

- anaphylactic rhinitis-asthma symptoms via reducing EOS count and regulating T cell function in rat ARA models[J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 152(3): 568-574.
- [11] Pflanz S, Timans J C, Cheung J, et al. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EB13 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4⁺ T cells[J]. *Immunity*, 2002, 16(6): 779-790.
- [12] Chen Z, Wang S, Erekosima N, et al. IL-4 confers resistance to IL-27-mediated suppression on CD4⁺ T cells by impairing signal transducer and activator of transcription 1 signaling[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2013, 132(4): 912-921.
- [13] Xie M, Mustovich A T, Jiang Y, et al. IL-27 and type 2 immunity in asthmatic patients: Association with severity, CXCL9, and signal transducer and activator of transcription signaling[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2015, 135(2): 386-394.
- [14] Yoshimoto T, Yoshimoto T, Yasuda K, et al. IL-27 suppresses Th2 cell development and Th2 Cytokines Production from Polarized Th2 Cells: a novel therapeutic way for Th2-mediated allergic inflammation [J]. *J Immunol*, 2007, 179(7): 4415-4423.
- [15] Mathie S A, Dixon K L, Walker S A, et al. Alveolar macrophages are sentinels of murine pulmonary homeostasis following inhaled antigen challenge[J]. *Allergy*, 2015, 70(1): 80-89.

地黄花对秀丽线虫寿命的影响

李玉洁¹, 陈鑫², 徐慧颖², 李寒冰^{2*}, 龚曼¹, 孙曙光¹

(1. 河南中医药大学基础医学院; 河南 郑州 450046; 2. 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450046)

摘要: **目的** 探讨地黄花对秀丽线虫寿命的干预效果与机制。**方法** 将秀丽线虫分为对照组和地黄花脂肪油、地黄花多糖及地黄花水提醇沉上清液各药物干预组, 观察在各组药物干预下秀丽线虫在急性热应激和慢性氧化应激条件下, 其生存时间的变化, 并比较各组药物对秀丽线虫生殖能力和延缓寿命的作用效果, 同时对抗氧化相关指标超氧化物歧化酶(SOD)进行检测。**结果** 与空白对照组相比地黄花各部位均能延长秀丽线虫在热应激和氧化应激条件下生存时间, 延长正常培养条件下秀丽线虫平均生存时间及提高秀丽线虫体内SOD活性, 其中地黄花水提醇沉上清液部位效果最为显著。地黄花各部位对线虫生殖能力均无明显影响。**结论** 地黄花能延长秀丽线虫的寿命, 地黄花水提醇沉上清液部位效果最佳, 其作用机制可能与提高机体SOD活性, 增强应激能力有关。

关键词: 秀丽线虫; 地黄花; 寿命

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2018)02-0452-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2018.02.042

中药地黄为玄参科(Scrophulariaceae)多年生草本植物地黄(*Rehmannia glutinosa* Libosch.)的新鲜或干燥块根^[1]。现代药理学研究发现地黄具有抗氧化、护肝、抗衰老、抗抑郁、止血、增强记忆力、降血糖、保护胃黏膜等多种药理作用^[2-10]。《本草纲目》记载:地黄花研末服用,功同地黄,如肾虚腰脊疼痛,将其研为末,用酒送服^[11]。但是目前地黄花在临床上的应用较少,关于地黄花的基础研究也较少,对地黄花药理作用进行研究有利于开发地黄新的药用部位,保证地黄资源的有效利用。

秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis Elegans*, 简称线虫)是存在土壤中的一种低等生物。由于其易于饲养和保存、生

长周期短、进化中高度保守、遗传信息清晰等优点,使得秀丽线虫成为抗衰老药物、功能因子研究的理想模型^[12-13]。衰老是多种因素导致的身体机能的下降,同时伴随着生化和生理功能的衰弱,因此对外界环境、压力、挑战等反应会有所降低,更易患上年龄相关的疾病而死亡^[14]。故本实验以国际公认的模式生物秀丽线虫为研究对象,测定了地黄花不同部位对秀丽线虫抵抗急性热应激和慢性氧化应激的能力,生殖能力,寿命的长短及以SOD为代表的抗氧化指标的影响,探讨地黄花不同部位对秀丽线虫寿命的影响及其可能的机制,为地黄花的开发利用奠定基础。

收稿日期: 2017-03-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81473435);河南省高等学校青年骨干教师资助计划(2013GGJS-092);河南中医学院大学生创新学习项目(YXCX[2014]22)

