

# 白屈菜红碱纳米粒的制备及体外抗黑色素瘤活性评价<sup>Δ</sup>

杨锦<sup>1\*</sup>, 韩伟<sup>1</sup>, 张永萍<sup>1</sup>, 陈晓兰<sup>1</sup>, 李哲<sup>2,3</sup>, 刘杰<sup>1</sup>, 吴静澜<sup>1#</sup> (1. 贵州中医药大学药学院, 贵阳 550025; 2. 贵州中医药大学基础医学院, 贵阳 550025; 3. 贵州中医药大学兽用中药制剂创新研发中心, 贵阳 550025)

中图分类号 R283.6; R979.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)24-2980-07  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.24.07



**摘要** 目的:制备白屈菜红碱纳米粒(CHE-NPs),对其处方进行优化,并评价其体外释药行为及对黑色素瘤的抑制作用。方法:以甲氧基聚乙二醇-聚乳酸-羟基乙酸共聚物(mPEG-PLGA)为载体材料,采用纳米沉淀法制备CHE-NPs,采用高效液相色谱法和透析袋法测定包封率、载药量。以二者的总评归一(OD)值为因变量,以CHE投药量、mPEG-PLGA质量浓度、泊洛沙姆188(F68)浓度为自变量,采用Box-Behnken响应面设计优化CHE-NPs处方。检测最优处方所制CHE-NPs的粒径和Zeta电位,考察其体外释药特征,比较CHE原料药和CHE-NPs对小鼠B16黑色素瘤细胞存活率的影响并计算二者的半数抑制浓度。结果:最优处方为CHE投药量2 mg、mPEG-PLGA质量浓度13 mg/mL、F68浓度1.8%。以此所制CHE-NPs的平均包封率为(80.18±1.11)%,平均载药量为(11.36±0.28)%,平均OD值为0.96±0.04[与OD预测值(0.90)的相对偏差为6.67%],粒径为(113.1±1.40)nm,Zeta电位为(-21.6±0.29)mV,多分散性指数为0.07±0.01(n=3)。CHE对照品、CHE-NPs在孵育8 h时的累积释放率分别为90.87%、68.68%,后者的体外释药行为符合Weibull动力学模型。CHE-NPs对B16黑色素瘤细胞的抑制作用显著强于CHE原料药,CHE-NPs和CHE原料药的24 h半数抑制浓度分别为69.35、107.36 μg/mL。结论:所制CHE-NPs具有缓释作用和较强的载药能力,同时增强了CHE对黑色素瘤的体外抑制作用。

**关键词** 白屈菜红碱;黑色素瘤;抑瘤作用;甲氧基聚乙二醇-聚乳酸-羟基乙酸共聚物;纳米粒;Box-Behnken响应面设计

## Preparation of Chelerythrine Nanoparticles and Evaluation of Anti-melanoma Activity *in vitro*

YANG Jin<sup>1</sup>, HAN Wei<sup>1</sup>, ZHANG Yongping<sup>1</sup>, CHEN Xiaolan<sup>1</sup>, LI Zhe<sup>2,3</sup>, LIU Jie<sup>1</sup>, WU Jinglan<sup>1</sup> (1. College of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China; 2. College of Basic Medicine, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China; 3. Innovation Research and Development Center of Veterinary Traditional Chinese Medicine Preparations, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To prepare chelerythrine nanoparticles (CHE-NPs), optimize their formulation, and evaluate its drug release behavior *in vitro* and its inhibitory effect on melanoma. METHODS: Using methoxy polyethylene glycol-poly(lactic-co-glycolic acid) (mPEG-PLGA) as carrier, CHE-NPs were prepared by the nano-precipitation method. HPLC method and dialysis bag method were used to determine entrapment efficiency and drug loading. The formulation of CHE-NPs was optimized by Box-Behnken response surface design using overall desirability (OD) of them as dependent variables, CHE dosage, mPEG-PLGA concentration and poloxamer 188 (F68) concentration as independent variables. The particle size and Zeta potential of CHE-NPs prepared by the optimal formulation were detected; the characteristics of drug release *in vitro* were investigated; the effects of CHE and CHE-NPs on survival rate of mice B16 melanoma cells were compared, and median inhibition concentrations (IC<sub>50</sub>) of them were calculated. RESULTS: The optimal formulation included CHE of 2 mg, mPEG-PLGA of 13 mg/mL, F68 of 1.8%. Average entrapment efficiency rate of CHE-NPs prepared by the optimal formulation was (80.18±1.11)%, average drug loading was (11.36±0.28)%, average OD value was 0.96±0.04 [the relative deviation from predicted value (0.90) of OD was 6.67%]; particle size was (113.1±1.40) nm, and Zeta potential was (-21.6±0.29) mV; polydispersity index was 0.07±0.01 (n=3); accumulative release rates of CHE control and CHE-NPs were 90.87% and 68.68% within 8 h, and drug release behavior *in vitro* of the latter was in accordance with Weibull kinetic model. Inhibitory effect of CHE-NPs on B16 melanoma cells was significantly stronger than that of CHE; the 24 h IC<sub>50</sub> of CHE-NPs and CHE were 69.35 and 107.36 μg/mL, respectively. CONCLUSIONS: The prepared CHE-NPs show good sustained-effect and high capacity of drug loading, and strengthen the inhibitory effect of CHE on melanoma.

