

三氧化二砷纳米粒的制备及对 4 种肿瘤细胞的抑制作用

于莲, 匡宇明, 杨金儒, 刘洋, 周彤, 杨佳蓉(佳木斯大学药学院, 黑龙江省高校生物药剂剂重点实验室, 黑龙江 佳木斯 154007)

摘要: 目的 采用星点设计优化处方, 制备三氧化二砷固体脂质纳米粒并探讨其对 4 种肿瘤细胞的抑制作用。方法 采用乳化超声法制备三氧化二砷固体脂质纳米粒。采用 MTT 法考察三氧化二砷固体脂质纳米粒对 4 种肿瘤细胞的体外抑制作用。结果 筛选的最优处方为 PEG-单硬脂酸甘油酯用量 0.11 g, 大豆卵磷脂的用量 0.18 g。平均粒径为 131.54 nm, 包封率 73.46%, 载药量为 1.07%。不同浓度三氧化二砷固体脂质纳米粒对 4 种细胞均有抑制增殖作用。结论 采用乳化超声法制得的三氧化二砷固体脂质纳米粒具有较好的稳定性, 粒子分布均匀, 符合制剂学要求。携带阳离子三氧化二砷固体脂质纳米粒组抑制作用最强。

关键词: 三氧化二砷; 固体脂质纳米粒; 乳化超声法; MTT; 肿瘤抑制作用

中图分类号: R284.1; R917

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2013)07-0701-07

Preparation of Arsenic Trioxide Nanoparticles the Cytotoxicity against Four Tumor Cells

YU Lian, KUANG Yuming, YANG Jinru, LIU Yang, ZHOU Tong, YANG Jiarong(Key Laboratory of Biopharmaceutical Preparations of Jiamusi University College of Pharmacy University of Heilongjiang, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepared arsenic trioxide solid lipid nanoparticles with central composite design and study the inhibitory effect of arsenic trioxide solid lipid nanoparticles on four kinds of tumor cells. **METHODS** Arsenic trioxide solid lipid nanoparticles were prepared by emulsion-ultrasonic dispersion method. And MTT experiment was used to investigate the inhibition of four tumor cells. **RESULTS** The optimal formulation was screened as monostearin 0.11 g and soy lecithin 0.18 g. Average size of nanoparticles was 131.54 nm. Encapsulation efficiency was 73.46% and drug loading was 1.07%. The proliferations of four cells were inhibited by different concentrations of arsenic trioxide. And nanoparticles further induced the apoptosis of cells. **CONCLUSION** Arsenic trioxide solid lipid nanoparticles prepared by emulsion-ultrasonic dispersion method owned well stability and uniformity of particle distribution which meets pharmaceutical requirement. The inhibitory effect of arsenic trioxide solid lipid nanoparticles carrying cationic potential is the most notable.

KEY WORDS: arsenic trioxide; solid lipid nanoparticles; emulsion-ultrasonic dispersion; MTT; tumor inhibition

注射用三氧化二砷(arsenic trioxide, ATO)适用于急性早幼粒细胞白血病的治疗, 已得到国内外专家的认可, 用于实体瘤的治疗则需要较大的剂量^[1-4], 往往会产生严重的全身不良反应, 使其应用受到限制。本实验将药物 ATO 包裹进由大豆卵磷脂及 PEG-单硬脂酸甘油酯组成的固体脂质纳米粒中, 制成新型纳米药物输送系统, 可提高治疗的靶向性^[5], 从而减少所需药物剂量, 进而减轻对各脏器的毒性作用。普通表面疏水性纳米粒通过静脉给药, 可以被网状内皮系统的吞噬细胞所吞噬, 仅表现出明显的肝、脾、骨髓等器官与组织的分布靶向性即天然靶向性(被动靶向性)^[6-7], 在

体内停留时间短。为延长体内滞留时间, 不少研究者通过引入亲水基团以达到长循环的作用^[8]。本实验将实验药物 ATO 制成脂质纳米粒, 即 ATO-SLN, 连接 PEG 改善表面的疏水性达到长循环的功能, 以阳离子活性剂双十二烷基二甲基溴化铵(DMAB)修饰表面, 以期达到理想的抗肿瘤效果。

1 材料

1.1 仪器与试剂

Sunrise 酶标仪(奥地利 Tecan 公司); A1130232 倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司); XSP-6C 光学显微镜(日本 Olympus 公司)。SCIENTZ-II D 超

基金项目: 国家自然科学基金项目(81274101)

