

香菇多糖 - 番荔枝素纳米粒的性能考察及其对小鼠黑色素瘤肺转移癌的抑制作用

高广宇, 李春梅*

哈尔滨商业大学, 黑龙江 哈尔滨 150076

摘要: **目的** 考察香菇多糖 - 番荔枝素纳米粒的性能, 及其对小鼠黑色素瘤肺转移癌的体内外抑制效果。 **方法** 采用反溶剂沉淀法制备香菇多糖 - 番荔枝素纳米粒, 以动态光散射法测定粒径、分散系数 (PDI) 及 Zeta 电位, 及其在不同生理介质 (5% 的葡萄糖、生理盐水、PBS 的混悬液) 中的稳定性; 采用透射电子显微镜观察纳米粒的形态、大小; 精确称量香菇多糖 - 番荔枝素纳米粒质量, 并采用 HPLC 法测量番荔枝素中番荔枝辛, 计算载药量; 用酶标仪在 540 nm 处测量不同浓度 (2、1.5、1、0.5、0.25、0.125 mg/mL) 香菇多糖 - 番荔枝素纳米粒与 5% 葡萄糖溶液等渗液的吸光度, 并计算溶血率; 采用透析袋法考察香菇多糖 - 番荔枝素纳米粒的体外释放行为。用划痕实验与 MTT 实验对香菇多糖 - 番荔枝素纳米粒进行体外药理学考察。构建黑色素瘤肺转移癌小鼠模型, 以紫杉醇注射液为阳性对照, 对不同剂量香菇多糖 - 番荔枝素纳米粒进行体内药理学研究。 **结果** 香菇多糖 - 番荔枝素纳米粒的粒径为 (160.6 ± 1.0) nm, PDI 为 0.082 ± 0.023 , Zeta 电位为 (-28.10 ± 1.14) mV, 透射电镜下呈球状。香菇多糖 - 番荔枝素纳米粒在 5% 的葡萄糖、血浆中稳定, 无溶血现象; 在体外可持续缓慢释放。体外研究结果显示, 与番荔枝素原料药相比, 香菇多糖 - 番荔枝素纳米粒对黑色素瘤 B16F10 细胞的迁移抑制作用及细胞毒性显著增加。体内药理学结果显示, 香菇多糖 - 番荔枝素纳米粒 iv 给药 14 d 后, 香菇多糖 - 番荔枝素纳米粒 0.4 mg/mL 组对黑色素瘤肺部转移抑制率可达到 91.6%, S-100 蛋白的表达也较模型组明显下调。 **结论** 香菇多糖可作为稳定剂制备香菇多糖 - 番荔枝素纳米粒, 香菇多糖 - 番荔枝素纳米粒对黑色素瘤肺转移癌初期具有显著的抑制作用。

关键词: 番荔枝素; 香菇多糖; 纳米粒; 黑色素瘤; 肺转移癌; S-100 蛋白

中图分类号: R944; R966 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2022)09-1945-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.09.008

Properties of lentinan - annonaceous acyogenins nanoparticles and its inhibitory effect on lung metastasis of melanoma in mice

GAO Guang-yu, LI Chun-mei

Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

Abstract: Objective To investigate the performance of lentinan - annonaceous acyogenins nanoparticles and their inhibitory effect on lung metastasis of mouse melanoma *in vitro* and *in vivo*. **Methods** Lentinan - annonaceous acyogenins nanoparticles was prepared by antisolvent precipitation method. The particle size, dispersion coefficient (PDI) and Zeta potential of lentinan - annonaceous acyogenins nanoparticles were determined by dynamic light scattering method, and their stability in different physiological media (5% glucose, 0.9% saline and PBS suspension) was determined. The morphology and size of the nanoparticles were observed by transmission electron microscopy. The mass of lentinan - annonaceous acyogenins nanoparticles was accurately weighed, and the content of Squamoci in annonaceous acyogenins was measured by HPLC, and the drug load was calculated. The absorbance of lentinan - annonaceous acyogenins nanoparticles with different concentrations (2, 1.5, 1, 0.5, 0.25, and 0.125 mg/mL) and 5% glucose solution was measured by microplate reader at 540 nm, and the hemolysis rate was calculated. The release behavior of lentinan - annonaceous acyogenins nanoparticles *in vitro* was investigated by dialysis bag method. *In vitro* pharmacodynamics of lentinan - annonaceous acyogenins nanoparticles were investigated by scratch test and MTT test. A mice model of lung metastasis of melanoma was established, and Paclitaxel Injection was used as a positive control to study the pharmacodynamics of different doses

收稿日期: 2022-05-16

基金项目: 哈尔滨市应用技术与开发项目 (2017RAQXJ115)

作者简介: 高广宇, 女, 硕士研究生, 主要从事药物新剂型研究。E-mail: 2737524232@qq.com

*通信作者: 李春梅, 女, 博士, 硕士生导师, 主要从事天然产物研究开发及制剂研究。E-mail: lichunmei81@163.com

of lentinan - annonaceous acyogenins nanoparticles *in vivo*. **Results** The particle size of nanoparticles was (160.6 ± 1.0) nm, PDI was (0.082 ± 0.023) , Zeta potential was (-28.10 ± 1.14) mV, and the particle size was spherical under transmission electron microscope. Lentinan - annonaceous acyogenins nanoparticles were stable in 5% glucose and plasma without hemolysis. Sustained slow release *in vitro*. The results of *in vitro* study showed that lentinan - annonaceous acyogenins nanoparticles significantly increased the migration inhibition and cytotoxicity of melanoma B16F10 cells compared with annonaceous acyogenins active pharmaceutical ingredients. *In vivo* pharmacodynamic results showed that 14 days after iv administration, the inhibition rate of melanoma lung metastasis in 0.4 mg/mL lentinan - annonaceous acyogenins nanoparticles group was 91.6%, and the expression of S-100 protein was also significantly down-regulated compared with the model group. **Conclusion** Lentinan can be used as a stabilizer to prepare annonaceous acyogenins nanoparticles, and lentinan - annonaceous acyogenins nanoparticles had a significant inhibitory effect on melanoma lung metastatic carcinoma at the initial stage.