\* 硕士研究生。研究方向:中药及民族药物新制剂与新剂型。  
E-mail:1510428733@qq.com

# 通信作者:教授,硕士生导师,硕士。研究方向:中药及民族药物新制剂与新剂型。E-mail:1259803072@qq.com

**KEYWORDS** Chelerythrine; Melanoma; Anti-tumor effect; Methoxy polyethylene glycol-poly(lactic acid-hydroxyacetic acid) copolymer; Nanoparticles; Box-Behnken response surface design

白屈菜红碱(chelerythrine, CHE)是来源于茜草科植物  
杆 *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br.、白屈菜 *Chelidonium  
majus* Linn. 等药用植物的生物碱类活性成分。大量研究  
数据显示, CHE 具有抑制肿瘤细胞生长的作用, 包括人  
结肠癌 HCT-116、人肝癌 HepG2、小鼠黑色素瘤 B16 细胞  
等<sup>[1-4]</sup>。但 CHE 的水溶性差, 加之游离药物本就难以在  
肿瘤部位扩散、渗透, 从而导致该成分的开发利用受到  
限制<sup>[5-6]</sup>。本研究拟结合现代药剂学新理论与新技术,  
将难溶性 CHE 载于高分子载体中以制备纳米粒, 以期提  
高其生物利用度、增强其抗肿瘤活性。

纳米递药系统在肿瘤组织中表现出较好的渗透性和  
滞留效应, 在构建该系统时, 选择合适的纳米载体可  
改善药物的递送和释放性能<sup>[7]</sup>。将亲水性的甲氧基聚乙  
二醇(methoxy polyethylene glycol, mPEG)嵌段引入聚乳  
酸-羟基乙酸共聚物[poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA]  
分子链中, 制成 mPEG-PLGA 聚合物, 该聚合物具有疏  
水和亲水的双重特性, 同时 mPEG 可以保护纳米粒不受  
网状内皮系统的影响, 使纳米粒在体内循环中拥有较长  
的半衰期<sup>[8-11]</sup>; PLGA 的存在也可使所载药物不被快速  
降解<sup>[12-14]</sup>。本研究选择两亲性 mPEG-PLGA 聚合物作为  
载体材料, 制备 CHE 纳米粒(CHE-NPs)并优化其处方,  
考察所制 CHE-NPs 的粒径、Zeta 电位等参数以及体外释  
药行为, 评价 CHE-NPs 对 B16 黑色素瘤细胞的体外抑制  
作用, 以期构建一种对黑色素瘤抑制活性更强的纳米载  
药制剂。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括 1260 型高效液相色谱  
(HPLC)仪(美国 Agilent 公司), SK8200H 型超声波清洗  
机(上海科导超声仪器有限公司), 3310-DMP 型激光粒  
度分析仪(美国 Beckman 公司), RCT basic 型磁力搅  
拌器(德国 Ika 公司), H2050R 型台式高速大容量冷  
冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司), N-1300  
型旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司), JEM-1400FL  
ASH 型透射电子显微镜(日本 JEOL 公司), AUW12D  
型电子天平(日本 Shimadzu 公司), T09-1S 型酶标  
仪、3111 型 CO<sub>2</sub> 培养箱、Sorvall ST 8R 型低温离心  
机[赛默飞世尔科技(中国)有限公司], CKX53 型倒  
置荧光显微镜(日本 Olympus 公司)等。

### 1.2 主要药品与试剂

CHE 对照品(批号 AF9030102, 纯度 ≥ 98%)购自  
成都埃法生物科技有限公司; CHE 原料药(批号  
34316-15-9, 纯度 > 98%)购自西安开来生物工程有  
限公司; mPEG-PLGA 聚合物[mPEG 分子量 2 000 Da,  
PLGA 分子量 15 000 Da, 乳酸(LA)/乙醇酸(GA)比例  
50:50]购自济南岱罡生物工程有限公司; 聚山梨酯  
80(批号 301C054)、MD34 透析袋(截留分子量 3 500  
Da)、RPMI 1640 培养基(批号 20210531)、磷酸盐缓  
冲液(PBS, pH

7.2, 批号 20201217)、MTT 试剂(批号 309E059)、二  
甲基亚砜(DMSO, 批号 1121E0325)均购自北京索  
莱宝科技有限公司; 泊洛沙姆 188(F68, 批号 T24J10Z80481)  
购自上海源叶生物科技有限公司; 胎牛血清(批号  
20200328)、青-链霉素双抗(批号 20200703)均购  
自赛澳美细胞技术(北京)有限公司; 含乙二胺四  
乙酸(EDTA)的 0.25% 胰蛋白酶(批号 2277237)购  
自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 其余试剂均  
为分析纯或实验室常用规格, 水为蒸馏水。

### 1.3 细胞

小鼠 B16 黑色素瘤细胞(货号 ZQ0186)购自上海  
中乔新舟生物科技有限公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 CHE-NPs 及空白 NPs 的制备

采用纳米沉淀法制备 CHE-NPs<sup>[15]</sup>。精密称取  
一定量的 mPEG-PLGA 聚合物和 CHE 原料药分散于  
丙酮 1 mL 中, 超声(功率 500 W, 频率 53 kHz, 下同)  
处理 5 min, 作为有机相。配制质量分数为 0.4% 的  
F68 溶液, 取 5 mL, 作为水相。在 1 000 r/min 条件  
下, 以 1 mL/min 的速度将有机相缓慢滴加到水相  
中, 室温搅拌 10 min, 得到淡蓝色乳光的混悬液,  
使用旋转蒸发器除去有机溶剂, 即得 CHE-NPs。按  
上述方法制备不含 CHE 的空白 NPs。CHE-NPs 的  
结构示意图见图 1。

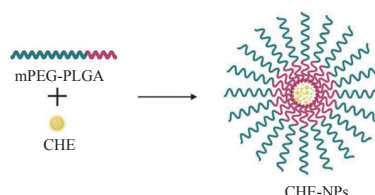


图 1 CHE-NPs 的结构示意图

Fig 1 Structure diagram of CHE-NPs

### 2.2 CHE 的含量测定

2.2.1 色谱条件 以 Ultimate XB-C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm,  
5 μm) 为色谱柱, 以乙腈(A)-0.1% 磷酸溶液(B)为流  
动相进行梯度洗脱(0 min, 20% A; 20 min, 60% A;  
25 min, 95% A; 35 min, 20% A); 流速为 0.8 mL/min;  
检测波长为 270 nm, 柱温为 35 °C; 进样量为 10 μL。

