

• 药理与临床 •

灵慧方多组分微乳的制备及其抗肺癌活性研究

袁成甜^{1,2}, 贺俊杰², 陈彦^{2*}, 瞿鼎², 孙文杰²

1. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013

2. 江苏省中医药研究院 国家中医药管理局中药释药系统重点实验室, 江苏 南京 210028

摘要: **目的** 制备灵慧方多组分微乳并对其抗肺癌活性进行研究。**方法** 以灵芝多糖和薏苡仁多糖水溶液为水相, 薏苡仁油为油相, 荷载灵芝三萜, 采用水滴定法制备灵慧方多组分微乳, 测定其粒径、Zeta 电位, 并考察其稳定性。以 Lewis 荷瘤小鼠抑瘤率、体质量变化、免疫器官(肝、脾和胸腺)指数以及血浆中肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-6 (IL-6) 水平为考察指标, 结合肿瘤组织病理切片和 TUNEL 凋亡原位检测, 评价灵慧方多组分微乳的抗肺癌活性。**结果** 制备所得微乳形态圆整, 平均粒径为 (69.92 ± 8.43) nm, 多分散指数 (PDI) 为 0.060 ± 0.008 , Zeta 电位为 (-11.30 ± 1.34) mV。微乳组抑瘤率 (57.25%) 显著高于混悬液组 (45.89%), 免疫器官指数和血浆中 TNF- α 和 IL-6 水平显著升高, 肿瘤组织病理切片和 TUNEL 凋亡原位检测显示微乳组抗肿瘤效果显著高于混悬液组。**结论** 灵慧方多组分微乳具有较好的抗肺癌活性。

关键词: 灵慧方; 灵芝多糖; 薏苡仁多糖; 灵芝三萜; 薏苡仁油; 多组分微乳; 抗肺癌

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)22-3284-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.22.013

Preparation of Lingyi Formula multicomponent microemulsion and its anti-lung cancer activity

YUAN Cheng-tian^{1,2}, HE Jun-jie², CHEN Yan², QU Ding², SUN Wen-jie²

1. Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

2. Key Laboratory of New Drug Delivery System of Chinese Meteria Medica, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

Abstract: Objective To prepare Lingyi Formula multicomponent microemulsion and evaluate its anti-lung cancer activity. **Methods** Lingyi Formula multicomponent microemulsion was prepared by aqueous titration method using polysaccharides solution of *Ganoderma lucidum* and *Coix lachryma-jobi* var. *ma-yuen* as aqueous phase and coix seed oil as oil phase, loading ganoderma triterpenes. The average particle size, Zeta potential, and stability were detected. The results of antitumor efficacy including tumor inhibitory rate, body weight change, immune organ index, and concentration of TNF- α and IL-6 were investigated. Besides, pathological section of tumor tissue and TUNEL labeling were conducted subsequently. **Results** The prepared microemulsion displayed spherical surface with mean droplet size of (69.92 ± 8.43) nm, polydispersity (PDI) of 0.060 ± 0.008 , and Zeta potential of (-11.30 ± 1.34) mV. Tumor inhibitory rate of microemulsion (57.25%) was significantly higher than that of suspension (45.89%), immune tissue index as well as the concentration of TNF- α and IL-6 were increased significantly. TUNEL labeling and pathological section of tumor tissue showed that the antitumor activity of microemulsion was significantly effective compared with that of suspensions. **Conclusion** Lingyi Formula multicomponent microemulsion has a good anti-lung cancer activity.

Key words: Lingyi Formula; *Ganoderma lucidum* polysaccharides; *Coix lachryma-jobi* var. *ma-yuen* polysaccharides; ganoderma triterpenes; coix seed oil; multicomponent microemulsion; anti-lung cancer

收稿日期: 2014-04-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81373979); 江苏省中药领军人才项目 (LJ200913); 江苏省自然科学基金资助项目 (BK20141058)

作者简介: 袁成甜 (1989—), 男, 硕士在读, 研究方向为中药新剂型。Tel/Fax: (025)85608672 E-mail: demon550537774@126.com

