

溴化双十二烷基二甲基铵修饰的载汉防己甲素聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒制备及体外评价

傅德皓¹, 郑思维², 陈春生², 史琛^{2*}

1. 华中科技大学同济医学院附属协和医院 骨科, 湖北 武汉 430022

2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院 药剂科, 湖北 武汉 430022

摘要: 目的 制备溴化双十二烷基二甲基铵 (DMAB) 修饰的载汉防己甲素 (Tet) 的聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA) 纳米粒 (DMAB-Tet-PLGA-NPs), 考察其制备的影响因素, 优化制备工艺, 并对其理化性质、细胞毒性及细胞摄取进行研究。方法 采用乳化分散溶剂挥发法制备 DMAB-Tet-PLGA-NPs, 运用均匀设计试验优化制备工艺, 通过包封率、载药量、累积释药量等指标考察其载药特性; 采用 MTT 比色法考察 DMAB-Tet-PLGA-NPs 对人肺腺癌细胞株 A549 的细胞毒性; 采用定量定性法评价 DMAB-Tet-PLGA-NPs 细胞摄取率。结果 制备的 DMAB-Tet-PLGA-NPs 平均粒径为 (205.40 ± 2.66) nm, 表面带正电, 呈规则的球形及椭圆形。药物包封率和载药量分别为 $(50.780 \pm 3.253)\%$ 和 $(2.130 \pm 0.035)\%$ 。体外释放实验显示 DMAB-Tet-PLGA-NPs 缓慢释药, 48 h 累积释药量 64.56%。MTT 实验表明 DMAB-Tet-PLGA-NPs 细胞毒性呈剂量及时间依赖性。定性定量细胞摄取实验证实 DMAB-Tet-PLGA-NPs 能较好地被细胞摄取。结论 DMAB-Tet-PLGA-NPs 粒径大小均一, 包封率高, 体外释药表现出较好的缓释效果, 易被细胞摄取, 对 A549 细胞的活性有明显的抑制作用。

关键词: 汉防己甲素; PLGA 纳米粒; 溴化双十二烷基二甲基铵; 抗肿瘤活性; 细胞摄取; 乳化分散溶剂挥发法

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)17-2556-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.17.009

Preparation and *in vitro* evaluation of DMAB-modified PLGA nanoparticles loading tetrandrine

FU De-hao¹, ZHENG Si-wei², CHEN Chun-sheng², SHI Chen²

1. Department of Orthopaedics, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

2. Department of Pharmacy, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

Abstract: Objective The study aims at preparing the didodecyldimethylammonium bromide (DMAB)-modified PLGA nanoparticles (NPs) loading tetrandrine (Tet) (DMAB-Tet-PLGA-NPs) and investigating the preparation process, physicochemical characterization, *in vitro* cytotoxicity, and particle cellular uptake. **Methods** DMAB-Tet-PLGA-NPs were prepared by the emulsion solvent diffusion method and the preparation process was optimized with the uniform design experiment. The drug loading, entrapment efficiency (EE), and *in vitro* drug release were studied to evaluate the drug-loading property. The *in vitro* cytotoxicity against human lung cancer cell A549 was measured by the standard MTT assay. The particles cellular uptake in A549 was evaluated by qualitative and quantitative methods. **Results** DMAB-Tet-PLGA-NPs in the mean size of (205.40 ± 2.66) nm with spherical shape and showed positive surface charge. Drug loading and EE were $(2.130 \pm 0.035)\%$ and $(50.780 \pm 3.253)\%$, respectively. DMAB-Tet-PLGA-NPs could retard drug release in pH 7.4 release media and the cumulative release was up to 64.56% over 48 h. And DMAB-Tet-PLGA-NPs showed the significant dose- and time-dependent cytotoxicity of Tet *in vitro* and well cellular uptake by A549. **Conclusion** DMAB-Tet-PLGA-NPs shows the good EE, uniform particle size, and could retard drug release *in vitro*. And DMAB-Tet-PLGA-NPs shows the significant cytotoxicity *in vitro* and well cellular uptake by A549.

