

· 论著 ·

## 丙戊酸钠及其代谢产物的体外肝毒性研究

谢新芳<sup>1,2</sup>, 温燕<sup>1</sup>, 高守红<sup>1</sup>, 游春华<sup>1,2</sup>, 陈万生<sup>1</sup>, 熊筱娟<sup>2</sup> (1. 第二军医大学长征医院药材料, 上海 200003; 2. 宜春学院江西省天然药物活性成分研究重点实验室, 江西 宜春 336000)

**[摘要]** 目的 研究丙戊酸钠及3个代谢产物(2-丙基-4-五烯酸、3-羟基丙戊酸、5-羟基丙戊酸)对体外人正常肝细胞L02增殖活性及对肝细胞损伤相关指标的影响。方法 实验分为对照组和实验组, 对照组细胞常规培养, 实验组加入丙戊酸钠及3个代谢产物, 采用CCK-8法检测细胞增殖活性, PCR法检测CYP1A1、CYP1A2、PCNA、Bax及Bcl-2的mRNA相对含量, Western Blotting法检测蛋白表达, 同时检测细胞上清液中谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、乳酸脱氢酶(LDH)的含量。结果 与对照组相比, 随着丙戊酸钠及3个代谢产物浓度和时间的增加, 对L02细胞增殖活性的抑制逐渐增强, CYP1A1、CYP1A2及Bax的mRNA相对含量和蛋白表达量升高, PCNA及Bcl-2的mRNA相对含量和蛋白表达量均有下降, AST、ALT、LDH含量升高。结论 丙戊酸钠及3个代谢产物与肝毒性有关。

**[关键词]** 丙戊酸钠; 2-丙基-4-五烯酸; 3-羟基丙戊酸; 5-羟基丙戊酸; 肝毒性

**[中图分类号]** R971.6; R96 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2017)01-0043-06

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.01.011

## An *in vitro* study of hepatotoxicity induced by valproic acid and its metabolites

XIE Xinfang<sup>1,2</sup>, WEN Yan<sup>1</sup>, GAO Shouhong<sup>1</sup>, YOU Chunhua<sup>1,2</sup>, CHEN Wansheng<sup>1</sup>, XIONG Xiaojuan<sup>2</sup> (1. Department of Pharmacy, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. College of Chemical and Biological Engineering, Yichun University, Yichun 336000, China)

**[Abstract]** **Objective** To confirm the hepatotoxicity of valproic acid (VPA) and its metabolites (2-propyl-4-pentenoic acid, 3-hydroxy valproic acid, 5-hydroxy valproic acid) on human liver cells. **Methods** Cells were divided into control group and VPA-treated group. The control group was conventionally cultured while the VPA-treated group was treated with valproic acid and its metabolites. The rate of cell proliferation was assayed by CCK 8 protocol. The mRNA levels of CYP1A1, CYP1A2, PCNA, Bax and Bcl-2 were measured by real time PCR. The correlated protein levels were measured by Western Blotting. The activity of LDH, AST and ALT were also detected. **Results** Compared to the control group, with the increases of concentrations and reaction time of VPA and its metabolites, the proliferation rate of L02-cell was reduced, the mRNA and protein levels of CYP1A1, CYP1A2, and Bax was increased, the mRNA and protein level of PCNA and Bcl-2 was decreased, AST, ALT, and LDH were also elevated in the treated group. **Conclusion** Valproic acid and its metabolites were positively related to hepatotoxicity.

**[Key words]** valproic acid; 2-propyl-4-pentenoic acid; 3-hydroxy valproic acid; 5-hydroxy valproic acid; hepatotoxicity

丙戊酸钠(valproic acid, VPA)是一类具有支链短链脂肪酸的钠盐, 临床上常作为一线抗癫痫药物使用, 对各种类型的癫痫均有治疗作用, 广泛应用于其他神经系统性疾病<sup>[1]</sup>。在长期的药物治疗过程中有耐药现象产生<sup>[2]</sup>, 同时也有不良反应发生, 其中最

严重的不良反应为肝毒性, 甚至发生急性肝坏死(常见于2岁以下儿童)<sup>[3-5]</sup>。研究显示, 癫痫患者中儿童癫痫的发病率占5%<sup>[6]</sup>, 因此, 深入研究VPA肝毒性的发病机制, 对于预防不良反应的发生以及促进临床安全用药具有重要意义。

