

## 乳糖酸修饰的黄芩苷自组装胶束载药系统的制备及体外评价

邵艳寻, 郭切切, 张舒迪, 杨雅欣, 龚法伍, 刘占军\*

华北理工大学药学院, 河北 唐山 063210

**摘要:** 目的 制备乳糖酸(lactobionic acid, LA)修饰的O-羧甲基壳聚糖(O-carboxymethyl chitosan, OCMC)偶联黄芩苷(baicalin, BC)的自组装胶束,并考察其作为载体共同递送阿霉素(doxorubicin, DOX)和黄芩苷的可行性。方法 以OCMC为水溶性骨架,通过酰胺化反应依次将黄芩苷、乳糖酸偶联到骨架上,分别获得O-羧甲基壳聚糖-黄芩苷偶联物(CMBC)和靶向的乳糖酸-O-羧甲基壳聚糖-黄芩苷偶联物(LA-CMBC)。利用核磁、红外确证偶联物的结构;透析-超声法制备自组装胶束并表征;芘荧光探针法测定临界聚集浓度(critical micelle concentration, CMC);制备载药胶束 DOX/LA-CMBC,紫外测定阿霉素的包封率和载药量;透析法考察载药胶束在不同pH值条件下的释放行为;MTT法考察体外抗肿瘤活性。结果 为考察取代度对粒径的影响,制备了3种取代度的CMBC胶束,粒径在164~215 nm, LA-CMBC和DOX/LA-CMBC胶束的粒径分别约为156 nm和180 nm。LA-CMBC胶束的CMC值为(0.081±0.019) mg/mL。载药胶束中阿霉素的包封率为(69.67±3.87)%,载药量为(16.08±0.25)%。体外释放表明DOX/LA-CMBC具有缓释性和pH敏感性。细胞毒性实验表明,DOX/LA-CMBC胶束对HepG2肝癌细胞生长具有显著的抑制作用。结论 制备的载药胶束DOX/LA-CMBC粒径均匀、载药量较好,提高了黄芩苷的水溶性,且具有良好的pH敏感性和抗癌活性。

**关键词:** 黄芩苷; O-羧甲基壳聚糖; 偶联物; 乳糖酸; 阿霉素; 自组装胶束

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)20-6216-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.20.011

## Preparation and *in vitro* evaluation of self-assembled micellar drug delivery system of baicalin modified with lactobionic acid

SHAO Yan-xun, GUO Qie-qie, ZHANG Shu-di, YANG Ya-xin, GONG Fa-wu, LIU Zhan-jun

College of Pharmacy, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China

**Abstract: Objective** To prepare a self-assembled micelle of lactobionic acid (LA) modified O-carboxymethyl chitosan (OCMC) coupled with baicalin (LA-CMBC), and investigate the feasibility of using it as a drug carrier for doxorubicin (DOX) and baicalin (BC) delivery. **Methods** Using OCMC as water-soluble skeleton, CMBC and LA-CMBC were obtained by coupling BC and LA to OCMC via amidation reaction. The structure of the conjugate was confirmed by <sup>1</sup>H-NMR and IR. The self-assembled micelles were prepared by dialysis-ultrasonic method. The critical micelle concentration (CMC) of conjugate was determined by pyrene fluorescence probe. The drug-loading micelles (DOX/LA-CMBC) were prepared using LA-CMBC as the carrier. The encapsulation rate and drug loading were measured by UV. The release behavior of DOX/LA-CMBC was investigated by dialysis method. MTT assay was used to evaluate the antitumor activity of drug-loaded micelles *in vitro*. **Results** In order to investigate the effect of substitution degree on particle size, CMBC micelles with three substitution degrees were prepared. The diameters of CMBC micelles ranged from 164 to 215 nm. The particle sizes of LA-CMBC and DOX/LA-CMBC micelles were about 156 nm and 180 nm, respectively. The CMC value of LA-CMBC micelles was (0.081 ± 0.019) mg/mL. The encapsulation efficiency of DOX/LA-CMBC was (69.67 ± 3.87)%, and drug loading was (16.08 ± 0.25)%. *In vitro* release showed that DOX/LA-CMBC micelles had sustained release and pH sensitivity. Cytotoxicity tests showed that DOX/LA-CMBC micelles had significant inhibitory effect on the growth of HepG2 hepatoma cells. **Conclusion** The prepared DOX/LA-CMBC micelles have uniform particle size, good drug loading capacity, improved water solubility of BC, and have good pH sensitivity and anticancer activity.

收稿日期: 2021-05-15

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目(H2018209347); 河北省自然科学基金—石药集团医药联合研究基金优先资助项目(H2021209024)

作者简介: 邵艳寻(1996—),女,硕士研究生,研究方向为药用新材料及药物新剂型。E-mail: lisyx19@sina.com

\*通信作者: 刘占军,男,博士,教授,研究方向为药用新材料及药物新剂型。Tel: (0315)8805809 E-mail: liuzhanjun929@sina.com

**Key words:** baicalin; *O*-carboxymethyl chitosan; conjugates; lactobionic acid; doxorubicin; self-assembled micelles

中医学家发现许多中药材能抑制和减轻化疗药物产生的不良反应,提高治疗效果<sup>[1-2]</sup>。黄芩苷(baicalin, BC)是黄芩的主要有效成分,具有抗菌、抗炎、抗氧化、镇静、降压、免疫抑制等药理作用<sup>[3-4]</sup>。研究<sup>[5-6]</sup>发现,黄芩苷主要影响肿瘤细胞内源性凋亡,通过多种信号通路影响B淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma 2, Bcl-2)家族蛋白、细胞色素C、Caspase-3、Caspase-9等蛋白表达,诱导肝癌细胞凋亡。黄芩苷虽有诸多优势,但其水溶性较差,生物利用度低<sup>[7]</sup>。目前已经开发了一系列载黄芩苷的纳米制剂,包括固体脂质纳米粒、磷脂复合物、共沉淀物、纳米乳<sup>[8-12]</sup>等,但存在工艺复杂、载药量低等问题。阿霉素(doxorubicin, DOX)是一种蒽环类拓扑异构酶抑制剂,可通过下调Bcl-2的蛋白表达以及诱导Wnt通路抑制剂的表达来诱导肝癌细胞凋亡。但是通过单独应用阿霉素,常会因为其较差的器官选择性而引起严重的毒副作用。目前,已有研究发现黄芩苷在肝癌、肺癌、乳腺癌等癌症的化疗中具有辅助治疗的作用,可以减轻不良反应,增强抗癌效果。