Key words: tetrandrine; PLGA nanoparticles; didodecyldimethylammonium bromide; anti-cancer activity; cell uptake; emulsion solvent diffusion method

收稿日期: 2015-05-24

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (#81370980)

作者简介: 傅德皓, 男, 副教授, 研究方向为骨质疏松症、骨靶向药物、纳米材料。E-mail: fudehao@qq.com

*通信作者 史琛, 女, 主管药师, 研究方向为医院药学、药物新剂型及有效性。E-mail: 29136909@qq.com

中药有效成分的抗肿瘤活性研究是目前药物抗肿瘤研究的热点^[1-2]。汉防己甲素(tetrandrine, Tet), 又称粉防己碱, 是从防己科(Menispermaceae)植物粉防己 *Stephania tetrandra* S. Moore 的干燥根中提取出的具有双苄异喹啉类结构的生物碱。大量文献表明 Tet 对多种肿瘤细胞表现出相当的活性, 其对肿瘤作用及其机制包括逆转肿瘤的多重耐药, 诱导细胞凋亡, 放疗增敏以及抑制肿瘤生成^[3-6]。但是作为一种生物碱, Tet 的水溶性差, 导致其生物利用度低; 此外, 它还具有一定的刺激性, iv 可导致局部疼痛或静脉炎, 这些都限制了其作为抗肿瘤药物的临床应用^[7]。

为了提高 Tet 的疗效并减低其毒性, 本研究采用聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA^[8], 一类 FDA 批准的安全、无毒的高生物相容性及可降解性高分子聚合物材料)制备载药纳米粒(Tet-PLGA-NPs), 利用纳米给药系统可以改善 Tet 的水溶性, 并具备缓释效果, 提高药物生物利用度, 减少其毒副作用^[9-11]。已有文献报道带正电的纳米粒更易被细胞摄取^[12], 本实验选取溴化双十二烷基二甲基铵(didodecyl dimethyl ammonium bromide, DMAB)作为稳定剂, 对 Tet-PLGA-NPs 表面进行修饰。全面考察了 DMAB-Tet-PLGA-NPs 的理化性质、载药特性、细胞毒性和细胞摄取特性, 为载 Tet 新剂型的开发提供依据。

1 仪器与材料

乳化超声仪 Ultrasonifier, G560E, Scientific Industries, Inc., 美国; Zetasizer 激光粒度仪, 英国马尔文仪器有限公司; ROTINA420 通用台式离心机, 德国 Hettich; EVO HD 扫描电子显微镜(SEM), Carl Zeiss, 德国; JEM-2010 透射电子显微镜(TEM), JEOL, 德国; 高效液相色谱仪, 德国 Dionex; 酶标仪, 瑞士 TECAN 集团有限公司; 激光共聚焦电镜 CLSM, 德国蔡司 LSM510。

Tet, 南京泽朗医药科技有限公司, 质量分数 98.65%, 批号 ZL20120108; PLGA (50:50), 德国 Evonik Industries, 相对分子质量 24 000~38 000, 批号#213748; 人肺腺癌细胞株 A549 由美国马纳萨斯典型培养物保藏中心(ATCC)提供; 四甲基偶氮唑蓝(MTT), 德国 Promega 公司; DMAB, 批号#108014, 美国 Sigma-Aldrich 公司; 透析袋, 截留相对分子质量 3 500, 美国 Fisher Scientific 公司; 其余试剂均为进口分析纯。

2 方法与结果

2.1 制备方法

DMAB-Tet-PLGA-NPs 制备采用乳化扩散溶剂挥发法^[13]。将含 PLGA 20 mg/mL 和 Tet 0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL 的醋酸乙酯作为有机相(2.5 mL), 逐滴滴加至含 0.1% DMAB 的水相(2.5 mL)中持续搅拌。该初乳液运用 Ultrasonifier (10%震幅等于 500 J)超声均匀乳化 30 s 后, 使用去离子水(15 mL)稀释使醋酸乙酯扩散入水相。搅拌过夜使有机溶液充分挥发。制得 DMAB-Tet-PLGA-NPs 胶体溶液。14 000×g、40 min 离心收集纳米粒, 纯化水洗涤冷冻干燥得成品, 贮存备用。

DMAB 修饰的空白 PLGA 纳米粒(DMAB-PLGA-NPs)采用同样方法制备。

2.2 处方工艺优化

通过预试验, 选出制备过程中对纳米粒的粒径均一性[以多分散系数(PDI)表示]影响较大的3个因素: 稳定剂 DMAB 的用量、油相-水相体积比及超声乳化能量(以振幅强度表示)。采用均匀设计法优化条件, 以纳米粒的 PDI 作为评价指标(平均粒径和 Zeta 电位作为辅助参考指标, 不参与条件优化), 对制备工艺进行考察优化。均匀设计试验及结果见表 1。

采用 Design-Expert.V8.0.6.1 软件对均匀设计试验结果进行分析, 见表 2。得出最佳制备条件为 DMAB 质量分数为 0.1%、油相-水相体积比 1:1、超声乳化振幅 10% (500 J)。表 2 结果表明, 3 个影响因素均对纳米粒的 PDI 有影响, 且在 3 个影响因素中, 对纳米粒 PDI 影响大小依次为 DMAB 用量(0.089) > 油相水相体积比(0.077) > 超声乳化能量(0.028)。

