

负载二氢杨梅素 ZIF-8 纳米粒的制备、表征及抗肿瘤评价

王涛丽¹, 张广辉¹, 张莉¹, 刘翔¹, 崔锋^{2*}

1. 郑州工业应用技术学院 医学院, 河南 郑州 451150

2. 亳州高新科创医药产业技术研究院有限公司研发中心, 安徽 亳州 236839

摘要: 目的 制备负载二氢杨梅素(Dmy)的类沸石咪唑酯骨架材料-8(ZIF-8)纳米粒(Dmy@ZIF-8), 对其理化性质进行表征, 并在体内外评价其抗肿瘤活性。方法 浸渍法制备 Dmy@ZIF-8 纳米粒。单因素考察 Dmy@ZIF-8 纳米粒制备的主要影响因素, 选择 ZIF-8 与 Dmy 质量比、Dmy 质量浓度和制备时间作为主要影响因素, 使用 Box-Behnken 设计-效应面法优化 Dmy@ZIF-8 纳米粒处方工艺。采用 X-射线粉末衍射法(XRPD)、傅里叶红外光谱法(FT-IR)、扫描电镜(SEM)进行表征, 考察 Dmy@ZIF-8 纳米粒在 pH 5.5、6.5、7.4 磷酸盐缓冲液中释药情况。采用 MTT 法和 Annexin V/PI 双染法考察 Dmy@ZIF-8 纳米粒对 Hep3B 细胞的抑制及促凋亡作用。应用 Hep3B 细胞建立肝癌小鼠模型, 考察 Dmy@ZIF-8 纳米粒体内抗肿瘤效果。结果 Dmy@ZIF-8 纳米粒最佳处方为: ZIF-8 与 Dmy 质量比 2.43:1, Dmy 质量浓度 1.51 mg·mL⁻¹, 制备时间 24.50 h。Dmy@ZIF-8 纳米粒的包封率、载药量、平均粒径和 ζ 电位分别为(85.96±1.17)%、(24.96±0.25)%、(53.49±4.17) nm、-(15.69±1.04) mV。Dmy@ZIF-8 纳米粒大小均匀, Dmy 在 Dmy@ZIF-8 纳米粒中转变为无定形态, Dmy@ZIF-8 纳米粒在 pH 5.0、5.5 磷酸盐缓冲液中释药行为符合 Weibull 模型, 体外释药具有 pH 敏感性。MTT 法结果显示, Dmy 和 Dmy@ZIF-8 纳米粒对 Hep3B 细胞半数抑制浓度(IC₅₀)分别为 74.16、55.89 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。体内药效学实验结果表明, 与模型组相比较, Dmy@ZIF-8 纳米粒显著抑制荷瘤裸鼠的肿瘤生长, Dmy@ZIF-8 纳米粒组(25 mg·kg⁻¹)抑瘤率达 66.28%。结论 成功制备了具有良好理化性质和 pH 敏感性的 Dmy@ZIF-8 纳米粒, 显著提高 Dmy 体内外抗肿瘤活性。

关键词: 二氢杨梅素; 纳米粒; 类沸石咪唑酯骨架材料-8(ZIF-8); Box-Behnken 设计-效应面法(BBD-RSM); pH 敏感性; 抗肿瘤; 浸渍法

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2025)05-1224-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.05.014

Preparation, characterization and anti-tumor evaluation of dihydromyricetin loaded by ZIF-8 nanoparticles

WANG Taoli¹, ZHANG Guanghui¹, ZHANG Li¹, LIU Xiang¹, CUI Feng²

1. Department of Medical, Zhengzhou University of Industrial Technology, Zhengzhou 451150, China

2. Center of Research, Bozhou Hi-tech Innovation Pharmaceutical Industry Technology Research Institute Co., Ltd., Bozhou 236839, China

Abstract: Objective To prepare dihydromyricetin (Dmy) loaded by zeolitic imidazolate framework-8 (ZIF-8) nanoparticles (Dmy@ZIF-8), characterize its physicochemical properties, evaluate its antitumor effects *in vivo* and *in vitro*. **Methods** Dmy@ZIF-8 nanoparticles were prepared by impregnation method. The main influencing factors of Dmy@ZIF-8 nanoparticles were investigated by single factor, and the mass ratio of ZIF-8 to Dmy, the mass concentration of Dmy and the preparation time were selected as the main influencing factors. Box-Behnken response surface design method was employed to optimize prescriptions of Dmy@ZIF-8 nanoparticles. X-ray powder diffraction (XRPD), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and scanning electron microscopy (SEM) were used for characterization. The drug release behavior of Dmy@ZIF-8 nanoparticles in phosphate buffer solution with pH 5.5, 6.5, 7.4 was investigated. MTT method and Annexin V/PI double staining method were used to investigate the inhibitory and proapoptotic effects of Dmy@ZIF-8 nanoparticles on Hep3B cells, respectively. Hep3B cell was used to establish the mouse model of

投稿日期: 2025-02-16

基金项目: 河南省教育厅高等学校重点科研项目(24B310010); 山西省中医药科技创新工程项目(2023kjzy009)

作者简介: 王涛丽(1990—), 女, 讲师, 硕士, 研究方向为临床药学及基础医学。E-mail: wangtaoli90@126.com

*通信作者: 崔锋(1982—), 男, 学士, 副研究员, 研究方向为制药新技术。E-mail: CuiF1982@qq.com

hepatocellular carcinoma, and the *in vivo* antitumor effect of Dmy@IF-8 nanoparticles was investigated. **Results** Optimal formulation of Dmy@ZIF-8 nanoparticles as follows: mass ratio of ZIF-8 to Dmy was 2.43 : 1, mass concentration of Dmy was 1.51 mg·mL⁻¹, and preparation time was 24.50 h. Envelopment efficiency, drug loading, average particle size and ζ potential were (85.96 ± 1.17) %, (24.96 ± 0.25) %, (53.49 ± 4.17) nm and -(15.69 ± 1.04) mV, respectively. Dmy@ZIF-8 nanoparticles were uniform in size. Dmy was transformed into amorphous state in Dmy@ZIF-8 nanoparticles. Drug release behavior of Dmy@ZIF-8 nanoparticles accorded with Weibull model in phosphate buffer solution with pH 5.5 and 6.5, and the *in vitro* drug release was pH sensitive. MTT method results shows that IC₅₀ of Dmy and Dmy@ZIF-8 nanoparticles on Hep3B cells were 74.6, 55.89 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively. *In vivo* pharmacodynamic experiment results shows that Dmy@ZIF-8 nanoparticles significantly inhibited tumor growth in nude mice comparing to model group, and tumor inhibition rate of Dmy@ZIF-8 nanoparticles group (25 mg·kg⁻¹) was 66.28%. **Conclusion** Dmy@ZIF-8 nanoparticles with excellent physicochemical properties and pH sensitivity were successfully prepared, significantly enhancing the *in vitro* and *in vivo* anti-tumor effects of Dmy.

Key words: dihydromyricetin; nanoparticles; zeolitic imidazolate framework-8 (ZIF-8); Box-Behnken design response surface method (BBD-RSM); pH-sensitive; antitumor; impregnation method

二氢杨梅素 (Dmy) 又名白藜素, 是蛇葡萄属植物显齿蛇葡萄主要活性成分, 是一种二氢黄酮类化合物。Dmy 对膀胱癌、前列腺癌、肝癌、胃癌、乳腺癌等均有较强的抑制活性^[1-2], 具有显著的临床研究与开发价值。但 Dmy 存在诸多应用限制, 其溶解度仅为 246.19 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^[3], 且原料药粒度较大, 导致溶出度低。在体内环境中, Dmy 易被广泛代谢^[4], 稳定性差, 消除半衰期仅为 32.04 min^[5], 并存在一定不良反应^[6], 这些因素极大地限制了 Dmy 抗肿瘤药效的发挥及临床应用。纳米技术能够显著提高难溶性药物溶解度与溶出度、增加药物体循环稳定性、延长消除半衰期、提升生物利用度, 从而为充分发挥药效奠定坚实基础^[7]。目前关于 Dmy 新型纳米制剂研究报道有纳米结构脂质载体、自微乳、脂质体、胶束等^[8-9], 但存在处方复杂、安全性有待考证、体内稳定性不足、肿瘤靶向效果欠佳等缺陷。

近年来, 金属有机骨架材料 (MOFs) 作为一种由有机配体与无机金属离子构成配位聚合物材料, 在生物医药领域备受关注^[10-11]。MOFs 具有粒径小、生物相容性好、载药量高、比表面积大、不饱和金属配位点多等优势。类沸石咪唑酯骨架材料 (ZIF) 是 MOFs 中的一种优良材料^[12], 其中 ZIF-8 材料是 ZIF 典型的代表, 是由 2-甲基咪唑基团和过渡金属离子 Zn²⁺ 自组装形成的一种拓扑结构纳米材料。由于咪唑基团是生理系统中组氨酸的重要组成部分, Zn²⁺ 是机体重要的过渡金属, ZIF-8 具有良好的生物安全性和使用安全性。此外, ZIF-8 还具有优良的 pH 敏感性, 在酸性环境中其骨架结构可被瓦解破坏, 使药物在肿瘤的微酸环境中实现定位释放, 达到靶向治疗、降低给药剂量、增强药效的效果。Ding

