

## 雷公藤甲素聚乳酸纳米粒对大鼠睾丸组织的影响

刘明星, 董 静, 杨亚江\*, 杨祥良, 徐辉碧  
(华中科技大学药物研究所, 湖北 武汉 430074)

**摘要:** 目的 观察采用聚乳酸纳米粒能否减轻雷公藤甲素的大鼠睾丸毒性。方法 雄性 Wistar 大鼠分别 ig 0.2 及 0.6 mg·kg<sup>-1</sup> 雷公藤甲素(非纳米粒组)及其聚乳酸纳米粒混悬液(纳米粒组), 连续给药 15 d, 以 ig 生理盐水的大鼠为对照组, 测定睾丸的脏器系数及其组织匀浆液中酸性磷酸酶(ACP)活性和果糖含量, 光镜观察睾丸组织的病理学变化。结果 在 0.6 mg·kg<sup>-1</sup> 剂量下, 非纳米粒组睾丸 ACP 活性和果糖的含量均明显低于纳米粒组( $P < 0.05$ )。光镜观察显示, 雷公藤甲素 0.6 mg·kg<sup>-1</sup> 可引起大鼠睾丸的损伤, 非纳米粒组引起的病变程度明显重于纳米粒组, 主要表现为睾丸萎缩, 各级生精细胞变性、坏死、数量减少或消失, 出现了多核巨细胞。结论 以聚乳酸作为药物载体的纳米体系, 可明显减轻雷公藤甲素对睾丸的毒性。

**关键词:** 雷公藤甲素; 聚乳酸; 纳米粒; 睾丸

中图分类号: R965.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2004)04-0305-04

雷公藤甲素(triptolide, TP)是中药雷公藤的主要有效成分之一, 经药理和临床试验表明它主要具有免疫抑制、抗炎及抗肿瘤等生物活性<sup>[1]</sup>。同时研究表明, TP 是雷公藤中毒性较大的单体之一, 大剂量服用对肝、肾、心血管系统及胃肠道有明显的毒性<sup>[2]</sup>, 同时对雄性生殖系统有一定的毒副作用<sup>[3]</sup>。因此其应用受到一定的限制, 如何既保持 TP 的生物活性, 又降低 TP 的毒副作用是开发新剂型需解决的关键问题。

收稿日期: 2003-09-02 接受日期: 2004-01-09

基金项目: 国家 863 计划项目(2001AA218051)

作者简介: 刘明星(1970-), 男, 湖北省大悟县人, 湖北理工学院在职博士研究生, 主要从事纳米药物控释和靶向性研究。

\* 联系作者 E-mail: yjyang@mail.hust.edu.cn Tel: (027)87547141

聚合物纳米粒作为药物载体释放体系在药物和基因输送方面具有许多优越性: 可缓释药物; 靶向输送; 减轻和避免毒副反应及建立一些新的给药途径等<sup>[4]</sup>。近年来具有可生物降解和生物相容性的聚乳酸[poly(*D, L*-lactic acid), PLA]作为载体材料的纳米控释系统的研究非常活跃<sup>[5]</sup>。

为了探讨载 TP 纳米粒对大鼠睾丸毒性的影响, 本文选择 PLA 作为药物载体, TP 为模型药物, 制备了 TP 聚乳酸纳米粒[TP-loaded poly(*D, L*-lactic acid) nanoparticles, TP-PLA-NP], 观察 TP-PLA-NP 和游离 TP 对大鼠睾丸组织生化指标及组织病理学的影响。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试剂及仪器

TP: 纯度 ≥ 95%, 福建中医药研究所提供; PLA: 平均分子量为 10197, 购自山东医疗器械研究所; poloxamer 188 为沈阳药科大学集琦药业有限责任公司产品; 酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP)测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

ZetaPALS 电位/动态激光粒度分析仪(Brookhaven, USA); 光学显微镜(Olympus, BH-2, Japan); 组织切片机(Leica, RM 2135, Germany); 紫外分光光度计(国产 7500 型)。

