

两种克班宁长循环纳米粒的急性毒性与抗心律失常作用研究

崔利利^{1,2}, 孔淑君^{1,3}, 程欣^{1,2}, 金文彬¹, 徐颖¹, 张景莲¹, 王丽¹, 马云淑^{1,4,5} (1. 云南中医药大学中药学院, 云南 昆明 650500; 2. 云南省高校外用给药系统与制剂技术重点实验室, 云南 昆明 650500; 3. 迪沙药业集团有限公司, 山东 威海 264200; 4. 云南省傣医药与彝医药重点实验室, 云南 昆明 650500; 5. 云南省药食同源饮品工程研究中心, 云南 昆明 650500)

摘要: **目的** 对两种经 PEG 修饰载体材料(PELGE、PLGA)制备的克班宁(Crebanine, Cre)长循环纳米粒(PELGE-Cre-NPs、PLGA-Cre-NPs)进行急性毒性试验与抗心律失常作用研究, 探讨其增效减毒的效果。**方法** 采用 Bliss 法对 PELGE-Cre-NPs 与 PLGA-Cre-NPs 进行小鼠急性毒性试验, 求半数致死量(LD₅₀); 采用氯仿诱发小鼠心室纤颤模型、氯化钡(BaCl₂)及乌头碱致心律失常大鼠模型对两种纳米粒进行药效作用考察。**结果** PLGA-Cre-NPs 与 PELGE-Cre-NPs 静脉注射的 LD₅₀ 分别为 13.619 mg·kg⁻¹ 与 14.839 mg·kg⁻¹, 均比克班宁静脉注射的 LD₅₀ (9.382 mg·kg⁻¹) 明显增加。与模型对照组比较, 两种纳米粒均能明显对抗氯仿诱发的小鼠心室纤颤、对抗氯化钡诱发的大鼠心律失常, 明显提高乌头碱诱发大鼠室性早搏(VPB)、室性心动过速(VT)、心室纤颤(VF)及心脏停搏(CA)的阈剂量($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。与克班宁 (5 mg·kg⁻¹) 实验组比较, PELGE-Cre-NPs 高剂量 (5 mg·kg⁻¹) 组恢复窦性心律维持时间 ≥ 5 min 的鼠数量明显增多 ($P < 0.05$), 心脏停搏乌头碱阈剂量明显提高 ($P < 0.05$)。**结论** 两种材料纳米粒 PLGA-Cre-NPs 与 PELGE-Cre-NPs 的毒性较克班宁小, 并具有较明显的抗心律失常活性, 且作用效果强于游离克班宁, 达到增效减毒作用。

关键词: 克班宁; 长循环纳米粒; PELGE-Cre-NPs; PLGA-Cre-NPs; 急性毒性; 抗心律失常作用; 大鼠; 小鼠
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2024)04-0500-06

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2024.04.007

Study on the Acute Toxicity and Antiarrhythmic Effects of Two Kinds of Long-Circulating Crebanine Nanoparticles

CUI Lili^{1,2}, KONG Shujun^{1,3}, CHENG Xin^{1,2}, JIN Wenbin¹, XU Ying¹, ZHANG Jinglian¹, WANG Li¹, MA Yunshu^{1,4,5} (1. College of Chinese Material Medica, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500 Yunnan, China; 2. Yunnan Key Laboratory of External Drug Delivery System and Preparation Technology in Universities, Kunming 650500 Yunnan, China; 3. Disha Pharmaceutical Group Co. Led., Weihai 264200 Shandong, China; 4. Yunnan Key Laboratory of Dai and Yi Medicine, Kunming 650500 Yunnan, China; 5. Engineering Research Center for Medicine and Homologous Beverage of Yunnan Province, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500 Yunnan, China)

