

甘草次酸修饰马钱子碱纳米给药系统的体内外肝靶向性评价

李 鞠¹, 夏昭睿², 于 欣², 管庆霞^{2*}, 赵金椽^{3*}

1. 河北廊坊市中医医院, 河北 廊坊 065000

2. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040

3. 哈尔滨商业大学, 黑龙江 哈尔滨 150076

摘要: 目的 制备甘草次酸(GA)修饰的马钱子碱(B)-聚乙二醇-二硫代二丙酸-单硬脂酸甘油酯(PSG)纳米粒(NPs)(B-GPSG-NPs)并评价其体内外肝靶向性。方法 采用溶剂乳化超声法制备B-GPSG-NPs和B-PSG-NPs,于透射电镜下观察其外观形态,测定其粒径、多分散性指数(PDI)、Zeta电位、包封率、载药量等理化性质。建立检测心、肝、脾、肺、肾、脑组织中马钱子碱含量的高效液相色谱法。将雌雄各半的小鼠90只随机分为3组:马钱子碱组、B-PSG-NPs组、B-GPSG-NPs组,禁食不禁水12 h后,尾iv相应溶液(以马钱子碱计 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),分别于给药后10、30、60、120、180 min取各组织进行HPLC检测,计算相对摄取率(Re)和靶向效率(Te),以评价给药系统的体内靶向性。制备载异硫氰基荧光素(FITC)的FITC-B-PSG-NPs、FITC-B-GPSG-NPs, FITC、空白PSG载体制成的纳米粒(PSG-NPs)、空白GPSG载体制成的纳米粒(GPSG-NPs)以及含马钱子碱质量浓度分别为500、250、125 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的FITC-B-PSG-NPs和FITC-B-GPSG-NPs与CBRH-7919肝癌细胞共培养24 h,荧光显微镜下观察CBRH-7919细胞对各受试物的摄取情况,以评价给药系统的体外靶向性。结果 B-GPSG-NPs的粒径为(98.91 ± 3.62) nm,呈正态分布;PDI值为(0.221 ± 0.006),Zeta电位为(-19.63 ± 0.40) mV,包封率为(78.37 ± 1.83)%,载药量为(2.86 ± 0.05)%;B-PSG-NPs与B-GPSG-NPs组肝脏的Re分别为1.49和1.72,明显高于其他组织;马钱子碱组肾脏Te最高,脑Te最低,而B-PSG-NPs和B-GPSG-NPs组肝脏中马钱子碱的Te明显高于其他各组织;CBRH-7919细胞摄取B-GPSG-NPs效率明显高于B-PSG-NPs,并表现出剂量相关性。结论 制备的B-GPSG-NPs在体内外均表现出良好的肝靶向效应,且优于无GA修饰的B-PSG-NPs。

关键词: 甘草次酸; 马钱子碱; 纳米载体; 靶向性评价; 细胞摄取; 肝癌

中图分类号: R943 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)12-2478-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.12.011

In vivo and *in vitro* hepatic targeting evaluation of brucine nano-drug delivery system modified by glycyrrhetic acid

LI Ju¹, XIA Zhaorui², YU Xin², GUAN Qingxia², ZHAO Jinchuan³

1. Langfang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Langfang 065000, China

2. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

3. Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

Abstract: Objective To prepare the glycyrrhetic acid (GA) modified brucine (B)-polyethylene glycol-dithiodipropionic acid-monostearate (PSG) nanoparticles (NPs) (B-GPSG-NPs) and evaluate its hepatic targeting property *in vivo* and *in vitro*. **Methods** B-GPSG-NPs and B-PSG-NPs were prepared by solvoemulsification ultrasonic method. Their appearance was observed under transmission electron microscope, and their physical and chemical properties such as particle size, polydispersity index (PDI), Zeta potential, encapsulation rate and drug loading were determined. To establish a HPLC method for the determination of brucine in heart, liver, spleen, lung, kidney and brain. Ninety mice, half male and half female, were randomly divided into three groups: brucine group, B-PSG-NPs group and B-GPSG-NPs group, after fasting without water for 12 h, tail iv corresponding solution ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ by

收稿日期: 2022-05-11

基金项目: 黑龙江自然科学基金面上项目(H2016076);黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12531624);哈尔滨市应用技术与开发项目(青年后备人才A类,2017RAQXJ090)