Key words: annonaceous acetogenins; lentinan; nanoparticles; melanoma; lung metastatic carcinoma; S-100 protein

黑色素瘤主要发于体表, 发病率及死亡率较低, 但其远处器官转移率与侵袭能力较强, 恶性程度极高^[1-2]。该病常易被人们忽视, 导致大部分患者确诊时已到中晚期。黑色素瘤晚期会出现各个器官的转移, 肺部是黑色素瘤最易转移的部位之一^[3]。黑色素瘤细胞从原发部位侵入血管或淋巴管, 通过血液循环到达肺部, 形成黑色素瘤同样类型的肺转移癌^[4-5]。临床治疗中对黑色素瘤敏感的药物较少, 且与原发性肿瘤相比, 传统的化疗药物如环磷酰胺、紫杉醇等对转移性肿瘤的治疗效果并不理想^[6]。

番荔枝是从番荔枝种子中提取得到的内酯类化合物, 在前期的研究中发现它对多种癌症表现出了较强的抑制作用^[7]。番荔枝的成分复杂, 其中番荔枝辛的含量较高, 在实验中多以该成分进行定量分析, 番荔枝辛的结构中包含 1 个邻位的四氢呋喃环, 番荔枝较强的抗肿瘤活性可能与该结构有关^[8]。然而番荔枝在水中的溶解度 $< 1 \mu\text{g/mL}$, 早期研究中多将其分散在植物油中口服给药, 生物利用度低, 难以发挥药效^[9]。而将番荔枝制备成纳米药物后静脉给药, 不仅能解决番荔枝给药难的问题, 还能通过实体瘤的高通透性和滞留效应, 促进肿瘤内纳米药物的累积^[10]。不同于以往制备纳米药物所用到的化学合成稳定剂, 本研究选择安全无毒副作用的天然高分子化合物香菇多糖包载番荔枝制备纳米粒, 探讨番荔枝对黑色素瘤肺转移癌的抑制效果。

1 材料

1.1 主要试剂与仪器

番荔枝 (质量分数 58.813%, 批号 20190517) 为中国医学科学院药用植物研究所司建勇研究员实验室提供; 香菇多糖 (批号 C17S9Y69375) 购自上海源叶生物技术有限公司; DMEM 培养基、PBS (1X) 购自美国 Hyclone 公司; 胰酶、青霉素和链霉

素混合液购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清购自杭州四季青公司; MTT (批号 298-93-1) 购自北京索莱宝科技有限公司; 甲醇 (色谱纯) 购自赛默飞世尔科技有限公司; 紫杉醇注射液 (批号 190601) 购自北京协和药厂; 透析管 (相对分子质量 2×10^5) 购自美国 Spectrum 公司; 小鼠 S-100 蛋白酶联免疫试剂盒购自厦门仑昌硕生物科技有限公司。

Zetasizer Nano ZS 90 型粒度仪/电位仪购自英国 Malvern Instruments 公司; U3000 高效液相色谱仪购自美国 Dionex 公司; RJ-TGL16C 型高速台式离心机购自无锡市瑞江分析仪器有限公司; MCO-18AC 二氧化碳培养箱购自日本 Sanyo 公司; Tecan M1000 多功能连续波长酶标仪购自瑞士帝肯有限公司; JEM 1400 透射电子显微镜购自日本电子株式会社; 药物透皮吸收仪购自上海黄海药检仪器销售有限公司。

1.2 动物与细胞

SPF 级雌性 C57BL/6 小鼠, 6~8 周龄, 体质量 18~20 g, 购于北京斯贝福生物技术有限公司, 动物许可证编号 SCXK (京) 2021-0105, 动物伦理批准单位为北京协和医学院药用植物研究所, 批准号 SLXD-20211201012。黑色素瘤 B16F10 细胞株, 购自北京协和医学院基础所细胞中心。

2 方法与结果

2.1 番荔枝的含量测定

2.1.1 色谱条件 C_{18} 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 - 水 (60 : 40); 检测波长 208 nm; 体积流量为 1 mL/min; 柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量为 20 μL 。

2.1.2 专属性考察 称取一定量的番荔枝辛和番荔枝素, 分别用色谱甲醇溶解, 按照 2.1.1 色谱条件测定, 考察峰形、对称性。

番茄辛是番茄素中含量较多的一种成分,通常将其作为指标性成分来确定药物的浓度。从图 1 可以看出,番茄辛的出峰时间为 24.5 min,番茄素中的番茄辛出峰时间也为 24.5 min,峰型良好,无杂峰干扰,可准确定量番茄素,用于后续实验。

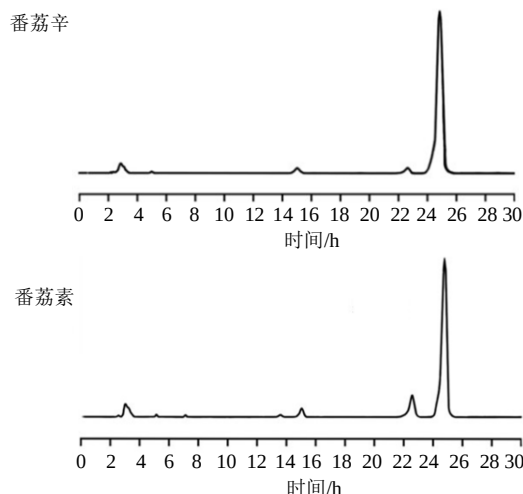


图 1 番茄辛与番茄素的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of squamocin and annonaceous acyogenins