*通信作者 陈彦 Tel/Fax: (025)85608672 E-mail: ychen202@hotmail.com

灵薏方是江苏省中西医结合医院临床使用的抗肺癌验方, 具有较好的疗效, 主要由传统的抗肿瘤中药灵芝和薏苡仁配伍组成。但由于该复方中主要抗肿瘤活性组分灵芝三萜和薏苡仁油水溶性较差, 口服生物利用度较低^[1-2], 导致临床常用剂型(汤剂)的疗效得不到充分发挥, 因此有必要对该复方剂型进行进一步研究, 期待通过提高各活性成分的水溶性来促进其肠道吸收, 增强疗效。微乳是一种由油相、表面活性剂及助表面活性剂组成的新型载药系统^[3], 可以显著增加难溶性药物的溶解度, 提高药物的生物利用度, 增强疗效^[4]。目前中药微乳剂型的相关研究已有报道, 如苦参碱微乳^[5-6]、秋水仙碱微乳^[7]、芍药苷微乳^[8]、芒果苷微乳^[9]等。为克服现有微乳载药量低, 辅料使用较多、毒副作用较大的缺陷, 本课题组前期研究中以薏苡仁油为油相, 荷载灵芝三萜制备了多组分微乳, 该微乳具有粒径小、抑瘤率高、组织毒性小的特点, 有效地改善了原型药物体内溶出较差等缺陷^[10]。本研究拟引入灵芝多糖和薏苡仁多糖的水溶液作为水相, 制备灵薏方多组分微乳, 并考察其抗肿瘤效果, 以达到充分利用药材中有效成分, 进一步体现中医药多组分、多靶点特色, 保持和提高制剂疗效的目的。

1 材料

1.1 仪器

UV-2802 紫外可见分光光度仪(上海尤尼柯仪器有限公司); 85-2 恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器厂); HERA Cell 150 CO₂ 培养箱、酶标仪(美国热电集团); COIC XDS-1B 相差倒置显微镜(重庆光电仪器总公司); Nano-ZS 型马尔文粒径测定仪(英国马尔文公司); Tecnai12 透射电镜(荷兰飞利浦制造公司); Nikon ECLIPSE 电子显微镜(日本尼康公司)。

1.2 药品和试剂

灵芝三萜(质量分数 61.50%)、灵芝多糖(质量分数 46.40%)、薏苡仁油(质量分数 74.35%)、薏苡仁多糖(质量分数 64.42%), 均为自制; 聚氧乙烯氢化蓖麻油(Cremophor[®] RH40)(德国 BASF 公司); 聚乙二醇 400(PEG 400)(国药集团化学试剂有限公司); 环磷酸胺冻干粉(江苏恒瑞制药有限公司, 批号 12032725); 苏木素-伊红(HE)染液(由核染液、分色液 I、分色液 II、浆染液及增色液组成)、TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)(南京凯

基生物科技发展有限公司); 水为 Milipore[®] 超纯水, 其他所用试剂均为分析纯或色谱纯。

1.3 细胞株及动物

Lewis 小鼠肺癌细胞, 购于南京凯基生物科技发展有限公司; C₅₇BL/6J 小鼠, 6~8 周龄, 购于上海斯莱克实验动物有限责任公司, 合格证号 SCXK(沪) 2007-0005。

2 方法与结果

2.1 灵薏方多组分微乳的制备^[11]

取 130 mg 灵芝多糖、500 mg 薏苡仁多糖加入到 2.6 mL 水中溶解, 作为水相。取灵芝三萜 75 mg, 薏苡仁油 400 mg, 在磁力搅拌器下搅拌 0.5 h, 再加入 RH40 400 mg, PEG 400 200 mg, 搅匀, 并逐滴加入水相, 磁力搅拌器搅匀, 得到澄清微乳溶液。

2.2 多组分微乳的表征

采用马尔文激光散射粒度测定仪, 在室温下测定多组分微乳的平均粒径、多分散指数(PDI)和 Zeta 电位。同时将载有 Formvar 支持膜的铜网放于蜡板上, 在膜上滴加微乳液 1 滴, 室温风干 30 min, 再滴加 2% 的磷钨酸 1 滴, 室温风干 10 min, 滤纸吸走多余液体, 置于 Tecnai 12 型透射电镜下观察微乳的外观形态, 电镜观察结果见图 1。结果显示所制备微乳外观圆整, 分散均匀, 平均粒径为 (69.92 ± 8.43) nm, PDI 为 0.060 ± 0.008 , Zeta 电位为 (-11.30 ± 1.34) mV。

