

猫须草纳米分散液的制备及其降尿酸活性研究

刘睿¹, 罗超², 朱君^{1,2}

(1. 纳米技术及应用国家工程研究中心, 上海 200241)

(2. 上海健康医学院 上海市分子影像学重点实验室, 上海 201318)

摘要: 纳米中药是近年来迅速发展起来的前沿科技领域。纳米技术和传统中药制剂的有机结合, 有力地推动了医药科技的发展。以猫须草为研究对象, 采用剪切、研磨和高压均质等方法制备了猫须草纳米分散液, 获得了平均粒径约为 100 nm 的均匀、稳定的分散体系, 研究了纳米分散液降尿酸(UA)的作用。结果表明: 相对于高尿酸模型组, 纳米分散液对 UA 的抑制率为 22.1%; 相对于水提液实验组, 纳米分散液表现出更好的降尿酸作用。通过进一步考察其对肝脏指标的影响, 探究了纳米分散液的毒副作用。相对于高尿酸模型组, 纳米分散液对肝脏谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)的表达水平未见明显影响, 这表明纳米分散液未引起明显的肝损伤。最后, 通过细胞实验证明了纳米分散液具有较低的细胞毒性。该实验表明猫须草纳米分散液的剂型在降尿酸方面具有潜在的应用价值, 为纳米中草药的应用提供了理论依据。

关键词: 猫须草; 纳米技术; 尿酸; 肝副作用; 细胞毒性

中图分类号: TB383 文献标识码: A 文章编号: 1674-3962(2021)04-0297-04

Preparation of Orthosiphon Stamineus Nano-Dispersion and Its Effect on Uric Acid

LIU Rui¹, LUO Chao², ZHU Jun^{1,2}

(1. National Engineering Research Center for Nanotechnology, Shanghai 200241, China)

(2. Shanghai Key Laboratory of Molecular Imaging, Shanghai University of Medicine & Health Sciences, Shanghai 201318, China)

Abstract: Nano-traditional Chinese medicine is a new research field that is developing rapidly in recent years. The combining of nanotechnology with traditional Chinese medicine produces an enormous influence on the development of medical science. In this paper, the preparation method of orthosiphon stamineus nano-dispersion is developed by shear grinding and high pressure homogenization. A uniform and stable nano-dispersion with average particle size of about 100 nm is obtained. Furthermore, the effect of the nano-dispersion on reducing uric acid (UA) is investigated. Compared with the model group, the inhibition rate of the nano-dispersion on UA is 22.1%, and compared with the water extract experimental group, the nano-dispersion shows a better effect on reducing UA. Additionally, the side effects of the nano-dispersion are evaluated by investigating the liver indexes, which shows that nano-dispersion causes less liver injury through detecting alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) of liver compared to that of the model group. Finally, the cytotoxicity of nano-dispersion is proved by cell experiment. The results show that the orthosiphon stamineus nano-dispersion has potential application in reducing UA, which can provide a theoretical basis for the reasearch of nano-dispersion about traditional Chinese medicine.

Key words: orthosiphon stamineus; nanotechnology; uric acid; liver side effect; cell cytotoxicity

1 前言

纳米中药是近年来迅速发展起来的一个新的研究领域。纳米中药制剂具有良好的药物可控性、递送性、缓释性以及生物相容性等特性, 可提高药物的生物利用度、降低用药量、减少药物毒副作用, 已成为材料学科、生命学科和中药学科的一个新的交叉前沿和热点^[1]。此外, 中药纳米制剂作为特效药物, 其对中药基础性发展的重

收稿日期: 2021-01-09 修回日期: 2021-02-04

基金项目: 上海市分子影像学重点实验室基金资助项目
(18DZ2260400)

