

## 吴茱萸碱固体脂质纳米粒的制备和抗肿瘤活性

牛小童<sup>1,2</sup>, 张力中<sup>1</sup>, 冯 易<sup>1</sup>, 谈峻林<sup>1</sup>, 任 燕<sup>1</sup>, 陈润怜<sup>1</sup>, 唐 霞<sup>1</sup>, 吴 敏<sup>1\*</sup>

(1. 成都医学院药学院, 四川 成都 610083; 2. 四川大学华西医院临床药理研究室, 四川 成都 610041)

**摘要:** 目的 制备吴茱萸碱固体脂质纳米粒, 并评价其抗肿瘤活性。方法 吴茱萸碱溶于混合溶剂(丙酮-无水乙醇)中, 加入 Precirol ATO 5 并水浴加热, 作为有机相, 将其缓慢倒入泊洛沙姆 188 溶液(水相)中, 冷冻干燥后制得纳米粒。分子模拟考察其处方组成。以 Precirol ATO 5 用量、药脂比、泊洛沙姆 188 用量为影响因素, 在单因素试验基础上通过 Box-Behnken 设计优化制备工艺, 再进行表征与体外抗肿瘤(人宫颈癌 HeLa 细胞)活性实验。结果 最佳条件为 30 mg Precirol ATO 5, 药脂比 1:3, 93 mg 泊洛沙姆 188, 所得纳米粒圆整, 分布均匀, 平均粒径 268.9 nm, 平均载药量 1.65%, 对 HeLa 细胞有较好的抑制作用, 并呈剂量依赖关系。结论 固体脂质纳米粒可有效改善吴茱萸碱的分散性与透膜吸收。

**关键词:** 吴茱萸碱; 固体脂质纳米粒; 制备工艺; 抗肿瘤活性; HeLa 细胞; 分子模拟; Box-Behnken 设计

中图分类号: R944

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)10-2149-08

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.10.011

## Preparation and antitumor activity of evodiamine-loaded solid lipid nanoparticles

NIU Xiao-tong<sup>1,2</sup>, ZHANG Li-zhong<sup>1</sup>, FENG Yi<sup>1</sup>, TAN Jun-lin<sup>1</sup>, REN Yan<sup>1</sup>, CHEN Run-lian<sup>1</sup>,  
TANG Xia<sup>1</sup>, WU Min<sup>1\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China; 2. Department of Clinical Pharmacology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To prepare evodiamine-loaded solid lipid nanoparticles and to evaluate their antitumor activity. **METHODS** Evodiamine was dissolved in the mixed solution of acetone and anhydrous alcohol and added into Precirol ATO 5 exposed to bath heating. As an organic phase, it was then slowly poured into Poloxamer 188 solution (water phase), and the nanoparticles were prepared after freeze-drying. The formulation composition was investigated by molecular simulation. With the volume consumption of Precirol ATO 5 and Poloxamer 188, and ratio of drug to lipid as influencing factors, the preparation was optimized by Box-Behnken design on the basis of single factor test, then the characterization and *in vitro* antitumor (human cervical carcinoma HeLa cells) test were carried out. **RESULTS** The optimal conditions were determined to be 30 mg Precirol ATO 5, 1:3 for ratio of drug to lipid, and 93 mg Poloxamer 188. The obtained round nanoparticles, with uniform distribution, an average particle size of 268.9 nm and an average drug-loading rate of 1.65%, exhibited a good inhibitory effect against HeLa cells in a dose-effect relationship. **CONCLUSION** The solid lipid nanoparticles can effectively improve evodiamine's dispersion and the permeable membrane absorption for it.

**KEY WORDS:** evodiamine; solid lipid nanoparticles; preparation; antitumor activity; HeLa cells; molecular simulation; Box-Behnken design

吴茱萸碱是从中药吴茱萸中提取出来的一种色胺吲哚类生物碱<sup>[1]</sup>, 能抑制多种肿瘤细胞生长,

诱导肿瘤细胞凋亡, 还能抑制肿瘤血管生成及浸润转移<sup>[2-6]</sup>, 是一种优质的新型抗肿瘤药物, 但其水

收稿日期: 2016-05-26

基金项目: 2013 年国家级大学生创新训练项目 (201313705004)

作者简介: 牛小童 (1993—), 女, 从事体内药物分析研究。Tel: 18382432071, E-mail: 947628123@qq.com

\* 通信作者: 吴 敏, 博士, 副教授, 从事中药新型给药系统研究。Tel: (028) 62308653, E-mail: wuminzhaofeng@126.com

溶性差,在正常小鼠体内的口服生物利用度仅为0.1%<sup>[7]</sup>。Jiang<sup>[4]</sup>曾指出,吴茱萸碱还缺少大量的临床研究工作,目前相关制剂的报道较少,仅有Xu<sup>[8]</sup>等以PVP K30为载体,采用溶剂挥发法制得其固体分散体;Liu<sup>[9]</sup>等以蛋黄卵磷脂为载体,同法制得其磷脂复合物;还有将黄连和吴茱萸中有效成分制成渗透泵控释制剂<sup>[10]</sup>及微乳<sup>[11]</sup>的报道。已有研究均在一定程度上提高了吴茱萸碱的口服生物利用度,但仍存在一些问题,如吴茱萸碱磷脂复合物提高了其水溶性,不能提高其体外抗肿瘤活性,反而有所降低<sup>[9]</sup>,因此对其相关制剂进行研究仍有意义。

