

咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂的制备及其体外抑制乳腺癌细胞作用研究

王琢^{1,2}, 马宏伟^{1,2}, 王向涛^{1,2*}

1. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193

摘要: 目的 优化咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂的处方, 并考察其体外抑制乳腺癌细胞作用。方法 以泊洛沙姆 188、蜂胶作为载体, 采用反溶剂沉淀法制备, 通过星点设计-效应面法优化最佳制备工艺参数, 并考察咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂的稳定性、载药量、包封率以及冻干保护剂的筛选, 同时考察对 4T1 乳腺癌细胞的生长抑制作用和细胞摄取情况。结果 咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂的最优处方为蜂胶 0.88 mg/mL、咖啡酸苯乙酯 1.86 mg/mL、泊洛沙姆 188 1 mg/mL, 制备得到咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂平均粒径为 150 nm 左右, 包封率 98% 以上, 在各种生理介质中都能够稳定存在; 0.5% 的 BSA 对于咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂的冻干保护效果最好。咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂对 4T1 乳腺癌细胞的抑制作用与咖啡酸苯乙酯相比提高了 2.95 倍。咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂被细胞摄取后主要分布在细胞质中, 随着给药时间的增长, 摄取也逐步提高。结论 所得咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂具有较高的包封率、载药量, 并显著提高了咖啡酸苯乙酯对于 4T1 细胞的抑制作用。

关键词: 咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂; 星点设计-效应面法; 粒径; 包封率; 制备; 稳定性; 4T1 乳腺癌细胞; 抑制作用; 细胞摄取

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2022)04-0729-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.04.008

Preparation of caffeic acid phenethyl ester nanosuspension and its inhibitory effect on breast cancer cells *in vitro*

WANG Zhuo^{1,2}, MA Hong-wei^{1,2}, WANG Xiang-tao^{1,2}

1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing, 100193, China

Abstract: Objective To optimize formulation of caffeic acid phenethyl ester nanosuspensions (CAPE-NPs) and evaluate its antitumor activity against breast cancer cell *in vitro*. **Methods** Poloxam 188 and propolis were used as carriers, and the formulation was prepared by antisolvent precipitation method. Preparation process parameters were optimized using Box-Behnken design-response surface method. The stability, drug loading capacity, and encapsulation efficiency of CAPE-NPs were investigated, and the lyophilization protective agent was screened. At the same time, the growth inhibitory effect and cellular uptake of 4T1 breast cancer cells of CAPE-NPs was evaluated by MTT assay *in vitro*. **Results** The optimal formulation included 0.88 mg/mL propolis, 1.86 mg/mL caffeic acid phenethyl ester, and 1 mg/mL P188. The mean particle size was about 150 nm, and the encapsulation rate was above 98%. CAPE-NPs could stably exist in various physiological media. 0.5% BSA could play a good protective role in the freeze drying process of CAPE-NPs. The inhibitory effect of CAPE-NPs against 4T1 breast cancer cells was 2.95 times higher than that of caffeic acid phenethyl ester. After being taken up by cells, it is mainly distributed in the cytoplasm, and the uptake of CAPE-NPs gradually increases with the increase of administration time. **Conclusion** CAPE-NPs has high encapsulation efficiency and drug loading, and can significantly improve the inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester against 4T1 cells.

Key words: caffeic acid phenethyl ester nanosuspensions; Box-Behnken design-response surface method; particle size; encapsulation rate; preparation; stability; 4T1 breast cancer; inhibitory effect; cellular uptake

收稿日期: 2022-02-05

基金项目: 中国医学科学院医学与健康创新工程重大协同创新项目 (2016-12M-1-012)

