

反式西红花酸-环糊精包合物的制备、表征、安全性和抗肿瘤评价

刘雪城^{1,2}, 丁平刚¹, 金皓洁², 何凌云^{2*}, 刘陶世^{1*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 南京艾德凯腾生物医药有限责任公司, 江苏 南京 211100

摘要: 目的 制备难溶性药物反式西红花酸(*trans*-crocetin, TC)与甲基- β -环糊精(methyl- β -cyclodextrin, M β CD)的包合物(TC-M β CD), 并评价包合物对 TC 溶解度、安全性和有效性的影响。方法 采用单因素实验和 Box-Behnken 响应面法筛选环糊精种类等工艺参数, 采用冷冻干燥法制备 TC-M β CD。采用扫描电子显微镜(SEM)、UV 法、体外释放度测定法对 TC-M β CD 包合物进行表征, 采用 HPLC 法测定 TC 含量。采用 Caco-2 细胞模型研究 TC 与 TC-M β CD 的体外转运机制。采用斑马鱼卵/胚胎发育保护模型评价 TC-M β CD 包合物的安全性, 采用体外乳腺癌 4T1 细胞和裸鼠体内乳腺癌 MCF-7 肿瘤模型对比研究 TC 及 TC-M β CD 的体内外抗肿瘤活性。结果 在 5 种环糊精中, M β CD 对 TC 的增溶效果最好, 优化包合工艺参数为料液比 33%, 搅拌温度 60 °C, 搅拌时间 120 min。TC-M β CD 冻干粉中 TC 含量 2.2%, 增溶效果显著, 复溶性良好。SEM 和 UV 法表明 TC 被 M β CD 的空穴结构包合, TC-M β CD 冻干粉可在 0.1%聚山梨酯 80-pH 6.8 介质中释放, 其拟合曲线符合一级释药模型。Caco-2 细胞模型表明 TC 转运机制为被动扩散, 包合促进吸收。斑马鱼卵/胚胎发育试验发现, TC-M β CD 包合物对斑马鱼的孵化率、斑马鱼胚胎的存活率和心率几乎没有影响, 表明包合物安全性好。乳腺癌 4T1 细胞体外抗肿瘤表明 TC-M β CD 的 IC₅₀ 明显低于 TC, 说明包合物对乳腺癌细胞有更强的抑制作用。裸鼠体内 MCF-7 肿瘤模型表明, 相同药物剂量下, TC-M β CD 的抑制率为 33.71%, 远高于 TC 的 16.86%。结论 采用相溶解度法筛选出合适的环糊精, 通过冷冻干燥制备 TC-M β CD 冻干粉, 并对其评价。TC 被 M β CD 包合后, 显著增加了 TC 的溶解度, 提高了 TC 的抗肿瘤活性和安全性, 为 TC 包合物制剂工业化生产提出理论依据。

关键词: 反式西红花酸; 甲基- β -环糊精; 包合物; 表征; 药物释放; 抗肿瘤

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)15-4663-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.15.009

Preparation, characterization, safety and antitumor evaluation of *trans*-crocetin cyclodextrin inclusion complex

LIU Xue-cheng^{1,2}, DING Ping-gang¹, JIN Hao-jie², HE Ling-yun², LIU Tao-shi¹

1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Nanjing CoreTech Biomedical Co., Ltd., Nanjing 211100, China

Abstract: Objective To prepare insoluble drugs *trans*-crocetin (TC) and methyl- β -cyclodextrin (M β CD) inclusion complex (TC-M β CD), and evaluate the effect of inclusion complex on the solubility, safety and effectiveness of TC. **Methods** The kinds of cyclodextrins and other process parameters were selected by single factor test and Box-Behnken response surface method, and TC-M β CD was prepared by freeze-drying method. The inclusion complex of TC-M β CD was characterized by scanning electron microscope, UV method and *in vitro* release assay, and the content of TC was determined by HPLC. Caco-2 cell model was used to study the transport mechanism of TC and TC-M β CD *in vitro*. The safety of TC-M β CD inclusion complex was evaluated by using zebrafish egg/embryo development protection model. The anti-tumor activity of TC and TC-M β CD *in vivo* and *in vitro* was compared by using 4T1 breast cancer cell anti-tumor model *in vitro* and MCF-7 tumor model in nude mice. **Results** Among the five cyclodextrins, M β CD had the best solubilization effect on TC. The optimized inclusion process parameters were as follows: solid-

收稿日期: 2022-01-19

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(81403114)

作者简介: 刘雪城, 硕士研究生, 从事中药制药技术与开发研究。Tel: 15738510895 E-mail: liuxuecheng0924@126.com

*通信作者: 何凌云, 博士, 硕士生导师, 从事中药制药技术与开发研究。Tel: 13057657678 E-mail: helina@core-tech.com.cn

刘陶世, 博士, 硕士生导师, 副研究员, 从事中药药剂学研究。Tel: 13611504994 E-mail: tslur4111@sina.com

liquid ratio 33%, stirring temperature 60 °C, stirring time 120 min. The content of TC in TC-M β CD lyophilized powder was 2.2%, which had remarkable solubilization effect and good resolubility. Scanning electron microscopy and UV method showed that TC was encapsulated by the hole structure of M β CD, and TC-M β CD lyophilized powder could be released in the range of 0.1% Tween80-pH 6.8. The fitting curve accorded with the first-order drug release model. Caco-2 cell model showed that the transport mechanism of TC was passive diffusion, and inclusion promoted absorption. Zebrafish egg/embryo development test found that TC-M β CD inclusion complex had little effect on zebrafish hatching rate, zebrafish embryo survival rate and heart rate, indicating that the inclusion complex was safe. The anti-tumor activity of 4T1 cells *in vitro* showed that the IC₅₀ of TC-M β CD was significantly lower than that of TC, indicating that the inclusion compound had a stronger inhibitory effect on breast cancer cells. The MCF-7 tumor model in nude mice showed that under the same drug dose, the inhibition rate of TC M β CD was 33.71%, much higher than 16.86% of TC. **Conclusion** Appropriate cyclodextrins were screened out by phase solubility method, and TC-M β CD lyophilized powder was prepared by freeze-drying and evaluated. The inclusion of TC by M β CD significantly increases the solubility of TC, improves the antitumor activity and safety of TC, and provides a theoretical basis for the industrial production of TC inclusion complex preparations.