固体脂质纳米粒是近年来发展较快的一种新型纳米粒给药系统,是指粒径在10~1 000 nm之间的固态胶体颗粒,以低毒、生物相容性好、可生物降解的固态天然或合成类脂为载体(卵磷脂、单硬脂酸甘油酯等),将药物吸附或包裹于脂质膜中制成的一种新型纳米粒给药系统,既具备聚合物纳米粒的高物理稳定性、药物泄漏慢等优势,还兼具脂质体和乳剂的低毒性、可大规模生产的优点,另外还有独特优势,如良好的生理相容性、广泛的药物适应性、提高敏感药物的稳定性、缓控释放和靶向性<sup>[12]</sup>。本实验通过探讨吴茱萸碱固体脂质纳米粒的制备工艺,以及研究优化该制剂处方的可行性,可为后续相关研究提供一定基础。

## 1 材料

1.1 仪器与材料 BP211D电子天平(赛多利斯天平北京有限公司);DF-101S集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司);TGL-16G离心机(上海安亭科学仪器厂);KH2200DB数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司);UPT纯水仪(优普超纯科技公司);Christ冷冻干燥机(德国Marin Christ公司);UV1902PC紫外分光光度计(上海奥析科学仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂 Precirol ATO 5(法国Gattefosse公司,144367);泊洛沙姆188(德国BASF公司,WPWI603B);海藻酸钠(国药集团化学试剂有限公司,20121226);吴茱萸碱(成都普菲德生物技术有限公司,140927);胎牛血清(美国Gibco公司);胰蛋白酶(美国Hyclone公司);DMEM培养基(美国Hyclone公司);磷酸缓冲盐干粉(成都三鹰公司);CCK-8试剂盒(北京同仁化学研究所);DMSO(美国Sigma公司);其他试剂均为分

析纯。

1.3 细胞 人宫颈癌HeLa细胞(西南交通大学周绍兵教授惠赠)。

1.4 软件 Hyperchem 8.0 Professional 软件。

## 2 方法与结果

2.1 吴茱萸碱固体脂质纳米粒的制备 将处方量泊洛沙姆188溶于50 mL水中,构成水相,水浴加热至75℃。精密称取处方量吴茱萸碱,溶于15 mL混合有机溶剂(5 mL丙酮+10 mL无水乙醇)中,加入Precirol ATO 5并水浴加热至与水相同温度,作为有机相。在1 400 r/min转速下将有机相缓慢倒入水相中,恒温搅拌2 h,使大部分有机溶剂挥发,得到初乳,经冷冻干燥后进一步除去剩余有机溶剂,4℃冰箱中保存;或将50 mL 0.2 g/L海藻酸钠溶液快速倾入初乳中,在冰浴条件下以相同转速搅拌固化1 h,即得。

2.2 吴茱萸碱含有量的测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取吴茱萸碱对照品10 mg,置于50 mL量瓶中,加甲醇超声溶解,定容,即得200 μg/mL对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密量取透析处理后纳米粒混悬液0.5 mL,置于5 mL量瓶中,加甲醇适量,超声10 min,冷却至常温,甲醇定容,16 000 r/min离心10 min,取上清液,即得纳米粒供试品溶液。同法制得空白溶液。

2.2.3 最大吸收波长的测定 取对照品、供试品与空白溶液,在190~400 nm波长范围内进行扫描。结果表明,其在225 nm波长处有最大吸收,空白溶液无干扰,故选择225 nm作为定量检测的最大吸收波长。

2.2.4 标准曲线的绘制 精密吸取对照品溶液25、50、75、100、125、150、175 μL,置于5 mL量瓶中,甲醇稀释至刻度,摇匀,在225 nm波长处测定吸光度A,以吸光度A对相应质量浓度C进行线性回归,得标准曲线方程 $A = 0.1784C - 0.0586$  ( $R^2 = 0.9995$ ),表明吴茱萸碱在1~7 μg/mL范围内线性关系良好。

2.2.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液100 μL,置于5 mL量瓶中,甲醇定容至4 μg/mL,于225 nm波长处测定,测得吸光度RSD ( $n = 5$ )为0.73%,表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性试验 平行量取同一批样品,共6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液进行测定,测得吴茱萸碱平均含有量为18.29 μg/mL,

RSD ( $n = 6$ ) 为 0.49% , 表明该方法重复性良好。

2.2.7 加样回收率试验 精密吸取对照品溶液 50、125、200  $\mu\text{L}$  , 置于 5 mL 量瓶中, 加入空白溶液 0.2 mL , 置于 5 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声 10 min , 冷却至常温, 甲醇定容至 2、5、8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  , 16 000 r/min 离心 10 min , 取上清液。以甲醇为空白, 在 225 nm 波长处测定吸光度, 平行 3 次, 测得平均回收率 ( $n=3$ ) 为 111.7 %。

