

雷公藤甲素阿魏酸醇质体凝胶经皮给药的长期毒性

陶玲^{1,2}, 白敦耀¹, 臧振中², 陈丽华², 关志宇², 朱卫丰², 管咏梅^{2*}

(1. 武汉科技大学附属武汉市普仁医院, 武汉 430081;

2. 江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004)

[摘要] 目的:考察雷公藤甲素(TP)阿魏酸醇质体凝胶经皮给药长期应用的安全性。方法:制备TP阿魏酸醇质体凝胶低、中、高剂量组(TP低、中、高剂量组)和空白组,对雄雌各半的SD大鼠进行破损皮肤和完整皮肤的分组后,每日经皮给药剂量TP低、中、高剂量组分别为63.75、127.50、255.00 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,连续给药12周,对每周大鼠体质量进行评估,最后1周处死大鼠进行生化指标的测定、进行脏器系数和病理组织学的检查,综合评估其毒性。结果:长期给药后,与完整皮肤空白组比较,各组大鼠体质量差异无统计学意义,血液生化指标差异无统计学意义,提示TP阿魏酸醇质体凝胶的皮肤给药相对安全,但在长期给药后期,TP高剂量组大鼠出现明显的毛发稀疏,用适宜剂量水合氯醛麻醉脱毛时,也极易出现死亡,提示大鼠基础状态不佳;与雌性完整皮肤空白组比较,雌性破损皮肤TP中剂量组脏器系数降低($P<0.05$),提示一定的心脏损伤;皮肤组织切片和肺部组织切片亦提示一定损伤,且与给药剂量、性别及皮肤状态均成一定的相关性。结论:TP阿魏酸醇质体凝胶临床应用相对安全,但长期应用可能存在皮肤和肺部的损伤,根据肝肾功能及皮肤状态制订个体化的给药方案可进一步确保临床用药的安全性。

[关键词] 雷公藤甲素;阿魏酸;醇质体凝胶;经皮给药;长期毒性

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)07-0095-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220621

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220113.1142.001.html>

[网络出版日期] 2022-01-14 13:00

Chronic Toxicity of Triptolide and Ferulic Acid Ethosomes Gel for Percutaneous Administration

TAO Ling^{1,2}, BAI Dun-yao¹, ZANG Zhen-zhong², CHEN Li-hua², GUAN Zhi-yu²,
ZHU Wei-feng², GUAN Yong-mei^{2*}

(1. Puren Hospital Affiliated to Wuhan Science & Technology University, Wuhan 430081, China;

2. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine Under Ministry of Education, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the long-term safety of triptolide ferulic acid ethosome gel in percutaneous administration. **Method:** We mixed triptolide with ferulic acid to make liposomes gel in different doses and then administrated the gel to SD rats of both sexes with intact skin and damaged skin for 12 weeks. The daily dosages calculated based on triptolide for the low-, middle-, and high-dose groups were 63.75, 127.50, 255.00 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively. The body weight of each rat was measured weekly. The rats were sacrificed in the last week for the determination of serum biochemical parameters and organ indexes as well as the observation of histopathology. The toxicity was assessed based on the body weight and all the parameters and indexes. **Result:** After long-term administration, the body weight and serum biochemical parameters did not show significant

[收稿日期] 2021-10-29

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81460607,82060722)

[第一作者] 陶玲,硕士,主管(中)药师,从事临床药理学和用药安全研究,E-mail:1445610008@qq.com

[通信作者] *管咏梅,博士,博士生导师,从事中药新剂型与新技术研究,E-mail:guanym2008@163.com

difference between the gel-treated groups and the blank group with intact skin, which indicated that the percutaneous administration of triptolide and ferulic acid ethosomes gel was relatively safe. However, the rats in the high-dose group showed sparse hair and were easy to die in the case of unhairing with chloral hydrate at the late stage of the study. Compared with the female rats with intact skin in the blank control group, the female rats with damaged skin in the middle-dose group showed decreased heart index ($P<0.05$), which indicated certain cardiotoxicity. Moreover, damage appeared in skin and lung, which may be influenced by dosage, sex, and skin state. **Conclusion:** Ferulic acid in combination with triptolide is relatively safe for percutaneous administration, whereas there are some risks of skin and lung damage in the case of long-term administration. Individualized administration scheme should be developed according to liver and kidney function and skin conditions to ensure the safety of clinical medication.

[Keywords] triptolide; ferulic acid; ethosomes gel; percutaneous administration; chronic toxicity

雷公藤 *Tripterygium wilfordii* 又名震龙根、莽草、黄藤、断肠草等,是卫矛科雷公藤属植物雷公藤根的木质部^[1],具有缓解风湿痛,活血化瘀的作用。雷公藤甲素(TP)是其主要有效成分,在临床上被广泛用于治疗各种自身免疫性疾病、肿瘤和各种皮肤疾病,特别是在治疗类风湿性关节炎(RA)方面疗效显著^[2-7]。但从其应用至今,其毒性一直为大众所关注,也一定程度上限制了其临床应用,为了解决临床应用安全性的问题,专家学者提出了各种方法,包括传统炮制减毒、配伍减毒和制剂减毒、现代生物技术结构修饰减毒等^[8-13],或是从临床出发,制定了相关的临床实践指南^[14]等,但国家药品不良反应监测中心仍多次警示雷公藤制剂可引起肝、肾、血液系统和生殖系统的损害,且有作者对中药致肾损伤的 CiteSpace 科学文献进行可视化分析,发现突现结束年份为2020年,且突现强度最高的中药关键词为雷公藤及其制剂^[15],提示雷公藤安全性问题仍为临床迫切需要解决的问题。前期研究表明,TP与阿魏酸配伍可起到减毒增效的作用^[16-17],TP阿魏酸醇质体凝胶具有良好的透皮吸收性^[18],有利于临床安全有效的用药。尽管人们对雷公藤在胃肠道给药后的心血管、血液循环、泌尿生殖道等多器官的损伤已经给予了足够的重视,但外用给药的安全性,尤其是对全身系统长期作用的安全性仍然缺乏相关证据,且RA是一种慢性全身性自身免疫性疾病,无法治愈,反复加重^[19-21],需要长期使用药物,而频繁的经皮给药可能破坏皮肤的自然结构,会在一定程度上增加皮肤的渗透性,导致不良反应/事件发生率的增加,而且随着人口老龄化不断加剧,RA的发病率逐年升高,而老年患者多合并多种慢性疾病,日常需服用多种药物,TP为细胞色素P4503A4酶(CYP3A4)的底物,药动学可能会受到CYP3A4诱

导剂和抑制剂的影响^[22],有文献报道TP与阿托伐他汀可增强肝损伤^[23],为了确保临床应用的安全性,有必要进行长期毒性实验,对长期给药的安全性进行评估。

1 材料

1.1 动物 80只SPF级SD大鼠,雄雌各半,180~220g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,合格证号SCXK(湘)2018-0003。饲养条件:室内相对湿度40%~80%,室温22~24℃,每天光照12h,相应的动物饲料和高压蒸汽灭菌后的自来水由动物自行取食或饮用。本研究所涉及的动物实验经江西中医药大学研究伦理委员会审查批准,批准号JZLLSC20210033。

