

黄芩苷纳米胶束的制备、表征及其对 MCF-7 细胞抑制作用的研究

马文转^{1,2}, 王金铃^{1*}, 屠鹏飞^{1*}

1. 北京中医药大学 中药现代研究中心, 北京 100029

2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102

摘要: 目的 制备黄芩苷(baicalin, BCN)聚乙二醇维生素 E 琥珀酸酯(TPGS)纳米胶束(BCN-TPGS-PMs)以改善其溶解性和体外抗肿瘤效果。方法 采用薄膜水化法制备 BCN-TPGS-PMs; 透射电子显微镜观察纳米胶束形态; 粒度测定仪考察其粒径和 Zeta 电位; 超速离心法考察制剂的包封率及载药量; 动态膜透析法考察体外释药特性; 四甲基偶氮唑盐(MTT)法考察其对人乳腺癌细胞(MCF-7)的抑制作用。结果 所制备的 BCN-TPGS-PMs 平均粒径为 (11.91 ± 0.14) nm; 载药量和包封率分别为 $(5.42 \pm 0.04)\%$ 和 $(95.83 \pm 7.34)\%$; 在体外 pH 7.4、6.5 的磷酸盐缓冲液(PBS)中 24 h 内分别释放 28.53% 和 35.06%; 表明所制备胶束粒径较小且均一, 体外释放具有一定缓释性。同时体外细胞毒性实验表明 BCN-TPGS-PMs 较 BCN 能够显著地抑制 MCF-7 细胞的增殖 ($P < 0.05$)。结论 所制备的 BCN-TPGS-PMs 粒径小, 载药量高, 稳定性好, 能显著提高 BCN 的体外抗肿瘤效果。

关键词: 黄芩苷; 纳米胶束; 聚乙二醇维生素 E 琥珀酸酯; 薄膜水化法; 抗肿瘤; MTT 法

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)04-0507-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.04.009

Preparation and characterization of baicalin-loaded polymeric micelles and its inhibition on MCF-7 cells

MA Wen-zhuan^{1,2}, WANG Jin-ling¹, TU Peng-fei¹

1. Modern Research Center for Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Abstract: **Objective** To prepare baicalin-loaded TPGS nanomicelles (BCN-TPGS-PMs) and to evaluate its physicochemical properties, *in vitro* release behavior, and antitumor activity against MCF-7 cells. **Methods** BCN-TPGS-PMs were prepared by film-thin hydration method. The preparation methods and formulations were optimized and screened based on particle size and encapsulation efficiency (EE) of micelles. The transmission electron microscope (TEM) was used to observe the particle appearance, zetasizer instrument was used to detect the diameter and Zeta potential, and ultracentrifugation was utilized to determine the EE and drug-loading rate. Dynamic dialysis method was used to study the *in vitro* release behavior of BCN-TPGS-PMs, and the antitumor activity against MCF-7 cells was determined by MTT method. **Results** The optimal BCN-TPGS-PMs were round with the nanometric size of (11.91 ± 0.14) nm, high EE rate of $(95.83 \pm 7.34)\%$, and drug-loading rate of $(5.42 \pm 0.04)\%$. The *in vitro* release behavior showed that BCN-TPGS-PMs had a slow release. Compared with free BCN, BCN-TPGS-PMs showed stronger cytotoxicity and inhibition against MCF-7 cells ($P < 0.05$). **Conclusion** The prepared BCN-TPGS-PMs have small particle size, high drug-loading rate, and good stability, and could obviously increase the *in vitro* inhibitory effect of BCN.

