

乳糖酸修饰聚酰胺-胺树枝状大分子接枝白藜芦醇纳米颗粒的制备及体外评价

周 婷¹, 刘春艳^{1*}, 李 颖², 阴龙飞¹

1. 华北理工大学药学院, 河北 唐山 063210

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 制备乳糖酸(LA)修饰聚酰胺-胺树枝状大分子(PAMAM)接枝白藜芦醇(Res)的纳米颗粒, 并进行体外评价。方法 采用发散法合成 G3.0 PAMAM, 将末端部分羧基化(PAMAM-COOH), 经酯化反应键合 Res、酰胺化反应接枝 LA 在载体表面, 制备 LA-PAMAM-Res 纳米颗粒, 用核磁共振氢谱(¹H-NMR)、红外光谱(IR)进行表征; LA-PAMAM-Res 物理包载 Res 制备 LA-PAMAM-Res/Res 纳米颗粒, 并用透析法检测其包封率; HPLC 检测 2 种纳米颗粒的载药量, 激光粒度分析法考察其粒径, 透析法测定其体外药物释放性能, 溶血性实验评价其生物安全性; MTT 法考察 PAMAM、PAMAM-COOH、Res、LA-PAMAM-Res 和 LA-PAMAM-Res/Res 的细胞毒性及抗癌活性。结果 成功制备了 LA-PAMAM-Res 和 LA-PAMAM-Res/Res 纳米颗粒。LA-PAMAM-Res/Res 的包封率为(75.1±2.2)%, LA-PAMAM-Res 和 LA-PAMAM-Res/Res 的载药量分别为(7.2±0.9)%和(18.4±1.1)%, 粒径分别为(126.3±3.4) nm 和(251.0±15.7) nm, 72 h 时体外药物释放度分别为(23.83±0.43)%和(35.28±0.72)%, 溶血率均低于 5%, 且载体 PAMAM-COOH 比 PAMAM 具有较小的细胞毒性, LA-PAMAM-Res 和 LA-PAMAM-Res/Res 仍具有抑制肿瘤增殖活性。结论 制备了能使药物缓慢释放、生物相容性良好、低细胞毒性和具有抗癌活性的 LA-PAMAM-Res 和 LA-PAMAM-Res/Res 纳米颗粒, 且 LA-PAMAM-Res/Res 进一步提高了 Res 的载药量。

关键词: 聚酰胺-胺树枝状大分子; 白藜芦醇; 载药量; 体外释放; 细胞毒性; 乳糖酸; 体外评价; 溶血性; 生物安全性; 细胞毒性; 抗癌活性; 增殖活性; 缓释

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2020)17-4457-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.17.013

Preparation and *in vitro* evaluation of lactobionic acid modified polyamide-amine dendrimer grafted resveratrol nanoparticles

ZHOU Ting¹, LIU Chun-yan¹, LI Ying², YIN Long-fei¹

1. School of Pharmacy, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China

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

Abstract: Objective To prepare resveratrol (Res) nanoparticles grafted with polyamide-amine dendrimer (PAMAM) modified by lactose acid (LA) and evaluate them *in vitro*. **Methods** After partial carboxylation of G3.0 PAMAM terminal (PAMAM-COOH) which synthesized by divergence method. Res was bonded through esterification reaction and LA was grafted on the surface of the carrier through amidation reaction. Nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) and infrared spectroscopy (IR) were used for characterization. La-PAMAM-Res/Res nanoparticles were prepared by physical encapsulation using LA-PAMAM-Res and Res, and the encapsulation rate was detected by dialysis method. The drug load of the two kinds of nanoparticles was detected by high performance liquid chromatography (HPLC), the particle size was investigated by laser particle size analysis method, the drug release performance *in vitro* was determined by dialysis method, and the biosafety was evaluated by hemolytic experiment. The cytotoxicity and anticancer activity of PAMAM, PAMAM-COOH, Res, LA-PAMAM-Res and LA-PAMAM-Res/Res were investigated by MTT assay. **Results** LA-PAMAM-Res and La-PAMAM-Res/Res nanoparticles were prepared. The encapsulation rate of LA-PAMAM-Res/Res was (75.1 ±

收稿日期: 2020-04-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21302040)

作者简介: 周 婷(1994—), 硕士研究生, 从事药物制剂研究。Tel: 18133565295 E-mail: 18133565295@163.com

*通信作者 刘春艳(1974—), 教授, 硕士生导师。Tel: 15031548560 E-mail: chunyanliu@ncst.edu.cn

2.2) %, the drug loading rates of LA-PAMAM-Res and LA-PAMAM-Res/Res were (7.2 ± 0.9) % and (18.4 ± 1.1) %, respectively. The particle size was (126.3 ± 3.4) nm and (251.0 ± 15.7) nm, respectively. After 72 h, the drug release *in vitro* was (23.83 ± 0.43) % and (35.28 ± 0.72) %, respectively. The hemolysis rate of both nanoparticles was less than 5%, and the carrier PAMAM-COOH showed less cytotoxicity than PAMAM, and both LA-PAMAM-Res and LA-PAMAM-Res/Res maintained anti-tumor proliferative activity. **Conclusion** LA-PAMAM-Res and LA-PAMAM-Res/Res nanoparticles with sustained drug release, good biocompatibility, low cytotoxicity and anticancer activity were prepared, and LA-PAMAM-Res/Res increased the drug load of Res.

