

甘草次酸修饰的人参皂苷 Rh₂ 脂质体的 制备及其体外评价

王琳¹, 杨智钧², 向敏¹, 吴纪凯¹, 方晨²

(1. 苏州卫生职业技术学院, 江苏 苏州 215009; 2. 香港浸会大学 中医药学院, 香港 999077)

[摘要] 目的: 制备由甘草次酸修饰的人参皂苷 Rh₂ 脂质体, 评价其体外理化性质和对人肝癌细胞 SMMC-7721 的生长抑制作用。方法: 采用薄膜分散法制备普通的人参皂苷 Rh₂ 脂质体 (Rh₂-L) 和甘草次酸修饰的人参皂苷 Rh₂ 脂质体 (GA-Rh₂-L), 利用 UPLC 测定人参皂苷 Rh₂ 的含量, 流动相乙腈-水 (28: 72), 流速 0.3 mL·min⁻¹, 检测波长 203 nm。考察脂质体的包封率、粒径、体外释放率及 Zeta 电位, 运用噻唑蓝 (MTT) 法评价人参皂苷 Rh₂ 溶液、Rh₂-L 和 GA-Rh₂-L 对 SMMC-7721 细胞体外增殖的抑制作用。结果: 与 Rh₂-L 相比, GA-Rh₂-L 的包封率、粒径、体外释放率及 Zeta 电位等理化性质均无显著性差异。Rh₂-L 和 GA-Rh₂-L 的包封率分别为 (91.67 ± 1.05) %、(95.54 ± 2.23) %, 粒径 (138.6 ± 45.8)、(146.5 ± 48.9) nm, Zeta 电位 - (12.75 ± 0.34)、- (14.79 ± 0.67) mV, 72 h 的体外释放率 (84.67 ± 7.23) %、(89.03 ± 8.61) %。人参皂苷 Rh₂ 溶液在 12 h 内释药率达 (91.23 ± 5.17) %。细胞用药 2 d 后, GA-Rh₂-L 对 SMMC-7721 的半抑制率 (IC₅₀) 分别为人参皂苷 Rh₂ 和 Rh₂-L 的 0.524、0.596 倍, 并呈浓度和时间以依赖关系。结论: 甘草次酸修饰不会影响人参皂苷 Rh₂ 脂质体得理化性质, 还可增加其对细胞的靶向性, 增加了细胞毒性, 为肝肿瘤的靶向治疗提供了新思路。

[关键词] 甘草次酸; 人参皂苷 Rh₂; 脂质体; 肝肿瘤; 薄膜分散法

[中图分类号] R283.6; R944.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)05-0029-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015050029

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150112.1453.008.html>

[网络出版时间] 2015-01-12 14:53

Preparation and *in vitro* Evaluation of Ginsenoside Rh₂ Liposomes Surface-modified with Glycyrrhetic Acid WANG Lin¹, YANG Zhi-jun², XIANG Min¹, WU Ji-kai¹, FANG Chen² (1. Suzhou Health College, Suzhou 215009, China; 2. School of Chinese Medicine, Hongkong Baptist University, Hongkong 999077, China)