第一作者: 李 鞠,主管中药师,研究方向为中药临床药学。E-mail: 18031607761@163.com

*共同通信作者: 赵金椽,博士,研究方向为中医药生物信息与新药开发。E-mail: 706061583@qq.com

管庆霞,博士,副教授,研究方向为中药纳米递药系统及中药新药开发。E-mail: 546105832@qq.com

brucine) was taken from each tissue at 10, 30, 60, 120 and 180 min after administration, respectively, for HPLC detection. Relative uptake rate (Re) and targeting efficiency (Te) were calculated to evaluate the *in vivo* targeting of the drug delivery system. FITC-B-PSG-NPs and FITC-B-GPSG-NPs containing isothiocyaniferin (FITC) were prepared. FITC, blank PSG carrier nanoparticles (PSG-NPs), blank GPSG carrier nanoparticles (GPSG-NPs) and FITC-B-PSG-NPs, FITC-B-GPSG-NPs whose brucine containing mass concentration were 500, 250 and 125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ were co-cultured with CBRH-7919 hepatocellular carcinoma cells for 24 h. The uptake of CBRH-7919 cells to each subject was observed under fluorescence microscope to evaluate the *in vitro* targeting of the drug delivery system. **Results** The particle size of B-GPSG-NPs was (98.91 ± 3.62) nm, and the distribution was normal. PDI value was (0.221 ± 0.006) , Zeta potential was $-(19.63 \pm 0.40)$ mV, encapsulation rate was $(78.37 \pm 1.83)\%$, drug loading was $(2.86 \pm 0.05)\%$. The Re of liver in B-PSG-NPs and B-GPSG-NPs groups was 1.49 and 1.72, respectively, which were significantly higher than those in other tissues. The highest Te in kidney and the lowest Te in brain were observed in brucine group, while the Te of brucine in liver in B-PSG-NPs and B-GPSG-NPs groups was significantly higher than that in other tissues. The uptake efficacy of the B-GPSG-NPs by CBRH-7919 cells was higher than that of the B-PSG-NPs, and exhibited dose dependence. **Conclusion** The prepared B-GPSG-NPs showed improved hepatic targeting efficacy both *in vivo* and *in vitro*, compared with the B-PSG-NPs unmodified by GA.

Key words: glycyrrhetic acid; brucine; nanocarriers; targeting evaluation; cellular uptake; liver cancer

近年来,肝癌的致死率在各大疾病中位列前茅,目前仍然缺乏有效的治疗方法。对肝癌的治疗不能仅依赖于手术,需要打破传统的研究思路,采用新的理念和思维模式进行深入研究,以此来强化肝癌治疗效果,因此越来越多的学者将目光转移至药物载体靶向治疗^[1-5]。靶向纳米粒以较小的体积进入人体内,并作用于相应的靶细胞而发挥作用。靶向药物能够比较精确地定位病变区域,使药物运送到各器官的效率增加,保证药物能够在病灶部位达到高度的积累,进而减少药物给机体带来的副作用。运用靶向药物载体进行治疗时,可以研发出具有不同治疗机制的药物,通过多重联合治疗来提高治疗效果^[6-9]。

研究发现肝细胞表面含有丰富的甘草次酸(GA)特异性结合位点,通过GA修饰载体能大大提高制剂的肝靶向性,并且GA本身具有一定的抗炎及抗癌作用,所以GA作为配体是研发肝癌靶向治疗药物的重要研究方向^[10-12]。马钱子碱为中药马钱子的主要活性和毒性成分,研究发现其具有抗肿瘤、抗炎、镇痛、刺激消化道等药理作用,并且还能影响神经系统^[13-15]。然而马钱子碱毒性大、水溶性差、生物利用度低等缺点限制了其在临床上的应用,通过药物载体靶向技术有望有效改善其临床适用性。本实验通过酰胺、酯化等方法将GA、聚乙二醇(PEG)以及二硫键进行合成,构建出的马钱子碱-GA-聚乙二醇-二硫代二丙酸-单硬脂酸甘油酯纳米粒(B-GPSG-NPs),并进行靶向性评价,为中药靶向制剂发展提供实践经验,推动中药临床应用的创新与突破。

1 材料

1.1 实验动物及细胞

清洁级昆明小鼠,体质量 (20 ± 2) g,2月龄,由

黑龙江中医药大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号SCXK(黑)2013-004。动物实验符合实验用动物保护法(条例86/609/EEC),并经黑龙江中医药大学实验动物伦理委员会许可,批准文号:20180921。

CBRH-7919肝癌细胞,购于上海联迈生物工程有限公司。

1.2 主要试剂

马钱子碱对照品,批号110706-200505,质量分数98%,中国食品药品检定研究院;参照已有方法^[16-17],自制GA-聚乙二醇-二硫代二丙酸-单硬脂酸甘油酯(GPSG)、聚乙二醇-二硫代二丙酸-单硬脂酸甘油酯(PSG);甲醇,色谱纯,北京DIKMA公司;泊洛沙姆188(F68),德国BASF公司;油酸,分析纯,天津市凯通化学试剂有限公司;卵磷脂,美国Cargill公司。

1.3 实验仪器

AB265-S分析电子天平,瑞士METTLER TOLEDO公司;Waters e2695-2698高效液相色谱仪系统,美国Waters公司;微型涡旋混合器,上海沪西分析仪器厂有限公司;氮吹仪氮气发生器,杭州德克尔实验设备有限公司;DF-101Z恒温磁力搅拌器,郑州长城科工贸有限公司;恒温细胞培养箱,北京诚茂兴业科技有限公司;多功能酶标仪,上海美谷分子仪器有限公司;DM0412E台式离心机,北京白洋医疗器械有限公司;高压灭菌锅,日本Hirayama公司;U-CTR30-2荧光倒置显微镜,德国徕卡。