自组装胶束作为纳米药物载体,具有内核疏水外壳亲水的结构,能改善难溶性药物的溶解性并实现持续、缓慢的药物释放<sup>[13]</sup>。针对胶束增溶能力强、粒径小、循环时间长等优点<sup>[14-16]</sup>,可通过寻找合适的载体材料设计开发载黄芩苷和阿霉素胶束。*O*-羧甲基壳聚糖(*O*-carboxymethyl chitosan, OCMC)保留了壳聚糖骨架大量的活性氨基,可用于化学修饰进行改造<sup>[17-19]</sup>。由于骨架上同时具有氨基和羧基,在水介质中有两性聚电解质的特性,在骨架上通过疏水修饰可以获得具有pH值敏感的壳聚糖自组装胶束体系。例如将疏水性药物小分子偶联到OCMC骨架上构建自组装前药胶束<sup>[20]</sup>。

乳糖酸(lactobionic acid, LA)可被肝实质细胞膜上的ASGP-R受体特异性识别并通过内吞作用快速摄取<sup>[21-22]</sup>,将其修饰到骨架上会增强载体的靶向递送能力。因而本研究设计合成CMBC及LA-CMBC,并以LA-CMBC为载体制备负载阿霉素的自组装胶束,对其制剂学性质及体外抗肿瘤活性进行考察,以期实现协同效应,为中药与化疗药物的协同抗肝癌研究奠定基础。

## 1 材料与仪器

FTIR-8400S 红外光谱分析仪,日本岛津公司;

ZEN3690 型激光粒度分析仪,英国 Malvern 仪器公司; F-320 荧光分光光度计,天津港东科技股份有限公司; 布鲁克 600 兆核磁共振波谱仪,德国布鲁克仪器公司; JEM-2800F 型聚焦双束扫描电子显微镜(SEM),美国 FEI 仪器有限公司; Lambda 35 紫外可见光分光光度计,珀金埃尔默仪器有限公司; iMark 全自动酶标仪,美国 Bio-Rad 公司。

黄芩苷(质量分数>90%,批号 21967-41-9)、*N*-羟基琥珀酸亚胺(NHS,分析纯)、1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl,分析纯)、乳糖酸(分析纯)、*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF,分析纯)、二甲基亚砷(DMSO,分析纯)、无水乙醇(分析纯)均购于阿拉丁有限公司; OCMC,脱乙酰度>90%,浙江澳兴生物科技有限公司; 盐酸阿霉素,分析纯,天津市福晨化学试剂厂; DMEM 高糖培养基(Eallbio,批号 NG190320EL)、胰酶(Eallbio,批号 N190823CF)、四甲基偶氮唑蓝(MTT, Eallbio,批号 190114)均购于北京中生奥邦生物科技有限公司; 胎牛血清,天津康源生物技术有限公司; 人肝癌细胞 HepG2 获赠于华北理工大学的齐亚娟教授实验室。

## 2 方法与结果

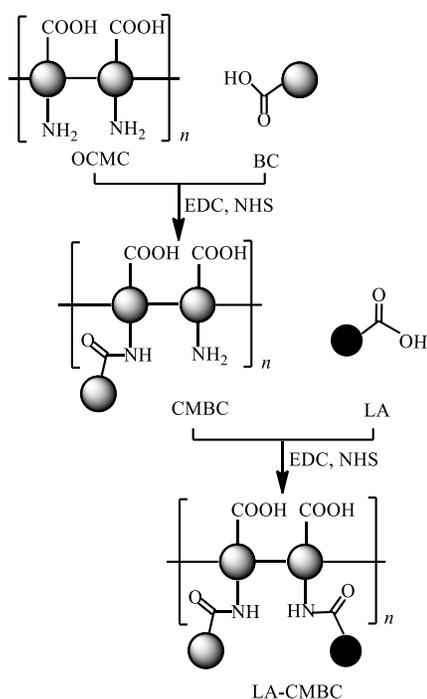
### 2.1 CMBC 的合成

根据文献方法<sup>[13]</sup>利用 EDC/NHS 介导的酰胺化反应,将黄芩苷偶联到 OCMC 骨架上合成 CMBC。称取(76~189 mg 黄芩苷,0.2~0.5 mol OCMC)的黄芩苷溶解于 DMF 中,超声溶解水浴加热至 60 °C,加入相当于黄芩苷 2 倍物质的量的 EDC 和 NHS 进行活化,搅拌 30 min 即得黄芩苷 NHS 活性酯溶液。另称取 200 mg OCMC 溶于蒸馏水中,60 °C 搅拌溶解,加入等量的 DMF 稀释,搅拌均匀。然后逐滴加入上述制备的黄芩苷活性酯溶液,60 °C 反应 4 h 后室温下继续反应 24 h。反应液用透析袋(相对分子质量 8000~14 000)在蒸馏水介质中透析 72 h,冻干即得 CMBC。通过控制黄芩苷和 OCMC 的投料比,可以获得不同黄芩苷取代度的 CMBC。

### 2.2 LA-CMBC 的合成

称取 76 mg (0.25 mol OCMC)的乳糖酸溶于 5 mL 蒸馏水中溶解,加入相当于乳糖酸 2 倍物质的量的 EDC 和 NHS 搅拌 30 min 使乳糖酸的羧基活化。另取冻干的 CMBC 溶于蒸馏水中,搅拌过夜,

将活化后的乳糖酸逐滴加入到 CMBC 水溶液中，室温搅拌 48 h 后，反应液用透析袋在蒸馏水介质中透析 48 h，冻干即得 LA-CMBC。合成路线见图 1。



OCMC 中的球代表糖骨架，黄芩苷中的球代表黄酮类母核及其部分结构 the spheres in OCMC represent the sugar skeleton and the spheres in baicalin represent the parent nucleus and part of the structure of flavonoids

图 1 CMBC 和 LA-CMBC 的合成过程  
Fig. 1 Synthesis of CMBC and LA-CMBC

### 2.3 偶联物的表征及结果

**2.3.1 核磁共振氢谱 (<sup>1</sup>H-NMR) 检测及结果** 以氘代 DMSO 和 D<sub>2</sub>O 为溶剂，分别对黄芩苷、OCMC 进行 <sup>1</sup>H-NMR 分析；以混合溶剂 (D<sub>2</sub>O-氘代 DMSO 1 : 1) 对 CMBC 和 LA-CMBC 进行 <sup>1</sup>H-NMR 分析。结果发现，图 2 中 OCMC 在 δ 3.29~4.00 显示出糖环骨架质子较宽的吸收峰。δ 2.00 处的特征峰归属于 N-乙酰葡萄糖胺上的甲基氢。相比于 OCMC 在 δ 6.75~8.00 出现的新的吸收峰，归属于黄酮类母核上的氢，其中在 δ 6.11~7.40 处是苯环上氢的吸收峰，证实了黄芩苷成功地偶联到了 OCMC 骨架上。图 2 显示乳糖酸偶联至 CMBC 之后，在 δ 3.34~4.32 出现了许多新的小峰，归属于乳糖酸环上的亚甲基峰。

