

香叶木昔凝胶剂的制备及体外释药特性研究^Δ

崔明宇*, 刘媛媛, 胡启萌, 关 枫, 马英丽(黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040)

中图分类号 R944.9 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)20-2778-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.20.09

摘要 目的:筛选香叶木昔凝胶剂的最优处方,并考察其体外释药特性。方法:以卡波姆940为基质制备香叶木昔凝胶剂;以累积释放率为考察指标,卡波姆940、乙醇、丙三酮用量以及pH值为考察因素设计 $L_9(3^4)$ 正交试验,优化香叶木昔凝胶剂的处方并验证。以香叶木昔软膏剂为参照,采用透析袋扩散法考察按最优工艺所制香叶木昔凝胶剂的体外释药特性。结果:香叶木昔凝胶剂最优处方为卡波姆940 1.5 g、乙醇15 mL、丙三酮8 g、pH 6。按最优处方所制凝胶剂呈黏稠状棕黄色半固体,涂展性良好;释药2 h时的平均累积释放率为 $(12.67 \pm 0.12)\%$ 。体外释药试验结果显示,香叶木昔凝胶剂在12 h内释放较快,然后逐渐放缓,12、24 h时的累积释放率分别为 $(71.93 \pm 0.42)\%$ 、 $(80.47 \pm 0.54)\%$,其释药符合Higuchi方程;香叶木昔软膏剂释放较慢,12、24 h时的累积释放率分别为 $(41.74 \pm 0.18)\%$ 、 $(62.63 \pm 0.59)\%$,其释药符合一级方程。结论:成功优化了香叶木昔凝胶剂的处方;所得香叶木昔凝胶剂释药性良好。

关键词 香叶木昔;凝胶剂;工艺优化;体外释药;累积释放率

Study on Preparation and *in vitro* Release Property of Diosmin Gel

CUI Mingyu, LIU Yuanyuan, HU Qimeng, GUAN Feng, MA Yingli (College of Pharmacy, Heilongjiang University of TCM, Harbin 150040, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the formulation of Diosmin gel and to investigate its *in vitro* release property. METHODS: Diosmin gel were prepared by using Carbomer 940 as matrix. Using accumulative release rate as index, with the amount of Carbomer 940, ethanol, acetone and pH as factors, $L_9(3^4)$ orthogonal test was conducted. The formulation of Diosmin gel was optimized and validated. Using Diosmin ointment as reference, dialysis bag diffusion method was used to investigate *in vitro* release property of Diosmin gel prepared by optimal formulation. RESULTS: The optimal formulation of Diosmin gel included Carbomer 940 1.5 g, ethanol 15 mL, glycerol 8 g, pH 6. The gel prepared with optimal formulation was sticky brown-yellow semi solid, and had good coating and spreading properties. The average accumulative release rate (2 h) was $(12.67 \pm 0.12)\%$. Results of drug release test showed that Diosmin gel released rapidly within 12 h, then gradually slowed down. The accumulative release rates were $(71.93 \pm 0.42)\%$ (12 h) and $(80.47 \pm 0.54)\%$ (24 h), drug release of which were in line with Higuchi equation. Diosmin ointment was released slowly. The accumulative release rates were $(41.74 \pm 0.18)\%$ (12 h) and $(62.63 \pm 0.59)\%$ (24 h). Drug release of it were in line with first-order equation. CONCLUSIONS: The formulation of Diosmin gel is optimized successfully. Prepared Diosmin gel has good drug release property.

