

西瑞香素纳米混悬剂的制备及其体外抗肿瘤作用研究

李怡静¹, 敖惠¹, 李好文¹, 刘彪², 王向涛^{1*}

1. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193

2. 哈尔滨商业大学 生命科学与环境科学研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

摘要: **目的** 制备西瑞香素纳米混悬剂, 并考察其对多种肿瘤细胞增殖的抑制作用。**方法** 以粒径、Zeta 电位、多分散性指数 (PDI) 为指标, 考察稳定剂、药载比、超声温度、均质温度、均质次数对西瑞香素纳米混悬剂反溶剂沉淀法制备的影响, 优化最佳处方和工艺条件。观察西瑞香素纳米混悬剂的透射电镜表征, 并进行 X 射线衍射、差示扫描量热分析, 考察其在血浆、PBS 中的稳定性以及载药量、体外释放情况, 采用 MTT 法比较其对 BT474、SKBR-3、A549、HeLa、HepG2 细胞的体外细胞毒性。**结果** 最佳处方和工艺条件: TPGS 为稳定剂, 药载比 1:1, 共同溶解于 DMSO 中, 在超声 (25 °C, 250 W) 条件下, 缓慢滴注于去离子水中, 透析除去有机溶剂, 高压均质 (25 °C, 150 MPa) 20 次, 即得西瑞香素纳米混悬剂, 其平均粒径为 (163.1±5.4) nm, Zeta 电位为 (-11.4±0.7) mV, PDI 为 0.15±0.04。西瑞香素纳米混悬剂近乎为球形, 大小较均匀; 在血浆中稳定存在, 不存在溶血现象, 满足静脉注射需求, 平均载药量为 (39.16±1.09) %。西瑞香素纳米混悬剂对 5 种受试细胞的生长抑制作用显著提高, 并呈现剂量相关性, 尤其是对 SKBR-3、A549、HeLa、HepG2 细胞, IC₅₀ 在 2.1~3.4 µg/mL。**结论** 西瑞香素纳米混悬剂具有小粒径、高载药量、显著肿瘤细胞毒性等优点, 在抗肿瘤研究方面具有良好的应用前景。

关键词: 西瑞香素纳米混悬剂; 西瑞香素; 制备工艺; 载药量; 稳定性; 细胞毒性

中图分类号: R944; R978.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2018)02-0231-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2018.02.005

Preparation of Daphnoretin Nanosuspensions and its anti-tumor activity *in vitro*

LI Yi-jing¹, AO Hui¹, LI Hao-wen¹, LIU Biao², WANG Xiang-tao¹

1. Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Institute of Medicinal Plant Development, Beijing 10019, China

2. Harbin University of Commerce China, Research Center on Life Sciences and Environmental Sciences, Harbin 150076, China

Abstract: **Objective** To prepare Daphnoretin Nanosuspensions (Dan-NSps) and study its anti-tumor activities *in vitro*. **Methods** Dan-NSps were prepared by anti-solvent precipitation method with particle size, Zeta potential, and PDI as indexes, and stabilizer, drug loading ratio, ultrasonic temperature, homogeneous temperature, and homogeneous times were studied to optimize the optimum prescriptions and technological conditions. TEM of Dan-NSps was observed, and X-ray diffraction and differential scanning calorimetry were carried out. Stabilities in plasma and PBS were studied, and the drug loadings and releases *in vitro* were also compared. MTT assay was used to evaluate the *in vitro* cytotoxicities against BT474, SKBR-3, A549, HeLa, and HepG2 cells. **Results** The best preparation method was as following: TPGS was as stabilizer with drug loading ratio 1:1, and was dissolved in DMSO together. Under the condition of ultrasonic (25 W, 250 W), it was slowly dripped into deionized water, and the organic solvent was removed by dialysis. The high pressure homogenization (25 °C, 150 MPa) was 20 times. The average particle size of Dan-NSps was (163.1 ± 5.4) nm, the Zeta potential was (-11.4 ± 0.7) mV, and PDI was 0.15 ± 0.04. Nanosuspensions were nearly spherical, and more uniform in size. Dan-NSps remained stable in plasma with no hemolysis, meeting the demand of intravenous administration. The drug loading content was determined to be as high as (39.16 ± 1.09) %. MTT assay showed that Dan-NSps had higher cytotoxicities against 5 kinds of cell lines with a dose dependent relationship, especially for SKBR-3, A549, HeLa, and HepG2 cells,

收稿日期: 2017-09-07

基金项目: 国家自然科学基金-广东联合基金资助项目 (U1401223)

作者简介: 李怡静 (1992—), 女, 山东烟台人, 硕士研究生, 研究方向为药物新剂型。Tel: 13717851696 E-mail: yijingli920730@163.com

*通信作者 王向涛 (1973—), 男, 河南洛阳人, 研究员, 博士, 主要从事药物新剂型研究。Tel: (010)57833266 E-mail: xtaowang@163.com

which IC_{50} were at 2.1 to 3.4 g/mL. **Conclusion** Dan-NSPs had advantages of small particle size, high drug load, and significant tumor cell toxicity, which has a good application prospect in the field of anti-tumor research.

