

## 聚酰胺-胺树枝状大分子包载白藜芦醇的制备及体外研究

常子晨<sup>1</sup>, 李 颖<sup>2</sup>, 张 颖<sup>1</sup>, 阴龙飞<sup>1</sup>, 刘春艳<sup>1\*</sup>

1. 华北理工大学药学院, 河北 唐山 063200

2. 同华医院管理公司同煤集团总医院 药学部, 山西 大同 037005

**摘要:** 目的 制备聚酰胺-胺树枝状大分子包载白藜芦醇纳米载体复合物 (Res-PAMAM-Ac), 并考察其稳定性和安全性。方法 采用发散法合成空白载体, 并进行乙酰化修饰, 核磁共振图谱 (<sup>1</sup>H-NMR)、红外光谱 (IR) 对载体进行表征, 粒径及 Zeta 电位检测考察载体性质; 逆相蒸发法制备 Res-PAMAM-Ac, HPLC 检测载药量、包封率以及稳定性; MTT 法考察载体和复合物对人肺癌 A549 细胞的细胞毒性; 溶血性试验评价载体和复合物的生物安全性。结果 成功合成 Res-PAMAM-Ac, 大小均匀, 平均粒径 (167.30±21.70) nm, PDI 为 0.115±0.006, 电位 (19.27±0.35) mV; 平均载药量 (76.99±1.30) mg/g, 包封率 (29.63±2.70) %, 稳定性参数 (*K<sub>E</sub>*) 小于 0.15, 且药物无明显析出; 复合物质量浓度在 30 μg/mL 以下时对人肺癌 A549 细胞具有较小毒性; 载体及复合物溶血率低于 5%, 视为生物安全。结论 制备的 Res-PAMAM-Ac 粒径均匀、载药量较好、稳定性高、毒性小。

**关键词:** 白藜芦醇纳米载体复合物; 聚酰胺-胺树枝状大分子; 载药量; 稳定性; 细胞毒性; 安全性; 发散法; 逆相蒸发法; HPLC; 包封率; MTT 法; 人肺癌 A549 细胞; 溶血性试验

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)24-5963-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.24.008

## Preparation and *in vitro* study of polyamide-amine dendrimer-loaded resveratrol

CHANG Zi-chen<sup>1</sup>, LI Ying<sup>2</sup>, ZHANG Ying<sup>1</sup>, YIN Long-fei<sup>1</sup>, LIU Chun-yan<sup>1</sup>

1. College of Pharmacy, North China University of Science and Technology, Tangshan 063200, China

2. Department of Pharmacy, General Hospital of Coal Group, Tonghua Hospital Management Company, Datong 037005, China

**Abstract: Objective** The resveratrol nanocarrier complex (Res-PAMAM-Ac) was encapsulated by polyamide-amine dendrimer, its stability and safety was investigated. **Methods** The blank carriers were synthesized by the divergence method and acetylated. Characterization of the nanocarriers was investigated by <sup>1</sup>H-NMR and IR. The properties of carriers were investigated by particle size and zeta potential. Res-PAMAM-Ac was prepared by reverse-phase evaporation method, and the drug loading, encapsulation rate and stability were examined by HPLC. The cytotoxicity of nanocarriers and complex on human lung cancer A549 cells were investigated by MTT method. The biosafety of nanocarriers and complex was inspected by hemolysis test. **Results** Res-PAMAM-Ac nanocarrier complex was synthesized successfully. The particle size of Res-PAMAM-Ac was (167.30±21.70) nm, PDI was 0.115±0.006 and the zeta potential was (19.27±0.35) mV. The average drug loading of Res-PAMAM-Ac was (76.99±1.30) mg/g and the encapsulation rate was (29.63±2.7)%. The stability parameter (*K<sub>E</sub>*) was less than 0.15, no obvious drug precipitation was observed. Cytotoxicity tests showed that Res-PAMAM-Ac was less toxic to human lung cancer A549 cells when the concentration was below 30 μg/mL. The hemolysis rate of the nanocarriers and complex was less than 5%, which can be considered as biosafety. **Conclusion** Res-PAMAM-Ac nanocarrier complex with uniform particle size, high stability, good drug loading and low toxicity was prepared.

**Key words:** resveratrol nanocarrier complex; polyamide-amine dendrimer; drug loading; stability; cytotoxicity; safety; divergence method; reverse phase evaporation; HPLC; encapsulation rate; MTT method; human lung cancer A549 cell line; hemolytic test

白藜芦醇 (resveratrol, Res) 是一种多酚类物质, 又名 (*E*)-3,5,4-三羟基二苯乙烯, 分子式为 C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>。Res 存在于虎杖、葡萄、蓝莓等植物中, 具有抗肿瘤、抗心血管疾病及抗氧化等作用<sup>[1-4]</sup>, 可

收稿日期: 2019-07-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21302040)

