

白藜芦醇 pH 敏感介孔二氧化硅纳米粒的制备、表征和体外抗肿瘤活性

李伟宏, 张 涛, 高 娟, 王丹蕾, 王风云*

河南应用技术职业学院, 河南 郑州 450042

摘要: 目的 制备白藜芦醇 pH 敏感介孔二氧化硅纳米粒 (Res-pH-MSNs), 并进行体外抗肿瘤活性研究。方法 以包封率、载药量和粒径为指标, 单因素试验结合 Box-Behnken 设计 - 效应面法优化 Res-pH-MSNs 处方工艺。X 射线衍射法分析晶型, 扫描电镜观察形貌, 并测试 pH 敏感性。采用噻唑蓝法考察 Res-pH-MSNs 对子宫内膜癌 HEC-1-A 细胞的体外抗肿瘤活性。采用 Annexin V-FITC/PI 双染法考察 Res-pH-MSNs 对子宫内膜癌 HEC-1-A 细胞凋亡的影响。结果 Res-pH-MSNs 最佳处方为: 介孔二氧化硅纳米粒与药物质量比为 1.95 : 1.00, 壳聚糖质量分数为 0.19%, 制备时间为 12.50 h。Res-pH-MSNs 平均包封率、载药量、粒径和 Zeta 电位分别为 $(84.96 \pm 1.17) \%$ 、 $(22.58 \pm 0.66) \%$ 、 $(137.28 \pm 7.69) \text{ nm}$ 和 $(31.09 \pm 0.87) \text{ mV}$ 。Res-pH-MSNs 呈规则球形, 白藜芦醇在 Res-pH-MSNs 中以无定型形式存在, 体外释药具有明显的 pH 值敏感性。Res-pH-MSNs 可有效抑制 HEC-1-A 细胞增殖, 24、48 h 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 47.72、28.82 $\mu\text{g/mL}$, 并有效诱导细胞凋亡。结论 制备的 Res-pH-MSNs 具有良好 pH 值敏感性和抗肿瘤活性。

关键词: 白藜芦醇 pH 敏感介孔二氧化硅纳米粒; 白藜芦醇; 包封率; 载药量; 粒径; 凋亡

中图分类号: R944 文献标志码: A 文章编号: 1674 - 5515(2025)08 - 1934 - 09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.08.007

Preparation, characterization, and antitumor activity *in vitro* of resveratrol pH-sensitive mesoporous silica nanoparticles

LI Weihong, ZHANG Tao, GAO Juan, WANG Danlei, WANG Fengyun

Henan Vocational College of Applied Technology, Zhengzhou 450042, China

Abstract: Objective To prepare resveratrol pH-sensitive mesoporous silica nanoparticles (Res-pH-MSNs), and to investigate its antitumor activity *in vitro*. **Methods** Encapsulation efficiency, drug loading, and particle size were acted as evaluation indexes, Res-pH-MSNs formulation was optimized though single factor test and Box-Behnken design-response surface method. Crystal form of Res-pH-MSNs was analyzed by X-ray diffraction, scanning electron microscope was used to observe the morphology of Res-pH-MSNs, and the pH-sensitivity was also checked. Inhibitory effects of Res-pH-MSNs on endometrial cancer HEC-1-A cells were detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method. The effects on apoptosis in HEC-1-A cells was detected using Annexin V-FITC/PI double staining method. **Results** Optimal formulation of Res-pH-MSNs was as following: MSNs to drug ratio was 1.95:1.00, chitosan concentration was 0.19%, and preparation time was 12.50 h. Average envelopment efficiency, drug loading, particle size, and Zeta potential were $(84.96 \pm 1.17) \%$, $(22.58 \pm 0.66) \%$, $(137.28 \pm 7.69) \text{ nm}$, and $(31.09 \pm 0.87) \text{ mV}$, respectively. Res-pH-MSNs were regular spherical, resveratrol existed as an amorphous form in the Res-pH-MSNs, and drug release *in vitro* had obvious pH-sensitivity. Res-pH-MSNs significantly inhibited the proliferation of HEC-1-A cells with half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of 47.72 and 28.82 $\mu\text{g/mL}$ at 24 and 48 h, respectively, and effectively induced apoptosis of HEC-1-A cells. **Conclusion** The prepared Res-pH-MSNs have obvious pH-sensitivity and antitumor activity.

Key words: resveratrol pH-sensitive mesoporous silica nanoparticles; resveratrol; encapsulation efficiency; drug loading; particle size; apoptosis

收稿日期: 2025-03-22

基金项目: 河南省科技攻关项目 (252102310468); 河南省高等学校重点科研项目计划 (23B320013); 河南应用技术职业学院 2023 年度校级课题 (2023-KJ-54)

作者简介: 李伟宏 (1980—), 女, 副教授, 硕士, 从事妇科肿瘤研究。E-mail: liweihong5168@126.com

*通信作者: 王风云 (1973—), 女, 教授, 硕士, 从事临床药理学和妇科肿瘤研究。E-mail: wangfengyun1973@126.com

子宫内膜癌对女性生命安全威胁较大, 由于化疗药物不良反应较大, 医药研究者将开发重心转向不良反应小、疗效高的中药领域。白藜芦醇广泛存在于石榴、葡萄、虎杖、松树等植物中, 属于二苯乙烯类化合物。研究证明白藜芦醇对子宫内膜癌具有较强活性^[1-4], 不良反应远小于化疗药物, 具有较高的研究开发价值^[5]。但白藜芦醇溶解度仅 42.28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[6], 注射给药消除半衰期仅 0.42 h^[7], 体内稳定性差, 限制了白藜芦醇的药效发挥。目前白藜芦醇有脂质体^[7]、固体脂质纳米粒^[8]、mPEG-PLGA 纳米粒^[9]的研究报道, 但存在载药量低、处方工艺复杂等缺陷。介孔二氧化硅纳米粒 (MSNs) 具有载药量高、制备过程影响因素少、生物相容性良好等优势^[10]。壳聚糖是一种良好的 pH 值敏感材料, 在弱酸性环境中易溶, 但在中性和弱碱性环境中几乎不溶^[11]。将壳聚糖包覆在介孔二氧化硅纳米粒表面, 利用壳聚糖的 pH 值敏感特性可使介孔二氧化硅纳米粒在弱酸性的肿瘤病灶部位定向释药, 利于增强药效^[11-12]。本研究采用吸附法制备了白藜芦醇介孔二氧化硅纳米粒 (Res-MSNs), 进一步在其表面包覆一层壳聚糖修饰层, 从而得到白藜芦醇 pH 敏感介孔二氧化硅纳米粒 (Res-pH-MSNs), 采用 Box-Behnken 设计 - 响应面法优化 Res-pH-MSNs 处方工艺, 并对 Res-pH-MSNs 微观形貌、pH 值敏感性、晶型、溶血和体外抗肿瘤进行评价, 为白藜芦醇应用于子宫内膜癌防治提供参考。