等^[10]采用浸渍法制备了木犀草素 ZIF-8 纳米粒, 该纳米粒在弱酸性介质中释药速率及累积释放度远大于中性或弱碱性介质, 表现出优良的 pH 敏感性, 且极大提高了木犀草素对宫颈癌细胞和前列腺癌细胞的抑制作用。

本研究基于 ZIF-8 材料的诸多优势, 首先制备了 ZIF-8, 并将其作为 Dmy 的给药载体, 构建负载 Dmy 的 ZIF-8 (Dmy@ZIF-8) 纳米粒, 通过单因素实验结合 Box-Behnken 设计-效应面法优化 Dmy@ZIF-8 纳米粒的处方工艺^[9], 并对 Dmy@ZIF-8 纳米粒理化性质、pH 敏感性、储存稳定性及体内外抗肿瘤等进行评价, 以期克服 Dmy 现有应用局限, 推动其在肿瘤治疗领域的临床应用。

1 仪器与材料

1.1 仪器

JC-TP 型电子天平 (青岛精诚仪器仪表有限公司); SN-P150 型超声仪 (广东洁盟超声实业有限公司); Hei-Mix S 磁力搅拌器型磁力搅拌器 (德国 Heidolph 公司); 1100 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); CGC-T18 台式高速离心机 (四川诚邦浩然测控技术股份有限公司); Zetasizer Nono ZS-90 型粒度测定仪 (英国马尔文公司); RT61212 型溶出仪 (深圳市锐拓仪器设备有限公司); JSM-IT810 场发射扫描电子显微镜 (日本电子株式会社); XRD-500 型粉末衍射仪 (上海安东帕商贸有限公司); ASAP 2460 型气体吸附分析仪 (美国麦克仪器公司); IR5 型傅里叶变换红外光谱仪 (英国爱丁堡仪器公司); CF40-8 型细胞培养箱 (北京昊诺斯科技有限公司); ReadMax 1900 型酶标仪型酶标仪 (上海闪谱生物科技有限公司); LSR Fortessa 型流式

细胞仪 (美国 BD 仪器公司)。

1.2 材料

Dmy 原料药 (批号 20220504, 质量分数 97.5%, 山西玉宁生物科技有限公司); Dmy 对照品 (批号 AF1215521, 质量分数 98.8%, 成都埃法生物科技有限公司); 六水合硝酸锌 (批号 20210811)、2-甲基咪唑 (批号 20210609), 国药集团化学试剂有限公司; 二甲基亚砜 (DMSO, 批号 500M0231)、四甲基偶氮唑盐 (批号 050M0304), 美国 Amresco 公司; RPMI-1640 培养基 (批号 C11965500BT, 美国 Gibco 公司); 环磷酰胺 (批号 230822, 江苏恒瑞医药股份有限公司); Annexin V/PI 试剂盒 (批号 20240811, 碧云天生物技术有限公司)。

1.3 细胞与动物

Hep3B 细胞购自上海研域生物工程有限公司。雄性 Balb/c 裸鼠, 体质量为 18~22 g, 购自河南省实验动物中心, 动物生产许可证号 SCXK(豫)2022-001。动物实验经郑州工业应用技术学院医学院伦理委员会批准, 批准号为 DWLL-202404-01。

2 方法与结果

2.1 Dmy@ZIF-8 纳米粒的制备

2.1.1 ZIF-8 的合成^[13] 取 330 mg 经纯化处理的 2-甲基咪唑溶于 10 mL 甲醇, 取 150 mg 六水合硝酸锌溶于 5 mL 纯化水中, 在磁力搅拌速度为 1000 r·min⁻¹ 条件下, 将硝酸锌溶液加入到 2-甲基咪唑溶液, 持续反应 20 min, 得到乳白色混悬液, 随后, 以 10 000 r·min⁻¹ 的转速离心 15 min, 收集沉淀, 使用乙醇对沉淀洗涤 5 次, 将其置于 40 °C 真空干燥箱中干燥过夜, 取出即得 ZIF-8 粉末。

2.1.2 纳米粒的制备 采用浸渍法制备 Dmy@ZIF-8 纳米粒^[13]。称取处方量 ZIF-8 粉末, 将其加入到一定质量浓度的 Dmy 乙醇溶液中, 45 °C 水浴环境下, 避光条件中磁力搅拌一定时间。混合液以 10 000 r·min⁻¹ 的转速离心 15 min, 弃去上清液。采用乙醇洗涤沉淀 2 次, 减压除尽乙醇, 即得 Dmy@ZIF-8 纳米粒粉末。

2.2 Dmy@ZIF-8 中 Dmy 含量测定

2.2.1 色谱条件 流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液 (40:60); 体积流量为 1.0 min·mL⁻¹; 检测波长为 290 nm; 色谱柱为 Diamonsil-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 进样体积为 10 μL; 柱温为 30 °C。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取 Dmy@ZIF-8 粉末 10 mg 置 10 mL 量瓶中, 加入 0.1 mol·L⁻¹ HCl

溶液 2 mL, 超声 5 min 破坏 Dmy@ZIF-8 使 Dmy 呈游离状态, 以乙腈-0.1%甲酸水溶液 (40:60) 稀释定容。经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 精密取 1 mL 至 50 mL 量瓶中, 加乙腈-0.1%甲酸水溶液 (40:60) 稀释定容, 即得 Dmy@ZIF-8 供试品溶液。

2.2.3 阴性样品溶液的制备 精密称取“2.1.1”项下的 ZIF-8 粉末按“2.2.2”项下方法制备, 即得阴性样品溶液。

2.2.4 对照品溶液配制及线性关系考察 精密称取 Dmy 对照品, 乙腈配制成质量浓度为 0.2 mg·mL⁻¹ 的 Dmy 对照品储备液。采用乙腈-0.1%甲酸水溶液 (40:60) 稀释成质量浓度为 10.00、5.00、2.00、1.00、0.10、0.05 μg·mL⁻¹ 的对照品溶液, 按“2.2.1”项下条件测定 Dmy 浓度 (X) 与峰面积 (Y), 绘制标准曲线, 得 Dmy 回归方程为: $Y=22.0146X+1.7723$, $r=0.9997$, 线性范围 0.05~10.00 μg。

2.2.5 专属性考察 取“2.2.2”项下 Dmy@ZIF-8 供试品溶液、“2.2.3”项下阴性样品溶液和质量浓度为 1.00 μg·mL⁻¹ 的 Dmy 对照品溶液, 分别按“2.2.1”项下色谱条件进行测定。色谱图结果见图 1, Dmy 色谱峰专属性高, 无其他色谱峰干扰。阴性样品溶液在对照品成分的出峰位置上无吸收, 对色谱峰无影响, 对照品溶液和供试品溶液中各对照品成分色谱峰的分离度良好 (图 1), 该方法专属性良好。

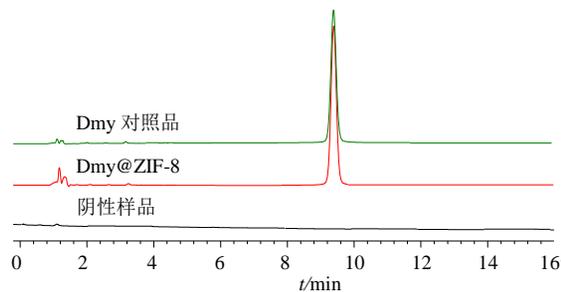


图 1 Dmy 对照品、Dmy@ZIF-8 和阴性样品溶液的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC spectrum of dihydromyricetin reference substance, Dmy@ZIF-8 and negative sample solution

2.2.6 稳定性考察 取“2.2.2”项下 Dmy@ZIF-8 供试品溶液于制备 0、3、6、9、12、24 h 测定 Dmy 峰面积, 计算得 RSD 值为 0.77% ($n=6$), 表明 Dmy@ZIF-8 供试品溶液 24 h 内稳定性良好。

2.2.7 精密度考察 取 10.00、2.00、0.05 μg·mL⁻¹ Dmy 对照品溶液, 分别按“2.2.1”项下色谱条件测定 6 次, 计算得 Dmy 峰面积 RSD 分别为 0.20%、

0.34%和 0.22%。各质量浓度每天测试 1 次,连续测试 6 d, 计算得 Dmy 峰面积 RSD 分别为 0.44%、0.46%和 0.28%, 表明日内、日间精密度良好。

2.2.8 重复性考察 精密称取“2.1.2”项下 Dmy@ZIF-8 纳米粒粉末, 按“2.2.2”项下方法平行制备供试品溶液 6 份, 按“2.2.1”项下方法进样分析, 测得 Dmy 含量的 RSD 值为 1.41% ($n=6$), 表明该方法重复性良好。

