

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00500

磁性聚乳酸羟基乙酸氧化苦参碱纳米微球的制备及抗小鼠肝纤维化作用

郑智武¹, 陈岳祥¹, 陈伟忠^{1*}, 宋春燕¹, 钱 慧¹, 高 静²

- 1. 第二军医大学长征医院消化内科, 上海 200003
- 2. 第二军医大学药学院药剂学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的:**探讨磁性聚乳酸羟基乙酸氧化苦参碱纳米粒(M-PLGA-OM-NP)对小鼠肝纤维化的防治作用。**方法:**运用复乳法制备 M-PLGA-OM-NP;透射电镜观察纳米粒形态。采用二甲基亚硝胺(DMN)诱导小鼠肝纤维化模型,观察 M-PLGA-OM-NP 干预后肝脏生化指标及病理组织改变。**结果:**M-PLGA-OM-NP 外观呈规则球形,平均粒径为 146.5 nm,载药量为 7.61%,包封率为 44.8%。M-PLGA-OM-NP 组(外加磁场组和非磁场组)的丙氨酸转氨酶(ALT)水平较模型组下降;光镜下肝脏的纤维化程度较模型组明显减轻,较单纯氧化苦参碱(OM)用药组也明显改善;肝星状细胞活化的标志物 α -SMA 的表达较模型组及单纯 OM 用药组明显减弱。**结论:**M-PLGA-OM-NP 在外加磁场的作用下,可增强 OM 的对 DMN 诱导的肝纤维化的防治作用。

[关键词] 肝纤维化;氧化苦参碱;聚乳酸羟基乙酸;磁性纳米粒

[中图分类号] R 943.42;R975.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)05-0500-05

Preparation of magnetic poly *D, L*-lactide-co-glycolide oxymatrine nanoparticles and their preventive effect against liver fibrosis in mice

ZHENG Zhi-wu¹, CHEN Yue-xiang¹, CHEN Wei-zhong^{1*}, SONG Chun-yan¹, QIAN Hui¹, GAO Jing²

- 1. Department of Gastroenterology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China
- 2. Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433

[ABSTRACT] **Objective:** To prepare magnetic poly *D, L*-lactide-co-glycolide oxymatrine nanoparticle(M-PLGA-OM-NP) and investigate its preventive effects against experimental liver fibrosis. **Methods:** The M-PLGA-OM-NP was prepared by multiple emulsion process and observed by transmission electron microscope(TEM). Dimethylnitrosamine (DMN)-induced liver fibrosis was established with mice. After intervention with M-PLGA-OM-NP, the expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) in the livers of mice was detected by immunohistochemical assay and the score of liver fibrosis was determined by H-E staining and Van Gieson (VG) staining. **Results:** The prepared M-PLGA-OM-NP was in a regular sphere shape, with a mean diameter of 146.5 nm; the drug loading was 7.61% and the encapsulation ratio was 44.8%. The serum Alt level in the M-PLGA-OM-NP group was decreased compared with that in the model group. Light microscopy revealed that the fibrosis in the M-PLGA-OM-NP group was greatly improved compared with the model group and pure oxymatrine group. The expression of α -SMA, the marker of hepatic stellate cell activation, was obviously decreased in the M-PLGA-OM-NP group compared with that in the other groups. **Conclusion:** The prepared M-PLGA-OM-NP under magnetic field can reinforce the preventive effect of oxymatrine against DMN-induced experimental liver fibrosis in mice.

[KEY WORDS] liver fibrosis; oxymatrine; poly *D, L*-lactic-co-glycolide acid; magnetic nanoparticles

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(5):500-504]

聚乳酸羟基乙酸(poly *D, L*-lactide-co-glycolide, PLGA)是近些年常采用的控释性给药系统的载体材

[收稿日期] 2008-10-14 **[接受日期]** 2009-02-24

[基金项目] 上海市卫生局科技发展基金(054123). Supported by Fund of Science Development of Health Department of Shanghai Municipal Government(054123).

