

β -环糊精-聚乙二醇- α -常春藤皂苷自组装胶束的制备和抗肿瘤活性研究

周 军, 刘 健

江西省胸科医院 药剂科, 江西 南昌 330006

摘要: **目的** 研究 β -环糊精-聚乙二醇- α -常春藤皂苷自组装胶束的制备、溶血性和体内外抗肿瘤活性。**方法** 采用自组合法制备了 β -环糊精-聚乙二醇- α -常春藤皂苷的纳米胶束, 考察了胶束在大鼠全血中的溶血性, 研究了胶束在不同细胞上的体外活性, 以荷 HT29 肿瘤细胞的小鼠为模型, 研究了胶束的体内抗肿瘤活性。**结果** β -环糊精-聚乙二醇- α -常春藤皂苷在水性介质中能自组装成粒径较小的纳米胶束。该胶束能显著降低 α -常春藤皂苷的溶血性; 在体外细胞实验中, 胶束的抗肿瘤活性明显低于 α -常春藤皂苷, 这可能与在体外环境中 α -常春藤皂苷不能从胶束中释放出来有关。 β -环糊精-聚乙二醇- α -常春藤皂苷自组装胶束在 HT29 荷瘤小鼠体内显示非常好的抗肿瘤活性。**结论** β -环糊精-聚乙二醇- α -常春藤皂苷自组装胶束为皂苷的减毒增效提供了一个非常好的研究模式。

关键词: α -常春藤皂苷; β -环糊精-聚乙二醇- α -常春藤皂苷自组装胶束; 制备; 溶血性; 抗肿瘤

中图分类号: R944 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2021)07-1375-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.07.006

Preparation of β -CD-PEG- α -hederin self-assembly micelle and its anti-tumor activity

ZHOU Jun, LIU Jian

Department of Pharmacy, Jiangxi Breast Hospital, Nanchang 330006, China

Abstract: **Objective** To prepare β -CD-PEG- α -hederin self-assembly micelle, and to study its preparation, hemolytic activity and the anti-tumor *in vitro* and *in vivo*. **Methods** The micelle was prepared with the self-assembly method. The hemolytic activity was studied with the rat blood. The *in vitro* and *in vivo* pharmacological activity was studied with cancer cell and tumor xenograft mice, respectively. **Results** The micelle was self-assembled in the aqueous solvent with small diameter. The hemolytic activity of β -CD-PEG- α -hederin micelle could be negligible when compared with α -hederin. The *in vitro* cytotoxicity of β -CD-PEG- α -hederin micelle was very low which may be related to the inability of α -hederin to be released from micelles in the *in vitro* environment. The micelle displayed a high anti-tumor activity in HT29-bearing mice. **Conclusion** The study of β -CD-PEG- α -hederin self-assembly micelle provides a basis for attenuation and enhancement of saponins.

Key words: α -hederin; β -CD-PEG- α -hederin self-assembly micelle; preparation; hemolytic activity; anti-tumor

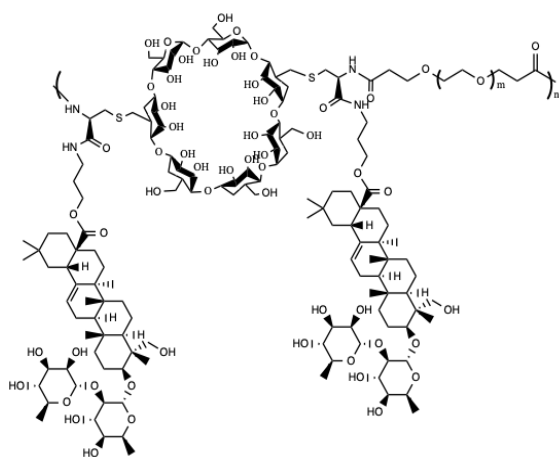
皂苷是一类重要的中药活性成分, 具有多种药理活性, 如抗炎、抗肿瘤等, 但是很多皂苷具有溶血性, 这限制了皂苷的广泛使用。 α -常春藤皂苷具有很好的抗肿瘤作用, 在抗肿瘤的同时能够提高白细胞水平^[1-2], 但是 α -常春藤皂苷与其他的抗肿瘤药物一样毒性很大, 尤其是溶血性。 α -常春藤皂苷溶血性的主要来源是结构中的 28 位羧基。为了提高 α -常春藤皂苷的抗肿瘤活性, 降低其毒性和溶血性, 将 28 位羧基与高分子材料 β -环糊精-聚乙二醇

