

人参皂苷 Rg3 纳米晶体的制备及抗肿瘤作用*

谢燕瑾 俞婷婷 楼炜

(浙江中医药大学附属第三医院西药药剂科 杭州 310001)

摘要 目的 比较人参皂苷 Rg3 纳米晶体和市售剂型(参一胶囊)对人肝癌 HepG₂ 和人肺癌 A549 肿瘤细胞株的体外抗肿瘤活性。方法 采用沉淀法与高压均质法联用技术制备人参皂苷 Rg3 纳米晶体,透射电镜对纳米晶体粒径及稳定性进行考察;噻唑蓝(MTT)法评价纳米晶体和参一胶囊对 HepG₂ 和 A549 肿瘤细胞的抗肿瘤作用。结果 所制备的人参皂苷 Rg3 纳米晶体平均粒径(284±14) nm,多分散系数为 0.156±0.007。纳米晶体与参一胶囊对 HepG₂ 细胞的半抑制浓度(IC₅₀)分别为(65.59±3.62) (97.64±10.48) μg·mL⁻¹;对 A549 细胞的 IC₅₀ 分别为(56.36±2.14) (83.26±7.44) μg·mL⁻¹,均差异有统计学意义(P<0.01)。结论 运用沉淀法与高压均质法联用技术制备所得的人参皂苷 Rg3 纳米晶体多分散系数理想且粒径较小,稳定性良好。人参皂苷 Rg3 纳米晶体对 HepG₂ 肝癌细胞与 A549 肺癌细胞的抗肿瘤活性较参一胶囊高,且在高浓度时,对 HepG₂ 肝癌细胞与 A549 肺癌细胞抗肿瘤活性更高。

关键词 人参皂苷 Rg3; 纳米晶体; HepG₂ 细胞; A549 细胞; 抗肿瘤

中图分类号 R286; R965

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2016)11-1186-04

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2016.11.007

Preparation and Assessment of the Antitumor Effect of Ginsenoside Rg3 Nanocrystals

XIE Yanjin, YU Tingting, LOU Wei (The Third Affiliated Hospital of Zhengjiang Chinese Medical University, Hangzhou 310001, China)

ABSTRACT Objective To investigate the inhibitory effects of ginsenoside Rg3 nanocrystals and Shen-yi capsule against the proliferation of A549 and HepG₂ cells *in vitro*. **Methods** The ginsenoside Rg3 nanocrystals were prepared by precipitation combined with high pressure homogenization technique. Particle size and polydispersity index were measured by TEM, and MTT assay was performed to evaluate the inhibitory effects of ginsenoside Rg3 nanocrystals and Shen-yi capsule on A549 and HepG₂ cells. **Results** The average particle size of ginsenoside Rg3 nanocrystals was (284±14) nm, and the PI was 0.156±0.007. The IC₅₀ values of nanocrystals and Shen-yi capsule in HepG₂ cells were (65.59±3.62) and (97.64±10.48) μg·mL⁻¹. They were (56.36±2.14) and (83.26±7.44) μg·mL⁻¹ in A549 cells. The differences were significant (P<0.01). **Conclusion** Ginsenoside Rg3 nanocrystals prepared by precipitation combined with high pressure homogenization technique had a small particle size, an ideal polydispersity coefficient and a better stability. In contrast to Shen-yi capsule, Ginsenoside Rg3 nanocrystals showed higher anti-tumour activities *in vitro*. There was a significant difference between two groups at high dosages. Ginsenoside Rg3 showed a higher anti-proliferative activity in A549 than in HepG₂ cells.

KEY WORDS Ginsenoside Rg3; Nanocrystals; HepG₂ cell; A549 cell; Antitumor

人参皂苷 Rg3 为已分离得到的八十多种人参皂苷中抗肿瘤作用最显著的皂苷,能够诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞生长、侵袭和转移等,并有抗病毒、增强机体免疫力及抗脂质过氧化等广泛药理作用^[1-2]。但人参皂苷 Rg3 在水中溶解度小,存在溶出速度慢、口服吸收差及生物利用度低等缺点,有报道称口服人参皂苷 Rg3 0.8 mg·kg⁻¹ 后最大血药浓度仅(4.4±0.8) μg·L⁻¹,生物利用度 2.63%^[3],近年来有学者对人参皂苷 Rg3 剂型进行改造,包括固体分散体、微乳制剂、脂质体等,以期改善人参皂苷 Rg3 生物利用度,