作者简介: 常子晨 (1996—), 女, 河北石家庄人, 在读研究生, 研究方向为新型药物合成。E-mail: zichen562@139.com

\*通信作者 刘春艳, 硕士生导师, 教授, 研究方向为药物剂型、天然药物化学、新型药物合成。E-mail: chunyanliu@ncst.edu.cn

以作为食品添加剂和抗肿瘤药物开发的原料,被称为继紫杉醇之后的新一代天然抗肿瘤药物。研究发现,Res 可通过调节相关分子靶点来控制肿瘤细胞的侵袭与转移<sup>[5-6]</sup>。Res 具备众多的药理活性及实用价值而得到广泛关注,但 Res 是脂溶性药物,水溶性差,靶向性不强,靶部位几乎不能达到有效治疗浓度,影响药效的发挥。想要充分发挥 Res 的药用价值,则需要弥补其缺点。

目前研究主要为 Res 的微/纳米系统,如固体脂质纳米粒子、微囊、微球和环糊精包合物等<sup>[1,7]</sup>。这些研究都是通过改变剂型从而使 Res 的体内生物利用度和体内代谢情况得到改善。聚酰胺-胺(polyamido-amine, PAMAM)树状大分子是一种人工合成的新型纳米级大分子化合物,具有高度对称、无免疫原性及良好的生物相容性等优点<sup>[8]</sup>,内部空腔的包载是其主要载药方式之一<sup>[9]</sup>。在现有的研究中,PAMAM 已经被广泛应用在许多方面,主要包括纳米药物及基因载体、免疫诊断纳米试剂、纳米疫苗和核磁共振造影剂等。目前 PAMAM 已成为抗癌、抗炎、抗病毒药物研究最多的载体,基于 PAMAM 的药物递送系统具有良好肿瘤靶向性、载药量高、水溶性强以及细胞毒性低等显著优点<sup>[10]</sup>,本实验采用发散法合成 4.0 代 PAMAM 大分子载体材料,并进行乙酰化。再通过逆相蒸发法制备 PAMAM-Ac 包载 Res 的新型载药系统 Res-PAMAM-Ac。考察其形态特征、理化性质和细胞毒性,以期提高 Res 的治疗效果。

## 1 材料与仪器

### 1.1 仪器

RE-52AA 型旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;HWCL-3 型恒温磁力搅拌仪、SHB-3 型循环水式真空泵,郑州长城工贸有限公司;Agilent 1260-API500 型高效液相色谱仪,美国安捷伦公司;FTIR-8400s 型红外光谱仪,日本 Shimadzu 公司;赛多利斯 BSA224S 型万分之一电子天平,德国赛多利斯公司;ZEN3690 型激光粒度分析仪,英国马尔文公司;Kinetex C<sub>18</sub> 色谱柱,美国菲罗门公司;FDU 型冻干机,日本东京理化器械株式会社;ZD-85 型恒温气浴振荡器,常州荣华仪器制造有限公司;酶标仪,美国 Bio-Rad 公司;0.22 μm 微孔滤膜,美国赛默飞世尔科技公司。

### 1.2 药品与试剂

乙二胺(EDA),成都艾科达化学试剂有限公

司;丙烯酸甲酯(MA),山东西亚化学试剂股份公司;乙酸酐(Ac),天津天大化工实验厂;三乙胺(TEA),北京百灵威科技有限公司;Res 原料药,上海思域化工科技有限公司,批号 B1807119,质量分数 99%;二甲基亚砜(DMSO),天津市津东天正精细化学试剂厂;甲醇,优级纯试剂,天津市津东天正精细化学试剂厂;DMEM 培养基,美国 Mediatech 公司;3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)、100%灭活胎牛血清、0.25%胰蛋白酶、人肺癌 A549 细胞由华北理工大学医学实验研究中心提供;SD 大鼠,由华北理工大学实验动物中心提供,许可证号 SCXK(京)2014-0004。

## 2 方法与结果

### 2.1 PAMAM 的合成与纯化

PAMAM 以乙二胺为核,其末端的 2 个氨基与丙烯酸甲酯进行迈克尔加成反应制备 0.5 代 PAMAM,之后再与乙二胺进行酰胺化反应形成末端为氨基的 1.0 代 PAMAM,反复进行以上步骤合成 4.0 代的粗产品 PAMAM,产率为 76.4%。PAMAM G4.0 的合成过程见图 1。因残存的未反应的乙二胺和丙烯酸甲酯会影响 PAMAM 合成的完整性,故反应结束后采用减压蒸馏的方式除去杂质。充分超声后再用透析法对产物进一步纯化,将粗品溶于适量的蒸馏水并装入截留相对分子质量 6 000 的透析袋中,用大量蒸馏水透析 24 h,将产物的水溶液用 0.22 μm 微孔滤膜滤过后冷冻干燥,得到纯品 PAMAM G4.0,产率为 70.7%。

### 2.2 PAMAM-Ac 载体材料的制备与纯化

称取 1.00 g PAMAM G4.0 溶于 100 mL 无水甲醇,加入 0.5 mL 三乙胺,混匀。再取 0.3 mL 乙酸酐和 60 mL 无水甲醇混匀后置于恒压滴液漏斗中,逐滴加入到上述溶液,室温搅拌过夜。PAMAM-Ac G4.0 的合成过程见图 2。反应结束后减压蒸馏除去甲醇,选用截留相对分子质量为 6 000 的透析袋透析 24 h 后得到 PAMAM-Ac G4.0 载体材料。