2.3 DMAB-Tet-PLGA-NPs 形态、粒径大小及 Zeta 电位

2.3.1 平均粒径和 Zeta 电位测定 利用激光粒度仪分别测定水溶液中 DMAB-Tet-PLGA-NPs 及 DMAB-PLGA-NPs 的粒径大小及 Zeta 电位。将 1 mL 稀释的纳米粒子溶液加入到 1 cm 的石英比色皿中进行检测。粒径大小及粒径分布图见表 3 和图 1。实验所合成的 DMAB-PLGA-NPs 及 DMAB-Tet-PLGA-NPs 胶体溶液为稳定、大小均一的乳白色半透明分散体系, 2 种纳米粒的 PDI 均较小, 表明制备的纳米粒粒径分布范围较窄, 纳米粒粒径大小均一, 而 Zeta 电位显示 DMAB-Tet-PLGA-NPs 带较强

表1 均匀设计及结果 ($n=3$)Table 1 Uniform design and results ($n=3$)

试验号	DMAB 质量分数/%	油相-水相体积比	振幅/%	平均粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
1	0.1	1:1	10	155.40±1.51	0.085±0.010	46.70±0.71
2	0.1	1:2	20	143.30±0.91	0.118±0.014	47.50±0.62
3	0.1	1:3	30	137.90±1.11	0.108±0.014	49.60±1.52
4	0.5	1:1	20	127.80±0.64	0.096±0.013	51.50±2.83
5	0.5	1:2	30	106.50±0.85	0.144±0.016	54.90±0.46
6	0.5	1:3	10	124.30±0.96	0.180±0.008	49.10±2.63
7	1.0	1:1	30	111.70±0.83	0.129±0.020	49.60±0.55
8	1.0	1:2	10	107.10±0.82	0.199±0.010	51.40±2.33
9	1.0	1:3	20	92.30±0.19	0.251±0.009	56.60±0.35

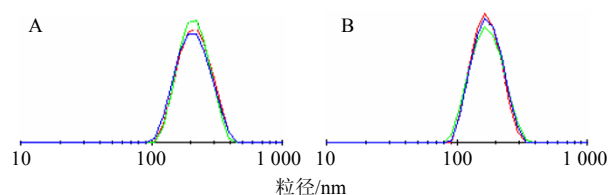
表2 均匀设计试验直观分析结果 (PDI)

Table 2 Results of uniform design experiment analyzed by intuitive analysis method (PDI)

水平	稳定剂用量/%	油相-水相体积比	振幅/%
1	0.104	0.103	0.155
2	0.140	0.154	0.155
3	0.193	0.180	0.127
极差	0.089	0.077	0.028

表3 DMAB-PLGA-NPs 和 DMAB-Tet-PLGA-NPs 的平均粒径、PDI 及 Zeta 电位 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Table 3 Diameter, PDI, and Zeta potential of DMAB-PLGA-NPs and DMAB-Tet-PLGA-NPs ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

样品	平均粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
DMAB-PLGA-NPs	164.10±2.79	0.085±0.019	45.20±1.00
DMAB-Tet-PLGA-NPs	205.40±2.66	0.084±0.011	46.80±2.20

图1 DMAB-Tet-PLGA-NPs (A) 及 DMAB-PLGA-NPs (B) 的粒径分布图 ($n=3$)Fig. 1 Size distribution by intensity of DMAB-Tet-PLGA-NPs (A) and DMAB-PLGA-NPs (B) ($n=3$)

悬液适量, 稀释, 滴加在覆盖碳膜的铜网上, 用 2.0% 的磷钨酸钠液负染色, TEM 观察形态结构。

结果见图 2, SEM 观察结果表明, DMAB-Tet-PLGA-NPs 呈表面光滑, 分布均匀的致密球形; TEM 结果显示, DMAB-Tet-PLGA-NPs 呈球型或椭球形, 大小均一。

2.3.3 稳定性考察 DMAB-Tet-PLGA-NPs 分散于

的正电荷。

2.3.2 扫描电镜 (SEM) 及透射电镜 (TEM) 对纳米粒表观形态的观察

(1) SEM 样品制备: 取 DMAB-Tet-PLGA-NPs 悬液适量, 稀释, 滴加在硅胶晶板上自然挥干, Quorum Q 150 ES 喷金仪真空条件喷金, 并用 EVO HD 型 SEM 观察形态结构。

