

• 药剂与工艺 •

丁酰半乳糖酯修饰的薏苡仁组分微乳的制备及其体外抗肿瘤活性研究

刘明健^{1,2}, 瞿 鼎², 陈 彦^{2*}, 孙文杰², 袁成甜^{1,2}, 王理想²

1. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013

2. 江苏省中医药研究院 中药组分与微生态研究中心, 江苏 南京 210028

摘要: 目的 合成丁酰半乳糖酯 (butyryl galactose ester, But-Gal) 并制备丁酰半乳糖酯修饰的薏苡仁组分微乳 (butyryl galactose ester modified coix component microemulsions, But-Gal-CMEs), 对其进行理化性质评价和体外抗肿瘤活性测定。方法 采用酶催化法合成 But-Gal, 并通过 ¹H-NMR 与 FT-IR 对其结构进行表征。以薏苡仁油为油相, 聚氧乙烯化蓖麻油 (Cremophor® RH40) 为乳化剂, PEG400 为助乳化剂, But-Gal 为肝肿瘤细胞靶配体, 薏苡仁多糖水溶液为水相, 水滴定法制备微乳, 测定其粒径、电位和形态。通过 MTT 法考察薏苡仁组分微乳 (CMEs) 与 But-Gal-CMEs 对肿瘤细胞 HepG2 细胞毒作用; 以异硫氰酸荧光素 (FITC) 为荧光探针, 借助荧光倒置显微镜观察 HepG2 细胞对微乳的摄取行为。结果 经 ¹H-NMR 与 FT-IR 表征确认丁酰半乳糖酯结构与设计一致。制备所得 But-Gal-CMEs 外观形态圆整, 平均粒径为 (57.68±6.65) nm, 多分散指数 (PDI) 为 0.070±0.006, Zeta 电位为 (-2.95±0.23) mV。MTT 实验表明, But-Gal-CMEs 与 CMEs 对 HepG2 细胞增殖的半数抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 62.55、71.23 μg/mL。HepG2 细胞摄取结果显示 But-Gal-CMEs 组的荧光强度强于 CMEs 组。结论 所制备的 But-Gal-CMEs 粒径小, 外观圆整, 稳定性好, But-Gal 能增加 HepG2 对 CMEs 的细胞摄取, 并增强其对 HepG2 细胞毒作用。

关键词: 薏苡仁; 丁酰半乳糖酯; 微乳; 细胞毒性; 细胞摄取; 抗肿瘤活性; 酶催化法; 水滴定法; 异硫氰酸荧光素

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)18-2696-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.18.006

Study on preparation of butyryl galactose ester-modified coix component microemulsions and their anticancer activity *in vitro*LIU Ming-jian^{1,2}, QU Ding², CHEN Yan², SUN Wen-jie², YUAN Cheng-tian^{1,2}, WANG Li-xiang²

1. College of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

2. Multi-component of Traditional Chinese Medicine and Microecology Research Center, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

Abstract: Objective To synthesize butyryl galactose ester (But-Gal) and prepare butyryl galactose ester-modified coix component microemulsions (But-Gal-CMEs) and to evaluate its physicochemical properties and anticancer activity *in vitro*. **Methods** But-Gal was synthesized by enzyme-catalyzed reaction and the structure of the product was confirmed by ¹H-NMR and FT-IR. The CMEs and But-Gal-CMEs were prepared by aqueous titration method using coix seed oil, Cremophor RH40, PEG400, But-Gal, and coixan solution as oil phase, surfactant, cosurfactant, target ligand, and aqueous phase, respectively. The average particle size, polydispersity index (PDI), and Zeta potential were detected by dynamic light scattering (DLS). The cytotoxicity of CMEs and But-Gal-CMEs against HepG2 cells was determined by MTT assay. The cellular uptake of CMEs and But-Gal-CMEs was detected by fluorescence microscopy. **Results** The structure of But-Gal was confirmed by ¹H-NMR and FT-IR. The But-Gal-CMEs displayed the spherical surface with mean droplet size of (57.68±6.65) nm, PDI of 0.070±0.006, and Zeta potential of (-2.95±0.23) mV, respectively. MTT experiments showed that the half of HepG2 cell proliferation inhibition concentration (IC₅₀) of But-Gal-CMEs and CMEs was 62.55

收稿日期: 2015-05-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81373979); 江苏省自然科学基金资助项目 (BK20141508)

作者简介: 刘明健 (1989—), 男, 硕士在读, 研究方向为中药新型给药系统。Tel/Fax: (025)85608672 E-mail: 15850594690@163.com

*通信作者 陈 彦 Tel/Fax: (025)85608672 E-mail: ychen202@hotmail.com

and 71.23 $\mu\text{g/mL}$. The HepG2 cell uptake results suggested that the fluorescence intensity of But-Gal-CMEs group was higher than that of CMEs group. **Conclusion** The But-Gal-CMEs presents small particle size, good roundness, and good stability. In addition, But-Gal could increase the uptake rate of CMEs in HepG2 cells and enhance the inhibition of HepG2 cell proliferation.