2.1.3 建立标准曲线 称取 5 mg 番茄素于 5 mL 棕色容量瓶中,加入色谱甲醇定容,摇匀,得到 1 mg/mL 的母液。将上述母液用色谱甲醇稀释成 5、10、25、50、100、200、250 $\mu\text{g/mL}$ 的系列标准溶液,各取 250 μL 于 HPLC 中检测,以番茄辛峰面积 (Y) 对药物浓度 (X) 进行线性回归,得标准曲线方程 $Y=0.1198X-0.2056$, $R^2=0.9999$ 。

2.2 香菇多糖-番茄素纳米粒的制备

采用反溶剂沉淀法制备香菇多糖-番茄素纳米粒。称取 9 mg 番茄素溶于适量无水乙醇中做为油相,3 mg 香菇多糖溶于 9 mL 去离子水中作为水相,在超声条件下将油相滴注于水相中。于 40 $^{\circ}\text{C}$ 减压旋转蒸发除去无水乙醇,即得。

2.3 香菇多糖-番茄素纳米粒的质量评价

2.3.1 粒径及电位测定 平行制备 3 份香菇多糖-番茄素纳米粒,以动态光散射法 (DLS) 测定粒径、分散系数 (PDI) 及 Zeta 电位,见图 2。所制备的纳米粒为淡黄色带乳光的澄清液体,粒径为 (160.6 ± 1.0) nm, PDI 为 0.082 ± 0.023 , PDI 值较低,提示该纳米粒粒径分布均一。Zeta 电位为 (-28.10 ± 1.14) mV,表明该纳米粒具有良好的物理稳定性。

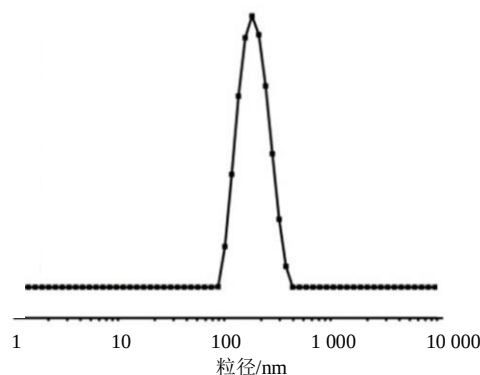


图 2 香菇多糖-番茄素纳米粒粒径分布图

Fig. 2 Particle size distribution map of lentinan-annonaceous acyogenins nanoparticles

2.3.2 形态考察 将稀释后的香菇多糖-番茄素纳米粒滴在碳支持膜的铜网上,静置 5 min 后除去多余液体,自然干燥后,滴加醋酸双氧铀染色,晾干,透射电子显微镜下观察纳米粒的形态和大小。

如图 3 所示,香菇多糖-番茄素纳米粒呈球状,粒径较小,这是由于需对样品进行干燥后检测,在干燥过程中纳米粒发生皱缩,导致粒径减小。

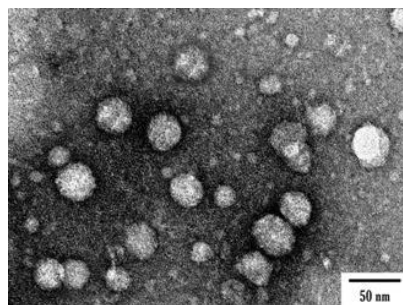


图 3 香菇多糖-番茄素纳米粒透射电镜图

Fig. 3 Transmission electron microscope image of lentinan-annonaceous acyogenins nanoparticles

2.3.3 载药量 (LE) 的测定 精确称量香菇多糖-番茄素纳米粒冻干粉,记为纳米粒的质量 (W_n);将冻干粉用甲醇溶解后, HPLC 法测量番茄素中含量较高的成分番茄辛的含量,记为纳米粒中包封的药量 (W_m)。样品平行制备 3 份,计算载药量。

$$LE = W_m / W_n$$

香菇多糖-番茄素纳米粒的载药量为 $(69.35 \pm 0.11)\%$,与理论载药量 (75%) 较为接近,说明在制备的过程中药物损失较少,该纳米粒的制备方法对番茄素实现了较大程度的保留。

2.3.4 不同生理介质稳定性考察 将香菇多糖-

香菇素纳米粒与 10%葡萄糖、生理盐水、PBS (× 2) (pH 7.4) 按 1:1 混匀, 得到等渗的香菇多糖 - 香菇素纳米粒的 5%葡萄糖、生理盐水、PBS 的混悬液, 与血浆按照 1:4 混匀。将上述体系于 37 °C 孵育, 分别于 0、2、4、6、8 h 取样测量粒径与 PDI。

香菇多糖 - 香菇素纳米粒在生理盐水、PBS 中孵育 8 h 后, 粒径与 PDI 较初始值变化显著 ($P < 0.001$), 但在 5%葡萄糖溶液与血浆中无显著变化, 未出现浑浊或絮集现象, 稳定性良好, 结果见图 4。因此, 该纳米粒可用葡萄糖调节等渗后进行静脉注射给药。