(2) TEM 样品制备: 取 DMAB-Tet-PLGA-NPs

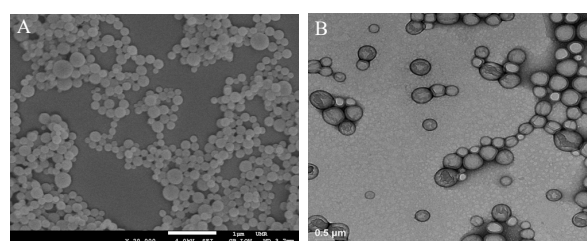


图2 DMAB-Tet-PLGA-NPs 的扫描电镜 SEM (A) 及透射电镜 TEM (B) 图像

Fig. 2 SEM image (A) and TEM image (B) of DMAB-Tet-PLGA-NPs

pH 7.4 的 PBS 缓冲液中, 于 0、3、6、9、12 d 时测定其粒径, 每次取 3 批样品测定, 结果平均粒径分别为 (205.5±2.95)、(200.1±3.27)、(198.2±3.21)、(196.4±4.26)、(191.9±2.63) nm, PDI 分别为 0.074±0.013、0.069±0.021、0.082±0.019、0.077±0.023、0.092±0.026。由结果可知, DMAB-

Tet-PLGA-NPs 在 PBS 环境中室温放置 12 d, 粒径变化范围在 14 nm 左右, 而 PDI 较小, 说明 DMAB-Tet-PLGA-NPs 具有较好的稳定性。

2.4 Tet 包封率、载药量及体外释放

2.4.1 色谱条件 色谱柱为 RP18-select B 柱 (125 mm×4 mm, 填充物粒径 5 μm); 流动相为水-乙腈-三乙胺 (700:300:1), pH 7.4; 体积流量 0.7 mL/min; 进样量 20 μL; 柱温 35 °C; 保留时间 2.5 min; 紫外检测器, 检测波长 280 nm。

2.4.2 包封率与载药量测定 精密称取一定量的 DMAB-Tet-PLGA-NPs 冻干粉, 用乙腈溶解, 经 0.2 μm 微孔滤膜滤过, 取滤液进行 HPLC 测定 Tet 的量, 并分别按公式计算包封率与载药量。

包封率=纳米粒中 Tet 的质量/Tet 的投药量

载药量=纳米粒中 Tet 的质量/(纳米粒中 Tet 的质量+PLGA 聚合物的质量)

2.4.3 投药量对包封率与载药量的影响 投药量的改变会对 DMAB-Tet-PLGA-NPs 的包封率和载药量造成影响。随着投药量的增加, 包封率下降, 载药量升高。包封率的下降是由聚合物的饱和性及高浓度 Tet 会析出结晶所造成^[14]。本实验考察了不同投药量 (Tet-PLGA 比例 1:50、2:50、3:50、4:50, PLGA 50 mg) 对包封率及载药量的影响, 结果包封率分别为 (65.48±1.67)%、(58.29±4.37)%、(49.98±4.32)%、(41.09±4.85)%, 载药量分别为 (0.96±0.04)%、(1.25±0.09)%、(2.19±0.05)%、(2.44±0.07)%。发现当 Tet-PLGA 比例为 3:50 时, 同时具有较高的载药量和包封率。平行重复试验 3 次, DMAB-Tet-PLGA-NPs 的包封率和载药量分别为 (50.780±3.253)% 和 (2.130±0.035)%, 纳米粒的包封率与载药量重现性较好。因此选取此组进行下一步体外释放及细胞学实验。

2.4.4 DMAB-Tet-PLGA-NPs 体外释药测定 精密称取 30 mg DMAB-Tet-PLGA-NPs 冻干粉, 用 6 mL 0.01 mol/L 的 pH 7.4 PBS 重分散, 转入处理过的透析袋中, 扎紧, 悬置于盛有 94 mL 0.01 mol/L 的 pH 7.4 PBS 烧杯中, 置于恒温 37 °C 摇床中。定时取样 0.5 mL, HPLC 法测定 Tet 的量, 计算 Tet 累积释放量。每次取样后立即补加等量新鲜的溶出介质, 并绘制 Tet 的药物累积释放曲线, 结果见图 3。

考察 0~168 h 内在 pH 7.4 的释放介质中, Tet 的累积释放情况。DMAB-Tet-PLGA-NPs 在 8 h 内累积释药量为 54.50%, 为快速释放相; 8~48 h 药

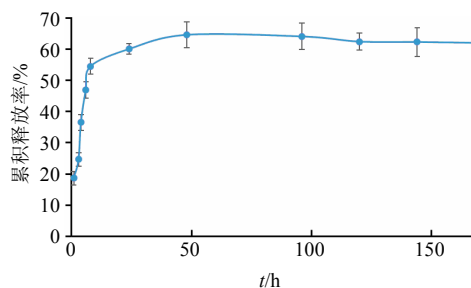


图3 DMAB-Tet-PLGA-NPs 的体外累积释药曲线

Fig. 3 Cumulative release curve *in vitro* of DMAB-Tet-PLGA-NPs

物相对缓速释放, 48 h 后药物释放达到平台期, 累积释药量 64.56%。实验结果表明将 Tet 制备成 PLGA 纳米给药系统可以实现药物的缓释, 而纳米粒内剩余药物最终随着 PLGA 聚合物的生物降解被逐步释放出来。

