

叶酸修饰水飞蓟宾固体脂质纳米粒的制备及其对 A549 细胞抑制作用研究

于 莲, 杜 妍, 田丽华, 赵 岩, 苏 瑾, 孙维彤, 平 洋, 刘思佳, 马丽娜

佳木斯大学药学院 黑龙江省高校生物药剂学重点实验室, 黑龙江 佳木斯 154007

摘要: 目的 制备一种通过叶酸受体途径作用于肿瘤细胞的叶酸修饰水飞蓟宾固体脂质纳米粒 (FA-SIL-SLN), 考察 FA-SIL-SLN 对 A549 细胞抑制作用。方法 酰化反应合成膜材 (FA-PEG₃₃₅₀-DSPE), 采用乳化-超声分散法制备 FA-SIL-SLN, 并研究其理化性质。MTT 法测定 FA-SIL-SLN 对 A549 细胞的抑制率; 流式细胞分析仪分析其对细胞周期的影响。结果 合成了膜材 FA-PEG₃₃₅₀-DSPE; 制备的 FA-SIL-SLN 外观圆整、平均粒径为 (103±21) nm, 包封率为 (90.73±0.33) %、载药量为 (2.13±0.17) %, 体外释药实验表明其具有良好的缓释特性; 对 A549 细胞的抑制作用呈现明显的量效和时效关系; 阻滞细胞增殖。结论 本实验为叶酸介导的抗肿瘤给药系统研究提供了依据。

关键词: 叶酸; 水飞蓟宾; 固体脂质纳米粒; A549 细胞; 乳化-超声分散法; 缓释

中图分类号: R283.6; 285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)02-0158-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.02.008

Preparation of silybin solid lipid nanoparticle modified by folic acid and its inhibitory effect on A549 cells

YU Lian, DU Yan, TIAN Li-hua, ZHAO Yan, SU Jin, SUN Wei-tong, PING Yang, LIU Si-jia, MA Li-na

Key Laboratory of Biopharmaceutics in Heilongjiang, College of Pharmacy, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China

Abstract: Objective To prepare silybin solid lipid nanoparticle modified by folic acid (FA-SIL-SLN) and to investigate its inhibitory effect on non-small cell lung cancer A549 cells. **Methods** The compounding membrane material FA-PEG₃₃₅₀-DSPE was synthesized by acylation; FA-SIL-SLN was prepared by emulsion-ultrasonic dispersion method; The physicochemical properties were studied; The inhibitory rate on A549 cells was determined by MTT method; The effect on cell cycle was analyzed by flow cytometry. **Results** The membrane material FA-PEG₃₃₅₀-DSPE was synthesized. The prepared FA-SIL-SLN was round and even, the average particle size was (103 ± 21) nm, the encapsulation efficiency was (90.73 ± 0.33)%, and the drug loading was (2.13 ± 0.17)%. The *in vitro* release experiments showed that it had good sustained-release characteristics and blocked cell proliferation, and the inhibitory effect on A549 cells presented the obvious dose-effect and time-effect relationships. **Conclusion** This study provides a basis for the research on folate-mediated antitumor drug delivery systems.

Key words: folic acid; silybin; solid lipid nanoparticles; A549 cells; emulsion-ultrasonic dispersion method; sustained-release

随着对肿瘤分子水平研究的不断深入, 在肿瘤细胞表面发现了一系列受体, 它们与肿瘤组织生长增殖密切相关并在肿瘤组织中过度表达, 这些受体能与特异性配体结合, 诱导细胞内化^[1]。抗肿瘤药物与特异性配体结合, 使制剂具有主动靶向作用, 能增强药物的肿瘤选择性并减少全身不良反应。叶酸受体介导的肿瘤靶向治疗已成为国内外研究热点, 其治疗策略在肿瘤靶向治疗中已显示出良好的临床应用前景^[2-3]。本实验以水飞蓟宾 (SIL) 为模

型药物, 在固体脂质纳米粒表面修饰叶酸, 制成叶酸修饰水飞蓟宾固体脂质纳米粒 (FA-SIL-SLN), 以期提高药物的靶向性, 增加疗效, 减少副作用。

1 仪器与材料

超声波细胞粉碎机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); DF—101S 集热式恒温加热磁力搅拌器 (河南省予华仪器有限公司); 红外光谱测定仪 (Varian, FT-IR, 型号 Excalibur HE 3100); Unity Inova 400 核磁共振谱仪 (美国瓦里安公司); 自动酶标仪 (Bio-

收稿日期: 2012-05-21

基金项目: 黑龙江省教育厅重点项目 (125112027)

作者简介: 于 莲 (1961—), 女, 教授, 硕士生导师, 从事靶向、缓控释给药系统研究。E-mail: jdyulian@163.com

网络出版时间: 2012-11-17 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20121117.1457.006.html>

Rad2550 美国); HNA-122DTABAI 型 CO₂ 恒温培养箱(日本三洋公司); 流式细胞分析仪(美国 BD 公司 Becton, Dickinson and Company)。

