

细胞穿膜肽PFV修饰紫杉醇/青蒿琥酯共载靶向胶束的制备及体外抗肿瘤作用研究^Δ

王 为^{1*},李学涛¹,孔 亮¹,姜 爽²,罗一夫²,王晓波^{1,2#}(1.辽宁中医药大学药学院,辽宁大连 116600;2.解放军联勤保障部队第九六七医院药物研究所,辽宁大连 116011)

中图分类号 R94 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)21-2592-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.21.06

摘要 目的:制备细胞穿膜肽PFV修饰紫杉醇(PTX)/青蒿琥酯(ART)共载靶向胶束,并考察其体外抗肿瘤活性。方法:按前期优化的工艺,采用薄膜水化法制备PFV修饰PTX/ART共载靶向胶束,并对其表征。以空白胶束作为空白对照,采用磺基罗丹明B法评价PTX胶束、ART胶束、PTX/ART胶束以及PFV修饰PTX/ART共载靶向胶束对人胃癌BGC-823细胞的毒性;以香豆素作为荧光探针取代PTX,制成相应的不同胶束,采用流式细胞仪和荧光显微镜测定和观察BGC-823细胞对各胶束的摄取情况和靶向性;并通过Transwell小室法考察PTX胶束、ART胶束、PTX/ART胶束以及PFV修饰PTX/ART共载靶向胶束对BGC-823细胞侵袭的影响。结果:PFV修饰PTX/ART共载靶向胶束的平均粒径为(51.30±3.95) nm,分散系数为0.19±0.01,Zeta电位为(0.21±0.02) mV,PTX、ART的包封率均高于90%,形态呈圆球形。空白胶束对BGC-823细胞无明显毒性,PTX胶束、PTX/ART胶束以及PFV修饰PTX/ART共载靶向胶束对BGC-823细胞的半数抑制浓度分别为(3.09±0.22)、(1.93±0.24)、(1.11±0.15) μmol/L;不同胶束在BGC-823细胞核中的分布数量排序依次为PFV修饰香豆素/ART胶束>香豆素/ART胶束>香豆素胶束>空白对照,抑制细胞侵袭作用的大小依次为PFV修饰PTX/ART共载靶向胶束>PTX/ART胶束>ART胶束>PTX胶束>空白对照。结论:制备的PFV修饰PTX/ART共载靶向胶束符合《中国药典》要求;其对BGC-823细胞具有较强的细胞毒性,可提高药物的靶向性和细胞对药物的摄取能力,并能抑制肿瘤细胞的侵袭和转移。

关键词 细胞穿膜肽;紫杉醇;青蒿琥酯;胶束;人胃癌BGC-823细胞;靶向作用;抗肿瘤作用

Study on Preparation and *in vitro* Anticancer Activity of Cell Penetrating Peptide PFV-modified Paclitaxel/artesunate Co-loaded Targeting Micelles

WANG Wei¹, LI Xuetao¹, KONG Liang¹, JIANG Shuang², LUO Yifu², WANG Xiaobo^{1,2}(1. School of Pharmacy, Liaoning University of TCM, Liaoning Dalian 116600, China; 2. No.967 Hospital of the Joint Logistic Support Force of PLA, Liaoning Dalian 116011, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare cell penetrating peptide PFV-modified paclitaxel (PTX)/artesunate (ART) co-loaded targeting micelles, and to investigate *in vitro* anti-tumor activity. METHODS: According to optimal technology, PFV-modified PTX/ART co-loaded targeting micelles were prepared by membrane hydration method, and were characterized. Using blank micelle as blank control, sulforhodamine B (SRB) method was used to evaluate the toxicity of PTX micelles, ART micelles, PTX/ART micelles and PFV-modified PTX/ART co-loaded targeting micelles to human gastric cancer BGC-823 cells. The coumarin was used as fluorescent probe replacing PTX to prepare corresponding micelles. Then, the uptake of BGC-823 cells to corresponding micelles and targeting effect were observed and determined by flow cytometry and fluorescence microscope. The effects of PTX micelles, ART micelles, PTX/ART micelles and PFV-modified PTX/ART co-loaded targeting micelles on the invasion of BGC-823 cells were investigated by Transwell chamber method. RESULTS: Average particle size of PFV-modified PTX/ART co-loaded targeting micelles was (51.30±3.95) nm; PDI was 0.19±0.01, and Zeta potential was (0.21±0.02) mV. The encapsulation efficiency of PTX and ART were higher than 90%. The shape of micelles were spherical. The blank micelles had no obvious toxicity to BGC-823 cells. The IC₅₀ value of PTX micelles, PTX/ART micelles and PFV-modified PTX/ART co-loaded targeting micelles to BGC-823 cells were (3.09±0.22), (1.93±0.24), (1.11±0.15) μmol/L, respectively. The distribution amount of different micelles in BGC-823 cell nucleus in the descending order were PFV-modified coumarin/ART micelles>coumarin/ART micelles>coumarin micelles>blank control. The order of inhibitory effect was PFV-modified PTX/ART co-loaded targeting micelles>PTX/ART micelles>ART micelles>PTX micelles>blank control.

