

# 冬凌草甲素聚乙二醇功能化氧化石墨烯纳米粒的制备及抗结肠癌实验研究

俞文英<sup>1</sup>, 马建琦<sup>1,2</sup>, 方杰<sup>1</sup>, 方晴霞<sup>3</sup>, 王露晨<sup>1,3</sup>, 莫丽<sup>1,3</sup>, 余陈欢<sup>1\*</sup>

1. 浙江省医学科学院, 浙江 杭州 310013

2. 杭州江干区人民医院, 浙江 杭州 310016

3. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053

**摘要:** 目的 制备负载冬凌草甲素 (oridonin, ORI) 的聚乙二醇功能化氧化石墨烯 (PEGylated graphene oxide, GO-PEG) 纳米粒 (nanoparticles, NPs), 并探讨其对结肠癌的抑制作用。方法 利用酰胺化反应将端基为氨基的四臂聚乙二醇 (PEG) 连到氧化石墨烯 (GO) 上, 并通过红外光谱 (IR) 和差示-热重联用热分析仪 (TGA) 等对其进行表征; 再通过物理共混的方法在 GO-PEG 上负载抗肿瘤药物 ORI, 紫外光谱 (UV) 法测其封装率和载药率, MTT 法测定载药体系对人结肠癌细胞 SW620 和 HT29 的增殖毒性, 并建立荷瘤裸鼠模型考察其体内抗肿瘤活性。结果 IR 和 TGA 测定结果表明 PEG 已成功偶联到 GO 上, UV 法测得 ORI-GO-PEG 的封装率和载药率分别为 95.81% 和 48.92%, 且在各种生理溶液中具有较好的稳定性。体外细胞毒性实验结果表明, 与 ORI 裸药相比, ORI-GO-PEG-NPs 对结肠癌细胞的杀伤能力更强。体内抑瘤实验进一步发现, ORI-GO-PEG-NPs 可以更好地抑制体内 SW620 肿瘤的生长。结论 制得的 ORI-GO-PEG-NPs 具有优良的载药性能和较强的抗结肠癌作用, 为今后开发抗肿瘤药物纳米给药系统提供了实验依据。

**关键词:** 氧化石墨烯; 冬凌草甲素; 聚乙二醇; 纳米粒; 药物传输; 结肠癌; 红外光谱; 差示-热重联用热分析; 封装率; 载药率; 增殖; 抗肿瘤活性

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2017)19-3954-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.19.009

## Preparation of PEGylated graphene oxide nanoparticles loaded with oridonin and its inhibitory effects on human colon cancer

YU Wen-ying<sup>1</sup>, MA Jian-qi<sup>1,2</sup>, FANG Jie<sup>1</sup>, FANG Qing-xia<sup>3</sup>, WANG Lu-chen<sup>1,3</sup>, MO Li<sup>1,3</sup>, YU Chen-huan<sup>1</sup>

1. Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China

2. Hangzhou Jianggan District People's Hospital, Hangzhou 310016, China

3. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

**Abstract: Objective** To prepare PEGylated graphene oxide nanoparticles (GO-PEG-NPs) loaded with oridonin (ORI) and investigate its inhibitory effect on human colon cancer. **Methods** 4-armed PEG was grafted onto GO via an amidation process and GO-PEG was characterized by IR and TGA. Then, ORI, a widely used cancer chemotherapy drug, was absorbed onto GO-PEG via blending. The encapsulation efficiency and drug loading ratio were measured by UV. The cytotoxicity of ORI-GO-PEG, GO-PEG, and free ORI on SW620 and HT29 human colon cancer cells were evaluated using MTT assay. *In vivo* anti-tumor activity of ORI-GO-PEG-NPs were evaluated in mice bearing SW620 tumor. **Results** IR and TGA data indicated that 4-armed PEG was successfully coupled with GO and UV data showed that the encapsulation efficiency and drug loading ratio were 95.81% and 48.92%, respectively. Moreover, ORI-GO-PEG-NPs showed good stability in physiological condition. The results of cytotoxicity test indicated that compared to free ORI, the ORI-GO-PEG-NPs exhibited higher cytotoxicity in SW620 and HT29 cells. Meanwhile, it was confirmed that ORI-GO-PEG-NPs could significantly inhibit the growth of SW620 tumor *in vivo* compared with ORI. **Conclusion** The obtained ORI-GO-PEG-NPs displayed excellent drug-loading capacity and better tumor inhibitory effect. These results provided the experimental basis for development of anticancer drug delivery system.