2 方法与结果

2.1 马钱子碱纳米粒的制备

采用溶剂乳化超声法制备马钱子碱纳米粒。

称取PSG或GPSG 20.00 mg、油酸 40.00 mg、卵磷脂 16.00 mg、马钱子碱 2.04 mg, 5 mL 无水乙醇溶解, 65 °C 水浴加热, 磁力搅拌下加入马钱子碱, 作为有机相; 配制 0.12% 的 F68 水溶液 20 mL, 预热至 65 °C, 作为水相; 1 000 r·min⁻¹ 磁力搅拌条件下, 在水相中逐滴加入有机相, 超声 3 min (频率 20 kHz、功率 750 W), 磁力搅拌 40 min, 除去有机相, 即得 B-GPSG-NPs 或 B-PSG-NPs 溶液。将所制备 B-GPSG-NPs 经处理后放置于透射电镜下观察其外观形态, 并参照前期方法^[16]测定样品平均粒径及多分散性指数(PDI)、Zeta 电位、包封率及载药量, 每个样品平行测定 3 次。

B-GPSG-NPs 电镜观察结果见图 1, 各理化性质测定结果见图 2~4。结果显示, B-GPSG-NPs 的粒径为 (98.91±3.62) nm, 呈正态分布; PDI 值为 (0.221±0.006), Zeta 电位为 -(19.63±0.40) mV, 包封率为 (78.37±1.83)%, 载药量为 (2.86±0.05)%。

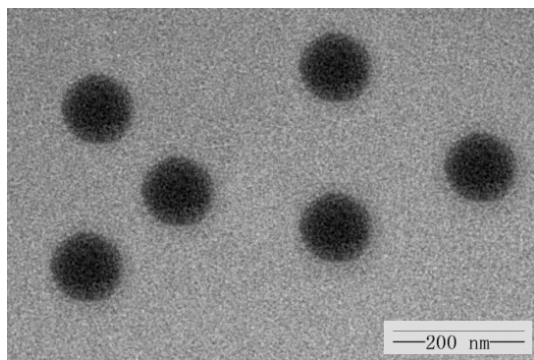


图1 B-GPSG-NPs透射电镜照片

Fig. 1 Picture of B-GPSG-NPs under transmission electron microscope

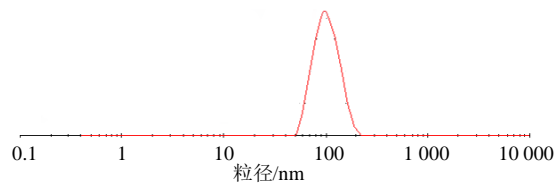


图2 粒径分布

Fig. 2 Particle size distribution

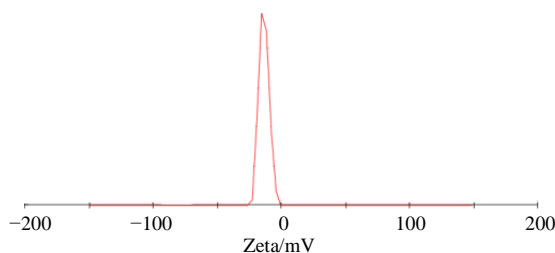


图3 Zeta 电位

Fig. 3 Zeta potential

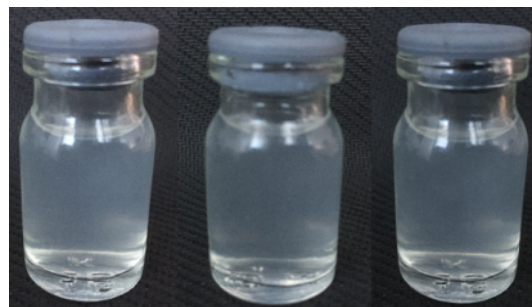


图4 B-GPSG-NPs外观

Fig. 4 Picture of B-GPSG-NPs

2.2 马钱子碱含量测定方法的建立

2.2.1 马钱子碱对照品溶液的制备 精密称取 2.6 mg 马钱子碱对照品, 加入到 25 mL 量瓶中, 加入甲醇定容, 此时溶液的质量浓度为 104 μg·mL⁻¹。

2.2.2 组织样品的处理 将小鼠各组织(心、肝、脾、肺、肾、脑)取出后, 分别用 0.9% 氯化钠溶液冲净, 滤纸吸干, 于离心管中加入 0.9% 氯化钠溶液制成 0.1 g·mL⁻¹ 匀浆, 置于高速匀浆机内, 粉碎匀浆, 转移至离心管中; 分别吸取 1 mL, 加入 1 mol·L⁻¹ 的氢氧化钠溶液 0.5 mL, 涡旋 3 min, 超声 15 min, 加入氯仿 2 mL, 涡旋 3 min, 超声 15 min, 10 000 r·min⁻¹ 离心 5 min; 吸取上层匀浆液进行二次萃取, 合并 2 次萃取液, 37 °C 氮气吹干, 滴加甲醇 1 mL, 用于沉淀蛋白, 离心 5 min, 取上清液置于 37 °C 氮气吹干, 用 200 μL 色谱甲醇溶解, 离心, 取上清液。

2.2.3 色谱条件 流动相为甲醇(A)-水-乙酸-三乙胺 (230.0: 2.4: 0.3) (B) 30: 70, 色谱柱为 Dikma C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 检测波长为 265 nm, 体积流量为 1 mL·min⁻¹, 进样量为 20 μL, 柱温为 30 °C。

2.2.4 马钱子碱的组织专属性考察 取“2.2.2”项下空白组织匀浆, 分为空白组与对照组, 另随机取尾 iv 马钱子碱的各组织匀浆为给药组, 对照组各组织混入马钱子碱对照品。按“2.2.3”项下色谱条件进样分析, 得到各组织色谱图。