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81973462, No.81874347)

* 硕士研究生。研究方向:药物新型给药系统。E-mail: 1915286446@qq.com

通信作者:教授,博士生导师,博士。研究方向:药物新型给药系统。E-mail: wxbbenson0653@sina.com

CONCLUSIONS: Prepared PFV-modified PTX/ART co-loaded targeting micelles are in line with the quality of *Chinese Pharmacopoeia*. It shows strong cytotoxicity to BGC-823 cells, can improve the drug targeting and the cell uptake, and inhibit the invasion and metastasis of BGC-823

cells.

KEYWORDS Cell-penetrating peptide; Paclitaxel; Micelles; Artesunate; Human gastric cancer BGC-823 cells; Targeting effects; Anti-tumor effect

胃癌是消化道肿瘤中发病率最高的恶性肿瘤^[1]。目前,化疗是胃癌的主要治疗方式,但化疗后残余的癌细胞会通过侵袭作用导致肿瘤转移,且化疗药物会增加机体的毒副作用,导致患者预后较差^[2]。紫杉醇(PTX)具有较高抗癌活性,在临床用于多种癌症的治疗,但溶解性低、生物利用度差、无选择性分布是限制其临床应用的主要原因^[3]。提高PTX的靶向性以降低其毒副作用并抑制肿瘤细胞转移显得尤为重要。细胞穿膜肽(简称“PFV”)具有细胞穿透能力强的特点,并且能增加药物在肿瘤部位的蓄积^[4]。青蒿琥酯(ART)具有抑制肿瘤血管新生、抑制肿瘤侵袭转移、增敏抗肿瘤化疗药物的作用^[5-7]。胶束具有粒径小和对机体毒性低等优点,可增加化疗药物的溶解度并提高化疗药物对肿瘤的被动靶向性^[8-11]。为提高PTX的肿瘤靶向性及其对肿瘤细胞侵袭和转移的抑制作用,本课题组前期优化工艺后采用薄膜水化法制备了PFV修饰PTX/ART共载靶向胶束,其中PFV用来提高细胞对药物的摄取能力,PTX作为化疗药物,ART用来抑制肿瘤细胞的侵袭和转移^[12]。本研究在前期研究基础上,对所制胶束进行表征后并进一步考察PFV修饰PTX/ART共载靶向胶束的体外抗肿瘤作用,为胶束包载PTX的靶向给药和ART抑制肿瘤细胞侵袭和转移的相关制剂开发提供参考。

1 材料

1.1 仪器

FA1004型电子天平(上海越平科学仪器有限公司);SG3300H型超声波清洗机(上海冠特超声仪器有限公司);RE52CS型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);DZKW-S-4型恒温水浴锅(上海医疗器械公司医疗器械五厂);HBS-1096A型酶标仪(南京德铁实验设备有限公司);JEM-1200EX型透射电镜(日本Tokyo公司);Accuri C型流式细胞仪(美国Becton Dickinson公司);ZS90型激光散射粒径测定仪(英国Malvern公司);WJ-80B-II型细胞培养箱(上海新苗医疗器械制造有限公司);SW-CJ-1D型超净台(上海沪净医疗器械有限公司)。

1.2 药品与试剂

PTX原料药(批号:MB1178,纯度:≥99%)、ART原料药(批号:J0101A,纯度:≥98%)、TPGS₁₀₀₀(批号:MB2036)、胰蛋白酶、磺基罗丹明B(SRB)、青链霉素双抗均购自大连美仑生物技术有限公司;RPMI 1640培养基、胎牛血清(美国Gibco公司);Soluplus两亲性接枝共聚物(德国BASF公司);二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇₂₀₀₀-PFV(DSPE-PEG₂₀₀₀-PFV)修饰胶束的靶向材料由辽宁中医药大学药学院药剂实验室合成;三氯甲烷、

