• 药剂与工艺 •

高载药量雷公藤红素纳米混悬剂的制备及体外评价

黄甜甜[1,2]，沈一平[2,3]，路丽康[2]，孙雪晴[4]，王向涛[1,2*]

1. 河南中医药大学 药学院，河南 郑州 450046
2. 中国医学科学院北京协和医学院 药用植物研究所，北京 100193
3. 哈尔滨商业大学 药学院 药物工程技术研究中心，黑龙江 哈尔滨 150076
4. 黑龙江中医药大学 药学院，黑龙江 哈尔滨 150040

摘 要：目的 以泊洛沙姆 188（P188）为稳定剂制备高载药量的雷公藤红素纳米混悬剂（Cel-NSps），提高药物的溶解度、释放度和抗肿瘤药效。**方法** 采用微型化介质研磨法和沉淀法制备 Cel-NSps，通过动态光散射法、透射电子显微镜和 X 射线衍射（XRD）法对粒径、形貌和晶型进行表征并考察其稳定性，透析袋法考察体外释放情况；MTT 法评价其对小鼠乳腺癌细胞 4T1、人肝癌细胞 HepG2、人皮肤恶性黑色素瘤细胞 SK-MEL-28、人乳腺癌细胞 MCF-7 的细胞毒性。**结果** 微型介质研磨法制备的 Cel-NSps 平均粒径为（215.7±0.7）nm，多分散指数（PDI）为 0.17±0.02，Zeta 电位为（−18.0±0.6）mV，平均载药量为（87.62±1.02）%，形状不规则，药物在纳米混悬剂中以晶形态存在；在磷酸盐缓冲液（PBS）、0.9% NaCl、5%葡萄糖、血浆和人工肠液中能稳定存在，但在人工胃液中不稳定；沉淀法制备的 Cel-NSps 平均粒径为（133.1±0.8）nm，PDI 为 0.13±0.02，Zeta 电位为（−16.9±1.2）mV，平均载药量为（86.39±0.21）%，近乎球形，药物在纳米混悬剂中以无定形态存在，在各种生理介质中都能稳定存在，可用于口服或静脉注射给药。微型化介质研磨法制备的 Cel-NSps 呈匀速缓慢的释放，144 h 累积释放 54.40%；沉淀法制备的纳米混悬剂呈两相释放，前 48 h 快速均匀释放，之后非常缓慢释放，144 h 累积释放 73.12%，而原料药 144 h 仅释放 11.09%。MTT 实验表明，Cel-NSps 对 4T1、HepG2、SK-MEL-28、MCF-7 细胞具有显著的生长抑制作用且呈剂量依赖性，对 4 种细胞的 IC_{50} 在 0.92～1.96 μg/mL。**结论** 以 P188 为稳定剂用 2 种不同方法制备了小粒径、高载药量的 Cel-NSps，成功解决了溶解度差和释放度低的难题，且制备方法简单，易于工业化生产，为雷公藤红素的新药研发奠定了基础。

关键词：雷公藤红素；纳米混悬剂；介质研磨法；反溶剂沉淀法；载药量；体外评价；溶解度；释放度；抗肿瘤药效；MTT 法；细胞毒性

中图分类号：R286.2 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2020)08 - 2125 - 09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.08.020

High drug loading celastrol nanosuspensions: Preparation and *in vitro* evaluation

HUANG Tian-tian[1,2], SHEN Yi-ping[2,3], LU Li-kang[2], SUN Xue-qing[4], WANG Xiang-tao[1,2]

1. College of pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China
2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China
3. Center of Pharmaceutical Engineering Technology Research, College of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China
4. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To prepare celastrol nanosuspensions (Cel-NSps) using poloxamer 188 as stabilizer in order to improve the solubility, drug release, and anti-tumor activity of celastrol. **Methods** The Cel-NSps were prepared by miniaturized media milling method and anti-solvent precipitation method. The particle size, morphology, and drug crystalline of the resultant nanosuspensions

收稿日期：2019-10-31

基金项目：国家自然科学基金委-广东省联合基金项目（U1401223）；中国医学科学院医学创新基金资助项目（2016-I2M-1-012）

作者简介：黄甜甜（1993—），女，硕士研究生，研究方向为药物新剂型。Tel: 18337128801 E-mail: tianthuang@163.com

***通信作者** 王向涛（1973—），男，研究员，博士，主要从事药物新剂型研究。Tel: (010)57833266 E-mail: xtaowang@163.com

were examined via dynamic light scattering, transmission electron microscopy and X-ray powder diffraction assay. We also evaluated their particle size change in different physiological media and *in vitro* release profile via dialysis bag method. MTT assay was used to evaluate their *in vitro* cytotoxicities against 4T1, HepG2, SK-MEL-28 and MCF-7 cells. **Results** The average particle size of Cel-NSps prepared by the miniaturized media milling method was (215.7 ± 0.7) nm, with the PDI of 0.17 ± 0.02, Zeta potential of (−18.0 ± 0.6) mV, and the average drug loading of (87.62 ± 1.02)%. The resultant nanosuspensions were irregular in shape and the drug existed in a crystal state. They were quite stable in PBS, normal saline, 5% glucose, plasma, and artificial intestinal juice, but unstable in artificial gastric juice. For the Cel-NSps prepared via precipitation method, the average particle size of (133.1 ± 0.8) nm, PDI of 0.13 ± 0.02, Zeta potential of (−16.9 ± 1.2) mV, and the drug loading of (86.39 ± 0.21)%, their shape was almost spherical. In this case, Cel was in an amorphous form and Cel-NSps were stable in various physiological media, which could be used for oral or intravenous administration. As to the *in vitro* release experiments, the nanosuspension prepared by the miniaturized media milling method showed a uniform and slow release, with a cumulative release rate of 54.40% within 144 h, while the nanosuspension prepared by precipitation method showed a two-phase release, a rapid release in the first 48 h followed by a very slow release with a cumulative release of 73.12% within 144 h, in contrast of only 11.09% within 144 h for free Cel. MTT assay showed that Cel-NSps had a significant cytotoxicities against 4T1, HepG2, SK-MEL-28 and MCF-7 cells in a dose-dependent manner, with the IC_{50} of 0.92—1.96 μg/mL. **Conclusion** Cel-NSps were successfully prepared via two different method using P188 as a stabilizer with small particle size and high drug loading. Nanosuspension helped to solve the problem of poor solubility and low release of free Cel with the preparation method being simple and easy to scale up for industrial production. The research result of this paper provided a foundation for the development of new drugs on the basis of Cel.