VPA体内代谢受多种因素影响, 个体差异大, 治疗窗范围窄, 血浆蛋白结合率为87%~95%, 有效治疗浓度为50~100 μg/ml, 超过100 μg/ml易发生不良反应, 需进行血药浓度监测<sup>[7-9]</sup>。VPA的毒性与血药浓度相关, 及时监测血药浓度可控制癫痫发作, 减少不良反应发生<sup>[10]</sup>。大量研究认为, VPA的肝毒性与其代谢过程紧密相关, VPA的体

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81302856); 上海市科学技术委员会计划项目(13ZR1413800)

**[作者简介]** 谢新芳, 硕士研究生, 研究方向: 临床药学. Tel: (021) 60748763; E-mail: xiexinfang0818@163.com

**[通讯作者]** 高守红, 硕士, 副主任药师, 研究方向: 药物分析与临床药学. Tel: (021) 60748763; E-mail: gaoshouhong@126.com

内药动学过程复杂,主要有3条代谢途径:40%经I相线粒体 $\beta$ -氧化代谢,产物有3-羟基丙戊酸(3-hydroxy valproic acid, 3-OH-VPA);10%~20%是CYP450酶介导的代谢,代谢产物主要为2-丙基-4-五烯酸(2-propyl-4-pentenoic acid, 4-ene-VPA)、3-OH-VPA、5-羟基丙戊酸(5-hydroxy valproic acid, 5-OH-VPA);50%由II相尿苷酸二磷酸葡萄糖醛酸酶(UGT)的羧化作用代谢为无活性的产物<sup>[11,12]</sup>。有研究证实VPA肝毒性与其自身代谢物有关,其中4-ene-VPA能通过抑制线粒体脂肪酸的 $\beta$ -氧化,还能通过各种代谢途径与谷胱甘肽反应使其大量消耗降低机体的抗氧化能力进而产生肝毒性<sup>[13]</sup>,但是,未见有3-OH-VPA及5-OH-VPA与肝毒性的相关文献,因此本实验主要考察VPA及3个代谢产物(4-ene-VPA、3-OH-VPA和5-OH-VPA)对外人正常肝细胞L02增殖活性及对肝细胞损伤相关指标的影响。

## 1 材料

**1.1 仪器** 冷冻离心机(5810R,德国Eppendorf公司),紫外分光光度计(美国Thermo公司),微量加样器(德国Eppendorf公司),Real time PCR仪(TP800,日本TaKaRa公司),摇床(TS-2,其林贝尔),电泳仪(EPS-300,上海天能),梯度PCR仪(TP600,日本TaKaRa公司),微型垂直电泳槽(VE-180,上海天能),扫描仪(LIDE90,佳能)等。

**1.2 药品与试剂** VPA(批号:FIA3C,纯度:98%)购自东京化工有限公司,3-OH-VPA(批号:1-TVPA-92-13,纯度:98%),5-OH-VPA(批号:1-TVPA-149-5,纯度:98%),4-ene-VPA(批号:3-XAL-91-4,纯度:98%)均购自多伦多研究化学品公司,人正常肝细胞L02(中国科学院上海细胞生物所),胎牛血清(FBS)、细胞培养基及Trizol试剂(批号:15596-018)均购自美国Invitrogen公司,CCK-8溶液(批号:CK04,日本同仁化学),逆转录酶Reverse Transcriptase M-MLV(批号:D2640)、Oligo 18 Primer(批号:D511)、dNTP(批号:D4030RA)、Ribonuclease Inhibitor(批号:D2310A)、Takara SYBR Premix Ex Taq(批号:DRR041A)、谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(Abcam公司),细胞总蛋白提取试剂盒(批号:78501)、蛋白定量试剂盒(批号:23227)和ECL发光试剂盒(批号:32106)均购自美国Pierce公司,预染蛋白Marker(批号:P77008,美国Biolabs公司),PVDF膜(批号:IPVH00010,美国MILLI-

