

## 番荔枝总内酯纳米混悬剂的制备及其体外抗肿瘤作用研究

聂凡茹<sup>1,2</sup>, 艾汝经<sup>2</sup>, 周欣欣<sup>1,2</sup>, 郭一飞<sup>2</sup>, 韩美华<sup>2</sup>, 王向涛<sup>1,2\*</sup>

1. 哈尔滨商业大学 生命科学与环境科学研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

2. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193

**摘要:** **目的** 制备番荔枝总内酯纳米混悬剂, 并对其体外抗肿瘤作用进行研究。**方法** 使用反溶剂沉淀法中的超声法制备番荔枝总内酯纳米混悬剂, 考察其处方和制备工艺参数; 动态光散射法测定其粒径和电位, 透射电镜考察其粒径分布和形态; 并对其人工胃液稳定性进行考察; 采用 MTT 比色法比较番荔枝总内酯纳米混悬剂和溶液对 HepG2 细胞毒性差异。**结果** 制备方法为将 10 mg 番荔枝总内酯与 1 mg PGDA 共溶于 1 mL 有机溶剂中, 超声 (250 W) 快速注入到 5 mL 水中, 减压旋转蒸发除去有机溶剂, 调整总体积至 5 mL。番荔枝总内酯纳米混悬剂平均粒径为  $(146.0 \pm 2.4)$  nm, 多分散指数 (PDI) 为  $0.184 \pm 0.02$ , Zeta 电位  $(26.0 \pm 2.0)$  mV, 纳米混悬剂几乎呈类球型, 粒径分布接近于正态分布, 分布比较均匀; 人工胃液内 4 h 稳定存在, 粒径基本不发生变化; 对 HepG2 细胞增殖均有一定的抑制作用, 番荔枝总内酯纳米混悬剂组的细胞增殖抑制效果均优于溶液组。**结论** 制备了以 PGDA 为载体的番荔枝总内酯纳米混悬剂, 解决了药物的难溶和给药问题, 为番荔枝总内酯的纳米剂型研究提供了参考。

**关键词:** 番荔枝总内酯纳米混悬剂; 番荔枝总内酯; 性质考察; HepG2 细胞; 抗肿瘤作用

**中图分类号:** R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2018)01-0024-05

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2018.01.006

## Preparation of Annonaceous Acetogenins Naonosuspensions and its anti-tumor activity *in vitro*

NIE Fan-ru<sup>1,2</sup>, AI Ru-jing<sup>2</sup>, ZHOU Xin-xin<sup>1,2</sup>, GUO Yi-fei<sup>2</sup>, HAN Mei-hua<sup>2</sup>, WANG Xiang-tao<sup>1,2</sup>

1. Life Sciences and Environmental Sciences Center, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

**Abstract: Objective** To prepare Annonaceous Acetogenins (ACGs) Naonosuspensions and study its anti-tumor activities *in vitro*. **Methods** ACGs Naonosuspensions were prepared with ultrasonic method in anti-solvent precipitation and its prescription and preparation process parameters were investigated. Dynamic light scattering method was used to measure particle size and transmission electron microscopy was used to observe the morphology. The stability of ACGs Naonosuspensions in different medium was also studied. MTT assay was used to assess their *in vitro* cytotoxicity against HepG2 cell line in contrast to free ACGs. **Results** The best preparation method was as following: 10 mg ACGs and 1 mg PGDA co-dissolved in 1 mL organic solvents, and then were rapidly infused into 5 mL water by ultrasound (250 W), then decompressed and rotated evaporation to remove organic solvents, and were adjusted the total volume to 5 mL. The average particle size of ACGs Naonosuspensions was  $(146.0 \pm 2.4)$  nm, the polydispersity index (PDI) value was  $0.184 \pm 0.02$ , the Zeta potential was  $(26.0 \pm 2.0)$  mV, and the particle size distribution was close to normal distribution. Naonosuspensions were nearly spherical, and the distribution was more uniform. They were quite stable in artificial gastric juice and intestinal juice for 4 h. ACGs Naonosuspensions had a certain inhibitory effect against proliferation of HepG2 cells, and the effect of naonosuspensions group was better than that of the solution group. **Conclusion** ACGs Naonosuspensions are successfully prepared taking PGDA as the carrier, and insolubility and drug delivery are solved, which provides reference for nano-formulation study of ACGs.