提高其抗肿瘤效果,但笔者尚未见有关人参皂苷 Rg3 纳米材料报道。纳米晶体药物是将纯药物形成亚微米颗粒的胶状分散体系,依靠电荷保护剂和立体保护剂维持稳定^[4]。该剂型药物无需载体材料,具有分散性好、稳定性高等优点,不论是难溶于水的药物,还是既难溶于水又难溶于油的药物,都可以通过纳米晶体技术提高低溶解度药物的口服生物利用度,也可以悬浮于水中(纳米混悬剂)用于静脉注射^[5-7]。或者冻存后制成纳米晶体冻干粉进行保存。如将羟基喜树碱制成纳米混悬液后提高了对人肝癌 SMMC-7221 细胞的抑制和杀伤作用^[8]。故从目前的研究现状来看,把人参皂苷 Rg3 制成纳米晶体能够解决普通剂型生物利用度差的缺点,并且又优于脂质体等纳米载体药物,具有很深远的研究意义。笔者在本研究运用沉淀法与高压均质法联用技术制备人参皂苷 Rg3 纳米晶体,对其纳

收稿日期 2015-09-05 修回日期 2015-10-12

基金项目 * 浙江中医药大学附属第三医院院级课题 (ZS14CA08)

作者简介 谢燕瑾(1987-),女,浙江富阳人,药师,硕士,从事抗肿瘤药物研究。E-mail: yanjin.xz@163.com。

米晶体粒径及稳定性进行考察,评价其对肿瘤细胞的抑制作用,为新剂型的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂 人参皂苷 Rg3 原料药(南京森贝伽生物科技有限公司,HPLC 法测得含量 $\geq 98\%$,批号: SBJ141208),参一胶囊(以人参皂苷 Rg3 为单一成分的制剂,吉林亚泰制药股份有限公司,规格:每粒 10 mg,批号: 20140704);泊洛沙姆 188(批号: SBJ141128)和甘露醇(批号: SBJ141120),南京森贝伽生物科技有限公司;甲醇(批号: WXBC1015V)和乙腈(批号: WXBC1011V)均为 HPLC 级,美国 Sigma 公司提供;噻唑盐(MTT,美国 Sigma 公司);DMEM 细胞培养基(批号: AAF202144)和胎牛血清(批号: NZJ1221),美国 HyClone 公司提供;HepG₂肝癌和 A549 肺癌肿瘤细胞株,浙江工业大学生物环境学院提供。

1.2 仪器与设备 NanoGenizer 高压均质机(苏州微流纳米生物技术有限公司);85-1 磁力搅拌器(杭州仪表电机有限公司);超低温冰箱(中科美菱低温科技股份有限公司);冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司);Nicom380 Z3000 激光粒度仪(苏州微流纳米生物技术有限公司);Shimadzu UFLC 液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司);Multiskan MK3 型酶标仪和 Revco Elite II 型二氧化碳(CO₂)培养箱(奥赛飞世尔科技公司);CK40 型倒置显微镜(Olympus 公司);HR2400 型冷冻离心机(天美科学仪器有限公司)。

1.3 HepG₂肝癌和 A549 肺癌肿瘤细胞株的培养 取对数生长期的 HepG₂和 A549 细胞株,用新鲜 10% 全培养基配成 5×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 细胞悬液,每孔 100 μL ,即每孔 5 000 个,接种于 96 孔细胞培养板,板四周用磷酸盐缓冲液(PBS)填充,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱中过夜,待细胞贴壁后进行实验。

1.4 人参皂苷 Rg3 纳米晶体的制备 称取人参皂苷 Rg3 原料药 60 mg,溶于甲醇 2.4 mL 作为有机相;300 mg 泊洛沙姆 188 溶于纯化水 30 mL 制备水相;在室温下将药物溶液有机相滴加到搅拌下的水相中制成粗混悬液,再置于高压均质机,在 28 MPa 压强下循环 4 次,48 MPa 压强下循环 10 次制得纳米混悬液。将制得的纳米晶体混悬液 20 mL 与甘露醇 0.5 g(2.5%, W/V $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)放入 100 mL 塑料烧杯,溶解后用保鲜膜覆盖烧杯口,并用细针在保鲜膜上刺 20 个小孔,置 -80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中预冻 12 h,再移入冷冻干燥机中冷冻干燥 40 h,制得人参皂苷 Rg3 纳米冻干粉保存。

