

负载阿霉素的黄芩苷纳米粒的制备及其体外性能评价

张舒迪, 邵艳寻, 郭切切, 龚法伍, 郭晨曦, 刘占军*

华北理工大学 药学院, 河北 唐山 063210

摘要: 目的 制备负载阿霉素的黄芩苷纳米粒 (DOX/SA-SS-BAI NPs), 并评价其体外性能。方法 构建以胱胺为连接臂的海藻酸钠-黄芩苷聚合物, 并负载阿霉素, 得到 DOX/SA-SS-BAI NPs。对 DOX/SA-SS-BAI NPs 的理化性质进行表征; 采用 HepG2 细胞进行 MTT 实验验证其细胞毒性。**结果** DOX/SA-SS-BAI NPs 粒径为 (158.2 ± 2.8) nm, PDI 为 (0.241 ± 0.008) , Zeta 电位为 (-24.1 ± 0.3) mV, 包封率为 $(64.34 \pm 0.25)\%$, 载药量为 $(16.22 \pm 0.06)\%$ 。体外释放显示载药纳米粒具有良好的还原响应性; MTT 实验证明 DOX/SA-SS-BAI NPs 对 HepG2 细胞具有良好的抑制作用; 细胞摄取实验表明 DOX/SA-SS-BAI NPs 在 HepG2 细胞内较快地释放阿霉素。**结论** 制备的 DOX/SA-SS-BAI NPs 具有较好的理化性质和体外抗癌作用。

关键词: 负载阿霉素的黄芩苷纳米粒; 阿霉素; 黄芩苷; 海藻酸钠; 胱胺; 纳米粒

中图分类号: R944 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2022)07-1482-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.07.008

Preparation and *in vitro* evaluation of baicalin nanoparticles loaded with doxorubicin

ZHANG Shu-di, SHAO Yan-xun, GUO Qie-qie, GONG Fa-wu, GUO Chen-xi, LIU Zhan-jun

School of Pharmacy, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China

Abstract: Objective To prepare baicalin nanoparticles loaded with doxorubicin (DOX/SA-SS-BAI NPs), and study *in vitro* evaluation. **Methods** Sodium alginate-baicalin copolymer with cystamine as the connecting arm was constructed, and doxorubicin was loaded to obtain DOX/SA-SS-BAI NPs. Physicochemical properties of DOX/SA-SS-BAI NPs were characterized. MTT assay was performed on HepG2 cells to verify cytotoxicity of DOX/SA-SS-BAI NPs. **Results** The particle size of DOX/SA-SS-BAI NPs was (158.2 ± 2.8) nm, PDI was (0.241 ± 0.008) , Zeta potential was (-24.1 ± 0.3) mV, the encapsulation rate was $(64.34 \pm 0.25)\%$, and the drug load was $(16.22 \pm 0.06)\%$. *In vitro* release showed that drug-loaded nanoparticles had good reduction response. MTT assay showed that DOX/SA-SS-BAI NPs had a good inhibitory effect against HepG2 cells. Cell uptake experiments showed that DOX/SA-SS-BAI NPs released doxorubicin rapidly in HepG2 cells. **Conclusion** Prepared DOX/SA-SS-BAI NPs had good physicochemical properties and *in vitro* anticancer effect.

Key words: baicalin nanoparticles loaded with doxorubicin; doxorubicin; baicalin; sodium alginate; cystine; nanoparticles

黄芩苷是主要的生物活性黄酮之一, 具有广泛的药理活性, 如抗病毒、抗炎、免疫调节作用, 并具有较强的抗癌作用^[1]。因为黄芩苷的溶解度差, 渗透率低, 口服生物利用度极低, 因此其在临床上的应用仍然有限。抗肿瘤药物封装在纳米载体中是天然化合物递送到肿瘤部位的有效方法, 然而, 由于大多数纳米载体并不具有治疗功效, 且这些材料在体内降解、转化或蓄积可能产生毒性^[2]。本研究

将疏水性的黄芩苷接枝在亲水性大分子聚合物海藻酸钠上, 制备成的两亲性聚合物通过疏水或静电作用在水溶液中形成纳米结构, 同时将游离的抗癌药物阿霉素一并包裹其中, 亲水性大分子成为外壳, 保护抗癌药, 使药物能够在肿瘤部位快速有效释放。本研究以胱胺为连接臂^[3], 接枝黄芩苷和海藻酸钠, 制备海藻酸钠-胱胺-黄芩苷纳米递送系统, 并以此为载体负载阿霉素, 制备负载阿霉素的

