

“药辅合一”茶多酚-蜂毒肽纳米复合物的制备及抗肿瘤研究

方 栋^{1,2,3}, 张 蕾^{1,2,3}, 孙 娟¹, 吴文瀚¹, 乔宏志^{1,2,3*}, 狄留庆^{1,2,3*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 江苏省中药高效给药系统工程技术研究中心, 江苏 南京 210023

3. 南京市中药微丸产业化工程技术研究中心, 江苏 南京 210023

摘要: **目的** 制备具有协同抗肿瘤作用的茶多酚-蜂毒肽纳米复合物 (EMN), 并考察其抗肿瘤活性。**方法** 通过拜耳反应合成了多聚表没食子儿茶素没食子酸酯 (polyEGCG), ¹H-NMR 和 MS 表征其结构和相对分子质量。通过正交试验优化 EMN 的制备工艺, 并考察在不同 pH 值条件下蜂毒肽 (Mel) 的体外释放。通过流式细胞仪比较异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的 Mel 和 EMN 的细胞摄取情况。MTT 法考察 polyEGCG 和 Mel 在 B16F10 和 A549 细胞的协同抗肿瘤效应。**结果** 合成的 polyEGCG 用 ¹H-NMR 和 MS 确证了结构, 正交试验优化的 EMN 最佳制备工艺为将 0.5 mg/mL polyEGCG 溶液逐滴加入到 1 mg/mL 等体积的 Mel 溶液中, 边滴加边搅拌, 室温孵育 30 min, 即得。体外释放实验表明 EMN 释放具有酸响应性。摄取实验表明 Mel 和 EMN 均能被肿瘤细胞摄取, 摄取量相当。MTT 实验结果表明, polyEGCG 和 Mel 联合使用的协同系数 (CI) 小于 1.0, 具有协同抗肿瘤效果。**结论** 采用自组装的方式制备 EMN, 工艺简单, 粒径适宜, 且具有协同抗肿瘤的效果, 值得深入研究。

关键词: 药辅合一; 蜂毒肽; 茶多酚; 纳米复合物; 表没食子儿茶素没食子酸酯; 体外释放; 细胞摄取; 抗肿瘤; 协同效应; 正交试验; MTT 法; 自组装

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2017)16-3300-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.16.006

Research on “unification of medicines and excipients” nanosystem comprising tea polyphenol and melittin for antitumor therapy

FANG Dong^{1,2,3}, ZHANG Lei^{1,2,3}, SUN Juan¹, WU Wen-han¹, QIAO Hong-zhi^{1,2,3}, DI Liu-qing^{1,2,3}

1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Engineering Research Center for Efficient Delivery System of TCM, Nanjing 210023, China

3. Nanjing Engineering and Technology Research Center for TCM Pellets, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To prepare nanocomplex comprising tea polyphenol and melittin (EMN) with synergistic effect for antitumor therapy. **Methods** Poly-epigallocatechin gallate (polyEGCG) was synthesized by Bayer reaction and characterized by ¹H-NMR and MS spectra. The preparation process of EMN was optimized by orthogonal test, and the *in vitro* release of EMN was conducted at different medium with different pH. The cell uptake of FITC-labeled Mel and EMN was measured by flow cytometry. The synergistic antitumor effect of polyEGCG and Mel was investigated using B16F10 and A549 cells by MTT assay. **Results** The structure of polyEGCG was confirmed by ¹H-NMR and MS. The optimized preparation process of EMN was as follows: 0.5 mg/mL polyEGCG solution was added dropwise to 1 mg/mL equal volume of Mel solution, and then incubated at room temperature for 30 min. *In vitro* release studies showed that acidic environment could accelerate the release of Mel. Cell uptake experiments showed that the cell uptake of Mel and EMN was comparable. MTT assay results showed the combination index (CI) of polyEGCG and Mel was less than 1, which intimated the synergistic effect when combined therapy with polyEGCG and Mel. **Conclusion** EMN was prepared

收稿日期: 2017-07-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81503259); 江苏省自然科学基金资助项目 (BK20151002); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PPZY2015A070); 江苏省研究生创新工程项目; 南京中医药大学大学生创新创业项目

作者简介: 方 栋 (1991—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药新剂型与新技术。Tel: (025)85811230 E-mail: fdly123@163.com

*通信作者 乔宏志, 博士, 讲师。Tel: 15151855306 E-mail: cpu_qhzh@126.com

狄留庆, 教授, 博士生导师。Tel: (025)85811230 E-mail: diliuqing@hotmail.com

by a self-assembly method, which has a simple preparation process, a suitable particle size, and synergistic antitumor effect, and it is worthy of further studies.