**2.3.2 红外光谱 (IR) 检测及结果** 采用 IR 法对 OCMC、CMBC 和 LA-CMBC 进行表征。结果 (图 3) 显示，OCMC 在 1602 cm<sup>-1</sup> 的特征吸收谱带为酰胺 II 谱带，对应于伯氨基上 N-H 的弯曲振动，酰胺 I 谱带是 C=O 的伸缩振动吸收峰，波数稍高 (1650

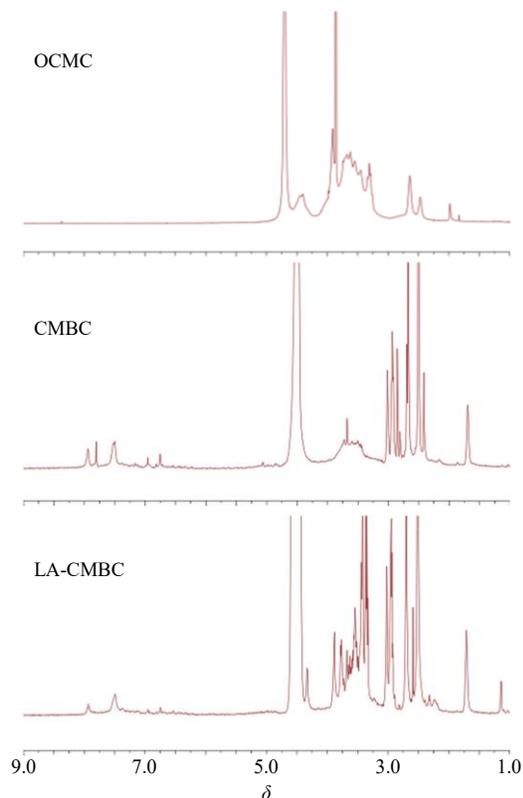


图 2 OCMC、CMBC 和 LA-CMBC 的 <sup>1</sup>H-NMR  
Fig. 2 <sup>1</sup>H-NMR spectrum of OCMC, CMBC and LA-CMBC

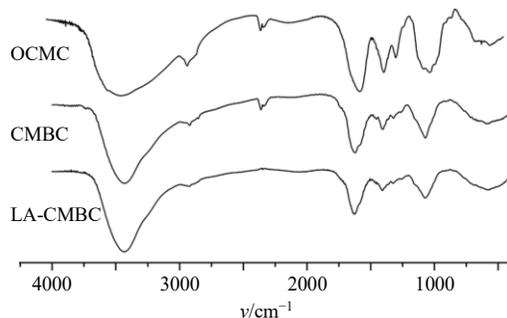


图 3 OCMC、CMBC 和 LA-CMBC 的 IR 图  
Fig. 3 Infrared spectrum of OCMC, CMBC and LA-CMBC

cm<sup>-1</sup>)，由于 1602 cm<sup>-1</sup> 处吸收峰较大，因此使得酰胺 I 谱带和酰胺 II 谱带的吸收峰区分并不明显，说明 OCMC 的脱乙酰化程度较高，活性氨基较多。产物 CMBC 与 OCMC 图谱相比，出现了 2 个区分明显的吸收峰，位于 1602 cm<sup>-1</sup> 的酰胺 II 谱带吸收峰强度明显降低，而位于 1650 cm<sup>-1</sup> 的酰胺 I 谱带吸收峰则相反的呈现增强趋势，说明形成了更多的酰胺键，使得黄芩苷与 OCMC 骨架偶联。终产物 LA-CMBC 与 CMBC 相比，位于 1602 cm<sup>-1</sup> 的酰胺 II 谱带吸收峰强度进一步降低，而酰胺 I 谱带进一步增强，因此同样证实乳糖酸也是通过酰胺键与 OCMC 骨架偶联的。

### 2.3.3 CMBC 取代度的测定及结果

(1) 黄芩苷分析方法的建立: 采用紫外分光光度法测定黄芩苷的取代度。以无水乙醇为溶剂, 配制一定质量浓度的黄芩苷溶液, 在 200~600 nm 进行紫外光谱扫描。取少量 OCMC、CMBC 水溶液, 分别用无水乙醇稀释至适当质量浓度进行光谱扫描, 结果见图 4。

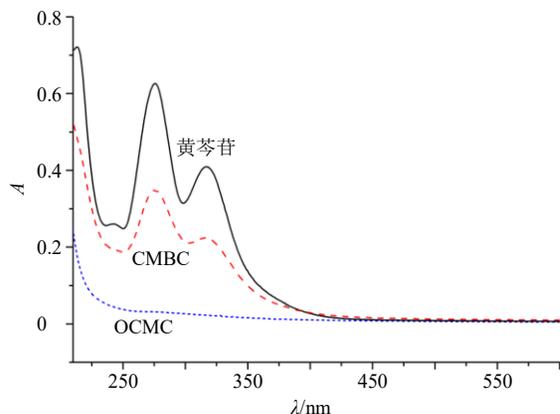


图 4 黄芩苷、CMBC 和 OCMC 的紫外扫描图谱

Fig. 4 UV scanning atlas of baicalin, CMBC and OCMC

可以看出, 黄芩苷有 2 处明显吸收, 最大吸收波长是 278 nm。而 OCMC 在此范围内均无吸收, 说明 OCMC 材料对黄芩苷的紫外吸收没有任何影响。而且, 偶联物 CMBC 显示出了跟黄芩苷峰形一致的吸收。因此, 可以确定将 278 nm 作为检测 CMBC 中黄芩苷含量的检测波长, 且进一步证明了黄芩苷成功修饰到了 OCMC 骨架材料上。

(2) 黄芩苷标准曲线建立: 以无水乙醇为溶剂, 配制质量浓度分别为 4.10、5.13、6.15、7.18、8.20、9.23  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的黄芩苷系列标准溶液, 于 278 nm 处测定各吸光度值。回归方程为  $Y=0.0741X-0.0433$ ,  $r^2=0.9974$ 。

(3) 黄芩苷取代度的测定结果: 黄芩苷的取代度规定为每 100 个 OCMC 重复单元中氨基连接黄芩苷的个数。在 CMBC 合成中, 通过控制黄芩苷和 OCMC 的投料比可以得到不同取代度的 CMBC, 即 CMBC-1、CMBC-2、CMBC-3。称取 3 种 CMBC 各 1 mg 至 5 mL 量瓶中, 无水乙醇溶解定容, 分别在 278 nm 下测定吸光度, 计算取代度。

$$\text{取代度} = m M_{\text{OCMC}} / (m_{\text{样品}} - m) M_{\text{黄芩苷}}$$

$m$  指通过黄芩苷标准曲线计算出的 CMBC 偶联物中黄芩苷的质量,  $M_{\text{黄芩苷}}$  指黄芩苷的相对分子质量;  $m_{\text{样品}}$  指加入的 CMBC 总质量,  $M_{\text{OCMC}}$  指 OCMC 单位糖单元的摩尔分数

