

• 药剂与工艺 •

聚多巴胺修饰的载榄香烯介孔二氧化硅纳米粒的制备及其靶向抗肿瘤活性研究

盛晓丹^{1,3}, 刘臻², 罗砚曦³, 王鑫², 许梦姣³, 阎辉^{3*}, 谢恬^{1,2,4,5,6*}

1. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 511400
2. 杭州师范大学医学院, 浙江 杭州 311121
3. 杭州医学院黄龙科教中心, 浙江 杭州 310013
4. 浙江省榄香烯类抗癌研究重点实验室, 浙江 杭州 311121
5. 浙产中药材资源开发与应用浙江省工程实验室, 浙江 杭州 311121
6. 浙八味等浙产中药材综合利用开发协同创新中心, 浙江 杭州 311121

摘要: 目的 制备聚多巴胺(PDA)修饰的载榄香烯(ELE)介孔二氧化硅纳米粒(D/MSN-ELE), 并对其处方工艺优化、质量评价、体外释放、体外抗肿瘤活性及促进细胞凋亡能力研究。方法 通过溶液吸附法制备载榄香烯介孔二氧化硅纳米粒(MSN-ELE), 聚合法制备聚多巴胺修饰的介孔二氧化硅纳米粒(D/MSN)和 D/MSN-ELE, 应用透射电子显微镜表征不同纳米粒的形态, 热重分析计算 PDA 接枝率, HPLC 法评价 D/MSN-ELE 载药量和包封率, 透析袋法考察 D/MSN-ELE 的体外释放特性。采用 MTT 染色法, 分析不同纳米粒对人胚胎成纤维 HELF 细胞和人非小细胞肺癌 A549 细胞的细胞毒性。采用流式细胞仪检测 D/MSN-ELE 活性氧水平和线粒体膜电位水平。结果 最优制备工艺为药物与载体比例 6:1, 温度为 50 °C, 时间为 8 h, 此工艺条件下制备的 D/MSN-ELE 分布均一, 粒径为 (288.70±3.88) nm。其平均载药量和包封率分别为 (11.58±0.73) %和 (59.82±0.57) %。体外释药具有 pH 值响应性, 累积释药量随 pH 值减小而增大。ELE、MSN-ELE 和 D/MSN-ELE 对 A549 细胞的半数抑制浓度分别为 91.29、27.56、6.02 μg/mL。活性氧及线粒体膜电位检测结果进一步表明 D/MSN-ELE 能促进肿瘤细胞凋亡。结论 优选工艺下的 D/MSN-ELE 具有较高的药物载药量、pH 值响应性药物释放和大幅增强的抗肿瘤活性及促进细胞凋亡能力, 为基于 MSN 的 ELE 药物靶向递送提供了进一步的实验基础。

关键词: 介孔二氧化硅; 榄香烯; 纳米粒; pH 响应敏感; 肿瘤靶向递送; 抗肿瘤活性; 质量评价; 体外释放; 细胞凋亡; 溶液吸附法; 聚合法; 热重分析; 接枝率; HPLC; 人胚胎成纤维 HELF 细胞; 人非小细胞肺癌 A549 细胞; 线粒体膜电位

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)10-2745-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.10.016

Preparation of elemene-loaded mesoporous silica nanoparticles and its targeted anti-tumor activity

SHENG Xiao-dan^{1,3}, LIU Zhen², LUO Yan-xi³, WANG Xin², XU Meng-jiao³, YAN Hui³, XIE Tian^{1,2,4,5,6}

1. School of Chinese Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 511400, China
2. School of Medicine, Hangzhou Normal University, Hangzhou 311121, China
3. Huanglong Science and Education Center, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310013, China
4. Key Laboratory of Elemene Class Anti-cancer Chinese Medicine of Zhejiang Province, Hangzhou 311121, China

收稿日期: 2020-02-22

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (81730108); 国家自然科学基金面上项目 (81973635); 浙江省重大科技专项项目 (2015C03055); 杭州市重大科研项目 (20162013A07); 杭州市重大科研项目 (20142013A63)

作者简介: 盛晓丹 (1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药提取分离技术与应用。

Tel: (0571)88215439 E-mail: shengxiaodan4322@126.com

*通信作者 阎辉 (1958—), 男, 研究员, 硕士生导师, 主要研究方向为肿瘤学和病毒学。

Tel/Fax: (0571)88215439 E-mail: yanhui@zjams.com.cn

谢恬 (1961—), 男, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为药物新剂型。Tel/Fax: (0571)28860237 E-mail: xbs@dljg.sina.net

5. Engineering Laboratory of Development and Application of Traditional Chinese Medicine from Zhejiang Province, Hangzhou 311121, China

6. Collaborative Innovation Center of Traditional Chinese Medicines from Zhejiang Province, Hangzhou 311121, China

Abstract: Objective To prepare polydopamine-modified elemene-loaded mesoporous silica nanoparticles (D/MSN-ELE), and conduct research on formulation process optimization, quality evaluation, *in vitro* release, *in vitro* antitumor activity, and ability to promote apoptosis. **Methods** Elemene-loaded mesoporous silica nanoparticles (MSN-ELE) were prepared by solution adsorption method, D/MSN-ELE and polydopamine-modified mesoporous silica nanoparticles (D/MSN) were prepared by polymerization. The morphology of the nanoparticles was characterized by transmission electron microscopy. The PDA graft ratio was calculated by thermogravimetric analysis. The loading and encapsulation efficiency of D/MSN-ELE were evaluated using HPLC, the dialysis bag method was used to investigate the release characteristics *in vitro* of D/MSN-ELE. MTT staining was used to analyze the cytotoxicity of different nanoparticles on HELF and A549 cells. Flow cytometry was used to detect the levels of D/MSN-ELE reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential. **Results** The optimal preparation process was the drug loading ratio of 6 : 1, the temperature was 50 °C, and the time was 8 h. The D/MSN-ELE prepare under the process condition have a were uniform distribution with a particle size of (288.70 ± 3.88) nm. The average drug loading and encapsulation efficiency were $(11.58 \pm 0.73)\%$ and $(59.82 \pm 0.57)\%$, respectively. *In vitro* drug release was pH-responsive, and cumulative drug release increased with decreasing pH. The half-lethal concentrations of ELE, MSN-ELE and D/MSN-ELE on A549 cells were 91.29, 27.56 and 6.02 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The detection results of reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential further indicated that drug-loaded nanoparticles were able to promote tumor target cell apoptosis. **Conclusion** D/MSN-ELE under the optimized process has a higher drug loading, pH-responsive drug release and greatly enhanced antitumor activity. This study provides further experiments basis for tumor-targeted delivery of elemene drugs based on mesoporous silica nanoparticles.