作者简介: 王琢 (1995—), 女, 硕士研究生, 主要从事药物新剂型研究。E-mail: 773935370@qq.com

*通信作者: 王向涛 (1973—), 男, 研究员, 博士生导师, 主要从事药物新剂型研究。E-mail: xtaowang@163.com

蜂胶是由意大利蜂工蜂采集的植物树脂所形成的固体胶状物^[1], 因其具有良好的药理作用和生物活性近年来越来越多地被人们所研究, 并被《中国药典》和《可用于保健食品的物品名单》收录。咖啡酸苯乙酯是蜂胶中主要有效成分, 产自中国的蜂胶中咖啡酸苯乙酯的质量分数可以达到 15~25 mg/g^[2-3]。有研究表明, 咖啡酸苯乙酯具有多种药理活性, 如抑制脂质过氧化^[4]、抑制血小板聚集而预防血栓栓塞的形成^[5]、抑制多种免疫细胞因子从而促进伤口愈合^[6]; 同时咖啡酸苯乙酯也是强效的特异性核因子 κ B (NF- κ B) 活性抑制剂, 能够在有效促进肿瘤细胞凋亡的同时抑制肿瘤引发的炎症反应^[5]。然而由于咖啡酸苯乙酯的苯环、酯类结构, 溶解度极低, 25 °C 条件下仅为 23 μ g/mL^[7]。研究人员曾采用助溶剂提高其溶解度以用于动物体内实验, 如 Gong 等^[8]将咖啡酸苯乙酯溶于 DMSO 后用生理盐水稀释, 用于治疗小鼠的睾丸功能障碍; Ali 等^[9]对大鼠 ip 以聚山梨酯 80 溶解的咖啡酸苯乙酯用于治疗阿霉素诱导的脑损伤, 但这些方法不能用于临床, 使咖啡酸苯乙酯在临床疾病的治疗、预防上受到了较大限制。目前对咖啡酸苯乙酯制剂的研究较少, 将咖啡酸苯乙酯纳米化以解决其溶解度差、生物利用度低等是较有前景的研究方向, 不过也存在一些缺陷, 如 Wang 等^[10]制备了咖啡酸苯乙酯微囊, 载药量仅有 10%; Arasoglu 等^[11]制备了咖啡酸苯乙酯-PLGA 微球, 载药量达到 49%, 但制备工艺繁琐, 不适用于工业化生产, 因此迫切需要一种简单高效的咖啡酸苯乙酯纳米粒的制备方法。本研究以蜂胶和泊洛沙姆 (P188) 为载体, 以简单的反溶剂沉淀法制备咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂, 并采用星点设计-效应面法优化处方, 所得的咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂制备工艺简单, 稳定性好, 显著提高了咖啡酸苯乙酯的表观溶解度, 较游离的咖啡酸苯乙酯显著提高了体外抗肿瘤活性, 口服有望能提高咖啡酸苯乙酯生物利用度, 静脉注射有望通过纳米粒的 EPR 效应提高抗肿瘤效果^[12], 为咖啡酸苯乙酯纳米粒的工业化生产和临床应用提供参考。

1 仪器与试剂

Mettler Toledo AL204 型电子天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司); PURELAB Classic 综合纯水仪 (英国 ELGA 公司); KQ3200DB 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); SHB-III 循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司); RE-

52CS 型旋转蒸发器 (上海振捷实验设备有限公司); Zetasizer-nanozs 90 纳米粒度、Zeta 电位分析仪 (马尔文仪器有限公司); PLPHR 2-4 LD Plus 低温冻干机 (德国 CHRIST 有限公司) MCO-18AC 二氧化碳培养箱 (日本 Sanyo 公司), Eclipse Ts2 荧光倒置显微镜 (上海尼康仪器有限公司)。

蜂胶 (批号 CC31172602, 上海源叶生物有限公司), 咖啡酸苯乙酯 (质量分数 98%, 批号 170925J, 道斯夫生物有限公司), 维生素 E 聚乙二醇琥珀酸酯 (TPGS, 质量分数 99% 以上, 批号 20121203, 上海海斯夫生物有限公司), 甲氧基聚乙二醇-聚乙内酯 (PEG2000-PCL2000, 质量分数 99%, 批号 20140521, 山东岱罡生物技术有限公司), P-188 (质量分数 99.5%, 批号 P-7000, 美国 Sigma 公司); 聚山梨酯 80 (质量分数 99% 以上, 批号 0121B071, 北京兰博利德商贸有限公司); 麦芽糖 (批号 0106C020, 北京兰博利德商贸有限公司); 海藻糖 (批号 L-32008, 上海吉至有限公司); 甘露醇 (批号 924C037, 北京索莱宝科技有限公司); 色谱纯甲醇、色谱纯乙腈 (批号分别为 M37630FAF、M6432C31E, 上海吉至生物科技有限公司); 香豆素 6 (Cy6, 批号 EZ3192S151, 德国 Biofroxx 公司); 噻唑兰 (MTT, 批号 EZ3453A124, 德国 Biofroxx 公司); 4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI, 批号 EZ5679Z125, 德国 Biofroxx 公司); RPMI 1640 培养基 (批号 K210816, 上海源培生物科技有限公司); 胎牛血清 (批号 20191124, 杭州四季青有限公司); 磷酸盐缓冲液 (PBS, 批号 AC83291379, 海克隆生物化学制品有限公司)。4T1 乳腺癌细胞株由国家医学实验细胞资源库提供。

2 方法与结果

2.1 咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂的制备

依据美国食品药品监督管理局非活性成分指南, 本实验基于反溶剂沉淀法对纳米混悬剂常用辅料 TPGS、PEG2000-PCL2000、P188、聚山梨酯 80 进行稳定剂筛选。精密称取一定量的咖啡酸苯乙酯、稳定剂共溶于丙酮, 超声条件下缓慢滴注于去离子水中, 45 °C 减压旋蒸除去有机溶剂, 即得。测定粒径和 PDI, 结果发现要么在制备过程中有晶体析出, 要么粒径在 1 000 nm 以上, 用以上辅料为稳定剂均无法制得咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂。

