

• 药剂与工艺 •

负载葫芦素 B 锌基金属有机骨架 ZIF-8 纳米粒的制备、表征及抗肝肿瘤药效评价

徐晓涵, 张慧中, 阮意丹, 李诗曼, 张 可, 王雯琪, 杨静雯, 李文静, 王欣竹, 董晓旭*, 倪 健*
北京中医药大学中药学院, 北京 102488

摘要: 目的 制备负载葫芦素 B 类沸石咪唑酯骨架材料-8 (ZIF-8) 纳米粒 (cucurbitacin B-loaded ZIF-8 nanoparticles, CuB@ZIF-8 NPs), 并对其表征和体外抗肝肿瘤药效评价。方法 利用“一锅法”制备 CuB@ZIF-8 NPs; 利用 HPLC 法测定葫芦素 B 载药量及包封率; 利用马尔文激光粒度分析、透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 观察、扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 观察、X 射线衍射 (X-ray diffraction, XRD) 分析、傅里叶变换红外光谱 (Fourier-transform infrared spectroscopy, FTIR) 分析、热重分析 (thermogravimetric analysis, TGA)、比表面积法 (Brunauer-Emmett-Teller, BET)、动态光散射 (dynamic light scattering, DLS) 分析和 ζ 电位分析等对其结构进行表征; 离心法考察 CuB@ZIF-8 NPs 的稳定性和体外释药行为。MTT 实验检测纳米粒抑制 HepG2 细胞增殖能力; 荧光显微镜观察纳米粒对 HepG2 细胞核的形态变化; 流式细胞仪检测纳米粒对细胞凋亡率及细胞内活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 水平的影响。结果 CuB@ZIF-8 NPs 的载药量为 $(16.62 \pm 1.20)\%$, 包封率为 $(66.73 \pm 2.30)\%$, 粒径为 (182.43 ± 1.88) nm, ζ 电位为 (24.80 ± 0.52) mV, 具有规则的十二面体结构, 比表面积为 $1\,391.10\text{ m}^2/\text{g}$; 纳米粒的稳定性良好, pH 5.5 时体外释放率达 77.56%; CuB@ZIF-8 处理的 HepG2 细胞的存活率为 $(18.82 \pm 3.52)\%$, 细胞内 ROS 含量为 $(123.61 \pm 0.03)\%$, 细胞凋亡率为 $(98.61 \pm 0.02)\%$ 。结论 制备的纳米粒形状均一, 载药量较高, 明显增强药物抗肝肿瘤疗效, 为葫芦素 B 纳米新制剂的开发提供借鉴。

关键词: 葫芦素 B; 锌基金属有机骨架 ZIF-8; 纳米粒; 抗肝肿瘤; 稳定性; 体外释药行为; 细胞增殖能力; 细胞凋亡; 活性氧簇

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)16-5739-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.16.004

Preparation, characterization, and antitumor efficacy evaluation of cucurbitacin B-loaded ZIF-8 metal-organic framework nanoparticles for hepatocellular carcinoma therapy

XU Xiaohan, ZHANG Huizhong, RUAN Yidan, LI Shiman, ZHANG Ke, WANG Wenqi, YANG Jingwen, LI Wenjing, WANG Xinzhu, DONG Xiaoxu, NI Jian

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: Objective To prepare cucurbitacin B-loaded Zinc-based metal organic skeleton (ZIF-8) nanoparticles (CuB@ZIF-8 NPs), systematically characterize their physicochemical properties, and evaluate their anti-hepatoma activity *in vitro*. **Methods** CuB@ZIF-8 NPs were synthesized using a one-pot method. Drug loading capacity and encapsulation efficiency of cucurbitacin B were quantified via HPLC. Physicochemical characterization included Malvern laser particle size analysis, transmission electron microscope (TEM) observation, scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR),

收稿日期: 2025-04-01

基金项目: 国家中医药管理局高水平建设学科项目 (zyyzdxk-2023272)

作者简介: 徐晓涵, 硕士, 从事中药新剂型与新技术的研究。E-mail: a3150605497@163.com

*通信作者: 倪 健, 博士, 教授, 从事中药新剂型与新技术的研究。E-mail: njtcm@263.net

董晓旭, 博士, 副教授, 从事中药新剂型与新技术的研究。E-mail: dxiaoxv@163.com

thermogravimetric analysis (TGA), Brunauer-Emmett-Teller (BET) surface area measurement, dynamic light scattering (DLS), and ζ potential analysis. Stability under physiological conditions and pH-responsive drug release kinetics were evaluated using centrifugation. *In vitro* anti-hepatoma efficacy was assessed using HepG2 cells: cytotoxicity via MTT assay, apoptosis via Annexin V-FITC/PI staining and nuclear morphological analysis, and intracellular reactive oxygen species (ROS) generation via flow cytometry.

Results The optimized CuB@ZIF-8 NPs exhibited a uniform rhombic dodecahedral morphology with a hydrodynamic diameter of (182.43 ± 1.88) nm, ζ potential of (24.80 ± 0.52) mV, high specific surface area $(1\,391.10\text{ m}^2/\text{g})$, drug loading of $(16.62 \pm 1.20)\%$, and encapsulation efficiency (EE) of $(66.73 \pm 2.30)\%$. The nanoparticles demonstrated exceptional colloidal stability and pH-dependent drug release, achieving 77.56% cumulative cucurbitacin B release in acidic buffer (pH 5.5). The survival rate of HepG2 cells treated with CuB@ZIF-8 was $(18.82 \pm 3.52)\%$, the intracellular ROS content was $(123.61 \pm 0.03)\%$, and the apoptosis rate was $(98.61 \pm 0.02)\%$. **Conclusion** The prepared nanoparticles have uniform shapes and high drug loading capacity, significantly enhancing the therapeutic effect against liver tumors and providing a reference for the development of new cucurbitacin B nano-preparations.