[Abstract] **Objective:** To encapsulate ginsenoside Rh₂ within glycyrrhetic acid modified liposomes and investigate its physicochemical properties and *in vitro* inhibitory effect on SMMC-7721 cells. **Method:** Ginsenoside Rh₂ liposomes (Rh₂-L) and ginsenoside Rh₂ liposomes surface-modified with glycyrrhetic acid (GA-Rh₂-L) were prepared by film dispersion method, UPLC was employed to determine the content of ginsenoside Rh₂ with mobile phase of acetonitrile-water (28: 72), flow rate of 0.3 mL·min⁻¹ and detection wavelength at 203 nm. Encapsulation efficiency (EE), particle size, Zeta potential and *in vitro* release were measured, MTT experiment was adopted to evaluate inhibitory effect of ginsenoside Rh₂ solution, Rh₂-L and GA-Rh₂-L on SMMC-7721 cells. **Result:** Modification of glycyrrhetic acid showed no effect on physicochemical properties of Rh₂-L, such as EE, particle size, Zeta potential and *in vitro* release. EE of Rh₂-L and GA-Rh₂-L were (91.67 ± 1.05) % and (95.54 ± 2.23) %, average particle size of them were (138.6 ± 45.8) nm and (146.5 ± 48.9) nm, Zeta potential of them were - (12.75 ± 0.34) mV and - (14.79 ± 0.67) mV, respectively. *In vitro* release of ginsenoside Rh₂ from Rh₂-L and GA-Rh₂-L within 72 h were (84.67 ± 7.23) % and (89.03 ± 8.61) %, while ginsenoside Rh₂ solution released (91.23 ± 5.17) % within 12 h. *In vitro* cytotoxicities (IC₅₀) of GA-Rh₂-L on SMMC-7721 cells was increased by 0.524 fold compared with ginsenoside Rh₂ solution and 0.596 fold compared with Rh₂-L. Ginsenoside Rh₂ solution, Rh₂-L and GA-Rh₂-L all inhibited proliferation of SMMC-7721 cells in dose-and-time-dependent

[收稿日期] 20131112(009)

[基金项目] 江苏省优秀骨干教师境外研修项目

[第一作者] 王琳 硕士, 讲师, 从事中药复方及制剂研究, Tel: 0512-62600370, E-mail: wanglinlinda@126.com

manners. **Conclusion:** Glycyrrhetic acid modification can not affect physicochemical properties of Rh₂-L, and it can increase targeting efficiency of liposomes on hepatocellular carcinoma, thus resulting in higher cytotoxicities in comparison with Rh₂-L. This study provides new ideas for targeted-therapy to hepatocellular carcinoma.

[Key words] glycyrrhetic acid; ginsenoside Rh₂; liposomes; hepatocellular carcinoma; film dispersion method

人参皂苷 Rh₂ 能有效抑制多种肝肿瘤细胞的增殖,增加肿瘤细胞的凋亡,并诱导其骨架发生变化^[1-3]。但人参皂苷 Rh₂ 生物利用率低^[4],文献报道将生物利用度低的药物包封于脂质体中,可防止药物在体内快速降解,延缓药物释放而延长药物在体内的作用时间,如果将脂质体经过适当修饰,还能增加药物对靶区的指向性,降低对正常细胞的毒性,提高药物生物利用度^[5-6]。肝癌多发生于肝实质细胞,研究证实该细胞表面存在大量的甘草次酸(glycyrrhetic acid, GA)特异性结合位点^[7],脂质体经甘草次酸修饰后,借助活体成像系统检测,药物的肝靶向指数明显提高^[8]。为了提高人参皂苷 Rh₂ 脂质体(ginsenoside Rh₂ liposome, Rh₂-L)的主动靶向性,拟通过化学合成的方法将甘草次酸连接在脂质体表面,利用肝细胞表面 GA 结合位点的介导,以提高脂质体对肝癌细胞的靶向效率。本实验采用薄膜蒸发法制备人参皂苷 Rh₂ 普通脂质体(Rh₂-L)和 GA 修饰人参皂苷 Rh₂ 脂质体(GA-modified ginsenoside Rh₂ liposome, GA-Rh₂-L),比较这2种脂质体的特性及体外释放差异,通过人肝癌 SMMC-7721 细胞毒性试验初步研究两类人参皂苷 Rh₂ 脂质体的体外抗肿瘤效果,为肝脏疾病的靶向性治疗提供参考。

1 材料

Acquity 型超高效液相(美国沃特世公司), Delsa Nano HC 型粒径测定仪(美国贝克曼库尔特有限公司), NU-4750E 型 CO₂ 培养箱(美国 Nuair 公司), CMS GmbH 型倒置显微镜(德国 Leica 公司), 5417R 型高速离心机(德国 Eppendorf 公司), MaxQ4000 型空气摇床(美国 Barnstead/Lab-Line 公司), Lipex 型脂质体挤出器(加拿大 Northern Lipids 公司), Benchmark Plus 型连续光谱酶标仪(美国 BIO-RAD 公司)。透析袋(截留相对分子质量14 000, 美国 Spectrum 公司), 甘草次酸、人参皂苷 Rh₂(南京泽朗医药科技股份有限公司,批号分别为 20120907-001 20110207-010), 大豆卵磷脂、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000(DSPE-mPEG2000, 美国 Avanti Polar Lipids 公司), 胆固醇(美国 Sigma 公司),