作者简介: 李玉洁(1983—),女,硕士,讲师,研究方向为中药活性成分及作用机理。Tel:(0371)65962746, E-mail:lyj_happy@139.com

* **通信作者:** 李寒冰(1973—),男,博士,副教授,从事中药对肠道菌群调节研究。Tel:(0371)65962746, E-mail:lhb8899@163.com

1 材料与方 法

1.1 菌株与试剂 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) OP50、野生型秀丽隐杆线虫 (*C. elegans*) 中国人民解放军军事医学科学院惠赠; 琼脂粉及牛肉蛋白胨购自北京奥博星生物技术有限责任公司; 地黄花于2016年4月中下旬采自河南焦作, 为玄参科 (*Scrophulariaceae*) 植物地黄 (*Rehmannia glutinosa* Libosch.) 的新鲜花; 超氧化物歧化酶 (SOD) 检测试剂盒 (批号 20160108) 及考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所 (批号 20160108)。

1.2 实验仪器 MJX-250B-Z 电热恒温培养箱 (上海博迅实业有限公司); SZ51 解剖显微镜 (日本奥林巴斯); vd-850 超净工作台 (江苏苏净集团有限公司); MultiskanFC 全波长多功能酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验药物 将地黄花自然晾干, 粉碎, 过 80 目筛, 称取 50 g, 置于 1 000 mL 圆底烧瓶中, 加入 500 mL 石油醚, 20 ℃ 超声 1 h, 过滤, 滤液低温减压浓缩干燥, 得地黄花脂肪油部位, 提取率为 3.93%; 滤渣加 500 mL 水煎煮 2 次, 30 min/次, 过滤合并滤液, 常温减压浓缩干燥, 将干燥药物配制成质量分数为 35% 的溶液, 加 95% 乙醇, 使溶液中乙醇终浓度为 80%, 静置, 2 000 r/min, 离心 5 min, 过滤, 下层沉淀物为地黄花多糖, 干燥后称定质量, 提取率为 11.94%, 上层醇溶液干燥后为水提醇沉上清液部位, 提取率为 16.35%。

1.3.2 线虫培养 采用 Brenner^[15] 的方法, 将雌雄同体线虫饲养于涂布大肠杆菌 OP50 (*E. coli* OP50) 的线虫标准培养基 (nematode growth medium, NGM) 上, 培养温度 20 ℃, 观察线虫生长情况。NGM 培养基的配制: 每 1 000 mL 培养基含有琼脂 18 ~ 25 g, 牛肉蛋白胨 2.7 g, Tris-base 0.55 g, Tris-HCl 0.27 g, NaCl 2 g, 121 ℃ 高压蒸汽灭菌 20 min。

1.3.3 线虫寿命测定 在同期化后第 4 天, 挑取大小一致的线虫放入添加 3 种不同药物的培养基中进行培养, 药物终质量浓度均为 50 mg/L, 并且选取普通 NGM 培养基作为空白对照组。每 24 h 将各平板上线虫转移至相同的新平板, 以分组当天记为线虫生命起始第 0 天, 从生命起始到终止的时间记为线虫寿命期。死亡判断标准: 无移动及吞

咽动作, 轻触后无任何反应。依据线虫生存、死亡的条数绘制生存曲线。

1.3.4 热应激实验 将同期化幼虫置于含或不含药物的 NGM 板中, 每组 3 个板, 每板 10 条, 给药组线虫经药物处理 48 h 后与空白对照组线虫同时置于 35 ℃ 培养箱中进行观察, 每隔 1 h 计数线虫死亡、存活数目, 直至线虫全部死亡, 重复 2 次, 死亡标准同寿命实验。

1.3.5 氧化应激实验 将同期化幼虫置于含或不含药物的 NGM 板中, 每组 3 个板, 每板 10 条, 48 h 后发育至成虫, 然后把各组线虫转移到含有 0.4 mmol/L H₂O₂ 的线虫标准培养基板中进行观察, 每隔 1 h 记录线虫存活数目, 直至线虫全部死亡, 重复 2 次, 死亡标准同寿命实验。

1.3.6 生殖能力测定 有效产卵量的测定, 每组挑取 10 条 L4 期的线虫到含或不含药物的 NGM 板中, 每板放置 2 条线虫。每隔 24 h 将线虫转移至新板中, 直至线虫生殖能力丧失。换下的旧板倒置于 20 ℃ 培养 24 h, 记录幼虫数量, 将每天产生的子代数相加即为线虫终身产卵量。