收稿日期: 2017-04-24

基金项目: 浙江省科技厅院所专项 (2015F50065, 2014F10033)

作者简介: 俞文英, 硕士, 助理研究员, 研究方向为药物新剂型与新技术的研究与开发。Tel: (0571)88215628 E-mail: zjywenying@163.com

\*通信作者 余陈欢, 博士, 副研究员, 研究方向为中药有效成分抗肿瘤作用及机制研究。Tel: (0571)88215628 E-mail: yuchenhuan2002@163.com

**Key words:** graphene oxide; oridonin; polyethylene glycol; nanoparticles; drug delivery; colon cancer; infrared spectrometry; differential scanning calorimetry-thermogravimetry analysis; encapsulation efficiency; loading efficiency; cell proliferation; anti-tumor activity

冬凌草甲素 (oridonin, ORI) 是从唇形科香茶菜属植物冬凌草中提取出来的一种贝壳杉烯二萜类化合物<sup>[1]</sup>。有研究表明 ORI 具有较强的抗肿瘤活性, 对多种肿瘤细胞具有抑制增殖和促凋亡作用<sup>[2-5]</sup>。但由于其水溶性较差, 吸收率低, 体内生物半衰期短, 目前有关制剂的临床抗癌疗效尚不理想。因此, 如何设计相应的药物传递系统, 解决 ORI 的溶解性、提高其生物利用度是目前亟待解决的问题。

纳米粒 (nanoparticles, NPs) 技术的飞速发展为解决上述问题提供了新的思路, 并促使药物开发逐渐从寻找新化合物向优化载药系统过渡<sup>[6-8]</sup>。氧化石墨烯 (graphene oxide, GO) 作为一种新型二维碳纳米材料, 可以通过物理、化学作用负载药物分子, 从而提高其水溶性; 同时 GO 表面具有丰富的羧基、环氧基和羟基等活性基团, 这就赋予其与聚合物的兼容性以及高度的可修饰性等优异性能<sup>[9]</sup>。将生物相容性良好的聚合物分子, 如壳聚糖、聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 等接枝到 GO 表面, 有利于改善其生物相容性, 从而实现其在特定领域的应用<sup>[10-11]</sup>。目前, 已有研究者将 GO 功能化修饰后负载诸如阿霉素、索拉非尼等抗肿瘤药物, 并实现了靶向释药的目的, 证明 GO 是潜在的药物转运载体<sup>[12-13]</sup>。本研究以 PEG 修饰的 GO (GO-PEG) 作为药物载体, 通过物理化学吸附作用, 使难溶性抗癌药物 ORI 负载到 GO-PEG 纳米粒的表面, 构建一种新型的纳米载药系统 (ORI-GO-PEG-NPs), 并通过体内实验考察 ORI-GO-PEG-NPs 的抗肿瘤效果, 以期 ORI 纳米制剂应用于结肠癌的治疗提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 药品与试剂

冬凌草甲素对照品, 质量分数 $\geq 99.5\%$ , 批号 111721-201403, 购于中国食品药品检定研究院; GO 分散液, 2 mg/mL, 批号 100686-160331, 购于南京先丰纳米材料科技有限公司; 4arm-PEG-NH<sub>2</sub> (相对分子质量 5 000), 购于北京键凯科技有限公司; 透析袋 (截留相对分子质量为 14 000), 购于国药集团化学试剂有限公司; MTT, 购于 Sigma 公司; 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 (EDC·HCl)、乙二胺四乙酸二钠、氢氧化钠、氯乙酸钠等

试剂均为分析纯。

### 1.2 细胞及动物

人结肠癌细胞 SW620 和 HT29 由浙江省医学科学院实验动物中心提供; SPF 级 BALB/c 裸鼠, 体质量 18~22 g, 雄性, 购自上海斯莱克实验动物有限公司, 动物生产许可证号 SCXK (沪) 2012-0002。

### 1.3 仪器

Nano ZS90 激光粒度分析仪, 英国马尔文公司; Nanoscope IIIA Multimode 原子力电子显微镜 (atomic force microscope, AFM), 美国 Veeco 公司; iS10 型傅里叶红外光谱仪, 美国尼高力仪器公司; SDT Q600 差示-热重联用热分析仪, 美国 TA 公司; SpectraMax M4 多功能酶标仪, 美谷分子仪器有限公司。T6 新世纪紫外分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 GO-PEG 的制备及表征

**2.1.1 GO-PEG 的制备** GO 与 PEG 反应前, 首先在强碱条件下将 GO 上羟基转化为羧基, 以提高其与 PEG 上氨基的反应速率。称取 5.0 g NaOH, 用 10 mL 蒸馏水溶解并冷却至室温, 再加入 5.0 g 氯乙酸钠, 充分溶解后定容至 25 mL, 将此溶液加入到 25 mL (50 mg) GO 水分散液中, 常温超声 2 h。待反应液颜色由棕红色转变为黑色, 13 000 r/min 离心 15 min, 取沉淀, 加入 50 mL 水分散后, 用浓盐酸调 pH 值至中性, 再次离心, 弃上清液后沉淀再用 50 mL 水分散, 并用截留相对分子质量 14 000 透析袋透析 4 h, 以除去残余的无机离子, 所得溶液即为 GO-COOH。