[作者简介] 郑智武, 硕士生, 主治医师. 现在解放军第 411 医院消化内科. E-mail: zhengzhiwu@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel:021-81885326, E-mail: cwz2001@sohu.com

料,是一种无毒可生物降解的聚合物,在体内最终产物是二氧化碳和水^[1]。纳米载体介导的磁性载药系统,在外加磁场作用下,能实现位点特异的靶向给药,有利于提高病灶部位的局部药物浓度,进一步提高疗效,减少全身不良反应。本实验以氧化苦参碱(oxyamatrine, OM)为靶向药物,将 PLGA 作为载体材料,以四氧化三铁(Fe_3O_4)为导向磁流体,制备了磁性聚乳酸羟基乙酸氧化苦参碱纳米粒(magnetic poly D, L-lactide-co-glycolide oxyamatrine nanoparticles, M-PLGA-OM-NP),同时观察了该制剂对二甲亚硝胺(dimethylnitrosamine, DMN)诱导的小鼠肝纤维化的防治作用。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器 OM(杭州中香化学有限公司)、PLGA(LA:GA=50:50,德国 Boehringer Ingelheim 公司)、聚乙烯醇 1788(北京有机化工厂)、纳米级 Fe_3O_4 (美国 Sigma 公司)、二氯甲烷(国药集团化学试剂上海有限公司),其他试剂均为分析纯。铷铁硼稀土磁铁(表面强度 4 250 Gs,上海杰灵磁性器材有限公司)、高速冷冻离心机(GL-21M 型,上海市离心机械研究所)、超声乳化仪(美国 Branson 公司)、高效液相色谱仪泵(515 型,美国 Waters 公司)、JEOL 2010 电子透射显微镜(日本电子株式会社)、Nano-ZS90 激光粒度分析仪(英国 Malvern 仪器公司)。

1.2 动物 雄性 ICR 小鼠(51 只,18~24 g)购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,合格证号:SCXK(沪)2007-0005。

1.3 磁性纳米粒制备 取一定量 OM,用 10 mmol/L (pH 7.4) PBS 150 μl 溶解稀释,终质量浓度达 20 mg/ml;以此为内水相,加入 10 mg/ml 的磁性铁粉,超声震荡使其分散均匀。以 30 mg/ml 的 PLGA 二氯甲烷溶液(二氯甲烷体积为 1 ml)为油相,与内水相混合,300 W 超声乳化 20 次制成初乳;将初乳快速滴加到质量体积分数为 3% 的聚乙烯醇水溶液中,300 W 超声乳化 40 次制成复乳;立即用约 50 ml 蒸馏水稀释,高速(800 r/min)搅拌 8 h,15 000 r/min 离心 20 min(离心半径 8 cm);收集纳米粒,蒸馏水洗涤 3 次,冷冻干燥 24 h,即得 M-PLGA-OM-NP。磁性空白纳米粒内水相用去离子水代替。

1.4 纳米粒形态观察和粒径测定 取 M-PLGA-

OM-NP 冻干粉,将其分散于适量蒸馏水中,滴置于 400 目铜网表面,分布均匀。用 JEOL 2010 电子透射显微镜观察纳米粒的形状、大小以及磁粉的存在状态。取 PLGA 纳米粒混悬液 3 ml,加入适量蒸馏水稀释,调整激光粒径测定仪透光度,即可测定纳米粒的平均粒径。

1.5 纳米粒载药量和包封率的测定 精密称取 M-PLGA-OM-NP 10 mg,置于试管中,用 1.0 ml 乙腈洗涤 3 次;弃去上清溶液,除去 PLGA,室温下挥干 1 h;残留物质用适量 PBS 溶解,15 000 r/min 离心 15 min,分离可能悬浮的磁性铁粉微粒;取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜,将滤液上样并进行药物含量测定。计算载药量及包封率。

