

番荔枝素纳米混悬剂的制备及其抗肿瘤作用研究

苏文晶^{1,2}, 肖瑶³, 张明珠¹, 洪靖怡², 季宇彬¹, 王向涛^{1,2}

1. 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

2. 北京协和医学院药用植物研究所 中草药物质基础与资源利用教育部实验室, 北京 100193

3. 黑龙江中医药大学 药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: 目的 制备高载药量番荔枝素纳米混悬剂(ACGs-NSPs), 并研究其对小鼠乳腺癌 4T1 移植肿瘤的生长抑制作用, 为强效抗肿瘤药物 ACGs 的临床应用提供可用注射剂型。方法 番荔枝素、TPGS、SPC(质量比 7:5:2)采用超声-沉淀法制备 ACGs-NSPs, 并用动态光散射法测定 ACGs-NSPs 的粒径, 透射电镜观察其形态; 稳定剂 TPGS、SPC 组成比例对 ACGs-NSPs 的溶血性考察; 透析法考察其体外释放; 采用 MTT 比色法评价 ACGs-NSPs 对 4T1 细胞细胞毒性; 建立 4T1 乳腺癌皮下小鼠肿瘤模型, 以紫杉醇注射液(PTX)为阳性对照, 考察不同剂量 ACGs-NSPs 静脉注射给药对 4T1 肿瘤的抗肿瘤药效。结果 ACGs-NSPs 为表面光滑的球形, 平均粒径为(129.03±1.03) nm, 多分散指数 PDI 为 0.134±0.03, zeta 为(-17.7±0.16) mV, HPLC 法测得番荔枝素线性回归方程为 $Y=0.1572X-0.3632$ ($R^2=0.999$), 在 5~200 µg/mL 范围内显性关系良好, 载药量高达(45.03±0.72)%; 体外释放较为缓慢; MTT 试验中, ACGs-NSPs 对 4T1 乳腺癌的细胞毒性显著强于游离药物(IC_{50} , 3.221 µg/mL vs 4.464 µg/mL, $P<0.05$); 4T1 荷瘤小鼠的药效学实验中, ACGs-NSPs 表现出剂量相关性的抑瘤作用, 高、中、低剂量组(0.4、0.2、0.1 mg/kg)抑瘤率分别为 76.09%、74.34%、42.03%; 但高剂量组小鼠有死亡(3/10)。结论 成功制备高载药量的 ACGs-NSPs, 且其对 4T1 乳腺癌有显著的抑制作用; 从药效和小鼠存活率来看, 0.2 mg/kg 为合适的给药剂量。

关键词: 番荔枝素; 纳米混悬剂; 药效学; 乳腺癌; 4T1 细胞

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2016)06-0966-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.06.010

Preparation of annonaceous acetogenins nanosuspensions and their antitumor effect

SU Wen-jing^{1,2}, XIAO Yao³, ZHANG Ming-zhu¹, HONG Jing-yi², JI Yu-bin¹, WANG Xiang-tao²

1. Life Sciences and Environmental Sciences Center, Harbin university of commerce, Harbin 150076, China

2. Peking Union Medical College, The Lab. of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Institute of Medicinal Plant Development, Beijing 100193, China

3. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To prepare annonaceous acetogenins (ACGs) nanosuspensions (ACGs-NSps) with high drug loading capacity and to study their anticancer efficacy on 4T1 breast cancer-bearing mice *in vivo*, so as to provide a suitable dosage form for the potent antitumor agent ACGs. **Methods** ACGs nanosuspensions were successfully prepared with ACGs, TPGS, and SPC (weight ratio of 7:5:2) using ultrasound-precipitation method. The particle size of ACGs nanosuspension was measured by dynamic light scattering method (DLS) and their morphology was observed by transmission electron microscope (TEM); The hemolysis of resultant ACGs-NSps was assessed; The *in vitro* drug release was evaluated using dialysis method; The *in vitro* cytotoxicity of ACGs solution and ACGs nanosuspensions against a breast cancer cell line (4T1 cells) were performed using MTT assay; The *in vivo* antitumor efficacy of ACGs-NSps was investigated on 4T1 breast cancer model using paclitaxel (PTX) as a positive control group. **Results** ACGs nanosuspensions were spherical with smooth surface and the average particle size of (129.03 ± 1.03) nm. The polydispersity

收稿日期: 2016-06-21

基金项目: 国家自然科学基金委(U1401223, 81460734)

