

甘草次酸修饰细菌纤维素包载紫杉醇口服胶束的构建与评价

耿宇婷^{1,2,3,4,5}, 张晓雪^{1,2,3,4,5}, 康荷笛^{1,2,3,4,5}, 赵修华^{1,2,3,4,5*}

1. 东北林业大学 森林植物生态学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040
2. 东北林业大学化学化工与资源利用学院, 黑龙江 哈尔滨 150040
3. 东北林业大学林业生物制剂教育部工程中心, 黑龙江 哈尔滨 150040
4. 黑龙江省林源活性物质生态利用重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040
5. 东北林业大学生物资源生态利用国家地方联合工程实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: 目的 构建一种以肝靶向分子甘草次酸 (glycyrrhetic acid, GA) 修饰的细菌纤维素 (bacterial cellulose, BC) 两亲性纳米载体用于紫杉醇 (paclitaxel, PTX) 口服给药。方法 以丁二酸酐 (succinic anhydride, SA) 作为连接臂, 将甘草次酸与 BC 进行偶联, 获得 GA-BC, 采用红外光谱法、核磁共振氢谱法对合成产物进行结构表征。通过超声法制备 GA-BC-PTX 载药胶束, 再通过粒径、 ζ 电位、透射电子显微镜及临界胶束浓度的测定进行表征, 采用稳定性实验、体外释放实验、MTT、细胞摄取、小鼠活体成像实验及斑马鱼安全性实验对该载药系统进行评价。结果 成功构建 GA-BC 载体, 经过红外光谱、核磁共振氢谱等检测证明偶联成功, GA-BC-PTX 载药胶束平均粒径为 (292.4 ± 3.7) nm, 表面电位为 (-16.8 ± 0.9) mV, 载药量为 (17.89 ± 0.61) %, 包封率为 (59.81 ± 0.73) %, 临界胶束质量浓度为 0.063 mg/mL, 呈均一球型, 制备的载体稳定性较好, 体外释放实验表明该载体能在胃肠道环境稳定存在, MTT 实验表明 GA-BC-PTX 胶束对 HepG2 细胞存在明显抑制作用, 并通过共聚焦显微镜观察流式细胞仪分析证明 HepG2 细胞对 GA-BC 胶束载尼罗红的摄取明显高于游离的尼罗红。通过对小鼠活体成像证明 GA-BC 聚合物胶束具有肝靶向作用。通过斑马鱼卵安全性检测证明当 GA-BC 载体质量浓度小于 2 mg/mL 时, 聚合物载体基本不具有生物毒性。结论 GA-BC 载体具有良好的生物安全性和肝靶向作用, 制备 GA-BC-PTX 口服载药胶束可以有效抑制肝肿瘤细胞 HepG2 的生长, 为肝癌的靶向治疗提供新的思路。

关键词: 细菌纤维素; 甘草次酸; 两亲性自组装胶束; 肝靶向; 口服递送; 紫杉醇

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)20-6451-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.20.017

Construction and evaluation of loaded paclitaxel oral micelles by glycyrrhetic acid-modified bacterial cellulose

GENG Yu-ting^{1,2,3,4,5}, ZHANG Xiao-xue^{1,2,3,4,5}, KANG He-di^{1,2,3,4,5}, ZHAO Xiu-hua^{1,2,3,4,5}

1. Key Laboratory of Forest Plant Ecology, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China
2. College of Chemistry, Chemical Engineering and Resource Utilization, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China
3. Engineering Research Center of Forest Bio-preparation, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China
4. Heilongjiang Provincial Key Laboratory of ecological utilization of Forestry-based active substances, Harbin 150040, China
5. National and Local Joint Engineering Laboratory for Ecological Utilization of Biological Resources, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To establish a bacterial cellulose (BC) amphiphilic nanocarrier modified with the liver-targeted molecule glycyrrhetic acid (GA) for oral administration of paclitaxel (PTX). **Methods** Using succinic anhydride as a connecting arm, glycyrrhetic acid is coupled with bacterial cellulose to obtain a glycyrrhetic acid modified bacterial cellulose carrier (GA-BC). The structure of the combination was detected by IR and ¹H-NMR. The GA-BC-PTX drug-loading micelle was prepared by ultrasonic

收稿日期: 2022-04-17

基金项目: 黑龙江省自然科学基金重点项目 (ZD2022C001); 黑龙江头雁创新团队项目和 111 计划 (B20088)

作者简介: 耿宇婷 (1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为林源活性物质生态利用。E-mail: 1071122169@qq.com

*通信作者: 赵修华 (1979—), 男, 博士, 教授, 研究方向为植物高值化利用。E-mail: xiuhua Zhao@nefu.edu.cn

method, and then characterized by particle size, ζ potential, transmission electron microscopy and critical micelle concentration determination. The drug carrier system was evaluated by stability experiment, *in vitro* release experiment, MTT, cell uptake, *in vivo* imaging experiment in mice and zebrafish safety experiment. **Results** In this experiment, the GA-BC carrier was successfully constructed, and the detection of infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance hydrogen spectroscopy proved that the coupling was successful, the average particle size of the GA-BC-PTX drug-loading micelle was (292.4 ± 3.7) nm, the surface potential was (-16.8 ± 0.9) mV, the drug load was $(17.89 \pm 0.61)\%$, the encapsulation rate was $(59.81 \pm 0.73)\%$, and the critical micelle concentration was 0.063 mg/mL, which was uniformly spherical, and the prepared carrier stability was good. *In vitro* release showed that the carrier could be stable in the gastrointestinal environment, MTT experiments showed that GA-BC-PTX micelles had a significant inhibitory effect on HepG2 cells, and the uptake of GA-BC-NR micellar by confocal microscopy was shown to be significantly higher than that of free NR. GA-BC polymer mice are shown to have a hepatic targeting effect by imaging mice *in vivo*. Zebrafish safety testing proved that when the GA-BC carrier concentration is less than 2 mg/mL, the polymer carrier is basically not biologically toxic. **Conclusion** GA-BC carrier has good biosafety and liver targeting effect, and prepared GA-BC-PTX oral loading micelles can effectively inhibit the growth of hepatic tumor cells HepG2, providing new ideas for targeted therapy of liver cancer.

Key words: bacterial cellulose; glycyrrhetic acid; amphiphilic self-assembly micelles; liver-targeting; oral delivery; paclitaxel

癌症一直是严重威胁人类生命健康, 其中肝癌更是我国高发恶性肿瘤之一^[1], 大多数抗肿瘤药物如紫杉醇水溶性差 ($<1 \mu\text{g/mL}$), 口服生物利用度较低 ($<2\%$)^[2-3], 在体内易被肝脏及免疫系统下清除, 不能有效到达病变部位而引发全身性毒性等副作用^[4]。为解决这一难题, 本课题组提出将药物负载于载体内进行输送, 因此, 开发一种高效低毒同时具有靶向性的载体具有重要意义。

近年来, 将大分子聚合物改性为两亲性聚合物作为药物递送系统受到极大的关注, 两亲性聚合物在水中可自组装形成具有亲水外壳和疏水核心的纳米胶束, 疏水区可用于包裹疏水药物, 不仅提高了药物的水溶性, 同时可以保护核内药物在生物介质中的活性^[5-7]。细菌纤维素 (bacterial cellulose, BC) 又称 β -1,4-葡聚糖, 是一种天然高分子聚合物^[8]。因其低毒、生物相容性高, 制成的医用植入物仅引起轻度的炎症反应等优点被广泛应用于伤口敷料、人工血管和组织再生等^[9-13], 同时其独特的载药特性具有极大的开发前景。

