

透明质酸修饰的包载人参中3种成分纳米脂质载体抗肿瘤活体靶向与组织分布研究

孙爽¹, 尚尔雨², 肖洪彬¹, 赵程程¹, 郭玉岩¹, 李永吉¹, 杨大字¹, 吕邵娃^{1*}

1. 黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 黑龙江省森林保护研究所, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: 目的 采用人肝癌 SMMC-7721 细胞移植裸鼠, 研究包载人参 3 种成分 (齐墩果酸、熊果酸、人参皂苷 Rg₃, OUR) 的透明质酸 (hyaluronic acid, HA) 修饰的纳米脂质载体 (HA-OUR-NLC) 在荷瘤小鼠体内的分布情况。方法 以 FITC 和 DiR 为荧光探针, 采用荧光内窥式共聚焦成像和小动物活体成像技术动态监测 HA-OUR-NLC 靶向到各组织器官的行为过程。结果 HA-OUR-NLC 可明显提高齐墩果酸、熊果酸、人参皂苷 Rg₃ 在肿瘤中的相对摄取率 (RUE), 分别达到 2.51 ± 1.23 、 2.27 ± 1.43 和 2.77 ± 0.25 , 表明经过 HA 修饰的纳米粒可增强药物在肿瘤中的摄取。DiR-HA-OUR-NLC 组荷瘤裸鼠肿瘤区域可以明显观察到较强的荧光信号, 显著高于 DiR-OUR-NLC 组。结论 HA-OUR-NLC 能够在肝肿瘤部位富集, 可明显提高给药系统的肿瘤靶向性。

关键词: 人参; 纳米脂质载体; 肿瘤靶向; 组织分布; 共聚焦成像; 活体成像; 齐墩果酸; 熊果酸; 人参皂苷 Rg₃

中图分类号: R283 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)17-4209-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.17.029

In vivo imaging in tumor-bearing animals and tissue distribution of nanostructured lipid carrier modified by hyaluronic acid loaded with three components in *Panax ginseng*

SUN Shuang¹, SHANG Er-yu², XIAO Hong-bin¹, ZHAO Cheng-cheng¹, GUO Yu-yan¹, LI Yong-ji¹, Yang Da-yu¹, LV Shao-wa¹

1. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. Heilongjiang Forest Protection Institute, Harbin 150040, China

Abstract: Objective Human hepatoma SMMC-7721 cells were transplanted into nude mice to study the tissue distribution of nanostructured lipid carrier modified by hyaluronic acid (HA-OUR-NLC) loaded with three components in *Panax ginseng* (oleanolic acid, ursolic acid, and ginsenoside Rg₃, OUR). **Methods** FITC and DiR were used as fluorescent probes to dynamically monitor the HA-OUR-NLC targeted behavior of various tissues and organs through fluorescence endoscopic confocal imaging and *in vivo* imaging studies. **Results** RUE values of oleanolic acid, ursolic acid, and ginsenoside Rg₃ in tumors were significantly increased in HA-OUR-NLC group, reaching 2.51 ± 1.23 , 2.27 ± 1.43 , and 2.77 ± 0.25 , respectively, which indicated that nanoparticles modified by hyaluronic acid could enhance drug uptake in tumors. The DiR accumulation in tumors of DiR-HA-OUR-NLC was higher than that of DiR-OUR-NLC by the visualized fluorescence of *in vivo* imaging. **Conclusion** It indicated that nanoparticles modified by hyaluronic acid loaded with three components in *P. ginseng* can be enriched in the tumor site of liver cancer, which is in line with the expectation and can significantly improve the tumor targeting of the drug delivery system.

Key words: *Panax ginseng* C. A. Mey.; nanostructured lipid carriers; tumor targeting; tissue distribution; laser confocal scanning microscopy; *in vivo* imaging; oleanolic acid; ursolic acid; ginsenoside Rg₃

收稿日期: 2019-03-27

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (81803985); 黑龙江省自然科学基金资助项目 (H2016060)

作者简介: 孙爽 (1985—), 女, 医学博士, 黑龙江中医药大学中医博士流动站在站人员, 主要从事中药新剂型及新药开发的研究。

Tel: 13339515831 (0451)87266916 E-mail: 309642421@qq.com

*通信作者 吕邵娃 (1971—), 女, 硕士研究生导师, 教授, 主要从事中药新剂型及新药开发的研究。

Tel: (0451)87266916 E-mail: lvshaowa5599@hotmail.com

中药某些抗癌成分具有明显的毒副作用, 治疗窗窄, 如莪术油具有溶血不良反应、斑蝥有效部位对泌尿系统有强烈的刺激性、乌头总生物碱对神经系统具有毒性等; 另一方面许多有效成分溶解度低(如齐墩果酸、人参皂苷等)、半衰期短(如丁香苦苷、龙胆苦苷等)。生物利用度低和安全性方面的问题已成为制约中药多成分临床应用的关键问题^[1-2]。如何解决这一问题, 也成为制约中药递药系统发展的难点, 迫切需要设计出适合中药多成分特点的现代给药系统, 更好地发挥其治疗作用。中药纳米递药系统的出现提供了新的给药途径, 其具有增强药物的靶向性、提高生物利用度、降低毒副作用和增强缓释等优势, 从而有效地控制和治疗疾病。

虽然纳米技术在中医药领域积累了不少成功经验, 但将中药多成分形成纳米递药系统, 无疑面临着平衡包封和均衡释放的问题^[3-4]。这是因为中药有效成分具有多样性的特点, 其结构、理化性质和溶解度也存在差异^[5]。随着纳米递药系统在药物研发领域的渗透和影响, 将中药多成分制成纳米粒, 或将水溶性小及难溶性的药物加工成纳米颗粒, 可提高药物的靶向性和生物利用度, 增加药物的稳定性, 增强疗效, 减少毒性和不良反应, 还可使药物进入到机体各级微细的组织管道和病变组织细胞中, 大幅度提高药物的定位性、时效性和有效性, 从而有效地控制和治疗疾病^[6]。

纳米脂质载体(nanostructured lipid carriers, NLC)是 20 世纪 90 年代发展起来的一种新型的固体骨架纳米递药系统, 是将固体脂质和液体脂质高温熔融再低温固化而成。将难溶性药物包载到 NLC 中提高其生物利用度是一个值得关注的研究方向。NLC 可以明显提高疏水性药物非口服给药的传递效率。它具有脂质药物载体的固有优势: 难溶性药物在脂质成分中表现出良好的溶解度; 所使用的脂质具有良好的生物相容性, 可生物降解, 内毒性低; 控制药物释放^[7]。

人参为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根, 其中含有多成分诸如人参皂苷、人参多糖、蛋白质等。其中具有确切抗肿瘤疗效的活性成分齐墩果酸(oleanolic acid, OA)、熊果酸(ursolic acid, UA)、人参皂苷 Rg₃(ginsenoside Rg₃, Rg₃)水溶性差, 生物利用度低, 肿瘤靶向性差, 限制了药效的发挥, 使其临床应用受到限制^[8-10]。前期研究已采用 NLC 包载人参中 3 种难溶性有效成分

