

PEG 化葛根素降低红细胞溶血的体内研究

刘新义¹, 李健和¹, 易利丹¹, 胡雄彬¹, 唐甜甜¹, 向大雄^{1*}, 叶祖光^{2*} (1.中南大学湘雅二医院药学部, 长沙 410013; 2.中国中医科学院, 北京 100700)

摘要: 目的 探讨 PEG 修饰技术降低葛根素诱导红细胞溶血的体内研究。方法 采用葛根素注射液和 PEG 化葛根素给予家兔每天等剂量静脉注射, 连续 7 d, 每天取血 3 mL, 进行血细胞计数分析; 7 d 实验结束后再取血, 检测红细胞渗透脆性和红细胞膜流动性。结果 血细胞计数分析结果表明, PEG 化葛根素组家兔的血细胞计数与空白对照组没有显著性差异, 而葛根素注射液组家兔出现了血管内容血现象; 红细胞渗透脆性和红细胞膜流动性结果表明, PEG 化葛根素可以降低红细胞渗透脆性和增强红细胞膜流动性。结论 PEG 修饰技术可以减轻葛根素诱导血管内容血的不良反应, 更安全。**关键词:** PEG 化葛根素; 葛根素注射液; 血细胞计数分析; 红细胞渗透脆性; 红细胞膜流动性

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2014)04-0402-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.04.004

Study on Reducing Hemolysis by PEGylated Puerarin *in Vivo*

LIU Xinyi¹, LI Jianhe¹, YI Lidan¹, HU Xiongbin¹, TANG Tiantian¹, XIANG Daxiong^{1*}, YE Zuguang^{2*} (1. Department of Pharmacy, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410013, China; 2. China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the reducing hemolysis effect induced by PEGylation of puerarin via *in vivo*. **METHODS** Rabbits were once-daily given the same dose of puerarin injection and PEGylated puerarin intravenously for 7 days, 3 mL blood was taken every day and used for complete blood counts analysis. At the end of 7 days of experiment, blood was taken for the determination of osmotic fragility of RBC and erythrocyte membrane fluidity. **RESULTS** Blood counts analysis indicated that there was no significant difference between PEGylated puerarin group and blank control group. Osmotic fragility of RBC and erythrocyte membrane fluidity indicated that PEGylated puerarin could reduce osmotic fragility of RBC and enhance erythrocyte membrane fluidity. **CONCLUSION** PEGylation technology could reduce intravascular hemolysis induced by puerarin, which is more safe.

KEY WORDS: PEGylated puerarin; puerarin injection; blood counts analysis; osmotic fragility of RBC; erythrocyte membrane fluidity

葛根素是从中药野葛 [*Pueraria lobata*(Willd.) Ohwi] 中提取的主要有效成分, 具有抗心律失常、抗心肌缺血和保护缺血的心肌和脑组织等作用, 临床上常用葛根素注射液治疗冠心病、心绞痛、心率失常等多种心脑血管疾病^[1-3]。虽然葛根素在临床上应用十分广泛, 但急性血管内容血反应严重, 极大限制了葛根素的临床应用。目前关于降低溶血的方法有牛磺酸配伍、亚微乳包裹等, 尽管这些方法能不同程度上减少溶血现象, 但不能从葛根素本身角度解决溶血的根本问题^[4-5]。本研究拟采用水溶性强、血液相容性良好的高分子聚乙二醇(PEG)材料修饰葛根素, 前期体外研究发现葛根素经 PEG 修饰后, 水溶性增强约 13 倍, 半

衰期延长 5.2 倍, 药效方面略有增强, 红细胞溶血现象明显减少^[6-8]。在此基础上, 对其体内溶血进行评价研究, 为其今后新型给药系统的临床应用奠定基础。

1 材料

1.1 仪器与试剂

BM830 全自动血细胞分析仪(泰诺科贸有限公司); 偏正二次靶 X 荧光光谱仪(佛山市仁孚机电设备有限公司); MK3 芬兰雷勃酶标仪(苏州江东精密仪器有限公司); 葛根素注射液(烟台鲁银药业有限公司, 批号: 120809, 规格: 2 mL : 0.1 g); mPEG 化葛根素[葛根素含量为 4.01%, 相对分子质量为 5 100, 纯度为 98%; 采用分子量为 4700