葡聚糖凝胶 G-50(sephadex G-50, 美国 Pharmacia 公司), 人肝癌细胞株 SMMC-7721(上海睿星基因技术有限公司), RPMI-1640 培养基、小牛血清 FBS 和噻唑蓝(MTT)试剂(加拿大 Invitrogen 公司), 水为自制纯化水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 脂质体的制备 采用薄膜蒸发法制备人参皂苷 Rh₂ 普通脂质体(Rh₂-L)。精密称取处方量大豆卵磷脂、胆固醇、人参皂苷 Rh₂, 分别为 225, 15, 8 mg, 充分溶解于 6 mL 混合溶媒[三氯甲烷-甲醇(1:1)]中,转移至 500 mL 圆底烧瓶中,于 50 ℃ 减压旋转 40~45 min 直至彻底挥去有机溶媒,用锡纸封住圆底烧瓶,用玻璃棒在锡纸上扎几个洞,置于 50 ℃ 真空干燥箱中过夜;精密量取 50 ℃ 的 PBS 液(pH 7.4) 10 mL 注入已真空干燥过的圆底烧瓶中,于 50 ℃ 水浴中旋转水化,磁力搅拌 50~60 min,运用脂质体挤出器分别通过 0.2, 0.1 μm 水不溶性滤膜各 2 次,经 0.08 μm 滤膜 6 次,得乳白色澄清液体,置于 4 ℃ 冰箱中备用,得 Rh₂-L。

称取处方量大豆卵磷脂、胆固醇、甘草次酸(GA, 15 mg)、人参皂苷 Rh₂ 和 DSPE-mPEG2000(5 mg),同法制备 GA 修饰的人参皂苷 Rh₂ 脂质体(GA-Rh₂-L),置于在水中浸泡过夜的透析袋中,置于水中透析过夜,收集透析袋内 GA-Rh₂-L,放入 4 ℃ 冰箱中备用。同法制备空白脂质体,即不加入人参皂苷 Rh₂。

2.2 脂质体粒径和外貌形态的观察 分别取 Rh₂-L 和 GA-Rh₂-L 各 100 μL,加 PBS 缓冲液稀释至 2 mL,混匀,采用激光散射粒径测定仪测得粒径分别为(138.6 ± 45.8), (146.5 ± 48.9) nm, Zeta 电位分别为-(12.75 ± 0.34), -(14.79 ± 0.67) mV。采用磷钨酸钠溶液对脂质体进行染色,透射电镜下观察脂质体形态,见图 1,结果显示 Rh₂-L 和 GA-Rh₂-L 均呈圆球状,前者边缘整齐,表面光滑,后者表面有许多甘草次酸附着体,故 GA-Rh₂-L 的粒径较前者增加了 8 nm。

2.3 人参皂苷 Rh₂ 的含量测定

2.3.1 色谱条件 Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱

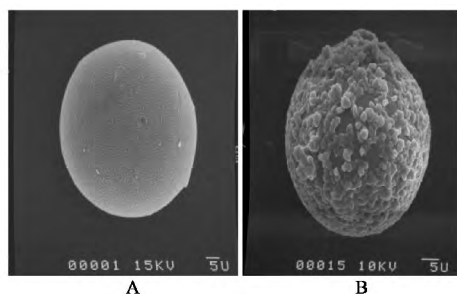
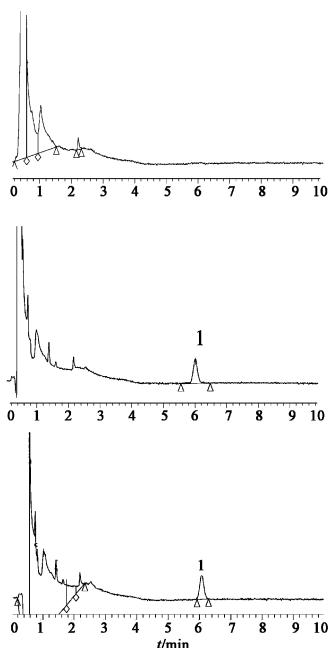