2.2.9 加样回收率考察 精密称取 9 份 Dmy@ZIF-8 粉末 5 mg 置 10 mL 量瓶中, 分为低、中、高 3 组, 分别加入 Dmy 对照品 1.0、1.5、2.0 mg, 加入 2 mL $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 溶液, 超声 5 min 破坏 Dmy@ZIF-8, 加乙腈-0.1%甲酸水溶液 (40:60) 定容至刻度。经 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 精密取 1 mL 滤液至 50 mL 量瓶中, 加乙腈-0.1%甲酸水溶液 (40:60) 定容, 按“2.2.1”项下方法进样分析计算 Dmy 总含量。结果表明, Dmy 平均回收率为 99.12%, RSD 值为 1.69% ($n=9$), 表明该方法准确度高。

2.3 包封率、载药量、粒径及 ζ 电位测定

按“2.2.4”项下方法测定 Dmy@ZIF-8 中被包载 Dmy 的量 (M_1), 根据投药量 (M_0) 计算包封率; 根据 ZIF-8 粉末和 Dmy 总用量 (W), 计算载药量; 取纯化水 100 mL, 加入 Dmy@ZIF-8 纳米粒约 10 mg, 震荡使之分散均匀, 测定 Dmy@ZIF-8 粒径和分散指数 (PDI); 取适量 Dmy@ZIF-8 混悬液至专用电槽中测定 Dmy@ZIF-8 的 ζ 电位。每份样品平均测试 3 次, 取平均值。

$$\text{包封率} = M_1/M_0$$

$$\text{载药量} = M_1/W$$

2.4 Dmy@ZIF-8 纳米粒处方工艺单因素考察

2.4.1 ZIF-8 与 Dmy 质量比考察 固定 Dmy 质量浓度为 $2.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、制备时间为 24 h 条件不变, 分别考察 ZIF-8 与 Dmy 质量比 (4:1、3:1、2:1、1:1、1:2) 对 Dmy@ZIF-8 包封率的影响, 结果见图 2。

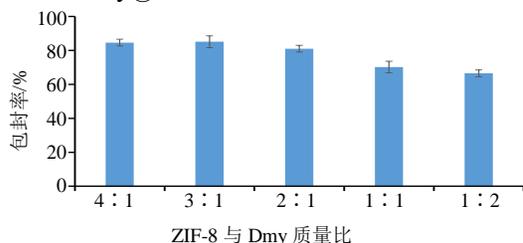


图 2 ZIF-8 与 Dmy 质量比对包封率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 2 Effects of ZIF-8 to Dmy mass ratio on encapsulation efficiency ($\bar{x} \pm s, n=3$)

ZIF-8 与 Dmy 质量比为 4:1 和 3:1 时 my@ZIF-8 纳米粒包封率均大于 80%, 当两者质量比下降至 1:1 时包封率低于 80%, 可见 ZIF-8 用量对 Dmy@ZIF-8 纳米粒包封率具有较大影响。考虑到 ZIF-8 用量过多时会影响 Dmy@ZIF-8 纳米粒载药量, 故选择 ZIF-8 与 Dmy 质量比 3:1~1:1 进行优化。

2.4.2 Dmy 浓度考察 固定 ZIF-8 与 Dmy 质量比 2:1、制备时间 24 h 条件不变, 分别考察 Dmy 质量浓度 (0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 对 Dmy@ZIF-8 包封率的影响。结果见图 3。

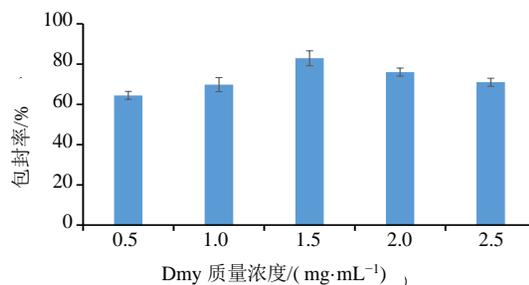


图 3 Dmy 质量浓度对包封率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 3 The effects of Dmy concentration on encapsulation efficiency ($\bar{x} \pm s, n=3$)

随着 Dmy 质量浓度增加, Dmy@ZIF-8 纳米粒包封率呈先增加后下降趋势, 可能是适当的浓度梯度利于药物进入 ZIF-8 内部, 但药物浓度过高时乙醇溶剂用量较少, 可能影响药物与 ZIF-8 载体之间配位络合^[14], 使 Dmy@ZIF-8 包封率下降。因此选择 Dmy 质量浓度 1.0~2.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 进行优化。

2.4.3 制备时间考察 固定 ZIF-8 与 Dmy 质量比为 2:1、Dmy 质量浓度为 $1.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 条件不变, 分别考察制备时间 (16、20、24、28、32 h) 对 Dmy@ZIF-8 包封率的影响。结果见图 4。

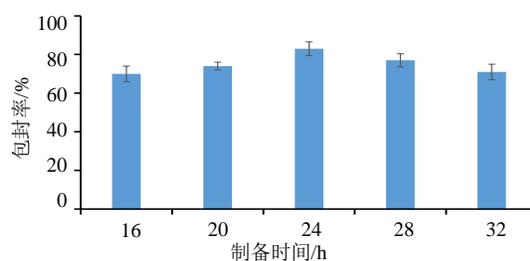


图 4 制备时间对包封率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 4 Effects of preparation time on encapsulation efficiency ($\bar{x} \pm s, n=3$)

随着制备时间的增加, Dmy@ZIF-8 包封率呈先增加后下降趋势, 原因可能是制备时间较短时 Dmy 未与 ZIF-8 充分络合^[11], 从而影响了 Dmy@ZIF-8 包封率。Dmy 属于多酚类化合物, 稳定性差^[9,15], 制备时间过长时可能导致 Dmy 降解, 也可能影响 ZIF-8 材料的稳定性, 致 Dmy@ZIF-8 包封率下降。因此选择 Dmy@ZIF-8 制备时间 20~28 h 进行优化。

2.5 Box-Behnken 设计-效应面法 (BBD-RSM) 优化 Dmy@ZIF-8 处方工艺

2.5.1 实验方案 将 ZIF-8 与 Dmy 质量比、Dmy 浓度和制备时间分别作为主要影响因素 X_1 、 X_2 、 X_3 , 根据“2.4”项下考察结果, 选择 Dmy@ZIF-8 包封率 (Y) 作为响应值, 使用 Design-Expert 12 软件设计 3 因素 3 水平效应面试验, 精确优化处方工艺。各因素水平设置、不同处方工艺实验组合及结果见表 1。

表 1 实验设计与结果

Table 1 Experiments design and results

序号	X_1	X_2 (mg·mL ⁻¹)	X_3 /h	Y %	序号	X_1	X_2 (mg·mL ⁻¹)	X_3 /h	Y %
1	3 : 1(1)	1.5(0)	20(-1)	76.41	10	3 : 1	1.0	24	80.26
2	2 : 1(0)	2.0(1)	28(1)	77.15	11	3 : 1	1.5	28	82.63
3	1 : 1(-1)	1.5	20	73.81	12	1 : 1	1.5	28	71.84
4	2 : 1	1.5	24(0)	86.22	13	1 : 1	1.0	24	72.75
5	1 : 1	2.0	24	70.51	14	2 : 1	1.5	24	85.15
6	2 : 1	1.5	24	84.24	15	2 : 1	1.5	24	86.34
7	2 : 1	1.5	24	83.54	16	2 : 1	1.0	28	73.62
8	2 : 1	1.0(-1)	20	74.91	17	3 : 1	2.0	24	78.33
9	2 : 1	2.0	20	76.37					

2.5.2 包封率数学模型建立、方差分析与最佳处方确定 使用软件 Design Expert V12 随机生成 17 个试验组合 (包括 5 个中心点试验), 分别制备不同处方工艺的 Dmy@ZIF-8 纳米粒, 并按“2.3”项下方法测定包封率。根据实验结果拟合得到 Dmy@ZIF-8 包封率的二次多元方程为: $Y=85.10+3.59 X_1-0.10 X_2+0.47 X_3+0.08 X_1 X_2+2.05 X_1 X_3+0.52 X_2 X_3-4.49 X_1^2-5.15 X_2^2-4.44 X_3^2$ 。方差分析结果见表 2, 建立的 Dmy@ZIF-8 纳米粒包封率数学模型具有极显著性差异 ($P<0.01$), 失拟项 P 值 = 0.152 7 > 0.05, 无显著性差异, 表明干扰或未知因素对拟合结果的影响可忽略。Dmy@ZIF-8 包封率 R^2 和 R_{adj}^2 分别为 0.956 5 和 0.900 6, 均 > 0.9, 说明拟合值和实测