第一作者: 刘睿, 女, 1980年生, 高级工程师

通讯作者: 朱君, 男, 1979年生, 研究员, 博士生导师,

Email: yzjzhu@163.com

DOI: 10.7502/j.issn.1674-3962.202101004

要性已得到了认可^[2],例如在肿瘤等疑难病治疗方面显示出惊人的效果^[3]。由此可见,纳米技术与中医药的结合已经对医学的发展产生了巨大的影响。

纳米技术与中草药结合的一类重要用途是采用纳米粉碎技术制备矿物药和难溶性药物等中药的超细粉。粉碎后的中草药性能具有一定优势,例如粒径的减小使得药物颗粒的比表面积迅速增大,药物的活性和生物利用率大幅提高,从而增加了疗效、减少了用量;另外,还能改善药物的溶出度、控制药量等^[4]。此类纳米粉碎技术主要包括:超微粉碎技术、固相分散技术、包合技术等^[5]。研究人员根据中草药含有的本质素、纤维、胶质、脂肪、糖类种类和数量的不同,选择不同的纳米粉碎技术^[6]。但是通过纳米粉碎技术制备的中草药纳米粉很难在水溶液中均匀分散形成稳定的分散液。因此,开发中草药混悬液成为开发液体剂型的一种重要方法^[7]。例如,研究人员制备了含有多种中草药成分的固体脂质纳米粒、纳米脂质体等混悬液^[8-10]。但是目前混悬液制剂多数是将中草药中有效成分,特别是油溶性强或者水油都不溶的成分进行包裹和纳米化^[11]。如何制备中草药药材均相、稳定的分散液仍具有一定的挑战性。

猫须草主要包括黄酮类、酚类、木脂素类、萜类及一些其它类化合物,具有抗炎、利尿、降压、降糖、抗氧化、保肝护肝和抗增殖等作用,可通过降尿酸、解热、镇痛、抗炎、抗氧化、抗纤维化等对痛风各期的病症发挥治疗作用,且毒副作用小,值得深入研究。但是到目前为止,关于猫须草纳米粉的研究报道仍然很少。因此,本文开发了一种猫须草纳米分散液的制备方法。通过建立大鼠的高尿酸模型,研究了猫须草纳米分散液的降尿酸作用;通过考察对其肝脏指标的影响,探究了猫须草纳米分散液的毒副作用;通过与人肺泡上皮细胞(HPA-EpiC)细胞共孵育,检测了猫须草纳米分散液的细胞毒性。本文的研究结果表明,猫须草纳米分散液的剂型在降尿酸方面具有潜在的应用价值,并能进一步为纳米中草药的应用提供理论依据。

2 实验

2.1 实验试剂

猫须草(上海健康医学院提供),糊精、非布司他(Feb)、氧嗪酸钾(中国医药集团有限公司提供),胎牛血清、F-12K培养基、青-链霉素(赛默飞世尔科技公司提供)。

2.2 实验仪器

细胞级超微粉碎机(TYM-8L,济南天宇专用设备有限公司),高压均质机(GS-120,朗灏孚纳米科技(上海)

有限公司),全自动生化仪(AU480, Beckman), IMark酶标仪(Bio-Rad)、CO₂恒温培养箱(Thermo)、纳米激光粒度仪(ZetasizerNano ZS, Malvern)、扫描电子显微镜(S-4800, Hitachi)。

2.3 猫须草纳米分散液的制备

称取500 g猫须草纯叶,经初步粉碎后,加入50 g糊精,混合均匀后将其置于细胞级超微粉碎机料筒内,降温至-10℃后开启机器工作7 min,制得猫须草超微细粉。将35 g猫须草超微细粉与100 mL去离子水混匀,经高压均质机处理(工作压力为160 MPa,循环往复5次),收集均质后的液体,获得猫须草纳米分散液。

作为参考组,称取35 g猫须草纯叶,经初步粉碎后与100 mL去离子水混匀,于100℃回流1 h,收集过滤后的液体,获得猫须草水提液。

2.4 猫须草纳米分散液的表征

利用纳米激光粒度仪检测分散液的粒径分布:将一定浓度的纳米分散液加入去离子水中,经超声分散3 min后移入样品池中,采用纳米激光粒度仪进行测试。

利用扫描电子显微镜观察分散液的形貌:将分散液滴在铝箔表面,氙灯下照射干燥后喷金60 s,采用扫描电子显微镜进行观察。

2.5 细胞实验

首先将人肺泡上皮细胞传代到96孔板中,细胞计数为每孔 5×10^3 ,并将其置于体积分数为5%的CO₂培养箱内在37℃下培育24 h;再将浓度分别为300, 700和1000 μg/mL猫须草纳米分散液的处理组分别加入到96孔板中,孵育24 h。孵育完成后,将质量分数为10%细胞计数试剂/磷酸缓冲盐(CCK/PBS)溶液加到各孔中,并再次在培养箱中孵育4 h。用IMark酶标仪检测96孔板各孔在450 nm波长处的吸光度(A值),计算各组吸光度的均值。以不添加纳米分散液的作为阴性对照组,将阴性对照组的吸光度值作为100%的细胞增殖率,则不同处理组的细胞活性(%)=处理组的平均吸光度值/对照组的平均吸光度值×100%。以上所有实验均采用5组以上的平均数值。