Key words: baicalin; micelles; TPGS; thin film hydration method; antitumor; MTT method

黄芩苷(baicalin, BCN)为中药黄芩的主要活性成分, 现代药理学研究表明, 黄芩苷具有抗菌、抗病毒、清除氧自由基、抗氧化、解热、镇痛、抗炎、抗肿瘤、保护心脑血管及神经元、保肝、预防或治疗糖尿病及其并发症等作用^[1]。近几年, 对其抗肿瘤的研究颇为广泛^[2-5]。体内外实验表明, 黄芩

收稿日期: 2014-08-25

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金(20130013120008)

作者简介: 马文转(1989—), 女, 在读硕士研究生, 从事中药制剂及新型纳米给药系统研究。Tel: 18811527935 E-mail: mwz0115@163.com

*通信作者 王金铃, 助理研究员, 研究方向为中药药剂及新型纳米给药系统研究。Tel: (010)64286180 E-mail: wangjinling22@163.com

屠鹏飞, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为中药活性成分及新药研究。Tel: (010)82802750 E-mail: pengfeitu@163.com

苷可抑制多种肿瘤细胞的增殖, 具有明显的抗肿瘤活性。但较低的水溶性及脂溶性会影响药物的体内吸收, 进而影响其临床疗效。而黄芩苷的水溶性和脂溶性均较差, 因而通过改善黄芩苷的水溶性及脂溶性, 将会增加其体内吸收进而提高其临床疗效。目前有研究利用环糊精包合、固体分散体、磷脂复合物、纳米粒等新技术解决黄芩苷水溶性差的问题, 但存在工艺复杂、载药量低等问题^[6-9]。

聚合物胶束是两亲性共聚物在水中自组装形成的纳米级核壳结构, 不但可以提高疏水性药物的溶解性, 而且可以降低药物被网状内皮系统识别和摄取的机会, 通过增强渗透滞留效应 (enhanced permeability and retention effect, EPRE), 实现被动靶向^[10-12]。因而本课题以聚乙二醇维生素 E 琥珀酸酯 (TPGS) 为载体材料, 采用薄膜水化法制备黄芩苷纳米胶束, 对纳米胶束的制剂学性质及体外抗肿瘤活性进行考察, 为黄芩苷新剂型的研究奠定基础。

1 仪器与材料

Bio-RAD680 酶标仪, 美国 Bio-RAD 公司; Eppendorf 高速离心机, 德国艾本德责任有限公司; Agilent 1260 高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; Nano-ZS 型粒度测定仪, 英国 Malvern 公司; H-600 型透射电镜, 日本 Hitachi 公司。

聚乙二醇维生素 E 琥珀酸酯 (TPGS), 美国 Sigma 公司; 黄芩苷对照品, 批号 110715-200514, 质量分数 >98%, 中国食品药品检定研究院; 黄芩苷原料药, 质量分数 >95%, 批号 20120806, 南京泽郎医药科技有限公司; 人乳腺癌细胞系 (MCF-7 细胞), 南京凯基生物技术有限公司; 胎牛血清、胰蛋白酶、1640 培养基、磷酸盐缓冲液 (PBS), 均购自美国 Hyclone 公司; 透析袋, 截留相对分子质量为 7 000, 美国 Viskase 公司; 所用有机溶剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 纳米胶束的制备

采用薄膜水化法制备空白纳米胶束及载药胶束。准确称取 TPGS 100 mg, 溶解于 4 mL 甲醇溶液, 加入不同体积的黄芩苷的甲醇溶液 (1 mg/mL), 充分混匀后旋转蒸发除去有机溶剂, 使其在瓶壁上形成一层均匀的脂膜, 加入 4 mL PBS, 于 37 °C 磁力搅拌 4 h。12 000 r/min 离心 10 min 取上清液即得澄清透明胶束溶液, 即为黄芩苷聚乙二醇维生素 E 琥珀酸酯纳米胶束 (BCN-TPGS-PMs)。

2.2 分析方法的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.5%磷酸水溶液 (25:75, 三乙胺调 pH 值至 4.0); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 °C; 检测波长 275 nm; 进样量 10 μL。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取黄芩苷对照品 10 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得到 1 mg/mL 的对照品储备液。

2.2.3 供试品溶液的制备 分别量取适量 BCN-TPGS-PMs 溶液和空白胶束溶液, 加入 10 倍甲醇稀释, 超声 (200 W, 40 kHz, 10 min) 破乳, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取滤液。