2.3 纳米粒载药量的测定 按“2.1”项下方法制备纳米粒, 精密量取 1.0 mL , 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 于 225 nm 波长处测定吴茱萸碱的吸光度, 换算得到吴茱萸碱总量。冷冻干燥法测定纳米粒的载药量, 方法为精密量取纳米粒混悬液 1.0 mL , 经冷冻干燥后测定冻干粉质量, 计算药物载药量, 公式为载药量 =  $M_{\text{药}}/M_{\text{总}} \times 100\%$  ( $M_{\text{药}}$  为包封于纳米粒中的药物量,  $M_{\text{总}}$  为纳米粒的总质量)。

#### 2.4 纳米粒包封率的测定

2.4.1 透析袋的处理 把透析袋剪成约 10 cm 的小段, 在 500 mL 2% 碳酸氢钠和 1 mmol/L EDTA-2Na (pH=8.0) 溶液中煮沸 10 min , 蒸馏水彻底清洗, 再置于 500 mL 1 mmol/L EDTA-2Na (pH = 8.0) 中煮沸 10 min , 冷却, 洗净, 置于超纯水中, 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存, 确保透析袋始终浸没在溶液内, 取用透析袋时必须戴手套。

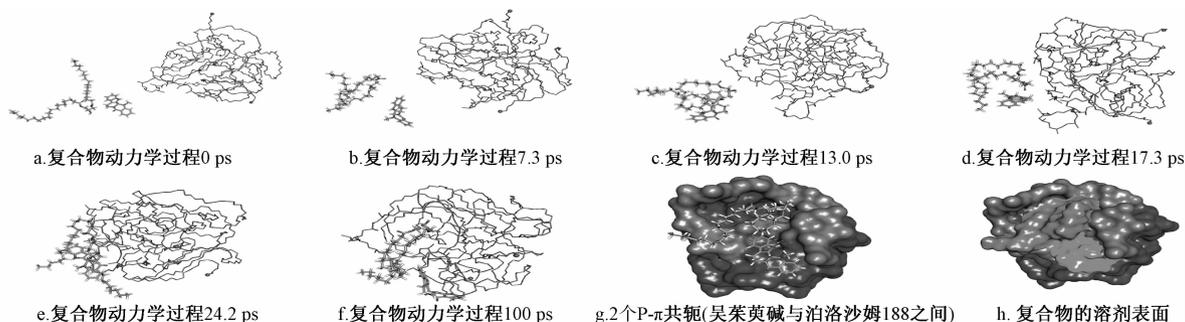
2.4.2 透析时间的确定 以 2% Poloxamer-188 水溶液为透析介质, 取 40 mL , 置于 100 mL 烧杯中, 将装有 2 mL 纳米粒水分散体的透析袋两端扎紧, 置于透析介质中, 于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温磁力搅拌器中搅拌,

于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 精密吸取透析袋外液 0.5 mL , 置于 5 mL 量瓶中, 甲醇定容, 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤, 在“2.2”项下条件检测, 测得游离吴茱萸碱含量。结果, 在 8 h 后透析达到平衡, 故确定以 8 h 为透析时间。

2.4.3 透析法分离游离吴茱萸碱 选择 8 000 ~ 14 000 Da 的透析袋, 透析液为 2% Poloxamer-188 水溶液 40 mL , 样品体积 2 mL , 透析温度 37  $^{\circ}\text{C}$  , 透析时间 8 h。在规定时间内测定透析外液中吴茱萸碱质量浓度, 计算药物包封率, 公式为包封率 =  $(M_{\text{药}} - M_{\text{游}}) / M_{\text{药}} \times 100\%$  ( $M_{\text{药}}$  为包封于纳米粒中的药物量,  $M_{\text{游}}$  为未包封的游离药物量)。

2.5 分子模拟<sup>[13]</sup> 为了研究不同脂质材料和乳化剂与吴茱萸碱的相互作用, 首先通过 Hyperchem 软件构建一系列脂质材料、乳化剂和吴茱萸碱的能量最低态 3D 结构, 按照纳米粒制备步骤, 在 Hyperchem 工作界面中先将吴茱萸碱通过融入法随机对接到脂质材料中, 随后对脂质与吴茱萸碱所形成的复合物进行分子动力学模拟, 温度设置为 75  $^{\circ}\text{C}$  , 与“2.1”项保持一致。溶剂化效应通过 CHRAMM 力场的介电常数参数进行设置。脂质和吴茱萸碱的复合物动力学模拟完成后, 将复合物与乳化剂进行对接, 方法与吴茱萸碱和脂质对接动力学模拟一致。

脂质-吴茱萸碱-乳化剂复合物的相互作用能在分子力学水平通过 CHRAMM 力场计算得到, 复合物初始状态到最终状态的构象变化如图 1 所示, 复合物初始状态和最终状态的相互作用能见表 1, 可知当脂质为 Precirol ATO 5, 乳化剂为泊洛沙姆 188 时, 形成的复合物最稳定。



