

• 药剂与工艺 •

香茅醇自乳化递送系统的制备及其体外抗肿瘤活性评价

杨佳佳¹, 韦世权¹, 张 科^{1,2}, 陈 妍¹, 姜 丰¹, 周 雪¹, 肖 婷¹, 彭剑青¹, 沈祥春^{1*}, 陶 玲^{1*}

1. 贵州医科大学, 贵州省特色天然药物资源高效利用工程中心(贵州省高等学校天然药物药理与成药性评价特色重点实验室, 贵州医科大学-贵阳市联合重点实验室, 天然药物资源优效利用重点实验室), 药学院, 贵州 贵阳 550025
2. 贵州医科大学, 基础医学院现代病原生物学特色重点实验室, 基础医学院寄生虫学教研室, 贵州 贵阳 550025

摘要: 目的 考察香茅醇(citronellol, CT)对人喉癌上皮细胞 HEP-2 和人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖能力的影响, 并制备 CT 自乳化递送系统(self-emulsified drug delivery system, SMs), 对 HEP-2 体外抗肿瘤活性和细胞摄取能力进行评价。方法 采用 MTT 法考察 CT 对 HEP-2 和 MCF-7 细胞增殖能力的影响; 通过伪三元相图法优化香茅醇自乳化递送系统(CT-SMs)处方, 进行外观形态、粒径和 Zeta 电位表征。采用 MTT 法检测 CT-SMs 对 HEP-2 细胞增殖能力的影响; 荧光倒置显微镜定性和流式细胞仪定量考察 HEP-2 细胞对 CT-SMs 的摄取情况。**结果** 经一定质量浓度 CT 处理后, MCF-7 细胞增殖未受影响, 差异无统计学意义(与对照组相比, $P>0.05$), 而 HEP-2 细胞的增殖能力受到明显抑制(与对照组相比, $P<0.05$), 呈剂量-时间依赖性; CT-SMs 最佳处方是 K_m (乳化剂与助乳化剂比例)为 Kolliphor® HS15-无水乙醇 7:3, CT- K_m 为 3:7。制备的微乳平均粒径为 (354.0 ± 9.5) nm, 外观圆整呈类球形, 分布均匀, Zeta 电位为 (-13.4 ± 0.3) mV。细胞摄取实验结果表明, 相同质量浓度的 CT-SMs 和 CT 处理 HEP-2 细胞后, CT-SMs 较 CT 摄取量更多, 分别为 545.70 ± 11.56 、 230.00 ± 17.76 。**结论** 采用滴加水法成功制备了 CT-SMs, 其处方工艺可行, 制得的自微乳质量稳定可控。CT-SMs 可明显抑制 HEP-2 细胞的增殖。

关键词: 香茅醇; 自乳化递送系统; 抗肿瘤; 人喉癌上皮细胞; 乳腺癌细胞; 细胞摄取; 细胞增殖; MTT 法; 伪三元相图
中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)05-1196-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.05.016

Preparation of citronellol self-emulsifying delivery system and evaluation of its *in vitro* antitumor activity

YANG Jia-jia¹, WEI Shi-quan¹, ZHANG Ke^{1,2}, CHEN Yan¹, JIANG Feng¹, ZHOU Xue¹, XIAO Ting¹, PENG Jian-qing¹, SHEN Xiang-chun¹, TAO Ling¹

1. Guizhou Province Specialized Natural Medicine Resource Efficient Utilization Engineering Center (Key Laboratory of Pharmacology and Pharmacological Evaluation of Natural Medicines in Guizhou Higher Education Institutions, Guizhou Medical University-Guiyang Joint Key Laboratory, Key Laboratory of Utilization of Natural Medicine Resources) College of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China
2. Key Laboratory of Modern Pathogenic Biology, Department of Parasitology, School of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China

Abstract: Objective To investigate the effect of citronellol (citronellol, CT) on the proliferation of HEP-2 and MCF-7 cells, and prepare CT self-emulsifying drug delivery system (CT-SMs). Its antitumor activity and cell uptake ability of HEP-2 cells *in vitro* was evaluated. **Methods** The effect of CT on the cell proliferation of HEP-2 and MCF-7 were investigated by MTT assay. The pseudo-

收稿日期: 2019-10-10

基金项目: 贵阳市科技计划项目(筑科合同[2017]30-25号); 贵州省科技创新团队项目(黔科合人才团队[2015]4025号); 贵州省高层次创新型人才百层次人才项目(贵州省科技厅黔科合人才[2015]4029号; 贵州医科大学药学国际科技合作基地(黔科合平台人才[2017]5802)

作者简介: 杨佳佳(1996—), 女, 贵州人, 在读硕士, 从事药物新剂型与新技术研究工作。Tel: 18886075017 E-mail: 1434412440@qq.com

***通信作者** 沈祥春 Tel: (0851)88416149 E-mail: shenxiangchun@126.com
陶 玲 Tel: (0851)88416160 E-mail: 649511230@qq.com

ternary phase diagram method was used to optimize the formulation of CT-SMs, and the appearance morphology, mean particle size, and Zeta potential were characterized. The effect of CT-SMs on the proliferation of HEp-2 cells was detected by MTT assay and cellular uptake was determined by fluorescence inversion microscopy and flow cytometry. **Results** After a certain concentration of CT treatment, MCF-7 cells proliferation was not affected, and the difference was not statistically significant ($P > 0.05$ compared with the control group), while the proliferative capacity of HEp-2 cells was significantly inhibited ($P < 0.05$ compared with the control group) in a dose-time dependent manner. The best prescription for CT-SMs was as following: K_m (emulsifier : co-emulsifier) was Kolliphor® HS 15 : absolute ethanol = 7 : 3, CT : K_m = 3 : 7, the mean particle size was (354.0 ± 9.5) nm, the appearance was round and spherical with uniform distribution, and the Zeta potential was (-13.4 ± 0.3) mV. The results of cellular uptake experiments showed that the intake of CT-SMs (545.70 ± 11.56) was higher than that of CT (230.00 ± 17.76) in HEp-2 cells treating the same concentration of CT-SMs and CT. **Conclusion** CT-SMs could significantly inhibit the proliferation of HEp-2 cells. In this study, CT-SMs were successfully prepared by dropping water method and the quality of CT-SMs was stable and controllable.