Key words: *Coicis Semen*; butyryl galactose ester; microemulsion; cytotoxicity; cell uptake; antitumor activity; enzymatic method; aqueous titration method; fluorescein isothiocyanate

薏苡仁 *Coicis Semen* 为禾本科 (Gramineae) 薏苡属 *Coix* Linn. 植物薏苡 *Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* (Roman) Stapf. 的干燥成熟种仁^[1]. 研究表明, 薏苡仁中含有酯类、不饱和脂肪酸类、糖类及内酰胺类等活性成分, 具有抗肿瘤、提高免疫力、降血糖等作用^[2-3]. 作为薏苡仁主要药效成分的薏苡仁油具有较强的抗肝癌作用^[4-5], 多糖成分具有调节免疫功能的作用, 但二者口服生物利用度较低, 影响了其作为口服制剂在临床上的疗效发挥。

微乳作为纳米载体之一, 是一种由油相、水相、表面活性剂和助表面活性剂按适当比例制得的一种透明、黏度低、且热力学稳定的溶液体系^[6], 其粒径小、稳定性好, 能够促进难溶性药物的口服吸收。本课题组前期研究中以薏苡仁油为微乳油相, 荷载灵芝三萜, 制备了薏苡仁油-灵芝三萜组分微乳, 有效地增加了薏苡仁油及灵芝三萜的体内吸收^[7]. 本实验利用薏苡仁中薏苡仁油及多糖 2 种抗肿瘤活性组分, 制备了薏苡仁组分微乳 (CMEs), 为了进一步提高薏苡仁组分微乳的抗肝癌作用, 本实验合成了能够被肝细胞膜上去唾液酸糖蛋白受体 (ASGPR)^[8-10] 特异性识别的一种具有半乳糖残基的丁酰半乳糖酯 (butyryl galactose ester, But-Gal), 并将其修饰 CMEs, 对修饰后的 CMEs 的理化性质及体外抗肿瘤活性进行了考察^[11], 为进一步提高中药多组分抗肿瘤制剂的组织靶向性及抗肿瘤效果提供实验依据。

1 仪器与材料

FA2104 型万分之一天平, 上海良平仪器仪表有限公司; Nano-ZS 型马尔文粒径测定仪, 英国马尔文公司; Nicolet IS-10 型傅里叶变换红外光谱 (FT-IR) 仪, 美国赛默菲世尔科技公司; JEM-2100 型透射电子显微镜, 日本 JEOL 公司; Bruker 500 MHz 核磁共振仪, 瑞士布鲁克公司; ZEISS 倒置显微镜, 南京微弗德科学仪器有限公司; HERA Cell 150 CO₂ 培养箱, 美国热电集团; 酶标仪, 美国热电集团; Cytation5 细胞成像微孔板检测系统, 美国伯腾仪器有限公司。

Novozym 435 固定化脂肪酶, 南京诚纳化工有

限公司; 丁酸乙烯酯, 南京森贝伽生物科技有限公司; D-(+)-半乳糖, 国药集团化学试剂有限公司; OP-10 乳化剂, 上海久亿化学试剂有限公司; 聚氧乙烯氢化蓖麻油 (Cremophor® RH40), 德国 BASF 公司; 聚乙二醇 400 (PEG400), 国药集团化学试剂有限公司; 聚山梨酯 80、20, 成都市科龙化工试剂厂; 薏苡仁油, 自制, 超临界萃取制得, 以总甘油三酯计质量分数为 86.67%; 薏苡仁多糖, 自制, 由超临界萃取药渣水提醇沉制得, 以葡萄糖计质量浓度为 76.63%; 胎牛血清, 杭州四季青生物工程材料有限公司; RPMI-1640 培养基、胰蛋白酶溶液, GIBCO 公司; 二甲基亚砜, 南京化学试剂有限公司; 四甲基偶氮唑盐 (MTT), SunShine 公司; 异硫氰酸荧光素 (FITC), 天津百萤科技有限公司。