2.5 体外细胞毒性实验及细胞摄取实验

2.5.1 剂量依赖性细胞毒性研究 剂量依赖性细胞毒性研究采用人肺腺癌 A549 细胞标准 MTT 法检测。将人肺腺癌 A549 细胞悬液每孔 1×10^4 接种于 96 孔板置于培养箱 24 h。实验共设 6 组: DMAB-PLGA-NPs 组, DMAB-Tet-PLGA-NPs 组、Tet 组、阴性对照组 (细胞培养液), 阳性对照组 (1% 的聚乙二醇辛基苯基醚, 即 1% TritonX-100) 和空白对照组 (无细胞)。Tet 组和 DMAB-Tet-PLGA-NPs 组分别设 0.4、2、4、20、40 μg/mL 5 个质量浓度, 对应 DMAB-PLGA-NPs 组设 0.045、0.225、0.45、2.25、4.5 mg/mL 5 个质量浓度。药物与 A549 细胞共培养 4 h 后, 每孔分别加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 200 μL, 置培养箱反应 4 h 后, 每孔再分别加入二甲基亚砜 (DMSO) 100 μL, 采用酶联免疫检测仪于 570 nm 处测定吸光度 (A) 值, 按下列公式计算细胞相对存活率, 重复实验 3 次。

$$\text{细胞活力} = (A_{\text{样品组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{阴性组}} - A_{\text{空白组}})$$

在剂量依赖性细胞毒性研究中, 如表 4 所示, 细胞与纳米粒共培养 4 h 后, 当 Tet 质量浓度为 0.4 μg/mL 时, Tet 组显示对 A549 细胞无毒性, 而 DMAB-Tet-PLGA-NPs 组表现出一定的细胞毒性, 但 Tet 组与 DMAB-Tet-PLGA-NPs 组间细胞存活率无显著差异; 当 Tet 质量浓度为 2、4 μg/mL 时, Tet 组和 DMAB-Tet-PLGA-NPs 组细胞毒性均随着药物质量浓度增高而加大, 在该 2 种质量浓度下, Tet 组的细胞存活率均显著性地高于 DMAB-Tet-PLGA-NPs 组。当 Tet 质量浓度增至 20 μg/mL 时, DMAB-

表4 Tet、DMAB-Tet-PLGA-NPs及DMAB-PLGA-NPs对A549细胞毒性的剂量依赖性 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Dose-dependent cytotoxicity assay against A549 cells of Tet, DMAB-Tet-PLGA NPs, and DMAB-PLGA NPs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	细胞活力/%
Tet	0.4	84.12 $\pm$ 1.83
	2	67.56 $\pm$ 5.20
	4	61.70 $\pm$ 3.44
	20	38.63 $\pm$ 2.47
	40	31.13 $\pm$ 2.61
DMAB-Tet-PLGA-NPs	0.4	77.64 $\pm$ 2.14
	2	56.42 $\pm$ 2.36*
	4	43.57 $\pm$ 2.93*
	20	37.55 $\pm$ 3.12
	40	33.48 $\pm$ 4.44
DMAB-PLGA-NPs	45	94.43 $\pm$ 2.41
	225	89.97 $\pm$ 3.08
	450	85.22 $\pm$ 2.79
	2 250	76.80 $\pm$ 2.82
	4 500	69.37 $\pm$ 3.87

*细胞活力显著低于Tet组 ($P<0.05$)

*The cell viability was significant low than the free Tet ($P<0.05$)

表5 Tet、DMAB-Tet-PLGA-NPs及DMAB-PLGA-NPs对A549细胞毒性的时间依赖性 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Time-dependent cytotoxicity assay against A549 cells of Tet, DMAB-Tet-PLGA-NPs, and DMAB-PLGA-NPs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	细胞活力/%			
		1 h	4 h	8 h	24 h
Tet	2	79.22 $\pm$ 2.02	70.53 $\pm$ 4.27	73.58 $\pm$ 2.27	71.90 $\pm$ 2.09
DMAB-Tet-PLGA-NPs	2	84.17 $\pm$ 3.93	63.02 $\pm$ 4.99*	57.81 $\pm$ 3.15*	22.73 $\pm$ 2.98*
DMAB-PLGA-NPs	225	90.86 $\pm$ 2.07	88.33 $\pm$ 4.16	85.37 $\pm$ 2.79	86.92 $\pm$ 2.06