从表 1 中看出, 在黄芩苷投料比达到 0.35 时,

表 1 黄芩苷和 OCMC 投料比及黄芩苷的取代度 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Table 1 Feeding ratio of baicalin and OCMC and substitution degree of BC ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

样品	黄芩苷与 OCMC 物质的量比	取代度/%
CMBC-1	0.20 : 1	8.3 $\pm$ 0.8
CMBC-2	0.35 : 1	12.5 $\pm$ 1.1
CMBC-3	0.50 : 1	14.2 $\pm$ 1.6

已经有足够多的黄芩苷偶联到了 OCMC 上。因此, 在偶联乳糖酸时为了能有较多的乳糖酸偶联到 CMBC 产物上, 选用 CMBC-2 用于乳糖酸的接枝。

### 2.4 自组装胶束的制备及表征

采用透析-超声法制备自组装胶束。由于 CMBC 和 LA-CMBC 均为两亲性偶联物, 所以两者在水中透析的过程中就会自组装形成纳米胶束, 为了使纳米颗粒分散均匀, 再用探头式超声在冰浴条件下超声处理 3 次, 每次处理 2 min, 超声程序设置为开 2 s 停 4 s, 超声功率为 120 W。然后过 0.45  $\mu\text{m}$  的滤膜, 即得自组装胶束 (图 5), 于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

采用激光粒度电位分析仪测定胶束的粒径、多分散指数 (polydispersity index, PDI) 和 Zeta 电位, 结果见表 2 和图 6。采用 SEM 观察胶束的形貌大小, 结果见图 7。

3 种 CMBC 胶束粒径在 164~215 nm, 随着黄芩苷取代度的增加, 胶束粒径逐渐减小。这是因为疏水基团越多, 形成的疏水性内核就更紧密, 粒径更小。LA-CMBC-2 胶束粒径约为 156 nm, 可以满足肝靶向制剂要求, 粒径小于 CMBC-2 胶束, 推测可能是水溶性乳糖酸的引入使 OCMC 骨架柔性增强, 更易弯曲缠绕成粒径更小的粒子。2 自组装体系均显示出负值的 Zeta 电位, 说明在自组装的过程中, 带负电荷的亲水性 OCMC 可以较为均匀分布



图 5 CMBC 胶束 (左)、LA-CMBC 胶束 (中) 和 LA-CMBC 冻干物 (右)

Fig. 5 CMBC micelles (left), LA-CMBC micelles (middle), and LA-CMBC lyophilized products (right)

表 2 3 种不同取代度的 CMBC 和 LA-CMBC 的粒径、PDI 和 Zeta 电位 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Partical size, PDI and Zeta potential of CMBC and LA-CMBC with three different degree of substitution ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

样品	取代度/%	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
CMBC-1	8.3	215.0±4.8	0.112±0.030	-17.02±0.29
CMBC-2	12.5	181.1±3.7	0.094±0.021	-17.16±0.75
CMBC-3	14.2	164.7±6.5	0.163±0.035	-17.24±0.82
LA-CMBC-2	-	156.3±6.4	0.131±0.087	-14.47±0.51

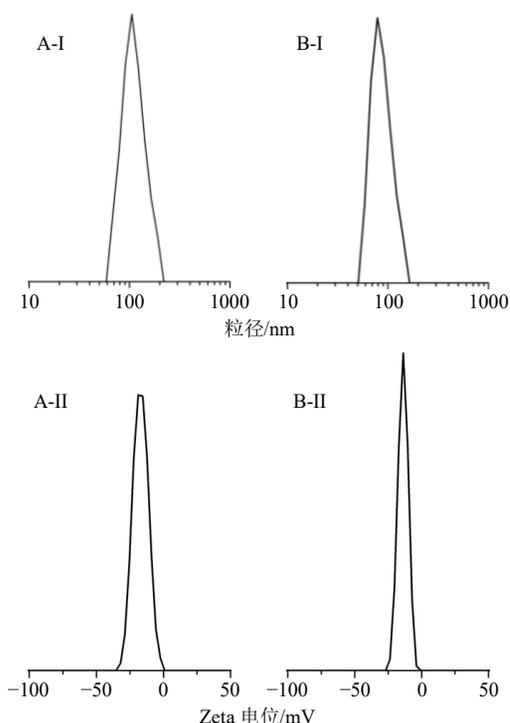


图 6 CMBC-2 (A)、LA-CMBC-2 (B) 的粒径分布 (I) 和 Zeta 电位 (II)

Fig. 6 Particle size distribution (I) and Zeta potential (II) of CMBC-2 (A) and LA-CMBC-2 (B)

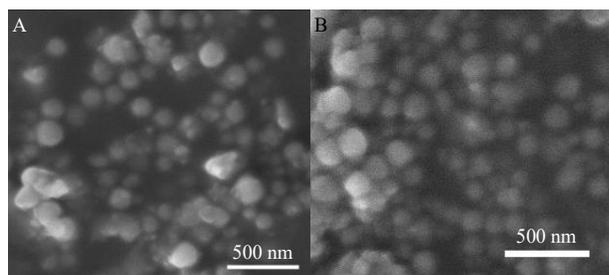


图 7 CMBC-2 (A)、LA-CMBC-2 (B) 的扫描电镜图

Fig. 7 SEM images of CMBC-2 (A) and LA-CMBC-2 (B)

在偶联物的表面,也间接证实了自组装体系的形成。通过 SEM 观察到的自组装胶束为形状较规则的类

球形,粒径大小较均一,实际观察到的粒径约为 150 nm,比粒度电位分析仪测定的粒径稍小。这是因为 SEM 样品在预处理过程中因干燥导致粒子失水,从而使电镜下呈现的粒径比其在粒度仪(水介质体系)中的数据要稍小一些,此现象与文献报道一致<sup>[23]</sup>。

## 2.5 临界胶束浓度 (critical micelle concentration, CMC) 的测定及结果

LA-CMBC 在水中的自组装行为采用芘荧光探针法进行考察。配制质量浓度为 0.012 mg/mL 的芘溶液和 1 mg/mL 的 LA-CMBC 母液。取 8 个棕色样品瓶,各加入 100  $\mu$ L 芘溶液,氮气吹干后各加入不同体积的 LA-CMBC 母液,蒸馏水定容至 10 mL。使所配制的系列溶液质量浓度分别为 0.001、0.005、0.010、0.025、0.050、0.100、0.250、0.500 mg/mL。水浴超声 40 min,室温避光静置 8 h。荧光分光光度计的激发波长为 334 nm,测定各溶液中芘的荧光吸收,将芘的第 3 个峰的谱带强度与第 1 个峰的谱带强度之比 ( $I_3/I_1$ ) 对质量浓度的对数做图,交点处对应的质量浓度即为胶束的 CMC 值。