1.3.7 SOD 活性检测 将同期化幼虫置于含或不含药物的 NGM 板中, 每个平板放入 30 ~ 35 只线虫, 每 24 h 将各平板上线虫转移至相同的新平板中, 5 h 后收集含药或不含药的 NGM 板上成虫于 EP 管中, 液氮中反复冻融 3 次提取线虫蛋白, 经离心收集上清液, 严格按照 SOD 检测试剂盒说明书要求操作。

1.3.8 统计方法 采用 SPSS 17.0 统计分析软件对线虫寿命及应激实验的数据进行 Kaplan-Meier 法的生存分析; 线虫生殖能力及 SOD 活性检测数据进行 one-way ANOVA 分析, 组间比较采用 LSD 法检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 地黄花不同部位对线虫寿命的影响 寿命长短是衰老过程研究中的一个主要依据, 经 Kaplan-Meier 生存分析得出 (表 1), 地黄花不同部位干预的线虫平均寿命及最大寿命均较空白对照组延长, 与空白对照组相比有统计学差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。线虫的生存曲线如图 1 所示, 与空白对照组相比, 地黄花各部位均能使线虫生存曲线右移, 延长线虫的平均寿命。效果以水提醇沉上清液部位效果最好, 其次为地黄花脂肪油部位。

表 1 地黄花不同部位对线虫寿命的影响

组别	n	平均寿命/d	改变率/%	最大寿命/d	改变率/%
空白对照组	56	13.21 ± 0.58	-	17.33 ± 0.58	-
地黄花多糖组	61	14.65 ± 0.51 *	10.90	20.00 ± 1.00 *	15.41
水提醇沉上清液组	58	16.24 ± 0.48 **	22.94	22.33 ± 1.53 **	28.85
地黄花脂肪油组	75	15.68 ± 0.39 **	18.70	21.67 ± 2.08 **	25.04

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 地黄花不同部位对热应激条件下线虫寿命的影响 35 ℃ 条件下, 检测地黄花不同部位干预的线虫抵抗热应激能力, 经 Kaplan-Meier 生存分析得出 (见表 2), 与空白对照组相比, 地黄花不同部位干预组线虫抵抗热应激的能力显著增强 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 热应激条件下线虫的生存

曲线如图 2 所示, 与空白对照组相比, 地黄花不同部位均能使线虫生存曲线右移, 延长线虫热应激条件下平均寿命, 作用强弱顺序为地黄花水提醇沉上清液 > 地黄花脂肪油 > 地黄花多糖。

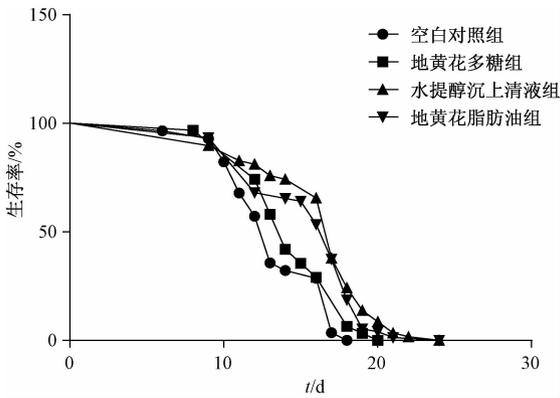


图1 地黄花不同部位对线虫生存曲线的影响

表2 地黄花不同部位对热应激条件下线虫寿命的影响

组别	n	平均寿命/h	改变率/%
空白对照组	94	6.77 ± 0.35	-
地黄花多糖组	78	8.90 ± 0.46 **	31.42
水提醇沉上清液组	68	10.44 ± 0.66 **	54.23
地黄花脂肪油组	62	8.84 ± 0.66 **	30.54