作者简介: 于莲, 女, 教授, 硕士 Tel: 13845405552 E-mail: jdyulian@163.com

声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司); UV-2550 紫外可见分光光度计(日本岛津公司); TGL-166B 台式离心机(上海安亭科学仪器厂制造); DF-1018 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); 碘化钾(天津市福晨化学试剂); 二水合氯化亚锡(西陇化工股份有限公司); 锌粒(天津市科密欧化学试剂有限公司); PEG-单硬脂酸甘油酯(天津市科密欧化学试剂有限公司); DMAB(安徽奔马先端科技有限公司, 纯度 99.86%)

1.2 细胞及材料

肝癌细胞株 SMMC7721(购自中国科学院上海科学研究所细胞资源中心); 胃癌细胞株 7901(购自中国科学院上海科学研究所细胞资源中心); 舌鳞癌细胞株 Tca8113(上海交通大学口腔医学院); 宫颈癌细胞株 Hela(购自美国物种保藏中心)。ATO 针剂($10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 哈尔滨伊达药业有限公司); RPM 1640 培养基(美国 Gibco 公司); 小牛血清(浙江天杭生物科技有限公司); 胰蛋白酶(Sigma 公司)。

2 方法

2.1 乳化超声法制备普通 ATO 固体脂质纳米粒(ATO-SLN)

称取适量 PEG-单硬脂酸甘油酯与大豆卵磷脂, 加入少许乙醇混溶, 共同放于超声条件下使其溶解; 同时另取适量泊洛沙姆 188 加入 20 ml 水超声条件下溶解。待其全部溶解后将前后两体系分别放于 60°C 水浴中加热。此时将配制的定量 ATO 溶液加入泊洛沙姆体系中混匀。待达到水浴温度后, 用胶头滴管吸取泊洛沙姆与 ATO 的混合液逐滴滴加到融溶的 PEG-单硬脂酸甘油酯与大豆卵磷脂的体系中并不断搅拌, 使其形成 W/O 型初乳, 再采用超声细胞粉碎机超声将粒子破碎。超声后将体系放入冷水中固化。固化后将体系过 $0.22 \mu\text{m}$ 半透膜, 得普通 ATO-SLN, 于 4°C 冰箱保存备用。

2.2 乳化超声法制备阳离子型 ATO 固体脂质纳米粒(DMAB-ATO-SLN)

制备好 ATO-SLN 后, 在体系中加入阳离子活性载体 DMAB 5 mg, 冰浴超声 60 s, 10°C 下高速离心 30 min, 得 DMAB-ATO-SLN, 4°C 冰箱保存备用。

2.3 DMAB-ATO-SLN 正交试验优化最佳工艺条件

根据单因素实验结果选择搅拌时间、滴加速度、超声功率、超声时间 4 个因素, 以包封率为指标, 进行 $L_9(3^4)$ 正交试验进行工艺优化。包封率计算方法: 采用超滤离心法, 先检测体系溶液 ATO 的含量, 再将体系 ATO 溶液置于超速离心管中, $5000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 低速离心 5 min, 离心后的溶液取上层清液测药物含量。 $EE\% = (W_1 - W_2) / W_1 \times 100\%$ (体系溶液中 ATO 的量为 W_1 , 离心后游离的 ATO 药物含量为 W_2 , 纳米粒中药物含量为 $W = W_1 - W_2$)。 ATO 的含量检测方法采用新银盐法^[9]。

2.4 DMAB-ATO-SLN 星点设计效应面优化最佳处方配比

按照最佳制备工艺制备, 在药物含量固定不变的前提下, 以 PEG-单硬脂酸甘油酯加入量(g), 乳化剂大豆卵磷脂的加入量(g)两个因素设计星点。选择各因素的水平, 以平均粒径(Y_1), 载药量(Y_2), 包封率(Y_3)为评价指标, 利用 Hassan 方法, 选择综合指标(Y_4)OD 值, 来考察各个指标的综合效果, 对各个指标进行归一化处理, 进行试验。

2.5 DMAB-ATO-SLN 质量考察

按照最佳处方配比分 3 批制备样品, 进行质量考察。

2.5.1 形态观察 取 DMAB-ATO-SLN 溶液适量, 加蒸馏水稀释, 然后滴加在覆盖碳膜的铜网上, 用 2% 磷钨酸染色, 在透射电镜下观察其形态并拍摄照片。同时取适量 DMAB-ATO-SLN 溶液通过扫描电镜观察其外观。