图 1 人参皂苷 Rh₂ 普通脂质体 (A) 和经甘草次酸修饰的脂质体 (B) 粒径形态

Fig. 1 Particle morphology of Rh₂-L (A) and GA-Rh₂-L (B)

(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm), 流动相 乙腈-水 (28:72), 进样量 10 μL, 流速 0.3 mL·min⁻¹ 检测波长 203 nm, 柱温 30 °C, 见图 2。



A. 空白脂质体; B. 对照品; C. 供试品; 1. 人参皂苷 Rh₂

图 2 经甘草次酸修饰的人参皂苷 Rh₂ 脂质体 UPLC

Fig. 2 UPLC chromatogram of GA-Rh₂-L

2.3.2 标准曲线 精密称取人参皂苷 Rh₂ 对照品约 10 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 加破膜剂 [无水乙醇-异丙醇 (1:4)] 溶解并定容至刻度, 混匀, 得储备液。精确量取储备液 1, 2, 4, 6, 8, 10 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加破膜剂定容, 得系列对照品溶液。以空白脂质体为对照, 在 203 nm 处测定吸光度 (A), 以 A 对质量浓度 (C) 进行线性回归, 得回归方程 $A = 2.041.8C + 76.651$ ($r = 0.9997$), 线性范围 10 ~ 100 mg·L⁻¹。最低检测量 (S/N = 10) 和最低检测限 (S/N = 3) 分别为 20 μg。另制备高、中、低质

量浓度的样品溶液, 按 2.3.1 项下色谱条件测定日内精密度 ($n = 6$) 的 RSD 分别为 2.0%, 1.5%, 2.1%, 日间精密度 ($n = 6$) 的 RSD 分别为 2.0%, 1.7%, 2.1%; 平均加样回收率 (97.34 ± 2.54) %。

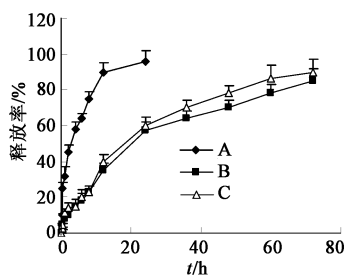
2.4 包封率的测定^[9] 采用离心超滤法分离游离药物和含药脂质体。精密吸取脂质体 0.5 mL 置于 1.5 mL 超滤管中, 使用高速冷冻离心机在 4 °C, 16 400 r·min⁻¹ 离心 45 min, 取下层, 加入破膜剂 5 mL 稀释后测定药物含量。另取同批次的脂质体 0.5 mL 用破膜剂定容至 5 mL, 按 2.3.1 项下色谱条件测定药物总含量。按照《中国药典》2010 年版中相关规定, 计算 Rh₂-L 和 GA-Rh₂-L 的包封率分别为 (91.67 ± 1.05) % (95.54 ± 2.23) %。

2.5 体外释放度考察^[10-11] 精密吸取 Rh₂-L, GA-Rh₂-L 和 0.8 g·L⁻¹ 游离人参皂苷 Rh₂ 溶液各 5 mL, 分别加入 3 个透析袋内, 两端夹紧后分别置于盛有 PBS 液 (pH 7.4) 50 mL 的具塞锥形瓶中, 在 37 °C 恒温摇床中以 50 r·min⁻¹ 的速率持续振摇, 分别于 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72 h 取透析液 1 mL, 同时补充相同体积和温度的 PBS 缓冲液。72 h 时取出全部的脂质体溶液, 加入破膜剂 5 mL, 记为无穷时间的释药量。将样品注入 UPLC 分析, 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 计算人参皂苷 Rh₂ 释放率 (F)。

$$F = \frac{C_n \times V + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \times V_i}{Q_{\text{总}}} \times 100\%$$