聚乙二醇- α -常春藤皂苷 (图 1)^[3-4]。 β -环糊精-聚乙二醇- α -常春藤皂苷能在水性溶液中自组装成纳米胶束, 利用肿瘤的 EPR 效应实现胶束的肿瘤靶向给药, 胶束进入肿瘤细胞后, 酯键断裂后释放出 α -常春藤皂苷, 达到减毒增效的目的。本实验首先制备了 β -环糊精-聚乙二醇- α -常春藤皂苷纳米胶束, 考察了胶束的溶血性, 研究了胶束在不同肿瘤细胞上的体外活性, 同时以荷瘤鼠为模型, 研究了胶束的体内抗肿瘤活性, 拟为皂苷类抗肿瘤药物的开发提供新的模式。

收稿日期: 2021-04-25

基金项目: 江西省卫生计生委中医药科研课题 (2017B096)

作者简介: 周 军 (1974—), 男, 江西南昌人, 副主任药师, 本科, 长期从事药理学管理工作。E-mail: 757511942@qq.com

图1 β -环糊精-聚乙二醇- α -常春藤皂苷的分子结构Fig. 1 Structure of β -CD-PEG- α -hederin

1 仪器和试剂

1.1 实验仪器

SpectraMaxi3 酶标仪 (美国 molecular devices 公司); D2010W 型电动搅拌器 (上海越众仪器设备有限公司); 集热式恒温加热磁力搅拌器 (郑州予华仪器制造有限公司); MicroPure 超纯水仪 (Thermo Fisher Scientific); Mastersizer 3000 激光粒度测定仪 (美国马尔文公司)。

1.2 试剂和动物

β -环糊精-聚乙二醇- α -常春藤皂苷 (自制, 相对分子质量在 $8 \times 10^4 \sim 9 \times 10^4$, α -常春藤皂苷的载药量是 9.8%); 二甲基亚砜 (国药集团化学试剂有限公司); α -常春藤皂苷 [质量分数 $\geq 99.0\%$, 凯立德生物医药技术 (上海) 有限责任公司, 批号 CL-170202]; 所购买的试剂为色谱纯或分析纯。

SD 大鼠、Balb/c 小鼠购自湖南斯莱克景达动物科技有限公司, 合格证号 2020-008。

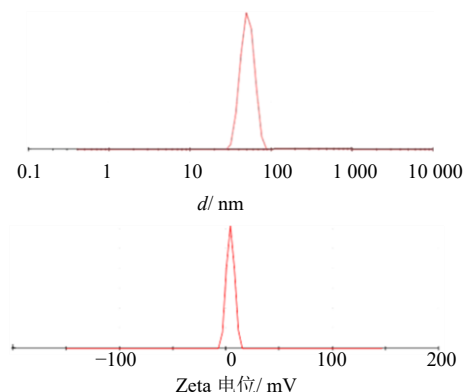
2 方法和结果

2.1 β -环糊精-聚乙二醇- α -常春藤皂苷纳米胶束的制备

由于 β -环糊精-聚乙二醇是水溶性的, α -常春藤皂苷是水不溶性的, β -环糊精-聚乙二醇- α -常春藤皂苷是两亲性聚合物, 在水性环境中能自组装成胶束。将 10 mg β -环糊精-聚乙二醇- α -常春藤皂苷溶解在 3 mL 乙醇中, 再将该含药溶液缓慢滴加至 1500 r/min 剧烈搅拌的超纯水中, 继续搅拌 30 min, 使其分散均匀。37 °C 旋转蒸发除去有机溶剂, 并用超纯水定容得到质量浓度为 1 mg/mL 的 β -环糊精-聚乙二醇- α -常春藤皂苷纳米胶束。