Abstract: Objective To compare the acute toxicity and antiarrhythmic effect of the two kinds of long-circulating Crebanine (Cre) nanoparticles (PELGE-Cre-NPs, PLGA-Cre-NPs) prepared from two PEG-modified carrier materials (PELGE, PLGA), and to explore their synergistic and attenuated effects. **Methods** The acute toxicity test of PLGA-Cre-NPs and PELGE-Cre-NPs in mice were conducted by using Bliss method, and LD₅₀ values were calculated by using of statistical software. The effect of PLGA-Cre-NPs and PELGE-Cre-NPs on ventricular fibrillation caused by trichloromethane in mice, ventricular arrhythmia caused by BaCl₂ in rats and arrhythmia

收稿日期: 2023-09-14

作者简介: 崔利利, 女, 讲师, 博士, 研究方向: 中药新型给药系统。Email: cuilili1015@163.com。通信作者: 马云淑, 女, 博士, 教授, 研究方向: 中药药剂学。Email: yunshuma2@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(82060723)。

caused by aconitine in rats was observed. **Results** The LD_{50} of PLGA-Cre-NPs and PELGE-Cre-NPs after intravenous injection were $13.619 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ and $14.839 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, respectively, which showed an obvious increase in LD_{50} compared to that of Cre (LD_{50} , $9.382 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). Compared with the model control group, both nanoparticles significantly inhibited chloroform-induced ventricular fibrillation in mice and barium chloride-induced arrhythmia in rats, and significantly increased the threshold dose of aconitine induced ventricular premature beat (VPB), ventricular tachycardia (VT), ventricular fibrillation (VF) and cardiac arrest (CA) in rats ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$). Compared with Cre ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) group, the number of mice with high-dose of PELGE-Cre-NPs ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) restored sinus rhythm for ≥ 5 minutes was significantly increased ($P < 0.05$). The threshold dose of aconitine in cardiac arrest was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** The toxicity of PLGA-Cre-NPs and PELGE-Cre-NPs were lower than that of Cre, and they had significant antiarrhythmic activity. Moreover, nanoparticles displayed stronger effect than Cre, and they can reduce toxicity of Cre.

Keywords: Crebanine; long-circulating nanoparticles; PELGE-Cre-NPs; PLGA-Cre-NPs; acute toxicity; antiarrhythmic effect; rats; mice

克班宁(Crebanine, Cre)是一种异喹啉类阿朴菲型生物碱^[1],在防己科千金藤属植物中含量较高,提取方法较简便^[2]。克班宁静脉注射及贴剂对 BaCl_2 、乌头碱、 CaCl_2 、氯仿、肾上腺素引起的多种动物心率失常有效^[3-4];能减少心肌缺血及梗死面积,对心肌缺血再灌注损伤有良好的保护作用^[5]。尽管克班宁抗心律失常活性强,起效快,但其不够稳定,遇光、高温易氧化变色,静脉注射毒性大、半衰期短,小鼠静脉注射 LD_{50} 为 $9.382 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,大鼠静脉注射 $t_{1/2\beta}$ 为 $(36.67 \pm 5.52) \text{ min}$,治疗指数小^[6-7]。针对克班宁上述问题,课题组前期试制了氰基丙烯酸正丁酯微粒^[8]、脂质体^[9-10]、经皮贴剂^[11]以期达到减毒保效的作用,但存在载药微粒不够稳定、毒性降低不明显、缓释效果不足或起效较慢等问题。为此,课题组以两种 PEG 修饰载体材料为载体,制备了克班宁长循环纳米粒(PELGE-Cre-NPs、PLGA-Cre-NPs),并对其组织分布及药动学参数进行分析^[12-13]。

本实验旨在研究 PELGE-Cre-NPs 与 PLGA-Cre-NPs 的毒性,并采用氯仿诱发小鼠心室纤颤模型、氯化钡(BaCl_2)及乌头碱致心律失常模型,对两种长循环纳米粒进行抗心律失常活性药效研究和作用机制初步分析,并与克班宁静脉注射进行药效作用比较,以期改善克班宁的药性、研究开发克班宁新型纳米制剂提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 动物 KM 小鼠,SPF 级,110 只体质量 $28 \sim 35 \text{ g}$,160 只体质量 $18 \sim 22 \text{ g}$,雌雄各半,购自湖南斯莱克