1.2 药品 TP阿魏酸醇质体凝胶中TP和阿魏酸均为对照品,阿魏酸对照品(纯度≥98%,成都普菲德生物技术有限公司,批号151103),TP对照品(纯度≥98%,四川省维克奇生物科技有限公司,批号140813)。

1.3 试剂 碱性磷酸酶(ALP)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、肌酐(Crea)、尿素(Urea)检测试剂盒(南昌百特生物高新技术股份有限公司,批号分别为180515、180801、180710、180911、180911),标准血清(美国贝克曼库尔特有限公司,批号0119),苏木精染液、伊红染液、返蓝液(南昌雨露实验器材有限公司,批号分别为181101、181101、181101),甲醛(西陇科学股份有限公司,批号1810202)。

1.4 仪器 AU480型全自动生化分析仪(美国Beckman Coulter公司),SIGMA3-18K型高速冷冻离心机(德国Sigma公司),Leica ASP300S型高级智能脱水机真空组织脱水机、RM2255型轮转式切片仪、EG1150H型包埋机、HI1220型烘片机(德国

Leica公司)。

2 方法

2.1 TP阿魏酸醇质体凝胶的制备 按处方量称取相应质量的卵磷脂、TP、阿魏酸,加入适量乙醇溶解,作为油相,将处方量超纯水作为水相密封在西林瓶中,置于磁力搅拌器(35℃,700 r·min⁻¹)上,用注射器缓慢地将油相加入水中,完全加入后,连续水合30 min。冷冻超声处理30次(每次处理3 s,3 s间隔,200 w),样品冷却至室温,然后用0.22 μm微孔膜过滤醇质体。将2%卡波姆940均匀分布于20%乙醇溶液中,磁搅拌(35℃,700 r·min⁻¹)1 h,使其充分膨胀,然后用三乙醇胺将pH值调节至7,作为空白凝胶。最后,将适量的醇质体、空白凝胶、0.2% DMMH充分混合,得到TP阿魏酸醇质体凝胶。

2.2 动物分组与给药 由雷公藤双层片(国药准字Z20010165)的说明书得TP口服人的剂量范围为1.67~3.33 μg·kg⁻¹·d⁻¹,换算大鼠经皮给药的TP有效剂量为52.60~209.8 μg·kg⁻¹·d⁻¹,结合前期实验结果^[18,24],设置TP阿魏酸醇质体凝胶低、中、高剂量组(TP低、中、高剂量组),换算每日给药TP量,TP低、中、高剂量分别为63.75、127.50、255.00 μg·kg⁻¹。给药前,用Na₂S去除所有SD大鼠背部毛发,脱毛面积约3 cm×3 cm,一半SD大鼠采用单面刀片刮伤大鼠背部皮肤,以渗血为度,制备损伤皮肤模型^[25],另一半为完整皮肤模型,然后随机分为8组,每组10只,每组包括5只雄性和5只雌性大鼠,①完整皮肤空白醇质体凝胶组(空白组);②、③、④分别为完整皮肤醇质体凝胶低、中、高剂量组;⑤破损皮肤空白醇质体凝胶组;⑥、⑦、⑧分别为破损皮肤醇质体凝胶低、中、高剂量组,每周测量体质量,根据动物皮毛恢复情况,定期脱毛,约2周1次,脱毛当天不给药,损伤模型组在每次脱毛时划伤1次,以保持皮肤的受损状态。所有大鼠均接受经皮给药,并用无刺激性橡胶纱布固定,确保药物和皮肤至少接触6 h,给药时间为12周。

2.3 血液生化检测 在末次给药后禁食不禁水,24 h后用10%的水合氯醛麻醉大鼠,腹股动脉取血于10 mL非抗凝管中,在室温下静置2 h,分离出液态血液于4℃冷冻离心(3 500 r·min⁻¹,10 min,离心半径12 cm),取上清液,使用全自动生化分析仪进行血清生化指标进行检测,考察ALP、AST、ALT、Crea、Urea水平。

2.4 组织病理学检测 采血后,处死大鼠。取已给药大鼠的重要脏器包括心、肝、脾、肺、肾和皮肤,用

生理盐水提取洗涤,滤纸干燥后称质量,脏器系数=脏器质量/体质量×100%,然后将组织在10%甲醛中固定48 h,用梯度乙醇脱水,在二甲苯中清除并包埋在石蜡中,切片、苏木素-伊红(HE)染色后用光学显微镜观察记录组织的病理变化。

2.5 数据处理 本实验所有结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,运用Graphpad Prism统计软件进行统计学处理,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠状态体质量的影响 大鼠前期状态良好,但给药9周后情况有所改变,饮食虽未见明显改变,但毛发开始稀疏,腹部开始肿胀,体质量未见明显增加。在后期麻醉脱毛过程中,死亡老鼠较多,对致死老鼠进行解剖,发现其胃部容纳较多,多为残留纱布,可能为给药后用于固定的纱布在饲养过程中相互撕咬吞食而致。在第10周对大鼠进行处理。对每周大鼠体质量进行单因素方差分析,与雄性完整皮肤空白组比较,各雄性给药组差异均无统计学意义;与雌性完整皮肤空白组比较,各雌性给药组之前差异无统计学意义,说明TP在此剂量范围内,性别和皮肤状态与其毒性无明显相关性。见表1、表2。

3.2 对大鼠脏器的影响 在系统尸检期间,发现除肺的各给药组颜色呈粉白相间且触摸有一定的颗粒感外,其他脏器并未见明显异常。与雄性完整皮肤空白组比较,雄性各组之间的器官系数差异无统计学意义,见表3。与雌性完整皮肤空白组比较,雌性破损皮肤TP中剂量组脏器系数降低($P < 0.05$),雌性其他各组差异无统计学意义。见表4。

3.3 对大鼠血中ALP、AST、ALT、Crea、Urea水平的影响 长期给药后,与雄性完整皮肤空白组比较,雄性各组血液生化指标差异无统计学意义;与雌性完整皮肤空白组比较,雌性各组血液生化指标差异无统计学意义。见表5、表6。

3.4 病理组织学结果

3.4.1 对大鼠皮肤组织病理学变化的影响 皮肤切片镜下可见完整的皮肤结构包括表皮、真皮和皮下组织,表皮无变性、水样、坏死和脱落。真皮为致密结缔组织,可见大量胶原束。皮肤下可见毛发和皮脂腺,皮脂腺丰富。且各组皮肤切片未有明显病理变化。但所有TP高剂量组的切片制备过程,真皮层细胞易散开导致制片困难,为排除制片操作的失误,对TP高剂量组再次切片验证,发现TP高剂量组