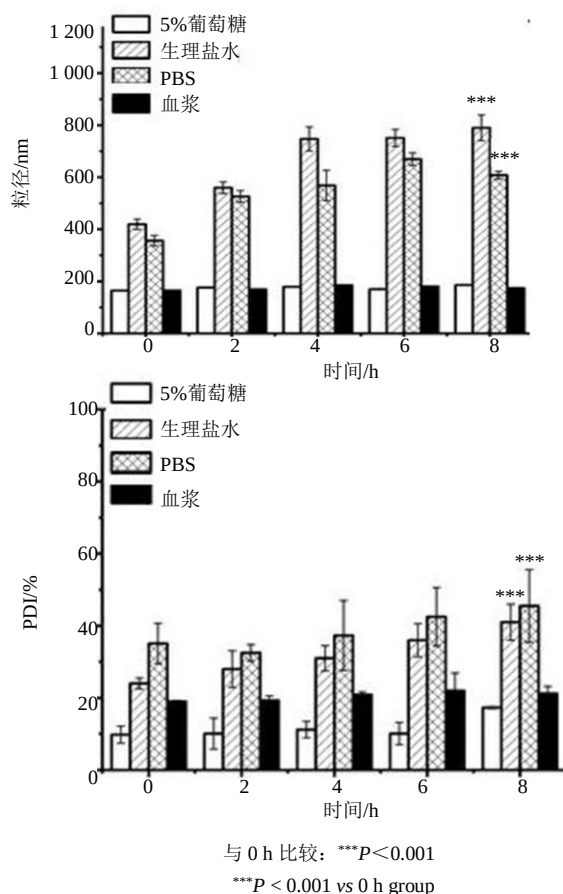


图 4 香菇多糖 - 香菇素纳米粒在不同生理介质中的粒径与 PDI 的变化 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Particle size and PDI changes of lentinan - annonaceous acyogenins nanoparticles in different physiological media ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.3.5 溶血性考察 取新鲜小鼠血液于抗凝管中, 3 500 r/min 离心 5 min, 弃去上清。加入适量生理盐水吹洗红细胞, 3 500 r/min 离心 5 min, 重复上述操作至上清澄清。弃去上清后, 根据红细胞沉淀的体积, 加入生理盐水配制 4%红细胞悬液。

用 5%葡萄糖溶液将香菇多糖 - 香菇素纳米粒

调整为 2.000、1.500、1.000、0.500、0.250、0.125 mg/mL 的等渗液, 与 4%红细胞悬液 1:1 混合, 使红细胞悬液终浓度为 2%。将混合后的体系于 37 °C 孵育 4 h, 3 500 r/min 离心 5 min。取适量上清液用酶标仪在 540 nm 处测量吸光度 (A), 每个浓度平行实验 3 次, 去离子水为阴性对照, 5%葡萄糖溶液与红细胞悬液混合为空白对照, 以去离子水与红细胞悬液混合为阳性对照组, 根据公式计算溶血率。

$$\text{溶血率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{阴性对照}} - A_{\text{空白对照}}) / (A_{\text{阳性对照}} - A_{\text{阴性对照}})$$

香菇多糖生物相容性很好, 几乎没有红细胞膜毒性, 将香菇素包载于纳米粒的内部后, 溶血率较低。与药物质量浓度为 2 mg/mL 时, 香菇多糖 - 香菇素纳米粒溶血率 6.87%相比, 药物质量浓度为 1.5 mg/mL 时溶血率显著降低, 为 2.59% ($P < 0.01$), 低于 5%, 符合静脉给药的要求, 见图 5。

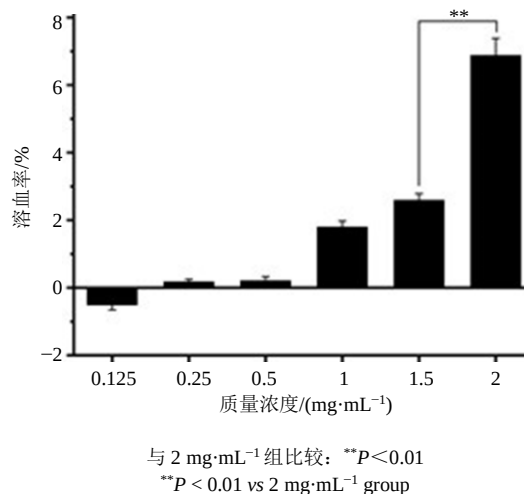


图 5 香菇多糖 - 香菇素纳米粒的溶血率 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 5 Hemolysis of lentinan - annonaceous acyogenins nanoparticles ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.3.6 体外药物释放行为考察 采用透析袋法考察香菇多糖 - 香菇素纳米粒的体外释放行为。取 2 mL 香菇多糖 - 香菇素纳米粒 (1 mg/mL) 装入即用型透析管截留 (相对分子质量 8 000~10 000), 放入 1 L 5%葡萄糖溶液中, 在 37 °C、200 r/min 的条件下进行释放行为考察。在特定时间间隔内从透析管中取出 50 μ L 样品加入 450 μ L 色谱甲醇混合, 于 13 000 r/min 离心 10 min 后取上清用 HPLC 测定药物含量, 计算累积释放率。样品平行制备 3 份, 取出样品后及时补充等量的释放外液, 每 24 小时更换 1 次释放外液^[8-9, 11]。

香菇多糖 - 香菇素纳米粒在 8 h 内累积释放 29.83%, 其中初始 0.5 h 内药物释放 18.23%, 可能

是少量吸附在纳米粒外层的番荔枝快速释放所致
的结果；在 108 h 内药物累积释放 89.10%，基本释
放完全。纳米粒体外释放行为见图 6，药物在体外
缓慢释放，在一定程度上可确保用药的安全性与有
效性。

