

叶酸修饰的克班宁聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸共聚物纳米粒的制备及其体外抗肿瘤活性研究

潘蕊^{1,3,4}, 张海亮^{1,4}, 赵笑雨¹, 唐钧泽¹, 吴健铭¹, 郑永仁⁵, 程欣^{1,2,4*}

1. 云南中医药大学中药学院, 云南 昆明 650500
2. 云南省高校外用给药系统与制剂技术研究重点实验室, 云南 昆明 650500
3. 云南省南药可持续利用研究重点实验室, 云南 昆明 650500
4. 云南省傣医药与彝医药重点实验室, 云南 昆明 650500
5. 云南中医药大学科学技术处, 云南 昆明 650500

摘要: 目的 制备叶酸修饰的克班宁聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸共聚物纳米粒 (folic acid modified crebanine polyethylene glycol-polylactic acid hydroxyacetic acid copolymer nanoparticles, FA-Cre@PEG-PLGA NPs), 并考察其体外释放及抗肿瘤活性。方法 以克班宁为模型药, 用 PEG-PLGA 共聚物、叶酸等为材料, 通过超声乳化-溶剂挥发法制备 FA-Cre@PEG-PLGA NPs, 采用激光粒度仪、透射电子显微镜和荧光显微镜对 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 的粒径、 ζ 电位及形态进行表征, 紫外光谱法测定并计算克班宁的封装率和载药量, 比较 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 和克班宁原料药 72 h 的体外释放规律, 通过溶血实验考察二者生物学特性, CCK-8 实验考察两者对正常肝 L02 细胞存活率的影响及对肝癌 Bel-7402 细胞体外增殖抑制作用。细胞划痕法考察纳米粒和原料药对肝癌 Bel-7402 细胞迁移能力的影响。荧光显微镜观察纳米粒在不同时间点对肝癌 Bel-7402 细胞的摄取情况。结果 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 的平均粒径为 (247.67 ± 2.49) nm, 多分散指数 (polydispersity index, PDI) 为 0.139 ± 0.027 , ζ 电位为 (-9.40 ± 0.54) mV, 透射电子显微镜下呈圆球状核壳结构, 荧光显微镜下观察纳米粒, 其气化后明场呈蓝色光点、暗场呈红色光点。FA-Cre@PEG-PLGA NPs 中克班宁的封装率为 83.78%, 载药量为 67.78%。FA-Cre@PEG-PLGA NPs 与克班宁原料药体外释放均符合 Ritger-Peppas 模型; 安全性评价结果显示, FA-Cre@PEG-PLGA NPs 相比于克班宁原料药在 50~300 μ g/mL 内具有良好的生物相容性。FA-Cre@PEG-PLGA NPs 对人正常肝 L02 细胞毒性较低, 相比于克班宁原料药有一定的安全性。体外增殖抑制结果显示, 两者对 Bel-7402 肿瘤细胞的增殖抑制率均呈现出剂量依赖性和时间依赖性, 且 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 联合超声辐照后对 Bel-7402 肝癌细胞具有更强的杀伤作用。细胞划痕实验表明, 克班宁原料药、FA-Cre@PEG-PLGA NPs 对 Bel-7402 肿瘤细胞迁移均有抑制作用, 呈剂量依赖性, 且纳米粒联合超声抑制细胞迁移效果更显著。细胞摄取实验表明, 相同时间下超声联合纳米粒能有效增强肿瘤细胞的摄取。结论 成功制得 FA-Cre@PEG-PLGA NPs, 而且体外具有良好的缓释效果和抑瘤作用, 为 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 应用于肝癌的治疗研究提供实验依据。**关键词:** 叶酸; 聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸; 克班宁; 纳米粒; 抗肿瘤活性; 体外释放; 超声乳化-溶剂挥发法
中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)20-6643-14
DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.20.009

Preparation and anti-tumor activity study of folic acid modified crebanine polyethylene glycol-polylactic acid hydroxyacetic acid copolymer nanoparticles *in vitro*

PAN Rui^{1,3,4}, ZHANG Hai-liang^{1,4}, ZHAO Xiao-yu¹, TANG Jun-ze¹, WU Jian-ming¹, ZHENG Yong-ren⁵, CHENG Xin^{1,2,4}

1. College of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China
2. Key Laboratory of External Drug Delivery System and Preparation Technology in University of Yunnan Province, Kunming

收稿日期: 2023-04-28

基金项目: 云南省科技厅——云南中医药大学应用基础研究联合专项重点项目 (202001AZ070001-008); 云南省科技厅生物医药重大科技专项 (202002AA100007); 云南省科技人才平台计划 (202105AG070012); 云南省傣医药与彝医药重点实验室开放课题 (202210SS2205); 云南省傣医药与彝医药重点实验室开放课题 (202210SS2206); 国家中医药管理局“十二五”重点学科——傣药学

作者简介: 潘蕊 (1999—), 硕士研究生, 研究方向为药物新剂型研究。Tel: 18468224320 E-mail: 547349550@qq.com

***通信作者:** 程欣 (1977—), 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为纳米医药、药物新剂型等研究。Tel: 15987162031

650500, China

3. College of Chinese Materia Medica and Yunnan Key Laboratory of Southern Medicinal Utilization, Kunming 650500, China

4. Yunnan Key Laboratory of Dai and Yi Medicines, Kunming 650500, China

5. Science and Technology Office, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China

Abstract: Objective To prepare folic acid modified crebanine polyethylene glycol-poly(lactic acid hydroxyacetic acid) copolymer nanoparticles (FA-Cre@PEG-PLGA NPs) and investigate their *in vitro* release and anti-tumor activity. **Methods** FA-Cre@PEG-PLGA NPs were prepared by ultrasonic emulsion-solvent evaporation method with crebanine as a model drug, polyethylene glycol-poly(lactic acid hydroxyacetic acid) (PEG-PLGA) copolymer and folic acid (FA) as materials. The particle size, potential and morphology of FA-Cre@PEG-PLGA NPs were characterized by laser particle size measurement, transmission electron microscopy and fluorescence microscope. The encapsulation rate and drug loading capacity of crebanine were determined and calculated by Ultraviolet spectroscopy. Meanwhile, the *in vitro* release patterns of FA-Cre@PEG-PLGA NPs and crebanine bulk drug at 72 h were compared. The biological properties were investigated by hemolysis assay. The safety evaluation on L02 cells and the proliferation inhibition on Bel-7402 cells were investigated by CCK-8 assay *in vitro*. The proliferation of Bel-7402 cells was quantified by cell wound scratch assay. Finally, the uptake capacity of nanoparticles to Bel-7402 cells at different time points was observed by fluorescence microscope. **Results** The average particle size of FA-Cre@PEG-PLGA NPs was (247.67 ± 2.49) nm, with a polydispersity index (PDI) of 0.139 ± 0.027 and a ζ potential of (-9.40 ± 0.54) mV. The transmission electron microscopy revealed a core-shell structure, while the fluorescence microscopy showed blue dots in the bright field and red dots in the dark area after gasification. The encapsulation rate of crebanine in nanoparticles was 83.78% and the drug loading was 67.78%. The release of FA-Cre@PEG-PLGA NPs and crebanine bulk drug conformed to the Ritger-Peppas model *in vitro*. The safety evaluation showed that FA-Cre@PEG-PLGA NPs had good biocompatibility within the range of 50–300 $\mu\text{g/mL}$ compared with crebanine bulk drug. The FA-Cre@PEG-PLGA NPs showed lower toxicity to L02 cells than crebanine bulk drug. The proliferation inhibition results showed dose-dependent and time-dependent effects on the proliferation of Bel-7402 cells *in vitro*. Moreover, the FA-Cre@PEG-PLGA NPs combined with ultrasound irradiation had stronger killing effect on Bel-7402 cells. The cell wound scratch experiments showed that both the crebanine bulk drug and FA-Cre@PEG-PLGA NPs inhibited the migration of Bel-7402 cells in a dose-dependent manner, and the nanoparticles combined with ultrasound irradiation could inhibit the migration of tumor cells more significantly. The cell uptake experiment showed that nanoparticles combined with ultrasound irradiation could effectively enhance the uptake of tumor cells at the same time. **Conclusion** The FA-Cre@PEG-PLGA NPs were successfully prepared, and exhibited good slow-release effect and antitumor effect *in vitro*, providing an experimental basis for the application of FA-Cre@PEG-PLGA NPs in the treatment of liver cancer.