甲醇等试剂均为分析纯,水为娃哈哈牌纯净水。

1.3 细胞

人胃癌BGC-823细胞购自中国医学科学院基础医学研究所。

2 方法与结果

2.1 胶束的制备

按照文献方法^[12],精密称取DSPE-PEG₂₀₀₀-PFV 1.5 mg、ART 2 mg、Soluplus 60 mg、TPGS₁₀₀₀ 12 mg、PTX 0.5 mg于50 mL圆底烧瓶中,加5 mL三氯甲烷使溶解,然后在40 °C水浴下减压旋转蒸发除去三氯甲烷。待烧瓶底部形成一层均匀白色膜时,加入磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)5 mL,在35 °C水浴下振摇11 min,再以微孔滤膜(0.22 μm)滤过2次,随后将滤过的胶束溶液转移至5 mL量瓶中,以PBS定容至刻度,即得PFV修饰PTX/ART共载靶向胶束。同时,按照上述方法制备空白胶束(空白对照)、PTX胶束、ART胶束和PTX/ART胶束,其中空白胶束只添加处方量的Soluplus和TPGS₁₀₀₀,PTX胶束只添加处方量的Soluplus、TPGS₁₀₀₀和PTX,ART胶束只添加处方量的Soluplus、TPGS₁₀₀₀和ART,PTX/ART胶束只添加处方量的Soluplus、TPGS₁₀₀₀、ART和PTX。

2.2 胶束的表征

按照本课题组前期建立的方法^[12]测定胶束的包封率,采用激光散射粒径测定仪和透射电镜分别测定胶束的粒径、多分散性指数(PDI)、Zeta电位并观察其形态学特征,每个试验重复3次。结果显示,载药胶束中PTX和ART的包封率均大于90%;5种胶束的粒径在47~51 nm之间,其中PFV修饰PTX/ART共载靶向胶束的粒径分布具有良好的集中性且高度集中在51 nm左右;5种胶束的PDI均小于0.20,Zeta电位均呈电中性;外观形态为圆球形。胶束的包封率、粒径、PDI和Zeta电位测定结果见表1;PFV修饰PTX/ART共载靶向胶束的透射电镜图见图1(其余胶束图略)。

表1 不同胶束的包封率、粒径、PDI和Zeta电位测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 1 The encapsulation efficiency, particle size, PDI and Zeta potential of different micelles ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品	包封率, %		粒径, nm	PDI	Zeta电位, mV
	PTX	ART			
PFV修饰PTX/ART共载靶向胶束	91.32±1.27	90.03±1.81	51.30±3.95	0.19±0.01	0.21±0.02
PTX/ART胶束	92.14±1.76	91.38±1.51	49.43±3.21	0.19±0.01	0.19±0.02
ART胶束	0	92.16±1.38	47.21±2.26	0.18±0.01	0.17±0.01
PTX胶束	94.02±1.21	0	48.21±2.10	0.18±0.01	0.18±0.01
空白胶束	0	0	47.28±3.62	0.18±0.02	0.17±0.01

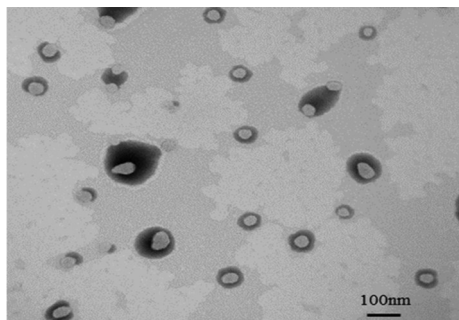


图1 PFV修饰PTX/ART共载靶向胶束的透射电镜图
Fig 1 TEM images of PFV-modified PTX/ART co-loaded targeting micelles

2.3 细胞培养

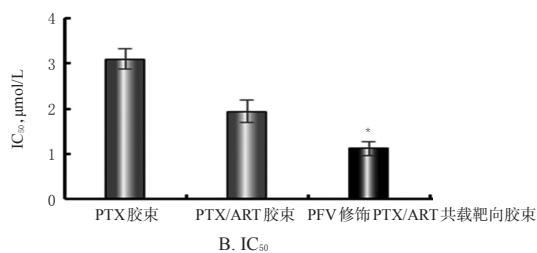
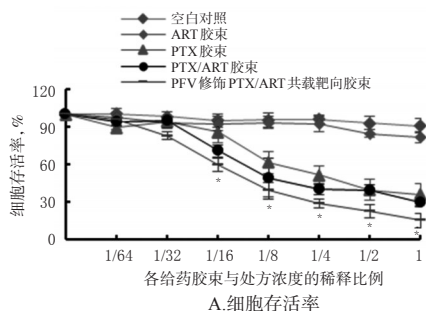
将BGC-823细胞接种到含1%青霉素和10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中,在37℃、5%CO₂条件下培养(下同)。第2天换液,隔天传代,采用4~6代细胞进行细胞试验。