#### 1.2 雷公藤甲素聚乳酸纳米粒的制备及其粒径测定

采用改进的自乳化溶剂扩散法制备 TP-PLA-NP<sup>[6]</sup>, 简述如下: 将溶有 100 mg PLA 和 5 mg TP 的丙酮/无水乙醇(3/2, V/V)所组成的有机相(15 mL), 加入到 1% poloxamer188 水相(40 mL)中, 减压蒸出有机溶剂和一部分水, 制得 10 mL 带有乳光的胶态 TP-PLA-NP 混悬液, 药物浓度为 0.5 g·L<sup>-1</sup>, 4℃避光保存, 备用。TP-PLA-NP 的平均粒径经动态激光粒度分析仪测定为 169.7 nm。

#### 1.3 动物分组及用药

取 Wistar 大鼠, ♂, 2~3 月龄, 141~171 g, 华中科技大学同济医学院动物中心提供, 随机分为 5 组

( $n = 6$ ), 空白对照组每天 ig 生理盐水, 非纳米药物组分别每天 ig 游离 TP 0.2 及 0.6  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  (0.05% DMSO 配制), 载药纳米组分别每天 ig TP-PLA-NP (TP 0.2 及 0.6  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 连续 15 d。

#### 1.4 睾丸组织匀浆液的制备

给药 15 d 后, 动物称重, 立即断头处死, 常规分离睾丸, 用 4 °C 的生理盐水清洗后, 滤纸吸干称重, 求脏器系数。其睾丸按每 1 g (湿重) 加 10 mL 预冷的 1.0  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (pH 7.0) 磷酸盐缓冲液, 置于玻璃匀浆器内, 冰浴匀浆后, 9000  $\times g$  离心 10 min, 取上清液, 立即进行 ACP 活力和果糖含量的测定。

#### 1.5 酸性磷酸酶活力和果糖含量的测定

果糖含量采用间苯二酚显色法测定<sup>[7]</sup>。

ACP 活力测定采用磷酸苯二钠法, 按照试剂盒说明书操作。

#### 1.6 睾丸组织的光镜检查

取刚处死动物的睾丸, 用 10% 甲醛溶液固定, 常规石蜡切片, HE 染色, 光镜观察各组睾丸的病理学变化。

#### 1.7 数据处理

数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间差异采用双侧  $t$  检验。

## 2 结果

### 2.1 睾丸脏器系数、酸性磷酸酶活力及果糖含量的变化

表 1 结果显示, 各实验组睾丸脏器系数有不同程度地降低, 0.2  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  TP 组、0.2 及 0.6  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  TP-PLA-NP 组与对照组相比无明显变化, 但 0.6  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  TP 组有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

从表 1 结果同时可看出, 所有给药组大鼠睾丸中的 ACP 活力和果糖含量均低于对照组, 0.2  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  TP 组及 0.6  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  TP-PLA-NP 组与对照组相比有显著性变化 ( $P < 0.05$ ), 而 0.6  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  TP 组有非常显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 并且 0.6  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  TP 组与 0.6  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  TP-PLA-NP 组之间有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 睾丸组织的光镜检查

在实验过程中, 0.6  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  TP 组在 d 9 死亡 1 只大鼠, 尸检发现早期死亡者与同剂量的最后处死者变化相似, 但程度稍轻。从图 1B 中可看出, TP-PLA-NP 组大鼠睾丸主要表现为睾丸萎缩, 残存细胞排列紊乱, 少量精子、精原细胞和精母细胞消失, 形

**Tab 1. Effect of triptolide (TP) and its nanoparticles on organ index, acid phosphatase (ACP) activity and fructose content in testis**