PORE公司),盐酸、冰乙酸等试剂均为分析纯,甲醇为色谱纯(德国Merck公司)。

## 2 方法

**2.1 L02细胞培养及实验分组** 用甲醇将VPA及3个代谢产物(4-ene-VPA、3-OH-VPA和5-OH-VPA)分别配成浓度为50、100、200、500、1000  $\mu\text{mol/L}$ 的溶液<sup>[14]</sup>,置4℃冰箱保存备用。取对数生长期的L02细胞,调整细胞密度至 $5 \times 10^5$ 个/ml,接种到96孔细胞培养板中,每孔加入100  $\mu\text{l}$ 细胞悬液培养24 h,后用含10% FBS的RPMI-1640培养基在37℃,5%  $\text{CO}_2$ 条件下培养,对照组细胞常规培养,实验组加入不同浓度的VPA及3个代谢产物进行干预,每组平行做3孔。培养24 h后加入10  $\mu\text{l}$ 的CCK-8溶液,继续孵育4 h后处理,用酶标仪于450 nm波长下测定每孔的吸光度值(A)<sup>[15]</sup>。选择VPA及3个代谢产物500  $\mu\text{mol/L}$ 干预L02细胞,按不同给药时间点(12、24、48、72 h)加入10  $\mu\text{l}$ 的CCK-8溶液,孵育4 h后处理,测定每孔的A值。

**2.2 Real time PCR检测L02细胞内mRNA含量**

**2.2.1 L02细胞总mRNA的提取、RNA浓度、纯度及质量的检测** 实验组加入500  $\mu\text{mol/L}$ 的VPA及3个代谢产物,对照组常规培养,24 h后除去培养液,用4℃预冷的2 ml PBS洗涤两次,各加入1 ml 4℃预冷的Trizol试剂,再转移至无菌离心管冷冻保存,参照试剂盒的方法提取总mRNA。通过紫外分光光度计在260 nm和280 nm波长下测定其A值,再取2  $\mu\text{l}$  RNA溶液稀释100倍后测定,计算所测RNA浓度,采用琼脂糖凝胶电泳法通过分析条带的完整性鉴定RNA的质量。

**2.2.2 PCR检测** 用逆转录酶Reverse Transcriptase M-MLV(D2640A, Takara)进行逆转录合成cDNA(反应条件:70℃下反应10 min,迅速在冰上急冷2 min),继续配制逆转录反应液(反应条件:42℃保温反应1 h,70℃保温反应15 min后冰上冷却),终产物置于-20℃冰箱冻存。利用Real time PCR检测L02细胞中的Beta actin、CYP1A1、CYP1A2、PCNA、Bax及Bcl-2的RNA含量变化,实时定量PCR双向引物序列分别为beta actin(NM\_001101.3)、CYP1A1(NM\_000499.3)、CYP1A2(NM\_000761.4)、PCNA(NM\_002592.2)、Bax(NM\_138761.3)和Bcl-2(NM\_000633.2),在相对定量(relative quantification)检测实验中,以 $\beta$ -actin mRNA作为对照,通过循环阈值(Ct值)进行数据分

析。Ct 值通过交点法计算获得,目的基因相对于内参基因的表达量为  $2^{\Delta Ct} = 2^{Ct_m - Ct_n}$ 。

**2.3 蛋白表达的检测** 实验组分别加入 500  $\mu\text{mol/L}$  的 VPA 及 3 个代谢产物进行干预,对照组常规培养,24 h 后,按细胞总蛋白提取试剂盒所述方法提取总蛋白,收集上清液,按照蛋白定量试剂盒说明书进行总蛋白含量测定。通过制胶、上样、电泳、转膜后,用立春红染色,观察膜上的目的条带是否存在。再分别用一抗和二抗先后处理,抗体稀释比分别为 Beta actin (1 : 1 000)、CYP1A1 (1 : 300)、CYP1A2 (1 : 500)、PCNA (1 : 600)、Bax (1 : 200)、Bcl-2 (1 : 500),其中分离胶浓度依次为 11%、11%、11%、11%、12%、12%,最后用化学发光试剂检测,曝光显影后分析条带的灰度值。

**2.4 L02 细胞上清液中 AST、ALT、LDH 的活性检测** 实验组分别加入 500  $\mu\text{mol/L}$  的 VPA 及 3 个代谢产物干预,对照组常规培养,24 h 后,按照试剂盒所述方法测定 AST、ALT、LDH 的活性。