作者简介: 苏文晶(1992—), 女, 黑龙江齐齐哈尔人, 硕士研究生, 专业方向为药剂学。Tel: 18045655226 E-mail: 13936453685@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

index (PDI) is (0.134 ± 0.03) , and Zeta potential was (-17.7 ± 0.16) mV, ACGs linear regression equation was $Y = 0.1572X - 0.3632$ ($R^2 = 0.999$) measured by HPLC, dominant good relations within 5 — 200 $\mu\text{g/mL}$, and the average drug loading was $(40.67 \pm 2.45)\%$. ACGs-NSPs showed sustained *in vitro* release with no burst effect. In MTT test, ACGs-NSPs displayed significantly higher cytotoxicity against 4T1 breast cancer cells than free drug (IC_{50} of 3.221 $\mu\text{g/mL}$ vs 4.464 $\mu\text{g/mL}$, $P < 0.05$). According to the results of pharmacodynamics experiment on 4T1 breast cancer-bearing mice, ACGs-NSPs demonstrated a dose-dependent tumor inhibitory effect (76.09% for 0.4 mg/kg, 74.34% for 0.2 mg/kg, and 42.03% for 0.1 mg/kg, respectively). But there were three mice (3/10) died in the high dose group. **Conclusion** ACGs-NSPs with high drug loading capacity are successfully prepared and show significant suppression against 4T1 breast cancer *in vitro* and *in vivo*. Judging from the *in vivo* antitumor efficacy and survival rate of mice, the dose of 0.2 mg/kg (iv administration) is recommended for the further *in vivo* study.

Key words: annonaceous acetogenins; nanosuspensions; pharmacodynamics; breast cancer; 4T1 cells

番荔枝 *Annona squamosa* 为番荔枝科 (*Annonaceae*) 番荔枝属植物, 原产美洲, 为热带和亚热带地区著名水果, 其果外形酷似荔枝^[1]。番荔枝素 (annonaceous acetogenins, ACGs) 是番荔枝植物 (主要是种子中) 所含的强效抗肿瘤活性成分^[2], 曾被喻为“明日抗癌之星”^[3-5]。ACGs 具有广谱抗肿瘤活性, 在人肝癌细胞、人乳腺癌、鼠淋巴瘤细胞、人胰腺癌、人肺癌等多种癌症都有较好的生长抑制作用^[6-9]。其机制可能与抑制线粒体呼吸链传递, 使细胞产生的能量受阻, 从而杀死肿瘤细胞有关^[10-11]。在化学结构上, ACGs 是一类含有四氢呋喃环 (THF) 的长碳链脂肪内酯类化合物, 其基本化学结构为 35~37 个碳原子构成的化学骨架^[12], Bullatacin 是 ACGs 中含量较高的一个药效成分 (图 1)。ACGs 脂溶性强, 没有特征紫外吸收, 加之所含成分复杂, 使得含量测定非常困难。ACGs 水溶性差 (25℃在水中的溶解度 $< 1 \mu\text{g/mL}$), 难于给药。抗肿瘤活性筛选中可以用 DMSO 溶解后以培养基稀释给药^[13], 但体内研究中以油溶液口服给药居多^[14], 尚未见有适合静脉注射给药的剂型。本文尝试将 ACGs 制备成纳米混悬剂, 在解决 ACGs 难溶难给药的基础上, 期望借助于肿瘤组织对纳米粒的高通透性和滞留效应 (EPR) 提高药效、降低剂量和副作用。

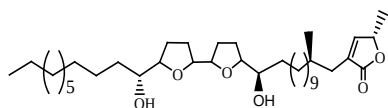


图 1 Bullatacin 化学结构

Fig.1 Chemical structure of Bullatacin

1 仪器和材料

KQ3200DB 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 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); LGJ-10B 冷冻干燥机 (北京四环科学仪器厂有限公司); RJ-TGL-16C 型高速台式离心机 (无锡市瑞江分析仪器有限公司); Meppler Toledo AL204 电子天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司); S-4800 型扫描电子显微镜 (日本 Hitachi 公司); SHA-B 水浴恒温振荡器 (金坛国旺实验仪器厂); UltiMate 3000 高效液相色谱仪 (美国 DIONEX 仪器公司); JEM-1200-EX 透射电子显微镜 (日本电子株式会社); Hel-VAP 旋转蒸发仪 (Heidolph 公司); Biotek 酶联免疫检测仪 (美国伯腾仪器公司); Spectra/Por Float-A-Lyzer 透析管 (美国 Spectrum 公司)。