收稿日期: 2022-03-10

基金项目: 河北省自然科学基金-生物医药联合基金培育项目 (H2021209024); 河北省自然科学基金资助项目 (H2018209347)

作者简介: 张舒迪 (1996—), 女, 河北唐山人, 硕士研究生。E-mail: 1264529864@qq.com

*通信作者: 刘占军 (1967—), 男, 教授, 博士, 硕士生导师, 研究方向为药用新材料、药物新剂型。E-mail: liuzhanjun929@sina.com

黄芩苷纳米粒,并考察其理化性质,评价体外活性。

1 材料与仪器

Avance NEO 600M 布鲁克核磁共振波谱仪(德国布鲁克仪器公司);Flash E96 型酶联免疫分析仪(北京领宇科技有限公司);I×70-S8F2 倒置相差显微镜、照相系统(日本 Olympus 公司)。

海藻酸钠(分析纯,天津市兴复精细化工研究所);胱胺二盐酸盐(CYS,质量分数 98%,上海麦克林生化科技有限公司,批号 C12195261);黄芩苷(质量分数>90%,上海阿拉丁试剂有限公司);盐酸阿霉素(质量分数 98%,上海阿拉丁试剂有限公司,批号 D2122186)。

人肝癌细胞 HepG2 获赠于华北理工大学齐亚娟教授实验室,DMEM 高糖培养基(北京 EallBio 公司,批号 NG190320EL)。

2 方法与结果

2.1 纳米递送系统的制备

2.1.1 海藻酸钠-胱胺-黄芩苷(SA-SS-BAI)聚合物的制备 参考文献报道方法^[4],利用 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDAC)/N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)催化酰胺反应,构建了以胱胺为连接臂的海藻酸钠-黄芩苷聚合物。称取 0.25 g 海藻酸钠,溶于 15 mL 超纯水中,搅拌,分批加入 EDAC、NHS,避光搅拌过夜,并氮气保护。称取 2.84 g CYS 加入到上述溶液中,反应 48 h。将产物转入截留相对分子质量为 8 000 的透析袋中,在超纯水中透析 2 d(12 h 换 1 次透析外液),冻干,得海藻酸钠-胱胺(SA-SS)。将 70 mg SA-SS 溶于 6 mL 甲酰胺中,备用。另称取黄芩苷、EDAC 和 NHS 适量,加入二甲基甲酰胺(DMF)溶解活化后,按照一定投料比滴加到 SA-SS 溶液中,室温搅拌。产物先用乙醇水溶液透析,再用超纯水透析,冻干,得 SA-SS-BAI 聚合物。本实验共制备 4 种不同投料比的 SA-SS-BAI 聚合物,SA-SS、BAI 投料比分别为 10:1、10:2、10:3、10:4。

2.1.2 海藻酸钠-胱胺-黄芩苷纳米粒(SA-SS-BAI NPs)的制备 将 10 mg SA-SS-BAI 聚合物溶于 10 mL 超纯水中,搅拌至完全溶解,超声 30 min,0.45 μm 滤膜滤过,即得,于 4℃ 冰箱保存。

2.2 SA-SS-BAI 聚合物的表征

2.2.1 红外谱图检测 将海藻酸钠、SA-SS、SA-SS-BAI 进行红外扫描,结果见图 1。海藻酸钠在 1 606、1 415 cm⁻¹ 为不对称羧酸盐离子 COO⁻伸缩振动引

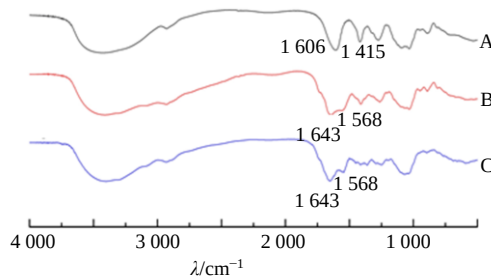


图 1 海藻酸钠(A)、SA-SS(B)、SA-SS-BAI(C)的 FT-IR 图谱

Fig. 1 FT-IR spectra of SA(A), SA-SS(B), and SA-SS-BAI(C)