Key words: unification of medicines and excipients; melittin; tea polyphenols; nanocomplex; epigallocatechin gallate; *in vitro* release; cell uptake; antitumor; synergistic effect; orthogonal test; MTT assay; self-assembly

肿瘤是世界上最难治愈的疾病之一。近几年,我国每年有 400 万左右的新发肿瘤病例和 300 万左右的癌症死亡病例^[1],肿瘤已经严重威胁到了人类健康,实现癌症的高效治疗,提高患者的治愈率和生存率仍然是癌症研究领域的热点问题。在目前癌症的治疗中,化疗占据至关重要的地位,然而化疗产生的毒副作用以及多次给药后出现的多药耐药性(MDR),往往使肿瘤的临床治疗效果欠佳^[2-4]。近年来,很多研究报道了中药在肿瘤治疗中的独特优势^[5],如降低毒副作用、逆转多药耐药^[6-7]等,在肿瘤治疗的传统经方中多用动物药,如全蝎、蜂毒、乌蛇、蜈蚣等,这些动物药具有钻透剔邪、搜风通络的功效,现代药理实验证实了这些动物药的抗肿瘤活性成分多为多肽,从中药多肽中筛选出具有抗肿瘤活性的成分,同时能逆转肿瘤的MDR,是研发抗肿瘤药物的热点方向之一。然而,这些中药毒肽具有较强的毒性^[8],其抗原性可能会导致过敏反应。此外,多肽类药物在体内稳定性较差,易被酶降解,在某些生理环境下常发生聚集沉淀^[9-10]。因此,开发适宜的递药系统以增加中药多肽药物在体内的稳定性,延长体内半衰期,同时提高药物肿瘤分布的选择性,减小毒副作用,是解决目前肿瘤治疗困境的重要途径之一。本研究以具有抗肿瘤作用的蜂毒肽(melittin, Mel)为模型药物,构建茶多酚-蜂毒肽纳米复合物(EMN),以期发挥减毒增效的治疗效果,为开发中药毒肽类药物的临床价值提供思路和方法。

Mel 是蜂毒的主要有效成分,是由 26 个氨基酸组成的阳离子多肽^[11],其氨基酸序列为 NH₂-Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-COOH,相对分子质量(M_r) 2 840,靠近 N 端的前 20 个氨基酸是疏水性的,靠近 C 端的后 6 个氨基酸是亲水性的,因此具有两亲性^[12]。Mel 易溶于甲醇,极易溶于水(>250 mg/mL),在中性水溶液中,低浓度的 Mel 以单体的形式存在,主要构象为无规则卷曲,随着 pH 值和浓度的提高, Mel 会自我交联,形成 α -螺旋的四聚体结构^[13]。Mel 具有抗炎、抗肿瘤、抗菌、抗艾滋病等多种药理活性^[14]。

Mel 被报道与某些化疗药合用具有协同抗肿瘤的效应,能有效地治疗已经产生多药耐药的癌症。Wang 等^[15]研究报道了 Mel 能够增加 HCC 细胞对肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)的敏感性,证实了 TRAIL 与 Mel 的合用可以有效治疗对 TRAIL 耐药的人类癌症。王瑞平等^[16]报道了 Mel 与 5-氟尿嘧啶(5-Fu)、顺铂(DDP)和多西他赛(TXT)合用对人胃癌细胞的协同作用。然而, Mel 因其具有溶血毒性强、分布特异性差、易代谢降解等缺点,极大地限制了其在临床中的应用。

茶多酚是茶叶的主要活性成分,其中量最多的是表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin-3-gallate, EGCG)。EGCG 具有多重药理活性,可通过上调抑癌基因 p53 的表达,抑制 PI3k/Akt 通路的活化,诱导肿瘤细胞凋亡^[17]。EGCG 还可通过抑制促肿瘤血管生长因子,如转化生长因子- β (TGF- β)、血管内皮生长因子(VEGF)的活性,减少肿瘤外周血管和纤维成分,改善纳米粒的迁移能力^[18-20]。研究表明,EGCG 具有很强的蛋白亲和力。如酪蛋白与 EGCG 结合可提高 EGCG 的稳定性,控制 EGCG 的缓慢释放^[21]。本课题组前期的研究也证实,儿茶酚残基可以通过氢键、疏水作用以及配位键等非共价作用与多种化合物或生物表面结合形成稳定的超分子^[22]。多酚成分在自然状态下可自发转变为聚合态形式,其稳定性优于单体,且易被水解酶降解而不会对正常组织产生毒性^[23]。这提示可以使用多聚 EGCG(polyEGCG)作为药源性载体负载 Mel。本课题组前期对药源性功能载体的制备和开发进行了一些研究,证明这类载体不仅可以解决“无效”载体的安全性问题,而且其自身功能也可助力其他活性物质增效减毒^[24],这符合中药制剂“药辅合一”的传统理念^[25]。因此,本实验将药性温和、安全、可生物降解的 polyEGCG 作为载体,与 Mel 进行组装,完成“药辅合一”体系的构建。因溶血活性端的可逆性络合,降低了 Mel 的毒副作用^[19],同时减少了“无效”载体的使用,解决了药物及载体二者潜在的安全性问题。

1 仪器与材料

BT25S 型十万分之一天平,德国 Sartorius 公司;

DF-10SA-H 磁力搅拌器, 南京科尔仪器设备有限公司; Nano ZS90 激光粒度仪, 英国 Malvern 公司; H7650 透射电镜, 日本 Hitachi 公司; 2998 型高效液相色谱系统, 美国 Waters 公司; MCO-15AC 细胞培养箱, 日本 Sanyo 公司; C6 流式细胞仪, 美国 BD 公司; ELX800 酶标仪, 美国 BioTek 公司。