Key words: citronellol; self-emulsifying delivery system; antitumor activity; laryngeal cancer cells; breast cancer cells; cellular uptake; cell proliferation; MTT assay; pseudo-ternary phase diagram

癌症是当今世界发病率和死亡率较高的恶性疾病之一,且呈上升趋势,目前临床治疗主要是以手术切除、放疗及辅助化疗为主的综合治疗,经由手术、化疗、放疗带来的副作用严重影响患者预后,降低了患者的生活质量^[1-2]。

自乳化递送系统 (self-emulsified drug delivery system, SMs) 作为一种具有良好热力学稳定性和各向同性等特性的新型胶体体系,在温和搅拌下加入/进入水介质时,会自发形成粒径 < 500 nm 的水乳状液^[3-8],可提高难溶性药物的溶解度、稳定性及生物利用度,是疏水性、难吸收、易水解药物的优良载体^[9-13]。

香茅醇 (citronellol, CT) 是在 *Cymbopogon citratus* 属植物精油中发现的单萜烯类化合物,具有玫瑰花香气,是一种具有较高价值的香料,安全性高,国内广泛用作药物、烟草、化妆品及食品的添加剂^[14-15]。实验室前期发现 CT 对人喉癌上皮细胞 HEp-2 具有显著的增殖抑制作用,故进一步考察了不同质量浓度范围的 CT 和香茅醇自乳化给药系统 (CT-SMs) 对人乳腺癌 MCF-7 细胞和 HEp-2 细胞增殖能力的影响。并根据 CT 水溶性差、易挥发等缺点,成功进行了 CT-SMs 制备研究,考察了 CT 与 CT-SMs 在 HEp-2 细胞中摄取情况,为 CT-SMs 临床应用于喉癌的治疗提供相关理论和实验依据。

1 材料

1.1 细胞

HEp-2 细胞, American Type Culture Collection; MCF-7 细胞, 中国科学院昆明细胞库。

1.2 仪器与试剂

85-2B 型恒温加热磁力搅拌器, 金坛市科析仪器有限公司; ME104/02 型电子天平, 梅特勒-托利

多仪器系统有限公司; BS-223S 分析天平, 北京赛多利斯仪器系统有限公司; KQ3200 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; HPLC U3000、3020-426 多功能全波长酶标仪, 美国 Thermo 公司; BT-9300H 激光粒度分析仪, 丹东百特仪器有限公司; Delsa Nano Zeta 电位及纳米粒度分析仪, 美国贝克曼库尔特有限公司; XDS-2B 倒置显微镜, 日本尼康公司; NovoCyte 流式细胞仪, 艾森生物杭州有限公司。

CT, 批号 H1507047, 质量分数 $\geq 95\%$, 阿拉丁试剂有限公司; 无水乙醇, 国药集团化学试剂有限公司; 聚乙二醇 400 (PEG 400), 西陇化工股份有限公司; 泊洛沙姆 188 (F68)、15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯 (Kolliphor® HS15), 德国巴斯夫公司; 1,2-丙二醇, 天津市光复精细化工研究所; 甘油, 浙江遂昌惠康药业有限公司; 大豆磷脂 (PC), 上海太伟药业股份有限公司; 乙腈、甲醇, 色谱纯, 美国天地公司。

2 方法与结果

2.1 CT-SMs 的制备

固定混合物 (油相 CT、乳化剂、助乳化剂) 总质量为 1 g, 称取一定量的 CT、乳化剂及助乳化剂于 EP 管中, 涡旋混合均匀, 置于预先恒温至 25°C 的水浴中, 逐滴加入纯水至 8 mL, 即得 CT-SMs。

不含 CT 的 SMs 制备方法同上, 仅不加入 CT。

2.2 CT 含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱 Ultimate® LP-C₁₈ 柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水 (70 : 30); 检测波长 205 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30°C ; 进样量 20 μL 。理论塔板数以 CT 色谱峰计算大于 6 000。

2.2.2 对照品溶液的配制 精密吸取 CT 对照品贮备液 (1 mg/mL) 2.5 mL 至 25 mL 量瓶, 加乙腈至

刻度, 摇匀, 得质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 CT 对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的配制 精密吸取 CT-SMs 溶液 0.5 mL 至 10 mL 量瓶, 加乙腈至刻度, 摇匀, 为含 CT 相当于 600 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液, 从中精密吸取 0.5 mL, 定容至 10 mL, 得质量浓度为 30 $\mu\text{g/mL}$ 的供试品溶液, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

空白自微乳供试品溶液制备方法同上。

2.2.4 专属性考察 分别取适量空白溶剂、空白自微乳溶液、CT 对照品溶液及供试品溶液各 20 μL , 注入液相色谱仪, 按“2.2.1”项下色谱条件测定, 记录色谱。结果显示, 供试品溶液在相应位置出峰, 且空白溶液及空白自微乳溶液在相应位置未出峰, 对测定无干扰, 见图 1。