Key words: polyamido-amine dendrimer; resveratrol; drug loading; *in vitro* release; cytotoxicity; lactobionic acid; *in vitro* evaluation; hemolysis; biosafety; cytotoxicity; anticancer activity; proliferative activity; sustained release

白藜芦醇 (resveratrol, Res) 最初是从虎杖中提取出来的一种天然多酚类化合物, 因植物响应伤害、感染或紫外线辐射而合成的具有健康特性的次生代谢产物^[1]。研究表明, Res 具有抗炎、抗糖尿病、抗肿瘤 (胰腺癌、皮肤癌、肝癌、肺癌和前列腺癌) 和化学预防等多种药理作用^[2-4], 可抑制癌细胞生长和增殖, 控制癌细胞凋亡, 增强癌细胞对化学疗法的敏感性^[5-7]。但 Res 水溶性低、生物利用度差的特性限制其临床应用^[8]。为改善药物的溶解性和生物利用度, Res 纳米粒^[9-10]、包合物^[11]、固体分散体^[12]等新剂型成为人们的研究热点。

聚酰胺-胺树枝状大分子 (polyamido-amine, PAMAM) 是一种人工合成的新型纳米材料, 具有载药量大、水溶性强和无免疫原性等特点^[13]。乳糖酸 (lactose acid, LA) 配体在肝癌细胞表面高度表达, 将其修饰在纳米材料表面可使载体具有主动靶向性, 增加药物在癌细胞的分布^[14]。PAMAM 内部疏水空隙及末端大量氨基对称超支化结构, 为内部物理包裹、末端键合提供环境。目前, 尚未见 PAMAM 内部包载、末端偶联 Res 及 LA 以提高载药量及靶向性的相关报道。本实验采用发散法合成第三代 (G3.0) PAMAM 载体, 对其末端氨基进行部分羧基化, 经酯化反应将 Res 键合, 酰胺化反应将 LA 偶联, 制备 LA-PAMAM-Res 纳米颗粒。为提高药物的载药量, 再以 LA-PAMAM-Res 内部物理包载 Res, 制备 LA-PAMAM-Res/Res 纳米颗粒, 考察两者的体外药物释放性能、生物相容性, 为 Res 制剂的研发提供新的方法。

1 材料

RE-52AA 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; Agilent 1260-API500 高效液相色谱仪, 美国安捷伦和 AB 公司; FTIR-8400s 红外光谱仪, 日本 Shimadzu 公司; ZEN3690 激光粒度分析仪, 英国马尔文公司; Diamonsil C₁₈ 色谱柱, 北京迪马科技有限公司; 紫外分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司;

酶标仪, 美国 Bio-Rad 公司。

白藜芦醇 (批号 B1807119, 质量分数 >99%)、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS, 质量分数 99%)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 (EDC-HCl, 质量分数 99%)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP, 质量分数 99%) 和 N,N'-二环己基碳二亚胺 (DCC, 质量分数 99%) 均购于上海思域化工科技有限公司; 二甲亚砜 (DMSO, 质量分数 >99%) 购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 丁二酸酐 (质量分数 98%) 和乳糖酸 (LA, 质量分数 97%) 购于上海麦克林生化科技有限公司; DMEM 培养基购于美国 Mediatech 公司; MTT 购于北京 EallBio 公司; 100% 灭活胎牛血清、0.25% 胰蛋白酶和人肺癌 A549 细胞由华北理工大学医学实验研究中心提供; 水为去离子水; 乙腈、甲醇为色谱纯; 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 LA-PAMAM-Res 的制备与纯化

(1) PAMAM-COOH 的制备: 按照课题组报道的制备方法^[15]合成 G3.0 PAMAM (图 1)。取 1.00 g G3.0 PAMAM 溶于 DMSO 溶液中, 称取 0.25 g 丁二酸酐溶于 DMSO 溶液并在剧烈搅拌下缓慢加入上述溶液, 室温反应 24 h 后, 将反应液装入透析袋 (截留相对分子质量 3 500) 中用大量水透析 48 h 除去过量丁二酸酐和 DMSO, 水溶液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过后冻干, 得到 PAMAM-COOH, 产率为 85.3%。