2.6 动物实验

猫须草具有降尿酸(UA)的作用,为了验证猫须草纳米分散液降尿酸的效果,制作了大鼠的高尿酸模型,即利用氧嗪酸钾腹腔注射获得高尿酸模型组(Model),同时以生理盐水腹腔注射获得的为空白对照组(Control)。再向高尿酸模型组分别注射猫须草纳米分散液和猫须草水提液获得纳米分散液实验组(Sample 1)和水提液实验组(Sample 2),同时以高尿酸模型组注射常用降尿酸药Feb为阳性对照组(Feb)。将体重400 g左右的实验大鼠

分为以上5组, 每组10个样本。其中, 实验组腹腔注射5 mL/kg 样品(折算后给药剂量为1.75 g/kg), 阳性对照组腹腔注射8 mg/kg 的Feb。观察给药后大鼠的一般表现, 并在给药后24 h将其处死取血, 静置离心取血清在全自动生化仪上分别检测UA值、谷丙转氨酶(ALT)值和谷草转氨酶(AST)值。

2.7 统计学分析

使用SPSS 18.0软件进行统计分析, 采用独立样本t检验的方法比较各组的均值并进行数据分析, 概率P值小于0.05时则认为具有统计学差异。

3 结果与讨论

猫须草纯叶经剪切、研磨后, 高压均质成固含量为3.5%的猫须草分散液(如图1所示), 该分散液3 h内未见沉淀。实验表征了猫须草纳米分散液的形貌、粒径和剪切面电位(Zeta 电位)。图2a为纳米分散液的SEM照片, 由图可知, 纳米分散液呈颗粒状, 单分散性很好, 未出现明显的团聚现象, 颗粒粒径在100 nm左右。由图2b

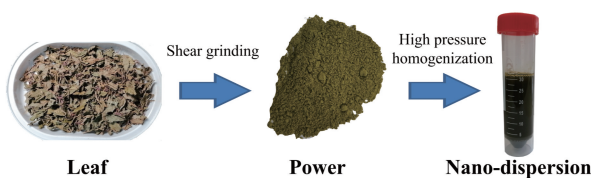


图1 猫须草纳米分散液制备示意图

Fig.1 Schematic diagram of the processing of orthosiphon stamineus nano-dispersion

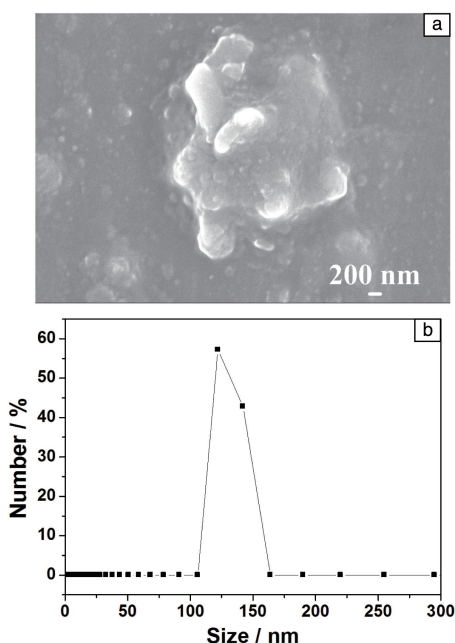


图2 猫须草纳米分散液的SEM照片(a)和水合粒径分布图(b)

Fig.2 SEM image (a) and size distribution (b) of the orthosiphon stamineus nano-dispersion