起的宽峰和对称 COO⁻伸缩振动引起的窄峰^[5]。

SA-SS、SA-SS-BAI 在 1 643、1 568 cm⁻¹ 处有酰胺 I 带和酰胺 II 带特征峰,且后者吸收峰加强,说明黄芩苷通过酰胺链接枝在了 SA-SS 上。

2.2.2 氢核磁共振图谱检测 将 SA-SS-BAI 进行 ¹H-NMR 分析,结果见图 2。δ 3.65~4.15 为海藻酸钠的特征吸收峰;δ 2.34、2.81 为 CYS 的亚甲基的质子峰,说明 CYS 已经成功连接在海藻酸钠上了。δ 6.83~8.16 出现了黄芩苷的特征吸收峰,说明黄芩苷被成功接枝到 SA-SS 上。另外,黄芩苷羧基质子的特征吸收峰 δ 12.53 在 SA-SS-BAI 图谱中消失,说明该羧基已经发生了反应。

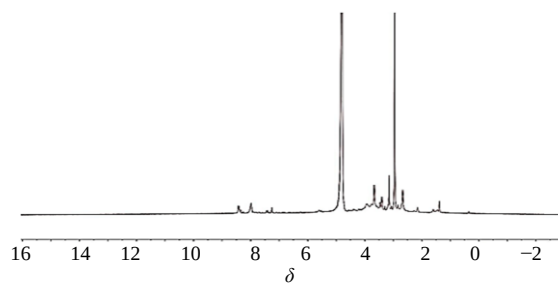


图 2 SA-SS-BAI 的 ¹H-NMR 图谱

Fig. 2 ¹H-NMR spectra of SA-SS-BAI

2.2.3 黄芩苷取代度(DS)的计算 黄芩苷的 DS 为每 100 个海藻酸钠糖残基上所接枝的黄芩苷的个数^[6],计算黄芩苷的 DS。

$$DS = (m/M_{\text{黄芩苷}}) / [(m_{\text{样品}} - m) / M_{\text{海藻酸钠单元}}]$$

m 表示标准曲线测定的黄芩苷的质量; $m_{\text{样品}}$ 表示 SA-SS-BAI 总质量; $M_{\text{黄芩苷}}$ 表示黄芩苷的相对分子质量; $M_{\text{海藻酸钠单元}}$ 表示每个海藻酸钠重复单元单体的相对分子质量

2.2.4 临界胶束浓度(CMC)的测定 采用荧光探针法测定聚合物的 CMC。CMC 值越低,形成的胶束越稳定^[7]。配制 12 μg/mL 芘乙醇溶液,待乙醇

挥尽后,加入不同质量浓度的聚合物溶液,超声 30 min 后避光静置 8 h。设定激发波长为 334 nm,在 300~700 nm 对样品溶液进行扫描,测定各溶液中芘的荧光吸收,计算 CMC。

反应投料比为 10:1、10:2 时,产物 SA-SS-BAI 1、2 并没有形成纳米粒,说明接枝的黄芩苷含量较低,产物疏水性较弱,无法成型。SA-SS-BAI 3、4 形成了纳米粒,CMC 值表现出降低的趋势,说明两亲性聚合物接枝的黄芩苷越多,聚合物的疏水作用越强,成型能力越强。通过对比择优,选择 SA-SS-BAI 4 用于后续实验,结果见表 1。

表 1 不同 SA-SS-BAI 聚合物的 DS、CMC 值 ($n=3$)

Table 1 Substitution and CMC of different SA-SS-BAI polymers ($n=3$)

样品	SA-SS、BAI 投料比	DS/%	CMC/(mg mL ⁻¹)
SA-SS-BAI 1	10:1	5.00±0.03	未形成纳米粒
SA-SS-BAI 2	10:2	8.10±0.02	未形成纳米粒
SA-SS-BAI 3	10:4	10.50±0.03	0.069
SA-SS-BAI 4	10:5	19.70±0.01	0.059

