

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.16.002

透明质酸靶向修饰苦参碱脂质体对肝癌 H22 小鼠的抑制作用*

赵玉玺, 张世鹏, 张帆, 刘倪, 刘福[△]

(川北医学院, 四川 南充 637000)

摘要:目的 考察透明质酸靶向修饰苦参碱脂质体(HA-MA 脂质体)对肝癌 H22 小鼠的抑制作用,并进行处方筛选。方法 筛选 HA-MA 脂质体的最佳制备方法;并以磷脂比、药脂比、磷酸盐缓冲液的 pH 为单因素考察指标,通过正交试验法筛选最佳处方工艺;使用透析袋法检测 HA-MA 脂质体的体外释放度;裸鼠右腋下接种 H22 肝癌瘤株,尾静脉注射给药 14 d 后,称取瘤体质量并计算抑瘤率。结果 采用薄膜分散法制备脂质体效果最好;最佳处方工艺的磷脂比为 3:1,药脂比为 1:25,磷酸盐缓冲液的 pH=7.4;HA-MA 脂质体与苦参碱脂质体释放曲线基本一致,且均有一定缓释效果;HA-MA 脂质体对 H22 肝癌小鼠的抑瘤率与环磷酰胺相近,高于苦参碱和苦参碱脂质体。结论 由于透明质酸的修饰,HA-MA 脂质体抑制 H22 肝癌裸鼠的效果明显优于苦参碱和苦参碱脂质体。

关键词:透明质酸;苦参碱;脂质体;肝癌;肿瘤细胞;抑制作用;靶向修饰;小鼠

中图分类号:R285.5;R273

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)16-0005-03

Inhibition Effect of Hyaluronic Acid Targeting Modified Matrine Liposome on Murine H22 Hepatocarcinoma

Zhao Yuxi, Zhang Shipeng, Zhang Fan, Liu Ni, Liu Fu

(North Sichuan Medical University, Nanchong, Sichuan, China 637000)

Abstract: Objective To investigate the inhibition effect of hyaluronic acid targeting modified matrine liposome(HA-MA liposome) on murine H22 hepatocarcinoma and optimize the formulation. **Methods** The method of preparing HA-MA liposome was screened. The formulation was screened by orthogonal design with ratio of phospholipids to cholesterol, ratio of drug to lipid, pH of phosphate buffer solution(PBS) as the single indexes. The *in vitro* release of HA-MA liposome was measured by dialysis bag method. The H22 liver tumor was inoculated subcutaneously under the right axilla of nude mice. After 14 d of tail intravenous injection of drugs, the tumor weight was weighed and the tumor inhibition rate was calculated. **Results** The effect of HA-MA liposome prepared by thin film hydration method was the best, the optimal parameters were as follows: the ratio of phospholipids to cholesterol was 3:1, ratio of drug to lipid was 1:25, pH of PBS buffer was 7.4. The release curve of HA-MA liposome and MA liposome were basically the same, both of them had a sustained-release efficacy. The inhibition rate of HA-MA liposome on H22 hepatocarcinoma was similar to that of cyclophosphamide, but it was higher than that of MA and MA liposome. **Conclusion** The inhibition effect of HA-MA liposome on H22 hepatocarcinoma nude mice were significantly better than that of MA and MA liposomes owe to the modification of hyaluronic acid.

Key words: hyaluronic acid; matrine; liposome; hepatocarcinoma; tumor cell; inhibition effect; targeting modification; rats

苦参碱(matrine, MA)是豆科植物苦参的干燥根、植株、果实经乙醇等有机溶剂提取制成的生物碱,属四环喹啉类化合物^[1],除有抗炎、抗病毒、抗肝纤维化、抗心律失常等作用外,还有较强的抗肿瘤作用,可抑制乳腺癌、肝癌、胃癌等多种肿瘤生长^[2-5]。脂质体是由脂质双分子层所形成的一种超微球形载体制剂,是纳米载药系统的典型代表^[6],常被用作抗肿瘤药物的载体,以减轻被包裹药物的毒性,或增加药物的溶解性,或改变药物的分布,提高药物的生物利用度等,从而提高抗肿瘤效果。目前,已有很多抗肿瘤药物脂质体制剂被用于试验和临床研究^[7]。透明质酸(hyaluronic acid, HA)是细胞外基质与胞间质的重要构成部分,其保证了细胞外基质结构。研究发现,透明质酸的特定受体包括受体 CD44 及 RHAMM 等,这些受体通常过量表达于肿瘤细胞表