取 20 mL GO-COOH (1 mg/mL), 水浴超声 30 min 充分分散后, 用三乙胺调 pH 值至 8~9, 同时称取 60 mg 4-arm-PEG-NH<sub>2</sub>, 用适量蒸馏水溶解后加入上述溶液中, 超声 5 min 后加入 EDC·HCl 6 mg, 水浴超声 40 min 后, 继续加入 EDC·HCl 16 mg, 搅拌 12 h, 将反应混合物放入透析袋 (截留相对分子质量 14 000) 中透析 1 周, 除去游离的 PEG 和催化剂, 经冷冻干燥后即得 GO-PEG<sup>[14]</sup>, 并用红外光谱 (IR)、差示-热重联用热分析 (TGA) 仪等进行表征。

**2.1.2 IR 表征** GO 和 GO-PEG 红外特征峰见图 1。GO 在 3 420 cm<sup>-1</sup> 附近有比较宽泛而强烈的 -OH 振

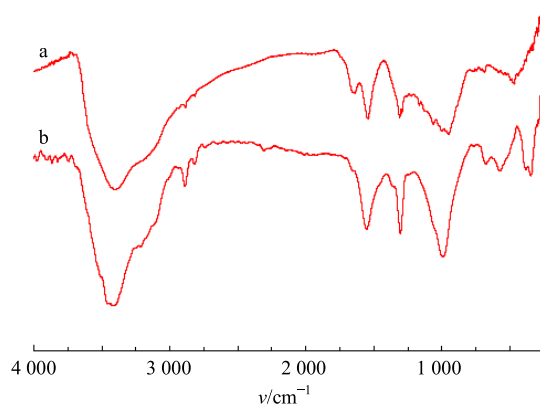


图1 GO (a) 和 GO-PEG (b) 的 IR 光谱图  
Fig. 1 IR spectra of GO (a) and GO-PEG (b)

动吸收峰,  $1\,650\text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰来自于羧基中  $\text{C}=\text{O}$  的伸缩振动。GO 与 PEG 反应后,  $2\,900\text{ cm}^{-1}$  处出现了来自于 PEG 中  $-\text{CH}_2$  的 C-H 振动吸收峰,  $1\,100\text{ cm}^{-1}$  处出现的强吸收峰为 C-O-C 的伸缩振动, 表明 PEG 成功接枝到 GO 上, 这一结果与文献报道相符<sup>[15]</sup>。

**2.1.3 TGA 表征** GO、PEG 和 GO-PEG 的热失重曲线如图 2 所示, GO 在  $\text{N}_2$  气氛下低于  $100\text{ }^\circ\text{C}$  的热失重归因于水分的蒸发,  $160\sim 250\text{ }^\circ\text{C}$  范围内出现显著的热失重归因于 GO 表面含氧官能团的热分解。而 GO-PEG 在  $200\text{ }^\circ\text{C}$  为表面剩余含氧官能团的热失重, 在  $350\sim 450\text{ }^\circ\text{C}$  出现急剧的热失重现象主要是由于接枝 PEG 的分解引起的<sup>[16]</sup>。根据  $500\text{ }^\circ\text{C}$  时的热失重数据 GO (35.48%)、PEG (98.70%)、GO-PEG (71.91%), 可以计算出 GO-PEG 中 2 组分的量, 其中 GO 占 42.38%, PEG 占 57.62%。

## 2.2 ORI-GO-PEG-NPs 的制备

精密称取 ORI 10 mg, 用适量乙醇溶解后加入

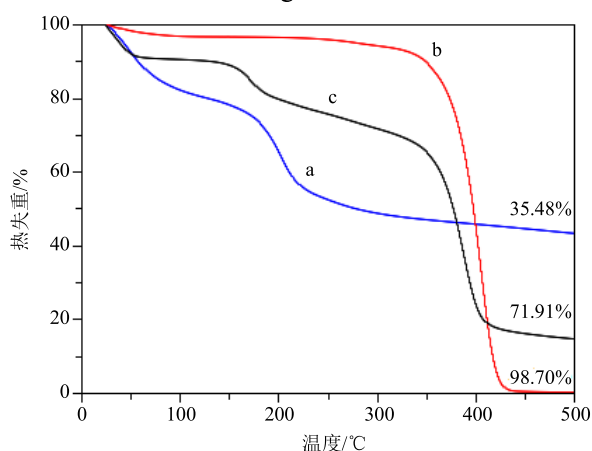


图2 GO (a)、PEG (b) 和 GO-PEG (c) 的热失重曲线  
Fig. 2 TGA curves of GO (a), PEG (b), and GO-PEG (c)