(2) PAMAM-Res 的制备: 取 1.00 g PAMAM-COOH 溶于 DMSO 溶液中, 加入 DMAP 和 DCC, 再加入过量 Res (0.91 g) 的 DMSO 溶液, 室温搅拌反应 12 h 后, 滤过不溶物, 滤液加甲醇-水 (1:1) 混合溶剂超声、离心, 收集上清液, 装入透析袋 (截留相对分子质量 5 000) 中用水透析 48 h, 水溶液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过后冻干, 得到 PAMAM-Res, 产率为 33.2%。

(3) LA-PAMAM-Res 的制备: 取 0.23 g LA,

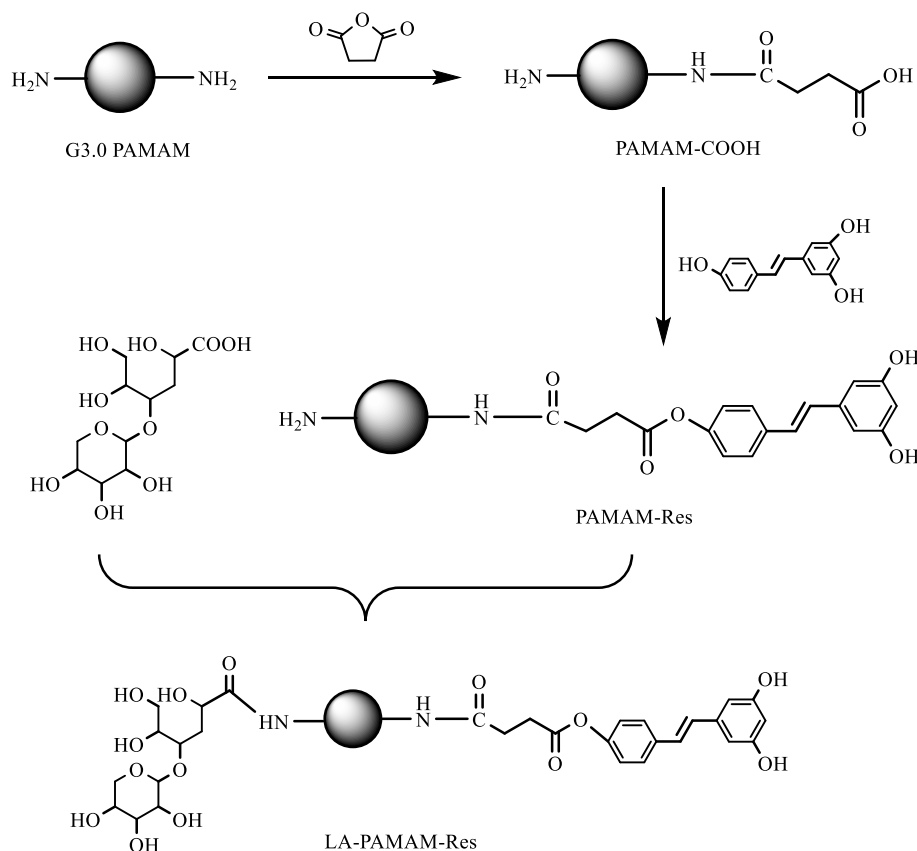


图 1 LA-PAMAM-Res 的合成过程

Fig. 1 Synthesis process of LA-PAMAM-Res

加入 NHS、EDC 溶于 DMSO 溶液中，室温下强磁力搅拌反应 3 h 以活化羧基。再取 0.49 g PAMAM-Res 溶于 DMSO 溶液中，按照 LA 与 PAMAM-Res 物质的量比为 8 : 1 加入 LA 溶液，室温下搅拌反应 72 h 后，装入透析袋（截留相对分子质量 7 000）用大量水透析，产物溶液用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过后冻干，得到 LA-PAMAM-Res，产率为 59.7%。

2.2 LA-PAMAM-Res 纳米颗粒的表征

2.2.1 红外光谱检测及结果 采用红外光谱 (IR) 法对 G3.0 PAMAM、PAMAM-COOH、PAMAM-Res 和 LA-PAMAM-Res 进行表征。结果 (图 2) 显示，G3.0 PAMAM 在 3 281.71、3 079.94 cm^{-1} 处出现 N-H 的伸缩和弯曲振动吸收峰；2 942.83、2 845.44 cm^{-1} 处是 $-\text{CH}_2-$ 的不对称和对称伸缩振动吸收峰；1 638.69、1 560.78 cm^{-1} 处是酰胺键的特征吸收峰；1 469.63 cm^{-1} 处出现 $-\text{CH}_2-$ 的弯曲振动吸收峰。PAMAM-COOH 在 1 026.36 cm^{-1} 处出现 C-O 的伸缩振动吸收峰；954.68 cm^{-1} 处是 O-H 弯曲振动吸收峰也是羧基的特征吸收。PAMAM-Res 在 1 507.07 cm^{-1} 处有苯环吸收峰，964.85 cm^{-1} 处出现反式 $\text{C}=\text{C}$ 的