Key words: celastrol; nanosuspensions; media milling method; anti-solvent precipitation method; drug loading content; *in vitro* evaluation; solubility; release rate; antitumor efficacy; MTT assay; cytotoxicities

据统计，在新药研发过程中约有 70%的候选药物在制剂开发阶段因溶解度低、生物利用度低而被淘汰[1]。近年来，纳米技术的发展为解决难溶性药物的溶解度和口服生物利用度提供了新思路[2-4]。纳米混悬剂（nanosuspension，NSps）是指以少量表面活性剂或高分子聚合物为稳定剂，将纯药物纳米颗粒分散于水中而形成的一种亚微米胶体分散体系，几乎适用于所有难溶性药物，可用于口服、注射、经皮、肺部和眼部等给药途径[5-7]。NSps 的制备主要有 3 种：自上而下（top-down）技术、自下而上（bottom-up）技术和二者联用技术。与普通的微米混悬剂相比，纳米混悬剂具有粒径小、载药量高和生物黏附的特点，可以显著提高难溶性药物的溶解度和溶出度，进而提高生物利用度和药效，同时还可通过进一步表面修饰，实现长循环和靶向给药，降低给药剂量和不良反应等[8]，具有良好的应用前景。

雷公藤红素（celastrol，Cel），又名南蛇藤素，1936 年由赵承瑕首次从传统中药雷公藤的根部分离得到，是一种五环三萜类化合物（化学结构见图 1）[9]，可以和体内蛋白的半胱氨酸残基中的巯基发生迈克尔加成反应，生成共轭加成产物影响多种蛋白或酶的活性，从而调节细胞内多种信号途径，产生多种药理作用[10]，如抗炎及免疫抑制[11]、抗肿瘤[12-13]、抗氧化[14]及抗肥胖[15-16]等药理作用。近些

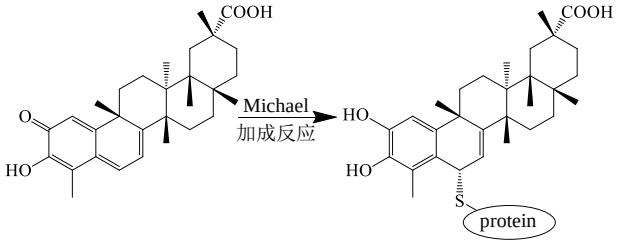

图 1　Cel 的结构式及药理作用基础

Fig. 1　Structure and pharmacological effects of Cel

年 Cel 的抗肿瘤活性受到广泛关注，其对肺癌[17]、肝癌[18]、乳腺癌[19-20]、骨肉瘤[21]、胃癌[22]、白血病[23]、宫颈癌[24]等均具有显著的抑制作用，其抗肿瘤机制涉及阻滞细胞周期、诱导凋亡、抑制血管新生及细胞侵袭和转移等方面，同时也是一种 P-糖蛋白（P-gp）抑制剂，可以逆转机体多药耐药等[25-26]。但是 Cel 在生物药剂学分类系统（BCS）中属于 BCS II 类，水溶性差（溶解度为 1.192 μg/mL）、溶出度低、生物利用度低、肝和生殖毒性等限制了其临床应用[27]。

近些年来研究者已通过制剂手段来提高 Cel 的溶解度和生物利用度，降低毒性。如陈欣妍等[28]利用薄膜分散法制备了 Cel 脂质体，不仅达到了缓释的目的，还提高了细胞摄取量，增强了 Cel 对 HepG2 细胞的毒性。黄萌萌等[29]制备了 Cel-薏苡仁组分微乳，达到了协同减毒增效的目的，但是 Cel 的载药量受到限制，仅有 1.08%。Soe 等[30]制备了叶酸靶

向的 Cel 和伊立替康双载药的脂质体，体内外实验都表明制成脂质体后抗乳腺癌作用显著高于原料药，毒性低于原料药，但是 Cel 载药量仅为 28.5%。前期本课题组以聚乙二醇-聚己内酯（$mPEG_{2000}$-PCL_{2000}）为稳定剂制备了雷公藤红素纳米混悬剂（Cel-NSps），显著提高了 Cel 的抗肝癌作用[31]，但是该处方中 $mPEG_{2000}$-PCL_{2000} 非 FDA 批准的注射用辅料，用于静脉给药时稳定剂对人体的安全性有待评估[32]，故本研究尝试以 iv 辅料泊洛沙姆 188（P188）为稳定剂，采用微型介质研磨法和沉淀法 2 种方法制备高载药量的 Cel-NSps，为下一步体内研究和临床应用打下基础。

1 仪器与材料

Zetasizer Nano ZS 型粒度仪，英国 Malvern Instruments 公司；Mettler Toledo AL204 电子天平，梅特勒-托利多仪器有限公司；KQ3200DB 型数控超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司；DF-101S 集热式恒温磁力搅拌器，北京恒丰长伟科技有限公司；DX-2700 型 X 射线衍射仪，上海精密仪器仪表有限公司；UltiMate 3000 高效液相色谱仪，美国戴安有限公司；Biotek 酶联免疫检测仪，美国伯腾仪器公司；JEM-1400 透射电子显微镜，日本电子珠式会社；Tecan Infinite M1000 PRO 多功能酶标仪，力臻卓越（北京）科学仪器有限公司。

Cel，质量分数＞98%，成都阿克丁公司，批号 CE-180402；泊洛沙姆 188（P-188），中国西格玛有限公司，批号 018K0029；色谱乙腈，赛默飞世尔科技有限公司，批号 192855；无水乙醇，分析纯，北京化工厂，批号 20190118；氧化锆球，直径为 0.4～0.6 mm，长沙华尊陶瓷材料有限公司；二甲基亚砜（DMSO），分析纯，北京化工厂。

小鼠乳腺癌 4T1 细胞、人肝癌 HepG2 细胞、人皮肤恶性黑色素瘤 SK-MEL-28 细胞、人乳腺癌 MCF-7 细胞均购自北京协和医学院基础医学研究所细胞中心；RPMI 1640、DMEM 培养基，美国 Hyclone 公司，批号 AD15805337、AD17218271；胎牛血清（批号 2017488）、0.25% Trypsin-EDTA（1×），美国 Gibco 公司；青霉素和链霉素双抗，美国 Hyclone 公司，批号 20170417。