Key words: mesoporous silica; elemene; nanoparticles; pH-responsive; tumor-targeted delivery; antitumor activity; quality evaluation; *in vitro* release; apoptosis; solution adsorption method; polymerization method; thermogravimetric analysis; grafting rate; HPLC; human embryonic fibroblast HELF cells; human lung cancer A549 cells; mitochondrial membrane potential

榄香烯 (elemene, ELE) 是从浙八味温郁金 *Curcuma zenyujin* Y. H. Chen et C. Ling 中提取获得的倍半萜烯类化合物, 主要成分为 β -榄香烯, 具有良好的抗肿瘤活性^[1-2]。榄香烯乳注射液由本课题组自主研发, 作为国家二类抗肿瘤新药于 1994 年上市^[3]。目前, 榄香烯主要剂型为脂质体、乳状注射液、口服乳等^[4-5], 一定程度上提高了药物的安全性和治疗效率, 但仍存在药物用量较大、注射液对静脉刺激、口服生物利用度较低等问题^[6]。

介孔二氧化硅纳米^[7-10] (mesoporous silica nanoparticles, MSN) 材料是一种新型无机材料, 具有较大的比表面积和孔容积, 载药量较脂质体、胶束等纳米载体高, 表面富含硅羟基易于修饰^[11]。具有环境响应性 (包括光敏、温敏和 pH 敏感等) 的 MSN 可以通过病灶微环境刺激药物载体而实现药物靶向释放, 考虑到肿瘤部位的酸性 (pH 5.5~6.5) 比正常组织 (pH 7.4) 强^[12], 构建 ELE pH 响应递药系统对于提高药物肿瘤靶向性具有重要意义。

聚多巴胺 (PDA) 是多巴胺氧化自聚合形成无毒、可降解的 pH 敏感材料^[13]。本研究采用吸附法和聚合法制备聚多巴胺修饰的载榄香烯介孔二氧化

硅纳米粒 (D/MSN-ELE), 通过 HPLC 法测定纳米粒的包封率和载药量, 以载药量和包封率为指标对 D/MSN-ELE 进行处方优化, 并对最优条件下制备的纳米粒进行理化性质、体外释药特性和体外抗肿瘤活性的评价, 为基于 MSN 的 ELE 药物肿瘤靶向递送提供进一步研究的实验基础。

1 仪器与材料

榄香烯 (含 β -榄香烯 >98%), 批号 20190102, 大连华立金港药业有限公司; β -榄香烯对照品, 质量分数 99.4%, 北京仪化通标科技有限公司, 批号 100268-200401; 盐酸多巴胺 (批号 G1826025)、二甲基亚砜 (DMSO), 阿拉丁公司, 批号 WXBC7821V; 活性氧检测试剂盒 (批号 050719190605)、线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1, 批号 040319190715), 上海碧云天生物技术有限公司; MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒, 凯基生物有限公司, 批号 KGA312; 单分散介孔二氧化硅纳米微球, 星状, 先丰纳米材料科技有限公司, 批号 66328381; 三羟甲基氨基甲烷 (Tris), 上海思吉生物制品有限公司, 批号 110211; RPMI 1640 培养基, 天津灏洋华科生物科技有限公司。人非小细胞

肺癌 A549 细胞、人胚胎成纤维 HELF 细胞、去离子水均由浙江省医学科学院提供。Synergy TM2 酶标仪, 美国 BIO-TEK 仪器公司; LC-2010AHT 高效液相色谱仪, 日本 Shimadzu 公司; Zetasizer Nano-ZS90 粒径电位测定仪, 英国 Malvern 公司; 85-2 恒温磁力加热搅拌器, 常州翔天实验仪器厂; 高内涵细胞成像分析仪 (Image Xpress Micro), 美谷分子仪器 (上海) 有限公司; BD FACS Calibur 流式细胞仪, 美国 Beckman 公司; FEI Tecnai G2 F20 S-TWIN 透射电子显微镜 (TEM), 美国 FEI 公司; AJ30I 超速低温离心机, 美国 Beckman 公司; P225D 电子天平, 北京赛多利斯科学仪器有限公司; MD44-5M 透析袋 (MYM), 截留相对分子质量 300 000; UV1902PC 紫外/可见分光光度计、E5 紫外分光光度计, 上海悦析仪器科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 ELE 含量测定

2.1.1 色谱条件^[14-15] 岛津 C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水 (90:10), 柱温 40 °C, 检测波长为 210 nm, 体积流量为 1.0 mL/min, 进样体积为 5 μL。

2.1.2 溶液的配制 精密称取 β-榄香烯对照品 2 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 甲醇定容, 得到 20 μg/mL 的 β-榄香烯对照品溶液。

精密称取 D/MSN-ELE 1 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 0.45 μm 的微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

另取空白 MSN 按供试品溶液配制方法制备空白溶液。

2.1.3 专属性试验 精确量取上述 3 种不同溶液各 200 μL, 按照“2.1.1”项下色谱条件, 进行检测, 记录色谱图, 结果见图 1, 供试品溶液在对照品对应位置有谱峰, ELE 的保留时间约为 16 min, 空

白溶液无干扰, 样品中其他成分不影响测定, 峰形良好。

2.1.4 线性关系考察 精密称取 β-榄香烯对照品 100 mg, 加甲醇溶解摇匀后配成含 β-榄香烯 200 μg/mL 对照品溶液。分别用甲醇稀释成含 β-榄香烯 1.0、5.0、20.0、100.0 μg/mL 的不同浓度梯度溶液。按“2.1.1”项色谱条件, 每次进样 5 μL。以对照品峰面积为纵坐标 (Y), 对照品质量浓度 (C) 为横坐标, 建立回归方程, 标准曲线方程为 $Y=5\ 226.5X+1\ 830.1$, $r^2=0.999\ 9$, 结果表明 β-榄香烯在质量浓度为 1~100 μg/mL 时线性关系良好。

2.1.5 精密度试验 取“2.1.4”项下制备的 5 μg/mL β-榄香烯对照品溶液, 连续进样 6 次, 记录 HPLC 图谱中 β-榄香烯的峰面积, 计算其 RSD 为 1.2%, 说明该方法精密度良好。

2.1.6 重复性试验 取同一批制备的 D/MSN-ELE 6 份, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 进样测定峰面积, 计算 D/MSN-ELE 中 β-榄香烯质量分数的 RSD 为 0.51%, 说明重复性良好。

2.1.7 加样回收率试验 精密称取已知质量分数的 D/MSN-ELE 样品 8.6 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 平行操作 9 份, 分别精密加入相当于 0.5、1.0、1.5 mg β-榄香烯的对照品溶液, 各 3 份, 加甲醇稀释至刻度, 超声混匀, 制得含低、中、高质量浓度 β-榄香烯的供试品溶液, 用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过后加入到样品瓶里, 按照“2.1.1”项下色谱条件测定其峰面积。计算低、中、高不同质量浓度的平均回收率分别为 99.5%、99.6%、101.7%, RSD 依次为 1.33%、0.80%、1.37%, 表明方法准确度高。