Key words: *trans*-crocetin; methyl- β -cyclodextrin; inclusion complex; characterization; drug release; antitumor

反式西红花酸 (*trans*-crocetin, TC) 是西红花与栀子等中的主要活性成分之一, 具有抗癌、改善溃疡结肠炎、神经保护和保肝护脏等药理活性^[1-3]。但其几乎不溶于水、乙醇、甲醇、醋酸乙酯, 易溶于碱溶液, 口服吸收差, 易氧化不稳定, 极大地限制了其药理效应的发挥^[4-7]。为提高 TC 的水溶性、稳定性和药效, 国外先后将西红花酸制成聚乳酸-羟基乙酸共聚物 [poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA] 纳米粒、脂质体、微囊和树枝状大分子等新型给药系统, 但效果不太理想^[8-12]。环糊精是直链淀粉在由芽孢杆菌产生的环糊精葡萄糖基转移酶作用下生成的一系列环状低聚糖以及其半合成衍生物的总称。环糊精在食品和药品行业有着广泛应用, 在药物制剂中环糊精常作为药物载体用于提高药物溶解度、提高药物稳定性、矫味、缓释和靶向作用等^[13-14], 常用的环糊精主要有 α -环糊精、 γ -环糊精、 β -环糊精及其衍生物。不同环糊精因结构差异使得其包含性能有所不同。采用环糊精包合技术拟提高 TC 的水溶性、稳定性和药效是值得探索的方法, 本实验对 TC 环糊精包合物的制备工艺、质量表征、体外释药、吸收机制、安全性和抗肿瘤药理活性进行较系统的研究, 为后续 TC 与甲基- β -环糊精 (methyl- β -cyclodextrin, M β CD) 的包合物 TC-M β CD 的新药研发打下基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

LC-20AT 型高效液相色谱仪, SPD 检测器, 日本岛津仪器公司; XP 型分析天平 ($d=0.01$ mg)、S220-K pH 计, 梅特勒托利多公司; UV-2450PC 型紫外/可见分光光度计, 日本岛津仪器公司; ZNCL-GS 型磁力搅拌器, 南京文尔仪器设备有限公司;

LY0-0.5 型真空冷冻干燥机, 上海东富龙科技有限公司; FEI PHENO 型扫描电子显微镜 (SEM), 日本电子株式会社; Thermo HERA cell 150i CO₂ 细胞培养箱, 美国 Thermo 公司; Millicell-ERS 型细胞电阻仪, 美国 Millipore 公司; Transwell 培养板, 美国 Corning 公司; BCM-1000A 型超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; Vision G2 Elite 8 型智能溶出仪, 美国 Hanson 公司; MD34 透析袋 (截留相对分子质量 1000), 美国 Viskase 公司; Nikon TS100 型倒置显微镜, 日本尼康公司; Zeiss Axio Vert. A1 型荧光显微镜, 德国 Carl Zeiss AG; MK3&4MK2 酶标仪, 美国 Bio Tek 公司。

1.2 材料

TC 对照品, 批号 wkq16041207, 四川省维克奇生物科技有限公司, HPLC 测定质量分数 $\geq 99\%$; TC 原料药, 批号 190106, 济南浩化实业有限责任公司, 质量分数 $> 98\%$; 甲醇, Honeywell 公司, 色谱纯; α -环糊精、 β -环糊精、 γ -环糊精、M β CD、羟丙基- β -环糊精, 山东滨州智源生物科技有限公司; DMEM 培养基, 美国 Gibco 公司; 胎牛血清, 美国 Hyclone 公司; 小鼠乳腺癌 4T1 细胞 (American type culture collection, ATCC)、人乳腺癌细胞系 MCF-7 (中国科学院细胞库); CCK-8 试剂盒 (Bioworld 公司); Caco-2 细胞株 (American type culture collection, ATCC); EdU 细胞增殖检测试剂盒 (R11053.9), 广州锐博生物技术有限公司; 水为高纯水, 其他化学试剂均为分析纯。

实验用斑马鱼, 4 月龄野生型 AB 斑马鱼, 购买于南京一树梨花公司。雄性裸鼠, SPF 级, 体质量 (22 ± 2) g, 购买于江苏凯基生物技术股份有限公司, 所有动物实验遵循南京中医药大学伦理委员会

有关实验动物管理和使用的规定,均符合 3R 原则。

2 方法与结果

2.1 TC HPLC 测定方法学的建立

2.1.1 色谱条件^[15] LC-20A 岛津高效液相色谱仪,色谱柱 Kromasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水-冰醋酸 (75.0:24.5:0.5), 检测波长 423 nm, 柱温 35 °C, 体积流量 1 mL/min; 进样量 20 μL。色谱图见图 1。

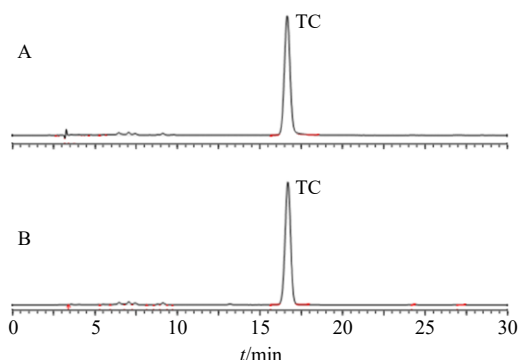


图 1 TC 对照品 (A) 和 TC-MβCD 包合物 (B) 的 HPLC 图
Fig. 1 HPLC of TC reference substance (A) and TC-MβCD inclusion complex (B)

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取 TC-MβCD 冻干粉 10 mg, 置 20 mL 量瓶中, 加流动相稀释, 超声破化包合结构, 使其充分溶解, 冷却至室温, 加流动相稀释至刻度, 摇匀。

2.1.3 线性范围考察 精密称取 5.01 mg TC 对照品至 100 mL 量瓶中, 加吡啶 5.0 mL 溶解, 流动相稀释至刻度, 即得 50.1 μg/mL 的对照品储备液, 精密量取储备液 0.1、0.5、1.0、4.0、8.0、12.0、16.0、20.0 mL 于 50 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度。即得含 TC 0.100 2、0.501、1.002、4.008、8.013、12.024、16.032、20.04 μg/mL 的系列对照品溶液。以峰面积 (Y) 为响应值对 TC 的质量浓度作图, 绘制标准曲线, 得回归方程为 $Y=12\,704\,1X+11\,760$, $R^2=0.999\,8$, 表明 TC 在 0.100 2~20.04 μg/mL 与峰面积呈良好的线性关系。

2.1.4 精密度试验 取 12.024 μg/mL 对照品溶液, 连续重复进样 6 次, 每次 20 μL, 峰面积的 RSD 为 0.39%, 结果表明仪器精密度良好。

2.1.5 稳定性试验 按“2.1.2”项下方法制备包合物供试品溶液, 取 12.024 μg/mL TC 对照品溶液和 TC 包合物供试品溶液, 分别在 0、2、4、6、8、10 h 进行测定, 前者 RSD 为 0.47%, 后者 RSD 为 1.44%, 结果表明 10 h 内对照品溶液和供试品溶液

稳定。

2.1.6 重复性试验 按照“2.1.2”项下方法制备包合物供试品溶液 6 份, 包合物中 TC 的平均质量分数为 2.25%, RSD 为 0.77%, 结果表明该方法重复性良好。