1.5 纳米晶体的粒径和稳定性测定 激光粒度仪对人参皂苷 Rg3 纳米晶体混悬液及冻干粉的粒径及多

分散系数进行表征,并将混悬液在 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 条件下放置 1 周、1 个月后考察其稳定性。纳米晶混悬液不经稀释直接测定,冻干粉用适量纯化水复溶后测定,每个样品均测定 3 次,求均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)^[9]。

1.6 纳米晶体中主药的含量测定 采用 HPLC 法测定并绘制人参皂苷 Rg3 标准曲线,称取一定量人参皂苷 Rg3 纳米冻干粉,甲醇溶解,测得峰面积,计算主药含量^[10]。

1.7 人参皂苷 Rg3 纳米晶体体外抗肿瘤活性测定 采用 MTT 法,选用 HepG₂肝癌和 A549 肺癌肿瘤细胞株评价抗肿瘤作用。取参一胶囊一粒(相当于 10 mg 人参皂苷 Rg3),先用甲醇溶解,再用培养基稀释至一定浓度,称取 0.054 5 g 人参皂苷 Rg3 纳米冻干粉(相当于 2 mg 人参皂苷 Rg3),用培养基稀释至相同浓度。用移液枪小心吸弃 96 孔板孔内的培养上清液,分别设置人参皂苷 Rg3 纳米晶混悬液组、参一胶囊组、药物辅料组、正常对照组(不加药物,但加入等容积细胞悬液)和空白对照组(不含细胞)。每组设 4 个复孔,加入试液 100 μL ,加药后继续置于培养箱中培养 48 h 后取出,倒置显微镜观察肿瘤细胞形态学变化,并进行 MTT 检测。向每孔加入 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ MTT 溶液 20 μL ,继续培养 4 h 后终止培养,用移液枪小心吸弃孔内培养上清液,每孔加入二甲亚砜 DMSO 150 μL ,置微孔振荡器上振荡 5 min,待紫色甲瓞完全溶解后,于酶标仪 490 nm 波长处测定吸光度(A)值。细胞增殖抑制率(%) = (正常对照组 A 值 - 实验组 A 值) / (正常对照组 A 值 - 空白对照组 A 值) $\times 100\%$ 。通过 Grafit 5.0 软件,求当生长抑制率为 50% 时所需药物的浓度,即 IC₅₀ 值。

1.8 数据的处理及统计学方法 采用 SPSS 17.0 版统计软件进行分析,计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两样本均数的比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人参皂苷 Rg3 纳米晶体的物理表征 人参皂苷 Rg3 纳米晶体的粒径(284 ± 14) nm,多分散系数(polydispersity,PI)为 0.156 ± 0.007 (图 1),纳米粒粒径较小,多分散系数理想。纳米混悬液在 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 条件下放置 1 周、1 个月后粒径与 PI 稍增加,但总体稳定性良好;纳米冻干粉粒径(340 ± 17) nm,PI 0.241 ± 0.029 ,较混悬液略上升(表 1)。人参皂苷 Rg3 纳米晶体透射电子显微镜(transmission electron microscope,TEM)观察显示见图 2,呈长条棒状。

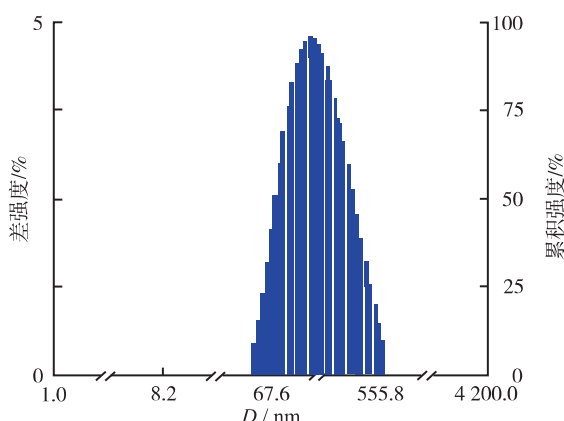


图1 人参皂苷 Rg3 纳米晶混悬液的粒径及分布

Fig.1 Particle size and distribution of ginsenoside Rg3 nano suspension

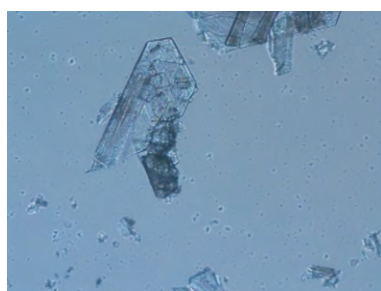
图2 人参皂苷 Rg3 纳米晶体的透射电镜图($\times 150\ 000$)Fig.2 Transmitting electron microscope(TEM) image of ginsenoside Rg3 nanocrystals($\times 150\ 000$)