2.5.2 粒径及粒度分布 吸取纳米粒分散液 2 mL 蒸馏水稀释至 50 mL, 取 2 mL 稀释液加入激光粒度仪的样品池中, 测定粒径大小及分布。

2.5.3 Zeta 电位 吸取 DMAB-ATO-SLN 溶液 2 mL 用蒸馏水稀释至 50 mL, 取 2 mL 稀释液加入到表面电位分析仪样品池中, 测定 Zeta 电位。

2.5.4 含量测定 精密量取 DMAB-ATO-SLN 2 mL, 乙醇溶解, 超声破碎 15 min 后放冷, 定容于 10 mL 量瓶中, $5000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清液用 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 采用新银盐法在 402 nm 处分别测定吸光度 A。平行测定 3 次, 根据标准曲线方程计算药物含量。

2.5.5 制备工艺收得率及重复性 收得率 = 制备出纳米粒体系的重量 / 投料总量 $\times 100\%$

按照同样的工艺条件制备出 6 批样品, 以包封率和粒径为考察标准进行考察。

2.6 DMAB-ATO-SLN 对 4 种肿瘤细胞体外抑制作用

选择 4 种肿瘤细胞进行体外抑制实验: 肝癌细胞 SMMC7721、胃癌细胞 SCG7901、舌鳞癌细胞 Tca8113、宫颈癌细胞 Hela。

2.6.1 细胞培养 每种细胞分别加入含有 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基完全培养液(含青霉素 $100 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, 链霉素 $100 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$), 吹打细胞使之处于悬浮状态并接种到培养瓶中, 荧光倒置显微镜可观察到悬浮的细胞, 37°C , 5% CO_2 饱和湿度条件下进行培养。细胞贴壁生长 24 h, 直到细胞达到对数生长期进行传代。

2.6.2 MTT 比色法测定细胞 IC_{50} 值 采用 MTT 比色法, 每种细胞实验设空白对照组(ATO 针剂), 普通纳米粒实验组和携带阳离子实验组(重复 3 次), 先用胰酶消化对数生长期的细胞, 调整配制浓度为 5×10^4 个单细胞悬液。培养板每孔接种 $200 \mu\text{L}$, 接种于 96 孔培养板, 置于 37°C , 5% CO_2 培养箱中培养 24 h。弃去培养液, 用新鲜配制灭菌的 PBS 缓冲溶液冲洗后分别加入 5 组不同浓度 ATO 溶液 2.5, 5, 7.5, 10, $12.5 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$, 空白组加入 RPMI 1640 培养液, 每孔补足 $200 \mu\text{L}$ 。继续培养 48 h, 用荧光倒置显微镜观察细胞形态变化。弃去培养液, 每孔加入 $200 \mu\text{L}$ 的 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ MTT, 继续培养 4 h, 再弃去培养液, 每孔加入二甲基亚砷 $100 \mu\text{L}$, 低速摇床进行混匀, 使用自动酶标仪于波长 492 nm 测量吸光度值。将各组不同药物浓度酶标仪测定值应用 χ^2 检验作统计学处理, 采用方差分析; IC_{50} 用直线相关及回归分析, 以 $P < 0.05$ 判断差异具有统计学意义。细胞生长抑制率计算公式: 细胞生长抑制率(%) = $(1 - \text{加药组细胞平均吸光度值} / \text{对照组细胞平均吸光度值}) \times 100\%$ 。

3 结果

3.1 DMAB-ATO-SLN 正交试验优化工艺结果

工艺优化结果见表 1。由结果可知, 各因素影响的主次顺序是 $B > C > A > D$, 各因素的最优化组合为 $A_1B_1C_3D_2$, 最终确定该制备工艺需搅拌时间 5 min、滴加速度 $4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 、超声功率 800 W、超声时间 8 min 时该处方制得的 ATO-SLN 包封率较大, 稳定性较好。

表 1 正交试验考察结果

Tab 1 The result of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	实验结果
1	1	1	1	1	73.33
2	1	2	2	2	58.82
3	1	3	3	3	69.98
4	2	1	2	3	71.73
5	2	2	3	1	62.50
6	2	3	1	2	64.29
7	3	1	3	2	76.47
8	3	2	1	3	53.33
9	3	3	2	1	63.50
K_1	67.377	73.843	63.65	66.443	
K_2	66.173	58.217	64.683	66.527	
K_3	64.433	65.923	69.65	65.013	
R	2.944	15.626	6	1.514	

3.2 DMAB-ATO-SLN 星点设计效应面处方优化结果

对星点设计实验结果各个指标进行归一化处理, 因素水平见表 2, 中心设计见表 3。

表 2 因素水平表

Tab 2 Factors and levels

因素	水平		
	-1	0	1
X_1 大豆卵磷脂的加入量/g	0.03	0.14	0.25
X_2 PEG-硬脂酸甘油酯的加入量/g	0.01	0.08	0.15

