

复方黄黛片有效成分纳米粒的制备及其肝癌治疗研究

金 成¹, 白 玲²

(1. 西电集团医院普通外科, 陕西 西安 710077; 2. 西安市人民医院泌尿外科, 陕西 西安 710100)

摘要: **目的** 探讨复方黄黛片有效成分硫化砷、靛玉红和丹参酮联合装载纳米粒的制备及肝癌 HepG₂ 和 Huh-7 细胞的治疗作用。**方法** 应用单乳溶媒挥发法, 制备聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物联合装载硫化砷、靛玉红和丹参酮纳米粒。氢化物发生原子吸收分光光度法和高效液相色谱法分析纳米粒中药物的载药率、包封率和模拟体外释药, 利用扫描电镜观察纳米粒的形态, 采用粒度分析仪检测纳米粒粒径。荧光显微镜观察 HepG₂ 和 Huh-7 细胞吞噬摄取纳米粒, 采用 MTT 测定法检验细胞活力, 细胞存活分析检测细胞克隆形成能力。**结果** 联合载药纳米粒呈球形, 粒径为 (115.09±36.71)nm, 多分散指数 0.131。硫化砷、靛玉红和丹参酮的载药率和包封率分别为 (5.17±1.26)%、(1.03±0.45)%、(1.72±0.67)% 和 (16.15±4.7)%、(76.74±6.8)%、(83.09±9.4)%。硫化砷、靛玉红和丹参酮模拟体外释药曲线早期呈爆发释放, 随后为缓慢持续释放。荧光显微镜结果可见肝癌细胞对纳米粒的吞噬摄取, MTT 检测显示药物单体和联合载药纳米粒作用后细胞活力较对照降低, 联合载药纳米粒较药物单体粒作用显著, 细胞存活分析结果也进一步证实上述结果。**结论** 复方黄黛片有效成分硫化砷、靛玉红和丹参酮联合装载纳米粒显示出明确的肝癌治疗效果, 这为中药的临床给药提供了新的剂型。

关键词: 复方黄黛片; 硫化砷; 靛玉红; 丹参酮; 纳米粒; 肝癌

中图分类号: R285

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2024)03-0021-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2024.03.004

The Research on the Therapy on Hepatocellular Carcinoma of Nanoparticles Loading Effective Components of Compound Huangdai Tablets

JIN Cheng¹, BAI Ling²

(1. Department of General Surgery, XD Group Hospital, Xi'an 710077, China;

2. Department of Urology, Xi'an People's Hospital, Xi'an 710100, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the preparation of nanoparticles loading the effective components of Compound Huangdai Tablets(Arsenic sulfide, Indirubin and Tanshinone) and the therapeutic effect of HepG₂ and Huh-7 cells. **Methods** The poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles loading Arsenic sulfide, Indirubin and Tanshinone were prepared by o/w emulsification-solvent evaporation method. The drug loading efficiency, encapsulation efficiency and release profile in vitro were analyzed using Hydride generation atomic absorption spectrometry and High-performance liquid chromatography. The morphology and size of nanoparticles were investigated by scanning electron microscopy and particle size analyzer, respectively. Cell viabilities were measured by MTT assay and forming colonies. **Results** The nanoparticles were spherical, with a diameter of (115.09 ± 36.71)nm and a polycentrifugation index of 0.131. The drug encapsulation efficiency and loading efficiency of Arsenic sulfide, Indirubin and Tanshinone were (5.17 ± 1.26)%, (1.03 ± 0.45)%, (1.72 ± 0.67)% and (16.15 ± 4.7)%, (76.74 ± 6.8)%, (83.09 ± 9.4)%, respectively. The mimics the drugs release in vitro were biphasic with early bursting release followed by slow and sustained release. Fluorescence microscopy revealed phagocytosis of nanoparticles by HepG₂ and Huh-7 cells. MTT detection and cell survival assay showed decreased cell viability after treatment with free drugs and drug loading nanoparticles compared with control cells, and drug loading nanoparticles were more significant than free drugs. **Conclusion** The nanoparticles loading Arsenic sulfide, Indirubin and Tanshinone have definite therapeutic efficacy on hepatocellular carcinoma, providing a new dose type for the clinical administration of traditional Chinese medicine.