Key words: cucurbitacin B; Zinc-based metal organic skeleton ZIF-8; nanoparticles; anti-liver tumor; stability; drug release behavior *in vitro*; cell proliferation ability; apoptosis; reactive oxygen species

原发性肝癌已经成为我国严重的公共卫生负担,截至 2022 年,肝癌发病率位居第 5,死亡率位居第 2^[1]。近年来,肝癌的治疗方案逐渐多样化,如肝切除、消融治疗、放射治疗、系统化疗、靶向治疗、免疫治疗、基因治疗及中医治疗等^[2]。然而,肝癌患病率依然居高不下,且死亡率逐年升高。与正常组织相比,肿瘤部位的血管内皮细胞渗透性更高,同时,快速生长的肿瘤细胞会不断侵袭和吸收周围的新生血管,进而形成结构和功能独特的渗漏血管,使得药物在肿瘤部位能够产生一定程度的靶向聚集效应^[3]。研究报道,纳米制剂可以高效负载抗肿瘤药物,保护药物在血液循环中的稳定性,延长其在体内的作用时间。另外,具有 pH 响应纳米制剂能够利用肿瘤微环境的特殊性质,实现药物在肿瘤部位的智能释放^[4-6]。

葫芦素为四环三萜类化合物,广泛存在于葫芦科植物中,其中,葫芦素 B 在自然界中最为普遍^[7]。葫芦素 B 具有抗肿瘤^[8-9]、抗氧化^[10]、保肝^[11]、抗炎^[12]等多种药理活性。其中,葫芦素 B 的抗癌活性尤为突出,对肝癌^[13]、肺癌^[14]、乳腺癌^[15]等多种癌症具有明显的抑制作用。虽然葫芦素 B 药理活性广泛,但其水溶性差、生物利用度低等问题严重限制了其应用。纳米制剂具有提高药物生物利用度、改善难溶性药物水溶性等优点^[16]。目前,葫芦素 B 纳米制剂主要有固体分散体^[17]、胶束^[18]、纳米结构脂质载体^[19]等,以上纳米制剂在一定程度上克服了上述问题,但其载药量偏低、合成方法较复杂等不足,限制了其进一步应用。

金属有机框架材料 (metal organic frameworks, MOFs) 是一种具有高表面积和内比表面积的晶体材料,锌离子与咪唑类配体结合形成的沸石咪唑酯骨

架材料-8 (zeolitic imidazolate frameworks-8, ZIF-8) 是一种特殊的 MOFs,其表面和孔隙率使其具有化学稳定性、热稳定性以及良好的吸附性能^[20]。“一锅法”是指将反应物混合在同一个反应容器中,进行连环多步反应的合成方法,以此方法制备的 ZIF-8 纳米制剂,具有制备方法简便^[21]、生物相容性良好^[22]、表面易于修饰^[23]、靶向癌细胞^[24]等优点,使得其在药物递送方面应用广泛^[25]。将葫芦素 B 开发成生物利用度高、水分散性好的纳米制剂,有助于改善药物自身存在的缺陷,提高其治疗效果。因此,本实验采用“一锅法”制备负载葫芦素 B 的 ZIF-8 纳米制剂 (cucurbitacin B-loaded ZIF-8 nanoparticles, CuB@ZIF-8 NPs),通过透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 观察、X 射线衍射 (X-ray diffraction, XRD) 分析、傅里叶变换红外光谱 (Fourier-transform infrared spectroscopy, FTIR) 分析等方法对其进行表征,并考察其对 HepG2 细胞的抑制作用,为葫芦素 B 新型纳米制剂的开发提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

KQ-500DE 型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;CJB-S-10D 型多点磁力搅拌器,郑州腾跃仪器设备有限公司;BY-G20 型医用离心机,北京白洋医疗器械有限公司;DZF-6050 型真空干燥箱,上海博远嘉程实业发展有限公司;MS105DU 型分析天平,梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司;ZEN-3600 型马尔文激光粒度仪,英国马尔文仪器有限公司;Agilent 1200 型高效液相色谱,美国安捷伦科技公司;FEI Tecnai G2 F30 型透射电子显微镜,赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司;S-4800 型扫描

电子显微镜, 日本 Hitachi 公司; D8 Advance X 射线衍射仪, 德国布鲁克(上海)有限公司; Nicolet 6700 型红外光谱仪, 美国尼高力仪器公司; ASAP 2460 型全自动物理吸附仪, 美国麦克仪器公司; STA 449 F3/F5 型热重分析仪, 德国耐驰仪器制造有限公司; BioTek Epoch 2 型酶标仪, 美国伯腾仪器有限公司; BD FACS Canto™ II 型流式细胞仪, 美国 BD Biosciences 公司; Olympus IX73 型荧光倒置显微镜, 日本 Olympus 公司。

1.2 药物与试剂

六水合硝酸锌(批号 C10095674)、二甲基咪唑(批号 C11172540), 质量分数 $\geq 98.0\%$, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 对照品葫芦素 B, 质量分数 $\geq 98\%$, 批号 Z02M7X10137, 上海源叶生物科技有限公司; 噻唑蓝(MTT), 批号 20220708, 北京百瑞极生物科技有限公司; 甲醇, 色谱级, 美国赛默飞公司; 胎牛血清, 批号 A2932148CP, 杭州四季青生物工程材料有限公司; DMEM 培养基, 批号 C11995500BT, 美国 Gibco 公司; 青霉素-链霉素-两性霉素(批号 AQ10010)、胰蛋白酶-EDTA 消化液 0.25% (批号 AQ515)、1×PBS 溶液(pH 7.4, 批号 AQ513), 北京翱擎生物科技有限公司。4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI, 批号 C1002)、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(批号 C1062M)、活性氧检测试剂盒(批号 S0033M), 北京碧云天科技有限公司。

1.3 细胞

人肝癌细胞系 HepG2 细胞, 编号 JNO-H0519, 广州吉妮欧生物科技有限公司, 细胞传至 5 代后进行实验。

2 方法与结果

2.1 纳米材料的合成

2.1.1 ZIF-8 NPs 合成 在文献报道制备方法^[26]的基础上进行改进, 确定最佳制剂工艺步骤如下: 精密称取 0.5 mmol 六水合硝酸锌、8 mmol 二甲基咪唑分别溶于 4 mL 甲醇中, 超声辅助溶解后转移至 20 mL 西林瓶中, 800 r/min 搅拌下加入 2 mL 甲醇, 室温继续搅拌 3 h。14 000 r/min 离心(离心半径为 60.87 mm) 15 min, 收集沉淀, 甲醇洗涤 2 次, 70 °C 下真空干燥过夜, 即得 ZIF-8 NPs。收集上清, 用于后续实验。

2.1.2 CuB@ZIF-8 NPs 合成 精密称取葫芦素 B 25 mg, 溶于 2 mL 甲醇中, 得药物储备液。精密称

取 0.5 mmol 六水合硝酸锌、8 mmol 二甲基咪唑分别溶于 4 mL 甲醇中, 超声辅助溶解后转移至 20 mL 西林瓶中, 800 r/min 搅拌下加入 2 mL 药物储备液, 室温继续搅拌 3 h。14 000 r/min 离心(离心半径为 60.87 mm) 15 min, 收集沉淀, 甲醇洗涤 2 次, 70 °C 下真空干燥过夜, 即得 CuB@ZIF-8 NPs。收集上清, 用于后续实验。

2.2 载药量及包封率测定

2.2.1 色谱条件 Agilent 1200 型高效液相色谱仪; 色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-0.1% 乙酸水溶液(46:54); 检测波长 228 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 °C; 进样量 10 μ L; 理论塔板数以葫芦素 B 峰计算不低于 5 000。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取适量葫芦素 B 对照品, 加甲醇配制成质量浓度为 50 μ g/mL 的葫芦素 B 对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 按照“2.1.2”项下方法制备 CuB@ZIF-8 NPs, 收集上清液于 50 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度, 即得供试品溶液。