甘草次酸 (glycyrrhetic acid, GA) 是从传统中药甘草中提取的一种五环三萜化合物, 是临床上常用的保肝药物, 甘草次酸具有抗炎、抗病毒、和抗肿瘤作用^[14-17]。并且研究发现肝脏具有甘草次酸特异性结合位点^[18], 因此, 本研究以甘草次酸作为疏水端同时作为载体的靶向基团, 丁二酸酐 (succinic anhydride, SA) 作为连接臂与亲水端 BC 进行接枝, 制成具有优良肝靶向的两亲性聚合物载体 GA-BC, 并负载紫杉醇 (paclitaxel) 制成口服胶束 (GA-BC-PTX), 并考察载体的靶向性及 GA-BC-PTX 初步抗癌效果, 为将来肝癌的治疗提供重要的

依据和方向。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Nexus 670 型傅里叶变换红外光谱仪, 日本岛津公司; Avance III HD 500 MHz 型核磁共振波谱仪, 瑞士 Bruker 公司; LD-900 型超声波细胞破碎仪, 常州零点设备有限公司; Waters 1525 型高效液相色谱仪, 美国沃特世公司; Zeta PALS 型激光粒度仪, 美国布鲁克海文仪器有限公司; JEM-2100 型透射电子显微镜 (TEM), 日本电子株式会社; F-7000 型荧光分光光度计, 日立高新技术公司; Infinite 200 Pro 型多功能酶标仪, 上海帝肯贸易有限公司; 高内涵细胞成像仪, 美国 BioTek 仪器公司; MoFlo Astrios EQ 型流式细胞仪, 美国贝克曼公司; Scientz-10N 型冷冻干燥器, 宁波新芝生物科技股份有限公司; IVIS Lumina Series III 型活体成像系统, 珀金埃尔默企业管理 (上海) 有限公司。

1.2 试剂

细菌纤维素, 北京美科美生物公司代理 Cellulose Lab; 甘草次酸 (批号 A08GS156949, 质量分数 $\geq 98\%$) 购自上海源叶生物科技有限公司; 丁二酸酐 (批号 20180404) 购自国药集团化学试剂有限公司; 四丁基醋酸铵 (实验室自制); 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 (EDC·HCl, 批号 D2121158) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 4-二甲氨基吡啶 (DMAP, 批号 E1923045) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 二甲基亚砜 (DMSO)、无水乙醇, 分析纯, 购自天津市富宇精细化工有限公司; 紫杉醇 (批号 NF-20170316, 质量分数 $\geq 99\%$) 购自西安天丰生物科技有限公司; 尼罗

红(批号 C12499771)购自上海麦克林生物有限公司; DIR 荧光探针(批号 DD0413)购自上海百赛生物技术股份有限公司; 四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT), 批号 EZ2811F374, 购自德国 Biofroxx 生物科技公司; 色谱乙腈、色谱甲醇均购自湖北弗顿科技技术有限公司。

1.3 动物及细胞

实验所用鱼品种为 AB 品系斑马鱼, 3~4 月龄, 鱼系均购自南京一树梨花生物科技有限公司。昆明种小鼠, SPF 级, 雌性, 体质量 22~25 g, 购自哈医大附属二院实验动物中心, 许可证号 ZC XK(黑) 2019-001, 动物实验已获得哈尔滨医科大学实验动物伦理委员会批准(批准号 SYDW-2021036)。人肝癌 HepG2 细胞为东北林业大学森林植物重点实验室冻存保种, 复苏后于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中

培养。

2 方法与结果

2.1 GA-BC 聚合物的合成

将 1.62 g BC 溶于 100 mL 含四丁基醋酸铵的 DMSO 溶液中, 搅拌至 BC 完全溶解, 制备成均一的 BC 溶液。称取 4.7 g 甘草次酸与 1 g 丁二酸酐加入到 20 mL DMSO 溶液中, 于 40 °C 下加热搅拌 24 h, 加入与甘草次酸同等物质的量的 DMAP 与 EDC 进行活化, 继续搅拌 1 h 后将上述反应液缓慢滴加入到 BC 溶液中, 混合均匀于 40 °C 下继续加热搅拌 24 h, 反应结束。利用反溶剂沉淀法^[19]将反应溶液滴加到自身 5 倍体积比的无水乙醇中, 离心除去上清, 用无水乙醇洗涤 3~4 次, 将沉淀溶于蒸馏水搅拌均匀后再次离心取上清, 冻干, 即得 GA-BC 聚合物。合成路线见图 1。

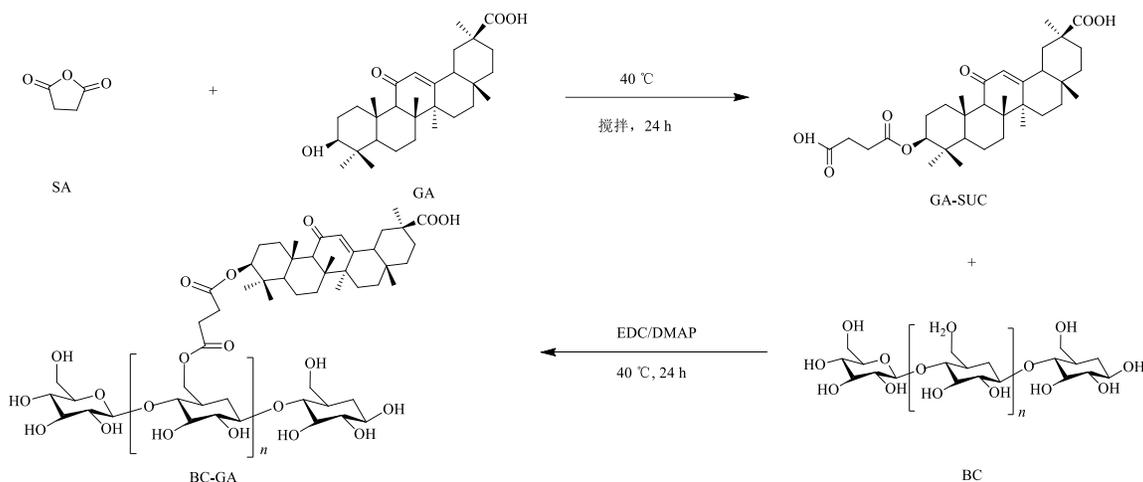


图 1 GA-BC 合成路线

Fig. 1 Synthesis of GA-BC

2.2 GA-BC 表征及结果

2.2.1 红外光谱 (IR) 检测及结果 采用 IR 法分别将 BC、甘草次酸、GA-BC 聚合物进行表征, IR 结果如图 2 所示。BC 的 IR 中, 3520~3200 cm⁻¹ 出现宽峰归属于 BC 上的 -OH 伸缩振动特征峰, 2895 cm⁻¹ 处的吸收峰为 C-H 的伸缩振动峰, 1651 cm⁻¹ 处归属于 BC 半缩醛基 (-C=O) 对称伸缩振动, 1148~993 cm⁻¹ 为环上 C-O 伸缩振动, 且 C-O 的面外弯曲振动造成了 893 cm⁻¹ 处的吸收峰。在甘草次酸 IR 图中, 3447 cm⁻¹ 处为 -OH 伸缩振动特征峰, 2936~2868 cm⁻¹ 为 C-H 的伸缩振动峰、1709 cm⁻¹ 处 -COOH 以及 1658 cm⁻¹ 处 C=O 均为甘草次酸的特征峰。与 BC 和甘草次酸相比, 新合成的 GA-BC 聚合物在保留了 BC 在 3 403.8 cm⁻¹ 处 -OH 的特征峰

但峰形明显变窄, 表明 BC 的 -OH 发生接枝反应, 同时破坏了 BC 分子内氢键, 在 2875 cm⁻¹ 处出现 -CH₂ 伸缩振动吸收峰外, 在 1 734.2 cm⁻¹ 处出现了属于 C=O 伸缩振动峰, 吸收峰增强, 说明新和成的载体化合物中属于甘草次酸的 -OH 与作连接臂的丁二酸酐反应生成了新的酯键, 在 1 161.8 cm⁻¹ 处出现 C-O-C 的不对称吸收峰, 证明 BC 与甘草次酸偶联成功。