2.2 纳米粒的制备

2.2.1 载榄香烯介孔二氧化硅纳米粒 (MSN-ELE) 的制备 采用物理吸附法制备^[16]。精密称取处方量的 MSN 粉末, 加至 60 mg/mL ELE 乙醇溶液 20 mL 中, 一定温度下, 300 r/min 磁力搅拌数小时, 10 000 r/min 离心 3 min, 除去游离 ELE, 无水乙醇洗涤数次, 离心, 即得 MSN-ELE。

2.2.2 聚多巴胺修饰的介孔二氧化硅纳米粒 (D/MSN) 和 D/MSN-ELE 的制备 按照文献报道采用聚合法制备^[17]。精密称取 MSN、MSN-ELE 各 50 mg 于 100 mL 烧杯中, 加入 10 mL 去离子水, 超声分散。30 °C 条件下, 磁力搅拌 0.5 h, 加入 0.01 g 多巴胺盐酸盐和 1 mg Tris 碱反应 2 h。反应结束后, 10 000 r/min 离心 3 min, 去离子水洗涤数次,

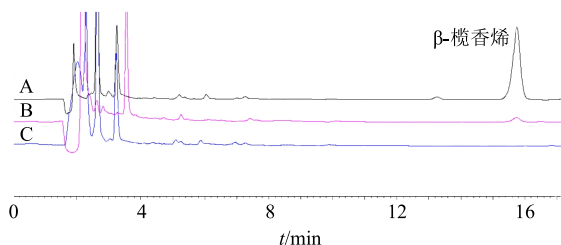


图 1 榄香烯对照品溶液 (A)、供试品溶液 (B) 和空白溶液 (C) 专属性试验 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chart of elemene reference solution (A), test solution (B) and blank solution (C) in specific test

离心, 于 30 ℃ 烘箱中烘干备用, 即得 D/MSN 和 D/MSN-ELE。

2.3 D/MSN-ELE 的处方工艺优化

2.3.1 D/MSN-ELE 载药量和包封率计算 精密称取 D/MSN-ELE 4 mg, 加入 10 mL 乙腈, 超声处理加速溶解, 吸取上述溶液 80 μ L, 置 1 mL 量瓶中, 用乙腈稀释至刻度, 摇匀, 过 0.45 μ m 的微孔滤膜。按“2.1.1”项下色谱条件进样。

载药量 = 纳米粒中 ELE 的质量 / 纳米粒的质量

包封率 = 纳米粒中 ELE 的质量 / ELE 总投药量

2.3.2 药物与载体比例优化 精密称取 MSN 粉末 400、300、200、150 mg, 分别加至 60 mg/mL ELE 乙醇溶液 20 mL 中, 按照“2.2.2”项中所述方法制备 D/MSN-ELE。高效液相测定法测量 D/MSN-ELE 的载药量和包封率, 平行 3 次。载药量及包封率情况见表 1。实验结果显示药物与载体比例 6 : 1 制备的 D/MSN-ELE 载药量与包封率较高。故选择药物与载体比例为 6 : 1 进行后续优化。

2.3.3 制备温度优化 选取温度为 30、40、50、60 ℃, 按照“2.1”项中所述方法制备 D/MSN-ELE。高效液相测定法测量 D/MSN-ELE 的载药量和包封率, 平行 3 次。载药量及包封率情况见表 2。实验结果显示 D/MSN-ELE 的载药量与包封率受温度影响, 考虑到纳米粒团聚随温度升高而增加, 故选择温度为 50 ℃。

表 1 药物与载体比例对 D/MSN-ELE 载药量与包封率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of drug to carrier ratio on drug loading and encapsulation efficiency of D/MSN-ELE ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

药物与载体比例	载药量/%	包封率/%
3 : 1	6.51 $\pm$ 0.12	38.02 $\pm$ 0.79
4 : 1	7.33 $\pm$ 0.27	37.14 $\pm$ 1.43
6 : 1	7.37 $\pm$ 0.18	59.25 $\pm$ 0.73
8 : 1	7.71 $\pm$ 0.32	10.11 $\pm$ 1.25

表 2 制备温度对 D/MSN-ELE 载药量与包封率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of temperature on drug loading and encapsulation efficiency of D/MSN-ELE ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

制备温度/℃	载药量/%	包封率/%
30	9.09 $\pm$ 0.30	25.12 $\pm$ 0.87
40	9.52 $\pm$ 0.19	19.34 $\pm$ 0.35
50	10.57 $\pm$ 0.21	62.51 $\pm$ 0.44
60	11.03 $\pm$ 1.33	63.40 $\pm$ 1.79

2.3.4 搅拌时间优化 选取搅拌时间为 4、6、8、12 h, 按照“2.1”项中所述方法制备 D/MSN-ELE。高效液相测定法测量 D/MSN-ELE 的载药量和包封率, 平行 3 次。结果见表 3, 考虑到搅拌时间对仪器的损耗以及后续制备所需的时间, 选取搅拌时间为 8 h。

表 3 搅拌时间对 D/MSN-ELE 载药量与包封率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of mixing time on drug loading and encapsulation efficiency of D/MSN-ELE ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

搅拌时间/h	载药量/%	包封率/%
4	10.17 $\pm$ 0.13	16.92 $\pm$ 1.98
6	10.85 $\pm$ 0.87	42.36 $\pm$ 0.30
8	11.26 $\pm$ 0.94	65.52 $\pm$ 0.77
12	12.05 $\pm$ 2.21	53.22 $\pm$ 0.24

2.3.5 D/MSN-ELE 最佳制备工艺确定 精密称取 MSN 粉末 200 mg, 加至 60 mg/mL ELE 乙醇溶液 20 mL 中, 一定温度下, 300 r/min 磁力搅拌 8 h, 10 000 r/min 离心 3 min, 除去游离 ELE, 无水乙醇洗涤数次, 离心, 加入 40 mL 去离子水, 超声分散。30 ℃ 条件下, 磁力搅拌 0.5 h, 加入 0.04 g 多巴胺盐酸盐和 4 mg Tris 碱反应 2 h。反应结束后, 10 000 r/min 离心 3 min, 去离子水洗涤数次, 离心, 于 30 ℃ 烘箱中烘干备用, 即得 D/MSN-ELE。

2.4 验证实验

按照“2.3.5”项确定的最佳工艺平行制备 3 批 D/MSN-ELE, 测定包封率与载药量, 结果见表 4, 在优化工艺条件下制备的 D/MSN-ELE 载药量与包封率分别为 (11.58 $\pm$ 0.73) % 和 (59.82 $\pm$ 0.57) %, 说明该方法可行, 工艺的重复性良好。