2.2 β -环糊精-聚乙二醇- α -常春藤皂苷纳米胶束的表征

使用激光粒度测定仪测定 β -环糊精-聚乙二醇- α -常春藤皂苷纳米胶束的粒径大小和 Zeta 电位。 β -环糊精-聚乙二醇- α -常春藤皂苷纳米胶束在水中形成了粒径为 (64.6 ± 3.1) nm 的纳米胶束, Zeta 电位为 $(+4.12 \pm 0.14)$ mV。该纳米胶束大小适中、粒径分布均匀, 见图 2。

图2 β -环糊精-聚乙二醇- α -常春藤皂苷纳米胶束的粒径和 Zeta 电位测定结果Fig. 2 Result of diameter and Zeta potential of β -CD-PEG- α -hederin micelle

2.3 β -环糊精-聚乙二醇- α -常春藤皂苷纳米胶束的溶血实验

选取新鲜大鼠全血, 经 PBS 洗涤后 (吸取 1 mL 血液和 2~3 mL PBS 加入到 15 mL 离心管中, 300 r/min 离心 15 min, 离心后吸取上清液, 重复以上步骤, 直至上清液澄清), 再用 PBS 稀释红细胞浓度至 5×10^5 个。分别配制 α -常春藤皂苷和 β -环糊精-聚乙二醇- α -常春藤皂苷胶束溶液, 逐级稀释 2 倍, 得到不同质量浓度 (36.0、18.0、9.0、4.5、2.25 μ g/mL) 的样品。阳性对照样品是 0.1% 十二烷基硫酸钠溶液 (溶血率是 100%), 阴性对照溶液是水溶液 (溶血率是 0)。在 96 孔板中依次加入 5 μ L 样品、50 μ L 稀释后血液和 45 μ L PBS, 充分混合均匀。每个浓度平行 3 个样品。阳性对照和阴性对照按照同样方式处理。将 96 孔板放置于 37 °C 恒温培养箱中, 静置培养 30 min 后将 96 孔板中液体取出, 300 r/min 离心 10 min, 吸取上层液体 50 μ L 至新的 96 孔板中, 使用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度值, 按照溶血率 = $(A_{\text{样品}} - A_{\text{阴性}}) / (A_{\text{阳性}} - A_{\text{阴性}})$ 计算溶血率^[5], 结果见表 1。可以看出, 浓度高达 36.0 μ g/mL 的 β -环糊精-聚乙二醇- α -常春藤皂苷胶束溶液也没

有溶血发生, 2.25 $\mu\text{g/mL}$ α -常春藤皂苷就显示出非常强的溶血性。因此将 α -常春藤皂苷和高分子材料对接后能够显著降低母药的溶血性。

表1 β -环糊精-聚乙二醇- α -常春藤皂苷纳米胶束的溶血实验
Table 1 Hemolytic test result of β -CD-PEG- α -hederin nanomicelles

$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	溶血率/%	
	纳米胶束	α -常春藤皂苷
36.0	0.23	16.80
18.0	0.12	8.21
9.0	-0.78	6.76
4.5	-1.56	4.45
2.25	-2.90	2.23

2.4 β -环糊精-聚乙二醇- α -常春藤皂苷纳米胶束的体外细胞毒性

采用 CCK8 法对 β -环糊精-聚乙二醇- α -常春藤皂苷纳米胶束的体外抗肿瘤活性进行评价。将细胞复苏并传代至保持较好的细胞状态, 转移至 96 孔板, 每孔加入约 5×10^4 个细胞, 在 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 培养箱培养 24 h; 用含 1% FBS 的培养基将 α -常春藤皂苷和 β -环糊精-聚乙二醇- α -常春藤皂苷纳米胶束配制成为不同浓度的溶液; 将 96 孔板中原有的培养基吸出并加入配制好的含药物的培养基 (按照二倍法稀释制备), 于细胞培养箱中继续孵育 24 h。吸出上清液, 每个孔中加入 100 μL 含 10 μL CCK8 的培养基混合液, 在细胞培养箱中继续孵育 4 h, 使用酶标仪 (450 nm) 测定吸光度 (A) 值, 按照存活率 = $(A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$ 计算加入不同浓度 β -环糊精-聚乙二醇- α -常春藤皂苷纳米胶束和 α -常春藤皂苷溶液后的细胞存活率, IC_{50} 值通过 SPSS 软件进行处理。体外细胞毒性实验结果见表 2。