2.1.7 加样回收率试验 取 9 份 TC-MβCD 包合物, 精密称定, 分别按样品中 TC 含量添加 TC 对照品适量 (80%、100%、120% 各 3 份), 测得 TC 平均加样回收率为 96.37%, RSD 为 2.15%, 结果表明该方法回收率良好。

2.1.8 样品测定 取各实验项下样品, 制备成供试品溶液, 按“2.1.1”项色谱条件检测各个样品中 TC 含量。

2.1.9 数据处理 所有数值均表示为 $\bar{x} \pm s$ 。显著性的统计分析通过 SPSS 19.0 软件 (美国 SPSS 公司) 进行。使用 *t* 检验评估各组之间的差异, 将 $P<0.05$ 视为具有统计学意义。

2.2 相溶解度法研究环糊精对 TC 的增溶作用

2.2.1 环糊精种类、用量和温度对 TC 的增溶试验 分别精密称定 α-环糊精、β-环糊精、γ-环糊精、MβCD、羟丙基-β-环糊精, 用蒸馏水分别配制成浓度分别为 2、4、6、8、10 mmol/L 的溶液。加入过量 TC 于上述溶液中, 分别在 15、37、60 °C 避光条件下置于电热恒温振荡水槽 (转速为 200 r/min) 振荡 48 h, 溶解平衡后, 微孔滤膜滤过 (0.45 μm), 测定滤液中 TC 的含量。表 1 结果表明, 当不添加环糊精时, TC 在水中的溶解度很小, 仅有 0.72 μg/mL, 当添加环糊精后, TC 在水中的溶解度增大, 其增溶效果与环糊精种类、用量和温度有关。环糊精浓度越大、温度越高、增溶效果越好。但是只有 MβCD 对 TC 的增溶效果显著, 其他 4 种环糊精增溶效果不理想。

2.2.2 MβCD 对 TC 的包合常数 (K) 包合物的形成过程是主客体相互选择性识别的动态平衡过程, 而 *K* 值大小能够反映出环糊精和药物形成包合物过程中结合力的强弱^[5]。一般 *K* 值越大说明包合效果越好。通过包合物的相溶解度曲线得出其线性方程, 再计算 *K*。

$$K = k/[S_0(1-k)]$$

k 为相溶解度曲线的斜率, *S*₀ 为 TC 在各温度下水中的饱和溶解度

表 2 结果表明, 随着温度的升高, MβCD 对 TC 的 *K* 逐渐增大, 说明升高温度包合效果越好。MβCD

表 1 不同温度条件下环糊精种类和用量对 TC 增溶效果的比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 1 Comparison of cyclodextrin types and amounts on solubilization of TC at different temperatures ($\bar{x} \pm s, n=3$)

温度/℃	环糊精种类	溶解度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)				
		2 mmol·L ⁻¹	4 mmol·L ⁻¹	6 mmol·L ⁻¹	8 mmol·L ⁻¹	10 mmol·L ⁻¹
15	α -环糊精	0.73±0.52	1.19±0.27	1.13±0.86	1.37±0.75	1.42±0.68
	β -环糊精	0.65±0.29	0.83±0.50	0.89±0.57	1.05±0.54	1.27±0.80
	γ -环糊精	0.46±0.32	0.48±0.31	0.53±0.17	0.69±0.43	0.81±0.34
	M β CD	1.42±0.34	3.34±0.48	6.32±0.63	8.25±0.65	10.55±0.85
	羟丙基- β -环糊精	0.79±0.40	1.15±0.39	1.73±0.48	2.48±0.54	2.53±0.65
37	α -环糊精	0.95±0.45	1.21±0.37	1.32±0.82	1.40±0.68	1.60±0.45
	β -环糊精	0.69±0.29	1.00±0.37	0.99±0.70	1.37±0.43	1.49±0.85
	γ -环糊精	0.38±0.11	0.55±0.26	0.51±0.15	0.97±0.15	0.87±0.26
	M β CD	1.52±0.29	3.30±0.49	6.29±0.60	9.09±0.63	11.27±0.85
	羟丙基- β -环糊精	0.92±0.31	1.43±0.40	2.04±0.45	2.75±0.48	2.96±0.59
60	α -环糊精	1.48±0.68	1.94±0.48	2.25±0.76	2.70±0.71	2.89±0.37
	β -环糊精	1.14±0.23	1.68±0.29	2.31±0.60	2.61±0.43	2.80±0.80
	γ -环糊精	1.11±0.89	1.32±0.37	1.31±0.59	1.72±0.46	1.91±0.32
	M β CD	1.90±0.38	3.72±0.43	6.41±0.59	9.32±0.71	12.44±0.87
	羟丙基- β -环糊精	1.14±0.88	1.91±0.37	2.29±0.46	3.16±0.60	3.62±0.51

表 2 M β CD 对 TC 的 K 值Table 2 K values of M β CD for TC

温度/℃	线性回归方程	R^2	$\Delta G/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$K/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$
15	$y=0.003\ 6x-0.003\ 5$	0.995\ 9	-252	5.02
37	$y=0.003\ 9x-0.004\ 4$	0.996\ 5	-274	5.44
60	$y=0.004\ 1x-0.004\ 4$	0.992\ 3	-297	5.72

在不同温度下,与 TC 包合的吉布斯自由能变化(ΔG) <0 ,表明 M β CD 与 TC 的包合自发进行,根据热力学第 2 定律,疏水作用在包合中起主要作用。

2.3 TC-M β CD 包合物的制备

将 M β CD 在一定温度下配成一定浓度的溶液,称取一定量的 TC 置于溶液中,在恒温磁力搅拌器上搅拌(转速 1000 r/min)一定时间,冷冻干燥,即得 TC-M β CD 包合物。

2.3.1 单因素实验考察环糊精用量和搅拌条件对 TC-M β CD 包合率的影响 以不同 M β CD 质量分数(0、10%、30%、50%、70%)、不同搅拌时间(30、60、90、120、150 min)、不同搅拌温度(40、50、60、70、80 ℃)以及不同搅拌速率(200、500、1000、1500 r/min)为考察因素,包合率为评价指标,考察各单因素对 TC-M β CD 包合率的影响,结果不同 M β CD 质量分数时 TC-M β CD 的包合率分别为 0、

(38.6±3.3)%、(78.4±3.8)%、(85.6±4.3)%、(86.2±3.7)%($n=3$),不同搅拌时间时 TC-M β CD 的包合率分别为(32.6±4.2)%、(57.3±2.3)%、(78.6±3.4)%、(81.7±2.3)%、(74.3±3.6)%($n=3$),不同搅拌温度时 TC-M β CD 的包合率分别为(56.4±1.2)%、(78.6±2.0)%、(82.2±1.7)%、(82.6±1.9)%、(83.0±1.5)%($n=3$),不同搅拌速率时 TC-M β CD 的包合率分别为(73.6±1.4)%、(76.9±1.9)%、(77.4±1.8)%、(78.6±2.0)%、(78.3±1.6)%($n=3$)。结果表明,M β CD 用量越大,温度越高,包合率越高,但温度大于 60 ℃后包合率增加不明显。包合率随着搅拌时间延长相应提高,但大于 150 min 后包合率反而下降。搅拌转速对包合率的影响不显著。