ACGs (中国医学科学院药用植物研究所斯建勇教授提取分离, 批号 20160112), 经 HPLC 检测其中 5 个主要成分 K20、GK23、K437、Bullatacin、K16 的质量分数分别为 3.470%、1.593%、7.729%、37.387%、8.984%, ACGs 总质量分数为 59.163%; TPGS (西安海斯夫生物科技有限公司, 批号 20151203); SPC (广州白云山汉方现代药业有限公司, 批号 A4140170); 紫杉醇注射液 (北京协和药厂, 国药准字 H10980069); 番荔枝素纳米混悬剂 (ACGs-NSPs, 自制); 乙腈、甲醇 (赛默飞世尔科技有限公司) 为色谱纯, 其余均为分析纯。

健康 Balb/c 小鼠, 雌性, 18~20 g, 北京斯贝福实验动物有限公司, SPF 级, 许可证编号: SCXK(京) 2016-0002。4T1 乳腺癌细胞株 (北京协和医学院基础所细胞中心); RPMI1640 培养基 (美国 Hyclone 公司); 胎牛血清、青霉素和链霉素双抗 (美国 Gibco 公司); 96 孔无菌培养板 (美国 Corning 公司)。

2 方法与结果

2.1 ACGs-NSPs 的制备

研究发现, 单独使用 TPGS 为稳定剂时, 制备

的 ACGs-NSPs 具有很强的溶血性。因 TPGS 本身并不溶血,分析认为溶血性主要来源于 ACGs 本身。之后以 TPGS 为基础,对方进行了摸索,结果发现加入适量大豆卵磷脂 SPC,能在一定程度上降低纳米混悬剂的溶血性。增加 SPC 用量,溶血性降低,但粒径有较大增加,综合考虑和比较,ACGs:TPGS:SPC (质量比 7:5:2) 比例制备的 ACGs-NSPs 粒径较小,同时溶血性能满足小鼠体内研究的需要,故选用这个处方制备 ACGs-NSPs。将 ACGs 7 mg 和 TPGS 5 mg、SPC 2 mg (7:5:2) 溶于 0.30 mL 甲醇中,在超声 (25 °C、250 W) 条件下,匀速缓慢注入到 7 mL 去离子水中,37 °C 减压旋转蒸发除去甲醇,补充去离子水至 7 mL,即得 ACGs-NSPs (1 mg/mL)。

2.2 ACGs-NSPs 粒径测定及 TEM 观察

制备的 ACGs-NSPs 用 Zetasizer nano ZS 型电位仪测定纳米混悬剂的粒径、粒度分布和表面电位。将 ACGs-NSPs (1 mg/mL) 用去离子水稀释到质量浓度为 0.10 mg/mL,取 6 μ L 滴到 300 目的铜网上,静置 5 min,滤纸吸干液体,室温静置 10 min 后,滴加 6 μ L 1%醋酸铀染色 90 s 后滤纸吸干液体,室温下自然晾干,透射电镜下观察纳米粒子的形态和大小。

Zetasizer nano ZS 型电位仪测定 ACGs-NSPs 平均粒径为 (129.03 ± 1.03) nm, PDI 为 0.134 ± 0.03 , zeta 为 (-17.7 ± 0.16) mV, 粒径分布如图 2。TEM 照片显示纳米混悬剂呈现球形,大小较均匀(图 3)。

2.3 ACGs-NSPs 不同介质稳定性考察

配制 2×PBS 溶液 (pH 7.4)、1.8%的氯化钠溶液、10%的葡萄糖溶液,各取 0.5 mL 加入等体积的 ACGs-NSPs 混匀,得到等渗的 ACGs-NSPs 的 PBS、

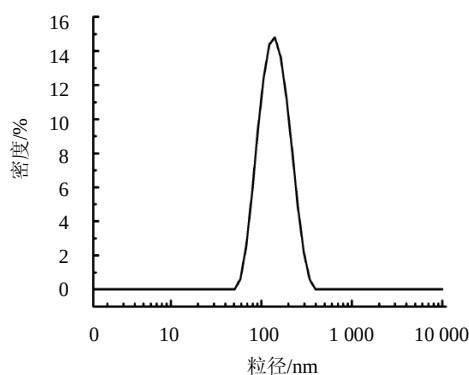


图 2 ACGs-NSPs 的粒径分布图

Fig.2 Particle size distribution of ACGs-NSPs

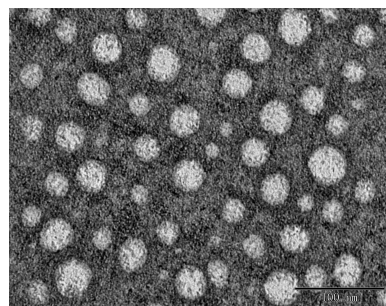


图 3 ACGs-NSPs TEM 照片

Fig.3 Transmission electron microscope images of ACGs-NSPs

0.9%氯化钠、5%葡萄糖悬浮液,37.0 °C 恒温孵育,分别在 0、1、3、5、12 h 取样,Zetasizer nano ZS 型粒度仪测定粒径并记录其粒径变化情况。