KEY WORDS: compound Huangdai tablets; arsenic sulfide; indirubin; tanshinone; nanoparticle; hepatocellular carcinoma

基金项目: 陕西省中医药管理局科研项目(SZY-KJCYC-2023-043); 西安市科技计划项目(23YXYJ0170); 环球医疗科研基金项目(UM0224005)

作者简介: 金 成(1975-), 男, 主治医师, 研究方向: 肝癌中西医结合治疗, E-mail: jc4587@126.com

复方黄黛片是一种中成药制剂,药物组成有雄黄、青黛、丹参,具有清热解毒、益气生血的作用。在现代医学中,复方黄黛片主要用于治疗急性早幼粒细胞白血病^[1-2]。雄黄具有解毒抗癌、散结消癥之功,用为君药。青黛可清热解毒、凉血消斑、泻肝定惊,为臣药。丹参活血祛瘀、消肿止痛、清心除烦,为佐使药。硫化砷、靛玉红和丹参酮分别为雄黄、青黛、丹参的有效成分。

肝癌是常见的难治性恶性肿瘤,研究显示复方黄黛片对肝癌也具有了良好的治疗作用^[3]。纳米药物是将药物制备成纳米尺度或应用纳米载体进行传输,是国际生物技术领域的热点^[4]。已有研究报道多种药物联合装载纳米粒,故将复方黄黛片有效成分硫化砷、靛玉红和丹参酮联合装载于纳米粒用于治疗肝癌在理论和实践上有基础,在临床应用上有前景^[5-6]。中药复方虽然在临床实践中取得一定疗效,但全球推广受到限制,本项目在机理假设确定的基础上希望能够以这一简单有效的中药剂型改良作为研究范例。本文旨在制备复方黄黛片有效联合装载纳米粒,验证其具有抑制肝癌细胞活力的作用,为在进一步的研究中进行动物实验奠定基础。

1 材料和方法

1.1 细胞系为人肝癌 HepG₂ 和 Huh7 细胞,培养于 DMEM 培养液中(美国 Gibco 公司),含 100 U/mL 青霉素,50 μg/mL 链霉素和 10%热灭活胎牛血清。37 ℃ 为培养条件、5%CO₂ 饱和湿度。每 3~5 d 细胞传代 1 次,对数生长期细胞用于实验。

1.2 主要试剂与仪器 硫化砷(As₂S₃,纯度为 95%)、靛玉红(靛玉红-3'-单脲)、丹参酮(丹参酮 IIA,纯度≥97%)、聚乙酸-聚羟基乙酸共聚物(PLGA,L/G=50/50,分子量=25 000)、聚乙烯醇(分子量=30 000~70 000)、碘化丙啶(PI)、联二苯-己三烯(DPH)购于美国 Sigma 公司,二甲基亚砜(DMSO)、四甲基偶氮唑盐(MTT)购于北京索莱宝公司,二氯甲烷购于西安化学试剂厂。硫化砷溶解于氢氧化钠溶液,然后用盐酸调节 pH 值至 7.35~7.45,浓度为 100 mg/mL 备用。靛玉红和丹参酮溶解于 DMSO,浓度分别为 1 mg/mL 和 5 mg/mL 备用。高效液相色谱仪购自美国 Agilent 公司,粒度分析仪购自英国 Malvern 公司,原

子吸收分光光度计购自北京东西分析仪器有限公司,荧光显微镜购自日本 Nikon 公司。

1.3 联合装载纳米粒制备 采用单乳溶酶挥发法制备联合装载硫化砷、靛玉红和丹参酮纳米粒。将 50 mg 硫化砷、2 mg 靛玉红和 3 mg 丹参酮溶于浓度为 2.5%的 PLGA 二氯甲烷溶液 5 mL,将其倒入 1%的聚乙烯醇水溶液 20 mL 中,机械搅拌并采用超声乳化 3 min。所得悬浊液持续磁力搅拌 6 h 至二氯甲烷挥发完全,3 000 rpm 离心悬浊液并弃上清,沉淀物用蒸馏水洗涤 3 遍后采用冷冻干燥,4 ℃保存干粉备用。

1.4 荧光纳米粒制备 在所述纳米粒制备过程中,荧光素 DPH 10 mg 溶于 5 mL 的 PLGA 二氯甲烷溶液,其余同前。

1.5 载药率和包封率的测定 氢化物发生原子吸收分光光度法检测联合装载纳米粒中硫化砷的含量^[7],高效液相色谱法检测联合装载纳米粒中靛玉红和丹参酮的含量^[8-9]。

载药率和包封率计算如下:

载药率 = (纳米粒中装载药物质量 / 纳米粒质量) × 100%

包封率 = (纳米粒中装载药物质量 / 所用药物总量) × 100%

1.6 纳米粒的形态和粒径分析 用 5 mL 蒸馏水分散 1 mg 联合载药纳米粒,滴 1 滴于盖玻片上,然后烤箱烤干,用导电胶黏将其贴于铜座上并溅射喷金,采用场发射扫描电镜观察纳米粒形态。采用动态光散射方法,利用粒度分析仪检测上述纳米粒悬液粒径及分布范围。

模拟体外释药:5 mg 联合装载纳米粒分散于 10 mL 磷酸盐缓冲液(PBS),将其在定轨摇床上震荡,维持 120 r/min 和 37 ℃条件。在设定时间点取混悬液离心,收集上清,10 mL 新鲜 PBS 重悬沉淀并继续震荡。同前分析上清中硫化砷、靛玉红和丹参酮含量。

1.7 肝癌细胞吞噬摄取纳米粒 在六孔培养板中以 1 × 10⁶/孔接种 HepG₂ 和 Huh7 细胞,预先放置盖玻片于培养板内,培养 48 h 后加入 1 mg/mL DPH 荧光纳米粒孵育 24 h。采用 95%酒精固定细胞爬片,用 PI 衬染细胞核。应用荧光显微镜观察,激发光为紫外光,橙黄色为细胞核,蓝色为纳米粒。

1.8 MTT 检测 肝癌 Huh7 和 HepG₂ 细胞以 1×10^5 /孔接种于 96 孔培养板,培养 24 h 后细胞贴壁。分成 3 组,每组重复 3 孔,各组给药作用 1 h,3 h,6 h,12 h 和 24 h,其中一组加入 DMSO 为对照组,一组加入硫化砷(终浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$)、靛玉红(终浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$)和丹参酮(终浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$)药物单体,一组加入联合载药纳米粒(终浓度为 10 mg/mL ,各时间点分别释放 12.41、28.95、36.71、49.63、81.17 $\mu\text{g/mL}$ 硫化砷,1.65、3.51、4.22、5.46、10.92 $\mu\text{g/mL}$ 靛玉红,1.75、3.57、4.66、8.50、13.54 $\mu\text{g/mL}$ 丹参酮),然后吸出含药培养液,加入 200 μL 完全培养液。给药共孵育 1 d 后,在每孔中加入 MTT 20 μL ,最终浓度为 5 mg/mL ,作用 4 h 后吸出培养液,在每孔中加入 DMSO 150 μL ,水平轻轻震荡 10 min 溶解 MTT 结晶,用酶联免疫检测仪在 490 nm 波长读取 OD 值。计算细胞活力 = (处理组 OD 值 / 对照组 OD 值) $\times$ 100%。

1.9 细胞存活分析 肝癌 Huh7 和 HepG₂ 细胞以 500/孔接种在六孔培养板中,24 h 培养后细胞贴壁。分成 3 组,每组重复 3 孔,各组给药作用 1 h,3 h,6 h,12 h 和 24 h,其中一组加入 DMSO 为对照组,一组加入硫化砷(终浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$)、靛玉红(终浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$)和丹参酮(终浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$)药物单体,一组加入联合载药纳米粒(终浓度为 10 mg/mL ,各时间点分别释放 12.41、28.95、36.71、49.63、81.17 $\mu\text{g/mL}$ 硫化砷,1.65、3.51、4.22、5.46、10.92 $\mu\text{g/mL}$ 靛玉红,1.75、3.57、4.66、8.50、13.54 $\mu\text{g/mL}$ 丹参酮),然后将含药培养液吸出,加入完全培养液 2 mL。在标准培养条件下,细胞培养 14 d,采用姬姆萨法染色,记数细胞克隆,细胞数 > 50 为阳性克隆,通过未给药组为对照组计算接种率(PE),细胞存活率 = [处理组细胞克隆数 / (接种细胞总数 $\times$ PE)] $\times$ 100%。

1.10 统计学处理 利用 SPSS 10.0 统计软件对数据进行方差分析,所测数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 联合载药纳米粒 呈球形,粒径为 $(115.09 \pm 36.71) \text{ nm}$,多分散指数 0.131(图 1)。硫化砷、靛玉红和丹参酮的载药率和包封率分别为 $(5.17 \pm 1.26)\%$ 、 $(1.03 \pm 0.45)\%$ 、 $(1.72 \pm 0.67)\%$ 和 $(16.15 \pm 4.7)\%$ 、