2.4 胶束对BGC-823细胞的毒性作用考察

采用SRB法测定胶束的细胞毒性作用。按“2.1”项下方法分别制备空白胶束(空白对照)、PTX胶束、ART胶束、PTX/ART胶束和PFV修饰PTX/ART共载靶向胶束,各含药胶束中PTX浓度均为10 μmol/L,ART浓度均为100 μmol/L。采用二倍稀释法,以PBS(pH=7.4)为稀释溶剂,使各胶束的药物浓度分别为处方浓度的1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64,作为系列稀释倍数样品进行试验。将对数生长期的细胞接种至96孔板中(1.5×10⁴个/孔),分为不同稀释倍数的胶束给药组,先用不含药的培养基培养24 h后,吸弃培养基,然后加入相应的含药培养基[180 μL/孔,其中胶束给药量均为20 μL/孔],继续培养48 h。然后以10%三氯乙酸固定细胞,加入0.4% SRB染料染色22 min,再加入Tris碱液溶解混合后的染料染色25 min。最后,采用酶标仪测定各孔在540 nm波长下的吸光度(OD)值,并计算细胞存活率:[细胞存活率(%)=给药组OD值/空白对照组OD值×100%]。试验重复3次。采用GraphPad 6.0软件计算不同胶束对细胞的半数抑制浓度(IC₅₀)。采用SPSS 18.0统计软件进行数据分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验,*P*<0.05表示差异有统计学意义。

结果显示,空白胶束对细胞无明显毒性作用,PTX胶束、PTX/ART胶束和PFV修饰PTX/ART共载靶向胶束对细胞的IC₅₀分别为(3.09±0.22)、(1.93±0.24)、(1.11±0.15) μmol/L(均以PTX计,下同),且PFV修饰PTX/ART共载靶向胶束对细胞的IC₅₀显著低于PTX胶束和PTX/ART胶束(*P*<0.05)。当胶束浓度为处方浓度的1/16~1(即PTX浓度为0.63~10 μmol/L)时,PFV修饰PTX/ART共载靶向胶束组细胞的存活率较其他各组均显著降低(*P*<0.05);当胶束中PTX浓度为10 μmol/L

时,对细胞的毒性作用最强,因此在后续试验中均设定胶束中PTX的浓度为10 μmol/L。结果见图2。



注:PFV修饰PTX/ART共载靶向胶束与其他胶束比较,**P*<0.05

Note: PFV-modified PTX/ART co-loaded targeted micelles vs. other micelles, **P*<0.05

图2 不同胶束对BGC-823细胞的毒性作用

Fig 2 Toxicity effect of different micelles to BGC-823 cells

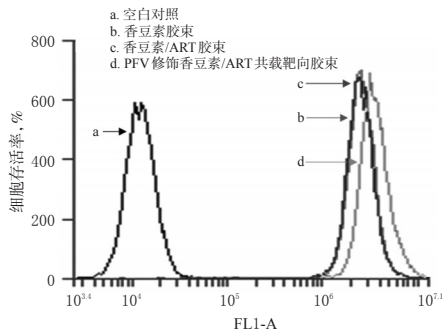
2.5 BGC-823细胞对胶束的摄取情况考察

以香豆素作为荧光探针考察细胞对胶束的摄取情况。以香豆素代替PTX,按“2.1”项下方法制备香豆素胶束、香豆素/ART胶束、PFV修饰香豆素/ART共载靶向胶束(香豆素的含量均为2 μmol/L^[3],其余药物和辅料的用量不变),并同时制备空白胶束作为空白对照。取对数生长期BGC-823细胞接种至6孔板中(2.5×10⁵个/孔),分为不同胶束给药组,先用不含药的培养基培养24 h后,弃培养基,然后加入新鲜含药培养基[180 μL/孔,其中胶束给药量均为20 μL/孔(含药胶束中ART浓度均为100 μmol/L)],继续培养3 h。然后以PBS洗板,以0.25%胰蛋白酶消化细胞后加入0.5 mL PBS。采用流式细胞仪测定各组细胞荧光强度,该值越大,说明细胞对胶束的摄取越多。