1 仪器与材料

KQ-300DGV 型超声仪 (昆山市超声仪器有限公司); GE0205 型电子天平 (上海佑科仪器仪表有限公司); 1200 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); Zetasizer Nono ZS-90 型粒度测定仪 (英国马尔文公司); WH420 型磁力搅拌器 (北京维根技术有限公司); H/T16MM 台式高速离心机 (湖南赫西仪器装备有限公司); RT61212 型溶出仪 (深圳市锐拓仪器设备有限公司); XRDynamic 500 型粉末衍射仪 (上海安东帕商贸有限公司); JEM-2100 透射电子显微镜 (日本电子株式会社); CF40-8 型细胞培养箱 (北京昊诺斯科技有限公司); FK-SY96S 型多功能酶标仪 (山东方科仪器有限公司); NovoCyte 型流式细胞仪 (美国 Agilent 公司)。

白藜芦醇原料药 (质量分数为 98.0%, 武汉华玖医药科技有限公司); 白藜芦醇对照品 (批号 111535-201703, 质量分数为 99.4%, 中国食品药品

检定研究院); 介孔二氧化硅纳米粒粉末 (批号 20221117, 博华斯纳米科技宁波有限公司); 壳聚糖 (批号 9012-76-4, 上海阿拉丁试剂公司); 乙酸 (批号 20220618, 上海国药集团试剂有限公司); 二甲基亚砜 (批号 3231026003, 美国 Solarbio 公司); 0.25% 胰蛋白酶 (批号 20221020, 上海埃泽思生物科技有限公司); 四甲基偶氮唑盐 (批号 M2128-5G, 美国 Sigma 公司); RPMI-1640 培养基 (批号 8122664, 美国 Gibco 公司); 大鼠红细胞购自郑州益康生物工程有限公司; HEC-1-A 细胞购自上海研域生物工程有限公司。

2 方法与结果

2.1 Res-pH-MSNs 的制备

用 1% 乙酸水溶液配制一定质量分数的壳聚糖溶液, 密封备用。白藜芦醇 50 mg 溶于 20 mL 无水乙醇, 加入处方量介孔二氧化硅纳米粒粉末, 在转速为 600 r/min、水浴温度为 45 $^{\circ}\text{C}$ 条件下磁力搅拌 4 h, 减压旋转蒸发除去有机溶剂, 即得 Res-MSNs 粉末。加入 20 mL 壳聚糖溶液, 磁力搅拌制备一定时间, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 加入 50 mL 纯化水洗涤 2 次, 所得产物置于 45 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥箱过夜, 即得 Res-pH-MSNs 粉末。

2.2 Res-pH-MSNs 中白藜芦醇的 HPLC 法测定

2.2.1 色谱条件 Diamonsil-C₁₈ 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇 - 水溶液 (55 : 45); 检测波长为 310 nm; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样体积为 10 μL 。

2.2.2 白藜芦醇对照品溶液配制及标准曲线的制备 精密称取白藜芦醇对照品 24.68 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 加入甲醇溶解后定容, 即得 0.246 8 mg/mL 白藜芦醇对照品储备液, 密封备用。取白藜芦醇对照品储备液适量, 使用甲醇 - 水溶液 (55 : 45) 稀释成 12.340 0、6.170 0、3.090 0、1.234 0、0.123 4、0.061 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 系列质量浓度, 分别进样测定峰面积, 线性回归得方程 $Y=22.145 3 X+1.024 9$ ($r=0.999 7$), 表明白藜芦醇在 0.061 7~12.340 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 线性关系良好。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密取 Res-pH-MSNs 粉末 10 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加入 0.1 mol/L 盐酸 5 mL, 超声 5 min 破坏 Res-pH-MSNs 表面的壳聚糖包覆层, 再加入约 40 mL 甲醇, 继续超声 15 min, 放冷后加入甲醇稀释定容。12 000 r/min 离心 10 min, 精密取 0.5 mL 上清液, 置 10 mL 量瓶中,

使用甲醇 - 水溶液 (55 : 45) 稀释至刻度, 即得。

2.2.4 方法学考察 取 Res-pH-MSNs 粉末制备 6 份供试品溶液, 测定白藜芦醇质量分数, 计算得其 RSD 值为 1.70%。取 12.340 0、1.234 0、0.061 7 $\mu\text{g/mL}$ 白藜芦醇对照品溶液, 分别进样测定 6 次, 计算得峰面积 RSD 值分别为 0.20%、0.64%、0.54%。取 Res-pH-MSNs 供试品溶液, 分别于 0、4、8、12、16、24 h 测定白藜芦醇质量分数, 计算得其 RSD 值为 1.26%, 表明 Res-pH-MSNs 供试品溶液稳定性良好。精密取 Res-pH-MSNs 粉末 5 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 共 9 份, 分为低、中、高 3 组, 分别加入 0.246 8 mg/mL 白藜芦醇对照品储备液 3.5、7.0、10.5 mL, 制备 Res-pH-MSNs 供试品溶液, 测定白藜芦醇质量分数, 计算得平均回收率为 101.09%, RSD 值为 1.73%。