EGCG, 批号 645700241, 质量分数 >98%, 大连美仑生物技术有限公司; 40% 乙醛、二甲基亚砜 (DMSO), 分析纯, 上海凌峰化学试剂有限公司; 冰醋酸, 分析纯, 南京化学试剂有限公司; 透析袋, 截留 M_r 为 1 000, 上海绿鸟科技发展有限公司; 高纯氮, 纯度大于 99.999%, 江苏天宏有限公司; 氙代二甲基亚砜 (质量分数 >99.9%)、三氟乙酸 (质量分数 >99.5%)、异硫氰酸荧光素 (FITC, 质量分数 >90%), 阿拉丁试剂有限公司; MeI, 批号 201505001, 质量分数 >98%, 上海吉尔生化有限公司; 噻唑蓝 (MTT), 质量分数 >98%, 南京生兴生物有限公司; DMEM 培养基、PBS、0.25% 胰酶、双抗 (10 000 IU 盘尼西林, 10.000 mg/mL 链霉素) 均为 HyClone 产品, 胎牛血清为 Gibco 产品。

小鼠黑色素瘤 B16F10 细胞株和人肺腺癌 A549 细胞株, 均购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

2 方法与结果

2.1 polyEGCG 的合成与表征

polyEGCG 的合成反应见图 1, 称取 1.0 g EGCG 溶解于 15 mL 乙酸、45 mL 水和 6 mL DMSO 的混合溶液中, 加入 7.2 mL 40% 乙醛, 调节 pH 值至 2, 在 20 °C 氮气保护下反应 12 h, 产物用截留 M_r 1 000 的透析袋透析, 冻干, 产率为 93.25%。产物经 $^1\text{H-NMR}$ 和 MS 进行结构确证。

产物的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱见图 2, 结果表明 EGCG 的 A 环上的 6 位和 8 位质子峰 (δ 5.8 左右) 消失, EGCG 单体没有甲基氢, 而 polyEGCG 的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱上在 δ 1.3~1.8 位置产生甲基和亚甲基质子峰, 证明了 $\text{CH}_3\text{-CH}$ 桥连在 EGCG 的 A 环 6 位或 8 位上, 形成 polyEGCG 聚合物, 其具体连接方式可能为 $\text{C}_6\text{-C}_6$ 、 $\text{C}_6\text{-C}_8$ 或 $\text{C}_8\text{-C}_8$ 位连接。polyEGCG 的 MS 结果表明最高聚合态为 EGCG 六聚物, M_r 为 2 906, 证实了 EGCG 聚合反应的发生。

2.2 polyEGCG 与 MeI 的复合工艺筛选

MeI 是一种两亲性的多肽, 其粒径用粒径仪未检测出, 利用正交设计实验优化 MeI 与 polyEGCG 复合的条件, 以 EMN 的平均粒径为考察指标, 考察 MeI 与 polyEGCG 复合比例 (质量比, A)、pH 值 (B) 和复合温度 (C) 对 EMN 平均粒径的影响。