在相似条件下, 本课题组已用 P188 成功制备了蜂胶纳米粒^[13], 而咖啡酸苯乙酯正是蜂胶中的一

种成分,故考虑将蜂胶作为载体辅助咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂的制备。将上述稳定剂与蜂胶、咖啡酸苯乙酯以 1:1:1 的质量比在相同条件下均成功制备得到了咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂,见表 1。结果平均粒径均在 150 nm 以下,其中以咖啡酸苯乙酯-PEG2000-PCL2000 纳米混悬剂粒径最优,咖啡酸苯乙酯-P188 纳米混悬剂分布最均一。但室温放置 24 h 后,以 TPGS、聚山梨酯 80、PEG2000-PCL2000 为稳定剂制备的纳米混悬剂均出现不可逆沉淀;以 P188 为载体制备的纳米混悬剂在放置 48 h 后有少量析出,振摇可消失,故选择相对稳定的 P188 进行进一步考察。

表 1 加入蜂胶后不同种类稳定剂对咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂粒径和 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 1 Effects of different stabilizers on particle size and PDI of CAPE-NPs after propolis addition ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

稳定剂	平均粒径/nm	PDI
TPGS	142.7±3.0	0.237±0.016
PEG2000-PCL2000	98.9±1.4	0.321±0.037
P188	143.8±1.9	0.232±0.015
聚山梨酯 80	136.9±4.0	0.243±0.004

初步确立咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂的制备方法为:精密称取一定量的咖啡酸苯乙酯、蜂胶、P188 共同溶解于丙酮溶剂中,向去离子水中缓慢超声滴注,45℃减压旋蒸除去有机溶剂,即得咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂。

2.2 咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂处方筛选的单因素考察

2.2.1 P188 质量浓度考察 蜂胶、咖啡酸苯乙酯质量浓度均为 1 mg/mL,采用不同质量浓度(1、2、3 mg/mL)的 P188,分别制备咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂,测定粒径和 PDI,结果见表 2。P188 质量浓度对于粒径没有显著影响,随着 P188 质量浓度增大,PDI 略有减小。为达到高载药量并减小辅料的用量,在不影响粒径和稳定性的情况下,后续拟选取低质量浓度 P188 进行制备。

2.2.2 蜂胶质量浓度考察 固定咖啡酸苯乙酯、P188 质量浓度均为 1 mg/mL,考察不同质量浓度(0、0.2、0.5、1.0、1.5 mg/mL)蜂胶,分别制备咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂,结果见表 3。不加蜂胶时平均粒径为 454 nm,且制备过程中有沉淀产生,而

表 2 不同质量浓度 P188 对咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂粒径和 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 2 Effects of different concentration of P188 on particle size and PDI of CAPE-NPs ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

P188 质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	平均粒径/nm	PDI
1	143.8±1.9	0.232±0.015
2	155.3±1.6	0.223±0.012
3	149.1±3.2	0.221±0.001

加入少量蜂胶后,粒径和 PDI 出现了明显的减小,当蜂胶质量浓度达到 1 mg/mL 时,粒径最小,而继续增大蜂胶质量浓度后,粒径和 PDI 则开始出现上升趋势。

表 3 不同质量浓度蜂胶对于咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂粒径和 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 3 Effects of different concentration of propolis on particle size and PDI of CAPE-NPs ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

蜂胶质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	平均粒径/nm	PDI
0	454.0±18.2	0.266±0.051
0.2	189.9±1.2	0.272±0.041
0.5	171.4±1.9	0.195±0.010
1	143.8±1.9	0.232±0.015
1.5	152.3±1.2	0.242±0.031

2.2.3 咖啡酸苯乙酯质量浓度考察 固定蜂胶、P188 质量浓度均为 1 mg/mL,考察不同质量浓度(1、2、3 mg/mL)咖啡酸苯乙酯对咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂制备的影响,结果见表 4。咖啡酸苯乙酯的质量浓度越高,粒径、PDI 也随之增大。

表 4 不同质量浓度咖啡酸苯乙酯对咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂粒径和 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 4 Effects of different concentration of caffeic acid phenethyl ester on particle size and PDI of CAPE-NPs ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

咖啡酸苯乙酯质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	粒径/nm	PDI
1	143.8±1.9	0.232±0.015
2	162.3±0.6	0.252±0.022
3	181.9±1.2	0.321±0.012

2.3 咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂处方的星点设计-效应面法优化

2.3.1 星点设计方案 在单因素考察结果的基础

上,选择对咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂制备影响显著的 3 个因素,即蜂胶质量浓度(A)、咖啡酸苯乙酯质量浓度(B)、P188 质量浓度(C),每个因素设计 3 个水平,见表 5。以粒径、PDI 作为评价指标,采用 Design-Expert 10.0 软件 Box-Behnken 中心组合对试验进行设计,不同制备工艺下的粒径、PDI 值变化见图 1。