**Key words:** Annonaceous Acetogenins Naonosuspensions; naonosuspensions; property study; HepG2 cell; antitumor activity

收稿日期: 2017-08-11

基金项目: 国家自然科学基金-广东联合基金资助项目 (U1401223)

作者简介: 聂凡茹 (1993—), 女, 黑龙江牡丹江人, 硕士研究生, 研究方向为药物新剂型。Tel: 18813120800 E-mail: 421661055@qq.com

\*通信作者 王向涛 (1973—), 男, 河南洛阳人, 研究员, 博士, 主要从事药物新剂型研究。Tel: (010)57833266 E-mail: xtaowang@163.com

番荔枝总内酯是从番荔枝属植物中分离得到的一系列化合物<sup>[1]</sup>, 是番荔枝种子等分离出来的抗肿瘤有效部位。从化学结构上看, 总内酯的各成分是具有长脂肪链(32或34个碳)白色的蜡状的脂肪酸内酯, 末端具有不饱和的内酯环。番荔枝总内酯表现出良好的抗肿瘤作用, 对人白血病<sup>[2-3]</sup>、人肝癌HepG2细胞<sup>[4]</sup>、人乳腺癌细胞<sup>[5-7]</sup>等都有很强的抑制作用, 具有“抗癌之星”称号。番荔枝总内酯中化合物K19(squamocin)和K16(annomin-VI)分别占46.8%、5.8%, 构效关系研究中也发现这两个化合物均具有很强的抗癌活性。但无论是总内酯环还是这两种主要成分, 其在水中溶解度均小于1 μg/mL, 为极难溶性药物, 限制了其临床应用<sup>[8-9]</sup>。纳米给药系统能够有效解决药物的难溶、难给药的问题, 并能提高口服生物利用度, 改善药动学特性, 并能由于高渗透长滞留(EPR)效应提高药物在肿瘤和炎症部位的蓄积, 将总内酯制备成纳米混悬剂无疑是一种很好的解决方案。合适的稳定剂的选择是纳米混悬剂制备的关键。随着化学合成技术的进步以及缓控释制剂的发展, 新的聚合物材料和药用辅料也得到了快速发展。两亲性嵌段聚合物可以自发形成核壳结构的聚合物胶束, 聚合物胶束有一个实心的内核, 作为难溶性药物的纳米储库。本课题组合成了一种新型的两亲性分子聚合物三分枝六聚乙二醇接枝十二胺共聚物(PGDA)<sup>[10]</sup>。PGDA是通过三分枝六聚乙二醇与含十二胺个碳的脂肪链共价偶联, 在水相中很易自组装成小粒径的胶束。因此本实验选用PGDA作为稳定剂, 制备番荔枝总内酯纳米混悬剂, 以期提高番荔枝总内酯溶解度, 并对其体外抗肿瘤作用进行研究。

### 1 仪器与材料

JEM-1400 80 kV 透射电镜(日本电子株式会社); DI-ONEXU3000 高效液相色谱仪(美国戴安公司); BioTekuquant 酶标仪(USA); Nano-ZS90 马尔文粒度仪(英国马尔文设备公司); AL204 电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司); MCA-15AC 细胞培养箱(SANYO); SCQ3201 超声波清洗器(上海声彦超声仪器有限公司); 振荡仪(Small 3-0 ROTATOR, Thermo); Buchi R-3 旋转蒸发仪(瑞士 Buchi)。

番荔枝总内酯含 K20 3.2%、GK23 1.2%、K437 8%、K19 38%、K16 9.2%, 由中国医学科学院药用植物研究所斯建勇研究员实验室提供; 两亲性分子

PGDA(相对分子质量 1 171.69, 本实验室合成); 乙腈和甲醇为色谱级, 其余试剂均为分析纯。

HepG2 细胞购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心, DMEM 培养基(批号 AB10190291)、胎牛血清(批号 1101-8611)、磷酸缓冲盐(PBS, 批号 AC10209969)、青链霉素(北京索莱宝科技有限公司, 规格 100 U/mL, 批号 J170012)。

## 2 方法与结果

### 2.1 番荔枝总内酯纳米混悬剂的制备

使用反溶剂沉淀法中的超声法制备番荔枝总内酯的纳米混悬剂, 通过单因素试验, 考察不同因素对方剂和制备工艺的影响<sup>[11]</sup>。

**2.1.1 不同有机溶剂的选择** 将 1 mg 番荔枝总内酯与 3 mg PGDA 共溶于 1 mL 有机溶剂中, 超声(250 W)快速注入到 5 mL 水中, 减压旋转蒸发除去有机溶剂, 调整总体积至 5 mL, 结果见表 1。丙酮相比其他两种有机溶剂, 制备粒径小、分布均匀, 故选择丙酮作为有机溶剂进行后续研究。