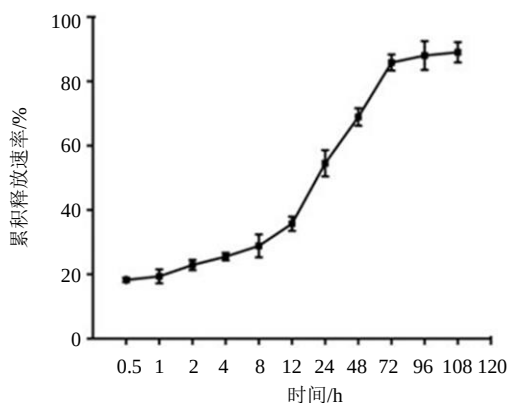


图 6 香菇多糖 - 番荔枝素纳米粒的体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

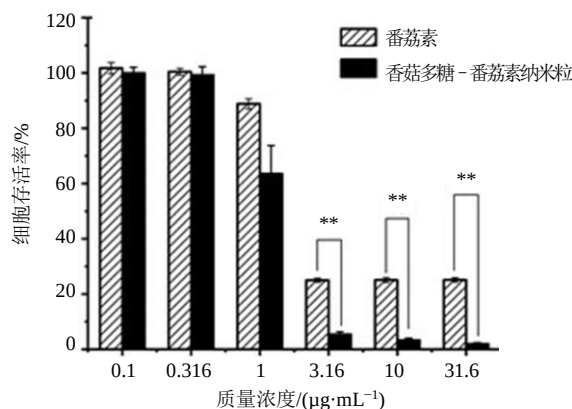
Fig. 6 *In vitro* release curve of lentinan - annonaceous acyogenins nanoparticles ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

2.4 体外药效学考察

2.4.1 MTT 实验 将对数生长期的黑色素瘤 B16F10 细胞接种于 96 孔板中 (1×10^4 个/孔)，于 37 °C、5% CO₂ 培养 24 h。将番荔枝素和香菇多糖 - 番荔枝素纳米粒分别稀释至 0.100、0.316、1.000、3.160、10.000、31.600 $\mu\text{g/mL}$ 后，弃去孔板上多余的培养液，取各浓度药物 150 μL 加至孔板，每个浓度平行 6 个复孔。培养 72 h 后加入 5 mg/mL MTT 溶液 20 μL 继续孵育 4 h。吸弃各孔液体，加入 150 μL DMSO，将孔板放入摇床振摇 10 min，溶解结晶物。在 570 nm 波长下检测 A 值，计算细胞存活率，利用 Graphpad Prism 软件计算半数抑制浓度 (IC₅₀)。

如图 7 所示，番荔枝素与香菇多糖 - 番荔枝素纳米粒对黑色素瘤 B16F10 细胞均有明显的抑制效果，当质量浓度在 3.160、10.000、31.600 $\mu\text{g/mL}$ 时，与番荔枝素比较，对细胞存活率存在显著差异 ($P < 0.01$)；番荔枝素与香菇多糖 - 番荔枝素纳米粒对黑色素瘤 B16F10 细胞 IC₅₀ 值分别为 1.230、0.556 $\mu\text{g/mL}$ 。结果表明，在相同浓度下香菇多糖 - 番荔枝素纳米粒对黑色素瘤 B16F10 细胞抑制作用优于番荔枝素原料药，这可能与将番荔枝素制备成纳米粒后粒径减小，易被细胞内吞摄取，滞留时间延长有关。

2.4.2 细胞划痕实验 取对数生长期的黑色素瘤 B16F10 细胞接种在 12 孔板上 (1×10^5 个/孔)，培



与番荔枝素原料药组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs annonaceous acyogenins active pharmaceutical ingredients group

图 7 番荔枝素原料药与香菇多糖 - 番荔枝素纳米粒对 B16F10 细胞的体外抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 7 *In vitro* inhibitory effect of annonaceous acyogenins active pharmaceutical ingredients and lentinan - annonaceous acyogenins nanoparticles on B16F10 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

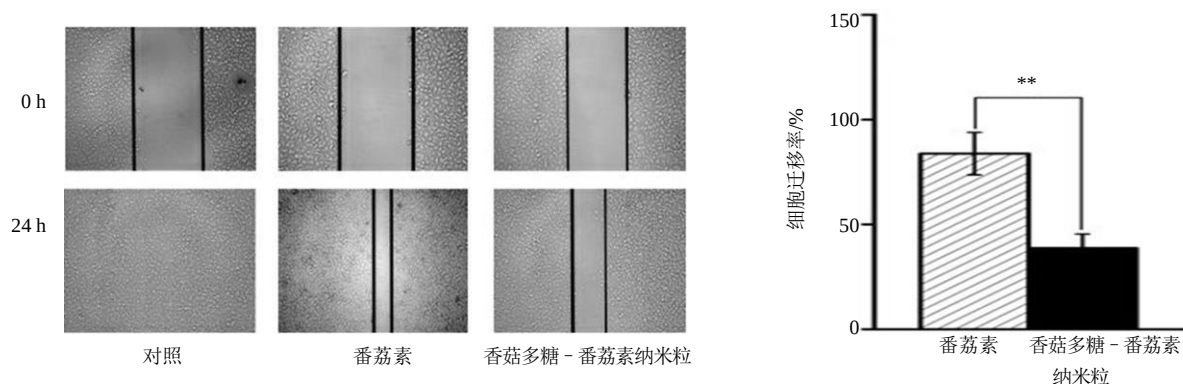
养 24 h 后在孔板中央划直线，用 PBS 冲洗划落的细胞。以 IC₅₀ 值 (1.230、0.556 $\mu\text{g/mL}$) 做参考，分别加入 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 番荔枝素原料药和香菇多糖 - 番荔枝素纳米粒溶液继续孵育细胞，对照组以空白培养基孵育细胞。利用显微镜观察 0、24 h 的划痕宽度，计算细胞迁移率。