Key words: Daphnoretin Nanosuspensions; daphnoretin; preparation process; drug loading; stability; cytotoxicity

西瑞香素化学名为 7-羟基-6-甲氧基-3,7'-双香豆素酯, 在菊科、芸香科、云实科、豆科和瑞香科植物中均有发现。研究表明, 西瑞香素对多种癌细胞的增殖具有抑制作用, 如人肝癌细胞HepG2^[1-2]、人肺癌细胞A549^[3-4]、人喉癌细胞Hep2^[1]、人宫颈癌细胞HeLa^[5], 并对其机制进行了研究^[4-6]。但是西瑞香素在水中溶解度低, 难以给药, 在一定程度上限制了其应用。本实验尝试将西瑞香素制备成纳米混悬剂, 以改善其溶解性差、难以给药的问题^[7], 并希望借助肿瘤细胞对纳米颗粒的吸附、吞噬作用增强对癌细胞的抑制效果, 为其体内抗肿瘤研究和临床应用提供参考。

1 仪器与材料

Mettler Toledo AL204 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); KQ3200DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); JNBIO 超高压纳米均质机(广州聚能生物科技有限公司); Purelab Classic 综合纯水仪(英国 Elga 公司); Zetasizer nano ZS 型粒度仪(英国 Malvern Instruments 公司); JEM-1400 型透射电子显微镜(日本电子株式会社); DX-2700 型 X 射线衍射仪(上海精密仪器仪表有限公司); Q200 型差示扫描量热仪(美国 TA 公司); RJ-TGL-16C 型高速台式离心机(无锡市瑞江分析仪器有限公司); UltiMate 3000 高效液相色谱仪(美国 Dionex 仪器公司); LGJ-10B 冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂有限公司); Tecan Infinite M1000 PRO 多功能酶标仪[力臻卓越(北京)科学仪器有限公司]; HSX-150 型细胞培养箱(上海和呈仪器制造有限公司)。

西瑞香素(湖州展舒生物科技有限公司, 质量分数>98%, 批号 201603227)、聚乙二醇-聚己内酯(mPEG2000-PCL2000, 济南岱罡生物工程有限公司, 批号 17031606)、生育酚琥珀酸聚乙二醇酯(TPGS, 西安海斯夫生物科技有限公司, 批号 20151203)、泊洛沙姆 F-68 (P-188, 中国西格玛有限公司, 批号 018K0029)、二甲基亚砜(DMSO, 分析纯, 北京化工厂)、色谱甲醇(赛默飞世尔科技有限公司)

BT474、SKBR-3、A549、HeLa、HepG2 细胞

均购自北京协和医学院基础医学研究所细胞中心, RPMI1640、DMEM、MEM 培养基(美国 Hyclone 公司, 批号分别为 AC10258508、AC10231631、AC10249345), 胎牛血清(美国 Gibco 公司, 批号 1688857)、青霉素和链霉素双抗(美国 Hyclone 公司, 批号 20170417)

2 方法与结果

2.1 西瑞香素纳米混悬剂的制备

2.1.1 稳定剂筛选 通过单因素试验考察不同稳定剂制备的西瑞香素纳米混悬剂粒径变化, 拟筛选出粒径最小的处方。以 mPEG2000-PCL2000、TPGS、P-188 为稳定剂在超声、高压匀质的条件下制备西瑞香素纳米混悬剂, 见表 1。可见以 TPGS 为稳定剂制备的西瑞香素纳米混悬剂粒径最小, 粒度分布也较窄。

表 1 稳定剂对西瑞香素纳米混悬剂粒径、多分散性指数和电位的影响

Table 1 Effects of stabilizers on size, PDI, and Zeta potential of Daphnoretin Nanosuspensions

稳定剂	粒径/nm	Zeta/mV	PDI
mPEG2000-PCL2000	226.1±1.1	-18.2±1.0	0.18±0.03
TPGS	163.1±5.4	-11.4±0.7	0.15±0.04
P-188	632.1±8.1	-9.8±0.9	0.37±0.05

2.1.2 药载比筛选 选择TPGS作为稳定剂, 改变处方中药物和稳定剂的比例, 筛选得到粒径最佳、所得样品最稳定的药载比, 见表2。提高药载比后, 西瑞香素纳米混悬剂粒径未出现显著增大, 但在PBS中的稳定性却下降, 综合粒径、粒度分布、表面电位和在PBS中的稳定性因素, 选择TGGS为载体, 药载比1:1为最佳处方。