面,因此,透明质酸可作为肿瘤靶向药物配体,实现主动靶向的目的。为增强苦参碱抗肿瘤作用,本试验中制备了以透明质酸作为主动靶向配体修饰的苦参碱脂质体(HA-MA 脂质体),筛选 3 种制备脂质体的方法后,再采用正交试验法得出最佳处方,并对 HA-MA 脂质体在肝癌 H22 小鼠体内的抑瘤效果进行了验证。

1 动物、仪器与试剂

实验动物:SPF 级雄性 BALB/c 小鼠,体质量(20±2)g(北京维通利华实验动物技术有限公司);H22 细胞株(川北医学院基础医学院实验室)。

仪器:SJIA-10N-50A 型冻干机(宁波市双嘉仪器有限公司);DF-101S 型集热式磁力搅拌器(上海鹏鸣仪器有限公司);RE-5003 型旋转蒸发仪(巩义羽翔仪器厂);ZS90 型激光粒度分析仪(马尔文公司);DZ-

*基金项目:国家自然科学基金[81460637]。

第一作者:赵玉玺,女,硕士研究生,研究方向为靶向药物制剂,(电子信箱)329034330@qq.com。

[△]通信作者:刘福,男,主任药师,硕士研究生导师,研究方向为临床药学,(电子信箱)1020267098@qq.com。

C1000 型超净台(丹泽科技有限公司);DM-IL 型倒置显微镜(德国徕卡公司);5424 型台式离心机(艾本德仪器公司);恒温摇床(上海博讯有限公司);100 μ L 及1 000 μ L 移液枪(德国 Brand 公司)。

试药:苦参碱原料(西安中鑫生物技术有限公司,纯度 > 98%);二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)、大豆磷脂、胆固醇、环磷酸胺(美国 Sigma 公司,纯度 > 99%);透明质酸钠(山东福瑞达生物化工有限公司,相对分子质量 8 000 Da,纯度 > 98%);其余试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 脂质体制备方法筛选^[8]

乙醇注入法:分别称取胆固醇 30 mg、卵磷脂 120 mg,置烧瓶中,加入无水乙醇 10 mL,超声溶解,缓慢均匀注入 60 $^{\circ}$ C 含苦参碱(含量为 1 g/L)的磷酸盐缓冲液(pH = 7.4)3 mL 和含 HA-DOPE(含量为 1 g/L)的磷酸盐缓冲液 2 mL,保温搅拌 1.5 h,超声 5 min,即得,编号为 A。

薄膜分散法:分别称取胆固醇 30 mg、卵磷脂 120 mg、苦参碱 5 mg,置烧瓶中,加入氯仿丙酮混合溶剂 10 mL,于 37 $^{\circ}$ C 旋转蒸发除去溶剂,形成薄膜。加入 pH = 7.4 的磷酸盐缓冲液 3 mL 和含 HA-DOPE(含量为 1 g/L)的磷酸盐缓冲液 2 mL,水化 1.5 h(35 $^{\circ}$ C),即得,编号为 B。

逆向蒸发法:分别称取胆固醇 30 mg、卵磷脂 120 mg 置茄形瓶中,加入氯仿 10 mL 及含苦参碱(含量为 1 g/L)的磷酸盐缓冲液 5 mL,超声 5 min,形成稳定的水/油(W/O)相,35 $^{\circ}$ C 旋转蒸发至凝胶状,再加入 2 mL 含 HA-DOPE(含量为 1 g/L)的磷酸盐缓冲液,水化 1.5 h(35 $^{\circ}$ C),即得,编号为 C。

将 3 种方法制得的 HA-MA 脂质体用蒸馏水稀释后,再用激光粒度分析仪测定粒径,结果脂质体 A、脂质体 B、脂质体 C 的平均粒径分别为 301.5,234.1,257.3 nm,多分散系数(PDI)分别为 0.285,0.156,0.194。可见,以脂质体的多分散系数值和平均粒径作为评价指标,采用薄膜分散法制备的 HA-MA 脂质体效果较好,故本试验中选用薄膜分散法。

2.2 正交试验法筛选处方

正交试验:采用三因素三水平正交试验表筛选制备 HA-MA 脂质体的最佳处方。三因素分别为磷脂比(因素 A)、药脂比(因素 B)、磷酸盐缓冲液的 pH(因素 C),详见表 1。采用离心法分离游离苦参碱和脂质体,采用高效液相色谱(HPLC)外标一点法测定 HA-MA 脂质体的包封率,筛选出最佳处方。正交试验结果见表 2。可见,三因素对包封率的影响程度依次为 A > B > C,最佳处方为 A₁B₁C₂,即磷脂比为 3:1,药脂比为 1:25,PBS 的 pH = 7.4。

