al. Improved bioavailability and antiasthmatic efficacy of poorly soluble curcum-

阿托伐他汀与一氧化碳供体分子3联用对动脉粥样硬化易损斑块模型大鼠炎症及氧化应激指标的影响^Δ

魏刚^{1*},包小敏¹,张英²,黄维义^{1#}(1.西南医科大学附属医院心内科,四川泸州 646000;2.西南医科大学机能实验室,四川泸州 646000)

中图分类号 R543.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)03-0338-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.03.12

摘要 目的:研究阿托伐他汀与一氧化碳供体分子3(CORM-3)联用对动脉粥样硬化(AS)易损斑块模型大鼠炎症及氧化应激指标的影响。方法:取大鼠随机分为对照组(灌胃生理盐水)、模型组(灌胃生理盐水)、他汀组[灌胃阿托伐他汀2 mg/kg]、他汀+CORM-3组[灌胃阿托伐他汀2 mg/kg+腹腔注射CORM-3 10 mg/kg],每组8只。对照组大鼠予以基础饲料喂养,右颈总动脉只经历手术暴露但不予损伤并用生理盐水代替药物干预;其余3组大鼠均予以高脂饲料喂养+右颈总动脉损伤+异种蛋白注射刺激免疫炎症反应等方法复制AS易损斑块模型,继续饲养10周后,给予相应药物进行干预,每天1次,连续2周。末次给药24 h后取腹腔动脉血,使用全自动生化分析仪测定血浆中低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)浓度,采用酶联免疫吸附试验检测血浆中超敏C反应蛋白(hs-CRP)、白细胞介素10(IL-10)、单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)、基质金属蛋白酶9(MMP-9)水平,化学比色法测定血浆中丙二醛(MDA)、氧化修饰型低密度脂蛋白(ox-LDL)水平,Western blot法测定血红素氧合酶1(HO-1)蛋白表达水平,并取右颈总动脉在光镜下观察病理学变化。结果:与对照组比较,模型组大鼠LDL-C、hs-CRP、MCP-1、MMP-9、MDA、ox-LDL水平和HO-1蛋白表达水平均明显升高($P<0.05$),HDL-C、IL-10水平均明显降低($P<0.05$),右颈总动脉形成明显的易损斑块。与模型组比较,他汀组和他汀+CORM-3组大鼠LDL-C、hs-CRP、MCP-1、MMP-9、MDA、ox-LDL水平均明显降低($P<0.05$),HDL-C、IL-10水平和HO-1蛋白表达水平均明显升高($P<0.05$),其中除LDL-C、HDL-C外其余指标他汀+CORM-3组改善效果较他汀组更明显($P<0.05$),他汀组颈动脉斑块改变尚不明显,但他汀+CORM-3组AS病变较模型组和他汀组显著减轻,斑块结构也更趋稳定。结论:阿托伐他汀与CORM-3联用对AS易损斑块模型大鼠炎症及氧化应激指标的改善作用强于单用阿托伐他汀,能促进AS易损斑块稳定。

关键词 阿托伐他汀;一氧化碳供体分子3;动脉粥样硬化;易损斑块;炎症;氧化应激;大鼠

- in-solid dispersion granules obtained using fluid bed granulation[J]. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 2014, 24(1):413-429.
- [10] JANG DJ, KIM ST, OH E, et al. Enhanced oral bioavailability and antiasthmatic efficacy of curcumin using redispersible dry emulsion[J]. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 2014, 24(1):917-930.
- [11] CHAUHAN PS, SUBHASHINI, DASH D, et al. Intranasal curcumin attenuates airway remodeling in murine model of chronic asthma[J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 21(1):63-75.
- [12] 王风秀,于锋英.姜黄素药物递送系统研究进展[J]. *中国药业*, 2014, 23(18):120-121.
- [13] 李楠,李锡晶,王倩,等.微乳法制备姜黄素固体脂质纳米粒[J]. *中国药房*, 2015, 26(19):2698-2702.
- [14] 李楠,于美丽.姜黄素固体脂质纳米粒干粉吸入剂的制备工艺研究[J]. *中国药房*, 2016, 27(28):3979-3981.
- [15] 李楠,刘佩莉,孔令钰,等.姜黄素固体脂质纳米粒干粉吸入剂的质量评价及初步稳定性考察[J]. *中国药房*, 2016, 27(34):4838-4841.
- [16] 陈德,刘意,范凯燕,等.姜黄素微球中药物存在形式与释药行为的关系研究[J]. *药学学报*, 2016, 51(1):140-146.
- [17] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:120-124.
- [18] 魏伟,吴希美,李元建.药理实验方法学[M]. 4版.北京:人民卫生出版社,2010:383-393.
- [19] WEBER S, ZIMMER A, PARDEIKE J. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for pulmonary application: a review of the state of the art[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2014, 86(1):7-22.
- [20] DAL MAGRO R, ORNAGHI F, CAMBIANICA I, et al. ApoE-modified solid lipid nanoparticles: a feasible strategy to cross the blood-brain barrier[J]. *J Control Release*, 2017.DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.01.039.
- [21] 陈亚媛,赵娣,李宁.缓释型肺吸入制剂的研究进展[J]. *药学研究*, 2018, 37(8):469-481.

Δ 基金项目:四川省科技厅-泸州市人民政府-泸州医学院联合科研专项资金计划项目(No.14JC0051);泸州市科技局项目(No.2013LZLY-J15)

* 医师,硕士研究生。研究方向:介入心脏病学。电话:0830-3165289。E-mail:553725703@qq.com

通信作者:教授,硕士。研究方向:介入心脏病学。电话:0830-3165289。E-mail:hwy6881@126.com

(收稿日期:2018-09-05 修回日期:2018-12-11)

(编辑:邹丽娟)