表 3 中心复合设计的实验安排及结果

Tab 3 Experimental arrangements and results of central composite design

Std	Run	X_1 A: 豆磷脂 加入量/g	X_2 B: PEG- 单甘脂 加入量/g	Y_1 粒径/ nm	Y_2 载药 量/%	Y_3 包封 率/%	Y_4 OD 值
1	6	0.03	0.01	289	0.87	58.82	0
2	11	0.25	0.010	139	0.92	61.24	0.066
3	5	0.03	0.15	93	0.92	64.44	0.12
4	10	0.25	0.15	228	1.06	67.61	0.13
5	1	0.03	0.08	134	1.04	71.33	0.33
6	2	0.25	0.08	111	1.196	76.47	0.84
7	3	0.14	0.01	148	0.816	53.33	0
8	9	0.14	0.15	76	1.012	63.82	0.34
9	12	0.14	0.08	97	1.02	73.33	0.42
10	4	0.14	0.08	97	1.02	73.33	0.42
11	8	0.14	0.08	97	1.02	73.33	0.42
12	13	0.14	0.08	97	1.02	73.33	0.42
13	7	0.14	0.08	97	1.02	73.33	0.42

3.2.1 粒径的模型拟合 采用 Design-Expert 8.0 软件, 按二项回归方程进行拟合。经过 F 检验, 总模型方程显著($P<0.05$), $R^2=0.9581$, 表明该回归模型拟合情况良好, 符合二项式拟合方程和多元回归方程拟合。粒径对大豆卵磷脂加入量与 PEG 单甘脂加入量的效应面图见图 1。

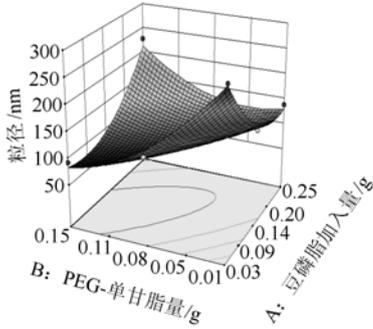


图 1 纳米粒粒径效应面图
Fig 1 Nanoparticles particle size response surface

二项式拟合方程: $Y_1=90.14-6.33X_1-29.83X_2+71.25X_1X_2+49.52X_1^2+39.02X_2^2$

多元回归方程: $Y_1=131-6.33X_1-29.83X_2$

3.2.2 载药量的模型拟合 采用 Design-Expert 8.0 软件, 按二项回归方程进行拟合。经过 F 检验显示, 总模型方程显著($P<0.05$), $R^2=0.9269$, 表明该回归模型的拟合情况良好, 符合二项式拟合方程和多元回归方程拟合。载药量对大豆卵磷脂加入量与 PEG 单甘脂加入量的效应面图见图 2。

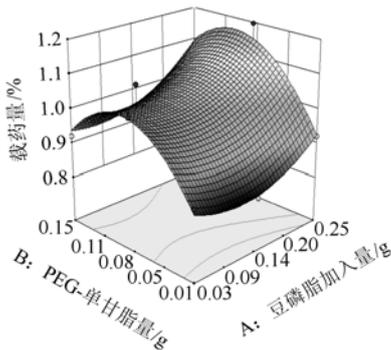


图 2 纳米粒载药量效应面图
Fig 2 Nanoparticle drug loading response surface

二项式拟合方程: $Y_2=1.03+0.058X_1+0.064X_2+0.022X_1X_2+0.064X_1^2-0.14X_2^2$

多元回归方程: $Y_2=0.99+0.058X_1+0.064X_2$

3.2.3 包封率的模型拟合 采用 Design-Expert 8.0 软件, 按二项回归方程进行拟合。经过了 F 检

验显示, 总模型的方程显著($P<0.05$), $R^2=0.9684$, 表明该回归模型的拟合情况良好, 符合二项式拟合方程和多元回归方程拟合。包封率对大豆卵磷脂加入量与 PEG 单甘脂加入量的效应面图见图 3。

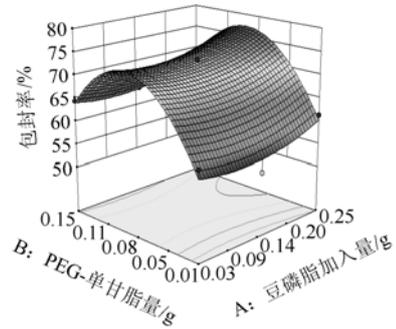


图 3 包封率效应面图
Fig 3 Nanoparticle encapsulation efficiency response surface

二项式拟合方程: $Y_3=72.79+1.79X_1+3.75X_2+0.19X_1X_2+2.44X_1^2-12.88X_2^2$ ($R^2=0.9684$)