KEYWORDS Diosmin; Gel; Formulation optimization; *in vitro* release; Accumulative release rate

香叶木昔(Diosmin)是从茜草科植物蓬子菜(*Galium verum* Linn.)中分离得到的黄酮苷类化合物,为该植物的主要活性成分^[1]。近年来,临床上应用蓬子菜及香叶木昔治疗糖尿病皮肤溃疡取得了较好的效果,如苑海刚等^[2]在控制糖尿病患者血糖水平的基础上,向其溃疡创面喷洒蓬子菜水煎液,发现该水煎液对患者皮肤溃疡创面的愈合具有明显的促进作用;Hasanoglu A等^[3]发现,外用微粉化香叶木昔可促进豚鼠皮肤感染创面的愈合;Guilhou JJ等^[4]的临床观察发现,口服微粉化香叶木昔可有效促进患者小腿静脉溃疡的愈合。但香叶木昔难溶于水,口服吸收效果不佳^[5],故本研究拟将香叶木昔制成外用制剂。临床常用的外用制剂剂型包括散剂、乳

膏剂等,存在易吸湿、热敏性差等缺点,影响药物稳定性,从而阻碍药效的充分发挥^[6]。凝胶剂的制备工艺简单,且具有生物相容性好、涂展性好、透皮吸收好、无油腻感、易清洗等优点,适用于皮肤或黏膜疾病的治疗^[7]。为此,本研究拟以卡波姆940为基质制备香叶木昔凝胶剂,以透析袋扩散法考察其体外释药特性;以累积释放率(Q)为指标,采用正交试验优化其处方,以期制得释药性良好且使用方便的糖尿病皮肤溃疡外用制剂。

1 材料

1.1 仪器

LC-2010A型液相色谱仪,配备Class-VP Ver.6.1色谱工作站(日本Shimadzu公司);BT25S型分析天平(德国Sartorius公司);SK8200H型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司);LDZ4-2型自动平衡离心机(常州市国立试验设备研究所);DELTA 320型pH计(瑞士Mettler Toledo公司);DHG-9140A型恒温干燥箱(上海

^Δ 基金项目:黑龙江省自然科学基金面上项目(No.H2015043、H2015044)

* 副教授,博士。研究方向:中药活性成分及其药物动力学。电话:0451-87266902。E-mail:cuingyu1971@163.com

一恒科学仪器有限公司);HZS-HA型水浴振荡器(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司)。

1.2 药品与试剂

香叶木苷原料药(本实验室自制,纯度:≥90%);香叶木苷对照品(批号:039H0692,纯度:≥99.5%)、透析袋(截留分子量:8 000~14 000 Da,批号:20100103012)均购自美国Sigma公司;卡波姆940(北京市海淀区会友精细化工厂,批号:090305);白凡士林(南昌白云药业有限公司);硬脂酸、液体石蜡(天津市天力化学试剂有限公司);单硬脂酸甘油酯(天津市大茂化学试剂厂);尼泊金乙酯(安徽山河药用辅料股份有限公司);司盘80(天津市博迪化工有限公司);聚山梨酯80(天津百世化工有限公司);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 香叶木苷凝胶剂的制备

称取卡波姆940 0.5 g,均匀撒入适量水中,使其充分溶胀;称取香叶木苷原料药10 g溶解于乙醇15 mL中,随后加入丙三醇10 g、对羟基苯甲酸乙酯0.05 g,混匀,加至溶胀的卡波姆940中搅拌均匀;用三乙醇胺调节pH至6,加水至100 g,搅拌均匀,即得(每100 g凝胶剂含香叶木苷原料药10 g)^[8]。

2.2 香叶木苷软膏剂的制备

称取香叶木苷原料药10 g,充分溶解于水中,加入丙三醇10 g作为水相,加热至85℃;取白凡士林3 g、硬脂酸5 g、液体石蜡10 g和单硬脂酸甘油酯4 g,作为油相,再加入防腐剂尼泊金乙酯0.2 g,加热至85℃;将水相滴加至油相中,充分搅拌均匀。另取司盘80 1 g和聚山梨酯80 4 g,混匀,加热至85℃,作为乳化剂,将乳化剂加至上述水相和油相混合物中,搅拌均匀,冷却,凝固,即得(每100 g软膏剂含香叶木苷原料药10 g)^[9]。

