

雷公藤多甙纳米乳的抗炎及免疫抑制试验

何 欣, 欧阳五庆, 许利耕, 阳卫超, 吴旭锦

(西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】 **【目的】**制备雷公藤多甙纳米乳(TP-NE),并考察其抗炎及免疫抑制效果。**【方法】**滴定法制备雷公藤多甙纳米乳,建立SD大鼠蛋清性关节炎和佐剂性关节炎模型,用雷公藤多甙片(TP)和TP-NE进行治疗,治疗过程中测量足部体积,观察其抗炎效果,治疗24 d后用噻唑兰(MTT)法研究TP-NE对脾淋巴细胞增殖活性的影响,并检测血清中超氧化物歧化酶(SOD)的活性和氧化氮(NO)的含量。**【结果】**TP-NE棕黄色、澄清、透明、平均粒径为23.6 nm,其对大鼠蛋清性关节炎有保护作用,对大鼠佐剂性关节炎有治疗作用,且给药时间越长治疗效果越显著;TP-NE对脾淋巴细胞增殖有显著的抑制作用,可以显著增强血清中SOD活性,极显著降低血清中NO含量。**【结论】**TP-NE具有较好的抗炎和免疫抑制效果,且具有一定的缓释效应。

【关键词】 纳米乳;雷公藤多甙;抗炎;免疫抑制

【中图分类号】 S853.76

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2008)02-0067-05

Study on anti-inflammatory and immunoinhibition test of Tripterygium polyglycosides nanoemulsion

HE Xin, OUYANG Wu-qing, XU Li-geng, YANG Wei-chao, WU Xu-jin

(College of Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** Tripterygium polyglycoside nanoemulsion(TP-NE) was prepared to assess its anti-inflammatory and immunoinhibition effects. **【Method】** TP-NE was prepared by titrimetric method, albumen arthritis and adjuvant-induced arthritis were cured by TP and TP-NE, the anti-inflammatory effects by measuring the volume of foot each 4 d during the curing period was researched. After 24 d, the multiplication activity of splenic lymphocyte through MTT method, was observed and the content of superoxide dismutase (SOD) and nitrogen monoxide (NO) in serum was detected. **【Result】** The results showed that the TP-NE was clear, the mean diameter was 23.6 nm. The albumen arthritis could be prevented and the inflammatory reaction of adjuvant-induced arthritis could be relieved lymphocyte proliferation could be inhibited remarkably. The activity of SOD was reinforced and the content of NO was lowered in serum. **【Conclusion】** TP-NE has preferably anti-inflammatory and immunoinhibition effect and has slow-release potency.

Key words: nanoemulsion; Tripterygium polyglycoside; anti-inflammatory; immunoinhibition

纳米乳(Nanoemulsion, NE), 又称微乳(Micro-emulsion, ME), 是一种新型药物载体, 可以增强药物的溶解性, 显著提高药物的生物利用度, 促进药物

透皮吸收, 提高药效, 降低其毒副作用^[1]。纳米乳作为一种透皮载药系统具有其显著的优越性, 近年来对纳米乳透皮制剂的研究较多。陈华兵等^[2]制备的

* [收稿日期] 2007-03-08

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2006BAD04A11); 西北农林科技大学校长基金项目(130709)

[作者简介] 何 欣(1980—), 女, 河北藁城人, 在读博士, 主要从事新药开发研究。E-mail: hexinyangling22@yahoo.com.cn