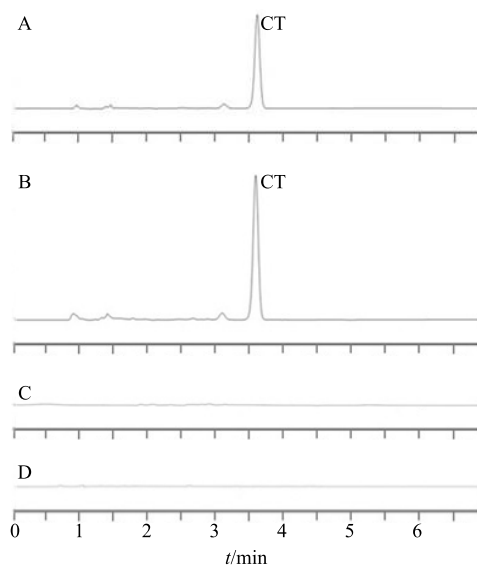


图1 供试品溶液 (A)、CT 对照品溶液 (B)、空白自微乳溶液 (C) 及空白溶剂 (D) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC diagram of test solution (A), CT reference solution (B), blank self-microemulsion solution (C) and blank solvent (D)

2.2.5 标准曲线的绘制 精密吸取对照品溶液 0.25、0.5、1、2、4 mL 至 10 mL 量瓶, 加乙腈至刻度, 摇匀, 配制成质量浓度为 2.5、5、10、20、40 $\mu\text{g/mL}$, 按“2.2.1”项下色谱条件测定, 记录峰面积, 以质量浓度 (Y) 对峰面积 (X) 进行线性回归, 得回归方程 $Y=0.5633X+0.1651$, $R^2=0.9999$, 结果表明, CT 质量浓度在 2.5~40 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积线性关系良好。

2.2.6 精密度试验 精密吸取对照品溶液 (质量浓

度 10 $\mu\text{g/mL}$) 20 μL , 按“2.2.1”项下色谱条件测定, 重复进样 6 次, 记录峰面积, 计算峰面积的 RSD 值为 0.93%, 表明仪器精密度良好。

2.2.7 重复性试验 按“2.2.3”项方法制备供试品溶液 6 份, 精密吸取各供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件测定, 记录峰面积, 计算 CT 质量浓度的 RSD 值为 0.52%, 表明该方法重复性良好。

2.2.8 稳定性试验 精密吸取供试品溶液适量, 分别于 0、2、4、6、8、10 h 按“2.2.1”项下色谱条件测定, 计算峰面积的 RSD 为 2.00%, 表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

2.2.9 加样回收率试验 精密吸取供试品适量置于 10 mL 量瓶中, 加入理论质量浓度为 10.0 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液 1.0 mL, 乙腈定容至刻度。按“2.2.1”项下色谱条件测定, 连续进样 6 次, 记录峰面积, 计算平均回收率为 101.40%, RSD 为 0.64%。

2.3 CT-SMs 的处方优化

称取一定量的油相 CT、乳化剂及助乳化剂, 混合均匀, 置于预先恒温至 25 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴中, 通过滴加水相的方法制备 CT-SMs, 记录体系的临界变化点, 采用 Origin 7.5 软件绘制伪三元相图, 用 IPP 6.0 软件计算所形成的微乳面积大小。

2.3.1 乳化剂的考察 以 CT 为油相, 助乳化剂为无水乙醇, 乳化剂与助乳化剂质量比 (K_m) 为 1:1, 分别以 Kolliphor[®] HS15、PC 和 F68 作为乳化剂, 固定总质量为 1 g, 油相与乳化剂质量比 1:9、2:8、3:7、4:6、5:5、6:4、7:3、8:2、9:1, 按“2.1”方法制备微乳。结果表明, 虽然 PC 和 F68 作为乳化剂所得伪三元相图面积较大, 但 PC 为乳化剂时易发生分层, F68 作为乳化剂时常温下易析出, 溶液出现浑浊或分层, 故选择 HS15 作为乳化剂进行后期试验。见图 2。

2.3.2 助乳化剂的考察 “2.3.1”项实验结果表明, 当乳化剂为 HS15, 油相- K_m (乳化剂与助乳化剂质量比) 为 3:7 时, 所得的微乳粒径范围较小。故以 CT 为油相, 选择 HS15 为乳化剂, 分别以无水乙醇、甘油、1,2-丙二醇、PEG 400 为助乳化剂, 固定总质量为 1 g, $K_m=1:9$ 、2:8、3:7、4:6、5:5、6:4、7:3、8:2、9:1, 按照“2.1”项下方法制备微乳。结果表明, 以甘油、1,2-丙二醇、PEG 400 为助乳化剂, 体系黏稠度大, 无法形成透明且流动性好的微乳液, 故不选其作为助乳化剂。以无水乙醇为乳化剂时, 微乳区域面积最大。见图 3。