迁移率 = (0 h 划痕面积 - 24 h 划痕面积) / 0 h 划痕面积
划痕实验结果如图 8 所示，孵育 24 h 后对照组孔板底部划痕消失，番荔枝素原料药组孔板中的划痕已趋近融合状态，较香菇多糖 - 番荔枝素纳米粒组有明显的细胞迁移。利用 Image J 软件对划痕面积进行统计，番荔枝素原料药和香菇多糖 - 番荔枝素纳米粒对黑色素瘤 B16F10 细胞的迁移率分别为 83.78%、38.73%，说明将番荔枝素制成纳米粒后能提高对黑色素瘤 B16F10 细胞的迁移抑制作用。

2.5 体内药效学考察

2.5.1 小鼠黑色素瘤肺转移癌模型的建立 用 DMEM 完全培养基 (含 1% 双抗、10% FBS) 培养黑色素瘤 B16F10 细胞至对数生长期，弃去培养液后加入 3 mL 0.25% 胰酶消化细胞。3 000 r/min 离心细胞 5 min，加入适量 PBS 重悬细胞，浓度为 1×10^6 个/mL。实验开始前每只小鼠 iv 0.2 mL 瘤液，建立黑色素瘤肺转移癌小鼠模型。

2.5.2 实验动物分组及给药方案 将小鼠分为对



与番茄素原料药组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs annonaceous acyogenins active pharmaceutical ingredients group

图 8 番茄素原料药与香菇多糖 - 番茄素纳米粒对 B16F10 细胞的迁移抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 8 Inhibitory effect of annonaceous acyogenins active pharmaceutical ingredients and lentinan - annonaceous acyogenins nanoparticles on migration of B16F10 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

照组、模型组、紫杉醇注射液组 (8 mg/kg) 以及香菇多糖 - 番茄素纳米粒低、中、高 (0.1、0.2、0.4 mg/kg) 剂量组, 每组 10 只小鼠。除对照和模型组外, 各组于造模第 2 天开始 iv 相应药物, 给药周期 14 d。其中对照组正常饲养, 模型组给予生理盐水。

2.5.3 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析。

2.5.4 小鼠体质量 每 2 天记录小鼠体质量并观察生存状态。

给药期间, 各组小鼠体质量变化曲线如图 9 所示。实验结束时紫杉醇注射液组小鼠体质量与初始体质量相比有所下降, 其他组无明显变化。实验过程中无小鼠死亡。

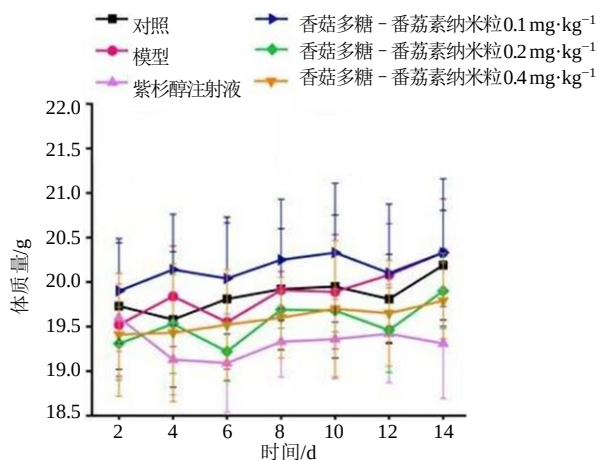


图 9 各组小鼠体质量 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 9 Body weight of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

2.5.5 肺质量和转移抑制率 实验结束后, 摘眼球放血, 脱颈处死小鼠并解剖, 剥离肺脏, 称取湿质量, 计算相对肺质量, 统计肺转移结节数, 计算转移抑制率。

相对肺质量 = 肺湿质量 / 体质量

肿瘤转移抑制率 = (模型组平均转移结节数 - 给药组平均转移结节数) / 模型组平均转移结节数

如表 1 所示, 相较于对照组, 模型组小鼠的相对肺质量显著增加 ($P < 0.01$), 香菇多糖 - 番茄素纳米粒 0.1 mg/kg 组略有增加 ($P < 0.05$); 相较于模型组, 紫杉醇注射液组、香菇多糖 - 番茄素纳米粒各剂量组小鼠肺转移结节数量均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.001); 相较于紫杉醇注射液组, 香菇多糖 - 番茄素纳米粒各剂量组肺转移结节数量显著降低, 结节转移抑制率显著升高 ($P < 0.05$ 、0.001)。

小鼠肺部转移情况如图 10 所示, 对照组小鼠肺部光滑, 模型组小鼠每片肺叶上均出现了大量结节; 紫杉醇注射液组肺部结节数较模型组有所减少; 香菇多糖 - 番茄素纳米粒组结节数量较模型组明显减少, 且与紫杉醇注射液组相比抑制作用更加明显。

2.5.6 ELISA 法分析小鼠体内 S-100 蛋白表达 采集各组小鼠全血, 于 30 min 内 2 000 r/min 离心 20 min, 取上清即可根据试剂盒说明书要求进行检测。如表 2 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠体内的 S-100 蛋白表达显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 紫杉醇注射液组和香菇多糖 - 番茄素纳米粒各剂量组小鼠 S-100 蛋白的表达显著降低 ($P < 0.01$)。

表 1 各组小鼠肺湿质量、相对肺质量、肺转移结节数量、结节转移抑制率 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)Table 1 Lung wet weight, relative lung weight, number of lung metastases nodules, and nodule metastasis inhibition rate of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	肺湿质量/mg	相对肺质量/%	肺转移结节数量/个	结节转移抑制率/%
对照	—	130.43 ± 4.53	0.65 ± 0.02	—	—
模型	—	242.31 ± 36.30	1.21 ± 0.24**	228.51 ± 45.84	—
紫杉醇注射液	8.0	164.76 ± 13.12	0.84 ± 0.07	122.54 ± 24.32 [#]	46.39
香菇多糖 - 番荔枝素	0.1	169.40 ± 15.90	0.89 ± 0.08*	87.50 ± 23.13 ^{###&}	61.70 ^{&}
纳米粒	0.2	142.46 ± 5.97	0.73 ± 0.04	37.17 ± 6.18 ^{###&&}	83.73 ^{&&}
	0.4	137.72 ± 4.73	0.69 ± 0.03	15.83 ± 8.03 ^{###&&&}	91.60 ^{&&&}