注: 泊洛沙姆 188 两端的氧原子用两个球形标注, 绿色代表吴茱萸碱, 橙色代表 Precirol ATO 5, 蓝色代表泊洛沙姆 188 的氧乙烯部分, 紫色代表泊洛沙姆 188 的氧丙烯部分

图 1 构象变化图

Fig. 1 Images of conformational change

表1 复合物能量变化 (kJ/mol)

Tab. 1 Energy changes of complexes (kJ/mol)

复合物	初始状态能量	最终状态能量	亲和能
Precirol ATO 5 + 吴茱萸碱 + 泊洛沙姆 188	1 928. 519	1 848. 323	-80. 196
Precirol ATO 5 + 吴茱萸碱 + 卵磷脂	352. 622	420. 385	67. 764
Precirol ATO 5 + 吴茱萸碱 + 吐温 80	626. 281	592. 187	-34. 093
单硬脂酸甘油酯 + 吴茱萸碱 + 泊洛沙姆 188	1 872. 127	1 847. 101	-25. 026
单硬脂酸甘油酯 + 吴茱萸碱 + 卵磷脂	373. 985	339. 168	-34. 817
单硬脂酸甘油酯 + 吴茱萸碱 + 吐温 80	569. 502	-	-
硬脂酸 + 吴茱萸碱 + 泊洛沙姆 188	1 840. 616	1 821. 022	-19. 595
硬脂酸 + 吴茱萸碱 + 卵磷脂	342. 329	303. 953	-38. 376
硬脂酸 + 吴茱萸碱 + 吐温 80	537. 616	-	-
山嵛酸甘油酯 + 吴茱萸碱 + 泊洛沙姆 188	-	-	-
山嵛酸甘油酯 + 吴茱萸碱 + 卵磷脂	-	-	-
山嵛酸甘油酯 + 吴茱萸碱 + 吐温 80	-	-	-

注：亲和能 = 最终状态能量 - 初始状态能量。- 表示未检测出

## 2.6 单因素试验

2.6.1 Precirol ATO 5 用量 取 Precirol ATO 5 20、30、50、80、100、150 mg，泊洛沙姆 188 100 mg，吴茱萸碱 10 mg，水相 50 mL，按“2.1”项下方法制备纳米粒，对其载药量进行考察，结果见图 2。由图可知，纳米粒载药量随 Precirol ATO 5 用量增加呈先升高后降低的趋势；当 Precirol ATO 5 用量为 30 mg（药脂比 1 : 3）时，载药量最大；当脂质用量较少时，药物未能完全包封，将导致载药量过低；当吴茱萸碱用量一定时，其包封已比较完全，若进一步增加脂质用量而未增加吴茱萸碱投料量，载药量反而会降低。

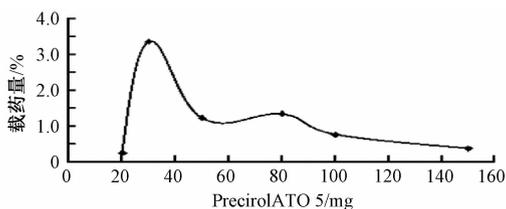


图2 Precirol ATO 5 用量对载药量的影响

Fig. 2 Effect of Precirol ATO 5 consumption on drug loading

2.6.2 药脂比 按药脂比 0.05、0.08、0.1、0.15、0.2 取吴茱萸碱和 Precirol ATO 5 适量，再取 100 mg 泊洛沙姆 188 溶于 50 mL 水中，按“2.1”项下方法制备纳米粒，对其载药量进行考察，结果见图 3。由图可知，随着药脂比增加，载药量呈波动变化，当药脂比为 1 : 10 时载药量最大；当投药量过大时，可能由于过饱和而导致 Precirol ATO 5 不能将过多的药物包封，反而造成药物析出，引起载药量降低；但当药脂比为 1 : 5 时，载药量又呈上升趋势。在考察 Precirol ATO5 用量

过程中，发现药脂比为 1 : 3 时载药量最大，故综合两者单因素试验结果，在 Box-Behnken 设计阶段选择药脂比为 1 : 6 ~ 1 : 3。

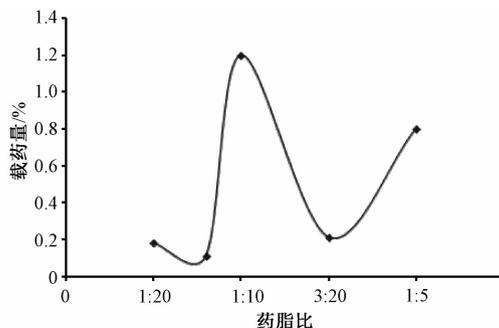


图3 药脂比对载药量的影响

Fig. 3 Effect of ratio of drug to lipid on drug loading

2.6.3 泊洛沙姆 188 用量 取泊洛沙姆 188 30、50、80、100、150、200 mg，Precirol ATO 5 100 mg，吴茱萸碱 10 mg，水相 50 mL，按“2.1”项下方法制备纳米粒，对其载药量进行考察，结果见图 4。由图可知，纳米粒载药量随泊洛沙姆 188 的用量呈波动变化，在 100 mg 时载药量最大。