2.2.2 对照品溶液的配制 精密称定 CHE 对照品 5  
mg, 置于 25 mL 量瓶中, 加入甲醇超声 10 min, 使其  
溶解, 再加入甲醇稀释、定容, 摇匀, 制成质量浓度  
为 200 μg/mL 的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的配制 精密量取 CHE-NPs 0.1 mL,  
置于 2 mL 量瓶中, 加甲醇 1.9 mL, 超声 30 min 破  
乳, 在 35 °C 条件下以氮气流吹干, 残渣加甲醇 2 mL  
复溶, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 作为供  
试品溶液。

2.2.4 方法学考察 参考文献[16-17]方法进行方法  
学考察。结果显示, 溶剂(甲醇)、载体材料对 CHE-  
NPs 中 CHE 的检测无干扰(图 2); 以 CHE 质量浓度  
(x, μg/mL)

为横坐标、峰面积( $y$ )为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $y=14.868x-0.8133(R^2=0.9998)$ ,CHE检测质量浓度的线性范围为 $0.125\sim 200\ \mu\text{g/mL}$ ;精密度试验的RSD为 $0.22\%$  ( $n=6$ );平均回收率为 $100.99\%$  (RSD= $2.32\%$ ,  $n=6$ );稳定性(12 h)试验的RSD为 $1.46\%$  ( $n=6$ );重复性试验的RSD为 $1.21\%$  ( $n=6$ )。

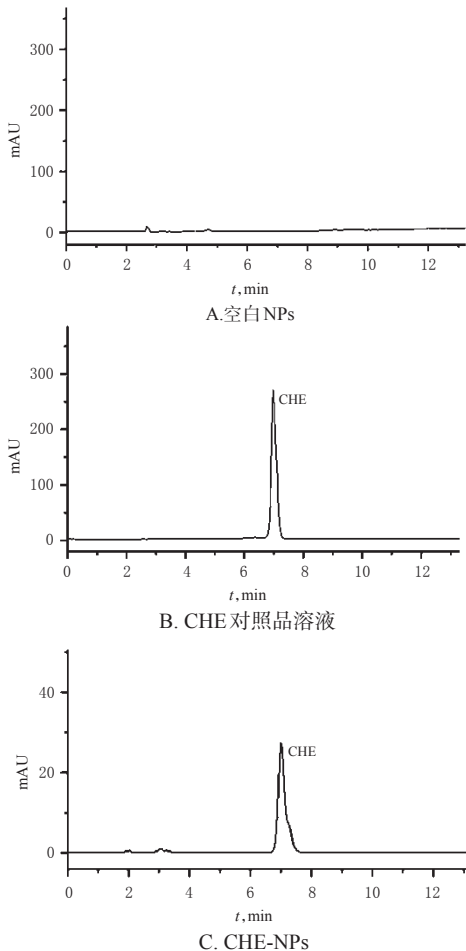


图2 CHE-NPs中CHE定量分析的HPLC图

Fig 2 HPLC chromatograms for quantitative analysis of CHE in CHE-NPs

### 2.3 包封率与载药量的测定

2.3.1 透析袋的预处理 取透析袋,剪成适宜长度,放入水中煮沸 $10\sim 20\ \text{min}$ ,冷却后取出,浸泡在水中,备用。

2.3.2 透析平衡时间的确定 精密吸取CHE-NPs  $2\ \text{mL}$ ,置于透析袋内,两头扎紧。将封口的透析袋置于锥形瓶中,以水 $50\ \text{mL}$ 为透析介质,转速为 $600\ \text{r/min}$ ,分别于透析 $0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5\ \text{h}$ 时精密吸取外液 $0.5\ \text{mL}$ ,同时补足等体积水<sup>[18]</sup>。用甲醇将外液稀释至 $1\ \text{mL}$ ,用 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,取续滤液按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,代入回归方程计算外液中CHE的质量浓度,同时绘制浓度-平衡时间曲线(图3)。由图3可知,随着透析时间的延长,CHE的质量浓度呈先升高后降低再升高再降低的趋势,说明CHE-NPs已逐渐破裂;当透析时间为 $1.5\ \text{h}$ 时,外液中CHE的质量

浓度达到最大值。因此,本研究选择 $1.5\ \text{h}$ 为透析平衡时间。

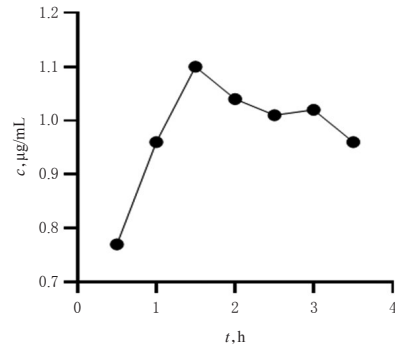


图3 CHE-NPs的浓度-平衡时间曲线

Fig 3 Concentration-equilibrium time curve of CHE-NPs

2.3.3 包封率与载药量的测定方法 精密吸取CHE-NPs  $2\ \text{mL}$ ,置于透析袋内,两头扎紧。将封口的透析袋置于锥形瓶中,以水 $50\ \text{mL}$ 为透析介质,转速为 $600\ \text{r/min}$ ,于透析 $1.5\ \text{h}$ 时精密吸取外液 $0.5\ \text{mL}$ ,用甲醇稀释至 $1\ \text{mL}$ ,再用 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,取续滤液按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,代入回归方程计算外液中CHE的质量浓度。按以下公式计算包封率和载药量:包封率( $\%$ )=(药物总量-外液中药物含量)/药物总量 $\times 100\%$ ,载药量( $\%$ )=(药物总量-外液中药物含量)/(药物总量+辅料总量) $\times 100\%$ 。