1.6 动物分组及实验 ICR 小鼠随机分为 6 组。除正常对照组外,其余 5 组小鼠参照文献^[2]方法制备肝纤维化模型:小鼠腹腔注射 1.6 g/L DMN,剂量为 8 mg/kg,1 次/d,每周连续 3 d 间隔 4 d,共 4 周。正常对照组小鼠腹腔注射相应量的生理盐水。具体分组及给药方法如下:(1)正常对照组($n=6$),尾静脉注射生理盐水(5 ml/kg,2 次/周);(2)模型组($n=6$),造模后的处理同正常对照组;(3)磁性空白纳米粒组($n=6$),将磁性空白纳米粒分散于生理盐水后尾静脉注射;(4)OM 组($n=11$),尾静脉注射 OM(溶于生理盐水);(5)M-PLGA-OM-NP 组($n=11$),尾静脉注射 M-PLGA-OM-NP(分散于生理盐水);(6)M-PLGA-OM-NP+磁场组($n=11$),尾静脉注射 M-PLGA-OM-NP 同时肝区强力绷带固定磁铁 1 h。OM 的剂量均为 10 mg/kg,2 次/周。每天记录小鼠体质量。第 4 周结束,眼眶取血,全自动生化仪测定小鼠肝功能。肝脏标本行 H-E、Van Gieson 染色及 α -SMA 免疫组化染色。肝脏病理纤维化评分方法参照 2000 年西安全国肝病会议通过的标准^[3],将病变依纤维化程度分别分为 0~IV 期:0 期,无任何纤维化改变;I 期,汇管区纤维化扩大,局限于窦周及小叶内纤维化;II 期,汇管区周围纤维化,纤维间隔形成,小叶结构保留;III 期,纤维间隔伴小叶结构紊乱,无肝硬化;IV 期,早期肝硬化(假小叶形成)。请病理科医师双盲分期。

1.7 统计学处理 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验进行统计学分析;纤维化分期比较采用秩和检验。所有统计学处理用 SAS 6.12 软件包完成。

2 结果

2.1 纳米微球的理化性质 形态、粒径和药物含量

结果表明, M-PLGA-OM-NP 外观呈圆形, 表面光滑, 分布均匀, 不粘连。磁性微球中可见非均匀分散的黑色不透光区, 为 Fe_3O_4 微粒(图 1)。激光粒度分析仪测定纳米粒的平均粒径为 146.5 nm, 分布系数为 0.096。微球的载药量为 7.61%, 包封率为 44.8%。

2.2 肝功能指标 给药 4 周后 M-PLGA-OM-NP (非磁场组和磁场组)的丙氨酸转氨酶(ALT)显著低于模型组($P < 0.001$), OM 组及磁性空白纳米粒子组与模型组的 ALT 水平无显著性差异。总胆红素(TBIL)、天冬氨酸转氨酶(AST)、总蛋白(TP)无显著性差异。结果见表 1。

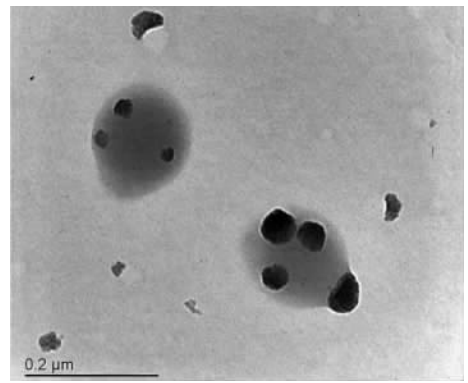


图 1 M-PLGA-OM-NP 透射电镜照片
Fig 1 Morphology of M-PLGA-OM-NP under transmission electron microscope