叶酸(FA, 98.9%)、琥珀酸酐(SUC)、聚乙二醇二胺(H₂N-PEG₃₃₅₀-NH₂, 99.1%)、脑磷脂(DSPE, 98%)、0.25%胰蛋白酶, Sigma 公司; 丙酮(AR)、氯仿(HPLC), 天津恒兴试剂有限公司; 透析袋(M_w 8 000, 上海绿鸟科技发展有限公司), 三乙胺(TEA, AR)、二甲亚砜(DMSO, GC 测定 H₂O<0.005%), 国药集团上海试剂公司; 羟基琥珀酰亚胺(NHS)、二环己基碳二亚胺(DCC), Fluka 公司; SIL(佳木斯三江水飞蓟素制品有限公司, 90.6%), 单硬脂酸甘油酯(天津市博迪化工有限公司), 泊洛沙姆 188(珠海远城医药化工有限公司), A549 细胞(中国科学院细胞生物学研究所), TBD 优级胎牛血清、TBD 青/链霉素原液(中国医学科学院生物医学工程研究所), 细胞周期试剂盒(BD), MTT (Amresco 0793), 无叶酸 RPMI 1640 培养基(Gibco 公司), 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 膜材 FA-PEG₃₃₅₀-DSPE 的合成

2.1.1 FA-PEG₃₃₅₀-NH₂ 合成工艺^[4-5] 分别称取 FA 65.8 mg、H₂N-PEG₃₃₅₀-NH₂ 350 mg、NHS 30 mg、DCC 60 mg, 依次加入 1 mL DMSO 中, 加入 100 μL TEA, 氮气保护、避光反应 24 h 后 50 °C (500 r/min) 反应 6 h, 加入 45 mL 冷氯仿混匀, 旋转蒸发去除氯仿, 残留少许液体, 真空干燥得淡黄色固体 FA-PEG₃₃₅₀-NH₂。

2.1.2 SUC-DSPE 合成工艺^[6] 称取 DSPE 50 mg 溶于 2.5 mL 氯仿; SUC 15 mg 溶于 0.5 mL DMSO, 转入前一体系, 逐滴加入 50 μL TEA, 500 r/min 室温反应 24 h, 残留少许液体, 加入 45 mL 无水冷丙酮沉淀, 12 000 r/min 离心 10 min, 45 mL 无水冷丙酮反复清洗沉淀 3 次, 真空干燥得 SUC-DSPE。

2.1.3 FA-PEG₃₃₅₀-DSPE 合成工艺 称取 SUC-DSPE 15 mg 溶解在 10 mL 氯仿中, 加入 DCC 30 mg 室温反应 4 h 活化羧基, 称取 FA-PEG₃₃₅₀-NH₂ 200 mg 溶解在 10 mL 氯仿中, 转入前一体系, 加入 40 μL TEA, 室温反应 24 h, 无水冷丙酮沉淀并清洗产物, 产物真空干燥后待检测。终产品真空干燥后精密称量约 66.15 mg, 终产率约 27%。

2.2 FA-PEG₃₃₅₀-DSPE 的结构表征

2.2.1 IR 表征 产物 FA-PEG₃₃₅₀-DSPE 在红外光谱

仪上以 KBr 压片法测得其红外光谱图。由 IR 结果可知, 在 1 200 cm⁻¹ 附近有一个中强氨基的特征峰; 在 1 500 cm⁻¹ 附近有一个 ν_{C-C} 吸收带, 为叶酸上苯环的特征峰; 1 720 cm⁻¹ 附近的吸收峰为 FA-PEG₃₃₅₀-NH₂ 与 SUC-DSPE 反应后产生的酰胺键; 在 3 431 cm⁻¹ 处是叶酸嘧啶环上的=N-H 和-OH 共同作用的宽峰, 同时具有 PEG 所含基团的特征峰, 1 100 cm⁻¹ 附近的为脂肪醚特征峰。

2.2.2 ¹H-NMR 表征 以 CDCl₃ 为溶剂, 在核磁共振仪上测得 FA-PEG₃₃₅₀-DSPE 的 ¹H-NMR。由结果可知, δ 6.0~9.0 为叶酸苯环结构上氢峰, δ 3.56~3.75 为聚氧乙烯氢峰, δ 1.22 为亚甲基峰, 三者的存在说明产物结构中有 FA 及聚氧乙烯的存在, 说明成功制备了膜材 FA-PEG₃₃₅₀-DSPE。

2.3 FA-SIL-SLN 的制备

2.3.1 单因素试验

(1) 脂质材料的选择: 分别称取硬脂酸、单硬脂酸甘油酯各 3 份, 固定用量为 2.0%, 分别加入 3.2% 注射用脑磷脂-泊洛沙姆 188 (1:3) 作为复配乳化剂, 采用乳化超声分散法制备空白 SLN, 结果以单硬脂酸甘油酯为脂质材料制备的 SLN 粒径较小, 符合要求, 因此, 选择单硬脂酸甘油酯为脂质材料。

(2) 乳化剂的比例: 选择脑磷脂-泊洛沙姆 188 (1:3) 作为复配乳化剂, 固定脂质用量 2.0%, 固定脑磷脂-泊洛沙姆 188 的用量为 3.2%, 考察脑磷脂-泊洛沙姆 188 的不同比例 (0:1、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6) 对 SLN 粒径及稳定性的影响, 结果选用复配乳化剂能够有效降低粒径, 单纯使用泊洛沙姆 188 时粒径较大且稳定性差, 因此采用脑磷脂-泊洛沙姆 188 (1:3) 时, SLN 粒径较小, 稳定性良好。

