

三七皂苷 R₁-低相对分子质量三七多糖纳米粒的制备及其对 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用

张梦雪¹, 王瑞莹¹, 李楠¹, 吴晨阳¹, 郑婷婷¹, 邹佩志¹, 韩杰¹, 张运¹, 黎迎¹, 郭一飞^{1,2}, 孙桂波^{1,2}, 董政起^{1,2*}

1. 中国医学科学院北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193

2. 中国医学科学院 基于经典名方的新药发现重点实验室, 北京 100193

摘要: 目的 利用水溶性低相对分子质量三七多糖 (low molecular weight *Panax notoginseng* polysaccharide, PNP-L) 作为新型载体制备纳米粒, 实现对三七皂苷 R₁ 的增溶并提高其治疗效果。方法 利用 Sephadex G-100 凝胶对三七多糖 (*Panax notoginseng* polysaccharide, PNP) 分级纯化, 得到相对均质的低相对分子质量三七多糖 (PNP-L)。以 PNP、PNP-L 作为三七皂苷 R₁ 的载体, 采用乳化溶剂挥发法制备三七皂苷 R₁-三七多糖 (R₁-PNP) 纳米粒和三七皂苷 R₁-低相对分子质量三七多糖 (R₁-PNP-L) 纳米粒。测定其载药量及包封率, 探索低相对分子质量多糖作为载体的可行性。采用马尔文粒度分析仪对纳米粒粒径、粒度分布及 Zeta 电位进行测定, 差示扫描量热仪 (DSC) 进行晶型分析, 透射电子显微镜 (TEM) 测定其形态。体外培养人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞, 构建缺氧/复氧模型, 比较三七皂苷 R₁、R₁-PNP-L 物理混合制剂、R₁-PNP-L 纳米粒对神经细胞损伤的保护作用。结果 R₁-PNP-L 纳米粒平均粒径 (139.17±7.22) nm, 多分散指数 (PDI) 为 0.41±0.19, Zeta 电位 (-19.14±3.14) mV, 载药量 28.62%, 包封率 85.85%, 将三七皂苷 R₁ 溶解度提高了 32.30 倍, 并起到缓释作用。R₁-PNP-L 纳米粒对 SH-SY5Y 细胞无明显细胞毒性, 对缺氧/复氧模型诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤的保护效果 R₁-PNP-L 纳米粒>R₁-PNP-L 物理混合制剂>三七皂苷 R₁。结论 PNP-L 可作为三七皂苷 R₁ 的一种良好载体, 形成的纳米粒可有效提高三七皂苷 R₁ 溶解度并对缺氧/复氧模型诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤具有保护作用。

关键词: 三七皂苷 R₁; 三七多糖; 新型载体; 纳米粒; 提高溶解度; SH-SY5Y 细胞; 损伤保护; 乳化溶剂挥发法; 缓释

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2021)10-2918-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.10.008

Preparation of notoginsenoside R₁-low molecular weight *Panax notoginseng* polysaccharide nanoparticles and its protective effect on SH-SY5Y cell injury

ZHANG Meng-xue¹, WANG Rui-ying¹, LI Nan¹, WU Chen-yang¹, ZHENG Ting-ting¹, ZOU Pei-zhi¹, HAN Jie¹, ZHANG Yun¹, LI Ying¹, GUO Yi-fei^{1,2}, SUN Gui-bo^{1,2}, DONG Zheng-qi^{1,2}

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

2. Key Laboratory for New Drug Discovery Based on Classic Prescriptions, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China

Abstract: Objective To increase the solubility of notoginsenoside R₁ and improve the therapeutic effect, hydrophilic low molecular weight *Panax notoginseng* polysaccharide (PNP-L) was used as a new carrier to construct the nanoparticles. **Methods** Sephadex G-100 gel was used to fractionate and purify *P. notoginseng* polysaccharide (PNP) to obtain uniform PNP-L with low molecular weight. Using PNP and PNP-L as the carrier of notoginsenoside R₁, the notoginsenoside R₁-notoginseng polysaccharide nanoparticles (R₁-PNP nanoparticles) and notoginsenoside R₁-notoginseng polysaccharide nanoparticles with low molecular weight (R₁-PNP-L nanoparticles) were prepared by solvent evaporation method. Determining the drug loading and encapsulation efficiency of nanoparticles, and exploring the feasibility of polysaccharides with low molecular weight as carriers. Malvern particle size

收稿日期: 2021-01-14

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项北京协和医学院创新项目(2018PT35030); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2020-I2M-2-011)

作者简介: 张梦雪 (1995—), 女, 蒙古族, 硕士研究生, 研究方向为中药学、生物药剂学。Tel: 18642194769 E-mail: zhangmx@126.com

*通信作者: 董政起, 硕士生导师, 主要从事中药学、生物药剂学研究。E-mail: zqdong@implad.ac.cn

analyzer was used to measure the particle size, poly dispersity index (PDI) and Zeta potential. Differential scanning calorimeter (DSC) was used to analyze the crystalline form of the nanoparticles. Transmission electron microscopy was used to observe the surface morphology. SH-SY5Y nerve cells were cultured *in vitro* and a hypoxia/reoxygenation model was constructed to compare the protection effect of *P. notoginseng* R₁, R₁-PNP-L physical mixture and R₁-PNP-L nanoparticles. **Results** The particle size, PDI, Zeta potential, drug loading and encapsulation efficiency of R₁-PNP-L nanoparticles were (139.17 ± 7.22) nm, 0.41 ± 0.19, (-19.14 ± 3.14) mV, 28.62% and 85.85%, respectively. R₁-PNP-L nanoparticles increased the solubility of notoginsenoside R₁ by 32.30 times and had slow-release effect. R₁-PNP-L nanoparticles had no cytotoxicity to SH-SY5Y cells. Protection effect on SH-SY5Y cell injury induced by hypoxia/reoxygenation model: R₁-PNP-L nanoparticles > R₁-PNP-L physical mixture > notoginsenoside R₁. **Conclusion** PNP-L is a good carrier to deliver notoginsenoside R₁, and the prepared nanoparticles can improve the solubility of notoginsenoside R₁ effectively and increase the protection effect of SH-SY5Y cells after hypoxia and reoxygenation injury.