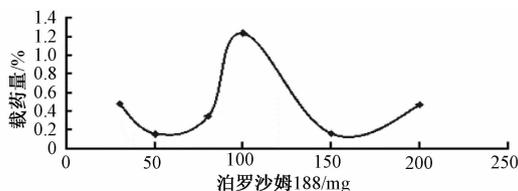


图4 泊洛沙姆 188 用量对载药量的影响

Fig. 4 Effect of Poloxamer 188 consumption on drug loading

2.6.4 水相体积 按“2.1”项下方法制备纳米粒，设置水相体积 20、30、40、50 mL，观察其外

观和溶液性状, 结果见图5。由图可知, 当水相体积增加时, 混悬体系透明度增加; 当水相体积为50 mL时, 纳米粒体系呈半透明状态, 泛淡蓝色乳光, 表明其浓度相对较低, 不易聚集沉降, 使得体系更加稳定。因此, 最终确定水相体积为50 mL。

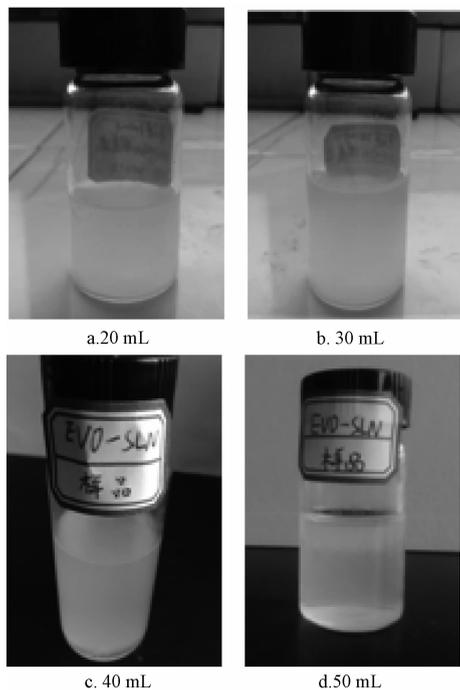


图5 水相体积考察结果

Fig. 5 Results of aqueous phase volume investigation

## 2.7 工艺优化

2.7.1 Box-Behnken 设计<sup>[14-16]</sup> 在预实验和单因素试验的基础上, 选择对载药量影响较大的 Precirol ATO 5 用量 (A)、药脂比 (B)、泊洛沙姆 188 用量 (C) 作为因素, 水平设置为 -1、0、1, 因素水平见表2。

表2 因素水平

Tab. 2 Factors and levels

因素	水平		
	-1	0	1
A Precirol ATO 5/mg	30	65	100
B 药脂比	1:6	1:4	1:3
C 泊洛沙姆 188/mg	50	100	150

2.7.2 Box-Behnken 试验结果 以载药量 (Y) 为指标, 结果见表3。

2.7.3 数据处理 利用 Design-Expert 8.05b 软件对数据进行回归分析, 结果见表4。

校正系数  $R_{adj}^2$  为 0.640 2, 表明该模型可以解释 64.02% 的响应值变化;  $P$  小于 0.05, 失拟项  $F$  为

4.09, 相对于绝对误差不显著, 表明该模型可靠<sup>[17]</sup>。将数据进行多元回归拟合, 得回归方程  $Y = 0.83 - 0.079A + 0.13B - 0.13C - 0.34AB - 0.080AC - 0.035BC - 0.13A^2 + 0.060B^2 - 0.29C^2$ 。

表3 Box-Behnken 试验结果

Tab. 3 Results of Box-Behnken tests

编号	因素			Y/%
	A	B	C	
1	-1	1	0	1.51
2	0	0	0	0.73
3	0	-1	-1	0.69
4	-1	-1	0	0.31
5	-1	0	-1	0.46
6	0	1	1	0.44
7	0	0	0	1.02
8	-1	0	1	0.37
9	1	0	1	0.20
10	1	1	0	0.52
11	0	0	0	0.76
12	1	-1	0	0.69
13	1	0	-1	0.61
14	0	-1	1	0.51
15	0	0	0	0.87
16	0	0	0	0.76
17	0	1	-1	0.76

表4 方差分析

Tab. 4 Analysis of variance

来源	离差平方和	自由度	均方	F	P
模型	1.25	9	0.14	4.16	0.036 7
A	0.050	1	0.050	1.49	0.262 2
B	0.13	1	0.13	3.97	0.086 5
C	0.13	1	0.13	3.75	0.094 2
AB	0.47	1	0.47	14.06	0.007 2
AC	0.026	1	0.026	0.77	0.410 2
BC	0.004 9	1	0.004 9	0.15	0.713 0
A <sup>2</sup>	0.071	1	0.071	2.14	0.186 9
B <sup>2</sup>	0.015	1	0.015	0.45	0.523 7
C <sup>2</sup>	0.35	1	0.35	10.45	0.014 4
残差	0.23	7	0.033	—	—
失拟项	0.18	3	0.059	4.09	0.103 7
净误差	0.057	4	0.014	—	—
总离差	1.48	16	—	—	—