表1 人参皂苷 Rg3 纳米晶混悬液粒径与 PI

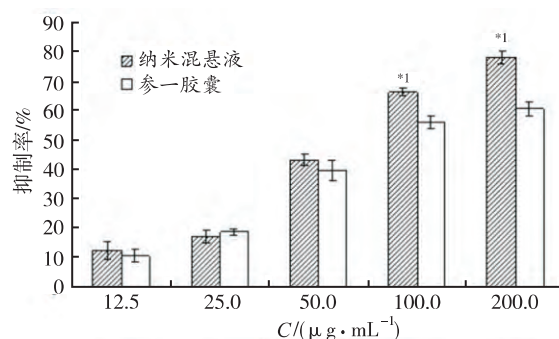
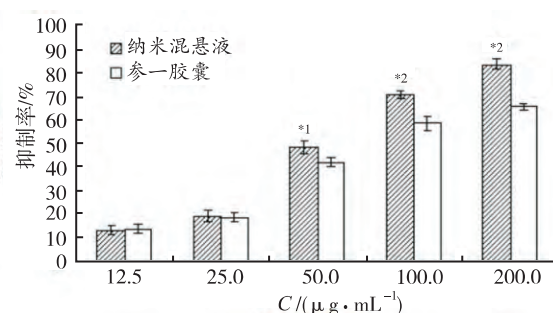
Tab.1 Particle size and PI of ginsenoside Rg3 nano suspension

组别	粒径/nm	PI
纳米混悬液	284 $\pm$ 14	0.156 $\pm$ 0.007
放置1周	316 $\pm$ 29	0.228 $\pm$ 0.010
放置1个月	348 $\pm$ 9	0.189 $\pm$ 0.029
纳米冻干粉	340 $\pm$ 17	0.241 $\pm$ 0.029

2.2 纳米冻干粉主药的含量测定 冻干粉质地疏松,形态美观,加水振摇片刻即分散均匀,并有轻微乳光,根据标准曲线,浓度 $73.4\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,即每克纳米冻干粉含人参皂苷 Rg3 为 $36.70\ \text{mg}$ 。

2.3 人参皂苷 Rg3 纳米晶体的体外抗肿瘤作用 本实验采用 MTT 法考察人参皂苷 Rg3 纳米晶体混悬液的体外抗肿瘤作用,同时将参一胶囊作为对照,按抑制率来计算 IC_{50} 值。结果可见图 3 和图 4。在浓度为 $12.5 \sim 200\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内,人参皂苷 Rg3 纳米晶混悬液与参一胶囊对 HepG₂ 细胞与 A549 细胞增殖均有较强的抑制作用,并且呈现明显的浓度依赖关系。当药

物浓度 $\leq 50\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,纳米混悬液与参一胶囊的抑制率相似;而当药物浓度 $> 50\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,纳米混悬液较参一胶囊表现出更高的细胞增殖抑制率,且在 A549 细胞表现出差异有统计学意义 ($P < 0.05$);当药物浓度 $\geq 100\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,纳米晶混悬液对 HepG₂ 与 A549 细胞的增殖抑制率较参一胶囊显著提高 ($P < 0.01$)。

与参一胶囊比较, *¹ $P < 0.01$ 图3 人参皂苷 Rg3 纳米混悬液和参一胶囊对 HepG₂ 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s\ n=4$)Compared with Shen-yi capsule, *¹ $P < 0.01$ Fig.3 Effects of ginsenoside Rg3 nano suspension and Shen-yi capsule on the proliferation of HepG₂ cells($\bar{x} \pm s\ n=4$)与参一胶囊对照组比较, *¹ $P < 0.05$; *² $P < 0.01$ 图4 人参皂苷 Rg3 纳米混悬液和参一胶囊对 A549 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s\ n=4$)Compared with Shen-yi capsule, *¹ $P < 0.05$; *² $P < 0.01$ Fig.4 Effects of ginsenoside Rg3 nano suspension and Shen-yi capsule on the proliferation of A549 cells($\bar{x} \pm s\ n=4$)