Key words: notoginsenoside R₁; *Panax notoginseng* polysaccharide; new carrier; nanoparticles; solubilization improving; SH-SY5Y cells; damage protection; emulsion solvent evaporation method; slow release

三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 被称为“中药之最珍贵者”，《中国药典》2020 年版中规定，三七皂苷 R₁ 含量作为判定三七质量的主要指标之一。三七皂苷 R₁ 是三七总皂苷的特征化合物，具有抗炎、改善糖尿病性视网膜病变^[1]、保护心肌细胞^[2]、减轻脑损伤^[3]、促进骨细胞生成^[4]、抗肿瘤^[5]、抑制血管平滑肌细胞增殖^[6]等多重药理作用。在临床用药过程中发现三七皂苷 R₁ 的生物利用度较低，这主要是由于三七皂苷 R₁ 属于生物制药分类系统 (biopharmaceutics classification system, BCS) 分类中 IV 类 (低溶低渗) 药物^[7]，低溶低渗的特性造成三七皂苷 R₁ 在经口服给药后，不易被转运吸收。

纳米给药体系 (nanometer drug delivery system, NDDS) 是纳米级的递送系统，在药物递送过程中具有增溶、缓释、提高生物利用度等优势^[8]。为了提高三七皂苷 R₁ 的口服生物利用度，提高药效。目前有以纳米材料为载体制备三七皂苷 R₁ 纳米给药体系的相关研究，如三七皂苷 R₁-聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA) 纳米微球^[9]、三七皂苷 R₁ 壳聚糖纳米粒^[10]等，证明均可提高三七皂苷 R₁ 的口服生物利用度。在纳米载体的选择上，目前常添加表面活性剂类，如聚山梨酯 80；有机溶剂类，如聚乙二醇^[11]；环糊精^[12]等对难溶药物进行增溶。虽然起到了很好的作用，但此类外源化合物载体可能会引发安全性问题，出现不良反应等^[13-14]。拟在三七自身寻找一种“自源性”成分作为药物载体，在提高三七皂苷 R₁ 溶解度同时增强其治疗效果。

近年来，天然多糖因其生物相容性好、来源广泛、易降解等优势被广泛关注^[15]。提取三七皂苷类成分后的三七药材残渣中常含有水溶性的三七多糖 (*Panax notoginseng* polysaccharide, PNP)，安全、无毒、可降解，官能团众多，水溶性良好且具有一

定黏性。此外 PNP 还具有降血糖^[16]、促进骨细胞生成^[17]、抗氧化^[18]、改善脂质代谢紊乱^[19]、抗肿瘤^[20]、免疫调节^[21]、抗衰老^[22]等药理作用。

基于多糖载体在纳米给药体系中的应用，借鉴同源载体及药物的协同作用，本实验拟通过研究同样源自于三七药材的成分三七多糖，对其进行分级纯化得到低相对分子质量三七多糖 (low molecular weight *Panax notoginseng* polysaccharide, PNP-L) 作为递送三七皂苷 R₁ 的载体，通过乳化溶剂挥发法形成纳米粒，方法简单且未添加其他外源辅料，保证了制剂的安全性。探索 PNP-L 作为三七皂苷 R₁ 载体的优势以及联用后对于缺氧/复氧诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用，使其用于更多心脑血管疾病的治疗。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪，美国 Agilent 公司；岛津 LC-20AD 液相色谱仪，日本岛津公司；Secura224-1CN 电子分析天平，德国 Sartorius 公司；Zetasizer Nano ZS 纳米粒度及 Zeta 电位分析仪，英国 Malvern 公司；KQ-500DE 型数控超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司；SP131010-33Q 加热磁力搅拌器，美国 Barnstead Thermolyne；RE-5205 旋转蒸发仪，上海亚荣生化仪器厂；JEM-1200EX (120 kV) 透射电子显微镜 (TEM)，JEOL 公司；Spark 多功能酶标仪，瑞士 Tecan 公司；Pion μDiss 药物溶解吸收测试系统，美国 Pion 公司；L550 台式低速大容量离心机，德国 Eppendorf 公司；371 二氧化碳培养箱，美国 Thermo Scientific 公司；Type III 型厌氧手套培养箱，美国 COY Laboratory；超净工作台，上海力申科学仪器有限公司；25 cm² 培养瓶、96 孔板，美国 Corning 公司。

1.2 药品与试剂

三七皂苷 R_1 (质量分数为 99.06%)、三七多糖 (质量分数 > 98%), 上海融禾医药科技发展有限公司; 娃哈哈纯净水; 窄分布聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 标样组 (质量分数 > 99%), 日本 TOSOH (TSK 东曹) 公司; 对照品葡萄糖、甘露糖、半乳糖、木糖、岩藻糖质量分数 $\geq 99\%$, 对照品阿拉伯糖、*N*-乙酰-氨基半乳糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、*N*-乙酰-氨基葡萄糖质量分数 $\geq 98\%$, 单糖对照品均购于中国食品药品检定研究院; 甲醇、乙腈、乙醇、浓硫酸、盐酸, 天津市北联精细化学品开发有限公司; 磷酸二氢钾、氢氧化钠、苯酚, 天津市大茂化学试剂厂; 正丁醇, 北京化工厂; 三氯甲烷, 北京市通广精细化工公司; 硝酸钠、叠氮化钠、1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP)、三氟乙酸, 上海麦克林生化科技有限公司; 醋酸双氧铀, 北京中镜科仪技术有限公司; 人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞, 购于中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心; Cell Counting Kit-8, 日本同仁公司; DMEM 培养基、进口胎牛血清, 美国 Gibco 公司; 胰酶细胞消化液, Beyotime 公司; 二甲基亚砜, 美国 Sigma-Aldrich 公司。

2 方法与结果

2.1 三七多糖的制备及性质研究

2.1.1 三七多糖的分级纯化 将三七多糖用 Sevage 法除蛋白后, 根据葡聚糖凝胶色谱柱分子筛原理对其进行分级色谱, 每次取三七多糖 100.0 mg 溶解于 2.0 mL 水中, 过 0.45 μm 滤膜, 经 Sephadex G-100 凝胶色谱柱 (100 cm $\times$ 2.0 cm), 用纯水洗脱, 经苯酚-硫酸法显色后于波长 490 nm 处测定吸光度, 直至检测不到吸光度, 并绘制管数-吸光度曲线, 得到 2 部分三七多糖, 分开收集并冻干机冷冻干燥 24 h, 记为高相对分子质量三七多糖 (high molecular weight *Panax notoginseng* polysaccharide, PNP-H)、PNP-L。为确保每次多糖分离的重现性, 需保证柱内凝胶体积一致, 上样量与质量浓度一致, 如若体积流量变慢, 则需更换新的凝胶, 每次多糖分离均采用苯酚-硫酸法进行吸光度测定, 以此保证实验的重现性。