表2 β -环糊精-聚乙二醇- α -常春藤皂苷纳米胶束对不同细胞系的 IC_{50} 值

Table 2 IC_{50} values of β -CD-PEG- α -hederin nanomicelles to different cancer cell lines

细胞	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	
	纳米胶束	α -常春藤皂苷
HT29	123.5 ± 12.7	9.5 ± 0.9
L-02	198.6 ± 10.8	13.2 ± 1.1
A2780	204.8 ± 13.1	19.6 ± 2.1

可以看出, 胶束的体外抑瘤率明显低于 α -常春藤皂苷。可能的原因是在体外环境中药物没有从胶束中释放出来。

2.5 β -环糊精-聚乙二醇- α -常春藤皂苷纳米胶束的体内抗肿瘤活性

待 HT29 细胞生长状态良好后, 经胰酶处理, 用新鲜的细胞培养液 (RPMI 1640) 终止消化, 1 000 r/min 离心后细胞计数, 用 PBS 稀释得到浓度为 5×10^6 个/mL 的细胞混悬液。每只 Balb/c 小鼠在其右侧腋下部位 sc 5×10^5 个上述细胞混悬液, 建立 HT29 荷瘤小鼠模型。

当荷瘤小鼠腋下的肿瘤体积长至 100 mm^3 左右时, 随机分为 5 组, 每组各 7 只小鼠, 分别是模型组、 α -常春藤皂苷注射液组 (30 mg/kg , 以 α -常春藤皂苷计)、 β -环糊精-聚乙二醇- α -常春藤皂苷纳米胶束组 (30 、 15 、 7.5 mg/kg , 以 α -常春藤皂苷计)。每 7 天给药 1 次, 共给药 3 次, 首次给药至给药后第 20 天, 每 2 天测量并记录荷瘤小鼠的体质量和测量瘤体体积。测量荷瘤小鼠肿瘤的短径、长径, 肿瘤体积按照公式肿瘤体积 = $(\text{短径}^2 \times \text{长径}) / 2$ 计算得到。结果见图 3。

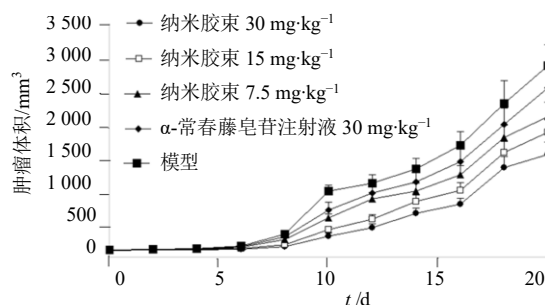


图3 肿瘤的生长曲线

Fig. 3 Curve of tumor growth

给药结束后处死荷瘤小鼠, 剥离肿瘤组织, 称定质量并拍照, 按照公式抑瘤率 = $(\text{模型组平均瘤质量} - \text{给药组平均瘤质量}) / \text{模型组平均瘤质量}$ 计算 β -环糊精-聚乙二醇- α -常春藤皂苷胶束的抑瘤率, 结果见表 3。可以看出, β -环糊精-聚乙二醇- α -常春藤皂苷胶束 30 mg/kg 的抑瘤率达到了 63.2%, 远高于母药 α -常春藤皂苷注射液抑瘤率的 16.7%。同时 β -环糊精-聚乙二醇- α -常春藤皂苷胶束 30 、 15 、 7.5 mg/kg 3 个不同剂量的抑瘤率都高于母药, 可能与胶束在肿瘤部位的靶向性和降低母药的溶血性有关。

表3 β -环糊精-聚乙二醇- α -常春藤皂苷纳米胶束对荷瘤小鼠瘤质量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=7$)