*细胞活力显著低于Tet组 ($P<0.05$)

*cell viability significantly lower than that in free Tet group ($P<0.05$)

摄取,同时DMAB-Tet-PLGA-NPs缓慢释放药物,持续抑制肿瘤细胞的活性,从而减少Tet在血管中的瞬间积聚带来的毒副作用。

2.5.3 定量细胞摄取实验^[15] 将人肺腺癌A549细胞悬液接种于96孔板,每孔细胞 1×10^4 。将培养液换100 μL (0.225 mg/mL, pH 7.4 PBS缓冲溶液)荧光标记的DMAB-PLGA-NPs培养液。细胞孵育1、4、8 h后,细胞用PBS缓冲液清洗3次除去未吸收的DMAB-PLGA-NPs。加入细胞裂解液(150 mmol/L NaCl、1% Triton X-100、0.1% SDS、50 mmol/L tris pH 7.4)处理收集的细胞,测定裂解液

Tet-PLGA-NPs及Tet组均表现出很强的细胞活力抑制作用,而Tet组与DMAB-Tet-PLGA-NPs组对细胞存活率的影响无显著性差异。Tet与DMAB-Tet-PLGA-NPs呈现剂量依赖性细胞毒性。同时,DMAB-PLGA-NPs组在质量浓度0.045、0.225、0.45 mg/mL时对细胞均无毒性,表明DMAB-PLGA-NPs的生物安全性高。

2.5.2 时间依赖性细胞毒性研究 实验共设5组:Tet组、DMAB-Tet-PLGA-NPs组、DMAB-PLGA-NPs组、阴性对照组(细胞培养液)、阳性对照组(1% TritonX-100)。Tet组和DMAB-Tet-PLGA-NPs组设2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度,对应DMAB-PLGA-NPs组选取对应质量浓度0.225 mg/mL。按照标准MTT实验步骤,分别与A549细胞培养1、4、8、24 h后测定A值,按公式计算细胞活力,重复实验3次。

时间依赖性细胞毒性研究中,如表5所示,当细胞共培养时间为1 h时,Tet组的细胞毒性高于DMAB-Tet-PLGA-NPs组;当培育时间为4、8、24 h时,DMAB-Tet-PLGA-NPs组的细胞毒性显著性高于Tet组,呈现时间依赖性细胞毒性。而对应该质量浓度的DMAB-PLGA-NPs在各个时间点均未显示出细胞毒性。结果表明载药纳米粒不断被细胞

中荧光强度(荧光素的激发波长为430 nm,发射波长为485 nm)。纳米粒浓度与细胞裂解液发射的荧光强度呈线性关系,通过荧光强度(I)的比值计算细胞的摄取率。细胞摄取率通过公式细胞摄取率= $(I_{\text{样品组}}-I_{\text{阴性组}})/(I_{\text{阳性组}}-I_{\text{阴性组}})$ 计算。结果细胞摄取率分别为(4.36 $\pm$ 2.40)%、(16.96 $\pm$ 2.97)%、(26.96 $\pm$ 3.96)% ($n=3$)。

当DMAB-PLGA-NPs与A549细胞共培养1 h,仅有4.36%的摄取率;当培养时间延长到4 h时,细胞摄取率为16.98%,显著高于1 h时的细胞摄取率;而当培养时间达到8 h时,细胞摄取率为26.86%,

显著性高于 1 h 及 4 h。定量细胞摄取实验显示 DMAB-PLGA-NPs 呈现明显地时间依赖性增加。

2.5.4 定性细胞摄取实验 利用共聚焦激光扫描显微镜 (CLSM) 示踪粒子的吸收行为。将人肺腺癌 A549 细胞悬液接种于 12 孔板, 每孔细胞 3×10^5 。37 °C 培养 2 d 后, 将培养液换成 1 mL (0.225 mg/mL, pH 7.4) 荧光标记的 DMAB-PLGA-NPs。与细胞孵育 1、4、8 h 后, 细胞用 PBS 缓冲液清洗 3 次除去未吸收的纳米粒, 用 DAPI 染色 A549 细胞核。固定细胞后运用激光共聚焦显微镜观察细胞摄取。采用 C-Apochromat 63 倍镜头, DAPI 激发光 $\lambda_{\text{ex}}=488 \text{ nm}$, 荧光激发光 $\lambda_{\text{ex}}=720 \text{ nm}$, 纳米粒的荧