Key words: folic acid; polyethylene glycol-poly(lactic acid hydroxyacetic acid); crebanine; nanoparticles; anti-tumor activity; *in vitro* release; ultrasonic emulsion-solvent evaporation method

克班宁是一种异喹啉类阿朴菲型生物碱, 提取自防己科千金藤属植物云南地不容 *Stephanina Yunnanensis* H. S. Lo 的块根中^[1-2]。研究表明, 克班宁具有镇静^[3]、镇痛^[4]、抗炎^[5-6]、抗心律失常^[7]等作用。近期研究表明克班宁对多种肿瘤细胞有明显的增殖抑制作用, 如对人肝癌 SMMC-7721 细胞^[8]、人肺腺癌 A549 细胞^[9]、宫颈癌细胞系 (KB-3-1 和 KB-V1)^[10]等肿瘤细胞均具有明显的细胞毒性。

作为一种新型的肿瘤治疗方法, 纳米粒疗法正逐渐应用于癌症治疗的临床研究, 纳米颗粒具有良好的可降解性, 可以被递送到肿瘤组织, 具有较强的高渗透长滞留效应 (enhanced permeability and retention effect, EPR)^[11-12]。聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸 (polyethylene glycol-poly(lactic acid hydroxyacetic

acid, PEG-PLGA) 共聚物中含有亲水段聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 和两亲性的聚乳酸羟基乙酸 (poly(lactic acid hydroxyacetic acid), PLGA) 共聚物。PEG 具有良好的亲水性, 能延长药物在体内的循环和滞留时间并提高稳定性。PLGA 具有良好的生物相容性和安全性, 在体内可降解为无毒的聚乳酸^[13]。用 PEG 修饰 PLGA 后, 可提高 PLGA 的亲水性, 减少巨噬细胞的识别和吞噬, 延长体内的循环时间。有学者认为 PEG 也可通过 EPR 效应增加纳米粒肿瘤蓄积^[14-15]。叶酸是一种小分子维生素, 具有相对分子质量小、无免疫原型、价廉易得、与受体亲和力强等优点, 可与叶酸受体 (folate receptor, FR) 尤其 FR α 亚型在体内发生特异性结合。叶酸受体在许多恶性肿瘤如肝癌、乳腺癌、宫

颈癌等癌细胞表面过度表达,而在正常细胞中几乎不表达或表达水平极低^[16-18]。为得到具有叶酸靶向性的运载系统,通过化学修饰将叶酸分子的羧基与 PEG-PLGA 中 PEG 的氨基端连接,从而得到靶向运载体聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸-叶酸 (polyethylene glycol-poly(lactic acid hydroxyacetic acid)-folic acid, PEG-PLGA-FA)。将药物包裹于 PEG-PLGA-FA 载体内,将赋予其叶酸靶向功能,特异性地选择 FR α 高表达的恶性肿瘤细胞,大大降低药物的不良反应,从而促进其在细胞水平或体内的吸收。

针对克班宁毒性较大^[19]、半衰期短^[20]、水溶性差^[21]等缺点,本实验以 PLGA-PEG-FA 为载体,制备叶酸修饰的克班宁聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸共聚物纳米粒 (FA-Cre@PEG-PLGA NPs),期望通过纳米粒的小粒径被动靶向和叶酸的主动靶向作用改善克班宁自身缺点,提高药物安全性和肿瘤细胞靶向性,为后续用于治疗肿瘤的新型纳米制剂研究提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

190Plus PALS 型纳米激光粒度仪,美国布鲁克海文仪器公司; HT7700 型透射电子显微镜, HITACHI 公司; JY98-IIIDN 型超声破碎仪,宁波新芝生物科技股份有限公司; Sigma3-30k 型超高速冷冻离心机,德国 Sigma 公司; Cary 60 型紫外分光光度计,美国安捷伦有限公司; MF52-N 型荧光倒置显微镜,广州市明美光电技术有限公司; 4750E 型二氧化碳培养箱,美国 Nuair 公司; DMil LED 型倒置显微镜,德国 Leica 公司; Multiskan 型酶标仪,美国 Thermo 公司; DP-50 型便携式超声诊断仪,深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司。

1.2 试剂

克班宁,云南中医药大学药剂实验室自制,批号 20141101,质量分数 99.2%; PLGA,济南岱罡生物科技有限公司,批号 20140921; PEG-PLGA-FA,重庆浦诺维生物科技有限公司,批号 RO018242; 液态氟碳 (PFP),美国 Strem Chemicals 公司,批号 28403300; 细胞膜荧光探针 DiR 碘化物,美国 Biotium 公司,批号 20160814; 聚乙烯醇 (PVA),美国 Sigma 公司,批号 SLBR4157V; CCK-8 试剂,西安瑞禧生物科技有限公司,批号 20010335; 胎牛血清 (批号 2144324)、青霉素-链霉素 (双抗,批号 2233204)、DMEM 培养基 (批号 2211070)、磷

酸盐缓冲液 (PBS),上海达特希尔生物科技有限公司,批号 2237244; 耦合胶,天津津亚科技发展有限公司,批号 20190393。

1.3 细胞株

正常肝 L02 细胞、肝癌 Bel-7402 细胞,均由云南中医药大学药剂实验室提供。

1.4 动物

SPF 级 KM 小鼠,雄性,体质量 (20 $\pm$ 2) g,购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司,动物生产许可证号为 SCXK (京) 2019-0010,本课题经云南中医药大学动物实验伦理委员会批准 (批准号 R-062022082),实验动物饲养于云南中医药大学实验动物中心,使用许可证号为 SYXK (滇) K2022-0004。

2 方法与结果

2.1 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 的制备

采用超声乳化-溶剂挥发法制备 FA-Cre@PEG-PLGA NPs,称取克班宁 30 mg 溶于 2 mL 的醋酸乙酯中,依次加入 PLGA 25.5 mg、5 mg/mL DiR 溶液 0.1 mL 和 PFP 300 μ L,避光冰浴下,超声破碎仪上乳化 180 s,另精密称取 PLGA-PEG-FA 76.40 mg 溶于 2 mL 醋酸乙酯并加入上述溶液中,避光冰浴下,超声破碎仪上乳化 90 s 后加入 25 mL 0.5% PVA 溶液再次进行超声乳化。随后加入 75 mL 纯水稀释,室温下通风橱内避光搅拌过夜。最后将所得乳液于冷冻离心机内 4 $^{\circ}$ C 16 000 r/min 离心 (离心半径 7.6 cm) 5 min,按此方法共离心 3 次,弃去上清液,收集沉淀,沉淀以 5 mL 纯水分散,备用。4 $^{\circ}$ C 冰箱内避光保存。如图 1 所示,所制备的 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 为带有淡蓝色乳光的澄清液体,放置后未产生沉淀或絮凝现象。

2.2 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 的表征

2.2.1 纳米粒的粒径、 ζ 电位测定 取适量纳米粒



图 1 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 的外观

Fig. 1 Appearance of FA-Cre@PEG-PLGA NPs

以纯水稀释 5 倍, 通过激光粒度仪测定纳米粒的平均粒径和 ζ 电位, 重复操作 3 次, 记录平均值。结果见图 2-A、B, 测得 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 的平均粒径为 (247.67 ± 2.49) nm, 多分散指数 (polydispersity index, PDI) 为 0.139 ± 0.027 , ζ 电位为 (-9.40 ± 0.54) mV。

2.2.2 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 的稳定性考察 将 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 分别于 7、15、30、60、90、120、150、180 d 取样观察并测定粒径及 ζ 电位。结果表明, 纳米粒外观仍呈淡蓝色, 震荡后均匀分

散, 粒径、 ζ 电位无明显变化, 结果如表 1 所示, FA-Cre@PEG-PLGA NPs 在 180 d 内平均粒径为 (256.09 ± 4.90) nm, RSD 为 1.92%; 平均 ζ 电位为 (-10.28 ± 0.54) mV, RSD 为 5.44%; 平均 PDI 为 0.144 ± 0.007 , RSD 为 4.89%。表明纳米粒在 180 d 内稳定性良好。

表 1 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 稳定性考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 1 Stability investigation of FA-Cre@PEG-PLGA NPs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

t/d	平均粒径/nm	ζ 电位/mV	PDI
7	248.17 $\pm$ 1.06	-9.36 $\pm$ 0.22	0.139 $\pm$ 0.023
15	255.27 $\pm$ 0.76	-10.01 $\pm$ 0.33	0.145 $\pm$ 0.011
30	256.10 $\pm$ 0.94	-10.47 $\pm$ 0.02	0.154 $\pm$ 0.023
60	259.81 $\pm$ 1.84	-10.83 $\pm$ 0.16	0.138 $\pm$ 0.015
90	264.11 $\pm$ 0.89	-11.12 $\pm$ 0.17	0.154 $\pm$ 0.015
120	259.08 $\pm$ 1.08	-10.43 $\pm$ 0.33	0.141 $\pm$ 0.025
150	253.13 $\pm$ 1.40	-10.18 $\pm$ 0.30	0.136 $\pm$ 0.021
180	253.07 $\pm$ 2.92	-9.84 $\pm$ 0.12	0.148 $\pm$ 0.015

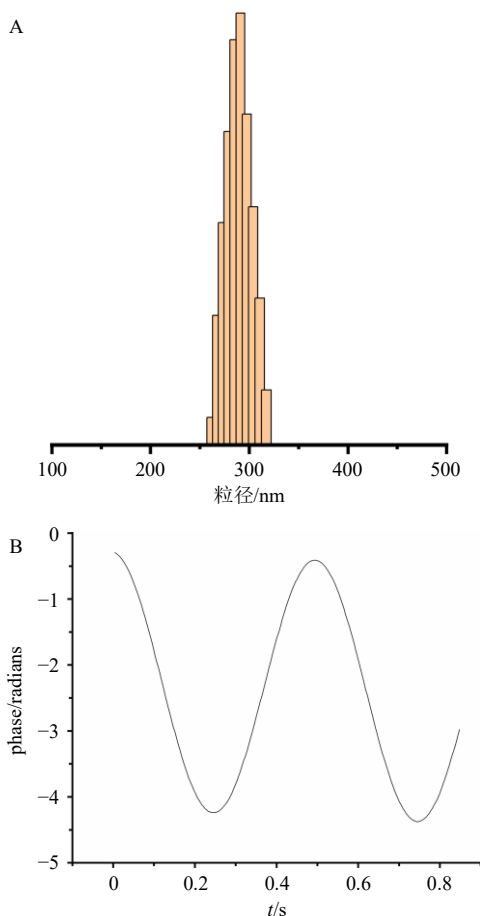
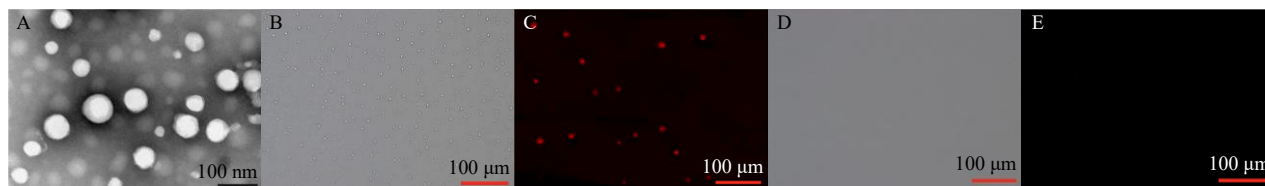