表 1 实验各组小鼠肝功能改变

Tab 1 Liver function change in mice with dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis

| Group | n | ALT ($z_B/U \cdot L^{-1}$) | AST ($z_B/U \cdot L^{-1}$) | TBIL ($\rho_B/\mu mol \cdot L^{-1}$) | TP ($\rho_B/g \cdot L^{-1}$) |
|----------------------------------|----|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------|
| Control | 6 | 45.7 ± 15.9 | 110.0 ± 21.8 | 3.7 ± 1.0 | 56.8 ± 3.3 |
| Model | 6 | 87.3 ± 17.9** | 128.2 ± 32.3 | 5.8 ± 1.5 | 54.2 ± 0.8 |
| Nanoparticles | 6 | 72.4 ± 11.4 | 111.0 ± 8.5 | 6.3 ± 1.5 | 50.7 ± 3.1 |
| OM | 11 | 62.8 ± 21.0 | 127.9 ± 26.8 | 5.3 ± 1.8 | 50.7 ± 2.8 |
| M-PLGA-OM-NP | 11 | 49.1 ± 13.5 $\Delta\Delta$ | 105.7 ± 35.1 | 4.1 ± 2.7 | 53.9 ± 2.9 |
| M-PLGA-OM-NP with magnetic field | 11 | 47.8 ± 17.9 $\Delta\Delta$ | 110.3 ± 20.5 | 5.5 ± 1.3 | 52.3 ± 2.4 |

** $P < 0.01$ vs control (t test); $\Delta\Delta$ $P < 0.001$ vs model (t test)

2.3 肝组织病理学观察及免疫组化观察 正常对照组:肝小叶完整,肝细胞排列整齐,无变性,无炎症细胞浸润。模型组:H-E染色见肝小叶结构破坏,炎症细胞大量浸润,肝细胞肿胀,胞质内可见脂肪空泡,桥状坏死,部分可见假小叶形成;VG染色见小叶周围大量纤维组织增生,形成纤维条索状间隔,汇管区增宽,纤维隔增宽,多数小叶有汇管区-汇管区、汇管区-中央静脉间隔形成,不完全分割小叶,较多胶原沉积。磁性空白纳米粒组:病变与模型组相似。OM组:仍可见肝小叶结构紊乱,肝细胞肿胀,变性,有脂肪空泡,炎症细胞浸润,程度较模型组轻;VG染色见小叶周围纤维组织增生形成纤维条索状间隔,但纤维间隔较模型组细。M-PLGA-OM-NP组:肝小叶结构尚完整,仍可见肝细胞肿胀、变性、脂肪空泡,炎症细胞浸润程度减轻;VG染色见小叶周围纤维组织增生,间隔呈纤细条索状,不完整。M-PLGA-OM-NP+磁场组:肝细胞变性轻,多数小叶仍呈放射状分布,炎症细胞浸润可见,较模型组明显减轻;VG染色见汇管区纤维隔纤细,数量明显减少,

偶见汇管区-汇管区间隔。结果见图 2。

α -SMA 在胞质表达,正常对照组主要表达于小动脉及小静脉,在胆管无表达。模型组 α -SMA 主要大量表达于汇管区及纤维间隔,部分呈条索形或梭形,呈强阳性染色。磁性空白纳米粒组 α -SMA 表达与模型组类似。OM 组部分强阳性染色。M-PLGA-OM-NP组(非磁场组和磁场组)的 α -SMA 表达呈弱阳性,结果见图 3。

2.4 肝组织病理纤维化分期情况 模型组、磁性空白纳米粒组中多数小鼠肝纤维化为 III ~ IV 期。OM 组中多数在 II ~ III 期,与模型组比较有显著性差异($P < 0.05$);应用 M-PLGA-OM-NP 的两组小鼠肝纤维化分期在 I ~ II 期,与模型组比较有显著性差异($P < 0.01$),与 OM 组比较也有显著性差异($P < 0.01$);在外加磁场作用下, M-PLGA-OM-NP + 磁场组与非磁场组差异有显著性($P < 0.05$)。见表 2。结果表明:磁性纳米粒子可增强 OM 抗肝纤维化作用,在外加磁场作用下, M-PLGA-OM-NP 抗肝纤维化作用更强。