到 GO-PEG 分散液 ( $0.5\text{ mg/mL}$ )  $20\text{ mL}$  中, 室温避光搅拌  $12\text{ h}$ , 以截留相对分子质量  $10\,000$  的超滤管反复超滤, 除去未被吸附的 ORI, 用蒸馏水反复洗涤, 直至紫外光谱检测不到滤过的水中 ORI 的特征吸收峰, 最终将截留部分用蒸馏水超声分散, 得到 ORI-GO-PEG-NPs, 于  $4\text{ }^\circ\text{C}$  下储存<sup>[17]</sup>。

## 2.3 ORI-GO-PEG-NPs 形态学特征

利用 AFM 对 GO、GO-PEG 和 ORI-GO-PEG-NPs 的形貌进行了表征, 结果如图 3 所示。GO 的表面较为光滑平整, 横向尺寸为  $50\sim 450\text{ nm}$ , 厚度约为  $0.85\sim 1.03\text{ nm}$ , 基本为单层; 由于 PEG 的接入以及接枝过程中的超声处理, GO-PEG 的表面出现褶皱, 横向尺寸减小为  $58\sim 380\text{ nm}$ , 厚度增加至  $1.27\sim 1.39\text{ nm}$ , 但仍为单层, 可能是由于经 PEG 修饰后, PEG 对 GO 片层间的范德华力和氢键的弱化作用, 有利于 GO 片层间的剥离与延展以及阻止 GO 的聚集<sup>[16]</sup>; 当 GO-PEG 负载上 ORI 后, 横向尺寸未发生明显变化, 厚度显著增加, 为  $5.07\sim 7.05\text{ nm}$ , 说明 ORI 已成功负载在 GO-PEG 上。

## 2.4 ORI-GO-PEG-NPs 包封率和载药率的测定

通过紫外分光光度 (UV) 法对 GO-PEG 中 ORI 的载药率和包封率进行了测定<sup>[18]</sup>。根据不同质量浓度 ( $10.9$ 、 $21.8$ 、 $32.7$ 、 $43.6$ 、 $54.5$ 、 $65.4$ 、 $87.2\text{ }\mu\text{g/mL}$ ) ORI 溶液在  $237\text{ nm}$  处的吸光度 ( $A$ ) 值, 首先绘制了 ORI 质量浓度 ( $C$ ) 与  $A$  值的标准曲线, 以  $A$  值对  $C$  进行线性回归, 得到回归方程为  $A=0.023\,3\,C+0.036\,5$ ,  $R^2=0.999\,1$  ( $n=3$ ), 当 ORI 质量浓度在  $10.9\sim 87.2\text{ }\mu\text{g/mL}$  时, 线性关系良好。

收集“2.2”项 ORI-GO-PEG-NPs 制备过程中滤出的超滤液, 用蒸馏水定容至  $10\text{ mL}$  量瓶中, 通过 UV 法测定  $237\text{ nm}$  下的  $A$  值, 带入标准曲线得到游离 ORI 的质量浓度, 由此可算出体系的载药率为  $(48.92\pm 0.78)\%$  ( $n=3$ ) 和包封率为  $(95.81\pm 2.97)\%$  ( $n=3$ )。

$$\text{载药率} = (\text{ORI 总量} - \text{游离 ORI 的量}) / \text{纳米粒子的量}$$

$$\text{包封率} = (\text{ORI 总量} - \text{游离 ORI 的量}) / \text{ORI 总量}$$

## 2.5 稳定性试验

将  $200\text{ }\mu\text{L}$  ORI-GO-PEG-NPs ( $0.5\text{ mg/mL}$ ) 溶液分别加入到  $800\text{ }\mu\text{L}$  蒸馏水、生理盐水、PBS 缓冲液以及 DMEM 细胞培养基中, 震荡摇匀后  $5\,000\text{ r/min}$  离心  $15\text{ min}$ , 观察其在各种生理溶液中的稳定性。从图 4 可以看出, ORI-GO-PEG-NPs 在 4 种溶液中可以很好地分散, 均无沉淀及聚集现象, 初步