(3) 乳化剂的用量: 固定脂质用量为 2.0%, 选择脑磷脂-泊洛沙姆 188 (1:3) 作为复配乳化剂, 考察乳化剂的用量 (2.5%、3.2%、4.0%) 对 SLN 粒径及稳定性的影响, 结果当乳化剂用量为 3.2% 时, 粒径较小, 稳定性良好。

(4) 脂质材料的浓度: 以脑磷脂-泊洛沙姆 188 (1:3) 作为复配乳化剂, 总用量为 3.2%, 模型药物 SIL 的用量为 0.2%, 考察一系列质量分数 (2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%) 的脂质材料对 SLN 粒径及稳定性的影响, 结果当脂质质量分数达到 3.5% 以上时, 放置 1 周即可出现胶凝现象, 因此, 选择脂质材料质量分数为 3.5%。

(5) 药物用量的考察: 以脑磷脂-泊洛沙姆 188 (1:3) 作为复配乳化剂, 用量为 3.2%, 单硬脂酸甘油酯用量为 2.0%, 加入不同药量 (5、8、10、12 mg), 按上述工艺制备, 考察不同药物用量对 SLN 包封率和稳定性的影响, 结果随着药物用量的增大, 包封率下降, 由于脂质材料与药物用量有一定的承载关系, 因此药物用量为 10 mg 时最佳。

2.3.2 正交试验优化 FA-SIL-SLN 处方 根据单因素试验得知脂质材料用量和乳化剂用量对 FA-SIL-SLN 的粒径和包封率有较大的影响。以单硬脂酸甘油酯的用量 (A)、乳化剂的用量 (B)、泊洛沙姆 188-脑磷脂的比例 (C) 及药物的用量 (D) 为考察因素, 每个因素设 3 个水平, 以包封率为筛选指标, $L_9(3^4)$ 正交设计表进行处方优化。正交试验设计及结果见表 1, 方差分析见表 2。 R 值越大表示该因素的影响越明显, 由表 1 可知各因素影响的主次顺序为 $D > B > C > A$; 由表 2 可知, 相对于因素 A, 因素 D 的影响具有显著性 ($P < 0.05$), 因素 B、C 无显著性; 最优处方为 $A_1B_1C_3D_2$, 即单硬脂酸甘油酯

表 1 正交试验设计及结果

Table 1 Design and results of orthogonal test

试验号	A / g	B / g	C	D / mg	包封率 / %
1	0.40 (1)	0.60 (1)	2 : 1 (1)	8 (1)	85.0
2	0.40 (1)	0.60 (2)	3 : 1 (2)	10 (2)	86.9
3	0.40 (1)	0.60 (3)	4 : 1 (3)	12 (3)	86.0
4	0.50 (2)	0.60 (1)	3 : 1 (2)	12 (3)	85.8
5	0.50 (2)	0.60 (2)	4 : 1 (3)	8 (1)	84.3
6	0.50 (2)	0.60 (3)	2 : 1 (1)	10 (2)	86.2
7	0.60 (3)	0.60 (1)	4 : 1 (3)	10 (2)	87.7
8	0.60 (3)	0.60 (2)	2 : 1 (1)	12 (3)	86.5
9	0.60 (3)	0.60 (3)	3 : 1 (2)	8 (1)	83.6
K_1	257.90	258.50	257.70	252.90	
K_2	256.30	257.70	256.30	260.80	
K_3	257.80	255.80	258.00	258.30	
R	1.60	2.70	1.70	7.90	

表 2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

方差来源	离均差平方和	自由度	F 值	显著性
B	1.282	2	2.392	
C	0.549	2	1.024	
D	10.859	2	20.278	$P < 0.05$
A (误差)	0.536	2		

$F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$

为 0.4 g、乳化剂为 0.6 g、泊洛沙姆 188-脑磷脂的比例为 4:1、药物用量为 10 mg。

2.3.3 FA-SIL-SLN 的制备 精密称取 0.4 g 单硬脂酸甘油酯、10 mg SIL 和 0.6 mL 膜材 FA-PEG₃₃₅₀-DSPE 的氯仿液, 加入 3 mL 无水乙醇, 水浴加热 (70 °C) 熔融, 作为油相。精密称取 0.48 g 泊洛沙姆 188, 加入 20 mL 蒸馏水中, 超声溶解, 精密称取 0.12 g 脑磷脂, 加入少量无水乙醇溶解后加入泊洛沙姆 188 中, 作为水相。将水相加热至同温度后以 10 mL/min 的体积流量滴加至油相中, 乳化 10 min 后超声分散 (600 W, 8 min), 置于 4 °C 水浴中固化, 0.22 μ m 滤膜滤过, 即得 FA-SIL-SLN 胶体溶液。