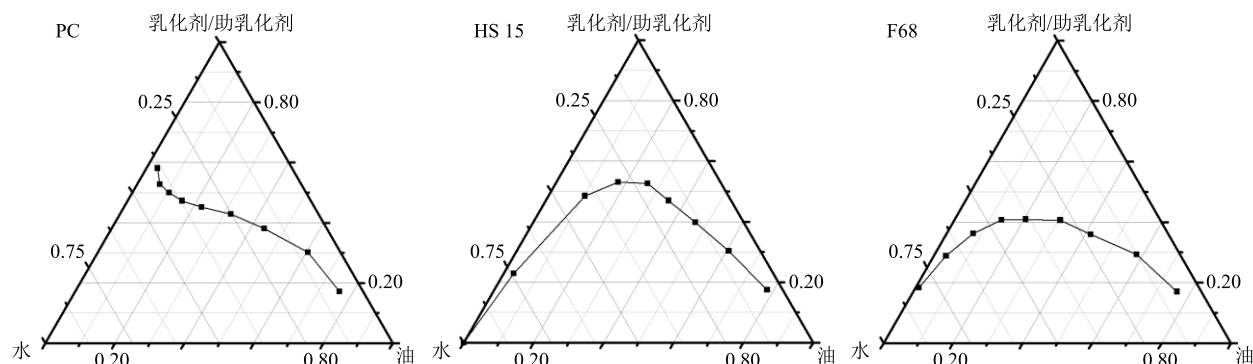


图 2 不同乳化剂的伪三元相图

Fig. 2 Pseudo-ternary phase diagram of different emulsifiers

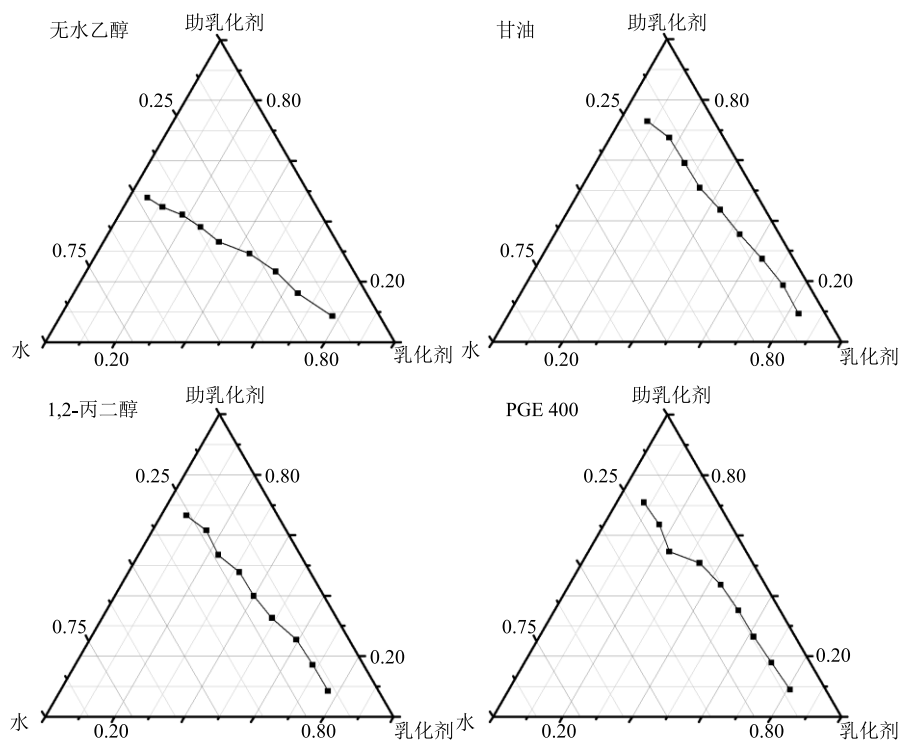


图 3 不同助乳化剂的伪三元相图

Fig. 3 Pseudo-ternary phase diagram of different co-emulsifiers

2.3.3 K_m 比例考察 在上述实验结果的基础上,以 CT 为油相, HS15 为乳化剂, 无水乙醇为助乳化剂 (K_m 值为 6:4、7:3、8:2、9:1), 固定总质量为 1 g, 设置油相与 K_m 值为 9:1、8:2、7:3、6:4、5:5、4:6、3:7、2:8、1:9 进行考察。结果 (图 4) 表明, 尽管 K_m 为 6:4 时其微乳区域面积最大, 考虑到乙醇注射有一定的刺激性且 K_m 值 7:3 粒径 RSD 值较小, 表明该处方较稳定, 故选择油相-混合乳化剂为 3:7, K_m 值为 7:3 进行下一步实验。

2.3.4 验证性实验 综合考虑表面活性剂用量尽量少, 粒径适中以及载油量尽可能大等因素。本实验

最终选择 HS15 为乳化剂, 无水乙醇为助乳化剂, K_m 值为 7:3 为最佳处方, 油相- K_m 为 3:7, 进行验证性实验。实验结果表明, 该处方和工艺可行, 重复性好, 见表 1。

2.4 CT-SMs 的包封率和载药量测定

2.4.1 CT-SMs 包封率的测定 取 CT-SMs 0.5 mL 于 10 mL 量瓶中, 乙腈定容至刻度, 按照“2.2”项下方法测定 CT 峰面积, 根据峰面积计算总药物量 ($W_{总}$); 取 CT-SMs 2 mL 于截留相对分子质量 30 000 超滤管中, 3 500 r/min 离心 30 min, 滤液 0.1 mL 置于 5 mL 量瓶中, 乙腈定容至刻度后进样测定, 根据峰面积计算游离药物量 ($W_{游}$)。按照以下公式计