图 2 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 的粒径 (A) 和 ζ 电位图 (B)
Fig. 2 Particle size (A) and potential diagram (B) of FA-Cre@PEG-PLGA NPs

2.2.3 纳米粒的形态观察 取适量纳米粒稀释后滴在碳膜铜网上放置 5 min, 滤纸吸取多余液体, 滴加 2% 磷钨酸溶液染色 5 min, 自然挥干, 采用透射电子显微镜观察纳米粒的形态。如图 3-A 所示, FA-Cre@PEG-PLGA NPs 呈圆球状核壳结构, 形态较规整, 粒子间未见明显黏连与聚集。另取适量 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 滴于载玻片上。滴入热水使纳米粒稀释气化, 于荧光显微镜下观察, 得纳米粒明场图和暗场图。并取等量的热水滴于载玻片上, 在荧光显微镜下观察热水的明场图和暗场图, 并与纳米粒气化后的图像进行对比。如图 3-B~E 所示, 纳米粒气化后明场呈蓝色光点, 暗场呈红色荧光点。

2.3 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 中克班宁含量测定方法的建立

2.3.1 线性关系考察 精密称取克班宁 2.5 mg 对照品置于烧杯中, 加适量无水乙醇溶解, 用生理盐



A-透射电镜图 B-纳米粒明场图 C-纳米粒暗场图 D-热水明场图 E-热水暗场图 ($\times 400$)
A-TEM B-NPs bright field C-NPs dark field D-hot water bright field E-hot water dark field ($\times 400$)

图 3 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 的表征

Fig. 3 Characterization of FA-Cre@PEG-PLGA NPs

水定容于 25 mL 棕色量瓶中,稀盐酸调 pH 值备用,分别量取 0.25、0.50、1.00、1.50、3.00、4.00、5.00 mL 于 25 mL 量瓶中,再加入生理盐水定容,紫外分光光度计 280 nm 测定吸光度 (A) 值。另取适量无水乙醇于量瓶中,加入生理盐水定容作为空白对照。用 A 值对质量浓度 (C) 作线性回归方程。得回归方程为 $A=0.061\ 3\ C-0.013\ 5$, $R^2=0.999\ 8$,结果表明克班宁在 1~20 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.3.2 精密度试验 取 2、6、16 $\mu\text{g/mL}$ 3 个不同质量浓度克班宁溶液,测定 A 值,同日内重复 3 次,连续进样 3 d,计算日内日间精密度。结果表明 3 个质量浓度的日内精密度 RSD 分别为 0.50%、0.16%、0.06%,日间精密度 RSD 分别为 0.51%、0.16%、0.06%,RSD 均小于 5.0%,符合方法学要求。

2.3.3 重复性试验 制备 6 份纳米粒样品,每份取 0.5 mL,分别置于 25 mL 棕色量瓶中,用生理盐水定容,同时以生理盐水作为调零溶液,在 280 nm 处测 A 值。结果,FA-Cre@PEG-PLGA NPs A 值的 RSD 为 0.49%,表明本方法重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 取 2 $\mu\text{g/mL}$ 克班宁溶液,在室温放置 0、2、4、6、8、12、24 h 时测定 A 值,考察稳定性,结果显示,克班宁溶液 A 值的 RSD 为 1.01%,稳定性良好,表明克班宁溶液在室温放置 24 h 内基本稳定。

2.3.5 加样回收率试验 精密量取已测定含量的样品 0.5 mL 测定 A_1 值,之后分别加入样品含量的 2、12、20 $\mu\text{g/mL}$ 对照品 0.5 mL,摇匀,过 0.22 μm 微孔滤膜,测定吸光度,计算加样回收率,结果显示,低、中、高质量浓度平均回收率为 102.05%、101.96%、101.21%,RSD 为 0.42%、0.27%、0.16%,说明该法测定克班宁含量回收率高、准确可靠。

2.4 封装率和载药量测定

取适量的 FA-Cre@PEG-PLGA NPs (投药量 W_1) 用无水乙醇稀释后,分别用超声诊断仪探头和超声清洗机超声 30 min,得滤液 (V_1),测定其 280 nm 波长处的吸光度,通过线性回归曲线方程计算出克班宁总质量浓度 (C_1)。取同样体积的纳米粒纯水稀释,离心 30 min,取滤液 (V_2),用紫外分光光度法测定并计算出游离克班宁质量浓度 (C_2)。按照下式计算封装率和载药量,得 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 的封装率为 83.78%,载药量为 67.78%。

$$\text{封装率}=(C_1-C_2)/C_1$$

$$\text{载药量}=(C_1V_1-C_2V_2)/W_1$$

2.5 体外释药规律分析

采用透析袋法^[23]测定 2 种制剂体外释药行为。分别取适量的 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 溶液和克班宁无水乙醇溶液于提前处理的透析袋中,透析袋两端系紧。生理盐水(稀盐酸调节 pH 6.8)为接受液,在 37 $^{\circ}\text{C}$,100 r/min 条件下,于 1、2、4、8、12、24、36、48、72 h 取样,并补加 10 mL 预热的生理盐水。样品测定前经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,用紫外分光光度法测定含量。在 280 nm 下测量吸光度,计算累积释放率,绘制体外释放曲线。结果见图 4,克班宁原料药在释放介质中释放迅速,48 h 释放度达到 90.67%,FA-Cre@PEG-PLGA NPs 仅前 12 h 属于快速释药期;12~72 h 属于缓慢释药期,72 h 累积释放率为 53.16%。相对于克班宁原料药,FA-Cre@PEG-PLGA NPs 有一定的缓释效果。通过软件 Origin 2018 利用不同释放模型处理克班宁原料药和 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 纳米粒在生理盐水中的释放数据。结果如表 2 所示,FA-Cre@PEG-PLGA NPs 中零级方程 R^2 为 0.778 1,一级方程 R^2 为 0.916 1,Higuchi 模型 R^2 为 0.934 2,Ritger-Peppas 模型 R^2 为 0.974 3。其中以 Ritger-Peppas 模型拟合度最高,符合该模型释放规律。Ritger-Peppas 模型可以描述为 $Q_t=kt^n$, n 可以代表药物释放机制,从 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 模型拟合结果可知,释放指数 (n)=0.315 1,当 $n<0.45$ 时,为 Fick 扩散^[22],即药物首先溶解成溶液后再从制剂中扩散出来进入介质,其释药受扩散速率的控制。

2.6 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 安全性评价

2.6.1 溶血实验 预先采集适量小鼠血液,收集在涂有肝素的离心管中,离心,弃去上清液。用生理盐水将离心所得的红细胞轻柔洗涤 3 次,配制成体

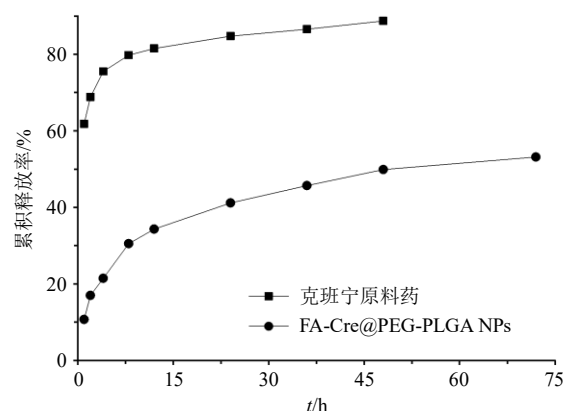


图 4 体外释放曲线

Fig. 4 Profiles of drug release in vitro

表 2 释药模型拟合方程结果

Table 2 Drug release model fitting equation results

拟合模型	克班宁原料药	FA-Cre@PEG-PLGA NPs
零级释放方程	$Q_t = 1.221\ 1\ t + 41.558\ 3$, $R^2 = 0.763\ 9$	$Q_t = 0.549\ 6\ t + 21.105\ 7$, $R^2 = 0.778\ 1$
一级释放方程	$Q_t = 82.562\ 2\ (1 - e^{-0.222\ 7\ t})$, $R^2 = 0.891\ 8$	$Q_t = 47.856\ 9\ (1 - e^{-0.133\ 2\ t})$, $R^2 = 0.916\ 1$
Higuchi 模型	$Q_t = 10.521\ 0\ t^{1/2} + 24.638\ 1$, $R^2 = 0.912\ 7$	$Q_t = 5.581\ 9\ t^{1/2} + 10.786\ 1$, $R^2 = 0.934\ 2$
Ritger-Peppas 模型	$Q_t = 31.891\ 0\ t^{0.281\ 0}$, $R^2 = 0.964\ 0$	$Q_t = 14.560\ 2\ t^{0.315\ 1}$, $R^2 = 0.974\ 3$