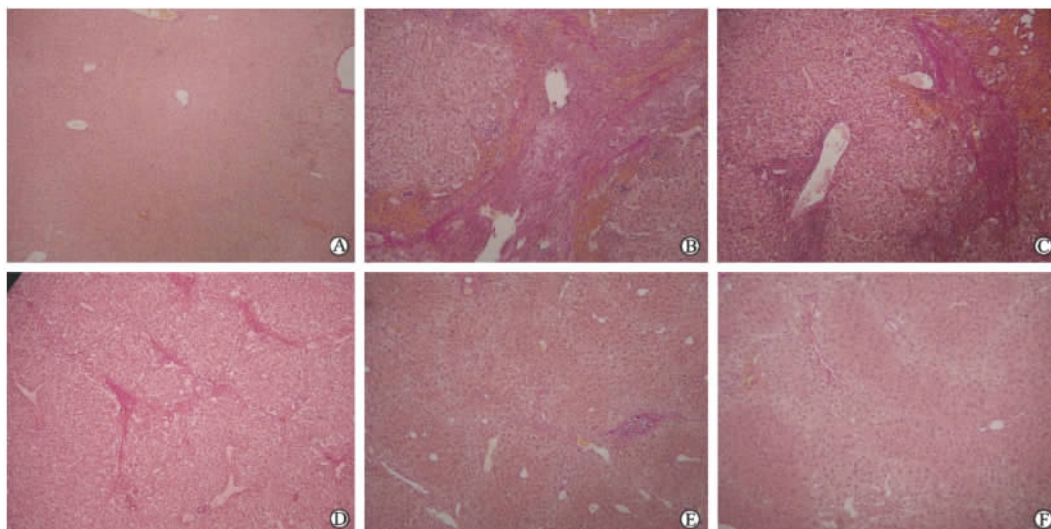


图 2 各组肝脏的病理学改变

Fig 2 Histological findings of liver in different groups (Van Gieson staining)

A: Control; B: Model; C: Nanoparticles; D: OM; E: M-PLGA-OM-NP; F: M-PLGA-OM-NP with magnetic field. Original magnification: $\times 100$

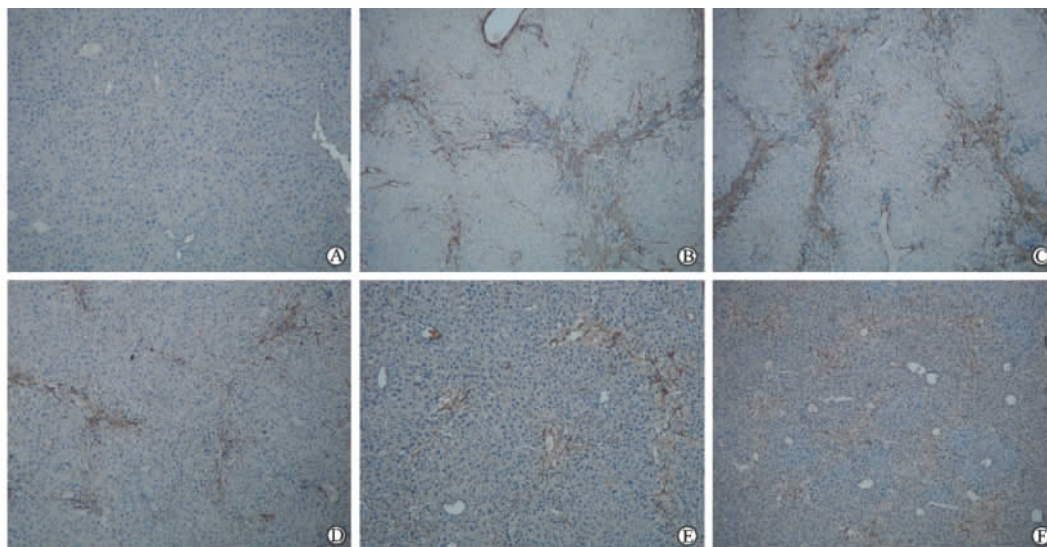


图 3 各组肝脏组织的免疫组化染色结果

Fig 3 Immunohistochemistry of α -SMA in mouse liver sections of each group (α -SMA)