多元回归方程: $Y_3=67.98+1.79X_1+3.75X_2$

3.2.4 归一值“OD”的模型拟合 采用 Design-Expert 8.0 软件, 按二项回归方程进行拟合。

二项式拟合方程: $Y_4=0.46+0.098X_1+0.087X_2-0.014X_1X_2+0.041X_1^2-0.37X_2^2$ ($R^2=0.9086$)

多元回归方程: $Y_4=0.3+0.098X_1+0.087X_2$ ($R^2=0.4294$)

因此多元回归模型不如二项式回归拟合模型好, 因此选择二项式回归拟合模型。归一值“OD”的模型拟合结果见图 4。

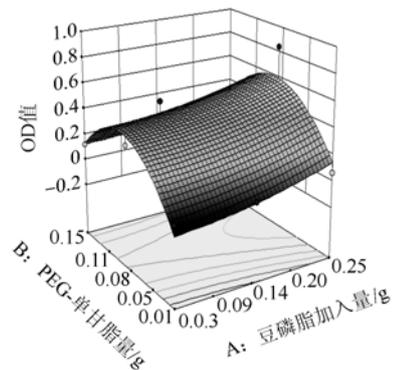


图 4 归一值 OD 效应面图
Fig 4 Normalized value OD response surface

由效应面优化得出最佳处方配比: 所需 PEG-单硬脂酸甘油酯的量为 0.11 g, 大豆卵磷脂的量为 0.18 g。

3.3 质量考察结果

3.3.1 外观观察结果 经扫描电镜扫描显示, 按

优化工艺制备的 DMAB-ATO-SLN 形态呈基本的球形, 大小较均匀圆整, 扫描电镜照片见图 5。

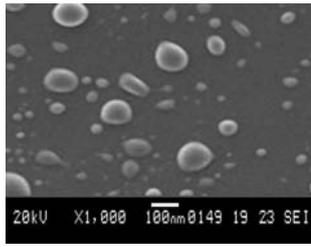


图 5 DMAB-ATO-SLN 扫描电镜图

Fig 5 Scanning electron microscopy of DMAB-ATO-SLN

3.3.2 粒径分布测定 制得的 DMAB-ATO-SLN 的平均粒径为 $(131.54 \pm 0.56)\text{nm}$, 呈正态分布。结果见图 6。

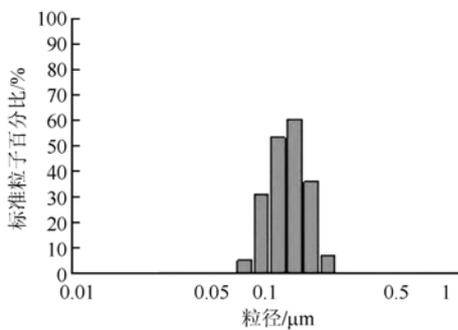


图 6 DMAB-ATO-SLN 粒径分布

Fig 6 The size distribution of DMAB-ATO-SLN

3.3.3 Zeta 测定结果 表面电位分析仪测得 Zeta 值为 $(26.24 \pm 0.78)\text{mV}$, 属热力学稳定体系。其结构为最内层为水溶性药物 ATO, 外层被脂溶性 PEG-单甘脂及大豆卵磷脂的复合物包裹。

3.3.4 含量测定结果 按“3.4”项下实验方法测得样品含量测定, 结果见表 4。

表 4 样品含量测定结果($n=3$)

Tab 4 Sample content determination($n=3$)

样品	测得药物量/ μg	平均值/ μg	RSD/%
1	9.78		
2	9.89	9.84	0.56
3	9.84		

由结果可知: 样品中药物含量为 $9.84 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ 。

3.3.5 收得率及重复性考查结果 制备出纳米粒体系经测得重量为 25.86 g。初始投料量总计为 26.38 g。收得率= $25.86/26.38 \times 100\%=98.03\%$ 。

按照同样的工艺条件制备出 6 批样品, 以封装率和粒径为考查标准进行考察。结果见表 5。

表 5 样品重复性测定结果($n=6$)

Tab 5 Results of repeatability($n=6$)

样品	粒径/nm	RSD/%	封装率/%	RSD/%
样品 1	134		69.3	
样品 2	136		73.3	
样品 3	136	1.01	72.4	1.08
样品 4	136		75.6	
样品 5	135		74.6	
样品 6	135		73.1	