积分分数 2% 的红细胞悬液。用生理盐水将 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 和克班宁原料药分别配制成质量浓度为 50、100、150、200、250、300 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液，并与体积分数 2% 红细胞悬液混合，作为样品液。体积分数 2% 红细胞悬液与生理盐水混合作为阴性对照；与纯水混合作为阳性对照。将混合液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵育 2 h，3000 r/min 离心半径 7.6 cm，离心 5 min，取上清液至于 96 孔板中，在 405 nm 处测定 A 值，并计算溶血率。

$$\text{溶血率} = (A_{\text{样}} - A_{\text{阴}}) / (A_{\text{阳}} - A_{\text{阴}})$$

$A_{\text{样}}$ 表示不同质量浓度的样品的吸光度， $A_{\text{阴}}$ 表示阴性对照的吸光度， $A_{\text{阳}}$ 表示阳性对照的吸光度

如图 5 和表 3 所示，克班宁原料药组仅在 50~150 $\mu\text{g/mL}$ ，溶血率 < 5% 的标准值；而 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 在 50~300 $\mu\text{g/mL}$ ，溶血率分别为 0.17%、0.40%、0.76%、0.94%、1.29%、1.70%，溶血率较低，且纳米粒在较高质量浓度（300 $\mu\text{g/mL}$ ）时，溶血率仍小于 2%，表明 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 相比于克班宁原料药在 50~300 $\mu\text{g/mL}$ 具有良好的生物相容性。

2.6.2 细胞培养 将正常肝 L02 细胞培养于含 10% 胎牛血清和 1% 双抗（青霉素-链霉素）的 RPMI 1640 培养基中，放于恒温培养箱（5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ ）中传代培养，维持细胞处于对数生长期。



从左到右依次为阴性对照组、阳性对照组和 50、100、150、200、250、300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ FA-Cre@PEG-PLGA NPs 组以及 50、100、150、200、250、300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 克班宁原料药组

the figures from the left to right are negative control group, positive control group, 50, 100, 150, 200, 250, 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ FA-Cre@PEG-PLGA NPs group and 50, 100, 150, 200, 250, 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ crebanine bulk drug group

图 5 溶血实验图

Fig. 5 Hemolysis test diagram

表 3 2 种克班宁制剂溶血率 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)Table 3 Hemolysis rate of two kinds of crebanine preparations ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

样品	溶血率/%					
	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 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
FA-Cre@PEG-PLGA NPs	0.17 ± 0.05	0.40 ± 0.10	0.76 ± 0.16	0.94 ± 0.13	1.29 ± 0.18	1.70 ± 0.20
克班宁原料药	2.63 ± 1.02	3.16 ± 1.06	4.23 ± 1.03	5.00 ± 1.08	22.79 ± 1.72	35.15 ± 2.54

2.6.3 细胞超声方法 超声探头对准 96 孔板底部，涂抹耦合胶进行间断式超声，每孔超声 8 min，暂停 1 min，超声 2 次后，再超声 7 min，每孔共计超声 25 min。

2.6.4 细胞超声辐照损伤试验 设置超声组与未超

声组。超声组方法如下：取对数生长期的正常肝 L02 细胞接种于 96 孔板（细胞密度 1×10^4 ），培养 24 h 外部添加超声辐照后，分别培养 24、48 h，加入 CCK-8 10 μL ，继续培养 2 h，用酶标仪在 450 nm 波长处读取 A 值。未超声组除不添加超声外，其余

处置方式与超声组均相同。超声辐照后细胞死亡率按下式计算。结果如表 4 所示, 正常肝 L02 细胞 24、48 h 细胞死亡均 <3%, 表明此超声条件不会引起细胞大量死亡, 超声辐照处置对正常肝 L02 细胞损伤较小, 安全性较好。

$$\text{细胞死亡率} = (A_{\text{未超声}} - A_{\text{超声}}) / A_{\text{未超声}}$$

表 4 超声辐照处置对正常肝 L02 细胞损伤影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 4 Effect of ultrasound irradiation on normal liver L02 cells injury ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

t/h	细胞死亡率/%
24	2.265 ± 0.009
48	2.849 ± 0.008

2.6.5 CCK-8 法检测正常肝 L02 细胞的活力 超声组: 将对数生长期的正常肝 L02 细胞接种于 96 孔板 (细胞密度 1×10^4), 待细胞贴壁后分别给予不同质量浓度的克班宁原料药和 FA-Cre@PEG-PLGA NPs, 并设置对照孔 (不含克班宁) 和空白孔 (不含克班宁和细胞), 外部添加超声辐照, 未超声组除不添加超声辐照外其余条件不变。分别孵育 24、48 h 后, 加入 CCK-8 $10 \mu\text{L}$, 继续培养 2 h, 用酶标仪在

450 nm 波长处读取 A 值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

结果如表 5 所示, 不同质量浓度的克班宁原料药和 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 对正常肝 L02 细胞存活率出现不同程度的影响。经计算, 未进行超声 24、48 h 后克班宁原料药的半抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC_{50}) 值分别为 (208.5 ± 16.0)、(127.6 ± 9.4) $\mu\text{g/mL}$, 克班宁原料药对正常肝 L02 细胞存活率影响较强, 存在一定的肝毒性; FA-Cre@PEG-PLGA NPs 在未进行超声 24、48 h 后 IC_{50} 值分别为 (497.9 ± 28.1)、(380.0 ± 25.8) $\mu\text{g/mL}$, 其在质量浓度 $50 \sim 300 \mu\text{g/mL}$ 时, 细胞存活率仍大于 50%; 且与克班宁原料药相比, 在 $50 \sim 250 \mu\text{g/mL}$ 时存在显著性差异 ($P < 0.05$), 表明未超声时 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 对正常肝 L02 细胞毒性较低, 安全性较好。

超声辐照处置 24、48 h 后, 克班宁原料药的 IC_{50} 值分别为 (186.2 ± 14.2)、(117.1 ± 10.3) $\mu\text{g/mL}$; FA-Cre@PEG-PLGA NPs 的 IC_{50} 值分别为 (221.8 ± 19.9)、(150.3 ± 13.8) $\mu\text{g/mL}$ 。FA-Cre@PEG-PLGA NPs 超声辐照处置 24、48 h 后分别与 FA-Cre@PEG-

表 5 2 种克班宁制剂对正常肝 L02 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 5 Effects of two kinds of crebanine preparations on survival rate of L02 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

制剂	质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	未超声细胞存活率/%		超声后细胞存活率/%	
		24 h	48 h	24 h	48 h
空白	—	—	—	—	—
对照	—	100.00 ± 5.73	100.00 ± 11.16	100.00 ± 3.19	100.00 ± 4.68
克班宁原料药	50	74.95 ± 1.93	65.90 ± 2.14	72.98 ± 1.78	63.64 ± 2.47
	100	67.78 ± 2.37	56.35 ± 3.78	65.02 ± 2.47	54.94 ± 4.01
	150	61.22 ± 3.73	50.54 ± 2.59	60.58 ± 1.43	50.39 ± 1.86
	200	54.32 ± 3.08	44.89 ± 2.20	51.52 ± 1.56	42.88 ± 3.68
	250	46.72 ± 4.20	33.92 ± 4.65	43.53 ± 3.95	30.49 ± 3.53
	300	35.38 ± 6.46	26.38 ± 6.89	32.09 ± 3.67	24.62 ± 4.73
FA-Cre@PEG-PLGA NPs	50	83.64 ± 1.67**	81.36 ± 1.80 ^{##}	77.59 ± 1.77**&&	68.88 ± 1.66 ^{##&&}
	100	78.63 ± 1.61**	75.02 ± 2.53 ^{##}	71.04 ± 0.85**&&	63.47 ± 1.93 ^{##&&}
	150	75.28 ± 1.56**	69.06 ± 1.34 ^{##}	66.07 ± 3.26**&&	56.92 ± 2.89 ^{##&&}
	200	68.59 ± 2.61**	62.33 ± 1.70 ^{##}	56.16 ± 4.31**&&	46.46 ± 5.24 ^{##&&}
	250	63.79 ± 1.61**	58.15 ± 1.72 ^{##}	48.86 ± 2.17**&&	36.85 ± 5.77 ^{##&&}
	300	57.39 ± 2.31**	53.49 ± 2.65	33.69 ± 4.43**&&	23.27 ± 5.23&&

同一处置方法下, 同一质量浓度与原料药组 24 h 比较: ** $P < 0.01$; 同一处置方法下, 同一质量浓度与原料药组 48 h 比较: ^{##} $P < 0.01$; 同一质量浓度, 同一时间下与纳米粒未超声组比较: && $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs bulk drug group for 24 h, under the same disposal method and the same mass concentration; ^{##} $P < 0.01$ vs bulk drug group for 48 h, under the same disposal method and the same mass concentration; && $P < 0.01$ vs nanoparticles without ultrasound group, under the same mass concentration at the same time