景达实验动物有限公司,动物质量合格证号:110324220108015825,生产许可证号:SCXK(湘)2019-0003。SD 大鼠,SPF 级,100 只体质量 $250 \sim 300 \text{ g}$,72 只体质量 $180 \sim 220 \text{ g}$,雌雄各半,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物质量合格证号:110324241100065851,生产许可证号:SCXK(湘)2019-0004。本实验经云南中医药大学动物福利与伦理委员会审批通过,审批伦理号:R-062016002。**1.2 药物及试剂** 乌头碱,批号:20130926,购于上海源叶生物科技有限公司,纯度 $\geq 98\%$;氯化钡,批号:20150401,购于天津市光复科技发展有限公司,纯度 $\geq 98\%$;维拉帕米注射液,批号:43150401,购于上海禾丰制药有限公司;盐酸利多卡因注射剂,批号:115056,购于山东华鲁制药有限公司;氯化钠注射液,批号:20150917,购于昆明南疆制药有限公司;75%乙醇消毒液,批号:121002,购于昆明远方生物制品有限公司;聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA;批号:20140921,截留相对分析质量 20 kDa)、聚乙二醇(-聚乳酸-羟基乙酸)-聚乙二醇三嵌段共聚物(PELGE;批号:20140918,截留相对分析质量 $4-20-4 \text{ kDa}$),购于济南岱刚生物科技有限公司;PLGA-Cre-NPs ($1.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),自制,包封率:87.51%;PELGE-Cre-NPs ($1.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),自制,包封率:91.66%。

1.3 仪器 BT25S 十万分之一电子天平,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;WZ-50C6 微量注射泵、WZ-50C6T 微量注射泵,浙江史密斯医学仪器有限公司;BL-420E 生物机能实验系统,成都泰盟科技有

限公司；一次性使用无菌注射器，上海康寿医疗器械有限公司；0.45 μm 尼龙水系微孔滤膜，天津市津腾实验设备有限公司。

1.4 急性毒性试验预试验 取健康小鼠40只，体质量18~22 g，随机分成10组，每组4只，雌雄各半。PLGA-Cre-NPs、PELGE-Cre-NPs分别设置40、20、10、5、2.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 5个剂量组。尾静脉注射给药后观察各组小鼠的中毒反应及死亡情况，并持续观察14 d，记录小鼠的死亡情况，找出引起动物0%(Dn)和100%(Dm)死亡的剂量，以此作为依据，计算正式试验分组的组距。实验初步得出引起小鼠死亡的剂量，PLGA-Cre-NPs: Dm=20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, Dn=10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ；PELGE-Cre-NPs: Dm=20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, Dn=10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

1.5 半数致死量(LD₅₀)的测定 各组试验在10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 与20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 之间设6个剂量组，每组10只，雌雄各半，给药剂量按等比递减，组间剂量比值为0.9。PLGA-Cre-NPs剂量组依次设置为17.78、16.00、14.40、12.80、11.67、10.50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ，PELGE-Cre-NPs剂量组依次设置为20.00、18.00、16.20、14.58、13.12、11.81 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。各组均采用尾静脉注射给药，观察并记录各组小鼠的中毒反应及死亡情况。

1.6 氯仿诱发小鼠心室纤颤分组与给药 取体质量为28~35 g的健康小鼠110只，随机分为11组，每组10只，雌雄各半；分为正常对照组、模型对照组、利多卡因阳性对照组(5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、维拉帕米阳性对照组(4 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、克班宁^[14]实验组(Cre, 5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、PLGA-Cre-NPs和PELGE-Cre-NPs高(5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、中(2.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、低(1.25 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)剂量组。各组均尾静脉注射，给药5 min后，除正常对照组外，其他各组实验动物均放入含4 mL氯仿棉球(每换一只小鼠追加氯仿1 mL)的500 mL倒置烧杯中，待小鼠呼吸停止后，立即取出；快速剖开胸腔，观察小鼠心室是否纤颤^[10]，记录结果并进行统计比较。