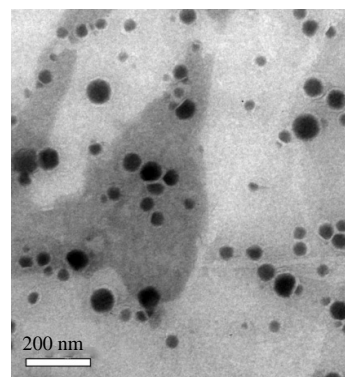


图 1 灵薏方多组分微乳的透射电镜图

Fig. 1 TEM graphs of Lingyi Formula multicomponent microemulsion

2.3 微乳稳定性考察

2.3.1 稀释对稳定性的影响 取微乳 1.0 mL, 分别用水及生理盐水将其稀释 10、100 倍, 观察微乳形态的变化并测定粒径, 结果见图 2, 稀释使微乳平均粒径小幅减小, 可能是因为稀释降低了微乳粒子

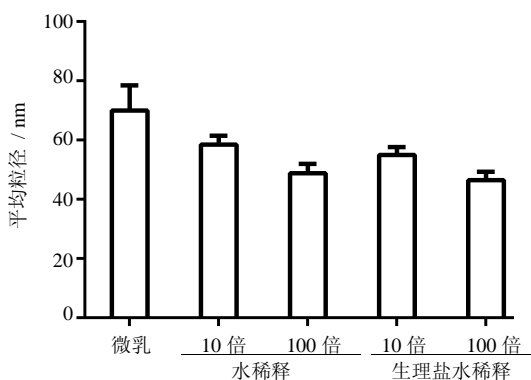


图 2 稀释对灵薏方多组分微乳粒径的影响

Fig. 2 Effect of dilution on particle size of Lingyi Formula multicomponent microemulsion

的聚集程度。

2.3.2 高速离心对稳定性的影响 取微乳 1.0 mL 于离心管中，以 13 000 r/min 离心 30 min，结果显示所制备微乳无明显絮凝和分层现象出现。

2.3.3 放置时间对稳定性的影响 微乳在 4 °C 和 25 °C 的条件下保存 1 个月，结果显示所制备微乳无明显絮凝和分层现象出现。

2.3.4 pH 值对稳定性的影响 取微乳样品溶液 10 份，加磷酸盐缓冲液 (PBS) 调节 pH 值分别为 2.0、3.0、4.0、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.4 和 8.0，观察其外观形态的变化并测定平均粒径，结果见图 3，在考察范围内 pH 值对微乳的粒径无明显影响。

2.4 灵薏方多组分微乳体内抗肺癌作用

2.4.1 模型复制、分组及给药 将 Lewis 肺癌细胞培养并传代，取生长良好的细胞经胰酶消化后，用计数板计数，将浓度调整至 1×10^7 /mL，于健康 C₅₇BL/6J 小鼠右腋部 sc，每只 0.2 mL，制备小鼠肺癌的实体瘤模型^[12-13]。

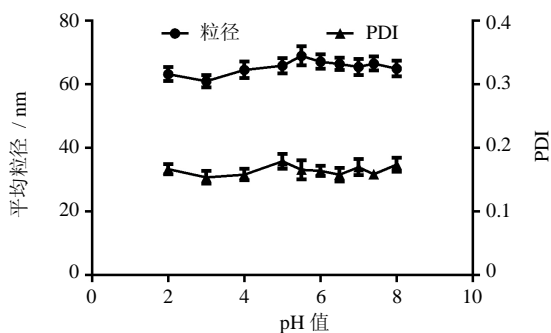


图 3 pH 值对灵薏方多组分微乳粒径和 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of pH value on particle size and PDI of Lingyi Formula multicomponent microemulsion ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

将 C₅₇BL/6J 小鼠称体质量后随机分为 4 组，每组 8 只，分别为模型组 (生理盐水)、阳性组 (环磷酰胺 20 mg/kg)、多组分微乳组 (总生药 30 g/kg)、混悬液组 (取灵芝三萜 0.75 g、薏苡仁油 4 g、灵芝多糖 1.3 g、薏苡仁多糖 5.04 g，用 0.2% 的 CMC-Na 溶液稀释至 50 mL，总生药 30 g/kg)。各组均 ig 给药，每日 0.4 mL/次，连续 14 d。

2.4.2 观察及检测指标 给药期间每日称小鼠体质量，观察其进食、活动状态及死亡状况。给药 14 d 后，眼球取血，3 000 r/min 离心 5 min，-20 °C 冷藏备用，采用酶标仪测定血浆中的肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 和白细胞介素-6 (IL-6) 水平。同时剥离腋下肿瘤、肝脏、脾脏、胸腺，计算抑瘤率、肝指数、胸腺指数、脾指数。

$$\text{抑瘤率} = 1 - \text{治疗组平均瘤质量} / \text{模型组平均瘤质量}$$

$$\text{肝指数} = \text{肝质量} / \text{体质量}$$

$$\text{胸腺指数} = \text{胸腺质量} / \text{体质量}$$

$$\text{脾指数} = \text{脾脏质量} / \text{体质量}$$

2.4.3 统计学方法 应用软件 SPSS 13.0 处理数据，两组间比较采用 *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析。