2.2.2 核磁共振氢谱 (¹H-NMR) 检测及结果 使用 CDCl₃ 溶解甘草次酸, D₂O 溶解 GA-BC 聚合物载体, 溶解后分别移至核磁管中进行 ¹H-NMR 分析, 图 3-A 所示为甘草次酸的 ¹H-NMR 谱, δ 0.68~1.35 分别为甘草次酸的 7 个强甲基峰, δ 2.33 为 H-9 单峰特征峰, δ 3.02 为 H-3 的 2 个二重峰; δ 5.40 为

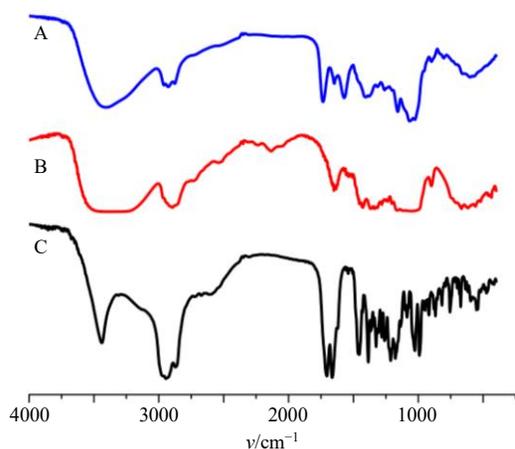


图2 GA-BC (A)、BC (B) 和甘草次酸 (C) 的 IR 图
Fig. 2 IR spectrum of GA-BC (A), BC (B) and GA (C)

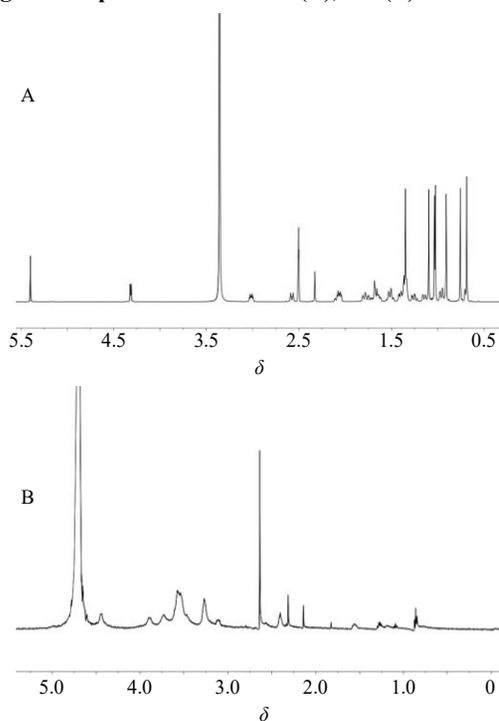


图3 GA (A) 和 GA-BC (B) 的 ¹H-NMR 图
Fig. 3 ¹H-NMR spectrum of GA (A) and GA-BC (B)

H-12 的烯氢信号，为单峰， δ 4.31 为 H-18 为 β 构型，图 3-B 为 GA-BC 聚合物的 $^1\text{H-NMR}$ 谱，通过对比，GA-BC 聚合物在 δ 0.98~1.20 处出现了甘草次酸的特征峰， δ 2.63 处出现新的吸收峰归属于连接臂丁二酸酐上的 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ， δ 3.2~4.5 处为 BC 环状结构的特征峰证明胶束偶联成功。

2.3 GA-BC 与 GA-BC-PTX 的制备及表征

2.3.1 GA-BC 自组装空白胶束的制备 GA-BC 为两亲性聚合物，在水中可自组装形成纳米胶束，称取定量的 GA-BC 冻干品溶于蒸馏水中，为了使纳米颗粒分散均匀，使用探头式超声发生器在冰浴条

件下超声处理，超声程序设置为工作 4 s 停 2 s，超声功率为 180 W，每次处理 2 min，超声后过 0.45 μm 的滤膜，即得自组装空白胶束。

2.3.2 载药胶束 GA-BC-PTX 制备 取 10 mg 冻干的 GA-BC 聚合物溶于 10 mL 蒸馏水中制备成 1 mg/mL 的 GA-BC 胶束溶液，称取 2 mg PTX 溶于 1 mL 无水乙醇中，冰浴下滴加到 GA-BC 胶束溶液中，采用探针型超声装置辅助 GA-BC 胶束对紫杉醇进行包载，混合物在冰浴下超声 20 min 后，移至室温环境在磁力搅拌器搅拌 24 h，挥发除去乙醇，离心机 3000 r/min 离心 10 min，分离出上清溶液进行冷冻干燥，即得 GA-BC-PTX 载药胶束。

2.3.3 胶束粒径、 ζ 电位 采用激光粒度电位分析仪来测定的粒径分布并测其 ζ 电位。具体为取适量冻干后的 GA-BC 和 GA-BC-PTX 样品加入蒸馏水中，配制成胶束溶液，进行测试，每个样品测试 3 次，结果 (表 1) 显示，GA-BC 载体平均粒径为 (287.2 ± 4.4) nm，表面电位为 (-19.2 ± 1.2) mV；GA-BC-PTX 载药胶束平均粒径为 (292.4 ± 3.7) nm，表面电位为 (-20.3 ± 1.2) mV。

2.3.4 胶束形态观察 将 GA-BC 与 GA-BC-PTX 胶束溶于蒸馏水中，适当稀释后滴至滴到碳涂层的 200 目铜网格上，晾干后用 1% 磷钨酸溶液染色，染色 2 min 后吸取多余的溶液，自然晾干，通过透射电镜观察到载体呈球形或类球形，外观圆整，粒径分布均匀，见图 4。

2.3.5 稳定性考察 取适量 GA-BC 和 GA-BC-PTX 用 PBS 溶解置于西林瓶中，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下放置 7 d 进行稳定性试验。分别在 0、0.5、1、2、3、5、7 d 时取样测定其粒径和 ζ 电位分布。结果如图 5 所示，

表1 GA-BC 和 GA-BC-PTX 的粒径与 ζ 电位 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 1 Particle size and ζ potential of GA-BC and GA-BC-PTX ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	粒径/nm	ζ 电位/mV
GA-BC	287.2 ± 4.4	-19.2 ± 1.2
GA-BC-PTX	292.4 ± 3.7	-16.8 ± 0.9

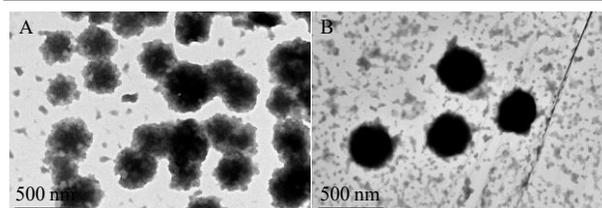


图4 GA-BC (A) 及 GA-BC-PTX (B) 的 TEM 图
Fig. 4 TEM images of GA-BC (A) and GA-BC-PTX (B)

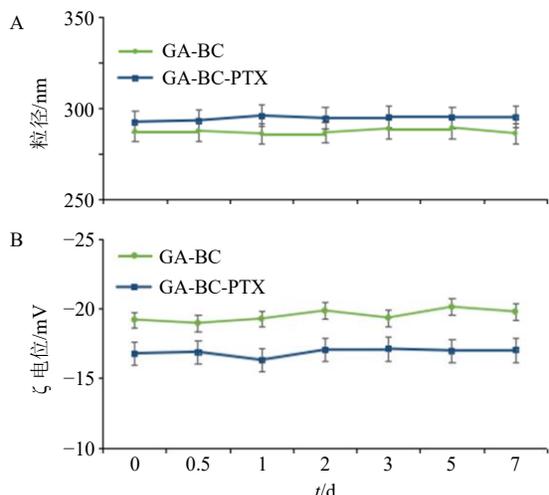


图5 GA-BC 和 GA-BC-PTX 在不同时间点时的粒径 (A) 和 ζ 电位 (B) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Particle size (A) and ζ potential (B) of GA-BC and GA-BC-PTX at different time points ($\bar{x} \pm s, n=3$)