表1 TP阿魏酸醇质体凝胶对雄性大鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 Effect of ethosomes gel on body weight in male rats ($\bar{x} \pm s, n=5$)

g

皮肤	组别	剂量/ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	第1周	第2周	第3周	第4周	第5周	第6周	第7周	第8周	第9周	第10周
完整	空白组		207.1±0.5	249.5±10.6	261.7±14.7	304.9±16.1	292.5±24.8	315.5±13.4	297.8±4.6	302.5±4.5	295.8±2.9	303.3±1.1
	TP低剂量组	63.75	191.8±5.1	243.2±7.1	248.0±5.0	268.9±10.0	252.2±7.0	269.8±18.4	239.1±34.5	256.3±48.4	263.5±43.6	275.2±46.2
	TP中剂量组	127.50	208.3±12.5	235.5±28.5	229.3±24.4	233.0±18.7	241.3±25.6	252.5±59.4	245.3±61.4	253.5±72.6	249.6±75.2	259.8±77.6
	TP高剂量组	255.00	205.0±17.7	230.6±18.5	235.2±22.2	260.4±24.8	241.6±22.4	249.3±24.0	252.8±26.4	244.5±21.5	246.2±25.1	249.8±27.5
破损	空白组		200.3±2.8	245.0±7.5	248.9±10.7	286.2±22.2	259.9±26.4	289.3±22.5	262.6±17.2	267.5±21.3	263.2±22.9	270.5±21.5
	TP低剂量组	63.75	193.1±9.3	227.6±25.3	234.8±26.3	254.3±30.7	243.8±26.1	268.3±32.0	253.7±39.5	275.4±45.0	284.7±47.5	289.4±51.1
	TP中剂量组	127.50	210.9±5.8	229.7±6.1	222.9±13.8	219.5±20.6	238.7±19.3	258.7±31.6	247.5±34.0	251.0±37.8	246.9±33.7	253.3±30.8
	TP高剂量组	255.00	197.7±2.2	229.3±4.9	232.6±9.2	250.8±9.0	232.4±8.4	245.3±18.1	261.1±30.2	252.0±30.9	249.5±27.1	257.2±29.4

表2 TP阿魏酸醇质体凝胶对雌性大鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 Effect of ethosomes gel on body weight in female rats ($\bar{x} \pm s, n=5$)

g

皮肤	组别	剂量/ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	第1周	第2周	第3周	第4周	第5周	第6周	第7周	第8周	第9周	第10周
完整	空白组		171.9±8.1	188.8±9.1	185.5±11.3	206.9±8.4	202.5±6.4	217.4±14.6	223.3±12.9	211.0±11.5	207.6±28.5	206.5±31.5
	TP低剂量组	63.75	180.0±5.3	212.4±2.8	208.0±5.2	217.2±9.1	211.8±4.7	233.0±16.2	214.6±27.7	217.7±9.5	221.3±12.4	218.4±14.6
	TP中剂量组	127.50	175.7±13.0	212.4±24.8	204.7±27.3	218.1±20.2	209.6±21.3	218.0±29.0	203.9±23.2	217.2±23.8	227.7±22.9	236.7±15.7
	TP高剂量组	255.00	186.2±12.9	214.6±11.0	198.6±10.9	220.7±10.2	207.6±7.6	244.5±2.5	240.3±7.7	230.0±11.0	243.6±4.8	253.5±8.6
破损	空白组		178.1±7.3	204.7±6.6	201.5±8.7	221.9±6.7	226.6±0.4	234.0±17.7	222.9±41.0	240.4±2.2	234.7±13.6	234.7±10.7
	TP低剂量组	63.75	179.4±1.4	209.9±2.0	205.9±4.3	211.7±2.6	214.3±4.1	234.8±5.2	227.9±9.7	217.3±12.4	229.0±11.5	228.4±15.2
	TP中剂量组	127.50	176.4±11.8	219.6±10.9	210.4±9.2	227.4±10.7	212.1±9.9	237.3±17.2	222.2±2.5	243.4±0.5	253.3±0.4	270.2±0.2
	TP高剂量组	255.00	179.1±12.9	206.8±3.5	193.1±8.0	212.6±10.7	203.2±7.9	242.7±8.1	227.9±16.6	220.5±19.6	189.9±17.0	196.8±20.6

表3 TP阿魏酸醇质体凝胶对雄性大鼠器官指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 3 Effect of ethosomes gel on organ index in male rats ($\bar{x} \pm s, n=5$)

$\text{g} \cdot (100 \text{g})^{-1}$

皮肤	组别	剂量/ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	心	肝	脾	肺	肾
完整	空白组		0.28±0.01	3.55±0.34	0.18±0.02	0.44±0.09	0.69±0.08
	TP低剂量组	63.75	0.27±0.00	3.88±0.09	0.16±0.02	0.55±0.05	0.63±0.01
	TP中剂量组	127.50	0.28±0.00	3.58±0.30	0.19±0.03	0.87±0.43	0.69±0.05
	TP高剂量组	255.00	0.28±0.01	3.37±0.07	0.18±0.02	0.56±0.06	0.67±0.04
破损	空白组		0.28±0.01	3.65±0.38	0.19±0.02	0.65±0.17	0.68±0.06
	TP低剂量组	63.75	0.29±0.03	3.36±0.29	0.18±0.01	0.54±0.06	0.69±0.02
	TP中剂量组	127.50	0.29±0.01	3.65±0.09	0.16±0.00	0.72±0.17	0.72±0.04
	TP高剂量组	255.00	0.29±0.03	3.27±0.11	0.19±0.02	0.54±0.05	0.67±0.03

仍存在真皮层细胞易散开的问题,显微镜下观察,各给药组均存在部分大鼠皮肤部分大鼠表皮变薄,细胞层次减少的问题,但仅TP高剂量组,部分大鼠可见表皮细胞呈空泡状,其余未见异常病理性改变,此现象发生的频率和严重程度与大鼠性别、皮肤的状态也有一定的相关性,其中雌性破损TP高剂量组大鼠均出现了表皮的空泡状,其他组只有部分出现。见图1。

3.4.2 对大鼠心脏组织病理学变化的影响 心脏切片可见清晰的心肌纤维呈不规则的短圆柱状,有分支并相互吻合成网,且所检各鼠心组织结构正常,心肌纤维无变性,水肿,无坏死等异常改变,心内外膜及心肌纤维间结缔组织未见增生及炎性细胞浸润,各组间差异无统计学意义。见图2。

3.4.3 对大鼠肝脏组织病理学变化的影响 用显微镜对染色后的肝脏切片进行观察,各组间均未发

表4 TP阿魏酸醇质体凝胶对雌性大鼠器官指数的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 4 Effect of ethosomes gel on organ index in Female rats ($\bar{x}\pm s, n=5$) g·(100 g)⁻¹