各组色谱图见图 5。空白组无马钱子碱吸收峰, 而对照组与给药组均显示马钱子碱单一吸收峰, 表明组织的处理方法合适, 未引入干扰性物质, 且测定结果不受内源性物质的影响, 证明专属性符合要求。

2.2.5 方法的线性关系考察 配制马钱子碱质量浓度为 0.65、3.25、6.50、13.00、26.00、52.00 μg·mL⁻¹ 的系列对照品溶液, 各取 200 μL, 挥干溶剂, 加入 200 μL 不同组织的空白匀浆液, 制成各浓度组织

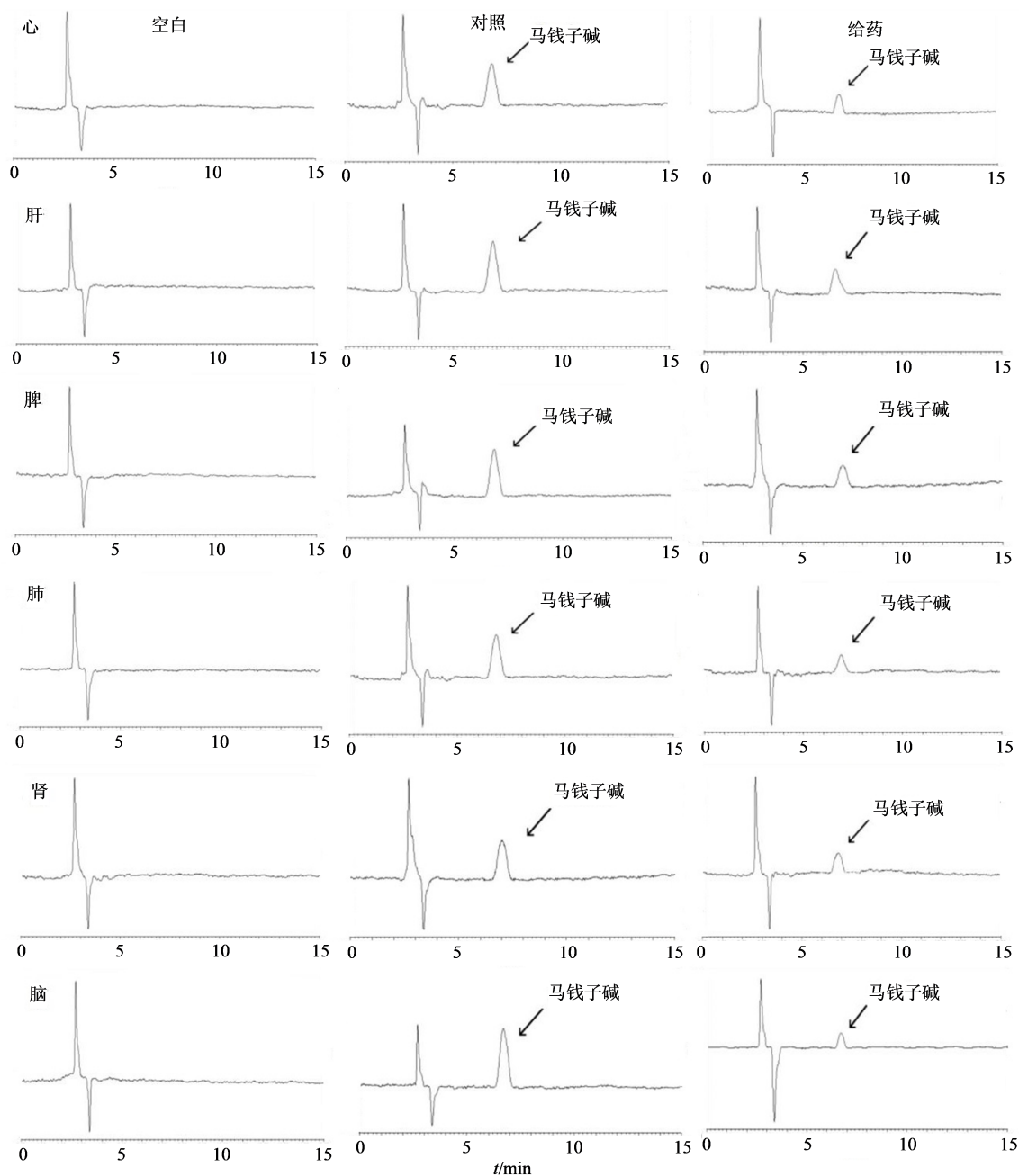


图5 各组马钱子碱色谱图

Fig. 5 Chromatograms of brucine in each administration group

样品,按“2.2.2”“2.2.3”项方法进行样品的处理和进样分析,记录峰面积,纵坐标为峰面积,横坐标为质量浓度,用加权最小二乘法进行线性回归运算。

线性回归方程结果见表1。结果显示,各线性方程 R^2 均大于0.99,表明在 $0.65\sim 52.00\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度内,马钱子碱的峰面积与质量浓度呈良好的线性关系。

2.2.6 方法的精密度考察 精密量取“2.2.5”项下质量浓度为高、中、低(52.00 、 13.00 、 $0.65\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的马钱子碱与各组织混合样品各 $200\ \mu\text{L}$,按“2.2.2”“2.2.3”项方法进行样品的处理和进样分