2.7.4 参数优化与预测 根据回归方程, 以纳米粒载药量为指标, 采用 Design-Expert 8.05b 软件进行优化 (图6), 得到最佳处方为 Precirol ATO 5 用量 30 mg, 药脂比 1:3 (即吴茱萸碱 10 mg), 泊洛沙姆 188 用量 93.11 mg, 响应面图见图7。

## 2.8 验证试验及表征

2.8.1 验证试验 按“2.7.4”项下处方, “2.1”项下方法制得 3 批样品, 发现其外观澄清半透明, 泛淡蓝色乳光 (图8), 平均载药量为 1.65%, 包

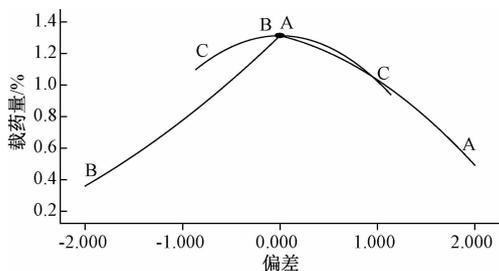


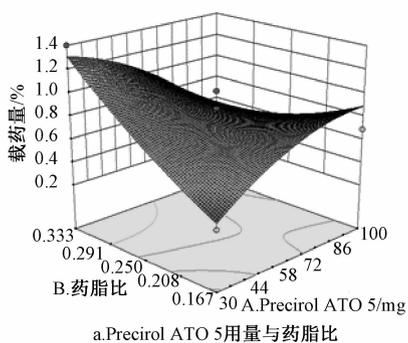
图6 Design-Expert 8.05b 软件优化图

Fig. 6 Optimization image obtained by Design-Expert 8.05b software

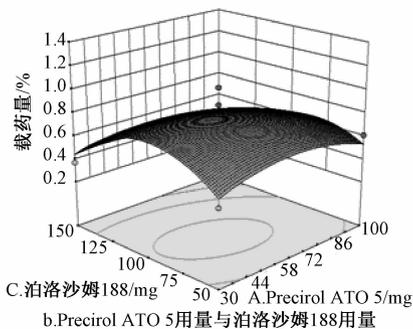


图8 样品图

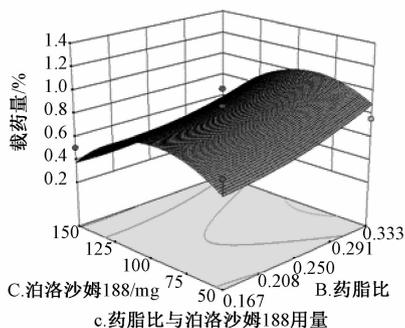
Fig. 8 Sample image



a. Precirol ATO 5用量与药脂比



b. Precirol ATO 5用量与泊洛沙姆188用量



c. 药脂比与泊洛沙姆188用量

图7 响应面图

Fig. 7 Response surface graphs

封率为99.2%。

2.8.2 表征 室温下，取适量纳米粒悬浮液滴于覆盖碳膜的铜网上，2% 磷钨酸 (pH = 6.5) 负染，室温下干燥，透射电子显微镜观察纳米结晶形态，

结果见图9，可知纳米粒呈圆形，分布均匀。再用超纯水按适当比例稀释，激光粒度仪测定其粒径，结果见图10，测得平均粒径为  $(268.9 \pm 6.3)$  nm，呈正态分布，而且分布趋势较为集中。

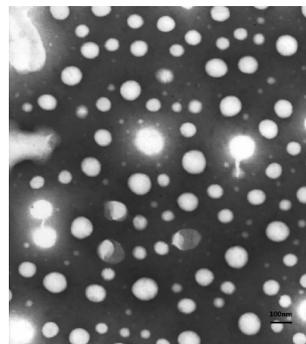


图9 透射电镜图 ( $\times 50\ 000$ )

Fig. 9 Transmission electron microscope image ( $\times 50\ 000$ )

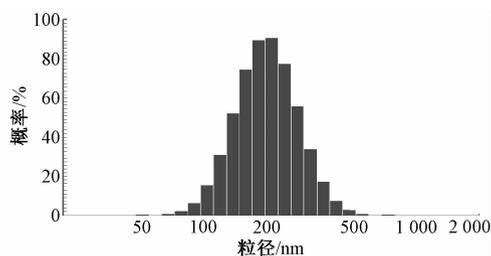


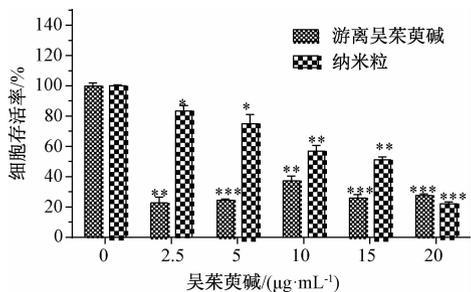
图10 粒径分布图

Fig. 10 Particle size distribution image

2.8.3 抗肿瘤活性实验 DMSO 溶解吴茱萸碱，配成 5 mg/mL 母液，保存于 4 °C 冰箱，应用时以含 10% FBS 的 DMEM 培养基稀释。制备纳米粒后，测得其中吴茱萸碱的质量浓度为 0.084 3 mg/mL，同法稀释。Hela 细胞分为实验组和对照组，前者加入不同质量浓度 (20、15、10、5、2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的吴茱萸碱和纳米粒，而后者不加入药物，另外再