2 方法与结果

2.1 微型化介质研磨法制备 Cel-NSps

参照文献方法[33]，采用基于“top-down”原理的微型化介质研磨技术，以磁力搅拌器为动力装置，西林瓶为研磨室，氧化锆球为研磨介质制备 Cel-NSps。具体操作如下：精密称取 40 mg Cel 和 5 mg P188 于西林瓶中，加入 4 mL 去离子水，超声使药物分散均匀后加入搅拌子及氧化锆球（直径为 0.4～0.6 mm），氧化锆球的用量为液体体积的 3/4，室温下，以 800 r/min 的转速室温搅拌 2 h，然后用注射器将液体吸出并用去离子水冲洗 3 次，合并液体即得 Cel-NSps，记为 Cel-NSps(a)。

2.2 沉淀法制备 Cel-NSps

沉淀法是基于“bottom-up”原理制备 NSps 的常用技术，该法通过将药物的良溶剂加入到可互溶的不良溶剂中，药物因过饱和而析出形成纳米尺寸的药物晶体，最后除去有机溶剂。具体操作如下：精密称取 8 mg Cel 溶于 0.8 mL 无水乙醇中，再称取 1 mg P188 溶于 8 mL 去离子水中，在超声（25 ℃，250 W）条件下将药物的醇溶液缓慢滴入到水相中，45 ℃下减压旋转蒸发除去有机溶剂，即得 Cel-NSps，记为 Cel-NSps(b)。

2.3 粒径、多分散指数（PDI）及 Zera 电位测定

分别取上述 2 种方法制备的 Cel-NSps 适量，适当稀释后用马尔文激光粒度仪测定其平均粒径、PDI 及 Zeta 电位，每个样品平行测定 3 次，结果见图 2。Cel-NSps(a) 和 Cel-NSps(b) 的平均粒径分别为（215.7±0.7）、（133.1±0.8）nm，PDI 分别为 0.17±0.02、0.13±0.02，Zeta 电位分别为（−18.0±0.6）、（−16.9±1.2）mV。

2.4 形貌观察

将上述 2 种方法制备的 Cel-NSps 稀释到 100 μg/mL，取 6.0 μL 滴到 300 目铜网上，静置 5 min 后用滤纸吸干多余液体，室温放置 20 min 后，滴加 6.0 μL 2%磷钨酸负染色液于铜网上，自然晾干，使用 JEM-1400 透射电子显微镜（TEM）观察 Cel-NSps 的形态，结果见图 3。微型化介质研磨法制备的 Cel-NSps(a) 呈无规则形状，而沉淀法制备的 Cel-NSps(b) 呈球形，在 TEM 下 2 种纳米粒的粒径均小于动态光散射法（DLS）测得的粒径，这是因为 TEM 观测的是干燥粒子的粒径，而 DLS 观测的是水化粒子的粒径[34]。

2.5 X 射线衍射（XRD）分析

采用真空冷冻干燥机将上述 2 种 Cel-NSps 冻干成粉末，然后与原料药（Cel）、稳定剂（P188）、Cel 与 P188 的物理混合物（8∶1）一起进行 XRD 分析[35]。测试条件为 Cu 靶，40 mA、40 kV，扫描

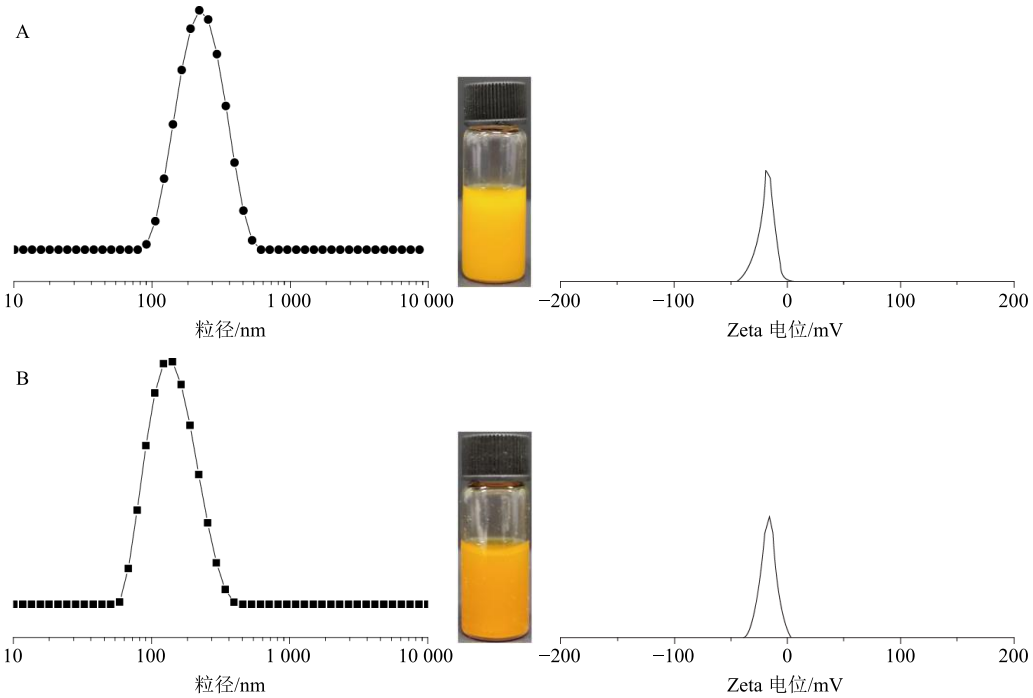

图 2　微型化介质研磨法 (A) 和沉淀法 (B) 制备的 Cel-NSps 的粒径和 Zeta 电位分布

Fig. 2　Particle size and Zeta distribution of Cel-NSps prepared by miniaturized media milling method (A) and precipitation method (B)

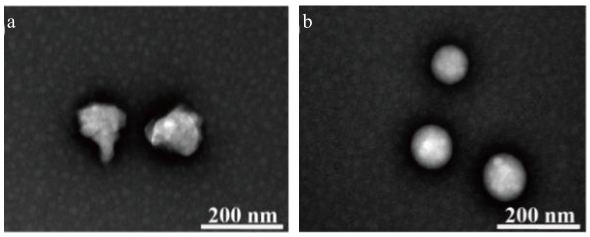

图 3　微型化介质研磨法 (a) 和沉淀法 (b) 制备的 Cel-NSps 的透射电镜照片

Fig. 3　Transmission electron microscope photo of Cel-NSps prepared by miniaturized media milling method (a) and precipitation method (b)