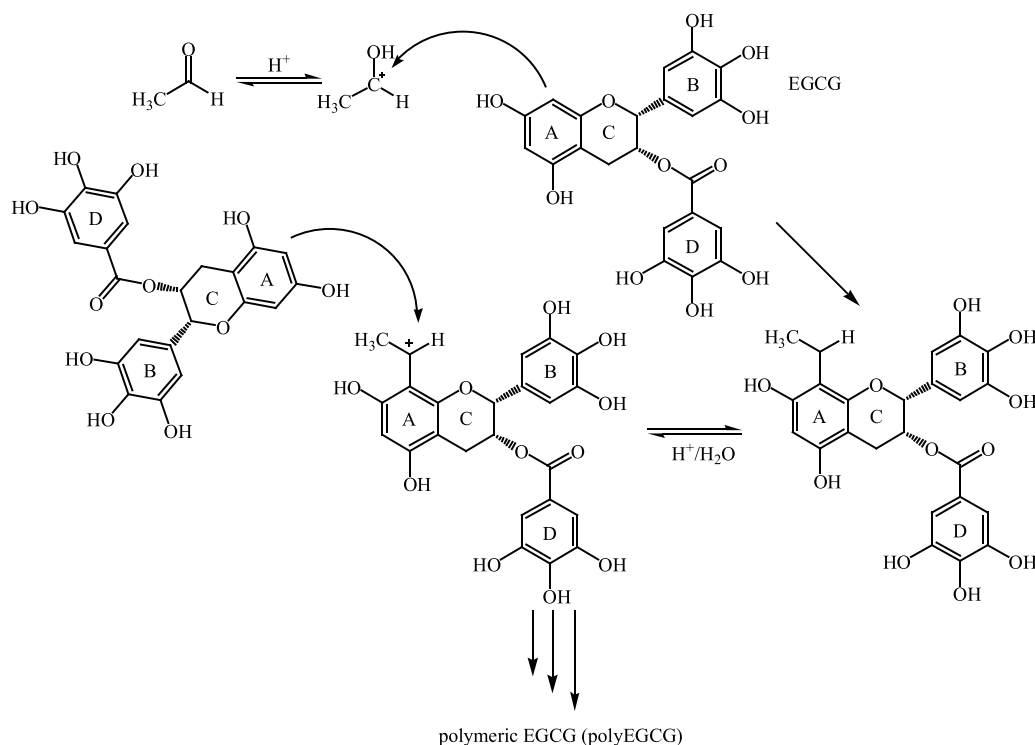


图1 polyEGCG 的合成示意图

Fig. 1 Synthesis of polyEGCG

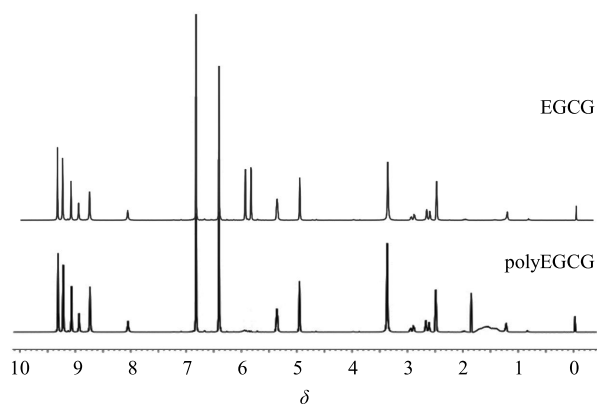


图 2 EGCG 和 polyEGCG 的 ^1H -NMR 图谱
Fig. 2 ^1H -NMR spectrum of EGCG and polyEGCG

称取 Mel 和 polyEGCG 溶于 pH 值 4.5、6.5、7.4 的缓冲体系中, 在质量浓度为 1.0 mg/mL 的 Mel 溶液中逐滴加入等体积不同质量浓度的 polyEGCG (0.1、0.5、1.0 mg/mL) 溶液, 在 25、37、60 $^{\circ}\text{C}$ 的温度下孵育 30 min, 马尔文激光粒度仪测定 EMN 的平均粒径和多分散系数 (PDI), 用软件正交设计助手 (IIV3.1) 对结果进行分析。结果见表 1、2。由表 1 可知, 以平均粒径为 EMN 制备工艺评价指标, 3 个因素对制备工艺的影响顺序为 Mel 与 polyEGCG 复合比例 > 复合温度 > pH 值。

由表 2 中正交试验方差分析结果可知, Mel 与 polyEGCG 复合比例和复合温度对 EMN 粒径具有

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果分析

Table 1 Results of orthogonal experimental design

试验号	A	B	C/ $^{\circ}\text{C}$	D (空白)	平均粒径/nm	PDI
1	1 : 1 (1)	4.5 (1)	25 (1)	(1)	256.5 $\pm$ 4.1	0.375 $\pm$ 0.017
2	1 : 1	6.5 (2)	37 (2)	(2)	267.0 $\pm$ 3.7	0.347 $\pm$ 0.007
3	1 : 1	7.4 (3)	60 (3)	(3)	371.6 $\pm$ 6.6	0.464 $\pm$ 0.006
4	2 : 1 (2)	4.5	37	(3)	129.3 $\pm$ 2.2	0.236 $\pm$ 0.005
5	2 : 1	6.5	60	(1)	208.6 $\pm$ 2.8	0.247 $\pm$ 0.014
6	2 : 1	7.4	25	(2)	124.6 $\pm$ 3.4	0.211 $\pm$ 0.017
7	10 : 1 (3)	4.5	60	(2)	194.8 $\pm$ 6.4	0.204 $\pm$ 0.024
8	10 : 1	6.5	25	(3)	124.0 $\pm$ 2.4	0.206 $\pm$ 0.010
9	10 : 1	7.5	37	(1)	133.8 $\pm$ 2.1	0.196 $\pm$ 0.019
K_1	895.1	580.6	505.1	598.9		
K_2	462.5	599.6	530.1	586.4		
K_3	452.6	630.0	775.0	624.9		
R	442.5	49.4	269.9	38.5		

表 2 正交试验方差分析

Table 2 Variance analysis of orthogonal test

误差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	42 560.780 0	2	165.498 8	$P < 0.01$
B	413.946 7	2	1.609 6	
C	14 827.446 7	2	57.657 0	$P < 0.05$
D (误差)	257.166 7	2		

$$F_{0.05}(2, 2) = 19.00 \quad F_{0.01}(2, 2) = 99.00$$

显著影响 ($P < 0.05$), 而体系的 pH 值对 EMN 平均粒径几乎没有影响。

由图 3 可知, Mel 质量浓度保持不变时 (1.0 mg/mL), 随着加入 polyEGCG 的量增加, EMN 的平均粒径先保持不变而后增加, 过量的 polyEGCG 可能会导致 EMN 的聚集。在 25 $^{\circ}\text{C}$ 和 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育温

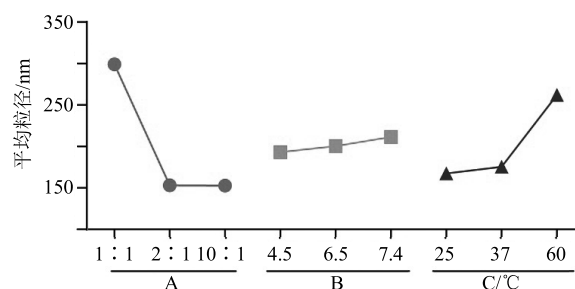


图 3 正交试验的效应曲线图

Fig. 3 Effect of each factor on size in orthogonal experimental design

度下, EMN 的平均粒径几乎不变, 当温度升高至 60 $^{\circ}\text{C}$ 时, 平均粒径显著增大。在 3 种 pH 值条件下复合, 平均粒径没有显著性变化。基于上述结果, EMN 的制备工艺拟定为在 1.0 mg/mL Mel 水溶液中