TP/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	testis index/ %	ACP/ $\text{mmol} \cdot$ $\text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ protein	Fructose/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
Control	1.67 $\pm$ 0.2	0.35 $\pm$ 0.12	320 $\pm$ 31
TP 0.2	1.25 $\pm$ 0.2	0.15 $\pm$ 0.09*	190 $\pm$ 20*
0.6	0.91 $\pm$ 0.13*	0.08 $\pm$ 0.03**	91 $\pm$ 10**
TP-PLA-NP 0.2	1.18 $\pm$ 0.14	0.19 $\pm$ 0.06	231 $\pm$ 20
0.6	1.10 $\pm$ 0.13	0.17 $\pm$ 0.07*#	201 $\pm$ 20*#

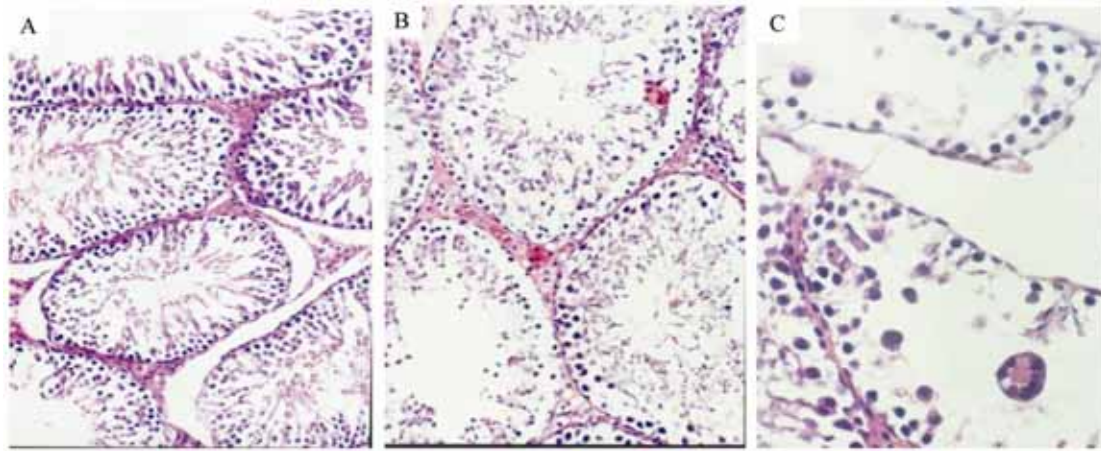
TP or its nanoparticles were administered ig daily for 15 d. TP-PLA-NP: TP-loaded poly(*D, L*-lactic acid) nanoparticles. Testis index: testis/body weight ratio.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5 - 6$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with control; #  $P < 0.05$ , compared with TP 0.6  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ .

成不规则空隙; 然而, 对于同剂量的 TP 组, 睾丸的整个曲细精管内几乎无精子、精原细胞和精母细胞可见, 管腔空旷, 精子严重变性坏死, 管腔内明显可见多个多核巨细胞(图 1C)。

## 3 讨论

精液中果糖和 ACP 分别是精囊和前列腺的特征性分泌物, 是反映两个腺体分泌功能的简便、灵敏而又特异的指标。在 TP-PLA-NP 组和 TP 组中, 大鼠睾丸的脏器系数、ACP 活性和果糖含量都明显低于正常对照组, 但 0.6  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  TP-PLA-NP 组与 0.6  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  TP 组之间有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 游离 TP 严重影响了睾丸曲细精管的生精功能, 引起果糖分泌异常, 阻碍了精子获能和其他活动, 导致精子活动率减少, 精子变形增加<sup>[8]</sup>。同时光镜观察发现, TP 组引起睾丸病变明显重于 TP-PLA-NP 组, 前者几乎所有曲细精管内各级生精细胞和精子消失, 精子严重变性坏死, 管腔内出现多个多核巨细胞。