注:与空白对照组比较,**P < 0.01

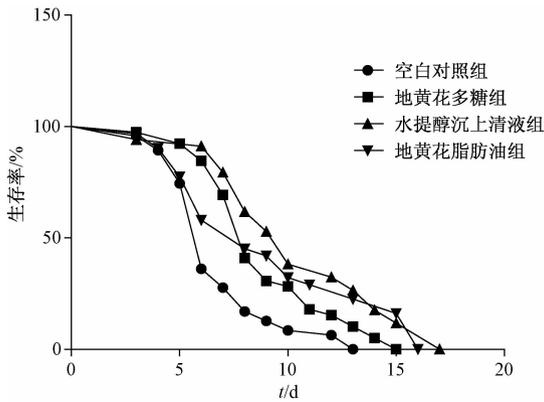


图2 地黄花不同部位对热应激条件下线虫生存曲线的影响

表4 地黄花不同部位对线虫生殖能力及机体SOD活性的影响

指标	空白对照组	地黄花多糖组	水提醇沉上清液组	地黄花脂肪油组
1 d/(个·d ⁻¹)	22.75 ± 3.86	28.75 ± 2.50 **	17.50 ± 1.29 *	13.50 ± 2.38 **
2 d/(个·d ⁻¹)	72.25 ± 6.60	46.75 ± 10.44 **	29.25 ± 3.30 **	29.50 ± 3.87 **
3 d/(个·d ⁻¹)	72.75 ± 6.40	81.00 ± 4.55	95.75 ± 9.25 **	72.50 ± 6.45
4 d/(个·d ⁻¹)	28.50 ± 3.11	11.75 ± 1.71 **	43.25 ± 2.22 **	58.00 ± 2.94 **
5 d/(个·d ⁻¹)	14.00 ± 0.82	18.00 ± 2.94 **	6.75 ± 0.96 **	13.25 ± 1.71
6 d/(个·d ⁻¹)	9.00 ± 0.82	13.00 ± 2.94 **	1.75 ± 0.96 **	8.25 ± 1.71
7 d/(个·d ⁻¹)	0.50 ± 0.58	0.50 ± 0.58	4.75 ± 0.96 **	2.25 ± 0.96 **
8 d/(个·d ⁻¹)	0.00 ± 0.00	1.25 ± 0.50 **	0.00 ± 0.00	2.00 ± 0.82 **
总子代数/个	219.75 ± 11.73	201.00 ± 22.29	199.00 ± 13.09	199.25 ± 9.88
SOD/(U · mg prot ⁻¹)	30.29 ± 5.17	46.15 ± 4.36 *	80.84 ± 10.75 **	68.08 ± 8.70 **

注:与空白对照组比较,*P < 0.05,**P < 0.01

2.5 地黄花不同部位对线虫T-SOD活性的影响 T-SOD作为线虫体内最主要的抗氧化酶,主要清除机体内过量的超氧化物自由基。经 one-way ANOVA 分析得出表4,与空白对照组相比地黄花不同部位干预组线虫体内相对酶活力显著增强 (P < 0.05, P < 0.01),地黄花、多糖地黄花水提醇

2.3 地黄花不同部位对氧化应激条件下线虫寿命的影响 经 Kaplan-Meier 生存分析得出(表3),与空白对照组相比,地黄花不同部位干预组线虫抵抗氧化应激的能力显著增强 (P < 0.05, P < 0.01)。氧化应激条件下线虫生存曲线如图3所示,与空白对照组相比,地黄花各部位线虫生存曲线均明显右移,热应激条件下线虫平均寿命延长,作用强弱顺序为地黄花水提醇沉上清液 > 地黄花脂肪油 > 地黄花多糖。

表3 地黄花不同部位对氧化应激条件下线虫寿命的影响

组别	n	平均寿命/h	改变率/%
空白对照组	74	6.92 ± 0.28	-
地黄花多糖组	82	8.22 ± 0.40 **	18.79
水提醇沉上清液组	57	10.42 ± 0.66 **	50.58
地黄花脂肪油组	67	9.25 ± 0.49 **	33.67

注:与空白对照组比较,**P < 0.01

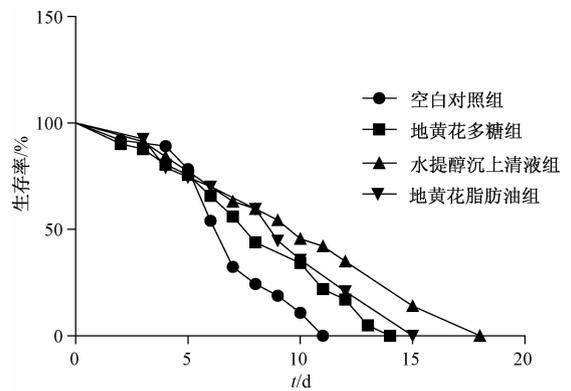


图3 地黄花不同部位对氧化应激条件下线虫生存曲线的影响

2.4 地黄花不同部位对线虫生殖能力的影响 经 one-way ANOVA 分析得出表4,空白对照组线虫平均产卵219.75枚,与空白对照组相比,地黄花各部位干预组线虫平均产卵数有下降趋势,但与空白对照组比较无显著性差异。对各组线虫每天子代数目分析可以发现,地黄花干预组线虫的生殖期较空白对照组略有延迟。