PLGA NPs 未超声 24、48 h 后相比, 在 50~300 $\mu\text{g/mL}$ 时细胞存活率显著降低, 存在极显著性差异 ($P<0.01$); FA-Cre@PEG-PLGA NPs 超声辐照处置 24、48 h 后分别与克班宁原料药超声辐照 24、48 h 相比, 在 50~250 $\mu\text{g/mL}$ 时, FA-Cre@PEG-PLGA NPs 对正常肝 L02 细胞毒性略低于克班宁原料药, 在 300 $\mu\text{g/mL}$ 时 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 对 L02 细胞毒性略高于克班宁原料药, 且在 50~250 $\mu\text{g/mL}$ 时存在显著性差异 ($P<0.05$)。表明 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 对正常肝 L02 细胞毒性较低, 相比于克班宁原料药有一定的安全性。但 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 对正常肝 L02 细胞仍有一定的细胞增殖抑制作用, 推测在纳米粒制备过程中, 大部分克班宁被包载进入纳米粒, 但仍有部分克班宁以小分子形式附着在 PLGA 外壳上, 使 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 与正常肝 L02 细胞共孵育时, 附着在 PLGA 上的克班宁被细胞吞噬, 从而产生毒性作用。

2.7 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 的体外抗肿瘤活性研究

2.7.1 细胞培养 将肝癌 Bel-7402 细胞培养于含 10%胎牛血清和 1%双抗的 DMEM 培养基中, 放于恒温培养箱中传代培养, 维持细胞处于对数生长期。

表 7 2 种克班宁制剂在未超声、超声条件下对肝癌 Bel-7402 细胞增殖抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 7 Effects of two crebanine preparations on proliferation inhibition rate of Bel-7402 cells under non-ultrasound and ultrasound irradiation conditions ($\bar{x} \pm s, n=6$)

制剂	质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	未超声细胞增殖抑制率/%		超声后细胞增殖抑制率/%	
		24 h	48 h	24 h	48 h
空白	—	—	—	—	—
对照	—	100.00 $\pm$ 6.95	100.00 $\pm$ 9.07	100.00 $\pm$ 6.51	100.00 $\pm$ 1.08
克班宁原料药	50	26.70 $\pm$ 5.26	29.61 $\pm$ 3.60	28.51 $\pm$ 4.66	29.51 $\pm$ 3.31
	100	30.73 $\pm$ 3.20	34.81 $\pm$ 5.19	33.62 $\pm$ 4.16	31.89 $\pm$ 3.31
	150	42.78 $\pm$ 4.35	45.20 $\pm$ 4.24	42.95 $\pm$ 3.85	46.28 $\pm$ 2.26
	200	48.41 $\pm$ 1.52	51.84 $\pm$ 2.15	53.11 $\pm$ 1.79	54.34 $\pm$ 1.77
	250	53.24 $\pm$ 2.83	59.53 $\pm$ 5.61	55.38 $\pm$ 3.34	63.14 $\pm$ 3.09
	300	59.53 $\pm$ 2.18	64.48 $\pm$ 2.00	65.45 $\pm$ 2.15 ^{&&}	67.99 $\pm$ 2.22 ^{&}
FA-Cre@PEG-PLGA NPs	50	20.53 $\pm$ 7.03	25.75 $\pm$ 6.89 ^{##}	27.52 $\pm$ 3.81 [#]	31.51 $\pm$ 4.70 ^{##&&}
	100	29.61 $\pm$ 3.60	31.40 $\pm$ 3.07 ^{##}	35.39 $\pm$ 4.15 [#]	35.39 $\pm$ 4.15 ^{##&&}
	150	36.48 $\pm$ 3.77	40.11 $\pm$ 3.42	41.95 $\pm$ 3.56	47.78 $\pm$ 2.73
	200	40.96 $\pm$ 2.51	45.36 $\pm$ 2.56	47.54 $\pm$ 2.50	55.21 $\pm$ 2.40
	250	47.53 $\pm$ 1.94	54.04 $\pm$ 1.98	57.61 $\pm$ 2.09	67.13 $\pm$ 2.77
	300	52.68 $\pm$ 3.33	59.57 $\pm$ 2.86	67.36 $\pm$ 1.54	70.94 $\pm$ 1.48 [#]

同一处置方法下, 同一浓度与原料药组 48 h 比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$; 同一浓度, 同一时间下与纳米粒未超声组比较: [&] $P<0.05$ ^{&&} $P<0.01$

[#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs bulk drug group for 48 h, under the same disposal method and the same mass concentration; [&] $P<0.05$ ^{&&} $P<0.01$ vs nanoparticles without ultrasound group, under the same mass concentration at the same time

2.7.2 细胞超声辐照损伤试验 超声方法按“2.6.3”和“2.6.4”项下方法, 同样设置超声组与未超声组, 对肝癌 Bel-7402 细胞进行超声辐照损伤实验。结果如表 6 所示, 肝癌 Bel-7402 细胞 24、48 h 细胞死亡率均 $<3\%$, 表明此超声条件下对肝癌 Bel-7402 细胞损伤较小, 这种处置方法对实验影响较小, 可作为体外细胞超声来源。

表 6 超声辐照处置对 Bel-7402 细胞损伤影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 6 Effect of ultrasound irradiation on Bel-7402 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

t/h	细胞死亡率/%
24	2.953 $\pm$ 0.005
48	2.858 $\pm$ 0.009

2.7.3 肿瘤细胞增殖抑制能力的检测 采用 CCK-8 试剂盒检测克班宁原料药和 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 对肝癌 Bel-7402 细胞增殖抑制的影响。将对数生长期的 Bel-7402 细胞接种于 96 孔板 (细胞密度 1×10^4), 待细胞贴壁后, 同样设置超声组与未超声组, 操作步骤同“2.6.5”项, 计算细胞增殖抑制率。

$$\text{细胞增殖抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

结果如表 7 显示, 随着药物剂量的增加, 克班

宁原料药和 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 对肝癌 Bel-7402 细胞的增殖均产生了不同程度的抑制, 呈现出剂量依赖性。未超声条件下, FA-Cre@PEG-PLGA NPs 对肿瘤细胞的增殖抑制效果稍弱于克班宁原料药; 但在超声处置 24 h 和 48 h 后, FA-Cre@PEG-PLGA NPs 对肿瘤细胞的杀伤能力得到增强, 特别是超声处置 48 h 后纳米粒对细胞增殖抑制率均高于原料药, 在 50~100 $\mu\text{g/mL}$ 和 300 $\mu\text{g/mL}$ 时存在显著性差异 ($P<0.05$)。FA-Cre@PEG-PLGA NPs 超声辐照 24 h 后与 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 未超声 24 h 后相比, 在 300 $\mu\text{g/mL}$ 时细胞增殖抑制率显著升高, 存在极显著性差异 ($P<0.01$); FA-Cre@PEG-PLGA NPs 超声辐照 48 h 后与 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 未超声 48 h 后相比, 在 50~100 $\mu\text{g/mL}$ 和 300 $\mu\text{g/mL}$ 时存在显著性差异 ($P<0.05$)。

经计算, 未超声 24 h 后克班宁原料药和 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 的 IC_{50} 值分别为 (211.2 ± 12.0)、(285.1 ± 13.1) $\mu\text{g/mL}$; 未超声 48 h 后克班宁原料药和 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 的 IC_{50} 值分别为 (171.5 ± 10.0)、(219.4 ± 13.3) $\mu\text{g/mL}$; 超声辐照 24 h 后克班宁原料药和 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 的 IC_{50} 值分别为 (180.3 ± 11.2)、(182.3 ± 12.9) $\mu\text{g/mL}$; 超声辐照 48 h 后克班宁原料药和 FA-Cre@

PEG-PLGA NPs 的 IC_{50} 值分别为 (161.1 ± 10.2)、(145.0 ± 10.0) $\mu\text{g/mL}$ 。超声组 24、48 h 后 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 的 IC_{50} 相比于未超声组降低 1.56 倍、1.51 倍。克班宁原料药超声前后对肝癌 Bel-7402 细胞增殖抑制率的影响变化不大。

FA-Cre@PEG-PLGA NPs 未超声处置时对肝癌 Bel-7402 细胞抑制率低于克班宁原料药, 由“2.5”项体外释放结果可知, 48 h 纳米粒内药物释放缓慢, 猜测克班宁包裹在纳米粒内, 因此, 对肿瘤细胞抑制率低于原料药; 超声处置后对肝癌 Bel-7402 细胞增殖抑制率显著提升, 推测 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 在超声辐照区破碎, 激发纳米粒相变释药, 改善药物在细胞内的蓄积, 提高纳米粒对肝癌 Bel-7402 细胞的增殖抑制率。结果表明, FA-Cre@PEG-PLGA NPs 联合超声辐照后, 对肝癌 Bel-7402 细胞增殖抑制作用增强。

2.7.4 细胞形态观察 将细胞接种于 6 孔板中, 然后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 12 h 使其贴壁生长, 弃去原培养基并补加 1 mL 含不同质量浓度 (0、50、150、300 $\mu\text{g/mL}$) 的原料药和纳米粒的培养基, 其中纳米粒分为未超声组与超声组。继续孵育 48 h 后用显微镜观察细胞形态并拍照记录。结果如图 6 所示, 当原料药组、纳米粒未超声组、纳米粒超声组质量浓