0.6  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  TP-PLA-NP 组与 0.6  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  TP 组对睾丸的影响有显著不同, 可能是因为粒径约为 200 nm 的聚合物纳米粒的肝靶向性和包裹在纳米粒内的药物缓慢释放的结果。对于脂溶性较高和毒性较大的药物, 其临床应用受到一定的限制, 近年来迅速发展的纳米控释体系为其提供了一个很好的研究方法<sup>[9]</sup>, 根据纳米粒粒径的不同可有效地把药物输送到特定的靶部位<sup>[10]</sup>, 而且由于载体材料在体内



**Fig 1. Pathological changes in the testicle tissue after administration of triptolide and its nanoparticles (ig, 15 d).** A: control ( $\times 200$ ); B: TP-PLA-NP  $0.6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  ( $\times 200$ ), moderate degeneration and few necrosis of the spermatozoon, spermatid were observed; C: TP  $0.6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  ( $\times 400$ ), there were severe histologic damage with the decrease or necrosis of amount of the spermatozoon, spermatid and secondary spermatocyte, an appearance of multi-nucleus large cells.

的生物降解, 药物释放是一个缓慢的过程<sup>[11]</sup>, 从而减少药物对其他器官或靶器官的副作用。不难理解, 对于  $0.2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  TP-PLA-NP 组与  $0.2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  TP 组没有显著性变化, 但前者对睾丸的毒性相对较轻。

聚乳酸纳米体系能有效降低 TP 对大鼠睾丸的毒性作用, 对于它的降毒机理和分子生物学基础有待进一步研究, 同时纳米粒的靶向性研究现正在进行。

#### 4 参考文献:

- [1] Shamon LA, Pezzuto JM, Graves JM, Mehta RR, Wangcharoenrakul S, Sangsuwan R, et al. Evaluation of the mutagenic, cytotoxic, and antitumor potential of triptolide, a highly oxygenated diterpene isolated from *Tripterygium wilfordii*[J]. *Cancer Lett*, 1997, **112**(1):113 - 117.
- [2] Sun X, Zhang SM, Tian CH, Yang L, Wang LM, Li SL. Safety of *Tripterygium wilfordii*[J]. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2001, **10**(7):539 - 543.
- [3] Liu L, Wang ZY, Huang GZ, Liu Y. The influence of triptolide sub-chronic intoxication on kidney and testicle in mice [J]. *Acta Univ Med Tongji* (同济医科大学学报), 2001, **30**(3):214 - 217.
- [4] Kawashima Y. Nanoparticulate systems for improved drug delivery[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, **47**(1):1 - 2.
- [5] Chang J, Liu HF, Yao KD. Recent advances in medical nanoparticles[J]. *Chin J Biomed Eng* (中国生物医学工程学报), 2000, **19**(4):423 - 431.
- [6] Murakami H, Kobayashi M, Takeuchi H, Kawashima Y. Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method[J]. *Int J Pharm*, 1999, **187**(2):143 - 152.
- [7] Gonzales GF, Villena A. Influence of low corrected seminal fructose levels on sperm chromatin stability in semen from men attending an infertility service[J]. *Fertil Steril*, 1997, **67**(4):763 - 768.
- [8] Lin YZ, Peng SJ, Chen SH, Liu SP, Zou GL. Effect of triptolide on metabolism of testicular tissue in rats[J]. *J Wuhan Univ(Nat Sci Ed)* (武汉大学学报·自然科学版), 1999, **45**(2):200 - 202.
- [9] Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Ruzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices[J]. *J Control Release*, 2001, **70**(1-2):1 - 20.
- [10] Hans ML, Lowman AM. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting[J]. *Curr Opin Solid State Mater Sci*, 2002, **6**:319 - 327.
- [11] Gorner T, Gref R, Michenot D, Sommer F, Tran MN, Del-lacherie E. Lidocaine-loaded biodegradable nanospheres. I. Optimization of the drug incorporation into the polymer matrix[J]. *J Control Release*, 1999, **57**(3):259 - 268.