2.4 FA-SIL-SLN 形态观察

吸取 FA-SIL-SLN 1 mL, 室温下透射电镜 (TEM) 观察其形态, 结果见图 1。由 TEM 图可见, 制得的 FA-SIL-SLN 形态圆整、大小均一, 为类球形粒子。

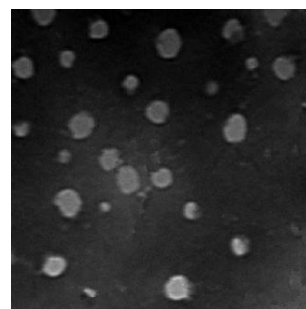


图 1 FA-SIL-SLN 透射电镜图

Fig. 1 TEM photograph of FA-SIL-SLN

2.5 FA-SIL-SLN 粒径及粒度分布测定

吸取 FA-SIL-SLN 2 mL 蒸馏水稀释至 50 mL, 取 2 mL 稀释液加入激光粒度仪的样品池中, 测定粒径大小及分布, 结果见图 2。粒度分布呈单峰, 平均粒径为 (103 ± 21) nm ($n = 5$)。

2.6 包封率、载药量的测定^[7]

2.6.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 流动相为甲醇-水-冰醋酸 (50:50:

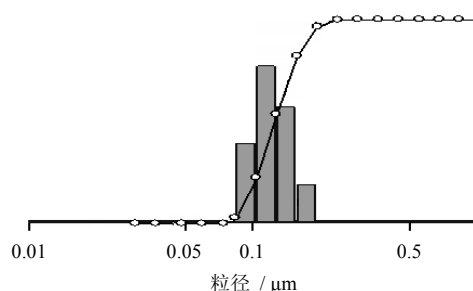


图 2 FA-SIL-SLN 粒径分布

Fig. 2 Particle size distribution of FA-SIL-SLN

0.5, 体积流量 1 mL/min, 柱温为室温, 检测波长 287 nm, 进样量 5 μ L。

2.6.2 专属性考察 分别吸取 FA-SIL-SLN 样品溶液和空白 SLN 5 μ L 进样, 得 FA-SIL-SLN 样品、空白 SLN 色谱图。吸取 SIL 对照品储备液 6 mL 置 50

mL 量瓶中, 无水乙醇稀释至刻度, 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 5 μ L 进样, 得 SIL 对照品色谱图, 结果见图 3。由结果可知, 辅料对 SIL 测定无干扰, 该检测方法的专属性符合要求。

2.6.3 线性关系考察 精密称取真空干燥至恒定质

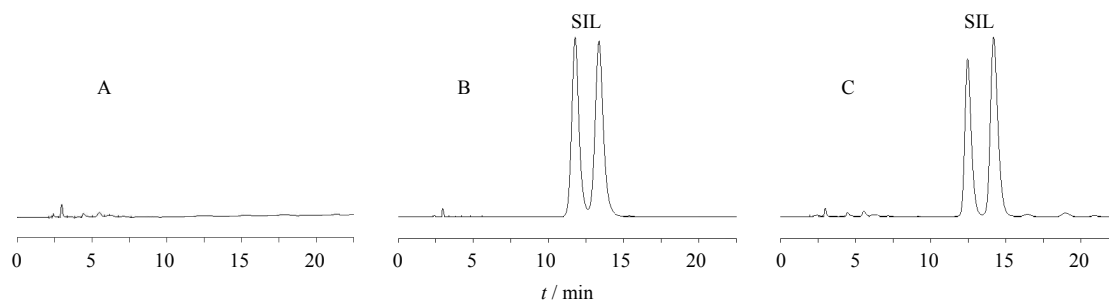


图3 空白 SLN (A)、SIL 溶液 (B) 和 FA-SIL-SLN (C) 的 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of blank SLN (A), SIL solution (B), and FA-SIL-SLN (C)

量的 SIL 对照品 5 mg, 置 50 mL 量瓶中, 无水乙醇稀释至刻度, 备用。精密量取上述溶液适量, 无水乙醇稀释至刻度, 分别配制质量浓度分别为 5、10、20、30、40、50、60 μ g/mL 的对照品溶液, 5 μ L 进样, 测定峰面积, 以峰面积为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X) 进行线性回归, 得回归方程 $Y = 811.06 X - 4139.1$, $r^2 = 0.9992$, 结果表明 SIL 在 5~60 μ g/mL 线性关系良好。

2.6.4 精密度试验 分别精密吸取质量浓度为 20、30、40 μ g/mL 的系列对照品溶液 5 μ L 进样, 测定峰面积。每隔 2 h 进样 1 次, 共测定 5 次, 计算日内精密度; 精密吸取上述对照品溶液 5 μ L 进样, 每天测定 1 次, 连续 5 d, 计算日间精密度, 结果日内精密度 RSD 分别为 0.58%、1.58%、1.34%, 日间精密度 RSD 分别为 2.91%、2.34%、1.75%。由结果可知, 各质量浓度组精密度 RSD 均小于 3%, 精密度良好, 符合方法学要求。