2.3 纳米胶束包封率及载药量的测定

将制备的载药胶束经高速冷冻离心机 12 000 r/min 离心 (4 °C) 10 min, 除去游离药物, 上清液即为载药胶束。分别量取一定体积离心前、后的胶束溶液, 加入 10 倍体积甲醇溶解、超声破坏纳米胶束的结构, 测定胶束中药物的量, 计算包封率。同时将一定体积离心后的上清胶束溶液冷冻干燥, 然后称质量, 并用甲醇溶解测定所含药物量, 计算载药量。

$$\text{包封率} = M_0 / M$$

$$\text{载药量} = M_1 / M_2$$

M 为所制备的初始胶束 (离心前) 中药物的量, M_0 为离心后胶束上清液中药物的量, M_1 为冻干胶束中药物的量, M_2 为冻干胶束的质量

2.4 方法专属性

分别量取适量黄芩苷对照品、BCN-TPGS-PMs 溶液和空白胶束溶液, 加入 10 倍甲醇稀释, 超声 (200 W, 40 kHz, 10 min) 破乳, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取滤液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定。黄芩苷色谱峰峰形良好, 辅料和溶剂对药物测定无干扰 (图 1)。

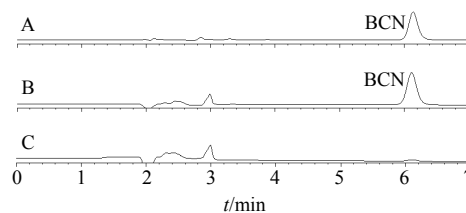


图1 黄芩苷 (A)、BCN-TPGS-PMs (B) 和空白 PMs (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of BCN (A), BCN-TPGS-PMs (B), and blank PMs (C)

2.5 线性关系考察

精密称取黄芩苷对照品 10 mg, 置于 10 mL 棕色量瓶中, 用甲醇溶解, 稀释至刻度, 配制成质量浓度为 1 mg/mL 的黄芩苷对照品储备液。分别精密量取黄芩苷对照品储备液适量, 加甲醇稀释成质量浓度分别为 100.0、50.0、20.0、10.0、5.0、2.0、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 以峰面积积分值 (Y) 对质量浓度 (X) 进行线性回归, 得黄芩苷回归方程 $Y=31.584 X+0.242 8$, $r=0.999 9$, 结果表明黄芩苷在 1~100 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积呈良好的线性关系。

2.6 精密度试验

取低、中、高 (1.0、10.0、100.0 $\mu\text{g/mL}$) 3 个质量浓度的黄芩苷对照品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 分别于 1 d 内测定 6 次, 连续测定 3 d, 计算得日内和日间精密度的 RSD 分别为 1.34%、1.07%、1.33% 和 2.35%、2.86%、1.36%, 符合方法学要求。

2.7 稳定性试验

取同一批次制备的 BCN-TPGS-NPs 溶液, 加入 10 倍甲醇溶液稀释, 超声, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取滤液分别于 0、2、4、8、6、12、24 h 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 结果 RSD 为 1.12%, 符合方法学要求。

2.8 重复性试验

取同一批次制备的 BCN-TPGS-PMs 溶液 6 份, 分别加入 10 倍甲醇溶液稀释, 超声, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取滤液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 结果 RSD 为 1.47%, 符合方法学要求。

2.9 回收率试验

吸取 1 mL 空白 NPs 溶液于 10 mL 棕色量瓶中, 分别精密加入黄芩苷对照品适量, 用甲醇稀释至刻度, 配成低、中、高 (1、10、100 $\mu\text{g/mL}$) 3 个质量浓度的样品溶液。经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取滤液按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 计算得平均回收率分别为 (99.70 $\pm$ 1.74)%、(99.17 $\pm$ 0.88)%、(101.18 $\pm$ 0.14)% ($n=3$), 符合方法学要求。