2.3.2 数学模型拟合和分析 采用 Design-Expert 8.0 软件对数据进行处理和效应面处方优化^[14-15],以蜂胶质量浓度(X_A)、咖啡酸苯乙酯质量浓度(X_B)、P188 质量浓度(X_C)为自变量,以粒径大小(Y_1)和 PDI (Y_2)为因变量,进行二次多项式方程拟合。

$$Y_1 = 154.64 + 3.56 X_A + 23.24 X_B + 5.32 X_C - 14.03 X_A X_B + 1.00 X_B X_C + 29.72 X_A^2 + 9.42 X_B^2 - 8.51 X_C^2, R^2 = 0.8489$$

$$Y_2 = 0.26 - 1.875 \times 10^{-3} X_A + 1.7 \times 10^{-2} X_B - 4.625 \times 10^{-3} X_C - 7.53 - 3 X_A X_B + 0 X_B X_C + 3.8 \times 10^{-2} X_A^2 + 4.525 \times 10^{-3} X_B^2 - 1.2 \times 10^{-2} X_C^2, R^2 = 0.7600$$

Y_1 是评价纳米粒的主要指标,以粒径和 PDI 尽量小、咖啡酸苯乙酯质量浓度尽量高、P188 质量浓度尽量低为处方优化依据,得到最佳处方条件为: $X_A = 0.88 \text{ mg/mL}$, $X_B = 1.86 \text{ mg/mL}$, $X_C = 1 \text{ mg/mL}$,预测粒径为 142.199 nm, PDI 为 0.2501。由此可见,

蜂胶质量浓度、咖啡酸苯乙酯质量浓度、P188 质量浓度 3 个因素与粒径、PDI 值具有良好的相关性。

表 5 Box-Behnken 试验设计方案和响应值

Table 5 Box-Behnken test design and response value

编号	A	B	C	粒径/nm	PDI
1	0.5	2	3	188.2	0.281
2	1	1	1	143.8	0.232
3	1.5	3	2	221.3	0.313
4	1	2	2	156.7	0.281
5	0.5	3	2	239.1	0.328
6	1.5	2	3	179.4	0.261
7	1	2	2	151.2	0.269
8	1.5	1	2	176.5	0.291
9	1	2	2	155.3	0.223
10	1	2	2	162.2	0.272
11	0.5	2	1	159.5	0.298
12	0.5	1	2	138.2	0.276
13	1.5	2	1	176.3	0.303
14	1	1	3	147.2	0.243
15	1	3	3	169.3	0.272
16	1	2	2	147.8	0.251
17	1	3	1	181.9	0.281

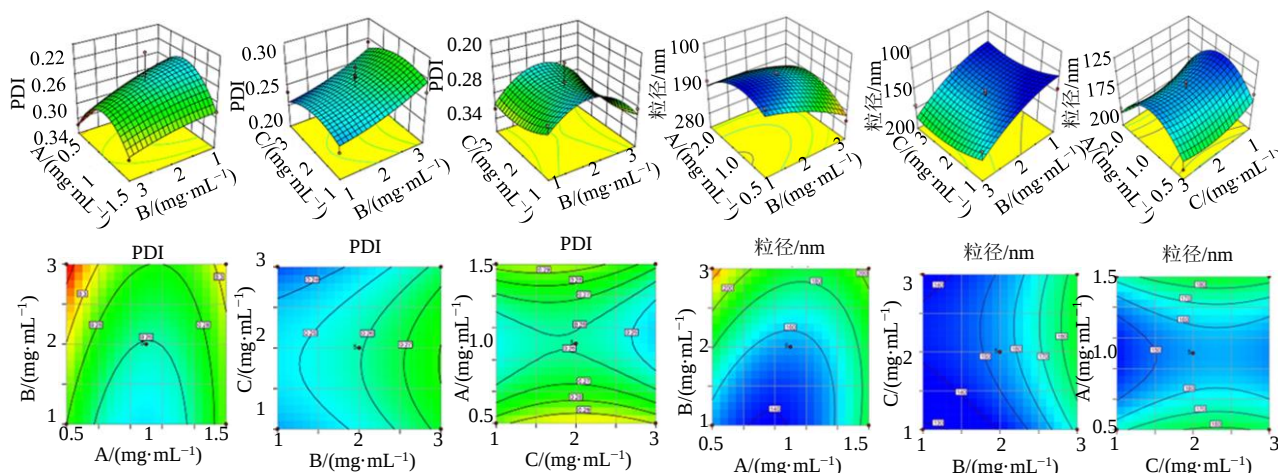


图 1 各因素对于粒径和 PDI 影响的响应面图

Fig. 1 Response surface diagram of the influence of each factor on particle size and PDI

2.3.3 优化处方验证 依照优化后处方制备 3 批咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂,粒径和 PDI 测定结果见表 6,粒径分布见图 2。可见 3 批制备得到的咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂粒径均在 150 nm 左右, PDI 在 0.25 左右,样品制备重现性较好,说明该模型可信度良

好,预测性较优,可用于处方优化。

2.4 咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂稳定性考察

2.4.1 放置稳定性考察 将制备好的咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂于室温 25 ℃放置,测定 10 d 内的粒径变化。结果见图 2。咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂在

10 d 内粒径变化较小, 放置过程中会有少量沉淀产生, 振摇后可消失, 故该纳米粒的稳定性在短期内良好, 但是如果以纳米混悬液的形式长期储存和运输还不是十分的理想。

表 6 咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂的粒径和 PDI 测定结果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 6 Particle size and PDI determination results of CAPE-NPs ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