2.4.4 抑瘤率等指标结果 阳性组、微乳组和混悬液组的抑瘤率分别为 74.59%、57.25%、45.89%，微乳组和混悬液组相比较，抑瘤率有显著提高 ($P < 0.05$)。图 4 中，微乳组小鼠瘤质量低于混悬液组，与模型组比较明显降低，表明多组分微乳具有优良的抗肿瘤能力。图 5 中，环磷酰胺组与模型组相比，小鼠肝指数、脾指数和胸腺指数均有一定的降低 ($P < 0.05$)，可能是由于环磷酰胺对小鼠免疫系统有抑制作用；微乳组和混悬液组小鼠肝指数、脾指数和胸腺指数与模型组和环磷酰胺组比较显著提高 ($P < 0.05$)，表明灵薏方多组分微乳和混悬液均可增强小鼠机体免疫活性；与混悬液组相比，微乳组的免疫指标均有所提高，表明微乳可以更好地提高机体免疫力。图 6 中，环磷酰胺组与模型组相比，小鼠血浆中 TNF-α 和 IL-6 水平有所降低，可能是由于环磷酰胺抑制了机体免疫系统，但微乳组和混悬液组与模型组比较，小鼠血浆中 TNF-α 和 IL-6 的量显著提高，且微乳组高于混悬液组，表明微乳具有较好的免疫调节能力。

2.4.5 肿瘤组织病理切片观察 将切取的肿瘤组织用 10% 福尔马林固定，由低到高梯度乙醇脱水，二甲苯洗脱 3 次，每次 5 min，经石蜡包埋后组织

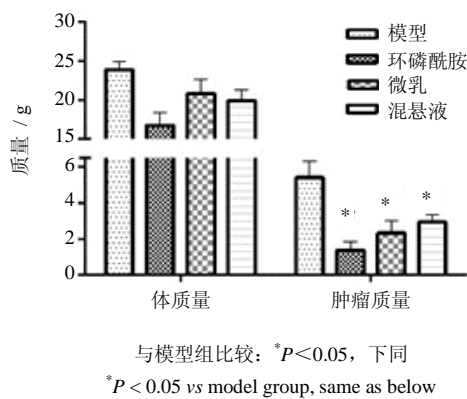


图 4 各组荷瘤小鼠的体质量与瘤质量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig. 4 Comparison on body weight and tumor weight of tumor-bearing mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

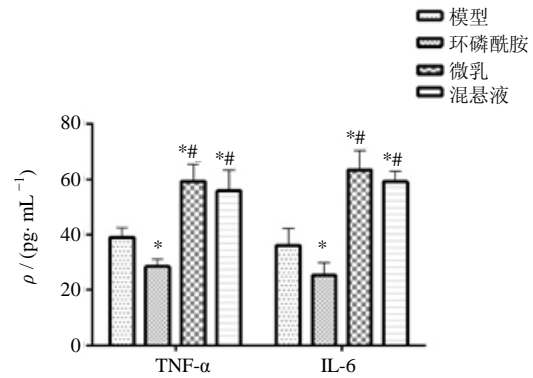


图 6 各组荷瘤小鼠血浆中 TNF-α 和 IL-6 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig. 6 Levels of TNF-α and IL-6 in plasma of tumor-bearing mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

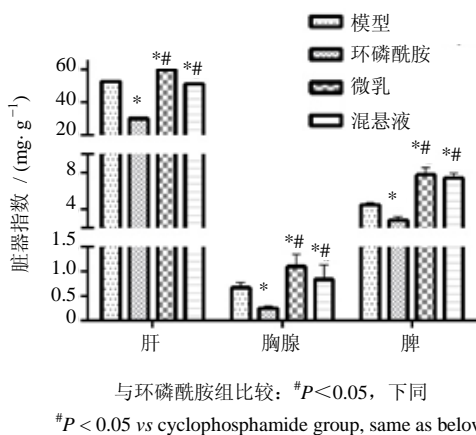


图 5 各组荷瘤小鼠肝指数、胸腺指数和脾指数比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig. 5 Comparison on liver, thymus, and spleen indexes of tumor-bearing mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