$Q_{\text{总}}$ 为透析袋内的初始总药物量 (4 mg), C_n 为指定时间点测得的释放介质中药物浓度, V 为释放池的总体积; C_i 为上一个指定时间点测得的释放介质中药物浓度, V_i 为取样体积。以 t 为横坐标, F 为纵坐标, 绘制 Rh₂-L, GA-Rh₂-L 和游离人参皂苷 Rh₂ 溶液的体外释放曲线, 见图 3。结果显示 Rh₂-L 和 GA-Rh₂-L 的释放情况基本相似, 72 h 内的累积释放量分别为 (84.67 ± 7.23) % (89.03 ± 8.61) %, 在 12 h 内释药均 < 40%; 而游离人参皂苷 Rh₂ 在 12 h 内释药率达 (91.23 ± 5.17) %, 说明人参皂苷 Rh₂ 经脂质体包封后能延缓药物的释放, 且脂质体表面经 GA 修饰后并未影响到体外释放速率。

2.6 人肝癌 SMMC-7721 细胞抑制试验^[3, 12] 选取指数生长期的人肝癌细胞株 SMMC-7721 用 0.5% 胰酶消化成细胞悬液, 按 5×10^4 个/mL 的密度接种于 96 孔板, 每孔加入细胞混悬液 100 μL, 在 5% CO₂ 37 °C 培养箱中培养 1 d 后换液, 加药。试验设



A. 游离人参皂苷 Rh_2 ; B. 人参皂苷 Rh_2 普通脂质体; C. GA 修饰的人参皂苷 Rh_2 脂质体

图 3 游离人参皂苷 Rh_2 及其脂质体的体外释放曲线($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 3 In vitro release profiles of ginsenoside Rh_2 solution, Rh_2 -L and GA- Rh_2 -L($\bar{x} \pm s, n=5$)

置空白组及 $0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 游离人参皂苷 Rh_2 溶液组, Rh_2 -L 组, GA- Rh_2 -L 组, 各组依次设计 5 个终质量浓度($5, 10, 20, 30, 40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 每个质量浓度设置 3 个复孔, 置于培养箱中, 每 2 d 换液 1 次, 处理 2, 4, 6 d 后采用 MTT 法测定 570 nm 处各孔的 A, 按 $(1 - A_{\text{样品}}/A_{\text{空白}}) \times 100\%$ 计算细胞生长抑制率。将每个样品组的细胞抑制率用统计软件 Graph pad prism5 计算半抑制率(IC_{50})。结果显示人参皂苷 Rh_2 , Rh_2 -L 和 GA- Rh_2 -L 均对 SMMC-721 细胞有生长抑制作用, 并呈浓度和时间依赖关系。细胞用药 2 d 后, GA- Rh_2 -L 的 IC_{50} 分别是人参皂苷 Rh_2 和 Rh_2 -L 的 0.524, 0.596 倍; 用药 4 d 后, GA- Rh_2 -L 的 IC_{50} 分别是人参皂苷 Rh_2 和 Rh_2 -L 的 0.592, 0.629 倍; 用药 6 d 后, GA- Rh_2 -L 的 IC_{50} 分别是人参皂苷 Rh_2 和 Rh_2 -L 的 0.60, 0.65 倍。说明人参皂苷 Rh_2 制成普通脂质体后对 SMMC-721 细胞的毒性增强, 但效果不是特别明显, 当脂质体表面被 GA 修饰后靶向性显著增强, 对 SMMC-721 细胞的生长起到了明显的抑制作用。

表 1 游离人参皂苷 Rh_2 及其脂质体对人肝癌细胞 SMMC-721 的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effects of ginsenoside Rh_2 solution, Rh_2 -L and GA- Rh_2 -L on SMMC-721 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