由表可知制备工艺的重复性较好。

3.4 细胞实验结果

3.4.1 MTT 比色法检测 ATO 对肝癌细胞 SMMC7721 的抑制率 不同种类纳米粒不同剂量药物对细胞抑制率结果见表 6。结果显示 ATO 能明显抑制肝癌细胞 SMMC7721 的增殖。ATO 各组对肝癌细胞作用 24 h 后, 同一浓度下阳离子纳米粒抑制率大于不携带阳离子的普通纳米粒剂型组, 普通纳米粒剂型组抑制率大于普通 ATO 针剂($P<0.05$), 具有剂量和剂型依赖性。根据线性回归方程计算出 ATO 针剂, 普通纳米粒组及阳离子靶向组的 IC_{50} 值分别为 3.92, 2.96, 1.22 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

表 6 不同浓度 ATO 3 种剂型对 SMMC7721 细胞抑制率($n=96$)

Tab 6 Different formulations with different concentrations of arsenic trioxide on SMMC 7721 cell inhibition rate($n=96$)

组别	抑制率/%				
	2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$	5 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$	7.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$	12.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$
ATO 针剂组	34.68	62.84	73.89	94.68	98.89
普通纳米粒剂型组	43.11	61.53	83.37	96.53	99.16
阳离子靶向剂型组	49.16	73.37	87.32	97.84	99.42

3.4.2 MTT 比色法检测 ATO 对胃癌细胞 SCG7901 的抑制率 不同剂型不同剂量药物对细胞抑制率结果见表 7。结果显示 ATO 能明显抑制胃癌细胞 SCG7901 的增殖。ATO 各剂型组对胃癌细胞作用 24 h 后, 同一浓度下携带阳离子纳米粒抑制率大于不携带阳离子的普通纳米粒剂型组, 普通纳米粒剂型组抑制率大于普通 ATO 针剂($P<0.05$), 具有剂量和剂型依赖性。根据线性回归方程计算出 ATO 针剂, 普通纳米粒组及阳离子靶向组的 IC_{50} 值分别为 4, 2.44, 1.61 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

表7 不同浓度ATO 3种剂型对SCG7901细胞抑制率(n=96)

Tab 7 Different formulations with different concentrations of arsenic trioxide on SCG7901 cell inhibition rate(n=96)

组别	抑制率/%				
	2.5 μmol·mL ⁻¹	5 μmol·mL ⁻¹	7.5 μmol·mL ⁻¹	10 μmol·mL ⁻¹	12.5 μmol·mL ⁻¹
ATO 针剂组	32.79	58.70	82.76	95.19	96.77
普通纳米粒剂型组	46.80	62.67	83.55	95.45	97.30
阳离子靶向剂型组	48.92	69.28	86.46	95.98	99.10

3.4.3 MTT 比色法检测 ATO 对口腔舌磷癌细胞 Tca8113 的抑制率 不同剂型不同剂量药物对细胞抑制率结果见表 8。结果显示 ATO 能明显抑制舌磷癌细胞 Tca8113 的增殖。ATO 各剂型组对口腔癌细胞作用 24 h 后, 同一浓度下阳离子纳米粒抑制率大于不携带阳离子的普通纳米粒剂型组, 普通纳米粒剂型组抑制率大于普通 ATO 针剂 ($P<0.05$), 具有剂量和剂型依赖性。根据线性回归方程计算出 ATO 针剂, 普通纳米粒组及阳离子靶向组的 IC₅₀ 值分别为 8.34, 7.83, 6.74 μmol·mL⁻¹。

表8 不同浓度ATO 3种剂型对PCA8113细胞抑制率(n=96)
Tab 8 Different formulations with different concentrations of arsenic trioxide on PCA8113 cell inhibition rate(n=96)

组别	抑制率/%				
	2.5 μmol·mL ⁻¹	5 μmol·mL ⁻¹	7.5 μmol·mL ⁻¹	10 μmol·mL ⁻¹	12.5 μmol·mL ⁻¹
ATO 针剂组	5.32	28.90	50.17	57.48	78.74
普通纳米粒剂型组	14.95	35.55	51.16	58.14	80.07
阳离子靶向剂型组	22.92	1.20	56.81	63.46	89.04