沉上清液、地黄花脂肪油部位线虫体内相对酶活力分别较空白对照组升高52.36%、166.87%及124.76%。

3 讨论

本研究采用线虫这一模式生物,以整体动物寿命实验作为检测手段,观察地黄花对线虫寿命的影响,发现地黄

花不同部位对线虫均有延寿作用,其中地黄花水提醇沉上清液部位效果最佳(见表1、图1)。此外,地黄花不同部位干预的线虫抵抗外界不良应激的能力显著增强,从生存曲线及平均寿命上看,地黄花不同部位干预组线虫生存曲线右移,平均寿命延长,效果强弱顺序为地黄花水提醇沉上清液>地黄花脂肪油>地黄花多糖(见表2~3,图2~3)。同时通过观察正常生长条件下线虫寿命的变化发现,相比于空白对照组,地黄花不同部位干预组线虫生存曲线右移,延缓了线虫衰老的时间,显著提高了线虫的平均寿命,结果与上述应激实验结果一致。

在众多衰老理论中,寿命与生殖的关系最具争议,一些生物学家认为长寿与生殖之间存在“权衡利弊”的关系,即寿命的延长是通过降低或丧失生殖力为代价的^[16]。另一部分生物学家认为“权衡利弊”不是总起作用^[17]。本实验研究发现地黄花不同部位干预组线虫平均寿命和最大寿命较空白对照组延长,生殖期较空白对照组略有延迟,生殖能力较空白对照组有降低趋势,但与空白对照组比较无显著性差异(见表4),这一结果说明地黄花不同部位对线虫寿命的延长作用可能不是以降低或丧失其生殖能力为代价的。

衰老自由基学说最早由 Harman 提出,认为体内形成的各种自由基可使机体慢性中毒,促使机体衰老^[18]。SOD 作为体内主要的抗氧化酶,在清除自由基方面发挥关键性作用。本实验观察了地黄花不同部位干预后线虫体内 SOD 活力变化情况,结果发现地黄花不同部位均可增强线虫体内 SOD 酶活力,效果强弱顺序为地黄花水提醇沉上清液>地黄花脂肪油>地黄花多糖(见表4),该结果与上述应激实验及寿命实验结果一致,提示地黄花不同部位延长线虫寿命的机制可能与其增强线虫体内 SOD 酶活力,增强机体抗氧化能力有关。

总之,本研究探讨了地黄花对线虫寿命的影响。结果发现地黄花干预后线虫的平均寿命和不良应激环境下的平均生存时间延长,并且体内抗氧化酶 SOD 活性增强,其作用机制可能与其增强线虫应激能力相关。该发现为进一步研究利用地黄花,开发功能性食品或医疗保健品奠定理论基础。

目前,关于地黄抗衰老作用机理及物质基础研究相对较多,如地黄中的梓醇、酚类化合物^[19-20]具有神经保护作用或抗氧化作用,可能是其发挥抗衰老作用的物质基础,但是,关于地黄花抗衰老作用及其物质基础的相关研究还未见报导,地黄花化学成分的系列研究也未见报导,地黄花发挥抗衰老作用的物质基础是否与地黄一样也不清楚,因此进一步对其成分进行分析,是明确其抗衰老作用物质基础的前提,也是地黄花开发利用的基础,同时也是制定其质量标准的前提条件,这些均需要进一步的研究和探索。

参考文献:

[1] 朱俏峭,钟亮,戚进.地黄中环烯醚萜类化学成分的研究进展[J].海峡药学,2015,27(9):1-5.

[2] Piatczak E, Dfbska M, Kontek B, et al. Antioxidant properties of methanolic extracts from the shoots and roots of pre-transformed plants of *rehmannia glutinosa* libosch [J]. *Acta Pol Pharm*, 2016, 73(2): 433-438.