2.3 负载阿霉素的黄芩苷纳米粒 (DOX/SA-SS-BAI NPs) 的制备

将 10 mg SA-SS-BAI 聚合物分散在 5 mL 超纯水中,搅拌,备用。精密称取 3 mg 盐酸阿霉素,分散于甲醇溶液中,并加入 2 倍物质的量的三乙胺,室温避光搅拌 2 h,低压旋蒸除去甲醇,加入 1 mL 二氯甲烷溶解后,将其缓慢滴加到上述水溶液中,避光搅拌 24 h 后透析 2 d,将溶液超声 20 min 后,过 0.45 μm 滤膜,即得。

2.4 DOX/SA-SS-BAI NPs 的粒径、电位、PDI 测定

通过激光粒度仪进行粒径、电位、PDI 的考察,结果 SA-SS-BAI NPs 粒径为 (149.8±2.2) nm, PDI 为 (0.247±0.019), Zeta 电位为 (-27.8±0.3) mV。DOX/SA-SS-BAI NPs 粒径为 (158.2±2.8) nm, PDI 为 (0.241±0.008), Zeta 电位为 (-24.1±0.3) mV。载药后的纳米粒粒径略微变大。

2.5 DOX/SA-SS-BAI NPs 中阿霉素载药量和包封率的测定^[8]

2.5.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-2%醋酸水 (35:65); 检测波长: 481 nm; 体积流量: 1 mL/min; 进样量: 20 μL。

2.5.2 线性关系考察 称取阿霉素适量,用甲醇制备 1 000 μg/mL 储备液。配制 0.1、0.4、1.0、4.0、8.0、10.0、20.0 μg/mL 阿霉素溶液。取各溶液进样,测定峰面积值。以峰面积对质量浓度进行线性回归,得方程 $Y=29\,935.55X-547.17$, $R^2=0.999\,9$,表明阿霉素在 0.1~20.0 μg/mL 线性关系良好。

2.5.3 载药量和包封率的测定 精密量取 0.5 mL 载药纳米溶液,加入 4.5 mL 甲醇超声溶解 10 min,用甲醇定容,经 0.22 μm 有机膜滤过,进样测定,计算 DOX/SA-SS-BAI NPs 的载药量和包封率,结果载药量为 (16.22±0.06)%,包封率为 (64.34±0.25)% ($n=3$)。

载药量=阿霉素在纳米粒中的量/载药纳米粒的总质量

包封率=阿霉素在纳米粒中的量/阿霉素的投料量

2.6 DOX/SA-SS-BAI NPs 的体外释放实验

采用动态膜透析法模拟细胞在不同条件下的药物释放,研究纳米粒在 pH 7.4 还原型谷胱甘肽 (GSH) 不同浓度下的还原响应性。在 pH 7.4 条件下测得释放率对释放时间的方程 $Y=15\,288.44X-4\,325.882$, $R^2=0.999\,8$ 。采用 HPLC 法测定阿霉素的质量浓度,计算累积释放率,结果见图 3。在 pH 7.4 10 mmol/L GSH 的条件下,DOX/SA-SS-BAI NPs 中的阿霉素的释放率比较快,在 24 h 内释放率达到了 48%,说明 GSH 诱导二硫键断裂后,两亲性的 SA-SS-BAI 转化为亲水的海藻酸钠,纳米粒解体,释放出阿霉素。而在 10 μmol/L GSH 中只释放了 38%,说明纳米粒在低浓度 GSH 中阿霉素的释放率较少,结果表明 DOX/SA-SS-BAI NPs 具有还原响应性,释放药物的快慢受到 GSH 浓度的影响。

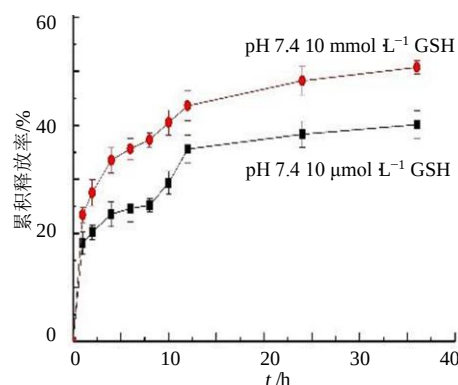


图 3 阿霉素在 GSH 不同浓度条件下的释放 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Drug release of doxorubicin under different GSH conditions ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.7 DOX/SA-SS-BAI NPs 的 MTT 实验