### 2.4 Box-Behnken 响应面设计优化CHE-NPs的处方

本课题组前期以有机溶剂种类、有机相与水相比比例、F68浓度、磁力搅拌器转速、载体材料质量浓度、投药量、载体材料种类为影响因素进行单因素实验,考察其对CHE-NPs包封率、载药量的影响。在单因素实验的基础上,本研究选择对包封率和载药量影响较大的因素——CHE投药量( $A$ )、mPEG-PLGA质量浓度( $B$ )、F68浓度( $C$ )为自变量,以包封率( $Y_1$ )和载药量( $Y_2$ )的总评归一(OD)值为因变量,采用Box-Behnken响应面设计,以Design Expert 12软件优化CHE-NPs处方。由于 $Y_1、Y_2$ 的取值越大越好,故选择对应 $d_{\text{max}}[d_{\text{max}}=(Y_1-Y_{\text{min}})/(Y_{\text{max}}-Y_{\text{min}})]$ 以计算OD值:OD=( $d_1\times d_2$ )<sup>[19-20]</sup>。CHE-NPs处方优化Box-Behnken响应面设计的因素与水平见表1,实验安排与结果见表2。

表1 CHE-NPs处方优化Box-Behnken响应面设计的因素与水平

Tab 1 Factors and levels of Box-Behnken response surface design for formulation optimization of CHE-NPs

水平	A(CHE投药量),mg	B(mPEG-PLGA质量浓度),mg/mL	C(F68浓度),%
-1	1.0	10	1.0
0	1.5	15	1.5
1	2.0	20	2.0

表2 CHE-NPs处方优化 Box-Behnken 响应面设计的实验安排与结果

Tab 2 Experimental design and results of Box-Behnken response surface design for formulation optimization of CHE-NPs

序号	A, mg	B, mg/mL	C, %	$Y_1, %$	$Y_2, %$	OD值
1	1.5	10	2.0	75.02	9.19	0.72
2	1.0	20	1.5	72.63	3.41	0
3	1.5	15	1.5	72.18	6.22	0.46
4	1.5	10	1.0	73.09	9.28	0.68
5	1.5	15	1.5	76.90	6.73	0.57
6	1.0	15	2.0	72.89	4.42	0.28
7	1.0	10	1.5	73.61	6.89	0.53
8	1.0	15	1.0	74.13	4.30	0.27
9	1.5	20	2.0	74.12	4.75	0.34
10	1.5	15	1.5	77.71	7.43	0.64
11	2.0	15	2.0	80.95	9.99	0.88
12	1.5	15	1.5	79.50	7.14	0.65
13	1.5	15	1.5	79.04	7.50	0.67
14	2.0	15	1.0	79.13	9.36	0.81
15	2.0	10	1.5	72.15	11.83	0.79
16	2.0	20	1.5	75.74	6.59	0.54
17	1.5	20	1.0	57.38	3.74	0

采用 Design Expert 12 软件对数据进行二次多项式回归拟合,得到二次多元回归方程为  $OD=0.597 0+0.242 0 \times A-0.230 5 \times B+0.057 0 \times C+0.071 5 \times AC+0.075 5 \times BC-0.001 3 \times A^2-0.128 8 \times B^2-0.034 2 \times C^2$  ( $R^2=0.942 3$ ), 方差分析结果见表3。由表3可知,模型的拟合程度较好( $P=0.001 5$ ),因素A、B、 $B^2$ 对OD值均具有显著影响( $P<0.05$ )。

表3 CHE-NPs处方优化 Box-Behnken 响应面设计的方差分析结果

Tab 3 Analysis of variance of Box-Behnken response surface design for formulation optimization of CHE-NPs

方差来源	偏差平方和	自由度	均方和	F值	P值
模型	1.04	9	0.115 7	12.70	0.001 5
A	0.468 5	1	0.468 5	51.41	0.000 2
B	0.425 0	1	0.425 0	46.64	0.000 2
C	0.026 0	1	0.026 0	2.85	0.135 1
AB	0.020 4	1	0.020 4	2.24	0.177 8
AC	0.001 2	1	0.001 2	0.134 4	0.724 7
BC	0.022 8	1	0.022 8	2.50	0.157 7
$A^2$	$6.579 0 \times 10^{-4}$	1	$6.579 0 \times 10^{-4}$	0.000 7	0.979 3
$B^2$	0.069 8	1	0.069 8	7.66	0.027 8
$C^2$	0.004 9	1	0.004 9	0.542 0	0.485 5
残差	0.063 8	7	0.009 1		
失拟项	0.034 3	3	0.011 4	1.55	0.332 7
纯误差	0.029 5	4	0.007 4		
总值	1.11	16			

为进一步评价A与B、B与C、A与C交互作用对OD值的影响,本研究采用 Design Expert 12 软件绘制各因素的响应面图和等高线图,详见图4。由图4可知,OD值随A、C的升高而升高。根据 Box-Behnken 响应面设计结果,求解二次多元方程得到CHE-NPs的最优处方如

下:CHE 2.0 mg、mPEG-PLGA 质量浓度 12.79 mg/mL、F68 浓度 1.8%,为方便称量,优化mPEG-PLGA 质量浓度为 13 mg/mL。