1.7 BaCl₂诱发大鼠心律失常动物分组与给药 以BaCl₂诱发过速型心律失常模型^[15]为抗心律失常的经典模型，研究不再设立正常对照组。取SD大鼠，体质量250~300 g，随机分为10组，每组10只，雌雄各半，分别为模型对照组(4 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)，利多卡因阳性对照组(5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)，维拉帕米阳性对照组(5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)，克班宁实验组(5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)，PLGA-Cre-NPs和PELGE-Cre-NPs高(5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、中(2.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、低(1.25 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)剂量组。将大鼠麻醉仰位固定于鼠板上，连接心电信号采集系统，连接II导联，并记录

一段正常心电图。舌下静脉注射BaCl₂溶液4 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ，观察心电图，待出现心律失常3 min后，舌下静脉注射给药。观察各组大鼠恢复窦性心律的情况，并详细记录各组能够恢复窦性心律的大鼠数量、窦性心律维持时间大于5 min的数量和窦性心律维持时间大于20 min的数量。

1.8 乌头碱诱发的大鼠心律失常动物分组与给药 以乌头碱诱发的大鼠心律失常模型为抗心律失常的经典模型^[16]，研究不再设立正常对照组。取SD大鼠，体质量180~220 g，随机分9组，每组8只，雌雄各半。分别为模型对照组(4 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)，利多卡因阳性对照组(5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)，克班宁实验组(5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)，PLGA-Cre-NPs和PELGE-Cre-NPs高(5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、中(2.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、低(1.25 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)剂量组。将大鼠麻醉仰位固定于鼠板上，连接心电信号采集系统，连接II导联，记录一段正常心电图。分离一侧股静脉，舌静脉注射药物，5 min后，用微量泵以每分钟10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的速度于股静脉恒速输注乌头碱溶液，连续记录II导联心电图，分别记录各组动物发生室性早搏(VPB)、室性心动过速(VT)、心室纤颤(VF)及心脏停搏(CA)所需的时间。

1.9 统计学处理方法 采用统计软件SPSS 19.0进行分析，对小鼠的室颤发生率、BaCl₂诱发过速型心律失常大鼠模型的数据采用卡方检验($\alpha=0.05$)，对乌头碱诱发的大鼠心律失常的影响，将记录的时间换算成乌头碱的给药量(每分钟10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)，先进行组间方差齐性检验，得出F值及P值($\alpha=0.05$)。方差齐则进行t检验，方差不齐则进行t'检验。以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 急性毒性试验结果 给予PELGE-Cre-NPs、PLGA-Cre-NPs后，两者中毒症状相似，出现瞳孔放大、眼球突出、竖尾、弹跳、抽搐、呼吸急促、流涎、小便失禁、死亡等症状。各剂量组给药后，由高到低剂量组，PLGA-Cre-NPs各组的死亡率分别为100%、80%、70%、30%、20%、0%；PELGE-Cre-NPs各组的死亡率分别为90%、80%、70%、50%、30%、10%。使用统计软件SPSS 19.0，采用机率单位加权回归法(Bliss法)，分别计算PELGE-Cre-NPs、PLGA-Cre-NPs的LD₅₀。PLGA-Cre-NPs的半数致死量LD₅₀=13.619 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ，回归方程： $Y[\text{PROBIT}(p)]=-18.803(\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1})+16.5791\text{g}(\text{D})$ ，LD₅₀ 95%的可信

限为 12.802 ~ 14.499 mg · kg⁻¹, LD₅=10.838 mg · kg⁻¹, LD₉₅=17.115 mg · kg⁻¹。PELGE-Cre-NPs 的半数致死量 LD₅₀=14.839 mg · kg⁻¹, 回归方程: Y[PROBIT(p)]=-12.694(mg · kg⁻¹) + 10.837 lg(D), LD₅₀ 95% 的可信限为 18.126 ~ 28.699 mg · kg⁻¹, LD₅=10.462 mg · kg⁻¹, LD₉₅=21.046 mg · kg⁻¹。