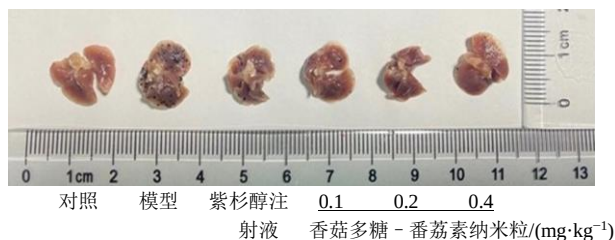
与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{###} $P < 0.001$; 与紫杉醇注射液组比较: [&] $P < 0.05$ ^{&&} $P < 0.001$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ ^{###} $P < 0.001$ vs model group; [&] $P < 0.05$ ^{&&} $P < 0.001$ vs Paclitaxel Injection group

图 10 小鼠黑色素瘤肺转移情况

Fig. 10 Lung metastases of melanoma in mice

与紫杉醇注射液组比较, 其中香菇多糖 - 番荔枝素纳米粒 0.2、0.4 mg/kg 的香菇多糖 - 番荔枝素纳米粒 S-100 蛋白的表达下降更为显著 ($P < 0.01$)。说明 0.2 mg/kg 的香菇多糖 - 番荔枝素纳米粒即可对黑色素瘤肺转移癌起到较好的抑制作用。

表 2 各组小鼠体内 S-100 蛋白的浓度 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)Table 2 S-100 protein value in each group of mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	S-100 蛋白/(pg·mL ⁻¹)
对照	—	0.109 3 ± 0.006 1
模型	—	1.417 6 ± 0.208 5**
紫杉醇注射液	8.0	0.698 2 ± 0.060 9 ^{##}
香菇多糖 - 番	0.1	0.584 5 ± 0.101 7 ^{###}
荔枝素纳米粒	0.2	0.255 6 ± 0.082 6 ^{###&}
	0.4	0.234 3 ± 0.087 8 ^{###&&}

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与紫杉醇注射液组比较: [&] $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ vs control group; ^{##} $P < 0.01$ vs model group; [&] $P < 0.01$ vs Paclitaxel Injection group

3 讨论

番荔枝素的抗肿瘤活性极高, 却因难溶于水、成药性差、溶血性强等缺点限制了体内研究^[11]。早期研究中利用固体分散技术将番荔枝素制成滴丸, 虽能提高生物利用度并降低毒性, 但效果不显著^[12]。而纳米制剂技术的应用, 不仅能提高番荔枝素的溶解

度, 还能在低剂量下达到较高药效, 这为番荔枝素提供了更大的利用空间^[13-14]。近年来, 多糖被广泛应用于纳米药物载体的研究中, 以天然多糖为载体参与合成纳米传递系统可增加药物在肿瘤细胞中的蓄积, 减少不良反应, 提高安全性^[15]。香菇多糖具有较好的抗肿瘤作用^[16]。吴名等^[17]将疏水性药物熊果酸包封于亲水性载体香菇多糖内, 香菇多糖上存在大量羟基可与熊果酸通过氢键作用力形成的类球形纳米复合物。丁建勋等^[18]成功制备得到了香菇多糖与阿霉素的键合药, 该药物表现出了良好的生物活性、生物相容性和较低的不良反应。

本研究首次尝试将香菇多糖作为稳定剂包载番荔枝素, 成功制备了平均粒径为 (160.6 ± 1.0) nm 的球形纳米粒。香菇多糖 - 番荔枝素纳米粒在 5% 的葡萄糖等渗注射介质中稳定, 不会与血浆中的蛋白及酶类等成分络合, 可静脉给药。但番荔枝素脂溶性较强, 静脉注射时存在溶血隐患。制得香菇多糖 - 番荔枝素纳米粒在 1.5 mg/mL 时溶血率低于 5%, 而 P188-番荔枝素纳米粒的溶血率则在 0.25 mg/mL 时才低于 5%^[8]。猜测原因可能是不溶血且生物相容性极好的香菇多糖将番荔枝素通过纳米包封进行保护, 致使香菇多糖 - 番荔枝素纳米粒在较高剂量范围内仍符合静脉给药需求。

香菇多糖 - 番荔枝素纳米粒的体外释放行为总体较缓慢, 说明该纳米粒具有一定的缓释功能, 有利于维持药物在体内的浓度, 使药效更持久。番荔枝素主要通过抑制 NADH 氧化酶到泛醌的电子传递过程使线粒体氧化磷酸化受阻, 减少 ATP 供能, 最终引起肿瘤细胞凋亡^[19]。另外, 番荔枝素可逆转多药耐药性, 也能与 G1 期的肿瘤细胞作用引起肿瘤细胞凋亡^[20-21]。通过 MTT 实验与划痕实验可以看出, 香菇多糖 - 番荔枝素纳米粒对黑色素瘤 B16F10 细胞