$(76.74 \pm 6.8)\%$ 、 $(83.09 \pm 9.4)\%$ 。硫化砷、靛玉红和丹参酮从聚合物中释放行为均显示出立即爆发效应,其特征是在最初的 24 h 内迅速释放,随后缓慢和持续释放,硫化砷、靛玉红和丹参酮 14 d 累积药物释放分别约为 20%、35% 和 40%(图 2)。

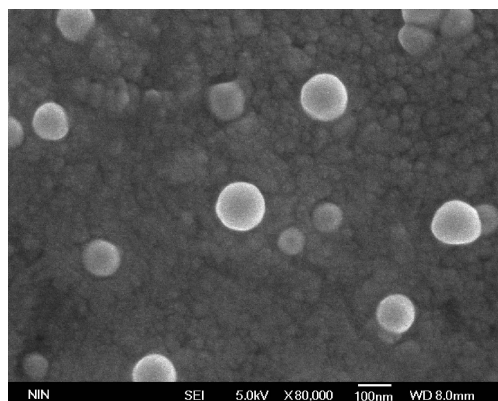


图 1 联合载药纳米粒扫描电镜照片

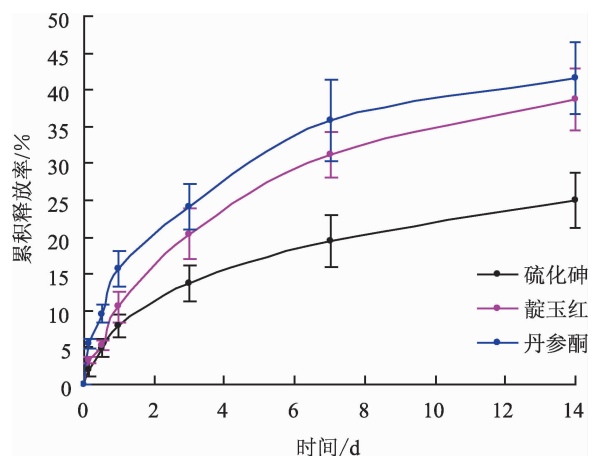


图 2 联合载药纳米粒体外模拟释放曲线
(相同时间点组间比较: $P < 0.05$)

2.2 荧光显微镜结果 可见肝癌细胞对纳米粒的吞噬摄取(图 3),并且 MTT 检测显示药物单体和联合载药纳米粒作用后细胞活力较对照降低,随时间延长降低更明显,联合载药纳米较药物单体粒作用显著(表 1)。细胞存活分析结果也进一步证实药物单体和联合载药纳米粒降低肝癌细胞克隆形成能力(图 4),说明联合载药纳米粒对细胞存活率影响更明显。

3 讨论

纳米生物技术是国际生物技术领域的前沿和热点,利用纳米尺度物质所特有的物理、化学性能,开发

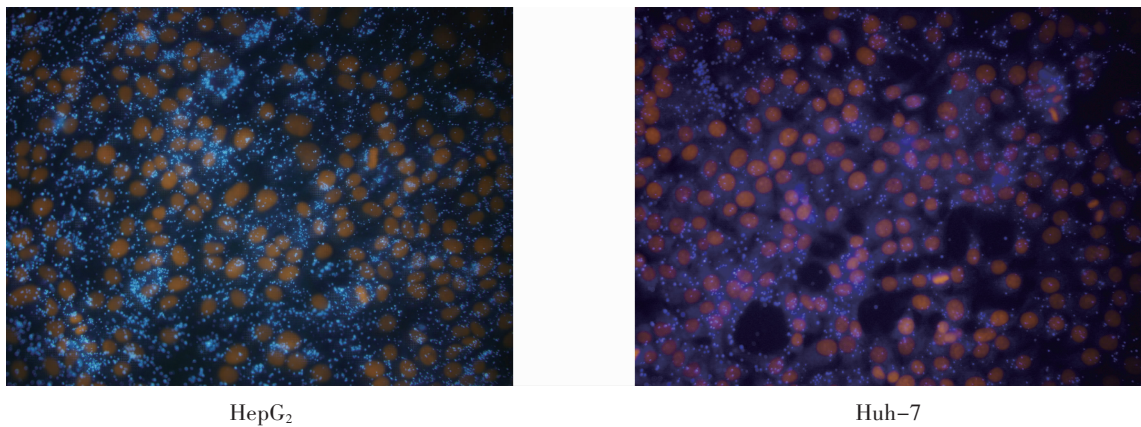


图 3 肝癌细胞对联合载药纳米粒吞噬摄取的荧光照片(×200)