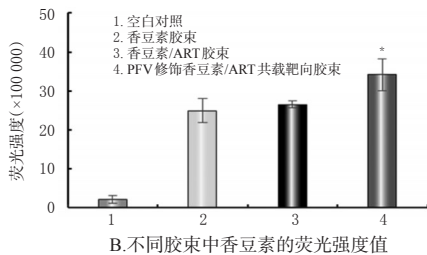
结果显示,空白对照组、香豆素胶束组、香豆素/ART胶束组、PFV修饰香豆素/ART共载靶向胶束组细胞的荧光强度分别为(2.18±0.09)×10⁴、(2.49±0.24)×10⁶、(2.64±0.09)×10⁶、(3.42±0.31)×10⁶;其中,PFV修饰香豆素/ART共载靶向胶束的荧光强度最大,且显著大于其他各胶束样品(*P*<0.05),表明PFV修饰后可提高药物的靶向性,结果见图3。

2.6 胶束对BGC-823细胞的靶向性考察

以香豆素作为荧光探针考察胶束的靶向性。以香豆素代替PTX,按“2.1”项下方法制备香豆素胶束、香豆素/ART胶束、PFV修饰香豆素/ART共载靶向胶束;同法



A.不同胶束中香豆素的荧光强度曲线



B.不同胶束中香豆素的荧光强度值

注:PFV 修饰香豆素/ART 共载靶向胶束与其他各样品比较, * $P < 0.05$

Note: PFV modified PTX/ART co-loaded targeting micelles vs. other micelles, * $P < 0.05$

图3 BGC-823细胞对胶束的摄取情况

Fig 3 Uptake of micelles by BGC-823 cells

进行细胞分组、给药,继续培养3 h后,以PBS洗板,加入4%多聚甲醛固定细胞8 min,在避光处用Hoechst 33258对细胞进行染色。采用荧光显微镜观察细胞中药物的分布情况,其中蓝色荧光区域代表BGC-823细胞核,绿色荧光区域代表香豆素,蓝绿色荧光区域为细胞与香豆素分布的叠加处。

结果显示,在各胶束样品中,PFV修饰香豆素/ART共载靶向胶束在细胞中的荧光强度最大,说明药物可选

择性地分布在细胞核内。各组细胞中荧光强度的大小顺序为PFV修饰香豆素/ART共载靶向胶束组>香豆素/ART胶束组>香豆素胶束组>空白对照组,结果见图4。

2.7 PFV修饰PTX/ART共载靶向胶束对BGC-823细胞侵袭的影响

采用Transwell小室法进行测定。按“2.1”项下方法分别制备空白胶束(空白对照)、PTX胶束、ART胶束、PTX/ART胶束和PFV修饰PTX/ART共载靶向胶束,各含药胶束中PTX浓度均为10 $\mu\text{mol/L}$,ART浓度均为100 $\mu\text{mol/L}$ 。取对数生长期BGC-823细胞,以0.25%胰蛋白酶溶液消化后,接种在Transwell小室中(1.5×10^5 个/孔),分为不同胶束给药组,各小室中加入相应含药培养基[200 μL /室,给药量为20 μL /室]。在24孔板中加入含10%胎牛血清的培养基(700 μL /孔),将上述Transwell小室放在24孔板中培养10 h后,用棉球擦去小室中未侵袭的细胞,并用4%多聚甲醛固定小室下方侵袭的细胞25 min,然后用0.1%结晶紫染色15 min。采用显微镜观察,并随机选取1个视野拍照,镜下紫色信号的数量与侵袭通过小室基底膜的细胞数量成正比。

结果显示,与空白对照组比较,ART胶束组、PTX/ART胶束组以及PFV修饰PTX/ART共载靶向胶束组的紫色信号强度依次减弱,表明侵袭的细胞数量依次减少。各胶束对细胞的侵袭抑制作用强弱顺序为PFV修饰PTX/ART共载靶向胶束>PTX/ART胶束>ART胶束>PTX胶束>空白对照,结果见图5。