**2.5 数据分析处理** 采用 SPSS 18.0 统计软件分

析数据,细胞活性数据用均数士标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,先进行单因素方差分析,若有显著性差异再进行组间 Dunnett-t 检验,  $P < 0.05$  为有统计学意义, mRNA 相对含量表达中两组间比较用  $t$  检验,  $P < 0.05$  为有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 VPA 及 3 个代谢产物对 L02 细胞增殖活性的影响** 不同浓度下实验组与对照组相比, L02 细胞的增殖活性都受到不同程度的抑制作用,其中 5-OH-VPA 的 500  $\mu\text{mol/L}$  组与对照组的 A 值比较有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 1 000  $\mu\text{mol/L}$  的 VPA 及 3 个代谢产物各组与对照组的 A 值比较有显著性差异 ( $P < 0.05$ ); 不同时间下对照组与对照组相比 L02 细胞的增殖活性也受到不同程度的抑制作用, 48 h 时 5-OH-VPA 的 500  $\mu\text{mol/L}$  组与对照组的 A 值比较有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 72 h 时 VPA 及 3 个代谢产物各组与对照组的 A 值比较有显著差异。结果见表 1 和表 2。

表 1 CCK-8 法检测药物浓度对 L02 细胞活性的影响 (A 值,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	药物组浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )				
	50	100	200	500	1 000
实验组					
VPA	1.350 $\pm$ 0.093	1.332 $\pm$ 0.120	1.227 $\pm$ 0.161	1.204 $\pm$ 0.163	0.970 $\pm$ 0.118*
4-ene-VPA	1.456 $\pm$ 0.059	1.388 $\pm$ 0.115	1.353 $\pm$ 0.071	1.265 $\pm$ 0.089	0.997 $\pm$ 0.127*
3-OH-VPA	1.469 $\pm$ 0.055	1.353 $\pm$ 0.069	1.243 $\pm$ 0.136	1.118 $\pm$ 0.088	0.982 $\pm$ 0.127*
5-OH-VPA	1.183 $\pm$ 0.175	1.133 $\pm$ 0.097	0.975 $\pm$ 0.143	0.866 $\pm$ 0.105*	0.631 $\pm$ 0.087**
对照组	1.383 $\pm$ 0.214	1.383 $\pm$ 0.214	1.383 $\pm$ 0.214	1.383 $\pm$ 0.214	1.383 $\pm$ 0.214

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , 与对照组比较 (Dunnett-t 检验)

表 2 CCK-8 法检测用药时间对 L02 细胞活性的影响 (A 值,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	药物 (500 $\mu\text{mol/L}$ )			
	12 h	24 h	48 h	72 h
实验组				
VPA	0.339 $\pm$ 0.066	0.579 $\pm$ 0.075	1.204 $\pm$ 0.163	1.404 $\pm$ 0.149*
4-ene-VPA	0.343 $\pm$ 0.035	0.616 $\pm$ 0.103	1.265 $\pm$ 0.089	1.595 $\pm$ 0.159*
3-OH-VPA	0.331 $\pm$ 0.060	0.614 $\pm$ 0.100	1.118 $\pm$ 0.088	1.339 $\pm$ 0.185*
5-OH-VPA	0.309 $\pm$ 0.054	0.583 $\pm$ 0.068	0.866 $\pm$ 0.105*	1.055 $\pm$ 0.183**
对照组	0.346 $\pm$ 0.053	0.626 $\pm$ 0.063	1.257 $\pm$ 0.206	1.707 $\pm$ 0.109

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , 与对照组比较 (Dunnett-t 检验)

**3.2 VPA 及 3 个代谢产物对 mRNA 含量表达的影响** 采用实时 PCR 技术检测 L02 细胞中 CYP1A1、CYP1A2、Bax、PCNA 及 Bcl-2 的 mRNA 含量变化,以  $\beta$ -actin mRNA 作为内参,通过 Ct 值进行数据分析。实验组中 4-ene-VPA 组与 5-OH-

VPA 组的 CYP1A1 的 mRNA 相对含量、3-OH-VPA 组与 5-OH-VPA 组的 CYP1A2 的 mRNA 相对含量及 5-OH-VPA 组的 Bax 的 mRNA 相对含量与对照组相比均有显著性差异 ( $P < 0.05$ ),其余实验组的 mRNA 相对含量与对照组相比虽有所升高,