基金项目: 湖南省自然科学基金(14JJ3038)

作者简介: 刘新义, 男, 博士, 药师 Tel: (0731)85292093 E-mail: liuxinyi128@126.com *通信作者: 向大雄, 男, 博士, 主任药师
Tel: (0731)85292129 E-mail: xiangdaxiong@163.com 叶祖光, 男, 硕士, 研究员 Tel: (010)64014411 E-mail: yezuguang@sina.com

的 mPEG-COOH 与葛根素葡萄糖上的 3''-OH 和 6''-OH 按照 2:1 的摩尔比反应,其中以 *N,N'*-二环己基碳二酰亚胺(DCC)为脱水剂,4-二甲氨基吡啶(DMAP)为催化剂,通过缩合成酯反应,经凝胶柱色谱反复纯化,经 UV、IR、¹H-NMR、¹³C-NMR 光谱综合解析,PEG 化葛根素的化学结构为 2 个 PEG 分子链接于葛根素葡萄糖上的 3''-OH 和 6''-OH]。

1.2 动物

家兔来源于中南大学湘雅医学院实验动物中心,生产许可证号:SCXK(湘)-2010-0002。

2 方法

2.1 分组及给药

50 只家兔,♂,体质量 1 500~1 800 g,按体质量随机分为 3 组,分别为葛根素注射液组(按照临床人常用剂量进行换算,耳外缘静脉注射液剂量为 22 mg·mL⁻¹);PEG 化葛根素组 552 mg·mL⁻¹ (PEG 化葛根素中葛根素含量为 4.01%,剂量折算后与葛根素注射液等剂量);空白对照组注射等量的生理盐水,每只动物每天给药 1 次,连续给药 7 d。

2.2 检测指标

2.2.1 血细胞计数分析 每天给药后 2 h,从兔耳缘静脉取血 3 mL 于离心管,离心管预先加入 1.5% 的 Na₂-EDTA 溶液处理(平均 5 mL 血液用 0.4 mL Na₂-EDTA 溶液),防止凝血,移取 2 mL 血样于全自动血细胞计数分析仪测定红细胞数(RBC),红细胞压积(HCT),红细胞平均血红蛋白含量(MCH),血红蛋白(Hb),红细胞平均血红蛋白浓度(MCHC)。

2.2.2 红细胞渗透脆性^[6] 配制 0.03~0.14 mmol·L⁻¹ 系列浓度的 NaCl 溶液,各取 2 mL 分装于玻璃试管中备用。给药 7 d 后,从各组家兔耳缘静脉取血 5 mL 于洁净玻璃试管中,摇匀,3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,取下层红细胞悬液 50 μL,加入到上述系列浓度的 NaCl 溶液玻璃试管中,各管置于 37 °C 生化培养箱中孵育 2 h,然后观察各管的溶血程度及血细胞的凝集情况(随时轻微振摇,使其分散),1 500 r·min⁻¹ 离心,精密吸取上清液 400 μL,转移到 96 孔酶标板,用酶标仪于 540 nm 处测定吸光度(OD),按以下公式计算溶血率。溶血率=(样品管 OD 值-阴性对照管 OD 值)/(阳性对照管 OD 值-阴性对照管 OD 值)×100%。以生理盐水管为阴性对照管,蒸馏水管为阳性对照管,计算各管的溶血率。最后采用合适的数学模型,建立 NaCl 浓度