表 1 MTT 检测药物单体和联合载药纳米粒对 HepG₂ 和 Huh-7 细胞活力的影响

组别	样本数	HepG ₂				
		1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
对照组	8	96.45±7.62	94.71±6.13	94.02±6.58	92.35±5.98	90.18±6.05
药物单体组	8	74.23±6.71 ^a	66.59±7.01 ^a	50.19±6.37 ^a	38.14±5.22 ^a	17.48±4.85 ^a
联合载药纳米粒组	8	70.22±8.14 ^{a, b}	59.14±6.51 ^{a, b}	43.72±5.52 ^{a, b}	31.56±4.71 ^{a, b}	15.26±3.47 ^{a, b}

组别	样本数	Huh-7				
		1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
对照组	8	97.63±8.58	96.25±7.49	94.56±6.86	91.75±6.82	89.26±6.43
药物单体组	8	78.25±8.16 ^a	58.53±7.18 ^a	42.59±5.33 ^a	25.72±4.71 ^a	15.85±4.17 ^a
联合载药纳米粒组	8	74.53±6.31 ^{a, b}	51.34±6.97 ^{a, b}	35.46±5.23 ^{a, b}	21.24±3.41 ^{a, b}	13.52±3.48 ^{a, b}

注: %,均数±标准差,a:P<0.05 vs 对照组;b:P<0.05 vs 药物单体组

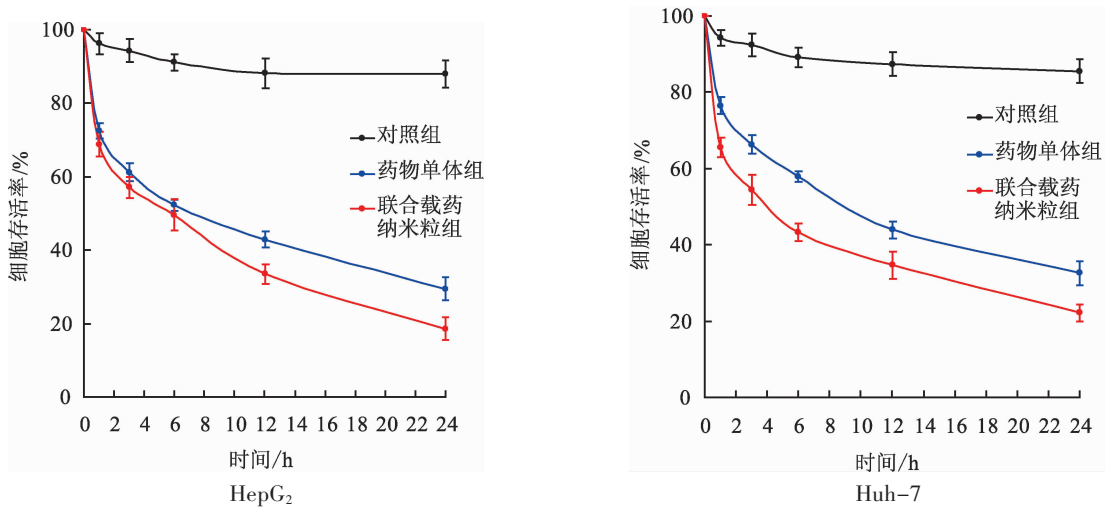


图 4 联合载药纳米粒对肝癌细胞存活率的影响

针对疾病诊断和治疗的新型功能生物材料、医疗器械以及高效和高度灵敏的检测技术,提高疾病的诊治和预防水平^[10]。纳米药物有很多优点,如控释给药;增强细胞内渗透;血液循环时间延长,易于在病灶内聚集;靶向作用;微环境敏感释药;将各种功能的化学分子同时组装到同一纳米载体表面,获得多种功能的生物学性质,成为智能的纳米药物。中药方剂在化学成分上包括成百上千种化合物,但主要作用依赖于其中数