2.3 香叶木苷含量的测定

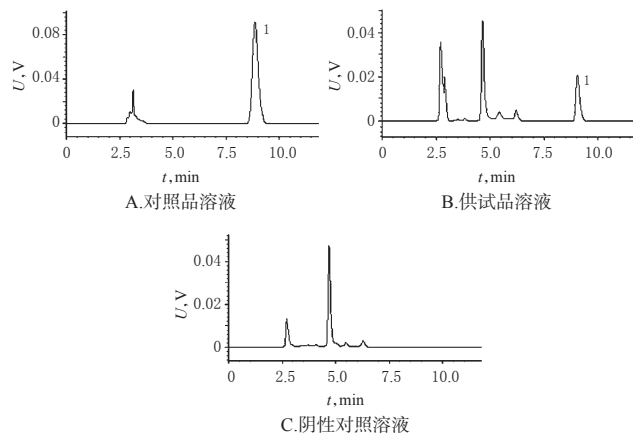
2.3.1 色谱条件 色谱柱:Topsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.2%磷酸水溶液(47:53, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:275 nm;柱温:30℃;进样量:10 μL。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取香叶木苷对照品0.005 0 g,置于50 mL量瓶中,加甲醇溶解并定容,即得质量浓度为0.1 mg/mL的对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 按“2.1”项下方法制备香叶木苷凝胶剂后,精密称取0.080 0 g,置于25 mL量瓶中,加甲醇溶解并定容,超声(功率:500 W,频率:59 kHz,下同)处理20 min。精密量取上述溶液5 mL,置于25 mL量瓶中,加甲醇溶解并定容,超声处理20 min,经0.45 μm微孔滤膜滤过后,即得供试品溶液。

2.3.4 阴性对照溶液的制备 按“2.1”项下方法制备缺香叶木苷原料药的空白凝胶剂,再按“2.3.3”项下方法操作,即得阴性对照溶液。

2.3.5 专属性试验 取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各适量,按“2.3.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图。结果,香叶木苷的保留时间约为8.7 min,阴性对照溶液在相同保留时间处未见干扰,表明本法专属性好,详见图1。



注:1.香叶木苷
Note: 1. diosmin

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.3.6 标准曲线的绘制 精密量取“2.3.2”项下对照品溶液1、2、4、6、8、10 mL,分别置于10 mL量瓶中,加甲醇定容,摇匀,制得质量浓度分别为10、20、40、60、80、100 μg/mL的系列标准溶液,按“2.3.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积。以待测物质量浓度(x, μg/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得标准曲线方程为 $y=346\ 187x-96.501$ ($R^2=0.999\ 4$),表明香叶木苷检测质量浓度的线性范围为10~100 μg/mL。

2.3.7 定量限与检测限的考察 取“2.3.2”项下对照品溶液适量,用甲醇倍比稀释,按“2.3.1”项下色谱条件进样分析,以信噪比10:1、3:1分别计算定量限、检测限。结果,香叶木苷的定量限为4 μg/mL,检测限为1.5 μg/mL。

2.3.8 精密度的试验 取“2.3.6”项下质量浓度为60 μg/mL的标准溶液,按“2.3.1”项下色谱条件重复进样6次,记录峰面积。结果,香叶木苷峰面积的RSD为0.38%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.3.9 稳定性试验 取“2.3.3”项下供试品溶液适量,分别于室温放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.3.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积。结果,香叶木苷峰面积的RSD为0.40%(n=6),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.3.10 重复性试验 取“2.1”项下同一批次凝胶剂,共6份,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积。以香叶木苷对照品为外标物、采用外标法计算样品含量。结果,香叶木苷的平均含量(质量百分比)为8.58%,RSD为0.80%(n=6),表明本法重复性良好。

2.3.11 加样回收率试验 取“2.1”项下同一批次凝胶剂,共9份,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液。将上述供试品溶液分为3组,分别以样品中香叶木苷含量的80%、100%、120%加入一定量的香叶木苷对照品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积并计算加样回收率。结果,香叶木苷的平均加样回收率分别为98.66%、99.55%、96.78%,RSD分别为1.86%、1.44%、1.31%($n=3$)。