2.2.5 样品测定方法 将 Res-pH-MSNs 粉末制备成供试品溶液, 测定, 根据随行标准曲线计算白藜芦醇的质量浓度。

2.3 包封率、载药量、粒径和 Zeta 电位的测定

精密称取 Res-pH-MSNs 粉末 (W) 分散于蒸馏水中, 得 Res-pH-MSNs 混悬液。精密量取 1 mL 于 12 000 r/min 离心 10 min, 测定上清液中白藜芦醇质量浓度, 即得游离白藜芦醇的质量 (M_1), 测定 Res-pH-MSNs 中白藜芦醇的总质量 (M_0), 计算载药量、包封率。

$$\text{载药量} = (M_0 - M_1) / W$$

$$\text{包封率} = (M_0 - M_1) / M_0$$

取适量 Res-pH-MSNs 混悬液置比色皿中, 用擦镜纸擦拭干净后于粒度分析仪上测定粒径、多分散指数 (PDI)。取 Res-pH-MSNs 混悬液置 Zeta 电位专用电槽中, 用擦镜纸擦拭干净后测定 Zeta 电位。

2.4 单因素考察

2.4.1 MSNs 与白藜芦醇质量比的考察 在壳聚糖质量分数为 0.20%, 制备时间为 12 h 条件下考察 MSNs 粉末与白藜芦醇质量比 (1.0 : 1.0、1.5 : 1.0、2.0 : 1.0、2.5 : 1.0、3.0 : 1.0) 对 Res-pH-MSNs 包封率、载药量和粒径的影响, 结果见表 1。Res-pH-MSNs 包封率随着 MSNs 与白藜芦醇质量比的增加而增加, 表明增加 MSNs 用量比利于提高 Res-pH-MSNs 包封率^[13], 当两者质量比大于 2.0 : 1.0 时包封率增加趋势减缓, 但 MSNs 用量比过大时对 Res-pH-MSNs 载药量影响较大。Res-pH-MSNs 粒径逐渐增大, 可能是 MSNs 比例过大时 Res-pH-MSNs 数

表 1 MSNs 与白藜芦醇质量比对 Res-pH-MSNs 的影响 ($n=3$)

MSNs 与白藜芦醇质量比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
1.0 : 1.0	61.15 ± 1.06	23.68 ± 0.22	114.76 ± 8.04
1.5 : 1.0	74.58 ± 0.94	22.77 ± 0.43	124.25 ± 6.17
2.0 : 1.0	85.42 ± 1.34	23.93 ± 0.57	137.08 ± 7.09
2.5 : 1.0	85.48 ± 1.07	20.59 ± 0.41	152.89 ± 5.96
3.0 : 1.0	85.66 ± 0.91	17.89 ± 0.38	179.48 ± 9.28

量激增, 由于壳聚糖具有一定的黏性, 导致 Res-pH-MSNs 之间发生黏连概率增加^[12], 故使粒径增大。综合考虑包封率、载药量和粒径变化趋势, 后续以 MSNs 与白藜芦醇质量比 2.0 : 1.0 为中心, 对 1.5 : 1.0 ~ 2.5 : 1.0 进行优化。

2.4.2 壳聚糖质量分数的考察 在 MSNs 与白藜芦醇质量比为 2.0 : 1.0, 制备时间为 12 h 条件下分别考察壳聚糖质量分数 (0.10%、0.15%、0.20%、0.25%、0.30%) 对 Res-pH-MSNs 的影响, 结果见表 2。Res-pH-MSNs 包封率和载药量随着壳聚糖质量分数的增加呈先增加后下降趋势, 可能是壳聚糖包覆在 Res-pH-MSNs 表面时利于减少药物泄漏, 利于提高包封率; 但壳聚糖质量分数过大时壳聚糖也被吸附进入 MSNs 载药孔道, 可能将药物排挤出^[13-14], 导致包封率和载药量下降。随着壳聚糖质量分数的增加, Res-pH-MSNs 表面吸附的壳聚糖包裹层厚度随之增加, 导致粒径逐渐增大。由于壳聚糖质量分数为 0.2% 时 Res-pH-MSNs 包封率和载药量均相对较大, 粒径小于 150 nm, 后续以 0.2% 为中心, 对壳聚糖质量分数 0.15% ~ 0.25% 进行优化。

表 2 壳聚糖质量分数对 Res-pH-MSNs 的影响 ($n=3$)

壳聚糖质量分数/%	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
0.10	72.18 ± 1.17	21.31 ± 0.25	98.23 ± 5.67
0.15	77.05 ± 1.24	21.64 ± 0.33	118.46 ± 7.46
0.20	85.94 ± 0.92	22.56 ± 0.52	133.81 ± 8.99
0.25	86.77 ± 0.97	21.42 ± 0.31	148.97 ± 7.83
0.30	82.63 ± 1.05	19.49 ± 0.44	162.49 ± 8.24

2.4.3 制备时间的考察 固定 MSNs 与白藜芦醇质量比为 2.0 : 1.0, 壳聚糖质量分数为 0.20% 条件下考察制备时间 (8、10、12、14、16 h) 对 Res-pH-MSNs 的影响, 结果见表 3。Res-pH-MSNs 包封率和载药量随着制备时间增加呈先增加后下降趋势, 可能是制备较短时药物未被充分吸附进入 MSNs 载药孔道内, 壳聚糖也未被充分包覆在 Res-pH-MSNs 表面, 使包封率和载药量较低^[13]; 但制备时间过长可能使白藜芦醇发生降解, 且 Res-pH-MSNs 自身稳定性也可能受到影响^[14], 最终导致包封率和载药量下降。制备时间对 Res-pH-MSNs 粒径影响不大, 当制备时间为 12 h 时包封率和载药量相对较大, 故后续以 12 h 为中心对制备时间 10~14 h 进行优化。

2.5 Box-Behnken 设计-响应面法优化 Res-pH-MSNs 处方工艺

2.5.1 试验设计方案 MSNs 与药物质量比 (X_1)、壳聚糖质量分数 (X_2) 和制备时间 (X_3) 作为 Res-pH-MSNs 影响因素, 参考单因素结果, X_1 、 X_2 、 X_3 水平设置见表 4。采用包封率 (Y_1)、载药量 (Y_2) 和粒径 (Y_3) 的总评归一值 (OD) 优化 Res-pH-MSNs 处方工艺。包封率和载药量采用 d (包封率或载药量) = $(M_i - M_{\min}) / (M_{\max} - M_{\min})$ 计算, 粒径采用 d 粒径 =

$(M_{\max} - M_i) / (M_{\max} - M_{\min})$ 计算, 式中 M_i 、 M_{\max} 和 M_{\min} 分别代表该组实验中实测值、最大值和最小值; OD 值计算为: $OD = (d_{\text{包封率}} \times d_{\text{载药量}} \times d_{\text{粒径}})^{1/3}$ 。分别测定不同处方 Res-pH-MSNs 的包封率、载药量和粒径, 并计算 OD 值, 结果见表 5。