3.4.4 MTT 比色法检测 ATO 对宫颈癌细胞 Hela 抑制率 不同剂型不同剂量药物对细胞抑制率结果见表 9。结果显示 ATO 能明显抑制宫颈癌细胞 Hela 的增殖。ATO 各剂型组对宫颈癌细胞作用 24 h 后, 同一浓度下阳离子纳米粒抑制率大于不携带阳离子的普通纳米粒剂型组, 普通纳米粒剂型组抑制率大于普通 ATO 针剂 ($P<0.05$), 具有剂量和剂型依赖性。根据线性回归方程计算出 ATO 针剂, 普通纳米粒组及阳离子靶向组的 IC₅₀ 值分别为 8.65, 8.04, 7.06 μmol·mL⁻¹。

表9 不同浓度ATO 3种剂型对Hela细胞抑制率(n=96)
Tab 9 Different formulations with different concentrations of arsenic trioxide on Hela inhibition rate (n=96)

组别	抑制率/%				
	2.5 μmol·mL ⁻¹	5 μmol·mL ⁻¹	7.5 μmol·mL ⁻¹	10 μmol·mL ⁻¹	12.5 μmol·mL ⁻¹
ATO 针剂组	2.23	26.39	44.24	57.62	77.70
普通纳米粒剂型组	10.41	33.83	50.56	59.85	78.07
阳离子靶向剂型组	16.73	40.52	51.30	75.09	89.22

4 讨论

纳米粒常用的制备方法为乳化-超声分散法, 它的优点是操作简单, 易于控制, 仪器价格低廉, 成本低。它比较适合实验室操作, 适于药物处方的初步筛选。在乳化-超声分散法中, 超声过程通过外加能量使得初乳的乳滴被破坏分散成为更小的液滴, 新生成的小乳滴立刻被体系中的乳化剂所稳定。故本实验应用本法制备 ATO-SLN。本实验将水溶性的 ATO 包裹进脂质纳米粒体系中, 并在包裹的材料中加入 PEG 达到长循环效果, 同时载入阳离子载体, 与现在市售伊泰达(ATO 针剂)进行比较, 对癌细胞的抑制率明显增高, 从而对未来 ATO 在临床应用中关于抗癌效果与剂型呈依赖关系等方面的探索有着积极的作用。

ATO-SLN^[10-11]针对肝癌、胃癌、宫颈癌等实体瘤癌症在临床的治疗上已有报道^[12-14], 但砷剂在现阶段临床上应用于治疗舌鳞癌等口腔类的癌性病变方面还未有报道。本实验通过 DMAB-ATO-SLN 对 4 种癌细胞进行 MTT 实验可看出, DMAB-ATO-SLN 对细胞的抑制率大小分别为肝癌 SMMC7721>胃癌 SCG7901>舌鳞癌 Tca8113>宫颈癌 Hela, 由此可看出肝癌细胞 SMMC7721 对 DMAB-ATO-SLN 最为敏感, 因此今后在治疗肝癌方面本药有着良好的发展前景。

REFERENCES

- [1] LIU H, NARENMANDURA. Mechanisms of arsenic trioxide used in cancers therapy [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2013, 30(3): 338-342.
- [2] BIN T, HUANG J F, QUN W, et al. Anti-hepatoma effect of arsenic trioxide on experimental liver cancer induced by 2-acetamidofluorene in rats [J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(38): 5938-5943.
- [3] GAO F, YI J, YUAN J Q, et al. The cell cycle related apoptotic susceptibility to arsenic trioxide is associated with the level of reactive oxygenspecies [J]. Cell Res, 2004, 14(1): 81-85.
- [4] XIAO Y F, LIU S X, WU D D, et al. Inhibitory effect of arsenic trioxide on angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in gastric cancer [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(36): 5780-5786.
- [5] ZHANG J, ZHANG J, DE S H. Nanoparticles targeting property in the research progress [J]. Shandong Med(山东医药), 2006, 46(35): 75-76.
- [6] HU X M, LIU F, MA R. Application and assessment of Chinese arsenic drugs in treating malignant hematopathy in China [J]. Chin J Integr Med(中国结合医学杂志), 2010, 16(4): 368-377.
- [7] LIANG F S, YANG D Z, HAI J S, et al. Liver targeting and the delayed drug release of the nanoparticles of adriamycin