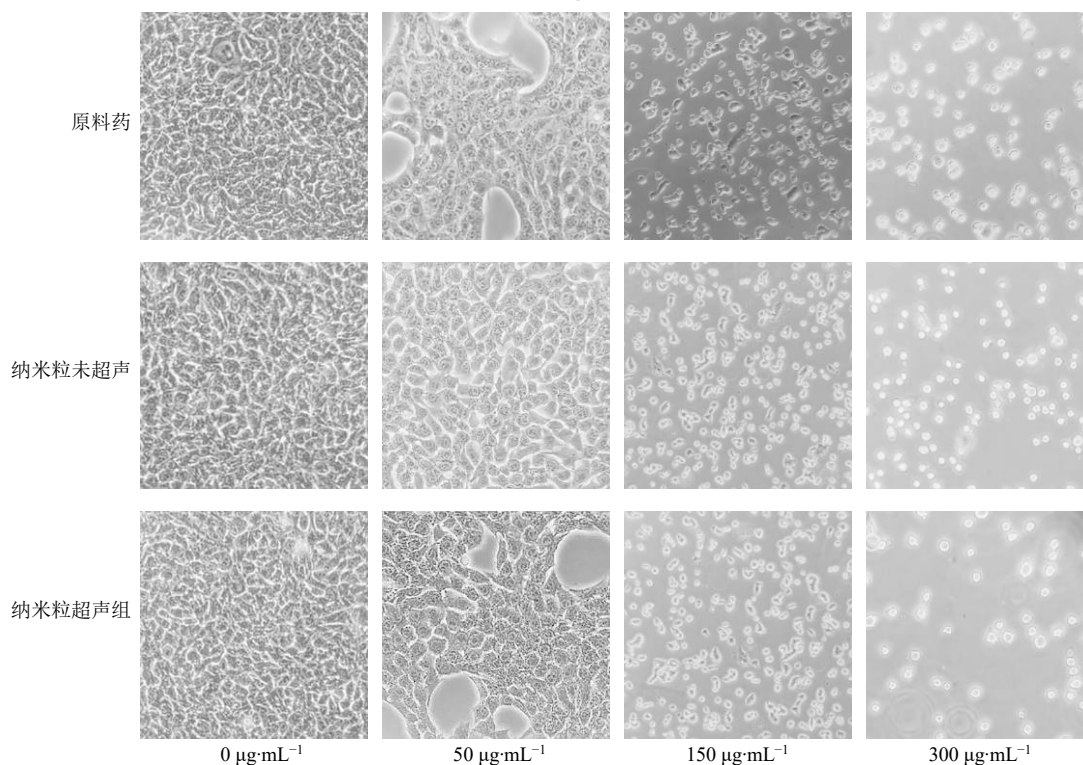


图 6 不同克班宁制剂对肝癌 Bel-7402 细胞形态的影响 (×200)

Fig. 6 Effects of different crebanine preparations on morphology of Bel-7402 cells (×200)

度为 0 $\mu\text{g/mL}$ 时, 肝癌 Bel-7402 细胞呈不规则多边形, 细胞间连接紧密、分界清晰, 未见明显缝隙, 表面光滑; 50 $\mu\text{g/mL}$ 原料药组、纳米粒未超声组、纳米粒超声组处理 48 h 后, 肝癌 Bel-7402 细胞分布密度降低, 其中原料药组、纳米粒超声组细胞密度低于纳米粒未超声组; 而 150 $\mu\text{g/mL}$ 和 300 $\mu\text{g/mL}$ 原料药组、纳米粒未超声组、纳米粒超声组处理 48 h 后, 细胞分布密度显著降低, 大量细胞出现变圆、皱缩, 其中 300 $\mu\text{g/mL}$ 纳米粒超声组相比于同浓度的原料药组和纳米粒未超声组, 细胞尤为稀疏。该结果进一步证实纳米粒联合超声辐照后对肝癌 Bel-7402 细胞生长具有显著的抑制作用, 并呈明显的剂量效应。

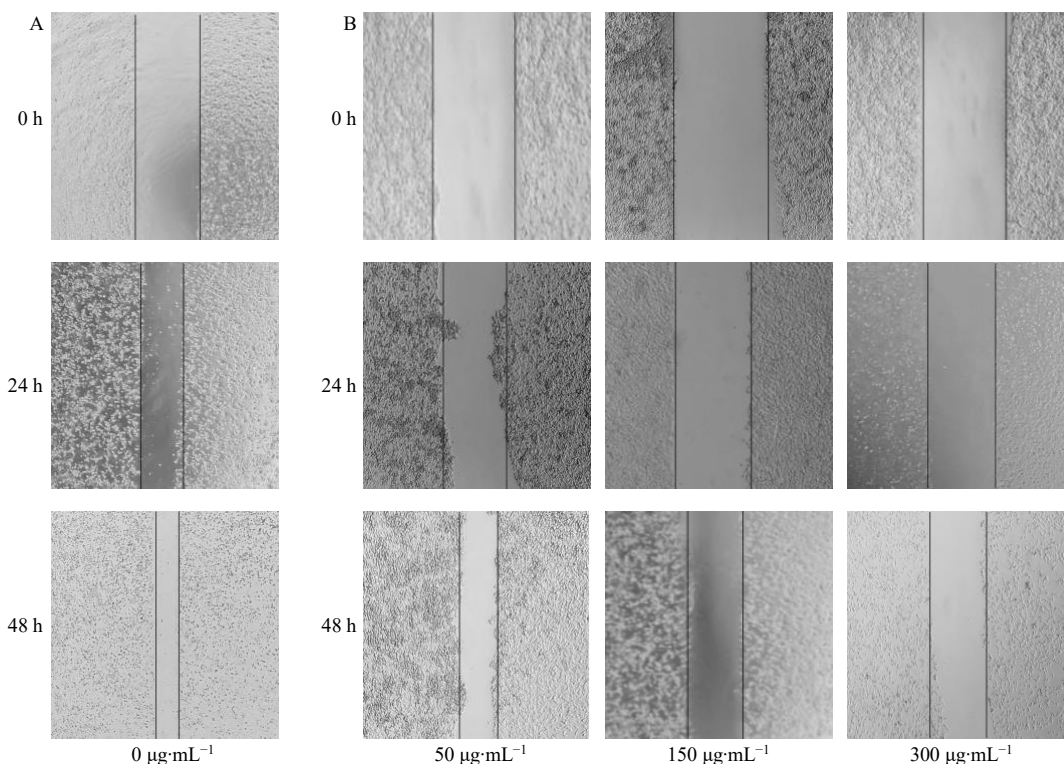
2.7.5 对肿瘤细胞迁移能力的影响 采用细胞划痕实验分析克班宁原料药和 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 对肝癌 Bel-7402 细胞迁移能力的抑制作用。提前在 6 孔板底部用笔画 3 条均分的直线, 将对数生长期的肝癌 Bel-7402 细胞接种于 6 孔板 (细胞密度 1×10^4) 中。待细胞贴壁长满后, 用 10 μL 微量移液器的枪头垂直于定位横线垂直方向均匀划线, PBS 洗涤细胞 2 次, 除去细胞碎片。将划下的细胞清洗干净后, 加入不同处置的药物继续培养, 分为空白组和 50、150、300 $\mu\text{g/mL}$ 3 个不同质量浓度的原料药组、纳米粒未超声组、纳米粒超声组。将 6

孔板放入培养箱中, 分别于 0、24、48 h 用倒置显微镜拍照并记录, 使用 Image J 软件对图像进行分析, 并计算划痕面积恢复率。

划痕面积恢复率 = (0 h 划痕面积 - 24 h 或 48 h 划痕面积) / 0 h 划痕面积

结果见图 7 和表 8, 空白组的 Bel-7402 细胞迅速向“伤口”位置转移。原料药组、纳米粒未超声组、纳米粒超声组对细胞抑制效果存在差别。相比于空白组, 这 3 个组均对 Bel-7402 细胞的迁移存在抑制, 使 Bel-7402 细胞迁移“愈合”划痕的速度降低, 并且均表现出剂量依赖性。同一质量浓度下各组 24、48 h 对 Bel-7402 细胞迁移抑制效果排序为纳米粒未超声组 < 原料药组 < 纳米粒超声组。表明克班宁原料药以及超声联合纳米粒处置均可显著抑制肿瘤细胞的迁移 (与空白组相比 $P < 0.01$); 且超声联合纳米粒处置 48 h 迁移能力显著下降 (与原料药组相比, $P < 0.01$; 与纳米粒未超声组相比 $P < 0.01$)。

2.7.6 细胞摄取实验 将肝癌 Bel-7402 细胞接种于 6 孔板中, 孵育 24 h 后, 加入含游离 DiR 或 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 的培养液, 其中 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 分为未超声组和超声组。再分别培养 6、12 h 后, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 荧光倒置显微镜进行荧光成像。结果如图 8 所示, 仅含有培养基的 Bel-7402 细胞, 6、12 h 后细胞均未出现红色荧光, 表