人肝癌细胞 HepG2 细胞株, 购自于中国科学院上海生命科学院生物化学与细胞生物学研究所。

2 方法与结果

2.1 But-Gal 的合成与表征^[12-13]

称取 2.0 g Novozym 435 固定化脂肪酶, 研细, 与 1.5 g D-(+)-半乳糖和 3.0 mL 丁酸乙烯酯, 共置于 100 mL 圆底烧瓶中, 加入纯化后的丙酮 50 mL, 与分子筛适量, 60 °C 油浴, 回流 15 h. 将所得粗产物进行 TLC 分析, 并以硅胶柱色谱, 以石油醚: 醋酸乙酯 (12:1) 为洗脱剂洗脱, 纯化产物。But-Gal 合成路线见图 1, 通过 FT-IR 及 ¹H-NMR 对其结构进行验证。FT-IR、¹H-NMR 结果见图 2 与图 3。

FT-IR: 在 3 428.11 cm⁻¹ 处是羟基的伸缩振动吸收峰, 在 2 917.61、2 849.96 cm⁻¹ 处有甲基和亚甲基的吸收峰, 1 736.70 cm⁻¹ 处是羰基的特征峰, 而在 1 600 cm⁻¹ 处不存在丁酸乙烯酯烯键的特征峰,

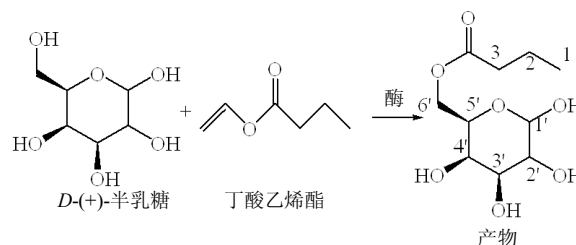


图 1 But-Gal 的合成路线

Fig. 1 Synthesis route of But-Gal

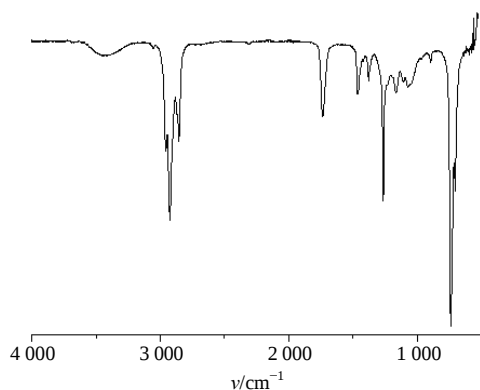
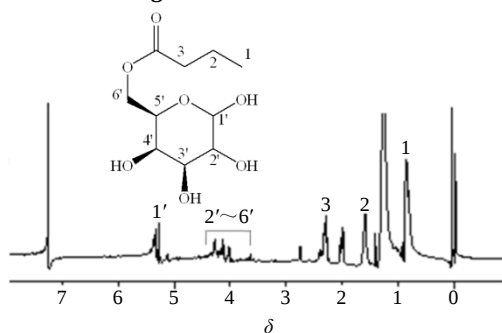


图2 But-Gal 的 FT-IR 图

Fig. 2 FT-IR of But-Gal

图3 But-Gal 的 $^1\text{H-NMR}$ 图Fig. 3 $^1\text{H-NMR}$ of But-Gal

提示反应生成了 But-Gal。

$^1\text{H-NMR}$ (500 Mz, CDCl_3) 中, δ 0.89 (3H, t, $J = 6.0$ Hz, 1- CH_3), 1.62 (2H, m, 2- CH_2), 2.01 (4H, s, 1', 2', 3', 4'-OH), 2.32 (2H, t, $J = 3.5$ Hz, 3- CH_2), 3.5~4.5 归属为 *D*-半乳糖单元 C-2', 3', 4', 5', 6' 位质子, 5.31 (s) 归属为 *D*-半乳糖单元 C-1' 位质子。产物在 δ 0.89~2.32 处有丁酸乙酯结构中的 $-\text{CH}_2$ 、 $-\text{CH}_3$ 质子信号峰, 在 δ 3.54~4.51 处有与 *D*-半乳糖相似的峰, 提示成功合成了 But-Gal。

通过 FT-IR 及 $^1\text{H-NMR}$ 分析, 经过酶促反应, 在半乳糖 C-6' 位羟基发生了酯化反应, 所得产物为 But-Gal。

2.2 CMEs 处方的设计与筛选

2.2.1 伪三元相图的绘制 按乳化剂与助乳化剂的质量比 (K_m 值) 称取混合乳化剂 (S_{mix}), 磁力搅拌混匀, 固定薏苡仁油与混合乳化剂的质量比为 1:9、2:8、3:7、4:6、5:5、6:4、7:3、8:2 及 9:1, 加入薏苡仁油, 于磁力搅拌下混匀后, 在室温下以 240 mg 薏苡仁多糖溶于不同体积的蒸馏水中作为水相, 磁力搅拌下滴加此薏苡仁多糖水溶液, 直到形成澄清透明的微乳, 分别以混合乳化剂、