A: Control; B: Model; C: Nanoparticles; D: OM; E: M-PLGA-OM-NP; F: M-PLGA-OM-NP with magnetic field. Original magnification: $\times 100$

表 2 实验各组小鼠肝纤维化分期比较

Tab 2 Comparison of hepatic fibrosis staging of mice in different groups

| Group | N | Stage (n) | | | | |
|---------------------------------------|----|-----------|---|----|-----|----|
| | | 0 | I | II | III | IV |
| Control | 6 | 6 | | | | |
| Model | 6 | | | | 3 | 3 |
| Nanoparticles | 6 | | | 1 | 2 | 3 |
| OM* | 11 | | 1 | 5 | 5 | |
| M-PLGA-OM-NP**▲▲ | 11 | | 3 | 8 | | |
| M-PLGA-OM-NP with magnetic field**▲▲△ | 11 | | 7 | 4 | | |

Rank sum test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model; ▲▲ $P < 0.01$ vs OM; △ $P < 0.05$ vs M-PLGA-OM-NP

3 讨论

OM 是中药苦参、山豆根和苦豆子的主要有效成分,具有直接抑制乙型肝炎病毒复制的作用,能有效抑制肝细胞凋亡,同时阻断和减轻肝纤维化程度。已有报道^[4-7]表明 OM 对多种实验性肝纤维化均有防治作用。OM 的保护肝细胞、抗肝纤维化效果在一定范围内呈剂量依赖性^[8]。由于 OM 的半衰期较短,人体消除半衰期仅 133 min,原型药物及其代谢物主要分布在肾脏,极少量进入肝脏^[9-10]。OM 口服给药后大部分(约 86.8%)在肠道菌群作用下代谢

为疗效相对较低、不良反应较大的苦参碱,使治疗效果下降^[11]。研究 OM 的新型给药系统显得尤为价值。磁性药物纳米给药系统将药物和铁磁性物质共同包藏于载体中从而形成稳定的制剂,在足够强的外磁场作用下逐渐集中于靶器官,缓慢释放药物,相应减少了全身药物水平,可起到高效、缓释的作用。粒径小于 300 nm 的纳米粒主要被单核吞噬系统摄取吞噬,积聚在肝脏和淋巴系统,对肝脏有被动靶向作用。加入磁性物质后,在肝区外加一磁场则能进一步提高其肝靶向效应,增加病灶局部的药物浓度。 Fe_3O_4 由于其良好的氧化稳定性和较低的毒性(LD_{50} 约 2 000 mg/kg, 远远高于目前的临床应用剂量^[12]), 被广泛用作磁性纳米粒中的磁性微粒。

本实验结果表明, M-PLGA-OM-NP 能显著降低 DMN 诱导的小鼠肝纤维化模型 ALT 的水平, 病理结果也显示 M-PLGA-OM-NP 组肝细胞变性坏死程度较模型组及 OM 单独给药组轻, 结缔组织形成也明显减少, 说明通过磁性靶向给药系统可增强 OM 的抗肝纤维化作用。肝纤维化的病理改变是细胞外基质(ECM)的增生和降解失衡所致; 病理情况下细胞外基质的主要细胞来源是肝星状细胞(HSC), 其激活和增生在肝纤维化过程中起主要作用^[13]; α -SMA 是肝星状细胞活化的标志^[14], α -SMA 在 M-PLGA-OM-NP 组肝组织中的表达明显减少, 提示 M-PLGA-OM-NP 可能抑制肝星状细胞活化, 阻止细胞外基质产生, 从而延缓或逆转肝纤维化的发生。