ACGs-NSPs 在 0.9%生理盐水、5%葡萄糖溶液、pH7.4 的 PBS 溶液中较稳定,其粒径均在 30 nm 内变化,说明 ACGs-NSPs 稳定性良好,可使用以上 3 种注射溶媒的任意一种调节至等渗后进行静脉注射;常温下放置 7 d 后粒径无显著变化,较为稳定。

2.4 ACGs-NSPs 红细胞膜毒性实验

取不同浓度的 ACGs-NSPs 1 mL,调等渗后分别加入等体积的 4%红细胞悬液,使其终质量浓度为 500、250、125、62.5、40 μ g/mL,37 °C 孵育 4 h,5 000 r/min 离心 5 min,取上清,酶联免疫检测仪 540 nm 测吸光度 (A) 值,计算溶血率。

$$\text{溶血率} = (A_1 - A_2 - A_4) / (A_3 - A_4)$$

其中 A_1 为 ACGs-NSPs 与等体积 4%红细胞悬液混合的吸光度值, A_2 为 ACGs-NSPs 与等体积去离子水混合的吸光度值, A_3 为 4%红细胞悬液与等体积去离子水混合的吸光度值, A_4 为 4%红细胞悬液与等体积生理盐水混合的吸光度值。

溶血性试验(表 1)显示,单独使用 TPGS 时,制备的 ACGs-NSPs 溶血,处方中加入适量大豆卵磷脂 SPC,如在 ACGs:TPGS:SPC (质量比 7:5:2) 比例下,制备的 ACGs-NSPs 能兼顾较小的粒径和可接受的溶血性。此时,在 ACGs 浓度不高于 40 μ g/mL 时,纳米混悬剂不显示溶血性,故将 40 μ g/mL 设为 ACGs-NSPs 静脉注射最高浓度。见表 1。为尽快获知 ACGs-NSPs 在抗肿瘤方面的体内外表现,暂时未在 ACGs-NSPs 溶血性改善方面做进一步探讨。如果随后的研究证明 ACGs-NSPs 在抗肿瘤方面表现突出,再行开展相关研究。

表1 ACGs-NSPs 不同浓度的溶血率
Table 1 Hemolysis rates of ACGs-NSPs in different concentration

$C_{\text{ACGs-NSPs}}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	溶血率/%			
	SPC 0 mg	SPC 1 mg	SPC 2 mg	SPC 3 mg
500	82.3	68.3	68.3	61.9
250	66.9	58.5	53.2	48.3
125	58.8	43.3	36.7	28.1
62.5	33.4	24.0	6.0	7.8
40	21.7	7.2	4.6	0.0

2.5 载药量的测定

精密称取 ACGs 样品 2 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解, 定容至刻度摇匀, 得到浓度 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 ACGs 储备液。用色谱甲醇稀释成浓度分别为 100、50、25、10、5、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列标准液。色谱柱 Princeton SPHER-100 C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水梯度洗脱 (70:30) 0~45 min; (65:35) 46~55 min; (70:30) 56~60 min), 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长 210 nm, 进样量 20 μL 。

ACGs 为含有多种成分的混合物, 除几个主要成分外, 还含有若干低含量的成分, 故难以用 HPLC 对 ACGs 进行准确的定量分析。Bullatacin 是 ACGs 中含量较高的一个药效成分, 本研究拟以 Bullatacin 为指标性成分, 通过对 Bullatacin 的定量分析来衡量 ACGs-NSPs 的载药量和进行体外释放等。将 ACGs 标准溶液以 HPLC 进行分析, 记录其指标成分 Bullatacin 的峰面积, 以药物峰面积 Y 对药物浓度 X 进行线性回归得标准曲线方程。