2.2.4 阴性供试品溶液的制备 取“2.1.1”项下方法制备 ZIF-8 NPs, 收集上清液于 50 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度, 即得阴性供试品溶液。

2.2.5 专属性考察 将对照品溶液、供试品溶液、阴性供试品溶液分别依照“2.2.1”项下色谱条件进样, 记录色谱图。结果如图 1 所示。对照品溶液中葫芦素 B 出峰时间为 13.690 min, 供试品溶液中葫芦素 B 出峰时间为 13.694 min, 二者出峰时间一致, 且阴性供试品溶液中无干扰峰存在, 表明该方法专属性良好。

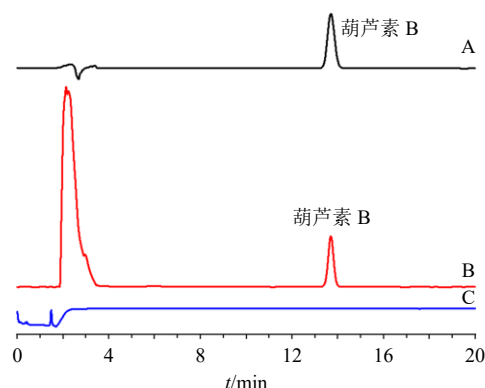


图 1 葫芦素 B 对照品 (A)、CuB@ZIF-8 NPs 样品 (B)、ZIF-8 NPs 样品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of cucurbitacin B reference substance (A), CuB@ZIF-8 NPs sample (B) and ZIF-8 NPs sample (C)

2.2.6 线性关系考察 精确称取适量的葫芦素 B 对照品, 加甲醇制备质量浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 的葫芦素 B 对照品溶液。精密吸取适量对照品溶液, 加甲醇稀释, 制备质量浓度分别为 10、20、40、100、140 $\mu\text{g/mL}$ 的葫芦素 B 对照品溶液。按照“2.2.1”项下方法进行检测, 以色谱峰面积 (Y) 作为因变量, 样品质量浓度 (X) 作为自变量, 绘制标准曲线并进行线性回归分析, 得回归方程 $Y=11.849X+15.131$, $R^2=0.9998$, 线性范围为 10~140 $\mu\text{g/mL}$, 结果表明线性关系良好。

2.2.7 精密度考察

(1) 日内精密度: 精确吸取 50 $\mu\text{g/mL}$ 的葫芦素 B 对照品溶液, 依照“2.2.1”项下色谱条件, 连续进样 6 针, 记录峰面积, 并计算其 RSD 值。结果表明, 连续 6 针进样的峰面积的 RSD 为 2.30%, 说明该仪器日内精密度良好。

(2) 日间精密度: 由另一名分析者隔日精密吸取同一对照品溶液 (质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$), 依照“2.2.1”项下色谱条件, 连续进样 6 针, 计算葫芦素 B 峰面积的 RSD 值; 与上述日内精密度结果比较, 计算两者精密度试验结果之间的 RSD。结果表明, 隔日测定的葫芦素 B 峰面积的 RSD 为 1.76%, 与上述日内精密度试验结果比较, 两者精密度结果之间的 RSD 为 1.82%, 说明该仪器日间精密度良好。

2.2.8 稳定性考察 精确吸取按“2.1.2”项下方法制备的供试品溶液 1 mL, 按照“2.2.1”项下色谱条件, 分别在制备后 0、2、4、6、12、24 h 进样测定, 记录峰面积并计算其 RSD 值。结果表明, 不同时间点峰面积的 RSD 为 0.39%, 说明供试品溶液稳定性良好。

2.2.9 重复性考察 按照“2.1.2”项下方法制备 6 份供试品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件对其进行检测, 记录峰面积并按照“2.2.11”项下方法计算 CuB@ZIF-8 NPs 中葫芦素 B 的载药量与 RSD 值。结果表明, 载药量为 $(17.16 \pm 0.41)\%$, RSD 为 2.37%, 说明重复性良好。

2.2.10 加样回收率考察 准确称取适量葫芦素 B 对照品, 配置成 1 mg/mL 的对照品溶液; 准确称取 10 mg ZIF-8 NPs, 共 6 份, 分别置于 10 mL 量瓶中, 分别加入 0.5 mL 对照品溶液, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 按照“2.2.1”项下色谱条件检测峰面积, 计算其加样回收率和 RSD 值。结果表明, 葫芦素 B 的平均加样回收率为 100.38%, RSD 为 2.30%, 说

明该含量测定方法加样回收率符合要求。

2.2.11 载药量和包封率的测定 按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件对各供试品溶液进行检测, 根据色谱峰面积计算未载入的药物质量, 记为 $M_{\text{上清}}$, 根据以下公式计算纳米粒中葫芦素 B 的药物载药量和包封率。结果表明, CuB@ZIF-8 NPs 中葫芦素 B 的载药量为 $(16.62 \pm 1.20)\%$, 包封率为 $(66.73 \pm 2.30)\%$ 。

$$\text{载药量} = (M_{\text{投}} - M_{\text{上清}}) / M_{\text{总}}$$

$$\text{包封率} = (M_{\text{投}} - M_{\text{上清}}) / M_{\text{投}}$$

$M_{\text{投}}$ 为投入葫芦素 B 的质量; $M_{\text{总}}$ 为干燥后纳米粒的质量

2.3 纳米材料的表征

2.3.1 粒径与 ζ 电位测定 精密称取 ZIF-8 NPs、CuB@ZIF-8 NPs 各 1 mg, 分散于 10 mL 甲醇中, 得样品溶液。利用马尔文激光粒度仪测定粒径与 ζ 电位。结果 (图 2) 显示, ZIF-8 NPs、CuB@ZIF-8 NPs 的粒径分别为 (174.10 ± 0.87) 、 (182.43 ± 1.88) nm; 多分散指数 (polydispersity index, PDI) 分别为 0.19 ± 0.00 、 0.14 ± 0.03 ; ζ 电位分别为 (-68.57 ± 0.74) 、 (24.80 ± 0.52) mV。