光信号通过 (BP 505-550) 检测。

通过荧光标记的 DMAB-PLGA-NPs 与 A549 细胞培养 1、4、8 h 后, 利用共聚焦激光显微镜多通道扫描, 检测 DAPI 染色的 A549 细胞核和荧光标记的 DMAB-PLGA-NPs 的分布情况, 见图 4。结果证明 DMAB-PLGA-NPs 能充分被人肺腺癌 A549 细胞摄取, 且分布在细胞各层中。摄取量顺着培养时间延长明显增加。时间依赖性结果与定量细胞摄取实验一致。

2.6 统计分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

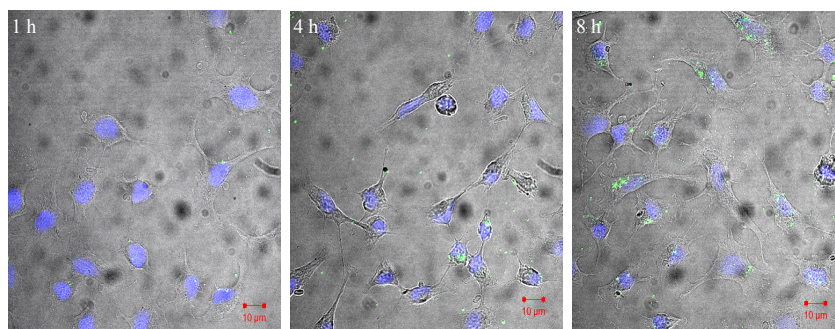


图4 A549 细胞体外摄取 DMAB-PLGA-NPs 的激光共聚焦断层扫描图

Fig. 4 Confocal laser scanning images of DMAB-PLGA-NPs of A549 cellular uptake *in vitro*

3 讨论

乳化扩散溶剂挥发法制备 PLGA 纳米粒的过程中, 稳定剂的浓度选择十分重要, 浓度过高, 过量的稳定剂不容易被除去, 残留在纳米粒表面会增加纳米粒的毒性, 同时纳米粒体系稳定性下降; 浓度过低, 同样无法保证纳米粒体系的稳定性^[16-20]; 油相体积比, 根据制备方法, 油相缓慢滴加入水相中形成液滴, 而当油相体积大于水相时, 在制备中, 高分子聚合物 PLGA 会出现絮集, 继而沉淀析出, 出现分层, 无法形成均匀的初乳体系^[13]; 超声乳化能量, 将初乳液滴切割成纳米尺寸, 需要给予一定能量, 而能量大小直接影响纳米粒的均一性^[21]。根据前期预试验研究发现以上 3 个因素对纳米粒的制备有较大影响。而多分散系数 (PDI) 表示高分子直径的多分散性, 是评价纳米粒大小均一性、稳定性的直接指标。作为纳米载体, 只有大小一致才能保证每个纳米粒载药量的一致性。如果大小不均一, 每个纳米粒的载药量必然不相同, 这将直接影响后期药物释放, 及体外细胞实验的准确性。故本实验中以 PDI 作为考察指标; 稳定剂 DMAB 的质量分

数、油相水相体积比及超声乳化能量为考察因素, 设计均匀实验, 优化最佳制备工艺。

DMAB 作为常用的表面修饰剂和稳定剂用于纳米粒的制备, 它可将 PLGA 负电性的表面转变为正电性表面。由于细胞膜的负电性, 带正电的载药纳米粒可以通过静电力的作用, 有效地与细胞相结合, 延长纳米粒在细胞表面的接触停留时间, 增加纳米粒的细胞摄取机会。从而更有效地将药物带入胞内^[18,22-23]。

由于 Tet 依靠单纯扩散作用被细胞摄取, 而其疏水性又在很大程度上限制了其被细胞摄取。带正电的 PLGA 纳米粒则可以不断被细胞摄取, 药物在细胞内从纳米粒中被缓慢释放, 发挥对癌细胞更持久的细胞毒作用, 从而提高药物疗效。而作为药物载体的 DMAB-PLGA-NPs 在一定质量浓度内无细胞毒性, 生物安全性高。

研究结果表明 DMAB-Tet-PLGA-NPs 能明显提高 Tet 对肺癌 A549 细胞的抗肿瘤活性作用。DMAB-Tet-PLGA-NPs 作为 Tet 一种有效的纳米传递系统, 值得继续深入研究。