与溶血率的关系,计算葛根素注射液组、PEG 化葛根素组和空白对照组各自的 H_{50%}(红细胞溶血率为 50%时所对应的 NaCl 浓度)。

2.2.3 红细胞膜流动性^[9-10] 采用四氢呋喃作溶剂配制 2×10⁻³ mol·L⁻¹ 的储存液,于棕色瓶中 4 °C 低温保存,四氢呋喃工作液临用前以等渗 PBS 稀释。从各组家兔耳缘静脉取血 5 mL 于洁净玻璃试管中,采用等渗 PBS 稀释至合适浓度,然后与四氢呋喃工作液等体积混匀,于 37 °C 水浴孵育,检测偏振荧光(激发光波长:362 nm,发射光波长:430 nm),以空白对照组为基准,按下列公式计算荧光偏振度 *P* 和膜微黏度 η ,比较 2 组药物对红细胞膜流动性的影响。

$$P=(I_{VV}-GI_{VH})/(I_{VV}+GI_{VH}); \eta=2P/(0.46-P)$$

式中 *I_{VV}* 和 *I_{VH}* 分别是起偏和检偏器光轴为垂直和水平方向时测得的荧光强度;G 是校正因子。

2.3 统计处理

所获数据采用 SPSS 13.0 处理,各处理组之间的差异进行独立样本 *t* 检验,红细胞渗透脆性值与生理盐水浓度值关系采用 Sigma Plot 12.0 软件进行数学模型拟合。

3 结果与讨论

3.1 血细胞计数分析

与空白对照组比较,葛根素注射液连续给药 7 d 后,血液 RBC、Hb、HCT、MCH 和 MCHC 均下降,空白对照组的血细胞计数无明显变化,由此推断葛根素注射液高剂量连续给药可诱导家兔血管内溶血。原因可能是体内蓄积的葛根素可形成一种异己的新抗原,刺激机体免疫系统,使敏感型个体产生相应的药物性抗体,当葛根素再次进入体内后可形成一种药物性新抗原,抗体再作用于新抗原,形成“抗原-抗体复合物”,同时活化补体系统参与反应,造成红细胞损伤而导致溶血。另外,葛根素注射液高剂量连续给药造成体内蓄积,对肝肾等造血系统造成损伤也可能导致溶血。PEG 化葛根素连续注射给药后,血细胞计数各项指标参数变化不大,与空白对照组基本持平,说明 PEG 修饰技术可以降低原型药物的红细胞溶血。原因可能是 PEG 作为一种新型高分子药物载体材料,具有良好的血液相容性,PEG 修饰葛根素药物后,由于臂膀式的高分子化学结构,可以完全掩盖原型药物的抗原性,在体循环过程中不会破坏血液系统的相对稳定;且在体内可以

自行降解成小片段分子, 通过肾脏排泄, 故不会造成体内蓄积。由此理论上推测, PEG 修饰技术

降低葛根素的溶血作用具有可行性。血细胞计数分析结果见图 1。

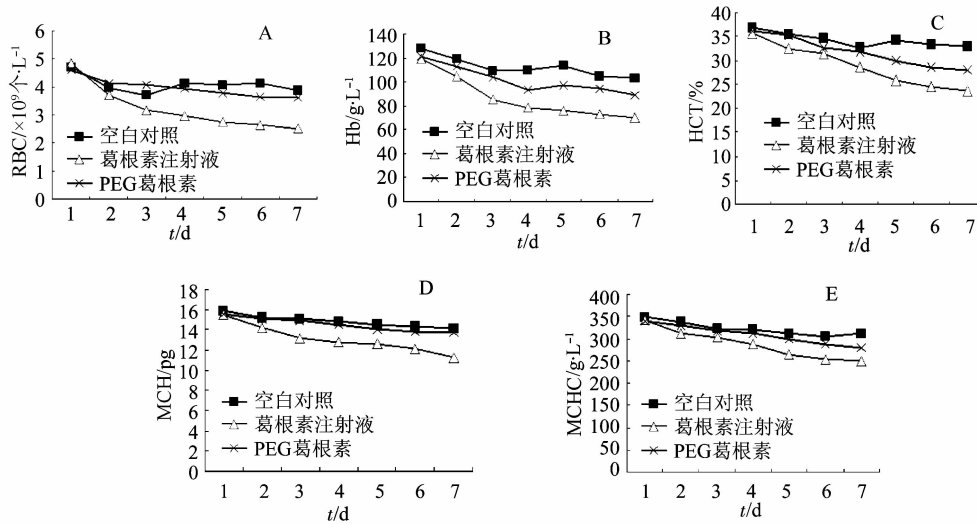


图 1 血细胞计数分析图

A-红细胞数(RBC); B-血红蛋白(Hb); C-红细胞压积(HCT); D-红细胞平均血红蛋白含量(MCH); E-红细胞平均血红蛋白浓度(MCHC)