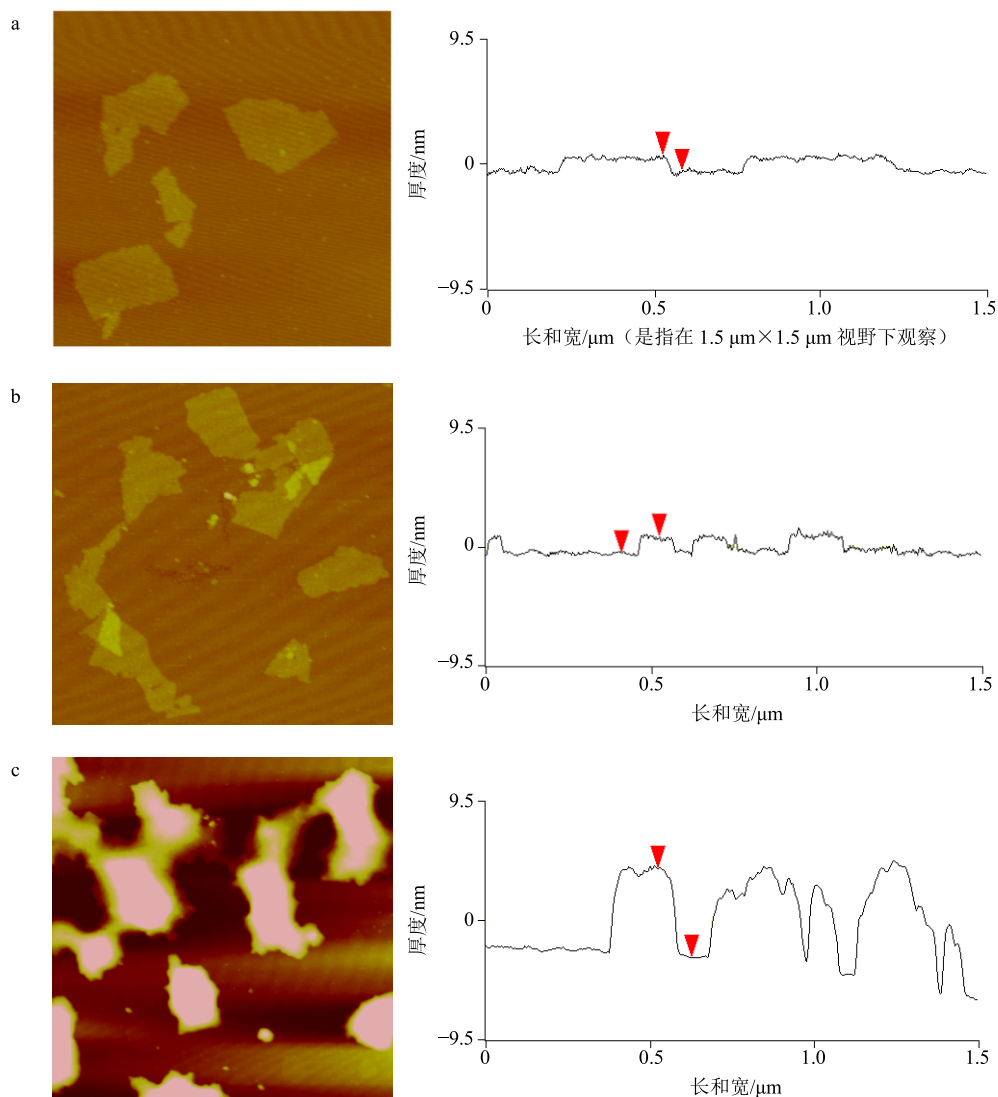


图 3 GO (a)、GO-PEG (b) 和 ORI-GO-PEG-NPs (c) 的 AFM 图

Fig. 3 AFM images of GO (a), GO-PEG (b), and ORI-GO-PEG-NPs (c)