但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 实验组中 5-OH-VPA 组的 PCNA 和 Bcl-2 的 mRNA 相对含量与对照组相比都有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 其余实验组的 mRNA 相对含量与对照组相比虽有所降低, 但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 结果见图 1。

### 3.3 VPA 及 3 个代谢产物对 L02 细胞蛋白表达的

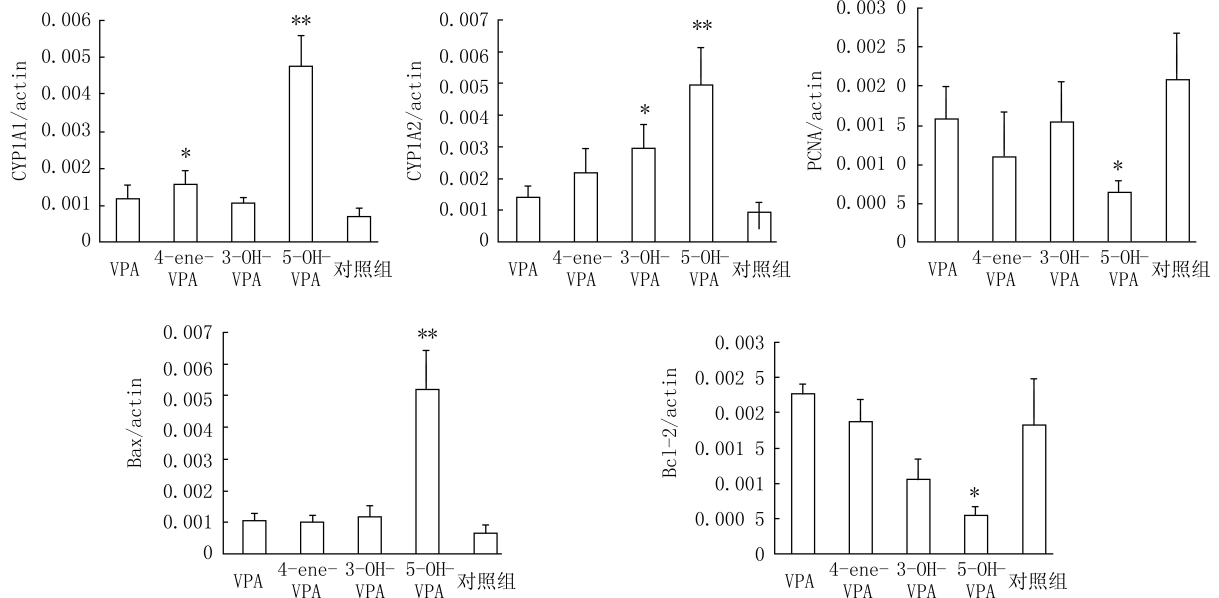


图 1 CYP1A1、CYP1A2、PCNA、Bax 及 Bcl-2 的 mRNA 相对含量图

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , 与对照组比较

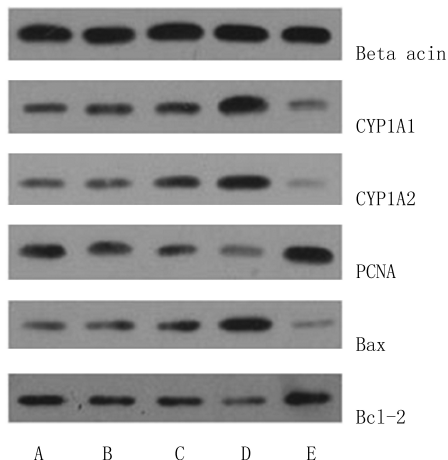


图 2 蛋白胶片扫描结果

A. VPA; B. 4-ene-VPA; C. 3-OH-VPA;  
D. 5-OH-VPA; E. 对照组

**3.4 L02 细胞上清液中 AST、ALT、LDH 的活性检测结果** 通过相应的试剂盒分别测定实验组 (VPA 及 3 个代谢产物) 的 AST、ALT 及 LDH, 并与对照组比较, 三者的漏出率均有所增加, 其中 3-OH-VPA 及 5-OH-VPA 与对照组相比有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 结果表明在  $500 \mu\text{mol/L}$  时, VPA 及