## Effect of triptolide-loaded poly(*D, L*-lactic acid) nanoparticles on testicle tissue in rats

LIU Ming-Xing, DONG Jing, YANG Ya-Jiang\*, YANG Xiang-Liang, XU Hui-Bi

(Institute of Materia Medica, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

**Abstract:** **AIM** To study if poly(*D, L*-lactic acid) nanoparticles can reduce the toxicity of triptolide(TP) on testicle tissue in rats. **METHODS** Male rats were treated respectively with a 15 d successive oral administration of 0.2, 0.6 mg·kg<sup>-1</sup> TP or the suspension of TP-loaded poly(*D, L*-lactic acid) nanoparticles (TP-PLA-NP, containing TP 0.2, 0.6 mg·kg<sup>-1</sup>). The rats in control group were treated with normal saline. The testis organ index, the content of fructose and the activity of acid phosphatase (ACP) in testicular hemogenate were measured and the pathological changes in testicular tissue were observed by optical microscope. **RESULTS** The ACP activity and fructose content in TP 0.6 mg·kg<sup>-1</sup> group were significantly lower than that in TP-PLA-NP 0.6 mg·kg<sup>-1</sup> group. Meanwhile, the testicular lesion in rats caused by TP was observed and the

damage in TP group was more serious than that in the TP-PLA-NP group. The testicle of rats in TP 0.6 mg·kg<sup>-1</sup> group were shown with atrophy of testicle, severe degeneration and necrosis of amount of the spermatozoon, spermatid and secondary spermatocyte, and even an appearance of multi-nucleus large cells. **CONCLUSION** The nanoparticles system of poly(*D, L*-lactic acid) as a drug carrier material may obviously abate the toxicity of the testicle in rats caused by TP.

**Key words:** triptolide; poly(*D, L*-lactic acid); nanoparticles; testis

**Foundation item:** The project supported by National 863 Key Research Projects(2001AA218051)

\* Corresponding author.

(本文编辑 石 涛)

### 关于申报评选 2004 年第八届中国药理学会 Servier 青年药理学工作者奖的通知

中国药理学会经与法国 Servier 研究院商定,第八届中国药理学会 Servier 青年药理工作者奖将于 2004 年 10 月评出。现将有关报名事宜通知如下:

#### 一、获奖候选人条件

① 2004 年 5 月 15 日以前入会中国药理学会会员(老会员已交纳 2004~2006 年会费的);② 年龄在 40 岁以下(1964.7.1 以后出生);③ 在国内从事药理学研究并取得优秀成绩,不包括在国外做过的工作;④ 至少 2 年以上在国内工作经历(包括 2 年以上工作经历的硕士、博士研究生),并没有近期出国(指出国工作或长期学习)计划的人员(从申报起一年内);⑤ 申请者必须有两名中国药理学会会员作为推荐专家,提供推荐信;⑥ 提交近三年在国内完成的发表或未发表的论文参加评选。

#### 二、报名及评选程序

申请者须提供以下材料:① 按要求填写申报表(申报表可在中国药理学会网站下载或向学会办公室索取);② 论文一篇,全文用中文或英文撰写(用 A4 纸打印)并附软盘(Word 格式或文本文件);③ 二位药理学会的专家(教授或相当职称者)的推荐书。

将报奖材料于 2004 年 8 月 30 日前提交学会办公室,进行资格审查,不符合标准及虚假材料将取消评审资格。学会评奖委员会评选 12 名候选人报法国 SERVIER 研究院评审。从中评选中国药理学会 Servier 青年药理工作者奖 8 名,中国药理学会青年药理学工作者奖 4 名。获奖者将获得奖状和奖金。

2004 年颁奖大会将在 2004 年 10 月中法药理学术会议(详细情况见通知,或向学会索取通知)期间举行。

药理学会通讯地址:北京先农坛街一号 邮编:100050 联系人:赵小丹 (010)63165211(O) (010)65271835(H);孙静霞 (010)63165385 (H) 电子信箱:zhxd@imm.ac.cn; 传真:(010)63165211; 中国药理学会网页:www.cnphars.org