设置空白培养基组, 不加入 HeLa 细胞和药物, 只加入等量培养基。

取对数生长期的耐药细胞适量, 接种于 96 孔板, 每孔加入 200  $\mu\text{L}$  细胞悬液, 使细胞数为 5 000 个/孔, 每组设 3 个复孔。96 孔板周围一圈加入 PBS 以避免培养基挥发而影响体积。细胞上板后, 在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h, 取出细胞, 弃去旧培养基, 加入新鲜培养基, 并按设置质量浓度加入吴茱萸碱和纳米粒, 每孔终体积为 200  $\mu\text{L}$ 。加药后, 细胞在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 48 h, 每孔加入 CCK - 8 溶液 10  $\mu\text{L}$ , 继续培养 4 h, 在酶标仪上检测 450 nm 波长处的吸光度  $A$ , 计算细胞存活率, 公式为  $\text{细胞存活率} = \frac{A(\text{药物实验组}) - A(\text{空白培养基组})}{A(\text{细胞对照组}) - A(\text{空白培养基组})} \times 100\%$ 。结果见图 11。



注: 与对照组 (0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

图 11 抗肿瘤活性实验结果

Fig. 11 Results of antitumor activity tests

由图可知, 与各自对照组比较, 游离吴茱萸碱与纳米粒均能显著抑制 HeLa 细胞的增殖。其中, 纳米粒呈剂量依赖关系, 表明其可能改变了吴茱萸碱的透膜吸收机制, 从而促进其透膜吸收, 而游离吴茱萸碱未呈现出明显的剂量依赖关系, 变化起伏较大。

### 3 讨论

本实验曾选用单硬脂酸甘油酯、硬脂酸、两者混合物、Compritol 888 ATO、Precirol ATO 5 作为脂质材料来制备固体脂质纳米粒, 通过比较其稳定性及外观颜色, 发现当颜色越接近乳白色时, 代表粒子越多, 越易发生团聚, 从而引起药物的析出, 即越不稳定。由于随着脂质材料用量的增加, 最后样品越来越呈乳白色, 而且纳米粒的粒径会逐渐增大, 故在不影响药物完全包封的前提下, 应尽可能地减少脂质材料用量。结果, Precirol ATO 5 较其他 3 种脂质材料稳定性好, 而且熔点相对较低, 适

合制备纳米粒, 它是一种混合脂质, 由硬脂酸和棕榈酸的单、二和三甘油脂的混合物组成, 能改变单一脂质晶格的高度有序性, 形成缺陷众多的较不完整脂质晶体, 提供空间以容纳更多的药物, 因此具有较高的包封率和载药量, 同时有利于药物的稳定<sup>[18]</sup>。此外, 在乳化过程中, 脂质的影响主要体现在为药物在熔融脂质中的溶解度、可混合性及固体脂质材料的物理化学结构、多型性等<sup>[19]</sup>。结合分子模拟结果, 最终选择 Precirol ATO 5 为吴茱萸碱的载体材料, 但分子模拟尚不能完全模拟纳米粒制备时所处介质环境, 尤其是介质的动态变化过程, 而且限于现有技术水平及软件原因, 开展的仅是分子水平的模拟, 未能进行介观层次的模拟。基于以上原因, 所得的分子对接构象与真实构象之间会存在明显差异, 尚需开展深入研究。

固体脂质纳米粒的考察指标主要有载药量、包封率、形态、粒径及其分布、Zeta 电位、沉降系数、突释效应等, 其中载药量是决定药物进入体内发挥作用的重要指标, 载药量越高, 表明药物与脂质的亲和力越好; 包封率是体现药物包封于脂质材料中多少的一项重要指标, 但在固体脂质纳米粒中, 药物不止能与脂质紧密结合形成纳米粒, 而且未被包封的药物也能以胶束、脂质体、混合胶束、药物晶体的形式存在, 多种结构的共存反而使得药物处于一种稳定的平衡状态, 可大幅度地提高混悬液中药物的含有量, 进入体内后能发挥以纳米粒为主的多种不同结构的吸收优势<sup>[20]</sup>。本研究发现, 吴茱萸碱在选定的药脂比范围内均有很高的包封率, 没有明显差异, 故未将其作为单因素试验与 Box-Behnken 设计的评价指标, 而优先选择载药量。

单因素试验显示, 当药脂比与 Precirol ATO 5 用量变化时, 载药量的变化趋势较为复杂, 呈双峰趋势, 因而在 Box-Behnken 设计时, 未选用 30 mg Precirol ATO 5 用量及 1 : 10 药脂比作为中间值, 而是综合两者变化时载药量的试验结果, 选择了表 2 中的 3 个水平进行实验设计。