[通讯作者] 欧阳五庆(1960—), 男, 陕西凤翔人, 教授, 博士生导师, 主要从事纳米药物研究。E-mail: oywq506@sina.com

布洛芬微乳透皮制剂,可提高药物的局部浓度,有利于对局部炎症和疼痛的治疗,减少全身不良反应。宋金春等^[3]制备的马钱子碱微乳,促进了马钱子碱的透皮吸收,显示出缓释、高效的转运特点,载有马钱子碱的微乳有望成为一种新型透皮制剂。廉云飞^[4]制备的吡哆美辛微乳,增大了药物的溶解度,通过透皮给药,减少了药物对胃肠道的刺激。雷公藤多甙(Tripterygium Polyglycosides, TP)由雷公藤的根(去皮)经粉碎、提取、精制而成,难溶于水,具有显著的抗炎和免疫抑制作用,临床上主要用于治疗类风湿性关节炎、红斑狼疮、慢性肾炎、皮肤病等^[5],但其毒性较强,不良反应发生频率远高于其他药物^[6]。从而使其临床应用受到限制。

本研究将纳米乳作为药物载体对雷公藤多甙进行包合,在制备雷公藤多甙纳米乳的基础上,以 SD 大鼠为试验对象,建立两种关节炎模型,对雷公藤多甙纳米乳和雷公藤多甙片的抗炎与免疫抑制效果进行了比较,旨在研制一种高效低毒的雷公藤多甙新剂型,以扩大其临床应用。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 试验动物 SD 大鼠,质量(180±20) g,72 只,雌性,购于第四军医大学。

1.1.2 药品和试剂 雷公藤多甙片(TP tablets)为黄石飞云制药有限公司产品,批号:20060117;肉豆蔻酸异丙酯(IPM)为上海高维实业公司产品,批号:20050625;聚氧乙烯氢化蓖麻油(RH-40)为德国 BASF 公司产品;美诺芬(Aceclofenac Tablets)为西安海欣制药有限公司产品,批号:060201;弗氏完全佐剂、刀豆蛋白 A(Con A)、植物血凝素(PHA-P)和噻唑兰(MTT)均为 SIGMA 公司产品;RPMI-1640 培养基和犊牛血清为民海生物公司产品,犊牛血清批号:20060420;超氧化物歧化酶试剂盒和一氧化氮试剂盒均为南京建成生物工程研究所产品。

1.1.3 主要仪器 HITACHI 高效液相色谱仪和 JEM1230 透射电子显微镜均为日本日立公司生产,马尔文激光粒度分析仪为英国马尔文公司生产,Model550 酶标仪为美国 BIO-RAD 公司生产,CO₂ 培养箱为日本三洋公司生产。

1.2 雷公藤多甙纳米乳的制备

通过溶解度试验,选择 IPM 为油相、RH-40 为表面活性剂、乙醇为助表面活性剂,利用滴定法绘制伪三元相图^[7-8],选择离心(10 000 r/min,30 min)稳

定,乳剂粒径在 1~100 nm 的纳米乳区为配方候选区。按 $m(\text{表面活性剂}):m(\text{助表面活性剂})=9:1$, $m(\text{混合表面活性剂}):m(\text{油})=9:1$ 比例混合均匀(制备雷公藤多甙纳米乳时需精确称取适量雷公藤多甙加入到混合液体中),搅拌,同时逐滴加入注射用水,即得澄清透明的空白纳米乳;加入适量雷公藤多甙即得雷公藤多甙纳米乳(TP-NE)。用透射电子显微镜观察其形态,马尔文激光粒度分析仪测定其粒径。

1.3 雷公藤多甙纳米乳对大鼠蛋清性关节炎的保护作用

1.3.1 大鼠蛋清性关节炎模型的建立 SD 大鼠右后足跖皮内注射 0.1 mL 体积分数 10% 的新鲜蛋清溶液致炎,建立蛋清性关节炎模型^[9]。

1.3.2 用药方法 取 SD 大鼠 32 只,随机分为 4 组,每组 8 只。阳性对照组灌服生理盐水,灌胃剂量为 5 mL/kg;雷公藤多甙片组,灌胃给药,灌胃剂量为 8.75 mg/kg(此剂量为按成人比例换算而得)^[10];雷公藤多甙纳米乳组,涂抹给药,涂抹剂量为 8.75 mg/kg;美诺芬片组,灌胃给药,灌胃剂量为 15 mg/kg。给药 7 d,每天 1 次,末次给药后大鼠右后足跖皮内注射体积分数 10% 的新鲜蛋清溶液造模,分别在建立模型前及建立模型后 0.5,1,2,4,8 和 24 h,用自制的毛细管放大测量器测量右后足踝关节以下部分的体积。