2.6.5 加样回收率试验 制备 3 批 FA-SIL-SLN 样品液, 按“2.6.1”项下色谱条件检测, 分别量取 1 mL SLN 样品加入质量浓度为 20、30、40 μ g/mL 的系列对照品溶液, 5 μ L 进样, 测定峰面积。按回归方程求得实际的药物质量浓度, 则该实际质量浓度与相应理论质量浓度的比值即为回收率, 结果平均回收率分别为 97.45%、97.13%、98.27%, RSD 分别为 1.07%、0.67%、0.26% ($n=3$)。由结果可知, 各质量浓度组回收率 RSD 均小于 2%, 符合方法学要求。

2.6.6 样品测定^[8] 精密量取 FA-SIL-SLN 样品液 3 mL, 置 10 mL 量瓶中, 无水乙醇稀释至刻度, 5 000

r/min 离心 10 min, 吸取上清液, 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 5 μ L 进样, 测定峰面积, 根据回归方程计算药物的量, 平行测定 3 次, 结果样品液中 SIL 平均为 0.488 mg/mL, RSD 为 0.67% ($n=3$)。

2.6.7 包封率、载药量的测定 精密吸取 FA-SIL-SLN 样品液 0.5 mL 置超滤离心管上端, 5 000 r/min 离心 10 min, 滤液置 10 mL 量瓶中, 无水乙醇稀释至刻度, 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 5 μ L 进样, 测定峰面积, 计算游离药物质量浓度, 平行测定 3 次; 另精密吸取 FA-SIL-SLN 样品液 0.5 mL 置 10 mL 量瓶中, 加入 3 mL 无水乙醇超声溶解破乳, 无水乙醇稀释至刻度, 测定药物总质量浓度, 计算包封率和载药量, 结果包封率为 $(90.73 \pm 0.33)\%$ ($n=3$), 载药量为 $(2.13 \pm 0.17)\%$ ($n=3$)。

$$\text{包封率} = 1 - C_{\text{free}} / C_{\text{total}}$$

$$\text{载药量} = W_{\text{drug}} / W_{\text{lipid}}$$

C_{free} 为游离 SIL 质量浓度, C_{total} 为胶体分散液中 SIL 总质量浓度, W_{drug} 为 SLN 中包封的药物质量, W_{lipid} 为处方中脂质的质量

2.7 体外释药特性研究

2.7.1 不同试验方法对药物释放的影响^[9-10]

(1) 正向透析法: 分别量取 FA-SIL-SLN 和 SIL 溶液 3 mL, 平行 3 份, 置于经蒸馏水浸泡处理过的透析袋内两端扎紧, 悬置于盛有 300 mL 的释放介质 (pH 7.4 PBS, 含 9 g 十二烷基硫酸钠粉末) 中, 恒温 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 转速 50 r/min, 预定时间吸取透析液, 同时补加等量、同温的释放介质。样品液用 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 采用 HPLC 法测定 SIL

的量, 计算游离药物的累积释放率, 结果见图 4。

(2) 反向透析法: 将 12 个大小形状相同, 内含 3 mL 释放介质 (pH 7.4 PBS, 含 9 g 十二烷基硫酸钠粉末) 的透析袋浸入释放介质中, 分别量取 FA-SIL-SLN 和 SIL 溶液 3 mL 加至透析袋外的释放介质中, 恒温 (37 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$, 转速 50 r/min, 预定时间各取出一个透析袋, 取出的样品液用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 采用 HPLC 法测定 SIL 的量, 计算游离药物的累积释放率, 结果见图 4。可以看出, 同等条件下, 采用正向透析法 24 h 累积释放率为 97.11%, 反向透析法 24 h 累积释放率只有 64.73%。由此可见, 反向透析法耗时较长, 释药速率偏小。正向透析法方便快捷, 释药情况良好, 能较好地模拟 FA-SIL-SLN 的释药行为。因此本试验选择正向透析扩散法进行研究。

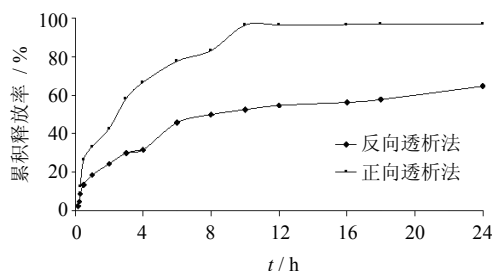


图 4 不同试验方法对药物释放的影响

Fig. 4 Effects of different methods on drug release

2.7.2 不同转速对药物释放的影响 采用正向透析法, 分别选择转速为 50、100、150 r/min, 考察转速对 FA-SIL-SLN 释放的影响, 结果见图 5。可知, 转速对 FA-SIL-SLN 的释放影响较为明显。转速越快, 相同的浓度释药越快。本试验选择转速为 50 r/min, 来更好地模拟药物在体内的释放。

2.7.3 FA-SIL-SLN 体外释药试验 分别量取 FA-SIL-SLN 和 SIL 溶液 3 mL, 平行 3 份, 置经蒸馏水浸泡处理过的透析袋内两端扎紧, 悬置盛有 300 mL 的释放介质 (pH 7.4 PBS, 含 9 g 十二烷基硫酸钠) 中, 恒温 (37 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$, 转速 50 r/min, 预定时间