2.10 制剂处方工艺的优化

对纳米胶束制备过程中的 3 个因素: 水化时间、水化温度和药物与载体比例对纳米胶束性质的影响进行考察。

2.10.1 水化时间的影响 固定药物与载体比例, 分别考察不同水化时间下, 所制备胶束的粒径、包封

率变化 (表 1)。从表 1 中可以得出, 水化时间对胶束的粒径影响不大, 从 3 h 开始已趋于平衡, 且黄芩苷纳米胶束的包封率随水化时间的增加有所增大, 在 4 h 时包封率最高, 综合考虑, 选择 4 h 为水化时间。

表 1 水化时间对胶束的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effect of different hydration time on micelles ($\bar{x} \pm s, n=3$)

水化时间/h	粒径/nm	包封率/%
1	17.66 $\pm$ 1.11	87.23 $\pm$ 2.21
2	16.93 $\pm$ 1.35	90.35 $\pm$ 2.48
3	12.77 $\pm$ 1.69	92.67 $\pm$ 2.12
4	11.78 $\pm$ 1.55	95.18 $\pm$ 3.25
5	12.33 $\pm$ 1.34	90.33 $\pm$ 4.23
6	12.65 $\pm$ 1.78	90.25 $\pm$ 2.18

2.10.2 水化温度的影响 固定药物与载体比例, 分别考察不同水化温度下, 所制备胶束的粒径、包封率变化 (表 2)。随着水化温度的增加, 胶束的粒径逐渐增加, 包封率逐渐降低且较高的水化温度对药物和载体材料稳定性会产生一定影响, 基于以上考虑, 选择接近于人体温度 37 $^{\circ}\text{C}$ 为水化温度。

表 2 水化温度对胶束的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of different hydration temperature on micelles ($\bar{x} \pm s, n=3$)

水化温度/ $^{\circ}\text{C}$	粒径/nm	包封率/%
37	11.66 $\pm$ 1.33	97.23 $\pm$ 3.28
50	19.93 $\pm$ 1.25	85.35 $\pm$ 3.33
60	25.77 $\pm$ 1.12	82.67 $\pm$ 3.55

2.10.3 药物与载体比例的影响 选取 6 个不同的药物与载体比例, 并对其载药量、包封率、粒径及 Zeta 电位进行考察 (表 3)。从结果中可以看出固定载体质量为 100 mg 时, 当药物质量小于 8 mg 时, 药物包封率均较高 (均高于 90% 以上), 但药物质量大于 8 mg 时, 随着药物质量的增加, 包封率随之降低, 当药物质量为 20 mg 时, 包封率下降至约 70%, 主要是由于疏水性内核中的药物达到了饱和。另外从稳定性方面考察, 当药物质量为 8 mg 时, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 存放第 3 天时便开始出现絮状沉淀, 通过液相色谱测定其量, 发现其量显著下降。而药物为 4、6 mg 时在 4 $^{\circ}\text{C}$ 存放 30 d 稳定性良好。因此, 综合考虑纳米胶束的包封率、载药量及稳定性, 最终选

表3 药物与载体比例对胶束的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 3 Drug carrier ratio on micelles ($\bar{x} \pm s, n=3$)

药物-载体	载药量/%	包封率/%	粒径/nm	Zeta 电位/mV
4:100	3.78±0.08	94.14±3.85	11.32±1.05	-1.23±0.13
6:100	5.42±0.04	95.83±7.34	11.91±1.14	-0.20±0.04
8:100	7.21±0.01	91.60±5.48	12.09±1.03	-0.35±0.11
10:100	9.12±0.34	85.60±4.36	12.78±1.05	-1.01±0.23
15:100	11.23±0.48	78.44±5.12	11.55±1.21	-0.35±0.14
20:100	15.73±0.56	70.63±4.89	12.24±1.34	-0.67±0.21

择药物与载体的比例为6:100。

综合考虑纳米胶束的粒径、包封率、载药量及稳定性,选择纳米胶束的制备工艺为100 mg TPGS溶于适量甲醇溶液,待材料完全溶解后加入1 mg/mL的黄芩苷甲醇溶液6 mL,混匀后,旋转蒸发除去有机溶剂,形成均匀的脂膜,加入4 mL PBS洗下脂膜,37℃磁力搅拌4 h,12 000 r/min离心(4℃)10 min,取上清即为纳米胶束。所制备纳米胶束的平均粒径为(11.91±0.14) nm;载药量和包封率分别为(5.42±0.04)%和(95.83±7.34)%,Zeta电位为(-0.20±0.04) mV。