表1 马钱子碱在各组织内的标准曲线

Table 1 Standard curve of brucine in different organs

组织	回归方程	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	R^2
心	$Y=31\ 236 X-42\ 762$	$0.65\sim 52.00$	0.994 2
肝	$Y=32\ 532 X-47\ 965$	$0.65\sim 52.00$	0.996 8
脾	$Y=34\ 567 X-67\ 366$	$0.65\sim 52.00$	0.994 9
肺	$Y=36\ 482 X-52\ 749$	$0.65\sim 52.00$	0.995 3
肾	$Y=31\ 352 X-61\ 624$	$0.65\sim 52.00$	0.994 8
脑	$Y=34\ 167 X-89\ 766$	$0.65\sim 52.00$	0.993 7

析,记录峰面积。每日连续 6 次,计算日内精密密度;相同条件下连续操作 6 d,计算日间精密密度。另将马钱子碱对照品溶液不断稀释后进行分析,以测定其最低检测限和最低定量限。

日内与日间 RSD 均小于 4.88%,符合精密密度要求。所测最低检测限为 0.428 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,最低定量限为 0.650 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。可见该方法的灵敏度较高,能满足马钱子碱含量测定的要求。

2.2.7 方法的回收率考察 精密量取“2.2.5”项下 52.00、13.00、0.65 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的马钱子碱与各组织混合样品各 200 μL ,按“2.2.2”“2.2.3”项方法进行样品的处理和进样分析,记录峰面积。将提取的马钱子碱各组织样品的峰面积与所配标准溶液组织混合样品的峰面积相比得到提取回收率,将各浓度组织样品峰面积带入标准曲线计算浓度,与相应浓度比较得到方法回收率。

结果显示,提取回收率大于 78.25%,方法回收

率大于 87.37%,RSD<8.82%,表明提取比较完全,符合回收率要求。

2.2.8 样品稳定性考察 精密量取“2.2.5”项下 52.00、13.00、0.65 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 马钱子碱与各组织混合样品各 200 μL ,室温静置,于 6、12、24 h 取样,冷冻存储,间隔 1、2、3 周后取样,按“2.2.2”“2.2.3”项下方法进行样品的处理和进样分析,记录峰面积,计算 RSD。各组样品 RSD<10%,符合稳定性要求。

2.3 药物体内靶向性考察

2.3.1 分组与给药 将雌雄各半的小鼠 90 只随机分为 3 组:马钱子碱组、B-PSG-NPs 组、B-GPSG-NPs 组,禁食不禁水 12 h 后,尾 iv 相应溶液(以马钱子碱计 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),分别于给药后 10、30、60、120、180 min 取样,按“2.2.2”“2.2.3”项下方法进行组织样品的处理和进样分析,记录峰面积,计算马钱子碱在不同时间点的浓度。各组给药后不同时间点各组织中马钱子碱质量浓度见图 6。

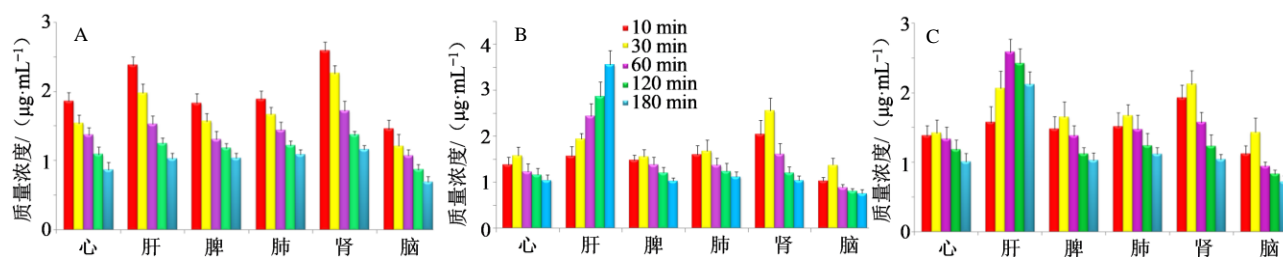


图 6 马钱子碱组(A)、B-PSG-NPs 组(B)、B-GPSG-NPs 组(C)马钱子碱在各组织内不同时间点的质量浓度($\bar{x}\pm s, n=6$)

Fig. 6 Mass concentration of brucine of brucine group (A), B-PSG-NPs group (B), B-GPSG-NPs group (C) in different organs at different time points ($\bar{x}\pm s, n=6$)

2.3.2 靶向性评价 给药系统的靶向性一般以相对摄取率(Re)和靶向效率(Te)来衡量^[18]。Re>1 表示药物制剂在该组织或器官具有一定靶向性,Re 越大,则靶向效果越好。Re≤1 则表示没有靶向性。Te 是指各器官的 AUC 与血浆 AUC 的比值,Te 表示待测物对靶器官的选择性,Te 越大选择性越强。

$$\text{Re} = \text{AUC}_{i \text{ 药物制剂}} / \text{AUC}_{i \text{ 原料药溶液}}$$

$$\text{Te} = \text{AUC}_{\text{器官}} / \text{AUC}_{\text{血浆}}$$

AUC_i表示由浓度-时间曲线求得的第 i 个器官或组织的药时曲线下面积

计算各组组织的 AUC, AUC_{血浆}来自本课题组前期研究^[19],代入公式计算出 Re 及 Te,结果(表 2)显示,B-PSG-NPs 与 B-GPSG-NPs 组肝脏的 Re 分别为 1.49 和 1.72,明显高于其他组织,表明肝脏对 B-PSG-NPs 和 B-GPSG-NPs 均具有相对其他组织较高的 Re,且 B-GPSG-NPs 的肝脏 Re 高于 B-PSG-NPs。通过对比各组的 Te 值发现,马钱子碱组肾脏 Te 最