2.1.3 超声温度的影响 采用上述处方进行单因素试验, 考察超声温度对粒径的影响, 发现25℃超声注入制备的西瑞香素纳米混悬剂粒径最小, 见表3。

2.1.4 均质温度的影响 单因素试验考察均质温度对粒径的影响, 发现均质温度为25℃制备的西瑞香素纳米混悬剂的粒径最小, 见表4。

表 2 药载比对西瑞香素纳米混悬剂粒径的影响

Table 2 Effect of drug loading ratio on size of Daphnoretin Nanosuspensions

药载比	粒径/nm	Zeta/mV	PDI	PBS中稳定时间/h
1 : 1	163.1±5.4	-11.4±0.7	0.15±0.04	>24
2 : 1	186.5±0.8	-27.1±1.1	0.16±0.02	2
4 : 1	201.3±1.4	-28.7±1.9	0.13±0.07	2
6 : 1	184.6±9.3	-29.6±2.1	0.15±0.01	2
8 : 1	203.7±2.1	-26.7±3.1	0.14±0.03	2
10 : 1	178.0±2.3	-27.3±2.8	0.11±0.06	2
无载体	199.3±2.2	-26.1±2.9	0.18±0.01	0

表 3 超声温度对西瑞香素纳米混悬剂粒径的影响

Table 3 Effect of ultrasonic temperature on particle size of Daphnoretin Nanosuspensions

超声温度/℃	粒径/nm	Zeta/mV	PDI
20	461.2±11.4	-11.3±1.5	0.39±0.02
25	251.9±9.2	-18.2±2.4	0.22±0.01
30	402.1±9.8	-13.8±0.8	0.40±0.06
40	283.5±27.1	-17.5±1.9	0.36±0.01

表 4 均质温度对西瑞香素纳米混悬剂粒径的影响

Table 4 Effect of homogeneous temperature on particle size of Daphnoretin Nanosuspensions

均质温度/℃	粒径/nm	Zeta/mV	PDI
20	362.7±11.4	-10.4±1.8	0.30±0.07
25	163.1±5.4	-11.4±0.7	0.15±0.04
30	261.3±15.3	-12.5±1.1	0.36±0.06
40	370.4±5.6	-10.3±1.0	0.43±0.05

2.1.5 均质次数的影响 采用上述处方进行单因素试验考察均质次数对西瑞香素纳米混悬剂粒径的影响,结果见表 5。结果表明随着均质次数的增加,粒径越来越小。综合考虑能量损耗和对粒径的要求,选择均质 20 次为最终方案。

表 5 均质次数对西瑞香素纳米混悬剂粒径的影响

Table 5 Effect of homogeneous times on particle size of Daphnoretin Nanosuspensions

均质次数/次	粒径/nm	Zeta/mV	PDI
5	211.3±4.9	-18.1±1.1	0.16±0.04
10	181.5±1.7	-12.2±0.9	0.16±0.05
15	172.5±5.0	-17.6±1.7	0.16±0.04
20	163.1±5.4	-11.4±0.7	0.15±0.04

2.1.6 最佳处方和最优工艺条件 本研究的目的是制备载药量高、粒径小、放置稳定的纳米混悬剂,以解决西瑞香素水溶性差、应用受限的难题。以此为筛选指标,采用反溶剂沉淀法通过单因素试验筛选出最佳处方和工艺条件:TPGS 为稳定剂,药载比 1 : 1,共同溶解于 DMSO 中,在超声(25 ℃,250 W)条件下,缓慢滴注于去离子水中,透析除去有机溶剂,高压均质(25 ℃,150 MPa)20 次,即得西瑞香素纳米混悬剂。

2.2 西瑞香素纳米混悬剂的表征

2.2.1 粒径、电位、多分散性指数考察 将制备好的西瑞香素纳米混悬剂使用粒度仪测定粒径、电位、PDI,每个样品重复 3 次(25 ℃)。西瑞香素纳米混悬剂的平均粒径为(163.1±5.4) nm, Zeta 电位为(-11.4±0.7) mV, PDI 为 0.15±0.04。西瑞香素纳米混悬剂粒径分布良好,见图 1。样品呈淡蓝色乳光;西瑞香素原料药在水中溶解度低于 2 μg/mL,然而西瑞香素纳米混悬剂中西瑞香素质量浓度可达到 2 mg/mL 以上,表观溶解度提高近千倍,较好解决了其溶解性差的问题。