测得 LA-CMBC 胶束的 CMC 值为 (0.081  $\pm$  0.019) mg/mL (图 8),说明 LA-CMBC 在水中容易聚集形成纳米粒,并且进入血管后可以抵抗大量的血液稀释,是一种良好的两亲性偶联物。

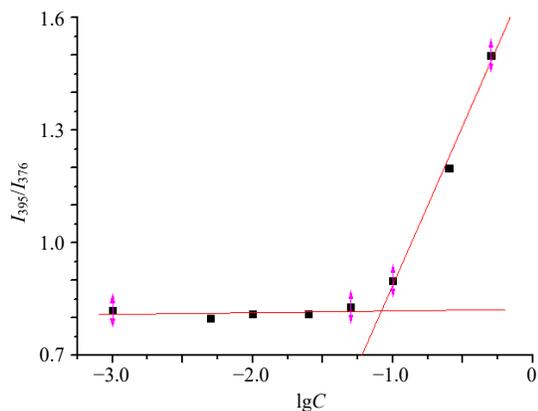


图 8 芘发射光谱荧光强度比值  $I_3/I_1$  和胶束质量浓度 ( $C$ ) 的对数关系图 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 8 Logarithmic relationship between pyrene emission spectral fluorescence intensity ratio  $I_3/I_1$  and micelle concentration ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

## 2.6 载药胶束 DOX/LA-CMBC 的制备、含量测定、体外释放及结果

### 2.6.1 载药胶束的制备

采用透析法制备 DOX/LA-CMBC 胶束。称取 DOX·HCl 3 mg 溶于 5 mL DMSO,加入 2 倍物质的量的三乙胺进行脱盐酸处

理, 避光搅拌过夜。另取 LA-CMBC 10 mg 溶于 5 mL 蒸馏水, 搅拌过夜使之充分溶胀溶解。将阿霉素溶液缓慢滴加到 LA-CMBC 水溶液中, 继续避光搅拌 24 h 后对蒸馏水透析 24 h。将溶液用探头超声处理, 过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜即得。

**2.6.2 阿霉素含量测定方法的建立** 采用紫外分光光度法测定胶束制剂中阿霉素的含量。

(1) 阿霉素对照品储备液的制备: 以 DMSO 为溶剂配制 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的阿霉素对照品储备液, 避光备用。

(2) 检测波长的确定: 分别取适量阿霉素储备液、CMBC、LA-CMBC 胶束溶液用 DMSO 稀释至适当质量浓度, 在 280~600 nm 扫描其紫外吸收光谱。如图 9 可见, 阿霉素在 481 nm 处有一比较大的特征吸收峰, 偶联物 CMBC 和 LA-CMBC 在 481 nm 处均无吸收, 说明选用 LA-CMBC 作为载体不会影响阿霉素的紫外吸收, 因此, 选用 481 nm 作为阿霉素定量测定的检测波长。

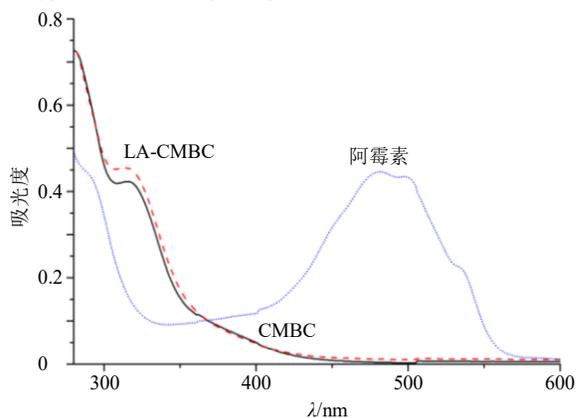


图 9 阿霉素、CMBC、LA-CMBC 溶液的紫外扫描图谱  
Fig. 9 Ultraviolet scanning atlas of doxorubicin, CMBC and LA-CMBC solutions

(3) 标准曲线的建立: 取阿霉素对照品储备液用 DMSO 分别稀释配制成质量浓度为 5、10、15、20、30、40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的系列对照品溶液。于 481 nm 处测定吸光度值, 绘制标准曲线, 进行线性回归, 得到阿霉素标准曲线的回归方程为  $Y=0.0192X+0.0045$ ,  $R^2=0.9994$ 。可见阿霉素在 5~40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  线性关系良好。

(4) 精密度的试验: 取阿霉素储备液用 DMSO 稀释成 5、20、40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的阿霉素供试液, 用紫外在同天内每个质量浓度测量 5 次得到日内精密度; 连续测定 5 d, 得日间精密度。计算出低、中、高 3 种质量浓度的阿霉素供试液的日内 RSD 分别为

1.83%、0.95%、0.68%; 日间 RSD 分别为 1.98%、1.52%、1.27%, 均小于 2.0%, 满足分析测试的要求。

(5) 回收率试验: 分别配制 250、1000、2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的阿霉素溶液各 5 份, 各取 0.2 mL, 加入处方比例的 LA-CMBC 胶束溶液混匀后用 DMSO 定容至 10 mL, 即得质量浓度分别为 5、20、40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的阿霉素供试液, 紫外测定各吸光度值, 计算阿霉素的回收率, 分别为 98.83%、101.19%、100.79%, 说明阿霉素与 LA-CMBC 胶束溶液不发生吸附作用, 可认为该载体对药物含量测定没有影响, 该方法可行。

(6) 稳定性试验: 按“2.6.1”项下方法制备阿霉素浓度为 5、20、40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的载药胶束供试液, 分别在室温下于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 测定紫外吸收。结果显示, 3 种质量浓度的供试液在 24 h 内的 RSD 分别为 1.24%、1.68%、1.52%, 表明在 24 h 内供试液稳定性良好。

(7) 重复性试验: 按“2.6.1”项下方法制备 6 份样品溶液, 分别进行紫外测定, 计算 RSD 值, 考察重复性, 结果 RSD 为 1.49%, 表明该方法重复性良好。

**2.6.3 载药胶束中阿霉素的含量测定及结果** 量取载药胶束 0.5 mL 于 10 mL 量瓶中, 加入 DMSO 超声混匀并定容至刻度, 按“2.6.2”项下的方法测定吸光度值, 测得载药胶束中阿霉素的包封率为  $(69.67 \pm 3.87)\%$ , 载药量为  $(16.08 \pm 0.25)\%$  ( $n=3$ ) (由于阿霉素是以疏水性小分子包载于自组装胶束中, 其本身溶解度很低, 故不考虑极少量游离阿霉素的量)。

$$\text{包封率} = m_1/m_2$$

$$\text{载药量} = m_1/m_{\text{总}}$$

$m_1$  为阿霉素在自组装胶束中的量,  $m_2$  为阿霉素的投料量,  $m_{\text{总}}$  为载药胶束的总质量

**2.6.4 DOX/LA-CMBC 载药胶束的理化性质考察及结果** 取适量载药胶束溶液用蒸馏水稀释后, 利用马尔文粒度仪检测, 结果见图 10。测得 DOX/LA-CMBC 载药胶束的平均粒径为  $(180.2 \pm 6.7)$  nm, PDI 为  $0.140 \pm 0.003$ , Zeta 电位为  $(-16.14 \pm 0.25)$  mV ( $n=3$ )。