范围 2θ 为 3°～80°，扫描速度为 6 °/min。结果见图 4。在 XRD 图中，Cel 表现出强烈的晶型衍射峰，说明 Cel 在原料药中以晶体形式存在；Cel 和 P188 的物理混合物表现出相同的晶体衍射峰，说明在混合物中 Cel 仍以晶体形式存在；微型化介质研磨法制备的 Cel-NSps(a) 也表现出相同的晶体衍射峰，说明在 Cel-NSps(a) 中 Cel 仍以晶体形式存在；沉淀法制备的 Cel-NSps(b) 晶型衍射峰完全消失，说明在 Cel-NSps(b) 中 Cel 以无定形形式存在；Cel-NSps(c)为沉淀法制备的纳米粒在 4 ℃放置 3 个月的样品，其 XRD 图谱未见有任何衍射峰出现，说明在放置过程中纳米粒中药物依然为无定形态。

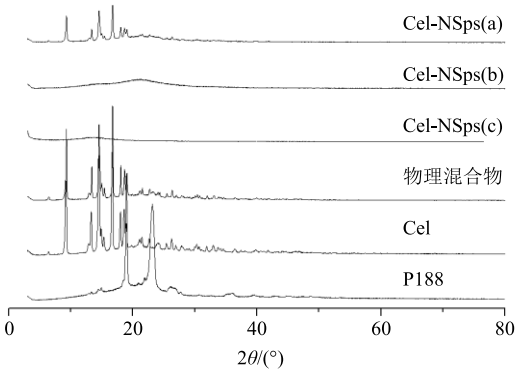

图 4　Cel-NSps、Cel 原料药、Cel 和 P188 的物理混合物 (8∶1)、P188 的 XRD 图

Fig. 4　XRD patterns of Cel-NSps, Cel in bulk powder, P188, and physical mixture of Cel in bulk powder and P188 (8∶1)

2.6　放置稳定性研究

将微量介质研磨法制备的 Cel-NSps(a) 和沉淀法制备的 Cel-NSps(b) 密封放置于 4 ℃，分别在 0、2、4、8、15、23、30 d 时取样测粒径，结果见表 1，4 ℃放置 30 d 纳米粒粒径无明显变化，且无肉眼可见的聚集和沉淀现象，说明 2 种方法制备的 Cel-NSps 在 4 ℃下能稳定存在 30 d。

2.7　生理介质稳定性研究

2.7.1　Cel-NSps 在生理介质中的粒径变化　将 Cel-

表 1 Cel-NSps 在 4 ℃放置时的粒径变化

Table 1 Particle size change of Cel-NSps at 4 ℃

t/d	Cel-NSps(a)		Cel-NSps(b)	
	粒径/nm	PDI	粒径/nm	PDI
0	215.7±0.7	0.17±0.02	151.7±2.3	0.15±0.02
2	214.5±6.1	0.15±0.02	153.9±3.1	0.15±0.05
4	216.1±3.8	0.17±0.03	158.9±1.2	0.16±0.06
8	220.9±1.1	0.18±0.04	156.9±4.5	0.16±0.03
15	217.8±3.8	0.19±0.02	154.7±3.0	0.15±0.02
23	212.6±5.4	0.14±0.02	157.8±4.0	0.17±0.04
30	231.0±3.6	0.21±0.03	152.8±2.9	0.11±0.02

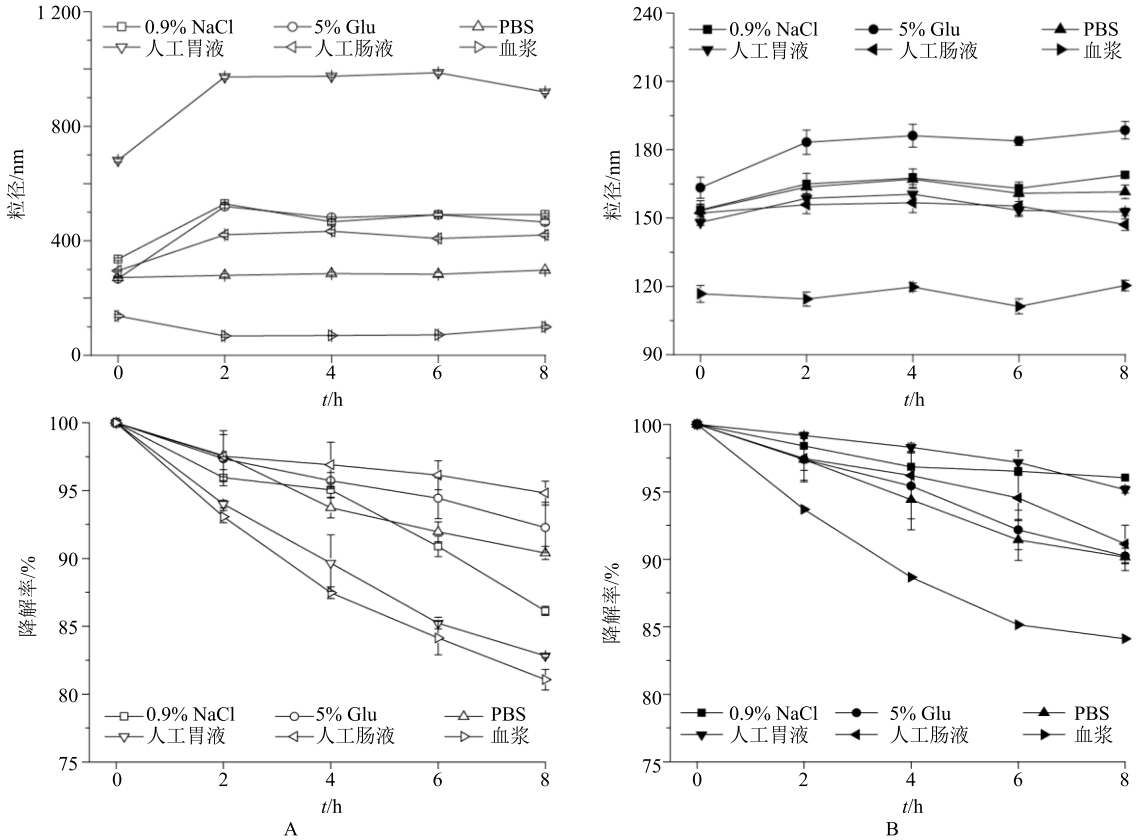

图 5 微型化介质研磨法 (A) 和沉淀法 (B) 制备的 Cel-NSps 在 0.9% NaCl、5% Glu、PBS、人工胃液、人工肠液及血浆在 37 ℃孵育时的粒径变化及降解率

Fig. 5 Particle size change and residual of Cel-NSps by miniaturized media milling method (A) and precipitation method (B) in 0.9% NaCl, 5% glucose (Glu), phosphate buffer saline (PBS), artificial gastric juice, artificial intestinal fluid, and plasma at 37 ℃