2.1.2 三七多糖相对分子质量的测定 选用 TSK gel G4000 PWXL 凝胶色谱柱; 流动相为 0.05 mol/L 硝酸钠 + 0.06% 叠氮化钠水溶液; 体积流量 0.6 mL/min; 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; PEG 标样组, 相对分子质量

500~500 000; 手动六通阀进样器 (定量环 20 μL)。取三七多糖、PNP-H、PNP-L 粉末, 加纯净水制成 10 mg/mL 溶液, 25 $^{\circ}\text{C}$ 超声 10 min, 静置 3 h 使其充分溶解, 摇匀, 5000 r/min 离心 10 min, 取上清液作为供试品进样分析。另取 PEG 标样组, 作为对照品溶液做标准曲线, 相对校正法测三七多糖、PNP-H、PNP-L 的相对分子质量。

重均相对分子质量 (M_w) 和数均相对分子质量 (M_n) 测定结果见表 1, $M_n=3124$ 的 PNP-L 占比较大, 约占三七多糖的 82.21%, 其余为 $M_n=34\ 173$ 的 PNP-H。从相对分子质量分布系数 (M_w/M_n) 来看, PNP-L 值较小, 说明相对均一, 通过观察发现 PNP-L 水溶性优于 PNP-H。通常情况下低相对分子质量多糖相比于高相对分子质量多糖水溶性好, 生物相容度高, 相对生物活性也更高^[23]; 此外, 有研究发现低相对分子质量多糖较高相对分子质量多糖更易被益生菌利用, 促进益生菌的增殖效果更为显著, 对于肠道吸收的药物具有现实意义^[24], 因此, 后续研究主要针对三七多糖和 PNP-L 展开。

表 1 三七多糖、PNP-H、PNP-L 相对分子质量

Table 1 Molecular weight of PNP, PNP-H and PNP-L

样品	M_n	M_w	M_w/M_n
三七多糖	5298	13 620	2.57
PNP-H	34 173	92 593	2.71
PNP-L	3124	5204	1.67

2.1.3 单糖组成的测定 为进一步了解多糖的组成, 采用 PMP 衍生化/HPLC 法对三七多糖、PNP-L 水解产物的单糖组分进行鉴定并用单标定量法计算各单糖组分的质量分数。

(1) 色谱条件: 岛津 LC-20AD 液相色谱仪; 色谱柱为 Xtimate C_{18} 柱 (200 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 250 nm; 进样量 20 μL ; 流动相为 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液 (氢氧化钠溶液调 pH 6.70)-乙腈 (83:17)。

(2) 对照品溶液: 精密称取甘露糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、*N*-乙酰-氨基葡萄糖、葡萄糖、*N*-乙酰-氨基半乳糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖、岩藻糖对照品适量, 加水溶解稀释至各对照品均为 50 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照溶液。

(3) 对照品溶液衍生: 精确吸取 250 μL 混合对照溶液到 5 mL EP 管中, 加入 250 μL 0.6 mol/L NaOH 水溶液、500 μL 0.4 mol/L PMP 甲醇溶液,

70 ℃条件下反应 1 h, 冷水中冷却 10 min; 加入 500 μ L 0.3 mol/L HCl 水溶液中和, 再加入 1 mL 氯仿漩涡 1 min, 3000 r/min 离心 10 min, 小心取上清液, 重复萃取 3 次, 上清液用于 HPLC 分析。

(4) 待测样品水解: 精密称取三七多糖、PNP-L 样品适量至 5 mL 安培瓶中, 加入 5 mL, 2 mol/L 三氟乙酸于 5 mL 安瓿中, 封管, 110 ℃酸解 4 h, 取出挥干三氟乙酸后加 1.0 mL 水复溶。

(5) 样品溶液衍生: 精确吸取 250 μ L 样品溶液到 5 mL EP 管中, 加入 250 μ L 0.6 mol/L NaOH 水溶液, 500 μ L 0.4 mol/L PMP 甲醇溶液, 70 ℃条件下反应 1 h, 冷水中冷却 10 min; 加入 500 μ L 0.3 mol/L HCl 中和, 再加入 1 mL 氯仿漩涡 1 min, 3000 r/min 离心 10 min, 小心取上清液, 重复萃取 3 次, 取上清液, 即得。

HPLC 结果见图 1, 单糖组成结果见表 2, 三七多糖主要由葡萄糖、阿拉伯糖、木糖, 还有少量葡萄糖醛酸、甘露糖、岩藻糖和半乳糖组成; PNP-L 主要由葡萄糖、木糖、阿拉伯糖, 还有少量甘露糖、葡萄糖醛酸、半乳糖、岩藻糖组成。与三七多糖相比, PNP-L 葡萄糖、甘露糖比例更高。

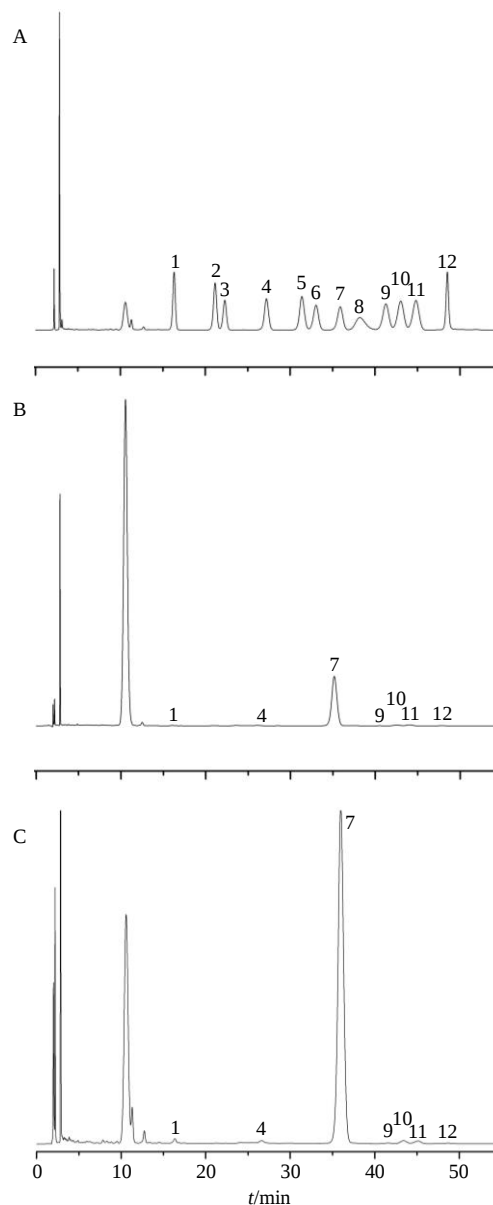
2.2 三七皂苷 R₁ 纳米粒载体的筛选

HPLC 法建立标准曲线测定纳米粒中三七皂苷 R₁, 通过考察和比较 R₁-PNP 纳米粒和 R₁-PNP-L 纳米粒的载药量和包封率, 筛选出三七皂苷 R₁ 纳米粒最佳的多糖载体。