1.4 雷公藤多甙纳米乳对大鼠佐剂性关节炎的治疗作用

1.4.1 大鼠佐剂性关节炎模型的建立 取 SD 大鼠 32 只,用自制的毛细管放大测量器测量足部体积,然后对每只大鼠右后跖皮内注射弗氏完全佐剂 0.1 mL 致炎^[11],每隔 4 d 测量 1 次足部体积,待右后足(原发侧足)和左后足(继发侧足)肿胀均达到高峰(约 20 d)时,模型建立成功。

1.4.2 用药治疗 将 1.4.1 中 32 只模型动物随机分为 4 组,每组 8 只,模型组,灌胃生理盐水,灌胃剂量为 5 mL/kg;雷公藤多甙片组,灌胃给药,灌胃剂量为 8.75 mg/kg(此剂量为按成人比例换算而得)^[10];雷公藤多甙纳米乳组,涂抹给药,涂抹剂量为 8.75 mg/kg;空白纳米乳组,涂抹给药,涂抹体积与雷公藤多甙纳米乳组相同。另取 8 只未造模型 SD 大鼠为正常对照组,灌胃生理盐水,灌胃剂量为 5 mL/kg。各组连续给药 24 d,每天 1 次,每隔 4 d 测量 1 次原发侧足和继发侧足体积,计算肿胀度。肿胀度/mL=治疗后体积-造模前体积。

1.5 雷公藤多甙纳米乳对大鼠脾淋巴细胞增殖的影响

佐剂性关节炎大鼠治疗 24 d 后眶窦采血处死, 无菌采取脾脏, 制备淋巴细胞单细胞悬液, Hank's 液洗涤 2 次, 用含体积分数 10% 小牛血清的 1640 培养液调整细胞浓度为 $5 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$, 将细胞悬液接种至 96 孔板, 接种量为 $100 \mu\text{L}/\text{孔}$, 然后分别加入 $100 \mu\text{L}$ 含体积分数 10% 小牛血清的 1640 培养液、含 3 mg/L 刀豆蛋白 A(Con A) 的 1640 培养液和含 18 mg/L 植物血凝素(PHA-P) 的 1640 培养液, 每处理重复 2~3 孔^[12]。置 37 ℃ 饱和湿度、体积分数 5% CO_2 培养箱中培养 68 h, 每孔加 $10 \mu\text{L}$ MTT, 继续培养 4 h, 每孔加 $100 \mu\text{L}$ 二甲亚砜, 振荡, 于 570 nm 处测 OD_{570} 值^[13], 并计算细胞增殖的抑制率: $\text{抑制率}/\% = (1 - \text{试验组 } \text{OD}_{570} / \text{对照组 } \text{OD}_{570}) \times 100\%$ ^[14]。

1.6 雷公藤多甙纳米乳对大鼠血清中超氧化物歧化酶(SOD)活性和一氧化氮(NO)含量的影响

佐剂性关节炎大鼠治疗结束后眶窦采血, 收集血清。黄嘌呤氧化酶法测血清中 SOD 活性, 硝酸还原酶法测血清中 NO 含量, 具体测定方法按超氧化物歧化酶试剂盒和一氧化氮试剂盒说明书进行。