0~7 d 的储存时间段内, GA-BC 和 GA-BC-PTX 的粒径和电位均无较大变化, 说明具有较好的稳定性。

2.3.6 临界胶束浓度 (CMC) 测定 采用荧光探针技术对 GA-BC 聚合物的 CMC 进行测定。首先将丙酮配制的芘溶液 (0.1 mmol/L) 加入试管中, 通过氮气干燥除去丙酮后各加入不同体积的 GA-BC 母液, 蒸馏水定容至 10 mL。使所配制的溶液质量浓度分别为 3.75、7.50、15.00、20.00、31.25、62.50、100.00、125.00、250.00、500.00 $\mu\text{g/mL}$ 。室温下超声 30 min 后, 将其在黑暗条件中 37 $^{\circ}\text{C}$ 下平衡 24 h。通过荧光分光光度计测量荧光强度。激发波长为 340 nm, 发射波长范围是 350~600 nm。芘会被胶束所包裹, 环境的极性发生变化, 第 1 波段 (373 nm, I_1) 和第 3 波段 (391 nm, I_3) 强度的比值也随之变化, 将 I_1/I_3 的值进行拟合, 2 条切线的交点确定 CMC 值。经检测, GA-BC 载体在水中的 CMC 为 0.063 mg/mL (图 6), 具备良好的抗体液稀释能力。

2.4 载药量和包封率的测定

精密称取 2 mg GA-BC-PTX 载药胶束用 1 mL 蒸馏水溶解, 再加入甲醇定容至 10 mL, 离心机 5000 r/min 离心 10 min, 取上清, 过 0.22 μm 有机滤膜, 取 10 μL 进样高效液相色谱仪进行测定, 并按公式计算载药量和包封率。

$$\text{载药量} = W_1/W_2$$

$$\text{包封率} = W_1/W_3$$

W_1 为测得 GA-BC 胶束中紫杉醇的含量, W_2 为 GA-BC-PTX 的总质量, W_3 为紫杉醇的总投药量

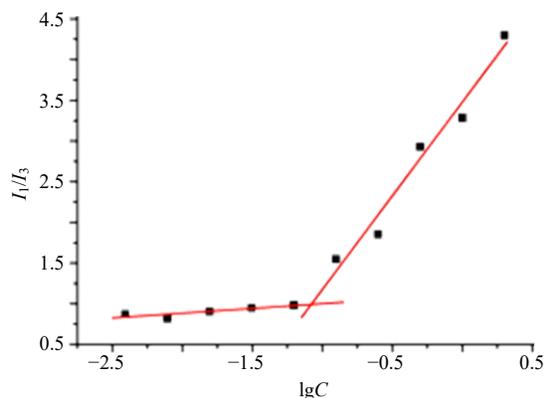


图6 GA-BC 的 CMC 图

Fig. 6 CMC diagram of GA-BC

紫杉醇的含量测定色谱条件^[20]: 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 反相柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-乙腈-水 (40 : 30 : 30); 体积流量 1 mL/min; 检测波长 230 nm; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 10 μL 。建立关于紫杉醇对照品质量浓度 (X) 和峰面积积分值 (Y) 线性回归方程 $Y=24\ 022 X+6\ 677.3$, $R^2=0.999\ 8$, 经 HPLC 法测得 GA-BC-PTX 载药胶束样品的载药量为 (17.89 \pm 0.61) %, 包封率为 (59.81 \pm 0.73) % ($n=3$)。

2.5 体外释放考察

采用透析袋法考察紫杉醇原药和 GA-BC-PTX 胶束溶液的体外释药情况。采用 pH 1.2, 含 0.5% 聚山梨酯-80 的盐酸溶液的人工胃液, 和 pH 6.8 含 0.5% 聚山梨酯-80 的磷酸盐缓冲液的人工肠液作为释放介质模拟胃肠道环境, 分别将 0.4 mg 紫杉醇、GA-BC-PTX (含紫杉醇 0.4 mg) 置于透析袋 (截留相对分子质量 3500) 中, 浸入 200 mL 人工胃液 (或肠液), 在体系温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温磁力搅拌器中搅拌, 转速为 100 r/min, 分别在 5、10、15、20、25、30、60、120、240、360、480、720 min 以及 24 h 时间点取样 1 mL, 同时补充 1 mL 相同基质的空白人工胃液 (或肠液), 取出的样品经离心后取上清液, 用 0.22 μm 有机滤膜滤过后, 采用高效液相色谱仪检测紫杉醇的含量并计算药物的累积释放率, 每组平行 3 次。

紫杉醇原药和 GA-BC-PTX 载药胶束在人工胃液及人工肠液中的释放曲线如图 7 所示。游离的紫杉醇原药在 0~6 h 时间段内累积释放率随着时间的增长有明显提高, 6~24 h 时间段内累积释放率的变化趋于平缓。GA-BC-PTX 中紫杉醇的释放率在 0~2 h 时间段内随着时间的增长累积释放率有明显提

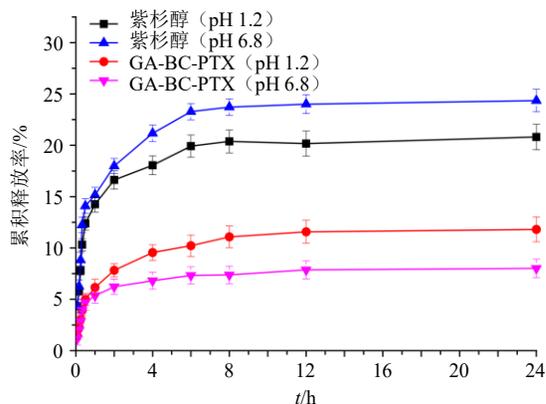


图7 紫杉醇与 GA-BC-PTX 在人工胃液及人工肠液中的累积释放率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Cumulative release rate of PTX and GA-BC-PTX in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

高和紫杉醇原药较为相似，而 2~6 h 表现为紫杉醇缓慢释放，之后趋于平缓，紫杉醇原药在人工胃液及人工肠液中至 24 h 的累积释放率分别为 20.81% 和 24.36%，释放趋势基本相同，在人工胃液累积释放率稍高于人工肠液，GA-BC-PTX 在人工胃液及人工肠液中至 24 h 的累积释放率分别为 11.81% 和 8.01%，载药胶束的累积释放率明显低于紫杉醇原药，表明载药胶束 (GA-BC-PTX) 结构稳定能够承受酸性条件和胃肠道的稀释，可将药物稳定地包载在纳米胶束的内部，提高了紫杉醇经胃肠道进入人体的稳定性。

2.6 MTT 实验

通过 MTT 法评价 GA-BC 空白胶束及 GA-BC-PTX 载药胶束的抗癌活性。取对数生长期的 HepG2 细胞接种于 96 孔板中，5% CO₂、37 °C 培养箱培养 24 h 后，取出培养板，显微镜下观察细胞贴壁情况良好后吸走孔内培养基，将 GA-BC 空白胶束及 GA-BC-PTX 载药胶束质量浓度分别为 1.0、2.5、5.0、10.0、25.0、50.0、100.0 μg/mL 的溶液分别加入 HepG2 细胞系培养 24 h。利用 MTT 法测量 570 nm 处的吸光度 (A) 值，根据公式计算细胞抑制率。

$$\text{细胞抑制率} = 1 - A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

对照组为给药与胶束同等体积的纯化水

实验结果如表 2 所示，游离紫杉醇的质量浓度在 1.0~10.0 μg/mL 时，对 HepG2 细胞的抑制率随着药物质量浓度的增大而呈现显著增长，而质量浓度增长到 100.0 μg/mL 时对 HepG2 细胞的抑制率并未随着药物质量浓度的增加而显著增长，同时也未

表 2 不同质量浓度的紫杉醇与 GA-BC-PTX 载药胶束与 HepG2 细胞孵育 24 h 和 48 h 的细胞抑制率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 2 Rate of cellular inhibition of different concentrations of PTX and GA-BC-PTX loaded micelles incubated with HepG2 cells for 24 h and 48 h ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