表 3 制备时间对 Res-pH-MSNs 的影响 ($n=3$)

Table 3 Influence of preparation time on the Res-pH-MSNs ($n=3$)

制备时间/h	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
8	72.12 ± 0.92	18.74 ± 0.59	140.28 ± 6.08
10	79.88 ± 1.11	20.58 ± 0.37	132.16 ± 4.86
12	86.19 ± 0.98	22.38 ± 0.50	136.64 ± 6.11
14	81.43 ± 1.07	21.05 ± 0.63	138.05 ± 5.86
16	76.08 ± 1.34	19.89 ± 0.48	142.77 ± 8.20

表 4 影响因素和水平设置表

Table 4 Influencing factors and level settings

水平	因素		
	X_1	X_2 /%	X_3 /h
-1	1.5 : 1.0	0.15	10
0	2.0 : 1.0	0.20	12
1	2.5 : 1.0	0.25	14

表 5 不同处方 Res-pH-MSNs 的包封率、载药量、粒径和 OD 值 ($n=3$)

Table 5 Encapsulation rate, drug loading, particle size, and OD value of different prescription of Res-pH-MSNs ($n=3$)

序号	X_1	X_2 /%	X_3 /h	Y_1 /%	Y_2 /%	Y_3 /nm	OD 值
1	0	0	0	84.74 ± 1.12	22.44 ± 0.26	136.22 ± 7.17	0.840
2	0	-1	-1	74.82 ± 0.89	20.66 ± 0.36	140.67 ± 6.25	0.290
3	0	1	-1	80.77 ± 1.04	19.51 ± 0.19	164.51 ± 4.26	0.233
4	-1	1	0	73.92 ± 0.77	21.01 ± 0.28	155.26 ± 5.58	0.000
5	0	0	0	83.64 ± 0.98	22.52 ± 0.15	140.94 ± 6.08	0.773
6	-1	0	1	77.81 ± 1.12	23.28 ± 0.22	141.54 ± 3.69	0.597
7	0	1	1	72.24 ± 1.33	18.43 ± 0.20	157.67 ± 4.82	0.062
8	1	0	-1	79.18 ± 1.05	19.14 ± 0.14	156.72 ± 5.19	0.279
9	-1	-1	0	75.35 ± 1.14	24.13 ± 0.31	138.27 ± 3.61	0.469
10	-1	0	-1	74.46 ± 0.98	22.19 ± 0.25	136.82 ± 6.63	0.301
11	1	1	0	80.74 ± 1.25	18.26 ± 0.39	168.15 ± 5.87	0.000
12	0	-1	1	78.67 ± 0.82	21.74 ± 0.23	140.74 ± 3.28	0.571
13	0	0	0	86.13 ± 0.90	22.63 ± 0.19	135.22 ± 4.41	0.897
14	1	0	1	81.65 ± 1.24	19.86 ± 0.28	154.37 ± 6.08	0.412
15	1	-1	0	82.49 ± 0.96	19.58 ± 0.25	155.63 ± 5.51	0.387
16	0	0	0	84.44 ± 1.11	22.37 ± 0.31	134.15 ± 5.93	0.845
17	0	0	0	84.86 ± 0.89	22.49 ± 0.26	139.63 ± 8.02	0.815

2.5.2 数学模型建立与方差分析 使用软件 Design Expert V12.1 对 OD 值数据进行拟合, 得 OD 二次多元方程: $OD=0.830-0.036 X_1-0.180 X_2+0.067 X_3+0.020 X_1X_2-0.041 X_1X_3-0.110 X_2X_3-0.260 X_1^2-0.360 X_2^2-0.180 X_3^2$, 模型 R^2 和 R^2_{adj} 分别为 0.9771、0.9477, 表明拟合结果与测得结果相关性良好。方差分析见表 6, OD 值数学模型 P 值差异具有极显著性 ($P<0.0001$), 失拟项 P 值为 0.1008 ($P>0.05$), 无显著差异, 说明拟合结果具有较高的参考价值。OD 值数学模型中 X_3 、 X_2X_3 差异具有显著性 ($P<0.05$), 而 X_2 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 差异均有极显著 ($P<0.001$)。根据 F 值可知, 3 个主

要影响因素对 Res-pH-MSNs 总评归一值 OD 影响顺序为: 壳聚糖质量分数>制备时间>MSNs 与药物质量比。

2.5.3 响应面、Res-pH-MSNs 最佳处方 MSNs 与药物质量比 (X_1)、壳聚糖质量分数 (X_2) 和制备时间 (X_3) 任意两因素交互作用见图 1。随着其中两个因素的增加 (另 1 个因素取中间值), OD 值均呈先上升后下降趋势, 因此 OD 值存在最大值。选择 OD 值最大值为优化目标, 得 Res-pH-MSNs 的最佳处方为: MSNs 与药物质量比为 1.95:1.00, 壳聚糖质量分数为 0.19%, 制备时间为 12.58 h (修正为 12.50 h), 预测 OD 值为 0.912。

表 6 OD 值方差分析
Table 6 Variance analysis of OD value

项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1.43	9	0.16	33.20	<0.0001
X_1	0.01	1	0.01	2.17	0.1838
X_2	0.25	1	0.25	52.66	0.0002
X_3	0.04	1	0.04	7.55	0.0286
X_1X_2	1.62×10^{-3}	1	1.62×10^{-3}	0.34	0.5757
X_1X_3	6.67×10^{-3}	1	6.67×10^{-3}	1.39	0.2767
X_2X_3	0.05	1	0.05	10.71	0.0136
X_1^2	0.28	1	0.28	57.48	0.0001
X_2^2	0.56	1	0.56	116.47	<0.0001
X_3^2	0.14	1	0.14	28.71	0.0001
残差	0.03	7	4.79×10^{-3}		
失拟项	0.03	3	8.48×10^{-3}	4.17	0.1008
绝对误差	8.13×10^{-3}	4	2.03×10^{-3}		
总和	1.47	16			