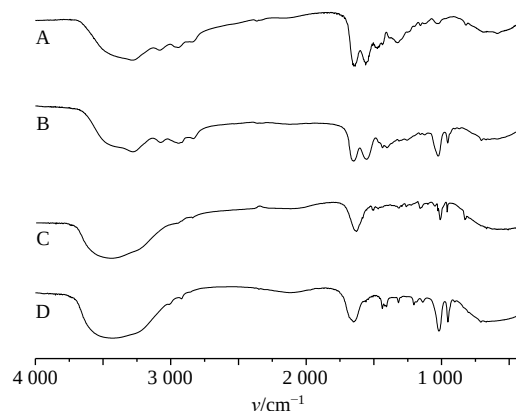


图 2 G3.0 PAMAM (A)、PAMAM-COOH (B)、PAMAM-Res (C) 和 LA-PAMAM-Res (D) 的红外光谱图

Fig. 2 Infrared spectrum of G3.0 PAMAM (A), PAMAM-COOH (B), PAMAM-Res (C) and LA-PAMAM-Res (D)

特征吸收峰。LA-PAMAM-Res 在 1 139.99 cm^{-1} 处出现半乳糖环中 C-O-C 非对称伸展的特征吸收峰。

2.2.2 核磁共振氢谱检测及结果 以重水 (D_2O) 为溶剂，对 G3.0 PAMAM 和 PAMAM-COOH 进行 ^1H -NMR 分析；以氘代 DMSO 为溶剂对 PAMAM-Res 和 LA-PAMAM-R 进行 ^1H -NMR 分析。结果 (图

3)显示,G3.0 PAMAM在 δ 2.35~2.37处有 $-\text{CH}_2\text{CO}-$ 的吸收峰,在 δ 2.49~2.56处出现 $-\text{CH}_2\text{N}-$ 的吸收峰,在 δ 2.69~2.79处有 $-\text{CONHCH}_2-$ 的吸收峰,在 δ 3.19~3.25处出现 $-\text{NCH}_2\text{CH}_2-$ 的吸收峰,在 δ 1.90~1.93处出现 $-\text{NH}_2$ 的吸收峰;PAMAM-COOH在 δ 1.86~1.90处是 $-\text{NH}_2$ 的吸收峰;PAMAM-Res在 δ 6.11~7.40处是苯环上氢的吸收峰, δ 9.18是羟基吸收峰;LA-PAMAM-Res在 δ 5.32、5.91~5.96是乳糖酸的特征吸收峰。

2.3 药物包载及载药量、包封率的测定

2.3.1 色谱条件^[15-16] 色谱柱为 Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm);流动相为乙腈-水(30:70);检测波长 306 nm;检测时间 13 min;进样量 10 μL ;体积流量 1 mL/min;柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。Res 保留时间 8.2

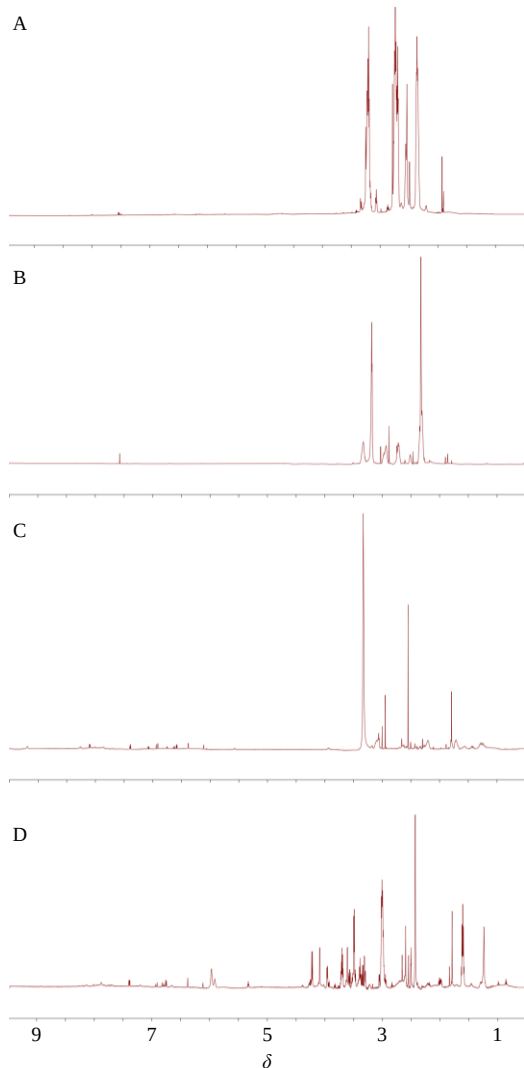


图3 G3.0 PAMAM (A)、PAMAM-COOH (B)、PAMAM-Res (C) 和 LA-PAMAM-Res (D) 的核磁共振氢谱

Fig. 3 ^1H -NMR spectrum of G3.0 PAMAM (A), PAMAM-COOH (B), PAMAM-Res (C) and LA-PAMAM-Res (D)