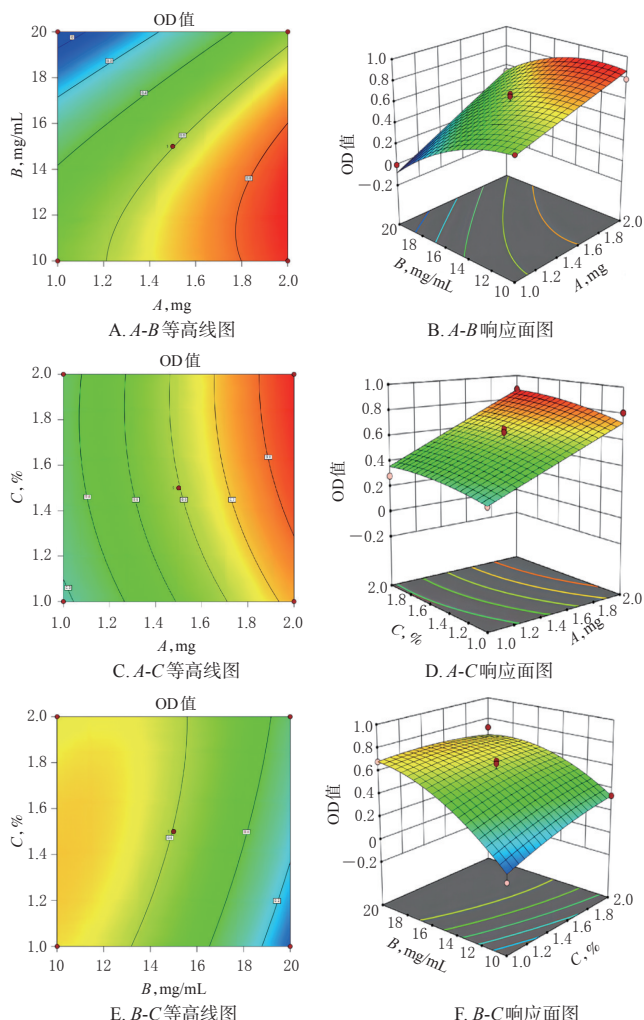


图4 CHE-NPs处方优化中各因素交互作用的响应面图和等高线图

Fig 4 Response surface maps and contour plots of the interaction of various factors in formulation optimization of CHE-NPs

按上述最优处方称取CHE、mPEG-PLGA 聚合物,分散于丙酮1 mL中,超声处理5 min,作为有机相。配制质量分数为1.8%的F68溶液5 mL,作为水相。在1 200 r/min条件下,以1 mL/min的速度将有机相缓慢滴加到水相中,室温搅拌10 min,得到淡蓝色乳光的混悬液,使用旋转蒸发仪除去有机溶剂,即得CHE-NPs。平行制备3份,按“2.3.3”项下方法测得平均包封率为(80.18 ± 1.11)%,平均载药量为(11.36 ± 0.28)%,平均OD值为0.96 ± 0.04[与OD预测值(0.90)的相对偏差为6.67%],说明 Box-Behnken 响应面设计所得的模型预测良好。

## 2.5 CHE-NPs的表征

2.5.1 粒径与Zeta电位 吸取按最优处方制备的CHE-NPs 0.2 mL,加水1.8 mL稀释,使其均匀分散,所得

混悬液呈淡蓝色乳光。取上述混悬液适量,采用激光粒度分析仪,在25℃下测定CHE-NPs的粒径和Zeta电位,重复测定3次。结果显示,CHE-NPs的粒径为(113.1±1.40)nm,Zeta电位为(-21.6±0.29)mV,多分散性指数为0.07±0.01(n=3)。CHE-NPs的粒径分布图见图5。

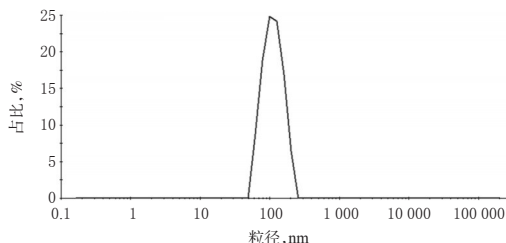


图5 CHE-NPs的粒径分布图

Fig 5 Distribution of particle size of CHE-NPs

2.5.2 形态观察 吸取按最优处方制备的CHE-NPs 1 mL,加水稀释10倍,用2%磷钨酸于室温下染色1~2 min,于透射电子显微镜下进行形态观察。结果显示,所得CHE-NPs呈球形,表面光滑、圆整,大小均匀,分散良好。结果见图6。

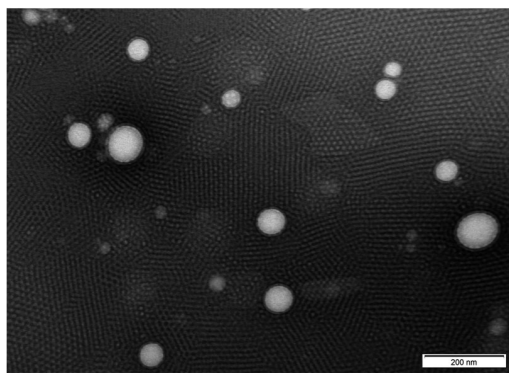


图6 CHE-NPs的透射电子显微镜图

Fig 6 Transmission electron micrograph of CHE-NPs

## 2.6 体外稳定性考察

将按最优处方制备的CHE-NPs置于4℃冰箱中冷藏,分别于冷藏0、7、14 d时取样,按“2.5”项下方法测定粒径、Zeta电位及多分散性指数。结果显示,CHE-NPs的粒径、Zeta电位及多分散性指数均无明显变化,其混悬液仍呈淡蓝色乳光,说明CHE-NPs的稳定性良好。结果见表4。

表4 CHE-NPs的体外稳定性试验结果(n=3)

Tab 4 Results of stability tests *in vitro* of CHE-NPs (n=3)

参数	0 d	7 d	14 d
平均粒径, nm	113.10±1.40	112.27±0.83	113.53±0.93
Zeta电位, mV	-21.60±0.29	-20.79±0.67	-15.47±0.41
多分散性指数	0.07±0.01	0.10±0.03	0.09±0.00