[3] Liu Y M, Zhu L L, Li R, et al. Xijiao Dihuang Decoction (犀角地黄汤) and *Rehmannia glutinosa* Libosch. protect mice against lipopolysaccharide and tumor necrosis factor alpha-induced acute liver failure[J]. *Chin J Integr Med*, 2015.

[4] 朱颖,夏少秋,吴亚军,等.六味地黄生物制剂抗衰老活性部位的筛选研究[J].辽宁中医杂志,2010,37(10):1997-1999.

[5] Wang J M, Yang L H, Zhang Y Y, et al. BDNF and COX-2 participate in anti-depressive mechanisms of catalpol in rats undergoing chronic unpredictable mild stress[J]. *Physiol Behav*, 2015, 151: 360-368.

[6] Zhang R X, Li M X, Jia Z P. *Rehmannia glutinosa*: Review of botany, chemistry and pharmacology [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 117(2): 199-214.

[7] Zhang L N, Jin G Q, Zhang X L, et al. Effects of 5-hydroxymethyl furfural extracted from *Rehmannia glutinosa* Libosch on the expression of signaling molecules relevant to learning and memory among hippocampal neurons exposed to high concentration of corticosterone [J]. *Chin J Integr Med*, 2014, 20(11): 844-849.

[8] Tong S, Lin C, Zhang Q, et al. Separation of catalpol from *Rehmannia glutinosa* Libosch. by high-Speed countercurrent chromatography [J]. *J Chromatog Sci*, 2015, 53(5): 725-729.

[9] Shi C J, Wen X S, Gao H F, et al. Steamed root of *Rehmannia glutinosa* Libosch (Plantaginaceae) alleviates methotrexate-induced intestinal mucositis in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 183: 143-150.

[10] Jiang B, Shen R F, Bi J, et al. Catalpol: a potential therapeutic for neurodegenerative diseases [J]. *Curr Med Chem*, 2015, 22(10): 1278-1291.

[11] 李时珍.《本草纲目》白话全图本[M].重庆:重庆大学出版社,1994.110.

[12] Wang E, Wink M. Chlorophyll enhances oxidative stress tolerance in *Caenorhabditis elegans* and extends its lifespan [J]. *Peer J*, 2016, 4(3): e1879.

[13] Ding A J, Wu G S, Tang B, et al. Benzimidazole derivative M084 extends the lifespan of *Caenorhabditis elegans* in a DAF-16/FOXO-dependent way [J]. *Mol Cell Biochem*, 2016.

[14] Lee H C, Wei Y H. Role of mitochondria in human aging [J]. *J Biomed Sci*, 1997, 4(6): 319-326.

[15] Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans* [J]. *Genetics*, 1974, 77(1): 71-94.

[16] Watson E, MacNeil L T, Ritter A D, et al. Interspecies systems biology uncovers metabolites affecting *C. elegans* gene expression and life history traits [J]. *Cell*, 2014, 156(4): 759-770.

[17] 许巧,许湘,王平.福苓方对秀丽隐杆线虫寿命的影响

响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(4): 171-173.
[18] Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry[J]. *J Gerontol*, 1956, 11(3): 298-300.
[19] 袁保刚. 生地黄提取物抗氧化活性研究[D]. 杨凌: 西北

农林科技大学, 2011.
[20] 张秀丽. 梓醇对 D-半乳糖衰老小鼠的神经保护作用研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2008.

羟基喜树碱 PEG-PHDCA 纳米粒的制备及表征

周雪峰¹, 洪伟勇¹, 王金明¹, 王英¹, 郭钊元², 杨根生^{2*}

(1. 台州市立医院, 浙江 台州 318000; 2. 浙江工业大学药学院, 浙江 杭州 310032)

摘要: 目的 制备羟基喜树碱聚乙二醇化聚十六烷基氰基丙烯酸酯 (PEG-PHDCA) 纳米粒, 并进行表征。方法 酯化、缩聚法制备 PEG-PHDCA, 凝胶渗透色谱法 (GPC) 测定新合成材料的相对分子质量, 纳米沉淀法制备纳米粒, 测定其粒径、载药量、包封率, 透析法考察其体外释药特性。结果 所得纳米粒相对分子质量为 2 300 ~ 2 700, 能较好地包埋喜树碱, 平均粒径为 (86.5 ± 7.2) nm, Zeta 电位为 (-16.34 ± 2.4) mV, 包封率和载药量分别为 $(90.23 \pm 1.13)\%$ 和 $(3.17 \pm 0.15)\%$ 。载药体系能实现药物良好的体外缓释。结论 PEG-PHDCA 适合作为纳米制剂的载体。羟基喜树碱 PEG-PHDCA 纳米粒能提高药物的水溶性, 并可实现其体外缓释。