2.3.2 采用 Box-Behnken 响应面法优化包合工艺参数 选取影响包合效果较大的 M β CD 质量分数(X_1)、搅拌温度(X_2)和搅拌时间(X_3)3 个因素,设置 3 个水平对 15 个试验点^[16]。结果见表 3。

使用 Design-Expert 8.0.6 软件对上表数据进行 2 次多项式回归拟合,该实验的 2 项式拟合方程为包合率 $=-133.125-0.172\ X_1+4.946\ X_2+1.301\ X_3+0.011\ 8\ X_1X_2+2.250\times 10^{-3}\ X_1X_3-2.500\times 10^{-3}\ X_2X_3-0.012\ 9\ X_1^2-0.043\ 2\ X_2^2-5.018\times 10^{-3}\ X_3^2$,该方程表明影响包合率的因素主次顺序为搅拌温度 $>$ 搅拌

表 3 处方工艺的 Box-Behnken 响应面法实验设计与结果

Table 3 Experimental design and results of Box-Behnken response surface methodology of prescription process

试验号	$X_1/\%$	$X_2/^\circ\text{C}$	X_3/min	包封率/%	试验号	$X_1/\%$	$X_2/^\circ\text{C}$	X_3/min	包封率/%	试验号	$X_1/\%$	$X_2/^\circ\text{C}$	X_3/min	包封率/%
1	40	60	120	86.4	6	40	60	120	85.7	11	40	70	150	76.8
2	30	70	120	79.6	7	40	70	90	76.8	12	30	50	120	84.5
3	50	60	90	75.1	8	30	60	150	83.2	13	40	50	90	75.3
4	40	60	120	84.8	9	30	60	90	81.6	14	50	50	120	78.1
5	40	50	150	78.3	10	50	60	150	79.4	15	50	70	120	77.9

时间>料液比。

图 2 和表 4 结果表明,模型优化后给出的最佳参数为料液比 33.74%、搅拌温度 58.41 $^\circ\text{C}$ 、搅拌时间 127.12 min、包封率为 86.614%。结合大生产对工艺参数进行修正,得到 TC-M β CD 包合工艺料液比 33%,搅拌温度 60 $^\circ\text{C}$,搅拌时间 120 min。

采用以上包合工艺制备 3 批样品进行验证,其

包封率分别为 86.4%、85.7%、87.0%,结果表明,该工艺重复性良好,根据星点设计实验所建立的数学模型预测性良好。

2.4 TC-M β CD 包合物的表征

利用紫外-可见分光光度计检测原料药的吸收峰与包合的吸收峰之间的差异^[13,18]。图 3 表明,TC 包合后其在 400~500 nm 的吸收峰消失。

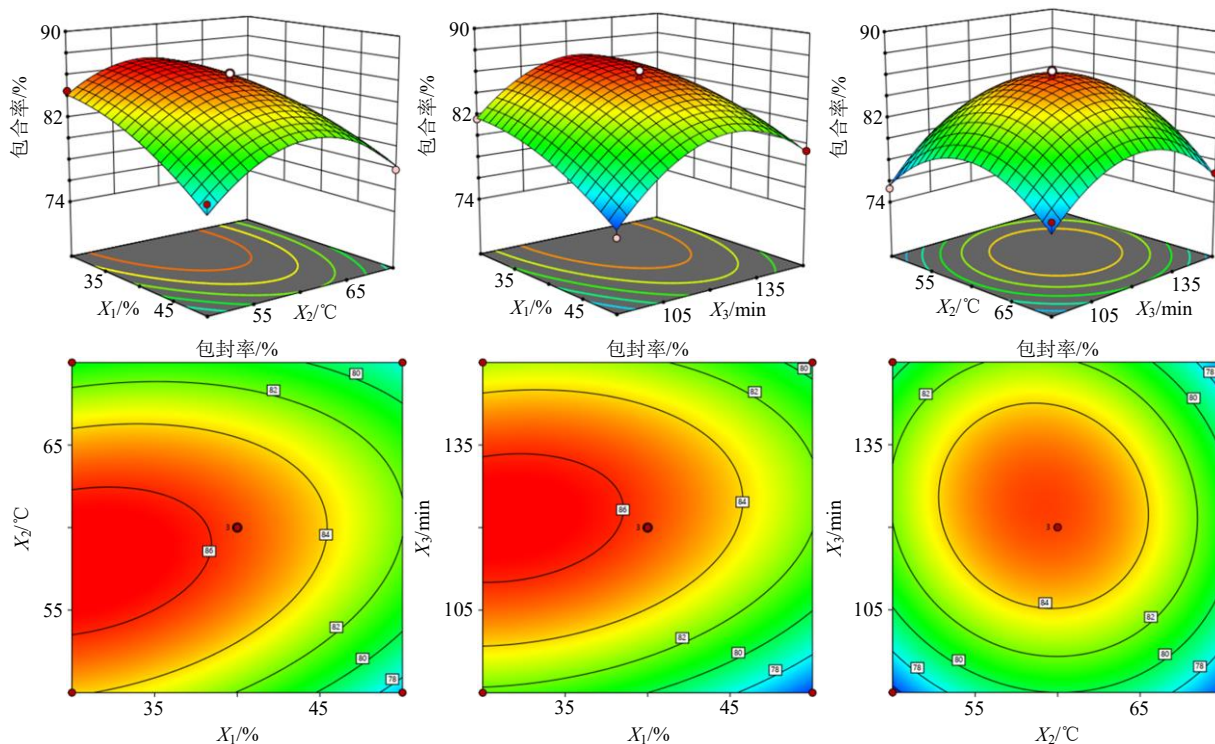


图 2 X_1 、 X_2 、 X_3 对包封率影响的 3D 曲面图和等高线图

Fig. 2 3D surface and contour map of influence of X_1 , X_2 and X_3 on inclusion efficiency

表 4 方差分析结果

Table 4 Results of variance analysis

来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值	来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值	来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值
模型	9	200.54	22.28	17.99	0.002 7	X_1X_3	1	2.25	2.25	1.82	0.235 6	残差	5	6.19	1.24		
X_1	1	9.90	9.90	7.99	0.036 8	X_2X_3	1	5.52	5.52	4.46	0.088 5	失拟项	3	4.91	1.64	2.54	0.294 8
X_2	1	42.32	42.32	34.16	0.002 1	X_1^2	1	75.32	75.32	60.80	0.000 6	纯误差	2	1.29	0.64		
X_3	1	3.25	3.25	2.62	0.166 2	X_2^2	1	6.16	6.16	4.97	0.076 2	总和	14	206.73			
X_1X_2	1	1.82	1.82	1.47	0.279 3	X_3^2	1	68.80	68.80	55.54	0.000 7						