1.7 数据处理

数据用 SPSS11.0 软件进行统计分析, 用“平均值±标准差($\bar{X} \pm S$)”表示。

2 结果与分析

2.1 雷公藤多甙纳米乳的物理性状

选用 IPM 为油相, RH-40 为表面活性剂, 乙醇为助表面活性剂, 制备空白纳米乳和雷公藤多甙纳米

乳。空白纳米乳橙黄色、澄清、透明、流动性良好, 雷公藤多甙纳米乳棕黄色、澄清、透明、流动性良好。雷公藤多甙纳米乳颗粒在透射电镜下观察均呈圆球形, 且乳滴粒径大多为 10~100 nm, 激光粒度分析仪测定其平均粒径为 23.6 nm。

2.2 雷公藤多甙纳米乳对大鼠蛋清性关节炎的保护作用

由图 1 可以看出, 雷公藤多甙纳米乳的抗炎效果优于相同剂量下的雷公藤多甙片; 4 h 后美诺芬片剂和雷公藤多甙片的治疗作用已不明显, 而雷公藤多甙纳米乳的治疗作用在 24 h 内效果一直明显, 说明雷公藤多甙纳米乳具有缓释性。

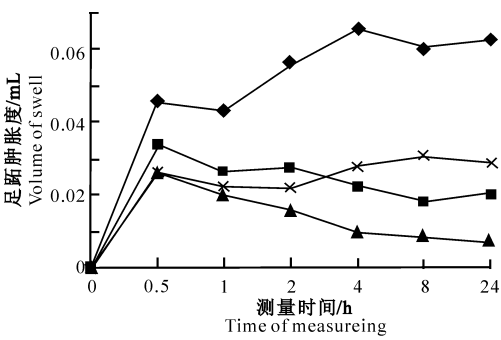


图 1 雷公藤多甙纳米乳对大鼠蛋清性关节炎的保护作用
—◆—, 阳性对照; —■—, 雷公藤多甙片;
—▲—, 雷公藤多甙纳米乳; —×—, 美诺芬片
Fig. 1 Prevention effect of TP-NE against albumen arthritis
—◆—, Positive control; —■—, TG tablets; —▲—, TP-NE; —×—, Aceclofenac tablets

2.3 雷公藤多甙纳米乳对大鼠佐剂性关节炎的治疗作用

雷公藤多甙纳米乳对大鼠佐剂性关节炎的治疗作用见表 1 和表 2。

表 1 雷公藤多甙纳米乳对大鼠佐剂性关节炎原发侧足肿胀的治疗作用 (n=8)
Table 1 Therapeutic action of TP-NE on primarily feet swelling of rats with adjuvant arthritis (n=8)

组别 Groupe	肿胀度/ mL Volume of swell					
	4 d	8 d	12 d	16 d	20 d	24 d
正常对照组 Blank control	0.017±0.029	0.013±0.012	0.010±0.017	0.007±0.012	0.005±0.005	0.017±0.015
模型组 Positive control	1.033±0.058	1.067±0.029	1.067±0.058	1.067±0.115	0.900±0.000	0.933±0.115
雷公藤多甙片组 TP tablets	0.967±0.057	0.780±0.108	0.713±0.155 [#]	0.550±0.180 [#]	0.533±0.104 ^{* #}	0.500±0.100 [#]
雷公藤多甙纳米乳组 TP-NE	0.950±0.050	0.783±0.029 ^{**}	0.583±0.058 ^{**}	0.383±0.076 ^{**}	0.250±0.050 ^{**}	0.167±0.029 ^{**}
空白纳米乳组 Blank ME	0.933±0.115	0.900±0.050	0.883±0.115	0.883±0.104	0.867±0.115	0.817±0.126

注: 标 * 和 * * 者分别表示与模型组相比差异达显著 ($P<0.05$) 或极显著 ($P<0.01$) 水平, 标 # 和 # # 者分别表示与雷公藤多甙纳米乳组相比差异达显著 ($P<0.05$) 或极显著 ($P<0.01$) 水平。下表同。

Note: Compare with positive control group, signal * and * * means the significant difference ($P<0.05$) and the polari-significant difference ($P<0.01$), respectively. Compare with TP-NE group, # and # # meas the significant difference ($P<0.05$) and the polari-significant difference ($P<0.05$) respectively. The following table is same.