紫杉醇质量浓度/ (μg·mL ⁻¹)	细胞抑制率/%			
	24 h		48 h	
	紫杉醇	GA-BC-PTX	紫杉醇	GA-BC-PTX
1.0	17.99	47.78	37.09	55.88
2.5	37.80	56.06	48.51	65.56
5.0	54.18	64.78	54.98	70.92
10.0	60.50	70.28	61.86	77.51
25.0	63.74	73.88	65.67	80.38
50.0	64.62	76.87	66.95	84.56
100.0	66.57	79.72	69.02	87.55

随着孵育时间的延长而抑制效果增加。这可能由于紫杉醇为疏水性药物，溶解度极差且粒径较大不利于细胞的摄取，多数通过被动扩散进入细胞。而实验组显示出良好的肿瘤细胞抑制性，随药物质量浓度的上升，抑制率也逐步增加，GA-BC-PTX 负载的紫杉醇质量浓度为 100.0 μg/mL 时，HepG2 细胞 24 h 时的抑制率为 79.7%，48 h 时细胞抑制率为 87.5%，抑制效果随着时间的延长而增加，可能由于 GA-BC-PTX 纳米载药胶束具有较小的粒径有助于细胞对药物的摄取，实现药物在细胞内的累积，GA 修饰后能存在对肝癌细胞的主动靶向，很大程度的提高了紫杉醇的抗癌活性。

2.7 细胞摄取

以尼罗红 (Nile Red, NR) 作为疏水性荧光探针通过超声将其负载入 GA-BC 聚合物中，游离尼罗红作为阳性对照组，PBS 溶液为空白对照组。取对数生长期的 HepG2 细胞接种于 24 孔板中，5% CO₂、37 °C 培养箱培养 24 h 后，取出培养板，显微镜下观察细胞贴壁情况良好后吸走孔内培养基，每孔加入 200 μL 载有尼罗红的 GA-BC-NR 胶束溶液，以含有相同含量的尼罗红溶液为对照组，每组设 4 个复孔。分别培养 2、4 h 后吸弃药液，用 PBS 清洗 2 次，然后用 DAPI 将细胞核染色 10 min，吸弃染液，PBS 清洗 2 次，再加入 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min，固定结束吸弃多聚甲醛再用 PBS 清洗 2 次，使用高内涵细胞成像仪观察细胞内荧光分布情况，并通过流式细胞仪对细胞摄取荧光定量分析。

比较 2 组内荧光强度结果如图 8 所示，尼罗红

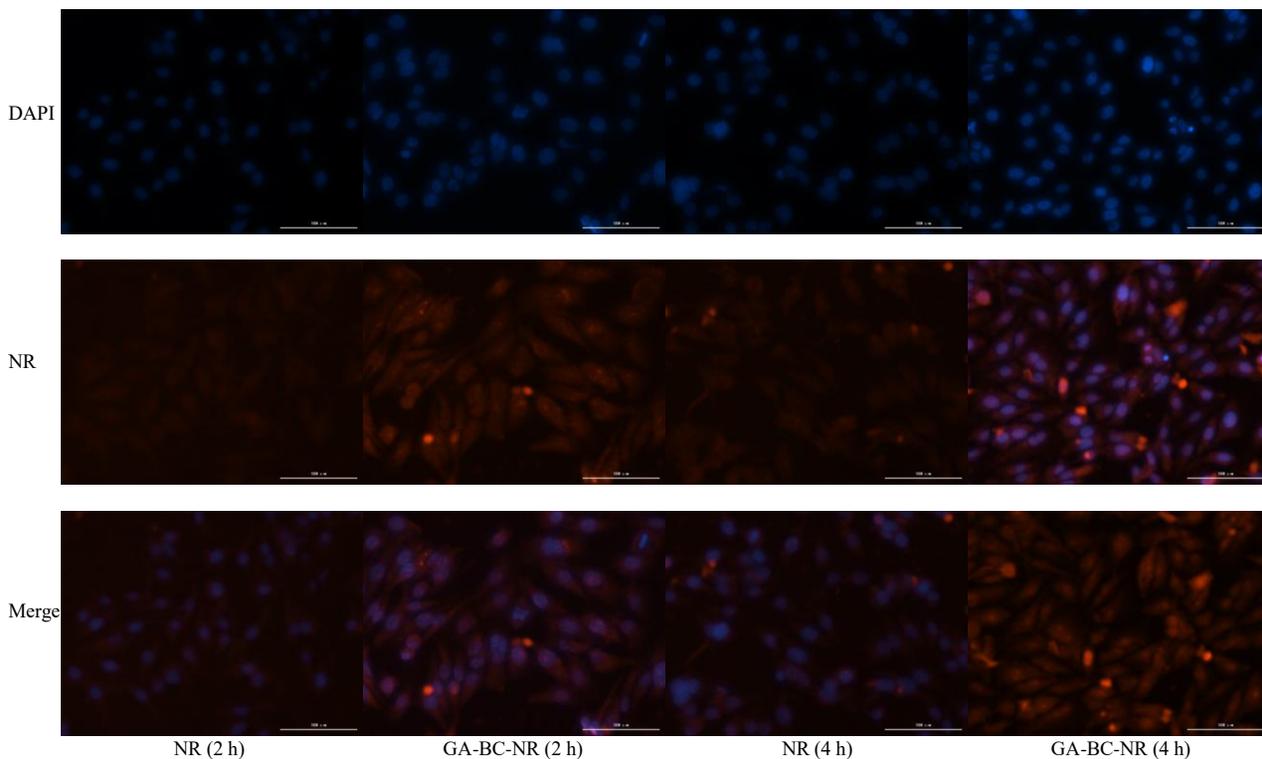


图8 孵育2 h和4 h后 HepG2 细胞摄取游离尼罗红和 GA-BC-NR 胶束的高内涵细胞成像图像 (图中标尺为 100 μm)
 Fig. 8 High-content cell imaging images of free NR and GA-BC-NR micelles internalization in HepG2 cells after 2 h and 4 h incubation (scale is 100 μm)

特有的红色荧光显示了药物的位置,细胞核用 DAPI 染为蓝色。孵育 2 h 后游离尼罗红的红色荧光在细胞质和细胞核中几乎不可见。相比之下,GA-BC-NR 在相同药量的相同孵育条件下,细胞质中观察到清晰的红色药物荧光。

利用流式细胞仪和 SPSS 统计学软件进行荧光定量分析结果如图 9 所示,孵育 2 h,GA-BC-NR 的荧光摄取量是游离的尼罗红的 8.1 倍;孵育 4 h,游离的尼罗红荧光强度几乎未发生变化,而 GA-BC-NR 胶束荧光强度明显增强,HepG2 细胞对其的摄取量是游离的尼罗红的 16 倍,远高于游离尼罗红。结果表明 GA-BC 纳米胶束有助于 HepG2 细胞对药物的摄取,由于甘草次酸受体介导,明显增强了 GA-BC 胶束对 HepG2 肝癌细胞的靶向能力,能够实现药物在细胞内的富集。

2.8 肝靶向效果评价

由于紫杉醇和载体本身不具有荧光性,因此将近红外荧光染料 DiR 作为荧光探针载入 GA-BC 纳米胶束中,通过 IVIS Lumina Series III 活体成像系统记录小鼠口服给药后 2、4、6、8、12、24 h 全身的荧光分布情况。24 h 全身荧光观察结束后,取出小鼠的心脏、肝脏、脾脏、肺脏和肾脏用于体外的