的抑制效果均高于番荔枝原料药,推测可能是由于纳米粒粒径较小,更易被细胞内吞,纳米粒缓释的特性可使药物持续作用于肿瘤细胞,并延长药物在细胞内滞留时间。

在进行体内实验前,根据文献对构建黑色素瘤肺转移癌模型所需要的黑色素瘤 B16F10 细胞浓度进行筛选,最终选择 1×10^6 个/mL 的浓度进行尾静脉接瘤,该方法成瘤率高、重复性好^[22-23]。实验结果表明 0.2、0.4 mg/kg 的香菇多糖-番荔枝素纳米粒对肺部结节的抑制率较高,可能是由于在造模的第 2 天对荷瘤小鼠进行给药干预,此时黑色素瘤肺转移处于早期,及时用药对转移起到了较好的抑制效果^[24]。此外,静脉注射给药大幅提高了香菇多糖-番荔枝素纳米粒生物利用度。S-100 蛋白是黑色素瘤诊断中免疫组化常用标志物,不仅可用于转移性肿瘤的确诊,还可评价黑色素瘤的治疗情况^[25-26]。根据结节数量来确定肺部转移抑制效果存在一定的局限性,因此本研究增加对小鼠体内 S-100 蛋白浓度的检测,进一步证实了香菇多糖-番荔枝素纳米粒对黑色素瘤肺转移癌的增殖抑制作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 韦金玉,曾建红.木犀草素对黑色素瘤 A375 细胞增殖和迁移的影响及其作用机制 [J]. 广西医科大学学报, 2019, 36(12): 1894-1897.
- [2] Mirzavi F, Barati M, Soleimani A, et al. A review on liposome-based therapeutic approaches against malignant melanoma [J]. *Int J Pharm*, 2021, 599: 120413.
- [3] 王一苓,周佳磊,白凯文,等.黑色素瘤的发病机制和治疗研究进展 [J]. 药物生物技术, 2019, 26(4): 357-361.
- [4] 任宇,刘宝瑞,邹征云.晚期恶性黑色素瘤的靶向及免疫治疗研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26(12): 1970-1974.
- [5] Guan X. Cancer metastases: Challenges and opportunities [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5(5): 402-418.
- [6] 杨钰莹,刘莉,折虹,等.恶性黑色素瘤的黑色素含量与其进展和转移相关性探讨 [J]. 中国肿瘤临床, 2018, 45(23): 1201-1205.
- [7] 杨海军,张宁,曾庆琪,等.番荔枝种子化学成分研究 (I) [J]. 中南药学, 2017, 15(2): 154-161.
- [8] 洪靖怡.番荔枝素纳米靶向制剂及抗肿瘤增效研究 [D]. 北京:北京协和医学院, 2017.
- [9] 苏文晶,肖瑶,张明珠,等.番荔枝素纳米混悬剂的制备及其抗肿瘤作用研究 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(6):

966-972.

- [10] 李昕,朱丹丹,陈裕,等.纳米药物递送系统在促进肿瘤深层渗透方面的研究进展 [J]. 中南药学, 2020, 18(12): 2009-2018.
- [11] Bonneau N, Schmitz-Afonso I, Brunelle A, et al. Validation data for the quantification of the annonaceous acetogenin annonacin in Rat brain by UPLC-MS/MS [J]. *Data Brief*, 2016, 7: 1633-1638.
- [12] 徐莎莎,李祥,陈建伟,等.番荔枝内酯滴丸制剂工艺及其含量测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1): 16-19.
- [13] 聂凡茹,艾汝经,周欣欣,等.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 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(1): 24-28.
- [14] Srinivas N S K, Verma R, Kulyadi G P, et al. A quality by design approach on polymeric nanocarrier delivery of gefitinib: Formulation, *in vitro*, and *in vivo* characterization [J]. *Int J Nanomedicine*, 2017, 12: 15-28.
- [15] 廖美红,石锐,张立群.天然多糖类纳米凝胶药物载体的研究进展 [J]. 高分子通报, 2016(12): 1-9.
- [16] 苏畅,李小江,贾英杰,等.香菇多糖的抗肿瘤作用机制研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(6): 1499-1504.
- [17] 吴名,刘小龙,曾永毅,等.一种香菇多糖熊果酸自组装纳米颗粒及其制备方法与应用:中国, CN114522171A [P]. 2022-05-24.
- [18] 丁建勋,许维国,庄秀丽,等.香菇多糖-阿霉素键合药及其制备方法:中国, CN103656671B [P]. 2015-09-16.
- [19] Dang Y J, Feng H Z, Zhang L, et al. In situ absorption in rat intestinal tract of solid dispersion of annonaceous acetogenins [J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2012, 2012: 879676.
- [20] Pedro N D, Cautain B, Melguizo A, et al. Analysis of cytotoxic activity at short incubation times reveals profound differences among annonaceous acetogenins, inhibitors of mitochondrial Complex I [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2013, 45(1): 145-152.
- [21] Yuan S S F, Chang H L, Chen H W, et al. Selective cytotoxicity of squamocin on T24 bladder cancer cells at the S-phase via a Bax-, Bad-, and caspase-3-related pathways [J]. *Life Sci*, 2006, 78(8): 869-874.
- [22] 孟星君,李孝东,刘俊,等. C57BL/6 J 小鼠黑色素瘤肺转移模型的构建 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(2): 139-144.
- [23] 王峥,苗晋鑫.黑色素瘤小鼠模型研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(2): 120-127.
- [24] 许先荣,赵桂芝,朱婉萍,等.紫杉醇脂质体联合中药姜黄素对小鼠转移性肺癌的影响 [J]. 中国中医药科技, 2016, 23(5): 551-553.
- [25] 刘硕,常谨,刘英琦. S100A6 对黑色素瘤细胞增殖、侵袭、迁移的影响及机制研究 [J]. 广西医科大学学报, 2021, 38(11): 2090-2096.
- [26] Wang T, Huo X Y, Chong Z Y, et al. A review of S100 protein family in lung cancer [J]. *Clin Chim Acta*, 2018, 476: 54-59.

【责任编辑 高源】