OA、UA、Rg₃制备纳米脂质载体(OUR-NLC)^[11]。本研究采用透明质酸(hyaluronic acid, HA)作为靶向因子, 经电荷吸附作用进行修饰得到 HA-OUR-NLC, 对其进行体内组织分布和小动物活体成像的研究, 以期探索药物对各组织的靶向性; 另外通过内窥镜式激光共聚焦成像系统(fluorescence *in vivo* endomicroscopy, FIVE)探讨 HA-OUR-NLC 能否靶向于肿瘤细胞, 克服了普通共聚焦显微镜不能对体内组织细胞进行在体成像的缺点, 实现动物活体内实时监测细胞尺寸水平, 从宏观和微观 2 个水平探索 HA-OUR-NLC 的靶向行为。

1 材料与仪器

雌性 BALB/C-nu 纯系裸鼠, 4~6 周龄, 体重 18~22 g, 北京维通利华公司提供, 合格证号 1100111711015241。实验动物许可证号 SCXK(京)2012-0001, 实验和饲养均在 SPF 条件下的超净层流架中进行, 动物自由摄取灭菌处理后的水和饲料。

人肝癌 SMMC-7721 细胞购自武汉博士德公司, 用含有 10%胎牛血清和 1%双抗的 RPMI 1640 培养基, 在 37 ℃、5% CO₂ 及饱和湿度的条件下培养, 取对数生长期的细胞进行实验。

对照品 OA(质量分数≥98%, 批号 130826)、UA(质量分数≥98%, 批号 131107)、Rg₃(质量分数≥98%, 批号 131029), 成都瑾哲生物有限公司; 甲醇、乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

ACQUITY UPLC I-Class 超高效液相色谱、BEH C₁₈ 色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm)、HLB 型 SPE 柱, 美国 Waters 公司; FA2004 分析电子天平(上海良平仪器表有限公司); 小动物活体成像系统(英国 Burker 公司); TGL-16C 型离心机(上海安亭科学仪器厂); Autotune 高强度超声波细胞破碎仪(美国 Sonics 公司)。

2 方法

2.1 OUR、OUR-NLC 和 HA-OUR-NLC 的制备

精密称取 OA、UA、Rg₃ 各 0.65 mg, DMSO 溶解, 用蒸馏水定容至 5 mL, 得总质量浓度为 0.39 mg/mL 的 OUR 溶液备用。

OUR-NLC 和 HA-OUR-NLC 制备方法参照文献方法^[11], 其中 OUR 的质量分数分别为 0.075%、0.038%。

2.2 组织分布实验

2.2.1 色谱条件 血浆中 OA、UA 检测波长 205 nm; 流动相为甲醇-水(92:8); 体积流量 1.0

mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 20 μL。血浆中 Rg₃ 检测波长 203 nm; 流动相为乙腈-水 (55:45); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 20 μL。

2.2.2 对照品溶液配制

(1) OA 对照品溶液的制备: 精密称取 OA 对照品 5.04 mg, 置于 25 mL 量瓶中, 甲醇定容, 得到 199.20 μg/mL 的对照品储备液, 分别精密量取对照品储备液适量于量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 配成 OA 质量浓度分别为 5.04、20.16、50.40、100.08、130.10 μg/mL 的系列对照品溶液备用。

(2) UA 对照品溶液的制备: 精密称取 UA 对照品 5.03 mg, 置于 25 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度, 得到 201.20 μg/mL 的对照品储备液, 分别精密量取对照品储备液适量于量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 配成 UA 质量浓度分别为 5.03、20.12、50.30、100.60、130.78 μg/mL 的系列对照品溶液备用。

(3) Rg₃ 对照品溶液的制备: 精密称取 Rg₃ 对照品 4.01 mg, 置于 25 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度, 得到 200.40 μg/mL 的对照品储备液, 分别精密量取对照品储备液适量于量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 配成 Rg₃ 质量浓度分别为 4.01、16.04、40.10、80.20、150.30 μg/mL 的系列对照品溶液备用。

2.2.3 模型制备与给药 取对数生长期 SMMC-7721 细胞, 接种于 BALB/C-nu 纯系裸鼠右侧肩胛上方, 每只小鼠接种 1×10^7 个细胞, 接种体积 0.2 mL。接种肿瘤细胞后, 待可观察到明显肿瘤结节时即建模成功 (3~6 周)。

取荷瘤小鼠 30 只, 随机分为 3 组, OUR、OUR-NLC 和 HA-OUR-NLC 组。给药前动物禁食不禁水 12 h 后, 尾 iv 给药, 给药剂量为 10 mg/kg (以 OUR 计)。

2.2.4 样品处理 给药后, 于 10 min 及 0.5、1、2、3 h 眼眶取血并脱臼处死小鼠, 迅速摘取心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏和肿瘤器官, 用生理盐水洗净各组织表面的残血, 并用滤纸将水分吸干, 精密称定质量, 加 1 mL 生理盐水, 快速匀浆器制备成匀浆液。取组织匀浆 200 μL, 加乙腈溶液 3 mL, 涡旋混合 1 min, 离心 (10 000 r/min) 5 min。并于 40 °C 水浴下氮气吹干, 加入 300 μL 甲醇溶解, 涡旋 1 min, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 进行 HPLC 分析, 进样量 20 μL, 记录峰面积, 按照公式计算峰浓度比值 (Ce)^[12]、相对摄取率 (RUE)^[13] 和相对靶向率 (RTE)^[14]。

$$Ce = C_{\max(NLC)} / C_{\max(溶液)}$$

$$RUE = AUC_{NLC} / AUC_{溶液}$$

$$RTE = [AUC_{组织(NLC)} / AUC_{总(NLC)} - AUC_{组织(溶液)} / AUC_{总(溶液)}] / [AUC_{组织(溶液)} / AUC_{总(溶液)}]$$

$C_{\max(NLC)}$ 和 $C_{\max(溶液)}$ 分别表示药物纳米粒和药物溶液峰质量浓度; AUC_{NLC} 和 $AUC_{溶液}$ 分别表示药物纳米粒和药物溶液制剂在靶器官中的药时曲线下面积; $AUC_{组织}$ 表示同一制剂在靶器官中药时曲线下面积; $AUC_{总}$ 表示同一制剂在所有组织中的药时曲线下面积总和

2.2.5 方法学考察

(1) 专属性: 分别制备荷瘤小鼠空白血浆以及心、肝、脾、肺、肾和瘤组织空白匀浆液 (不加入对照品溶液), 含对照品的血浆和各组织匀浆液 (空白血浆与空白匀浆液中加 OA、UA 与 Rg₃ 对照品) 及尾 iv 给药后血浆与各组织样品, 按照 “2.2.4” 项下方法进行操作, 进样 20 μL, HPLC 分析。在上述色谱条件下, 方法的专属性好, 所用色谱条件适宜, 处理方法理想, 生物样品中的内源性物质不影响 OA、UA、Rg₃ 3 个成分的检测, 适合本研究中生物样品的分析。