薏苡仁油、薏苡仁多糖水溶液作为伪三元相图的 3 个顶点, 每一条边表示相应 2 组分的质量比, 微乳制备过程中记录进入凝胶区、退出凝胶区以及微乳形成时各相所占比例, 应用 Origin 7.5 软件绘制伪三元相图, 确定凝胶区及微乳区。

2.2.2 乳化剂的选择 以薏苡仁油、PEG400 为微乳油相、助乳化剂, 分别选取聚山梨酯 80、RH40、OP-10 以及聚山梨酯 20 作为乳化剂, 混合均匀后, 滴加薏苡仁多糖水溶液, 观察体系的变化, 绘制伪三元相图。结果显示, 以 RH40 作为乳化剂所得微乳区面积最大, 其次为聚山梨酯 80, OP-10 与聚山梨酯 20 的微乳区面积均较小, 表明 RH40 更有利于微乳形成, 因此确定最佳乳化剂为 RH40。

2.2.3 助乳化剂的选择 以薏苡仁油、RH40 为微乳油相、乳化剂, 分别选取乙醇、PEG400 以及丙二醇作为助乳化剂, 混合均匀后, 滴加薏苡仁多糖水溶液, 观察体系的变化, 绘制伪三元相图。结果显示, 以 PEG400 作为助乳化剂所得微乳区面积最大, 其次为乙醇, 丙二醇的微乳区面积最小, 表明 PEG400 更有利于微乳形成, 因此确定最佳助乳化剂为 PEG400。

2.2.4 K_m 值筛选 根据以上筛选的处方, 以薏苡仁油为油相、RH40 为乳化剂、PEG400 为助乳化剂、薏苡仁多糖水溶液为水相, 分别选择 K_m 值 1:1、2:1、3:1, 水滴定法制备微乳并绘制伪三元相图。结果显示, 当 K_m 值为 3:1 时所得微乳区面积最大, 2:1 时略小于 3:1, 1:1 时微乳区面积最小, 表明乳化剂与助乳化剂的最佳比例为 3:1, 因此确定最佳 K_m 值为 3:1, 见图 4。

根据上述研究结果, 确定 CMEs 处方为薏苡仁油 200 mg、RH40 150 mg、PEG400 50 mg、薏苡仁多糖 240 mg 溶于水相, 所制备的微乳有淡蓝色乳光, 澄清透明。

2.3 CMEs 及 But-Gal-CMEs 制备

2.3.1 CMEs 制备^[14] 取 150 mg RH40、50 mg PEG 400 置于西林瓶中, 磁力搅拌 2.5 h, 混匀后加 200 mg 薏苡仁油, 再磁力搅拌 2.5 h 混匀, 以 2 mL 薏苡仁多糖水溶液 (120 mg/mL) 为水相, 水滴定法制备 CMEs。

2.3.2 But-Gal-CMEs 制备 取 150 mg RH40、50 mg PEG400 与 32 mg But-Gal 置于西林瓶中, 磁力搅拌 2.5 h, 混匀后加 200 mg 薏苡仁油, 再磁力搅拌 2.5 h 混匀, 以 2 mL 薏苡仁多糖水溶液 (120