值相关性良好。数学模型中 $X_1 X_3$ 具有显著性差异 ($P<0.05$), 而 X_1 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 具有极显著性差异 ($P<0.01$)。F 值大小可知, 各因素对 Dmy@ZIF-8 纳米粒包封率影响顺序为: $X_1>X_3>X_2$ 。因素交互作用效应面见图 5, 采用 Dmy@ZIF-8 纳米粒包封率的最大值为优化目标, 优化区间为 60%~100%, 得 Dmy@ZIF-8 纳米粒最佳处方工艺为: ZIF-8 与 Dmy 质量比 2.43 : 1, Dmy 质量浓度 1.51 mg·mL⁻¹, 制备时间 24.50 h, 预测包封率为 87.69%。

2.5.3 Dmy@ZIF-8 工艺验证 平行制备 3 批 Dmy@ZIF-8 纳米粒, 测得平均包封率为 (85.96 ± 1.17) %。根据预测包封率 (87.69%), 计算得实测包封率相对偏差仅为 -1.97%, 证明所建立的包封率

表 2 方差分析

Table 2 Variance analysis

项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	434.72	9	48.30	17.11	0.000 6	X_1^2	84.80	1	84.80	30.04	0.000 9
X_1	103.10	1	103.10	36.53	0.000 5	X_2^2	111.58	1	111.58	39.53	0.000 4
X_2	0.09	1	0.09	0.03	0.867 9	X_3^2	82.93	1	82.93	29.38	0.000 1
X_3	1.75	1	1.75	0.62	0.457 1	残差	19.76	7	2.82		
$X_1 X_2$	0.02	1	0.02	8.51×10^{-3}	0.929 1	失拟项	13.79	3	4.60	3.08	0.152 7
$X_1 X_3$	16.77	1	16.77	5.94	0.044 9	绝对误差	5.97	4	1.49		
$X_2 X_3$	1.07	1	1.07	0.38	0.557 4	总和	454.49	16			

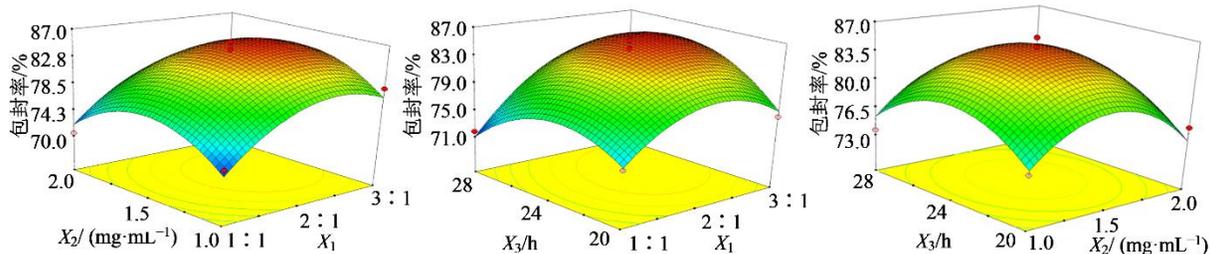
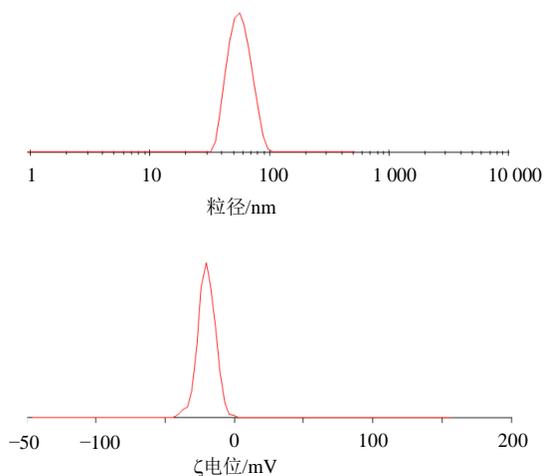


图 5 自变量与响应值的三维图

Fig. 5 Three-dimensional plot of independent factors and response values

数学模型可信度较高, 可用于 Dmy@ZIF-8 纳米粒处方工艺研究。按“2.3”项下操作, 另测得 Dmy@ZIF-8 纳米粒平均粒径为 (53.49 ± 4.17) nm, 粒径分布, ζ 电位为 $-(15.69 \pm 1.04)$ mV, PDI 值为 (0.085 ± 0.010) , 结果见图 6。

图 6 Dmy@ZIF-8 纳米粒粒径和 ζ 电位图Fig. 6 Particle size and ζ potential of Dmy@ZIF-8 nanoparticles

2.6 傅里叶红外光谱 (FT-IR) 分析

FT-IR 测试条件: 扫描次数为 16 次, 扫描范围为 $400 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$, 分辨率为 4 cm^{-1} 。取 Dmy、ZIF-8、物理混合物 (比例同 Dmy@ZIF-8) 和 Dmy@ZIF-8 纳米粒粉末适量, 按照质量比 1 : 100 加入 KBr 研磨成细粉, 压片 (透明状), 测试结果见图 7。

在空白 ZIF-8 红外光谱中, 1582 cm^{-1} 处吸收峰由 C=N 伸缩振动引起, 在 $1340 \sim 1510 \text{ cm}^{-1}$ 内吸收峰由咪唑环的伸缩振动引起, 在 $900 \sim 1340 \text{ cm}^{-1}$ 吸收峰由咪唑环的面内弯曲振动引起, 在 3004 cm^{-1} 和 2871 cm^{-1} 吸收峰由 2-甲基咪唑中芳香类 C-H 键的伸缩振动引起, 与相关研究一致^[15], 证明 ZIF-8 成功合成。Dmy 红外光谱中, 3352 cm^{-1} 是结构式上酚

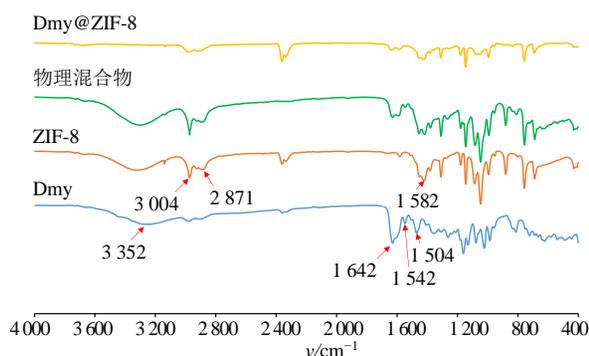


图 7 Dmy、ZIF-8、物理混合物和 Dmy@ZIF-8 纳米粒 FT-IR 图

Fig. 7 FT-IR spectrum of dihydromyricetin, ZIF-8, physical mixture and Dmy@ZIF-8 nanoarticles

羟基伸缩振动吸收峰, 1642 cm^{-1} 处属于 C=O 伸缩振动吸收峰, 1542 和 1504 cm^{-1} 等属于 Dmy 芳香环特征吸收峰。在 Dmy@ZIF-8 纳米粒红外图谱中, Dmy 在 3352 cm^{-1} 和 1542 cm^{-1} 处特征吸收峰消失, 在 1642 cm^{-1} 处吸收峰强度大幅下降, 可能是 ZIF-8 骨架对 Dmy 红外信号产生屏蔽效应所致, 证明 Dmy 被负载至 ZIF-8 骨架内部。物理混合物红外光谱仅是 Dmy 和 ZIF-8 的叠加, 与 Dmy@ZIF-8 纳米粒红外光谱存在较大差别, 说明 Dmy@ZIF-8 纳米粒并非是 Dmy 和 ZIF-8 简单混合物。

2.7 X-射线粉末衍射法 (XRPD) 分析

测试条件: Cu-K α 靶, 衍射角度 (2θ) 范围为 $3^\circ \sim 45^\circ$, 测试速度为 $5^\circ \cdot \text{min}^{-1}$ 。取 Dmy、ZIF-8、物理混合物 (Dmy 和 ZIF-8 比例同 Dmy@ZIF-8 纳米粒) 和 Dmy@ZIF-8 纳米粒粉末适量置于样品槽, 进行 XRPD 分析, 结果见图 8。

ZIF-8 在 7.3° 、 10.2° 、 12.7° 、 14.8° 、 16.4° 、 18.1° 等处出现特征衍射峰, 与相关研究一致^[15]。Dmy 在 14.5° 、 16.6° 、 23.3° 及 25.8° 处特征衍射峰强度相对较强, 在物理混合物 XRPD 图谱中 Dmy 特征衍射峰

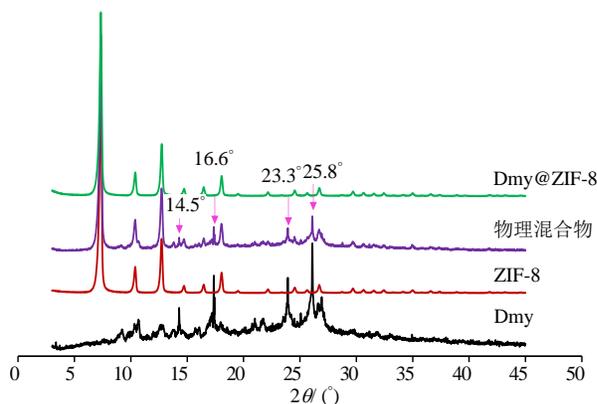


图 8 Dmy、ZIF-8、物理混合物和 Dmy@ZIF-8 纳米粒 XRPD 结果

Fig. 8 XRPD results of Dmy, ZIF-8, physical mixture and Dmy@ZIF-8 nanoparticles

仍可见, 说明简单混合后 Dmy 晶型仍未变。在 Dmy@ZIF-8 纳米粒 XRPD 图谱中仅显示 ZIF-8 在 7.3°、10.1°、12.5°、14.8°、17.0°、17.6° 等处特征晶型峰, Dmy 特征衍射峰全部消失, 说明 Dmy 可能以无定形态存在于 Dmy@ZIF-8 纳米粒中, 药物晶态的变化会对其溶解度、溶出度等产生较大的影响^[3], 利于增加药效。