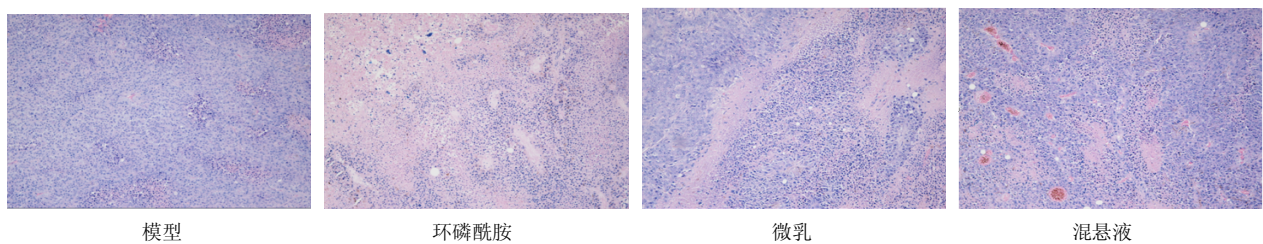


图 7 各组荷瘤小鼠肿瘤组织病理观察

Fig. 7 Pathological observation of tumor tissue of tumor-bearing mice in each group

TdT 酶孵育 60 min, PBS 冲洗, 每个样本上滴加 50 μ L POD-conjugated Anti-FITC 工作液处理, PBS 冲洗, 每个样本上滴加 50 μ L DAB 工作液, 室温下孵育 3~5 min, PBS 冲洗, 苏木素复染, 1% 盐酸甲醇溶液中分化 5 s, 二甲苯浸 3 次后加中性树脂和盖玻片, 光镜下观察拍照^[16]。

切片 (5 μ m), 95% 乙醇固定 3 min, 水洗, 核染液染缸内染色 3~5 min, 水洗, 浸入分色液 I 中 20 s, 水洗, 浸入分色液 II 中 40 s, 水洗, 浆染液中染色 2 min, 试剂五增色液洗去多余染液, 乙醇脱水后用二甲苯处理, 树脂封固^[14-15], 显微镜下观察。结果见图 7, 可见给药组的肿瘤组织都有不同程度的坏死。微乳组的坏死面积要比对应混悬液组的坏死面积大, 说明灵慧方多组分微乳具有促进肿瘤组织坏死的作用。

2.4.6 肿瘤组织 TUNEL 凋亡原位检测 石蜡切片 5 μ m, 二甲苯脱蜡后乙醇水合, PBS 冲洗, 1% Triton X-100 通透液促渗, PBS 冲洗, 3% H₂O₂ 封闭液处理, PBS 冲洗, 每个样本按滴加 100 μ L 新鲜配置的 Proteinase K 工作液, 37 $^{\circ}$ C 反应 15 min, PBS 冲洗,

结果如图 8 所示, 各给药组的肿瘤细胞都有不同程度的凋亡, 显微镜下观察和计数 TUNEL 凋亡细胞, 结果显示模型组肿瘤细胞几乎没有凋亡, 多组分微乳几乎表现出与阳性组同样明显的细胞凋亡, 且程度明显大于混悬液组, 表明灵慧方多组分微乳可以促进肿瘤细胞凋亡, 且促凋亡效果显著优于混悬液。

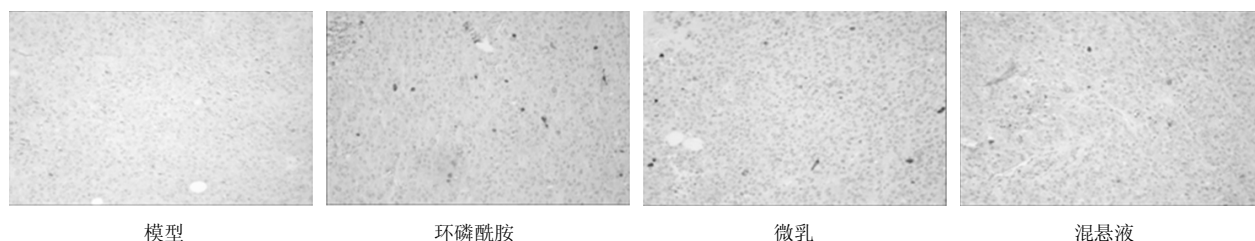


图 8 各组荷瘤小鼠肿瘤组织的 TUNEL 凋亡检测结果

Fig. 8 TUNEL apoptosis detection of tumor tissues of tumor-bearing mice in each group