Table 3 Tumor inhibition of β -CD-PEG- α -hederin nanomicelles on tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s$, $n=7$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	瘤质量/g	抑瘤率/%
模型	—	4.43 ± 1.38	—
α -常春藤皂苷注射液	30	3.69 ± 1.31	16.7
纳米胶束	7.5	3.27 ± 1.67	27.6
	15	2.81 ± 1.23*	36.6
	30	1.63 ± 0.97**	63.2

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

3 讨论

很多皂苷都具有溶血性,对很多具有抗肿瘤活性的皂苷而言,溶血性可能是其具有药理活性的原因。但是溶血性会使得皂苷的给药性成为一个难题。因此降低皂苷的溶血性同时保持它的抗肿瘤活性是一个非常艰巨的药学课题。本课题以具有抗肿瘤活性和溶血的 α -常春藤皂苷为模型药物,在前期研究中设计并合成了两亲性的高分子化合物 β -环糊精-聚乙二醇- α -常春藤皂苷,在此结构中, α -常春藤皂苷通过酯键与水溶性高分子 β -环糊精-聚乙二醇相连^[6-7]。

本研究中首先制备了 β -环糊精-聚乙二醇- α -常春藤皂苷的自组装胶束制剂,制备过程简单,使用乙醇作为有机溶剂,并且在制备过程中减压除去了乙醇,避免了有机溶剂的毒性。所制备的胶束粒径大小合适,满足肿瘤EPR效应的要求^[8-9]。 β -环糊精-聚乙二醇- α -常春藤皂苷自组装胶束可以很大程度地降低 α -常春藤皂苷的溶血性,可能的原因是酯键能降低 α -常春藤皂苷在血液中的释放。体外细胞抗肿瘤实验发现, β -环糊精-聚乙二醇- α -常春藤皂苷自组装胶束的细胞毒性小于 α -常春藤皂苷,这与在体外细胞环境中 α -常春藤皂苷不能从高分子聚合

物中释放出来有关。以HT29肿瘤为模型的荷瘤实验发现, β -环糊精-聚乙二醇- α -常春藤皂苷自组装胶束30、15、7.5 mg/kg 3个剂量组都具有很强的抗肿瘤活性,都高于 α -常春藤皂苷组,这可能与胶束的靶向性有关,在体内肿瘤环境中, α -常春藤皂苷应该可以从胶束中释放出来。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 董媛. 扶正抗癌方对H22腹水型瘤株移植瘤小鼠CyclinD1和Caspase-3表达影响的实验研究[D]. 咸阳: 陕西中医学院, 2011.
- [2] 罗颖颖. 白头翁皂苷抗肿瘤作用及机制研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2014.
- [3] Mark E D, Chen Z, Shin D M. Nanoparticle therapeutics: An emerging treatment modality for cancer [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7: 771-782.
- [4] Mark E D. Design and development of IT-101, a cyclodextrin-containing polymer conjugate of camptothecin [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61: 1189-1192.
- [5] 陈毓, 秦枫, 朱善元, 等. 三七总皂苷粗提物S-3及体外免疫活性的研究[J]. 扬州大学学报: 农业和生命科学版, 2019, 40(4): 84-88.
- [6] Li Y, Wu Y, Chen J, et al. A simple glutathione-responsive turn-on theranostic nanoparticle for dual-modal imaging and chemo-photothermal combination therapy [J]. *Nano Lett*, 2019, 19(8): 5806-5817.
- [7] Zhou Q, Shao S, Wang J, et al. Enzyme-activatable polymer-drug conjugate augments tumour penetration and treatment efficacy [J]. *Nat Nanotechnol*, 2019, 14(8): 799-809.
- [8] Li G, Zhao M, Zhao L. Lysine-mediated hydroxyethyl starch-10-hydroxy camptothecin micelles for the treatment of liver cancer [J]. *Drug Deliv*, 2020, 27(1): 519-529.
- [9] Iwao T, Kazuo Y, Tatsuya N. Characterization of regiopecific A, C- and A, D-disulfonate capping of β -cyclodextrin, capping as an efficient production technique [J]. *J Am Chem Soc*, 1984, 106(18): 5267-5270.

[责任编辑 解学星]