(2) 标准曲线: 精密吸取 OA、UA 与 Rg₃ 系列对照品溶液 200 μL, 置于 4 mL 离心管中, 分别精密加入心、肝、脾、肺、肾和肿瘤的空白组织匀浆液及空白血浆 100 μL, 涡旋混合 1 min 后, 按 “2.2.4” 项下方法处理。进样 20 μL, 记录色谱图。分别以 OA、UA 与 Rg₃ 峰面积为纵坐标 (Y), 以各自的质量浓度 C (μg/mL) 为横坐标 (X), 用加权最小二乘法进行线性回归运算, 求得标准曲线方程, 见表 1, OA 在 5.04~130.10 μg/mL、UA 在 5.03~130.78 μg/mL、Rg₃ 在 4.01~150.30 μg/mL 质量浓度与峰面积均呈现良好的线性关系。

(3) 精密度: 取大鼠空白血浆 100 μL, 分别加入适量的 OA、UA 与 Rg₃ 对照品溶液, 配制成 OA 低、中、高 3 个质量浓度 (5.04、20.16、100.08 μg/mL), UA 低、中、高 3 个质量浓度 (5.03、20.12、100.60 μg/mL) 与 Rg₃ 低、中、高 3 个质量浓度 (4.01、16.04、80.20 μg/mL) 的样品溶液, 涡旋混匀后 12 000×g 高速离心, 上清液采用 HPLC 测定 OA、UA 与 Rg₃ 的含量, 1 d 内连续测定 5 次, 连续测定 3 d。计算日内、日间精密度。结果显示, OA 低、中、高 3 个质量浓度样品的日内精密度 RSD 分别为 3.27%、4.26%、3.64%, 日间精密度 RSD 分别为 3.93%、4.90%、3.86%; UA 的日内精密度 RSD 分别为 4.02%、2.39%、2.86%, 日间精密度 RSD 分别为

表 1 各组织中各成分标准曲线方程

Table 1 Standard curve in different rat tissue homogenates

成分	组织	标准曲线方程	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	r^2
OA	心脏	$Y=2\ 826.1\ X+1.7\times 10^5$	5.04~130.10	0.996 4
	肝脏	$Y=5\ 038.6\ X+1.0\times 10^5$		0.997 8
	脾脏	$Y=3\ 646.2\ X+1.5\times 10^5$		0.996 1
	肺脏	$Y=2\ 859.2\ X+1.2\times 10^5$		0.999 0
	肾脏	$Y=3\ 819.6\ X+2.1\times 10^5$		0.998 7
	血液	$Y=2\ 019.3\ X+1.0\times 10^5$		0.996 8
	肿瘤	$Y=4\ 806.0\ X+2.2\times 10^5$		0.998 5
	心脏	$Y=3\ 142.0\ X+1.2\times 10^5$	5.03~130.78	0.998 9
UA	肝脏	$Y=5\ 937.0\ X+1.6\times 10^5$		0.998 2
	脾脏	$Y=4\ 936.0\ X+1.3\times 10^5$		0.994 9
	肺脏	$Y=3\ 984.2\ X+1.2\times 10^5$		0.996 7
	肾脏	$Y=2\ 019.8\ X+1.4\times 10^5$		0.994 1
	血液	$Y=2\ 671.5\ X+2.5\times 10^5$		0.993 6
	肿瘤	$Y=3\ 284.6\ X+2.2\times 10^5$		0.997 9
	心脏	$Y=3\ 735.0\ X+2.2\times 10^5$	4.01~150.30	0.994 9
Rg ₃	肝脏	$Y=1\ 880.0\ X+1.0\times 10^5$		0.998 1
	脾脏	$Y=4\ 446.0\ X+1.1\times 10^5$		0.993 6
	肺脏	$Y=6\ 859.2\ X+1.2\times 10^5$		0.999 3
	肾脏	$Y=1\ 832.8\ X+1.4\times 10^5$		0.999 7
	血液	$Y=1\ 574.0\ X+2.5\times 10^5$		0.998 4
	肿瘤	$Y=3\ 459.0\ X+2.2\times 10^5$		0.998 2

4.83%、3.01%、3.28%；Rg₃的日内精密度 RSD 分别为 3.29%、4.30%、2.37%，日间精密度 RSD 分别为 4.27%、4.88%、3.02%，符合生物样品方法学的测定要求。

(4) 稳定性：分别取上述低、中、高 3 个质量浓度的样品溶液，考察在室温放置 6 h、4 ℃冷藏条件放置 24 h、-20 ℃冰箱中放置 24 h，取出在室温下自然融解，完全融化后再放置于-10 ℃条件下测定样品中 OA、UA 与 Rg₃的含量，评价不同条件下稳定性。在稳定性实验中不同条件下样品溶液中 OA、UA 与 Rg₃含量的 RSD 均小于 10%，提示 OA、UA 与 Rg₃血浆样品溶液在室温放置 6 h、4 ℃冷藏 24 h 和冷冻贮存条件下具有良好的稳定性。

(5) 加样回收率：取大鼠空白血浆 100 μL ，分别加入适量的 OA、UA 与 Rg₃对照品溶液，配制成 OA 低、中、高 3 个质量浓度 (5.04、20.16、100.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，UA 低、中、高 3 个质量浓度 (5.03、20.12、100.60 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 与 Rg₃低、中、高 3 个质量浓度 (4.01、16.04、80.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的样品溶液，涡旋混匀后 12 000 $\times g$ 高速离心，取上清液 20 μL 进样检测并记录峰面积，根据标准曲线方程计算样品的

含量，将样品实测质量浓度与理论质量浓度进行比较，计算方法回收率。另精密移取低、中、高 3 个浓度 OA、UA 和 Rg₃对照品溶液直接进样，记录峰面积，将样品的峰面积与上述对照品溶液的峰面积进行比较，计算提取回收率。结果显示，各质控样品 OA 方法回收率为 89.67%、92.23%、94.32%，RSD 分别为 4.46%、4.32%、2.97%；UA 方法回收率为 89.45%、93.63%、92.19%，RSD 分别为 4.98%、3.26%、2.79%；Rg₃方法回收率为 97.94%、92.18%、89.97%，RSD 分别为 4.32%、3.82%、4.93%，RSD 均小于 5%。

OA 提取回收率为 87.31%、90.25%、86.72%，RSD 分别为 4.34%、4.21%、3.96%；UA 提取回收率为 90.02%、87.74%、89.27%，RSD 分别为 4.17%、4.33%、4.18%；Rg₃提取回收率为 88.06%、89.95%、90.28%，RSD 分别为 4.40%、3.28%、4.09%，RSD 均小于 10%。符合生物样品定量分析的相关要求。