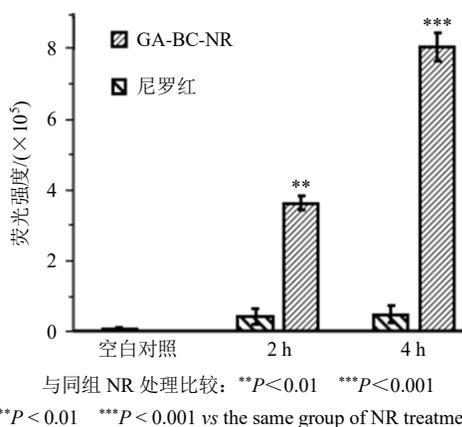


图9 孵育2 h和4 h后流式细胞仪测量对照、游离尼罗红和 GA-BC-NR 胶束在 HepG2 细胞中的荧光强度 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 9 Fluorescence intensity of control, free NR, and GA-BC-NR micelles was measured in HepG2 cells after 2 h and 4 h of incubation ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

成像和定量分析。使用 Living Image 软件进行定量分析,测定荧光强度。结果如图 10-A 所示,游离 DiR 主要集中在胃肠道进行循环消化,在给药 6 h 荧光强度最强,此后开始逐渐下降,24 h 后几乎不可见。相比之下,GA-BC-DiR 纳米胶束给药 2 h 进入胃肠道后逐渐被体内吸收,4~6 h 肝脏部位荧光

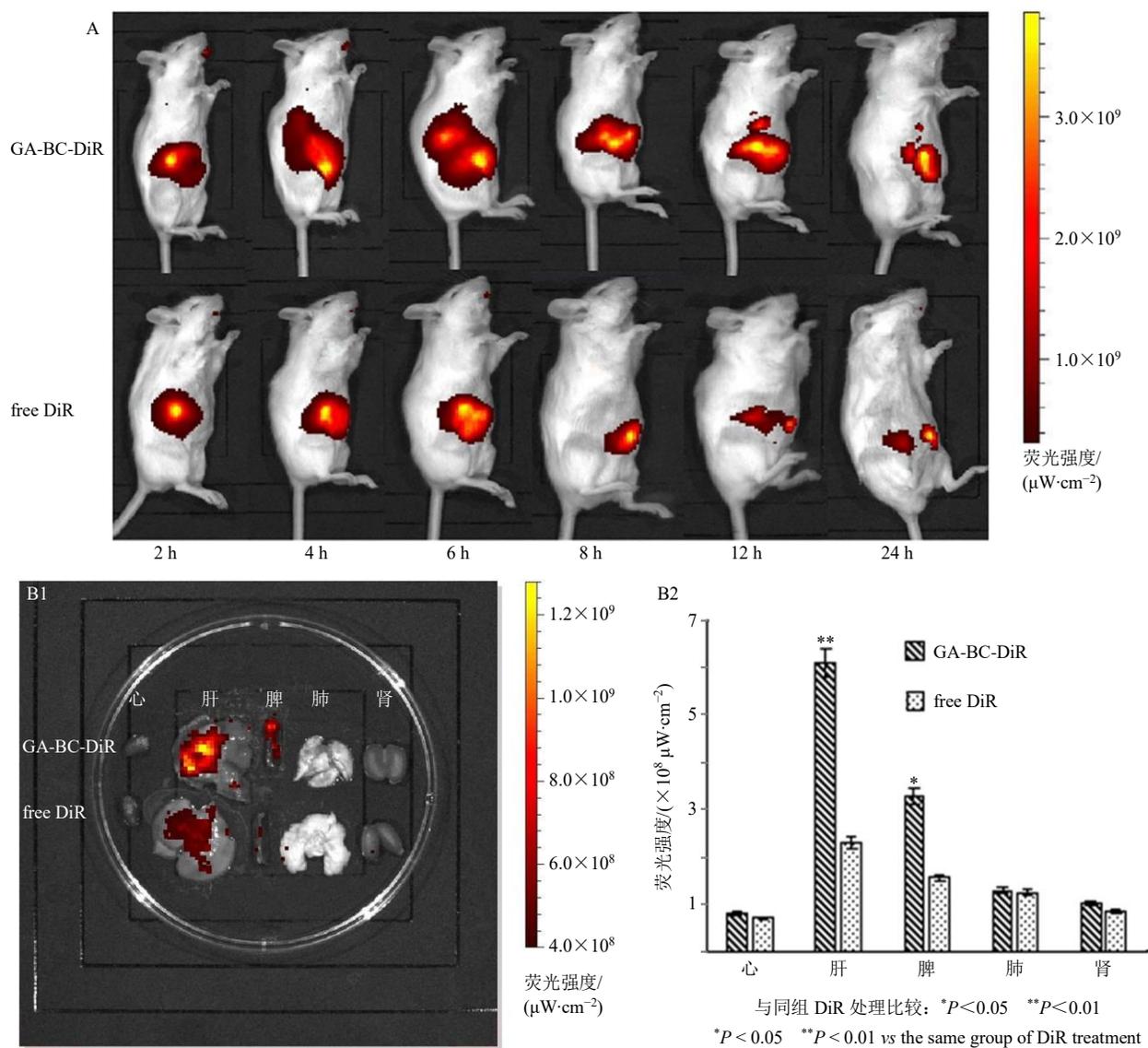


图 10 小鼠口服 DiR 和 GA-BC-DiR 纳米胶束 24 h 内的体内荧光成像 (A) 及 24 h 后的离体器官的荧光成像 (B1) 和平均荧光强度 (B2) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 *In vivo* fluorescence imaging within 24 h oral administration of DiR and GA-BC-DiR nanomicelles in mice (A), fluorescence imaging of isolated organs (B), and mean fluorescence intensity after oral administration of DiR and GA-BC-DiR nanomicelles for 24 h ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

信号变强,说明 GA-BC-DiR 纳米胶束可进入肝脏,实现荧光积累。

实验结束进一步解剖器官的体外荧光图像及定量分析如图 10-B1、B2 所示,在肝脏部位 GA-BC-DiR 组的荧光强度是游离 DiR 组的 2.65 倍,进一步证实负载 DiR 的 GA-BC 纳米胶束比游离 DiR 更容易在肝脏积累,表明 GA 修饰的 GA-BC 纳米胶束对肝脏存在靶向作用,可用于肝脏靶向给药。

2.9 GA-BC 胶束安全性评价

2.9.1 斑马鱼胚胎的准备 挑选健康的斑马鱼雌雄成鱼进行追尾交配自然受精,收集受精卵,在显微

镜下观察,剔除未受精或已经死掉的鱼卵,随后将其放入 (29±1) °C 的恒温培养箱孵育 2~4 h,选取受精后 4 hpf (hours postfertilization) 后胚胎发育阶段相同的鱼卵用于毒性暴露试验。

2.9.2 斑马鱼胚胎毒性实验 胚胎发育至 4 hpf 时开始加药处理,将同步发育的胚胎分选到 24 孔板内,每孔 5 枚,小心吸出 24 孔板中置有斑马鱼胚胎的培养液,沿室壁缓慢轻柔地加入含有不同质量浓度的待测药物 (载体质量浓度分别为 0.01、0.02、0.05、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00、10.00 mg/mL) 配制的胚胎培养液,轻轻分散胚胎,避免聚集,每

个质量浓度设置3组相同质量浓度进行平行重复试验,以单纯培养基为空白对照。置于恒温培养箱中孵育。分别在受精后24、48、72、96 h时放置显微镜下观察胚胎发育情况并记录实验结果。

实验结果表明如图11所示,在受精24 h时,载体质量浓度在0.01~2 mg/mL时受精卵发育状态正常,48 h开始孵化,通过显微镜可以清楚地观察到受精卵内斑马鱼的头、脑、尾以及卵黄囊等发育正常,至72 h斑马鱼脱膜而出,成功孵化为小鱼,

此时载体质量浓度在2 mg/mL的条件下存在少量鱼卵发育迟缓未脱膜现象,其余均可正常生长发育,由于10 mg/mL的药物质量浓度过高,药液呈现粘稠胶状,存在药物毒性使胚胎不能发育成功,大多数受精卵中的卵黄囊消失,并且斑马鱼卵内部无明显的头、脑和尾巴等特征出现,受精卵出现大量死亡情况并逐渐消融。因此,当载体质量浓度低于2 mg/mL时基本对斑马鱼卵的正常发育生长无毒副作用,可作为安全的药物递送载体。