表 1 处方中有机溶剂的筛选

Table 1 Screening of different organic solvent in prescription

有机溶剂	粒径/nm	Zeta/mV	PDI
丙酮	120.0±3.1	26.8±2.1	0.180±0.02
甲醇	153.0±2.9	22.6±2.7	0.230±0.05
乙醇	160.7±3.2	23.8±3.3	0.310±0.05

**2.1.2 不同制备方法的选择** 采用上述处方进行单因素试验, 将超声注入改为搅拌注入, 考察制备方法对粒径的影响, 发现超声注入制备的纳米混悬剂粒径更小, 见表 2。故选择超声注入作为制备方式进行后续研究。

表 2 处方中制备方法的筛选

Table 2 Screening of different preparation in prescription

制备方法	粒径/nm	Zeta/mV	PDI
超声法	120.0±3.1	26.8±2.1	0.180±0.02
搅拌法	144.0±2.1	19.0±3.1	0.200±0.05

**2.1.3 不同药载比的选择** 采用上述处方进行单因素试验, 不断提高药载比, 考察对粒径的影响, 见表 3。结果表明, 药载比 1:3、1:1、3:1, 粒径差别不大, 继续提高药载比 10:1, 粒径只有略微增大。故确定最终制备方法中药载比提高到 10:1。

表3 处方中药载比对粒径的影响

Table 3 Effect of drug-stabilizer ratio on particle size in prescription

药载比	粒径/nm	Zeta/mV	PDI
1:3	120.0±3.1	25.8±4.2	0.184±0.02
1:1	125.1±2.8	29.8±1.1	0.20±0.01
3:1	130.4±3.6	36.1±2.7	0.177±0.02
10:1	146.8±7.7	26.0±3.1	0.184±0.05

2.1.4 最佳制备方法 将 10 mg 番荔枝总内酯与 1 mg PGDA 共溶于 1 mL 有机溶剂中,超声(250 W)快速注入到 5 mL 水中,减压旋转蒸发除去有机溶剂,调整总体积至 5 mL。

2.2 番荔枝总内酯纳米混悬剂性质考察

2.2.1 粒径、电位、多分散指数(PDI)考察 将制备好的番荔枝总内酯纳米混悬剂稀释 10 倍,用 Nano-ZS90 马尔文粒度仪测定粒径和电位。所有测定均在室温下进行,激光波长为 633 nm,散射角为 90°,样品平行操作 3 份。结果平均粒径为 (146.0±2.4) nm, PDI 为 0.184±0.02, Zeta 电位 (26.0±2.0) mV, 粒径分布接近于正态分布,且重现性良好。见图 1。

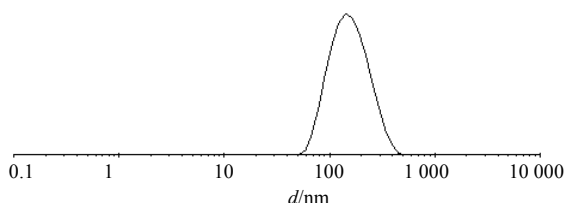


图1 番荔枝总内酯纳米混悬剂的粒径分布

Fig. 1 Particle size distribution of ACGs Naonosuspensions

2.2.2 透射电镜形态考察 将制备的番荔枝总内酯纳米混悬剂用水稀释成 100 μg/mL。取 6 μL 滴加到电镜铜网上,自然晾干,滴加 1%的磷钨酸水溶液 6 μL 染色 15 min,滤纸吸去多余染色液,晾干,透射电镜下观察,结果纳米混悬剂几乎呈类球型,没有明显的聚集,分布比较均匀。见图 2。

2.2.3 番荔枝总内酯纳米混悬剂的胃肠液稳定性试验 将番荔枝总内酯纳米混悬剂与人工胃液、人工肠液按照体积比 1:4 混合,37 °C 水浴孵育,于 1、2、3、4 h 取样测定粒径,样品平行操作 3 份。结果番荔枝总内酯纳米混悬剂在人工胃液肠液中 4 h 内粒径无明显变化,也没有出现肉眼可见的沉淀和浑浊。见图 3。