影响 采用 Western Blotting 法检测 L02 细胞中的 CYP1A1、CYP1A2、PCNA、Bax 及 Bcl-2 蛋白含量变化情况, 胶片扫描结果见图 2。灰度值分析见表 3, 与对照组相比, 实验组的 CYP1A1、CYP1A2 及 Bax 蛋白含量明显上升, PCNA 及 Bcl-2 蛋白含量有所下降。

3 个代谢产物对 L02 细胞有损害作用, 结果见表 4。

## 4 讨论

CCK-8 法是通过测定生成甲瓞物的数量来间接反映活细胞数量, 酶标仪测定的 A 值与细胞活性成正比, 可以反映 VPA 及 3 个代谢产物对 L02 细胞的损伤程度, 采用 Dunnett-t 检验实验组与对照组的差异性, 本实验采用 CCK-8 法测定 VPA 及 3 个代谢产物对 L02 细胞增殖的影响, 结果显示, 随着 VPA 及 3 个代谢产物浓度增加, 其抑制 L02 细胞增殖活性逐渐增强, 其中  $500 \mu\text{mol/L}$  浓度下 5-OH-VPA 组与  $1000 \mu\text{mol/L}$  浓度下各实验组与对照组的 A 值比较有显著性差异 ( $P < 0.05$ ); 在不同时间下, VPA 及 3 个代谢产物干预时间越久, 其抑制 L02 细胞增殖活性越强, 结果表明 VPA 及 3 个代谢产物具有一定的抑制 L02 细胞增殖作用, 并表现为时间依赖性和浓度依赖性。

mRNA 相对含量及蛋白表达实验中, 实验组与对照组相比, CYP1A1、CYP1A2 及 Bax 的 mRNA 相对含量和蛋白表达均有升高, PCNA 及 Bcl-2 的 mRNA 相对含量和蛋白表达量均有下降, PCNA、

表3 灰度值测定结果

组别	胶孔	beta actin	CYP1A1	CYP1A2	PCNA	Bax	Bcl-2
实验组							
VPA	1	1258431	427060	332480	799190	315116	618004
4-ene-VPA	2	1248130	539932	367549	559626	406739	515897
3-OH-VPA	3	1349236	535596	588543	518023	501495	473001
5-OH-VPA	4	1330257	993413	928477	307106	930081	278157
对照组	5	1192064	253207	107878	1151403	121461	635710

表4 VPA及3个代谢产物对L02细胞AST、ALT及LDH的影响

组别	AST (mU/ml)	ALT (mU/ml)	LDH (mU/ml)
实验组			
VPA	59.09±14.87	52.48±17.01	24.45±4.98
4-eneVPA	51.85±13.91	64.80±19.09	12.61±5.33
3-OH-VPA	83.21±37.63*	88.27±21.39*	30.40±8.46*
5-OH-VPA	97.31±12.28*	248.24±42.55*	59.82±13.30*
对照组	41.12±7.18	37.45±11.01	13.43±5.41

\* P<0.05,与对照组比较

Bcl-2及Bax的mRNA相对含量变化表明VPA及3个代谢产物对L02细胞有损害作用,CYP1A1及CYP1A2的mRNA相对含量增加,加剧体内氧化过程,而过多氧化可攻击肝细胞膜上的不饱和脂肪酸,引起过氧化反应,消耗超氧化歧化酶和谷胱甘肽,导致细胞膜结构发生变化,细胞膜通透性增强,细胞增殖抑制甚至死亡<sup>[16]</sup>。因此VPA及3个代谢产物对正常肝细胞有一定的损害作用。

有研究表明,VPA的毒副作用与其血药浓度呈一定的正相关<sup>[12]</sup>,ALT、AST是临床上常用的评价肝毒性的生化指标,ALT和AST的比值大小在判断肝损伤发展程度时有重要意义<sup>[17]</sup>,当L02细胞受损时,细胞质内标志物AST、ALT及LDH会外泄,引起体外培养细胞死亡,故可以通过测定L02细胞上清液中的AST、ALT及LDH来反映细胞的完整性<sup>[18]</sup>。VPA的肝毒性与其代谢产物4-ene-VPA有关<sup>[17,19]</sup>,Chen等<sup>[20]</sup>研究显示肝功能指标AST和ALT与4-ene-VPA浓度存在显著正相关,4-ene-VPA浓度可以用于预警VPA肝毒性发生,在本实验中,实验组中的AST、ALT及LDH与对照组相比均有所升高,且3-OH-VPA组和5-OH-VPA组有显著性差异,结果说明VPA的肝毒性与VPA及3个代谢产物浓度相关。