2.4 香叶木苷凝胶剂的体外释药行为考察

参考透析袋扩散法^[10]模拟体外释药。精密称取香叶木苷凝胶剂4.0 g,置于经预处理的透析袋中,尽量除尽袋内气泡后,用透析夹夹紧,置于水浴振荡器中,设置释放介质为pH 7.4的磷酸缓冲溶液(PBS)1 000 mL、转速为100 r/min、温度为(37.0±0.5)℃。分别于释放试验第10、30 min以及1、2、4、6、9、12、24 h时精密吸取释放液5 mL,同时补充等温、等体积的空白释放介质。释放液经0.45 μm微孔滤膜滤过后,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,代入标准曲线方程计算溶出液中香叶木苷的质量浓度(c),并按公式计算相应时间点香叶木苷的 Q 值: $Q(\%) = [(c_n \times V + \sum_{i=1}^{n-1} c_i \times V_i) / m] \times 100\%$ (式中, c_n 为第 n 个取样点药物的质量浓度, V 为释放介质的体积, c_i 为第 i 个取样点药物的质量浓度, V_i 为取样体积, m 为凝胶剂中香叶木苷原料药的质量)。

2.5 香叶木苷凝胶剂处方的优选

2.5.1 正交试验设计及结果 在本课题组前期单因素试验考察的基础上,选择对凝胶剂性能影响较大的卡波姆940用量(A)、乙醇用量(B)、丙三醇用量(C)及pH值(D)等4个因素作为考察对象,每个因素设3个水平,以 $L_9(3^4)$ 正交试验表安排试验,按“2.1”项下方法制备凝胶剂,以2 h时的 Q 值作为评价指标^[11],筛选香叶木苷凝胶剂的最优处方。因素与水平见表1,正交试验设计及结果见表2,方差分析见表3。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素			
	A(卡波姆940用量),g	B(乙醇用量),mL	C(丙三醇用量),g	D(pH)
1	0.5	15	6	6
2	1.0	20	8	6.5
3	1.5	25	10	7

由表2可见,各因素对香叶木苷 Q 值的影响程度排序为 $B>C>D>A$,处方以 $A_3B_1C_2D_1$ 组合为最佳,即卡波姆940 1.5 g、乙醇15 mL、丙三醇8 g、pH为6。由表3可见,乙醇、丙三醇用量及pH值对凝胶剂中香叶木苷 Q 值的影响有统计学意义($P<0.05$)。

2.5.2 验证试验 按照正交试验筛选的最优处方制备3批香叶木苷凝胶剂,按“2.3.3”项下方法处理后,再按“2.3.1”项下色谱条件进样分析,并按“2.4”项下方法进行体外释药试验,计算2 h时的 Q 值。结果,按最优处方制得的3批凝胶剂均呈黏稠状棕黄色半固体,且涂展性好;

释药2 h时其平均 Q 值为(12.67±0.12)% ,RSD为0.94%($n=3$),表明该工艺合理、可行。

表2 正交试验设计及结果

Tab 2 Design and results of orthogonal test

序号	A	B	C	D	$Q_1, \%$	$Q_2, \%$	$Q_{\text{总}}, \%$
1	1	1	1	1	10.123	11.103	21.226
2	1	2	2	2	8.461	9.198	17.659
3	1	3	3	3	8.331	7.328	15.659
4	2	1	2	3	10.218	11.568	21.786
5	2	2	3	1	8.375	8.349	16.724
6	2	3	1	2	8.584	9.220	17.804
7	3	1	3	2	9.587	10.119	19.706
8	3	2	1	3	8.249	6.945	15.184
9	3	3	2	1	10.849	11.910	22.759
K_1	54.544	62.718	54.214	60.709			
K_2	56.314	49.567	62.204	55.169			
K_3	57.649	56.222	52.089	52.629			
\bar{K}_1	18.181	20.906	18.071	20.236			
\bar{K}_2	18.771	16.522	20.735	18.390			
\bar{K}_3	19.216	18.741	17.363	17.543			
R	1.035	4.384	3.372	2.693			