将 HepG2 细胞以 1×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔板中培养, 试验组加入不同质量浓度 (0.25、0.50、1.00、5.00、10.00 $\mu\text{g/mL}$) 的待测样品 (黄芩苷、阿霉素、黄芩苷与阿霉素物理混合、SA-SS-BAI NPs、DOX/SA-SS-BAI NPs)。对照组加入等体

积的培养液, 每组 5 个复孔, 培养 48 h 后, 每孔加 10 μL MTT 后再培养 4 h, 弃上清液, 每孔加入 150 μL DMSO, 避光震荡 10 min, 在 490 nm 处测定吸光度 (A) 值, 计算细胞抑制率, 结果见表 2。

$$\text{细胞抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{试验}}) / A_{\text{对照}}$$

$A_{\text{对照}}$ 表示对照组测得 A 值; $A_{\text{试验}}$ 表示试验组测得 A 值

表 2 DOX/SA-SS-BAI NPs 对 HepG2 细胞抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 2 Effect of DOX/SA-SS-BAI NPs on inhibition rates against HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

样品	细胞抑制率/%					IC ₅₀ /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
	0.25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	1.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	5.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	10.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	
黄芩苷	3.81 $\pm$ 1.70	8.10 $\pm$ 1.95	12.86 $\pm$ 2.34	20.88 $\pm$ 2.38	25.70 $\pm$ 2.56	—
阿霉素	37.86 $\pm$ 2.61	53.40 $\pm$ 3.20	61.81 $\pm$ 3.64	69.88 $\pm$ 3.98	75.48 $\pm$ 4.27	0.50 $\pm$ 0.09
物理混合	37.92 $\pm$ 2.46	54.86 $\pm$ 3.53	64.45 $\pm$ 3.72 [#]	74.29 $\pm$ 4.22 [#]	78.47 $\pm$ 4.21 [#]	0.43 $\pm$ 0.04
SA-SS-BAI NPs	8.10 $\pm$ 2.01	17.62 $\pm$ 2.39	21.29 $\pm$ 2.45	32.13 $\pm$ 2.46 [*]	52.74 $\pm$ 3.36 ^{**}	8.91 $\pm$ 0.18
DOX/SA-SS-BAI NPs	40.13 $\pm$ 2.81	58.25 $\pm$ 3.89	73.79 $\pm$ 4.32	81.26 $\pm$ 4.65 [*]	90.19 $\pm$ 4.89 [*]	0.31 $\pm$ 0.01

与黄芩苷组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$; 与阿霉素组比较: [#] $P < 0.05$; 与物理混合组比较: ^{*} $P < 0.05$

^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs baicalin group; [#] $P < 0.05$ vs doxorubicin group; ^{*} $P < 0.05$ vs physical mixture group

可见 SA-SS-BAI NPs 对 HepG2 细胞的抑制效果强于游离的黄芩苷溶液, 说明纳米粒能够增加 HepG2 细胞对药物的摄取。物理混合组的细胞抑制率均高于游离的黄芩苷和阿霉素, 可能是两者发挥协同作用, 加强了抑制效果。载药纳米粒的抑制效果最强, 说明 HepG2 细胞中的 GSH 诱导结构中的二硫键断裂, 释放出黄芩苷和阿霉素, 使细胞凋亡。

2.8 DOX/SA-SS-BAI NPs 的细胞摄取实验

将 HepG2 细胞接种于 6 孔板中培养 24 h, 然后加入 DOX/SA-SS-BAI NPs、阿霉素溶液和培养基, 在不同时间用荧光显微镜观察 HepG2 细胞的荧光强度。结果见图 4。由于阿霉素本身具有荧光效果, 所以无需其他荧光染料进行标记。DOX/SA-SS-BAI NPs 的荧光效果明显优于单药, 因纳米粒剂型改变, 加强细胞对其的摄取能力, 细胞内的 GSH 诱导二硫键发生断裂, 阿霉素的释放速度加快, 显示更强的荧光性。

3 讨论

本研究通过脒胺将黄芩苷、海藻酸钠进行连接, 制备两亲性聚合物, 将阿霉素进行包裹, 形成纳米结构, 实现了黄芩苷和阿霉素的共同递送。海藻酸钠作为亲水性骨架, 具有较高的生物相容性。脒胺作为连接臂, 在肿瘤部位受到 GSH 的诱导, 发生还原反应, 导致纳米粒裂解, 加速释放药物, 达到抗肿瘤的能力。