- polybutylcyanoacrylate in mice [J]. *Chin Med J*, 2006, 119(15): 1287-1293.
- [8] WANG Z Y, LIAO G T. Nanoparticle carrier material body outer degradation and toxicity [J]. *Chin Pharm J(中国药理学杂志)*, 1999, 34(2): 73-76.
- [9] LIAO Y S. The new silver salt method to determine the trace arsenic in cosmetics research [J]. *Chin J Health Lab Technol(中国卫生检验杂志)*, 1995, 36(5): 4.
- [10] SUN J H, ZHANG Y J. Arsenic trioxide antitumor mechanism research [J]. *Liaoning Med J(辽宁医学杂志)*, 2007, 14(3): 217-219.
- [11] SUN E H, LU C. Arsenic trioxide on three negative breast cancer cell proliferation and apoptosis inhibition [J]. *Jiangsu Med(江苏医药)*, 2012, 4(38): 894-896.
- [12] XIAO Y F, WU D D, LIU S X, et al. Effect of arsenic trioxide on vascular endothelial cell proliferation and expression of vascular endothelial growth factor receptors Flt-1 and KDR in gastric cancer in nude mice [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(48): 6498-6505.
- [13] LIN L M, LI B X, XIAO J B, et al. Synergistic effect of all-trans-retinoic acid and arsenic trioxide on growth inhibition and apoptosis in human hepatoma, breast cancer, and lung cancer cells in vitro [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(36): 5633-5637.
- [14] XU H Y, YANG Y L, LIU S M, et al. Effect of arsenic trioxide on human hepatocarcinoma in nude mice [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(24): 3677-3679.

收稿日期: 2012-12-08

SPE-HPLC-DAD 同时测定大鼠血浆中斯皮诺素和 6'''-阿魏酰斯皮诺素的含量

鲍康德¹, 赵继红², 齐炼文³ (1. 浙江康莱特药业有限公司药研所, 杭州 310018; 2. 浙江康莱特新森医药原料有限公司质管部, 杭州 310018; 3. 中国药科大学天然药物国家重点实验室, 南京 210009)

摘要: 目的 建立一种便捷、灵敏定量分析酸枣仁黄酮提取物在大鼠血浆中代谢成分的方法。方法 大鼠口服酸枣仁黄酮提取物后于 0~24 h 内分别自各组大鼠眼眶后窝采血, 血样经固相萃取预处理后采用高效液相-二极管阵列检测器联用色谱法(SPE-HPLC-DAD)定量分析其主要代谢成分。结果 酸枣仁黄酮提取物在血浆中主要代谢成分仍以原形形式存在; 斯皮诺素和 6'''-阿魏酰斯皮诺素在血浆中的固相萃取平均回收率分别为 84.76% 和 84.33%; 斯皮诺素在 0.52~119.31 mg·L⁻¹ ($r > 0.999 8$), 6'''-阿魏酰斯皮诺素在 0.38~91.73 mg·L⁻¹ ($r > 0.999 7$) 内线性关系良好, 二者平均血浆药物浓度于给药后的 6 h 和 4 h 达峰值, 并在体内缓慢代谢完毕。结论 SPE-HPLC-DAD 可用于定量分析酸枣仁黄酮提取物在大鼠体内的代谢过程, 为中药主要活性成分在生物体内药理学特征研究提供了一种有效、快捷途径。

关键词: 酸枣仁黄酮提取物; 血浆; 代谢物; 固相萃取-高效液相色谱-二极管阵列检测法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2013)07-0707-05

Determination of Spinosin and 6'''-Feruloylspinosin in Rat Plasma after Oral Administration of Flavonoid Extract from *Ziziphi Spinosae* Semen by SPE-HPLC-DAD

BAO Kangde¹, ZHAO Jihong², QI Lianwen³ (1. Institute of Pharmacology, Zhejiang Kanglaite Pharma Co., Ltd., Hangzhou 310018, China; 2. Department of Quality Management, Zhejiang Kanglaite Xinsen Medicinal Material Co., Ltd., Hangzhou 310018, China; 3. State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a convenient and sensitive method for determination of flavonoid metabolites in rat plasma after oral administration of *Ziziphi Spinosae* Semen extract. **METHODS** The rat blood samples were collected from each rat by puncture of the retro-orbital sinus from 0 to 24 h after oral administration of flavonoid extract of jujube seeds, then pretreated with a Waters OASISTM SPE column using cartridges. The plasma samples were analyzed by HPLC-DAD method to detect the main metabolites. **RESULTS** The original flavonoids were the major forms of flavonoid metabolites in rat plasma. The calibration curves were linear over the range of 0.52~119.3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r > 0.999 8$) for spinosin and 0.38~91.7 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r > 0.999 7$) for 6'''-feruloylspinosin with the mean extraction recoveries as 84.76% and 84.33%, respectively. The average plasma drug concentration of them reached the top level at the 12th and 24th hour after oral administration, and disappeared

基金项目: 国家自然科学基金项目(30530870)

作者简介: 鲍康德, 男, 博士, 工程师 Tel: (0571)86571169 E-mail: bocand@163.com