中的水合粒径分布图可知, 纳米分散液的平均水合粒径为130.7 nm, 分布较为集中。此粒径大于SEM观测的结果, 这是由猫须草除有效成分外含有的木质素、纤维等易于通过氢键作用吸附水分子形成络合水所致。综上, 本实验成功制备了猫须草纳米分散液, 其较小的粒径及较好的单分散性有利于其在生物学领域中的应用, 可以更容易地被生物体吸收后产生药物作用。纳米分散液的Zeta 电位为-17.6 mV, 这使得溶液中的纳米颗粒具有较好的斥力, 不易团聚。

图3为猫须草纳米分散液对大鼠血清UA水平的影响。由图3可知, 空白对照组的UA值为87.8 $\mu\text{mol/L}$, 高尿酸模型组的UA值为178.1 $\mu\text{mol/L}$, 约为空白对照组的2倍; 阳性对照组的UA值为42.7 $\mu\text{mol/L}$, 显示了预期的降尿酸作用($P < 0.001$), 该结果表明实验造模成功。进一步观察发现, 纳米分散液实验组大鼠血清中的UA值为138.6 $\mu\text{mol/L}$, 相对于高尿酸模型组其对UA的抑制率为22.1%, 具有较好的降尿酸作用($P < 0.05$); 水提液实验组大鼠血清中的UA值为158.5 $\mu\text{mol/L}$, 相对于高尿酸模型组其对UA的抑制率为11.0%, 也表现出降尿酸作用($P < 0.05$)。但从两个实验组对UA的抑制率来看, 纳米分散液表现出更好的降尿酸作用, 其原因可能在于猫须草纳米化后, 有效成分溶出更高, 更有利于机体对有效成分的吸收。

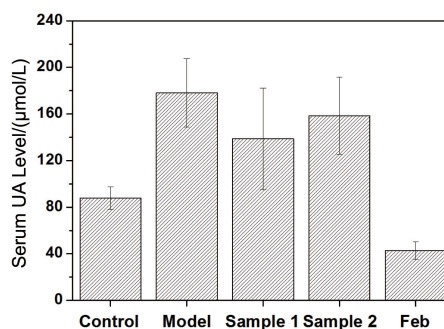


图3 猫须草纳米分散液对大鼠血清尿酸水平的影响

Fig.3 Effect of orthosiphon stamineus nano-dispersion on serum UA level in rats

为进一步探究猫须草纳米分散液的毒副作用, 研究了纳米分散液对肝脏指标的影响。图4a和4b分别为纳米分散液对大鼠血清中ALT和AST水平的影响。由图4a可知, 空白对照组和高尿酸模型组的ALT值接近, 分别为34.2和34.4 U/L; 阳性对照组的ALT值为29.0 U/L, 相对于高尿酸模型组下降了15.7%, 未见明显的肝损伤; 纳米分散液实验组血清中的ALT值为31.6 U/L, 相对于高尿酸模型组下降了8.1%, 也未见明显的肝损伤。同样地, 如图4b所示, 空白对照组和高尿酸模型组的

AST 值分别为 95.5 和 105.4 U/L, 高尿酸模型组表现出了轻微的肝损伤; 阳性对照组的 ALT 值为 93.4 U/L, 未见明显的肝损伤; 纳米分散液实验组血清中的 AST 值为 109.6 U/L, 相对于高尿酸模型组上升了 3.9%, 但由于该实验组的标准偏差(17.6)较大, 故并未显示出统计学显著性差异。以上结果表明, 样品组的 ALT 和 AST 水平相对于高尿酸模型组均未显示出明显的肝损伤。

图 5 为猫须草纳米分散液对 HPAEpiC 细胞活性的影响。如图 5 所示, 随着纳米分散液浓度的增加, 细胞存活率相对于对照组略有上升。但在相对大剂量(1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