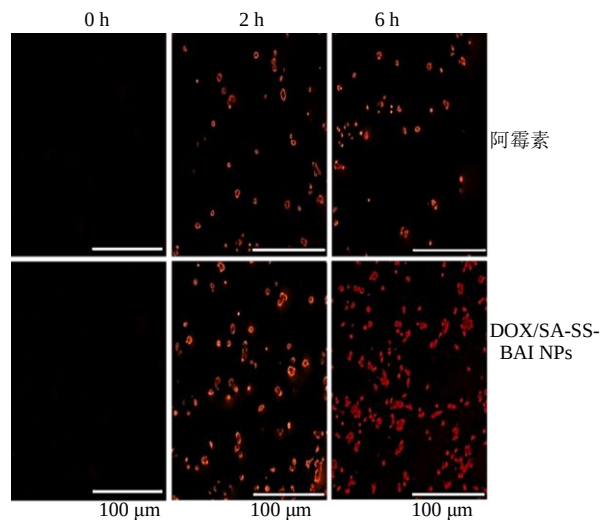


图 4 HepG2 细胞与 DOX/SA-SS-BAI NPs 不同时间的荧光显微图像

Fig. 4 Fluorescent microscopic images of HepG2 cells incubated at different times with DOX/SA-SS-BAI NPs

随着投料比的增加, 接枝的黄芩苷的量也随之增加, 但是 CMC 值和粒径呈下降趋势, 这是因为聚合物接枝了更多的疏水药物黄芩苷, 导致聚合物分子内部的疏水性增加, 在成型的过程中形成了更加紧密的内核, 因而粒径变小。体外释放考察表明制备的 SA-SS-BAI NPs、DOX/SA-SS-BAI NPs 具有还原响应性, 在高浓度 GSH 条件下药物释放最快。MTT 实验表明 SA-SS-BAI NPs 的抑制效果要强于

游离的黄芩苷,说明纳米结构易被 HepG2 细胞吸收以发挥作用。DOX/SA-SS-BAI NPs 的抑制效果最强,说明在 HepG2 细胞内高浓度 GSH 诱导二硫键断裂,快速释放黄芩苷和阿霉素以发挥效果。细胞摄取实验表明 DOX/SA-SS-BAI NPs 是易被 HepG2 细胞释放药物。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 洪铁, 杨振, 绳娟, 等. 黄芩苷抗肿瘤作用及机制的研究 [J]. 中国药理学通报, 2008, 24(12): 1676-1678.
- [2] 李林峰, 高漓. 纳米载药系统在泌尿系肿瘤治疗中应用的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(8): 1724-1728.
- [3] Tian C H, Asghar S, Xu Y R, *et al.* The effect of the molecular weight of hyaluronic acid on the physicochemical characterization of hyaluronic acid-curcumin conjugates and *in vitro* evaluation in glioma cells [J]. *Colloid Surface*

B, 2018, 165: 45-55.

- [4] Song M F, Xue Y A, Chen L D, *et al.* Acid and reduction stimulated logic "and"-type combinational release mode achieved in DOX-loaded superparamagnetic nanogel [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2016, 65: 354-363.
- [5] Xu L F, Zhong S L, Shi C, *et al.* Sonochemical fabrication of reduction-responsive magnetic starch-based microcapsules [J]. *Ultrason Sonochem*, 2018, 49: 169-174.
- [6] Tian C, Asghar S, Hu Z, *et al.* Understanding the cellular uptake and biodistribution of a dual-targeting carrier based on redox-sensitive hyaluronic acid-ss-curcumin micelles for treating brain glioma [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 136:143-153.
- [7] 张晨, 徐传锡, 王志强, 等. β -环糊精-聚乙二醇-7-乙基-10-羟基喜树碱纳米胶束的制备及其质量评价 [J]. 现代药物与临床, 2021, 36(8): 1586-1589.
- [8] 杜洪亮. 基于甘草次酸修饰自组装胶束递药系统的研究 [D]. 济南: 山东大学, 2017.

[责任编辑 解学星]