批次	平均粒径/nm	PDI
1	145.70 ± 4.71	0.246 ± 0.021
2	148.51 ± 2.15	0.252 ± 0.037
3	153.11 ± 1.17	0.243 ± 0.025

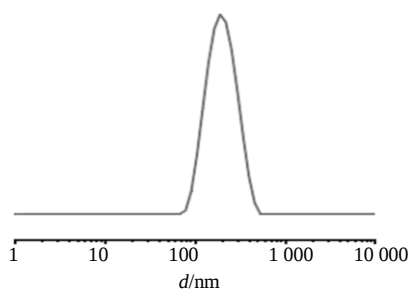


图 2 咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂粒径分布
Fig. 2 Particle size distribution of CAPE-NPs

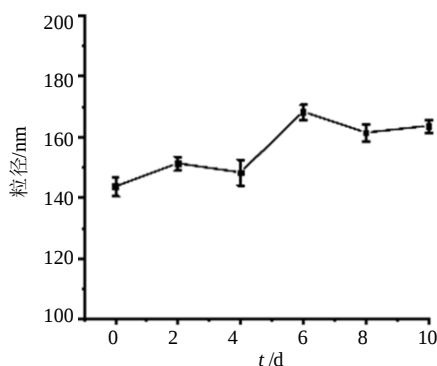


图 3 室温放置 10 d 咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂粒径变化
Fig. 3 Particle size change of CAPE-NPs placed at room temperature within 10 d

2.4.2 介质稳定性考察 将制备好的咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂在 37 °C 条件下分别于生理盐水、葡萄糖溶液、PBS 缓冲液、人工胃液和人工肠液中进行 8 h 的粒径变化监测, 结果见图 2。在各生理介质中的咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂粒径变化均较小, 说明该纳米粒在应用到体内时可以通过葡萄糖溶液或生理盐水来调节等渗, 同时适用于静脉注射和口服的给药方式。

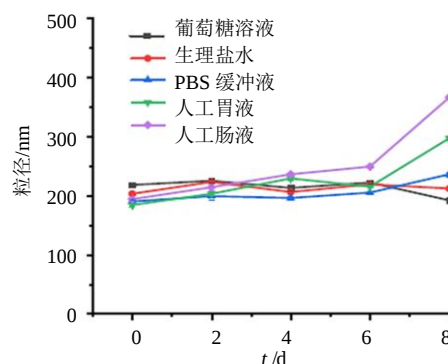


图 4 咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂在不同生理介质中的粒径变化
Fig. 4 Particle size change of CAPE-NPs in different physiological media

2.5 咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂的冻干和保护剂的筛选

冷冻干燥固化是纳米制剂长期储存和进一步加工的常用手段。取制备好的咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂, 初步设定用量 0.5%, 加入同种类冻干保护剂 (甘露醇、葡萄糖、半乳糖、蔗糖、BSA) 冷冻干燥, 并设立对照组 (不加入冻干保护剂), 加入以冻干前等体积的水复溶考察其溶解情况并测定粒径, 结果见表 7。结果发现, 加入不同种类冻干保护剂的咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂在冻干后都能够复溶, 而对对照组无法完全溶解。其中以 BSA 对于咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂的冻干保护效果最好, 复溶后粒径仅增大了 50 nm, 故选用 0.5% 的 BSA 用作咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂冷冻干燥的保护剂。

表 7 咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂加入不同保护剂冻干后复溶的平均粒径 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 7 Average particle size of CAPE-NPs after lyophilization with different protectants ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

冻干保护剂	复溶后粒径/nm
对照	—
甘露醇	463.5 ± 12.3
葡萄糖	491.2 ± 11.9
半乳糖	473.4 ± 5.1
蔗糖	329.1 ± 4.2
BSA	193.3 ± 2.9

2.6 咖啡酸苯乙酯纳米粒包封率和载药量的测定

2.6.1 对照品储备液的制备 精密称取咖啡酸苯乙酯对照品 2 mg, 置 2 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并

加至刻度, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 即得。

2.6.2 色谱条件 采用 Welch C₁₈ 反相色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.3%磷酸水溶液 (70:30), 柱温 30 ℃, 检测波长 270 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 进样量 20 μL。

2.6.3 专属性试验 取咖啡酸苯乙酯对照品溶液 (储备液稀释质量浓度释至 50 μg/mL) 和空白色谱纯甲醇溶液进样测定, 得到的咖啡酸苯乙酯吸收峰型良好, 保留时间为 4.5 min, 在相同时间内的色谱纯甲醇溶液溶剂对照无吸收峰。同时在该色谱条件下对蜂胶 (50 μg/mL)、P188 (50 μg/mL) 分别进样测