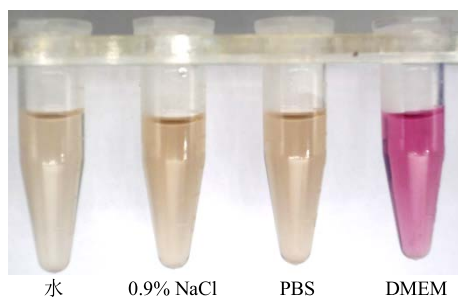


图 4 ORI-GO-PEG-NPs 在不同溶液中的稳定性

Fig. 4 Stability of ORI-GO-PEG-NPs in different solutions

说明制备的纳米体系在体外具有良好的稳定性。

## 2.6 体外细胞毒性实验

取 0.25% 的胰酶分别消化对数生长期的 SW620 和 HT29 细胞，制成单细胞悬液，以  $1 \times 10^4$  个/mL

的浓度接种于 96 孔培养板，每孔接种 100  $\mu\text{L}$ 。在 37  $^{\circ}\text{C}$  含 5%  $\text{CO}_2$  和饱和湿度条件下培养 24 h，分别加入 200  $\mu\text{L}$  不同质量浓度（以 ORI 计，1、2、4  $\mu\text{g/mL}$ ）的 ORI 与 ORI-GO-PEG-NPs，以及相应质量浓度的空白载体 GO-PEG（1.04、2.08、4.16  $\mu\text{g/mL}$ ），每个质量浓度均设 5 个复孔，不含药物的培养基作为阴性对照。分别培养 24 h 后，每孔加入 20  $\mu\text{L}$  MTT 溶液（5  $\text{g/L}$ ），细胞培养箱内避光孵育 4 h，小心吸去上清液，加入 200  $\mu\text{L}$  的 DMSO，室温条件下避光振荡混匀，用酶标仪在 570 nm 处测定其  $A$  值，并根据阴性对照组计算其余各组细胞存活率<sup>[19]</sup>。

从表 1 中可以看出，ORI 和 ORI-GO-PEG-NPs 均能有效抑制 2 种结肠癌细胞的增殖，且抑制率随

表1 ORI-GO-PEG-NPs、ORI 和 GO-PEG 对 SW620 细胞和 HT29 细胞相对存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )Table 1 Effect of ORI-GO-PEG-NPs, ORI, and GO-PEG on relative cell viability of SW620 and HT29 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

| 组别             | SW620 细胞相对存活率/%                    |                                    |                                    | HT29 细胞相对存活率/%                     |                                    |                                    |
|----------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
|                | 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ | 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ | 4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ | 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ | 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ | 4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ |
| GO-PEG         | 97.27 $\pm$ 2.35                   | 86.66 $\pm$ 4.35                   | 86.19 $\pm$ 1.95                   | 91.66 $\pm$ 3.84                   | 81.23 $\pm$ 2.20                   | 82.16 $\pm$ 3.44                   |
| ORI            | 77.33 $\pm$ 3.90                   | 56.78 $\pm$ 1.61                   | 32.74 $\pm$ 1.54                   | 69.39 $\pm$ 1.33                   | 58.73 $\pm$ 2.47                   | 38.40 $\pm$ 0.91                   |
| ORI-GO-PEG-NPs | 71.69 $\pm$ 2.94                   | 39.95 $\pm$ 2.30**                 | 28.84 $\pm$ 0.55*                  | 70.89 $\pm$ 2.65                   | 46.48 $\pm$ 0.71**                 | 32.58 $\pm$ 0.62**                 |

与 ORI 组比较: \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$ \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$  vs ORI group

着药物质量浓度的增加而升高, 呈浓度依赖性。与单独药物相比, ORI-GO-PEG-NPs 可以更有效地杀伤 SW620 和 HT29 细胞, 在药物质量浓度均为 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 单独 ORI 作用下, SW620 细胞的 24 h 相对存活率为 56.78%, 而 GO-PEG 负载后, 细胞的相对存活率为 39.95%; 对于 HT29 细胞, 单独 ORI 在 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 细胞的相对存活率为 58.73%, 而 ORI-GO-PEG-NPs 存在的条件下, 24 h 的细胞存活率为 46.48%。

空白载体细胞毒性实验结果 (表 1) 表明, GO-PEG 在相应质量浓度下培养 24 h, 2 种细胞的存活率仍在 80% 以上, 说明单独的药物载体对 2 种细胞的毒性较小, 体系对结肠癌细胞的杀伤作用主要来自于 GO-PEG 负载的 ORI。

### 2.7 体内抗肿瘤活性

选取 SW620 细胞按常规方法稀释后接种于裸鼠右前腋皮下, 每只接种 0.1 mL ( $5 \times 10^7$  个/mL), 观察记录, 约 7 d 时间肿瘤形成, 以皮下瘤体结节直径  $>0.5$  cm 为接种成瘤标准。随机分成 4 组 (模型组、ORI 裸药组、空白载体组、ORI-GO-PEG-NPs 组), 每组 6 只。模型组给予等体积生理盐水, ORI 裸药组和 ORI-GO-PEG-NPs 组分别于尾 iv 7.5 mg/kg 不同组别的药物, 空白载体组给予相应质量浓度的 GO-PEG, 每日 1 次, 连续给药 12 d。于首次给药时, 每隔 3 天用游标卡尺测量肿瘤的长径 ( $a$ ) 和短径 ( $b$ ), 按公式  $V=a \times b^2/2$  计算肿瘤体积, 并绘制肿瘤生长曲线 (图 5)。

从图 5 中可知, 随着给药时间的延长, 模型组的瘤体积不断增大, 并呈不断加快的趋势, 且因为瘤体过大, 荷瘤鼠的活动受到一定程度的影响, 表现出行动迟缓; 与模型组相比, 空白载体 GO-PEG 对肿瘤的生长未表现出明显的抑制作用 ( $P>0.05$ ), 而 ORI 裸药组和 ORI-GO-PEG-NPs 组的瘤体积虽亦随时间延长而有所增长, 但增长速度较模型组相比