2.11 纳米胶束的粒径、Zeta 电位及形态

取适量 BCN-TPGS-PMs 溶液,蒸馏水稀释,Nano-ZS 型粒径分析仪测定平均粒径及 Zeta 电位。将 BCN-TPGS-PMs 滴至覆有支持膜的铜网上,用1%乙酸双氧铀染色剂染色,用滤纸吸走多余的液体,自然晾干后,透射电子显微镜(TEM)观察其形态。胶束的粒径大小及粒径分布是影响微粒分散体系物理稳定性以及体内传递行为的重要因素。采用 Nano-ZS 型粒度测定仪测得制备的空白胶束的平均粒径和电位分别为(12.41±0.05) nm 和(-1.13±0.132) mV;载药胶束的平均粒径和电位分别为(11.91±0.14) nm 和(-0.20±0.04) mV。从图2中可以看出,胶束的粒径较小且分布较窄。同时透射电镜结果表明所制备的载药胶束大小均匀,形态呈球形或椭圆形(图3)。合适的粒径能增加胶束在肿瘤组织中的分布,减少肝脏摄取和避免肾脏滤过,从而延长血液循环时间。纳米胶束的 Zeta 电位均趋向于0 mV,主要是由于亲水性的聚乙二醇(PEG)链能在纳米胶束的外层形成中性的 PEG 水化层,降低纳米胶束的电负性,能避免网状内皮系统的吞噬,延长血液循环时间。

2.12 体外释放研究

分别取1 mg/mL的胶束溶液剂及黄芩苷原料药

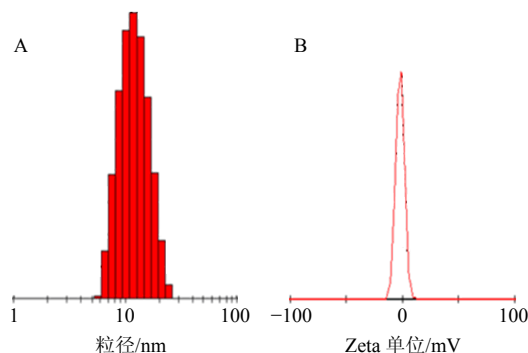


图2 BCN-TPGS-PMs 的粒径 (A) 和 Zeta 电位 (B) 图
Fig. 2 Distribution of particle size (A) and Zeta potential (B) of BCN-TPGS-PMs

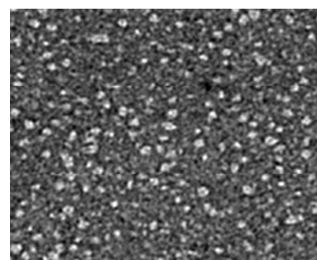


图3 BCN-TPGS-PMs 的 TEM 图
Fig. 3 TEM photograph of BCN-TPGS-PMs

溶液1 mL放入到预先处理好的透析袋中,并将透析袋置于50 mL释放介质中,即pH 6.5磷酸盐缓冲液(PBS)及pH 7.4 PBS,含0.5%聚山梨酯80,于(37.0±0.5)℃恒温水浴振荡(100 r/min),分别于0.5、1、2、4、6、8、10、12、24 h取样1 mL,并补充同温等量释放介质。样品用0.22 μm微孔滤膜滤过,取滤液按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,计算累积释放率,绘制释药曲线(图4)。