种有效成分,将这些成分联合装载在纳米载体内,在临床上可以提高疗效,降低给药量和毒副作用。

中药复方“君臣佐使”的配伍原则展现着协同作用的思想。已经证实由雄黄、青黛、丹参组成的复方黄黛片治疗急性早幼粒细胞白血病具有很好的疗效,其中的有效成分为硫化砷、靛玉红和丹参酮,在分子水平研究已阐明其联合可显著增强硫化砷对白血病疗效的机制。硫化砷呈“君药”作用,引起癌蛋白的降解;丹参酮符合“臣药”特征,促进细胞分化;靛玉红符合“佐药”特点,抑制细胞周期;丹参酮与靛玉红还都起到“使药”的作用,能增加运输硫化砷的蛋白表达。研究表明,复方黄黛片对肝癌也展示了良好的治疗潜力,可有效改善肝功能,抑制血管新生相关蛋白的表达^[11]。纳米载体复合装载多种药物的技术已十分成熟,无论对于常用化疗药物组合,还是中药复方成分的联合输送,相对于传统给药方式具有明显的优势。

本研究所制备的联合载药纳米粒粒径和形态满意,载药率和包封率较高,体外释药实验显示纳米粒中的药物早期释放具有突释现象,然后逐渐缓慢释放,原因为在纳米粒表面吸附的药物首先溶解释放,而后随着纳米粒降解,在内部包裹的药物被释放。由于3种药物单体水溶性很低,所以累积释放较少。

MTT检测和细胞存活分析结果显示药物单体和载药纳米粒共培养的肝癌细胞活力和增殖能力降低,提示硫化砷、靛玉红和丹参酮联合具有明确的细胞毒性,具有生物活性的药物单体从纳米粒中释放,并且药效具有时效关系。联合载药纳米粒依靠两种方式发挥治疗作用,其一是在细胞周围释药,其二是被肝癌细胞吞噬进细胞内而作为药泵持续释药,作用更显著和持久。

在本研究中联合载药纳米粒缓释中药复方的有效成分,延长药物的作用时间,而且可以进入细胞内持续释药发挥作用,显著提高治疗效果,这为抗肝癌药物的给药提供了新的剂型,具有较高的临床应用价值和前景。本研究探索利用现代药物化学和生物材料

学的语言来阐释复方协同、辨证施治、祛邪扶正、以毒攻毒等中医药传统理论的精髓和内涵,有利于推动中药的现代化、产业化、国际化发展,同时为优化方药配伍提供有力的实验依据。

参考文献:

- [1] 何甘霖,王春燕,谭获. 复方黄黛片治疗急性早幼粒细胞白血病的系统评价[J]. 白血病·淋巴瘤,2011,20(9): 539-542.
- [2] 向阳,常晓慧,成玉斌,等. 复方黄黛片为主的缓解后治疗方案对急性早幼粒细胞白血病长期生存的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2010,30(12):1253-1256.
- [3] 侯美辰. 复方黄黛片含药血清对 HL-60 细胞和 HepG₂ 细胞的凋亡作用研究[D]. 沈阳:辽宁中医药大学,2020.
- [4] BHISE K,SAU S,ALSAAB H,et al. Nanomedicine for cancer diagnosis and therapy: advancement,success and structure-activity relationship[J]. Ther Deliv,2017,8(11): 1003-1018.
- [5] WYATT EA,DAVIS ME. Nanoparticles Containing a combination of a drug and an antibody for the treatment of breast cancer brain metastases[J]. Mol Pharm, 2020, 17(2):717-721.
- [6] JIN C,BAI L,WU H,et al. Radiosensitization of paclitaxel,etanidazole and paclitaxel +etanidazole nanoparticles on hypoxic human tumor cells in vitro[J]. Biomaterials, 2007,28:3724-3730.
- [7] 刘兰,张勇仓,钟铎,等. 原子吸收分光光度法测定藏药二十五味珊瑚丸中5种重金属含量[J]. 中国药房,2018,29(7):973-976.
- [8] 李玲,王婷婷,陈乃江. 高效液相色谱法同时测定喉康散中靛蓝和靛玉红含量[J]. 中国药业,2021,30(23):65-67.
- [9] 孟召全,陈鸿楠,钱捷. 丹参酮ⅡA的分离纯化[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(2):6-7.
- [10] FAROKHZAD OC,LANGER R. Impact of nanotechnology on drug delivery[J]. ACS Nano,2009,3(1):16-20.
- [11] 遆振宇,高小鹏,千东维,等. 复方黄黛片对 Solt-Farber 原发性肝癌大鼠血管新生作用的影响[J]. 中国中西医结合外科杂志,2019,25(6):876-881.

(收稿日期:2024-03-19)