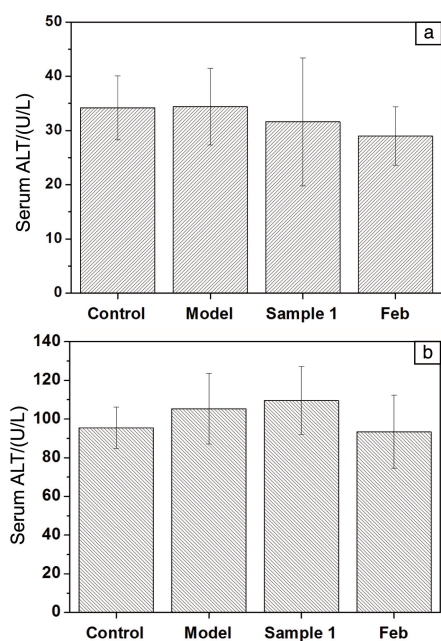


图 4 猫须草纳米分散液对大鼠血清谷丙转氨酶(a)和谷草转氨酶(b)的影响

Fig. 4 Effect of orthosiphon stamineus nano-dispersion on serum ALT (a) and AST (b) level in rats

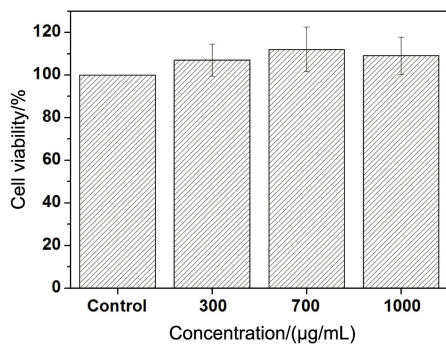


图 5 猫须草纳米分散液对人肺泡上皮细胞细胞活性的影响

Fig. 5 Effect of orthosiphon stamineus nano-dispersion on HPAEpiC cell viability

的条件下, 纳米分散液与 HPAEpiC 细胞共孵育培养 24 h 后, 细胞存活率呈现下降趋势。此结果表明, 猫须草纳米分散液与细胞共同孵育时, 细胞的状态良好, 表现出较低的细胞毒性。

4 结 论

本文采用剪切、研磨和高压均质法制备了猫须草纳米分散液, 其平均粒径约为 100 nm, Zeta 电位呈电负性。通过建立大鼠的高尿酸模型, 研究了猫须草纳米分散液的降尿酸作用。结果表明, 相对于高尿酸模型组, 纳米分散液对尿酸(UA)的抑制率为 22.1%; 相对于水提液实验组, 纳米分散液表现出更好的降尿酸作用。此外, 通过考察对肝脏指标的影响, 探究了猫须草纳米分散液的毒副作用。相对于高尿酸模型组, 纳米分散液对肝脏的谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)水平未见明显影响, 表明猫须草纳米分散液未引起明显的肝损伤。最后, 通过与人肺泡上皮细胞(HPAEpiC)细胞共孵育, 证明了猫须草纳米分散液具有较低的细胞毒性。本文的研究结果表明猫须草纳米分散液在降尿酸方面具有潜在的应用价值, 能为纳米中草药的应用提供理论依据。

参考文献 References

- [1] MA Z, FAN Y Q, WU Y M, *et al.* International Journal of Nanomedicine[J], 2019, 14: 2029-2053.
- [2] ZHANG Y K, LU P, QIN H, *et al.* Biomedicine & Pharmacotherapy[J], 2021, 133: 111072.
- [3] WU R. Nano Biomedicine and Engineering[J], 2010, 22(2): 193-200.
- [4] BILIA A R, BERGONZI M C, BOULOS J C, *et al.* World Journal of Traditional Chinese Medicine[J], 2020, 6(1): 26-38.
- [5] JIN W B, ZHOU T, LI G, *et al.* Journal of Chromatography A[J], 2019, 1606: 460377.
- [6] HU T, JIANG J G. Current Nanoscience[J], 2012, 8(3): 474-484.
- [7] WANG H, XIAO Y, WANG H, *et al.* International Journal of Pharmaceutics[J], 2019, 566: 67-76.
- [8] LI Y C, DONG L, JIA A, *et al.* International Journal of Biological Macromolecules[J], 2006, 38(3-5): 296-299.
- [9] MIRANDA M, CRUZ M T, VITORINO C, *et al.* Materials Science & Engineering C[J], 2019, 103: 109804.
- [10] ZHAO Y, CHANG Y X, HU X, *et al.* International Journal of Pharmaceutics[J], 2017, 516: 364-371.
- [11] ZHANG Y T, JING Q, HU H M, *et al.* International Journal of Pharmaceutics[J], 2020, 580: 119183.

(编辑 吴 锐)