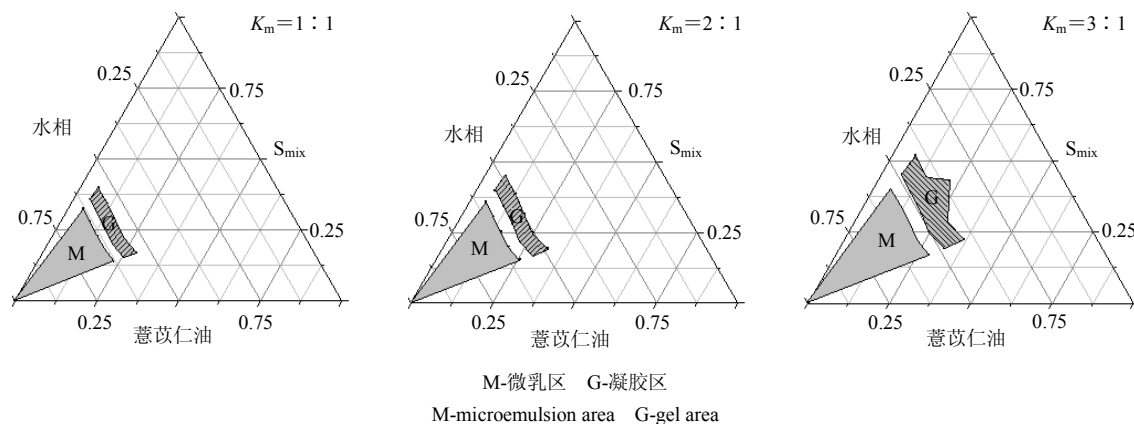


图 4 不同 K_m 值的 But-Gal-CMEs 伪三元相图

Fig. 4 Pseudo-ternary phase diagram of But-Gal-CMEs at different K_m values

mg/mL) 为水相, 水滴定法制备 But-Gal-CMEs。

2.4 微乳表征

采用马尔文激光散射粒度测定仪, 在室温下测定 CMEs 与 But-Gal-CMEs 的平均粒径、多分散指数 (PDI) 和 Zeta 电位, 结果见表 1。同时将载有 Formvar 支持膜的铜网放于蜡板上, 在膜上滴加微乳液 1 滴, 红外灯下照射 5 min, 再滴加 1% 的磷钨酸 1 滴, 室温风干 10 min, 置于 JEM-2100 型透射电镜下观察微乳的外观形态。结果显示所制备的 CMEs 与 But-Gal-CMEs 外观圆整, 分散均匀 (图 5)。

2.5 But-Gal-CMEs 的稳定性考察

2.5.1 稀释对稳定性的影响 取微乳 1.0 mL, 分别用蒸馏水及生理盐水将其稀释 10、20、50、100 倍, 测定其粒径和 PDI。结果见表 2, 稀释对微乳粒径无显著性影响。

表 1 微乳的平均粒径、PDI 与 Zeta 电位

Table 1 Average particle size, PDI, and Zeta potential of microemulsions

组别	平均粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
CMEs	63.04 ± 6.83	0.106 ± 0.008	-0.168 ± 0.340
But-Gal-CMEs	59.68 ± 6.65	0.070 ± 0.006	-2.950 ± 0.230

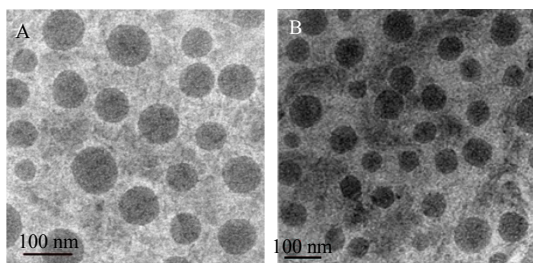


图 5 CMEs (A) 与 But-Gal-CMEs (B) 的透射电镜图

Fig. 5 TEM photos of CMEs (A) and But-Gal-CMEs (B)

表 2 不同稀释介质对微乳粒径的影响

Table 2 Effect of different dilution media on mean droplet size of But-Gal-CMEs

稀释介质	粒径/nm	PDI
原液	59.68 ± 4.34	0.129 ± 0.011
生理盐水稀释 10 倍	57.06 ± 3.35	0.125 ± 0.009
生理盐水稀释 20 倍	56.63 ± 3.97	0.106 ± 0.008
生理盐水稀释 50 倍	56.02 ± 3.55	0.131 ± 0.007
生理盐水稀释 100 倍	54.64 ± 3.26	0.098 ± 0.007
蒸馏水稀释 10 倍	56.54 ± 3.27	0.135 ± 0.008
蒸馏水稀释 20 倍	55.96 ± 3.62	0.127 ± 0.010
蒸馏水稀释 50 倍	55.45 ± 3.17	0.110 ± 0.008
蒸馏水稀释 100 倍	55.37 ± 3.24	0.095 ± 0.006

2.5.2 高速离心对稳定性的影响 取微乳 1.0 mL 于离心管中, 以 13 000 r/min 的速度离心 30 min, 观察微乳外观。结果显示所制备微乳无明显絮凝和分层现象。

2.5.3 放置时间对稳定性的影响 微乳在 4 °C 和 25 °C 的条件下保存 1 个月, 观察微乳外观。结果显示所制备微乳无明显絮凝和分层现象。

2.5.4 pH 对稳定性的影响 取微乳样品溶液 7 份, 加磷酸缓冲液调节 pH 值分别为 2.5、3.0、4.5、5.0、6.5 和 7.4, 观察其外观形态的变化并测定平均粒径。结果见图 6 及表 3, 在考察范围内 pH 对微乳的粒径无显著性影响。