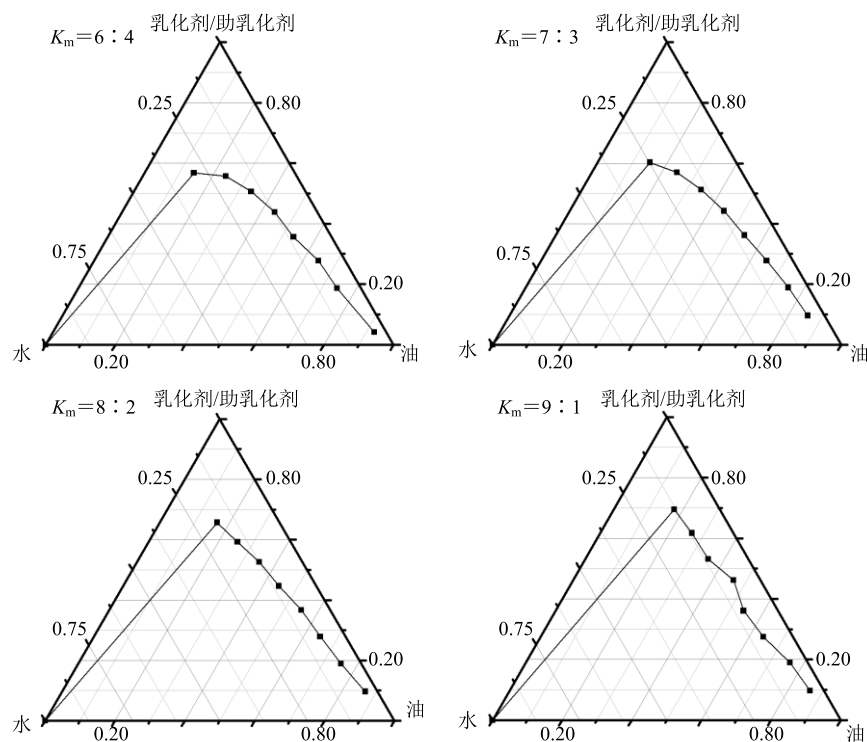
图 4 不同 K_m 值的伪三元相图Fig. 4 Pseudo-ternary phase diagram of different K_m values

表 1 验证性试验结果

Table 1 Confirmatory test results

K_m	中位粒径/ μm	粒径范围/ μm	RSD/%
7:3	0.361	0.201~0.651	0.26
	0.343	0.155~0.636	
	0.357	0.154~0.666	

算包封率, 得包封率为 $(98.46 \pm 0.02)\%$ 。

$$\text{包封率} = (W_{\text{总}} - W_{\text{游}}) / W_{\text{总}}$$

2.4.2 CT-SMs 中 CT 载药量测定 取供试品溶液适量, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加乙腈超声 (功率 80 W) 10 min 溶解后稀释至刻度, 摇匀, 经 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 按“2.2”项下方法测定 CT 峰面积, 按外标法峰面积计算 CT-SMs 中 CT 载药量为 3.7 mg/mL 。

2.5 CT-SMs 的质量评价

2.5.1 外观形态 CT-SMs 为乳白色略带蓝色乳光液体, 且离心后无药物析出及分层。取 CT-SMs 适量, 以水适当稀释后滴加在铜网上, 片刻后再滴加 2% 磷酸染色, 于透射电镜下观察 CT-SMs 的形态。透射电镜结果显示, CT-SMs 乳滴为类球形, 外观较圆整, 见图 5。

2.5.2 粒径分布及 Zeta 电位 取 CT-SMs 适量, 以水适量稀释后加入样品池中, 采用 Delsa Nano Zeta

电位及纳米粒度分析仪测定其粒度及 Zeta 电位, 结果见图 6、7。结果表明, CT-SMs 的平均粒径为 $(354.0 \pm 9.5) \text{ nm}$, PDI 为 0.267 ± 0.010 , Zeta 电位为 $(-13.40 \pm 0.26) \text{ mV}$ 。

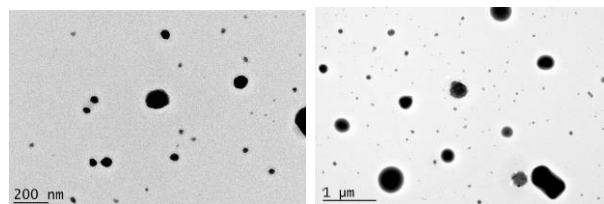


图 5 CT-SMs 的 TEM 图

Fig. 5 TEM image of CT-SMs

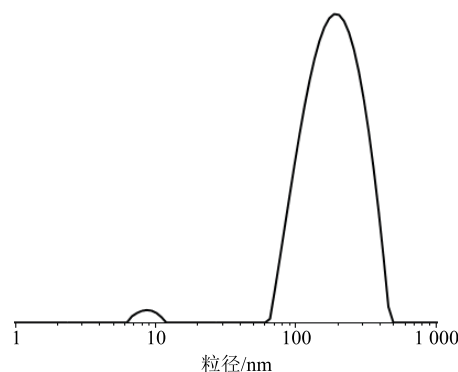


图 6 CT-SMs 乳化后粒径分布

Fig. 6 Particle size distribution after emulsification of CT-SMs

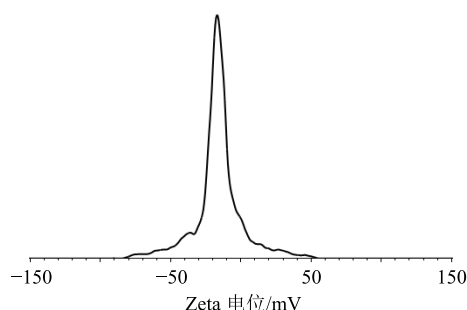


图 7 CT-SMs 乳化后 Zeta 电位分布

Fig. 7 Zeta potential distribution after emulsification of CT-SMs

2.5.3 稳定性试验 取一定量的 CT-SMs 制剂密封, 分别于 25、4 °C 内放置 0、1、3、5、7 d 后观察外观形态, 并测定粒径。结果表明, 未经稀释的 CT-SMs 于室温、4 °C 分别放置 0、1、3、5、7 d 后, 未见分层、析油等现象, 于相应时间点分别测定 CT-SMs 的中位粒径, 得出 RSD 分别为 2.4%、2.6%, 表明该制剂的物理稳定性良好。