逐滴加入等体积 0.5 mg/mL polyEGCG 水溶液, 边滴加边搅拌, 室温孵育 30 min。

按上述工艺制备的 EMN 粒径分布和透射电子显微镜 (TEM) 图见图 4 和图 5, 在该比例下, EMN 为类球形, 平均粒径为 (127.67 ± 5.17) nm, PDI 为 0.24 ± 0.04 , 表面电荷为 (25.4 ± 1.8) mV, 所制备的 EMN 粒径较优, 粒径分布均一。

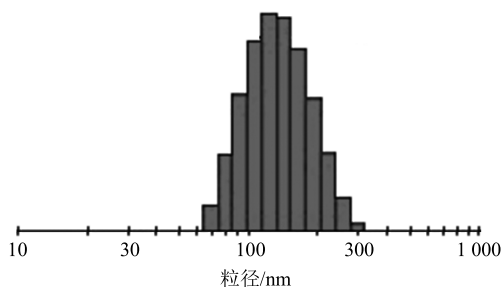


图4 EMN 的粒径 (polyEGCG-Mel 1:2)

Fig. 4 Size of EMN (polyEGCG-Mel 1:2)

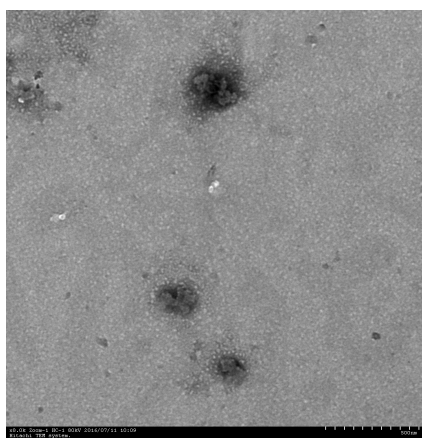


图5 EMN 的形态 (polyEGCG-Mel 1:2)

Fig. 5 Morphology of EMN (polyEGCG-Mel 1:2)

2.3 体外释放实验研究

2.3.1 色谱条件 色谱柱为汉邦 C_{18} 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-0.2%三氟乙酸水 (44.5:55.5); 体积流量为 1 mL/min; 柱温 25 $^{\circ}$ C; 检测波长 220 nm; 进样量 20 μ L; 理论塔板数以 Mel 计不低于 3 000。

2.3.2 线性关系考察 精密称取 12.59 mg Mel 置于量瓶中, 加水定容到 10 mL, 精密取 1 mL 于 10 mL 量瓶中, 将 Mel 稀释到 125 μ g/mL 作为母液, 分别移取 0.02、0.04、0.08、0.20、0.40、1.00 mL 母液于 10 mL 量瓶中, 加水定容, 配得 0.25、0.50、1.00、2.50、5.00、12.50 μ g/mL 对照品溶液, 液相进样测定。将峰面积 (Y) 对质量浓度 (X) 进行线性回归, 得回归曲线 $Y=406\,337X+81\,486$, $r=0.999\,7$, 结

果表明 Mel 在 0.25~12.50 μ g/mL 线性关系良好。

2.3.3 EMN 的体外释放实验 取 2 mL EMN 溶液装入截留 M_r 25 000 透析袋中, 浸没于 18 mL pH 4.5、6.5、7.4 的缓冲液中, 放入 (37.0 ± 0.5) $^{\circ}$ C 的气浴摇床中, 摇床转速为 600 r/min。分别于 0.25、0.5、1、2、4、6、8、12、24 h 取 0.2 mL 释放介质, 同时补充 0.2 mL 新鲜介质。样品进液相测定 Mel 量, 平行 3 份。结果见图 6, 在 pH 7.4 的缓冲体系中, EMN 释放缓慢, 24 h 的累积释放量不足 10%, EMN 可在中性生理环境下保持稳定; 在 pH 6.5 条件下, 24 h 的累积释放量为 (23.40 ± 2.87) %, 比中性环境下略有增加; 而在 pH 4.5 的环境下, EMN 的释放明显加快, 24 h 的累积释放量增加至 (49.27 ± 5.36) %, 说明酸性环境能加速 Mel 的释放。