取 5 mL ACGs-NSPs 将其冻干后, 精确称质量,

加入适量乙腈溶解破坏纳米混悬剂使药物释放出来, HPLC 法测定载入纳米混悬剂内的药物含量, 根据以下公式测定载药量 (drug loading, DL)。

$$\text{DL}(\%) = W_1/W_2$$

其中 W_1 为实测的 5 mL 纳米混悬剂中 ACGs 的质量, W_2 为制备 5 mL ACGs-NSPs 冻干后实测质量。

采用 HPLC 对 ACGs 进行含量测定, 记录指标成分 Bullatacin 的峰面积, 以峰面积 (Y) 对 ACGs 质量浓度 (X , $\mu\text{g}/\text{mL}$) 进行线性回归, 得到 ACGs 标准曲线为 $Y=0.157\ 72\ X-0.363\ 2$, $R^2=0.999$, 线性范围 5~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 其载药量为 $(45.03\pm0.72)\%$ 。

2.6 体外释放

取 4 mL ACGs-NSPs (1 mg/mL), 加到即用型透析管 (MWCO 相对分子质量为 8 000~10 000) 中, 平行 3 份, 以 PBS 溶液 (pH 7.4) 为释放外液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 100 r/min 磁力搅拌条件下考查药物释放情况 (每隔 24 h 更换一次释放外液), 于不同时间点取 40 μL 释放内液, 加入 360 μL 甲醇混匀, 13 000 r/min 离心 20 min 取上清, HPLC 同 2.5 中的方法测定番荔枝素含量, 计算累积释放百分比。

ACGs-NSPs 在 pH 7.4 的 PBS 溶液中 192 h 累计释放百分比达 95% 左右, 4 h 内累积释放为 20% 左右, 如图 4 (A、B), 图 4-B 显示 ACGs-NSPs 并无明显突释现象, 可能是吸附在纳米粒表面的药物较少, 图 4-A 看出药物从纳米粒中释放缓慢, 具有一定缓释作用, 有利于维持体内药物浓度^[15]。

2.7 ACGs-NSPs 对 4T1 细胞的抑制率

4T1 细胞用 1640 培养基 (含 10% 胎牛血清、100 U/mL 的青霉素、链霉素) 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中培养, 细胞增长到对数生长期时用胰酶消

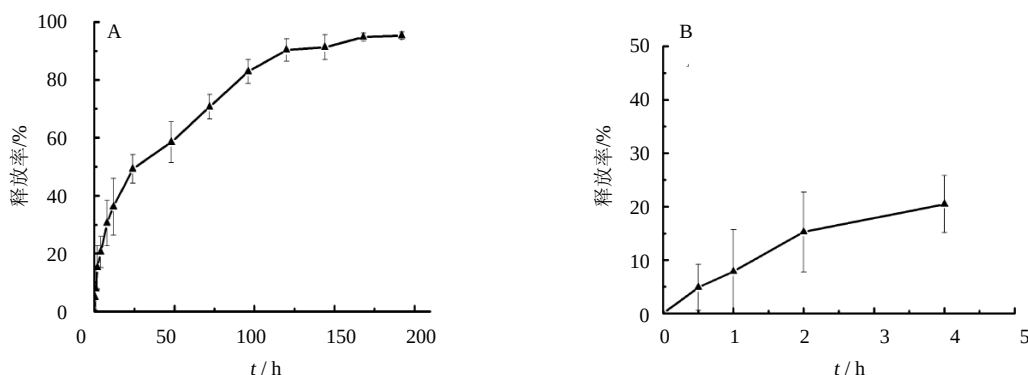


图4 ACGs-NSPs 释放曲线 ($n=3$)
Fig.4 Release curves of ACGs-NSPs ($n=3$)

化, 加入培养基悬浮细胞, 以每孔 10^4 个左右接种于 96 孔板中, 37°C 、5% CO_2 条件下培养。24 h 后弃去培养基, 将 ACGs-NSPs 与其 DMSO 溶液用培养基 (含 100 U/mL 的青霉素、链霉素) 稀释至药物质量浓度为 0.05、0.125、0.25、0.5、0.75、1.25、2.5、5、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后加入到 96 孔板中。每个质量浓度 3 个复孔, 各 150 μL , 以含 100 U/mL 的青霉素、链霉素的培养基为空白对照组。继续培养 24 h 后, 每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μL , 孵育 4 h。小心吸弃各孔上层液体, 加入 DMSO 150 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 置于微孔板振荡器上振荡 10 min, 使结晶物溶解。酶联免疫荧光仪检测 570 nm 下的吸光度值 (A), 计算细胞抑制率, 根据 GraphPad prism 软件计算半数抑制浓度 (IC_{50})。

$$\text{细胞抑制率} = (\text{A}_{\text{空白对照组}} - \text{A}_{\text{实验组}}) / \text{A}_{\text{空白对照组}}$$