表 2 各组组织 Re 与 Te

Table 2 Re and Te of tissues in each group

组 织	Re		Te		
	B-PSG- NPs	B-GPSG- NPs	马钱子 碱	B-PSG- NPs	B-GPSG- NPs
心	0.98	0.98	0.167	0.050	0.044
肝	1.49	1.72	0.199	0.092	0.091
脾	0.98	0.99	0.173	0.052	0.046
肺	0.98	0.97	0.183	0.055	0.047
肾	0.91	0.93	0.222	0.062	0.055
脑	0.98	0.97	0.127	0.039	0.033

高,脑 Te 最低;而 B-PSG-NPs 组与 B-GPSG-NPs 组肝脏 Te 明显高于其他各组织,表明肝脏对 B-PSG-NPs 和 B-GPSG-NPs 均具有相对其他组织的较高选择性,且对二者的选择性相当。

2.4 药物体外靶向性考察

2.4.1 载异硫氰基荧光素(FITC)纳米粒的制备

精密称取 PSG 或 GPSG 20.00 mg、油酸 40.00 mg、卵磷脂 16.00 mg、马钱子碱 2.04 mg、FITC 1.00 mg，并用 5 mL 无水乙醇溶解，65 °C 水浴加热，磁力搅拌下加入马钱子碱，作为有机相；1 000 r·min⁻¹ 磁力搅拌下，将有机相缓缓滴加至 0.12% 的 F68 水溶液中，滴毕立即超声（功率 750 W、频率 20 kHz）3 min，磁力搅拌 40 min，除去无水乙醇，即得 FITC-B-PSG-NPs 或 FITC-B-GPSG-NPs 混悬液。

2.4.2 药物的细胞摄取观察 将 CBRH-7919 肝癌细胞用培养液稀释成密度为 $1 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的悬液，并接种于 12 孔细胞培养板中，在含一定浓度的 CO₂ 无菌培养箱中培养 24 h，待细胞贴壁后，分为 FITC 组，空白 PSG 载体制成的纳米粒 (PSG-NPs) 组，GPSG-NPs 组，含马钱子碱质量浓度分别为 500、250、125 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 FITC-B-PSG-NPs 和 FITC-B-GPSG-NPs 组，共 9 组，药物处理细胞 24 h。实验前后用磷酸盐缓冲液 (PBS) 轻轻冲洗细胞表面 3 次，置于荧光显微镜下观察 CBRH-7919 细胞对各受试物的摄取情况。

结果如图 7 所示，FITC 组、PSG-NPs 组、GPSG-NPs 组未显现出荧光现象，其余各组（包载了 FITC 的纳米粒）均有荧光显现，说明 FITC 不能进入细胞内部，而 GPSG-NPs、PSG-NPs 本身无荧光效应，因此排除了游离 FITC、GPSG-NPs、PSG-NPs 对于荧光的干扰。细胞与 FITC-B-PSG-NPs 作用后可以观察到荧光，且呈现量效关系，500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组荧光强度最强。FITC-B-GPSG-NPs 组荧光强度比相同质量浓度的 FITC-B-PSG-NPs 均明显增加，也表现出量效关系。结果表明，B-GPSG-NPs 能够被 CBRH-7919 细胞摄取，且 GPSG 作为载体的体外靶向性明显优于 PSG 载体。

3 讨论

肝癌是人类生命健康的严重威胁之一，目前主要治疗手段为手术和化学疗法，而当前的化疗药物大部分理化性质差、稳定性低，并对正常组织具有明显的毒副作用，限制了其长期应用^[20]。靶向给药系统有望通过增加对靶向器官的亲性和实现药物在特定位置的富集，从而减少在正常组织的不良反应。GA 具备一定的肝靶向性，且其生物活性较好，已经有大量的研究将 GA 不同的位点修饰后作为靶向载体包封药物，但很多并不理想，所以寻找一个高效简单的修饰途径和优良剂型尤为重要^[21]。本研究通过酰胺、酯化等方法成功将 GA、PEG 以及二硫键进行合成构建出 B-GPSG-NPs，经实验评价对