**2.6.5 不同 pH 值环境下载药胶束中阿霉素、黄芩苷的体外释放及结果** 采用透析法, 选取不同 pH 值 (5.8、6.5、7.4) 的 PBS 溶液作为释放介质, 采用荧光分光光度法测定阿霉素在 3 种不同 pH 值 PBS 溶

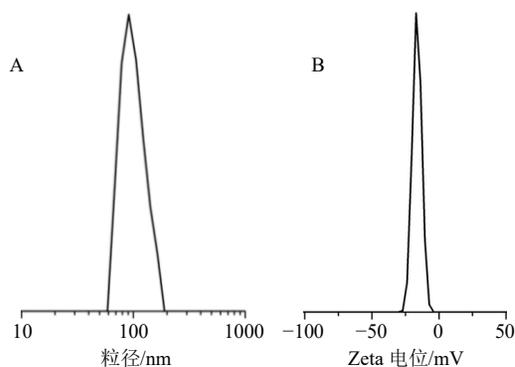


图 10 DOX/LA-CMBC 的粒径分布 (A) 和 Zeta 电位 (B)  
Fig. 10 Particle size distribution (A) and Zeta potential (B) of DOX/LA-CMBC

液中的标准曲线, 结果分别为阿霉素荧光强度 ( $F$ , pH 5.8) =  $163.62X + 2.4759$ ,  $R^2 = 0.9995$ ;  $F$  (pH 6.5) =  $158.09X + 0.1669$ ,  $R^2 = 0.9991$ ;  $F$  (pH 7.4) =  $143.06X + 1.2571$ ,  $R^2 = 0.9994$ ; 结果表明阿霉素在 0.02~0.80  $\mu\text{g/mL}$  荧光强度与质量浓度线性均良好。采用紫外法测定黄芩苷在 3 种 PBS 溶液中的标准曲线, 结果分别为  $Y$  (pH 5.8) =  $0.0684X - 0.0061$ ,  $R^2 = 0.9991$ ;  $Y$  (pH 6.5) =  $0.0668X - 0.0014$ ,  $R^2 = 0.9990$ ;  $Y$  (pH 7.4) =  $0.0640X + 0.0031$ ,  $R^2 = 0.9991$ ; 结果表明黄芩苷在 0.1~20.0  $\mu\text{g/mL}$  线性关系良好。

量取 DOX/LA-CMBC 溶液 1 mL, 置于透析袋内, 密封好后浸入含 20 mL 释放介质的锥形瓶中, 在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、100 r/min 转速的条件下进行体外释放实验。在预设时间点取样 1 mL, 并同时补充等体积新鲜的释放介质。计算累积释放量, 分别作阿霉素、黄芩苷的体外释放曲线 (图 11)。从释药曲线看出, 胶束中阿霉素的释放均较为缓慢、持久, 无明显突释现象。还表现出 pH 值敏感性, 即在较低 pH 值条件下释放较快且多, 在较高 pH 值条件下, 释放较缓慢且较少。胶束中的黄芩苷在 pH 7.4 条件下只释放了 26.16%, 在 pH 6.5 条件下释放了 38.24%, 虽然比 pH 7.4 下释放较快, 但是释放量依然较少, 说明胶束在到达肿瘤部位前可以较好的保持结构的稳定性。而在 pH 5.8 条件下不仅释放快, 释放量还达到了 68.45%, 说明胶束到达肿瘤部位时, 胶束体系瓦解, 酰胺键快速水解从而释放出黄芩苷。总之, 阿霉素、黄芩苷的释放行为一致, 均表现为 pH 值敏感性。

### 2.7 体外抗肿瘤活性检测及结果

采用 MTT 法检测胶束制剂的细胞毒性。实验

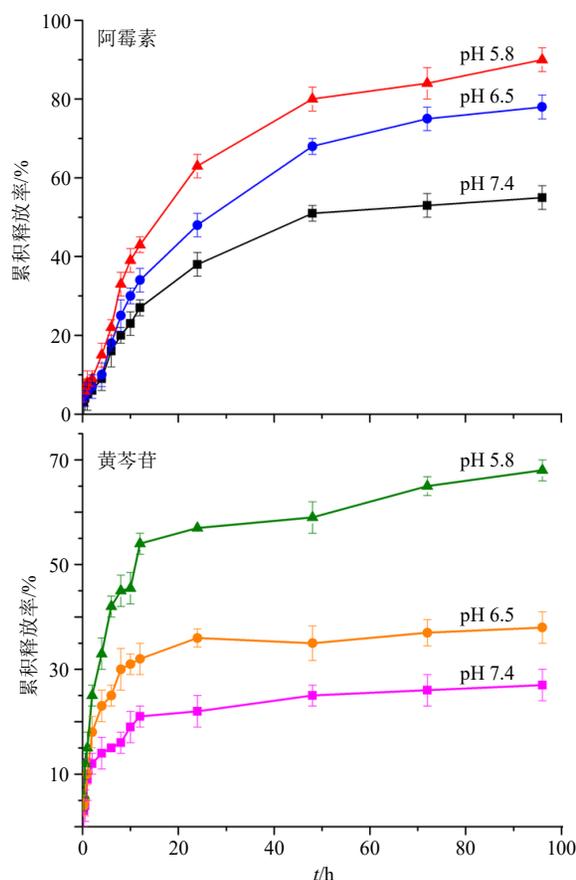


图 11 载药胶束中阿霉素和黄芩苷在不同 pH 值释放介质中的释药曲线 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

Fig. 11 Drug release curves of doxorubicin and baicalin in drug-loading micelles in different pH release media ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

中考察的黄芩苷的质量浓度分别为 0.25、0.50、1.00、5.00、10.00  $\mu\text{g/mL}$ 。简而言之, 将 HepG2 细胞以  $5 \times 10^3$  个/孔的密度接种于 96 孔板中培养过夜, 试验组分别加入不同质量浓度的黄芩苷、阿霉素、CMBC、LA-CMBC 和 DOX/LA-CMBC 溶液, 对照组加入等体积培养液, 每组 5 个复孔后培养 48 h, 之后弃培养液, 每孔加 10  $\mu\text{L}$  MTT (5 mg/mL) 和 190  $\mu\text{L}$  培养液后培养 4 h, 终止培养并弃上清, 每孔加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO, 避光震荡 10 min 后于 570 nm 处测吸光度, 计算细胞生长抑制率。

$$\text{细胞生长抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{试验}}) / A_{\text{对照}}$$