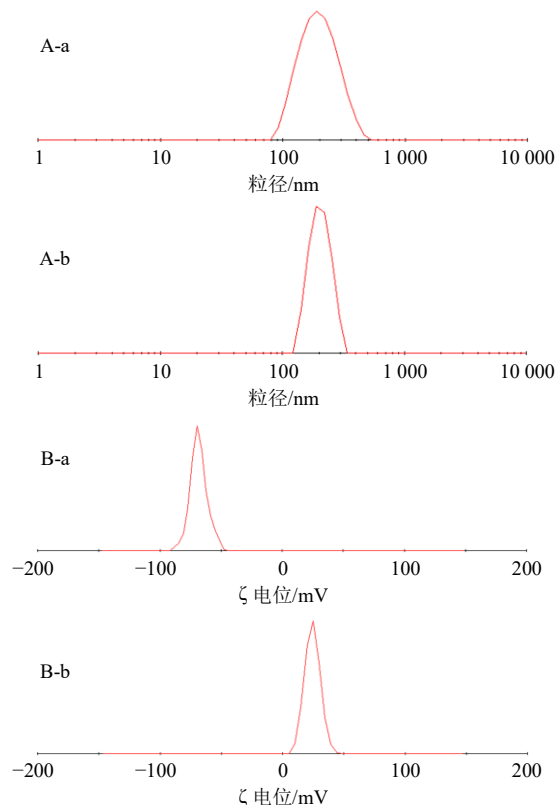


图 2 ZIF-8 NPs (a) 和 CuB@ZIF-8 NPs (b) 的粒径 (A) 和 ζ 电位 (B)

Fig. 2 Size (A) and ζ potential (B) of ZIF-8 NPs (a) and CuB@ZIF-8 NPs (b)

2.3.2 TEM 观察纳米粒形貌 取适量 ZIF-8 NPs、CuB@ZIF-8 NPs 分散于甲醇中，超声处理 30 min，滴于铜网上，待液体蒸发干燥后，重复此过程 2~3 次，最后将铜网烘干，并记录图像。如图 3-A 显示，ZIF-8 NPs 为规则的十二面体结构，粒径均一，分散性良好。

2.3.3 扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 观察纳米粒形貌 取适量 ZIF-8 NPs、CuB@ZIF-8 NPs 分散于甲醇中，超声处理 30 min，将分散液滴于硅片上，室温风干。通过场发射扫描电子显微镜在不同倍数下对 2 种纳米粒进行扫描测定。如图 3-B 显示，CuB@ZIF-8 NPs 与空白 ZIF-8 NPs 形貌与尺寸无明显差异，粒径与马尔文粒径仪结果基本一致。

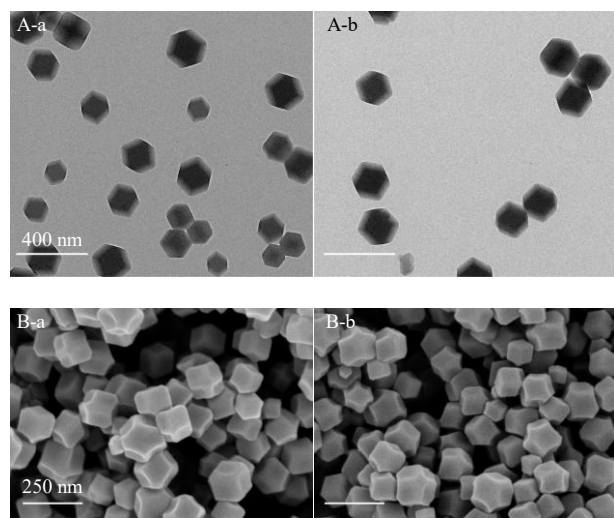


图 3 ZIF-8 NPs (a) 和 CuB@ZIF-8 (b) 的 TEM (A) 和 SEM (B) 观察

Fig. 3 TEM (A) and SEM (B) observation of ZIF-8 NPs (a) and CuB@ZIF-8 NPs (b)

2.3.4 XRD 分析 取适量葫芦素 B 原料药、ZIF-8 NPs、CuB@ZIF-8 NPs，过筛后置于样品槽，将样品安装在样品台上，样品中心与中心线对准，设置仪器参数为 Cu-Co 射线($\gamma=0.1541\text{ nm}$)，管流 40 mA，高压 40 kV，扫描范围 $5^\circ\sim 80^\circ$ ，扫描速率为 $2^\circ/\text{min}$ 。结果如图 4 所示，制备的 ZIF-8 NPs 和 CuB@ZIF-8 NPs 均具有一定的结晶度，且 ZIF-8 NPs 的晶面峰的峰型与报道一致^[27]，在 5.9° 、 10.3° 、 12.6° 、 17.9° 处有明显的特征峰。CuB@ZIF-8 NPs 与 ZIF-8 NPs 的曲线基本一致，证明“一锅法”的载药方法并未改变 ZIF-8 NPs 的晶体结构。在 CuB@ZIF-8 NPs 的 XRD 图中，葫芦素 B 原料药在 22° 处的特征峰消失，

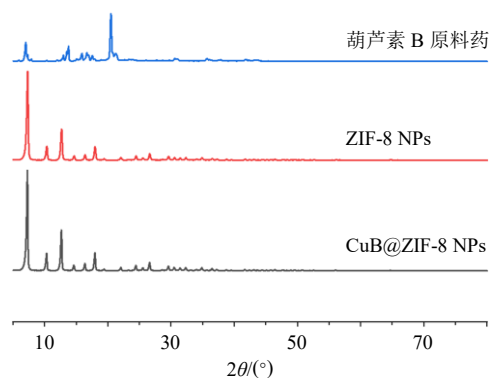


图 4 葫芦素 B、ZIF-8 NPs 和 CuB@ZIF-8 NPs 的 XRD 曲线

Fig. 4 XRD curves of cucurbitacin B, ZIF-8 NPs and CuB@ZIF-8 NPs

在 5.9° 、 12.6° 、 17.9° 处的特征峰强度升高，表明葫芦素 B 成功载于 ZIF-8 NPs 中，且葫芦素 B 的晶型形式在 CuB@ZIF-8 NPs 中部分保留。

2.3.5 FTIR 分析 称取适量 ZIF-8 NPs、CuB@ZIF-8 NPs，与干燥的溴化钾分散均匀后压片，在 $4000\sim 400\text{ cm}^{-1}$ 采集样品 FTIR 谱图。结果如图 5 所示，在 1580 cm^{-1} 和 $500\sim 1500\text{ cm}^{-1}$ 出现了氮杂环中的 C=N、C-N 和 N-H 键的伸缩振动峰，证明 ZIF-8 NPs 的成功合成。CuB@ZIF-8 NPs 的红外图谱与 ZIF-8 NPs 基本一致，证明葫芦素 B 的成功载入并未改变 ZIF-8 NPs 的结构。