以 ACGs 的 DMSO 溶液为对照, MTT 法检测 ACGs-NSPs 在不同浓度下的细胞毒性, 图 5 显示, 与 ACGs 的溶液相比, ACGs-NSPs 表现出更强的细

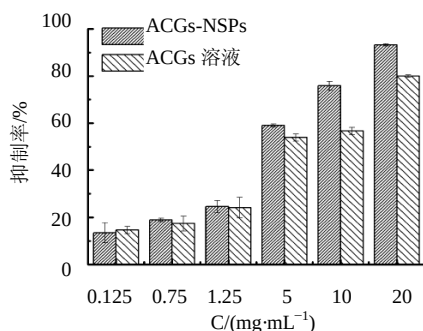
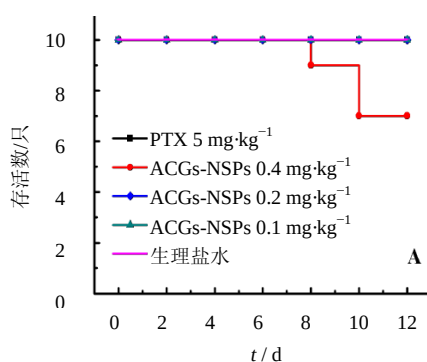


图5 ACGs-NSPs 和 ACGs 溶液对 4T1 细胞的抑制率 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 5 4T1 cell inhibition rate of ACGs-NSPs and DMSO solutions ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



胞毒性, 并随着浓度增加, ACGs-NSPs 对 4T1 的细胞毒性表现出剂量依赖性。

GraphPad Prism5.0 软件计算 ACGs-NSPs 和溶液对 4T1 细胞的 IC_{50} 值分别为 3.221 和 4.464 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 根据 SPSS 软件比较两组之间显著性差异 ($P < 0.05$), 说明 ACGs-NSPs 抑瘤效果显著强于溶液组, 可能是纳米粒能够通过非特异性内吞作用或吞噬作用内化入胞, 使其抑瘤作用增强^[16]。

2.8 ACGs-NSPs 的药效学实验

体外培养的 4T1 乳腺癌细胞用 1640 培养基配成细胞悬液, 细胞密度为 5×10^6 个/mL, 取 0.2 mL 接种于雌性 Balb/c 小鼠右前肢腋下, 7 d 后肿瘤长至 100 mm^3 左右开始实验。筛选肿瘤大小相对一致的荷瘤小鼠, 随机分为 5 组, 每组 10 只: 阴性对照组 iv 给予生理盐水 0.2 mL, 阳性对照组 iv 给予 PTX 注射液 5 mg/kg ^[16], ACGs-NSPs 高、中、低剂量组分别 iv 0.4、0.2、0.1 mg/kg 的 ACGs-NSPs。各组每 2 天给药 1 次, 实验过程中每天称量动物体质量变化, 观察小鼠活动情况并记录小鼠死亡情况。末次给药后处死小鼠, 完整剥离腋窝皮下转移瘤体, 称量质量, 计算抑瘤率。

$$\text{抑瘤率} = (1 - \text{给药组平均瘤质量} / \text{对照组平均瘤质量})$$

4T1 荷瘤小鼠在给药期间体质量变化曲线见图 6-B, 生理盐水组体质量呈上升趋势, 高剂量 ACGs-NSPs 组体质量有降低趋势, 中、低剂量和阳性对照组增长速率相对缓慢。整个实验过程中 (图 6A), 高剂量组在给药第 8 天死亡 1 只, 第 10 天死亡 2 只, 同时高剂量 ACGs-NSPs 组小鼠出现炸毛、瘦小的现象, 提示高剂量的 ACGs-NSPs 具有较大毒副作用。

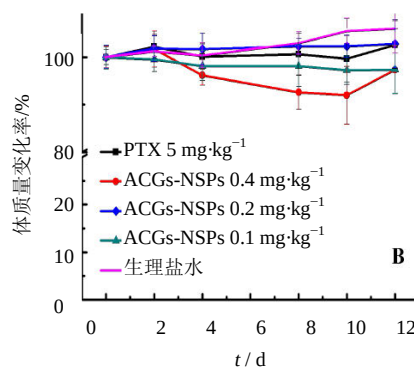


图6 给药后各组小鼠存活 (A) 及体质量 (B) 变化曲线 ($n=10$)

Fig. 6 Mortality curves (A) and relative body weight changes (B) of mice after iv administration with saline, PTX injection, and ACGs-NSPs ($n=10$)