### 2.3 PAMAM-Ac G4.0 载体材料的表征

**2.3.1 核磁共振氢谱(<sup>1</sup>H-NMR)检测及结果** 以氘代氯仿(CDCl<sub>3</sub>)为溶剂,对 PAMAM G4.0 和 PAMAM-Ac G4.0 进行 <sup>1</sup>H-NMR 分析。结果(图 3)显示 PAMAM G4.0 在 δ 1.932 处存在 s 峰,说明有 -RNH 上的 H 的吸收峰;δ 3.219~3.254 处有 -NH-CH<sub>2</sub>-的 H 吸收峰;δ 2.702~2.777 处为多峰,说明有 =NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-的吸收峰。与 PAMAM G4.0 的 <sup>1</sup>H-

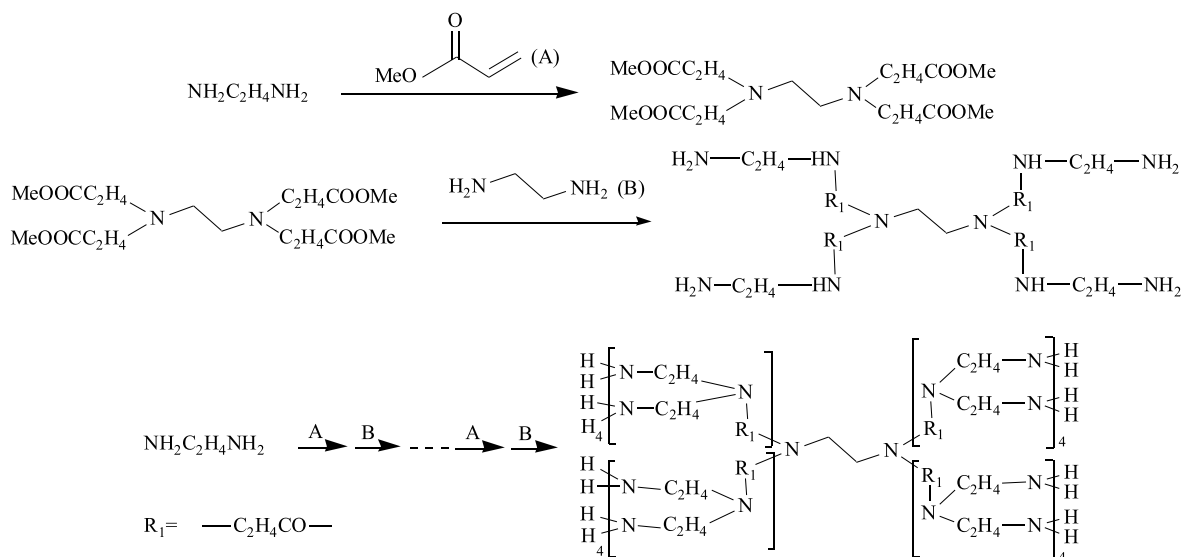


图 1 PAMAM G4.0 的合成过程

Fig. 1 Synthesis process of PAMAM G4.0

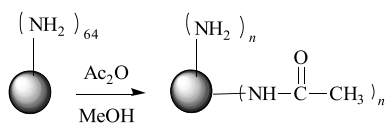


图 2 PAMAM-Ac G4.0 的合成过程

Fig. 2 Synthesis process of PAMAM-Ac G4.0

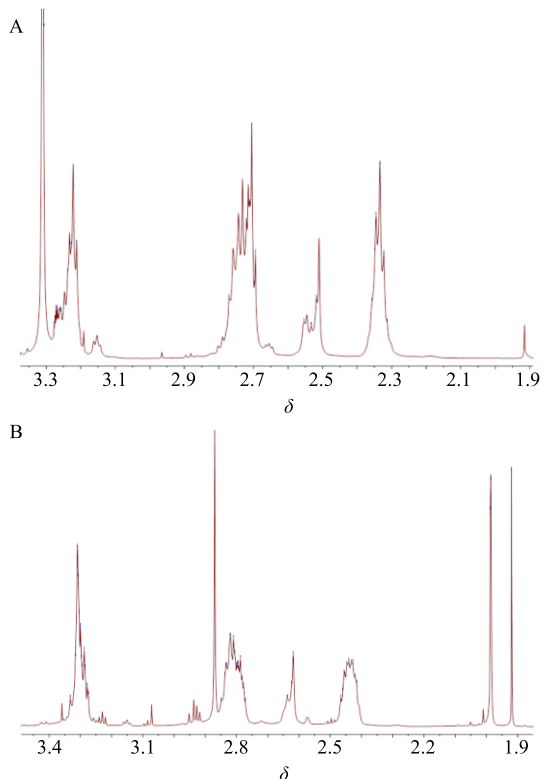


图 3 PAMAM G4.0 (A) 和 PAMAM-Ac G4.0 (B) 的核磁共振氢谱

Fig. 3  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of PAMAM G 4.0 (A) and PAMAM-Ac G 4.0 (B)