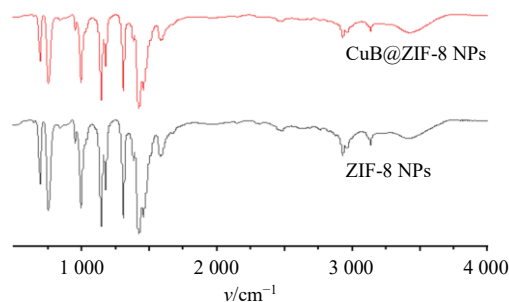


图 5 ZIF-8 和 CuB@ZIF-8 NPs 的 FTIR 图谱

Fig. 5 FTIR spectra of ZIF-8 NPs and CuB@ZIF-8 NPs

2.3.6 热重分析 (thermogravimetric analysis, TGA) 称取适量 ZIF-8 NPs、CuB@ZIF-8 NPs 置于热重仪，在氮气环境中以 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ 的升温速率从 30°C 加热至 800°C ，监测质量损失的百分比与温度之间的变化关系。结果如图 6 所示，当温度低于 500°C 时，ZIF-8 和 CuB@ZIF-8 质量变化较小；当温度达到 500°C 时，二者质量急剧下降。由此看出，ZIF-8 NPs 和 CuB@ZIF-8 NPs 具有良好的热稳定性。在 $200\sim 500^\circ\text{C}$ ，CuB@ZIF-8 NPs 失重略低于 ZIF-8 NPs，证

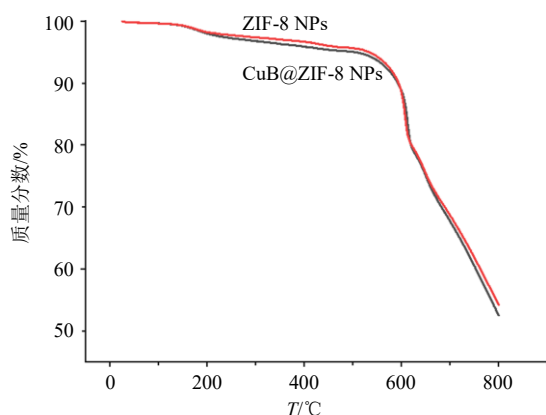


图 6 ZIF-8 和 CuB@ZIF-8 NPs 的 TGA 曲线

Fig. 6 TGA curves of ZIF-8 and CuB@ZIF-8 NPs

明葫芦素 B 的加入可以提高 ZIF-8 骨架在此区间的热稳定性。

2.3.7 比表面积法 (Brunauer-Emmett-Teller, BET) 分析比表面积与孔径 称取适量 ZIF-8 NPs, 以 10 °C/min 升温速率加热至 120 °C, 并在此温度下保温 6 h, 用以除去杂质, 随后进行氮气的吸附-脱附实验, 对最终所得的数据进行颗粒微孔径和比表面积的分析。结果如图 7 所示, 所制备的纳米粒孔径为 2.2 nm, 比表面积为 1 391.10 m²/g。

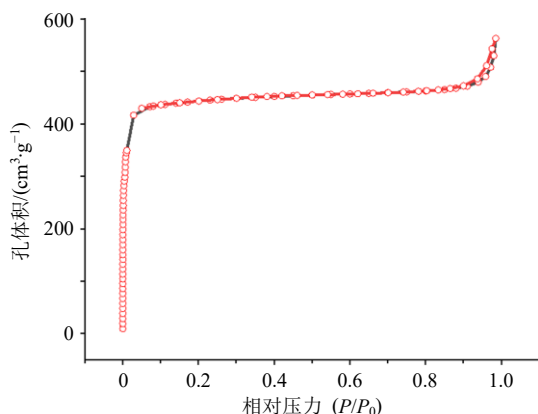


图 7 ZIF-8 NPs 的等温吸附-脱附曲线

Fig. 7 Isothermal adsorption-desorption curve of ZIF-8 NPs

2.4 CuB@ZIF-8 NPs 稳定性考察

精密称取 1 mg CuB@ZIF-8 NPs 于 15 mL 离心管中, 加入 10 mL 去离子水, 30 min 超声分散后置于摇床中震荡, 分别于第 1~3 天取样, 测定纳米粒的粒径。结果如表 1 所示, 3 d 内 CuB@ZIF-8 NPs 的粒径一致, 表明其在水中稳定性良好。

2.5 体外释药性能考察

精密度称取 CuB@ZIF-8 NPs 1 mg, 分别分散于 5 mL pH 7.4、6.5 的 PBS (0.5% 聚山梨酯-80)

表 1 CuB@ZIF-8 NPs 3 d 内粒径分布 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Particle size distribution at CuB@ZIF-8 NPs in 3 days ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t/d	粒径/nm	RSD/%
1	193.43 ± 3.12	2.70
2	183.27 ± 3.51	
3	187.93 ± 2.01	

中, 孵育于 37 °C 的恒温震荡仪中 (200 r/min), 在预定时间点取样 (1、2、4、8、12、24、48、72 h) 1 mL, 离心 (17 000 r/min, 15 min), 收集上清液, 补入等体积的释放介质。按照“2.2.1”项下色谱条检测上清液中药物的含量, 计算药物累积释放率。结果如图 8 所示, CuB@ZIF-8 NPs 在 pH 7.4 和 pH 5.5 条件下 72 h 的累积释放率分别为 56.11% 和 77.56%, 表现出明显的 pH 响应释放特性。主要因为 ZIF-8 MOFs 具有 pH 敏感性, 在酸性条件容易降解, 从而促进药物的释放。

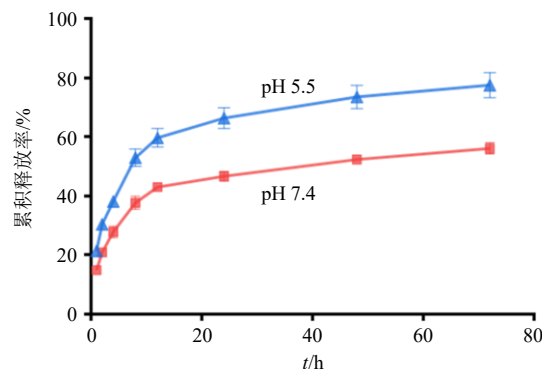


图 8 CuB@ZIF-8 NPs 在不同 pH 值条件下的体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Cumulative release curves of CuB@ZIF-8 NPs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.6 体外药效学研究

2.6.1 细胞培养及分组 细胞复苏后于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养至 5 代。将细胞随机分为对照组、葫芦素 B 组、CuB@ZIF-8 组 [以葫芦素 B 半抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀) 计]。

2.6.2 MTT 法检测细胞存活率 将对数生长的 HepG2 细胞接种于 96 孔板 (5 000 个/孔), 按照“2.6.1”项下分组处理细胞 48 h, 每组设置 4 个复孔。在每孔中加入 20 μL 的 MTT 溶液 (5 mg/mL), 继续培养 4 h, 去除培养液, 在每个孔中加入 100 μL DMSO。酶标仪孵育 5 min 后 490 nm 处测定吸光度 (A), 计算细胞存活率。结果 (表 2) 表明, 0~1.0 μmol/L ZIF-8 NPs 对 HepG2 细胞无杀伤作用, 细胞