3 讨论

近年来,胶束作为化疗药物的运送载体在抗肿瘤方面的应用受到越来越多的关注,其疏水嵌段组成的聚合物胶束内核能够为难溶性药物提供贮藏空间,而疏水性

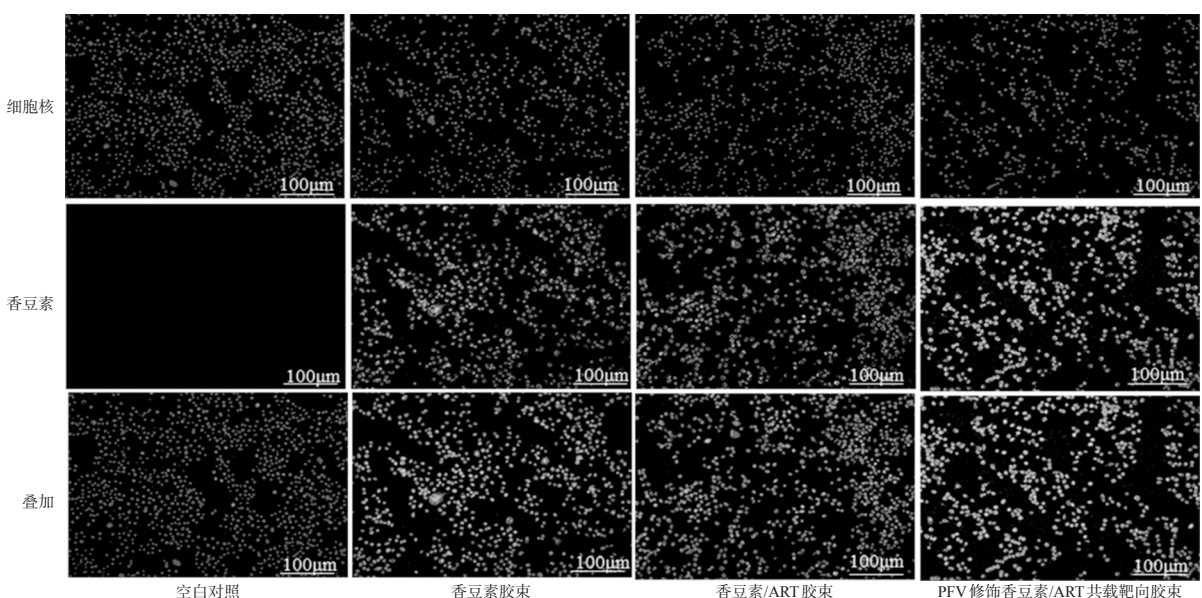


图4 胶束在BGC-823细胞中的分布显微图

Fig 4 Micrographs of the distribution of micelles in BGC-823 cells

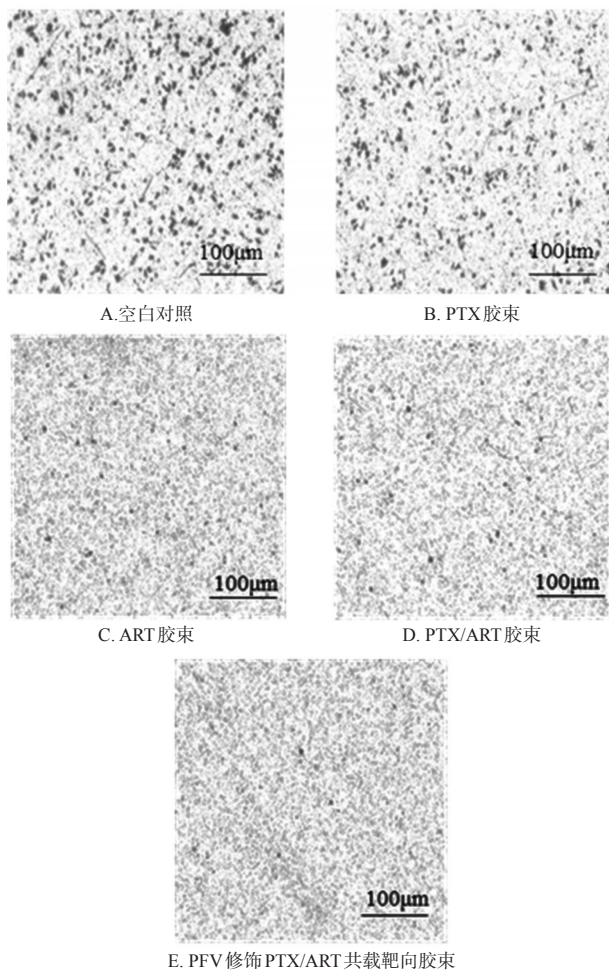


图5 胶束对BGC-823细胞侵袭影响的显微图

Fig 5 Micrographs of the effect of micelles on the invasion of BGC-823 cells

化疗药物的溶解度也在亲水外壳的共同作用下明显提高^[8]。基于此,本课题组将化疗药PTX和ART共同包埋于胶束内,使这两种药物达到协同增效的目的。PFV是一种疏水性的电中性短肽,经PFV修饰的脂质体等递药系统能明显增加细胞对药物的摄取^[4]。本课题组前期通过酰化反应合成了DSPE-PEG₂₀₀₀-PFV,其可嵌入胶束中使PFV修饰于胶束外周。本研究制备的PFV修饰PTX/ART共载靶向胶束呈圆球形,粒径在51 nm左右,有良好的粒径分布和形态,药物的包封率均大于90%,符合2015版《中国药典》(四部)的要求^[13]。

