

黄芩苷脂质体的制备及体外抗肿瘤作用

洪怡^{1*}, 何伟², 李丹¹, 何莉¹, 张伟¹

(1. 湖北中医药大学药学院, 武汉 430065; 2. 武汉市第一医院药剂科, 武汉 430022)

[摘要] 目的: 制备黄芩苷脂质体, 考察其在体外对肝癌 HepG2 凋亡的影响。方法: 以包封率为主要指标, 对制备方法、处方组成进行了考察, 筛选最佳处方工艺, 考察脂质体的形态、稳定性等理化性质, 并考察对肝癌 HepG2 凋亡的影响。结果: 脂质体在电镜下呈类圆形, 在冷藏条件下较稳定, 采用薄膜分散法制备包封率为 $(34.62 \pm 0.89)\%$ 。细胞凋亡率与制剂的剂量和作用时间呈正相关。结论: 薄膜分散法制备黄芩苷脂质体简便易行, 该制剂对 HepG2 细胞有明显的体外抑制作用。

[关键词] 黄芩苷; 脂质体; HepG2 细胞; 体外抑制

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)03-0029-03

Preparation and *in vitro* Anti-tumor Effect of Baicalin Liposome

HONG Yi¹, HE Wei², LI Dan¹, HE Li¹, ZHANG Wei¹

(1. College of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;

2. Department of Pharmacy, Wuhan No. 1 Hospital, Wuhan 430022, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare baicalin liposome and investigate effect of *in vitro* apoptosis on liver cancer HepG2. **Method:** With encapsulation efficiency as main index, investigated preparation method and prescription form, optimum prescription technology were selected, studied form, stability and other physical and chemical properties, and effect of apoptosis on liver cancer HepG2 were investigated. **Result:** Liposome was oval under electron microscope, it was stable under refrigerated conditions, prepared by film encapsulation efficiency was $(34.62 \pm 0.89)\%$. Cell apoptosis rate was positive correlation with dosage and action time of preparation. **Conclusion:** This method was simple and feasible. This preparation had significantly *in vitro* inhibition on HepG2 cell.

[Key words] baicalin; liposome; HepG2 cell; *in vitro* inhibition

黄芩苷是黄芩的有效成分之一, 水解后产生黄芩素和葡萄糖醛酸^[1], 具有清热、抗炎、利胆、抗变态反应等作用^[2]。近年有文献报道黄芩苷对肝癌、胃癌、黑色素瘤等有一定的抑瘤作用^[3]。

黄芩苷及其制剂虽应用广泛, 但存在口服吸收差、生物利用度低、水溶液不稳定和药物体内半衰期短等特点^[4]。脂质体是一种类似于生物膜结构的类脂质双分子层微囊, 进入人体内主要被网状内皮系统吞噬, 改变被包封药物的体内分布, 药物主要在

肝、脾、肺等组织发挥药效, 可提高药物作用的靶向性, 降低药物的副作用^[5]。本实验制备黄芩苷脂质体, 讨论影响其包封率的因素, 考察制剂在体外对肝癌细胞系 HepG2 凋亡的影响。

1 仪器与试剂

UV-1700 型紫外分光光度计(日本岛津公司), 5424R 型低温高速离心机(Eppendorf), FACS 型流式细胞仪(美国 BD)。

胆固醇(上海科瑞生物), 黄芩苷对照品(中药固体剂制造技术国家工程研究中心, 批号 1084-050514), 黄芩苷原料(江苏天晴制药总厂), 大豆磷脂(上海西宝生物科技有限公司), 三氯甲烷(中国医药上海化学试剂公司), 异丙醇(天津市北方化玻购销中心), 凋亡试剂盒(南京凯基), DMEM 培养基(Sigma)。

[收稿日期] 20110802(009)

[基金项目] 湖北省教育厅科学研究项目(Q20101804); 湖北中医药大学本科生开放性实验研究项目

[通讯作者] * 洪怡, 博士, 讲师, 从事药物新剂型与新技术研究, Tel: 15327130080, E-mail: hongyiw@ sina.com.cn

2 方法与结果

2.1 黄芩苷含量测定

2.1.1 检测波长的选择 以磷酸盐缓冲液为溶剂,黄芩苷磷酸盐溶液在 250 ~ 400 nm 检测,275.4 nm 时,有最大吸光度。制备空白脂质体,4 ℃ 低温离心(10 000 r·min⁻¹ × 1 h),弃去上清液,用三氯甲烷-异丙醇(14:1)溶解沉淀,过滤,滤液在 250 ~ 400 nm 波长进行紫外扫描,在 275.4 nm 处无吸收,说明空白脂质体不影响主药的含量测定。