从表 1 可以看出,在本试验所用剂量下,雷公藤多甙片纳米乳和雷公藤多甙均有一定的抗炎效果;雷公藤多甙纳米乳小剂量多次给药的治疗效果优于相同剂量下的雷公藤多甙片,用药 12~24 d 时,雷公藤多甙纳米乳组的肿胀度显著或极显著小于雷公藤多甙片剂组;空白纳米乳无抗炎效果,其肿胀度与模型组相比差异不显著。

表 2 雷公藤多甙纳米乳对大鼠佐剂性关节炎继发侧足肿胀的治疗作用 (n=8)

组别 Groupe	肿胀度/ mL Volume of swell					
	4 d	8 d	12 d	16 d	20 d	24 d
正常对照组 Blank control	0.033±0.058	0.040±0.017	0.060±0.053	0.023±0.025	0.050±0.005	0.017±0.029
模型组 Positive control	0.917±0.076	1.050±0.100	1.050±0.050	1.016±0.144	0.850±0.132	0.883±0.029
雷公藤多甙片组 TP tablets	0.817±0.076	0.767±0.115	0.697±0.167	0.583±0.144 [#]	0.567±0.029 [#]	0.533±0.029 [#]
雷公藤多甙纳米乳组 TP-NE	0.950±0.050	0.783±0.029 [*]	0.567±0.029 ^{**}	0.367±0.057 ^{**}	0.233±0.029 ^{**}	0.133±0.076 ^{**}
空白纳米乳组 Blank ME	0.967±0.058	0.900±0.050	0.900±0.087	0.917±0.058	0.917±0.076	0.850±0.050

2.4 雷公藤多甙纳米乳对大鼠脾淋巴细胞增殖的影响

从表 3 可以看出,与模型组对比,雷公藤多甙纳米乳和雷公藤多甙片均可以使刀豆蛋白 A 和植物血凝素诱导的淋巴细胞增殖受到抑制,且雷公藤多甙纳米乳组的抑制率显著高于雷公藤多甙片组。

表 3 雷公藤多甙纳米乳对脾淋巴细胞增殖活性及血清中 SOD 活力、NO 含量的影响 (n=8)

组别 Groupe	抑制率/% Inhibition ratio		SOD/(U · mL ⁻¹)	NO/(μmol · L ⁻¹)
	ConA	PHA-P		
正常对照组 Blank control	0	0	344.01±10.03	26.98±6.66
模型组 Positive control	2.1	3.1	258.00±16.76	49.25±7.28
雷公藤多甙片组 TP tablets	15.2 [#]	15.8 [#]	303.26±7.30 ^{**}	39.35±2.05 [#]
雷公藤多甙纳米乳组 TP-NE	25.3 [*]	22.9 [*]	357.37±21.98 [*]	26.67±1.93 ^{**}
空白纳米乳组 Blank ME	3.1	2.8	282.81±34.11	55.5±8.49

3 讨 论

国内在 50~60 年代已成功的将雷公藤应用于治疗类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、肾小球肾炎等自身免疫性疾病。近年来,雷公藤在器官移植手术中作为免疫抑制剂,也取得了良好的疗效。但是,由于雷公藤毒副作用较大,其临床应用受到一定的限制。本研究利用纳米乳透皮吸收的高效性、缓释性、控释性、靶向性等优点^[15],制备雷公藤多甙纳米乳,从而提高雷公藤多甙的生物利用度,扩大其临床应用,降低其毒副作用。