2.5 纳米粒的表征

2.5.1 形态、粒径和 Zeta 电位 采用高倍 TEM 观察制备的 4 种纳米粒的形貌, MSN、D/MSN、MSN-ELE、D/MSN-ELE 形态见图 4; 室温下采用激光粒

表 4 验证实验不同批次 D/MSN-ELE 的载药量与包封率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Drug loading and encapsulation efficiency of D/MSN-ELE in different batches ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

批次	载药量/%	平均值/%	包封率/%	平均值/%
1	12.31	11.58 $\pm$ 0.73	59.27	59.82 $\pm$ 0.57
2	11.57		60.40	
3	10.85		59.80	

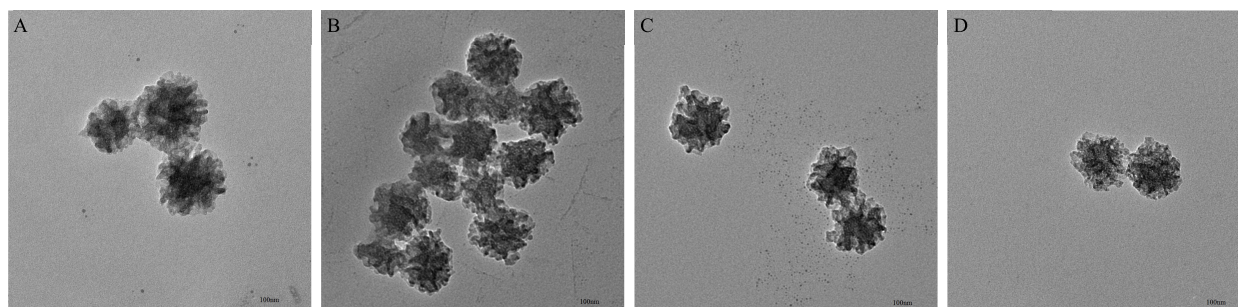


图 4 MSN (A)、D/MSN (B)、MSN-ELE (C) 和 D/MSN-ELE (D) 的 TEM 图

Fig. 4 TEM images of MSN (A), D/MSN (B), MSN-ELE (C) and D/MSN-ELE (D)

度仪测定各纳米粒的粒径、粒径分布、Zeta 电位及多分散指数 (PDI), 结果见图 5 和表 5。TEM 观察样品外观后显示, D/MSN-ELE 形貌呈类球形, 粒径约 100 nm, 分散均匀, 无明显团聚现象。图 4-B 图可见, D/MSN 粒子表面光滑且具有“壳”层, 即为修饰在 MSN 表面的 PDA 层。C 图可见 MSN-ELE 内部实心, 表明药物已成功装载。

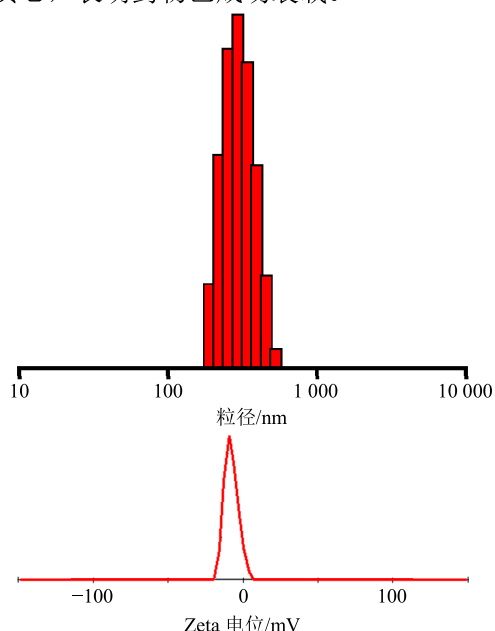


图 5 D/MSN-ELE 的粒径分布 (A) 与 Zeta 电位图 (B)

Fig. 5 Particle size (A) and Zeta potential picture (B) of D/MSN-ELE

表 5 不同纳米粒的平均粒径与 Zeta 电位 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 5 Particle size and Zeta potential of different nanoparticles ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品	平均粒径/nm	Zeta 电位/mV	PDI
MSN	268.5 ± 8.41	2.26 ± 0.82	0.231 ± 0.022
D/MSN	282.2 ± 3.18	-3.02 ± 1.18	0.293 ± 0.041
MSN-ELE	270.4 ± 2.91	-7.10 ± 1.48	0.247 ± 0.055
D/MSN-ELE	288.7 ± 3.88	-20.87 ± 0.46	0.236 ± 0.022

由表 5 可知, D/MSN-ELE 的平均粒径为 (288.70 ± 3.88) nm, PDI 为 (0.236 ± 0.022) , Zeta 电位为 (-20.87 ± 0.46) mV ($n=3$)。MSN-ELE 粒径大小与 MSN 接近, 表明药物对材料粒径影响不大。D/MSN 粒径大小比 MSN 略大, 说明 PDA 层影响介孔材料的粒径。MSN 经 PDA 修饰后 Zeta 电位发生翻转, 由正值变为负值。

分析粒径结果发现激光粒度仪测定的粒径略大于透射电镜。由于 MSN 比表面积较大, 因此纳米粒间存在较大的相互作用力, 主要包括范德华力、库仑力和分子间作用力等。由于力的相互作用, 纳米粒形成凝聚体和复聚体。TEM 可以直观看到纳米粒的外貌和粒径大小, 因此可以客观评价纳米粒的大小。而激光粒度仪测得的是纳米粒团聚体的粒径大小, 尽管采取了消除团聚的手段, 但团聚依然存在, 所以测试的结果偏大^[18]。

2.5.2 紫外光谱分析 分别精密称取 ELE、MSN、D/MSN、MSN-ELE 和 D/MSN-ELE 各 2 mg, 用甲醇分别配成 25 μ g/mL 溶液, 参比溶液为甲醇, 分别进行紫外光谱分析, 波长范围为 200~400 nm。由图 6 可知, 在 204 nm 处 ELE 有最大吸收峰, MSN-

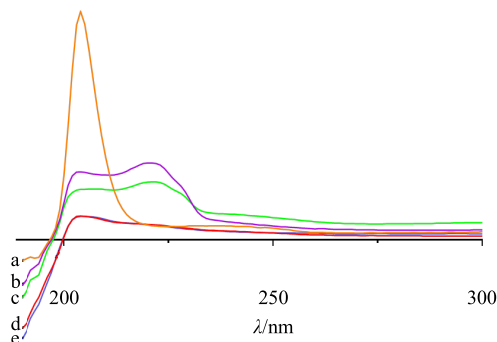


图 6 ELE (a)、MSN (b)、D/MSN (c)、MSN-ELE (d) 和 D/MSN-ELE (e) 的紫外光谱图

Fig. 6 UV spectra of ELE (a), MSN (b), D/MSN (c), MSN-ELE (d) and D/MSN-ELE UV (e)