2.6 体外抗肿瘤活性考察

采用 MTT 比色法检测细胞增殖率。设置对照组及 5 个质量浓度梯度的 CT-SMs 组 (120、100、80、60、40 μg/mL)、SMs 组 (280、233.3、186.6、139.9、93.2 μg/mL, 相当于 CT-SMs 各质量浓度组中混合辅料含量) 以及 5 个质量浓度梯度的 CT 组 (120、100、80、60、40 μg/mL)。

取对数生长期的 HEp-2、MCF-7 细胞, 以 6×10^4 个/孔接种于 96 孔板中, 每孔体积 100 μL, 置 37 °C、相对湿度为 5% 的 CO₂ 培养箱中培养 24 h。根据预试验结果, 分别加入含 CT 质量浓度为 40~120 μg/mL 的培养基 200 μL, 另设不加药物的对照组, 每个质量浓度设 6 个复孔, 边缘空白孔加 PBS 保持湿度。于培养箱中分别培养 24、48 h, 加入 20 μL MTT (避光操作), 置于 CO₂ 体积分数为 5%,

温度为 37 °C 的条件下继续培养 4 h, 弃上清, 每孔加 150 μL DMSO, 振摇 10 min, 酶标仪上以 490 nm 波长测定吸光度 (*A*) 值, 实验重复 3 次, 结果见表 2~4。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

MTT 实验结果显示, CT 组分别作用 MCF-7、HEp-2 细胞 24 h 后, 结果表明, 40~120 μg/mL CT 对 MCF-7 细胞活性无显著抑制作用, 80~120 μg/mL CT 对 HEp-2 细胞活性有显著抑制作用 (表 2)。相应质量浓度的 CT、SMs 及 CT-SMs 作用 HEp-2 细胞 24 h 后, 与对照组比较, CT 组与 SMs 组在 40、60 μg/mL 质量浓度下对 HEp-2 细胞增殖无明显的抑制作用, 不同质量浓度的 CT、SMs 及 CT-SMs 对 HEp-2 细胞增殖抑制作用呈剂量依赖性 (表 3)。与对照组比较, 各样品溶液在作用 HEp-2 细胞 48 h 后, SMs 组在 40、60 μg/mL 质量浓度下对 HEp-2 细胞增殖无明显的抑制作用, CT、CT-SMs 组在 40~120 μg/mL 对 HEp-2 细胞增殖有显著的抑制作用 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001, 表 4), 呈剂量-时间依赖性。

表 2 CT 对 MCF-7 和 HEp-2 的细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 2 Effect of CT on cell viability of MCF-7 and HEp-2 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	HEp-2 存活率/%	MCF-7 存活率/%
对照	—	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
CT	40	101.83 ± 10.22	98.74 ± 1.48
	60	99.33 ± 9.68	99.70 ± 0.85
	80	80.42 ± 7.63*	101.07 ± 4.34
	100	72.73 ± 7.37**	104.25 ± 9.89
	120	55.20 ± 8.96***	97.74 ± 8.08

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

表 3 各样品分别作用 24 h 对 HEp-2 细胞活力影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 3 Effect of each sample on HEp-2 cell viability for 24 h ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

样品	存活率/%				
	40 μg·mL ⁻¹	60 μg·mL ⁻¹	80 μg·mL ⁻¹	100 μg·mL ⁻¹	120 μg·mL ⁻¹
对照	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
CT	101.83 ± 10.22	99.33 ± 9.68	80.42 ± 7.63*	72.73 ± 7.37**	55.20 ± 8.96***
CT-SMs	93.46 ± 10.60	67.97 ± 8.72***	16.17 ± 4.17***&&&	7.83 ± 1.11***&&&	7.68 ± 1.01***&&&
SMs	97.91 ± 7.13	82.23 ± 12.66	81.88 ± 2.05*	73.36 ± 10.35*	60.56 ± 2.95***

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与 CT 组比较: # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$; 与 SMs 组比较: &&& $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$ vs CT group; &&& $P < 0.001$ vs SMs group

表 4 各样品分别作用 48 h 对 HEp-2 细胞活力影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 4 Effect of each sample on HEp-2 cell viability for 48 h ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品	存活率/%				
	40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	120 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
对照	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00
CT	113.32 $\pm$ 6.89*	90.61 $\pm$ 3.30**	75.56 $\pm$ 5.32**	58.09 $\pm$ 1.59***	49.05 $\pm$ 5.78***
CT-SMs	85.38 $\pm$ 7.64*##	80.01 $\pm$ 6.58**	75.43 $\pm$ 5.67**&	51.86 $\pm$ 9.38***&&	29.99 $\pm$ 6.05***&&&
SMs	97.48 $\pm$ 5.84	90.57 $\pm$ 8.62	92.85 $\pm$ 4.17*	85.02 $\pm$ 7.71*	79.33 $\pm$ 5.02**

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$; 与 CT 组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$; 与 SMs 组比较: & $P<0.05$ && $P<0.01$ &&& $P<0.001$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs CT group; & $P<0.05$ && $P<0.01$ &&& $P<0.001$ vs SMs group

2.7 荧光显微镜考察细胞摄取

以香豆素 6 (C6) 为荧光探针。取对数生长期的 HEp-2 细胞以每孔 1 mL, 1×10^5 个/孔的密度接种于 12 孔板中, 培养 24 h, 弃去上层培养基, 取 C6 溶液, 含 C6 的 CT 溶液 (C6-CT), 含 C6 的自乳化空白辅料组 (C6-SMs) 溶液, 含 C6 的 CT-SMs 溶液 (C6-CT-SMs) 与细胞共孵育 4 h。用预冷的 PBS 洗 3 次, 加入 0.5% 的多聚甲醛固定液, 避光 10 min, 弃固定液, PBS 洗 2 遍, 每次 3 min, 弃去 PBS。加入 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 DAPI 染色液, 染色 8 min, 去染色液, PBS 洗 2 遍, 每次 3 min。放于倒置荧光显微镜下, 相同条件下观察并拍摄图像, 结果见图 8。倒置荧光显微镜结果显示, 游离的 CT 在 HEp-2 细胞中未检测到荧光, 表明 CT 被 HEp-2 细胞摄取