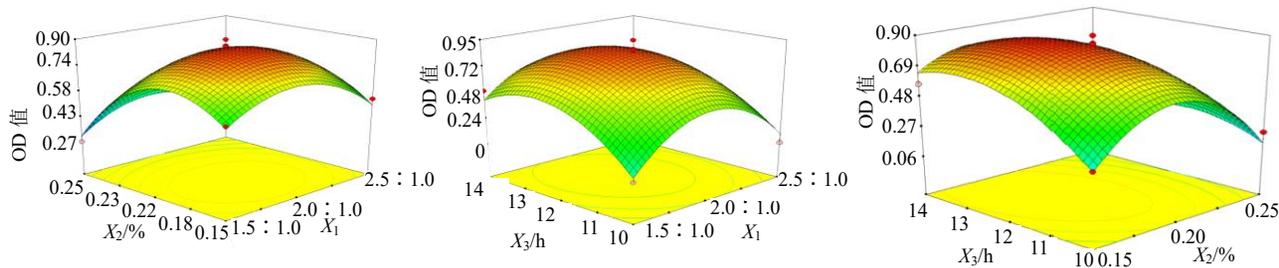


图 1 自变量与响应值三维图

Fig. 1 Three-dimensional plots of independent factors and response values

2.5.4 Res-pH-MSNs 工艺验证 制备 3 批 Res-pH-MSNs, 测得平均包封率、载药量和粒径分别为 $(84.96 \pm 1.17)\%$ 、 $(22.58 \pm 0.66)\%$ 、 (137.28 ± 7.69) nm, 粒径分布图见图 2。计算得实测 OD 值为 0.909,

以预测 OD 值 (0.912) 为参考计算得实测 OD 值相对偏差为 -0.33%, 表明实测 OD 值与数学模型预测结果较为相符。另测得 Res-pH-MSNs 的 Zeta 电位为 (31.09 ± 0.87) mV, 见图 2, 由于壳聚糖是一种

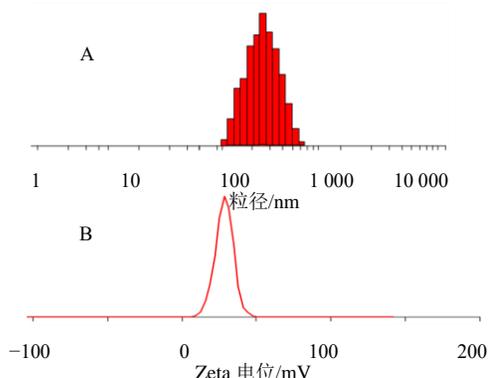


图 2 Res-pH-MSNs 粒径 (A) 和 Zeta 电位图 (B)

Fig. 2 Particle size (A) and Zeta potential (B) of Res-pH-MSNs

带正电荷的多糖, 包覆在 Res-pH-MSNs 表面后也使之带正电荷。

2.6 紫外吸收光谱分析

介孔二氧化硅纳米粒不溶于水或有机溶剂, 故不进行紫外吸收光谱分析。取白藜芦醇、壳聚糖和 Res-pH-MSNs 适量, 溶于甲醇 (均含 1% 乙酸), 并适当稀释, 置于比色皿中, 分别进行紫外扫描, 扫描范围为 190~400 nm, 结果见图 3。白藜芦醇溶液在 310 nm 有最大吸收峰, 而 Res-pH-MSNs 最大吸收峰发生红移至 314 nm, 这可能是由于载体介孔二氧化硅纳米粒与白藜芦醇之间发生了氢键络合等作用所致^[15]。壳聚糖在白藜芦醇、Res-pH-MSNs 最大吸收峰附近基本无紫外吸收, 利于准确测定 Res-pH-MSNs 中白藜芦醇。

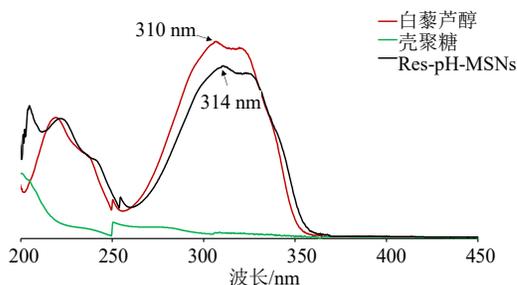
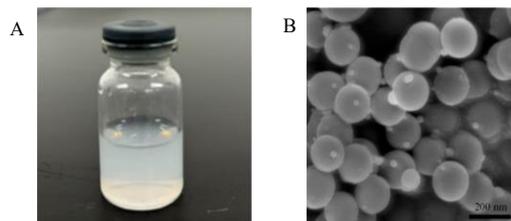


图 3 Res-pH-MSNs 紫外可见光吸收光谱图

Fig. 3 UV absorption spectrum of Res-pH-MSNs

2.7 Res-pH-MSNs 混悬液外观及扫描电镜

取 Res-pH-MSNs 粉末适量, 加入蒸馏水超声 10 s 使之分散, Res-pH-MSNs 混悬液外观见图 4。取 Res-pH-MSNs 混悬液滴至胶带上, 震荡铺展, 室温晾干, 喷金后于扫描电镜下观察 Res-pH-MSNs 形貌 ($\times 12\,500$), 结果见图 4, Res-pH-MSNs 呈规则球形, 粒径均一。

图 4 Res-pH-MSNs 混悬液外观 (A) 和扫描电镜 (B)
Fig. 4 Appearance (A) and TEM image (B) of Res-pH-MSNs suspension

2.8 X-射线衍射分析

参考 Res-pH-MSNs 处方, 取适量白藜芦醇、介孔二氧化硅纳米粒粉末和壳聚糖进行简单混合, 得物理混合物。取白藜芦醇原料药、介孔二氧化硅纳米粒粉末、壳聚糖、物理混合物和 Res-pH-MSNs 粉末适量测定 XRPD 图谱。测试条件: Cu-K α 靶, 记录衍射角度 (2θ) 范围为 $2.5^\circ\sim 45.0^\circ$, 扫描速度为 $4^\circ/\text{min}$, 结果见图 5。白藜芦醇在 4.4° 、 12.1° 、 13.6° 、 15.4° 、 15.5° 、 25.1° 出现特征衍射峰, 介孔二氧化硅纳米粒粉末和壳聚糖的 XRPD 图谱中无特征晶型峰, 表明两者均属于无定形材料。在物理混合物 XRPD 图谱中仍可见白藜芦醇特征衍射峰, 说明白藜芦醇晶态未改变。在 Res-pH-MSNs 粉末 XRPD 图谱中白藜芦醇特征衍射峰消失, 推测白藜芦醇可能由晶态转变为无定形态, 晶态的改变利于白藜芦醇发挥药效。