min 左右。色谱图见图 4。

2.3.2 线性关系考察 配制质量浓度为 5、10、20、50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 的 Res 甲醇溶液,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过后按以上色谱条件用 HPLC 检测,并记录峰面积,建立关于质量浓度 (X) 和峰面积 (Y) 的线性回归方程 $Y=80.457 X-60.477$, $r=0.999 5$ 。

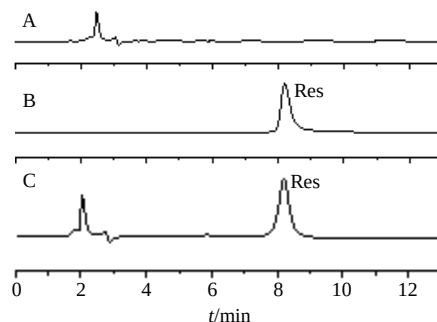


图4 空白样品 (A)、Res 对照品 (B) 和检测样品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 4 HPLC of blank (A), resveratrol reference substance (B) and test samples (C)

2.3.3 药物的包载及包封率、载药量的测定

(1) LA-PAMAM-Res 物理包裹 Res 的制备: 称取一定量的 LA-PAMAM-Res 及药物 Res, 分别溶解于 DMSO 中, 将 Res 溶液逐滴加入 LA-PAMAM-Res 溶液中, 同时超声促进分散, 室温搅拌过夜。用大量水透析, 之后冷冻干燥得到物理包裹 Res 的 LA-PAMAM-Res/Res 纳米药物。

(2) 包封率: 将上述的大量透析水减压蒸馏, 用纯水定容, 醋酸乙酯进行萃取、氮吹、甲醇复溶, 按“2.3.1”项色谱条件进行 HPLC 检测, 由回归方程得到游离 Res 的量, 按照公式计算 LA-PAMAM-Res/Res 的包封率为 $(75.1 \pm 2.2) \%$ 。

$$\text{包封率} = 1 - W_0/W$$

W_0 为游离药物的量, W 为药物总量

(3) 载药量: 将 LA-PAMAM-Res 和 LA-PAMAM-Res/Res 分别溶解于 DMSO- H_2O (1:1) 的混合溶液中超声充分浸提后用醋酸乙酯萃取, 得到醋酸乙酯层, 氮吹, 用甲醇复溶, 按“2.3.1”项色谱条件进行 HPLC 检测, 计算样品的载药量。结果显示 LA-PAMAM-Res 和 LA-PAMAM-Res/Res 的载药量分别为 $(7.2 \pm 1.0) \%$ 、 $(18.4 \pm 0.9) \%$ ($n=3$), 结果表明 LA-PAMAM-Res/Res 比 LA-PAMAM-Res 的载药量有较大提高。

$$\text{载药量} = W_1/W_2$$

W_1 为载药纳米颗粒中 Res 的量, W_2 为载药纳米颗粒的量

2.4 平均粒径检测及结果

将 G3.0 PAMAM、LA-PAMAM-Res 和 LA-PAMAM-Res/Res 分别用水稀释, 利用马尔文激光粒度分析仪在 25 °C 检测粒径。由结果(表 2)可知, LA-PAMAM-Res 和 LA-PAMAM-Res/Res 的粒径明显增加, 且粒径分布较集中。

表 2 载体及纳米颗粒的粒径和分布 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Particle size and distribution of carrier and nanoparticles ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	粒径/nm	PDI
G3.0 PAMAM	3.2 ± 0.1	0.309 ± 0.010
LA-PAMAM-Res	126.3 ± 3.4	0.283 ± 0.004
LA-PAMAM-Res/Res	251.4 ± 15.7	0.295 ± 0.007