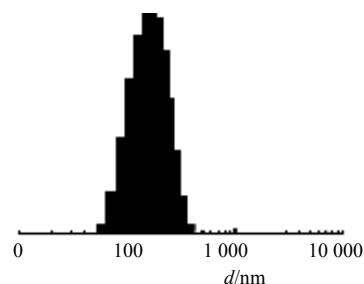


图 1 西瑞香素纳米混悬剂的粒径分布

Fig. 1 Particle size distribution of Daphnoretin Nanosuspensions

2.2.2 透射电镜表征 将西瑞香素纳米混悬剂稀释到西瑞香素理论质量浓度为 $100\ \mu\text{g/mL}$ 。取 $6.0\ \mu\text{L}$ 滴到 300 目铜网上, 静置 5 min, 用滤纸吸干, 室温放置 10 min 后, 滴加 $6.0\ \mu\text{L}$ 醋酸铀于铜网上染色 90 s, 用滤纸吸干, 室温自然晾干, 透射电镜下加速电压为 120 kV 观察纳米粒子的形态和大小。透射电镜结果见图 2。西瑞香素纳米混悬剂近乎为球形, 大小较均匀。在 200 nm 的标尺下, 目测粒径 100 nm 左右, 稍小于动态光散射法测得的结果。这主要因为透射电镜下观察的是西瑞香素纳米混悬剂在干态下的粒径, 而动态光散射测得的是西瑞香素纳米混悬剂在水相介质中充分水化之后的湿态半径, 后者是在水化层效应下的等效动力学半径^[8]。

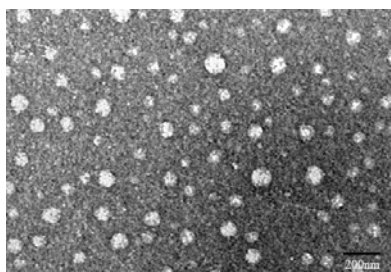


图 2 西瑞香素纳米混悬剂的透射电镜照片

Fig. 2 Transmission electron microscope photo of Daphnoretin Nanosuspensions

2.2.3 X 射线衍射 将西瑞香素纳米混悬剂冻干成固态粉末, 然后与 TPGS、西瑞香素原料药、西瑞香素和 TPGS 的物理混合物 (1:1) 于 X 射线衍射仪下分析其 X 衍射图谱。检测参数为 100 mA、40 kV, 扫描范围 2θ 为 $3^\circ\sim 80^\circ$ 。结果见图 3。西瑞香素原料药的 X 衍射图中出现强烈的晶型衍射峰, 表明西瑞香素在原料药中以晶体形式存在; 西瑞香素与 TPGS 的物理混合物表现出与西瑞香素原料药一致的衍射峰, 表明混合物中西瑞香素仍以晶体形式存在; 然而西瑞香素纳米混悬剂的晶型衍射峰与西瑞香素原料药比较, 各衍射峰的强度均明显降低, 表明在纳米混悬剂制备过程西瑞香素 (至少有一部分) 从结晶状态转变为无定形态等形态。其原因可能是西瑞香素纳米混悬剂中辅料 TPGS 含量较高, 在形成纳米混悬剂过程中, 部分药物与 TPGS 发生了相互作用, 导致这部分药物未能形成原来的晶格结构。

2.2.4 差示扫描量热分析 采用差示扫描量热仪对西瑞香素纳米混悬剂冻干粉、西瑞香素原料药、TPGS、西瑞香素和 TPGS 的物理混合物 (1:1) 进

行差示量热分析。精密称取 8 mg 样品于标准铝盘中, 密封后在氮气保护环境下按照 $10\ ^\circ\text{C}/\text{min}$ 在 $0\sim 500\ ^\circ\text{C}$ 进行分析, 结果见图 4。

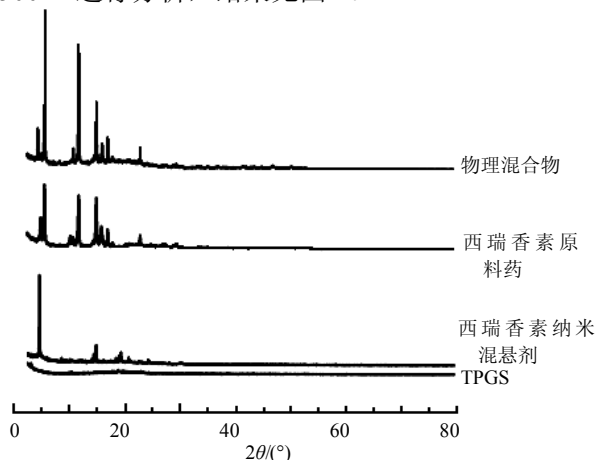


图 3 西瑞香素纳米混悬剂、西瑞香素原料药、TPGS 和西瑞香素和 TPGS 物理混合物 (1:1) 的 X 衍射图谱

Fig. 3 XRD patterns of Daphnoretin Nanosuspensions, daphnoretin bulk powder, TPGS, and the physical mixture of daphnoretin bulk powder and TPGS (1:1)