均明显降低 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ ), 且荷瘤鼠呈现较好的精神状态。其中, ORI-GO-PEG-NPs 组抑瘤效果最为显著, 与 ORI 裸药组相比, 瘤体积减少近 30% ( $P<0.05$ ), 见图 5、6。

### 3 讨论

本实验制备了 GO-PEG 纳米载体, 并通过 IR、TGA 等对其进行了表征, 证明 PEG 成功偶联到了 GO 上; 体外细胞毒性实验表明, 空白载体具有较

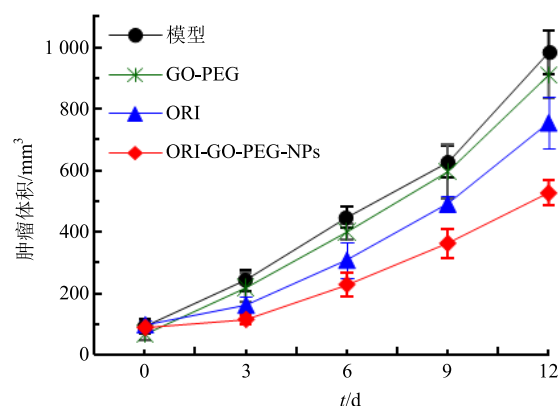
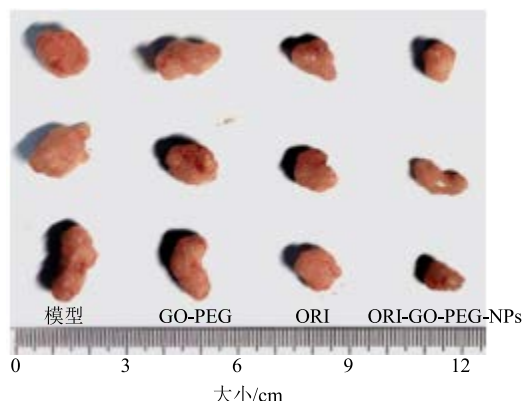
图5 各组 SW620 荷瘤裸鼠肿瘤体积比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )Fig. 5 Comparison on tumor volume of SW620 bearing mice in each group ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

图6 给药后各组肿瘤大小肉眼观察

Fig. 6 Tumor sizes in various groups after drug administration

低的细胞毒性,可作为抗肿瘤药物的潜在纳米载体,该结果与之前的报道一致,Zhou等<sup>[20]</sup>研究发现GO经PEG修饰后,对乳腺癌细胞和非癌细胞均未表现出明显的细胞毒性,这可能是由于PEG不仅能屏蔽GO所带的静电,且能减少GO和生物界面的接触。

在以GO-PEG为载体的基础上,通过物理吸附的方法成功将抗肿瘤药物ORI负载到GO-PEG上,形成ORI-GO-PEG-NPs,并实现了ORI的高效装载,载药率可达48.92%。由于GO为二维结构,其两面都可以吸附疏水性药物,因此载药率较普通的载体要高。稳定性试验结果表明,制备的ORI-GO-PEG-NPs可以在各种生理溶液中稳定存在。由于纳米药物应用于生物体内过程中,不可避免会与无机离子、生物大分子接触,因此具有良好生理稳定性的纳米体系在实际应用中更具优势。

ORI-GO-PEG-NPs的体外细胞毒性实验发现,ORI经GO-PEG负载后对人结肠癌细胞SW620和HT29均表现出明显的细胞毒性,且在一定质量浓度下相比ORI裸药具有更强的杀伤肿瘤细胞的能力,该结果与相关文献报道结果一致。Xu等<sup>[21]</sup>以GO-PEG为纳米载体负载了抗肿瘤药物紫杉醇(paclitaxel, PTX),结果发现与PTX裸药相比,GO-PEG负载的PTX无论对人肺癌A549细胞还是对人乳腺癌MCF-7细胞均表现出极高的细胞毒性。

体内抑瘤实验结果进一步证明了ORI-GO-PEG-NPs具有良好的抗结肠癌作用。在预试验中发现,随着药物剂量的加大,抑瘤效果更显著,但载体质量浓度过高会导致肺栓塞,Zhang等<sup>[22]</sup>也发现当GO的质量浓度从1 mg/kg提高到10 mg/kg时,小鼠肺部出现明显的病理改变。

因此,在下一步研究中需要摸索最佳使用剂量,找到以GO-PEG为载体的处方疗效和毒性之间的平衡点;并阐明载药系统与生物体之间的作用机制,以期以GO-PEG为载体的纳米药物在生物医学领域的应用奠定基础。