2.1.2 标准曲线的制备 精密称取黄芩苷对照品适量,用磷酸盐缓冲液配制成质量浓度为 4,6,8,10,12,15 mg·L⁻¹ 的系列标准液,于波长 275.4 nm 处测定吸光度,以吸光度(A)对质量浓度(C)线性回归,得回归方程 $A = 0.0449 + 0.0523C$ ($r = 0.9997$)。

2.2 脂质体制备方法比较

2.2.1 薄膜分散法 取卵磷脂-胆固醇 4:1,黄芩苷适量溶于三氯甲烷-异丙醇(14:1)中,减压回收,使其成膜,加入磷酸盐缓冲液 10 mL,超声混合 10 min,保持一定的水浴温度(25 ℃),水化适 30 min,即得。

2.2.2 逆相蒸发法 取卵磷脂-胆固醇(4:1),加乙酸 5 滴,溶于三氯甲烷-异丙醇(14:1)中。另取黄芩苷适量,加 pH 7.0 磷酸盐缓冲液溶解并定容至 10 mL,将上述 2 相混于圆底瓶中,超声乳化,减压蒸去混合溶剂,滴加磷酸盐缓冲液 10 mL,超声 10 min,即得。

2.2.3 包封率的测定 依上述 2 法各制备 3 批脂质体,并取样 1 mL,4 ℃ 低温离心,取上清,测定包封率,结果薄膜制备法 3 批样品包封率分别为 22.58%,25.79%,23.37%;逆相蒸发制备法制备样品分别为 21.63%,15.28%,17.75%。从结果可知应选择薄膜分散法制备脂质体。

2.3 卵磷脂与胆固醇比例考察 按薄膜法制备脂质体,改变卵磷脂与胆固醇的比例,其余操作相同,平行制备 4 份黄芩苷脂质体。以包封率为考察指标,考察卵磷脂与胆固醇的比例为 8:1,4:1,2:1,1:1 条件下脂质体的包封率,结果包封率分别为 13.58%,15.44%,25.22%,13.12%。表明卵磷脂与胆固醇的比例为 2:1 时的包封率最好。

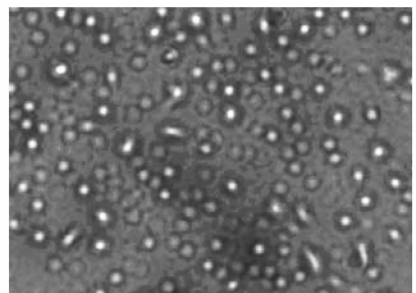
2.4 黄芩苷与卵磷脂用量比例的考察 按薄膜法制备脂质体,改变黄芩苷与卵磷脂用量比例,其余操作相同,平行制备 5 份黄芩苷脂质体溶液。黄芩苷投药量不变,按相应比例增加卵磷脂投药量,以包封

率为考察指标,考察黄芩苷与卵磷脂用量比例为 1:1,1:4,1:8,1:10,1:20 条件下脂质体的包封率分别为 27.01%,32.65%,18.33%,20.43%,18.79%。结果表明黄芩苷与卵磷脂用量比例为 1:4 时的包封率较高。1:10 与 1:20 两组可能由于卵磷脂用量相对较多而至过于粘稠,致使包封率有所下降。

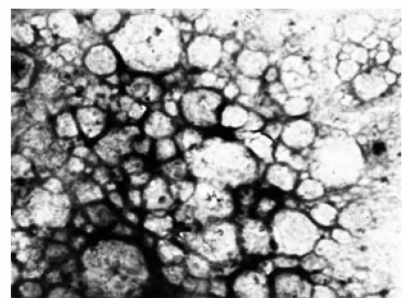
2.5 最佳工艺验证试验 通过单因素考察,得到最佳工艺为薄膜分散法制备脂质体,卵磷脂和胆固醇的比例为 2:1,黄芩苷与卵磷脂的比例为 1:4。连续制备 3 批脂质体,测得的包封率结果为 34.21%,35.85%,33.79%,验证试验结果表明制备工艺条件稳定可靠。

2.6 稳定性试验 将成品分别放置于 4,25 ℃ 的环境中,于 0,7,14 d 检测其包封率分别为 32.28%,31.05%,28.76%;32.28%,15.79%,13.66%。结果表明在 25 ℃ 的环境中,脂质体包封率逐渐下降,而 4 ℃ 时,脂质体的包封率能保持在稳定的水平,表明黄芩苷脂质体需保存在 4 ℃ 的环境中。