制剂	$IC_{50} / \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$		
	2 d	4 d	6 d
人参皂苷 Rh_2	29.32 ± 0.34	22.99 ± 1.07	19.38 ± 0.25
Rh_2 -L	$25.81 \pm 0.72^{1)}$	21.64 ± 0.43	17.87 ± 1.30
GA- Rh_2 -L	$15.37 \pm 0.97^{2, 4)}$	$13.61 \pm 0.81^{2, 4)}$	$11.62 \pm 1.28^{2, 3)}$

注: 与 人参皂苷 Rh_2 相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 Rh_2 -L 相比³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

3 讨论

GA- Rh_2 -L 的包封率略高于 Rh_2 -L, 原因可能是因为前者制备时较后者多了一步操作, 即将 GA-

Rh_2 -L 放入透析袋中浸泡过夜以去除多余的甘草次酸, 这一操作会将一部分游离的人参皂苷 Rh_2 去掉, 从而提高了包封率。因为 GA 带有负电性, 当其修饰在脂质体表面时就会影响 GA- Rh_2 -L 的带电性, 使其 Zeta 电位略低于 Rh_2 -L。由于 GA 用量很少, 仅占脂质总量的 6.5%, 所以产生影响其实很小, 这也能从 2 种脂质体的体外释放曲线得以证实。本文将人参皂苷 Rh_2 制成 GA 修饰脂质体, 借助肝肿瘤细胞表面的 GA 结合位点, 使 GA 与其结合后能特异性地将脂质体包裹的人参皂苷 Rh_2 导入细胞内, 抑制肿瘤细胞的生长, 提示 GA 修饰脂质体在抗肝癌方面具有良好前景。

[参考文献]

- [1] Park H M, Kim S J, Kim J S, et al. Reactive oxygen species mediated ginsenoside Rg_3 - and Rh_2 -induced apoptosis in hepatoma cells through mitochondrial signaling pathways [J]. Food Chem Toxicol, 2012, 50 (8): 2736-2741.
- [2] 王华, 周滨, 郭星, 等. 人参皂苷 Rh_2 对肝癌 SMMC-7721 细胞增殖和细胞骨架的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(6): 1226-1229.
- [3] 樊光华, 姜浩, 欧文胜. 人参皂苷- Rh_2 诱导人肝癌 Bel-7404 细胞凋亡的作用 [J]. 实用癌症杂志, 2003, 18(1): 16-18.
- [4] 顾轶, 王广基, 孙建国, 等. LC-MS 法测定 Beagle 犬血浆中人参皂苷 20(R)- Rh_2 及其药代动力学研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11(3): 256-260.
- [5] 崔召元, 孙勇. 配体修饰脂质体的研究进展 [J]. 中国药房, 2012, 23(41): 3924-3926.
- [6] 王琳, 蔡宝昌, 李伟东, 等. 马钱子碱长循环脂质体的制备和质量评价 [J]. 中国药理学杂志, 2006, 41(18): 1397-1400.
- [7] Salvi M, Fiore C, Armanini D, et al. Glycyrrhetic acid-induced permeability transition in rat liver mitochondria [J]. Biochem Pharmacol, 2003, 66(12): 2375-2379.
- [8] 吴超, 郭伟英. 甘草次酸衍生物修饰去甲斑蝥素脂质体在小鼠体内肝靶向性研究 [J]. 辽宁医学院学报, 2008, 29(6): 490-493.
- [9] 施晓琴, 赵继会, 王志东, 等. 醇质体在经皮给药方面的应用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(12): 352-355.
- [10] 齐滨, 刘莉, 张楠楠, 等. 西洋参 SOD 脂质体的制备工艺优选和性质评价 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(18): 17-19.
- [11] 胡戴. K237 修饰的紫杉醇长循环靶向脂质体的制备及体外评价 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2013.
- [12] 曾小莉, 涂植光. 人参皂苷 Rh_2 对人肝癌细胞 SMMC-7721 的诱导分化作用 [J]. 癌症, 2004, 23(8): 879-884.

[责任编辑 刘德文]