各实验组对 4T1 荷瘤小鼠的抑瘤率结果见表 2, 与阴性对照组相比, ACGs-NSPs 高、中和低剂量组与紫杉醇组的抑瘤作用差异极显著 ($P<0.01$), 抑瘤率分别为 76.09%、74.34%、42.03%、61.17%。ACGs-NSPs 高、中剂量组的抑瘤率显著高于与阳性药紫杉醇注射液 ($P<0.05$), 而给药剂量却较紫杉醇注射液低一个数量级, 提示 ACGs 可能是比紫杉醇更强的抗肿瘤药物, 具有很好的进一步开发前景。从小鼠体质量、实验期间死亡率和抑瘤率三个方面综合考虑, 认为 0.2 mg/kg 的静脉注射剂量可用于 ACGs-NSPs 进一步抗肿瘤研究的合适剂量。

表 2 ACGs-NSPs 对 4T1 小鼠的抑瘤率 ($n=10$)

Table 2 Inhibitory rate of ACGs-NSPs in 4T1 tumor-bearing mice ($n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	瘤质量/g	抑瘤率/%
阴性对照	—	2.76±0.15	—
紫杉醇注射液	5	1.07±0.26 ^{###}	61.17
ACGs-NSPs	0.4	0.66±0.10 ^{###}	76.09*
	0.2	0.71±0.17 ^{###}	74.34*
	0.1	1.60±0.19 ^{###}	42.03**

与阴性对照组比较: ^{###} $P<0.01$; 与紫杉醇组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

^{###} $P<0.01$ vs negative control group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs PTX group

2.9 统计学分析

数据采用 SPSS17.0 统计软件处理, 实验数据均由 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析。

3 讨论

ACGs 为黏稠状半固体状态, 脂溶性强, 不溶于水 (25℃在水中的溶解度 $<1 \mu\text{g/mL}$), 以及其溶血性均限制其给药途径, 本实验以 TPGS、SPC 为载体, 超声-沉淀法成功制备 ACGs-NSPs, 初步解决了 ACGs 的难于给药的问题。TPGS 是维生素 E 的水溶性衍生物, 是一种性能优良的非离子型表面活性剂, 可显著提高纳米制剂的包封率^[15-16]。近年来的研究发现, TPGS 具有 P-gp 抑制作用, 可有效地克服肿瘤多药耐药并提高抗肿瘤药物的疗效, 已广泛应用于抗肿瘤药物的递送系统中^[17-18]。本研究尝试用 TPGS 做稳定剂, 成功制备了粒径小 (平均粒径为 $(129.03 \pm 1.03) \text{nm}$, 多分散指数 PDI 为 0.134 ± 0.03 、稳定性良好、载药量达 $(45.03 \pm 0.72) \%$ 的纳米混悬剂, 制备的 ACGs-NSPs 呈现表面光滑的球形。由于 TPGS 具有潜在的逆转多药耐药功能, 所制备的 ACGs-NSPs 有望对耐药性瘤株也能发挥作用。这也是本研究以 TPGS 为主要稳定剂制备

ACGs-NSPs 的原因。

但研究过程中意外发现, 制备的 ACGs-NSPs 其具有较强的溶血性, 静脉注射会带来隐患。在排除 TPGS 带来溶血性之后, 从 SPC 为载体制备的 ACGs 脂质体不会溶血推断, SPC 有可能改善 ACGs-TPGS 纳米混悬剂的溶血性, 通过实验证实这一方法可行, 并最终确定制备纳米混悬剂处方比例为 ACGs:TPGS:SPC (7:5:2)。但 SPC 改善 ACGs-TPGS 纳米混悬剂溶血性的机制有待于进一步探讨。

ACGs-NSPs 在 PH 7.4 的 PBS 溶液中 192 h 累计释放百分比达 95%左右, 并无明显突释现象, 4 h 内虽无突释现象, 但释放速率也相对较快, 可能由于吸附在纳米混悬剂表面的药物在释放介质中迅速溶解所导致。ACGs-NSPs 总体上释放缓慢, 也说明了纳米混悬剂具有一定的缓释作用, 有利于维持体内药物浓度, 增强药效。

通过 MTT 实验结果看出, ACGs-NSPs 对 4T1 细胞毒性表现出浓度相关性, 且抑瘤效果显著强于其 DMSO 溶液组 ($P<0.05$), 这可能是由 ACGs-NSPs 通过细胞内吞作用进入细胞内, Dintaman 等^[19]研究表明 TPGS 是一个有效的 P-gp 介导的药物耐药和转运的抑制剂, 大幅度增加癌细胞对药物的摄取, 而细胞膜表面的 P-gp 对番茄素的 DMSO 溶液外排, 所以 ACGs-NSPs 有更强的抑瘤效果。