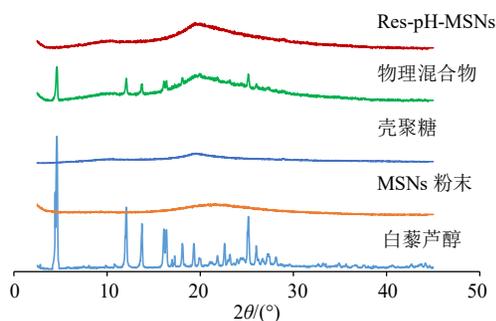


图 5 白藜芦醇、MSNs 粉末、壳聚糖、物理混合物和 Res-pH-MSNs 的 XRD 结果

Fig. 5 XRD of resveratrol, MSNs powder, chitosan, physical mixture, and Res-pH-MSNs

2.9 Res-pH-MSNs 的 pH 值敏感性检查

使用 pH 7.4 磷酸盐缓冲液模拟正常体液环境, pH 5.5 磷酸盐缓冲液模拟肿瘤弱酸性环境。取 Res-pH-MSNs 粉末适量 (含白藜芦醇 10 mg), 加入 pH 7.4 磷酸盐缓冲液 8 mL, 得混悬液, 另取 10 mg 白

藜芦醇原料药溶于乙醇溶液，分别密封于透析袋中（截留相对分子质量 8 000~12 000）。取 pH 7.4 磷酸盐缓冲液 1.0 L 作为释药介质，转篮转速为 75 r/min，待介质恒温至 (37±1) °C 后进行实验，分别于各个时间点取样 5 mL，取样后立即补加 pH 7.4 磷酸盐缓冲液 8 mL。各个样品 12 000 r/min 离心 10 min，测定上清液中白藜芦醇，同法考察 Res-pH-MSNs 粉末和白藜芦醇原料药在 pH 5.5 磷酸盐缓冲液中的释药行为，结果见图 6。白藜芦醇原料药在两种 pH 值介质中快速释药，且释药行为无明显差异。Res-pH-MSNs 在 pH 5.5 磷酸盐缓冲液中释药速率和释放度明显大于在 pH 7.4 磷酸盐缓冲液中的释药速率和释放度，表明 Res-pH-MSNs 具有 pH 值敏感性。

2.10 溶血试验

取大鼠红细胞，使用生理盐水配成 2% 的悬液，备用。实验设计见表 7。取 8 个离心管，分别加入 2% 红细胞悬液 2.5 mL，1~6 号离心管含有不同体积的 Res-pH-MSNs 混悬液和生理盐水，使白藜芦醇质量浓度依次为 0.1、0.2、0.4、0.8、1.0、2.0 mg/mL，摇匀后立即密封。7 号管加入 2.5 mL 生理盐水，作

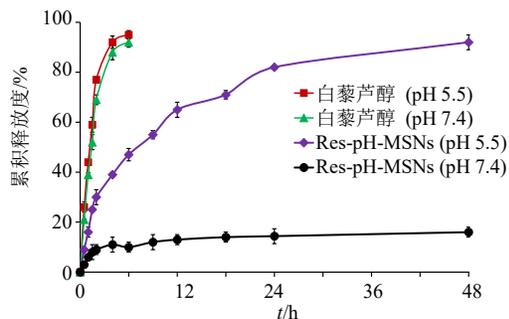


图 6 白藜芦醇和 Res-pH-MSNs 在不同 pH 值磷酸盐缓冲液中体外释放曲线 (n=6)

Fig. 6 *In vitro* release curves of resveratrol and Res-pH-MSNs in phosphate buffer at different pH (n=6)

为阴性对照组。8 号管加入 2.5 mL 纯化水，作为阳性对照组。将各样品置于 37 °C 水浴中，孵育 1.5 h 后取出，置于离心机中 3 000 r/min 离心 3 min，取上清液于 416 nm 处测定中吸光度 (A) 值，计算溶血率[溶血率 = (A_{样品} - A_{阴性}) / (A_{阳性} - A_{阴性})]。结果显示 Res-pH-MSNs 质量浓度小于 0.4 mg/mL 时，溶血率小于 5%，说明在此质量浓度下使用时安全性良好，为后续研究提供了参考。

表 7 溶血试验设计和结果

Table 7 Design and results of hemolysis test

管号	Res-pH-MSNs 混悬液体积/mL	生理盐水/mL	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	纯化水/mL	溶血率/%
1	0.1	2.4	0.1	0.0	2.26±0.11
2	0.2	2.3	0.2	0.0	2.92±0.33
3	0.4	2.1	0.4	0.0	3.88±0.39
4	0.8	1.7	0.8	0.0	7.72±0.62
5	1.0	1.5	1.0	0.0	11.16±1.15
6	2.0	0.5	2.0	0.0	15.25±1.40
7	0.0	2.5	0.0	0.0	0.00±0.00
8	0.0	0.0	0.0	2.5	100.00±0.00

2.11 Res-pH-MSNs 对人子宫内膜癌细胞 HEC-1-A 的增殖抑制作用

将人子宫内膜癌细胞系 HEC-1-A 细胞置于含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中，置培养箱中 (5% CO₂、37 °C) 进行培养。待细胞覆盖培养皿底面积约 80% 时，按照 1:3 的比例传代操作，取传代 3 次后处于对数生长期的 HEC-1-A 细胞进行实验。

采用培养液分别配制白藜芦醇和 Res-pH-MSNs 药液。取处于对数生长期的 HEC-1-A 细胞，

以 1.0×10⁵ 个/mL 密度接种于 96 孔板，每孔 100 μL，置培养箱 (5% CO₂、37 °C) 培养 24 h。分成对照组 (HEC-1-A 细胞、培养基、0.5% MTT 和 DMSO)、白藜芦醇组 (10、20、40、80、160 μg/mL) 和 Res-pH-MSNs 组 (10、20、40、80、160 μg/mL)，每组质量浓度均设 6 个重复孔，相同条件下分别处理 HEC-1-A 细胞 24、48 h。另设空白组 (培养基、0.5% MTT 和 DMSO)。加 0.5% MTT 溶液 20 μL 终止培养，4 h 后弃去培养液，按 150 μL/孔加入 DMSO，震荡 2 min。置于酶标仪 (490 nm) 测定吸