另外, 本实验结果显示总胆红素、总蛋白及 AST 等肝功能指标与模型组比较差异无统计学意义, 可能与每组样本量较少有关; OM 组降酶和抗肝纤维化效果欠佳可能与实验用剂量偏小相关。

综上所述, OM 经磁性纳米载药系统包被后抗肝纤维化作用增强, 提示可为防治肝纤维化提供新的方法, 值得进一步深入研究。

(志谢 感谢解放军第 411 医院病理科王晓熙、沈宾鸿、王英、张晓莉在病理学检测方面提供的帮助。)

[参考文献]

- [1] Shive M S, Anderson J M. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1997, 28; 5-24.
- [2] Hu Q W, Liu G T. Effects of bicyclol on dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in mice and its mechanism of action[J]. *Life Sci*, 2006, 79; 606-612.
- [3] 中华肝病学会肝纤维化学组. 肝纤维化诊断及疗效评估共识[J]. *中华肝病杂志*, 2002, 10; 327-328.
- [4] 陈伟忠, 张俊平, 许青, 胡振林, 谢渭芬, 张兴荣. 苦参碱对大鼠实验性肝纤维化的影响[J]. *第二军医大学学报*, 1996, 17; 424-426.
Chen W Z, Zhang J P, XU Q, Hu Z L, Xie W F, Zhang X R. Effects of matrine on rat liver fibrosis[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 1996, 17; 424-426.
- [5] Shi G F, Li Q. Effects of oxymatrine on experimental hepatic fibrosis and its mechanism *in vivo* [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11; 268-271.
- [6] 杨文卓, 曾民德, 范竹萍, 茅益民, 陆伦根, 曹爱平. 氧化苦参碱防治二甲基亚硝胺诱导大鼠肝纤维化的实验研究[J]. *中华消化杂志*, 2003, 23; 165-168.
- [7] 杨文卓, 曾民德, 陆伦根, 茅益民, 范竹萍, 宋育民, 等. 氧化苦参碱预防半乳糖诱导的大鼠肝纤维化的实验研究[J]. *肝脏*, 2002, 7; 2-4.
- [8] 朱 樑, 宋 健, 张兴荣, 沈建伟, 张贤康. 苦参素对成纤维细胞增殖、形态学及转化生长因子 β_1 的影响[J]. *中国新药与临床杂志*, 2000, 19; 461-463.
- [9] 宋永良, 董青莲, 陈海燕, 金月英. ^3H -氧化苦参碱在小鼠及大鼠体内的代谢[J]. *中国医学科学院学报*, 1986, 8; 22-26.
- [10] 王 毅, 孟根达莱, 郑文艳, 刘栓娣. 氧化苦参碱注射液的人体药代动力学[J]. *中国临床药理学杂志*, 2003, 19; 301-302, 305.
- [11] 张明华, 李灵芝, 陈 虹, 郭建新, 杨林静. 苦参碱和氧化苦参碱对 CCl_4 肝损伤小鼠转氨酶的影响[J]. *武警医学院学报*, 2002, 11; 74-75.
- [12] 邓勇辉, 汪长春, 杨武利, 胡建华, 金 岚, 褚轶雯, 等. 磁性聚合物微球研究进展[J]. *高分子通报*, 2006, 18; 27-36.
- [13] Sakata R, Ueno T, Nakamura T, Sakamoto M, Torimura T, Sata M. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits platelet-derived growth factor-induced proliferation of human hepatic stellate cell line LI90[J]. *J Hepatol*, 2004, 40; 52-59.
- [14] Ballardini G, Groff P, Badiali de Giorgi L, Schuppan D, Bianchi FB. Ito cell heterogeneity: desmin-negative Ito cells in normal rat liver[J]. *Hepatology*, 1994, 19; 440-446.

[本文编辑] 商素芳, 邓晓群