2.8 扫描电镜 (SEM) 观察

取 ZIF-8 粉末固定至导电胶上, 晾干后将导电胶粘贴至样品台上, 真空喷金 1 min, 置于扫描电镜下, 放大 13 500 倍观察 ZIF-8 形貌。同法观察 Dmy@ZIF-8 纳米粒形貌。结果见图 9。ZIF-8 边缘棱角尖锐 (图 9-A), Dmy@ZIF-8 纳米粒棱角尖锐度下降, 表面致密 (图 9-B), 可能与 Dmy 填充或吸附在 ZIF-8 表面有关。

2.9 比表面积分析及孔径分布

在恒温 120 °C 条件下将 ZIF-8 和 Dmy@ZIF-8 纳米粒脱气干燥处理 12 h, 在液氮温度下 (77 K) 使用

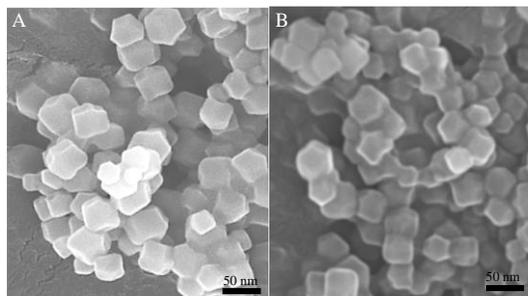


图 9 ZIF-8 (A) 和 Dmy@ZIF-8 纳米粒 (B) 的 SEM 图

Fig. 9 SEM of ZIF-8 (A) and Dmy@ZIF-8 nanoparticles (B)

气体吸附分析仪测试 ZIF-8 和 Dmy@ZIF-8 比表面积和孔径分布。ZIF-8 和 Dmy@ZIF-8 纳米粒 N₂ 吸附 (Ads)-洗脱 (Des) 等温曲线见图 10-A, 相对压力较小时 N₂ 吸附体积迅速升高, 属于典型的 Langmuir I 型等温吸附, N₂ 吸附-洗脱等温曲线基本重合, 说明 ZIF-8 和 Dmy@ZIF-8 纳米粒具有微孔结构^[14]。孔径分布曲线见图 10-B, ZIF-8 和 Dmy@ZIF-8 纳米粒孔径在 0.4~1.8 nm。由表 3 结果可知, Dmy@ZIF-8 纳米粒比表面积、总孔容和微孔孔容大幅度降低, 这可能与 Dmy 占据了 ZIF-8 内部孔道有关^[14]。

2.10 体外释药行为比较

2.10.1 透析袋吸附性考察 取 Dmy 对照品储备液适量, 加入 1 000 mL pH 5.0 磷酸盐缓冲液 (V₁), 使 Dmy 质量浓度约为 5.0 μg·mL⁻¹ (C₀), 作为透析

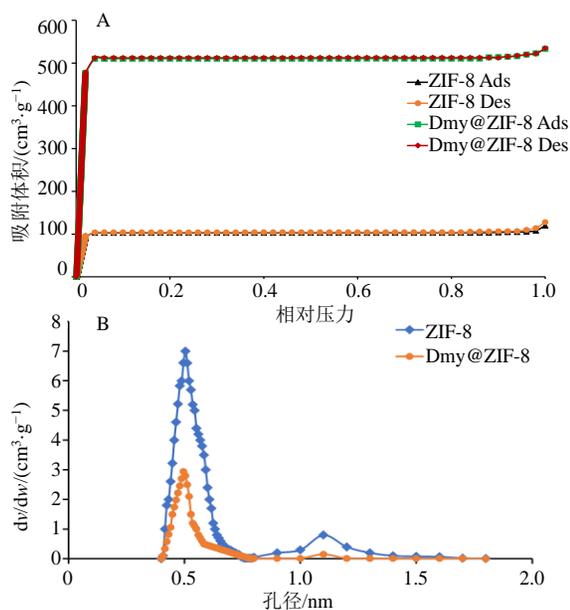


图 10 N₂ 吸附-脱附等温线 (A) 和孔径分布曲线 (B)

Fig. 10 N₂ adsorption-desorption isotherms (A) and pore-size distribution (B)

表 3 ZIF-8 和 Dmy@ZIF-8 纳米粒比表面积、孔容和平均孔径 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Specific surface area, pore volume and average pore size of ZIF-8 and Dmy@ZIF-8 nanoparticles ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品	比表面积/ (m ² ·g ⁻¹)	总孔容/ (cm ³ ·g ⁻¹)	微孔孔容/ (cm ³ ·g ⁻¹)	平均孔 径/nm
ZIF-8	1 758.25 ± 53.61	0.70 ± 0.11	0.64 ± 0.12	0.55 ± 0.06
Dmy@	335.14 ± 8.17	0.17 ± 0.03	0.13 ± 0.02	0.51 ± 0.03
ZIF-8				

外液。取透析袋（截留分子量 8 000），加入 pH 5.0 磷酸盐缓冲液 10 mL (V_2)，作为透析内液。在透析外液温度为 $(37 \pm 0.2)^\circ\text{C}$ ，转速为 $75 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下持续 48 h，取样测定透析外液中 Dmy 质量浓度 (C_1)，计算透析袋吸附率。

$$\text{吸附率} = [C_0 \times V_1 - C_1 (V_1 + V_2)] / (C_0 \times V_1)$$

同法考察在 pH 5.5、6.5、7.4 磷酸盐缓冲液中透析袋对 Dmy 吸附率。结果显示，pH 5.0、5.5、6.5、7.4 磷酸盐缓冲液中透析袋对 Dmy 吸附率依次为 2.53%、2.16%、2.69% 和 1.77%，透析袋吸附率均小于 3.00%，对结果影响较小。

2.10.2 释药行为分析 取 Dmy@ZIF-8 粉末适量 (Dmy 含量为 10 mg)，加入 pH 5.0 磷酸盐缓冲液 10 mL，密封至透析袋中。采用 pH 5.0 磷酸盐缓冲液 1 000 mL 作为释药介质，介质温度为 $(37.0 \pm 0.2)^\circ\text{C}$ ，转速为 $75 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ，于 0.5、1.0、2.0、4.0、

6.0、9.0、12.0、18.0、24.0、48.0 h 取样 3 mL，补加 3 mL pH 5.0 磷酸盐缓冲液，测定 Dmy 含量，绘制释药曲线。同法考察 Dmy@ZIF-8 在 pH 5.5、6.5、7.4 磷酸盐缓冲液中释药情况。取 10 mg Dmy，同法考察在 pH 5.0、5.5、6.5、7.4 磷酸盐缓冲液中释药情况。结果见图 11。

随着 pH 值的减小，Dmy@ZIF-8 纳米粒释药速率和释放度逐渐增大 (图 11-A)，表明 Dmy@ZIF-8 具有明显的 pH 值响应特点，这种特点利于其在肿瘤微酸性环境中的释放^[16]，从而增强靶向性、降低药物不良反应以提高药效。但 Dmy 原料药在各 pH 介质中释药行为无明显的 pH 值响应特点 (图 11-B)。Dmy@ZIF-8 纳米粒在 pH 5.0、5.5 磷酸盐缓冲液中释药模型见表 4，根据相关系数 r 可知，Dmy@ZIF-8 纳米粒释药行为均与 Weibull 模型拟合度最高。

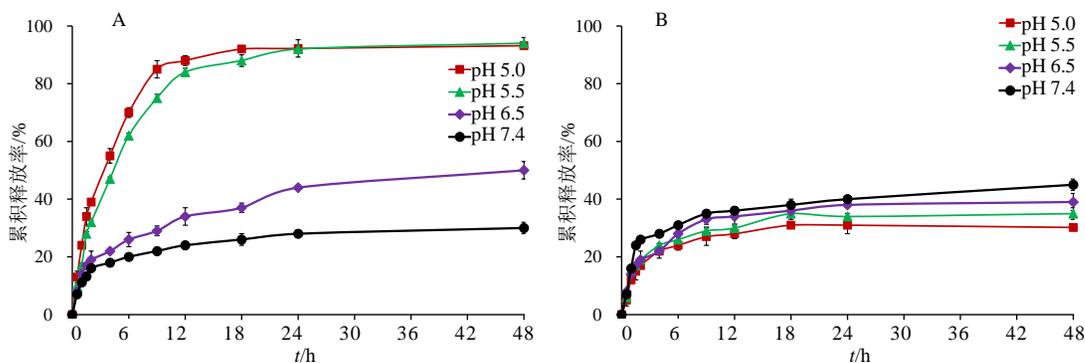


图 11 Dmy@ZIF-8 (A) 和 Dmy (B) 在不同 pH 值磷酸盐缓冲液中体外释放曲线 ($n=6$)