2.2.1 纳米粒制备方法 采用溶剂挥发法制备纳米粒, 将三七多糖和 PNP-L 配制成 1.0 mg/mL 水溶液, 三七皂苷 R₁ 配制为 2.0 mg/mL 乙醇溶液, 按照药载质量比 1:2 制备纳米粒, 用注射器 (13 mm×0.45 mm) 将三七皂苷 R₁ 乙醇溶液分别逐滴加入三七多糖和 PNP-L 水溶液中, 超声 20 min, 使其形成纳米乳液, 室温下在磁力搅拌器上搅拌 2 h 除去有机溶剂, 以 13 000 r/min 超速离心 30 min 收集纳米粒, 45 ℃真空干燥 48 h 后即得三七皂苷 R₁-三七多糖 (R₁-PNP) 纳米粒和三七皂苷 R₁-PNP-L (R₁-PNP-L) 纳米粒。

2.2.2 三七皂苷 R₁ 含量测定方法

(1) 色谱条件: 色谱柱为 Agilent TC-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-水 (22:78); 柱温 30 ℃; 体积流量为 1.0 mL/min; 检测波长为 203 nm; 进样量 10 μ L; 理论塔板数应不低于 3000^[10]。



1-甘露糖 2-核糖 3-鼠李糖 4-葡萄糖醛酸 5-半乳糖醛酸 6-N-乙酰-氨基葡萄糖 7-葡萄糖 8-N-乙酰-氨基半乳糖 9-半乳糖 10-木糖 11-阿拉伯糖 12-岩藻糖
1-mannose 2-ribose 3-rhamnose 4-glucuronic acid 5-galacturonic acid 6-N-acetyl-glucosamine 7-glucose 8-N-acetyl-galactosamine 9-galactose 10-xylose 11-arabinose 12-fucose

图 1 混合对照品 (A)、三七多糖 (B)、PNP-L (C) HPLC 图
Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A), PNP (B) and PNP-L (C)

(2) 标准曲线的绘制: 将三七皂苷 R₁ 配制成 0.050、0.100、0.125、0.250、0.500、1.000 mg/mL 甲醇溶液, 超声后过 0.45 μ m 滤膜, 用 HPLC 测定三七皂苷 R₁ 质量浓度, 计算线性回归方程。以峰面积对质量浓度的回归方程为 $Y=2.8032X-30.699$, $r=0.9999$, 其线性范围良好, 线性范围为 0.050~1.000 mg/mL。

表 2 三七多糖、PNP-L 单糖组成
Table 2 Monosaccharide ratio of PNP and PNP-L

多糖	质量分数/%							
	甘露糖	葡萄糖醛酸	葡萄糖	半乳糖	木糖	阿拉伯糖	岩藻糖	其他
三七多糖	0.363	0.702	94.144	0.205	1.913	2.360	0.301	0.011
PNP-L	0.677	0.551	96.384	0.190	0.986	0.944	0.121	0.145

(3) 精密度的试验: 分别配制低、中、高 (0.050、0.125、1.000 mg/mL) 3 个质量浓度的三七皂苷 R₁ 对照品, 测得各质量浓度三七皂苷 R₁ 日内精密度的 RSD 分别为 1.06%、0.25%、0.38%, 日间精密度的 RSD 分别为 1.75%、1.26%、1.19%, RSD 均 < 2%, 表明该方法精密度的良好。

(4) 稳定性试验: 配制 0.1 mg/mL 三七皂苷 R₁ 对照品甲醇溶液, 在室温下放置 0、2、4、6、8 h, 测定其峰面积并计算得到 RSD 为 1.22%, 表明在室温下 8 h 内稳定性良好, 可满足自动进样的要求。

(5) 重复性试验: 平行制备 6 份 0.1 mg/mL 三七皂苷 R₁ 对照品溶液, 相同条件下进样测定, 计算得到 RSD 为 1.43%, 说明重复性良好。

(6) 回收率试验: 取未经冷冻干燥空白纳米粒 1 mL, 分别加入 0.4、0.6、1.0 mg/mL 的三七皂苷 R₁ 对照品甲醇溶液 1 mL, 每个浓度平行 3 次, 根据标准曲线计算得到平均回收率分别为 98.27%、98.64%、99.21%, RSD 分别为 1.32%、1.86%、1.55%, 符合含量测定的方法学要求。

2.2.3 载药量和包封率的测定 制备纳米粒时的药物投入量记为 W₁, 精确称定冻干后的纳米粒粉末, 质量记为 W₂; 加入适量的甲醇溶液使纳米粒完全溶解, 采用“2.2.2”项下色谱条件测定三七皂苷 R₁ 质量浓度, 得到纳米粒中三七皂苷 R₁ 质量 (W₃), 根据下述公式计算载药量和包封率。由表 3 可见, R₁-PNP-L 纳米粒比 R₁-PNP 纳米粒载药量和包封率均有显著提高, 因此, 选择 PNP-L 作为三七皂苷 R₁ 载体。

$$\text{载药量} = W_3 / W_2$$

$$\text{包封率} = W_3 / W_1$$

表 3 纳米粒的载药量、包封率测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 3 Measurement results of drug loading and encapsulation efficiency ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

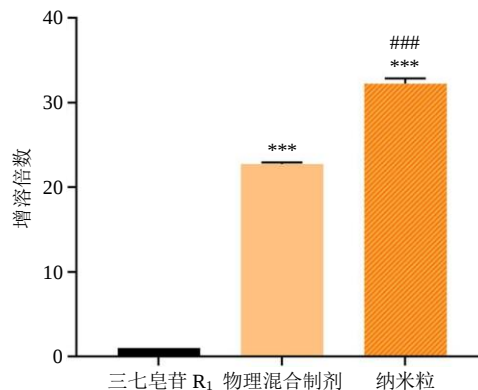
纳米粒	载药量/%	包封率/%
R ₁ -PNP	23.92 ± 0.12	71.76 ± 1.27
R ₁ -PNP-L	28.62 ± 0.14	85.85 ± 1.21