综上,VPA及3个代谢产物对体外人正常肝细胞L02的增殖具有一定抑制作用,表现为时间依赖

性和浓度依赖性,且能够在核酸和蛋白水平上影响CYP1A1、CYP1A2、PCNA、Bax及Bcl-2的表达。VPA及3个代谢产物可升高细胞中AST、ALT及LDH的活力,提示VPA肝毒性发生与VPA自身及其代谢产物的浓度有关,因此及时监测VPA及其代谢产物的血药浓度对预防肝毒性发生具有重要意义。在此基础上本课题组已成功建立LC-MS/MS法监测癫痫患者血浆VPA及3个代谢产物的血药浓度,该法快速、简便、准确<sup>[21]</sup>,通过监测VPA及3个代谢产物的血药浓度能更好地预警肝毒性不良反应的发生,及时调整癫痫患者VPA的剂量,为临床合理化用药提供帮助。

### 【参考文献】

- [1] Ghodke-Puranik Y, Thorn CF, Lamba JK, *et al.* Valproic acid pathway: pharmacokinetics and pharmacodynamics [J]. *Pharmacogenet Genom* 2013, 23(4): 236-241.
- [2] 冯亚娟,周建华,吴干斌,等. 丙戊酸代谢相关CYP2C19基因多态性在癫痫患儿体内的分布及治疗个体化研究[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2015, 1(5): 49-52.
- [3] 陈蕊,张明. 丙戊酸相关肝损害的治疗进展[J]. *中国新药与临床杂志*, 2015, 34(6): 405-409.
- [4] Schmid MM, Freudenmann RW, Keller F, *et al.* Non-fatal and fatal liver failure associated with valproic acid [J]. *Pharmacopsychiatry*, 2013, 46(02): 63-68.
- [5] Nanau RM, Neuman MG. Adverse drug reactions induced by valproic acid [J]. *Clin Biochem*, 2013, 46(15): 1323-1338.
- [6] Kuzniecky RI, Barkovich AJ. Malformations of cortical development and epilepsy [J]. *Brain Dev*, 2001, 23(1): 2-11.
- [7] 李新林,赵明明,肇丽梅,等. 丙戊酸群体药代动力学研究进展[J]. *实用药物与临床*, 2014, 17(3): 345-349.
- [8] Leppik IE, Bimbaum AK. Epilepsy in the elderly [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1184: 208-224.
- [9] 游春华,高守红,陈万生,等. 群体药代动力学用于丙戊酸钠个体化给药[J]. *第二军医大学学报*, 2015, 36(12): 1-4.
- [10] 万长亮,王志纲. 丙戊酸血药浓度的研究进展[J]. *内蒙古医学院学报*, 2010, 32(4): 31-35.
- [11] 白向荣,姜德春,王育琴. 基因多态性与丙戊酸的药物代谢[J]. *中国药物依赖性杂志*, 2007, 16(4): 241-244.

(下转第53页)

表2 PTX与3种不同取代度载PTX  
纳米粒的IC<sub>50</sub>值(48 h, n=6)

	PTX	SD 6.55%	SD 7.30%	SD 8.95%
IC <sub>50</sub> (μg/ml)	8 657.44	25.81	7.77	0.88

#### 4 结论

本实验合成了3种取代度分别为6.55%、7.30%、8.95%的CHSB,并利用透析法制备载PTX-CHSB纳米颗粒。纳米颗粒在透射电镜(TEM)下观察到近似球形,置激光粒度分析仪(DLS)中检测到颗粒粒径分布较窄。载药量及包封率与白及多糖上胆甾醇琥珀酰基的取代度有一定的关系,在取代度为7.30%时载药量与包封率最大,分别为17.72%和72.06%。在DSC下可以看出药物包载于载体材料中,并非是简单的物理混合。在体外释放实验中载药纳米粒均表现出了一定的缓释能力,无突释现象;在体外细胞摄取试验中显示罗丹明B标记的纳米粒子被内吞进了细胞内。体外药效学结果显示:所选用载体材料具有较好的生物安全性,所制备的载药纳米粒对肿瘤细胞有一定的杀伤能力,且与同浓度的药物溶液相比,杀伤性更大,间接表明了载药纳米粒子更容易被细胞摄取。