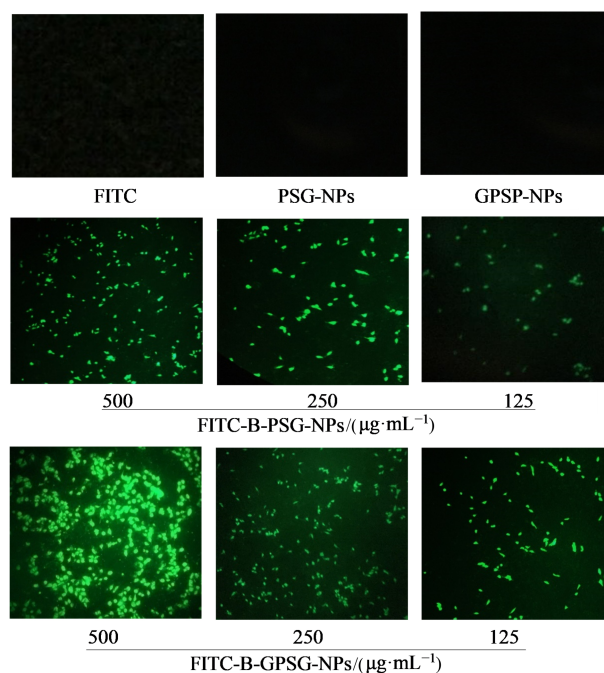


图 7 荧光显微镜下的受试物细胞摄取情况 (×100)

Fig. 7 Cellular uptake of brucine under fluorescence microscope (×100)

其包封率、稳定性、肝靶向性等多方面性质较为满意，有望作为 GA 修饰途径和肝脏给药剂型。

传统意义来讲，将药物制成纳米制剂，本身就可以增加药物的趋肝性，而本研究将 GPSG 载体制成的纳米粒与 PSG 相比，体内实验表现出肝摄取率的上升，并且随着时间的延长，药物逐渐在肝部富集，从而达到肝部定向输送药物的特点，实现了药物的优化利用。Te 计算结果显示，相对于马钱子碱，B-PSG-NPs 与 B-GPSG-NPs 的 Te 值较低，即血浆中药物浓度相对较高，是药物在体内长循环的间接体现，起到了靶器官长效给药的效果。其原因，除了 GA 的肝细胞导向作用，还可能与两亲性药物载体 PEG 的隐形长循环有关，即 PEG 能有效减少药物被蛋白分解，延长药物体循环时间^[22-23]。

本研究比较了肝癌细胞对 PSG 与 GPSG 的摄取效果，24 h 孵育结果显示，高浓度的 B-GPSG-NPs 摄取效果相较于等浓度的 B-PSG-NPs 和低浓度的 B-GPSG-NPs 均更为明显，证明纳米粒经 GA 修饰后对肝癌细胞更明显的靶向亲和力，与体内实验结果相吻合。

本研究结果表明，B-GPSG-NPs 的成功构建为 GA 纳米粒的制备和马钱子碱肝脏给药剂型提供了实践经验，为实现主动靶向治疗肝癌提供了可能的新思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 袁海霞, 关佩珊, 金赞杰, 等. 靶向CD147纳米微泡的制备及超声成像能力检测 [J]. 中国临床医学, 2022, 29(1): 84-87.
Yuan H X, Guan P S, Jin Y J, et al. Preparation and ultrasonic imaging ability of CD147-targeted nanobubbles [J]. Chin J Clin Med, 2022, 29(1): 84-87.
- [2] 杜紫晶. 近红外响应的具有靶向抗肝癌活性的纳米给药系统研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2021.
Du Z J. Study on A near-infrared response nano-drug system targeted anti-HCC activity [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021.
- [3] 庞丽莹, 黄小龙, 朱玲玲, 等. 偶联CD133核酸适体的载紫杉醇PLGA-PEG纳米载体靶向清除CD133阳性肺癌干细胞 [J]. 南方医科大学学报, 2022, 42(1): 26-35.
Pang L Y, Huang X L, Zhu L L, et al. Targeted killing of CD133⁺ lung cancer stem cells using paclitaxel-loaded PLGA-PEG nanoparticles with CD133 aptamers [J]. J South Med Univ, 2022, 42(1): 26-35.
- [4] 仇静文, 郑转弟, 钟华, 等. 乳糜微粒流对黄芩苷纳米乳动物体内组织分布的影响研究 [J]. 安徽中医药大学学报, 2021, 40(3): 86-91.
Qiu J W, Zheng Z D, Zhong H, et al. Effect of chylomicron flow on the tissue distribution of baicalin nanoemulsion in animals [J]. J Anhui Univ Chin Med, 2021, 40(3): 86-91.
- [5] 吴小祥, 朱娜, 邢亚群. 肝靶向羟基喜树碱PLGA纳米微球的药动学与组织分布研究 [J]. 中国医药科学, 2020, 10(19): 72-77.
Wu X X, Zhu N, Xing Y Q. Research on pharmacokinetics and tissue distribution of hepatic targeted hydroxycamptothecin-PLGA nano-microspheres [J]. China Med Pharm, 2020, 10(19): 72-77.
- [6] Huang H T, Zhang X L, Yu J H, et al. Fabrication and reduction-sensitive behavior of polyion complex nanomicelles based on PEG-conjugated polymer containing disulfide bonds as a potential carrier of anti-tumor paclitaxel [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2013, 110: 59-65.
- [7] Zong L L, Wang H Y, Hou X Q, et al. A novel GSH-triggered polymeric nanomicelles for reversing MDR and enhancing antitumor efficiency of hydroxycamptothecin [J]. Int J Pharm, 2021, 600: 120528.
- [8] 刘斌, 徐小娜, 唐文强, 等. pH敏感的氧化钼纳米材料的制备及其肿瘤靶向成像与治疗作用研究 [J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(5): 595-601.
Liu B, Xu X N, Tang W Q, et al. Study on pH sensitive tantalum oxide nanomaterials for tumor targeted imaging and therapy [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2022, 39(5): 595-601.
- [9] 陈瑶, 张洪源, 刘雨婷, 等. 肿瘤氧化还原微环境智能响应型前药纳米组装体的研究进展 [J]. 药学进展, 2021, 45(5): 337-348.
Chen Y, Zhang H Y, Liu Y T, et al. Advances in the research on intelligent responsive prodrug nano-assembly in tumor redox microenvironment [J]. Prog Pharm Sci, 2021, 45(5): 337-348.
- [10] 梁俊杰, 夏国园, 程祖胜, 等. 甘草次酸的肝靶向应用进展 [J]. 广东医学, 2019, 40(17): 2554-2557.
Liang J J, Xia G Y, Cheng Z S, et al. Progress in liver targeting of glycyrrhetic acid [J]. Guangdong Med J, 2019, 40(17): 2554-2557.
- [11] Cheng M R, Gao X Y, Wang Y, et al. Synthesis of glycyrrhetic acid-modified chitosan 5-fluorouracil nanoparticles and its inhibition of liver cancer characteristics *in vitro* and *in vivo* [J]. Mar Drugs, 2013, 11(9): 3517-3536.
- [12] 王若宁, 柳雨影, 陈健, 等. 甘草酸、甘草次酸的抗肿瘤机制及其作为药物递送载体的研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(23): 5876-5886.
Wang R N, Liu Y Y, Chen J, et al. Antitumor mechanism of glycyrrhizic acid and glycyrrhetic acid and their application as drug delivery carriers [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2019, 50(23): 5876-5886.
- [13] 管庆霞, 夏昭睿, 王艳宏, 等. 包载马钱子碱聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒处方工艺优化及其特性研究 [J]. 中草药, 2021, 52(4): 951-961.
Guan Q X, Xia Z R, Wang Y H, et al. Optimization of formulation and characteristics of PLGA nanoparticles containing brucine [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(4): 951-961.
- [14] Shu G W, Mi X, Cai J, et al. Brucine, an alkaloid from seeds of *Strychnos nux-vomica* Linn., represses hepatocellular carcinoma cell migration and metastasis: The role of hypoxia inducible factor 1 pathway [J]. Toxicol Lett, 2013, 222(2): 91-101.
- [15] Guo R X, Wang T, Zhou G H, et al. Botany, phytochemistry, pharmacology and toxicity of *Strychnos nux-vomica* L.: A review [J]. Am J Chin Med, 2018, 46(1): 1-23.
- [16] 管庆霞, 张伟兵, 张喜武, 等. 马钱子碱纳米结构脂质载体处方与制备工艺的优化 [J]. 中草药, 2018, 49(11): 2557-2563.
Guan Q X, Zhang W B, Zhang X W, et al. Optimization of prescription and preparation technology of brucine nanostructured lipid carriers [J]. Chin Tradit Herb Drugs,