2.3 纳米粒对三七皂苷 R₁ 溶解度的影响

按照“2.2.1”项下方法制备 R₁-PNP-L 纳米粒, 将三七皂苷 R₁ 与 PNP-L 按照质量比 1 : 2 溶于纳米粒等体积的水中, 玻璃棒搅拌至溶解即得物理混合制剂组, 考察 PNP-L 的加入与不同结合方式对三七皂苷 R₁ 溶解度的影响。

采用 Pion μDiss 药物溶解吸收测试系统, 将过量的三七皂苷 R₁、R₁-PNP-L 物理混合制剂及 R₁-PNP-L 纳米粒溶于 20 mL 水中, 并置于样品杯中 (保持三七皂苷 R₁ 质量浓度相同), 动态监测三七皂苷 R₁、R₁-PNP-L 物理混合制剂及 R₁-PNP-L 纳米粒中三七皂苷 R₁ 的溶解度, 37 °C 条件下以 200 r/min 的速度搅拌, 采集间隔为 60 s, 直至溶解度在 1 h 内保持稳定, 并按公式增溶倍数 = 物理混合制剂或纳米粒中三七皂苷 R₁ 溶解度 / 三七皂苷 R₁ 溶解度计算得相应增溶倍数。由图 2 可知, R₁-PNP-L 物理混合制剂将三七皂苷 R₁ 溶解度提升至 22.75 倍, 纳米粒将三七皂苷 R₁ 溶解度提升至 32.26 倍。

实验均采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。2 种制剂与单独使用三七皂苷 R₁ 相比, 均具有显著性 ($P < 0.001$), 纳米粒组对于物理混合制剂组对提高溶解度也具有



与三七皂苷 R₁ 比较: *** $P < 0.001$; 与物理混合制剂比较: ### $P < 0.001$
*** $P < 0.001$ vs notoginsenoside R₁; ### $P < 0.001$ vs physical mixed preparation

图 2 物理混合制剂、纳米粒对三七皂苷 R₁ 溶解度的影响
Fig. 2 Solubilization effect of physical mixing and nanoparticles on notoginsenoside R₁

显著性差异 ($P < 0.001$), 说明 PNP-L 与三七皂苷 R_1 联用, 可以有效提高三七皂苷 R_1 在水中的溶解度, 纳米粒制剂在提高溶解度方面具有更加明显的优势。

2.4 R_1 -PNP-L 纳米粒测量与表征

2.4.1 平均粒径、多分散指数 (PDI)、Zeta 电位测定 取一定量的 R_1 -PNP-L 纳米粒, 在纳米粒度及 Zeta 电位分析仪上分析其平均粒径、PDI 及 Zeta 电位, 结果 R_1 -PNP-L 纳米粒的平均粒径为 (139.17 ± 7.22) nm, PDI 为 0.41 ± 0.19 , Zeta 电位为 (-19.14 ± 3.14) mV。纳米粒粒径较小, Zeta 电位较大。但 PDI 较大, 这与 PNP-L 自身性质有关, PNP-L 成分复杂, 已作均质处理, 为确保 PNP-L 保持其药理活性, 此处未针对 PNP-L 的 PDI 进行过多优化处理。

2.4.2 R_1 -PNP-L 纳米粒晶型分析 用 DSC 差示扫描量热仪对三七皂苷 R_1 、PNP-L、 R_1 -PNP-L 物理混合制剂、 R_1 -PNP-L 纳米粒进行分析。以空白坩埚为参比物, 另一坩埚放入 6~10 mg 样品, 温度范围为 40~200 $^{\circ}\text{C}$, 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。氮气作为保护气, 保护气体积流量为 60 mL/min; 吹扫气体积流量为 40 mL/min。由图 3 可知, 三七皂苷 R_1 在 174.43 $^{\circ}\text{C}$ 有 1 吸热峰, 判定为其熔融峰, 在结晶之后熔融, PNP-L 熔融峰为 154.06 $^{\circ}\text{C}$, R_1 -PNP-L 物理混合制剂在 145.23、158.88 $^{\circ}\text{C}$ 存在 2 个熔融峰, 说明没有形成一稳定物质, R_1 -PNP-L 纳米粒熔融峰为 156.90 $^{\circ}\text{C}$, 纳米粒中三七皂苷 R_1 的熔融峰完全消

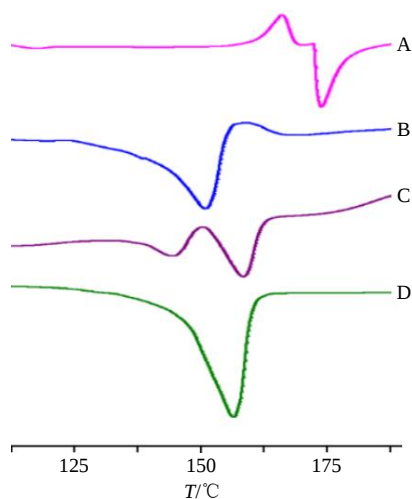


图 3 三七皂苷 R_1 (A)、PNP-L (B)、三七皂苷 R_1 与 PNP-L 物理混合制剂 (C)、 R_1 -PNP-L 纳米粒 (D) 的 DSC 图

Fig. 3 DSC thermograms of notoginsenoside R_1 (A), PNP-L (B), physical mixed preparation of notoginsenoside R_1 and PNP-L (C) and R_1 -PNP-L nanoparticles (D)

失, 说明三七皂苷 R_1 被包载在载体中, 该纳米粒在人工模拟的胃肠液中 6 h 内可稳定存在, 粒径变化范围较小, 无肉眼可见沉淀产生, 推测可有效减少三七皂苷 R_1 在胃中被酸性环境破坏。

2.4.3 R_1 -PNP-L 纳米粒的形态学考察 将 R_1 -PNP-L 纳米粒负染制样: 将镀碳支持膜铜网放到封口膜上, 滴 1 滴样品 (约 30 μm) 到支持膜上, 停留 2~5 min, 用带尖的滤纸从边缘部分吸去多余的溶液, 拿到滤纸上停留 10 min 左右。再把干燥后的支持膜放到封口膜上, 滴 1 滴醋酸双氧铀染液, 染色 90 s, 用带尖的滤纸吸去多余的染液, 夹到滤纸上干燥 3 h, 在透射电镜下观察。如图 4 所示, 纳米粒呈球状, 粒径均为 200 nm 下。