NMR 相比, PAMAM-Ac G4.0 在  $\delta$  1.866 处出现了 s 峰, 其为酰胺键-CO-NH-的 H 吸收峰, PAMAM-Ac G4.0 在  $\delta$  2.870 处有明显的乙酰基-CO-CH<sub>3</sub> 吸收峰。

**2.3.2 红外光谱检测及结果** 采用红外光谱检测法对 PAMAM G4.0 和 PAMAM-Ac G4.0 进行表征, 结果 (图 4) 显示在  $3\,283.14\text{ cm}^{-1}$  处存在-NH<sub>2</sub> 的吸收峰;  $2\,937.21\text{ cm}^{-1}$  和  $2\,871.17\text{ cm}^{-1}$  处分别是-CH<sub>2</sub>-

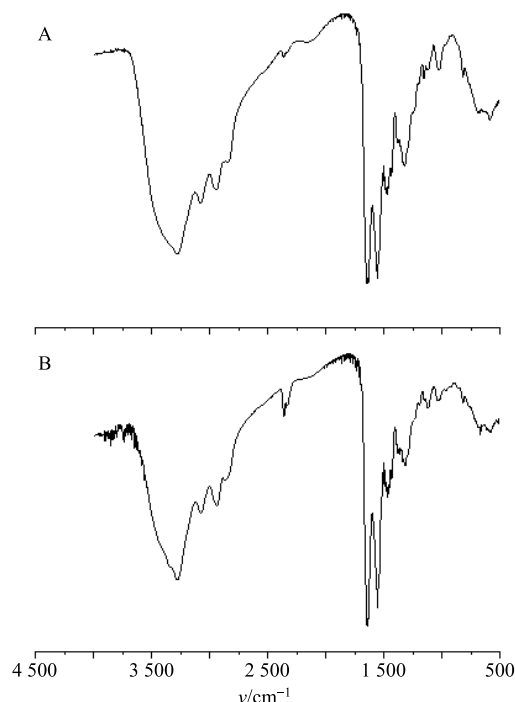


图 4 PAMAM G4.0 (A) 和 PAMAM-Ac G4.0 (B) 的红外光谱图

Fig. 4 Infrared spectrum of PAMAM G 4.0 (A) and PAMAM-Ac G 4.0 (B)

对称伸缩振动和不对称伸缩振动的特征吸收峰；在  $1\,645.50\text{ cm}^{-1}$  和  $1\,558.25\text{ cm}^{-1}$  出现 -CO-NH- 的特征吸收峰。

**2.3.3 平均粒径、Zeta 电位考察及结果** 分别称取 0.20 mg PAMAM G4.0 和 PAMAM-Ac G4.0 载体材料溶于 1 mL 甲醇，利用马尔文激光粒度分析仪在 25 °C 下检测粒径和 Zeta 电位，测得 PAMAM G4.0 载体的平均粒径为  $(8.00 \pm 1.30)\text{ nm}$ ，PDI 为  $0.119 \pm 0.031$ ，Zeta 电位为  $(1.19 \pm 0.40)\text{ mV}$ ；PAMAM-Ac G4.0 载体的平均粒径为  $(8.07 \pm 0.71)\text{ nm}$ ，PDI 为  $0.121 \pm 0.010$ ，Zeta 电位为  $(-6.06 \pm 1.84)\text{ mV}$ 。

## 2.4 Res-PAMAM-Ac 的制备及表征

**2.4.1 Res-PAMAM-Ac 的制备** 称取 PAMAM-Ac G4.0 1.00 g 置于 10 mL 离心管中，用 10 mL 甲醇充分溶解后，再加入 1.00 g（过量）Res，在 25 °C 下，恒温振荡 72 h。反应停止后加入 10 mL 纯水，逆相蒸发除去有机相，将溶于水的复合物与不溶于水的 Res 进行抽滤分离，滤液冷冻干燥后即得 Res-PAMAM-Ac 复合物。

**2.4.2 色谱条件** 色谱柱 Diamonsil C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm)；柱温 30 °C；流动相乙腈-水溶液（体积比为 30 : 70）；体积流量 1 mL/min；紫外检测波长 306 nm；进样量 10 μL；检测时间 15 min。Res 保留时间 8.2~9.5 min。

**2.4.3 线性关系考察** 取 Res 原料药溶于甲醇溶液配制质量浓度为 0.5 mg/mL 的储备液，量取储备液稀释制得质量浓度分别为 250.00、125.00、62.50、31.25 μg/mL 的 Res（甲醇溶液）对照品。取储备液及各质量浓度样品 1 mL，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过后按“2.4.1”项色谱条件置于高效液相色谱仪检测，记录峰面积（Y），得到关于峰面积和质量浓度的线性回归方程  $Y = 73\,248 X + 238.46$ ， $r^2 = 0.999\,3$ 。Res 在质量浓度为 10~250 μg/mL 时与峰面积线性关系良好。