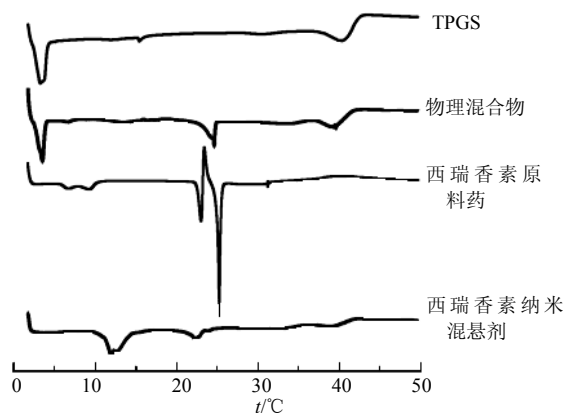


图 4 西瑞香素纳米混悬剂、西瑞香素原料药、TPGS 和西瑞香素和 TPGS 物理混合物 (1:1) 的热分析图谱

Fig. 4 Differential scanning calorimetry thermograms of Daphnoretin Nanosuspensions, daphnoretin bulk powder, TPGS, and the physical mixture of daphnoretin bulk powder and TPGS (1:1)

原料药和物理混合物在 $250\ ^\circ\text{C}$ 左右出现熔点峰, 与原料药的熔点 $245\sim 246\ ^\circ\text{C}$ 接近, 说明两者都是以结晶状态存在; 然而, 西瑞香素纳米混悬剂在 $120\ ^\circ\text{C}$ 左右出现熔点峰, 介于 TPGS ($36\ ^\circ\text{C}$) 和药物熔点 ($245\sim 246\ ^\circ\text{C}$), 进一步证明药物在制备成纳米混悬剂的过程中药物由结晶状态转变为无定形态, 或至少有部分药物结晶状态发生了改变。其原

因应该是药物与辅料 TPGS 发生了相互作用。

2.3 西瑞香素纳米混悬剂静脉给药适宜性考察

将西瑞香素纳米混悬剂与大鼠血浆按照体积比 1:4 混合, 37 °C 孵育, 分别在 0、1、3、7、12 h 测量粒径, 平行实验 3 份, 考察纳米混悬剂在血浆中的稳定性。将西瑞香素纳米混悬剂与 2×PBS 等体积比混合, 37 °C 孵育, 考察纳米混悬剂在 PBS 中粒径变化, 结果见图 5。与血浆孵育 12 h 后纳米混悬剂粒径变化较小, 没有出现任何浑浊或沉淀现象, 说明西瑞香素纳米混悬剂在血浆中稳定性良好; 在 PBS 中粒径变化较大, 但无肉眼可见浑浊或沉淀, 且粒径未超过 400 nm, 说明西瑞香素纳米混悬剂在 PBS 中相对稳定。等渗的西瑞香素纳米混悬剂在血浆中稳定, 且不存在溶血现象, 表明西瑞香素纳米混悬剂适用于静脉注射给药。将制备的西瑞香素纳米混悬剂于 4 °C 放置 30 d, 粒径未出现明显增大, 说明放置稳定性良好便于储存。

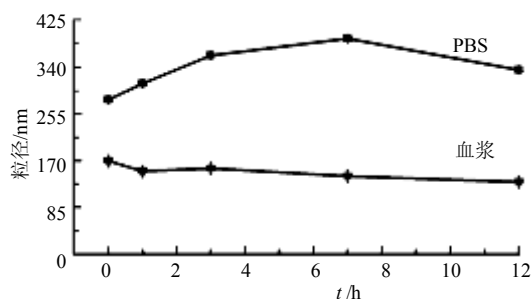


图 5 粒径随孵育时间变化曲线
Fig. 5 Curves of particle size over time

2.4 载药量测定

2.4.1 色谱条件^[9] C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.2%磷酸水溶液 (55:45), 检测波长为 346 nm, 体积流量为 1 mL/min, 柱温为 30 °C, 进样量为 20 μL。

2.4.2 线性关系考察 精密称取西瑞香素对照品 10 mg, 置 10 mL 量瓶中, 甲醇溶解并加至刻度, 作为储备液。取储备液适量, 用甲醇稀释, 配制 0.01、0.05、0.1、0.5、1、2、5、10、20、50 μg/mL 西瑞香素对照品溶液。按照上述色谱条件, 进样测定, 分别记录峰面积。以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得回归方程 $Y=1.4276X-0.0471$ ($R^2=0.9998$), 表明西瑞香素在 0.5~50 μg/mL 与峰面积线性关系良好。