2.3 激光共聚焦实验

在 OUR-NLC 和 HA-NUR-NLC 中加入荧光探针 FITC，制备得到 FITC-OUR-NLC、FITC-HA-OUR-NLC 纳米粒。荷瘤小鼠 18 只，随机分为 3 组，

即对照组(FITC 溶液)、FITC-OUR-NLC 组和 FITC-HA-OUR-NLC 组。给药前小鼠禁食不禁水 12 h, ip 2%戊巴比妥钠(0.1 mL/20 g)深度麻醉,待麻醉后,尾 iv 给药,给药剂量为 10 mg/kg(以 OUR 计)。

在小鼠肝脏部位做微创手术,将共聚焦显微镜探针置于肿瘤及肝脏处,各实验组在 60、90、120、150、180、240 min 实时拍照。

2.4 活体成像实验

在 OUR-NLC 和 HA-NUR-NLC 中加入荧光探针 DiR,制备得到 DiR-OUR-NLC、DiR-HA-OUR-NLC 纳米粒。荷瘤小鼠 18 只,随机分为 3 组,即对照组(DiR 溶液)、DiR-OUR-NLC 组和

DiR-HA-OUR-NLC 组。给药前小鼠禁食不禁水 12 h 后,ip 2%戊巴比妥钠(0.1 mL/20 g),待麻醉后,尾 iv 给药,放置于活体成像仪中,各实验组在 10 min 及 0.5、1、2、3、12 h 实时拍照。拍摄模式为荧光模式,激发波长 760 nm,发射波长 700 nm,曝光时间为 7 s。

3 结果

3.1 HA-OUR-NLC 对 OA、UA 和 Rg₃ 在荷瘤小鼠各组织中分布的影响

OUR、OUR-NLC 和 HA-OUR-NLC 给药后各时间点小鼠血浆、心、肝、脾、肺、肾以及肿瘤中 OA、UA 和 Rg₃ 水平变化结果见图 1~3。结果可知,

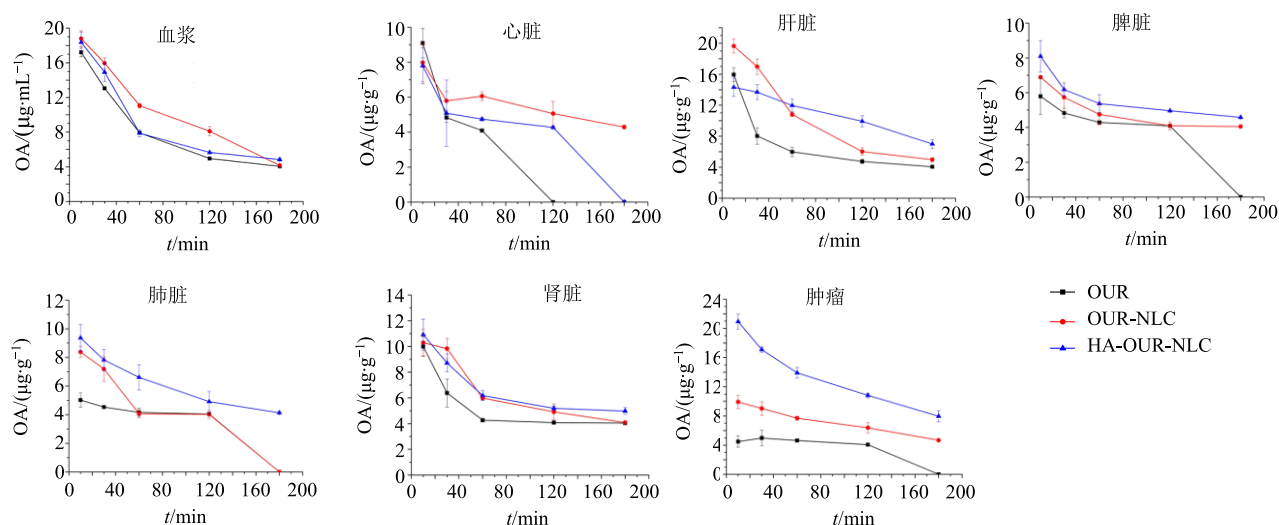


图 1 OUR、OUR-NLC 和 HA-OUR-NLC 给药后 OA 在荷瘤小鼠血浆和各组织的分布 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 1 OA distribution in plasma and tissues of mice injected with OUR, OUR-NLC, and HA-OUR-NLC ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

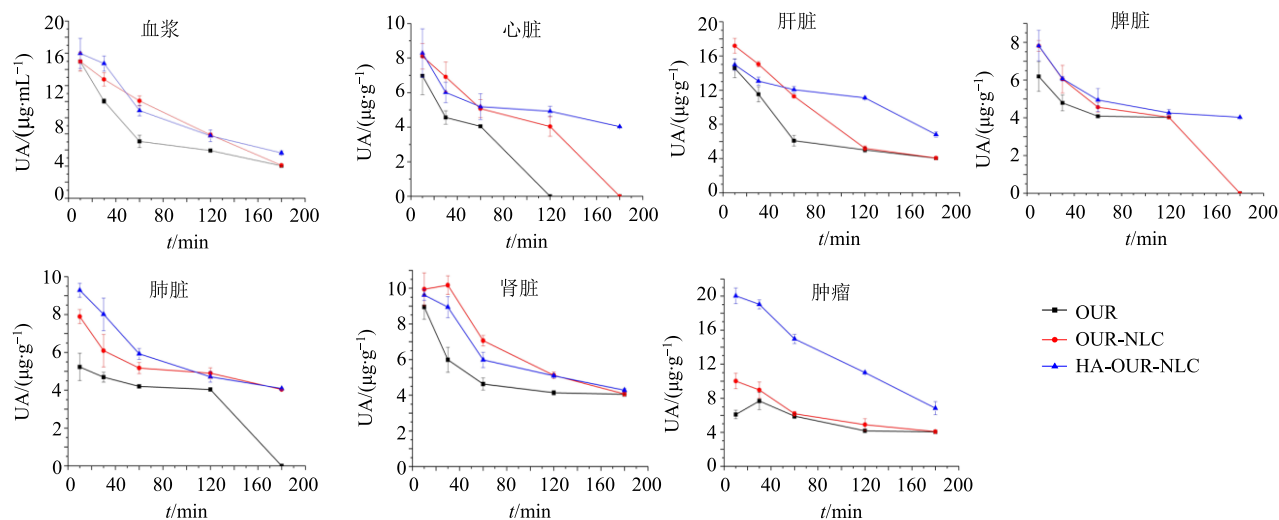


图 2 OUR、OUR-NLC 和 HA-OUR-NLC 给药后 UA 在荷瘤小鼠血浆和组织的分布 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 2 UA distribution in plasma and tissues of mice injected with OUR, OUR-NLC, and HA-OUR-NLC ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