皮肤	组别	剂量/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	心	肝	脾	肺	肾
完整	空白组		0.32±0.01	4.07±0.45	0.24±0.04	1.12±0.63	0.75±0.08
	TP低剂量组	63.75	0.33±0.00	3.60±0.21	0.25±0.02	1.10±0.65	0.66±0.06
	TP中剂量组	127.50	0.29±0.01	4.46±0.56	0.21±0.00	0.59±0.05	0.66±0.04
	TP高剂量组	255.00	0.32±0.00	4.14±0.09	0.21±0.02	0.60±0.07	0.65±0.04
破损	空白组		0.33±0.01	3.55±0.42	0.24±0.02	0.86±0.16	0.69±0.03
	TP低剂量组	63.75	0.31±0.01	3.78±0.48	0.26±0.03	0.67±0.09	0.67±0.05
	TP中剂量组	127.50	0.28±0.01 ¹⁾	4.5±0.07	0.23±0.01	0.56±0.00	0.64±0.01
	TP高剂量组	255.00	0.31±0.04	3.90±0.07	0.22±0.03	1.41±0.01	0.64±0.00

注:与雌性完整皮肤空白组比较¹⁾ $P<0.05$

表5 TP阿魏酸醇质体凝胶对雄性大鼠血液指标的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 5 Effect of ethosomes gel on biochemical parameters of male rats ($\bar{x}\pm s, n=5$)

皮肤	组别	剂量/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	Crea/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Urea/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	AST/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	ALP/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	ALT/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$
完整	空白组		89.67±2.78	7.91±1.79	222.45±146.20	275.85±69.33	71.27±2.78
	TP低剂量组	63.75	96.54±7.87	8.08±1.04	134.19±41.55	290.57±35.00	71.27±24.30
	TP中剂量组	127.50	77.88±12.76	7.58±1.19	104.65±39.62	276.04±122.03	48.54±21.62
	TP高剂量组	255.00	90.84±12.46	7.58±0.84	154.65±55.26	263.33±42.54	67.95±10.08
破损	空白组		89.67±9.23	8.11±2.04	205.35±101.09	274.00±40.16	63.22±20.50
	TP低剂量组	63.75	100.35±39.83	7.00±3.12	109.56±15.98	225.43±43.36	53.70±8.23
	TP中剂量组	127.50	85.61±17.12	6.48±1.48	131.28±38.46	240.53±74.71	73.31±19.85
	TP高剂量组	255.00	75.76±3.04	6.41±0.20	117.60±12.20	198.96±9.01	57.57±2.71

表6 TP阿魏酸醇质体凝胶对雌性大鼠血液指标的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 6 Effect of ethosomes gel on biochemical parameters of female rats ($\bar{x}\pm s, n=5$)

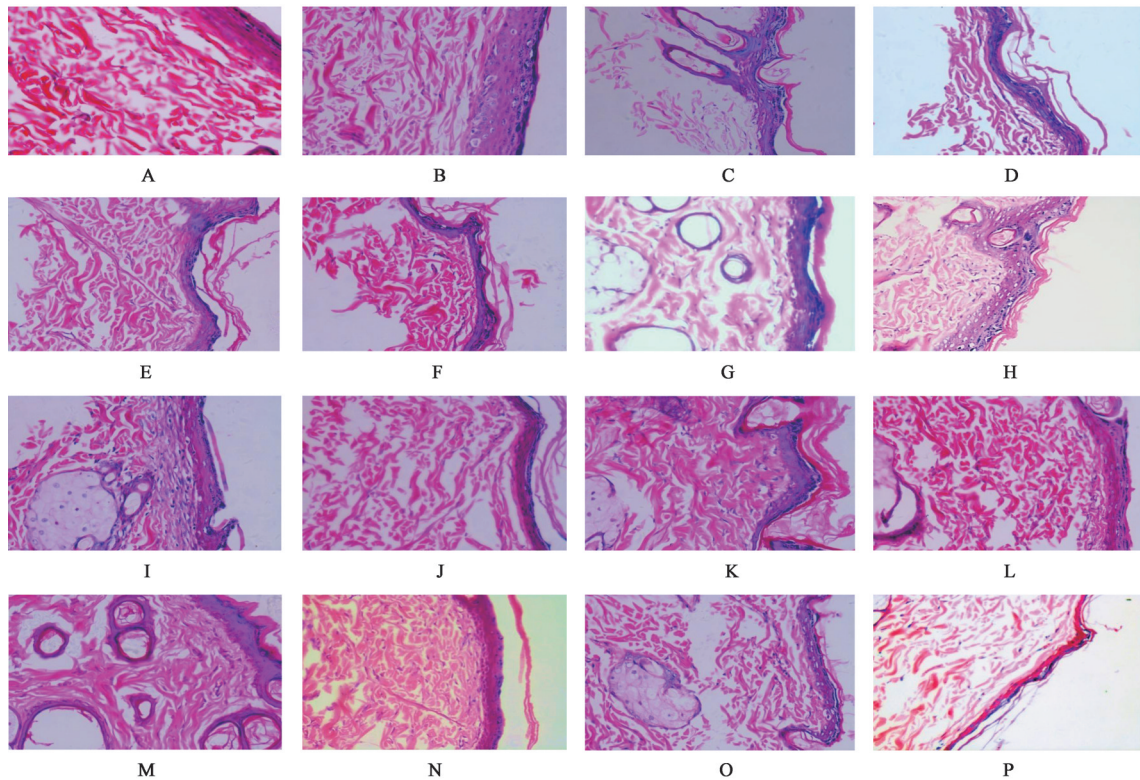
皮肤	组别	剂量/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	Crea/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	Urea/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	AST/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	ALP/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	ALT/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$
完整	空白组		88.03±4.70	6.23±0.91	107.70±29.64	197.77±51.62	47.75±16.65
	TP低剂量组	63.75	87.05±15.22	6.89±1.87	124.97±40.32	175.70±31.72	58.44±25.46
	TP中剂量组	127.50	82.07±15.03	6.57±1.92	123.98±21.28	224.46±51.67	74.42±11.79
	TP高剂量组	255.00	82.14±18.35	5.29±0.98	110.50±30.58	226.72±74.92	56.45±12.82
破损	空白组		104.72±35.17	5.52±2.21	84.25±31.97	229.11±153.20	45.10±21.49
	TP低剂量组	63.75	79.36±17.40	5.35±1.43	100.18±14.83	180.73±57.67	45.22±4.20
	TP中剂量组	127.50	83.77±14.35	6.70±1.33	121.20±22.67	201.77±37.91	61.25±11.61
	TP高剂量组	255.00	98.57±15.46	6.96±0.52	96.56±26.63	185.44±46.61	45.94±13.45

现明显病理变化,可见肝小叶结构完整,小叶内的肝细胞基本正常,肝细胞质丰富,核大而圆,核仁清楚,中央静脉及门管区正常,未见明显的肝细胞变性与坏死,未见门静脉区炎症,未见明显的大泡性与小泡性脂肪变性,未见明显肝纤维化及肝硬化,小胆管上皮细胞、汇管区及脉管未见细胞增生。见图3。