存活率均高于 85%，表明 ZIF-8 骨架对 HepG2 细胞具有良好的细胞相容性；CuB@ZIF-8 组细胞存活率与葫芦素 B 组相比具有显著性差异，表现出更明显的细胞抑制作用，结果见表 3。

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

表 2 ZIF-8 NPs 生物相容性 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 2 Biocompatibility of ZIF-8 NPs ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

浓度/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	细胞存活率/ %	浓度/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	细胞存活率/ %
0	100.00 ± 0.00	0.6	102.75 ± 2.97
0.2	101.51 ± 3.09	0.8	98.67 ± 7.27
0.4	101.59 ± 2.77	1.0	88.02 ± 0.86

表 3 不同组别 HepG2 细胞存活率 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 3 HepG2 cells survival rates in different groups ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	细胞存活率/%
对照	—	100.00 ± 2.53
ZIF-8	6.0	91.89 ± 5.12
葫芦素 B	6.0	50.86 ± 2.81**
CuB@ZIF-8	6.0	18.82 ± 3.52** $\Delta\Delta$

与对照组比较：** $P < 0.01$ ；与葫芦素 B 组比较： $\Delta\Delta P < 0.01$ ；表 4、5 同。

** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs cucurbitacin B group; same as tables 4, 5.

2.6.3 Annexin V-FITC PI 染色法检测细胞凋亡率 将对数生长的 HepG2 细胞接种于 6 孔板 (7×10^5 个/孔)，按照“2.6.1”项下分组处理细胞 48 h。收集细胞并计数，取 $5.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^5$ 个重悬细胞，离心后按顺序加入 195 μL Annexin V-FITC 结合液、5 μL Annexin V-FITC、10 μL 碘化丙啶染色液，轻轻混匀。37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min 后置于冰浴中，利用流式细胞仪进行检测。结果如表 4 所示，相较于对照组，葫芦素 B 组凋亡率略升高，CuB@ZIF-8 组凋亡率升高更为显著，表明 CuB@ZIF-8 NPs 能够

表 4 不同组别 HepG2 细胞凋亡率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Apoptosis rates of HepG2 cells in different groups ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

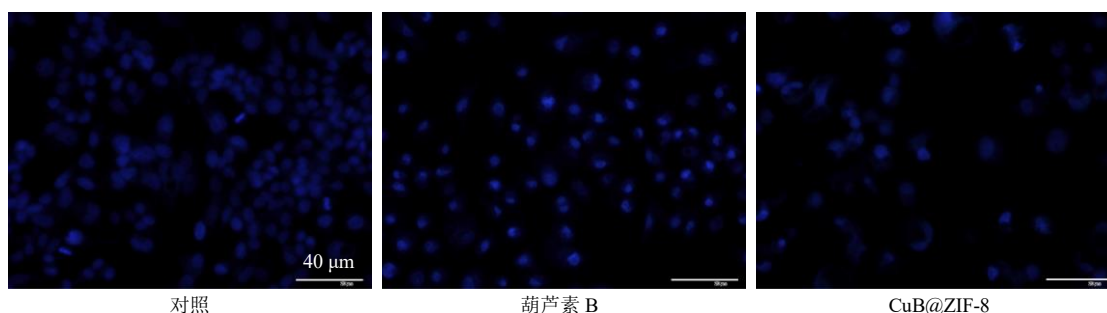
组别	剂量/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	总凋亡率/%
对照	—	9.31 ± 0.87
葫芦素 B	6.0	18.29 ± 0.03**
CuB@ZIF-8	6.0	98.61 ± 0.02** $\Delta\Delta$

更大程度促进细胞凋亡。

2.6.4 DAPI 染色法观察细胞核形态变化 将对数生长的 HepG2 细胞接种于 6 孔板 (7×10^5 个/孔)，按照“2.6.1”项下分组处理细胞 48 h，移去上清，PBS 清洗，每孔加入 1 mL DAPI 溶液染色 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，室温避光孵育 5 min，移去上清，PBS 洗 3 次，荧光显微镜拍照并收集图像。与对照组相比，葫芦素 B 组细胞核出现破损，轻微变圆，表明葫芦素 B 使 HepG2 细胞发生一定程度的凋亡。而 CuB@ZIF-8 组细胞核完全变圆，且多数呈现碎片状，表明其诱导 HepG2 细胞凋亡更显著，其结果与流式细胞仪定量结果一致。结果见图 9。

2.6.5 细胞内 ROS 水平变化 将对数生长的 HepG2 细胞接种于 6 孔板 (7×10^5 个/孔)，按照“2.6.1”项下分组处理细胞 48 h，每孔加入 2 mL DCFH-DA 稀释液 (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 20 min，PBS 洗 3 次，荧光显微镜拍照并收集图像。收集细胞，流式细胞仪进行检测。

荧光显微镜观察结果可见，与对照组相比，葫芦素 B 组细胞内 ROS 水平升高；CuB@ZIF-8 组细胞内 ROS 水平进一步升高，表明制备的纳米粒比葫芦素 B 单体具有更强的诱导 ROS 生成的能力，对 HepG2 细胞杀伤力更强。流式细胞仪检测结果与荧光显微镜观察结果一致。与对照组相比，葫芦素 B 组荧光强度略升高，CuB@ZIF-8 组荧光强度大幅升高，结果见图 10 和表 5。



对照

葫芦素 B

CuB@ZIF-8

图 9 不同组别 HepG2 细胞核形态变化

Fig. 9 Nuclear morphological changes of HepG2 cells in different groups

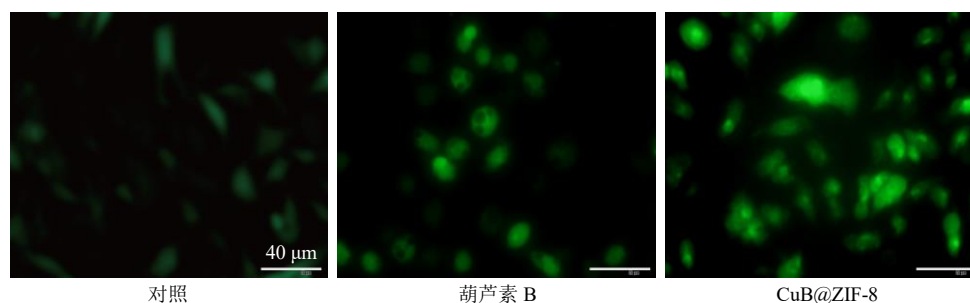


图 10 不同组别 HepG2 细胞内 ROS 水平变化及不同组别 HepG2 细胞内 DCFH 相对荧光强度

Fig. 10 Changes of ROS levels in HepG2 cells of different groups and relative fluorescence intensity of DCFH in HepG2 cells of different groups