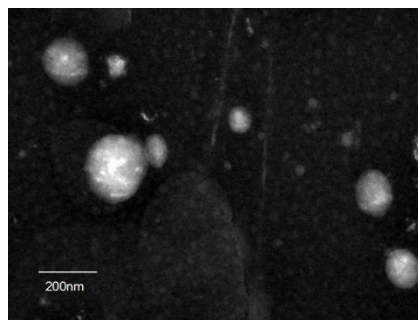


图 4 R_1 -PNP-L 的 TEM 图

Fig. 4 TEM image of R_1 -PNP-L

2.5 体外释药特性研究

精密吸取三七皂苷 R_1 质量浓度均为 1 mg/mL 的三七皂苷 R_1 原料药、 R_1 -PNP-L 物理混合制剂、 R_1 -PNP-L 纳米粒各 5 mL, 装入经蒸馏水浸泡处理过的透析袋 (相对分子质量 3000) 内, 将袋口扎紧, 以 50 mL 磷酸盐缓冲液 (PBS) 为释放介质。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴恒温搅拌 (100 r/min)。在预设时间点 (0、1、2、4、6、8、10、12 h) 取样 1 mL, 同时补充相同体积释放介质。由于更换溶质为 PBS, 因此按照“2.2.2”项下的色谱条件, 重新进样测定后绘制标准曲线, 得到峰面积对质量浓度的线性回归方程为 $Y = 4.0132X - 0.3164$, $r = 0.9996$, 线性范围 49.2~1 000.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。将所取样品 10 000 r/min 离心 10 min 后, 取上清液通过 HPLC 法测定释放介质中三七皂苷 R_1 的含量, 计算累积释放率 (实验平行 3 份), 绘制体外释放曲线。由图 5 可知, 与三七皂苷 R_1 原料药相比, R_1 -PNP-L 物理混合制剂组中的三七皂苷 R_1 释放速度略有减慢, 说明与 PNP-L 联用可减缓三七皂苷 R_1 释放速率, 但并不明显; 而纳米粒组释放速度明显减慢, 在 4 h 时, 累积释放率达

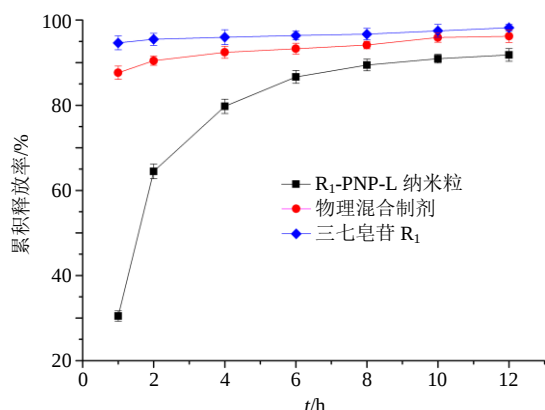


图5 三七皂苷 R₁ 体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 *In vitro* release curve of notoginsenoside R₁ ($\bar{x} \pm s, n=3$)

到 80.07%, 10 h 后累积释放率达到 90% 以上, 说明具有一定的缓释作用。这可能是由于三七皂苷 R₁ 与 PNP-L 通过氢键结合形成相对稳定的结构, 可有效减缓三七皂苷 R₁ 的释放速度。

2.6 R₁-PNP-L 纳米粒细胞毒性评价

培养 SH-SY5Y 神经细胞, 按照 1×10^5 个/mL 的密度铺板, 并在实验前生长 36 h。在 96 孔板中, 移入 SH-SY5Y 神经细胞, 加入含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基, 每孔 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下孵育至铺满 96 孔板后, 弃去原培养液。取三七皂苷 R₁、PNP-L、三七皂苷 R₁ 与 PNP-L 物理混合制剂、R₁-PNP-L 纳米粒, 用不含胎牛血清 DMEM 培养基配制成不同质量浓度 (12.5、62.5、125.0、250.0、500.0 μ g/mL) 的各药物作为给药组, 以直接加入不含胎牛血清的 DMEM 培养基作为对照组, 用 CCK-8 试剂盒检测细胞活力, 用酶标仪在 450 nm 下测量每个孔的吸光度, 计算细胞活力, SPSS 软件计算是否有显著性差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

细胞活力 = (给药组或模型组细胞吸光度值 - 本底吸光度值) / (对照细胞吸光度值 - 本底吸光度值)

由图 6 可知, 三七皂苷 R₁、PNP-L、R₁-PNP-L 物理混合制剂、R₁-PNP-L 纳米粒在 500.0 μ g/mL 内对正常 SH-SY5Y 细胞安全、无毒性, 与对照组相比无显著性差异, 可在此范围内选择适合的浓度开展实验。

2.7 R₁-PNP-L 纳米粒对 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用

培养 SH-SY5Y 细胞接种在含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 培养液中, 在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中培养。0.25% 胰酶消化并收集对数生长期的