2.5 体外药物释放实验及结果

以含 5% DMSO 的磷酸盐缓冲液(pH 7.4, PBS)为溶出介质, 分别称取 10 mg 的 LA-PAMAM-Res 和 LA-PAMAM-Res/Res 溶于 1 mL PBS 溶液(含 5% DMSO, pH 7.4)中, 置于透析袋(截留相对分子质量 1 000)并夹紧两端^[17], 一端接上转子放入 95 mL 溶出介质中, 温度 37 °C, 转速 100 r/min, 每隔一段时间取样 0.5 mL, 同时补充 0.5 mL 新鲜介质溶液。所取样品用醋酸乙酯萃取、氮吹、甲醇复溶, 按“2.3.1”项色谱条件用 HPLC 检测, 按公式计算药物累积释放率的释放量。由结果(图 5)可知, LA-PAMAM-Res 和 LA-PAMAM-Res/Res 纳米颗粒的体外药物最大释放量分别为(23.83 ± 0.43)% 和 (35.28 ± 0.72)%。在 10 h 内 LA-PAMAM-Res 和 LA-PAMAM-Res/Res 纳米颗粒释放速度很快, 之后速度变缓, 且 LA-PAMAM-Res 比 LA-PAMAM-Res/Res 的药物释放速度缓慢。

$$\text{药物累积释放率} = [96 C_{\text{Res}(n)} + 0.5 \times \sum C_{\text{Res}(n-1)}] / W_0$$

W_0 为样品的载药量, $C_{\text{Res}(n)}$ 第 n 次测量时释放液中 Res 的质量浓度, $C_{\text{Res}(n-1)}$ 为第 $n-1$ 次测量时释放液中 Res 的质量浓度, $\sum C_{\text{Res}(n-1)}$ 为前 $n-1$ 次测量 Res 质量浓度之和

2.6 体外溶血性实验及结果

采集健康 SD 大鼠眼底静脉丛血液 1.5 mL, 置于抗凝血管内, 3 000 r/min、4 °C 离心, 除去血清后加入生理盐清洗下层红细胞再次离心, 至上清液为无色。用生理盐水稀释, 制备 2% 红细胞悬液。称取一定量冻干样品 G3.0 PAMAM、LA-PAMAM-Res 和 LA-PAMAM-Res/Res, 用 0.9% 生理盐水各配制高、中、低 3 个质量浓度 (0.5、0.3、0.1 mg/mL),

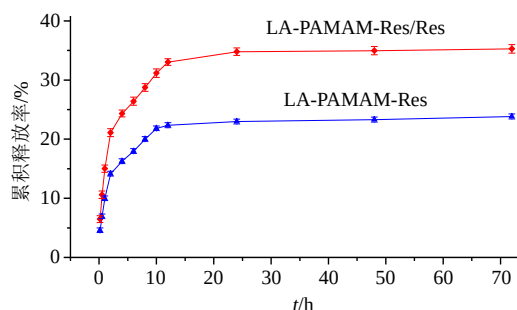


图 5 LA-PAMAM-Res 与 LA-PAMAM-Res/Res 体外药物释药曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Release profile of resveratrol from resveratrol prodrug dendrimer LA-PAMAM-Res and LA-PAMAM-Res/Res *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

用 0.45 μm 微孔滤膜滤过。G3.0 PAMAM、LA-PAMAM-Res 和 LA-PAMAM-Res/Res 为样品受试组, 生理盐水为阴性对照组, 双蒸水为阳性对照组。将样品分别置于洁净试管内, 加入等体积 2% 红细胞悬浮液, 混合均匀, 置于 37 °C 水浴中孵育 1 h。结束后, 离心收集上清液, 测量样品在 540 nm 处的吸光度(A)值, 按公式计算溶血率(HR)。由结果(表 3)可知, LA-PAMAM-Res、LA-PAMAM-Res/Res 纳米颗粒在高、中、低质量浓度时溶血率均小于 5%, 且 LA-PAMAM-Res 和 LA-PAMAM-Res/Res 纳米药物溶血率都低于 G3.0 PAMAM。

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

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 细胞毒性实验及结果

采用 MTT 法分别考察 G3.0 PAMAM、PAMAM-

表 3 载体与纳米颗粒的溶血率 ($n = 3$)

Table 3 Hemolysis rate of carrier and nanoparticles ($n = 3$)

样品	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	溶血率/%
生理盐水	—	0
G3.0 PAMAM	0.1	2.5
	0.3	4.1
	0.5	5.6
LA-PAMAM-Res	0.1	0.3
	0.3	0.7
	0.5	1.5
LA-PAMAM-Res/Res	0.1	0.1
	0.3	0.6
	0.5	1.2
水	—	100.0

COOH、LA-PAMAM-Res、LA-PAMAM-Res/Res 和 Res 对人肺癌 A549 细胞的细胞毒性。取对数生长期的 A549 细胞以 6×10^3 个/孔接种于 96 孔板中, 在 37°C 、5% CO_2 环境中孵育 24 h 后弃去培养液, 再分别加入 DEME 培养液 (含 2% 血清) 稀释的 5、10、20、30、40、50 $\mu\text{g/mL}$ 载体、Res 及含该浓度 Res 的纳米颗粒, 每孔 100 μL , 每个质量浓度设置 4 个复孔, 只加 DMEM 培养液 (含 2% 血清) 的细胞作为阴性对照, 继续培养 24 h 之后弃去培养液, 用 PBS 清洗 2 次, 每孔再加入 5 mg/mL MTT 试剂继续孵育 30 min, 吸去 MTT 试剂, 加入 DMSO 溶液振荡摇匀, 用酶标仪在 490 nm 处测定 A 值, 根据实验组和对照组 A 值计算细胞存活率。