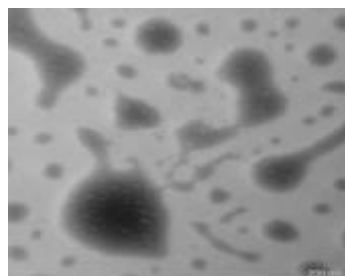


图2 番荔枝总内酯纳米混悬剂的透射电镜照片  
Fig. 2 TEM photo of ACGs Naonosuspensions

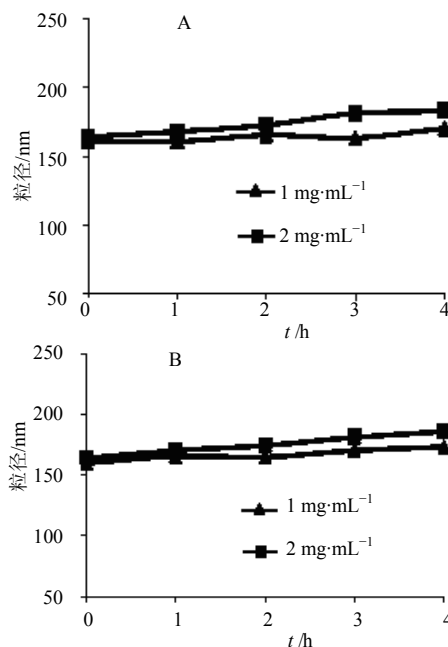


图3 番荔枝总内酯纳米混悬剂在人工胃液(A)和人工肠液(B)中的粒径变化 (x̄ ± s, n = 3)

Fig. 3 Particle size change of ACGs Nanosuspensions in artificial gastric juice (A) and intestinal juice (B) (x̄ ± s, n = 3)

2.3 番荔枝总内酯纳米混悬剂细胞增殖抑制实验

HepG2 细胞株生长于 DMEM 培养基中,其中含 10%的胎牛血清、2 mmol/L 谷氨酰胺、1 000 U/mL 青链霉素,于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养,每 2 天更换 1 次培养液,每周用胰酶消化并传代(1:1),留取对数期细胞用于实验。MTT 试剂临用前以 pH 7.4 磷酸缓冲液配制成 5 mg/mL。

取对数期生长的 HepG2 细胞接种于 96 孔板上,每孔 5 × 10<sup>4</sup> 个细胞,96 孔板于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养 24 h,设立空白对照组(细胞成长所需完全培养基)、PGDA 辅料组、ACGs 的 DMSO

溶液组和 ACGs 纳米混悬剂组。用完全培养基将药物或载药纳米混悬剂稀释到所需浓度，每孔加入含药辅料培养基 100  $\mu\text{L}$ 。96 孔板于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱中培养 48 h。弃上清，加入 5 mg/mL MTT 20  $\mu\text{L}$ ，继续培养 4 h，小心吸取上清液，弃去，加入 DMSO 100  $\mu\text{L}$ ，将培养板置于微孔板振荡器上振

荡 10 min 混匀。在酶联免疫荧光仪上 570 nm 波长处测定吸光度 ( $A$ ) 值，计算细胞存活率。以药物浓度为横坐标，对抑制率为纵坐标绘制剂量 - 效应曲线，通过 GraphPad Prism5.0 软件计算细胞抑制率为 50% 的药物浓度，即半数抑制浓度。见表 4。

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{药物每孔 } A \text{ 值}}{\text{空白对照组 } A \text{ 值}}$$

表 4 番荔枝总内酯纳米混悬剂对 HepG2 细胞生长存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  
Table 4 Effect of ACGS Nanoparticles on viability of HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

样品	细胞存活率/%					IC <sub>50</sub> /( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
	0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	
ACGS 溶液	98.0 $\pm$ 0.8	96.5 $\pm$ 0.5	90.3 $\pm$ 0.6	48.6 $\pm$ 0.5	10.6 $\pm$ 0.7	26.56
ACGs 纳米混悬剂	95.2 $\pm$ 0.9	89.0 $\pm$ 2.4	85.4 $\pm$ 1.5	23.8 $\pm$ 1.9	8.1 $\pm$ 3.5	9.64
PGDA 溶液	98.4 $\pm$ 0.2	96.5 $\pm$ 0.3	96.6 $\pm$ 0.5	82.0 $\pm$ 0.7	89.0 $\pm$ 0.2	—

可见两者对细胞增殖均有一定的抑制作用，番荔枝总内酯纳米混悬剂组的细胞增殖抑制效果均优于番荔枝总内酯溶液组，其 IC<sub>50</sub> 分别是 9.64、26.56  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。PGDA 小于 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时对细胞增殖的抑制效果不明显，说明纳米制剂中辅料无明显的细胞抑制实验。