Fig 1 Blood counts analysis

A-brythrocyte counts(RBC); B-hemoglobin(Hb); C-hematocrit(HCT); D-mean corpuscular hemoglobin(MCH); E-mean corpuscular hemoglobin concentration(MCHC)

3.2 红细胞渗透脆性

红细胞渗透脆性曲线见图 2。葛根素注射液组红细胞溶血率最大, 说明葛根素对红细胞具有一定的刺激作用, 导致其抗低渗 NaCl 溶液能力下降。葛根素注射液的 $H_{50\%}$ 为 $0.090 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, PEG 化葛根素组溶血率则相对较小, 其 $H_{50\%}$ 为 $0.031 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 甚至小于空白对照组的 $H_{50\%}$ ($0.082 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 结果见表 1。原因可能是 PEG 化葛根素具有长链状大分子化学结构, 能缠绕并附着在红细胞表面, 相当于固定了整个红细胞体系的空间布局, 减少红细胞相互之间的聚集, 降低红细胞之间相互碰撞而导致溶血的可能性, 故溶血率较低。

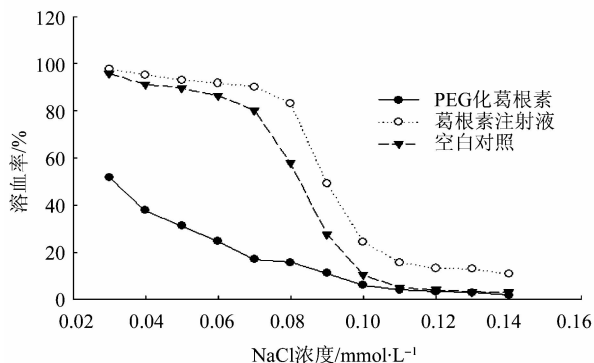


图 2 红细胞渗透脆性曲线

Fig 2 Osmotic fragility curves of erythrocytes

表 1 红细胞渗透脆性曲线方程

Tab 1 Curvilinear equation of osmotic fragility curves of erythrocytes

组别	曲线方程	$H_{50\%}/\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$
空白对照组	$y = 3.0928 + \frac{89.0859}{1 + e^{\frac{(x-0.082)}{0.0072}}}, r = 0.9993$	0.082
葛根素注射液组	$y = 12.6210 + \frac{81.9888}{1 + e^{\frac{(x-0.0892)}{0.0057}}}, r = 0.9989$	0.090
PEG 化葛根素组	$y = -11.3455 + \frac{105.2873}{1 + \left(\frac{x}{0.0384}\right)^{1.5635}}, r = 0.9970$	0.031

3.3 红细胞膜流动性

与空白对照组比较, 葛根素注射液组的荧光偏振度明显增大, 微黏度明显增大, 红细胞膜流动性下降显著, PEG 化葛根素荧光偏振度与葛根素注射液相比显著减少, 基本与空白对照组数据相近, 与葛根素注射液组比较, 经 t 检验存在显著性差异, 由此表明, PEG 修饰技术具有稳定红细胞膜, 增强膜流动性的作用, 结果见表 2。

4 结语

综上所述, PEG 修饰技术可以降低葛根素药物诱导的红细胞溶血, 降低红细胞渗透脆性和增强红细胞膜流动性, 从而保护了红细胞正常结构和功能, 进一步证实了 PEG 修饰技术具有一定的

表 2 各组药物对红细胞膜流动性差异

Tab 2 Effect of each group on the membrane fluidity of erythrocyte membrane

组别	剂量/ mg·mL ⁻¹	P	η
葛根素注射液组	22	0.349±0.007	6.276±0.008
空白对照组	-	0.227±0.004 ¹⁾	2.015±0.005 ²⁾
PEG 化葛根素组	552	0.251±0.006 ¹⁾	2.402±0.003 ²⁾