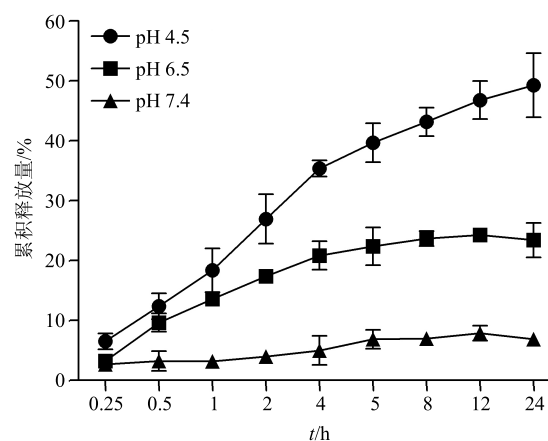


图6 EMN 在 pH 4.5、6.5 和 7.4 缓冲体系中的释放曲线

Fig. 6 Release behavior of EMN in pH 4.5, 6.5, and 7.4 buffer solutions

2.4 细胞摄取实验

取对数生长长期的小鼠黑色素瘤细胞 B16F10 细胞, 以每孔 1 mL 1×10^5 的细胞密度接种于 12 孔细胞培养板, 细胞培养箱中培养 24 h, 待细胞贴壁生长后, 小心移去细胞培养基, 加入 1 mL 含 FITC 标记的 Mel、EMN 的培养基 (FITC 标记的 Mel 终质量浓度均为 5 μ g/mL), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1、2、4、6 h, 或加入含 FITC 标记的 Mel 终质量浓度为 1.0、2.5、5.0、7.5 μ g/mL 的 Mel、EMN 的培养基, 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h。弃去药物, 加 1 mL 预冷的 PBS 洗 2 次, 加胰酶 0.4 mL 消化, 加 1 mL 完全培养基终止消化, 将细胞收集到 2 mL 离心管中, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃去培养基, 加 0.5 mL 预冷的 PBS 重悬细胞, 用尼龙膜滤过, 流式细胞仪测定。结果见表 3、4, B16F10 细胞对 Mel 和 EMN 的细胞摄取量均随着质

表 3 荧光强度与 Mel 质量浓度的关系

Table 3 Relationship between fluorescence intensity and concentrations of Mel

质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	荧光强度	
	Mel	EMN
1.0	16 039.885 $\pm$ 1 402.24	16 810.200 $\pm$ 3 298.16
2.5	38 432.430 $\pm$ 4 254.87	36 091.900 $\pm$ 6 592.68
5.0	58 840.795 $\pm$ 2 447.75	60 136.215 $\pm$ 6 891.44
7.5	70 150.600 $\pm$ 3 819.83	72 508.970 $\pm$ 1 944.54

表 4 荧光强度与孵育时间的关系

Table 4 Relationship between fluorescence intensity and incubation time

时间/h	荧光强度	
	Mel	EMN
1	16 031.240 $\pm$ 1 682.90	15 047.730 $\pm$ 2 536.55
2	29 322.270 $\pm$ 3 942.79	29 666.370 $\pm$ 2 156.71
4	53 840.795 $\pm$ 4 643.32	55 636.215 $\pm$ 527.48
6	68 115.830 $\pm$ 6 628.83	67 520.715 $\pm$ 2 297.62

量浓度和时间的增加而增加, 呈现质量浓度和时间的依赖性, EMN 的细胞摄取量与游离 Mel 的细胞摄取量相当。

2.5 细胞毒性实验

为了考察 EMN 对肿瘤细胞的抑制作用, 本实验选择了 2 种不同来源的肿瘤细胞: 小鼠黑色素瘤 B16F10 细胞和人肺腺癌 A549 细胞。以 1×10^4 /孔的细胞密度接种在 96 孔板上, 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 12 h, 移去培养基, 加入含不同质量浓度 Mel、polyEGCG 和 EMN 的不完全培养基 200 μL (EMN 中 polyEGCG 与 Mel 质量比为 1:2, Mel 质量浓度为 0.05、0.10、1.00、5.00、10.00、25.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$, polyEGCG 质量浓度为 0.025、0.050、0.500、2.500、5.000、12.500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h, 移去培养基, 加 200 μL PBS 清洗 1 次, 加含 MTT 的不完全培养基 200 μL , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h, 移去溶液, 加 150 μL DMSO, 摇床摇匀, 酶标仪 570 nm 测定吸光度 (A) 值。结果见图 7, EMN 对 B16F10 和 A549 2 种细胞均有明显的抑制作用。EMN 对 2 种细胞的半数致死质量浓度分别为 Mel 1.950 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、polyEGCG 0.975 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (B16F10) 和 Mel 2.981 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、polyEGCG 1.490 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (A549), 均小于 Mel 的 3.785 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (B16F10)、6.808 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (A549) 和 polyEGCG 的 42.432 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (B16F10)、29.922 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (A549), 表现出更优的