2.2 纳米粒对氯仿诱发小鼠心室纤颤的影响 见表 1。正常对照组小鼠室颤率为 0%，模型对照组小鼠室颤率为 90%，提示小鼠纤颤造模成功。与模型对照组比较，利多卡因阳性组、维拉帕米阳性组能够明显对抗氯仿诱发的小鼠心室纤颤(P < 0.01)。与模型对照组比较，PLGA-Cre-NPs 高、中剂量组和 PELGE-Cre-NPs 高、中、低剂量组能够明显对抗氯仿诱发的小鼠心室纤颤(P < 0.01)；PLGA-Cre-NPs 低剂量组、Cre 实验组能够对抗氯仿诱发的小鼠心室纤颤(P < 0.05)。PLGA-Cre-NPs 和 PELGE-Cre-NPs 的各剂量组分别与维拉帕米阳性组、利多卡因阳性组、克班宁实验组比较，P 值均大于 0.05，提示这两种纳米粒对抗氯仿诱发小鼠心室纤颤的效果与上述各药物的差异无统计学意义。

表 1 各组对氯仿诱发小鼠心室纤颤模型的影响 (n=10)

Table 1 Effects of chloroform-induced ventricular fibrillation in mouse models (n=10)

编号	组别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	室颤数/个	室颤率/%
1	正常对照组	-	0	0
2	模型对照组	-	9	90
3	利多卡因阳性组	5	3	30**
4	维拉帕米阳性组	4	2	20**
5	克班宁实验组	5	4	40*
6	PELGE-Cre-NPs 高剂量组	5	2	20**
7	PELGE-Cre-NPs 中剂量组	2.5	3	30**
8	PELGE-Cre-NPs 低剂量组	1.25	3	30**
9	PLGA-Cre-NPs 高剂量组	5	2	20**
10	PLGA-Cre-NPs 中剂量组	2.5	3	30**
11	PLGA-Cre-NPs 低剂量组	1.25	4	40*

注：经卡方检验，与模型对照组比较，*P < 0.05, **P < 0.01

2.3 纳米粒对 BaCl₂ 诱发的大鼠心律失常的影响 见表 2。与模型对照组比较，利多卡因阳性组恢复窦性心律的大鼠数量及窦性心律维持时间 ≥ 5 min 的大鼠数量均明显上升(P < 0.001)，提示利多卡因能够明显对抗 BaCl₂ 诱发的过速型心律失常，此实验体系可信。

以恢复的大鼠数量为标准，与模型对照组比较，克班宁实验组(P < 0.001)、PLGA-Cre-NPs 高(P <

0.001)、中(P < 0.001)、低(P < 0.05)剂量组和 PELGE-Cre-NPs 高(P < 0.001)、中(P < 0.001)、低(P < 0.01)剂量组能够对抗 BaCl₂ 诱发的过速型心律失常，增多恢复的大鼠数量。

以维持时间 ≥ 5 min 的数量为标准，与模型对照组比较，PELGE-Cre-NPs 高(P < 0.001)、中(P < 0.01)剂量组及 PLGA-Cre-NPs 高(P < 0.01)剂量组能够对抗 BaCl₂ 诱发的过速型心律失常，增多窦性心律维持时间 ≥ 5 min 的大鼠的数量。与克班宁阳性组及维拉帕米阳性组比较，PELGE-Cre-NPs 高剂量组恢复窦性心律维持时间 ≥ 5 min 的大鼠数量明显增多(P < 0.05)，以维持时间 ≥ 20 min 的数量为标准，与模型对照组比较，PELGE-Cre-NPs 高剂量组(P < 0.01)、PLGA-Cre-NPs 高剂量组(P < 0.05)，能够对抗 BaCl₂ 诱发的过速型心律失常，增多窦性心律维持时间 ≥ 20 min 的大鼠的数量。以上提示 PELGE-Cre-NPs、PLGA-Cre-NPs 能延长恢复窦性心率后的维持时间。

表 2 各组对 BaCl₂ 诱发大鼠心律失常的影响 (n=10)

Table 2 Effects of BaCl₂-induced arrhythmia in rats (n=10)