表 5 不同组别 HepG2 细胞内 DCFH 相对荧光强度
($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 5 Relative fluorescence intensity of DCFH in HepG2 cells of different groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	剂量/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	相对荧光强度/%
对照	—	100.00 $\pm$ 0.06
葫芦素 B	6.0	111.38 $\pm$ 0.001**
CuB@ZIF-8	6.0	123.61 $\pm$ 0.03** $\Delta\Delta$

2.7 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8 软件进行统计学分析及作图, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 One-way ANOVA 检验。以 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

3 讨论

ZIF-8 MOFs 在装载抗肿瘤成分方面应用广泛。有研究报道, 将姜黄素^[28]、白藜芦醇^[29]、雷公藤甲素^[30]等中药活性成分负载于 ZIF-8 NPs 中, 有效改善了中药活性成分难溶、生物利用度低等问题。本文制备的 CuB@ZIF-8 NPs 载药量与包封率稳定, 粒径均一, 表明其制备工艺稳定可靠。电位结果显示, 载药后纳米粒的电位发生了反转, 表明葫芦素 B 的成功负载。BET 结果表明, ZIF-8 NPs 具有多孔结构, 且比表面积较大, 这种结构有利于葫芦素 B 的负载, 且随着药物的载入, 推测 CuB@ZIF-8 NPs 的孔径可能减小^[31]。XRD、FTIR 结果表明, 葫芦素 B 成功负载于 ZIF-8 NPs 中。TGA 测定结果表明, 葫芦素 B 可以提高 ZIF-8 骨架在 200~500 °C 的热稳定性。CuB@ZIF-8 NPs 体外释放结果表明, 纳米粒在肿瘤微环境下能够释放更多的葫芦素 B, 这有利于药物进入细胞从而发挥抗肿瘤作用。

葫芦素 B 是一种天然的抗肿瘤成分, 其抗肝癌机制包括破坏核因子红系 2 相关因子 2/血红素加氧酶-1 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2/heme

oxygenase-1, Nrf2/HO-1) 抗氧化通路, 诱导细胞铁死亡^[32]; 改变蛋白激酶 B/雷帕霉素复合物 1 (protein kinase B/mechanistic target of rapamycin complex 1, AKT/mTORC1) 信号通路影响脂质代谢、氨基酸代谢和葡萄糖代谢^[33]; 抑制 Janus 激酶/信号传导及转录激活因子 (Janus kinase/signal transducers and activators of transcription, JAK/STAT) 信号通路^[13]; 诱导 ROS 介导的 DNA 损伤、细胞凋亡和保护性自噬^[34]等, 其促凋亡机制主要包括抑制细胞增殖和迁移^[35]、抑制 STAT3 磷酸化^[36]、阻滞细胞周期^[37]。ROS 是一种细胞代谢物, 可以通过核外未配对电子和其他化合物产生一系列化学反应, 进而损伤癌细胞^[38], 其主要机制包括诱导肿瘤细胞自噬、凋亡、焦亡、铁死亡、DNA 损伤、调控细胞周期等^[39-40]。ROS 参与抗肿瘤机制中的多个通路, 如核因子- κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPKs)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/AKT 和 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1-核因子 (红细胞衍生 2) 相关因子 2-抗氧化反应元件 (Kelch-like ECH-associated protein 1-nuclear factor erythroid 2-related factor 2-antioxidant response element, Keap1-Nrf2-ARE)^[41]。研究表明, ROS 的升高有助于促进癌细胞的凋亡^[42]。

本实验初步考察了 CuB@ZIF-8 NPs 对 HepG2 细胞的体外作用。与游离葫芦素 B 相比, 负载葫芦素 B 的 ZIF-8 NPs 能够更大程度抑制 HepG2 细胞增殖、促进 HepG2 细胞凋亡、增加 HepG2 细胞内 ROS 产生, 提示 CuB@ZIF-8 NPs 具有更强的肿瘤抑制作用, 可能是由于 CuB@ZIF-8 NPs 具有 pH 响应性, 在肿瘤微环境下能够增强 HepG2 细胞内药物的积累。此外, 有研究表明, 葫芦素 B 可以对肝癌