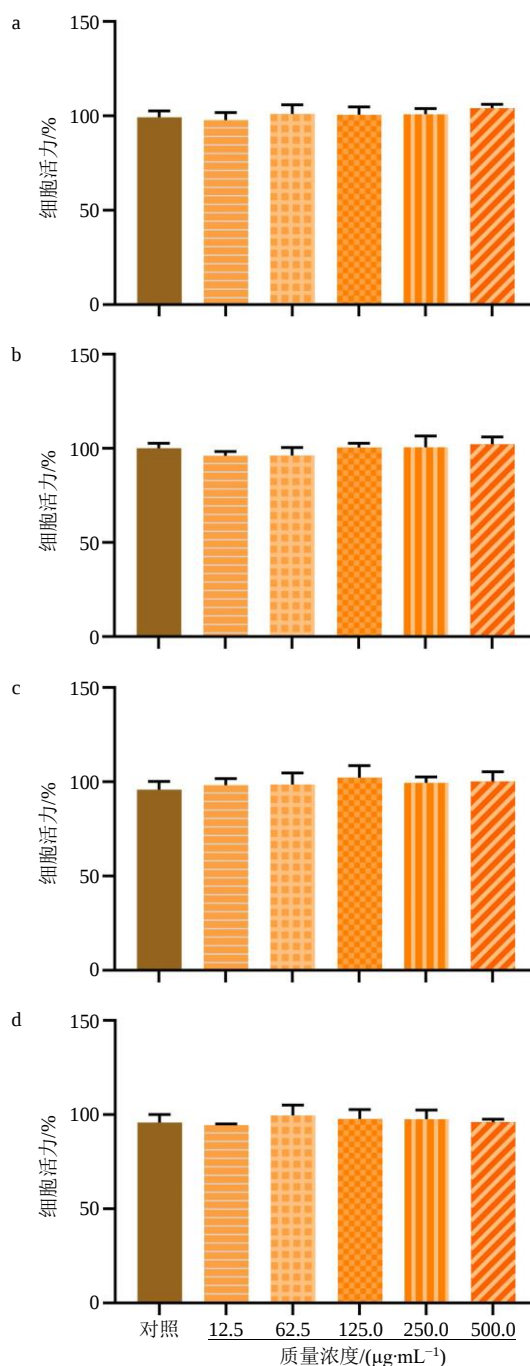


图6 三七皂苷 R₁ (a)、PNP-L (b)、R₁-PNP-L 物理混合制剂 (c)、R₁-PNP-L 纳米粒 (d) 对 SH-SY5Y 细胞活力的影响
Fig. 6 Effects of notoginsenoside R₁ (a), PNP-L (b), R₁-PNP-L physical mixed preparation (c), and R₁-PNP-L nanoparticles (d) on viability of SH-SY5Y cells

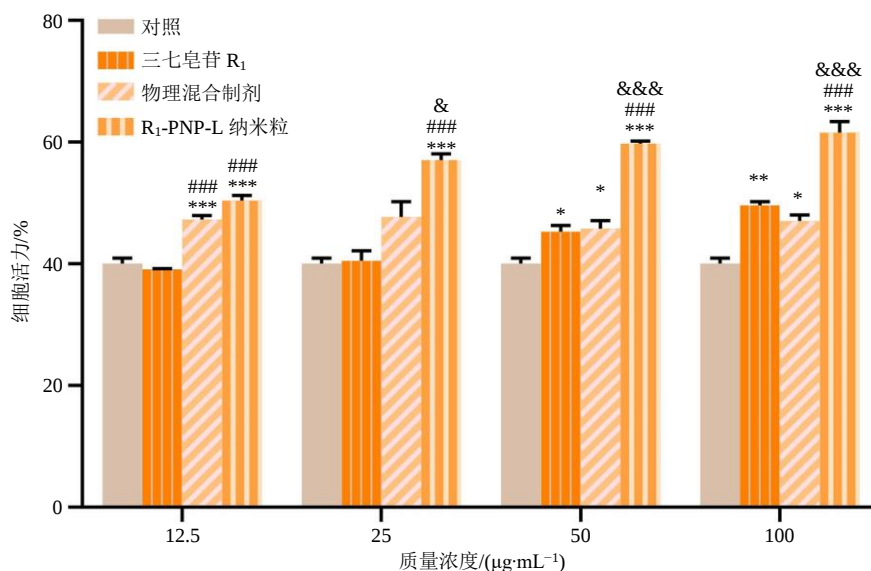
SH-SY5Y 细胞, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液混悬细胞, 调整细胞悬液浓度 1×10^5 个/mL 并加入到 96 孔板中, 每孔加入 100 μ L 细胞悬液, 在 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 培养条件下孵育 24 h, 至细胞达到 70%~80% 融合率, 弃旧培养液, 依次加入 12.5、25.0、50.0、100.0 μ g/mL 质量浓度的三七皂苷 R₁、R₁-PNP-L 物

理混合制剂、R₁-PNP-L 纳米粒。作用 2 h 后，在厌氧培养箱中缺氧处理 4.5 h，再移入 CO₂ 培养箱中复氧 2 h 构建缺氧/复氧模型。复氧 2 h 后，避光加入 CCK-8，每孔 10 μ L。1.5 h 后，在酶标仪上 450 nm 波长处测定吸光度值，计算每孔细胞活力，SPSS 软件计算是否有显著性差异。

由图 7 可知，R₁-PNP-L 物理混合组相比于三七皂苷 R₁，细胞活力略有提高，在低质量浓度 12.5 μ g/mL 时，差异显著 ($P < 0.01$)，三七皂苷 R₁、R₁-PNP-L 纳米粒对 SH-SY5Y 细胞缺氧/复氧诱导的调

亡具有抑制作用，并均呈剂量相关性，随着药物质量浓度的提高，存活的细胞比例升高。各质量浓度 R₁-PNP-L 纳米粒与三七皂苷 R₁ 单用相比，细胞活力均有显著提高。

在 100 μ g/mL 时，纳米粒组与单独用三七皂苷 R₁ 相比，细胞活力从 49.66% 提升至 61.60%。推测 PNP-L 具有 PNP 的抗氧化、抗炎等多重作用，与三七皂苷 R₁ 联用在低浓度时有效抑制了缺氧/复氧诱导的细胞凋亡，起到保护作用，而纳米粒组更易被细胞摄取发挥药效。



与对照比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与三七皂苷 R₁ 比较: #### $P < 0.001$; 与物理混合制剂比较: & $P < 0.05$ &&& $P < 0.001$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control; #### $P < 0.001$ vs notoginsenoside R₁; & $P < 0.05$ &&& $P < 0.001$ vs physical mixed preparation

图 7 三七皂苷 R₁、R₁-PNP-L 物理混合、R₁-PNP-L 纳米粒对 SH-SY5Y 缺氧复氧损伤的保护作用

Fig. 7 Protective effects of notoginsenoside R₁, R₁-PNP-L physical mixed preparation, R₁-PNP-L nanoparticles on SH-SY5Y hypoxia-reoxygenation

3 讨论

PNP-L 水溶性良好，以溶剂挥发法包载三七皂苷 R₁，采用毒性较低的乙醇作为有机相且未引入其他外源辅料，可以最大限度保证制剂的“自源性”。由于多糖成分复杂且具有一定的黏性，有着大量官能团，因此，PNP-L 在包载三七皂苷 R₁ 的过程中可能起到一种天然的表面活性剂的作用^[25]，能够有效提高中药成分的溶解度以提高生物利用度。由于人体内缺乏直接分解非淀粉类多糖的酶类，因此非淀粉类多糖难以被胃肠道消化吸收，并且对胃肠动力有一定的积极作用^[26]，这为多糖作载体的纳米粒提供了口服给药的可能性。