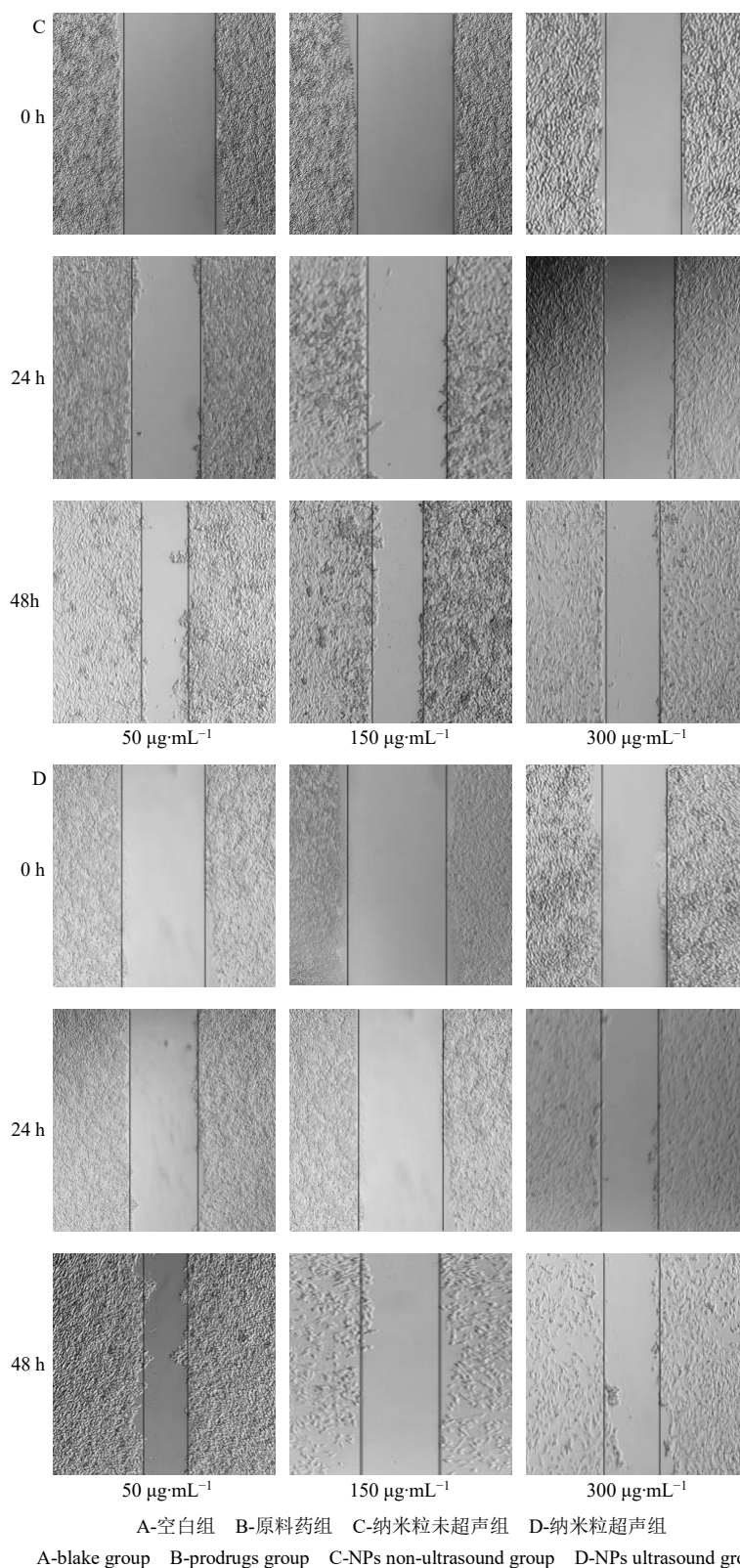


图 7 细胞划痕结果 ($\times 40$)

Fig. 7 Results of cell scratch assay ($\times 40$)

明无肿瘤细胞自发荧光对实验的干扰。同时，12 h 游离 DiR 组、6 h 纳米粒未超声组、6 h 纳米粒超声组仅观察到 Bel-7402 细胞的细胞膜出现红色荧光，

且 6 h 纳米粒超声组的红色荧光更明显。12 h 纳米粒未超声组、12 h 纳米粒超声组细胞内也出现红色荧光，且 12 h 纳米粒超声组细胞内红色荧光更明显。

表 8 不同克班宁制剂对 Bel-7402 细胞迁移能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 8 Effects of different crebanine preparations on migration ability of Bel-7402 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

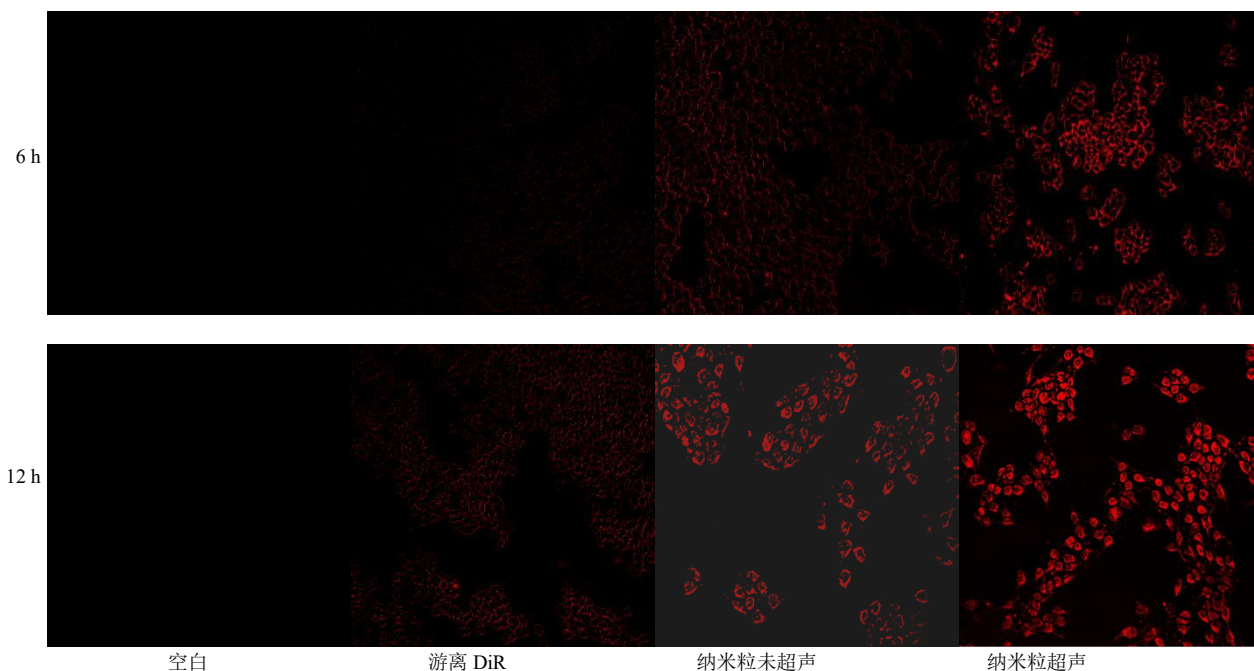
组别	质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	划痕面积恢复率/%	
		24 h	48 h
空白	—	52.07 $\pm$ 3.49	69.30 $\pm$ 4.62
原料药	50	41.37 $\pm$ 6.78**	63.26 $\pm$ 4.43**
	150	31.07 $\pm$ 3.84**	53.27 $\pm$ 2.86**
	300	23.32 $\pm$ 2.21**	51.68 $\pm$ 5.49*
纳米粒未 超声	50	45.41 $\pm$ 2.32**	64.31 $\pm$ 2.86**
	150	39.29 $\pm$ 3.81**	63.04 $\pm$ 2.51**
	300	28.14 $\pm$ 5.93**	60.05 $\pm$ 6.04*
纳米粒超声	50	40.23 $\pm$ 6.51**&&	61.51 $\pm$ 5.94**&&&
	150	25.79 $\pm$ 1.18**&&&	36.03 $\pm$ 6.29**&&&
	300	11.17 $\pm$ 4.35**&&&	21.35 $\pm$ 6.59**&&&

同一时间下与空白组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 同一质量浓度, 同一时间下与原料药组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 同一质量浓度, 同一时间下与纳米粒未超声组比较: & $P < 0.05$ && $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs blank group at the same time; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs bulk drug group, under the same mass concentration at the same time; & $P < 0.05$ && $P < 0.01$ vs nanoparticles without ultrasound group, under the same mass concentration at the same time

与游离 DiR 组相比, 纳米粒未超声组红色荧光强度增强, 推测 PEG-PLGA-FA 修饰纳米粒后, 赋予其主动靶向功能, 提高叶酸高表达的 Bel-7402 细胞对纳米粒的摄取能力; 与纳米粒未超声组相比, 纳米粒超声组红色荧光强度增强, 推测经超声辐照处置后, 纳米粒内 DiR 大量释放, 被细胞摄取。表明联合超声处置可以提高 Bel-7402 细胞对纳米粒的摄取能力。

3 讨论

癌症是全球主要的公共卫生问题, 每年造成数百万人死亡, 严重威胁人们的健康。据美国癌症协会统计, 恶性肿瘤已成为世界上主要的致死性疾病之一, 2022 年美国新增癌症病例 190.1 万例, 新增死亡病例 60.9 万例, 发病率与死亡率呈逐年上升趋势^[23]。其中肺癌、肝癌、胃癌是我国东、中、西部各地区常见的恶性肿瘤死亡原因^[24-25]。2020 年肝癌虽然在我国癌症新发病类型中仅占 9%, 但在死亡病例中占 13%, 位于癌症死亡病例的第 2。表明肝癌致死率较高, 严重威胁我国人群健康。手术、化疗、免疫治疗等仍是临床上常用的药物治疗方法, 但各类药物的不良反应及耐药性的产生也是临床亟待解决的问题。

图 8 6、12 h Bel-7402 细胞对各组摄取的荧光图 ($\times 200$)Fig. 8 Uptake of each group by Bel-7402 cells at 6 h and 12 h ($\times 200$)

近年来, 随着分子生物学和超声成像技术的发展, 应用超声微泡介导肝癌的靶向治疗成为研究的热点, 并有望为肝癌患者提供一种更安全、有效的

治疗方法。临床上超声检查具有实时观察、技术简单、无创等优点, 可作为诊断肝脏肿瘤的第一步^[26-27]。微泡是常用的超声增强显影剂, 纳米级微泡如液态

氟碳微泡较微米级微泡具有更强的穿透力,可以穿越血管内皮进入组织间隙,渗入到肿瘤的空隙中,使循环时间更长^[28-30]。因此,超声联合纳米造影剂运载体系是一种很有前途的非侵入性靶向载药技术,有望实现深部肿瘤更好的治疗效果。