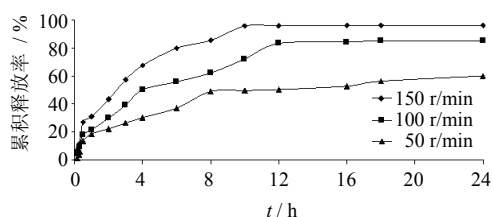


图 5 不同转速对药物释放的影响

Fig. 5 Effects of different rotating speeds on drug release

吸取透析液, 同时补加等量、同温的释放介质。样品液用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 采用 HPLC 法测定 SIL 的量, 计算游离药物的累积释放率, 结果见图 6; Origin 6.0 软件将试验结果进行拟合, 拟合方程见表 3。由图 6 可知 SLN 无突释现象, SIL 原料药在 6 h 内几乎全部释放完全, FA-SIL-SLN 在 0~8 h 累积释放达到 49.56%, 在 24 h 累积释放 65.82%, 具有良好的缓释特性, 数据经拟合符合 Weibull 方程。

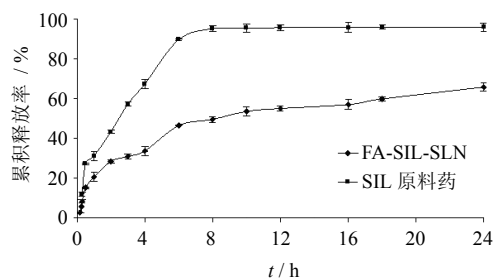


图 6 FA-SIL-SLN 和 SIL 释药特性曲线

Fig. 6 *In vitro* release curves of FA-SIL-SLN and SIL

表 3 FA-SIL-SLN 累积释药曲线的拟合方程

Table 3 Fitting equations of accumulative release curves of FA-SIL-SLN

释放模型	拟合方程	R
零级释放	$F(t) = 14.858\ 66\ t + 2.431\ 14$	0.902\ 15
一级释放	$F(t) = 11.543\ 88\ t + 5.497\ 14$	0.650\ 07
Higuchi 方程	$F(t) = 0.148\ 59\ t + 0.024\ 31$	0.902\ 15
Weibull 方程	$F(t) = -2.020\ 39\ t + 0.692\ 07$	0.963\ 51

2.8 MTT 法测定 FA-SIL-SLN 对 A549 细胞抑制率

2.8.1 细胞准备 A549 细胞用含 15% 小牛血清的无叶酸 RPMI 1640 培养液培养 (培养箱 CO_2 为 5%, 温度 $7\ ^{\circ}\text{C}$), 取对数生长期细胞用于试验, 台盼蓝拒染法检测到处于对数期的活细胞数的比例达 98% 以上, 增殖活跃。

2.8.2 MTT 法检测 FA-SIL-SLN 对 A549 细胞抑制率 取对数生长期细胞, 0.25% 胰蛋白酶消化后轻轻吹打成单细胞悬液, 调整细胞浓度为 1×10^5 个/mL, 接种于 96 孔板中, 每孔 100 μL , 共接种 2 块培养板, 置于 $37\ ^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , 饱和湿度培养箱中培养, 待细胞贴壁后, 弃去原培养液, 加入不同物质, 分组情况如下: 空白对照孔, 不接种细胞, 只加含 DMSO 的培养液、MTT 溶液; 溶剂对照孔: 接种细胞, 加含 DMSO 的培养液、MTT 溶液; 试验组 1, 接种细胞, 加入含 SIL 浓度为 25、50、100、150、200、300 $\mu\text{mol/L}$ 的 SIL 注射液 50 μL 、培养液 50 μL , 每组设 3 个复孔; 试验组 2, 接种细胞, 加入含 SIL

浓度为 25、50、100、150、200、300 $\mu\text{mol/L}$ 的 SIL-SLN 50 μL 、培养液 50 μL ，每组设 3 个复孔；试验组 3，接种细胞，加入含 SIL 浓度为 25、50、100、150、200、300 $\mu\text{mol/L}$ 的 FA-SIL-SLN 50 μL 、培养液 50 μL ，每组设 3 个复孔。同样条件分别培养 24、48 h 后，每孔加入 20 μL MTT 溶液，继续培养 4 h 后终

止培养，快速弃去上清液，每孔加入 100 μL DMSO，在水平摇床上振荡至蓝紫色结晶溶解，以空白对照孔调零，酶标仪于 490 nm 处检测各孔的吸光度 (A) 值，取 3 孔平均值，计算细胞增殖抑制率，结果见图 7。