纳米乳由油、水、表面活性剂和助表面活性剂组成。本试验中油、表面活性剂和助表面活性剂的选

从表 2 可以看出,在本试验所用剂量下,雷公藤多甙片对于小鼠足部继发侧炎症也有较强的治疗作用;在用药 16~24 d,雷公藤多甙纳米乳的治疗效果显著或极显著优于雷公藤多甙片。以上结果均显示,在本试验所用剂量下,使用雷公藤多甙纳米乳治疗时间越长,治疗效果越好,分析可能是因为雷公藤多甙纳米乳具有高效性和缓释性。

2.5 雷公藤多甙纳米乳对佐剂性关节炎大鼠血清中 SOD 活性和 NO 含量的影响

从表 3 可以看出,与模型组对比,雷公藤多甙纳米乳和雷公藤多甙片均可显著增加血清中 SOD 活性,显著降低血清中 NO 含量,而雷公藤多甙纳米乳的效果要优于同剂量下的雷公藤多甙片。

择,综合考虑了药物在其中的溶解度、纳米乳的形成及透皮效果 3 方面的因素。IPM 可以进入皮肤角质层,破坏脂质排列的密实性从而增加其流动性,另外,还可以起到增溶作用,影响药物在基质与皮肤间的分配^[16]。RH-40 在透皮过程中的作用也可以影响或改变皮肤的屏障作用。乙醇具有挥发性,以乙醇为助表面活性剂,在使用中当乙醇挥发后可以使药物达到过饱和状态,在角质层的内外造成更大的药物浓度梯度,从而促进药物的透皮吸收^[8]。

本试验建立了大鼠蛋清性关节炎和佐剂性关节炎模型,并考察了雷公藤多甙纳米乳的抗炎和免疫抑制效果,结果发现,雷公藤多甙纳米乳的治疗效果比传统制剂强,分析原因可能为:一是纳米乳的粒子

粒径小,通过马尔文粒度分析仪分析,雷公藤多甙纳米乳的平均粒径为 23.6 nm,这使药物可以更好地发挥药效;二是利用纳米乳在透皮给药途径中的优越性,使药物直接在关节局部达到较高的浓度,减少传统制剂给药时药物的首过效应,既提高了药效又降低了毒副作用;三是纳米乳有很高的药物浓度,能起到药物储库的作用,可产生较高的、持续的药物浓度,从而提高药效^[17]。因此,利用纳米乳对雷公藤多甙进行包合,可以避免传统制剂给药时药物对胃肠道的刺激和对肝脏的首过效应,延长药物的作用时间,提高药物疗效,对扩大雷公藤多甙在临床上的应用具有重要意义。

备注:此研究成果正在申请专利保护,专利申请号为 200610104979.2。

[参考文献]