## 2.7 体外释药实验

采用动态透析法进行考察。精密量取CHE对照品溶液、按最优处方制备的CHE-NPs各5 mL,分别置于预处理后的透析袋中,两头扎紧,置于生理盐水(含0.3%

聚山梨酯80,下同)20 mL中,于(37.0±0.5)℃条件下以100 r/min恒温振荡,分别于孵育1、2、4、6、8、12、24、48 h时取样1 mL,同时补足等温等体积的生理盐水。样品于60℃水浴中挥干,残渣加甲醇1 mL复溶,用0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,代入回归方程计算样品中CHE的质量浓度。实验平行操作3次,按以下公式计算累积释放率:累积释放率=( $V_0c_n + V \sum_{n=1}^{t-1} c_i$ )/ $M_{药}$ (式中, $V_0$ 表示释放介质总体积, $t$ 表示 $n-1$ , $c_n$ 表示第 $n$ 个时间点所测得的CHE质量浓度, $V$ 表示每次取样的体积, $c_i$ 表示 $n-1$ 个时间点所测得的CHE质量浓度, $M_{药}$ 表示投入药物总质量)。采用Origin 2021软件,以累积释放率( $Q$ )和释放时间( $t$ )对CHE-NPs的体外释药行为进行零级动力学模型、一级动力学模型、Higuchi动力学模型、Weibull动力学模型方程拟合。结果显示,CHE对照品溶液在孵育8 h时的累积释放率已达90.87%,提示已基本释放完全,而CHE-NPs在孵育8 h时的累积释放率为68.68%,48 h时的累积释放率为88.72%,具有缓释特征,其体外释药行为符合Weibull动力学模型。CHE对照品和CHE-NPs的体外释药曲线见图7,CHE-NPs的体外释药动力学方程拟合结果见表5。

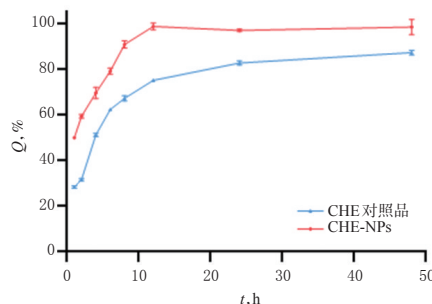


图7 CHE对照品和CHE-NPs的体外释放曲线(n=3)

Fig 7 Release curves *in vitro* of CHE control and CHE-NPs(n=3)

表5 CHE-NPs的体外释药动力学方程拟合结果

Tab 5 Equation fitting results of drug release *in vitro* of CHE-NPs

模型	拟合方程	$R^2$
零级动力学	$Q=47.69+1.09t$	0.528 9
一级动力学	$Q=84.01(1-e^{-0.25t})$	0.951 1
Higuchi动力学	$Q=10.16t^{1/2}+30.25$	0.757 6
Weibull动力学	$\ln[\ln(1/Q)]=0.89\ln t-1.98$	0.986 7

## 2.8 体外抑瘤作用评价

2.8.1 空白NPs的细胞毒性 采用MTT法进行检测。取处于对数生长期的B16黑色素瘤细胞,以5 000个/孔接种于96孔板中,于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中孵育24 h至细胞贴壁。实验共设置9个组别,分别为空白组(无细胞、无药物)、对照组(有细胞、无药物)和不同质量浓度(10、25、50、100、250、500、1 000 μg/mL<sup>[21]</sup>,以mPEG-PLGA

计)空白 NPs, 药物溶液用空白培养基配制。每组设 6 个复孔。药物干预 24 h 后, 每孔加入 MTT 试剂 10  $\mu\text{L}$  (1 $\times$  PBS 配制, 5 mg/mL), 于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中避光孵育 4 h。弃去孔中液体, 每孔加入 DMSO 150  $\mu\text{L}$ , 使用酶标仪在 490 nm 波长处测定各孔的吸光度 ( $A$ ), 并按以下公式计算细胞存活率: 细胞存活率 (%) = ( $A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}$ ) / ( $A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}$ )  $\times 100\%$ 。结果显示, 空白 NPs 对 B16 黑色素瘤细胞的存活率无明显影响, 说明其具有良好的生物相容性。结果见图 8。

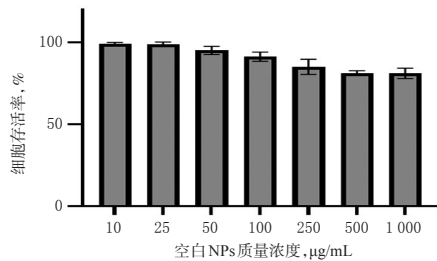


图 8 空白 NPs 对 B16 黑色素瘤细胞存活率的影响 ( $n=6$ )

Fig 8 Effects of blank NPs on survival rate of B16 melanoma cells ( $n=6$ )

2.8.2 CHE-NPs 的细胞毒性 按“2.8.1”项下方法检测不同质量浓度 CHE 原料药 (1、20、40、60、80、100、120  $\mu\text{g/mL}$ , 浓度根据预实验结果设置) 和不同质量浓度 CHE-NPs (1、20、40、60、80、100、120  $\mu\text{g/mL}$ , 以 CHE 计, 浓度根据预实验结果设置) 干预 24、48、72 h 对 B16 黑色素瘤细胞存活率的影响, 并计算半数抑制浓度。采用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计分析, 计量资料均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析。结果显示, 当质量浓度超过 20  $\mu\text{g/mL}$  后, CHE-NPs 的细胞毒性均显著大于 CHE 原料药 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 且有浓度和时间依赖趋势, CHE-NPs 和 CHE 原料药的 24 h 半数抑制浓度分别为 69.35、107.36  $\mu\text{g/mL}$ 。结果见表 6。

表 6 CHE 原料药和 CHE-NPs 干预不同时间对 B16 黑色素瘤细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6, \%$ )

Tab 6 Effects of CHE, CHE-NPs and different intervention time on survival rate of B16 melanoma cells ( $\bar{x} \pm s, n=6, \%$ )