**2.4.4 方法学考察** 取 Res-PAMAM-Ac G4.0 和 Res 原料药，用甲醇溶液配制成 300.0、150.0、50.0 μg/mL 的高、中、低 3 种质量浓度，利用高效液相色谱仪在同天内每个质量浓度测量 5 次得到日内精密密度；连续测定 5 d，得日间精密密度。结果日内和日间 RSD 值分别为 7.84%、5.99%、8.55% 和 3.99%、5.71%、9.35%（ $n = 5$ ）。取 Res-PAMAM-Ac G4.0 和 Res 原料药，用纯水配制成 30、25、20 μg/mL 的高、中、低 3 个质量浓度，25 °C 恒温振荡 72 h，

经冷冻干燥除水后用甲醇定容，之后过 0.22 μm 微孔滤膜按“2.4.2”项色谱条件检测，测得高、中、低质量浓度回收率分别为  $(92.67 \pm 1.60)\%$ 、 $(98.36 \pm 4.44)\%$ 、 $(99.75 \pm 5.31)\%$ （ $n = 3$ ）。其日内、日间精密密度及回收率均满足实验要求。

**2.4.5 载药量的测定** 采用甲醇浸提法测定复合物的载药量，将一定量的复合物用甲醇溶解，超声充分浸提，按“2.4.2”项色谱条件检测，由回归方程算得复合物中药物质量浓度，进而计算载药量。

$$\text{载药量} = W_1/W_2$$

$W_1$  为复合物中 Res 质量， $W_2$  为复合物质量

**2.4.6 反应时间对载药量的影响** 取 PAMAM-Ac G4.0 用甲醇溶解配制质量浓度为 5 mg/mL 的 8 份样品，均加入 100 mg Res 原料药，置于 25 °C 恒温气浴振荡器中，每隔 9 h 取出 1 份样品加入等量的纯水，逆相蒸发除去有机相，抽滤并将滤液冷冻干燥后加入 1 mL 甲醇复溶，超声后按“2.4.2”项色谱条件检测，每份重复测定 5 组，结果代入回归方程。按“2.4.5”公式计算药物含量，结果（表 1）显示 PAMAM G4.0 在 63 h 后载药量逐渐趋于平稳。

表 1 载药量随反应时间的变化 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

Table 1 Drug loading varies with reaction time ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

| 反应时间/h | 载药量/(mg·g <sup>-1</sup> ) | 反应时间/h | 载药量/(mg·g <sup>-1</sup> ) |
|--------|---------------------------|--------|---------------------------|
| 9      | $1.61 \pm 2.79$           | 45     | $67.00 \pm 3.07$          |
| 18     | $25.24 \pm 2.84$          | 54     | $74.49 \pm 1.83$          |
| 27     | $46.97 \pm 2.63$          | 63     | $76.21 \pm 2.77$          |
| 36     | $48.53 \pm 2.82$          | 72     | $76.91 \pm 2.57$          |

**2.4.7 pH 值对载药量的影响** 取 PAMAM-Ac G4.0 用甲醇溶解配制质量浓度为 1 mg/mL 的 5 份样品。由于 PAMAM-Ac 表面含有大量 -NH<sub>2</sub>，检测 pH 值为 10，所以先用稀盐酸调节各组 pH 值至 5、6、7、8、9，再分别加入 50 mg Res 原料药，置于 25 °C 恒温气浴振荡器中，72 h 后取出加入等量纯水，逆相蒸发除去有机相，抽滤并将滤液冷冻干燥后加入 1 mL 甲醇复溶，超声后按“2.4.2”项色谱条件检测，平行测定 5 组，结果代入回归方程，根据“2.4.5”项公式计算载药量。结果如表 2 所示，平均载药量达到  $(76.99 \pm 1.30)\text{ mg/g}$ （ $n = 5$ ）。

**2.4.8 Res-PAMAM-Ac 平均粒径、Zeta 电位检测及结果** 配制 Res-PAMAM-Ac 水溶液 10 mg/mL，超声 20 min，利用马尔文粒径检测仪检测，测得 Res-PAMAM-Ac 平均粒径为  $(167.30 \pm 21.70)\text{ nm}$ ，PDI

表 2 pH 值对载药量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )Table 2 Effect of pH values on drug loading ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

| pH 值 | 载药量/(mg·g <sup>-1</sup> ) | pH 值 | 载药量/(mg·g <sup>-1</sup> ) |
|------|---------------------------|------|---------------------------|
| 5    | 51.12±2.15                | 8    | 70.96±2.10                |
| 6    | 56.96±1.72                | 9    | 58.17±2.15                |
| 7    | 76.99±1.30                |      |                           |

为  $0.115 \pm 0.006$ , Zeta 电位为  $(19.27 \pm 0.35)$  mV。由结果可知,随着乙酰化和药物的包载,分散体系逐步趋向稳定。