定, 结果发现在相同质量浓度条件下, P188 无吸收峰, 对咖啡酸苯乙酯的测定无干扰; 蜂胶则在与咖啡酸苯乙酯相同保留时间下存在吸收峰, 但是由于蜂胶中咖啡酸苯乙酯的质量分数较低 (实际测量质量分数为 1.82%), 相同质量浓度下蜂胶在 4.5 min 的吸收峰的面积对咖啡酸苯乙酯的吸收峰干扰小于 3%, 故将其忽略不计。取制备好的咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂混悬液以甲醇进行破乳稀释 (稀释至理论质量浓度 50 μg/mL), 进样测定, 结果咖啡酸苯乙酯的峰型良好, 无杂质峰干扰, 可以用于咖啡酸苯乙酯的定量检测。色谱图见图 5。

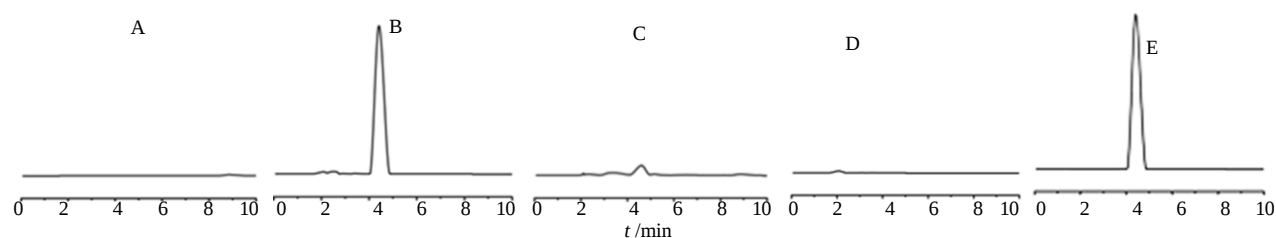


图 5 空白色谱纯甲醇 (A)、咖啡酸苯乙酯 (B)、蜂胶 (C)、P188 (D)、咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂 (E) 的 HPLC 图谱
Fig. 5 HPLC chromatograms of methanol (A), caffeic acid phenethyl ester (B), propolis (C), P188 (D), and CAPE-NPs (E)

2.6.4 标准曲线的建立 取咖啡酸苯乙酯对照品储备液, 分别稀释至 120、60、30、15、10、5、1、0.2 μg/mL, 进样测定峰面积。以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 建立线性回归方程, 得方程 $Y=3.5913X-3.8933$, $R^2=0.9998$ 。

2.6.5 包封率和载药量的测定 制备的 3 批样品分别取 2 mg 冻干咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂粉末, 使用甲醇进行破坏后稀释至 50 μg/mL, 进样测定其实际质量浓度, 计算载药量。分别取 2 mL 咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂混悬液, 以截留相对分子质量 3 000 的超滤离心管在 6 000 r/min 转速下离心 5 min, 对滤膜外侧溶液中的游离药物质量浓度进行测定, 计算包封率。结果见表 8。可见咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂载药量达到 50% 以上, 包封率达到 98% 以上, 且重现性良好, 不同批次样品间无差异, 说明药物被有效地包载在纳米粒中, 且几乎没有损失。

载药量=纳米粒中药物质量/纳米粒的质量

包封率=(混悬液中咖啡酸苯乙酯总量-游离咖啡酸苯乙酯的量)/混悬液中咖啡酸苯乙酯总量

2.7 咖啡酸苯乙酯纳米粒的细胞毒实验^[16-17]

将鼠源乳腺癌细胞 4T1 培养至对数生长期, 用含胎牛血清 10% 的 RPMI 培养液将细胞配成单细胞悬液, 以每孔约 1×10^4 个的细胞浓度接种于无菌

表 8 咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂的载药量和包封率结果 (n=3)
Table 8 Results of drug load and encapsulation rate of three batches of CAPE-NPs (n=3)

批次	载药量/%	包封率/%
1	58.33	99.07
2	54.67	98.91
3	53.91	98.31

96 孔培养板。在实验条件为 5% CO₂、37 ℃ 的培养箱培养 1 d, 弃培养液, 将咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂和咖啡酸苯乙酯的 DMSO 溶液以不完全培养基稀释, 药物设 2 500、790、250、79、25、7.9、2.5、0.79、0.25 μg/mL 共 9 个质量浓度, 每个质量浓度 3 个复孔, 同时设立对照组。将细胞孵育 48 h, 吸取上清溶液并弃去, 每孔加 5 mg/mL MTT 溶液 20 μL; 孵育 4 h 后, 停止孵育, 将孔内的培养上清液吸取弃去, 并于每孔均匀加入 200 μL DMSO, 均匀振荡 10 min 使其结晶均匀溶解。使用酶标仪测定吸光度值, 使用的检测波长为 570 nm。结果见图 6, 可知咖啡酸苯乙酯的 IC₅₀ 值为 23.73 μg/mL, 而纳米化的咖啡酸苯乙酯 IC₅₀ 值为 8.025 μg/mL, 即咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂对 4T1 乳腺癌细胞的抑制作用是咖啡酸苯乙酯的 2.95 倍。