质量浓度, $\mu\text{g/mL}$	干预 24 h		干预 48 h		干预 72 h	
	CHE 原料药	CHE-NPs	CHE 原料药	CHE-NPs	CHE 原料药	CHE-NPs
1	104.62 $\pm$ 3.81	96.93 $\pm$ 3.42**	96.31 $\pm$ 5.39	81.85 $\pm$ 1.87**	76.78 $\pm$ 4.91	78.13 $\pm$ 5.71
20	97.70 $\pm$ 2.42	94.95 $\pm$ 3.53	88.92 $\pm$ 1.95	76.29 $\pm$ 4.06**	58.64 $\pm$ 4.09	50.78 $\pm$ 4.90**
40	88.29 $\pm$ 4.40	78.17 $\pm$ 4.46**	65.86 $\pm$ 1.33	62.31 $\pm$ 2.95*	35.11 $\pm$ 3.56	29.88 $\pm$ 2.71*
60	79.72 $\pm$ 4.39	45.78 $\pm$ 4.34**	55.25 $\pm$ 2.96	43.49 $\pm$ 2.44**	29.06 $\pm$ 2.18	13.96 $\pm$ 1.53**
80	56.26 $\pm$ 2.57	33.01 $\pm$ 3.11**	42.80 $\pm$ 2.05	29.40 $\pm$ 2.32**	26.61 $\pm$ 2.20	11.28 $\pm$ 3.52**
100	52.69 $\pm$ 2.75	24.47 $\pm$ 1.84**	34.76 $\pm$ 2.52	18.36 $\pm$ 2.54**	31.59 $\pm$ 1.37	9.19 $\pm$ 1.25**
120	50.49 $\pm$ 2.02	17.71 $\pm$ 2.38**	31.93 $\pm$ 3.14	13.47 $\pm$ 3.33**	22.32 $\pm$ 1.39	9.14 $\pm$ 1.60**

注: 与同浓度同干预时间的 CHE 原料药比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

Note: vs. CHE with the same concentration and intervention time, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

### 3 讨论

mPEG-PLGA 聚合物易溶于有机溶剂, 难溶于水, 在水相比比例高的流动相条件下易对 HPLC 仪及色谱柱造成不良影响 (4 min 时有最大吸收)。本课题组前期研究发现, 使用氮气流吹干样品进行前处理, 可减少 mPEG-PLGA 聚合物对色谱系统的干扰。

本课题组在前期预实验及单因素实验考察中对 mPEG-PLGA 聚合物进行了筛选, 分别考察了亲水段和疏水段比例对 CHE-NPs 包封率、载药量的影响。因 CHE 是由疏水段 PLGA 包裹, 所以较大的疏水段分子量对 CHE-NPs 包封率和载药量的影响更大。当 mPEG 分子量为 2 000 Da, PLGA 分子量为 15 000 Da 时, CHE-NPs 的包封率与载药量均较高。

为准确地测定 CHE-NPs 的包封率, 本课题组前期考察了低速离心法、低温超速离心法、鱼精蛋白沉淀法和透析袋法对 CHE-NPs 包封率测定的影响。结果发现, 无论是低速还是超速离心都无法将 NPs 与游离的 CHE 完全分离。使用鱼精蛋白沉淀吸附之后再离心, 可能会使 NPs 和游离 CHE 的分离度更高, 因为鱼精蛋白是一种碱性氨基酸, 拥有大量带正电的胍基, 可与 Zeta 电位为负的 NPs 相结合, 在此基础上进行超速离心, 可使包载的 NPs 凝聚沉淀<sup>[22-25]</sup>。但结果发现, 鱼精蛋白沉淀法所测得的包封率重复性及稳定性并不佳, 相对偏差为 25.44%。而透析袋法所测得的包封率稳定性高、重复性好, 故本研究最终选择透析袋法测定 CHE-NPs 的包封率。

Box-Behnken 响应面设计是一种多因素非线性实验优化方法, 可以连续对实验的各个因素及水平进行分析, 既弥补了正交试验和均匀设计的不足, 又具有实验次数少、精准度高的优点, 在制剂优化应用领域显现出独特的优势<sup>[26-27]</sup>。本研究选择 Box-Behnken 响应面设计对 CHE-NPs 的处方进行优化, 结果显示, 该法所拟合的模型回归方程预测性良好; 模型拟合的  $R^2$  为 0.942 3, 表明 94.23% 实验数据的变异可用此回归模型来解释。体外释药实验结果显示, CHE-NPs 体外释药行为符合 Weibull 动力学模型, 且具有缓释特征。

细胞毒性实验结果表明, CHE-NPs 对 B16 黑色素瘤细胞有明显的体外抑制作用, 在相同用量下, 其抑制作用强于 CHE 原料药, 且有一定的时间和浓度依赖趋势。这可能与纳米递药系统本身的优势相关, 如较小的粒径、在肿瘤部位的高度滞留及更易被细胞内吞摄取等<sup>[28-29]</sup>。

综上所述, 本研究采用纳米沉淀法成功制备了一种以 mPEG-PLGA 聚合物为载体的 CHE-NPs, 其具有缓释作用和较强的载药能力, 同时增强了 CHE 对黑色素瘤的体外抑制作用。在后续实验中, 本课题组将继续探索 CHE-NPs 在体内的抑瘤作用, 考察其是否能有效抑制实