- [1] Lawrence M J, Drees G. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2000,45(1):89-121.
- [2] 陈华兵,翁 婷,常雪灵,等.布洛芬微乳的制备及其透皮吸收研究[J]. *中国药学杂志*,2004,39(1):43-45.
Chen H B, Weng T, Chang X L, et al. Preparation of ibuprofen microemulsion and its transdermal absorption[J]. *China Pharm J*, 2004,39(1):43-45. (in Chinese)
- [3] 宋金春,王玉广.马钱子碱微乳的制备及其体外透皮吸收的研究[J]. *中国药学杂志*,2006,41(12):928-931.
Song J C, Wang Y G. Studies on preparation of Brucine Microemulsion and its transdermal absorption[J]. *China Pharm J*, 2006,41(12):928-931. (in Chinese)
- [4] 廉云飞. 吡啶美辛微乳经皮制剂的研究[D]. 南京:中国药科大学,2004.
Lian Y F. Research on transdermal preparation of indomethacin [D]. Nanjing: China Pharmaceutical University, 2004. (in Chinese)
- [5] Mei Z N, Li X K, Wu Q R, et al. The research on the anti-inflammatory activity and hepatotoxicity of triptolide-loaded solid lipid nanoparticle[J]. *Pharmacological research*, 2005, 51: 345-351.
- [6] 贾公孚,李 涛,许 莉. 药物毒副反应防治手册[M]. 北京:中国协和医科大学出版社,2004.
Jia G F, Li T, Xu L. A Handbook for prevention and cure of toxical and side effect of medicine[M]. Beijing: Peking Union Medical College Press, 2004. (in Chinese)
- [7] 孙红武,欧阳五庆. 盐酸黄连素纳米微乳的研制及其体外抗菌活性研究[J]. *西北农林科技大学学报:自然科学版*, 2007, 35(1):54-57.
Song H W, Ouyang W Q. The preparation and antibacterial activity in vitro of berberine hydrochloric nanometer microemulsion [J]. *Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition*, 2007, 35(1):54-57. (in Chinese)
- [8] 杨惊宇,严 冬,罗杰英,等. 新型药物剂型——微乳[J]. *中国医学工程*, 2005, 13(4):378-381.
Yang J Y, Yan D, Luo J Y, et al. Drug delivery system——Microemulsion [J]. *China Medical Engineering*, 2005, 13(4):378-381. (in Chinese)
- [9] 高 岚,张仲一,张 莉,等. 薏苡仁汤镇痛消炎作用试验研究[J]. *天津中医学院学报*, 2005, 24(1):17-19.
Gao L, Zhang Z Y, Zhang L, et al. Experimental research of anti-inflammation and analgesic effect of yiniren decoction [J]. *Journal of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, 2005, 24(1):17-19. (in Chinese)
- [10] 肖 诚,何颖辉,黄芳华,等. 雷公藤多甙对佐剂性关节炎大鼠自由基和炎症因子的影响[J]. *北京中医药大学学报*, 2006, 29(6):389-392.
Xiao C, He Y H, Huang F H, et al. Influence of Tripterygium polyglycosides on free radicals and inflammatory factors in rats with adjuvant arthritis [J]. *Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine*, 2006, 29(6):389-392. (in Chinese)
- [11] 赵 宁,周 静,肖 诚,等. 雷公藤多甙对大鼠佐剂性关节炎黏膜免疫的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2005, 12(10):32-33.
Zhao N, Zhou J, Xiao C, et al. Effect of Tripterygium polyglycosides on immune of adjuvant arthritis rats [J]. *Chinese Journal of Information on TCM*, 2005, 12(10):32-33. (in Chinese)
- [12] 于海荣. 目穿山龙皂甙对大鼠淋巴细胞功能影响的血清药理学研究[D]. 石家庄:河北药科大学,2004.
Yu H R. The pharmacological study of whole saponin of Rhizoma Dioscoreae effect on rats' lymph cell function [D]. Shijiazhuang: China Pharmaceutical of Hebei, 2004. (in Chinese)
- [13] 徐红丽,郭婷婷,傅 莉,等. 5种海洋动物多糖对体外小鼠脾淋巴细胞及大鼠睾丸支持细胞增殖作用的比较[J]. *中国药学杂志*, 2006, 41(11):839-841.
Xu H L, Guo T T, Fu L, et al. Effects of polysaccharides from five kinds of marine animals on transformation rate of mouse lymphocytes and multiplication rate of rat sertoli cells *in vitro* [J]. *Chin Pharm J*, 2006, 41(11):839-841. (in Chinese)
- [14] Yu L, Wu S L, Zhang M, et al. Effect of resveratrol alone and its combination with cyclosporine A on the immune function of human peripheral blood T lymphocytes [J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2003, 19(6):549-551.
- [15] Anna K, Nissim G. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicle [J]. *Advances and Interface Science*, 2006, 123-126:369-385.
- [16] 朱盛山. 药物新剂型[M]. 北京:化学工业出版社,2003:320.
Zhu S S. New dosage-form of medicine [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2003:320. (in Chinese)
- [17] Rhee Y S, Choi J G, Chi S C, et al. Transdermal delivery of ketoprofen using microemulsions [J]. *Int J Pharm*, 2001, 228:161.