$$\text{增殖抑制率} = 1 - A_T / A_C$$

A_T 为实验组 490 nm 处 A 值， A_C 为空白对照组 490 nm 处 A 值

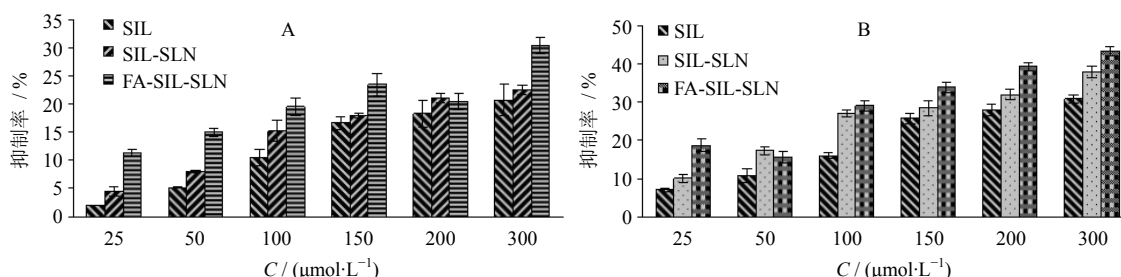


图 7 作用 24 h (A) 和 48 h (B) 的细胞抑制率

Fig. 7 Inhibitory rates after 24 h (A) and 48 h (B) treatment

由结果可知，不同浓度的 SIL 制剂作用细胞不同时间后，细胞的生长受到明显抑制作用，各浓度制剂间作用效果具有显著性差异。随着制剂浓度的增大，抑制率逐渐升高。而在制剂浓度相同条件下，随着作用时间的延长，细胞的生长抑制作用也更为明显，可以看出 SIL 制剂对 A549 细胞的生长抑制作用呈现明显的量效和时效关系。不同制剂对细胞抑制作用也具有明显差异，SLN 比溶液制剂更易被细胞摄取；由于叶酸与肿瘤细胞表面的叶酸受体特异性结合，FA-SIL-SLN 对细胞的抑制作用强于溶液制剂与 SLN。

2.9 FA-SIL-SLN 对 A549 细胞周期的影响

取对数生长期细胞，0.25%胰蛋白酶消化后轻轻吹打成单细胞悬液，调整细胞浓度为 1×10^5 个/mL，接种于 24 孔板中，待细胞贴壁后分别加入 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 SIL 溶液剂、SIL-SLN、FA-SIL-SLN 及 0.05% DMSO 对照组，每组设 3 个复孔，继续培养 24 h 后，胰酶消化制备成单细胞悬液，PBS 洗涤 2 次，取重悬的细胞 1 000 g 离心 (1 000 r/min) 5 min，加入预冷 70%乙醇固定过夜，离心去固定液，PBS 洗涤 2 次，按试剂盒说明操作，流式细胞仪分析细胞周期，结果见表 4 和图 8。FCM 检测显示，与对照组相比，100 $\mu\text{mol/L}$ SIL 溶液剂、SIL-SLN、FA-SIL-SLN 作用于 A549 细胞 24 h 后，可改变细胞周期的分布。 G_1 期比例明显增加， G_2 期比例明显减少，S 期比例也明显减少。

3 讨论

在 FA 与 $\text{H}_2\text{N-PEG}_{3350}\text{-NH}_2$ 室温顺序加样酰化

表 4 SIL 不同制剂对 A549 细胞周期的影响

Table 4 Effects of different SIL preparations on cell cycle of A549

组别	G_1 期 / %	G_2 期 / %	S 期 / %
SIL 溶液	14.83 ± 0.33	39.91 ± 0.45	10.32 ± 0.65
SIL-SLN	16.71 ± 0.41	31.01 ± 0.21	8.49 ± 0.34
FA-SIL-SLN	16.98 ± 0.52	22.06 ± 0.71	8.29 ± 0.11
对照	13.37 ± 0.70	30.28 ± 0.58	10.36 ± 0.31

反应实验中，考虑到即使 $\text{H}_2\text{N-PEG}_{3350}\text{-NH}_2$ 过剩，与下一步反应中的产物 SUC-DSPE 生成副产物 PEG-DSPE，也不会影响制剂的性质，掺入了部分 PEG-DSPE 反而能够增加药物的水化膜，延长药物在体内的作用时间，增加药物半衰期^[11]，故本次实验中省略去除过剩 $\text{H}_2\text{N-PEG}_{3350}\text{-NH}_2$ 的步骤，以简化反应条件，反应最终产物中存在 PEG-DSPE、FA-PEG-DSPE。

由于 SIL 不溶于水，在普通释放介质中仅能测到微量的药物，而在释放介质中加入增溶剂十二烷基硫酸钠，即可达到漏槽条件。从释放曲线上可以看出 SLN 0.5 h 释放的 13.41% 药物可能是由于位于 SLN 表面或近表面的药物快速释放，此后 24 h 内可能为药物分子通过 SLN 表面孔道释放。根据此结果预测，本实验所制备的 FA-SIL-SLN 是一个药物与脂质的骨架结构，由于 SLN 比表面积大，药物分子可能一部分吸附在 SLN 的表面，另一部分镶嵌在脂质骨架中，形成固体溶液，随着脂质骨架的溶蚀，药物分子缓慢而持续地释放。