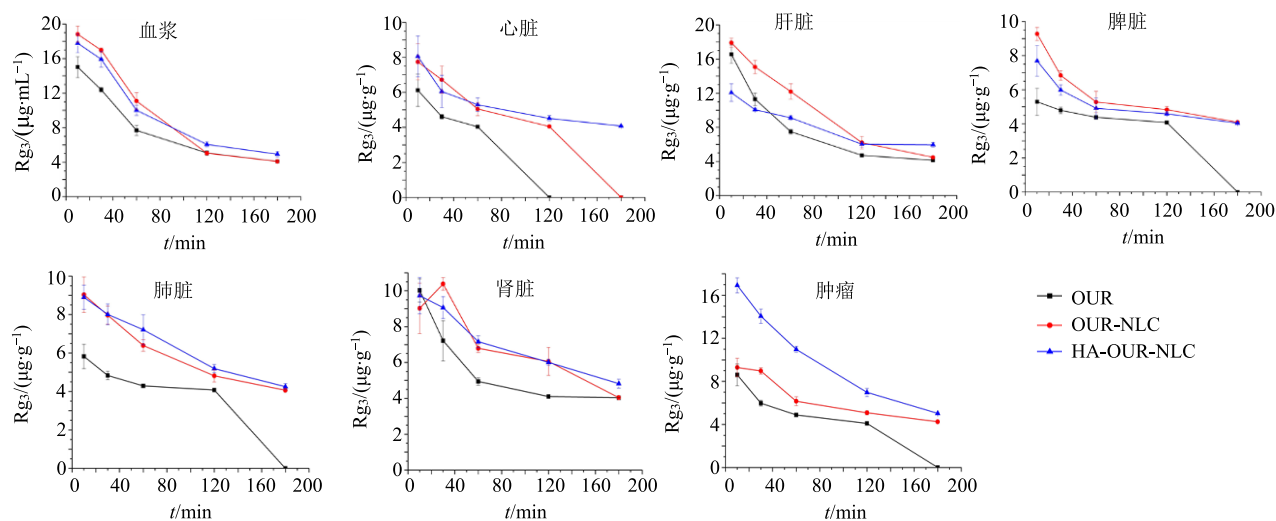


图3 OUR、OUR-NLC 和 HA-OUR-NLC 给药后 Rg_3 在荷瘤小鼠血浆和组织的分布 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 3 Rg_3 distribution in plasma and tissues of mice injected with OUR, OUR-NLC, and HA-OUR-NLC ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

HA-OUR-NLC 组小鼠 OA、UA 和 Rg_3 质量分数在肿瘤中最高, 其次为肝脏, 心脏中最低。OUR-NLC 组小鼠各组织中 OA、UA 和 Rg_3 质量浓度均高于 OUR 组, 且衰减时间有所延长。与 OUR-NLC 比较, HA-OUR-NLC 的肿瘤靶向性更明显, 且肝、肾的含药量略有降低。HA-OUR-NLC 给药后经体循环快速富集于肿瘤和肝脏, 而在血液和其他组织中分布较少。HA-OUR-NLC 组在肿瘤的药物蓄积增加, 推断

HA 可能与肿瘤细胞表面受体 CD44 特异性结合, 介导药物转运入胞, 从而增加了药物在肿瘤中的蓄积。表 2~4 结果表明, HA-OUR-NLC 组小鼠 OA、UA 和 Rg_3 在肿瘤中 Ce 分别为 2.99 ± 0.85 、 3.11 ± 0.50 、 3.12 ± 0.32 。RUE 分别达到 2.51 ± 1.23 、 2.27 ± 1.43 和 2.77 ± 0.25 , 表明经过 HA 修饰的纳米粒可增强药物在肿瘤中的摄取。RTE 分别达到 $(5.60 \pm 1.62)\%$ 、 $(5.24 \pm 0.32)\%$ 和 $(5.07 \pm 1.43)\%$ 。

表2 OUR、OUR-NLC 和 HA-OUR-NLC 给药后 OA 在荷瘤小鼠组织中的靶向性 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Targeting of OA in tissues of mice injected with OUR, OUR-NLC, and HA-OUR-NLC ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	部位	AUC/(h·μg·mL ⁻¹)	C _{max} /(μg·mL ⁻¹)	RUE	RTE/%	Ce
OUR	心脏	1.21 ± 0.54	0.49 ± 0.54	—	—	—
	肝脏	11.79 ± 1.16	9.01 ± 1.25	—	—	—
	脾脏	1.57 ± 0.27	3.02 ± 1.82	—	—	—
	肺脏	1.08 ± 1.02	0.66 ± 0.92	—	—	—
	肾脏	3.01 ± 0.87	2.86 ± 0.75	—	—	—
	肿瘤	10.13 ± 1.90	4.18 ± 0.24	—	—	—
OUR-NLC	心脏	0.82 ± 0.38	0.38 ± 1.05	0.68 ± 1.95	-0.32 ± 0.21	0.78 ± 0.23
	肝脏	30.13 ± 0.81	15.32 ± 1.34	2.55 ± 0.64	7.53 ± 1.23	1.70 ± 0.86
	脾脏	2.55 ± 0.12	4.52 ± 0.74	1.62 ± 0.83	3.02 ± 1.43	1.50 ± 1.25
	肺脏	1.63 ± 0.61	0.83 ± 1.57	1.51 ± 0.57	1.78 ± 0.85	1.26 ± 1.35
	肾脏	1.03 ± 0.28	1.54 ± 0.82	0.34 ± 1.53	-0.15 ± 0.93	0.54 ± 0.23
	肿瘤	11.39 ± 0.72	5.92 ± 1.56	1.12 ± 0.27	3.26 ± 0.96	1.42 ± 1.11
HA-OUR-NLC	心脏	0.63 ± 1.76	0.21 ± 1.49	0.52 ± 0.86	-0.71 ± 0.64	0.43 ± 0.21
	肝脏	22.20 ± 1.07	15.51 ± 0.38	2.14 ± 1.27	4.38 ± 1.74	1.72 ± 1.18
	脾脏	2.08 ± 0.43	3.89 ± 0.48	1.32 ± 0.85	3.22 ± 1.44	1.29 ± 0.32
	肺脏	1.25 ± 0.64	0.70 ± 0.32	1.16 ± 0.23	2.09 ± 1.57	1.06 ± 0.98
	肾脏	1.12 ± 0.22	1.06 ± 1.27	0.37 ± 0.89	-0.26 ± 0.94	0.37 ± 1.92
	肿瘤	25.39 ± 0.54	12.48 ± 1.33	2.51 ± 1.23	5.60 ± 1.62	2.99 ± 0.85