#### 参考文献

- [1] Ding Y, Ding C H, Ye N, *et al.* Discovery and development of natural product oridonin-inspired anticancer agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 122(43): 102-117.
- [2] 车宪平, 韩瑞发, 周晶, 等. 冬凌草甲素诱导膀胱癌MB49细胞凋亡及机制研究 [J]. *中草药*, 2008, 39(8): 1219-1222.
- [3] Yao Z, Xie F H, Li M, *et al.* Oridonin induces autophagy via inhibition of glucose metabolism in p53-mutated colorectal cancer cells [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(2): e2633.
- [4] 王汉楚, 沙丽晓, 陈小燕, 等. 冬凌草甲素对卵巢癌细胞紫杉醇耐药性的拮抗作用及其机制研究 [J]. *中草药*, 2012, 43(3): 534-539.
- [5] 季宇彬, 江剑, 高世勇. 冬凌草甲素注射剂诱导人胃癌SGC-7901细胞凋亡及其机制研究 [J]. *中草药*, 2011, 42(10): 2051-2055.
- [6] 傅德皓, 郑思维, 陈春生, 等. 溴化双十二烷基二甲基铵修饰的载汉防己甲素聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒制备及体外评价 [J]. *中草药*, 2015, 46(17): 2556-2562.
- [7] 许婷, 李秀妍, 李琳, 等. 纳米有机金属框架与精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸序列短肽偶联最佳工艺 [J]. *中草药*, 2015, 46(10): 1460-1463.
- [8] 刘朝勇, 肖云芝, 李瑞生, 等. 小莱蛾抗菌肽聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒的制备及体外评价 [J]. *中草药*, 2015, 46(3): 348-352.
- [9] Barahuie F, Saifullah B, Domiani D, *et al.* Graphene oxide as a nanocarrier for controlled release and targeted delivery of an anticancer active agent, chlorogenic acid [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 74: 177-185.
- [10] Emadi F, Amini A, Gholami A, *et al.* Functionalized graphene oxide with chitosan for protein nanocarriers to protect against enzymatic cleavage and retain collagenase activity [J]. *Sci Rep*, 2017, doi:10.1038/srep42258.
- [11] Bikhof Torbati M, Ebrahimian M, Yousefi M, *et al.* GO-PEG as a drug nanocarrier and its antiproliferative effect on human cervical cancer cell line [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2017, 45(3): 568-573.
- [12] Ma N, Liu J, He W, *et al.* Folic acid-grafted bovine serum albumin decorated graphene oxide: An efficient drug carrier for targeted cancer therapy [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2017, 490: 598-607.
- [13] Thapa R K, Choi J Y, Poudel B K, *et al.* Receptor-targeted, drug-loaded, functionalized graphene oxides for chemotherapy and photothermal therapy [J]. *Int J Nanomed*, 2016, 11: 2799-2813.
- [14] Liu Z, Robinson J T, Sun X, *et al.* PEGylated nano-graphene oxide for delivery of water insoluble cancer drugs [J]. *J Am Chem Soc*, 2008, 130(33): 10876-10877.
- [15] 陈小静, 温惠云, 黎琪, 等. 纳米氧化石墨烯的合成与功能化修饰 [J]. *化学工程*, 2014, 42(12): 11-14.
- [16] 徐国强, 徐鹏武, 施冬健, 等. PEG接枝氧化石墨烯的制备与细胞成像 [J]. *无机化学学报*, 2014, 30(9): 1994-1999.



- [17] Fan L, Ge H, Zou S, *et al.* Sodium alginate conjugated graphene oxide as a new carrier for drug delivery system [J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 93: 582-590.
- [18] 徐志远, 李永军, 史 萍, 等. 功能化石墨烯冬凌草甲素抗肿瘤制剂的研究 [J]. 有机化学, 2013, 33: 573-580.
- [19] 邵换璋, 许隽颖, 丁军利, 等. 冬凌草甲素抑制结肠癌细胞 HT-29 的作用及其机制 [J]. 中华实验外科杂志, 2016, 33(3): 574-576.
- [20] Zhou T, Zhang B, Wei P, *et al.* Energy metabolism analysis reveals the mechanism of inhibition of breast cancer cell metastasis by PEG-modified graphene oxide nanosheets [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(37): 9833-9843.
- [21] Xu Z, Zhu S, Wang M, *et al.* Delivery of paclitaxel using PEGylated graphene oxide as a nanocarrier [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7(2): 1355-1363.
- [22] Zhang X Y, Yin J L, Peng C, *et al.* Distribution and biocompatibility studies of graphene oxide in mice after intravenous administration [J]. *Carbon*, 2011, 49(3): 986-995.