2.6 体外抗肿瘤活性考察

2.6.1 细胞培养 从液氮罐中取出 HepG2 细胞冻存管, 迅速置于 37 °C 恒温水浴中解冻, 离心去除冻存液, 加入已配制的含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液, 吹打均匀并移至细胞培养瓶中, 于 37 °C、

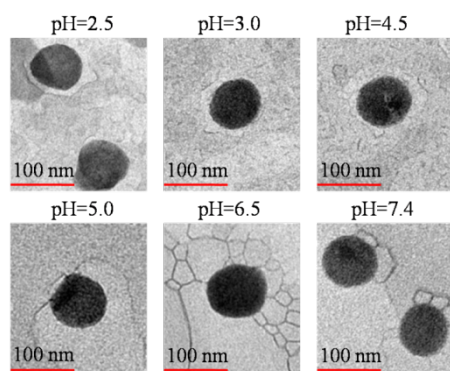


图6 不同pH值下But-Gal-CMEs的透射电镜图

Fig. 6 TEM photos of But-Gal-CMEs at different pH values

表3 不同pH值下微乳的粒径与PDI

Table 3 Particle size and PDI at different pH values

pH 值	粒径/nm	PDI
2.5	62.58±3.24	0.120±0.011
3.0	64.70±3.64	0.135±0.012
4.5	65.20±2.86	0.140±0.009
5.0	64.85±3.18	0.118±0.011
6.5	63.75±3.09	0.125±0.010
7.4	63.45±2.78	0.128±0.012

5% CO₂ 的饱和湿度孵箱中静置培养。次日换液, 2~3 d 传代, 取对数生长期细胞用于实验。

2.6.2 MTT 实验^[15-16] 收集对数生长期 HepG2 人肝癌细胞, 用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基调整细胞悬液浓度至 1×10^5 个/mL, 接种于 96 孔板中, 每孔加入 200 μ L 细胞悬液, 置于 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 24 h 使其贴壁, 对照组正常培养, 对照组给予 RPMI 1640 不完全培养基, 给药组给予 CMEs 与 But-Gal-CMEs (以薏苡仁油质量浓度计分别为 7.81、15.63、31.25、62.50、125.00、250.00 μ g/mL), 每个质量浓度均设 3 个复孔, 药物与细胞作用 48 h, 终止培养前 4 h 加入 MTT (5 mg/mL), 10 μ L/孔, 培养结束后弃去上层液体, 每个复孔加入 100 μ L DMSO 溶液, 摇床低速振摇 10 min 后, 采用酶标仪检测 492 nm 处各孔吸光度 (*A*) 值。并利用公式计算药物对细胞的增殖抑制率。

$$\text{细胞增殖抑制率} = 1 - A_{\text{给药组}} / A_{\text{对照组}}$$

根据细胞增殖抑制率 (表 4) 求得 CMEs、But-Gal-CMEs 抑制 HepG2 细胞增殖的半数抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 71.23、62.55 μ g/mL。在薏苡仁油质量浓度为 7.81、15.63 μ g/mL 时, But-Gal-CMEs 与 CMEs 相比, But-Gal-CMEs 对 HepG2 细胞增殖

表4 CMEs 和 But-Gal-CMEs 作用 HepG2 细胞 48 h 的抑制效应 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)Table 4 Inhibitory effect of CMEs and But-Gal-CMEs on HepG2 cells at 48 h ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

质量浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	抑制率/%	
	CMEs	But-Gal-CMEs
7.81	2.49±0.67	8.94±0.73**
15.63	9.95±1.02	16.00±1.24**
31.25	14.43±1.42	16.41±2.36
62.50	51.24±1.52	55.88±2.54
125.00	66.14±2.67	68.06±2.55
250.00	90.05±1.32	88.71±1.97

与 CMEs 组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs CMEs group

的抑制作用显著强于 CMEs。

2.7 HepG2 细胞摄取实验^[17-18]

2.7.1 试药配制 游离 FITC (free FITC) 溶液的制备: 称取 FITC 0.975 mg, 用去离子水溶解定容至 5 mL, 得 500 μ mol/L Free FITC 溶液, 避光保存于 4 $^{\circ}$ C。

薏苡仁组分物理混合 (mixture) 溶液的制备: 精密称取薏苡仁油 200 mg、薏苡仁多糖 240 mg、FITC 0.975 mg, 磁力搅拌混合均匀后溶于 5 mL DMSO 中, 得 500 μ mol/L 溶液, 避光保存于 4 $^{\circ}$ C。