较少。经 C6-CT-SMs、C6-SMs 处理的 HEp-2 细胞的荧光强度较强, 且 C6-CT-SMs 组强于 C6-SMs 组, 说明 C6-CT-SMs 在规定时间内可以向 HEp-2 细胞输送更多的 CT, 是 C6 和 CT-SMs 共同作用的结果。

2.8 流式细胞术考察细胞摄取

将细胞密度调整为 4×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 培养 24 h, 弃去上层培养基, 分别取完全培养基, 完全培养基配制的 C6 溶液、C6-CT 溶液、C6-SMs 溶液以及 C6-CT-SMs 溶液与 HEp-2 细胞共孵育 4 h。实验前用 PBS 清洗 3 次, 0.25% 的胰酶消化, 1 000 r/min 离心 5 min, 1 mL 的 PBS 重悬细胞, 流式细胞仪进行检测, 结果见图 9。由图 9 可见, 与荧光显微镜下观察到的结果一致, 相同 CT 含量的 CT-SMs 和 CT 处理 HEp-2 细胞后, CT-SMs 较

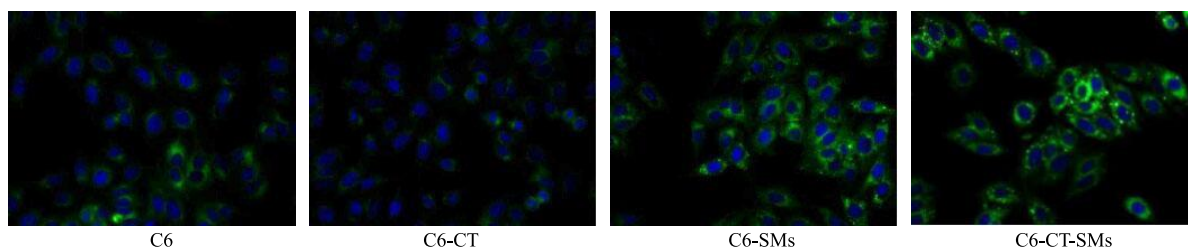


图 8 HEp-2 细胞的荧光显微镜图像

Fig. 8 Fluorescence microscopy images of HEp-2 cells

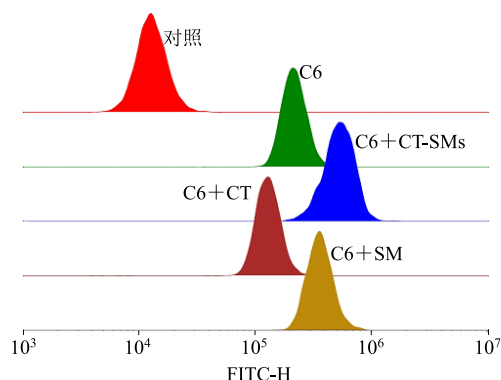


图 9 HEp-2 细胞的流式细胞仪图像

Fig. 9 Flow cytometry image of HEp-2 cells

CT 荧光摄取量大, 分别为 545.70 ± 11.56 和 230 ± 17.76 。提示制备成自乳化递送系统后, HEp-2 细胞对 CT 的摄取具有显著的促进作用。

3 讨论

目前, 已有诸多研究支持香茅草在抗肿瘤方面具有较高的应用价值及前途。Bidinotto 等^[16]研究结果表明, 在 DDB [由 7,12-二甲基苯并 (a) 蒽 (DMBA)、1,2,2-二甲基肼二盐酸盐 (DMH)、N-丁基-N-(4-羟丁基)亚硝胺 (BBN) 组成] 启动的雌性 BALB/C 小鼠体内, 香茅草精油对 N-甲基亚硝胺 (MNU) 诱导的 DNA 损伤具有显著的保护作用,

并具有潜在的抗乳腺癌活性。Bao 等^[17]研究了香茅草多糖对 S180 细胞的细胞毒性,结果表明香茅草多糖对移植的 S180 肿瘤有明显的抑制作用,可能是因为香茅草多糖剂量依赖性地提高了荷瘤小鼠的免疫力而实现了其抗肿瘤活性。然而,关于 CT 抗肿瘤性能的相关研究未见报道。实验室前期发现 CT 对 HEP-2 细胞的增殖具有显著的抑制作用,但本实验结果表明,CT 对 MCF-7 细胞的增殖无抑制作用,可能 Bidinotto 等^[16]报道的香茅草精油抗乳腺癌活性与精油中含有的其他成分有关。

实验室前期采用滴加乳化剂法,将脂溶性较强的 CT 包封于 SMs 中,可明显提高其水溶性,减少挥发量,成功制备了 CT-SMs。但考虑到这种方法在实际生产中操作性不强,临床应用前滴加微量乳化剂和助乳化剂极不方便,也不可能先进入体内再滴加乳化剂和助乳化剂,故改用滴加水法进行了 CT-SMs 制备研究,并成功获得适宜的处方。单独的 CT 作为油相,增大了微乳液中的载药量。