3.4.4 对大鼠脾脏组织病理学变化的影响 脾脏切片镜下可见组织结构正常,显示红髓、白髓结构

清晰,淋巴组织及淋巴细胞结构正常,脾血窦未见扩张充血。见图4。

3.4.5 对大鼠肺组织病理学变化的影响 空白组肺切片无扩张、无水肿、无淤血,各级支气管通畅,肺内无淤血,肺内有炎性细胞浸润,纤维组织增生,肺组织结构正常。在高剂量组,无论雄雌和大鼠皮肤状态均可见肺组织病理改变,表现为肺组织局部炎性细胞浸润明显,大量淋巴细胞增生,肺泡损伤,肺泡有炎性细胞和血细胞。中剂量组中,仅破损皮



注:A. 雄性完整皮肤空白组;B. 雄性破损皮肤空白组;C. 雄性完整皮肤TP低剂量组;D. 雄性破损皮肤TP低剂量组;E. 雄性完整皮肤TP中剂量组;F. 雄性破损皮肤TP中剂量组;G. 雄性完整皮肤TP高剂量组;H. 雄性破损皮肤TP高剂量组;I. 雌性完整皮肤空白组;J. 雌性破损皮肤空白组;K. 雌性完整皮肤TP低剂量组;L. 雌性破损皮肤TP低剂量组;M. 雌性完整皮肤TP中剂量组;N. 雌性破损皮肤TP中剂量组;O. 雌性完整皮肤TP高剂量组;P. 雌性破损皮肤TP高剂量组(图2-图6同)

图1 醇质体凝胶对SD大鼠皮肤的影响(HE,×40)

Fig. 1 Effect of ethosomes gel on skin pathological inorphology of SD rats (HE,×40)

肤组部分出现肺组织病理改变,表现为肺组织局部炎性细胞浸润明显,肺间质充血,此现象的出现与大鼠的性别未见明显联系,与给药剂量和皮肤状态呈一定的相关性。见图5。

3.4.6 对大鼠肾脏组织病理学变化的影响 用显微镜对染色后的肾脏切片进行观察,未见明显病理改变,各组的肾小球与肾小管结构清晰,肾小管上皮细胞无变性坏死,肾曲管及肾小球未见肿胀变性,间质无炎症细胞浸润,组织结构正常。见图6。

4 讨论

RA可导致软骨、骨骼损伤及残疾,且因其无法治愈,反复加重,给个人和国家带来了极大的经济负担,目前虽有较完善的治疗方案,但由于医疗条件、疾病认知等方面的差异,我国RA治疗的现状仍不容乐观^[19]。长期以来,许多传统中药被用来治疗风湿病,人们对传统草药有信心,临床依从性也相应提高,雷公藤作为一种传统中药,在有效治疗类风湿性关节炎方面有着丰富的经验积累,但没有强有力的安全性证据^[26-27]。在前期研究中,研发了一

种基于醇质体载体的TP、阿魏酸靶向给药系统,用于治疗关节炎,其有效性和安全性已通过数据挖掘和HaCaT细胞的实验研究得到证明,在本实验中,长期给药后,各组大鼠器官均无实质性损伤,肝肾生化指标亦差异无统计学意义,提示TP阿魏酸醇质体凝胶的皮肤给药相对安全。对雌性Wistar大鼠单次灌胃给予雷公藤多苷及等量TP($12 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)24 h,即可造成大鼠急性肝脏毒性^[28],但此次实验中,TP高剂量组($255 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)约为其20倍,且给药周期约为70倍但氨基转移酶和肝脏切片均未见异常,一定程度上证明其减毒作用。

在长期给药的后期,高剂量组大鼠出现明显的毛发稀疏,用适宜剂量水合氯醛麻醉脱毛时,也极易出现死亡,对应的皮肤和肺组织切片也表现一定损伤,提示TP阿魏酸醇质体凝胶长期经皮给药仍表现一定的毒性,且毒性与大鼠的性别、给药剂量、给药的皮肤转态、给药时间长短均呈一定相关性,雌性、受损皮肤在同等状态下更易出现损伤,且毒性有时间和剂量的依赖性。既往文献报道,除生殖毒

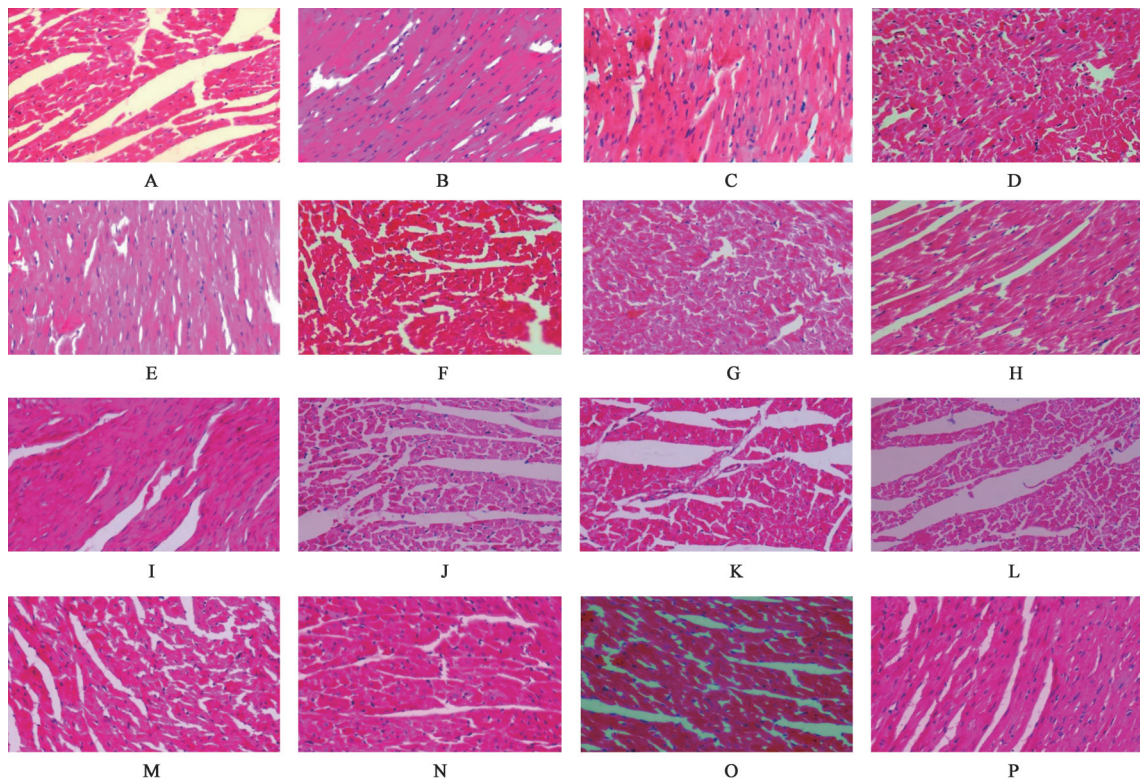


图2 醇质体凝胶对SD大鼠鼠心脏的影响(HE,×40)