控制和延缓药物的释放可提高药物的疗效,因而药物的释放速率是评价药物传递系统的一个重要指标。肿瘤细胞外与血液和正常组织相比pH值更低,血液pH值为7.4,肿瘤细胞外液pH值为6.5,因而考察载药纳米胶束在pH 7.4、6.5缓冲液中的释放情况来模拟纳米胶束在生理条件及肿瘤细胞外液的释放。从图4中可以看出黄芩苷溶液在2种pH值条件下4 h几乎全部释放,释放量达98%以上,表明透析袋对药物没有截留作用。而载药胶束在pH 7.4生理条件下释放缓慢只有28.53%,表明药物主要包裹于胶束疏水内核中,以胶束的形式存在。在pH 6.5条件下释放35.06%,虽然较pH 7.4释放较快,但是释放量仍然很少,表明纳米胶束在到达肿瘤位点之前,在血液循环中能保持完整的胶束结构

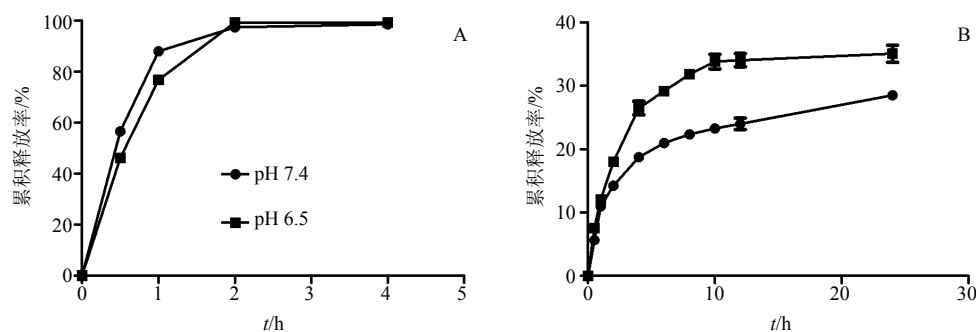


图4 黄芩苷 (A) 与 BCN-TPGS-PMs (B) 在不同 pH 值下的体外释放曲线 ($n=3$)

Fig. 4 *In vitro* release curves of BCN (A) and BCN-TPGS-PMs (B) in different pH values ($n=3$)

而较少的释放药物,从而表明所制备的纳米胶束稳定性良好。

2.13 体外抗肿瘤活性研究

将状态良好的 MCF-7 细胞用胰酶消化,用培养液稀释至细胞密度为 5×10^4 个/mL,吹匀后于 96 孔板中每孔加入细胞悬液 100 μ L,置培养箱中孵育 24 h 使其贴壁。待细胞贴壁后加药。本实验中药物溶液与胶束的配制和稀释均用不含胎牛血清的 1640 培养液。受试溶液每孔加入 100 μ L,每个浓度 3 个平行孔;对照组不加待测药液,单一补加 100 μ L 培养液,置培养箱中和细胞共同孵育。于加药后 24、48、72 h,将 96 孔板取出,每孔加入 2 mg/mL MTT 溶液 50 μ L,置培养箱中孵育 4 h 后甩板,将 96 孔板倒扣于滤纸上充分吸干残留液体后,每孔加入 200 μ L DMSO 于振荡器上振荡 10 min 溶解蓝紫色结晶物。设定 A1 孔 (只含有 200 μ L DMSO) 为调零孔。使用酶标仪在 570 nm 处测定各孔调零后的吸光度值。

BCN-TPGS-PMs 及黄芩苷的体外细胞抑制实验结果见表 4,从结果中可以看出,黄芩苷和 BCN-TPGS-PMs 对肿瘤细胞均具有一定的抑制作用,黄

芩苷及 BCN-TPGS-PMs 处理细胞 24、48、72 h 后, MCF-7 细胞存活率降低,并呈浓度与时间依赖性。从表 4 中可以看出,黄芩苷在 2~100 μ g/mL, 24 h 时黄芩苷抑制率从 16% 升至 52%,而 BCN-TPGS-PMs 的抑制率从 26% 升至 60%; 48 h 时黄芩苷的抑制率从 30% 升至 57%,而 BCN-TPGS-PMs 的抑制率从 37% 升至 64%; 72 h 时黄芩苷抑制率从 33% 升至 63%, BCN-TPGS-PMs 抑制率从 41% 升至 72%。表明与黄芩苷相比,随着时间的延长和浓度的增加 BCN-TPGS-PMs 组对 MCF-7 细胞的抑制率均显著高于黄芩苷组。同时应用 GraphPad prism 5.0 软件拟合数据计算 BCN-TPGS-PMs 组及黄芩苷组对 MCF-7 细胞的 IC_{50} 值,如表 5 所示,黄芩苷在 24、48 及 72 h 时的 IC_{50} 值分别为 49.84、23.24 和 20.34 μ g/mL, BCN-TPGS-PMs 的 IC_{50} 值分别为 24.06、8.50 和 5.66 μ g/mL, 综上可以看出在同一时间点 BCN-TPGS-PMs 的 IC_{50} 值明显低于 BCN 的 IC_{50} 值,表明黄芩苷包裹于胶束中,能显著提高其抗肿瘤效果。