载 FITC 的 CMEs (FITC-loaded CMEs) 的制备: 称取 FITC 0.975 mg、RH40 150 mg、PEG400 50 mg, 避光条件下, 磁力搅拌 2 h, 加入 200 mg 薏苡仁油, 磁力搅拌 2 h 混匀, 以 2 mL 薏苡仁多糖水溶液 (120 mg/mL) 为水相, 水滴定法制备微乳, 用去离子水定容至 5 mL, 得 500 μ mol/L FITC-loaded CMEs 微乳, 避光保存于 4 $^{\circ}$ C。

载 FITC 的 But-Gal-CMEs (FITC-loaded But-Gal-CMEs) 的制备: 称取 FITC 0.975 mg、RH40 150 mg、PEG400 50 mg、But-Gal 32 mg, 避光条件下, 磁力搅拌 2 h, 加入 200 mg 薏苡仁油, 磁力搅拌 2 h 混匀, 以 2 mL 薏苡仁多糖水溶液 (120 mg/mL) 为水相, 水滴定法制备微乳, 用去离子水定容至 5 mL, 得 500 μ mol/L FITC-loaded But-Gal-CMEs 微乳, 避光保存于 4 $^{\circ}$ C。

2.7.2 细胞摄取实验 取对数生长期细胞, 用胰蛋白酶消化使其脱壁, 用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液重悬成单细胞悬液, 并进行细胞计数, 用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液稀释至细胞浓度 1×10^5 /mL, 吹打均匀, 接种于 24 孔细胞培养板, 每孔

培养液 400 μL , 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 24 h。移去孔内原培养液, 将上述 500 $\mu\text{mol/L}$ free FITC、mixture、FITC-loaded CMEs、FITC-loaded But-Gal-CMEs 用不完全培养基稀释至 20 $\mu\text{mol/L}$, 给药于 HepG2 细胞, 每孔 400 μL 。然后移入细胞培养箱继续培养 2 h。孵育结束后, 快速弃去培养基, 加入冷的 PBS 终止细胞摄取, 并冲洗细胞 3 遍。于荧光倒置显微镜下观察并比较各孔的细胞形态及细胞

荧光强度, 结果见图 7。

由图 7 可知, FITC-loaded CMEs 及 FITC-loaded But-Gal-CMEs 组荧光强度显著强于 free FITC、mixture 组, 提示薏苡仁油形成微乳后增强了细胞摄取作用; 由 FITC-loaded CMEs 及 FITC-loaded But-Gal-CMEs 组对比可知, But-Gal-CMEs 荧光强度强于 CMEs, 提示 CMEs 经 But-Gal 表面修饰后进一步增强了细胞摄取作用。

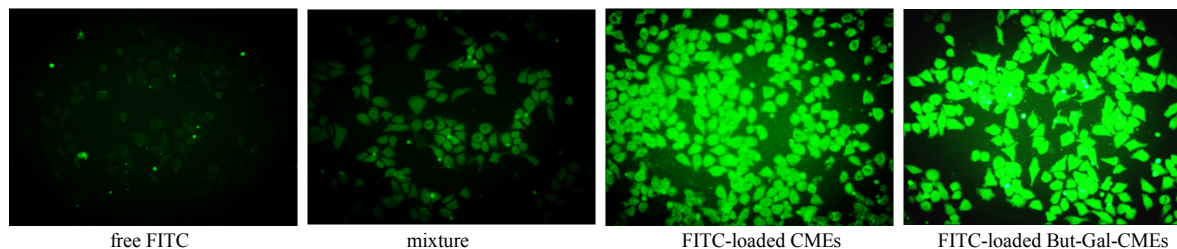


图 7 荧光倒置显微镜观察各组 HepG2 细胞 2 h 的摄取作用

Fig. 7 Fluorescent staining of cellular uptake in each group after incubation with HepG2 cell for 2 h

3 讨论

本研究以酶催化法成功合成了 But-Gal, 并用水滴定法制备了 CMEs 及经 But-Gal 对 CMEs 表面修饰形成的 But-Gal-CMEs。所制备的微乳均具有粒径小、圆整度好、稳定性好的特点。体外 MTT 实验考察了 CMEs 与 But-Gal-CMEs 对抑制肝癌细胞 HepG2 增殖的作用, 实验发现, CMEs、But-Gal-CMEs 抑制 HepG2 细胞增殖的 IC_{50} 值分别 71.23、62.55 $\mu\text{g/mL}$, CMEs 经 But-Gal 修饰后促进了其对 HepG2 细胞增殖的抑制作用。细胞摄取结果也进一步证明了 But-Gal-CMEs 增强了 HepG2 细胞对药物的摄取。CMEs 及 But-Gal-CMEs 体内靶向性如何, 值得进一步建立荷瘤 HepG2 裸鼠异位瘤模型, 采用近红外成像技术观察 CMEs 及 But-Gal-CMEs 口服后体内分布情况, 以及 2 种制剂体内药效如何, 也会对其进一步验证。