2.4.3 载药量测定 将西瑞香素纳米混悬剂冻干, 取冻干后的粉末 (质量记为 W) 加入一定体积的甲

醇 (记为 V) 溶解, 13 000 r/min 离心 10 min, 取上清测定西瑞香素的质量浓度 (记为 C), 平行 3 次实验, 计算载药量 (载药量 = CV/W)。西瑞香素纳米混悬剂平均载药量为 (39.16±1.09) %, 与理论载药量 50% 相比略低, 分析主要原因为透析和高压均质过程的损失造成。

2.5 西瑞香素纳米混悬剂体外释放

通过前期筛选发现西瑞香素纳米混悬剂在常规释放介质 (PBS、含 0.5% 聚山梨酯 80、1% SDS、10% 乙醇的 PBS) 中无法稳定存在, 故选择含 5% 胎牛血清 (FBS) 的 PBS 作为释放外液; 鉴于西瑞香素在外液中的饱和溶解度较低, 选择检测释放内液的方式。将 200 μg/mL 西瑞香素纳米混悬剂 4 mL 加入到截留相对分子质量为 8 000~14 000 的即用型透析管中, 置于 1 L 含 5% FBS 的 PBS 中进行释放, 释放温度为 37 °C, 转速 100 r/min, 平行实验 3 份; 于不同时间点取释放内液 50 μL, 同时补充相应体积释放介质, 每 24 小时更换 1 次释放外液。向取出的释放内液中加入 450 μL 甲醇并混匀, 13 000 r/min 离心 20 min, 上清液采用 HPLC 测定药物浓度, 计算累积释放率, 结果见图 6。

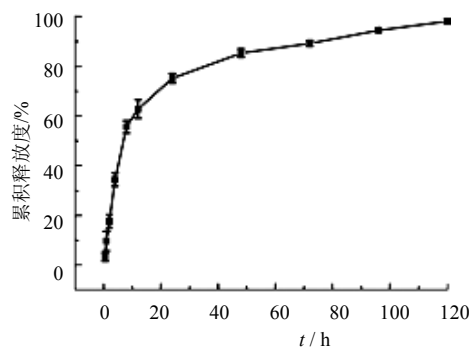


图 6 西瑞香素纳米混悬剂体外释放曲线

Fig. 6 In vitro release curve of Daphnoretin Nanosuspensions

西瑞香素纳米混悬剂在 pH 7.4 含 5% FBS 的 PBS 中呈两相释放, 先是 8 h 内较均匀的快速释放, 累积释放达 55%, 然后是 8~120 h 内的缓慢释放, 累积释放 98.12%; 同时考察了原料药 (将西瑞香素物理分散在去离子水中) 在相同条件下的释放行为, 考察时间内释放内液药物未见减少, 即累积释放率为 0 (数据未在图中显示)。所以将西瑞香素制备成纳米混悬剂可显著提高其体外释放率, 实现持续缓慢释放, 有利于提高体内生物利用度。

2.6 西瑞香素纳米混悬剂体外细胞毒实验

将对数期 BT474、SKBR-3、A549、HeLa、HepG2

细胞以 8 000 个/孔接种于 96 孔板, 37 ℃、5% CO₂ 培养 24 h 后, 弃去培养基; 加入西瑞香素纳米混悬剂、西瑞香素的 DMSO 溶液, 每个样品的药物质量浓度设为 0.1、0.5、1、5、10、20、50 μg/mL (用含 1% 双抗的培养基稀释), 平行实验 6 组; 继续培养 48 h 后, 每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 20 μL, 在 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中继续孵育 4 h; 弃去上清

液, 每孔加入 150 μL DMSO, 于微孔板振荡器上振荡 10 min, 使结晶物溶解均匀, 使用酶标仪在 570 nm 波长处测定吸光度 (*A*) 值。西瑞香素纳米混悬剂或溶液给药 48 h 后不同肿瘤细胞存活率见表 6, 使用 GraphPad Prism 5 软件计算 IC₅₀ 值, 显著性差异由 SPSS 22.0 软件计算得到, 结果见表 7。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{空白}}$$

表 6 西瑞香素对肿瘤细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 6 Effect of daphnoretin on survival rates of tumor cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