BCN-TPGS-PMs 提高黄芩苷抑制肿瘤细胞生长的原因可能是 ① 粒径较小,能通过 EPRE 效应

表4 黄芩苷与 BCN-TPGS-PMs 处理 24 (A)、48 (B) 和 72 h (C) 后对 MCF-7 细胞的抑制率 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 4 Inhibitory rates of BCN and BCN-TPGS-PMs on MCF-7 cells after 24 (A), 48 (B), and 72 h (C) treatment ($\bar{x} \pm s, n=5$)

质量浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	24 h 抑制率/%		48 h 抑制率/%		72 h 抑制率/%	
	黄芩苷	BCN-TPGS-PMs	黄芩苷	BCN-TPGS-PMs	黄芩苷	BCN-TPGS-PMs
2	16.49 ± 0.61	$26.14 \pm 0.21^{**}$	30.65 ± 0.65	$37.42 \pm 0.33^*$	33.65 ± 0.39	$41.37 \pm 0.98^*$
5	18.38 ± 1.60	$31.33 \pm 0.76^{**}$	33.87 ± 0.25	$42.86 \pm 0.29^*$	36.55 ± 0.73	$47.38 \pm 0.26^*$
10	30.39 ± 0.90	$41.89 \pm 0.35^{**}$	44.79 ± 0.21	$57.06 \pm 0.37^*$	42.54 ± 2.42	$57.98 \pm 0.33^*$
20	50.07 ± 0.80	$52.59 \pm 0.49^*$	55.45 ± 1.12	$59.36 \pm 0.30^*$	50.08 ± 0.40	$59.31 \pm 0.25^*$
50	51.66 ± 0.75	$58.71 \pm 0.47^*$	56.34 ± 0.77	$61.62 \pm 0.20^*$	58.47 ± 3.32	$65.65 \pm 0.45^*$
100	52.16 ± 0.25	$60.54 \pm 0.56^*$	57.37 ± 1.52	$64.15 \pm 0.26^*$	63.22 ± 0.14	$72.13 \pm 0.45^*$

与黄芩苷组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs BCN group

表5 BCN和BCN-TPGS-PMs对MCF-7细胞的 IC_{50} 值
Table 5 IC_{50} of BCN and BCN-TPGS-PMs for MCF-7 cells

剂型	$IC_{50}/(\mu g \cdot mL^{-1})$		
	24 h	48 h	72 h
黄芩苷	49.84	23.24	20.34
BCN-TPGS-PMs	24.06	8.50	5.66

而靶向到肿瘤部位;② 黄芩苷被包载在疏水性内核中,增加了水溶性,能更好地发挥药效;③ 胶束表面 PEG 所形成的水化层能降低调理素等血浆蛋白的吸附而避免被单核巨噬细胞吞噬。