光度 (A) 值, 计算半数抑制浓度 (IC_{50}) 和细胞存活率[细胞存活率 = $(A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$], 结果见图 7。与白藜芦醇溶液相比, Res-pH-MSNs 在 24、48 h 时细胞存活率均降低, 表明 Res-pH-MSNs 增强了白藜芦醇对 HEC-1-A 细胞的增殖抑制作用。白藜芦醇处理 24、48 h 后 IC_{50} 分别为 75.69、54.14 $\mu\text{g/mL}$, Res-pH-MSNs 处理 24、48 h 后 IC_{50} 分别下降至 47.72、28.82 $\mu\text{g/mL}$, 表明 Res-pH-MSNs 增强了白藜芦醇对子宫内膜癌细胞 HEC-1-A 的增殖抑制作用, 提高了抗肿瘤活性。

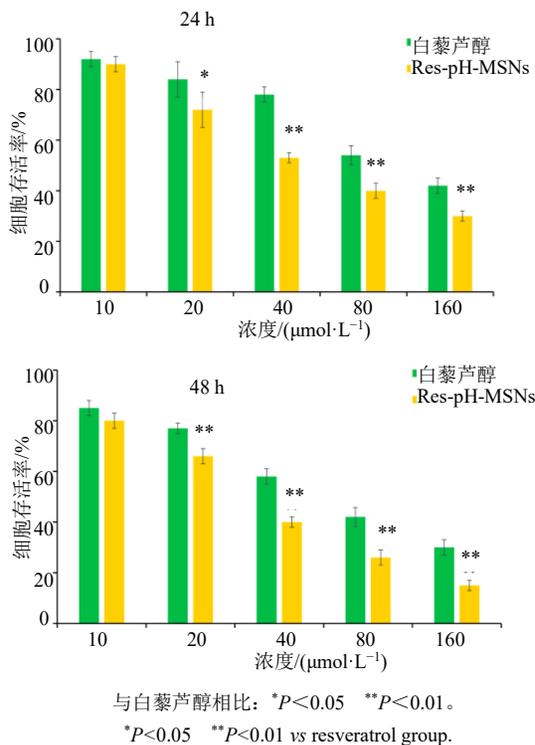


图 7 Res-pH-MSNs 对 HEC-1-A 细胞的抑制作用 ($n=3$)
Fig. 7 Inhibitory effects of Res-pH-MSNs on HEC-1-A cells ($n=3$)

取对数生长期 HEC-1-A 细胞接种于 6 孔板中, 每孔 5×10^5 个, 培养 24 h。设置对照组 (等量 DMSO)、白藜芦醇组 (80 $\mu\text{g/mL}$) 和 Res-pH-MSNs 组 (80 $\mu\text{g/mL}$), 培养 24 h。使用无 EDTA 胰酶消化, 并收集细胞悬液, 置于离心机中, 3 000 r/min 离心 3 min, 弃去上清液, PBS 清洗并再次离心。在避光环境中加 Binding buffer 100 μL 重悬, 再加入 10 μL FITC 标记的 Annexin-V, 孵育 30 min, 加入 PI 5 μL 孵育 5 min, 加 Binding buffer 500 μL , 进行流式细胞仪检测 (5 min 内检测) [16], 结果见图 8。白藜芦醇组 HEC-1-A 细胞凋亡率为 28.93%, 表明白藜芦醇具有一定的促凋亡作用; Res-pH-MSNs 组 HEC-1-A 细胞凋亡率提高至 47.26%, 表明 Res-pH-

MSNs 可进一步增加 HEC-1-A 细胞凋亡, 且 Res-pH-MSNs 晚期凋亡率高于白藜芦醇晚期凋亡率。

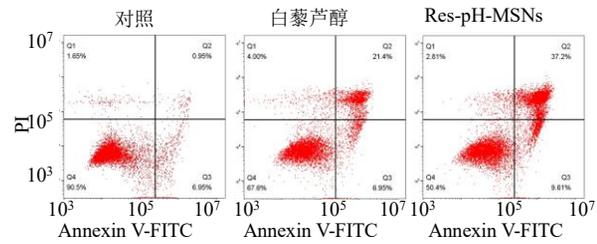


图 8 Res-pH-MSNs 对 HEC-1-A 细胞凋亡的影响
Fig. 8 Effects of Res-pH-MSNs on apoptosis of HEC-1-A cells

3 讨论

肿瘤细胞生长速度过快, 糖酵解率高, 导致肿瘤组织附近的 pH 值 (pH 5.0~6.5) 低于正常组织 pH 值 (pH 7.0~7.4), 利用肿瘤细胞周围微环境与正常组织差异性构建 pH 敏感纳米粒, 利于提高药物在肿瘤病灶部位的富集程度。但目前 pH 敏感纳米制剂存在辅料昂贵、辅料种类繁多、制备工艺复杂等缺陷 [17]。介孔二氧化硅纳米粒和壳聚糖制备工艺较成熟, 国内已实现量产, 因而采用介孔二氧化硅纳米粒和壳聚糖构建 pH 敏感介孔二氧化硅纳米粒更具有现实意义。Res-pH-MSNs 最佳处方的平均包封率大于 80%, 符合《中国药典》2020 年版四部 9014 项下对微粒制剂的要求, 且载药量大于 20%, 远大于报道的白藜芦醇纳米制剂载药量 [7-9]。