粒径由 215 nm 增大到 919 nm，说明 Cel-NSps(a) 在人工胃液中不能稳定存在，可做成肠溶制剂；在血浆中粒径先减小随后保持稳定，且无沉淀，说明在血浆中也能稳定存在，可用于 iv 给药。而 Cel-NSps(b) 在上述生理介质中都能稳定存在，可用于口服或静脉注射给药。

2.7.2 Cel-NSps 在生理介质中的含量变化 将 Cel-NSps(a) 和 Cel-NSps(b) 分别与 1.8% NaCl、10% Glu 和磷酸盐缓冲液（PBS）（2×）溶液等体积混合；与人工胃肠液、大鼠血浆按体积比 1∶4 混合，37 ℃孵育，并分别在 0、2、4、6、8 h 取样测粒径，观察有无聚集、沉淀，结果见图 5。与上述生理介质共孵育 8 h 后，Cel-NSps(a) 在 PBS 溶液中粒径变化较小，且无任何浑浊、沉淀现象，说明 Cel-NSps(a) 在 PBS 中稳定性较好，而在 0.9% NaCl、5% Glu 和人工肠液中，Cel-NSps(a) 的粒径有增大趋势，但是无沉淀现象，说明 Cel-NSps(a) 在这 3 种介质中稳定性一般，而在人工胃液中 Cel-NSps(a) 和 Cel-NSps(b) 分别与 1.8% NaCl、10% Glu 和 PBS（2×）溶液等体积混合；与人工胃肠液、大鼠血浆按体积比 1∶4 混合，37 ℃孵育，并分别于 0、2、4、6、8 h 取样 100 μL，用 900 μL 色谱甲醇充分混匀后涡旋 10 min，HPLC 测定 Cel 质量浓度，按下式计算 Cel 剩余量，剩余量＝C_n/C_0，C_n 为第 n 小时 Cel 的质量浓度，C_0 为 0 时 Cel 的质量

浓度，平行 3 次实验。

从图 5 可以看出，研磨法制备的纳米粒中 Cel 在 5% Glu、PBS 和人工肠液中孵育 8 h 后药物剩余量大于 90%；而在 0.9% NaCl、人工胃液和血浆中孵育 8 h 后药物剩余量最低降到 81%，推测和该纳米粒在 0.9% NaCl 中粒径增大、肠液低 pH 值以及胃蛋白酶和血浆中蛋白类成分和代谢酶有关。

沉淀法制备的纳米粒中 Cel 在 0.9% NaCl、5% Glu、PBS、人工胃液和人工肠液中孵育 8 h 后剩余量大于 90%；在血浆中剩余量降到 84%，可能是受血浆中蛋白类成分和代谢酶影响。

2.8　Cel-NSps 的载药量测定

2.8.1　色谱条件　色谱柱为 Venusil MP C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相为乙腈-0.005 mol/L 磷酸水溶液（85∶15），体积流量 1.0 mL/min，柱温 25 ℃，检测波长 425 nm，进样量 20 μL。

2.8.2　专属性考察　精密称取一定量的 Cel 对照品，用色谱甲醇溶解，按“2.8.1”项色谱条件进样，观察峰形、对称性及有无杂质峰干扰。同时，按照“2.2”项方法制备 Cel-NSps 和不含药的空白 NSps，用色谱甲醇稀释后按照上述色谱条件进样，并记录相应色谱图，结果见图 6。Cel 的保留时间为 14.3 min，峰形对称，无拖尾；空白纳米粒在 14.3 min 未出峰，说明辅料对 Cel 的检测没有干扰，专属性良好。

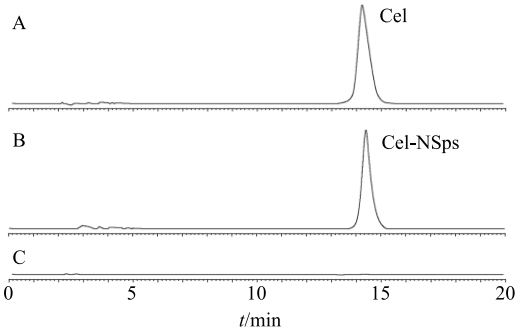

图 6　Cel (A)、Cel-NSps (B)、空白纳米粒 (C) 的 HPLC 图

Fig. 6　HPLC of Cel (A), Cel-NSps (B) and blank-NSps (C)

2.8.3　标准曲线的建立　参照文献方法[36]建立 Cel 的标准曲线。精密称取 Cel 原料药 10 mg 并转移至 10 mL 量瓶中，用色谱甲醇溶解并定容至刻度线，得到质量浓度为 1 mg/mL 的母液。取母液适量，加入色谱甲醇稀释成 100、75、50、20、10、5、2.5、1、0.5、0.1、0.05 μg/mL 的一系列对照品溶液，按上述色谱条件进样并记录峰面积，以峰面积为纵坐标（Y），质量浓度为横坐标（X），以 Y 对 X 进行线性回归，得回归方程 Y＝0.609 4 X－0.060 4，r^2＝0.999 8，结果表明药物质量浓度在 0.5～100.0 μg/mL 线性关系良好。

2.8.4　精密度考察　取“2.8.3”项下质量浓度为 5、50、100 μg/mL 的 Cel 溶液于 1 d 内重复进样 5 次，考察日内精密度；日间连续进样 5 d，考察日间精密度。结果表明，各质量浓度的 RSD 值均小于 5%，表明此方法的精密度良好，符合含量测定的要求。

2.8.5　载药量测定　将上述 2 种方法制备的 Cel-NSps 冻干，精密称取冻干粉适量（W）加入一定体积的色谱甲醇（V）溶解，13 000 r/min 离心 10 min，取上清液进液相测药物质量浓度（C），平行 3 份，按下式计算载药量（drug loading，DL）[34]，DL＝CV/W。微型介质研磨法制备的 Cel-NSps 平均载药量为（87.62±1.02）%，沉淀法制备的 Cel-NSps 平均载药量为（86.39±0.21）%，比理论载药量 88.89% 略低，分析主要原因是制备时转移过程中的残留造成的。

2.9　体外释放研究

采用透析袋扩散法考察 Cel-NSps 的体外释放情况[31]。取 Cel-NSps、Cel 原料药（分散于 0.5% CMC-Na 的去离子水）各 1 mL 于截留相对分子质量为 8 000～14 000 的即用型透析袋中，然后放入 50 mL 含 0.5%聚山梨酯 80 的磷酸盐缓冲液（PBS）中进行释放，释放温度为 37 ℃，转速 100 r/min，每个样品平行 3 份；分别于 0.25、0.5、1、2、4、8、12、24、48、72、96、120、144 h 取 1 mL 释放外液，同时补充相应体积的释放介质，每 24 h 更换 1 次释放外液。将取出的释放外液 13 000 r/min 离心 20 min，取上清液进液相测药物质量浓度，计算累积释放率，结果见图 7。Cel-NSps(a) 在含 0.5%聚