结果 (图 6、7) 表明, 载体及纳米颗粒的细胞毒性均呈浓度相关性。当质量浓度达到 50 $\mu\text{g/mL}$ 时, PAMAM-COOH (89.98 ± 3.24) % 的细胞存活

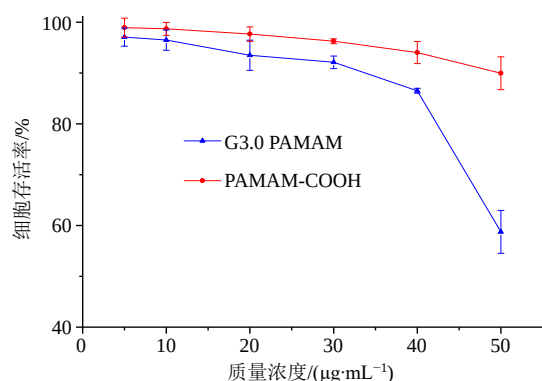


图 6 G3.0 PAMAM 与 PAMAM-COOH 的细胞存活率 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 6 Cell survival rate of G3.0 PAMAM and PAMAM-COOH ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

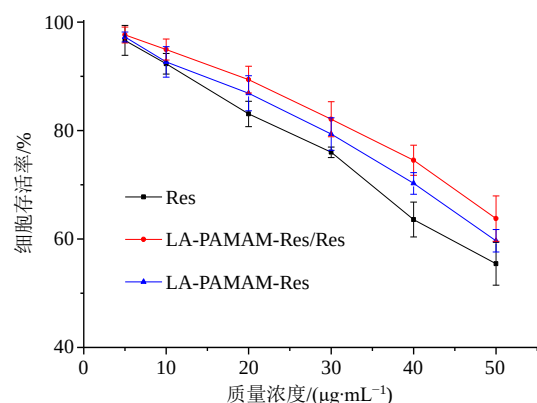


图 7 Res、LA-PAMAM-Res 和 LA-PAMAM-Res/Res 的细胞存活率 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 7 Cell survival rate of Res, LA-PAMAM-Res and LA-PAMAM-Res/Res ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

率高于 G3.0 PAMAM 的 (58.75 ± 4.18) %, LA-PAMAM-Res 的 (63.76 ± 4.11) % 和 LA-PAMAM-Res/Res 的 (59.68 ± 2.06) %, 纳米颗粒的癌细胞抑制率微低于 Res (55.46 ± 3.98) %, 但仍具有抗癌活性。

3 讨论

文献报道^[18], 多氨基化合物通过控制氨基与羧基化试剂的比例可以实现部分氨基化。本实验将 G3.0 PAMAM 与丁二酸酐按照 1:12 物质的量比进行反应, 制得末端氨基部分羧基化的 PAMAM-COOH 载体, 再经酯化反应键合 Res、酰胺化反应接枝 LA 制备 LA-PAMAM-Res 纳米颗粒, 将 LA-PAMAM-Res 物理包载 Res 制备 LA-PAMAM-Res/Res 纳米颗粒。发现 LA-PAMAM-Res/Res 比 LA-PAMAM-Res 的载药量有较大提高, 这与 PAMAM 外部键合 Res, 内部疏水空间包载 Res 相一致, 为增加 Res 载药量提供了思路。

Res 难溶于水, 可溶于 DMSO、醋酸乙酯等有机溶剂^[19]。体外药物释放实验, 因需模拟人体体内环境, 一般选用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液作为溶出介质^[20], 但 Res 的溶解度很低, 影响药物的释放和检测, 本实验选用含 5% DMSO 的 PBS 溶液为溶出介质以提高 Res 的溶解度。发现 LA-PAMAM-Res 和 LA-PAMAM-Res/Res 均为部分释放, 这与化学键合的 Res 在弱酸性环境下发生可逆反应有关, 文献报道通过酯键键合的前药, 在富含酯酶的肿瘤细胞中酶催化下酯键完全水解能够释放出大量药物^[21], 进一步的实验正在进行。