Fig. 2 Effect of ethosomes gel on heart of SD rats (HE,×40)

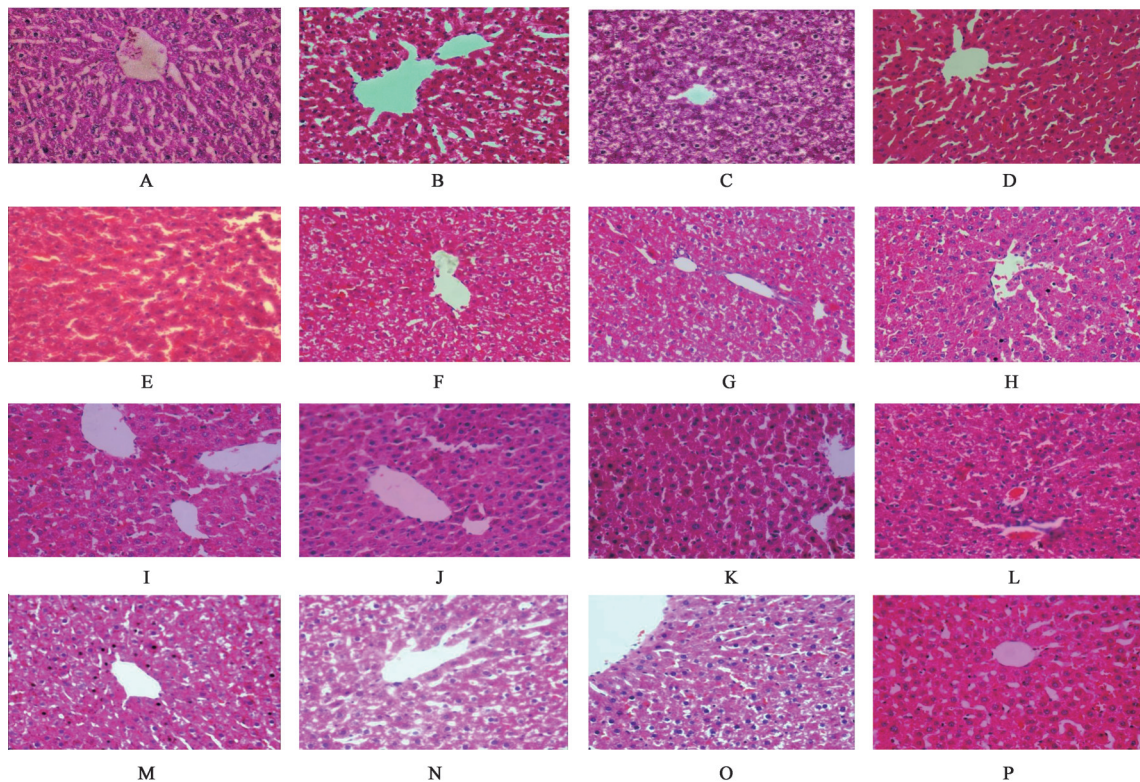


图3 醇质体凝胶对SD大鼠肝脏的影响(HE,×40)

Fig. 3 Effect of ethosomes gel on liver of SD rats (HE,×40)

性外,肝损伤和肾毒性表现出性别差异,主要是因雌性大鼠特异表达的CYP3A2导致TP代谢加速,故

雌性大鼠易表现出更大的毒性^[29],此次实验中雌性大鼠亦较雄性大鼠更易出行毒性,除上述理由外,

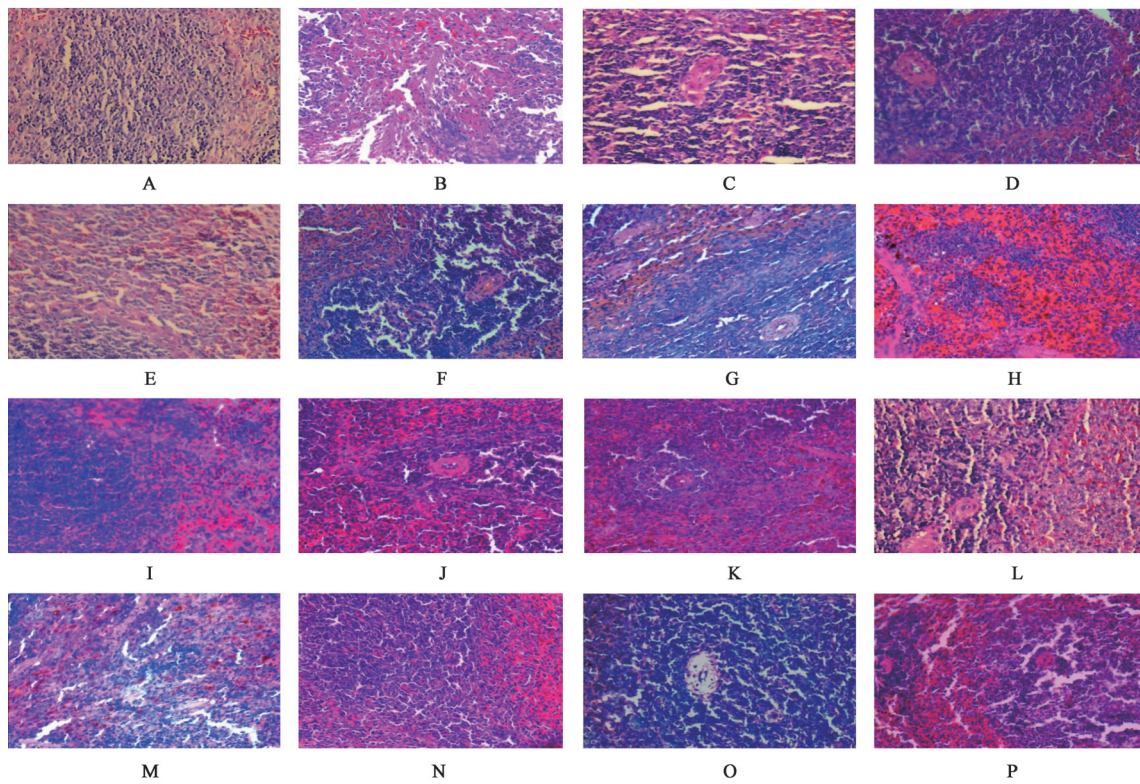


图4 醇质体凝胶对SD大鼠脾脏的影响(HE,×40)

Fig. 4 Effect of ethosomes gel on spleen of SD rats (HE,×40)