体外细胞毒性试验中,PTX的终浓度设置为10 µmol/L是为了保证在杀伤肿瘤细胞的前提下,还能保证本研究各项试验中有足够的细胞存活量;在ART的Transwell小室预试验中,当ART的浓度为100 µmol/L时,恰能抑制细胞的侵袭和转移,因此本研究在胶束的处方中设置ART的浓度为100 µmol/L。本研究结果显示,空白胶束对BGC-823细胞无明显细胞毒性,这提示胶束膜材安全性较高,可作为运送药物的载体^[14]。PFV修饰PTX/ART共载靶向胶束中PTX浓度为0.63~10

µmol/L时,与其他胶束样品比较具有更强的细胞毒性。

因PTX和ART都不具有荧光活性,所以在细胞摄取和胶束靶向性试验中,本课题组选择具有荧光活性的香豆素作为探针药物。香豆素作为荧光探针在研究脂质体等给药体系的药物摄取情况中已有运用,具有简便、易操作的特点^[15]。本研究通过流式细胞仪和荧光显微镜对PFV修饰香豆素/ART共载靶向胶束进行定量和定性考察,发现香豆素的荧光强度在PFV修饰胶束组细胞中显著增强,表明PFV修饰后可增加载药胶束在肿瘤细胞中的分布,提高了药物的肿瘤靶向性,并增强了肿瘤细胞对药物的摄取。此外,本研究通过细胞侵袭试验发现,载有ART的胶束均呈现出对细胞侵袭的抑制作用,这表明ART的加入可抑制BGC-823细胞的侵袭和转移。

综上所述,本研究成功制备了PFV修饰PTX/ART共载靶向胶束,其具有较强的细胞毒性,能提高药物的肿瘤靶向性和细胞对药物的摄取能力,并且可抑制肿瘤细胞的侵袭和转移。但由于试验均在体外完成,并不能代表体内结果,在接下来的研究中,笔者将进一步展开PFV修饰PTX/ART共载靶向胶束的体内抗肿瘤作用研究。

参考文献

- [1] 黄叶明. 食道胃癌的MSCT成像技术及临床应用[D]. 福州: 福建医科大学, 2013.
- [2] 褚泽文, 刘延庆. 中医药治疗胃癌淋巴转移的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(7): 225-231.
- [3] 徐佳茗, 夏学军, 刘玉玲. 紫杉醇新型制剂及临床研究进展[J]. 实用药物与临床, 2016, 19(4): 510-517.
- [4] CAI D, GAO W, HE B, et al. Hydrophobic penetrating peptide PFVYLI-modified stealth liposomes for doxorubicin delivery in breast cancer therapy[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(7): 2283-2294.
- [5] 刘硕. 青蒿琥酯联合索拉非尼抗肿瘤作用的研究[D]. 淮南: 安徽理工大学, 2019.
- [6] 苗立云, 张祖貽. 铁离子增强青蒿琥酯抗癌作用及改变癌细胞死亡方式研究[J]. 中草药, 2008, 39(10): 1528-1532.
- [7] 李异兴, 李曦雯, 农晓琳. 青蒿琥酯抗肿瘤作用机制与临床应用的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(6): 986-989.
- [8] 王鑫. 多功能紫杉醇靶向聚合胶束的研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2019.
- [9] 曾迎春, 纪忠华, 谢兴亮, 等. 基于Soluplus的东莨菪内酯胶束在Caco-2细胞上的摄取和代谢[J]. 中国药学杂志, 2018, 53(23): 2029-2033.
- [10] 韩宝来, 李禄辉, 刘伟芬. 姜黄素胶束的制备与体外抗肿瘤活性研究[J]. 国际药学研究杂志, 2019, 46(8): 606-613.
- [11] 陈洋洋, 耿雪, 屈子卉, 等. 熊果酸/PF127/TPGS-多柔比星混合纳米胶束的制备及其体外释药特性研究[J]. 中国药

人参根提取物对小鼠脾淋巴细胞自噬、增殖和细胞因子分泌的影响及机制研究^Δ

李芳宇^{1*}, 齐滨¹, 边帅², 赵月¹, 卢姝言², 王佳雯², 赵大庆^{2#} (1. 长春中医药大学药学院, 长春 130117; 2. 长春中医药大学人参科学研究院, 长春 130117)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)21-2597-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.21.07