白藜芦醇在 Res-pH-MSNs 中转变为无定形态, 这是由于介孔二氧化硅纳米粒的介孔一般小于 10 nm, 白藜芦醇被吸附进入介孔后, 在限域作用下无法以晶型状态存在, 白藜芦醇晶态的变化也为增强药效奠定基础 [18-19]。体外释药结果显示 Res-pH-MSNs 具有明显的 pH 值敏感性, 这是由于壳聚糖在弱酸性环境中易被溶解, 但在中性或碱性环境中几乎不溶, 将壳聚糖包覆在介孔二氧化硅纳米粒表面后可发挥“门控开关”作用。Res-pH-MSNs 在弱酸性环境中时介孔二氧化硅纳米粒表面壳聚糖包覆层被迅速溶解或破坏, 导致 Res-pH-MSNs 内部药物快速释放 [20]; Res-pH-MSNs 在中性或碱性环境中时介孔二氧化硅纳米粒表面壳聚糖包覆层稳定性较高, 难以被溶解或破坏, 因此在壳聚糖包覆层阻滞下 Res-pH-MSNs 中药物释放较困难。

与白藜芦醇溶液相比, Res-pH-MSNs 的 IC_{50} 明显下降, 且细胞凋亡率明显提高, 这可能是由于 Res-pH-MSNs 粒径较小, 可通过增强渗透滞留效应

在癌细胞中蓄积; Res-pH-MSNs 在肿瘤细胞微酸环境中具有 pH 值敏感性,从而导致 Res-pH-MSNs 中白藜芦醇在癌细胞中快速释放;与正常细胞相比,癌细胞表面往往带更多的负电荷,而表面带正电荷的 Res-pH-MSNs 更易被癌细胞摄取、内吞^[21],最终显著增强了白藜芦醇药效。溶血实验结果表明,Res-pH-MSNs 使用安全性良好,可能是由于壳聚糖生物相容性良好,包覆 Res-pH-MSNs 表面利于减少红细胞膜破解^[11,22],降低了溶血效应。本研究为白藜芦醇新型抗肿瘤药物的研发提供了借鉴,也为后续 Res-pH-MSNs 体内药效学研究奠定了实验基础^[23]。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 王真,陈立伟.白藜芦醇抗肿瘤药理作用机制研究进展[J].药物评价研究,2023,46(2):445-451.

[2] 杨琴,周涛,王友华.白藜芦醇防治脑梗死的作用机制研究进展[J].现代药物与临床,2023,38(9):2374-2380.

[3] 鲁文凤,路嘉瑞,韩迪,等.白藜芦醇衍生物作为新型 LSD1/HDAC 双靶点抑制剂的计算模拟研究[J].化学研究与应用,2024,36(3):572-580.

[4] 周佳韞,印泽远,王晴,等.基于网络药理学及分子对接探讨白藜芦醇防治子宫内膜癌的作用及分子机制[J].徐州医科大学学报,2023,43(4):280-286.

[5] Nagaoka T, Hein T W, Yoshida A, et al. Resveratrol, a component of red wine, elicits dilation of isolated porcine retinal arterioles: Role of nitric oxide and potassium channels[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48(9): 4232-4239.

[6] 李珏,姜飞,李慧丽,等.白藜芦醇-牛磺脱氧胆酸钠共无定形体系改善溶解度和物理稳定性[J].中草药,2024,55(21):7248-7256.

[7] 李颖,周婷,阴龙飞,等.白藜芦醇纳米脂质体在大鼠体内的分布及靶向性评价[J].中国临床药理学杂志,2019,35(23):3092-3094.

[8] 杨娟,钟莹,尚曙玉,等.白藜芦醇磷脂复合物固体脂质纳米粒的制备及其体内药动学研究[J].中成药,2021,43(4):841-846.

[9] 李伟宏,王风云.白藜芦醇 mPEG-PLGA 纳米粒的制备及其体内药动学、抗肿瘤活性研究[J].中成药,2022,44(11):3409-3415.

[10] Hudson S P, Padera R F, Langer R, et al. The biocompatibility of mesoporous silicates [J]. *Biomaterials*, 2008, 29(30): 4045-4055.

[11] O'Keefe T L, Deng C, Wang Y, et al. Chitosan-coated mesoporous silica nanoparticles for suppression of *Fusarium virguliforme* in soybeans (*Glycine max*) [J]. *ACS Agric Sci Technol*, 2024, 4(5): 580-592.

[12] Liao T, Liu C, Ren J, et al. A chitosan/mesoporous silica nanoparticle-based anticancer drug delivery system with a "tumor-triggered targeting" property [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 183(7): 2017-2029.

[13] 房伟,王彦阁,王奎鹏,等.木犀草素磷脂复合物介孔二氧化硅纳米粒的制备、表征和药动学研究[J].现代药物与临床,2025,40(2):330-340.

[14] 周敬,郑宝玉,李阳杰,等.白屈菜红碱介孔二氧化硅纳米粒缓释片的制备及体外释药考察[J].中国医院药学杂志,2024,44(2):159-165.

[15] 肖健.体外冲击波及其介导下包裹非甾体抗炎药的介孔二氧化硅纳米颗粒局部治疗跟腱炎模型的研究[D].合肥:安徽医科大学,2024.

[16] 郑煦阳,李凌宇,胡玥,等.吡啶-1,3,4-二唑类衍生物的合成及其体外抗肿瘤活性研究[J].现代药物与临床,2024,39(4):886-893.

[17] 汪洁,顾雪梅,张思雨,等.甘草次酸和叶酸共修饰双靶向 pH 敏感黄芩苷/姜黄素共载脂质体的制备及评价[J].药物评价研究,2024,47(12):2816-2829.

[18] 毛利紧,朱家豪,郝海军.芒果苷纳米囊泡的制备、表征和药动学研究[J].现代药物与临床,2025,40(6):1389-1397.

[19] 曹伶俐,刘素梅.甜菊糖苷-高良姜素纳米复合物的制备及其理化性质评价[J].化学研究与应用,2025,37(6):1506-1514.

[20] 杨阳.壳聚糖-介孔二氧化硅载药纳米粒子的制备及性能研究[D].郑州:郑州大学,2015.

[21] 李彪,陈颖翀,申宝德,等.智能响应型介孔二氧化硅抗肿瘤纳米递药系统的设计策略与研究应用[J].药学学报,2023,58(3):494-505.

[22] 黎哲.共载紫杉醇/丹参酮 IIA 叶酸修饰脂质体包覆介孔二氧化硅递药系统的构建及抗肿瘤研究[D].上海:上海中医药大学,2020.

[23] 苏祖恒,梅先林,吴科锋,等.抗癌肽的抗肿瘤作用机制和临床应用的研究进展[J].现代药物与临床,2024,39(8):2169-2176.

[责任编辑 解学星]