表 1 因素水平表

水平	因素 A	因素 B	因素 C
1	3:1	1:20	6.6
2	4:1	1:25	7.4
3	5:1	1:30	7.8

表 2 正交试验结果

编号	因素 A	因素 B	因素 C	包封率(%)
1	1	1	1	60.64
2	1	2	2	74.32
3	1	3	3	56.10
4	2	1	3	63.98
5	2	2	1	59.83
6	2	3	2	69.02
7	3	1	2	50.26
8	3	2	3	61.56
9	3	3	1	55.49
K ₁	63.69	58.29	58.65	
K ₂	64.28	65.24	64.53	
K ₃	55.77	60.20	60.55	
R	25.53	20.85	17.64	

最佳处方工艺验证:分 6 批按正交试验筛选出的最佳工艺处方制备 HA-MA 脂质体,测定包封率。结果为 (75.18 $\pm$ 1.26)%。

2.3 体外释放试验

分别取 HA-MA 脂质体、苦参碱脂质体(制备方法同 HA-MA 脂质体,在水化时加入 5 mL pH = 7.4 的磷酸盐缓冲液)5 mL 以及苦参碱溶液(含 MA 5 mg),置透析袋中,加入 50 mL pH = 7.4 的磷酸盐缓冲液作为释放介质,振荡温度为 37 $^{\circ}$ C,转速为 100 r/min。分别在开始试验的 0.5,1.0,2.0,4.0,8.0,12.0,24.0,36.0,48.0 h 时各取样 1 mL,用 HPLC 法测定苦参碱的药物浓度,计算 3 组样品在不同时间点累积释药分数,结果见图 1。可见,苦参碱在最初的 0.5 h 释放已达 70.72%,释药曲线在 8.0 h 后趋于稳定;而 HA-MA 脂质体和苦参碱脂质体无明显突释现象,8.0 h 累积释放度分别为 58.83% 和 55.78%;48.0 h 时,HA-MA 脂质体和苦参碱脂质体的累积释放度分别为 88.32% 和 61.63%。因此,HA-MA 脂质体和苦参碱脂质体的释放曲线相似,且与游离药物相比有一定缓释作用。

2.4 HA-MA 脂质体抑瘤试验

用生理盐水稀释 H22 肝癌细胞株至适宜密度 (2 $\times$ 10⁶ 个/mL),接种于小鼠右腋窝皮下(接种量为 0.2 mL/只)。将 75 只裸鼠分为肿瘤模型组、阳性对照组、MA 组、MA 脂质体组和 HA-MA 脂质体组,各 15 只(肿瘤模型组及 MA 组小鼠后各死亡 1 只,实际纳入 14 只)。均于接种次日开始尾静脉注射给药,1 次/日,

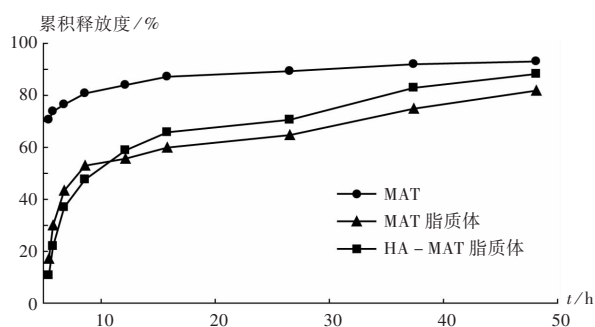


图1 HA-MA的体外释放曲线

连续给药14 d。分别给予生理盐水、环磷酰胺溶液(10 mg/kg)、苦参碱溶液(10 mg/kg)、苦参碱脂质体(苦参碱含量为10 mg/kg)、HA-MA脂质体(苦参碱含量为10 mg/kg),注射体积为每只0.2 mL。

给药完毕处死小鼠,摘取肿瘤,称量瘤体质量。按公式(抑瘤率 = 1 - 治疗组的平均瘤体质量 / 模型组的平均瘤体质量 × 100%)计算抑瘤率,用SPSS 18.0统计学软件分析。由表3可知,苦参碱、苦参碱脂质体及HA-MA脂质体均可抑制肿瘤的生长,其中HA-MA脂质体的抑瘤率为59.60%,与阳性对照药物环磷酰胺效果相近,均明显高于苦参碱脂质体和苦参碱。结果表明,经过透明质酸修饰的苦参碱脂质体对H22肝癌小鼠肿瘤的抑制效果较明显。

表3 5组药物对H22肝癌小鼠的抑制作用

组别	剂量 (mg/kg)	瘤体质量 ($\bar{X} \pm s, g$)	抑瘤率 (%)
肿瘤模型组($n=14$)	-	4.01 ± 0.67	-
阳性对照组($n=15$)	10	$1.45 \pm 0.43^{\#}$	63.84
MA组($n=14$)	10	$2.79 \pm 0.58^{\#}$	30.42*
MA脂质体组($n=15$)	10	$2.36 \pm 0.41^{\#}$	41.15
HA-MA脂质体组($n=15$)	10	$1.62 \pm 0.39^{**}$	59.60