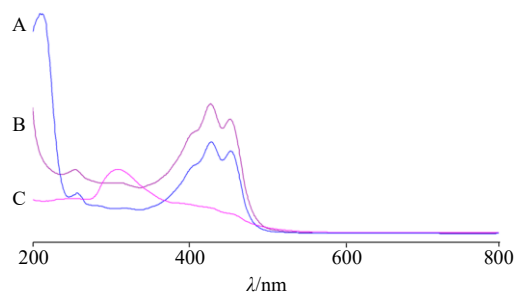


图3 TC (A)、TC 和 MβCD 物理混合物 (B) 与 TC-MβCD 包合物 (C) 的紫外吸收光谱图

Fig. 3 Ultraviolet absorption spectra of TC (A), TC and MβCD physical mixture (B) and TC-MβCD inclusion complex (C)

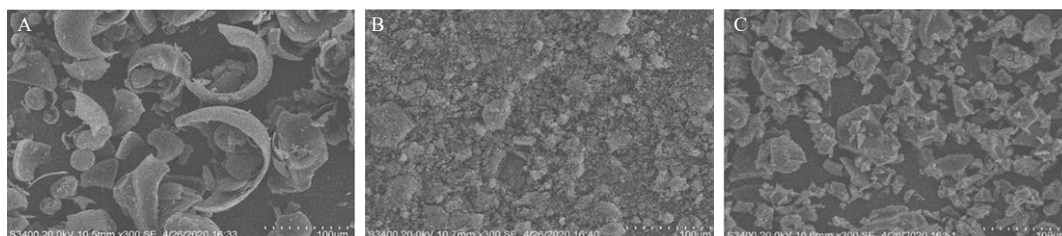


图4 TC (A)、MβCD (B)、TC-MβCD 包合物 (C) 的 SEM 图

Fig. 4 SEM images of TC (A), MβCD (B) and TC-MβCD inclusion complex (C)

℃, 转速 75 r/min, 进行体外释放, 取样点分别为 10、15、30、45、60、90 min 及 2、3、4、6、8、10、12、18 h。每次取样 10 mL, 同时补加相同温度的等量介质溶液。样品溶液用 0.45 μm 针筒滤头过滤后, 进样测定 TC 的质量浓度, 计算累积释放率。TC 原料药因为在释放介质中溶解度太低, HPLC 难以检测, 未绘制出释药曲线。TC-MβCD 包合物的药物释放曲线结果见图 5。表 5 结果表明, TC 从包合物中的释放符合一级速率释药, 具有缓释效果。

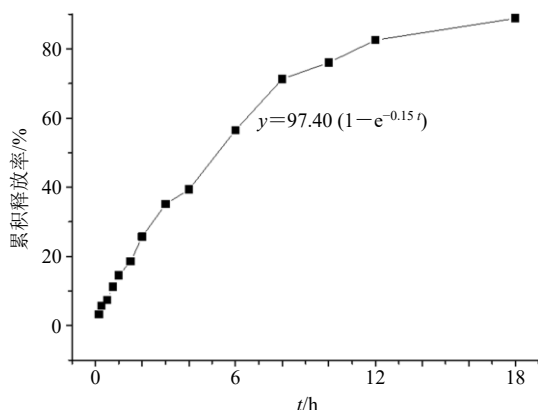


图5 TC-MβCD 包合物在 0.1% 聚山梨酯-80 pH 6.8 介质中药物释放曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Drug release curve of TC-MβCD inclusion complex in 0.1% Tween-80 pH 6.8 medium ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

利用 SEM 观察 TC 原料药及包合物的形态^[17], 图 4 结果表明 TC 呈微小颗粒结晶形状, MβCD 呈原弧片状形片状, 而包合物不同于主客体的形貌, 大小和形状呈现了不规则的块状形貌, 以上表明主客体之间形成了包合物, 结构性质发生改变。

2.5 TC-MβCD 的体外释放^[19-20]

精密称取一定量的 TC 原料药和等药量的 TC-MβCD 包合物, 用 0.1% 聚山梨酯-80 pH 6.8 的水溶液混悬后放入截留相对分子质量 1000 的透析袋内, 两端用透析夹夹紧保证不渗漏, 分别置于以 900 mL 0.1% 聚山梨酯-80 pH 6.8 的水溶液为介质的溶出杯中, 将其置于智能溶出仪中, 设置温度 (37.0 ± 0.1)

表5 TC-MβCD 包合物在介质中药物释放拟合方程

Table 5 Drug release fitting equation of TC-MβCD inclusion complex in media

模型	拟合方程	R^2
零级释药	$y = 5.43 t + 12.23$	0.889 01
一级释药	$y = 97.40 (1 - e^{-0.15 t})$	0.995 86
Higuchi 释药	$y = 25.38 t^{1/2} - 8.81$	0.977 86

2.6 Caco-2 细胞模型研究 TC 与 TC-MβCD 包合物的体外转运机制^[21-22]

Caco-2 细胞培养 21 d 后, 取跨膜电阻大于 600 Ω/cm² 的 Transwell 培养板, 首先, 将细胞单层用预热 (37 ℃) 的空白汉克平衡盐溶液 (HBSS) 洗涤 3 次, 在 Apical 侧 (AP) 到 Basolatera 侧 (BL) 的转运试验中, 将等浓度的 TC 溶液与 TC-MβCD 包合物溶液加 0.5 mL 到 AP 面作为供给池, 将 1.5 mL HBSS (pH 7.4) 添加到 BL 中作为接收池。在 BL 到 AP 转运试验中, 将等浓度的 TC 溶液或 TC-MβCD 包合物溶液分别加 1.5 mL 到 BL 中, 并将 0.5 mL HBSS 添加到 AP 中。每个实验组设置 3 个平行孔。置 37 ℃ 培养箱中培养, 分别在 120 min 时吸取接收池溶液各 200 μL 进行 HPLC 测定。结果见表 6。TC 的 $P_{app} (AP \rightarrow BL)$ 值与 $P_{app} (BL \rightarrow AP)$ 值与相差

表 6 制剂对 TC ($20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 在 Caco-2 细胞转运的影响
Table 6 Effects of preparation on TC ($20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) transport in Caco-2 cells

样品	$P_{\text{app}}/(\times 10^{-5}\ \text{cm}\cdot\text{s}^{-1})$		流通量比
	AP→BL	BL→AP	
TC	3.16 ± 0.31	2.65 ± 0.27	0.84
TC-M β CD 包合物	5.18 ± 0.25	4.42 ± 0.46	0.85