本实验从制剂学及体外药效学角度考察了疏水

改性后的白及多糖作为载药纳米粒的载体材料的可行性,为难溶性药物的新剂型研究提供了一定的基础。

#### 【参考文献】

- [1] 孙达锋,史劲松,张卫明,等.白及多糖胶研究进展[J].食品科学,2009,30(3):296.
- [2] 毕亚静,王艳萍,刘福强,等.胆甾醇琥珀酰基白及多糖的制备及其理化性质研究[J].药学实践杂志,2013,31(3):220-222.
- [3] 赵雪竹,刘洋,王艳萍,等.原料纯度对白及多糖疏水改性反应取代度的影响[J].药学实践杂志,2015,33(3):221-225.
- [4] 杨文智.疏水改性普鲁兰多糖及其自组装载药纳米粒的研究[D].北京:北京协和医学院,2009.
- [5] 李磊.胆固醇基-羧甲基可德兰衍生物自聚集纳米粒子的制备以及作为抗肿瘤药物载体的研究[D].北京:中国协和医科大学,2010.
- [6] Gupta PN, Jain S, Nehate C, et al. Development and evaluation of paclitaxel loaded PLGA: poloxamer blend nanoparticles for cancer chemotherapy [J]. Int J Biol Macromol, 2014, 69: 393-399.
- [7] Thomas RG, Moon MJ, Lee S, et al. Paclitaxel loaded hyaluronic acid nanoparticles for targeted cancer therapy: In vitro and in vivo analysis [J]. Int J Biol Macromol, 2015, 72: 510-518.

〔收稿日期〕 2016-08-27 〔修回日期〕 2016-11-08

〔本文编辑〕 顾文华

(上接第47页)

- [12] 储小曼,郭岑,张丽芬.丙戊酸的代谢特征与其肝毒性的相关性[J].中国医学院杂志,2013,33(19):1611-1614.
- [13] Surendrass J, Chang TKH, Abbott FS. Assessment of the role of in situ generated (E)-2, 4-diene-valproic acid in the toxicity of valproic acid and (E)-2-ene-valproic acid in sandwich-cultured rat hepatocytes [J]. Toxicol Appl Pharm, 2012, 264(3): 413-422.
- [14] Kiang TKL, Teng XW, Karagiozov S, et al. Role of oxidative metabolism in the effect of valproic acid on markers of cell viability, necrosis, and oxidative stress in sandwich-cultured rat hepatocytes [J]. Toxicol Sci, 2010, 118(2): 501-509.
- [15] 刘爱旗,夏璐. CCK-8法与MTT法检测兔成纤维细胞活性的比较研究[J].中国医学创新,2013,10(2):12-13.
- [16] 陈海鹰,曹雨诞,颜晓静,等.醋制降低京大戟对人正常肝细胞L02的毒性及机制研究[J].中国中药杂志,2013,38(6): 866-870.
- [17] 王灿,马虹英,王方杰,等.丙戊酸肝毒性的早期预警及预防

研究状况[J].中国临床药理学杂志,2015,31(2):150-154.

- [18] Abarikwu SO, Farombi EO, Pant AB. Biflavanone-kolaviron protects human dopaminergic SH-SY5Y cells against atrazine induced toxic insult [J]. Toxicol In Vitro, 2011, 25(4): 848-858.
- [19] Lee MS, Lee YJ, Kim BJ, et al. The relationship between glucuronide conjugate levels and hepatotoxicity after oral administration of valproic acid [J]. Arch Pharm Res, 2009, 32(7): 1029-1035.
- [20] Chen ZJ, Wang XD, Wang HS, et al. Simultaneous determination of valproic and 2-propyl-4-pentenoic acid for the prediction of clinical adverse effects in Chinese patients with epilepsy [J]. Seizure, 2012, 21: 110-117.
- [21] Gao S, Miao H, Tao X, et al. LC-MS/MS method for simultaneous determination of valproic acid and major metabolites in human plasma [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2011, 879(21): 1939-1944.

〔收稿日期〕 2016-05-31 〔修回日期〕 2016-09-29

〔本文编辑〕 顾文华