裸鼠抑制瘤有明显抑制作用^[43], 实验室前期研究证明葫芦素 B 能够通过诱导 HepG2 细胞铁死亡以发挥抗肿瘤作用^[13], 但 CuB@ZIF-8 NPs 能否增强诱导 HepG2 细胞铁死亡还有待进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] World Health Organization. Data visualization tools for exploring the global cancer burden in 2020 [EB/OL]. (2023-05-26) [2025-04-21]. <https://gco.iarc.fr/today/en/fact-sheets-populations#countries>.
- [2] 陈世发, 赵礼金. 肝癌发生发展机制的研究进展及其治疗现状 [J]. 中国普通外科杂志, 2018, 27(7): 910-923.
- [3] Attia M F, Anton N, Wallyn J, *et al.* An overview of active and passive targeting strategies to improve the nanocarriers efficiency to tumour sites [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2019, 71(8): 1185-1198.
- [4] Rab S O, Roopashree R, Altalbawy F M A, *et al.* Phytochemicals and their nanoformulations for targeting hepatocellular carcinoma: Exploring potential and targeting strategies [J]. *Cell Biochem Funct*, 2024, 42(8): e70013.
- [5] Mi C L, Liu S, Chen Z D. Redefining hepatocellular carcinoma treatment: Nanotechnology meets tumor immune microenvironment [J]. *J Drug Target*, 2025, 33(7): 1125-1144.
- [6] 王慧敏, 赵东明, 李险峰. 多功能纳米载药系统在肝癌治疗中的研究进展 [J]. 中国癌症防治杂志, 2025, 17(1): 128-132.
- [7] 刘钰莹, 马越, 赵晓燕, 等. 植物资源中葫芦素类化合物的分布 [J]. 农产品加工, 2017(10): 75-78.
- [8] Jin Y T, Zhou P, Huang S S, *et al.* Cucurbitacin B inhibits the proliferation of WPMY-1 cells and HPRF cells via the p53/MDM2 axis [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(17): 9333.
- [9] 宫辰, 杨冰, 周钰通, 等. 葫芦素抗肿瘤作用及其机制研究进展 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(2): 453-461.
- [10] Yang M Y, Chen X, Cheng C, *et al.* Cucurbitacin B induces ferroptosis in oral leukoplakia via the SLC7A11/mitochondrial oxidative stress pathway [J]. *Phytomedicine*, 2024, 129: 155548.
- [11] Dai S, Wu R, Fu K, *et al.* Exploring the effect and mechanism of cucurbitacin B on cholestatic liver injury based on network pharmacology and experimental verification [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 322: 117584.
- [12] 钟娅. 甜瓜蒂中葫芦素 B 的提取优化和对银屑病体外分子机制研究 [D]. 成都: 成都大学, 2024.
- [13] Wang X L, Bai Y D, Yan X, *et al.* Cucurbitacin B exhibits antitumor effects on CD133⁺ HepG2 liver cancer stem cells by inhibiting JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. *Anticancer Drugs*, 2021, 32(5): 548-557.
- [14] Zeng Z Y, Hu Y Y, Xiang J, *et al.* Cucurbitacin B targets STAT3 to induce ferroptosis in non-small cell lung cancer [J]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 978: 176805.
- [15] Xu Q Q, Jiang Z Y, Pan Y Q, *et al.* Cucurbitacin B stimulates PD-1 immunotherapy response in malignant breast cancer by covalent targeting MTCH2 [J]. *Phytomedicine*, 2025, 145: 157017.
- [16] Birla D, Khandale N, Bashir B, *et al.* Application of quality by design in optimization of nanoformulations: Principle, perspectives and practices [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2025, 15(3): 798-830.
- [17] 程佳慧, 武倩, 刘喜纲. 葫芦素 B 固体分散体的制备 [J]. 中成药, 2020, 42(3): 570-573.
- [18] Pang L J, Zhang L, Zhou H, *et al.* Reactive oxygen species-responsive nanococktail with self-amplificated drug release for efficient co-delivery of paclitaxel/cucurbitacin B and synergistic treatment of gastric cancer [J]. *Front Chem*, 2022, 10: 844426.
- [19] 张琦, 曹萌, 王彬彬, 等. 葫芦素 B-IR780 共载药纳米结构脂质载体的制备及其处方优化 [J]. 军事医学, 2022, 46(6): 447-455.
- [20] Wen M, Yang W Y, Zhao Z P. Advancements in nanoscale MOFs-based catalytic materials: Synthesis strategies and applications [J]. *J Environ Chem Eng*, 2025, 13(2): 115613.
- [21] Raptopoulou C P. Metal-organic frameworks: Synthetic methods and potential applications [J]. *Materials*, 2021, 14(2): 310.
- [22] Mansuriya B D, Altintas Z. Applications of graphene quantum dots in biomedical sensors [J]. *Sensors*, 2020, 20(4): 1072.
- [23] Wang Y F, Luo X, Sun X L, *et al.* Lactate dehydrogenase encapsulated in a metal-organic framework: A novel stable and reusable biocatalyst for the synthesis of D-phenyllactic acid [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2022, 216: 112604.
- [24] 方婷. 基于金属有机骨架 ZIF-8 的多重修饰载药体系的构建与抗肿瘤活性研究 [D]. 芜湖: 皖南医学院, 2024.
- [25] 呼高伟, 洪纯丽, 罗希, 等. ZIF-8 作为疫苗佐剂/递送系统的应用研究 [J]. 中国生物工程杂志, 2024, 44(7): 81-88.
- [26] Sun C Y, Qin C, Wang X L, *et al.* Zeolitic imidazolate framework-8 as efficient pH-sensitive drug delivery vehicle [J]. *Dalton Trans*, 2012, 41(23): 6906-6909.
- [27] Mahmoodi N M, Ghadirli M M, Hayati B, *et al.* Synthesis

- of ZIF-8 composite (g-C₃N₄@ZIF-8/Ag₃PO₄) as a catalyst for the malachite green and tetracycline degradation [J]. *Inorg Chem Commun*, 2025, 177: 114345.
- [28] Rahman M, Kabir M, Islam T, *et al.* Curcumin-loaded ZIF-8 nanomaterials: Exploring drug loading efficiency and biomedical performance [J]. *ACS Omega*, 2025, 10(3): 3067-3079.
- [29] 卢丹萍. 载药 ZIF-8 纳米颗粒在抗细胞衰老方面的应用研究 [D]. 深圳: 中国科学院大学(中国科学院深圳先进技术研究院), 2020.
- [30] 唐子琰, 曾亚文, 倪健, 等. 装载雷公藤甲素的金属有机骨架材料 ZIF-8 的制备、表征及优化研究 [J]. *中南药学*, 2021, 19(2): 182-187.
- [31] Luo J J, Liang Y F, Lin J Y, *et al.* Design and evaluation of photothermal and chemical multimodal antibacterial agents based on ZIF-8 [J]. *Polyhedron*, 2025, 273: 117491.
- [32] 洪婷, 王依蕾, 曾海荣, 等. 葫芦素 B 诱导细胞铁死亡抑制肝癌 Huh-7 细胞增殖的机制 [J]. *中国药理学通报*, 2023, 39(4): 638-645.
- [33] Ji X Y, Chen X, Sheng L, *et al.* Metabolomics profiling of AKT/c-Met-induced hepatocellular carcinogenesis and the inhibitory effect of cucurbitacin B in mice [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1009767.
- [34] Niu Y N, Sun W, Lu J J, *et al.* PTEN activation by DNA damage induces protective autophagy in response to cucurbitacin B in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 4313204.
- [35] 付康. 葫芦素 B 和纤细薯蓣皂苷对癌细胞的抑制活性研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2020.
- [36] Zhang M X, Zhang H L, Sun C Y, *et al.* Targeted constitutive activation of signal transducer and activator of transcription 3 in human hepatocellular carcinoma cells by cucurbitacin B [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2009, 63(4): 635-642.
- [37] Chan K T, Meng F Y, Li Q, *et al.* Cucurbitacin B induces apoptosis and S phase cell cycle arrest in BEL-7402 human hepatocellular carcinoma cells and is effective via oral administration [J]. *Cancer Lett*, 2010, 294(1): 118-124.
- [38] 杨大宁, 刘金娟. ROS 在肿瘤发生及抗肿瘤药物中的调控作用 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2021, 43(5): 1082-1089.
- [39] 梁润森, 严逸非, 陈家辉, 等. 活性氧的抗肿瘤作用机制及其在肿瘤治疗中的应用 [J]. *生命的化学*, 2023, 43(4): 501-509.
- [40] 周建敏, 刘鑫玉, 刘远莉, 等. ROS 在肿瘤细胞中的调控作用及相关的抗肿瘤策略 [J]. *生命的化学*, 2022, 42(12): 2214-2221.
- [41] Rauf A, Khalil A A, Awadallah S, *et al.* Reactive oxygen species in biological systems: Pathways, associated diseases, and potential inhibitors-A review [J]. *Food Sci Nutr*, 2023, 12(2): 675-693.
- [42] Mohamed H R H, Essam R, Mohamed B A, *et al.* Potent cytotoxicity and induction of ROS-mediated genomic instability, mitochondrial dysfunction, and apoptosis by Y₂O₃ NPs in Hep-G2 hepatic cancer cells [J]. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2025: 1-11.
- [43] 张洪亮. 葫芦素 B 在体内外对肝癌细胞的生长抑制作用 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2008.

[责任编辑 郑礼胜]