组别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	恢复的鼠数/只	维持时间 ≥ 5 min 的鼠数/只	维持时间 ≥ 20 min 的鼠数/只
模型对照组	-	1	1	0
利多卡因阳性组	5	10***	10***	5**
维拉帕米阳性组	5	10***	4	1
克班宁实验组	5	10***	5	2
PELGE-Cre-NPs 高剂量组	5	10***	9***▲△	5**
PELGE-Cre-NPs 中剂量组	2.5	10***	8**	3
PELGE-Cre-NPs 低剂量组	1.25	8**	4	2
PLGA-Cre-NPs 高剂量组	5	10***	7**	4*
PLGA-Cre-NPs 中剂量组	2.5	10***	5	3
PLGA-Cre-NPs 低剂量组	1.25	6*#	5	3

注：卡方检验。与模型对照组比较，*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001；与维拉帕米阳性组比较，▲P < 0.05；与克班宁实验组比较，△P < 0.05

2.4 纳米粒对乌头碱诱发的大鼠心律失常的影响 见表 3。与模型对照组比较，利多卡因阳性组可提高乌头碱致 VPB 的阈剂量(P < 0.05)，对乌头碱致 VT、VF、CA 等的阈剂量均明显增加(P < 0.001)，提示利多卡因阳性组有明显对抗乌头碱致 VPB、VT、VF、CA 的作用，此实验体系可信。

与模型对照组比较，克班宁实验组 VPB 的乌头碱阈剂量增加(P < 0.05)，同时 VT、VF、CA 的乌头碱阈剂量明显增加(P < 0.01)。PELGE-Cre-NPs 高剂量组 VPB(P < 0.01)、VT(P < 0.01)、VF(P < 0.001)、

CA ($P < 0.001$) 的乌头碱阈剂量明显增加; PELGE-Cre-NPs 中剂量组 VPB ($P < 0.05$)、VT ($P < 0.05$)、CA ($P < 0.05$)、VF ($P < 0.001$) 乌头碱阈剂量明显增加。PLGA-Cre-NPs 高剂量组 VT ($P < 0.001$)、VF ($P < 0.001$)、CA ($P < 0.001$) 的乌头碱阈剂量明显增加; PLGA-Cre-NPs 中剂量组 VF 的乌头碱阈剂量增加 ($P < 0.05$)。

与利多卡因阳性组比较, PELGE-Cre-NPs 高剂量组 CA 的乌头碱阈剂量明显增加 ($P < 0.01$), 提示在乌头碱致 CA 方面, PELGE-Cre-NPs 高剂量比利多卡因的对抗作用明显。与克班宁实验组比较, PELGE-Cre-NPs 高剂量组 CA 的乌头碱阈剂量提高 ($P < 0.05$), 提示在乌头碱致 CA 方面, PELGE-Cre-NPs 高剂量比克班宁的对抗作用明显。

表 3 各组对乌头碱诱发大鼠心律失常的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 Effects on arrhythmia induced by aconitine in rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	乌头碱阈剂量/(μg·kg ⁻¹)			
		VPB	VT	VF	CA
模型对照组	-	14.49 ± 2.11	18.31 ± 4.08	32.73 ± 6.44	60.71 ± 4.48
利多卡因阳性组	5	19.34 ± 5.40*	40.39 ± 4.05***	53.27 ± 8.70***	77.75 ± 4.86***
克班宁实验组	5	19.36 ± 5.61*	31.60 ± 11.41**	54.33 ± 14.66**	78.28 ± 15.37**
PELGE-Cre-NPs 高剂量组	5	18.76 ± 3.13**	29.56 ± 8.33**	63.47 ± 11.52***	93.88 ± 12.35****#
PELGE-Cre-NPs 中剂量组	2.5	18.37 ± 4.11*	31.06 ± 7.91*	55.87 ± 6.36***	76.12 ± 14.66*
PELGE-Cre-NPs 低剂量组	1.25	15.33 ± 3.66	18.38 ± 2.83	45.78 ± 10.12**	65.53 ± 7.39
PLGA-Cre-NPs 高剂量组	5	15.60 ± 2.69	39.28 ± 7.74***	60.57 ± 9.36***	81.10 ± 10.19***
PLGA-Cre-NPs 中剂量组	2.5	16.83 ± 5.41	20.33 ± 4.31	41.26 ± 7.52*	73.60 ± 17.39
PLGA-Cre-NPs 低剂量组	1.25	15.00 ± 3.43	20.29 ± 3.78	32.94 ± 3.86	59.80 ± 9.78