Fig. 11 Release profiles of Dmy@ZIF-8(A) and Dmy(B) *in vitro* in phosphate buffer with different pH values ($n=6$)

表 4 体外释药模型拟合结果

Table 4 Fitting results of drug release model *in vitro*

介质	模型	拟合方程	r
pH 5.0	一级释放	$\ln(1 - M_t/M_\infty) = -0.0563 t - 0.8035$	0.6570
	Higuchi	$M_t/M_\infty = 0.1433 t^{1/2} + 0.2051$	0.7686
	Weibull	$\ln \ln[1/(1 - M_t/M_\infty)] = 0.6431 \ln t - 1.0763$	0.9182
pH 5.5	一级释放	$\ln(1 - M_t/M_\infty) = -0.0591 t - 0.5803$	0.7726
	Higuchi	$M_t/M_\infty = 0.1496 t^{1/2} + 0.1439$	0.8256
	Weibull	$\ln \ln[1/(1 - M_t/M_\infty)] = 0.7442 \ln t - 1.4860$	0.9528

M_t/M_∞ 为 t 时累积释放百分率， M_t 为 t 时累积释放率， M_∞ 为 ∞ 时累积释放率。

M_t/M_∞ is cumulative release percentage at time t , M_t is cumulative release rate at time t , and M_∞ is cumulative release rate at time ∞ .

2.11 Dmy@ZIF-8 纳米粒粉末稳定性考察

取 Dmy@ZIF-8 纳米粒粉末密封于西林瓶中，置于湿度 60%、温度 30°C 的恒温恒湿箱中。分别于放置 0、1、2、3、6 个月取样，加纯化水分散后，

按照“2.3”项下方法测定包封率、粒径和 PDI 值。结果见表 5。

Dmy@ZIF-8 纳米粒粉末在加速条件下放置 6 个月后包封率大于 80%，粒径仍小于 60 nm，PDI

表 5 Dmy@ZIF-8 纳米粒稳定性考察结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Results of Dmy@ZIF-8 nanoparticles stability study ($\bar{x} \pm s, n=3$)

时间/月	封装率/%	粒径/nm	PDI 值
0	85.14±1.16	52.11±4.02	0.091±0.009
1	85.17±0.94	52.86±3.56	0.096±0.011
2	84.08±0.90	51.87±4.72	0.103±0.012
3	84.10±1.37	55.14±5.98	0.095±0.008
6	83.79±0.95	53.99±5.23	0.098±0.010

值约 0.1, 表明粒径均一性良好。因此 Dmy@ZIF-8 纳米粒在 6 个月内储存稳定性较高, 为评价其成药性提供了参考。

2.12 体外抗肿瘤实验

2.12.1 Hep3B 肿瘤细胞生长抑制实验 取对数生长期 Hep3B 细胞用 0.25%胰蛋白酶进行消化, 细胞培养液调整至 5×10^4 个·mL⁻¹, 接种于 96 孔板中, 每孔 100 μ L, 置培养箱 (37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂) 孵育 24 h。采用培养液稀释配制不同质量浓度的 Dmy 和 Dmy@ZIF-8 药液, 设置空白组 (培养基、0.5% MTT 和 DMSO)、对照组 (Hep3B 细胞、培养基、0.5% MTT 和 DMSO)、ZIF-8 组 (20、40、60、80、100、120 μ g·mL⁻¹)、Dmy 组 (20、40、60、80、100、120 μ g·mL⁻¹) 和 Dmy@ZIF-8 组 (20、40、60、80、100、120 μ g·mL⁻¹), 各质量浓度设 6 个复孔。相同条件下孵育 48 h, 加 0.5% MTT 溶液 20 μ L, 孵育 4 h, 弃去培养液, 分别加 150 μ L DMSO, 震荡 2 min, 在酶标仪 (490 nm) 测定吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率, 结果见图 12。

$$\text{存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

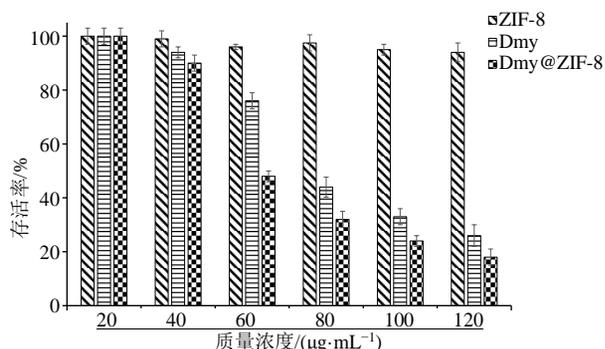


图 12 Dmy 和 Dmy@ZIF-8 纳米粒对 Hep3B 细胞生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 12 Inhibitory effects of dihydromyricetin and Dmy@ZIF-8 nanoparticles on Hep3B cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

各浓度 ZIF-8 对 Hep3B 细胞无明显毒性, 在 120 μ g·mL⁻¹ 时细胞存活率仍大于 90%, 表明各质

量浓度 ZIF-8 均未呈现出明显细胞毒性。Dmy 和 Dmy@ZIF-8 对 Hep3B 细胞均具有抑制作用, 随着 Dmy 质量浓度的逐渐增加抑制作用也随之增强, 呈现明显的量效关系。Dmy 和 Dmy@ZIF-8 对 Hep3B 细胞的半数抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 74.16、55.89 μ g·mL⁻¹, 表明 Dmy@ZIF-8 显著增加了 Dmy 抗肿瘤活性。其机制可能涉及以下两方面: 一是 Dmy@ZIF-8 具有较小的粒径, 约 50 nm, 该特性使其能够充分利用增强渗透滞留效应, 实现肿瘤细胞内的高效蓄积^[17]; 二是 Dmy@ZIF-8 具有较高的 pH 敏感性, 可实现在肿瘤细胞微酸环境中的定位释放^[10-11], 最终达显著提升了 Dmy@ZIF-8 抗肿瘤效果。

2.12.2 流式细胞术检测细胞凋亡 取对数生长期 Hep3B 细胞接种于 6 孔板中, 每孔 5×10^5 个, 置培养箱 (37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂) 孵育 24 h。设置对照组 (等量 DMSO)、Dmy 组 (60 μ g·mL⁻¹) 和 Dmy@ZIF-8 组 (60 μ g·mL⁻¹), 继续孵育 24 h, 使用无 EDTA 胰酶消化并收集细胞悬液, 3 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃去上清液, 加 PBS 清洗, 再次 3 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃去上清液。加 Binding buffer 100 μ L 重悬, 再加入 FITC 标记的 Annexin-V 10 μ L, 孵育 30 min (过程避光), 加入碘化丙啶 (PI) 5 μ L 孵育 5 min (过程避光), 加 Binding buffer 500 μ L, 5 min 内进行流式细胞仪检测。结果见图 13。当 Dmy 质量浓度均为 60 μ g·mL⁻¹ 时, Dmy 组 Hep3B 细胞凋亡率为 33.76%, 表明 Dmy 本身具有一定促凋亡作用。Dmy@ZIF-8 组 Hep3B 细胞凋亡率增加至 47.58%, 表明 Dmy@ZIF-8 可进一步引起 Hep3B 细胞凋亡, 且晚期凋亡明显高于 Dmy 组, 证明 Dmy@ZIF-8 进一步增强了 Dmy 抗肿瘤药效。

2.13 Dmy@ZIF-8 纳米粒体内抗肿瘤实验

2.13.1 肿瘤模型的建立 取 Balb/c 裸鼠, 按照 1.0×10^7 个·mL⁻¹ 细胞浓度 sc Hep3B 细胞悬液 0.2 mL, 建立肝癌小鼠模型。接种 1 周后用游标卡尺测量每只小鼠的肿瘤的宽 (a) 和长 (b), 计算肿瘤体积 (V), 选取肿瘤体积为 150 mm³ 荷瘤小鼠进行实验。

$$V = a \times b^2 \times \pi / 6$$

2.13.2 实验方案 将 40 只荷瘤小鼠随机分成 5 组即: 模型组 (0.9%氯化钠溶液)、阳性药组 (环磷酰胺, 20 mg·kg⁻¹)、Dmy 组 (25 mg·kg⁻¹)、Dmy@ZIF-8 纳米粒低、高剂量组 (15、25 mg·kg⁻¹)。每 3 天 iv 给药 1 次, 共 5 次。第 5 次注射给药 3 d 后处死荷瘤小鼠, 取出瘤体, 称质量 (g), 计算抑瘤率。