G3.0 PAMAM 表面存在大量氨基, 具有较大细胞毒性, 且肿瘤细胞较正常细胞对其更加敏感^[22]。本实验对 G3.0 PAMAM 末端氨基进行部分修饰, 发现其减轻了树状聚合物产生的非特异性细胞毒性, 因此通过修饰末端氨基降低 G3.0 PAMAM 细胞毒性可能为其应用提供新的思路。LA-PAMAM-Res 和 LA-PAMAM-Res/Res 的抗肿瘤活性较同量的 Res 略有下降, 可能是酯键在体外肿瘤细胞中酯酶的作用没能够完全水解释放。总之, 本实验成功制备了 LA-PAMAM-Res 和 LA-PAMAM-Res/Res 纳米颗粒且初步进行了评价, 其 LA 介导的靶向性还需进一步研究验证。

参考文献

- [1] Naveet P, Archana B. Resveratrol: From enhanced biosynthesis and bioavailability to multitargeting chronic

- diseases [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 2237-2251.
- [2] 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.
- [3] 杜丽芬, 胡建武, 卢立, 等. 白藜芦醇对烟熏和脂多糖诱导大鼠慢性阻塞性肺疾病的改善及肺 Derlin-1 蛋白的调控作用 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(8): 1865-1869.
- [4] 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.
- [5] Said M, Rabiatul B, Shanker K, et al. Potential application of resveratrol in nanocarriers against cancer: Overview and future trends [J]. *J Drug Deliv Sci Tec*, 2019, 53: 1-15.
- [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] 刘兰, 饶智国, 张志敏, 等. 白藜芦醇上调 BTG2 表达抑制肝癌 HepG2 细胞增殖 [J]. 现代肿瘤医学, 2019, 27(20): 17-21.
- [8] Davidov-Pardo G, McClements D J. Resveratrol encapsulation: Designing delivery systems to overcome solubility, stability and bioavailability issues [J]. *Trends Food Sci Tech*, 2014, 38(2): 88-103.
- [9] Van T V, Loi N T, Moon J Y, et al. Core-shell materials, lipid particles and nanoemulsions, for delivery of active anti-oxidants in cosmetics applications: Challenges and development strategies [J]. *Chem Eng J*, 2019, 368: 88-114.
- [10] 王建泽, 颜仁梁, 王兴荣, 等. 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.
- [11] Kumar R, Kaur K, Uppal S, et al. Ultrasound processed nanoemulsion: A comparative approach between resveratrol and resveratrol cyclodextrin inclusion complex to study its binding interactions, antioxidant activity and UV light stability [J]. *Ultrason Sonochem*, 2017, 37: 478-489.
- [12] 成伟业, 陈怡, 张彩云, 等. 白藜芦醇苷固体分散体的制备及体内外评价 [J]. 中草药, 2017, 48(3): 468-473.
- [13] Rushikesh S A, Maya C, Balasubramanian K. Recent advances in dendrimer-based nanoplatform for cancer treatment: A review [J]. *J Pre-Proofs*, 2020, <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109546>.
- [14] Kamruzzaman Selim K M, Ha Y S, Kim S J, et al. Surface modification of magnetite nanoparticles using lactobionic acid and their interaction with hepatocytes [J]. *Biomaterials*, 2007, 28(4): 710-716.
- [15] 常子晨, 刘春艳, 李颖, 等. 聚酰胺-胺树枝状大分子包载白藜芦醇的制备及体外研究 [J]. 中草药, 2019, 50(24): 5963-5969.
- [16] 杨润涛, 周四元, 章翔, 等. 液相色谱-串联质谱法同时测定血浆中白藜芦醇及其代谢产物 [J]. 分析化学, 2007, 35(9): 1309-1313.
- [17] Yang R, Zhang S, Kong D, et al. Biodegradable polymer-curcumin conjugate micelles enhance the loading and delivery of low-potency curcumin [J]. *Pharm Res*, 2012, 29(12): 3512-3525.
- [18] 李磊, 宁俚锋, 王强, 等. 白藜芦醇改性壳聚糖水凝胶的制备及体外释放研究 [J]. 沈阳药科大学学报, 2019, 36(8): 647-654.
- [19] 刘丹, 于丽红, 李磊. 提高白藜芦醇生物利用度的制剂策略 [J]. 医药导报, 2018, 37(3): 333-337.
- [20] 侯迪旭, 王东凯. 关于半固体制剂中药物的体外释放研究进展 [J]. 中国药剂学杂志: 网络版, 2019, 17(4): 135-140.
- [21] 王文龙. 抗肿瘤用白藜芦醇-聚合物载体的制备及其载药性能研究 [D]. 北京: 北京化工大学, 2016.
- [22] Saghir A, Bindu C, Mariam H Y, et al. Chronic administration of nano-sized PAMAM dendrimers *in vivo* inhibits EGFR-ERK1/2-ROCK signaling pathway and attenuate diabetes-induced vascular remodeling and dysfunction [J]. *Nanomed Nanotechnol*, 2019, 18: 78-89.