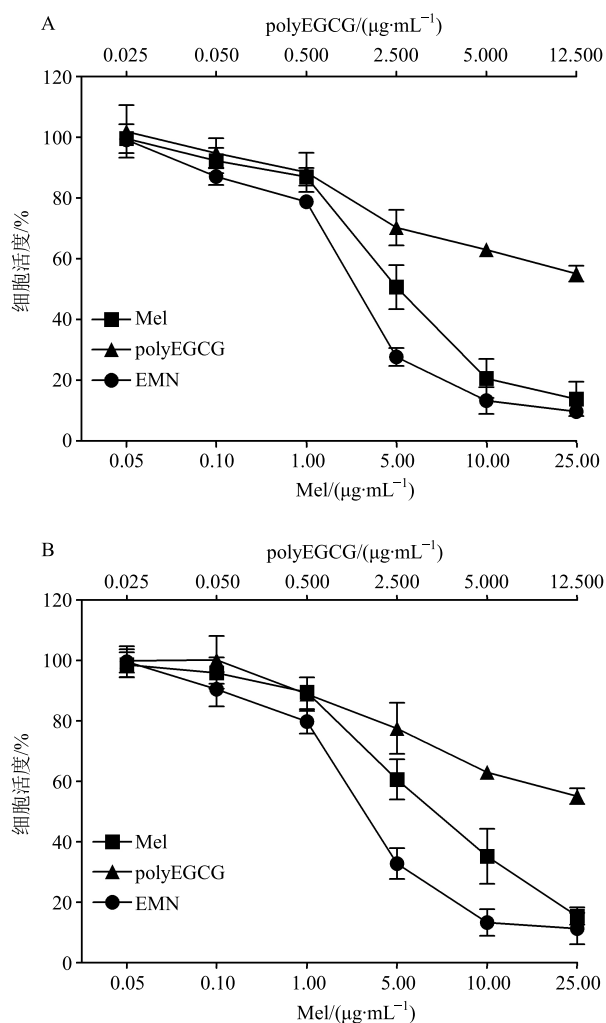


图 7 Mel、polyEGCG 和 EMN 对 B16F10 细胞 (A) 和 A549 细胞 (B) 的细胞毒性

Fig. 7 Cytotoxicity of Mel, polyEGCG, and EMN on B16F10 cells (A) and A549 cells (B)

抗肿瘤增殖活性。

通过协同系数 (CI) ^[26] 评价 Mel 和 polyEGCG 的联合治疗效果, $CI=D_1/Dx_1+D_2/Dx_2$, 其中 D_1 和 D_2 分别是联合使用时达到 Fa 抑制率时 Mel 和 polyEGCG 的质量浓度, Dx_1 和 Dx_2 分别是 Mel 和 polyEGCG 单独使用达到 Fa 抑制率时的质量浓度。当 $CI=1.0$ 时, 表示加合效应; $CI<1.0$, 代表协同作用; $CI>1.0$, 则是拮抗作用^[27]。

用 SPSS 软件拟合 Mel、polyEGCG 和 EMN 对 B16F10 和 A549 细胞达到不同 Fa 抑制率时的药物质量浓度, 使用公式计算 Fa 抑制率对应的协同系数 CI 值, Fa 抑制率在 CI 值 0.2~0.8 可用于评价药物的协同效应^[28], 由图 8 可知, 当 Fa 在 0.2~0.8 时, 对应的 CI 值均小于 1.0, 证明 Mel 与 polyEGCG 合

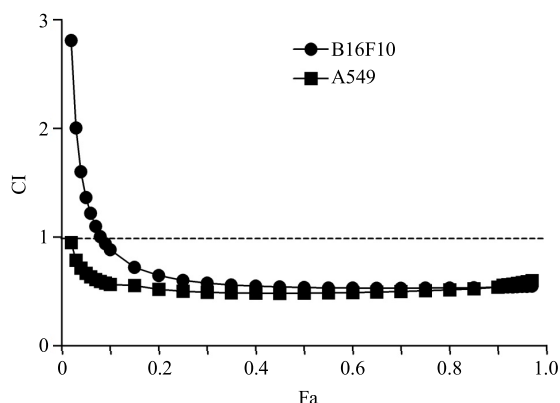


图8 EMN在B16F10细胞和A549细胞中的CI与Fa的相应关系

Fig. 8 Corresponding CI vs Fa plots of EMN on B16F10 cells and A549 cells

用发挥协同抗肿瘤作用。

3 讨论

中药毒肽具有明确的抗肿瘤效果，然而其对细胞毒性的选择性差，直接使用常会带来严重的毒副作用；中药毒肽属于外源性生物制品，具有一定的免疫原性，易导致过敏反应；多肽类药物在体内稳定性较差，易被酶降解，在某些生理环境下可发生聚集沉淀而失效；多肽药物在血液中半衰期较短，iv后短时间内就被清除或降解，为了达到药效剂量，常需要频繁给药，给病人带来诸多的不便。为了解决毒肽药物的上述成药性问题，开发安全、高效的递药系统，本课题选用Mel作为模型药物，并利用polyEGCG的多肽识别作用，复合制备了EMN。正交试验考察了复合比例、pH值和复合温度对EMN平均粒径的影响，优化了工艺条件。制备的EMN为类球形，分布均一。体外释放实验表明EMN在中性生理环境下，Mel释放量较少(<10%)，而在酸性环境下(如肿瘤微环境或溶酶体环境)，Mel加速释放。这有利于提高Mel的安全性和肿瘤区域的定位释放效果。体外细胞毒性实验研究了Mel与polyEGCG合用的抗肿瘤效果，证明EMN对多种肿瘤均有明显的抑制作用，二药联用可发挥协同效应。上述结果表明，本课题构建的“药辅合一”EMN，充分利用了二者结构和功能的互补性，既减少了无效载体的应用，又实现了联合用药协同增效的目的，对中药毒肽类活性成分新制剂的开发和临床应用具有较好的借鉴意义。

参考文献

[1] Chen W, Zheng R, Baade P D, *et al.* Cancer statistics in

China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.

[2] 郑礼胜, 崔艳丽, 金玉洁, 等. 非小细胞肺癌 EGFR-T790M 突变药物的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2017, 32(7): 1381-1387.