**2.4.9 包封率测定及结果** 采用透析法测定纳米载体的包封率,取 Res-PAMAM-Ac,用磷酸盐缓冲液(PBS)溶解配制质量浓度为 1 mg/mL 的储备液,取 2 mL 储备液稀释数倍后置于截留相对分子质量为 6 000 的透析袋,并在 400 mL 的 PBS 中透析,24 h 后收集透析液并定容,按“2.4.2”项色谱条件检测游离药物含量,由公式算得 Res-PAMAM-Ac 包封率为  $(29.63 \pm 2.70)\%$  ( $n = 5$ )。

$$\text{包封率} = (W_0 - W_1) / W_0$$

$W_0$  为药物总量,  $W_1$  为游离药物量

## 2.5 细胞毒性实验

由于肿瘤细胞较正常细胞对于毒性更加敏感<sup>[11]</sup>,所以本实验选用人肺癌 A549 细胞,并采用 MTT 法分别考察 PAMAM、PAMAM-Ac 空白载体和 Res-PAMAM-Ac 含药载体对人肺癌 A549 细胞的细胞毒性。取对数生长期的 A549 细胞以  $6 \times 10^3$  个/孔接种于 96 孔板中,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 环境中孵育 24 h 后弃去培养液。分别加入含 2% 血清的 DEME 培养基稀释的 PAMAM、PAMAM-Ac 空白载体(浓度依次为 0.005、0.01、0.1、1、10、20 μmol/L)<sup>[7]</sup>和 Res-PAMAM-Ac 含药载体(质量浓度依次为 1、10、30、50、100、200 μg/mL),每孔 100 μL,每个浓度设置 4 个复孔,只加入细胞的 DMEM 培养基作为阴性对照。继续培养 24 h,弃去含药培养液,用 PBS 清洗 2 次后,每孔加入 5 mg/mL MTT 试剂继续孵育 30 min,然后吸去 MTT 试剂,加入 DMSO 溶液振荡摇匀,用酶标仪在 490 nm 处测定每孔的吸光度( $A$ )值,并根据实验组和对照组  $A$  值的比值计算细胞存活率。实验重复 3 次。由结果(表 3、4)可知,PAMAM 空白载体在浓度为 1 μmol/L 时细胞毒性最小,乙酰化后的载体随着浓度的增大,细胞毒性逐渐增强,但在 20 μmol/L 的条件下,细胞存活率依然接近 100%,表明乙酰化的空白载体

表 3 PAMAM G4.0、PAMAM-Ac G4.0 对人肺癌 A549 细胞的毒性 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )Table 3 Viabilities of A549 cells after being treated with PAMAM G4.0 and PAMAM-Ac G4.0 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 浓度/(μmol·L <sup>-1</sup> ) | 细胞存活率/%    |               |
|----------------------------|------------|---------------|
|                            | PAMAM G4.0 | PAMAM-Ac G4.0 |
| 0.005                      | 91.71±2.14 | 99.50±0.88    |
| 0.01                       | 93.13±1.49 | 99.23±0.68    |
| 0.1                        | 93.10±1.76 | 98.91±1.71    |
| 1                          | 97.74±2.44 | 98.81±3.19    |
| 10                         | 82.09±2.45 | 96.85±1.23    |
| 20                         | 78.05±2.61 | 90.63±2.25    |

表 4 Res-PAMAM-Ac 对 A549 细胞的毒性 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )Table 4 Viabilities of A549 cells after being treated with Res-PAMAM-Ac ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 质量浓度/(μg·mL <sup>-1</sup> ) | 细胞存活率/%    |
|-----------------------------|------------|
| 1                           | 99.83±2.84 |
| 10                          | 98.80±3.07 |
| 30                          | 98.78±4.59 |
| 50                          | 95.55±3.03 |
| 100                         | 96.15±3.19 |
| 200                         | 95.58±0.74 |

有较好的体外安全性。在相同浓度下,PAMAM 对 A549 细胞的细胞毒性显著高于 PAMAM-Ac,这表明乙酰化显著降低了其细胞毒性。含药载体的细胞毒性显示随着药物质量浓度的增加,各组含药载体对 A549 细胞的毒性逐渐增加。

## 2.6 溶血实验

采集 SD 大鼠眼球后静脉血液 2 mL,置于抗凝采血管内,3 000 r/min、4 °C 离心 10 min,除去血清后加入 0.9% 生理盐水再次离心 10 min,清洗下层的红细胞至上清液为无色。以 0.9% 生理盐水为稀释剂,制备 2% 红细胞悬液。将 0.1 μmol/L PAMAM-Ac G4.0 和 30 μg/mL Res-PAMAM-Ac 溶液与等体积的红细胞悬液混合,取空白血加 0.9% 生理盐水作为阴性对照,空白血加蒸馏水作为阳性对照。将样品置于 37 °C 水浴中孵育 1 h 后,离心收集上清液测量样品在 540 nm 波长处的  $A$  值,计算溶血率(HR)<sup>[12]</sup>。结果测得 PAMAM-Ac G4.0 和 Res-PAMAM-Ac 的溶血率仅为 3.24% 和 2.05% ( $n = 3$ ),符合《中国药典》2015 年版对溶血率小于 5% 的要求。

$$HR = (A_1 - A_0) / (A_2 - A_0)$$

$A_0$  为阴性对照组吸光度,  $A_1$  为实验组吸光度,  $A_2$  为阳性对照组吸光度

## 2.7 稳定性考察

将制得的 Res-PAMAM-Ac 进行长期稳定性试验, 放置条件为 4 ℃、60 d, 观察样品外观以及药物渗漏情况, 并进行质量浓度检测。

将制得的 Res-PAMAM-Ac 进行加速离心实验 (10 000 r/min, 15 min), 并在离心前后, 分别用高效液相色谱仪测定在 306 nm 波长处的峰面积, 根据公式计算稳定性参数 ( $K_E$ )。