摘要 目的: 研究人参根提取物对小鼠脾淋巴细胞自噬、增殖及细胞因子分泌的影响, 并研究其作用机制。方法: 将小鼠脾淋巴细胞分为空白对照组、阳性对照组(刀豆蛋白 A, 5 μg/mL)和不同质量浓度人参根提取物组(32、125、500 μg/mL, 以冻干粉末计)。各组细胞加入相应药物培养 48 h 后, 分别采用吖啶橙染色法检测细胞的自噬情况; 采用 CCK-8 法检测细胞的增殖情况; 采用酶联免疫吸附法测定细胞培养液中白细胞介素 4(IL-4)、IL-6、肿瘤坏死因子 α(TNF-α)的水平; 采用 Western blotting 法检测细胞中微管相关蛋白轻链 β₃(LC3B)、酵母 ATG6 同源物(Beclin-1)的表达水平以及腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)、蛋白激酶 B(AKT)、雷帕霉素靶蛋白(mTOR)的磷酸化水平。结果: 与空白对照组比较, 32、125、500 μg/mL 人参根提取物均能够增加小鼠脾淋巴细胞酸性自噬体的数量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 125、500 μg/mL 人参根提取物均可显著提高细胞存活率, 显著提高细胞中 IL-4、IL-6 和 TNF-α 的水平, 显著促进细胞中 LC3B I 向 LC3B II 转化, 显著上调细胞中 Beclin-1 蛋白表达水平, 显著提高 AMPK 蛋白的磷酸化水平, 显著降低 AKT 和 mTOR 蛋白的磷酸化水平, 差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论: 人参根提取物能通过激活 AMPK、抑制 AKT 活化来抑制 mTOR 活性, 从而诱导小鼠脾淋巴细胞发生自噬、激活脾淋巴细胞活性、调节细胞因子分泌以发挥免疫增强作用。

关键词 人参根提取物; 脾淋巴细胞; 自噬; 细胞因子; 免疫增强作用

Study on the Effects of Ginseng Root Extract on Autophagy, Proliferation and Cytokine Secretion of Mice Splenic Lymphocytes and Its Mechanism

LI Fangyu¹, QI Bin¹, BIAN Shuai², ZHAO Yue¹, LU Shuyan², WANG Jiawen², ZHAO Daqing² (1. School of Pharmacy, Changchun University of TCM, Changchun 130117, China; 2. Institute of Ginseng Science, Changchun University of TCM, Changchun 130117, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of ginseng root extract on autophagy, proliferation and cytokine of splenic lymphocyte of mice, and to study its mechanism. METHODS: The splenic lymphocyte of mice were divided into blank control group, positive control group (concanavalin A, 5 μg/mL), different concentration of ginseng root extract groups (32, 125, 500 μg/mL, by lyophilized powder). After 48 h of culture with the corresponding medicine, acridine orange staining method was used to detect autophagy of splenic lymphocyte; CCK-8 assay was used to detect the cell proliferation; ELISA assay was used to determine the levels of IL-4, IL-6 and TNF-α in cell culture; Western blotting method was used to detect the expression of LC3B and Beclin-1, as well as the phosphorylation of AMPK, AKT and mTOR. RESULTS: Compared with blank control group, 32, 125, 500 μg/mL ginseng root extract could increase the number of acidic autophagosomes in splenic lymphocytes of mice ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); 125, 500 μg/mL Ginseng root extract could significantly enhance the survival rate of splenic lymphocytes, the levels of IL-4, IL-6 and TNF-α and the transformation of LC3B I to LC3B II, significantly increased the protein expression of Beclin-1,

房, 2019, 30(20): 2789-2795.
[12] 王姣, 王艳红, 刘爽, 等. 星点设计-响应面法优化穿膜肽修饰紫杉醇和他莫昔芬脂质体的处方[J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(4): 825-827.

Δ 基金项目: 国家重点研发计划项目(No. 2017YFC1702100); 吉林省教育厅“十三五”科学技术项目(No. JJKH20190478KJ)

* 硕士研究生。研究方向: 中药生物技术。E-mail: L18843926718@163.com

通信作者: 研究员, 硕士生导师, 博士。研究方向: 中药化学、中药生物技术。E-mail: zhaodaqing1963@163.com

[13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 371-374.

[14] ZHAO J, XU Y, WANG C, et al. Soluplus/TPGS mixed micelles for dioscin delivery in cancer therapy[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2017, 43(7): 1197-1204.

[15] LI XT, ZHOU ZY, JIANG Y, et al. PEGylated VRB plus quinacrine cationic liposomes for treating non-small cell lung cancer[J]. *J Drug Target*, 2015, 23(3): 232-243.

(收稿日期: 2020-05-12 修回日期: 2020-09-21)

(编辑: 林静)