由表 3 看出, 纯阿霉素对 HepG2 细胞生长抑制作用最强, 黄芩苷、CMBC 及 LA-CMBC 对细胞均有一定的抑制作用, 并与浓度成依赖性。在实验浓度下, 黄芩苷的抑制率从 5% 升至 35%, CMBC 抑制率从 10% 升至 46%, LA-CMBC 抑制率从 14% 升至 51%, 表明与黄芩苷相比, CMBC 与 LA-CMBC

表3 黄芩苷、阿霉素、CMBC、LA-CMBC 和 DOX/LA-CMBC 对 HepG2 细胞的生长抑制率 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
 Table 3 Growth inhibition rate of baicalin, doxorubicin, CMBC, LA-CMBC and DOX/LA-CMBC on HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

样品	细胞生长抑制率/%				
	0.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0.50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	1.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	5.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	10.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
黄芩苷	5.1 $\pm$ 1.2	9.0 $\pm$ 0.5	15.2 $\pm$ 1.4	28.2 $\pm$ 0.7	35.4 $\pm$ 1.0
阿霉素	35.0 $\pm$ 2.4	53.4 $\pm$ 1.5	62.3 $\pm$ 2.0	73.1 $\pm$ 1.6	79.2 $\pm$ 1.2
CMBC	10.4 $\pm$ 2.2	12.1 $\pm$ 1.7*	20.6 $\pm$ 2.5*	33.3 $\pm$ 1.3*	46.0 $\pm$ 1.7*
LA-CMBC	14.2 $\pm$ 1.6	15.1 $\pm$ 1.9*#	25.6 $\pm$ 2.4*#	40.5 $\pm$ 1.0*#	51.3 $\pm$ 1.5*#
DOX/LA-CMBC	28.3 $\pm$ 2.1*#	31.1 $\pm$ 1.6*#	47.6 $\pm$ 1.2**#	63.5 $\pm$ 1.8**#	70.2 $\pm$ 0.9**#

与黄芩苷组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ ; 与 CMBC 组比较: # $P < 0.05$   
 \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs baicalin group; # $P < 0.05$  vs CMBC group

的抑制率均高于黄芩苷 ( $P < 0.05$ ), 表明黄芩苷作为疏水端包裹于胶束中能显著提高其抗肿瘤效果。且 LA-CMBC 与 CMBC 相比, 差异具有显著性 ( $P < 0.05$ ), 可认为 LA-CMBC 比 CMBC 有较强抑制作用, 一定程度上表明了乳糖酸的靶向作用。在胶束质量浓度为 1~10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  内, DOX/LA-CMBC 的抑制作用最强 ( $P < 0.01$ ), 说明以 LA-CMBC 为载体共同递送阿霉素和黄芩苷可行。

### 3 讨论

本研究在 OCMC 偶联黄芩苷形成的前药基础上进行靶向修饰, 获得 LA-CMBC 并以其为载体制备载药胶束, 实现黄芩苷与阿霉素的共同递送, 所制备的胶束具有较好的制剂学性质。图 12 为 DOX/LA-CMBC 胶束形成示意图。OCMC 骨架构成亲水性外壳, 增加了胶束的血液循环时间, 在胶束表面形成水化层而阻止血浆调理素等蛋白吸附在胶束表

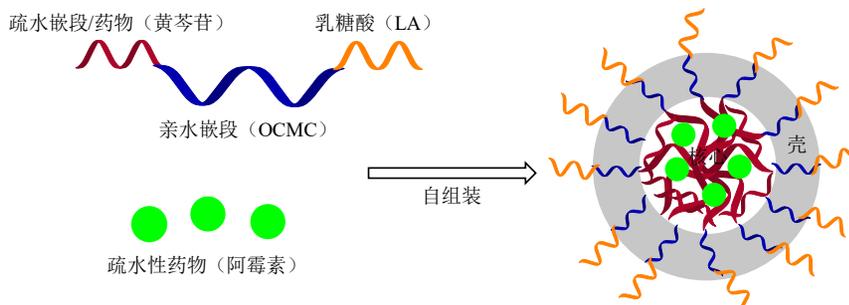


图 12 DOX/LA-CMBC 载药胶束形成示意图

Fig. 12 Schematic diagram of DOX/LA-CMBC drug-carrying micelle formation

面, 避免被网状内皮系统吞噬<sup>[2]</sup>。疏水性药物黄芩苷缔合为疏水内核同时作为一种药物, 与阿霉素共同递送来发挥协同抗癌作用。

在考察胶束体外释放时发现当释放介质 pH 值为 5.8 时, 胶束体系出现浑浊现象, 但全程未见有明显的沉淀, 推测在酸性条件下胶束体系稳定性下降, 从而使体系趋于瓦解, 但并未达到彻底裂解、聚集并沉淀的程度, 这与文献报道一致<sup>[13]</sup>。

细胞毒性实验表明, 纯阿霉素对 HepG2 细胞生长抑制作用最强, 这是因为纯阿霉素溶液通过自由扩散进入细胞, 而胶束通过靶向作用及实体瘤的高通透性和滞留效应 (EPR 效应) 到达肿瘤环境并存在缓慢的胞内释药行为, 所以使进入并富集于细胞的

药量少于纯阿霉素, 但是阿霉素选择性差, 毒副作用大。CMBC 和 LA-CMBC 的抑制作用比 DOX/LA-CMBC 的弱, 这是由于后者除了有乳糖酸介导的靶向作用还会通过体系瓦解、酰胺键水解释放 DOX、黄芩苷 2 种药物, 且据文献数据<sup>[1,24]</sup>推测 2 药物可能具有协同的抗肝癌作用。具体机制如下: 褚冬青等<sup>[25]</sup>发现将黄芩苷与 DOX 联用可以诱导舌癌细胞凋亡, 并且协同增效机制可以下调 Bcl-2、磷酸化粘着斑激酶 (phosphorylated focal adhesion kinase, p-FAK) 及磷酸化酪氨酸蛋白激酶 (phosphorylated tyrosine protein kinase, p-Src) 蛋白表达; 郁洁雯等<sup>[26]</sup>将黄芩苷与阿霉素联用抑制脑神经胶质瘤细胞, 其效果优于单个药物治疗, 可见二者联合应用具有协