ELE 和 D/MSN-ELE 纳米粒在此波长下有相应的特征吸收峰,空白载体材料杂质峰不明显,不干扰 ELE 测定,专属性良好。

2.5.3 红外光谱分析 各样品采用溴化钾压片法进行傅里叶变换红外光谱 (Fourier-transform infrared, FTIR) 定性分析。分别扫描记录 MSN、D/MSN、MSN-ELE 和 D/MSN-ELE 的 FTIR 谱图,波数范围为 $4\ 000\sim 400\text{ cm}^{-1}$,结果见图 7。结果显示,4 种纳米粒均出现了 MSN 的特征吸收峰: $1\ 080$ 、 791 cm^{-1} 处为 Si-O-Si 的不对称和对称伸缩振动吸收峰, 458 cm^{-1} 处为 Si-O-Si 的弯曲振动吸收峰^[19]。相比 MSN 的 FTIR 谱图,D/MSN 和 D/MSN-ELE 的 FTIR 谱图上出现了苯环 ($1\ 600\sim 1\ 450\text{ cm}^{-1}$) 的微弱吸收峰^[20],可以归属于 PDA 中苯环的微弱吸收峰,证明 PDA 壳层成功覆盖在 MSN 表面。

2.5.4 热重测试 利用热重分析仪测定 PDA 的接枝率以及纳米粒的载药量,取 MSN、D/MSN、MSN-ELE 和 D/MSN-ELE 适量,温度从 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 逐渐升温至 $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。结果见图 8,MSN、D/MSN、MSN-ELE 和 D/MSN-ELE 的质量损失率分别为

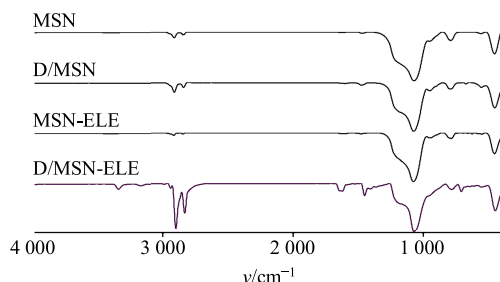


图 7 MSN、D/MSN、MSN-ELE 和 D/MSN-ELE 的 FTIR 谱图

Fig. 7 FTIR of MSN, D/MSN, MSN-ELE and D/MSN-ELE

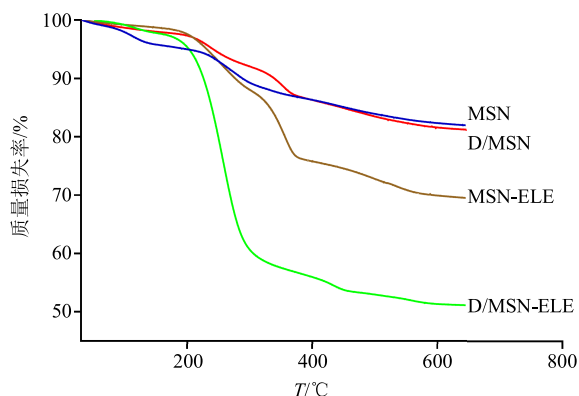


图 8 MSN、D/MSN、MSN-ELE 和 D/MSN-ELE 热重分析图谱

Fig. 8 Thermogravimetric analysis spectra of MSN, D/MSN, MSN-ELE and D/MSN-ELE

(18.04 ± 0.13)%、(18.77 ± 0.19)%、(30.49 ± 0.23)%、(48.87 ± 0.045)% ($n=3$)。可以得出 D/MSN-ELE 的载药量为 (12.44 ± 0.20)%,测定结果与 HPLC 法测定结果接近,PDA 的接枝率为 (0.73 ± 0.31)%。D/MSN-ELE 质量损失可能是制备过程中 ELE 黏附在纳米粒表面,由于 PDA 与 ELE 相互作用,对介孔材料产生影响。

2.6 体外释放

用不同 pH 值的 0.5% 十二烷基硫酸钠磷酸盐缓冲液 (0.5% SDS PBS 溶液, pH 3.0、5.0、7.4、8.0) 为释放介质,考察 D/MSN-ELE 的体外释药行为。精密称取 D/MSN-ELE 5 mg,用 2 mL 乙醇溶液溶解或分散,置于已处理的透析袋内,排除气泡后密封,置于 25 mL 释放介质中,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下恒温振荡 (100 r/min)。分别于 0、1、4、6、8、12、24 h 准确取样 2 mL,并立即补加等量同温同 pH 值新鲜释放介质,样品经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过。D/MSN-ELE 在不同 pH 的含 0.5% SDS 的 PBS 溶液中药物释放曲线如图 9 所示,其中 pH 为 3.0、5.0、7.4、8.0,分别模拟了极端酸性环境、肿瘤局部微环境、正常生理环境和偏碱性环境的 pH 条件。结果表明,在 pH 7.4 释放介质中,ELE 释放速率缓慢,24 h 累积释放约 11.36%。在 pH 5.0 释放介质中,ELE 释放速率有所增加,24 h 累积释放约 14.77%,在 pH 3.0 释放介质中,ELE 24 h 累积释放约 20.07%,因 PDA 在低 pH 条件下表面氨基和邻苯二酚质子化,药物和 PDA 之间的结合力降低。因此,D/MSN-ELE 的释放曲线具有 pH 值响应性。

2.7 载药纳米粒细胞毒性研究

按照厂商的产品说明书,采用 MTT 法研究不同纳米粒对 A549 细胞的细胞毒性作用,取对数生

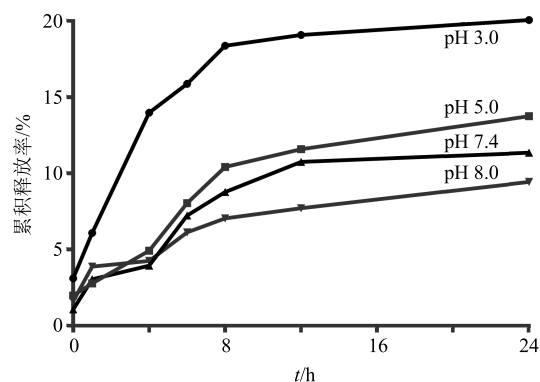


图 9 D/MSN-ELE 在不同 pH 值条件下的释放曲线

Fig. 9 Release profile at different pH value conditions of D/MSN-ELE

长期的 A549 细胞, 分别以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板。37 °C、5% CO₂ 的条件培养 24 h 后移弃培养液, 依次加入不完全培养基 (对照组)、1、5、10、15、20 $\mu\text{g/mL}$ 4 种不同纳米粒及 ELE 原料药。每组实验重复 3 次, 每个质量浓度 5 个复孔。4 周 PBS 封闭, 培养 48 h, 随后每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 50 μL , 孵育 4 h, 吸弃每孔内液, 加入 DMSO 150 μL , 避光条件下震荡 10 min。在 570 nm 波长下测定吸光度 (A) 值, 记录结果。另做一组 MSN 对 HELF 细胞的毒性作用, 浓度梯度及方法步骤同上。