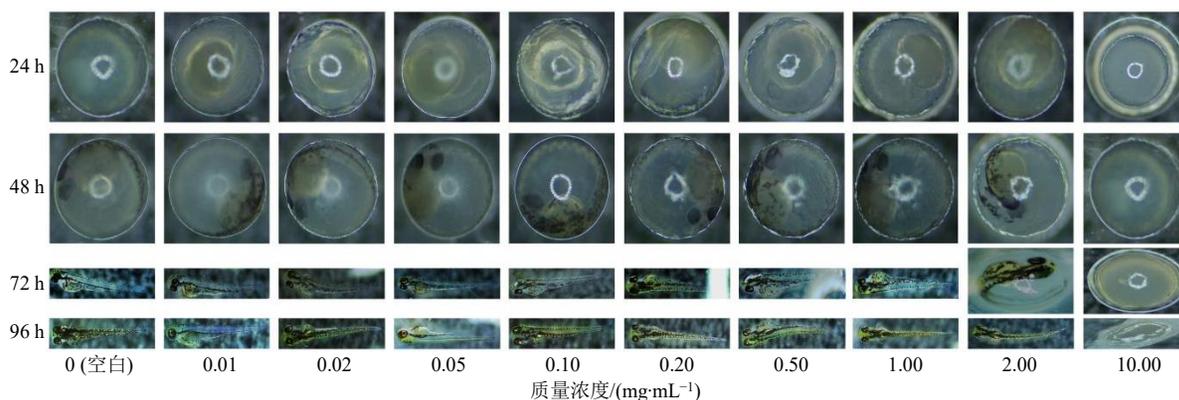


图11 不同质量浓度的GA-BC对斑马鱼胚胎整体发育的影响

Fig. 11 Effect of different concentrations of GA-BC on overall development of zebrafish embryos

3 讨论

紫杉醇是近些年来经临床验证疗效最为显著的抗癌药物之一,具有广谱抗肿瘤活性^[21-24],然而由于紫杉醇本身水溶性低,口服生物利用度差并且在体内非特异性分布会对正常细胞造成伤害等原因,使其本身能够发挥的疗效及临床使用的安全性受到极大的挑战。因此提高紫杉醇的疗效及靶向性,减少药物的不良反应,最大限度地提高药物局部作用仍是新药开发的重点方向^[25-26]。

本研究选择GA作为疏水端,对BC进行化学修饰,获得两亲性聚合物GA-BC。BC具有独特的超细网状纤维结构,同时具有高含水率、高结晶度、多微孔性可以容纳大量的药物分子以及便于药物的持续释放等优点^[27-28],可作为药物载体进行开发。但关于BC用于制备两亲性聚合物鲜有报道,根本原因为虽然BC本质上为亲水结构,但其内部强烈的氢键作用使其在水和多数有机溶剂中难以溶解,并且BC缺乏靶向性,这限制了BC在药物递送上的效率^[29-30]。本研究首先通过离子液体四丁基醋酸铵溶液削弱BC分子间氢键作用,再通过接枝反应改变BC结构,改善BC的亲水性能,同时使BC获得GA的肝靶向作用,以GA-BC为载体制备负

载PTX的口服纳米胶束。制成的GA-BC载体临界胶束质量浓度为0.063 mg/mL,据报道较低的临界胶束质量浓度(<0.135 mg/mL)和较小的粒径(<500 nm)可通过内吞作用被肠上皮细胞吸收,能有效提高胶束在体液中的抗稀释能力,增强药物体内的稳定性^[31-33]。

胃肠道的生理和物理屏障是阻碍药物递送系统吸收的一大难题,通常大多数药物进入胃肠道就会被分解释放,难溶性药物更不易被胃肠道吸收,因此药物未到达病变部位就被体内代谢和清除,导致血药浓度无法满足治疗需要^[34]。体外释放实验分别考察它们在人工胃液和人工肠液2种模拟人工介质中的释放情况,结果显示,GA-BC-PTX在人工胃液及人工肠液中在0~2 h内紫杉醇累积释放率有明显提高外,2~6 h表现为紫杉醇缓慢释放,之后胶束的几乎不释药,至24 h的累积释放率分别为11.81%和8.01%,明显低于紫杉醇原药,提示胶束可能以完整胶束形式被胃肠壁细胞摄取从而增强药物吸收。

肿瘤化疗所面临的另一个挑战是由于化疗药物体内非特异性分布对正常细胞所造成的伤害^[4]。为克服这个问题,设计GA作为肝靶向配体构建靶向

胶束。据文献报道 GA 具有肝靶向作用并且在肝癌细胞的表达是正常肝组织的 1.5~5 倍^[35], GA 与该位点的结合呈可饱和性、高度特异性。已有研究将 GA 在多种耐药癌细胞系以及多种动物模型上进行了测试,均表现出良好的靶向作用^[36-39]。因此将 GA 作为肝靶向配体来进行靶向治疗可使药物准确作用于肝部病变部位,减少药物对其他器官的损伤^[40]。本研究采用细胞摄取和小鼠活体成像考察胶束的主动靶向性,通过高内涵细胞成像系统观察到 2 h HepG2 细胞内的 GA-BC-NR 荧光强度比游离的 NR 更强,随着时间延长至 4 h,其荧光强度进一步增强,表明更多的胶束进入细胞。

通过流式细胞仪进行荧光定量分析,结果显示孵育 4 h HepG2 细胞对 GA-BC-NR 胶束摄取量是游离尼罗红的 16 倍,由此证明 GA 介导的 GA-BC 胶束对 HepG2 肝癌细胞具有靶向能力,能够实现药物在细胞内的富集。MTT 毒性实验同时也说明了这一现象,与游离的紫杉醇原药相比,GA-BC-PTX 载药胶束可以明显抑制 HepG2 细胞的活性,初步评价了 GA-BC-PTX 载药胶束的抗肿瘤效果。为了进一步验证 GA-BC 胶束的靶向性,在小鼠口服给药后,对其进行活体成像,可以在不同时间节点观察药物在体内吸收分布,结果显示 2~12 h 小鼠的腹部区域存在明显的荧光,可能是由于 GA-BC 胶束对肠道表面具有较强的黏附性,增加了药物在消化系统中的停留时间,12 h 后小鼠腹部区域的荧光由于吸收或消除作用逐渐脱离胃肠系统。

小鼠离体器官荧光成像图片对比全身荧光定位时可能存在少许误差,这是由于荧光是平面的,体内深层器官或组织被采集的信号将会衰减很多,所以在整体成像过程中不能很好地定位荧光的分布。因此实验再次对离体器官进行荧光定位及定量分析,结果显示,GA-BC-DiR 载药胶束已经进入肝脏和脾脏等一些组织或器官的可能在体内停留的时间更长,肝脏处 GA-BC-DiR 组的荧光强度是游离 DiR 组的 2.65 倍,进一步证实了 GA-BC 聚合物胶束的肝靶向能力,更易使药物在肝脏累积,提高药物作用效果。

综上所述,GA-BC 胶束可用于紫杉醇口服递药系统的开发,具有良好的肝脏靶向性和生物安全性可降低紫杉醇非特异性带来的不良反应,同时针对 HepG2 细胞,GA-BC-PTX 载药胶束表现出较好的抗肿瘤活性和入胞能力,为肝癌治疗提供新思路,