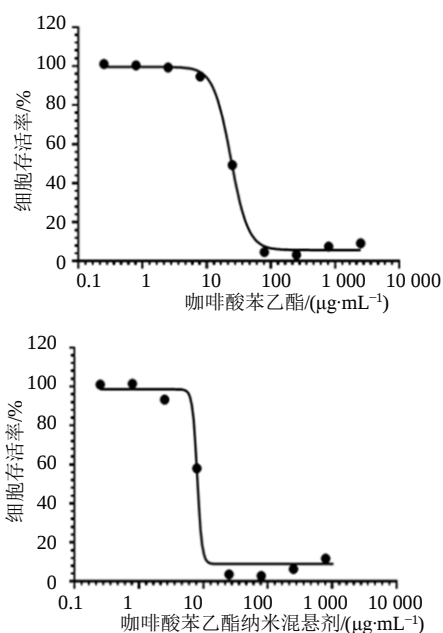


图 6 咖啡酸苯乙酯、咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂对于 4T1 乳腺癌细胞的生存抑制曲线

Fig. 6 Survival inhibition curve of caffeic acid phenethyl ester and CAPE-NPs on 4T1 breast cancer cells

2.8 咖啡酸苯乙酯纳米粒的细胞摄取

将培养至对数期的 4T1 细胞接种至 24 孔板, 每孔约 5×10^4 个细胞, 于培养箱中培养 24 h。将咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂以不完全培养基进行稀释, 设立 3 个测定时间点, 分别为 1、3、6 h, 每个时间点设立 3 个复孔。培养至 1、3、6 h 时弃去含药培养基, 用 PBS 溶液清洗 2 次, 每孔加入 0.4% 细胞固定液 0.4 mL 固定 20 min, 弃去后用 PBS 清洗 2 次, 每孔加入 0.5 µg/mL DAPI 染料 0.4 mL, 染色 10 min 后弃去, 再次用 PBS 清洗 2 次, 每孔加入 PBS 0.3 mL 后, 在荧光倒置显微镜下观测。结果见 7。从 Cy6 荧光强度随时间变化来看, 于给药后 6 h 时荧光最强, 且主要分布在细胞质中, 表明 4T1 细胞随着给药时间的增长对于咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂摄取也逐步提高, 但具体入胞机制还需要进一步探讨。

3 讨论

在制剂工艺优化和处方筛选中, 星点设计 - 效应面法常常作为一种可信性高、预测性良好的手段为研究人员所应用^[18]。本研究通过星点设计 - 效应面法对咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂处方进行了优化, 得到了制备工艺简单、放置相对稳定且粒径分布良好的纳米混悬剂。其制备过程中应用了 P188、蜂胶

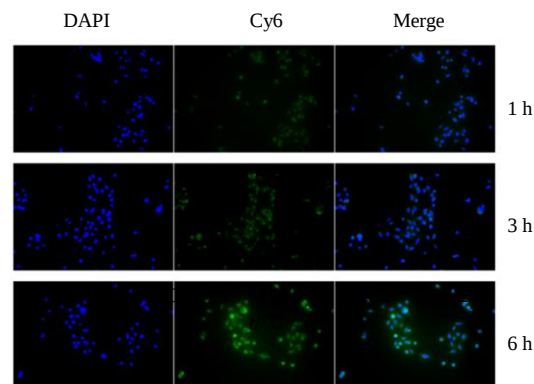


图 7 4T1 细胞在 6 h 内对咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂的摄取

Fig. 7 Uptake of CAPE NPs by 4T1 cells within 6 h

作为载体。首先 P188 因自身的胶束化作用能够提高药物的溶解度^[19]; 其次在尝试多种稳定剂制备效果不佳的情况下, 从之前 P188-蜂胶纳米粒的成功制备以及咖啡酸苯乙酯为蜂胶中成分得到启示, 猜测蜂胶有助于 P88-咖啡酸苯乙酯纳米粒的形成, 且蜂胶具有多种对人体有益的作用、安全无毒^[20]。结果加入蜂胶后制备得到的咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂的粒径分布和稳定性改善明显, 这可能由于来自同一天然药物的不同成分之间能够相互作用, 从而使最终得到的 P188-咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂形成了一个较稳定的体系。

在体外实验研究中, 咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂对 4T1 细胞的杀伤作用相较于咖啡酸苯乙酯提高了近 3 倍, 结合细胞摄取实验结果来看, 一方面可能是由于在将咖啡酸苯乙酯纳米化后, 提高了咖啡酸苯乙酯的溶出度和细胞对药物的摄取率; 另一方面可能是咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂本身具有缓释制剂的特性, 使药物能够缓慢持续地作用于肿瘤细胞且不易被清除, 另外少量蜂胶的加入也提高了药效。同时标记咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂的 Cy6 荧光随着时间增长在细胞质的分布也逐渐增多, 代表药物在细胞质中逐渐累积, 且能够长时间保留, 验证了咖啡酸苯乙酯促进肿瘤细胞凋亡的作用靶点是在细胞质中, 与文献报导的咖啡酸苯乙酯通过破坏线粒体膜电位诱导肿瘤细胞凋亡相吻合^[21]。