3 讨论

本研究以 TPGS 为载体材料,以难溶性抗肿瘤药物黄芩苷为模型药物,制备纳米胶束。所制备的纳米胶束粒径小,包封率及载药量高,在体外释放缓慢,具有较好的制剂学性质。同时体外细胞实验结果表明,黄芩苷纳米胶束对 MCF-7 细胞的抑制效果显著高于黄芩苷溶液。图 5 为黄芩苷纳米胶束的形成示意图,PEG 作为黄芩苷纳米胶束的亲水性外壳,能延长胶束的血液循环时间,降低肝肾的摄取,在胶束表面形成水化层而阻止血浆调理素等蛋白吸附在胶束表面而避免被网状内皮系统吞噬;维生素 E 琥珀酸酯(VES)形成疏水性内核将黄芩苷包裹于其中,进而增加黄芩苷的溶解度和渗透性,能通过 EPR 效应进入到肿瘤中,增加药物的体内生物利用度而提高疗效。为黄芩苷对乳腺癌的治疗开辟了新途径。

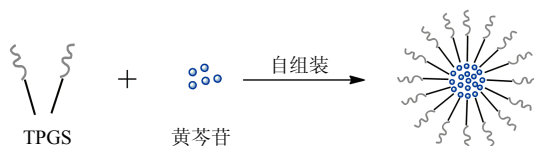


图5 BCN-TPGS-PMs 的形成示意图

Fig. 5 Formation of BCN-TPGS-PMs

综合国内外文献,目前,主要采用环糊精包合、固体分散体、磷脂复合物、纳米粒等新技术来解决黄芩苷水溶性差、肿瘤治疗疗效差的问题,具有一定的优势,但存在工艺复杂、载药量低等局限^[6-9]。尚未见报道将黄芩苷制备成纳米胶束的研究,因此,本研究尝试将黄芩苷制备成粒径小、载药量高、稳定性好的纳米胶束,以期黄芩苷新剂型的研究奠定基础。

但本研究仍有不足,仅在细胞水平上考察了所

制备胶束的肿瘤抑制作用,并没有在动物水平考察其体内药效,这方面研究有待进一步开展。

参考文献

- [1] 辛文好,宋俊科,何国荣,等. 黄芩素和黄芩苷的药理作用及机制研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2013, 22(6): 647-659.
- [2] Ikemoto S, Sugimura K, Kuratukuri K, *et al.* Antitumor effects of lipoxigenase inhibitors on murine bladder cancer cell line (MBT-2) [J]. *Anticancer Res*, 2004, 24(2B): 733-738.
- [3] Wang N, Tang L J, Zhu G Q. Apoptosis induced by baicalin involving up-regulation of P53 and bax in MCF-7 cells [J]. *J Asian Prod Res*, 2008, 10(11/12): 1129-1235.
- [4] Chen J, Li Z, Chen A Y. Inhibitory effect of baicalin and baicalein on ovarian cancer cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(3): 6012-6025.
- [5] Wang X F, Zhou Q M, Du J. Baicalin suppresses migration, invasion and metastasis of breast cancer via p38MAPK signaling pathway [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2013, 13(6): 923-931.
- [6] Liu Z D, Zhang X H, Wu H Y, *et al.* Preparation and evaluation of solid lipid nanoparticles of BCN for ocular drug delivery system *in vitro* and *in vivo* [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2011, 37(4): 475-481.
- [7] Chen Y J, Jia Y, Jin R X, *et al.* Preparation of BCN flexible nano-liposomes [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formula*, 2011, 17(5): 1-4.
- [8] Wang C, Zhao X M, Hao J F, *et al.* The process on new technology and novel dosage form to improve the bioavailability of BCN [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2012, 34(3): 545-549.
- [9] 严红梅,张振海,蒋艳荣,等. 黄芩苷-Eudragit L100-55 肠溶固体分散体制备及其体外释放度评价 [J]. 中草药, 2013, 44(20): 2841-2844.
- [10] Mikhail A S, Allen C. Block copolymer micelles for delivery of cancer therapy: transport at the whole body, tissue and cellular levels [J]. *J Controlled Release*, 2009, 138(3): 214-223.
- [11] Nishiyama N, Kataoka K. Current state, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery [J]. *Pharmacol Therapeut*, 2006, 112(3): 630-648.
- [12] Guo M, Yan Y, Liu X, *et al.* Multilayer nanoparticles with a magnetite core and a polycation inner shell as pH-responsive carriers for drug delivery [J]. *Nanoscale*, 2009, 2(3): 434-441.