注: Q_1 为第1次正交试验的 Q 值; Q_2 为重复正交试验的 Q 值; $Q_{\text{总}}=Q_1+Q_2$

Note: Q_1 is the Q value of the first orthogonal test; Q_2 is the Q value of the repeated orthogonal test; $Q_{\text{总}}=Q_1+Q_2$

表3 方差分析结果

Tab 3 Analysis results of variance

因素	偏差平方和	自由度	F	P
A	0.813	2	0.932	>0.05
B	14.391	2	16.499	<0.05
C	9.476	2	10.865	<0.05
D	5.679	2	6.512	<0.05
误差	3.925	9		

注: $F_{0.05}(2,2)=19.00$

Note: $F_{0.05}(2,2)=19.00$

2.6 香叶木苷凝胶剂体外释药特性的研究

取“2.2”项下香叶木苷软膏剂和“2.5.2”项下香叶木苷凝胶剂适量,按“2.4”项下方法进行体外释药试验,平行操作3次。以时间为横坐标、 Q 值为纵坐标,采用Excel 2007软件绘制体外释药曲线,详见图2。结果,香叶木苷凝胶剂在12 h内释放较快,然后逐渐放缓,12、24 h时的 Q 值分别为(71.93±0.42)%、(80.47±0.54)%;香叶木苷软膏剂释放较慢,12、24 h时的 Q 值分别为(41.74±0.18)%、(62.63±0.59)%。这表明香叶木苷凝胶剂的体外释药性能良好,且优于香叶木苷软膏剂。

将香叶木苷软膏剂、香叶木苷凝胶剂的 Q 值与时间分别按零级、一级、Higuchi模型进行拟合。结果,香叶木苷软膏剂的体外释药过程符合一级方程,香叶木苷凝胶剂的体外释药过程符合Higuchi方程(相关系数 r 越大,表明拟合效果越好),详见表4。

3 讨论

近年来,随着有关香叶木苷药理活性研究的不断深入,其越来越多的生物活性逐渐被发现,如降压^[12]、降血糖^[13]、抗肿瘤^[14]、保护心肌^[15]、抗炎^[16]、抗糖尿病皮肤溃

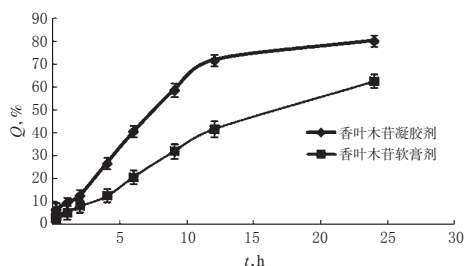


图2 香叶木苷凝胶剂及其软膏剂的体外释药曲线 ($n=3$)

Fig 2 Release curves of Diosmin gel and its ointment *in vitro* ($n=3$)

表4 香叶木苷凝胶剂和软膏剂的体外释药拟合方程

Tab 4 Fitting equations of *in vitro* release of Diosmin gel and ointment

方程	香叶木苷凝胶剂		香叶木苷软膏剂	
	拟合方程	r	拟合方程	r
零级方程	$Q=3.5018t+12.0520$	0.9243	$Q=2.6339t+3.9103$	0.9867
一级方程	$\ln(1-Q)=-0.0726t-0.0822$	0.9671	$\ln(1-Q)=-0.0410t-0.0114$	0.9980
Higuchi方程	$Q=19.0470t^{0.5}-5.6229$	0.9715	$Q=13.4930t^{0.5}-7.6180$	0.9767

痂^[2-4]等,其中抗糖尿病皮肤溃疡的作用备受关注。Atia NM等^[17]研究发现,外敷香叶木苷纳米晶体对糖尿病皮肤溃疡模型大鼠具有明显的创面改善作用;潘金强等^[18]的临床研究发现,口服微粒化香叶木苷能有效促进糖尿病皮肤溃疡患者创面的愈合;且内服与外用香叶木苷对糖尿病溃疡均有良好的疗效^[17-20]。但该化合物的溶解度较低,口服吸收效果不佳,且外用软膏剂的释药性能较差,使其应用受到一定限制^[5-6]。为此,本研究将香叶木苷制成具有良好释药性能的凝胶剂,并以体外释药特征为考察指标,对其处方进行优化,旨在为糖尿病皮肤溃疡的临床治疗提供参考。