$$K_E = (C_0 - C) / C_0$$

$C_0$  为纳米载体稀释液放置或离心前的药物质量浓度,  $C$  为纳米载体稀释液放置或离心后的药物质量浓度

作为评价纳米载体稳定性的指标,  $K_E$  愈小说明稳定性愈好<sup>[13]</sup>, 结果 (表 5、6) 显示 Res-PAMAM-Ac 的长期  $K_E$  和加速离心  $K_E$  平均值分别为 0.05 和 0.12, 均小于 0.15, 说明纳米载药体系稳定性良好。

## 3 讨论

本实验以 PAMAM 为载体, 利用其内部疏水空

表 5 Res-PAMAM-Ac 长期 (4 ℃、60 d) 稳定性测试结果  
Table 5 Res-PAMAM-Ac long-term (4 ℃、60 d) stability test results

| 质量浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> ) |       | $K_E$ |
|-----------------------------|-------|-------|
| 放置前                         | 放置后   |       |
| 78.37                       | 75.25 | 0.04  |
| 84.23                       | 79.62 | 0.05  |
| 72.49                       | 70.36 | 0.03  |
| 77.28                       | 72.27 | 0.06  |
| 73.84                       | 69.31 | 0.06  |
| 75.73                       | 70.86 | 0.06  |

表 6 Res-PAMAM-Ac 加速离心 (10 000 r·min<sup>-1</sup>、15 min) 稳定性测试结果

Table 6 Res-PAMAM-Ac accelerated centrifugal (10 000 r·min<sup>-1</sup>, 15 min) stability test results

| 质量浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> ) |       | $K_E$ |
|-----------------------------|-------|-------|
| 离心前                         | 离心后   |       |
| 75.78                       | 63.44 | 0.16  |
| 77.54                       | 70.68 | 0.09  |
| 73.97                       | 64.66 | 0.13  |
| 78.36                       | 71.82 | 0.08  |
| 82.69                       | 72.21 | 0.13  |
| 75.36                       | 67.03 | 0.11  |

间包埋 Res 为载药方式合成 Res-PAMAM-Ac 纳米载药复合物。首先采用发散法合成 PAMAM 载体材料, 在合成过程中随着 PAMAM 代数的增加, 支链的长度和黏度不断增加, 内部空腔增多, 有利于提高载药量。由于载体表面官能团的相互排斥作用, 使得载体形态接近于球形, 有助于药物的包封。据报道, 高代数的 PAMAM 外层存在大量的氨基, 会使载体具有较大的细胞毒性<sup>[14]</sup>, 所以本研究制备 PAMAM G4.0 代载体并进行部分乙酰化修饰减少表面正电荷, 从而降低细胞毒性<sup>[15]</sup>。

Res 不溶于水, 可溶于醋酸乙酯、甲醇等有机溶剂, PAMAM 是疏水性树状大分子, 可作为配体对 Res 进行包载, 采用逆相蒸发法制备的 Res-PAMAM-Ac 含药纳米载体复合物粒径均匀, 分布范围窄, 药物含量稳定。由于复合物粒径的检测采用水作为溶剂, 所以出现疏水聚集的现象, 导致粒径较以甲醇为溶剂的载体粒径大许多。在倪文娟等<sup>[16]</sup>的纳米递药系统体外研究中表明当电位为 (19.27±0.35) mV 时处于安全范围。建立 Res 样品的 HPLC 测定方法, 得到 Res 甲醇溶液质量浓度的标准曲线为  $Y=73\,248X+238.46$ ,  $r^2=0.999\,3$ 。以甲醇破坏含药载体的结构并测定载体内药物质量浓度, 计算载药量<sup>[17]</sup>。载药量检测结果表明最佳载药的 pH 值为 7, 时间为 60 h, 此时载药量为 (76.99±0.72) mg/g, Res 复合物相比 Res 在水中的溶解度有很大提高。载体与药物的分离是测定包封率的关键步骤, 目前常用的分离方法有透析法、离心法和凝胶过滤法<sup>[18]</sup>。本研究采用透析法测包封率, 该法测定方式简便, 结果较准确, 并且适用于 Res 等水不溶性药物的测量。

在进行安全性考察时, 由于肿瘤细胞比正常细胞对载体毒性更加敏感, 所以本研究选用人肺癌 A549 细胞进行细胞毒性实验<sup>[16]</sup>。根据韩顺平等<sup>[8]</sup>和丁伯美等<sup>[14]</sup>对 PAMAM 载体细胞毒实验的研究, 本实验将载体浓度选定在 0.005~20 μmol/L, 各浓度之间跨度大, 可以更好地观察载体的安全性; 而当复合物浓度与载体浓度相同时, 复合物在 1 μmol/L 的浓度下的细胞成活率均接近 100%, 在相邻的 10 μmol/L 浓度时细胞成活率出现大幅度降低, 为获得更为精确的复合物安全浓度范围, 参考陈英等<sup>[19]</sup>的研究, 将复合物质量浓度选定在 1~200 μg/mL。结果表明, PAMAM-Ac 载体具有良好的生物安全性, 无明显细胞毒性, Res-PAMAM-Ac 含药