表 3 OUR、OUR-NLC 和 HA-OUR-NLC 给药后 UA 在荷瘤小鼠组织中的靶向性 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Targeting of UA in tissues of mice injected with OUR, OUR-NLC, and HA-OUR-NLC ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	部位	AUC/(h·μg·mL ⁻¹)	C _{max} /(μg·mL ⁻¹)	RUE	RTE/%	Ce
OUR	心脏	1.06 ± 0.43	0.26 ± 0.89	—	—	—
	肝脏	11.41 ± 1.23	8.37 ± 1.23	—	—	—
	脾脏	2.06 ± 0.45	2.91 ± 0.43	—	—	—
	肺脏	1.37 ± 0.94	0.49 ± 1.92	—	—	—
	肾脏	2.91 ± 0.52	2.28 ± 1.62	—	—	—
	肿瘤	12.11 ± 1.96	4.45 ± 0.84	—	—	—
OUR-NLC	心脏	0.79 ± 0.33	0.36 ± 0.90	0.75 ± 1.30	-0.54 ± 1.34	1.38 ± 0.03
	肝脏	32.02 ± 1.17	15.29 ± 0.59	2.80 ± 0.61	8.04 ± 0.21	1.83 ± 0.84
	脾脏	2.95 ± 1.01	3.97 ± 0.78	1.43 ± 0.69	3.15 ± 0.68	1.36 ± 0.44
	肺脏	1.80 ± 0.29	0.78 ± 0.22	1.31 ± 0.43	2.31 ± 0.84	1.59 ± 0.60
	肾脏	1.12 ± 0.33	1.60 ± 0.17	0.38 ± 0.44	-0.54 ± 1.53	0.70 ± 0.32
	肿瘤	11.18 ± 1.87	5.81 ± 1.09	0.92 ± 0.52	3.93 ± 1.68	1.31 ± 0.87
HA-OUR-NLC	心脏	0.56 ± 0.12	0.23 ± 0.03	0.53 ± 1.21	0.69 ± 0.33	0.88 ± 0.48
	肝脏	22.79 ± 0.52	16.82 ± 1.83	2.26 ± 0.45	4.79 ± 0.53	2.01 ± 0.97
	脾脏	2.68 ± 1.27	3.59 ± 0.78	1.30 ± 0.55	3.78 ± 0.89	1.23 ± 1.59
	肺脏	1.14 ± 0.92	0.69 ± 0.34	0.83 ± 0.44	2.12 ± 0.22	1.41 ± 0.78
	肾脏	0.94 ± 1.14	1.26 ± 0.33	0.32 ± 1.20	-0.18 ± 0.92	0.55 ± 0.18
	肿瘤	27.53 ± 0.62	13.84 ± 0.91	2.27 ± 1.43	5.24 ± 0.32	3.11 ± 0.50

表 4 OUR、OUR-NLC 和 HA-OUR-NLC 给药后 Rg₃ 在荷瘤小鼠组织中的靶向性 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Targeting of Rg₃ in tissues of mice injected with OUR, OUR-NLC, and HA-OUR-NLC ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	部位	AUC/(h·μg·mL ⁻¹)	C _{max} /(μg·mL ⁻¹)	RUE	RTE/%	Ce
OUR	心脏	1.83 ± 0.52	0.52 ± 0.47	—	—	—
	肝脏	12.63 ± 0.45	9.36 ± 0.35	—	—	—
	脾脏	1.09 ± 0.52	2.71 ± 0.44	—	—	—
	肺脏	1.21 ± 0.24	0.78 ± 0.58	—	—	—
	肾脏	2.98 ± 0.83	2.61 ± 0.48	—	—	—
	肿瘤	9.53 ± 0.80	4.10 ± 0.04	—	—	—
OUR-NLC	心脏	0.91 ± 0.77	0.45 ± 0.94	0.50 ± 1.24	-0.13 ± 0.22	0.87 ± 0.45
	肝脏	33.43 ± 1.27	13.17 ± 0.73	2.64 ± 1.09	6.38 ± 0.93	1.41 ± 1.77
	脾脏	2.88 ± 0.18	3.10 ± 0.61	2.64 ± 1.03	3.22 ± 0.39	1.14 ± 1.98
	肺脏	1.35 ± 0.61	0.92 ± 1.96	1.12 ± 0.98	2.09 ± 0.94	1.18 ± 0.25
	肾脏	0.92 ± 0.39	1.36 ± 0.67	0.31 ± 0.33	-0.26 ± 0.53	0.52 ± 0.58
	肿瘤	10.75 ± 1.80	5.01 ± 0.42	1.13 ± 0.83	3.29 ± 0.61	1.22 ± 0.91
HA-OUR-NLC	心脏	0.62 ± 0.77	0.33 ± 1.93	0.34 ± 0.94	-0.82 ± 1.02	0.63 ± 1.63
	肝脏	22.43 ± 0.42	13.06 ± 0.09	2.01 ± 0.43	4.94 ± 1.04	1.40 ± 0.54
	脾脏	2.26 ± 0.21	3.50 ± 0.79	2.07 ± 0.93	2.86 ± 0.70	1.29 ± 0.84
	肺脏	0.91 ± 1.23	0.89 ± 0.07	0.75 ± 0.08	1.47 ± 0.44	1.14 ± 0.83
	肾脏	1.03 ± 0.35	1.21 ± 1.06	0.35 ± 0.48	-0.07 ± 1.53	0.46 ± 0.93
	肿瘤	26.39 ± 0.42	12.78 ± 0.79	2.77 ± 0.25	5.07 ± 1.43	3.12 ± 0.32

3.2 激光共聚焦实验

由图 4 可知, 给药 60 min 后 FITC 溶液组没有荧光, 未见肿瘤细胞以及肝细胞轮廓, FITC-OUR-NLC、FITC-HA-OUR-NLC 组肿瘤和肝脏细胞轮廓

清晰, 因此, 排除了游离 FITC 对测定的干扰。

由图 5 可知, 给药 60 min 时 FITC-HA-OUR-NLC 主要分布在细胞间, 90 min 时向内移动到细胞膜内侧, 当给药 120 min 时, FITC-HA-OUR-NLC

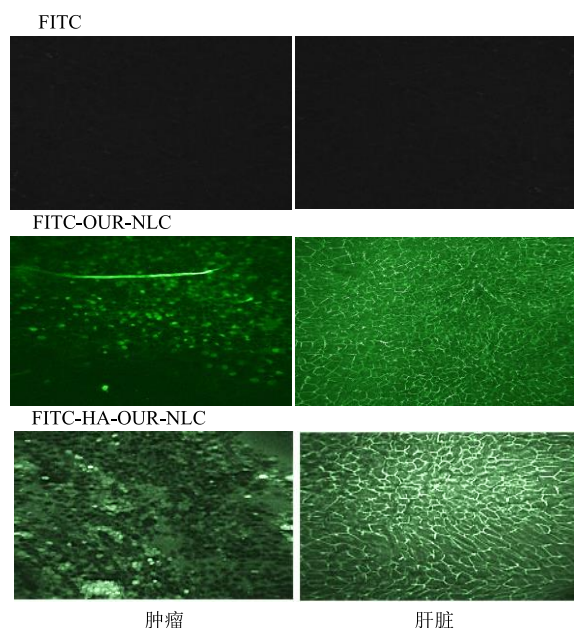


图 4 给药 60 min 后 FITC、FITC-OUR-NLC 和 FITC-HA-OUR-NLC 在荷瘤小鼠肿瘤和肝脏的分布

Fig. 4 Distribution of FITC, FITC-OUR-NLC and FITC-HA-OUR-NLC in tumor and liver of tumor-bearing nude mice after 60 min