在建立香叶木苷含量测定方法时,本课题组曾以甲醇-水体系为流动相。为改善色谱峰峰形、提高分离度,在水相中加入了少量磷酸^[21-22]。同时,本研究对两相的比例进行了筛选,最终以甲醇-0.2%磷酸水溶液(47:53, V/V)作为流动相。方法学考察结果显示,本研究所建立的HPLC法简便、快速、灵敏度高,可用于香叶木苷含量的测定。

在前期研究中,笔者曾尝试使用引湿性强、吸水性的羧甲基纤维素作为该水性凝胶剂的基质,但该基质不溶于有机溶剂,且所得制剂黏度较大、涂展性较差、体外释药性能差(Q 值低)。卡波姆940是水性凝胶剂常用的基质,对酸、碱、醇均具有一定的耐受性,可进行低温贮存,并耐高压和湿热灭菌,具有良好的生物相容性和载药性能,且涂展性较好,易黏附于皮肤的表面,有助于延长药物的滞留时间^[23]。因此,本研究以卡波姆940作为凝胶剂基质。同时,考虑到水性凝胶剂容易丧失水分及发生霉变,故本研究以丙三醇为保湿剂、对羟基苯甲酸乙酯为防腐剂,以确保凝胶剂的稳定性。

在前期单因素试验中,笔者将凝胶剂的外观、涂展性、热稳定性等作为初步处方筛选的指标,发现卡波姆

940、乙醇和丙三醇的用量以及pH值对上述指标的影响较大,且当卡波姆940、丙三醇用量较大(卡波姆940 ≥ 0.020 g/g,丙三醇 ≥ 0.120 g/g)或乙醇用量偏少(≤ 0.01 mL/g)、pH值偏低($\text{pH} \leq 5.5$)时,所得凝胶剂稳定性差,且外观无光泽。因此,笔者将卡波姆940、乙醇、丙三醇用量以及pH水平分别设置为0.5~1.5 g、15~25 mL、6~10 g和6~7,在此基础上,以 Q 值为评价指标^[11],采用正交试验对上述因素及水平进行筛选。由于所选正交试验表未预留误差项,故本研究进行了重复正交试验以减少试验误差。结果显示,各因素对药物释放的影响程度排序为B>C>D>A,且乙醇、丙三醇用量以及pH值对凝胶剂 Q 值的影响有统计学意义。筛选获得最优处方为卡波姆940 1.5 g、乙醇15 mL、丙三醇8 g、pH 6。按此处方制备了3批香叶木苷凝胶剂,得黏稠状棕黄色半固体,涂展性好,且pH值与正常皮肤pH值一致^[24]。

体外释药研究结果显示,香叶木苷凝胶剂的释药过程符合Higuchi方程,属骨架扩散机制;与香叶木苷软膏剂比较,该凝胶剂的 Q 值更高、释药性更好,可作为糖尿病溃疡外用治疗药物,但其透皮吸收特征还有待后续试验进一步探讨。

综上,本研究成功优化了香叶木苷凝胶剂的处方,所得制剂呈黏稠状棕黄色半固体,涂展性及释药性能良好。本课题组将进一步对该凝胶剂的刺激性、致敏性以及其对糖尿病皮肤溃疡的治疗效果进行研究,以期为该凝胶剂的开发及应用提供科学依据。