以薏苡仁油作为 CMEs 的油相, 不仅可以作为药效成分, 又可以降低辅料用量, CMEs 中的薏苡仁多糖成分, 能够起到协同抗肿瘤作用。

在肝细胞膜表面具有丰富的 ASGPR, 能特异性识别结构中具有半乳糖残基的半乳糖配体, 结合形成的配体受体复合物, 定向转运到肝细胞内。而且 But-Gal 是一种带有半乳糖残基的化合物, 能被 ASGPR 特异性识别, 将其对 CMEs 表面修饰形成 But-Gal-CMEs, 增强肿瘤靶向效果。此外, 本研究合成 But-Gal 所采用的酶催化法具有反应温和、效

率高、选择性强、副产物少等优势。

本研究合成 But-Gal 过程中遇到了产率低问题, 期望得到较高产率仍需对反应条件进行优化。本研究只合成了一种半乳糖酯修饰中药组分微乳, 关于其对不同分子构象的半乳糖酯修饰中药组分微乳能否达到较好的肿瘤靶向效果, 可以对其进行进一步研究。

参考文献

- [1] 胡少华, 肖小年, 易醒, 等. 薏苡仁的研究新进展 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(5): 1059-1060.
- [2] 吴岩, 原永芳. 薏苡仁的化学成分和药理活性研究进展 [J]. 华西药学杂志, 2010, 25(1): 111-113.
- [3] 张明发, 沈雅琴. 薏苡仁抗代谢综合征的药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2014, 37(2): 178-183.
- [4] 胡军, 金国梁. 薏苡仁的营养与药用价值 [J]. 中国食物与营养, 2007(6): 57-58.
- [5] 张明发, 沈雅琴. 薏苡仁油抗肝癌的药理作用与临床应用 [J]. 现代药物与临床, 2010, 25(6): 422-425.
- [6] Tenjaria S. Microemulsions: An overview and pharmaceutical applications [J]. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1999, 16(5): 461-521.
- [7] 贺俊杰, 陈彦, 杜萌, 等. 灵芝多组分微乳一步制备方法的探索 [J]. 药学学报, 2013, 48(3): 441-446.
- [8] Rigopoulou E I, Roggenbuck D, Smyk D, et al. Asialoglycoprotein receptor (ASGPR) as target autoantigen in liver autoimmunity: Lost and found [J]. Autoimmun Rev, 2012, 12(2): 260-269.
- [9] Mcvicker B, Tuma D J, Kubik J A, et al. The effect of ethanol on asialoglycoprotein receptor-mediated phagocytosis of

- apoptotic cells by rat hepatocytes [J]. *Hepatology*, 2002, 36(6): 1478-1487.
- [10] 张 盈, 杨 硕, 李灵芝. 肝靶向给药系统研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2013, 22(8): 923-927.
- [11] 严红梅, 贾晓斌, 张振海, 等. 维生素E聚乙二醇1000琥珀酸酯对宝藿苷I抑制乳腺癌细胞MCF-7增殖的影响 [J]. 中草药, 2015, 46(3): 384-388.
- [12] 程 怡, 吴 卫, 张冬青. 非水相酶促催化合成去唾液酸糖蛋白配体修饰物 [J]. 药学学报, 2010, 45(9): 1134-1138.
- [13] 郭波红, 程 怡, 林绿萍, 等. 去唾液酸糖蛋白受体介导的肝靶向脂质体配体的酶促催化合成研究 [J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(1): 40-43.
- [14] 袁成甜, 贺俊杰, 陈 彦, 等. 灵薏方多组分微乳的制备及其抗肺癌活性研 [J]. 中草药, 2014, 45(22): 3284-3288.
- [15] Eren Y, Özata A. Determination of mutagenic and cytotoxic effects of *Limonium globuliferum* aqueous extracts by Allium, Ames, and MTT tests [J]. *Rev Bras Farmacogn*, 2014, 24(1): 51-59.
- [16] 岳文华, 徐 坤, 冯玉林, 等. 白头翁皂苷D体外抗肝癌作用及其机制研 [J]. 中草药, 2014, 45(22): 3295-3301.
- [17] Nam H Y, Kwon S M, Chung H, *et al.* Cellular uptake mechanism and intracellular fate of hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles [J]. *J Controlled Release*, 2009, 135(3): 259-267.
- [18] Teskač K, Kristl J. The evidence for solid lipid nanoparticles mediated cell uptake of resveratrol [J]. *Int J Pharm*, 2010, 390(1): 61-69.