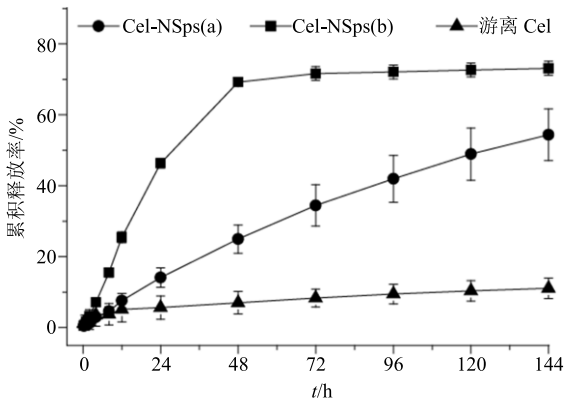

图 7　Cel-NSps 的体外释放曲线

Fig. 7　*In vitro* cumulative release curve of Cel-NSps

山梨酯 80 的 PBS（pH 7.4）中缓慢恒速释放，144 h 累积释放率达 54.40%；而 Cel-NSps(b) 呈两相释放，先是 48 h 内快速释放，累积释放率达 69.20%，然后是 48～144 h 内缓慢释放，144 h 累积释放率达 73.12%；Cel 原料药在相同条件下的累积释放率仅有 11.09%。由此可见，将 Cel 制成 NSps 后，显著提高了其体外释放率，这将有利于提高 Cel 体内生物利用度。

2.10 体外细胞毒性实验

将生长至对数期的 4T1、HepG2、SK-MEL-28 和 MCF-7 细胞以每孔 8×10^3 个的密度接种于 96 孔板上，放入 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h，弃去培养基，加入不同质量浓度的 Cel-NSps 和 Cel 的 DMSO 溶液（DMSO 终质量分数＜0.1%），每个质量浓度平行 6 组，同时设不加药的空白组，继续放回培养箱培养，48 h 后每孔加入 20 μL MTT 溶液（5 mg/mL），在培养箱中孵育 4 h 后，吸去上清液，每孔加 150 μL DMSO，避光，在微孔振荡器上振荡 10 min 使甲瓒结晶充分溶解，然后用酶标仪测定各孔在 570 nm 处的吸光度（A）值。按下式计算细胞抑制率：细胞抑制率＝1－$A_{给药}/A_{空白}$，Cel-NSps 和 Cel DMSO 溶液给药 48 h 后对不同肿瘤细胞的生长抑制情况见图 8。使用 GraphPad Prism 5 软件计算 IC_{50} 值，由 SPSS 22.0 软件计算显著性差异。在 4 种肿瘤细胞模型中，Cel DMSO 溶液、Cel-NSps(a) 和 Cel-NSps(b) 对细胞的生长抑制呈现明显的剂量依赖性。Cel DMSO 溶液、Cel-NSps(a) 和 Cel-NSps (b) 对 HepG2 细胞的 IC_{50} 值分别为 0.87、0.68 μg/mL（$P<0.05$，*vs* Cel DMSO 组），0.62 μg/mL [$P>0.05$，*vs* Cel-NSps(a)]；对 SK-MEL-28 细胞的 IC_{50} 值分别为 1.96、1.91、1.93 μg/mL，3 组之间无显著性差异；对 4T1 细胞的 IC_{50} 值分别为 1.29、1.02 μg/mL（$P<0.05$，*vs* Cel DMSO 组），0.84 μg/mL [$P>0.05$，*vs* Cel-NSps(a)]；对 MCF-7 细胞的 IC_{50} 值分别为 1.10、0.89 μg/mL（$P<0.05$，*vs* Cel DMSO 组），0.93 μg/mL [$P>0.05$，*vs* Cel-NSps(a)]。从 IC_{50} 值来看，Cel-NSps 的抑瘤效果优于 Cel DMSO 溶液组，这可能与纳米粒的非特异性内吞或吞噬作用内化入胞有关[37-38]。