注: *t* 检验。与模型对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与利多卡因阳性组比较, # $P < 0.01$; 与克班宁组比较, ^Δ $P < 0.05$

3 讨论

本实验对 PLGA-Cre-NPs、PELGE-Cre-NPs 两种克班宁纳米制剂急性毒性及药效进行研究。急性毒性试验中发现, 小鼠中毒症状表现为竖尾, 继而弹跳, 四肢持续猛蹬, 瞳孔突出, 嘴角流涎, 小便失禁, 抽搐死亡。实验中对已经停止呼吸的小鼠进行解剖, 发现纳米粒组心跳仍在持续节律性跳动, 并维持一定时间。纳米粒可能具有中枢和运动神经系统、自主神经系统、呼吸系统毒性^[17-18]。但 PLGA-Cre-NPs ($LD_{50} = 13.619 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、PELGE-Cre-NPs ($LD_{50} = 14.839 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 这两种纳米粒的毒性较克班宁 ($LD_{50} = 9.382 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 小^[6], 可达到制剂减毒的目的, 且 PELGE-Cre-NPs 的减毒效果比 PLGA-Cre-NPs 更好。

氯仿诱发小鼠心室纤颤研究表明, PLGA-Cre-NPs ($1.25 \sim 5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和 PELGE-Cre-NPs ($1.25 \sim 5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 能够明显对抗氯仿诱发的小鼠心室纤颤。PLGA-Cre-NPs 和 PELGE-Cre-NPs 对抗氯仿诱发小鼠心室纤颤的作用与利多卡因、维拉帕米、克班宁相当。

氯化钡 (BaCl_2) 诱发的大鼠心律失常作用机理与 Ca^{2+} 相似, 静脉注射给药后导致大鼠产生室性早搏、

室性心动过速和心室颤动, 与细胞膜上 Ca^{2+} 的内流有关; 也可能是因为抑制 K^+ 的流出, 因而增加四肢坡度, 提高心房传导组织和房室束-浦顷野氏纤维等快反应细胞的自律性^[19-20]。本实验中, PLGA-Cre-NPs ($1.25 \sim 5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、PELGE-Cre-NPs ($1.25 \sim 5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 对 BaCl_2 诱发的大鼠心律失常具有良好的抑制作用, 与利多卡因 ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 阳性组的差异无统计学意义。PELGE-Cre-NPs 高剂量 ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 比克班宁 ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、维拉帕米 ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 的抗心律失常作用更明显。

乌头碱诱发大鼠心律失常的模型机理, 可能与其使心肌细胞 Na^+ 通道开放, 加速 Na^+ 内流, 促使细胞膜去极化, 从而提高心房传导组织和房室束-浦顷野氏纤维等快反应细胞的自律性, 导致形成一源性或多源性异位节律, 缩短不应期有关^[19-20]。本实验中, PLGA-Cre-NPs、PELGE-Cre-NPs 能提高乌头碱诱发大鼠发生室性早搏 (VPB)、室性心动过速 (VT)、心室纤颤 (VF) 及心脏停搏 (CA) 的阈剂量。另外, 值得关注的是, 在提高心脏停搏的阈剂量方面, PELGE-Cre-NPs 高剂量 ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 明显优于利多卡因 ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 与克班宁 ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。以上说明, 制备的克班宁纳米制剂能明显增加抗心律失常药效, 抑制心肌细胞 Na^+ 通道开放, 抑制心肌细胞的去极化作用^[18,21],

且能延长乌头碱致室性早搏、室性心动过速和心室颤动、心脏停搏的时间，增加阈剂量，表现出纳米粒的延效作用。

综上所述，PLGA-Cre-NPs、PELGE-Cre-NPs 这两种克班宁纳米粒较克班宁的毒性小，抗心律失常效果明显，在一定程度上达到了减毒增效作用；其中，PELGE-Cre-NPs 制剂比 PLGA-Cre-NPs 制剂的毒性更小，可为后期制剂开发提供实验依据。

参考文献：

[1] 汪波. 云南地不容化学成分及阿朴菲型生物碱抗心律失常构效关系初步研究[D]. 昆明：云南中医学院，2013.