采用 SPSS.22.0 软件进行 t 检验分析。

实验结果显示当 MSN 质量浓度小于 10 $\mu\text{g/mL}$ 时对正常人胚胎成纤维细胞 HELF 毒性较小, 证明低剂量空白材料 MSN 对正常人体无毒副作用, 生物安全性良好, 如图 10 所示。2 种空白纳米材料 MSN 和 D/MSN 对肿瘤细胞 A549 细胞的细胞毒性在低质量浓度时接近。当质量浓度大于 10 $\mu\text{g/mL}$ 时, D/MSN 的细胞毒性低于 MSN, 但未见统计学差异, 如图 11 所示。药物的药效与药物剂量呈正相关, 经实验可知空白 MSN 在高质量浓度下有一定的毒性作用, 图 11 表明 D/MSN 在高质量浓度下 PDA 修饰可以减弱纳米粒对人肺癌细胞 A549 的毒性作用, 因此猜测 D/MSN 可以减弱高质量浓度空白 MSN 对正常细胞的毒性作用。MSN 和 D/MSN 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 18.29、38.89 $\mu\text{g/mL}$ 。

为了排除空白 MSN 材料质量浓度对 D/MSN-ELE 细胞毒性影响, 进行不同质量浓度 MSN-ELE、D/MSN-ELE 的 MTT 实验, 如图 12 所示, 结果显

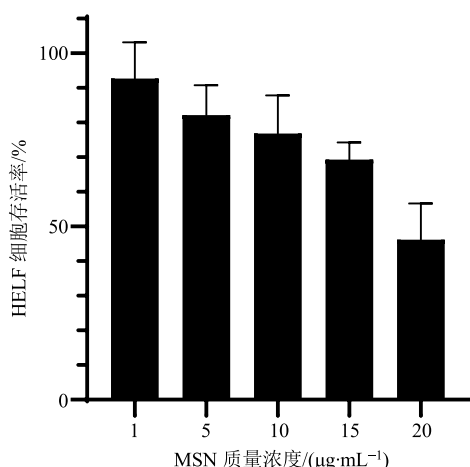


图 10 MSN 对 HELF 细胞的体外生长抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 10 *In vitro* growth inhibition effect of MSN on HELF cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

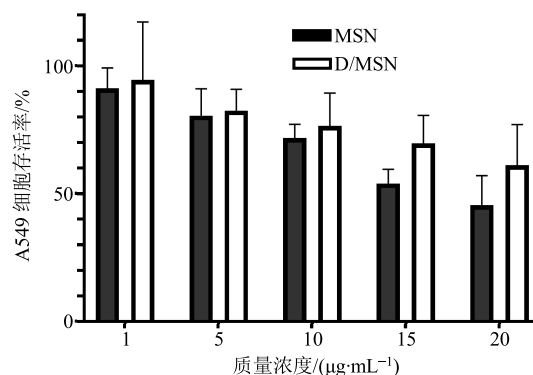


图 11 MSN 和 D/MSN 对 A549 细胞的体外生长抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 11 *In vitro* growth inhibition effect of MSN and D/MSN on A549 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

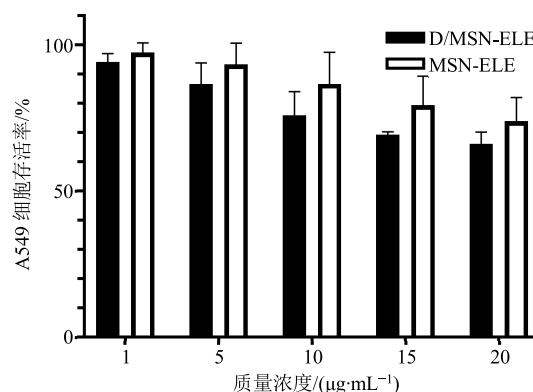


图 12 MSN-ELE、D/MSN-ELE 对 A549 细胞的体外生长抑制作用 (质量浓度为所含纳米粒质量浓度, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 12 *In vitro* growth inhibition effect of MSN-ELE and D/MSN-ELE on A549 cells (here “concentration” indicated that of nanoparticle contained, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

示当载药纳米粒质量浓度小于 20 $\mu\text{g/mL}$ 时, 空白 MSN 材料毒性对 D/MSN-ELE 影响较弱, 无统计学差异。ELE、MSN-ELE 和 D/MSN-ELE 对 A549 细胞毒性均呈现浓度依赖性, 如图 13 所示。从表 6 可知 MSN-ELE 和 D/MSN-ELE 的 IC_{50} 值分别为 27.56、6.02 $\mu\text{g/mL}$, 均小于 ELE 的 IC_{50} 值 91.29 $\mu\text{g/mL}$, PDA 修饰后, D/MSN-ELE 较 MSN-ELE 对 A549 细胞增殖的抑制效果更为显著 ($P < 0.001$), 说明 D/MSN-ELE 具有较理想的体外抗肿瘤作用。

2.8 活性氧检测

细胞内活性氧 (ROS) 作为一种参与调控细胞增殖、分化、周期等生理功能的一种活性物质, 在细胞凋亡时会引发 ROS 升高^[21]。采用流式细胞术检测 ELE、MSN-ELE 和 D/MSN-ELE 对 A549 细胞活性氧水平的影响。收集处于对数期且生长状态良好的 A549 细胞制成细胞悬液, 以 6×10^5 个/孔接种

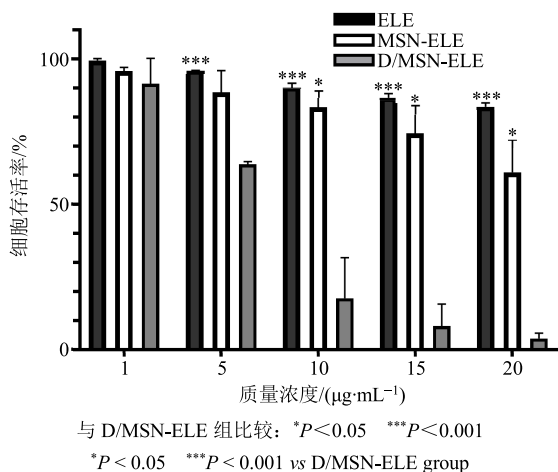


图 13 ELE、MSN-ELE、D/MSN-ELE 对 A549 细胞的体外生长抑制作用 (质量浓度为所含 ELE 质量浓度, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 13 *In vitro* growth inhibition effect of ELE, MSN-ELE and D/MSN-ELE on A549 cells (here “concentration” indicated that of ELE contained, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