注: 与葛根素注射液组比较, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01

Note: Compared with puerarin injection group, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01

抗溶血作用。这些实验结果表明 PEG 修饰技术减少了葛根素的溶血不良反应, PEG 化葛根素具有较好的安全性。

REFERENCES

- [1] YU J Q, GAO E. Research progress in pharmacological activities of puerarin on cardio-cerebral-vascular system [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med(现代中西医结合杂志), 2008, 17(24): 3880-3882.
- [2] ZHANG H Y, LI D W, SHI C H. Advances in studies on clinical practice of puerarin [J]. Drugs Clin(现代药物与临床), 2012, 27(1): 75-78.
- [3] HUANG P, GONG Y S, FAN X W, et al. Effect of puerarin on Apelin/APJ system in right ventricle of pulmonary hypertensive rats induced by hypoxia-hypercapnia [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2008, 39(4): 565-569.
- [4] LI G. Research on biological assessment of anti-hemolysis compound puerarin injection [D]. Yangcheng: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2009.
- [5] YUE P F, YUAN H L, CONG L B, et al. Study on preparation and anti-hemolysis activity of puerarin submicron emulsion [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2008, 43(2): 119-123.
- [6] LIU X Y, LI J R, WANG N J, et al. Alleviation of PEGylated puerarin on erythrocyte hemolysis induced by puerarin in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient rats [J]. Chin Herb Med, 2013, 5(1): 47-52.
- [7] LIU X Y, YU B Y, WANG N J, et al. A validated stability-indicating HPLC method for the determination of PEGylated puerarin in aqueous solutions [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2010, 878(23): 2061-2066.
- [8] LIU X Y, ZHI H Y, DU F, et al. A HPLC-UV method for the determination of puerarin in rat plasma after intravenous administration of PEGylated puerarin conjugate [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2010, 878(31): 3297-3302.
- [9] YANG Y, YE X L, LI X G. Effect of berberine on membrane fluidity and membrane protein fluorescence of rabbit red-blood cells [J]. J Fourth Mil Med Univ(第四军医大学学报), 2009, 30(17): 1627-1629.
- [10] ZHANG L Q, GUI X, et al. Clinical significance of changes of membrane fluidity of akaryocyte in hypoxic ischemic(HIE) of newborn [J]. Chin Rem Clin(中国药物与临床), 2010, 10(10): 1154-1155.

收稿日期: 2013-06-05

牡荆苷对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的影响

周晨慧, 张雪, 徐道华* (广东医学院, 广东 东莞 523808)

摘要: 目的 探讨牡荆苷对体外培养大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的影响。方法 采用 MTT 法检测牡荆苷对骨髓间充质干细胞生存率的影响, 以对硝基苯磷酸盐法检测碱性磷酸酶活性, 茜素红法染色评价钙化结节形成。实时荧光定量 PCR 检测 runt-related transcription factor 2(Runx2)和 osterix(Osx)表达。结果 牡荆苷在 0.1~50 μmol·L⁻¹ 浓度内对骨髓间充质干细胞生存率无显著影响。牡荆苷能明显提高骨髓间充质干细胞内碱性磷酸酶活性, 并能促进钙化结节形成。牡荆苷也上调 Runx2 和 Osx 基因表达。结论 牡荆苷可促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞方向分化, 其作用可能与上调 Runx2 和 Osx 基因表达有关。

关键词: 牡荆苷; 骨髓间充质干细胞; 成骨分化

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2014)04-0405-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.04.005

Effect of Vitexin on the Osteogenic Differentiation of Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

ZHOU Chenhui, ZHANG Xue, XU Daohua* (Guangdong Medical College, Dongguan 523808, China)

基金项目: 东莞市科技计划资助项目(2011108102019)

作者简介: 周晨慧, 女, 博士, 讲师 Tel: (0769)22896506

E-mail: chenhuizh@126.com

*通信作者: 徐道华, 男, 博士, 教授,

硕导 Tel: (0769)22896551 E-mail: daohuax108@163.com