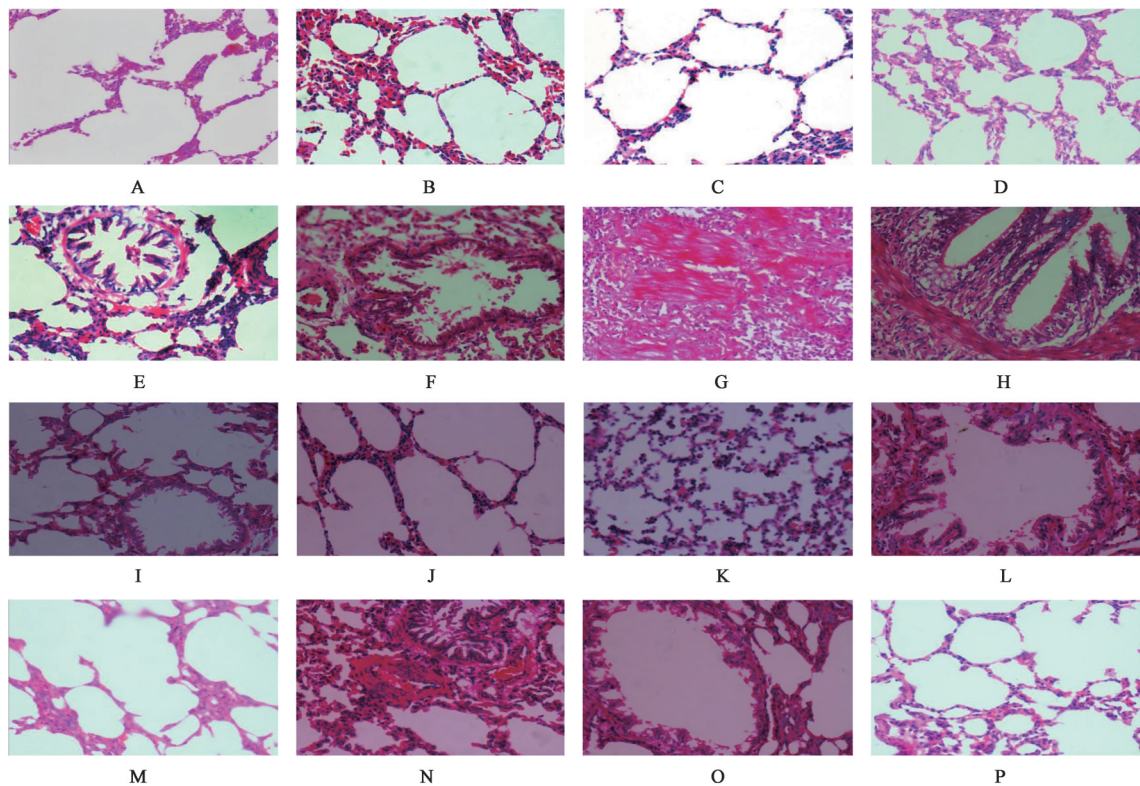


图5 醇质体凝胶对SD大鼠肺脏的影响(HE,×40)

Fig. 5 Effect of ethosomes gel on lung function in SD rats (HE,×40)

可能与经皮吸收的机制相关^[30],虽然目前罕有对性别、个体影响药物经皮吸收的研究,但对于下一代

的精准医疗的应用,尤其是治疗窗较窄的药物,可根据不同的皮肤的性质,厚度等差异,控制给药剂

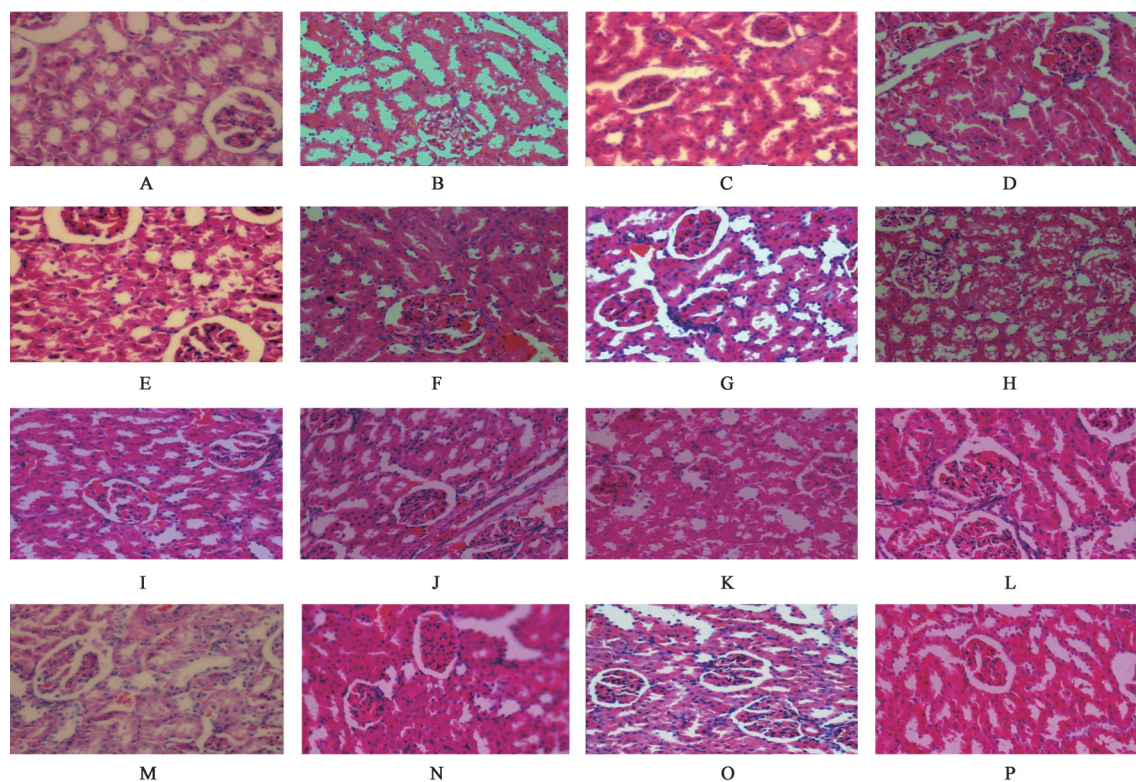


图6 醇质体凝胶对SD大鼠肾脏的影响(HE,×40)

Fig. 6 Effect of ethosomes gel on kidney of SD rats (HE,×40)

量及速率以达到最佳的药物治疗效果,保证临床的用药安全性。

临床报道雷公藤制剂所致不良发应多为有白细胞减少、胃肠道反应、月经不调和肝功能异常等,临床监测的重点也是肝脏和生殖系统的毒副作用,鲜有提到呼吸系统的损伤^[31-34],但该实验提示,长期给药后可能在肺部有一个蓄积,既往也有学者报道TP在大鼠尾静脉注射给药后,在肺部血药浓度最高^[35],临床长期用药时,应予以重视。外用皮肤给药,相对安全,临床多表现为皮疹、皮炎等局部的不良反应,较少出现器官的损伤,成品制剂的使用,使传统中药个体用药被忽略,此实验也提示临床,在使用雷公藤外用制剂时,除了关注局部皮肤反应,加强生化检测,评估肝肾功能外,还可根据患者的皮肤状态进行个体化给药,保证临床用药的有效性和安全性。