大 ($P>0.05$), 说明 TC 跨越肠上皮细胞的可能主要转运途径为被动扩散。但 TC 的 $P_{\text{app}}(\text{AP}\rightarrow\text{BL})$ 值与 $P_{\text{app}}(\text{BL}\rightarrow\text{AP})$ 值与 TC-M β CD 包合物有显著性差异 ($P<0.05$), 说明包合促进了 TC 的吸收, 从 TC 和 TC-M β CD 包合物的 $P_{\text{app}}(\text{BL}\rightarrow\text{AP})/P_{\text{app}}(\text{AP}\rightarrow\text{BL})$ 值均小于 1.5 可以看出 TC 可能不存在外排转运机制。TC 并非通过胞旁转运及载体介导的转运, 而是主要通过被动的跨细胞扩散而渗透^[2]。

2.7 TC-M β CD 包合物对斑马鱼鱼卵/胚胎发育的安全性

选取健康的 5 hpf 的鱼卵均匀的分到 24 孔板中, 每孔 20 枚鱼卵。将用 E3 溶液配制好的含 TC 不同质量浓度 (10、50、100、150、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 TC-M β CD 包合物溶液分别加入到相应的孔中, 每孔加入 3 mL 溶液, 每个浓度设置 2 个复孔。每孔的鱼卵作为 1 个统计数据。分别于 24、48、72、96 hpf 观察胚胎的发育情况, 并统计 24、48、72、96 hpf 的胚胎累积死亡率、畸形率、孵化率以及 72、96 hpf 的心率、体长等。心率的检测方式: 在 Leica DMI8 显微镜 4 倍视野下计算斑马鱼幼虫心脏 1 min

完成搏动的次数。体长的计算方法: 在 Leica DMI8 显微镜 4 倍视野下测量斑马鱼幼虫眼睛中心到尾巴末端的直线距离。结果见图 6 和表 7, 结果表明 TC-M β CD 包合物中 TC 不同质量浓度 (10、50、100、150、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 持续孵育下的斑马鱼卵/幼虫的存活率均在 90.0%及以上。将所得存活率的数据进行统计学分析, 发现与对照组相比, 不同质量浓度下 TC-M β CD 包合物孵育后的斑马鱼鱼卵/幼虫的存活率均无显著性差异。

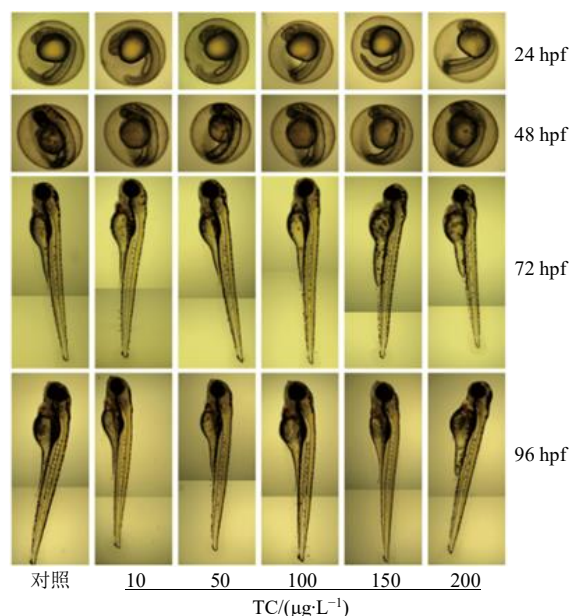


图 6 在 24、48、72、96 hpf 时间点的斑马鱼的代表性光学图像 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 6 Representative optical images of zebrafish at 24, 48, 72 and 96 hpf time points ($\bar{x}\pm s, n=3$)

表 7 TC-M β CD 包合物不同质量浓度持续孵育下的斑马鱼卵/幼虫的存活率 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Survival rate of zebra fish eggs/larvae incubated continuously at different concentrations of TC-M β CD inclusion complex ($\bar{x}\pm s, n=3$)

孵育时间/ hpf	存活率/%					
	对照	10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
24	95.66 ± 4.35	95.50 ± 5.08	95.69 ± 4.10	98.07 ± 3.62	95.82 ± 4.35	94.37 ± 5.31
48	96.62 ± 3.87	95.98 ± 4.12	95.82 ± 3.62	98.55 ± 3.87	96.30 ± 3.87	93.89 ± 4.83
72	95.50 ± 3.64	94.69 ± 4.58	95.98 ± 3.86	97.75 ± 5.31	95.82 ± 5.07	93.73 ± 4.38
96	95.98 ± 4.34	95.66 ± 4.35	96.46 ± 3.48	98.55 ± 5.07	95.50 ± 4.12	93.73 ± 4.83

由表 8 可知, TC-M β CD 包合物不同质量浓度 (10、50、100、150、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 持续孵育下的斑马鱼卵/幼虫的累积孵化率最低值均出现在 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的质量浓度下, 其 72、96 hpf 的孵化率平均孵化率为 86.70%和 85.08%。将所得孵化率的数据进行统计学分析, 发现与对照组相比, 不同质量浓

度下 TC-M β CD 包合物孵育后的斑马鱼鱼卵/幼虫的孵化率无显著性差异。

表 9 结果表明, 将所得心率的数据进行统计学分析, 发现与对照组相比, 不同质量浓度下 TC-M β CD 包合物孵育后的斑马鱼鱼卵/幼虫的心率无显著性差异。

表 8 TC-M β CD 包合物不同质量浓度持续孵育下的斑马鱼卵/幼虫的孵化率 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 8 Hatchability of zebra fish eggs/larvae incubated continuously at different concentrations of TC-M β CD inclusion complex ($\bar{x} \pm s, n=3$)

孵育时间/ hpf	孵化率/%					
	对照	10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
72	93.98 $\pm$ 2.12	92.75 $\pm$ 1.63	93.08 $\pm$ 1.68	96.30 $\pm$ 3.50	96.14 $\pm$ 4.45	86.70 $\pm$ 1.87
96	94.14 $\pm$ 2.09	92.59 $\pm$ 2.58	92.59 $\pm$ 1.39	94.91 $\pm$ 4.42	95.99 $\pm$ 3.47	85.08 $\pm$ 0.53

表 9 TC-M β CD 包合物不同质量浓度持续孵育下的斑马鱼卵/幼虫的心率 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 9 Heart rate of zebra fish eggs/larvae continuously incubated at different concentrations of TC-M β CD inclusion complex ($\bar{x} \pm s, n=3$)

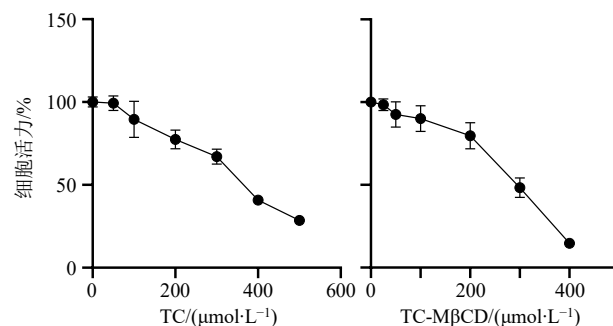
组别	质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	心率/(次 $\cdot\text{min}^{-1}$)
对照	—	166.54 $\pm$ 17.89
TC-M β CD 包合物	10	176.70 $\pm$ 14.13
	50	175.96 $\pm$ 9.36
	100	181.91 $\pm$ 14.54
	150	173.23 $\pm$ 11.90
	200	174.72 $\pm$ 23.83