3 讨论

微型介质研磨法是对传统介质研磨法的改良，

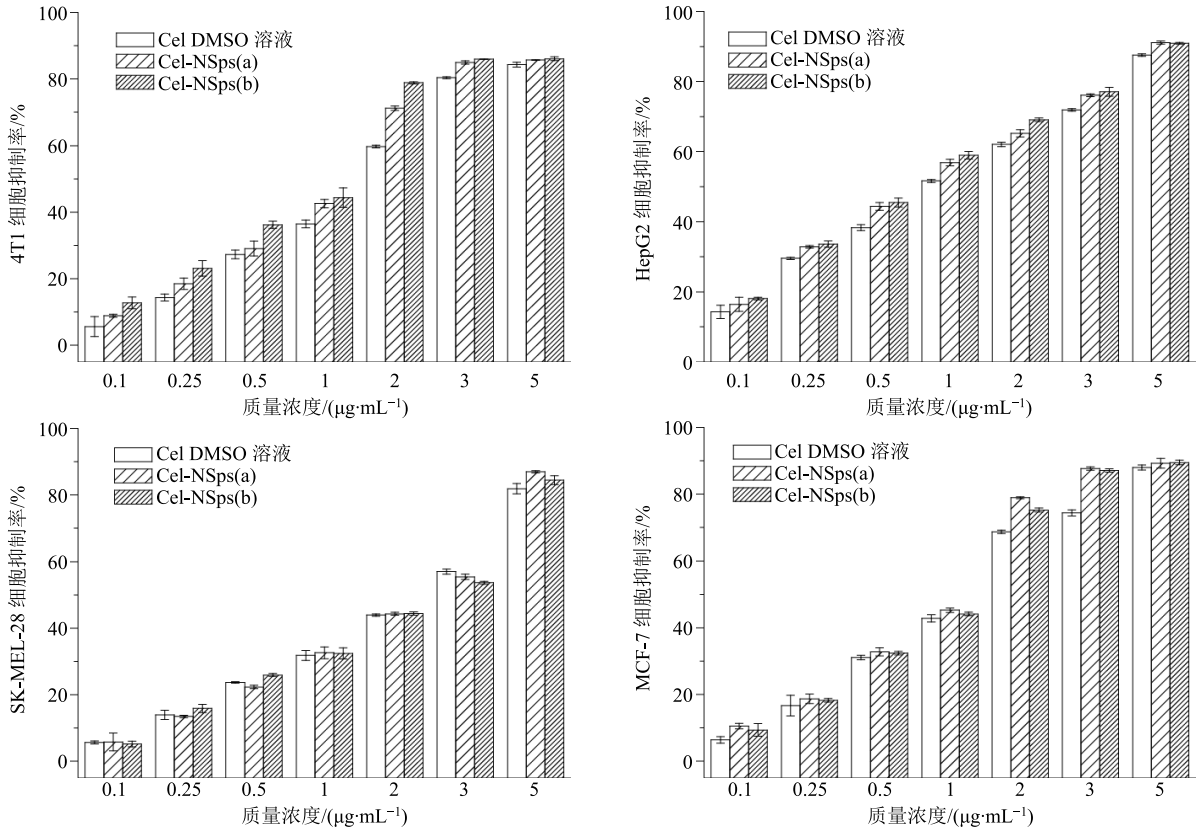

图 8 Cel-NSps 对 4T1、HepG2、SK-MEL-28 和 MCF-7 的 48 h 细胞生长抑制率（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Fig. 8 Proliferation inhibition of Cel-NSps against 4T1, HepG2, SK-MEL-28 and MCF-7 cells after 48 h of incubation ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

所需原料药较少，更适合前期在实验室的制剂处方及工艺研究。此外，该方法可以大大提高药物的活性，操作简单，工艺稳定，且无需使用有机溶剂，避免了有机溶剂残留造成的环境污染和机体毒性，但是该方法制备的纳米粒稳定性较差[2]。沉淀法是基于“bottom-up”原理制备纳米粒，控制结晶结构是技术关键，该方法操作简单，易于工业化大生产，但是制备过程中需使用有机溶剂。这 2 种方法是制备 NSps 常用的方法，几乎适用于所有难溶性药物。

药物晶型可能影响药物的释放、药效和安全性，研究者应关注制备过程中药物晶型的改变，一般来说介质研磨法可以保持药物原有的晶型，而沉淀法容易造成药物晶型的转变[39]。与目前研究较广泛的纳米载体药物相比，NSps 具有更高的载药量，更适合大剂量给药；处方组成简单，避免了大量附加剂对人体的毒副作用[40]。综上，将难溶性药物制成 NSps 不仅可以提高其溶解度和生物利用度，降低给药剂量和减少毒副作用等优点，还可以通过表面修饰，实现靶向给药，有较大的开发前景。

2 种方法制备的 Cel-NSps，药物、辅料、药载比都相同，因制备方法不同，导致纳米粒在生理介质中的粒径变化和药物在纳米粒中的存在形式不同。难溶性药物的纳米粒在生理介质中的粒径，有时和在纯水中相近，有时会比在纯水中略大，有时粒径会增大很多甚至出现聚集沉淀。这种变化与药物本身的性质、辅料性质、纳米组装方式，纳米粒的电位、水化层和表面性质，以及生理介质的离子强度都有关系，迄今尚无形成一套理论能够解释不同药物不同辅料的纳米粒在生理介质中的粒径变化。介质研磨法制备的纳米粒粒径偏大，在人工胃液中粒径增大较多；沉淀法制备的纳米粒粒径较小，在各种不同介质中均较稳定。这可能是由于沉淀法制备的纳米粒呈球形，制备过程中稳定剂 P188 能更加均匀地覆盖在纳米粒表面；而研磨法制备的纳米粒形状不规则，稳定剂吸附不如沉淀法。介质研磨法通常不改变药物的晶型，Cel 依然是以结晶状态存在；而反溶剂沉淀法的制备过程中，药物溶解成小分子后再自组装成纳米大小的颗粒，有时会保持原来的结晶形式，有时会形成能量更高的无定形态，而本研究中，Cel 用反溶剂沉淀法制备的纳米粒为无定形状态。

药物存在形式的不同，导致体外释放上的不同。在完全相同的条件下，微量介质研磨法制备的 Cel-NSps(a)，在 144 h 内呈匀速、平稳、缓慢的释放；而反溶剂沉淀法制备的 Cel-NSps(b)，因无定形态处于亚稳定的高能状态，故先经历 1 个为期 48 h 的快速释放相，然后是接近坪值的非常缓慢的慢释放相。但 2 种纳米粒的体外累积释放都远远超过 Cel 的物理混悬液。体外细胞毒性实验为下一步体内药效考察建立动物模型提供了参考依据，从 MTT 实验结果来看，Cel 纳米粒对 4 种细胞的 IC_{50} 值都较小，其中 HepG2 细胞对 Cel 最为敏感，其次是 4T1 细胞和 MCF-7 细胞，因此在后续体内药效学考察时，拟建立肝癌模型或乳腺癌动物模型。

综上所述，本研究通过微型介质研磨法和反溶剂沉淀法制备了粒径小、稳定性好、载药量高、可用于口服或静脉注射的 Cel-NSps，且制备方法简单，易于工业化大生产，有望成为继紫杉醇之后的新一代天然抗肿瘤药物[41]。

参考文献

[1] Shi Y, Porter W, Merdan T, *et al*. Recent advances in intravenous delivery of poorly water-soluble compounds [J]. *Expert Opin Drug Del*, 2009, 6(12): 1261-1282.

[2] 郑爱萍, 石　靖. 纳米晶体药物研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2012, 39(3): 177-183.

[3] 高彩芳, 夏加璇, 朱　颖, 等. 纳米技术在改善中药有效成分成药性中的应用 [J]. 中草药, 2018, 49(12): 2754-2762.

[4] Shegokar R, Müller R H. Nanocrystals: Industrially feasible multifunctional formulation technology for poorly soluble actives [J]. *Int J Pharm*, 2010, 399(1/2): 129-139.

[5] 马　静, 王晓青, 李　翔, 等. 药物纳米晶体混悬液的给药途径的研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2012, 47(24): 1965-1970.

[6] 唐海龙, 李小芳, 龙家英, 等. 以甘草酸为稳定剂制备水飞蓟素纳米混悬剂及稳定机制研究 [J]. 中草药, 2020, 51(4): 971-977.

[7] 刘营营, 肖　瑶, 苏文晶, 等. 高载药量甘草次酸纳米混悬剂的制备及其大鼠体内药动学研究 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(1): 74-79.

[8] 代孟孟, 张元元, 王绍花, 等. 纳米晶体药物制备技术的研究进展 [J]. 中国粉体技术, 2019, 25(5): 56-62.