[2] 彭扶云. 云南地不容的化学成分研究[D]. 昆明：云南中医学院，2014.

[3] 淤泽溥，马云淑，赵子仙，等. 克班宁的抗心律失常作用[J]. 中国中药杂志，1992，11：685-687.

[4] 崔利利，李婧瑜，徐鹤，等. 克班宁贴剂在大鼠体内的药动学与药效学评价[J]. 南京中医药大学学报，2022，38(11)：1062-1068.

[5] 李卫林，淤泽溥，林青，等. 克班宁对大鼠心肌缺血及缺血再灌注所致心律失常的影响[J]. 中国药理学通报，2005，21(8)：1019-1020.

[6] 马云淑，武鸿萍，张壮丽. 克班宁急性毒性与抗心律失常活性的初步研究[J]. 中国现代应用药学，2005，22(5)：18-19.

[7] 马云淑，商庆节，白一岑，等. 克班宁在大鼠体内的药动学[J]. 中国医院药学杂志，2010，30(10)：819-821.

[8] 张晓雷，马云淑，程欣，等. 盐酸克班宁氰基丙烯酸正丁酯毫微粒的制备工艺研究[J]. 云南中医学院学报，2007，30(5)：19-24.

[9] 刘娜，陈凌云，等. 克班宁长循环脂质体的制备工艺[J]. 中国医院药学杂志，2015，35(12)：1076-1079.

[10] 陈玲玲，马云淑，晏菲，等. 克班宁脂质体抗心律失常作用的研究[J]. 中国现代应用药学，2016，33(11)：1359-1361.

[11] 李婧瑜，马云淑，杨子贤，等. 克班宁透皮贴剂的制备及其体外经皮渗透实验研究[J]. 中国新药杂志，2017，26(21)：2584-2589.

[12] 程欣，孔淑君，马云淑，等. PLGA-克班宁纳米粒的制备、表征及体外释药规律分析[J]. 中国实验方剂学杂志，2018，24(9)：9-14.

[13] 崔利利，孔淑君，王辉，等. PELGE-克班宁纳米粒在大鼠体内的组织分布及药动学研究[J]. 中国药房，2022，33(24)：2957-2961.

[14] CUI L, PENG C, LI J, et al. The anti-inflammatory and analgesic activities of 2Br-Crebanine and Stephanine from *Stephania yunnanensis* H. S. Lo[J]. *Front Pharmacol*, 2023, 13: 1092583.

[15] SERGEEVICHEV D, FOMENKO V, STRELNIKOV A, et al. Botulinum Toxin-Chitosan Nanoparticles prevent arrhythmia in experimental rat models[J]. *Mar Drugs*, 2020, 2, 18(8): 410.

[16] HAZARI M S, HAYKAL-COATES N, WINSETT D W, et al. The effects of B0, B20, and B100 soy biodiesel exhaust on aconitine-induced cardiac arrhythmia in spontaneously hypertensive rats[J]. *Inhal Toxicol*, 2015, 27(11): 557-563.

[17] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 2版. 上海：上海科学技术出版社，2006：386-389.

[18] 陈成. 云南地不容中生物碱类成分及抗心律失常作用的初步研究[D]. 昆明：云南中医学院，2015.

[19] 晏菲. 山乌龟亚属中阿朴啡类生物碱抗心律失常作用初步研究[D]. 昆明：云南中医学院，2014.

[20] 钱慕仪. 抗心律失常药研究新进展[J]. 当代医学，2010，7(4)：22-24.

[21] 杨宝峰，蔡本志. 心律失常发病机制研究进展[J]. 国际药学研究杂志，2010，53(2)：81-88.

(编辑：修春)