进入到细胞内部开始大量聚集, 在 240 min 后, FITC-HA-OUR-NLC 在细胞内大量消散, 视野模糊。由此可见, FITC-HA-OUR-NLC 可以递药于细胞内。与 FITC-OUR-NLC 相比, FITC-HA-OUR-NLC 随着时间的延长, 在肿瘤部位的荧光强度增强, 纳米粒由细胞外逐渐进入到细胞内部, 数量亦逐渐增加, 说明纳米粒进入细胞内的数量与时间呈正相关性。结果表明, 经 HA 修饰后, HA-OUR-NLC 能更好地进入肿瘤细胞内部, 体现了其主动靶向肿瘤细胞的特性。

3.3 活体成像实验

不同实验组各时间点成像如图 6 所示, DiR-HA-OUR-NLC 组可以明显地在肿瘤区域观察到较强的荧光信号, 3 h 在肿瘤部位的蓄积量最大, 而 DiR-OUR-NLC 组只观察到明亮的全身信号, 肿瘤部位较弱。

4 讨论

HA 具有高效的肿瘤靶向特异性, 在赋予药物载体靶向性以及自身作为药物载体等方面有重要的应用。细胞表面表达的 CD44 是 HA 最重要的受体之一, CD44 表达量较高的细胞表现出对 HA 更高

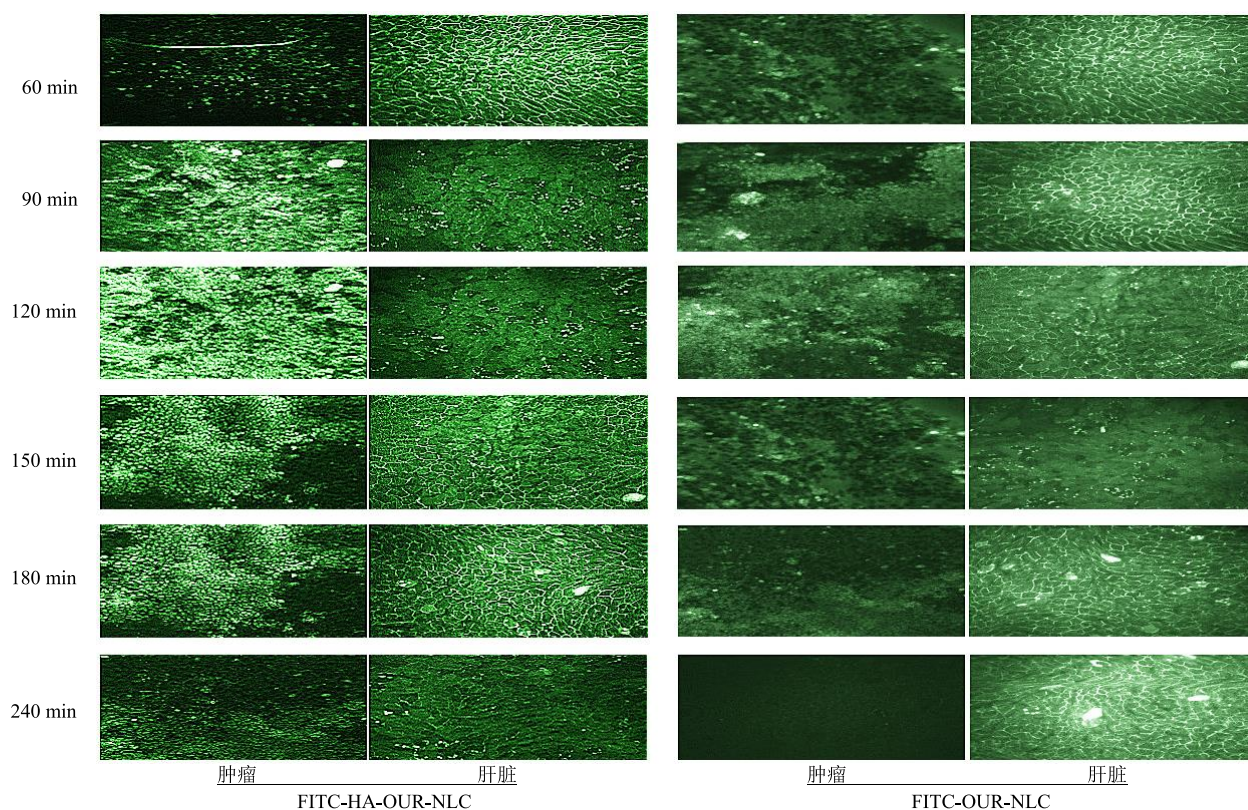


图 5 不同时间点 FITC-OUR-NLC 和 FITC-HA-OUR-NLC 在荷瘤小鼠肿瘤和肝脏的分布

Fig. 5 Distribution of FITC-OUR-NLC and FITC-HA-OUR-NLC in tumor and liver of tumor-bearing nude mice at different time points