表 6 不同纳米粒与 ELE 的 IC₅₀ 比值

Table 6 IC₅₀ ratio of different nanoparticles to ELE

IC ₅₀ 对比组	IC ₅₀ 比值
ELE 与 MSN-ELE	3
ELE 与 D/MSN-ELE	15
MSN-ELE 与 D/MSN-ELE	4

至 6 孔板, 于 5% CO₂、37 °C 培养箱中孵育 24 h。分别用无血清培养液、10 μg/mL 的 ELE、86.4 μg/mL MSN-ELE 和 D/MSN-ELE (载药纳米粒所含 ELE 的质量浓度与 ELE 组的质量浓度一致) 处理细胞 24 h, 收集 A549 细胞, 弃去上清液后 PBS 洗涤 1 次。加 10 mmol/L 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA) 的培养液, 37 °C 培养箱避光孵育 30 min。阳性对照组 (试剂盒 Rosup 阳性处理组) 按照试剂盒说明书要求处理。PBS 洗涤 1 次, 500 μL PBS 重悬细胞, 转移至流式管后流式细胞仪检测细胞内 ROS 水平。

DCFH-DA 本身没有荧光, 进入细胞后, 经酯酶作用脱去二酯生成 2',7'-二氯氢化荧光素 (DCFH), DCFH 被超氧阴离子和过氧化氢等 ROS 氧化, 生成发荧光的 2',7'-二氯荧光素 (DCF), 通过 DCF 水平的变化即可反映 ROS 水平的变化^[22]。从图 14 看出, 与 ELE 处理组相比较, D/MSN-ELE 组细胞凋亡率显著降低。这表明 D/MSN-ELE 通过上调细胞内 ROS 水平诱导 A549 细胞凋亡。

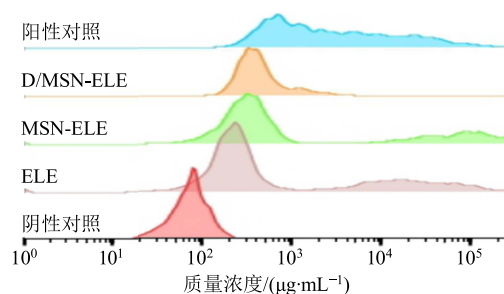


图 14 ELE 及不同纳米粒对 A549 细胞内活性氧水平的影响
Fig. 14 Effect of ELE and different nanoparticles on active oxygen levels in A549 cells

2.9 线粒体膜电位 ($\Delta\Psi_m$) 检测

$\Delta\Psi_m$ 被认为是线粒体功能的重要参数, 失去 $\Delta\Psi_m$ 被认为是细胞凋亡的一个特点^[22]。 $\Delta\Psi_m$ 降低是细胞凋亡作用进一步增强的一个指标。采用流式细胞术检测 ELE、MSN-ELE 和 D/MSN-ELE 对 A549 细胞 $\Delta\Psi_m$ 的影响。收集处于对数期且生长状态良好的 A549 细胞制成细胞悬液, 以 6×10^5 个/孔接种至 6 孔板, 于 5% CO₂、37 °C 培养箱中孵育 24 h。分别用 10 μg/mL 的 ELE、86.4 μg/mL MSN-ELE 和 D/MSN-ELE 处理细胞 24 h, 收集细胞, 弃去上清液后 PBS 洗涤 1 次。各组加入无血清培养基稀释的荧光亲脂性羰花青染料 (JC-1 染料), 37 °C 孵育 20 min 后 600 × g 离心 3 min, 用 JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次后重悬, 转移至流式管后流式细胞仪检测细胞内 $\Delta\Psi_m$ 水平。绿色荧光通过 FL1 通道检测; 红色荧光通过 FL2 通道检测^[22], 以红、绿荧光强度的相对比值来衡量 $\Delta\Psi_m$ 去极化程度。结果用 SPSS 22.0 软件进行 *t* 检验分析。与对照组相比, D/MSN-ELE 诱导的 A549 细胞 $\Delta\Psi_m$ 显著下降 ($P < 0.01$), 结果见图 15。

3 讨论

ELE 是对正常细胞低毒的广谱抗肿瘤药物, 但水溶性低, 导致生物利用度不高, 这些限制其药效发挥和在临床上的应用。本实验选用 MSN 为载体, 利用物理吸附和界面聚合法制备 D/MSN-ELE, 其粒径均一, 平均载药量和包封率分别为 $(11.58 \pm 0.73) \%$ 和 $(59.82 \pm 0.57) \%$ 。与 ELE 其他剂型如微乳、脂质体等^[23]相比, 包封率略低, 这是因为制备过程中受温度影响 ELE 挥发增多, 因此制备的 D/MSN-ELE 的包封率不高。对比 MSN 荷载其他药物如紫杉醇发现, 本实验制备的 D/MSN-ELE 的载药量较高, PDA 修饰后能有效封堵孔道, 提高药物利用率。

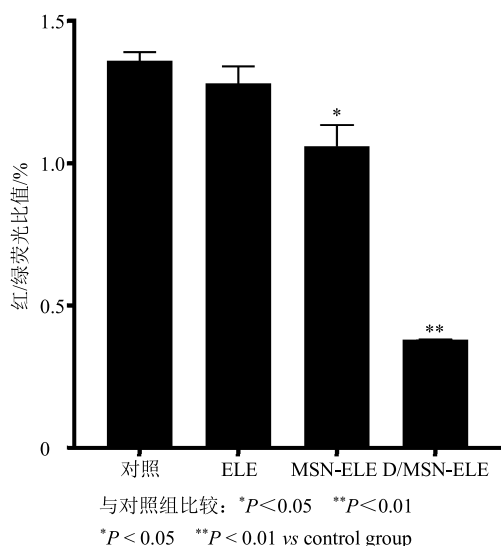


图 15 ELE 及不同纳米粒对 A549 细胞内 $\Delta\Psi_m$ 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 15 Effects of ELE and different nanoparticles on $\Delta\Psi_m$ in A549 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

药物释放实验中,以 pH 7.4、5.0 分别模拟人体正常环境和细胞内吞体 pH 值^[20]。结果显示 D/MSN-ELE 在 2 种 pH 值条件下累积释放率相差不大。由于药物在机体内释放机制复杂,本实验虽模拟体内环境,但与体内释药情况不完全对等,释放结果仅说明 D/MSN-ELE 确有 pH 敏感的特性。为了验证 PDA 在极端酸性条件下是否发生明显的 pH 响应性释放,本研究考察了 pH 3.0 条件下的体外释放,由结果可知随 pH 值减小, ELE 的释放率明显增大。由此说明, D/MSN-ELE 具有典型的 pH 响应性,能够在酸性环境下发生 pH 诱导的药物释放,且不会在极端酸性条件下发生 pH 响应的逆转。因此,本实验制备的 D/MSN-ELE 是一种性能优异的药物载体,不仅具有较大的药物负载量,还能响应肿瘤微环境 pH,实现 pH 控制的药物靶向释放。