关键词: 羟基喜树碱; PEG-PHDCA; 纳米粒; 制备; 表征

中图分类号: R944

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2018)02-0456-03

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2018.02.043

羟基喜树碱是从珙桐科植物喜树中分离得到的细胞周期抗增殖生物碱^[1], 能选择性抑制 DNA 拓扑异构酶 I, 进而抑制 DNA 复制、转录和有丝分裂, 促使细胞凋亡。羟基喜树碱抗癌谱广, 疗效确切, 目前主要用于胃癌、肝癌、膀胱癌等疾病的治疗^[2-3], 但其半衰期短、稳定性和水溶性差等缺点严重影响了临床疗效。目前, 临床所用的羟基喜树碱注射液是用 NaOH 溶液调节 pH 值, 该制剂中羟基喜树碱的羟基内酯环打开, 形成水溶性钠盐, 但抗肿瘤活性降低 90%^[4-5]。为了提高药物稳定性和水溶性, 延长半衰期, 提高疗效, 降低不良反应, 本实验选择泊洛沙姆 188 和聚乙二醇化聚十六烷基氰基丙烯酸酯 (PEG-PHDCA) 作为载体材料, 纳米沉淀法制备载羟基喜树碱的纳米, 并考察其理化性质和体外释放特性。

1 材料与仪器

1.1 材料 羟基喜树碱注射液 (湖北黄石药业有限公司)。单甲氧基聚乙二醇 (相对分子质量 1 900, 中国医药上海化学试剂公司); 羟基喜树碱 (上海龙翔生物医药开发有限公司); 泊洛沙姆 188 (BASF 中国上海分公司)。氰基乙酸 (常州佳纳化工有限公司); 乙腈为色谱纯 (天津四友化学品有限公司); 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器 Hitachi Nimaocr-21G-II 超速离心机 (日本日立

公司); 激光粒度测定仪 (美国 Beckman 公司); SY-4 000 K 高效液相色谱仪 (德国 KANUER 有限公司); KQ-300B 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

2 方法

2.1 PEG-PHDCA 制备^[6] 取单甲氧基聚乙二醇 2.0 g、氰基乙酸 0.25 g, 溶于二氯甲烷和乙酸乙酯中, 4-二甲氨基吡啶 (DMAP) 作为催化剂, 二环己基碳二亚胺 (DCC) 作为脱水剂, 氮气保护下制得聚乙二醇氰基乙酸酯 (Me-PEGCA)。取氰基乙酸 9.5 g、十六醇 13.5 g, 溶于二氯甲烷和乙酸乙酯中, 催化剂、脱水剂同上, 氮气保护下制得十六烷基氰基乙酸酯 (HDCA)。取 MePEGCA 1.0 g、HDCA 0.5 g, 溶于二氯甲烷和乙醇中, 滴加甲醛和吡咯烷, 氮气保护下室温搅拌反应, 盐酸洗涤, 二氯甲烷萃取后, 蒸馏水洗涤有机相, 无水硫酸钠干燥, 减压旋干至黏稠状后, 真空干燥固化, 即得。

2.2 PEG-PHDCA 相对分子质量测定 采用凝胶渗透色谱法 (GPC)。取 PEG-PHDCA 5 mg 于 10 mL 量瓶中, 四氢呋喃溶解定容。色谱条件为 Waters 1515 色谱泵, Waters 2414 示差折光检测器, 凝胶色谱柱; 流动相四氢呋喃; 柱温 40 °C; 进样量 50 μ L; 对照品聚苯乙烯。

2.3 PEG-PHDCA 差示扫描量热 (DSC) 测定 以空铝坩

收稿日期: 2017-01-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21376223); 浙江省药学会医院药学专项科研基金 (2016ZY35); 台州市科技计划项目 (1601KY27); 椒江区科技计划项目 (162047)

作者简介: 周雪峰, 女, 主管药师, 从事医院药学与药物新剂型研究。Tel: (0576) 88858266, E-mail: jacksonhunt@163.com

* **通信作者:** 杨根生, 男, 博士, 教授, 从事药物新剂型与新技术研究。Tel: (0571) 88871077, E-mail: yanggs@zjut.edu.cn