综上,TP与阿魏酸配伍制备的醇质体凝胶,长期毒性试验表明其临床应用相对安全,但可能存在皮肤和肺部的损伤,其作用机制有待逐步探索,因此若进一步探讨该药的临床安全性,其解毒机制和对肺损的作用机制都需要进一步明确。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会(1999). 中华本草(第五册)[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1999:206-215.
- [2] 刘斌,樊丹平,舒海洋,等. 雷公藤甲素毒性作用及减毒研究的整合探析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(20):181-190.
- [3] NOEL P, VON HOFF D D, SALUJA A K, et al. Triptolide and its derivatives as cancer therapies [J]. Trends Pharmacol Sci, 2019, 40(5):327-341.
- [4] LUO H, VONG C T, CHEN H, et al. Naturally occurring anti-cancer compounds: Shining from Chinese herbal medicine[J]. Chin Med, 2019, 14:48.
- [5] TASNEEM S, LIU B, LI B, et al. Molecular pharmacology of inflammation: Medicinal plants as anti-inflammatory agents [J]. Pharmacol Res, 2019, 139(3): 126-140.
- [6] SONG C Y, XU Y G, LU Y Q. Use of *Tripterygium wilfordii* Hook F for immune-mediated inflammatory diseases: Progress and future prospects[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2020, 21(4):280-290.
- [7] ZHANG Y, MAO X, LI W, et al. Tripterygium wilfordii: An inspiring resource for rheumatoid arthritis treatment[J]. Med Res Rev, 2021, 41(3): 1337-1374.

- [8] 刘巧,郭延丽,董泰玮,等. 补骨脂肝损伤机制及减毒方法研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(11):233-239.
- [9] 陶玲,肖芳,朱卫丰,等. 雷公藤减毒研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(5):229-234.
- [10] CHEN S, DAI Y, ZHAO J, et al. A mechanistic overview of triptolide and celastrol, natural products from *Tripterygium wilfordii* Hook. F. [J]. Front Pharmacol, 2018, 9(14): 1-13.
- [11] 严银银,张振强,曾华辉,等. 雷公藤甲素的毒副作用及减毒研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2021, 9(13): 1-11.
- [12] TONG L, ZHAO Q, DATAN E, et al. Triptolide: reflections on two decades of research and prospects for the future [J]. Nat Prod Rep, 2021, 38(4): 843-860.
- [13] GUO B, QIAO F, LIAO Y, et al. Triptolide laden reduced graphene oxide transdermal hydrogel to manage knee arthritis: *in vitro* and *in vivo* studies[J]. J Biomater Sci Polym Ed, 2021, 32(10):1288-1300.
- [14] 林娜,姜泉,刘维,等. 雷公藤多苷/雷公藤片治疗类风湿关节炎用药指南[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(17):4149-4153.
- [15] 成冯镜茗,王连心,谢雁鸣. 中药致肾损伤的 CiteSpace 科学文献可视化分析[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(4):1-13.
- [16] 管咏梅,陶玲,肖芳,等. 雷公藤在临床治疗类风湿性关节炎中的用药规律探析[J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(1):64-68.
- [17] ZHANG J, GUAN Y, HE L, et al. Influence of a combination of triptolide and ferulic acid on the activities of CYP450 enzymes and oxidative stress in HaCaT cells[J]. Exp Ther Med, 2020, 20(6): 157.
- [18] 陶玲,何良飞,管咏梅,等. 雷公藤甲素阿魏酸醇质体凝胶的制备与经皮渗透性研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(6):1139-1144.
- [19] 中华医学会风湿病学分会. 2018中国类风湿关节炎诊疗指南[J]. 中华内科杂志, 2018, 57(4):242-251.
- [20] 陶庆文,王金平,徐愿,等. 类风湿关节炎中西医结合医疗质量控制指标专家共识(2021年版)[J]. 中日友好医院学报, 2021, 35(1):12-15.
- [21] FRAENKEL L, BATHON J M, ENGLAND B R, et al. 2021 american college of rheumatology guideline for the treatment of rheumatoid arthritis [J]. Arth Rheumatol, 2021, 73(7): 1108-1123.
- [22] 徐叶. 雷公藤甲素及其衍生物雷腾舒药物代谢研究[D]. 上海:中国科学院大学, 2019.
- [23] ZHENG N, WEI A, WU T, et al. Triptolide and atorvastatin synergistically promote hepatotoxicity in cultured hepatocytes and female Sprague-Dawley rats by inhibiting pregnane X receptor-mediated transcriptional activation of CYP3A4[J]. Toxicol Lett, 2021, 342:85-94.
- [24] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社, 2011: 107-153.
- [25] 田悦,黄建梅,王晓焯,等. 朱红膏中汞在破损皮肤模型大鼠体内的蓄积及毒性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(8):34-39.
- [26] HUANG S, LIU L, MEI H F, et al. Altered integrity of hepatocyte tight junctions in rats with triptolide-induced cholestasis[J]. Chin J Nat Med, 2021, 19(3): 188-194.
- [27] LIU B, MENG X, MA Y, et al. Clinical safety of total glucosides of paeony adjuvant therapy for rheumatoid arthritis treatment: A systematic review and meta-analysis [J]. BMC Complement Med Ther, 2021, 21(1):102.
- [28] 缪莹莹,罗岚,舒婷,等. 雷公藤多苷与等量雷公藤甲素所致肝脏毒性差异及分子机制探究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(16):3468-3477.
- [29] LIU X, HU C, LI H, et al. Metabolic profiling of fatty acids in *Tripterygium wilfordii* multiglucoside- and triptolide-induced liver-injured rats[J]. Open Life Sci, 2021, 16(1): 184-197.
- [30] 武晏屹,田硕,白明,等. 基于皮肤功能特点的药物透皮吸收新思考[J]. 世界中医药, 2020, 15(3): 361-363, 368.
- [31] 冯雪,方赛男,高雨鑫,等. 雷公藤制剂安全性的循证评价研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(3):425-439.
- [32] 曹艳,运乃茹,邹爱英. 雷公藤多苷片致不良反应的 Meta 分析[J]. 中国药房, 2018, 29(1):125-130.
- [33] 田雅格,苏晓慧,刘立玲,等. 近20年来雷公藤肝毒性研究概述[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(16): 3399-3405.
- [34] 刘斌,樊丹平,舒海洋,等. 雷公藤甲素毒性作用及减毒研究的整合探析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(20):181-190.
- [35] 刘建群,李青,张锐,等. LC-MS/MS法研究甘草对雷公藤甲素药代动力学及组织分布与排泄的影响[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(9):1664-1671.

[责任编辑 张丰丰]