体瘤的生长及其抑瘤作用机制,为进一步的临床应用提供理论依据。

## 参考文献

- [1] 刘翀,蒋晓梅.白屈菜红碱对人结肠癌细胞凋亡的影响及其机制研究[J].中国现代应用药学,2019,36(24):3034-3039.
- [2] 韩聪,朱国福.白屈菜红碱诱导人肝癌细胞 HepG2 凋亡及机制探讨[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(11):127-130.
- [3] 李晓明,欧阳婷庭,董妙先,等.白屈菜红碱对肝纤维化小鼠 TGF- $\beta$ /Smads 信号通路的影响[J].中国病理生理杂志,2018,34(7):1323-1328.
- [4] 张步鑫,赵献敏,成琼,等.白屈菜红碱对黑色素瘤 B16 细胞增殖抑制和凋亡诱导作用的实验研究[J].时珍国医国药,2018,29(4):793-795.
- [5] 王云,李平平,高振坤,等.白屈菜红碱固体分散体的制备及其理化性质和抗氧化活性研究[J].中国药房,2020,31(9):1054-1061.
- [6] 李昕,朱丹丹,陈裕,等.纳米药物递送系统在促进肿瘤深层渗透方面的研究进展[J].中南药学,2020,18(12):2009-2018.
- [7] 郭惠婕,姜文姣,缪明星,等.抗肿瘤纳米药物的靶向递送及药代动力学模型研究进展[J].中南药学,2020,18(1):74-79.
- [8] XING L X, SHI Q S, ZHENG K L, et al. Ultrasound-mediated microbubble destruction (UMMD) facilitates the delivery of CA19-9 targeted and paclitaxel loaded mPEG-PLGA-PLL nanoparticles in pancreatic cancer[J]. Theranostics, 2016, 6(10):1573-1587.
- [9] CHEN T K, LI C W, LI Y, et al. Small-sized mPEG-PLGA nanoparticles of schisantherin A with sustained release for enhanced brain uptake and anti-Parkinsonian activity[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2017, 9(11):9516-9527.
- [10] HASANPOUR A, ESMAEILI F, HOSSEINI H, et al. Use of mPEG-PLGA nanoparticles to improve bioactivity and hemocompatibility of streptokinase: in-vitro and in-vivo studies[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2021, 118:111427.
- [11] XU R L, WANG J Y, XU J J, et al. Rhynchophylline loaded-mPEG-PLGA nanoparticles coated with tween-80 for preliminary study in Alzheimer's disease[J]. Int J Nanomedicine, 2020, 15:1149-1160.
- [12] BIRHAN Y S, HAILEMESKEL B Z, MEKONNEN T W, et al. Fabrication of redox-responsive Bi(mPEG-PLGA)-Se<sub>2</sub> micelles for doxorubicin delivery[J]. Int J Pharm, 2019, 567:118486.
- [13] GUO D D, LI Q, SUN Y Y, et al. Evaluation of controlled-release triamcinolone acetate-loaded mPEG-PLGA nanoparticles in treating experimental autoimmune uveitis [J]. Nanotechnology, 2019, 30(16):165702.
- [14] GAN M Y, ZHANG W P, WEI S J, et al. The influence of mPEG-PCL and mPEG-PLGA on encapsulation efficiency and drug-loading of SN-38 NPs[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2017, 45(2):389-397.
- [15] 管庆霞,于欣,吕邵娃,等.包载丁香苦苷和羟基酪醇的 mPEG-PLGA 纳米粒处方与制备工艺的优化[J].中成药, 2017, 39(12):2508-2512.
- [16] 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.
- [17] 李楠,李旭,程鹏,等.纳米多孔花形乳糖装载姜黄素干粉吸入剂的制备及体外释药性能研究[J].中国药房,2021, 32(7):794-801.
- [18] 余昕,陈斯玮,欧丽兰,等.芍药总苷的理化性质及其脂质体包封率的测定方法[J].中成药,2016,38(6):1260-1264.
- [19] 谢青璇,李小芳,谢龙,等. Box-Behnken 效应面法优化大黄素/小檗碱-壳聚糖双载药纳米粒的处方工艺研究[J]. 中草药,2021,52(6):1614-1622.
- [20] 徐玲霞,刘水婷,刘骏,等. Box-Behnken 效应面法优化吴茱萸次碱脂质体纳米粒的处方研究[J].中草药,2018, 49(21):5076-5081.
- [21] 洪伟勇,王金明,王海英,等.载姜黄素两亲性星状聚酯纳米粒的制备、表征及体外抗肿瘤研究[J].中草药,2021, 52(8):2237-2246.
- [22] 谢锐锋,杨琪璿,刘小敏,等.脑靶向阿霉素脂质体的制备及评价[J].今日药学,2018,28(7):438-441.
- [23] 陈丽萍,吴智敏,杨畅,等.广藜香酮传递体包封率测定方法的筛选研究[J].中南药学,2019,17(11):1864-1868.
- [24] 刘卫斌,薛彦宁,秦永刚.鱼精蛋白凝聚法测定和厚朴酚脂质体的包封率[J].中国药房,2010,21(39):3695-3697.
- [25] 孙维彤,黄桂华,叶杰胜,等.鱼精蛋白凝聚法测定脂质体和纳米脂质体包封率[J].中国药理学杂志,2006,41(22):1716-1720.
- [26] 陈婷婷,李顺英,秦婷婷,等. Box-Behnken 响应面法优化海藻酸钠 mPEG-b-PLGA 纳米粒处方工艺[J].中国药理学杂志,2019,54(19):1590-1598.
- [27] GIULIANA V, MINNA D, BYRNE H J, et al. Application of Box-Behnken experimental design for the formulation and optimisation of selenomethionine-loaded chitosan nanoparticles coated with zein for oral delivery[J]. Int J Pharm, 2018, 551(1/2):257-269.
- [28] 李晓婷,决利利,郝海军,等.隐丹参酮纳米混悬剂的制备及其抗肿瘤活性[J].中成药,2021,43(1):6-10.
- [29] 陈奋,杨月,张玲,等.姜黄素纳米制剂在肿瘤治疗中的研究进展[J].中国现代应用药学,2019,36(21):2731-2737.

(收稿日期:2021-09-08 修回日期:2021-11-18)

(编辑:邹丽娟)