在抗肿瘤活性实验中, 游离吴茱萸碱在 DMSO 中不能完全溶解而呈混悬状态, 从而影响了其透膜吸收。通过纳米粒的制备, 样品可以均匀分散在 DMSO 与培养基中, 因而抑制作用呈现出较好的剂量依赖关系。

### 4 结论

本实验研究了吴茱萸碱固体脂质纳米粒的制备

工艺,首先运用分子模拟法考其处方组成,再通过单因素试验进一步考察对其有显著影响的因素,并进一步通过 Box-Behnken 设计优化处方,在最优处方条件下制备 3 批平行样品,并进行了相关表征。结果,制得的纳米粒呈半透明的均一稳定体系,泛淡蓝色乳光,载药量、粒径等指标均满足后续实验要求,抗肿瘤活性也证实了其可有效改善吴茱萸碱的分散性与透膜吸收,显示出良好的抑制肿瘤细胞增殖的活性,也表明了结合分子模拟进行工艺设计与优化的合理性与可行性。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 刘 溪,高世勇. 吴茱萸碱药理作用研究进展[C] //第六届肉苁蓉暨沙生药用植物学术研讨会论文集. 北京: 中国药学会, 2011.
- [ 2 ] 张 醇,梁华平. 吴茱萸碱抗肿瘤活性研究进展[J]. 中国新药杂志, 2010, 19(17): 1558-1562.
- [ 3 ] Yu H, Jin H, Gong W, et al. Pharmacological actions of multi-target-directed evodiamine [J]. *Molecules*, 2013, 18 ( 2 ): 1826-1843.
- [ 4 ] Jiang J L, Hu C P. Evodiamine: A novel anti-cancer alkaloid from *Evodia rutaecarpa* [J]. *Molecules*, 2009, 14 ( 5 ): 1852-1859.
- [ 5 ] Chen M C, Yu C H, Wang S W, et al. Anti-proliferative effects of evodiamine on human thyroid cancer cell line ARO [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 110(6): 1495-1503.
- [ 6 ] Rasul A, Yu B, Zhong L L, et al. Cytotoxic effect of evodiamine in SGC-7901 human gastric adenocarcinoma cells via simultaneous induction of apoptosis and autophagy[J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(5): 1481-1487.
- [ 7 ] Shyr M H, Lin L C, Lin T Y, et al. Determination and pharmacokinetics of evodiamine in the plasma and feces of conscious rats[J]. *Anal Chim Acta*, 2006, 558(1-2): 16-21.
- [ 8 ] Xu H, Zhang T, Yang H, et al. Preparation of evodiamine solid dispersions and its pharmacokinetics[J]. *Indian J Pharm Sci*, 2011, 73(3): 276-281.
- [ 9 ] Liu S, Tan Q Y, Wang H, et al. Preparation, characterization and *in vitro* anti-tumor activities of evodiamine phospholipids complex[J]. *Chin Pharm J*, 2012, 47(7): 517-523.
- [ 10 ] 方 瑜. 复方中药炼萸胃滞留渗透泵控释制剂的设计与评价[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2012.
- [ 11 ] Zhang Y T, Huang Z B, Zhang S J, et al. *In vitro* cellular uptake of evodiamine and rutaecarpine using a microemulsion[J]. *Int J Nanomed*, 2012, 7(7): 2465-2472.
- [ 12 ] 夏爱晓,宋倩倩,孙 渊. 固体脂质纳米粒制备及应用研究进展[J]. 药学实践杂志, 2012, 30(5): 331-333, 368.
- [ 13 ] Gong C, Deng S, Wu Q, et al. Improving antiangiogenesis and anti-tumor activity of curcumin by biodegradable polymeric micelles[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(4): 1413-1432.
- [ 14 ] 郝吉福,王建筑,郭丰广,等. 基于 Box-Behnken 实验优化龙血竭固体脂质纳米粒的制备[J]. 中成药, 2011, 33(10): 1713-1718.
- [ 15 ] Bezerra M A, Santelli R E, Oliveira E P, et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry[J]. *Talanta*, 2008, 76(5): 965-977.
- [ 16 ] Ferreira S L, Bruns R E, da Silva E G, et al. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems[J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1158(1-2): 2-14.
- [ 17 ] 娄 彬,张 楠,刘 新,等. 响应面法优化石榴皮中原花青素提取工艺[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(17): 3816-3820.
- [ 18 ] 聂 绩,黄 华. 氯霉素固体脂质纳米粒的制备及质量评价[J]. 中国药房, 2011, 22(17): 1598-1601.
- [ 19 ] 张继东,万江陵. 丹参酮 II A 固体脂质纳米粒的制备及体外释药[J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(6): 431-436.
- [ 20 ] 李厚丽,翟光喜,祝伟伟,等. 槲皮素固体脂质纳米粒的制备及小鼠口服吸收研究[J]. 中国药理学杂志, 2008, 43(6): 435-438.