质量浓度	BT474细胞存活率/%		SKBR-3细胞存活率/%		A549细胞存活率/%		HeLa细胞存活率/%		HepG2细胞存活率/%	
(μg/mL)	纳米混悬剂	DMSO溶液	纳米混悬剂	DMSO溶液	纳米混悬剂	DMSO溶液	纳米混悬剂	DMSO溶液	纳米混悬剂	DMSO溶液
0.1	96.11±0.68	99.84±2.99	90.70±3.51	98.86±3.83	92.60±3.49	97.73±2.50	73.25±4.23	92.77±7.08	85.91±7.00	95.47±3.40
0.5	89.50±5.04	98.87±2.55	71.99±4.85	94.87±1.95	81.53±4.51	89.27±1.26	68.63±3.33	86.43±2.21	69.88±2.19	87.14±0.36
1	74.80±4.47	98.20±2.17	53.92±0.81	90.88±2.40	38.83±3.25	86.98±4.22	44.93±4.02	83.91±8.41	46.76±1.80	84.13±6.77
5	66.90±2.69	96.83±3.89	42.10±1.81	84.88±4.14	31.08±2.40	76.73±3.84	35.77±4.00	72.36±2.82	39.37±2.61	73.24±2.84
10	61.00±1.91	93.15±2.99	26.47±3.95	81.09±3.02	29.62±1.78	74.93±3.39	29.36±2.95	72.22±2.16	27.51±1.27	71.77±2.39
20	53.90±4.14	91.82±3.91	25.39±0.51	78.83±4.91	26.39±0.24	73.29±2.72	15.49±0.56	71.37±5.95	14.27±1.51	70.66±4.82
50	49.70±3.77	89.19±2.78	10.89±0.23	75.91±3.35	17.99±2.28	71.97±3.97	4.54±0.03	68.08±2.35	9.39±0.96	69.81±4.29

表 7 西瑞香素对不同肿瘤细胞的 IC₅₀ 值 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 7 IC₅₀ against different tumor cells of daphnoretin ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

细胞株	IC ₅₀ /(μg·mL ⁻¹)	
	西瑞香素纳米混悬剂	西瑞香素DMSO溶液
BT474	31.64±6.02**	> 50
SKBR-3	3.36±0.56**	> 50
A549	2.98±0.50**	> 50
HeLa	2.15±0.35**	> 50
HepG2	2.62±0.41**	> 50

与西瑞香素 DMSO 溶液组比较: ***P* < 0.01

***P* < 0.01 vs daphnoretin DMSO solution group

对于实验中的 5 种肿瘤细胞株, 游离西瑞香素抑制作用较弱, IC₅₀ 值均在 50 μg/mL 以上, 完全不具备成为抗肿瘤药物所需要的药效强度。游离西瑞香素的这一体外抗肿瘤药效, 其强度与文献报道数据一致^[2,3,5]。但制备成纳米混悬剂之后, 对 5 种受试细胞的生长抑制作用显著提高, 并呈现剂量相关性, 尤其是对 SKBR-3、A549、HeLa、HepG2 细胞, IC₅₀ 在 2.1~3.4 μg/mL。有文献报道, 肿瘤细胞能够非特异性吸附纳米粒, 并通过内吞作用对纳米粒进行有效摄取^[10], 且将药物制备成纳米粒提高体外抗肿瘤效果的实例已有很多。本研究的结果显示,

将西瑞香素制备成纳米混悬剂之后, 除了能解决西瑞香素难溶难给药问题, 还能显著改善其在抗肿瘤方面的成药性, 具有很好的应用前景。

3 讨论

目前, 化疗药物的主要问题是毒副作用大, 从自然界中寻找有效低毒的天然药物是抗癌研究的途径之一。西瑞香素是天然香豆素类化合物, 生物活性多样、毒性低且来源广泛, 同时具有一定的抗肿瘤作用。但西瑞香素溶解性差, 口服生物利用度低 (仅 0.15%)^[11], 限制其进一步应用。本研究将西瑞香素制备成纳米混悬剂, 解决其难溶性难给药问题, 并有效提高了其体外抗肿瘤活性, 还有望提高口服生物利用度。

目前, 关于西瑞香素的剂型研究, 颜红等^[12]将其制备成脂质体, 解决了水溶性差的问题, 但载药量较低 (7% 左右)。由于西瑞香素药效强度低, 给药剂量大, 需要更高的载药量才具有实用价值。本研究采用 TPGS 为稳定剂, 制备的西瑞香素纳米混悬剂载药量达到 39.16%, 对肿瘤细胞的体外抑制作用大幅度提高^[2,4,5]。研究发现 TPGS 还具有抑制肿瘤细胞 P-gp 对药物外排的作用, 能增加肿瘤细胞对药物的摄取, 可有效逆转肿瘤耐药性, 增强抗肿瘤药物疗效^[13-16]。西瑞香素抗肿瘤的作用靶点和机制尚