载体的细胞毒性随浓度增加呈增长趋势, 最佳给药质量浓度应控制在 30  $\mu\text{g/mL}$  及以下。长期稳定性实验和加速离心实验后检测药物无明显渗漏且外观、平均粒径均未发生明显变化, 表明其稳定性良好。本实验构建的 Res-PAMAM-Ac 含药纳米载体复合物具有较高的稳定性以及生物安全性, 为临床应用提供了新的研究方案。

#### 参考文献

- [1] 王建泽, 颜仁梁, 王兴荣. 白藜芦醇纳米乳的制备及大鼠体内的药动学研究 [J]. 中草药, 2019, 50(10): 2319-2324.
- [2] 卢佳倩, 赵耀鑫, 刘晓彤, 等. 白藜芦醇对糖尿病及其并发症作用机制的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(2): 334-339.
- [3] 张蕊, 马寅仲, 孙双勇, 等. 白藜芦醇对阿霉素诱导心脏毒性保护作用的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2017, 32(4): 752-756.
- [4] Liu S, Zhang X X, Zhuang S, *et al.* Effect of *Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix* and its ingredient resveratrol on experimental autoimmune myasthenia gravis by suppressing immune response [J]. *Chin Herb Med*, 2016, 8(3): 251-258.
- [5] Amri A, Chaumeil J C, Sfar S, *et al.* Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations [J]. *J Control Release*, 2012, 158(2): 182-193.
- [6] 王丽娟, 史惠蓉. 白藜芦醇通过调控 SIRT1 抑制卵巢癌细胞生长及 Wnt 信号通路的研究 [J]. 中草药, 2019, 50(3): 675-680.
- [7] 朱李飞, 刘晓妍, 陈红君, 等. 白藜芦醇二棕榈酰卵磷脂脂质粉雾剂的制备及其抗菌作用研究 [J]. 中草药, 2018, 49(24): 5803-5811.
- [8] 韩顺平, 李晶晶, 黄安皓, 等. 聚乙二醇接枝率对第五代聚酰胺-胺树状大分子体外毒性与细胞摄取的影响 [J]. 中国药学杂志, 2017, 52(1): 45-50.
- [9] Bai S, Ahsan F. Synthesis and evaluation of pegylated dimeric nanocarrier for pulmonary delivery of low molecular weight heparin [J]. *Pharm Res*, 2009, 26(3): 539-548.
- [10] Fu F, Wu Y, Zhu J, *et al.* Multifunctional lactobionic acid-modified dendrimers for targeted drug delivery to liver cancer cells: Investigating the role played by PEG spacer [J]. *Acs Appl Mater Interfaces*, 2014, 6(18): 16416-16425.
- [11] 陈虹宇, 谷仕艳, 李欣洋, 等. 双氢青蒿素对肿瘤细胞和正常细胞的毒性比较研究 [J]. 现代预防医学, 2017, 44(2): 301-305.
- [12] Cao D, Tian S, Huang H, *et al.* Divalent folate modification on PEG: An effective strategy for improving the cellular uptake and targetability of PEGylated polyamidoamine-polyethylenimine copolymer [J]. *Mol Pharm*, 2015, 12(1): 240-252.
- [13] 伍善广, 冯学珍, 蒙华琳, 等. 双指标参数 Box-Behnken 响应面优化  $\alpha$ -细辛脑脂质体制备工艺 [J]. 中药材, 2014, 37(3): 504-507.
- [14] 丁伯美, 严秀云, 胡青, 等. 双胍基修饰聚酰胺-胺/阿霉素递药系统的构建及体外评价 [J]. 中国新药杂志, 2018, 27(20): 94-99.
- [15] Majoros I J, Myc A, Thomas T, *et al.* PAMAM dendrimer-based multifunctional conjugate for cancer therapy: Synthesis, characterization, and functionality [J]. *Biomacromolecules*, 2006, 7(2): 572-579.
- [16] 倪文娟, 马瑞, 陆燕平, 等. 载三氧化二砷脑胶质瘤靶向纳米递药系统 iRGD/TGN-PEG-PAMAM/ATO 的构建及体外研究 [J]. 中草药, 2019, 50(9): 2049-2056.
- [17] Xu X, Wang C, Li H, *et al.* Evaluation of drug loading capabilities of  $\gamma$ -cyclodextrin-metal organic frameworks by high performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2017, 1488: 37-44.
- [18] 乐文慧, 黄早成, 肖苏尧, 等. 白藜芦醇固体脂质体制备工艺研究 [J]. 食品科学, 2010, 31(18): 59-62.
- [19] 陈英, 胡锦芳, 张长林, 等. 聚酰胺-胺-聚谷氨酸-聚乙烯亚胺共聚物的制备及作为基因载体的性能研究 [J]. 药学学报, 2019, 54(5): 919-926.