综上所述,虽然在 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度时 TC-M β CD 包合物对斑马鱼的孵化率产生一定程度的影响,但是其对斑马鱼胚胎的存活和心率的影响较弱。但进行涉及到生殖毒性或者对安全性要求较高水平的科学研究,并使用环糊精和 TC 时,建议将质量浓度控制在 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下。

2.8 CCK8 法测定 TC 与 TC-M β CD 包合物的体外抗肿瘤活性

用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、饱和湿度、含 5% CO_2 的培养箱中培养 4T1 细胞。取对数生长期、生长状态良好的 4T1 细胞(乳腺癌细胞),用 0.25%胰酶消化后细胞计数。将 4T1 细胞接种到 96 孔板中,每孔 7000 个细胞。经过预实验确定加入的 TC 原料药的浓度为 0、50、100、200、300、400、500 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 和 TC-M β CD 包合物制剂浓度为(以 TC 计)0、25、50、100、200、300、400 $\mu\text{mol}/\text{L}$,以未处理的细胞为对照。第 2 天,根据药物浓度的不同将细胞分成 12 组,更换含有相应浓度药物的培养基,继续培养。每种浓度 6 个重复进行测试。处理 48 h 后进行 CCK8 检测,即各组细胞在检测时间点时,每孔加 10 μL CCK8 溶液,继续在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 3 h。选择 450 nm 波长,在酶标仪法上测定各孔吸光度(A)值,记录

结果。利用 GraphPad Prism 软件的 Dose-response-inhibition 算法计算得出药物对细胞的半数致死浓度(IC_{50}),结果见图 7。结果表明,TC 原料药随着浓度增大其乳腺癌细胞存活率下降,且呈明显的浓度依赖性。在低浓度时(≤ 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$)包合物与原料药相比细胞存活率相差不大。在高浓度时(≥ 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$)细胞存活率包合物均小于原料药。经 GraphPad Prism 软件计算,原料药对 4T1 细胞的 $\text{IC}_{50}=356.0$ $\mu\text{mol}/\text{L}$,包合物制剂对 4T1 细胞的 $\text{IC}_{50}=283.5$ $\mu\text{mol}/\text{L}$,说明 TC 包合物比 TC 原料药对乳腺癌细胞有更强的抑制作用。

图 7 TC 与 TC-M β CD 包合物不同浓度下的细胞毒性试验 ($\bar{x} \pm s, n=6$)Fig. 7 Cytotoxicity test of TC and TC-M β CD inclusion complex at different concentrations ($\bar{x} \pm s, n=6$)

2.9 裸鼠体内 MCF-7 肿瘤模型研究 TC 与 TC-M β CD 包合物的体内抗肿瘤活性

2.9.1 动物分组与模型的建立 实验前将雄性裸鼠(22 $\pm$ 2) g 保持在无病原体的条件下,正常进食饮水 1 周后,将对数生长期的 0.1 mL MCF-7 细胞悬液(1×10^7 细胞/mL)接种到雄性裸鼠的右腋下,建立肿瘤模型。当平均肿瘤模型体积达到 60 mm^3 时,将小鼠随机分为 3 组($n=6$):对照组、TC 组、TC-M β CD 组。

2.9.2 给药与治疗 对照组、TC 组和 TC-M β CD 包合物组分别以 0.9%盐溶液,游离的 TC(含 50 mg/kg TC 的 0.5%羟丙基甲基纤维素溶液)和 TC-M β CD

包合物(相当于 50 mg/kg 的 TC)剂量 ig 从第 1 天到第 12 天,每天 1 次。肿瘤体积用游标卡尺测量,并在第 1、3、5、7、9、11、13 天测量小鼠的肿瘤体积。并进行统计学分析。在实验结束时,对动物实施安乐死并剥离肿瘤,统计分析肿瘤体积,计算肿瘤体积抑制率。然后对肿瘤进行苏木精和曙红(HE)染色以评估病理变化。

2.9.3 结果 图 8 结果表明,TC 和 TC-M β CD 包合物均对肿瘤表现出治疗作用,并在给药后,伴随着肿瘤坏死。与 TC 治疗相比,TC-M β CD 包合物治疗后肿瘤的 HE 染色显示细胞间间隙增大,组织坏死增加。治疗 2 周的体积-时间曲线如图 9 所示。与对照组相比,两者相同剂量的 TC 和 TC-M β CD 包合物,TC-M β CD 包合物的抑制率为 33.71%,远高于 TC (16.86%),TC-M β CD 包合物增强了 TC 的抗肿瘤作用 ($P < 0.05$)。

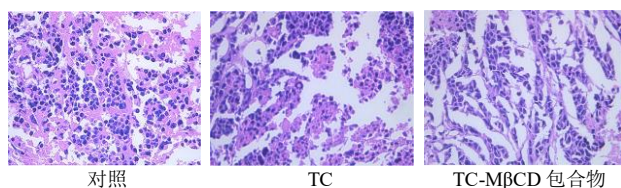


图 8 HE 染色观测抗肿瘤活性

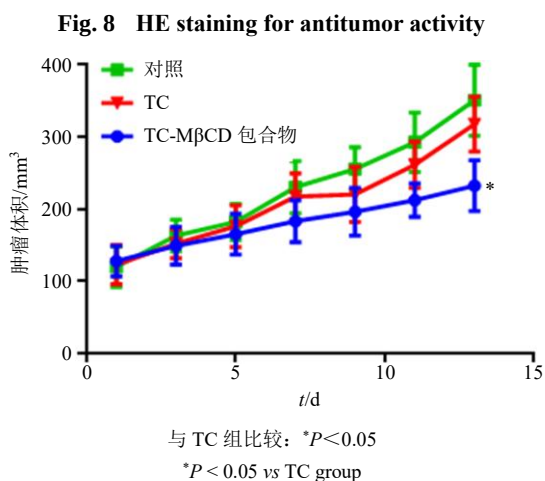


图 9 TC-M β CD 包合物在 MCF-7 肿瘤模型中的抗癌作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 9 Anticancer effect of TC-M β CD inclusion complex in MCF-7 tumor model ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

3 讨论

本研究比较了 α -环糊精、 β -环糊精、 γ -环糊精、M β CD、羟丙基- β -环糊精对 TC 的增溶效果,发现只有 M β CD 对 TC 的增溶效果显著,其他 4 种环糊精增溶效果一般。环糊精包合方法有饱和水溶液法、超声法、研磨法、冷冻干燥法、喷雾干燥法等,考