参考文献

- [1] 马英丽,卢卫红,于晓敏,等. 蓬子菜的化学成分研究: I [J]. 中草药, 2005, 36(10): 1464-1466.
- [2] 苑海刚,薛凤,赵钢. 蓬子菜水溶液对糖尿病患者皮肤溃疡的临床疗效观察[J]. 中医药信息, 2016, 33(2): 87-89.
- [3] HASANOGLU A, ARA C, OZEN S, et al. Efficacy of micronized flavonoid fraction in healing of clean and infected wounds[J]. *Int J Angiol*, 2001, 10(1): 41-44.
- [4] GUILHOU JJ, FÉVRIER F, DEBURE C, et al. Benefit of a 2-month treatment with a micronized, purified flavonoidic fraction on venous ulcer healing: a randomized, double-blind, controlled versus placebo trial[J]. *Int J Microcirc Clin Exp*, 1997, 17(1): 21-26.
- [5] AI F, MA Y, WANG J, et al. Preparation, physicochemical characterization and in-vitro dissolution studies of diosmin-cyclodextrin inclusion complexes[J]. *Iran J Pharm Res*, 2014, 13(4): 1115-1123.
- [6] 崔福德. 药剂学[M]. 6版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 110-177.
- [7] 杨媛媛,姜旭,王宇卿. 正交试验优化复方粉背雷公藤凝胶剂处方[J]. 中国药房, 2017, 28(7): 961-963.
- [8] 徐和,戴领,沈成英,等. 苦参碱凝胶剂的制备及体外释药特性考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(1): 8-11.
- [9] 黎月桃. 三七乳膏的制备及体外透皮特性的研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2014.
- [10] 袁子民,王博,王静,等. β -榄香烯聚氧基丙烯酸正丁酯

苯甲酰乌头原碱对人肺癌 A549 细胞自噬和凋亡的影响^Δ

邵鑫^{1,2*}, 韩彬², 蒋先虹³, 黎风^{1,2}, 何梅², 刘福^{1#} (1. 川北医学院药学院, 四川南充 637000; 2. 川北医学院附属医院药剂科, 四川南充 637000; 3. 川北医学院临床医学系, 四川南充 637000)

中图分类号 R734.2; R96 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)20-2782-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.20.10

摘要 目的: 研究苯甲酰乌头原碱(BAC)对人肺癌 A549 细胞自噬和凋亡的影响, 探讨其用于非小细胞肺癌治疗的作用机制。方法: 采用不同剂量的 BAC(10、50、100、200、400 μmol/L) 分别对 A549 细胞进行处理后, 观察细胞的形态变化, 并采用 CCK-8 法测定细胞的增殖抑制率。将细胞分为对照组(不加药物)和 BAC 低、高剂量组(200、400 μmol/L), 分别加入相应药物处理后, 采用流式细胞术测定细胞凋亡率, 采用聚合酶链式反应法和 Western blotting 测定细胞中凋亡相关因子 B 淋巴细胞瘤因子 2(Bcl-2)、Bcl-2 凋亡相关 X 蛋白(Bax)、胱天蛋白酶 3(Caspase-3) 和自噬相关因子 Beclin1、LC3、P62 的基因及蛋白表达水平。结果: 采用不同剂量的 BAC 处理后, 细胞出现皱缩、排列稀疏、溶解等现象, BAC 100、200、400 μmol/L 剂量组细胞增殖抑制率显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。流式细胞术检测结果显示, BAC 低、高剂量组细胞凋亡率分别在药物作用 24、48 h 时有不同程度的上升, 且该促凋亡作用具有剂量、时间依赖趋势。与对照组比较, BAC 各剂量组细胞中 Bcl-2、P62 的 mRNA 和蛋白表达水平均有不同程度的降低, Bax、Caspase-3、Beclin1、LC3 的 mRNA 和 Bax、Active Caspase-3、P62、Beclin1、LC3 II/I 的蛋白表达水平均有不同程度的升高, 其中 BAC 低剂量组 Caspase-3 的 mRNA 和 Bcl-2、Active Caspase-3、Beclin1、LC3 II/I、P62 蛋白表达水平, 以及 BAC 高剂量组各目标基因的 mRNA 和蛋白的表达水平差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且上述影响均呈剂量依赖趋势。结论: BAC 可抑制 A549 细胞的增殖、促进其凋亡, 并且能促进 Beclin1、LC3(LC3 II/I)、Bax、Caspase-3(Active Caspase-3) 表达和抑制 P62、Bcl-2 等自噬/凋亡相关基因及蛋白的表达; 其机制可能与 BAC 通过促进细胞发生过度自噬从而导致细胞凋亡有关。