载体毒性实验结果中 PDA 的修饰可有效降低 MSN 因较大比表面积及带有正电荷^[24]引起的细胞毒性。由于 PDA 的修饰可以掩蔽阳离子,因此 PDA 修饰的介孔递药系统的生物安全性得到进一步提高。体外抗肿瘤活性实验中, ELE、MSN-ELE 和 D/MSN-ELE 对 A549 细胞的 IC_{50} 值分别为 91.29、27.56、6.02 $\mu\text{g/mL}$,提示 D/MSN-ELE 与 MSN-ELE 分别增强了无纳米粒负载 ELE 抗肿瘤效能的 14 倍和 2 倍,且 D/MSN-ELE 增强了 MSN-ELE 抗肿瘤效能的 3 倍(表 6),由于 PDA 修饰,细胞对 D/MSN-ELE 内吞作用加强^[25],因此抗肿瘤作用较

MSN-ELE 增强。

活性氧实验结果中, D/MSN-ELE 组细胞凋亡程度明显高于 ELE 组,表示 D/MSN-ELE 可以通过上调细胞内 ROS 的水平,诱导 A549 细胞发生凋亡。 $\Delta\Psi_m$ 实验中利用 JC-1 荧光探针对 2 种载药纳米粒和 ELE 处理后的细胞进行检测,发现 D/MSN-ELE 细胞红/绿荧光比值较对照组显著下降,细胞的 $\Delta\Psi_m$ 降低,细胞发生线粒体依赖性凋亡。由此可以判定, D/MSN-ELE 通过调控 ROS 水平和 $\Delta\Psi_m$ 水平来调控 A549 细胞凋亡。

综上,本实验制备的 D/MSN-ELE 是一种具有肿瘤靶向性且带有较高抗肿瘤活性的药物,有望成为 ELE 新剂型。今后的研究中,将进一步对 D/MSN-ELE 的体内药效学、药动学进行评价,为 D/MSN-ELE 在肿瘤治疗中的应用提供更深入的理论和实验基础。

参考文献

- [1] 麻杰,陈娟,赵冰洁,等. 抗癌药物 β -榄香烯及其衍生物的研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(5): 1184-1191.
- [2] 赵志梅,张立杰,夏天,等. 莪术主要单体成分抗炎、抗肿瘤作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(1): 119-124.
- [3] 谢恬,李铖璐,王淑玲,等. 榄香烯脂质体系列靶向抗癌天然药物基础研究进展 [J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(4): 507-512.
- [4] 王博,袁子民,程岚. β -榄香烯聚氧基丙烯酸正丁酯纳米粒的制备工艺研究 [J]. 中草药, 2011, 42(3): 474-477.
- [5] 沈展,陈文斌. 转铁蛋白功能化的 β -榄香烯-雷公藤红素共传递微乳协同靶向抗结直肠癌研究 [J]. 中草药, 2019, 50(2): 471-480.
- [6] 赵永顺,吴春明,董斌,等. 榄香烯抑制 Raf/MEK/ERK 信号通路诱导人源胶质瘤 U87 细胞凋亡 [J]. 实用药物与临床, 2011, 14(5): 365-367.
- [7] 唐佳民,张瑞涛. 介孔二氧化硅纳米粒的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2015, 30(11): 1422-1426.
- [8] 张燕,费伟东,陶姣阳,等. Angiopep-2 修饰的载三氧化二砷介孔二氧化硅脂质囊纳米递药系统的构建及体外评价 [J]. 中草药, 2018, 49(6): 1289-1297.
- [9] Butler K S, Durfee P N, Theron C, et al. Protocells: Modular mesoporous silica nanoparticle-supported lipid bilayers for drug delivery [J]. Small, 2016, 12: 2173-2185.
- [10] Vallet-Regi M, Rámila A, del Real R P, et al. A new

- property of MCM-41: Drug delivery system [J]. *Chem Mater*, 2001, 13(4): 308-311.
- [11] Zhe L, Zhang Y T. Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis, classification, drug loading, pharmacokinetics, biocompatibility, and application in drug delivery [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2019, 3(16): 219-237.
- [12] Chang B S, Sha X V, Guo J, *et al.* Thermo and pH dual responsive, polymer shell coated, magnetic mesoporous silica nanoparticles for controlled drug rELEase [J]. *J Mater Chem B*, 2011, 25(26): 9805-9810.
- [13] 贺武, 帅韬, 高明阳. 聚多巴胺形成的机理及影响因素 [J]. *江西化工*, 2017, 4(4): 4-10.
- [14] 曾昭武, 周广林, 展晓日, 等. 超高效液相色谱法测定榄香烯脂质体的含量及包封率 [J]. *药物分析杂志*, 2010, 30(3): 508-510.
- [15] 王艳芝. β -榄香烯固体脂质纳米粒的研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2011.
- [16] Wang Y Z, Sun L Z, Jiang T Y, *et al.* The investigation of MCM-48-type and MCM-41-type mesoporous silica as oral solid dispersion carriers for water insoluble cilostazol [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2014, 40(6): 819-828.
- [17] Zong W, Hu Y, Su Y. Polydopamine-coated liposomes as pH-sensitive anticancer drug carriers [J]. *J Microencapsul*, 2016, 33(3): 257-262.
- [18] 程益军, 宋鹏. 激光粒度仪与透射电镜测试结果的比对 [J]. *中国粉体技术*, 2010, 16(4): 23-25.
- [19] Bertoluzzi A A, Faunano C, Morelli M A, *et al.* Raman and infrared-spectra on silica-gel evolving toward glass [J]. *J Non Cryst Solids*, 1982, 48(1): 117-128.
- [20] 成莉燕, 燕鹏华. 聚多巴胺修饰介孔二氧化硅 SBA-15 及体外生物活性研究 [J]. *兰州文理学院学报: 自然科学版*, 2015, 29(3): 42-45.
- [21] 陈迪凤. 介孔二氧化硅纳米复合物的合成及其体外生物活性研究 [D]. 开封: 河南大学, 2018.
- [22] 姚成才, 涂远荣, 姜杰, 等. 榄香烯乳诱导线粒体凋亡途径逆转肺癌 A549/DDP 细胞株耐药 [J]. *现代肿瘤医学*, 2014, 22(6): 1276-1281.
- [23] Zhai B T, Zeng Y Y, Zeng Z W, *et al.* Drug delivery systems for elemene, its main active ingredient β -elemene, and its derivatives in cancer therapy [J]. *Int J Nanomedicine*, 2018, 13: 6279-6296.
- [24] Yu T, Malugin A, Uhandehari H. Impact of silica nanoparticle design on cellular toxicity and hemolytic activity [J]. *Acs Nano*, 2011, 5(7): 5717-5728.
- [25] Meredith P, Sarna T. The physical and chemical properties of eumelanin [J]. *Pigment Cell Res*, 2010, 19(6): 572-594.