虑到 TC-M β CD 的易溶于水和热稳定性,选择冷冻干燥法制备 TC-M β CD;单因素实验发现 M β CD 用量越大,包合温度越高,包合时间越长,TC 的包合率越高,但温度大于 60 $^{\circ}\text{C}$ 后包合率增加不明显,包合时间大于 150 min 后包合率反而下降,此外发现搅拌转速对包合率的影响不显著;采用 Box-Behnken 响应面法优选出最佳包合条件为料液比 33%,搅拌温度 60 $^{\circ}\text{C}$,搅拌时间 120 min。

本实验采用 SEM 和紫外光谱验证了 TC-M β CD 包合物的形成,采用 Caco-2 细胞模型研究了 TC 与 TC-M β CD 的体外转运机制,发现包合物能促进 TC 的吸收。体外释放度研究表明,TC 包合物显著提高了 TC 的溶解度并具有一定的缓释作用,释药模型呈一级释放模型。环糊精包合物中药物在消化道的释药除了与包合物中药物的扩散渗漏有关外,还受消化酶和大肠菌群对环糊精的降解和消化道其它成分的置换等因素影响,但目前的释放介质难以复制这些因素,后续将进一步开展 TC-M β CD 的结构和药理学系统性研究以阐明环糊精包合对 TC 生物利用度的影响。

裸鼠体内 MCF-7 肿瘤模型试验发现,与 TC 原料药相比,TC 包合物的体内抗肿瘤药理活性明显增强,这可能是由于环糊精包合物的增溶和缓释作用,提高了 TC 的生物利用度所致。由于 CCK-8 检测非常方便快捷,且 CCK-8 对细胞的毒性很小,检测灵敏度高且重复性好,故体外抗肿瘤选用 CCK8 检测。体外乳腺癌 4T1 细胞模型试验表明 TC 包合物比 TC 原料药对乳腺癌细胞有更强的抑制作用。采用斑马鱼卵/胚胎发育试验发现,TC-M β CD 包合物对斑马鱼的孵化率、斑马鱼胚胎的存活和心率几乎没有影响,表明包合物安全性好。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Colapietro A, Mancini A, D'Alessandro A M, et al. Crocetin and crocin from saffron in cancer chemotherapy and chemoprevention [J]. *Anti-Cancer Agent Med Chem*, 2019, 19(1): 38-47.
- [2] Giaccio M. Crocetin from saffron: An active component of an ancient spice [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2004, 44(3): 155-172.
- [3] Nam K N, Park Y M, Jung H J, et al. Anti-inflammatory effects of crocin and crocetin in rat brain microglial cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 648(1): 110-116.
- [4] Lautenschläger M, Sendker J, Hüwel S, et al. Intestinal

- formation of *trans*-crocetin from saffron extract (*Crocus sativus* L.) and *in vitro* permeation through intestinal and blood brain barrier [J]. *Phytomedicine*, 2015, 22(1): 36-44.
- [5] Gezici S. Comparative anticancer activity analysis of saffron extracts and a principle component, crocetin for prevention and treatment of human malignancies [J]. *J Food Sci Technol*, 2019, 56(12): 5435-5443.
- [6] Mizuma H, Tanaka M, Nozaki S, *et al.* Daily oral administration of crocetin attenuates physical fatigue in human subjects [J]. *Nutr Res*, 2009, 29(3): 145-150.
- [7] Umigai N, Murakami K, Ulit M V, *et al.* The pharmacokinetic profile of crocetin in healthy adult human volunteers after a single oral administration [J]. *Phytomedicine*, 2011, 18(7): 575-578.
- [8] Zhou H, Yuan X F, Zhao Q S, *et al.* Determination of oxygen transmission barrier of microcapsule wall by crocetin deterioration kinetics [J]. *Eur Food Res Technol*, 2013, 237(4): 639-646.
- [9] Sadat Tabatabaei Mirakabad F, Nejati-Koshki K, Akbarzadeh A, *et al.* PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(2): 517-535.
- [10] Esposito E, Drechsler M, Mariani P, *et al.* Nanostructured lipid dispersions for topical administration of crocin, a potent antioxidant from saffron (*Crocus sativus* L.) [J]. *Mat Sci Eng C-Bio S*, 2017, 71: 669-677.
- [11] Soltani F, Ramezani M, Amel Farzad S, *et al.* Comparison study of the effect of alkyl-modified and unmodified PAMAM and PPI dendrimers on solubility and antitumor activity of crocetin [J]. *Artif Cell Nanomed Biotechnol*, 2017, 45(7): 1356-1362.
- [12] Hafezi Ghahestani Z, Alebooye Langroodi F, Mokhtarzadeh A, *et al.* Evaluation of anti-cancer activity of PLGA nanoparticles containing crocetin [J]. *Artif Cell Nanomed Biotechnol*, 2017, 45(5): 955-960.
- [13] 任敏, 孙希阳, 贺丰洋, 等. β -环糊精包合物的研究进展 [J]. 山东化工, 2020, 49(18): 77-78.
- [14] Aloisio C, Gomes de Oliveira A, Longhi M. Characterization, inclusion mode, phase-solubility and *in vitro* release studies of inclusion binary complexes with cyclodextrins and meglumine using sulfamerazine as model drug [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2014, 40(7): 919-928.
- [15] 刘同征, 钱之玉. 西红花酸含量的高效液相色谱法测定 [J]. 药物分析杂志, 2002, 22(3): 217-218.
- [16] 李曦, 陈晨, 欧洁睿, 等. 星点设计-效应面法优化降香油-羟丙基- β -环糊精包合物的制备工艺 [J]. 中国药学杂志, 2016, 51(2): 120-126.
- [17] 姜兴粲, 李冰, 张继瑜. 环糊精包合物超分子体系的制备与表征研究进展 [J]. 动物医学进展, 2021, 42(3): 96-101.
- [18] 李宁, 王雪婷, 蒋少鸿, 等. 姜黄素-羟丙基- β -环糊精包合物的制备及其体外抗肿瘤活性评价 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(19): 31-36.
- [19] Rahaiee S, Hashemi M, Shojaosadati S A, *et al.* Nanoparticles based on crocin loaded chitosan-alginate biopolymers: Antioxidant activities, bioavailability and anticancer properties [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 99: 401-408.
- [20] Nair A B, Attimarad M, Al-Dhubiab B E, *et al.* Enhanced oral bioavailability of acyclovir by inclusion complex using hydroxypropyl- β -cyclodextrin [J]. *Drug Deliv*, 2014, 21(7): 540-547.
- [21] 慈小燕, 武卫党, 李亚卓, 等. 不同 BCS 分类药物的肠道渗透性研究 [J]. 中国新药杂志, 2018, 27(1): 63-68.
- [22] 陈彦, 王晋艳, 辛然, 等. 柴胡皂苷对芍药苷在 Caco-2 细胞模型中吸收转运的影响 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(12): 1850-1854.

[责任编辑 郑礼胜]