同抗肿瘤作用。肿瘤的发生从来都不是一种基因异常造成的,联合给药才可增强药效。黄芩苷可以阻滞 HepG2 肝癌细胞在 S 期,通过促进人肝癌细胞的 E-钙黏蛋白(E-cadherin, E-cd)表达,抑制整合素- $\beta$ 1(integrin- $\beta$ 1)表达、信号转导和转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)mRNA 和蛋白的表达以及抑制 STAT3 蛋白的磷酸化,从而抑制肿瘤细胞的增殖<sup>[27]</sup>。阿霉素可通过下调 Bcl-2 的蛋白表达以及诱导 Wnt 通路抑制剂的表达来诱导肝癌细胞凋亡<sup>[28]</sup>。可见黄芩苷和阿霉素可以通过不同的作用机制诱导肝癌细胞凋亡。故本研究推测,当胶束通过主动靶向作用及 EPR 效应到达肿瘤环境释放黄芩苷、阿霉素时,两者可以发生协同作用。本研究将在动物水平上继续考察两者的协同效应,为中草药与化疗药物的协同抗肝癌研究奠定基础。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Zhou X, Fu L, Wang P, *et al.* Drug-herb interactions between *Scutellaria baicalensis* and pharmaceutical drugs: Insights from experimental studies, mechanistic actions to clinical applications [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 138: 111445.
- [2] 马文转,王金铃,屠鹏飞. 黄芩苷纳米胶束的制备、表征及其对 MCF-7 细胞抑制作用的研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(4): 507-512.
- [3] Zhang H Q, Zhao L L, Chu L J, *et al.* Preparation, optimization, characterization and cytotoxicity *in vitro* of baicalin-loaded mixed micelles [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2014, 434: 40-47.
- [4] 龙宇,向燕,谭裕君,等. 黄芩苷药理作用及新剂型的研究进展 [J]. *中草药*, 2019, 50(24): 6142-6148.
- [5] Gao C, Zhou Y, Li H, *et al.* Antitumor effects of baicalin on ovarian cancer cells through induction of cell apoptosis and inhibition of cell migration *in vitro* [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6): 8729-8734.
- [6] Wang H W, Li H L, Qin C F, *et al.* Baicalin extracted from Huang Qin (*Radix Scutellariae Baicalensis*) induces apoptosis in gastric cancer cells by regulating B cell lymphoma (Bcl-2)/Bcl-2-associated X protein and activating caspase-3 and caspase-9 [J]. *J Tradit Chin Med*, 2017, 37(2): 229-235.
- [7] 赵炎军,王建平,吴凡,等. 黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束的制备、表征及在急性心肌缺血模型大鼠体内的组织分布 [J]. *中草药*, 2018, 49(18): 4269-4276.
- [8] Wang B, Zhang W, Zhou X, *et al.* Development of dual-targeted nano-dandelion based on an oligomeric hyaluronic acid polymer targeting tumor-associated macrophages for combination therapy of non-small cell lung cancer [J]. *Drug Deliv*, 2019, 26(1): 1265-1279.
- [9] Kumar V, Leekha A, Kaul A, *et al.* Role of folate-conjugated glycol-chitosan nanoparticles in modulating the activated macrophages to ameliorate inflammatory arthritis: *In vitro* and *in vivo* activities [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2020, 10(4): 1057-1075.
- [10] Gong J, Chen M, Zheng Y, *et al.* Polymeric micelles drug delivery system in oncology [J]. *J Control Release*, 2012, 159(3): 312-323.
- [11] 严红梅,张振海,蒋艳荣,等. 黄芩苷-Eudragit L100-55 肠溶固体分散体制备及其体外释放度评价 [J]. *中草药*, 2013, 44(20): 2841-2844.
- [12] Rösler A, Vandermeulen G W, Klok H A. Advanced drug delivery devices via self-assembly of amphiphilic block copolymers [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 53(1): 95-108.
- [13] 杜洪亮. 基于甘草次酸修饰自组装胶束递药系统的研究 [D]. 济南: 山东大学, 2017.
- [14] Chai Z, Teng C, Yang L, *et al.* Doxorubicin delivered by redox-responsive hyaluronic acid-Ibuprofen prodrug micelles for treatment of metastatic breast cancer [J]. *Carbohydr Polym*, 2020, 245: 116527.
- [15] 张海群. 黄芩苷口服混合胶束制剂的研究 [D]. 济南: 山东大学, 2015.
- [16] Wu H, Liu Z, Peng J, *et al.* Design and evaluation of baicalin-containing *in situ* pH-triggered gelling system for sustained ophthalmic drug delivery [J]. *Int J Pharm*, 2011, 410(1/2): 31-40.
- [17] Zhou J, Ma S, Zhang Y, *et al.* Bacterium-mimicking sequentially targeted therapeutic nanocomplexes based on O-carboxymethyl chitosan and their cooperative therapy by dual-modality light manipulation [J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 264: 118030.
- [18] Hao R, Peng X, Zhang Y, *et al.* Rapid hemostasis resulting from the synergism of self-assembling short peptide and O-carboxymethyl chitosan [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12(50): 55574-55583.
- [19] 郭和坚. 肝靶向羧甲基壳聚糖衍生物自组装纳米粒给药系统的研究 [D]. 济南: 山东大学, 2014.
- [20] Majumder N, G Das N, Das S K. Polymeric micelles for anticancer drug delivery [J]. *Ther Deliv*, 2020, 11(10): 613-635.
- [21] Hyung Park J, Kwon S, Lee M, *et al.* Self-assembled nanoparticles based on glycol chitosan bearing hydrophobic moieties as carriers for doxorubicin: *In vivo*

- biodistribution and anti-tumor activity [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(1): 119-126.
- [22] Li T, Wang P, Guo W, *et al.* Natural berberine-based Chinese herb medicine assembled nanostructures with modified antibacterial application [J]. *ACS Nano*, 2019, 13(6): 6770-6781.
- [23] Jiang G B, Quan D P, Liao K R, *et al.* Preparation of polymeric micelles based on chitosan bearing a small amount of highly hydrophobic groups [J]. *Carbohydr Polym*, 2006, 66(4): 514-520.
- [24] Zheng J, Asakawa T, Chen Y Y, *et al.* Synergistic effect of baicalin and adriamycin in resistant HL-60/ADM leukaemia cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(1): 419-430.
- [25] 褚冬青, 马春宇. 黄芩苷增强阿霉素抗人舌癌细胞活性及其机制研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2019, 30(9): 1062-1068.
- [26] 郁洁雯, 曲培艺, 王琳. 黄芩苷联合阿霉素抗脑神经胶质瘤细胞的活性研究 [J]. *广东化工*, 2020, 47(23): 39-40.
- [27] 王白燕, 李淑贤, 韩倩倩, 等. 黄芩苷抗肿瘤作用研究进展 [J]. *中国现代医药杂志*, 2020, 22(8): 101-103.
- [28] 王新, 李德华. 阿霉素诱导肿瘤细胞凋亡机制的研究进展 [J]. *中国实用医药*, 2010, 5(7): 247-249.

[责任编辑 郑礼胜]