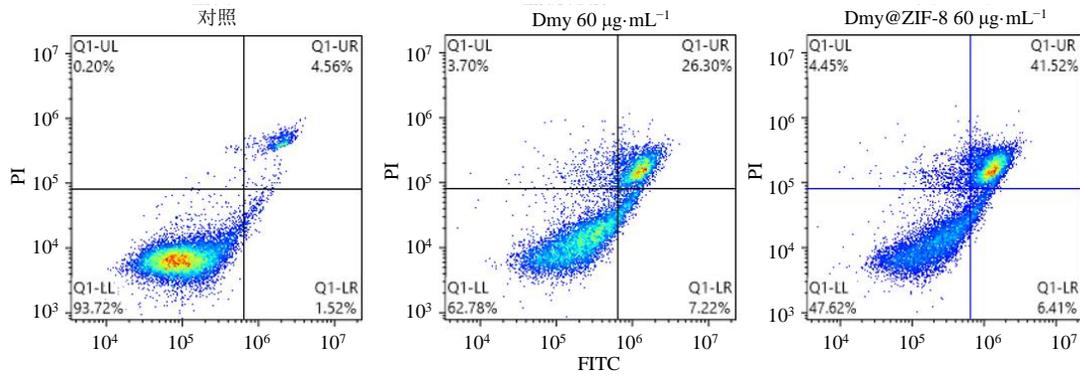


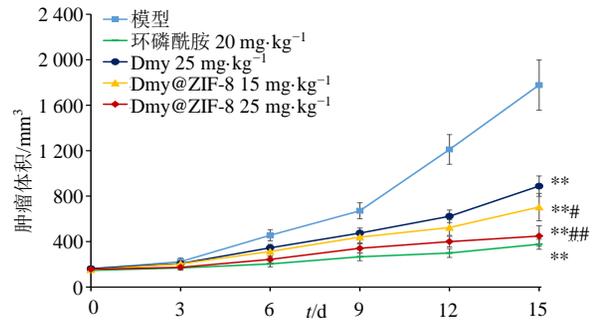
图 13 Dmy 和 Dmy@ZIF-8 纳米粒对 Hep3B 细胞凋亡的影响

Fig. 13 Effects of dihydromyricetin and Dmy@ZIF-8 nanoparticles on Hep3B cell apoptosis

抑瘤率 = 1 - 给药组平均肿瘤质量 / 模型组平均肿瘤质量

2.13.3 结果分析 各组荷瘤小鼠肿瘤体积增长情况见图 14, 肿瘤外观见图 15, 抑瘤率结果见表 6。模型组小鼠由于缺乏药物的治疗作用, 故肿瘤体积生长最快, 15 d 时肿瘤体积达 $(1\ 765.16 \pm 214.98)\ \text{mm}^3$ 。与模型组相比, 15 d 时, 各给药组肿瘤体积和肿瘤质量均极显著性下降 ($P < 0.01$), 表明各给药组均发挥了抑瘤作用。与 Dmy 组 ($25\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 相比, Dmy@ZIF-8 纳米粒低剂量组 ($15\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 在治疗第 15 天时肿瘤体积显著性下降 ($P < 0.05$), 说明 Dmy@ZIF-8 纳米粒有助于降低给药剂量, 增强 Dmy 的抑瘤作用; 但肿瘤质量无显著性差异 ($P > 0.05$), 可能是肿瘤密度存在较大差异所致^[18]。与 Dmy 组 ($25\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 相比, Dmy@ZIF-8 纳米粒高剂量组 ($25\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 在治疗第 15 天时肿瘤体积和肿瘤质量均极显著性下降 ($P < 0.01$), 可见在给药剂量相同的前提下 Dmy@ZIF-8 纳米粒表现出更高的抗肿瘤药效, 抑瘤率提高幅度更大 (66.28%), 并呈现出剂量依赖性。与模型组小鼠体质量相比, 环磷酰胺阳性对照组荷瘤小鼠体质量极显著性下降 ($P < 0.01$), 而 Dmy 组、Dmy@ZIF-8 纳米粒低、高剂量组体质量未发生明显下降 ($P > 0.05$), 且荷瘤小鼠精神状态优于阳性对照组, 提示 Dmy 及

Dmy@ZIF-8 纳米粒不良反应远小于环磷酰胺, 临床推广更具优势^[11,19]。



与模型组相比: ** $P < 0.01$; 与 Dmy 组相比: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs model group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs Dmy group.

图 14 荷瘤小鼠肿瘤体积变化 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 14 Tumor volume change of tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)

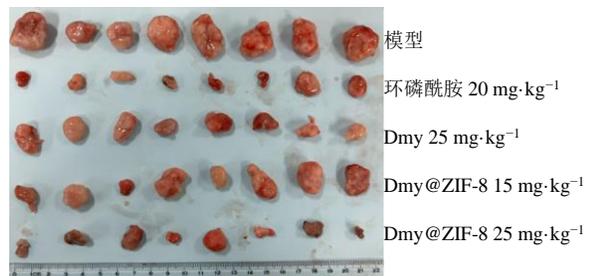


图 15 荷瘤小鼠的肿瘤外观 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 15 Tumor appearance of tumor-bearing mice ($n=8$)

表 6 体内抑瘤率结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Antitumor inhibition rate *in vivo* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

给药组	剂量/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	肿瘤质量/g	抑瘤率/%	体质量/g
模型	—	0.86 ± 0.19	—	30.14 ± 2.01
环磷酰胺	20	$0.23 \pm 0.10^{**}$	73.26	$22.19 \pm 2.38^{**}$
Dmy	25	$0.47 \pm 0.14^{**}$	45.35	28.26 ± 1.89
Dmy@ZIF-8	15	$0.44 \pm 0.20^{**}$	48.84	28.77 ± 2.06
	25	$0.29 \pm 0.17^{***\#}$	66.28	29.04 ± 2.26

与模型组相比: ** $P < 0.01$; 与 Dmy 组相比, ## $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs model group; ## $P < 0.01$ vs Dmy group.

2.14 统计学方法

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 值表示, 采用 SPSS 24.0 软件进行统计学分析。通过 *t* 检验比较组间差异, 当 $P < 0.05$ 时, 判定组间具有显著性差异。

3 讨论

课题组前期采用一步法制备 Dmy@ZIF-8 纳米粒时发现 Dmy@ZIF-8 包封率始终低于 70%, 分析原因可能是由于 Dmy 属于二氢黄酮类化合物, 分子结构中羟基及苯环容易和 2-甲基咪唑竞争与 Zn^{2+} 进行配位, 故影响了 Dmy@ZIF-8 包封率。本研究采用两步法制备 Dmy@ZIF-8 纳米粒, 即首先制备 ZIF-8 粉末, 再通过浸渍法使 Dmy 负载至 ZIF-8 纳米粒内部, 进而成功制备成 Dmy@ZIF-8 纳米粒, 最佳处方验证结果显示, Dmy@ZIF-8 纳米粒在加速条件下储存 6 个月时包封率仍可大于 80%, 符合《中国药典》2020 年版四部 9014 项下对微粒制剂的要求, 为相关研究提供了有益借鉴。

ZIF-8 纳米粒由 2-甲基咪唑基团和过度金属离子 Zn^{2+} 经配位作用形成, 但 ZIF-8 纳米粒中过度金属离子 Zn^{2+} 并未完全饱和, 因而仍可与结构中含羟基、苯环的药物分子进行配位^[19-20], 为 ZIF-8 纳米粒负载药物提供了结合位点。FT-IR 研究结果显示, Dmy 羟基吸收峰消失, 苯环特征吸收峰发生了很大变化, 因此推测 Dmy 通过羟基及苯环与 ZIF-8 纳米粒发生了氢键作用^[19-20], 进而实现有效载药, 形成了 Dmy@ZIF-8 纳米粒。由于 ZIF-8 纳米粒孔道属于纳米级别, Dmy 负载进入 ZIF-8 纳米粒孔道后, 在纳米孔道的限域效应下使得 Dmy 难以以结晶的形式存在, 因而最终以无定形的形式存在于 ZIF-8 纳米粒孔道内, 有效降低了 Dmy 原料药粒度、改变了药物晶型状态, 进而极大提高药物溶解度、释药速率及释放度。

Dmy@ZIF-8 纳米粒在 pH 5.0、5.5、6.5、7.4 磷酸盐缓冲液中释药结果显示, Dmy@ZIF-8 纳米粒随着介质 pH 值的降低释药速率逐渐变快, 这与 ZIF-8 载体材料 pH 值敏感性有关, ZIF-8 骨架上咪唑环的不饱和氮原子在酸性环境下容易质子化, 导致 ZIF-8 骨架结构被瓦解破坏^[10-11], 使药物释放阻力大大下降, 利于使药物在肿瘤的微酸性环境中快速释药, 达到治疗目的。Dmy 在相同条件下无明显的 pH 值响应特点, 证明 Dmy@ZIF-8 纳米粒 pH 值响应特点并不是由药物在不同 pH 值介质中溶解度差异引起。另外, Dmy 释药实验结束时仍可观察到原