参考文献

- [1] Shah U, Shah R, Acharya S, *et al.* Novel anticancer agents from plant sources [J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11(1): 16-23.
- [2] Cragg G M, Newman D J. Plants as a source of anti-cancer agents [J]. *J Ethnopharmacol*, 2005, 100(1/2): 72-79.
- [3] Xu W, Debeb B G, Lacerda L, *et al.* Tetrandrine, a compound common in Chinese traditional medicine, preferentially kills breast cancer tumor initiating cells (TICs) *in vitro* [J]. *Cancers*, 2011, 3(2): 2274-2285.
- [4] Liou J T, Chen Z Y, Ho L J, *et al.* Differential effects of triptolide and tetrandrine on activation of COX-2, NF-kappaB, and AP-1 and virus production in dengue virus-infected human lung cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 589(1/3):288-298.
- [5] Liu Z L, Hirano T, Tanaka S, *et al.* Persistent reversal of P-glycoprotein-mediated daunorubicin resistance by tetrandrine in multidrug-resistant human T lymphoblastoid leukemia MOLT-4 cells [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2003, 55(11): 1531-1537.
- [6] Cho H S, Chang S H, Chung Y S, *et al.* Synergistic effect of ERK inhibition on tetrandrine-induced apoptosis in A549 human lung carcinoma cells [J]. *J Vet Sci*, 2009, 10(1): 23-28.
- [7] Li R, Li X, Xie Q, *et al.* Preparation and evaluation of PEG-PCL nanoparticles for local tetrandrine delivery [J]. *Int J Pharm*, 2009, 379(1): 158-166.
- [8] 刘楠楠, 蒋福升, 俞婷婷, 等. 改良溶剂挥发法制备姜黄素衍生物 mPEG5000-PLGA 纳米粒的研究 [J]. *中草药*, 2013, 44(16): 2223-2229.
- [9] Roberts A D, Zhang H F. Poorly water-soluble drug nanoparticles via solvent evaporation in water-soluble porous polymers [J]. *Int J Pharm*, 2013, 447(1/2): 241-250.
- [10] Jose Merlin J P, Venkadesh B, Hussain R, *et al.* Paclitaxel loaded poly-D, L-lactide-co-glycolide nanoparticles: Enhanced anticancer effect in non-small cell lung carcinoma cell line [J]. *Biomed Prev Nutr*, 2013, 3(2): 1-9.
- [11] Brannon-Peppas L, Blanchette J O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56(11): 1649-1659.
- [12] Bhardwaj V, Ankola D, Gupta S, *et al.* PLGA nanoparticles stabilized with cationic surfactant: safety studies and application in oral delivery of paclitaxel to treat chemical-induced breast cancer in rat [J]. *Pharm Res*, 2009, 26(11): 2495-2503.
- [13] Nafee N, Schneider M, Friebel K, *et al.* Treatment of lung cancer via telomerase inhibition: Self-assembled nanoplexes versus polymeric nanoparticles as vectors for 2'-O-methyl-RNA [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2012, 80(3): 478-489.
- [14] Wischke C, Schwendeman S P. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles [J]. *Int J Pharm*, 2008, 364(2): 298-327.
- [15] Weiss B, Schneider M, Muys L, *et al.* Coupling of biotin-(poly(ethylene glycol)) amine to poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles for versatile surface modification [J]. *Bioconjug Chem*, 2007, 18(4): 1087-1094.
- [16] Shakweh M, Besnard M, Nicolas V, *et al.* Poly (lactide-co-glycolide) particles of different physicochemical properties and their uptake by Peyer's patches in mice [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2005, 61(1/2): 1-13.
- [17] Vandervoort J, Ludwig A. Biocompatible stabilizers in the preparation of PLGA nanoparticles: A factorial design study [J]. *Int J Pharm*, 2002, 238(1/2): 77-92.
- [18] Gan Q, Wang T, Cochrane C, *et al.* Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery [J]. *Colloid Surface B*, 2005, 44(2/3): 65-73.
- [19] Cheng F Y, Wang S P H, Su C H, *et al.* Stabilizer-free poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for multimodal biomedical probes [J]. *Biomaterials*, 2008, 29(13): 2104-2112.
- [20] Grabowski N, Hillaireau H, Vergnaud J, *et al.* Surface coating mediates the toxicity of polymeric nanoparticles towards human-like macrophages [J]. *Int J Pharm*, 2015, 482(1/2): 75-83.
- [21] Kimura T, Okuno A, Miyazaki K, *et al.* Novel PVA-DNA nanoparticles prepared by ultra high pressure technology for gene delivery [J]. *Mater Sci Eng: C*, 2004, 24(6/8): 797-801.
- [22] Prabha S, Zhou W Z, Panyam J, *et al.* Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection: Studies with fractionated nanoparticles [J]. *Int J Pharm*, 2002, 244(1/2): 105-115.
- [23] Peetla C, Labhasetwar V. Effect of molecular structure of cationic surfactants on biophysical interactions of surfactant-modified nanoparticles with a model membrane and cellular uptake [J]. *Langmuir*, 2009, 25(4): 2369-2377.