2.7 脂质体形态观察 取黄芩苷脂质体少量于载玻片上,于倒置显微镜(1 × 100)下观察(图 1A)。取脂质体混悬液适量,滴加到覆盖碳膜的铜网上,用 2% 磷钨酸钠进行染色,在 TEM2000 投射电镜下(1 × 10 000)观察粒径大小和形态(图 1B)。从图 1 可以看出,黄芩苷外型圆整,粒径大小较为均匀,粒径大小在 0.1 μm 以下。



A



B

A. 光学显微镜;B. 透射电镜

图 1 黄芩苷脂质体形态

2.8 黄芩苷脂质体对人肝癌 HepG2 细胞的影响

2.8.1 细胞培养 人肝癌 HepG2 细胞用含 10% 小牛血清、青霉素 ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、链霉素 ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的 DMEM 培养基,置 $37 \text{ }^\circ\text{C}$,5% CO_2 孵箱内静置培养。

2.8.2 PI-Annexin-V 染色检测肿瘤细胞凋亡 分别取对数生长期的 HepG2 细胞接种于 6 孔培养板中 (1×10^5 /孔),分别加入空白脂质体、黄芩苷溶液 ($5, 10, 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、黄芩苷脂质体 ($5, 10, 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),重复 3 孔。分别作用 24, 48 h 后,收集各组细胞。用冰冷的 PBS 液洗涤 2 次后,按 PI-Annexin-V 细胞凋亡检测试剂盒说明书操作,采用流式细胞仪 FACS 检测,并利用 Cell Quest 软件进行参数获取和数据分析。结果见表 1。

表 1 黄芩苷脂质体对人肝癌 HepG2 细胞凋亡试验

组别	黄芩苷质量浓度	24 h 凋亡率	48 h 凋亡率
	$/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$/\%$	$/\%$
对照	-	0.55 ± 0.07	1.04 ± 0.12
空白脂质体	-	0.94 ± 0.04	1.31 ± 0.07
黄芩苷溶液	5	5.53 ± 0.36	9.16 ± 0.24
	10	8.333 ± 0.36	19.98 ± 0.43
	20	11.64 ± 0.58	28.32 ± 0.92
黄芩苷脂质体	5	5.99 ± 0.63	10.5 ± 0.55
	10	8 ± 0.8	22.04 ± 0.76
	0	12.13 ± 0.61	30.31 ± 0.47

肝癌细胞株 HepG2 分别在质量浓度为 $5, 10, 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的黄芩苷溶液和黄芩苷脂质体溶液中作用 24, 48 h, 结果提示凋亡率与剂量和时间呈正相关。24 h 黄芩苷脂质体对细胞凋亡的影响较黄芩苷溶液对细胞凋亡的影响略微明显,但没有统计学的差异。随着作用时间的延长,48 h 相同浓度的黄芩苷

脂质体对细胞凋亡的影响明显强于黄芩苷溶液对细胞凋亡的影响,具有统计学差异。

3 讨论

逆相蒸发法所制得的脂质体,包封率低,而且相差较大,说明该方法制备黄芩苷脂质体较不稳定,故采用薄膜分散法制备的黄芩苷脂质体。实验用大豆卵磷脂,相变温度在 $0 \text{ }^\circ\text{C}$ 以下,考虑到高温磷脂易氧化,选择 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 水化温度,水化时间 30 min 为宜。

包封率的计算可通过未包封的药物或已包封的药物来计算包封率,2 种计算方法经过实验验证可得出相似的结论,但通过求出未包封的黄芩苷的量及称量时黄芩苷的总量,以此计算包封率,不需对脂质体进行破膜溶解,有机溶剂用量减少。安全性提高且更经济。所以采取高速离心后取上清计算包封率的方法。

本实验所制备的脂质体,包封率在 35% 左右,比文献报道的包封率要略低,这将是本研究今后要深入的问题。

[参考文献]

- [1] 车庆明,黄新立,李艳梅,等. 黄芩苷的药物代谢产物研究[J]. 中国中药杂志,2001,26(11):768.
- [2] 文敏,李雪,付守廷. 黄芩苷药理作用研究新进展[J]. 沈阳药科大学学报,2008,25(2):158.
- [3] 林红. 黄芩苷抗肿瘤作用及机制研究进展[J]. 新医学学刊,2008,5(3):453.
- [4] 陈燕军,贾燕,金日显,等. 黄芩苷柔性纳米脂质体的制备[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(5):1.
- [5] 王燕. 新型脂质体作为中药靶向载体在肿瘤治疗中的作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(16):212.

[责任编辑 仝燕]