注:与肿瘤模型组比较,* $P<0.05$;与阳性对照组比较,** $P<0.01$ 。肿瘤模型组及MA组小鼠各死亡1只,剔出试验。

3 讨论

随着研究的深入,越来越多的中药天然有效成分及其提取物被发现有助于治疗肿瘤等疾病,且不良反应少,不易产生抗药性^[9]。苦参碱对多种肿瘤有抑制作用,其机制主要为抑制肿瘤细胞增殖和诱导分化、抗肿瘤细胞黏附和浸润转移。由于苦参碱的抗肿瘤作用机制极其复杂,特别是诱导分化与凋亡、抗血管新生的机制尚未清楚,因此,还需要大量的基础和临床研究,以进一步评估其有效性及联合用药的功效^[10]。

本试验中将苦参碱制备成脂质体,可达到缓释、长效及被动靶向的目的,然而未经修饰的脂质体进入人体内主要被人体网状内皮系统吞噬,有一定的系统靶向性,但器官靶向性差。透明质酸可通过与细胞表面透明

质酸受体CD44和RHAMM结合,调节细胞的生长、增殖和迁移,尤其在肿瘤细胞的侵袭和转移中发挥重要作用,其中CD44最重要,是与透明质酸结合的主要部位^[11]。透明质酸具有良好的生物相容性、低免疫原性等优势,作为药物载体或靶向配体,近年来已成为治疗肿瘤的研究热点。透明质酸对脂质体进行表面修饰可提高脂质体的稳定性,减少脂质体被体内的网状内皮系统吞噬,增加脂质体在人体血液中的循环时间,从而增强肿瘤靶向性^[12]。

本试验中通过制备方法比较和正交试验,确定了HA-MA脂质体的制备方法和最佳处方,并通过体外释放试验证实其有缓释作用。对H22肝癌小鼠的抑瘤试验结果表明,HA-MA脂质体的抑瘤率与环磷酰胺效果相近,证实由于脂质体的包载及透明质酸配体的主动靶向作用,提高了苦参碱的生物利用度,增强了抗肿瘤效果,有望成为一种新型抗肿瘤靶向制剂。

参考文献:

- [1] 刘晶晶,牟艳玲. 苦参碱抗肿瘤作用机制的研究进展[J]. 中国药房,2017,28(19):2707-2711.
- [2] 常城,饶德利,邱晓明,等. 苦参碱对结肠癌HT29细胞生长抑制作用的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志,2014,34(1):62-65.
- [3] 周炳刚,魏昌晟,张硕,等. 苦参碱对人乳腺癌MCF-7/ADR细胞裸鼠移植生长及磷酸肌醇3激酶/蛋白激酶B信号通路凋亡因子的影响[J]. 中华实验外科杂志,2017,34(12):2098-2101.
- [4] 马玲娣,张彦,何於娟,等. 苦参碱对小鼠H22肝癌细胞凋亡作用的实验研究[J]. 肿瘤,2007,27(8):602-606.
- [5] 李海龙,陈兆峰,刘敏,等. 苦参碱对胃癌SGC7901/DDP细胞耐药相关miRNA表达的影响和靶点分析[J]. 中国老年学杂志,2015,35(17):4746-4748.
- [6] 李秀英,曾凡,赵曜,等. 脂质体药物递送系统的研究进展[J]. 中药药理与临床,2014,23(16):1904-1911.
- [7] 李祥,杜俊,向小四,等. 脂质体在抗肿瘤药物中的应用研究进展[J]. 中南药学,2012,10(4):290-294.
- [8] 赖滢滢,王岩,张英丰. 星点设计-效应面法进行蛇床子素脂质体处方优化的研究[J]. 中国新药杂志,2015,24(6):708-712.
- [9] 白云,刘萍,贾博宇,等. 中药抗肿瘤作用的研究进展[J]. 中国药师,2014,17(8):1406-1409.
- [10] 刘海艳. 苦参碱抗肿瘤机制及其研究进展[J]. 国际输血及血液学杂志,2015,38(3):270-273.
- [11] 蒲嘉琪,易芳莲,栗立标. 于透明质酸抗肿瘤药物载体的研究进展[J]. 医药前沿,2016,6(29):12-13.
- [12] 邱丽筠,黄丽丽,俞淑文. 透明质酸在肿瘤治疗药物新型给药系统中的应用[J]. 中国实用医药,2014,9(16):238-241.

(收稿日期:2018-04-16)