- 2018, 49(11): 2557-2563.
- [17] 肖璐, 陈志鹏, 肖衍宇, 等. 中心复合设计优化甘草次酸修饰马钱子碱脂质体 [J]. 南京中医药大学学报, 2011, 27(5): 451-454.
- Xiao L, Chen Z P, Xiao Y Y, et al. Optimization of brucine liposome modified with glycyrrhetic acid by central composite design [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2011, 27(5): 451-454.
- [18] 扈本荃, 廉江平, 徐玥, 等. 甘草酸脂质体的制备及小鼠体内肝靶向效率的评价 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(4): 401-405.
- Hu B Q, Lian J P, Xu Y, et al. Preparation of glycyrrhizic acid liposomes and evaluation its liver targeting property in mice [J]. Acta Lab Animalis Sci Sin, 2015, 23(4): 401-405.
- [19] Xu Q, Liu Y X, Su S S, et al. Anti-tumor activity of paclitaxel through dual-targeting carrier of cyclic RGD and transferrin conjugated hyperbranched copolymer nanoparticles [J]. Biomaterials, 2012, 33(5): 1627-1639.
- [20] 王梦弟, 平欲晖. 肝靶向载体甘草次酸结构修饰及纳米制剂的研究进展 [J]. 中南药学, 2016, 14(8): 841-846.
- Wang M D, Ping Y H. Research progress in structural modification and nano preparation of glycyrrhetic acid as a liver targeting carrier [J]. Central South Pharm, 2016, 14(8): 841-846.
- [21] Dsouza A A, Shegokar R. Polyethylene glycol (PEG): A versatile polymer for pharmaceutical applications [J]. Expert Opin Drug Deliv, 2016, 13(9): 1257-1275.
- [22] 王群. PEG-PLGA 共递送紫杉醇和姜黄素纳米递药系统的构建与评价 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2021.
- Wang Q. Co-delivery of paclitaxel and curcumin by PEG-PLGA nanoparticles for breast cancer chemotherapy [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2021.
- [23] Zeng X, Guo L, Ma L F. Preparation and characterization of glycyrrhetic acid-modified poly(ethylene glycol) - poly (β -benzyl-L-aspartate) nanoparticles as liver-targeted delivery system [J]. Colloid Polym Sci, 2015, 293(1): 319-328.

[责任编辑 兰新新]