本实验采用超声乳化-溶剂挥发法制备 FA-Cre@PEG-PLGA NPs。将克班宁包载于 PEG-PLGA 纳米粒中,并对其表面进行叶酸修饰,拟使纳米粒具有主动靶向肿瘤细胞的能力。通过对 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 进行表征,得到粒径较小,分布较均匀的纳米粒。在前期体外释放接收液的筛选上,尝试了 3 种接收液,在 pH 6.8 的磷酸盐缓冲溶液中溶解度低,累积释放率不足 20%;在 10%聚山梨酯 80-生理盐水溶液中,聚山梨酯 80 在生理盐水中不稳定,使得克班宁最大吸收峰从 280 nm 移至 272 nm,以上接收液均无法满足漏槽条件。而克班宁在生理盐水溶液中溶解度大,可达到漏槽条件。由于体内肿瘤部位为酸性微环境,选择微酸性释放液更能模拟体内肿瘤靶部位的释放特性,因此选择生理盐水(稀盐酸调 pH 6.8)作为接收液。但选择的接收液中含有盐溶液,若采用高效液相色谱法测定克班宁含量对色谱柱损伤较大,故本实验采取紫外光谱法进行测定。

后续体外释放实验表明,FA-Cre@PEG-PLGA NPs 具有缓释能力,符合 Ritger-Peppas 模型释放规律,释放机制为 Fick 扩散。溶血实验表明纳米粒具有更好的生物相容性。本实验使用低强度超声,添加的超声辐照对正常肝 L02 细胞和肝癌 Bel-7402 细胞伤害小,死亡率均<3%,安全有效,可作为体外联合超声治疗来源。正常肝 L02 细胞体外安全性实验和肝癌 Bel-7402 细胞增殖抑制试验结果显示,未联合超声辐照时,克班宁原料药和 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 对 2 种细胞均有一定的增殖抑制性,并在一定的范围内呈现浓度相关性。

但纳米粒对 2 种细胞的细胞毒性相较于克班宁原料药低,有一定的安全性。纳米粒分别与 L02 细胞、Bel-7402 细胞共孵育时仍有一定的细胞增殖抑制作用,可能原因:①纳米粒用叶酸修饰,因此未超声时纳米粒也容易与叶酸高表达的肝癌细胞表面的受体结合,介导细胞内吞作用使纳米粒被细胞吞噬从而发挥毒性作用。②部分克班宁未包裹进入纳米粒内部,附着在纳米粒外壳上,在与细胞孵育过程中慢慢被细胞吞噬,产生毒性作用。当外部添加

超声辐照后克班宁原料药和 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 对 L02 细胞和 Bel-7402 细胞增殖抑制率均提高,在对 Bel-7402 细胞增殖抑制率上,尤以纳米粒提升较为显著,推测超声激发纳米粒相变释药,增加药物在肿瘤细胞内的蓄积,达到增强抗肿瘤活性的效果。细胞划痕实验可用于量化细胞迁移能力,从实验结果看出,各实验组均有一定的抑制肿瘤细胞迁移的能力,并表现出剂量依赖性。且超声联合纳米粒处置方式展现出更强的抗肿瘤迁移能力。细胞摄取实验也表明超声联合纳米粒处置方式可以提高 Bel-7402 细胞对纳米粒的摄取能力。

本研究结果仅限于克班宁纳米粒的制备和初步体外评价,后续将对 FA-Cre@PEG-PLGA NPs 超声下相变能力、细胞摄取机制、组织分布、体内安全性等进行全面研究,为其进一步的开发应用提供更完整的实验数据。本研究有望为肝癌的治疗研究提供思路,也有望为肿瘤治疗提供一种超声微泡介导靶向治疗策略。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 马云淑,方波,张壮丽. 云南含克班宁的千金藤属植物资源调查研究 [J]. 云南中医学院学报, 2005, 28(1): 18-21.
- [2] 贾敏如,张艺. 中国民族药辞典 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2016: 137.
- [3] 张壮丽,马云淑. 克班宁的研究进展 [J]. 云南中医学院学报, 2003, 26(4): 52-58.
- [4] 朱兆仪,冯毓秀,何丽一,等. 中国防己科千金藤属药用植物资源利用研究 [J]. 药学学报, 1983, (6): 460-467.
- [5] He X S, Lin Q, Ma Y S, et al. Crebanine inhibits voltage-dependent Na^+ current in guinea-pig ventricular myocytes [J]. *Chin J Nat Med*, 2014, 12(1): 20-23.
- [6] Intayoung P, Limtrakul P, Yodkeeree S. Antiinflammatory activities of crebanine by inhibition of NF- κ B and AP-1 activation through suppressing MAPKs and Akt signaling in LPS-induced RAW264.7 macrophages [J]. *Biol Pharm Bull*, 2016, 39(1): 54-61.
- [7] 尚东雨. 基于拓扑异构酶抑制作用研究氧化克班宁对 MCF-7 细胞 DNA 损伤的机制 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2022.
- [8] 杨德兰,梅文莉,戴好富. 小叶地不容块根中的细胞毒活性生物碱 [J]. 中国药物化学杂志, 2010, 20(3): 206-210.
- [9] Yodkeeree S, Pompimon W, Limtrakul P. Crebanine, an

- aporphine alkaloid, sensitizes TNF- α -induced apoptosis and suppressed invasion of human lung adenocarcinoma cells A549 by blocking NF- κ B-regulated gene products [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(9): 8615-8624.
- [10] Wongsirisin P, Yodkeeree S, Pompimon W, *et al.* Induction of G1 arrest and apoptosis in human cancer cells by crebanine, an alkaloid from *Stephania venosa* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2012, 60(10): 1283-1289.
- [11] 梁尔光, 王玉丽, 高春生, 等. 纳米粒疗法: 一种新兴的癌症治疗方法 [J]. 国际药学研究杂志, 2009, 36(1): 71-75.
- [12] 王朝辉, 刘玉玲. 抗肿瘤纳米药物的临床转化进展及展望 [J]. 药学学报, 2022, 57(1): 134-141.
- [13] Nie X, Liu Y, Li M, *et al.* SP94 peptide-functionalized PEG-PLGA nanoparticle loading with cryptotanshinone for targeting therapy of hepatocellular carcinoma [J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2020, 21(4): 124.
- [14] Sun R, Xiang J, Zhou Q, *et al.* The tumor EPR effect for cancer drug delivery: Current status, limitations, and alternatives [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 191: 114614.
- [15] Islam W, Kimura S, Islam R, *et al.* EPR-effect enhancers strongly potentiate tumor-targeted delivery of nanomedicines to advanced cancers: Further extension to enhancement of the therapeutic effect [J]. *J Pers Med*, 2021, 11(6): 487.
- [16] 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.
- [17] Han M, Ji X, Li J, *et al.* Lipoprotein-inspired nanocarrier composed of folic acid-modified protein and lipids: Preparation and evaluation of tumor-targeting effect [J]. *Int J Nanomed*, 2020, 15: 3433-3445.
- [18] Movileanu C, Anghelache M, Turtoi M, *et al.* Folic acid-decorated PEGylated magnetite nanoparticles as efficient drug carriers to tumor cells overexpressing folic acid receptor [J]. *Int J Pharm*, 2022, 625: 122064.
- [19] Wang H, Cheng X, Kong S, *et al.* Synthesis and structure-activity relationships of a series of aporphine derivatives with antiarrhythmic activities and acute toxicity [J]. *Molecules*, 2016, 21(12): 1555.
- [20] 马云淑, 商庆节, 白一岑, 等. 克班宁在大鼠体内的药动学 [J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(10): 819-821.
- [21] 商庆节. 克班宁注射剂的非临床药物动力学研究 [D]. 昆明: 云南中医学院, 2006.
- [22] 赵亮, 苏畅. 丹参酮 II_A 微囊的制备及其质量考察 [J]. 中成药, 2012, 34(10): 1242-1246.
- [23] Siegel R L, Miller K D, Fuchs H E, *et al.* Cancer statistics, 2022 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2022, 72(1): 7-33.
- [24] Suzuki R, Goto R, Kawamura N, *et al.* Efficient multiple treatments including molecular targeting agents in a case of recurrent hepatocellular carcinoma, post-living donor liver transplantation [J]. *Clin J Gastroenterol*, 2022, 15(4): 755-764.
- [25] 孙可欣, 郑荣寿, 张思维, 等. 2015 年中国分地区恶性肿瘤发病和死亡分析 [J]. 中国肿瘤, 2019, 28(1): 1-11.
- [26] Chen W, Zheng R, Baade P D, *et al.* Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [27] Maruyama H, Yoshikawa M, Yokosuka O. Current role of ultrasound for the management of hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(11): 1710-1719.
- [28] Maruyama H, Ebara M. Recent applications of ultrasound: Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Clin Oncol*, 2006, 11(4): 258-267.
- [29] 于姣姣, 查莉, 曾书娥. 超声微泡在肝癌治疗中的应用研究进展 [J]. 肿瘤防治研究, 2022, 49(10): 1082-1085.
- [30] Ma J, Du L, Chen M, *et al.* Drug-loaded nano-microcapsules delivery system mediated by ultrasound-targeted microbubble destruction: A promising therapy method [J]. *Biomed Rep*, 2013, 1(4): 506-510.

[责任编辑 郑礼胜]