[9] 田　振, 张碧华, 杨莉萍. 雷公藤临床应用的古今沿革 [J]. 临床药物治疗杂志, 2019, 17(5): 19-23.

[10] 张国瑞. 雷公藤红素衍生物的合成及其抗肿瘤活性研究 [D]. 延吉: 延边大学, 2018.

[11] 钟　点, 陈　渊, 赵　伟. 雷公藤红素抗炎及免疫抑制的研究进展 [J]. 药物生物技术, 2018, 25(1): 64-69.

[12] Dharambir K, Ajay S, Singh T H, *et al*. Molecular targets of celastrol in cancer: Recent trends and advancements [J]. *Crit Rev Oncol Hem*, 2018, 128: 70-81.

[13] 郭梦菲, 瞿 鼎, 王理想, 等. 转铁蛋白/叶酸双重修饰的薏苡仁油-雷公藤红素微乳制备及其体外靶向抗肿瘤研究 [J]. 中草药, 2017, 48(9): 1748-1756.

[14] 赵 丹, 张宏岐, 喻玲玲, 等. 雷公藤红素体外抗自由基活性研究 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(1): 43-50.

[15] 胡维岳. 雷公藤红素对大鼠肥胖的治疗作用及机制研究 [D]. 南京: 南京医科大学, 2018.

[16] Chellappa K, Perron I J, Naidoo N, *et al*. The leptin sensitizer celastrol reduces age-associated obesity and modulates behavioral rhythms [J]. *Aging Cell*, 2019, 18(3): e12874.

[17] Zhao N, Wang H, Mu C, *et al*. Celastrol inhibits growth and increases apoptosis of human lung cancer A549 cells [J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2018, 34(12): 1111-1115.

[18] 罗晓霞, 石红梅, 肖 兵. 雷公藤红素对肝癌细胞株 HepG2 的影响及作用机制 [J]. 广东医学, 2016, 37(17): 2563-2565.

[19] 谢闺娥, 杜晶春, 徐 霞. 雷公藤红素对阿霉素耐药乳腺癌细胞生长的抑制作用研究 [J]. 广州医药, 2017, 48(4): 42-45.

[20] 秦 越, 王理想, 郭梦菲, 等. 雷公藤红素/丹参酮 II_A 磺酸钠共传递脂质体的制备、表征及协同抗乳腺癌研究 [J]. 中草药, 2018, 49(22): 5271-5279.

[21] 陈艳阳, 欧云生, 陶 勇, 等. 雷公藤红素通过内质网应激相关通路促进人骨肉瘤 HOS 细胞凋亡 [J]. 肿瘤, 2017, 37(9): 901-908.

[22] 李 珂, 张蕴莉, 苏荣健, 等. 雷公藤红素对胃癌细胞增殖及有氧糖酵解的影响 [J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2019, 40(4): 658-663.

[23] 杨 京, 张晓玲, 马世平. 雷公藤红素抗白血病作用研究进展 [J]. 药学与临床研究, 2016, 24(3): 248-252.

[24] Zhou Y, Li W, Wang M, *et al*. Competitive profiling of celastrol targets in human cervical cancer HeLa cells via quantitative chemical proteomics [J]. *Mol BioSyst*, 2017, 13(1): 83-91.

[25] Xiao Y, Liu J, Guo M, *et al*. Synergistic combination chemotherapy of carrier-free celastrol and doxorubicin nanocrystals for overcoming drug resistance [J]. *Nanoscale*, 2018, 10(26): 12639-12649.

[26] Shao-Ru C, Yan D, Jing Z, *et al*. A mechanistic overview of triptolide and celastrol, natural products from *Tripterygium wilfordii* Hook. F. [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 104-117.

[27] 吴 珏, 刘志宏, 林 兵, 等. 雷公藤固体分散体大鼠在体肠吸收研究 [J]. 中草药, 2019, 50(2): 203-211.

[28] 陈欣妍, 李 歆, 王皓南, 等. 雷公藤红素长循环脂质体的制备和体外性质初步研究 [J]. 中国新药杂志, 2019, 28(4): 105-111.

[29] 黄萌萌, 李 萍, 刘玉萍, 等. 雷公藤红素-薏苡仁组分微乳的制备及其体内抗肺癌药效研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2017, 19(11): 1801-1808.

[30] Soe Z C, Thapa R K, Ou W, *et al*. Folate receptor-mediated celastrol and irinotecan combination delivery using liposomes for effective chemotherapy [J]. *Coll Surf B*, 2018, 170: 718-728.

[31] 张明珠, 李怡静, 苏文晶, 等. 雷公藤红素纳米混悬剂的制备及其抗肿瘤作用研究 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(10): 1528-1534.

[32] 胡 倩. 聚乙二醇-聚己内酯（mPEG-PCL）的血液相容性研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2016.

[33] 申宝德, 连王权, 沈成英, 等. 微型化介质研磨法制备难溶性黄酮类化合物纳米混悬剂 [J]. 中草药, 2017, 48(21): 4413-4418.

[34] Hong J Y, Li Y, Xiao Y, *et al*. Annonaceous acetogenins (ACGs) nanosuspensions based on a self-assembly stabilizer and the significantly improved anti-tumor efficacy [J]. *Colloids Surf B*, 2016, 145: 319-327.

[35] 胡绍英, 张振海, 蒋艳荣, 等. 基于 HPMC-硬脂酸的雷公藤红素缓释固体分散体的研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(20): 3052-3055.

[36] 袁 菱, 周 蕾, 陈 彦, 等. 雷公藤红素纳米结构脂质载体的制备及其体外透皮研究 [J]. 中草药, 2012, 43(8): 1514-1518.

[37] 李怡静, 敖 惠, 李好文, 等. 西瑞香素纳米混悬剂的制备及其体外抗肿瘤作用研究 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(2): 231-237.

[38] Dong F, Dong X, Zhou L, *et al*. Doxorubicin-loaded biodegradable self-assembly zein nanoparticle and its anti-cancer effect: Preparation, *in vitro* evaluation, and cellular uptake [J]. *Coll Surf B*, 2016, 140: 324-331.

[39] 王绍花, 牛余珍, 张元元, 等. 纳米混悬技术提高中药难溶性成分溶解度的研究进展 [J]. 山东中医杂志, 2018, 37(7): 619-622.

[40] Müller R H, Gohla S, Keckacd C M. State of the art of nanocrystals-Special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery [J]. *Eur J Pharm*, 2011, 78(1): 1-9.

[41] 袁 菱, 童德银. 雷公藤红素及其制剂的抗肿瘤研究进展 [J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(14): 1224-1229.