PNP-L 相对分子质量相对均一，相比于 PNP 来说在水溶液中性质更加稳定，R₁-PNP-L 纳米粒在模

拟人工胃、肠液中稳定性良好，6 h 内粒径未有明显变化，无可见沉淀产生。由于 PNP-L 组成中主要单糖为葡萄糖，推测可给受损的 SH-SY5Y 细胞提供能量；此外，PNP 也具有抗炎、抗氧化等多重药理作用，可能与三七皂苷 R₁ 配伍发挥协同作用，因此 R₁-PNP-L 纳米粒比单独使用三七皂苷 R₁ 时对缺氧/复氧诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡效果增强。

作为药物递送载体，中药多糖本身成分复杂，因此如何控制多糖的质量，还需不断地探索，应从产地、运输方式、储存方法、含量及单糖组成等加以控制，才有可能大范围应用到临床用药中。本实验采用葡聚糖凝胶柱分离三七多糖，为保证分离完全，选择相对细且长的凝胶柱且上样量较小，可减少多糖在柱内凝胶的吸附，结果更加准确且有利于

凝胶的重复利用。实验结果表明 PNP-L 有成为一种递送三七皂苷类成分良好载体的潜力, 有利于三七资源可持续利用, 对于其他皂苷成分是否具有普适性仍需继续验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zhou P, Xie W J, Meng X B, *et al.* Notoginsenoside R₁ ameliorates diabetic retinopathy through PINK₁-dependent activation of mitophagy [J]. *Cells*, 2019, 8(3): E213.
- [2] 万强, 潘芸芸, 贾钰华, 等. 三七皂苷 R₁ 抑制 JNK 通路减轻 H₂O₂ 诱导心肌细胞损伤的作用 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(9): 2061-2064.
- [3] Tu L, Wang Y, Chen D, *et al.* Protective effects of notoginsenoside R₁ via regulation of the PI3K-Akt-mTOR/JNK pathway in neonatal cerebral hypoxic-ischemic brain injury [J]. *Neurochem Res*, 2018, 43(6): 1210-1226.
- [4] Liu Y, Lin Z, Guo J, *et al.* Notoginsenoside R₁ significantly promotes *in vitro* osteoblastogenesis [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 38(2): 537-544.
- [5] Li Y, Li Z, Jia Y H, *et al.* *In vitro* anti-hepatoma activities of notoginsenoside R₁ through downregulation of tumor promoter miR-21 [J]. *Dig Dis Sci*, 2020, 65(5): 1364-1375.
- [6] Fang H H, Yang S L, Luo Y Y, *et al.* Notoginsenoside R₁ inhibits vascular smooth muscle cell proliferation, migration and neointimal hyperplasia through PI3K/Akt signaling [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 7595.
- [7] 苏元元, 付宇, 李楠楠, 等. 三种达玛烷型皂苷的生物药剂学分类及吸收机制研究 [J]. 中国现代中药, 2018, 20(9): 1150-1156.
- [8] 张波, 张娜. 纳米载体共递送化疗药物用于肿瘤联合治疗的研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2014, 23(21): 2514-2520.
- [9] 杨丹, 姜岚, 黄娟, 等. 三七皂苷 R₁-PLGA 纳米微球的制备及优化研究 [J]. 化学与粘合, 2020, 42(2): 88-91.
- [10] 虞璐, 魏宇峰. 三七皂苷 R₁ 壳聚糖纳米粒的制备及其工艺优化 [J]. 中国基层医药, 2016, 23(19): 2996-2999.
- [11] Strickley R G. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations [J]. *Pharm Res*, 2004, 21(2): 201-230.
- [12] Gonzalez-Gaitano G, Isasi J R, Velaz I, *et al.* Drug carrier systems based on cyclodextrin supramolecular assemblies and polymers: Present and perspectives [J]. *Curr Pharm Des*, 2017, 23(3): 411-432.
- [13] 陈海清. 中药制剂中辅料的不良反应 [J]. 实用中医内科杂志, 2013, 27(9): 134-135.
- [14] 王淑颜, 李华, 富欣, 等. 常用辅料羟丙基-β-环糊精的毒性研究 [A] // 2016 年第六届全国药物毒理学年会论文集 [C]. 重庆: 中国毒理学会, 2016: 348-349.
- [15] 侯晓晖, 刘白玲. 药物控制释放用天然多糖载体的制备技术研究进展 [J]. 广州化学, 2007, 32(3): 51-58.
- [16] 杨洁, 马英慧, 崔秀成, 等. 三七多糖对糖尿病模型大鼠的降血糖作用和眼视网膜病变的治疗作用及其机制 [J]. 吉林大学学报: 医学版, 2017, 43(4): 734-738.
- [17] 李怀宇, 钟媛媛, 李双, 等. 三七粗多糖的分离纯化及其对人牙周膜干细胞、小鼠成骨细胞体外增殖活性的影响 [J]. 华西药理学杂志, 2019, 34(5): 433-439.
- [18] 黄上峰, 陆飞燕, 黄元河, 等. 三七多糖抗氧化活性研究 [J]. 微量元素与健康研究, 2018, 35(1): 30-32.
- [19] 李易, 叶曦. 三七多糖对糖尿病肾病大鼠炎症反应及脂质代谢调节作用的实验研究 [J]. 中国中医药科技, 2018, 25(1): 43-47.
- [20] Li H Y, Gu L L, Zhong Y Y, *et al.* Administration of polysaccharide from *Panax notoginseng* prolonged the survival of H22 tumor-bearing mice [J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9: 3433-3441.
- [21] Liu S N, Yang Y, Qu Y, *et al.* Structural characterization of a novel polysaccharide from *Panax notoginseng* residue and its immunomodulatory activity on bone marrow dendritic cells [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 161: 797-809.
- [22] Feng S L, Cheng H R, Xu Z, *et al.* Thermal stress resistance and aging effects of *Panax notoginseng* polysaccharides on *Caenorhabditis elegans* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 81: 188-194.
- [23] 孙雨豪. 几种低分子量海藻多糖的制备及其抗 ALV-J 活性研究 [D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2017.
- [24] 王凌, 孙利芹, 赵小惠. 一种海藻多糖的理化性质及抗氧化和保湿活性 [J]. 精细化工, 2012, 29(1): 20-24.
- [25] 王善勇, 项舟洋, 祁海松. 基于天然多糖的绿色表面活性剂 [J]. 精细化工, 2020, 37(10): 1965-1976.
- [26] 聂少平, 黄晓君. 天然产物多糖对胃肠道功能的影响 [J]. 中国食品学报, 2015, 15(5): 11-19.

[责任编辑 郑礼胜]