料药沉积于透析袋底部, 因而在各个 pH 值介质中累积释放度均较低, 这可能与原料药晶型存在状态、粒度大、疏水性强等原因有关^[21]。由于 Dmy@ZIF-8 纳米粒改变了 Dmy 晶型 (转变为无定形态), 极大降低了粒度 (纳米级别), 因而极大提高了累积释放度, 也为降低 Dmy 给药剂量、增强药效奠定坚实基础。

目前, pH 值敏感材料存在合成工艺复杂、价格昂贵、不易保存等缺陷, 本研究采用价格低廉的 2-甲基咪唑及六水合硝酸锌制备了 ZIF-8 纳米粒, 生物相容性、pH 值敏感性均良好, 载药量远高于脂质纳米粒, 为肿瘤药物相关研究提供了新型递药系统。采用 Box-Behnken 设计-效应面法筛选出 Dmy@ZIF-8 纳米粒最佳处方工艺, 制备过程简单, 重复性良好。Dmy@ZIF-8 纳米粒改变了 Dmy 晶型, 且具有明显的 pH 值响应特征。Dmy@ZIF-8 纳米粒极大降低了 Dmy 对 Hep3B 细胞的 IC_{50} , 并显著增强了 Dmy 体内抗肿瘤药效。后续需对 Dmy@ZIF-8 纳米粒体内药动学、毒理学等进行评价, 另外 Dmy@ZIF-8 纳米粒与化疗药物联合使用后是否具有减毒增效效果仍待进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 吴聪, 王文茂, 彭彩云, 等. 二氢杨梅素结构修饰及生物活性研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2024, 36(3): 540-553.
Wu C, Wang W M, Peng C Y, et al. Research advances of the structural modification and biological activity of dihydromyricetin [J]. Nat Prod Res Dev, 2024, 36(3): 540-553.
- [2] 周海云, 王文清, 施春阳, 等. 二氢杨梅素药理及药物相互作用研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(14): 3411-3418
Zhou H Y, Wang W Q, Shi C Y, et al. Research progress on pharmacological effects of dihydromyricetin and its interactions with drugs [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2018, 49(14): 3411-3418
- [3] 王彦阁, 陈晨, 丁林, 等. 以甜菊糖苷为载体的二氢杨梅素纳米胶束的制备、表征及口服生物利用度评价[J]. 中草药, 2024, 55(23): 8011-8022.
Wang Y G, Chen C, Ding L, et al. Preparation, characterization and oral bioavailability evaluation of dihydromyricetin nanomicelles using stevioside as carriers [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(23): 8011-8022.
- [4] Zhang Y, Que S, Yang X, et al. Isolation and identification of metabolites from dihydromyricetin[J]. Magn Reson

- chem, 2007, 45(11): 909-916.
- [5] 樊静静, 龚飞, 郁建平. 二氢杨梅素在小鼠体内的药代动力学研究[J]. 山地农业生物学报, 2014, 33(3): 13-16.
Fan J J, Gong F, Yu J P. Pharmacokinetics of dihydromyricetin in mice [J]. J Mt Agric Biol, 2014, 33(3): 13-16, 49.
- [6] 马秀玲, 钟贞, 谢文平, 等. 二氢杨梅素 28 d 毒性研究[J]. 发酵科技通讯, 2022, 51(4): 196-201.
Ma X L, Zhong Z, Xie W P, et al. Study on 28-day oral toxicity of dihydromyricetin [J]. Bull Ferment Sci Technol, 2022, 51(4): 196-201.
- [7] 李晓蒙, 郑妮媚, 张智强. 柚皮素磷脂复合物纳米混悬剂制备及其体内药动学研究 [J]. 中成药, 2024, 46(1): 41-48.
Li X M, Zheng W M, Zhang Z Q. Preparation and *in vivo* pharmacokinetics of nanosuspensions of naringenin phospholipids complex [J]. Chin Tradit Pat Med, 2024, 46(1): 41-48.
- [8] 田茂仙, 李娟, 施春阳, 等. 制剂新技术与新剂型提高二氢杨梅素生物利用度的研究进展 [J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(10): 1160-1164, 1178.
Tian M X, Li J, Shi C Y, et al. Research progress on improving bioavailability of dihydromyricetin by using new preparation technology and new dosage form [J]. Chin J Hosp Pharm, 2023, 43(10): 1160-1164, 1178.
- [9] 杨璞, 李晓, 宋亚琼, 等. 二氢杨梅素混合胶束的制备、表征及药动学研究 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(10): 2351-2360.
Yang P, Li X, Song Y Q, et al. Dihydromyricetin mixed micelles: Preparation characterization and pharmacokinetic study [J]. Drug Eval Res, 2024, 47(10): 2351-2360.
- [10] Ding L L, Chen H, Bi G L, et al. Improved anti-cancer effects of luteolin@ZIF-8 in cervical and prostate cancer cell lines [J]. Heliyon, 2024, 10(6): e28232.
- [11] Peng X Q, Tang S S, Tang D T, et al. Autonomous metal-organic framework nanorobots for active mitochondria-targeted cancer therapy [J]. Sci Adv, 2023, 9(23): eadh1736.
- [12] 杨舜禹, 马丹, 何贤会, 等. 负载姜黄素的 ZIF-90 载药 MOF 的制备与表征 [J]. 化学研究与应用, 2023, 35(2): 439-444.
Yang S Y, Ma D, He X H, et al. Preparation and characterization of ZIF-90 drug-loaded MOFs loaded with curcumin [J]. Chem Res Appl, 2023, 35(2): 439-444.
- [13] 李冰辉. ZIF-8 载 TMZ 药物输送系统的构建及其对 C6 细胞的作用研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2021.
Li B H. Construction of ZIF-8 TMZ drug delivery system and its effect on C6 cells [D]. Harbin: Harbin University of Commerce, 2021.
- [14] 闫晗. 多功能金属有机框架复合材料的制备及其在食品包装中的应用 [D]. 无锡: 江南大学, 2023.
Yan H. Preparation of multifunctional metal-organic frameworks composites and their applications in food packaging [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2023.
- [15] 孙瑞华, 杨卓凡, 张芮博, 等. 多孔材料 ZIF-8 的制备及其对布洛芬的载药性能 [J]. 复合材料学报, 2024, 41(12): 6757-6764.
Sun R H, Yang Z F, Zhang E B, et al. Preparation of the porous ZIF-8 and the behaviors of loading ibuprofen [J]. Acta Mater Compositae Sin, 2024, 41(12): 6757-6764.
- [16] 罗小莉, 朱陈斌, 蓝丹, 等. 金属-有机多孔材料 UiO-66 负载黄酮苷类药物负载率的研究 [J]. 化学研究与应用, 2021, 33(7): 1266-1271.
Luo X L, Zhu C B, Lan D, et al. Study on metal-organic porous material UiO-66 loaded with flavonoid glycosides [J]. Chem Res Appl, 2021, 33(7): 1266-1271.
- [17] 周菲, 曲姣蓉, 刘闰平, 等. 外泌体携载阿霉素递送体系构建及体外抗肿瘤活性评价 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(5): 976-982.
Zhou F, Qu J R, Liu R P, et al. Construction of tumor-derived exosome delivery system loaded with doxorubicin and its antitumor activity *in vitro* [J]. Drug Eval Res, 2023, 46(5): 976-982.
- [18] 苏瑞平. 阿昔替尼及其剂量滴定治疗晚期转移性肾癌的临床疗效及安全性评价 [D]. 西安: 西安医学院, 2021.
Su R P. Clinical efficacy and safety evaluation of axitinib and its dose titration in the treatment of metastatic renal cell carcinoma [D]. Xi'an: Xi'an Medical University, 2021.
- [19] 张训发, 廉唱唱, 桂双英, 等. 顺铂前药纳米载药系统联合丁硫氨酸亚砷亚胺增强肿瘤化疗效果的研究 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(12): 2601-2607.
Zhang X F, Lian C C, Gui S Y, et al. Construction of cisplatin prodrug nanoparticles combined with BSO and study on their anti-cancer effect [J]. Drug Eval Res, 2023, 46(12): 2601-2607.
- [20] 陈功森, 林龙飞, 刘宇灵, 等. 不同类型金属有机骨架材料合成及载雷公藤红素工艺研究[J]. 中草药, 2022, 53(18): 5673-5681.
Chen G S, Lin L F, Liu Y L, et al. Study on synthesis of different types of metal organic frameworks and technology of celastrol loading [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(18): 5673-5681.
- [21] 王涛丽, 李登云, 张莉, 等. 壳聚糖包覆芒果苷脂质体的制备、表征及口服药动学评价[J]. 中国医院药学杂志, 2024, 44(18): 2122-2128.
Wang T L, Li D Y, Zhang L, et al. Chitosan-coated mangiferin in liposomes: Preparation, characterization and oral pharmacokinetic evaluations [J]. Chin J Hosp Pharm, 2024, 44(18): 2122-2128.