关键词 苯甲酰乌头原碱; 非小细胞肺癌; A549 细胞; 增殖; 自噬; 凋亡

- 纳米粒的体外释药特性研究[J]. 中国药房, 2013, 24(5): 441-442.
- [11] 杨晨, 覃宗玲, 董晓莹, 等. 基于天然多糖复合凝胶珠的制备及其释药性能[J]. 功能高分子学报, 2015, 28(4): 403-409.
- [12] SILAMBARASAN T, RAJA B. Diosmin, a bioflavonoid reverses alterations in blood pressure, nitric oxide, lipid peroxides and antioxidant status in DOCA-salt induced hypertensive rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 679(1/2/3): 81-89.
- [13] JAIN D, BANSAL MK, DALVI R, et al. Protective effect of diosmin against diabetic neuropathy in experimental rats[J]. *J Integr Med*, 2014, 12(1): 35-41.
- [14] DUNG TD, DAY CH, BINH TV, et al. PP2A mediates diosmin p53 activation to block HA22T cell proliferation and tumor growth in xenografted nude mice through PI3K-Akt-MDM2 signaling suppression[J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50(5): 1802-1810.
- [15] QUEENTHY SS, JOHN B. Diosmin exhibits anti-hyperlipidemic effects in isoproterenol induced myocardial infarcted rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 718(1/2/3): 213-218.
- [16] CRESPO ME, GÁLVEZ J, CRUZ T, et al. Anti-inflammatory activity of diosmin and hesperidin in rat colitis induced by TNBS[J]. *Planta Med*, 1999, 65(7): 651-653.
- [17] ATIA NM, HAZZAH HA, GAAGAR PME, et al. Diosmin nanocrystalline-loaded wafers for treatment of diabetic ulcer: in vitro and in vivo evaluation[J]. *J Pharm Sci*, 2019, 108(5): 1857-1871.
- [18] 潘金强, 段永亮, 冯涛. 微化地奥司明片在糖尿病足溃疡愈合中的应用价值[J]. 新疆医科大学学报, 2011, 34(2): 197-199.
- [19] 韩海霞, 朱金芳, 王娟, 等. 两色金鸡菊提取物中 3 种黄酮苷在大鼠胃肠道的水解代谢研究[J]. 西北药学杂志, 2018, 33(5): 626-629.
- [20] 陈泣. 大蓟炭止血药效物质基础及止血增效作用机制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
- [21] 李海艳, 尚德军, 巩志国, 等. 高效液相色谱-串联质谱法检测葡萄干中 5 种植物生长调节剂的残留[J]. 保鲜与加工, 2014, 14(1): 27-32, 36.
- [22] 李广, 王清刚, 王义明, 等. 黄酮类化合物的定量色谱分析[J]. 食品科学, 2001, 22(2): 57-61.
- [23] 罗国平, 闫梦茹, 孟会宁, 等. 地肤子总皂苷凝胶剂的制备及体外透皮吸收实验研究[J]. 应用化工, 2017, 46(12): 2420-2423.
- [24] 郑俊民. 药剂学现代药物制剂技术丛书: 经皮给药新剂型[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 17.

Δ 基金项目: 四川省科技计划项目(No.2019YJ0386)
* 药师, 硕士研究生。研究方向: 临床药学、循证药学。E-mail: 18284165610@163.com
通信作者: 主任药师, 教授, 硕士生导师。研究方向: 医院药学、临床药学。电话: 0817-2262246。E-mail: nslf91@163.com

(收稿日期: 2019-01-23 修回日期: 2019-07-21)
(编辑: 张元媛)