从实验过程中各组动物体质量变化和抑瘤率来看, ACGs-NSPs 高剂量组体质量明显下降且死亡率较高 (3/10), 可能由于剂量偏高带来的毒副作用所致, 而中剂量组小鼠状态良好, 体质量变化正常, 无死亡现象, 且抑瘤率 (74.34%) 与高剂量组 (76.09%) 无显著性差异, 故以后将以 ACGs-NSPs 中剂量为基础进行进一步的抗肿瘤研究。根据文献报道可知 ACGs 可以逆转多药耐药性, 同时 TPGS 也可以逆转 ADR 效应, 接下来尝试耐药性细胞株进行实验, 以期其更多的治疗效果, 为肿瘤药物的发展提供更好的应用价值。

参考文献

- [1] 孙丽蕊, 朱虹, 甘礼社, 等. 番荔枝皮化学成分及其抗肿瘤活性的研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(14): 2100-2103.
- [2] 孙兰, 余竞光, 李德宇. HPLC 法测定番荔枝科植物中番茄素含量 [J]. 药学学报, 2001, 36(9): 683-685

- [3] 姚祝军, 吴毓林. 番荔枝内酯-明日抗癌之星[J]. 有机化学, 1995, 15(2): 120-132.
- [4] 韩金玉, 于良涛, 王 华. 泡番荔枝辛-明日抗癌之星[J]. 中草药, 2002, 33(4): 380-382.
- [5] 李艳芳, 符立梧. 番荔枝内酯抗肿瘤作用研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2004, 20(3): 245-247.
- [6] Kuwabara K, Takada M, Iwata J, *et al.* Design syntheses and mitochondrial complex I inhibitory activity of novel acetogenin mimics [J]. *Eur J Biochem*, 2000, 267(9): 2538-2546.
- [7] Chang F R, Liaw C C, Lin C Y, *et al.* New adjacent Bis-tetrahydrofuran Annonaceous acetogenins from *Annona muricata* [J]. *Planta Med*, 2003, 69(3): 241-246.
- [8] Yuan S S, Chang H L, Chen H W, *et al.* Annonacin, amono-tetrahydrofuran acetogenin, arrests cancer cells at the G1 phase and causes cytotoxicity in a Bax-and caspase-3 related pathway [J]. *Life Sci*, 2003, 72(25): 2853-2861.
- [9] Kim E J, Suh K M, Kim D H, *et al.* Asimitrin and 4-hydroxytrilobin, new bioactive annonaceous acetogenins from the Seeds of *Asimina triloba* possessing a bis-tetrahydrofuran ring [J]. *J Nat Prod*, 2005, 68(2): 194-197.
- [10] Morre D J, Cabo R, Farley C, *et al.* Mode of action of bullatacin, a potent antitumor acegotenin: inhibition of NADH oxidase activity of Hela and HL-60, but not liver, plasma membranes [J]. *Life Sci*, 1995, 56: 343-348.
- [11] 程春旭, 高颜茹. 抗肿瘤药物作用机制的研究进展 [J]. 吉林医学, 2009, 30(23): 3080-3083.
- [12] 袁 斐, 白钢钢, 苗筠杰. 番荔枝内酯类化合物对耐阿霉素乳腺癌细胞 MCF-7/ADR 体外活性的影响 [J]. 中草药, 2014, 45(19): 2815-2819.
- [13] 黄银久, 宋宝安, 金林红. SRB 法和 MTT 法抗肿瘤药物筛选结果相关性研究 [J]. 生物学杂志, 2009, 26(4): 13-16.
- [14] 徐莎莎, 李 祥, 陈建伟, 等. 番荔枝内酯滴丸制剂工艺及其含量测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18: 16-19.
- [15] 郭静静, 李仙义, 袁海龙, 等. 波棱甲素纳米混悬剂胶囊的制备及体外溶出度测定 [J]. 中草药, 2012, 43(3): 467-470.
- [16] 武 娜, 张利红, 程 玲, 等. 金丝桃苷固体纳米晶体的制备及其体外释放研究 [J]. 中草药, 2015, 46(12): 1759-1763.
- [17] 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.
- [18] Guo Y, Luo J, Tan S, *et al.* The applacations of vitamin E TPGS in drug delivery [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2013, 49(2): 175-186.
- [19] Dintaman J M, Silverman J A. Inhibition of P-glycoprotein by D-alpha- tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS) [J]. *Pharm Res*, 1999, 16(10): 1550-1556.