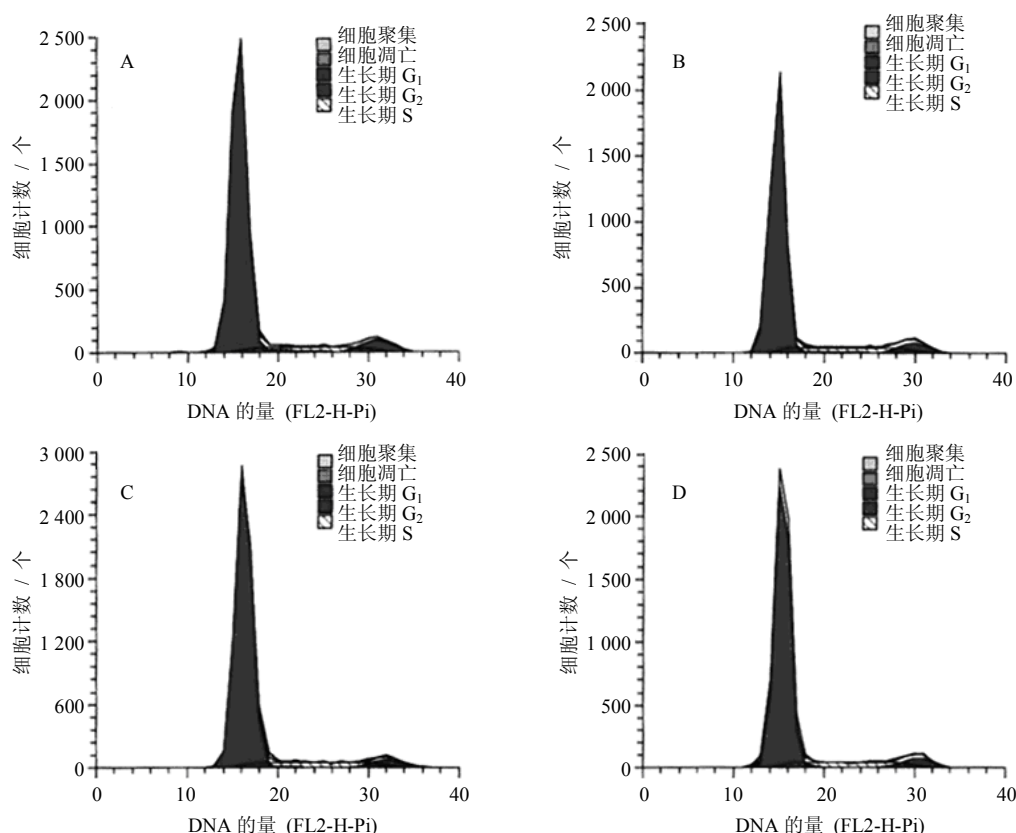


图8 SIL溶液剂(A)、SIL-SLN(B)、FA-SIL-SLN(C)及0.05% DMSO(D)对A549细胞周期的影响

Fig. 8 Effects of SIL-solution (A), SIL-SLN (B), FA-SIL-SLN (C), and 0.05% DMSO (D) on cell cycle of A549

MTT 试验表明 FA-SIL-SLN 对 A549 细胞的增殖抑制效果优于 SIL 溶液剂和 SIL-SLN, 原因为 FA-SIL-SLN 在叶酸的介导作用下进入细胞速率增大, 单位时间进入细胞的药物总量增加, 因而相同作用时间内, 与 SIL 溶液剂和 SIL-SLN 相比, 药物进入细胞的总量也较高。此点在以后的实验中可通过其他实验技术如激光共聚焦或游离叶酸竞争抑制实验方法来观察 FA-SIL-SLN 对 A549 细胞疗效显著提高是否为叶酸介导所致。

参考文献

- [1] Klibanov A L, Maruyama K, Torchilin V P, *et al.* Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes [J]. *FEBS Lett*, 1990, 268(1): 235-237.
- [2] Wu J, Liu Q, Lee R J. A folate receptor-targeted liposomal formulation for paclitaxel [J]. *Int J Pharm*, 2006, 316(1/2): 148-153.
- [3] Yoo H S, Park T G. Folate-receptor-targeted delivery of doxorubicin nano-aggregates stabilized by doxorubicin-PEG-folate conjugate [J]. *J Controlled Release*, 2004, 100(2): 247-256.
- [4] Stephenson S M, Low P S, Lee R J. Folate receptor-mediated targeting of liposomal drugs to cancer cells [J]. *Methods Enzymol*, 2004, 387: 33-50.
- [5] Lee E S, Na K, Bae Y H. Polymeric micelle for tumor pH and folate-mediated targeting [J]. *J Controlled Release*, 2003, 91(1/2): 103-113.
- [6] Lee R J, Low P S. Folate-mediated tumor cell targeting of liposome-entrapped doxorubicin *in vitro* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1233(2): 134-144.
- [7] 郝吉福, 房信胜, 王建筑, 等. 应用 Box-Behnken 实验设计优化水飞蓟素固体脂质纳米粒处方研究 [J]. *中草药*, 2011, 42(11): 2221-2225.
- [8] 定天明, 田颂九, 张正行, 等. 水飞蓟素制剂中有效成分 HPLC 分离测定 [J]. *药物分析杂志*, 1999, 19(5): 304-307.
- [9] Song Y, Zhuang J, Guo J, *et al.* Preparation and properties of a silybin-phospholipid complex [J]. *Pharmazie*, 2008, 63(1): 35-42.
- [10] 邓树海. 现代药物制剂技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [11] 张良珂, 候世祥, 毛声俊, 等. 叶酸偶联白蛋白纳米粒肿瘤细胞靶向性研究 [J]. *四川大学学报: 医学版*, 2004, 35(2): 165-168.