经 IC_{50} 公式计算可得,纳米晶体混悬液与参一胶囊对 HepG₂ 细胞的 IC_{50} 分别为 (65.59 ± 3.62) 与 (97.64 ± 10.48) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;对 A549 细胞的 IC_{50} 值分别为 (56.36 ± 2.14) 与 (83.26 ± 7.44) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,均差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。不论是参一胶囊还是人参皂苷 Rg3 纳米晶体混悬液,对肺癌细胞 A549 的 IC_{50} 值均

低于对肝癌 HepG₂ 细胞,说明人参皂苷 Rg3 对肺癌的抗肿瘤效果可能优于肝癌,但两组间差异无统计学意义。图 5 为显微镜下肺癌细胞 A549 的形态学变化,随着药物浓度增大,贴壁的 A549 细胞逐渐脱落,细胞变圆,体积缩小,呈现非正常的游离状态。

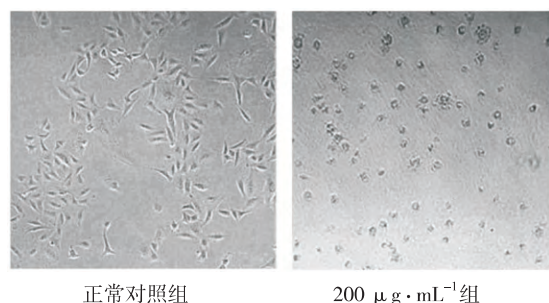


图 5 倒置显微镜下人参皂苷 Rg3 纳米混悬液对 A549 肿瘤细胞抑制情况(×10)

Fig.5 Effects of ginsenoside Rg3 nano suspension on the A549 cells observed by inverted microscope(×10)

3 讨论

本研究运用沉淀法与高压均质法联用技术制备人参皂苷 Rg3 纳米晶体,并对其体外抗肿瘤作用进行比较。结果成功制备多分散系数理想且粒径较小的纳米剂型,稳定性良好。在体外抗肿瘤活性测定中,人参皂苷 Rg3 纳米晶混悬液与参一胶囊对 HepG₂ 细胞与 A549 细胞均有较强的增殖抑制作用,并且呈现明显的浓度依赖关系。说明本研究制得的人参皂苷 Rg3 纳米晶混悬液较市售参一胶囊有更好的抑制肿瘤细胞作用。本研究初步证明人参皂苷 Rg3 纳米晶体有一定药效,但该纳米体内抗肿瘤效果尚需进一步研究。

参考文献

- [1] 储继红,许美娟,吴婷,等.人参皂苷 Rg3 药理学及药代动力学研究进展[J].中国药物与临床,2011,11(2):180-182.
- [2] LIU T G, HUANG Y, CUI D D, et al. Inhibitory effect of ginsenoside Rg3 combined with gemcitabine on angiogenesis and growth of lung cancer in mice [J]. BMC Cancer, 2009, 9(250): 1-11.
- [3] 饶远权,刘杏娥,王廷祥,等.人参皂苷 Rg3 抑制肺癌 NCI-H1650 细胞增殖作用研究[J].肿瘤学杂志,2013, 6(6): 413-416.
- [4] MOSCHWITZER J, ACHLEITNER G, POMPER H, et al. Development of an intravenously injectable chemically stable aqueous omeprazole for mulation using nanosuspension technology [J]. Eur J Pharm Bio Pharm, 2004, 58(4): 615-619.
- [5] 王宇.人参皂苷 Rg3 抑制人小细胞肺癌 NCI-H446 细胞增殖及下调 caveolin-1 表达作用的研究[D].大连:大连医科大学,2014.
- [6] 耿良,行书丽,俞静,等.人参皂苷 Rg3 和 PEG-PLGA-Rg3 纳米微粒抑制肺癌血管新生的体内实验研究[J].中华中医药杂志,2014, 29(2): 601-604.
- [7] 魏丽莎,龚伟,郑爱萍.紫杉醇纳米晶的细胞毒作用及药代动力学研究[J].国际药学研究杂志,2014, 41(2): 155-160.
- [8] 倪劲松,辛颖,王心蕊,等.20(S)-人参皂苷 Rg3 对 Lewis 肺癌生长及转移的抑制作用[J].肿瘤防治研究,2006, 23(5): 311-313.
- [9] 刘悦.联苯双酯纳米混悬液的研究[D].济南:山东大学,2012: 1-103.
- [10] 吕守磊,靳文仙,王成港,等.普罗布考纳米混悬液的制备及其家兔体内药动力学研究[J].中国药学杂志,2010, 45(21): 1635-1638.