具有良好的应用前景。此外,对于紫杉醇口服胶束的抗肿瘤效果仍需进行更系统、深入地研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 俞悦,黄慧瑶,吴大维,等. “十三五”期间中国肝癌药物临床试验进展 [J]. 肝癌电子杂志, 2021, 8(4): 26-30.
- [2] 吕冬颖,黄硕,沙露平,等. 载有紫杉醇的氧化还原敏感混合胶束的制备及评价 [J]. 药学学报, 2020, 55(6): 1320-1326.
- [3] 杨富恒,李国锋,李振东,等. 基于甘草酸为载体的紫杉醇-甘草酸纳米胶束的构建和口服生物利用度的评价 [J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(10): 1040-1044.
- [4] 陈旭玲,陈颜,赵艳丽,等. 基于前药构建混合胶束实现紫杉醇/阿霉素共递送 [J]. 药物生物技术, 2021, 28(1): 12-20.
- [5] Yuan H, Lu L J, Du Y Z, et al. Stearic acid-g-chitosan polymeric micelle for oral drug delivery: *In vitro* transport and *in vivo* absorption [J]. *Mol Pharm*, 2011, 8(1): 225-238.
- [6] 张菊,魏丹,张雪,等. 蝙蝠葛碱复合纳米胶束的制备及大鼠体内药动学研究 [J]. 中草药, 2021, 52(8): 2276-2284.
- [7] 赵丽娟,陈祥娥,杨敏. 紫杉醇口服给药系统的研究进展 [J]. 药物生物技术, 2020, 27(2): 169-172.
- [8] 汪丽粉,李政,贾士儒,等. 细菌纤维素性质及应用的研究进展 [J]. 微生物学通报, 2014, 41(8): 1675-1683.
- [9] 黄弘轩,白波,赖琛,等. 高分子修饰细菌纤维素细胞相容性的初步研究 [J]. 中华关节外科杂志: 电子版, 2020, 14(1): 63-67.
- [10] Li T, Chen C J, Brozena A H, et al. Developing fibrillated cellulose as a sustainable technological material [J]. *Nature*, 2021, 590(7844): 47-56.
- [11] Silva N H C S, Rodrigues A F, Almeida I F, et al. Bacterial cellulose membranes as transdermal delivery systems for diclofenac: *In vitro* dissolution and permeation studies [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 106: 264-269.
- [12] Shi Z J, Gao X, Ullah M W, et al. Electroconductive natural polymer-based hydrogels [J]. *Biomaterials*, 2016, 111: 40-54.
- [13] Römling U, Galperin M Y. Bacterial cellulose biosynthesis: Diversity of operons, subunits, products, and functions [J]. *Trends Microbiol*, 2015, 23(9): 545-557.
- [14] 白文静,夏春玉,李曼,等. 共递送 IR-780 及 18 β -甘草次酸的还原敏感胶束型纳米粒的构建及其抗肿瘤效果评价 [J]. 药学学报, 2022, 57(1): 211-221, 278.

- [15] 王若宁, 柳雨影, 陈健, 等. 甘草酸、甘草次酸的抗肿瘤机制及其作为药物递送载体的研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(23): 5876-5886.
- [16] 梁俊杰, 夏国园, 程祖胜, 等. 甘草次酸的肝靶向应用进展 [J]. 广东医学, 2019, 40(17): 2554-2557.
- [17] 刘景华, 赵阳, 李宾, 等. 甘草次酸对胃癌细胞 SGC7901 增殖、凋亡及 PI3K-Akt-mTOR 通路的影响 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(12): 2444-2449.
- [18] 王莎莎, 陈家琦, 王华华, 等. 甘草次酸修饰多西紫杉醇磁性纳米粒的制备与表征 [J]. 中国药房, 2020, 31(19): 2345-2350.
- [19] 俞洁. 反溶剂沉淀法制备生物相容性载药纳米粒子及其抗菌应用 [D]. 上海: 华东理工大学, 2021.
- [20] 许秋霞, 庄奕筠, 高雅莉, 等. 高效液相色谱法测定紫杉醇血药浓度的研究进展 [J]. 海峡药学, 2019, 31(8): 100-102.
- [21] 陈聪慧, 张佩语. 双靶向共载紫杉醇及白藜芦醇纳米系统构建及其体外抗多药耐药肿瘤研究 [J]. 中草药, 2022, 53(2): 395-402.
- [22] 李雨澎, 林睿, 母润红. 紫杉醇及其联合用药抗肿瘤的研究进展 [J]. 吉林医药学院学报, 2021, 42(6): 440-442.
- [23] 马晶晶, 杨政, 郭惠, 等. 水溶性及靶向性紫杉醇前药的研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2021, 30(16): 1489-1497.
- [24] 李小江, 赵阳, 牟睿宇, 等. 注射用香菇多糖联合 AC 方案和紫杉醇治疗晚期三阴性乳腺癌的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(1): 26-31.
- [25] 郑婉榕, 赖佛宝. 紫杉醇新剂型研究进展 [J]. 现代医药卫生, 2020, 36(2): 216-219.
- [26] 张倩, 杨坛, 黎梓坪, 等. 左旋肉碱修饰的壳聚糖-硬脂酸协载槲皮素口服紫杉醇纳米胶束的制备、表征及在体肠循环研究 [J]. 中草药, 2020, 51(21): 5440-5446.
- [27] Li G H, Wang L, Deng Y, *et al.* Research progress of the biosynthetic strains and pathways of bacterial cellulose [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2022, doi: 10.1093/JIMB/KUAB071.
- [28] Alkhatib Y, Dewaldt M, Moritz S, *et al.* Controlled extended octenidine release from a bacterial nanocellulose/poloxamer hybrid system [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2017, 112: 164-176.
- [29] Gregory D A, Tripathi L, Fricker A T R, *et al.* Bacterial cellulose: A smart biomaterial with diverse applications [J]. *Mater Sci Eng R Rep*, 2021, 145: 100623.
- [30] Islam S U, Ul-Islam M, Ahsan H, *et al.* Potential applications of bacterial cellulose and its composites for cancer treatment [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 168: 301-309.
- [31] Gaucher G, Satturwar P, Jones M C, *et al.* Polymeric micelles for oral drug delivery [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2010, 76(2): 147-158.
- [32] 范晓慧, 赵艳丽, 徐巍, 等. 半胱氨酸修饰的荷载紫杉醇聚离子复合物胶束口服给药的体内体外研究 [J]. 药物生物技术, 2015, 22(2): 95-99.
- [33] 曹姗, 夏云, 曲虹, 等. 纳米技术提高难溶性药物口服给药生物利用度 [J]. 吉林医学, 2020, 41(1): 206-208.
- [34] 赵阳, 刘仁凤, 窦寅, 等. 自组合法构建的疏水药物新型口服递送系统及其体内外评价 [J]. 第三军医大学学报, 2020, 42(10): 1053-1063.
- [35] 韩德恩, 辛玉凤, 田萍, 等. 甘草次酸修饰大黄素纳米结构脂质载体制备及药动学和肝靶向评价 [J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(2): 136-141.
- [36] Tian Q, Wang X H, Wang W, *et al.* Self-assembly and liver targeting of sulfated chitosan nanoparticles functionalized with glycyrrhetic acid [J]. *Nanomed Nanotechnol Biol Med*, 2012, 8(6): 870-879.
- [37] Han X F, Wang Z, Wang M Y, *et al.* Liver-targeting self-assembled hyaluronic acid-glycyrrhetic acid micelles enhance hepato-protective effect of silybin after oral administration [J]. *Drug Deliv*, 2016, 23(5): 1818-1829.
- [38] Guan Q X, Zhang X, Zhang Y, *et al.* Design, synthesis, and characterization of glycyrrhetic acid-mediated multifunctional liver-targeting polymeric carrier materials [J]. *J Mater Res*, 2020, 35(10): 1236-1248.
- [39] Zheng Y, Shi S D, Liu Y R, *et al.* Targeted pharmacokinetics of polymeric micelles modified with glycyrrhetic acid and hydrazone bond in H22 tumor-bearing mice [J]. *J Biomater Appl*, 2019, 34(1): 141-151.
- [40] 魏田田, 周洪伟, 邬瑞光. 甘草次酸及其衍生物在肝靶向载药系统中的应用 [J]. 中医药信息, 2016, 33(6): 109-112.

[责任编辑 郑礼胜]