### 3 讨论

番荔枝总内酯是有效部位，包含了一系列长脂肪链（含有 32 或 34 个碳和不饱和内酯环）的化合物。虽然番荔枝总内酯已被证实具有很强的细胞毒性和抗肿瘤作用，但水溶性差限制了其临床应用。本实验将纳米技术应用到中药多组分中，以两亲性分子 PGDA 作为稳定剂制备了番荔枝总内酯纳米混悬剂，实现了中药有效部位和纳米技术的结合，显著增加了番荔枝总内酯的溶解度。番荔枝总内酯纳米混悬剂的亮点是高载药量 (>90%)，这是其他制剂无法比较的。常见的纳米剂型如胶束和脂质体，载药量通常仅 10%~25%<sup>[12-13]</sup>。高载药量减少了辅料的使用，在体内给药，尤其是静脉注射给药中，能相应降低辅料本身带来的不利影响。

透射电镜显示，番荔枝总内酯纳米混悬剂为圆整的球形，平均粒径约为 30 nm 左右，比动态光散射法测定的要小 (146 nm)。这种差异是因为动态光散射测定的纳米粒的等效水化半径，是纳米粒具有水化层时的“湿态”粒径，而透射电镜测定的是纳米粒干燥皱缩后在“干态”时的粒子。纳米混悬剂在人工胃肠液中 4 h 内基本稳定，为口服制剂的

研究提供了数据。细胞增殖抑制实验显示，与游离药物番荔枝总内酯相比，纳米混悬剂对肿瘤细胞具有更强的生长抑制作用，而所用辅料对细胞增殖几乎无抑制作用。这是因为在和肿瘤细胞的相互作用中，载药纳米粒由于极高的比表面积常会被非特异性吸附在细胞表面，增加了被细胞摄取的机会；同时某些纳米粒还可增加被细胞摄取的途径，从而提高了细胞对纳米粒携带药物的生物利用度。这说明纳米混悬剂增加了药物的可利用率，与相同浓度的溶液剂相比，具有较强的抗肿瘤作用。

因此，本研究成功制备了以 PGDA 为载体的番荔枝总内酯纳米混悬剂，解决了药物的难溶和给药问题，并可能基于纳米效应提高疗效，为番荔枝总内酯的进一步体内研究和临床应用提供了参考。

### 参考文献

- [1] 余竞光, 罗秀珍, 孙 兰, 等. 番荔枝种子化学成分研究 [J]. 药学学报, 1994, 40(6): 359-362.
- [2] 李艳芳, 符立梧. 番荔枝内酯抗肿瘤作用研究进展 [J]. 中国药理学通报, 1998, 20(6): 245-247.
- [3] 符立梧, 谭炳炎, 梁永钜, 等. Bullatacin 克服肿瘤多药抗药性作用及其机理 [J]. 药学学报, 1999, 34(4): 268-271.
- [4] Kuwabara K, Takada M, Iwata J, et al. Design syntheses and mitochondrial complex I inhibitory activity of novel acetogenin mimics [J]. Eur J Biochem, 2000, 267(9): 2538-2546.
- [5] Nakanishi Y, Chang F R, Liaw C C, et al. Acetogenins as selective inhibitors of the human ovarian 1A9 tumor cell

- line [J]. *J Med Chem*, 2003, 46(15): 3185-3188.
- [6] Liaw C C, Chang F R, Chen S L, *et al.* Novel cytotoxic monotetrahydrofuranic Annonaceous acetogenins from *Annona montana* [J]. *Bioorg Med Chem*, 2005, 13(15): 4767-4776.
- [7] 袁 斐, 白钢钢, 苗筠杰, 等. 番荔枝内酯类化合物对耐阿霉素乳腺癌细胞 MCF-7/ADR 体外活性的影响 [J]. *中草药*, 2014, 45(19): 2815-2819.
- [8] Liaw C, Wu T, Chang F, *et al.* Historic perspectives on Annonaceous acetogenins from the chemical bench to preclinical trials [J]. *Planta Med*, 2010, 76(13): 1390-1404.
- [9] Dang Y, Feng H, Zhang L, *et al.* In situ absorption in rat intestinal tract of solid dispersion of annonaceous acetogenins [J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2012: 879676.
- [10] 聂凡茹, 艾汝经, 周欣欣, 等. 三分枝六聚乙二醇接枝十二胺共聚物的合成及其性能研究 [J]. *现代药物与临床*, 2018, 33(1): 5-9.
- [11] 刘 卫, 薛克营, 柯明耀, 等. 液相共沉淀法制备吉西他滨磁靶向纳米粒 [J]. *国际药学研究杂志*, 2016, 43(4): 727-730.
- [12] Gao L, Liu G, Wang X, *et al.* Preparation of a chemically stable quercetin formulation using nanosuspension technology [J]. *Int J Pharm*, 2011, 404(1-2): 231-237.
- [13] Nishiyama N, Kataoka K. Current state, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery [J]. *Pharmacol Ther*, 2006, 112(3): 630-648.