在乳化剂的考察过程中,当以磷脂为乳化剂时,溶液易分层,这可能是因为磷脂的 HLB 值较低,乳化能力差,无法形成澄清透明的自微乳体系。尽管 F68 的亲水疏水平衡值(HLB)值在 8~18,但是 F68 常温状态下易析出,甚至出现分层,故本研究选用 Kolliphor® HS15 作为乳化剂。乙醇、1,2-丙二醇、PEG 400、甘油等用作助乳化剂,嵌入乳化剂分子中降低界面张力及电荷斥力增加微乳稳定性,并调节乳化剂的 HLB 值^[18-19]。在本实验中,以甘油、1,2-丙二醇、PEG 400 为助乳化剂时,体系黏稠度大,无法形成透明且流动性好的微乳液,故不选其作为助乳化剂。

MTT 结果表明,游离的 CT-SMs 对 HEP-2 细胞的抑制作用显著强于单独的 CT, C6 由于其脂溶性较强,易进入细胞内,故使用单独的 C6 作用 HEP-2 细胞相同时间后,显微镜下观察到少量荧光。经 CT-SMs 处理的 HEP-2 细胞的荧光摄取量高于游离的 CT 处理的细胞,这可能是因为 CT-SMs 为较小的液滴,与细胞膜接触时相互融合,同时乳化剂和助乳化剂使细胞通透性增加,从而导致更多荧光染料随 CT-SMs 进入细胞内。

文献报道和实验室前期研究表明,HS15 在 50% 浓度范围以下具有较大的安全性,是欧洲药典允许的静脉注射附加剂^[20];5% 以下体积分数的乙醇对正常细胞具有一定的生长促进作用。本研究中辅料组

对细胞增殖具有一定的抑制作用,可能因为混合乳化剂作用于细胞膜所致,但是相应浓度范围内,与细胞共孵育 48 h 的影响较小。

参考文献

- [1] 张朝晖,金巧智,李志海,等. 鸦胆子油乳注射液对喉癌 HEP-2 细胞抑制作用研究 [J]. 现代实用医学, 2015, 27(4): 518-520.
- [2] Nakayama M, Okamoto M, Hayakawa K, *et al.* Clinical outcomes of 849 laryngeal cancers treated in the past 40 years: Are we succeeding [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2014, 44(1): 57-64.
- [3] Charman S A, Charman W N, Rogge M C, *et al.* Self-emulsifying drug delivery systems: Formulation and biopharmaceutic evaluation of an investigational lipophilic compound [J]. *Pharm Res*, 1992, 9(1): 87-93.
- [4] 仲粒,李小芳,廖艳梅,等. 甘草黄酮自微乳化释药系统的制备及其质量评价 [J]. 中草药, 2019, 50(13): 3044-3051.
- [5] 王冰,浦益琼,徐本亮,等. 20(S)-原人参二醇自微乳释药系统的处方优化和有效期预测 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(22): 1-6.
- [6] 杨志欣,张蕾,王鑫,等. 自乳化药物递送系统研究概述 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(3): 563-569.
- [7] 张小飞,果秋婷,邹俊波,等. 黄芪甲苷自乳化释药系统的制备及大鼠在体肠吸收研究 [J]. 中草药, 2019, 50(13): 3037-3043.
- [8] 苏菊,吴朝花,姜丰,等. 丹皮酚自微乳经皮给药系统处方的优选及药剂学性质评价 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(17): 11-16.
- [9] Craig D Q M, Lievens H S R, Pitt K G, *et al.* An investigation into the physico-chemical properties of self-emulsifying systems using low frequency dielectric spectroscopy, surface tension measurements and particle size analysis [J]. *Int J Pharmaceut*, 1993, 96(1/3): 147-155.
- [10] Tang B, Cheng G, Gu J C, *et al.* Development of solid self-emulsifying drug delivery systems: Preparation techniques and dosage forms [J]. *Drug Discov Today*, 2008, 13(13/14): 606-612.
- [11] Ruan J, Liu J, Zhu D, *et al.* Preparation and evaluation of self-nanoemulsified drug delivery systems (SNEDDSs) of matrine based on drug-phospholipid complex technique [J]. *Int J Pharmaceut*, 2010, 386(1/2): 282-290.
- [12] Constantinides P P. Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: Physical and biopharmaceutical aspects [J]. *Pharm Res*, 1995, 12(11): 1561-1572.

- [13] 赖章婷, 丁海波, 蒋且英, 等. 水飞蓟宾过饱和自微乳给药系统的制备及体外质量评价 [J]. 中草药, 2019, 50(17): 4091-4099.
- [14] 姜 丰, 王 益, 严俊丽, 等. 香茅醇微乳凝胶的制备及体外抗菌试验 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(20): 16-21.
- [15] 项佳媚, 郑希龙, 魏建和, 等. 香茅草及香茅草茶的研究进展 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2017, 19(5): 879.
- [16] Bidinotto L T, Costa C A R A, Salvadori D M F, *et al.* Protective effects of lemongrass (*Cymbopogon citratus* STAPF) essential oil on DNA damage and carcinogenesis in female Balb/C mice [J]. *J Appl Toxicol*, 2011, 31(6): 536-544.
- [17] Bao X L, Yuan H H, Wang C Z, *et al.* Polysaccharides from *Cymbopogon citratus* with antitumor and immunomodulatory activity [J]. *Pharm Biol*, 2014, 53(1): 1-8.
- [18] 张云雷, 刘晓娟. 拉西地平自微乳的制备与体内外质量评价 [J]. 沈阳药科大学学报, 2017, 34(3): 19-24.
- [19] 晋苗苗, 郭庆明, 蒋 鸣, 等. 银杏内酯缓释片的制备工艺筛选及体外释放度评价 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 12-16.
- [20] 张 蕾, 訾 鹏, 高 洁, 等. 非离子型表面活性剂 HS 15 在药剂中的研究进展 [J]. 药学进展, 2015, 39(5): 370-375.