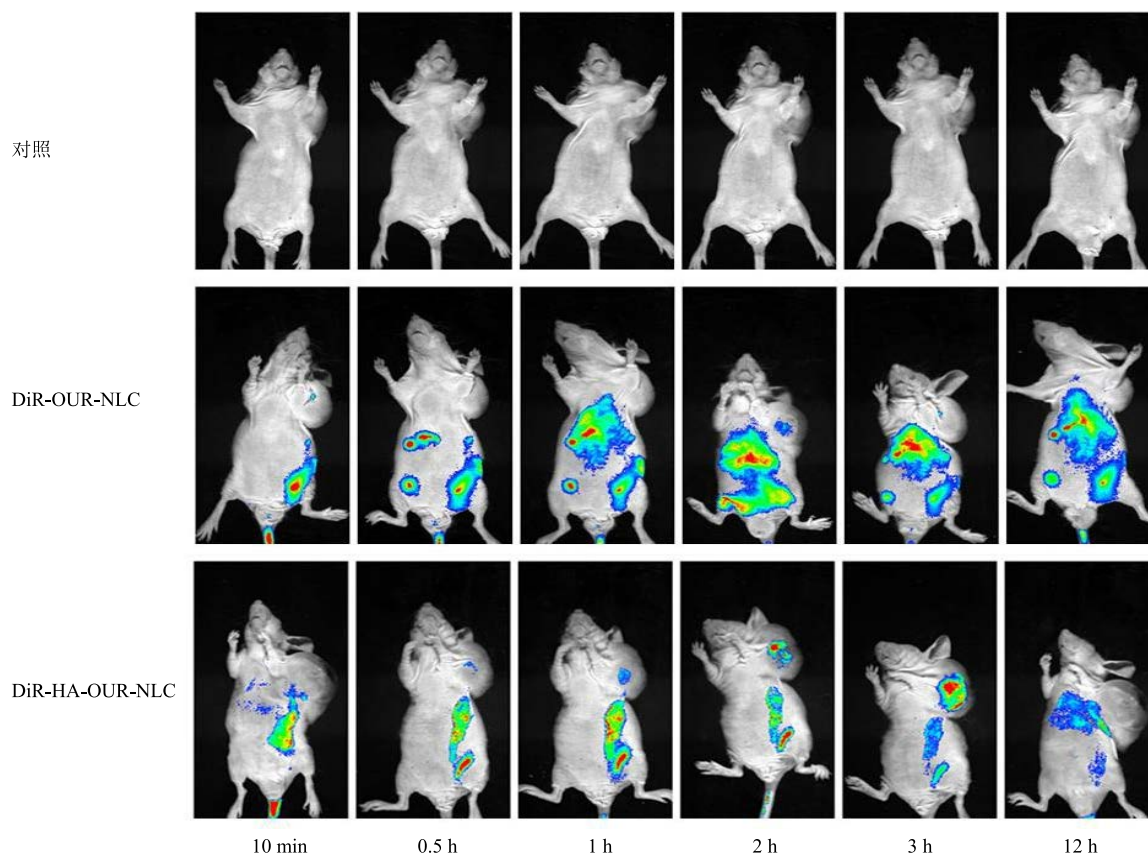


图 6 各组荷瘤小鼠肿瘤部位活体成像

Fig. 6 *In vivo* near-infrared fluorescence imaging of tumor

的摄取效率。肿瘤细胞表面相对正常细胞更多地表达 CD44 分子，通过 CD44 介导的细胞内吞作用，从而使肿瘤细胞能够更多地特异性摄取纳米脂质载体。HA 作为靶向肿瘤的药物载体，主要依靠受体介导的细胞内吞作用，实现在靶标细胞部位的药物浓度增加，实现靶向治疗^[11]。本研究选用人参中对抑制肿瘤确有疗效的难溶性有效成分 UA、OA、Rg₃，将 3 个成分包载在纳米脂质载体中，从而达到延长循环时间、改变药物在体内分布、提高药效和降低副作用的目的。采用 HA 作为靶向因子，经电荷吸附作用对纳米脂质载体进行靶向修饰，实现主动靶向肿瘤的目的。

在进行动物体内的相关研究时，通常需要将动物进行活体解剖取材，无法对活体进行长时间重复性的观察^[15]。近年来，活体生物荧光成像技术（optical *in vivo* imaging, OIVI）的出现使得这一难题得到了很好的解决。DiR 是一种亲脂性近红外荧光染料，可用于实时观察制剂在体内的迁移和分布。之所以选择近红外的荧光染料，是为了减小动物内源性物质及皮毛对测定的干扰。将 DiR 包载于内部，

尾 iv 给药，考察制剂的靶向性。

本研究以小动物活体成像仪考察了 HA-OUR-NLC 对荷瘤小鼠的肿瘤靶向性效果。结果显示，与 DiR-OUR-NLC 相比，DiR-HA-OUR-NLC 主动靶向于荷瘤小鼠的肿瘤部位，并在给药后 3 h 达到高效富集。进一步验证经 HA 修饰的纳米脂质载体具有良好的肿瘤靶向效果，符合预期设想。

参考文献

- [1] Pornputtipitak W, Pantakitcharoenkul J, Teeranachaideekul V, *et al.* Effect of oil content on physiochemical characteristics of γ -oryzanol-loaded nanostructured lipid carriers [J]. *J Oleo Sci*, 2019, 68(8): 699-707.
- [2] Elmowafy M, Shalaby K, Badran M, *et al.* Fatty alcohol containing nanostructured lipid carrier (NLC) for progesterone oral delivery: *In vitro* and *ex vivo* studies [J]. *J Drug Deliv Sci Tec*, 2018, 45: 230-239.
- [3] Huang J, Wang Q, Li T, *et al.* Nanostructured lipid carrier (NLC) as a strategy for encapsulation of quercetin and linseed oil: Preparation and *in vitro* characterization studies [J]. *J Food Eng*, 2017, 215(10): 1-12.
- [4] Czajkowska-Kośnik A, Szekalska M, Winnicka K.

- Nanostructured lipid carriers: A potential use for skin drug delivery systems [J]. *Pharmacol Rep*, 2019, 71(1): 156-166.
- [5] Wang K, Zhang Q J, Miao Y L, *et al.* Effect of solid lipid's structure on nanostructured lipid carriers encapsulated with sun filter: Characterisation, photostability and *in vitro* release [J]. *J Microencapsul*, 2017,34(1): 104-110.
- [6] Gaumet M, Gumy R, Delie F. Interaction of biodegradable nanoparticles with intestinal cells: The effect of surface hydrophilicity [J]. *Int J Pharm*, 2010, 390(1): 45-52.
- [7] Cirri M, Maestrini L, Maestrelli F, *et al.* Design, characterization and *in vivo* evaluation of nanostructured lipid carriers (NLC) as a new drug delivery system for hydrochlorothiazide oral administration in pediatric therapy [J]. *Drug Deliv*, 2018, 25(1): 1910-1921.
- [8] Yang Y, Ren C, Zhang Y, Wu X. Ginseng: An nonnegligible natural remedy for healthy aging [J]. *Aging Dis*, 2017, 8(6): 708-720.
- [9] Shin B K, Kwon S W, Park J H. Chemical diversity of ginseng saponins from *Panax ginseng* [J]. *J Ginseng Res*, 2015, 39(4): 287-298.
- [10] Kim J H. Pharmacological and medical applications of *Panax ginseng* and ginsenosides: A review for use in cardiovascular diseases [J]. *J Ginseng Res*, 2017, 42(3): 264-269.
- [11] 孙爽, 尚尔雨, 肖洪彬, 等. 同时包载人参3种成分的透明质酸修饰的纳米脂质载体的制备及表征 [J]. 中草药, 2018, 49(16): 3815-3820.
- [12] McLaren W J, Anikijenko P, Thomas S G, *et al.* *In vivo* detection of morphological and microvascular changes of the colon in association with colitis using fiberoptic confocal imaging (FOCI) [J]. *Digest Dis Sci*, 2002, 47(11): 2424-2433.
- [13] Yamaguchi M, Ueda K, Isowaki A, *et al.* Mucoadhesive properties of chitosan-coated ophthalmic lipid emulsion containing indomethacin in tear fluid [J]. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32(7): 1266-1271.
- [14] Zhao R, Liu S, Mao S, *et al.* Study on liver targeting effect of vinegar-baked *Radix Bupleuri* on resveratrol in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 126(3): 415-420.
- [15] Li J, Huo M, Wang J, *et al.* Redox-sensitive micelles self-assembled from amphiphilic hyaluronic acid-deoxycholic acid conjugates for targeted intracellular delivery of paclitaxel [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(7): 2310-2320.