近年来研究人员为了提高咖啡酸苯乙酯的水溶性和生物利用度做出了各种尝试, 但多存在辅料用量大、载药量低、制备工艺复杂等缺点。本研究所使用的制备方法工艺简单, 成本低廉, 既能够减少药物在复杂处理过程中的损失, 又能够保证体内用药的各项需求, 为咖啡酸苯乙酯纳米混悬剂向工

业生产以及临床应用的转化提供了依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Anjum S, Ullaha A, Khan K, et al. Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review [J]. Saudi J Biol Sci, 2019, 26(7): 1695-1703.
- [2] Shao B, Mao L, Shao J, et al. Mechanism of synergistic DNA damage induced by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and Cu(II): Competitive binding between CAPE and DNA with Cu(II)/Cu(I) [J]. Free Radical Bio Med, 2020, 159(1): 107-118.
- [3] 张梅梅, 谢英花, 刘朝霞. 蜂胶中咖啡酸苯乙酯的合成及应用研究进展 [J]. 河北科技大学学报, 2020, 157(6): 528-536.
- [4] Chen C, Kao C, Liu C. The cancer prevention, anti-inflammatory and anti-oxidation of bioactive phytochemicals targeting the TLR4 signaling pathway [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(9): 2729.
- [5] Tambuwala M, Khan M, Thompson P, et al. Albumin nano-encapsulation of caffeic acid phenethyl ester and piceatannol potentiated its ability to modulate HIF and NF- κ B pathways and improves therapeutic outcome in experimental colitis [J]. Drug Deliv Transl Re, 2019, 9: 14-24.
- [6] Bruna R, Jeanine S, Andréa M. Caffeic acid phenethyl ester promotes wound healing of mice pressure ulcers affecting NF- κ B, NOS2 and NRF2 expression [J]. Life Sci, 2018, 207: 158-165.
- [7] Li Y, Liu L, Yu X, et al. Transglycosylation improved caffeic acid phenethyl ester anti-inflammatory activity and water solubility by *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrase [J]. J. Agric. Food Chem, 2019, 67(16): 4505-4512.
- [8] Gong P, Xiao X, Wang L, et al. Caffeic acid phenethyl ester, a propolis polyphenolic, attenuates potentially cadmium-induced testicular dysfunction in mice [J]. Toxin Rev, 2020, 39(2): 147-156.
- [9] Ali M, Menze E, Tadros M, et al. Caffeic acid phenethyl ester counteracts doxorubicin-induced chemobrain in Sprague-Dawley rats: Emphasis on the modulation of oxidative stress and neuroinflammation [J]. Neuropharmacology, 2020: 181: 108334.
- [10] Wang A, Leible M, Lin J, et al. Caffeic acid phenethyl ester loaded in skim milk microcapsules: Physicochemical properties and enhanced *in vitro* bioaccessibility and bioactivity against colon cancer cells [J]. J Agric Food Chem, 2020, 68(50): 14978-14987.
- [11] Arasoglu T, Derman S, Mansuroglu B. Comparative evaluation of antibacterial activity of caffeic acid phenethyl ester and PLGA nanoparticle formulation by different methods [J]. Nanotechnology, 2016, 27(2): 025103.
- [12] 敖惠, 李好文, 王向涛. 地塞米松脂质体的制备及其对乳腺癌作用的体内外研究 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(2): 222-228.
- [13] 王向涛, 高熲玉, 敖惠, 等. 一种蜂胶纳米粒、制备方法、应用及其冻干粉的制备方法: 中国, CN110604747B [P]. 2021-09-28.
- [14] 蒋爱, 李国源, 王鑫. 星点设计-效应面法优化紫杉醇-白桦脂酸混合纳米混悬剂 [J]. 中草药, 2019, 639(4): 852-859.
- [15] 张季. 星点设计-效应面法优化吴茱萸次碱固体脂质纳米粒处方 [A]// 2014 年中国药学会暨第十四届中国药师周论文集 [C]. 石家庄: 中国药学会, 2014: 10.
- [16] 周军, 刘健. β -环糊精-聚乙二醇- α -常春藤皂苷自组装胶束的制备和抗肿瘤活性研究 [J]. 现代药物与临床, 2021, 36(7): 1375-1378.
- [17] 陈乐园, 勾文峰, 黄欢, 等. 含硼小分子固醇调控元件结合蛋白抑制剂的合成及其体外抗肿瘤活性研究 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(7): 1289-1294.
- [18] 王博, 李洪起, 连潇嫣. 星点设计-效应面法优化阿德福韦- β -环糊精包合物制备工艺的研究 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(11): 1227-1230.
- [19] 胡子燕, 晏晨阳, 厉青. 泊洛沙姆 188 的临床应用研究 [J]. 海峡药学, 2019, 235(8): 21-23.
- [20] Rojczyk E, Klama-Baryła A, Łabuś W, et al. Historical and modern research on propolis and its application in wound healing and other fields of medicine and contributions by Polish studies [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 262: 113159.
- [21] Lv L, Cui H, Ma Z, et al. Recent progresses in the pharmacological activities of caffeic acid phenethyl ester [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2021, 394(7): 1327-1339.

[责任编辑 解学星]