[3] Liu J, Li Q, Zhang J, *et al.* Safe and effective reversal of cancer multidrug resistance using sericin-coated mesoporous silica nanoparticles for lysosome-targeting delivery in mice [J]. *Small*, 2017, 13(9): 160-174.

[4] 陈洪, 陈婉清, 阙慧卿, 等. 鼻咽癌的治疗药物研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2017, 32(4): 747-751.

[5] 杜颖青. 浅议中药逆转剂在肿瘤多药耐药性的优势 [J]. *生物技术世界*, 2014, 8: 81.

[6] 刘海晔. 中药逆转肿瘤多药耐药性的研究进展 [J]. *中草药*, 2015, 46(7): 1096-1102.

[7] 汤涛, 董伟, 张婧, 等. 中药单体成分逆转肿瘤多药耐药的研究进展 [J]. *中草药*, 2017, 48(4): 792-797.

[8] Jain D, Kumar S. Snake venom: A potent anticancer agent [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(10): 4855-4860.

[9] 方宏清. 多肽类药物制剂研究现状 [J]. *药学进展*, 1998, 22(1): 18-23.

[10] 姚金凤, 白露, 宋亚芳. 多肽类药物代谢研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2013, 29(7): 895-899.

[11] Woo S Y, Lee H. Aggregation and insertion of melittin and its analogue MelP5 into lipid bilayers at different concentrations: effects on pore size, bilayer thickness and dynamics [J]. *Phys Chem Chem Phys*, 2017, 19(10): 7195-7203.

[12] Fan Q, Hu Y, Pang H, *et al.* Melittin protein inhibits the proliferation of MG63 cells by activating inositol-requiring protein-1 α and X-box binding protein 1-mediated apoptosis [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(4): 1365-1370.

[13] Raghuraman H, Chattopadhyay A. Melittin: a membrane-active peptide with diverse functions [J]. *Bioscience Rep*, 2007, 27(4): 189-223.

[14] Kong G M, Tao W H, Diao Y L, *et al.* Melittin induces human gastric cancer cell apoptosis via activation of mitochondrial pathway [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(11): 3186-3195.

[15] Wang C, Chen T Y, Zhang N, *et al.* Melittin, a major component of bee venom, sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by activating CaMKII-TAK1-JNK/p38 and inhibiting I κ B α kinase-NF κ B [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(6): 3804-3813.

[16] 王瑞平, 黄舒然, 周锦勇, 等. 蜂毒素与化疗药物的协

- 同作用及其可能机制的实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(2): 224-229.
- [17] Park S Y, Jung C H, Song B, *et al.* Pro-apoptotic and migration-suppressing potential of EGCG, and the involvement of AMPK in the p53-mediated modulation of VEGF and MMP-9 expression [J]. *Oncol Lett*, 2013, 6(5): 1346-1350.
- [18] 孙 静, 张小飞, 唐志书, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯壳聚糖纳米粒的制备及其药剂学性质研究 [J]. 中草药, 2016, 47(5): 741-747.
- [19] Li L, Sun J, He Z. Deep penetration of nanoparticulate drug delivery systems into tumors: Challenges and solutions [J]. *Curr Med Chem*, 2013, 20(23): 2881-2891.
- [20] 王苗苗, 韩 杰, 姜海燕. 表没食子儿茶素没食子酸酯对心脑血管缺血再灌注损伤保护作用机制的研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(18): 2732-2736.
- [21] Xue J, Tan C, Zhang X, *et al.* Fabrication of epigallocatechin-3-gallate nanocarrier based on glycosylated casein: Stability and interaction mechanism [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(20): 4677-4684.
- [22] Qiao H, Sun M, Su Z, *et al.* Kidney-specific drug delivery system for renal fibrosis based on coordination-driven assembly of catechol-derived chitosan [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(25): 7157-7171.
- [23] Chung J E, Kurisawa M, Kim Y J, *et al.* Amplification of antioxidant activity of catechin by polycondensation with acetaldehyde [J]. *Biomacromolecules*, 2004, 5(1): 113-118.
- [24] Qiao H, Fang D, Chen J, *et al.* Orally delivered polycurcumin responsive to bacterial reduction for targeted therapy of inflammatory bowel disease [J]. *Drug Deliv*, 2017, 24(1): 233-242.
- [25] 张定堃, 傅超美, 林俊芝, 等. 中药制剂的“药辅合一”及其应用价值 [J]. 中草药, 2017, 48(10): 1920-1929.
- [26] Chou T C, Motzer R J, Tong Y, *et al.* Computerized quantitation of synergism and antagonism of taxol, topotecan, and cisplatin against human teratocarcinoma cell growth: A rational approach to clinical protocol design [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1994, 86(20): 1517-1524.
- [27] Meyer M, Philipp A, Oskuee R, *et al.* Breathing life into polycations: Functionalization with pH-responsive endosomolytic peptides and polyethylene glycol enables siRNA delivery [J]. *J Am Chem Soc*, 2008, 130(11): 3272-3273.
- [28] Han Y, He Z, Schulz A, *et al.* Synergistic combinations of multiple chemotherapeutic agents in high capacity poly (2-oxazoline) micelles [J]. *Mol Pharm*, 2012, 9(8): 2302-2313.