不明确,没有合适的阳性药与之对照,在MTT体外抗肿瘤活性筛选时,仅对其中两种细胞的MTT研究中使用了紫杉醇作为阳性对照,其他细胞未使用阳性对照。但相较于游离药物溶液,西瑞香素制备成纳米混悬剂之后,体外抗肿瘤活性得到了显著提高,抗肿瘤应用前景广阔。西瑞香素纳米混悬剂体外实现缓慢持续释放,有利于维持体内药物浓度,提高生物利用度,增强药效;等渗的西瑞香素纳米混悬剂在血浆中可稳定存在,不存在溶血现象,满足静脉注射给药的需求;载药量高,粒径小,静脉注射还能通过高渗透滞留效应将药物被动靶向至肿瘤部位,可进一步提高药物的抗肿瘤药效^[17-18]。

综上所述,本研究中制备的西瑞香素纳米混悬剂具有小粒径、高载药量、显著肿瘤细胞毒性等优点,在抗肿瘤研究方面具有良好的应用前景。

参考文献

- [1] 杨振宇,郭薇,吴东媛,等. 了哥王中西瑞香素的提取分离及抗肿瘤作用研究 [J]. 天然产物研究与开发. 2008, 20(3): 522-526.
- [2] 颜红,夏新华,王挥,等. 西瑞香素对人肝癌 HepG2 细胞增殖、凋亡及细胞周期的影响 [J]. 湖南中医药大学学报. 2013, 33(9): 41-43, 81.
- [3] 姜洪芳,白雪,牛慧彦,何平. 西瑞香素对肺癌 A549 细胞侵袭及迁移能力的影响 [J]. 实用药物与临床, 2016, 19(2): 131-135.
- [4] Jiang H F, Wu Z, Bai X, et al. Effect of daphnetin on the proliferation and apoptosis of A549 lung cancer cells in vitro [J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(3): 1139-1142.
- [5] Yang Z Y, Kan J T, Cheng Z Y, et al. Daphnetin-induced apoptosis in HeLa cells: a possible mitochondria-dependent pathway [J]. *Cytotechnology*, 2014, 66(1): 51-61.
- [6] Diogo CV, Félix L, Vilela S, et al. Mitochondrial toxicity of the phytochemicals daphnetoxin and daphnetin-relevance for possible anti-cancer application [J]. *Toxicol In Vitro*, 2009, 23(5): 772-779.
- [7] 申宝德,连王权,沈成英,等. 微型化介质研磨法制备难溶性黄酮类化合物纳米混悬剂 [J]. 中草药, 2017, 48(21): 4413-4418.
- [8] Hong J, Li Y, Xiao Y, et al. Annonaceous acetogenins (ACGs) nanosuspensions based on a self-assembly stabilizer and the significantly improved anti-tumor efficacy [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2016, 145: 319-327.
- [9] 王瑞,张朋俊,翟晓晓,等. 不同产地芫花根皮药材中西瑞香素含量比较 [J]. 中国药业, 2014, 23(23): 50-51.
- [10] Dong F, Dong X, Zhou L, et al. Doxorubicin-loaded biodegradable self-assembly zein nanoparticle and its anti-cancer effect: Preparation, in vitro evaluation, and cellular uptake [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2016, 140: 324-331.
- [11] Lin L C, Yang K Y, Chen Y F, et al. Measurement of daphnetin in plasma of freely moving rat by liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1073(1-2): 285-289.
- [12] 颜红,欧阳婷,杨琼梁,等. 西瑞香素半乳糖化脂质体在大鼠体内组织分布的研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(18): 3457-3462.
- [13] Zhang Z, Feng S S. Self-assembled nanoparticles of poly(lactide)-Vitamin E TPGS copolymers for oral chemotherapy [J]. *Int J Pharm*, 2006, 324(2): 191-198.
- [14] Pan J, Feng S S. Targeted delivery of paclitaxel using folate-decorated poly(lactide)-vitamin E TPGS nanoparticles [J]. *Biomaterial*, 2008, 29(17): 2663-2672.
- [15] 郑楠楠,吴琳华,唐景玲. 聚乙二醇维生素 E 琥珀酸酯在药剂学中的应用进展 [J]. 中国药学杂志, 2014, 49(16): 1373-1376.
- [16] Guo Y, Luo J, Tan S, et al. The applications of Vitamin E TPGS in drug delivery [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2013, 49(2): 175-186.
- [17] Hong J, Li Y, Xiao Y, et al. Annonaceous acetogenins nanosuspensions stabilized by PCL-PEG block polymer: significantly improved antitumor efficacy [J]. *Int J Nanomed*, 2016, 11: 3239-3253.
- [18] Jain K K. Nanotechnology-based drug delivery for cancer [J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2005, 4(4): 407-416.