3 讨论

一些中药组分常常表现为水溶性较差和体内生物利用度低,微乳作为一种载药系统,可以提高药物的生物利用度,因此在中药应用上具有广阔的发展空间。本研究引入灵芝多糖和薏苡仁多糖的水溶液作为水相,薏苡仁油为油相,荷载灵芝三萜,其中多糖组分的加入使微乳中所含活性成分更加接近于验方灵薏方汤剂,更能体现中医药多组分、多靶点治疗的优势。

体内抗肺癌实验发现,多组分微乳具有较好的抗肺癌活性。微乳组与混悬液组相比,抑瘤率显著升高,肿瘤病理组织切片和 TUNEL 凋亡检测也表明灵薏方多组分微乳更能促进肿瘤组织坏死与肿瘤细胞凋亡,可能是因为微乳可以增加难溶性成分薏苡仁油和灵芝三萜的溶解和吸收,且微乳具有良好的生物相容性与跨膜能力,可以作为载体协助药物跨过细胞膜,到达靶点,从而提高药效。

此外增强机体免疫功能是一项重要的抗肿瘤机制,本研究中发现微乳组和混悬液组可以显著提高肝指数、脾指数和胸腺指数以及血浆中 TNF- α 和 IL-6 浓度,且微乳组优于混悬液组,表明灵薏方多组分微乳和其混悬液均具有较好的免疫调节能力,微乳组功效显著高于混悬液组,提示微乳与混悬液相比更能提高机体免疫能力,调控免疫器官分泌细胞因子,从而发挥抗肿瘤作用。

参考文献

- [1] 温晓蓉. 薏苡仁化学成分及抗肿瘤活性研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(3): 135-138.
- [2] 刘思好. 灵芝化学成分的研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2007.
- [3] 王刚, 韩法元, 傅经国, 等. 药用微乳的研究现状与发展趋势 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2004, 3(5): 1302-1306.
- [4] Dey T K, Ghosh S, Ghosh M, *et al.* Comparative study of gastrointestinal absorption of EPA & DHA rich fish oil from nano and conventional emulsion formulation in rats [J]. *Food Res Inter*, 2012, 49(1): 72-79.
- [5] 傅春升, 李洪松, 张学顺. 苦参碱固体自微乳制剂的制备及其评价 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(4): 511-514.
- [6] 潘玉, 李成森, 郭晏华, 等. 苦参碱口服微乳的制备及含量测定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2011, 28(3): 176-181.
- [7] 刘璇, 张振海, 陈彦, 等. 秋水仙碱微乳的制备及体外经皮渗透研究 [J]. 中草药, 2011, 42(10): 1963-1967.
- [8] 王春, 魏伟, 杨昭毅. 芍药苷微乳溶液在大鼠在体肠的吸收动力学研究 [J]. 中国药理学通报, 2009, 25(2): 181-185.
- [9] 轩肖玉, 王亚静, 张伟玲, 等. 芒果苷自微乳给药系统的制备及其大鼠体内药动学研究 [J]. 药物评价研究, 2013, 36(3): 166-170.
- [10] Qu D, He J J, Liu C Y, *et al.* Triterpene-loaded microemulsion using Coix lacryma-jobi seed extract as oil phase for enhanced antitumor efficacy: preparation and *in vivo* evaluation [J]. *Int J Nanomed*, 2014, 9: 109-119.
- [11] 贺俊杰, 陈彦, 杜萌, 等. 灵芝多组分微乳一步制备方法的探索 [J]. 药学报, 2013, 48(3): 441-446.
- [12] Dou J, Wang Y F, Wang J, *et al.* Antitumor efficacy induced by human ovarian cancer cells secreting IL-21 alone or combination with GM-CSF cytokines in nude mice model [J]. *Immunobiology*, 2009, 214(6): 483-492.
- [13] 范明明, 周光华, 苏加利, 等. 山仙颗粒对 Lewis 肺癌瘤株转染中 TNF- α 和 uPA 的影响 [J]. 实用癌症杂志, 2008, 23(5): 445-447.
- [14] 陈顺平, 朱育连, 郑云, 等. HE 染色常规石蜡病理组织切片烘烤温度与时间关系的探讨 [J]. 诊断病理学杂志, 2013, 20(2): 120.
- [15] 唐从国, 郭周庆. 如何做好一张 HE 染色切片 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2012, 21(4): 428-429.
- [16] 董小莉, 谭宁, 符永恒, 等. TUNEL 法原位检测心肌细胞凋亡的改进 [J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(5): 1038-1040.