

以泊洛沙姆 188 为稳定剂的番荔枝内酯纳米混悬剂的制备及其体内外研究

季宇彬^{1#}, 高艺璇^{1,2#}, 徐浩^{1,2}, 张雪洁^{1,2}, 王向涛^{1,2*}

(1. 哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076;

2. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193)

摘要: 番荔枝内酯 (annonaceous acetogenins, ACGs) 是从番荔枝科番荔枝的种子中提取分离得到的有效部位, 对多种肿瘤细胞具有良好的抗肿瘤活性。但溶解度差, 毒副作用大, 限制了其临床应用。本研究选择泊洛沙姆 (Poloxamer-188, P188) 作为药物载体, 用反溶剂沉淀法制备 ACGs 纳米混悬剂 (ACGs nanosuspensions, ACGs-NSps); 动态光散射测量粒径; 透射电镜考察形态; 高效液相考察载药量和体外药物释放, 并对 ACGs-NSps 的放置稳定性、在不同介质中的粒径变化、溶血性、冻干复溶等进行研究; 用 MTT 法考察纳米混悬剂对肿瘤细胞的生长抑制情况, 4T1 荷瘤小鼠模型考察其体内抗肿瘤效果。结果表明, ACGs-NSps 呈球形, 平均粒径 169.4 ± 1.25 nm, 多分散指数 (polydispersity index, PDI) 值为 0.130 ± 0.020 , zeta 电位 -19.8 mV, 载药量为 48.18%, 室温放置 15 天粒径未见显著变化, 可以用 0.5% 葡萄糖和 2% P188 为联合保护剂进行冻干, 144 h 缓慢释放累积达 80.82%。纳米混悬剂在各生理介质可稳定存在, 不溶血, 既能口服也能静脉注射给药。体外细胞毒性实验中, 与 ACGs 溶液相比, ACGs-NSps 对多种肿瘤细胞的生长抑制作用 (IC_{50} 值) 均显著优于 ACGs 溶液 (4T1: $0.892 \pm 0.124 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $2.495 \pm 0.108 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $P < 0.05$; HeLa: $0.747 \pm 0.051 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $2.204 \pm 0.064 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $P < 0.01$; HepG2: $2.265 \pm 0.081 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $4.159 \pm 0.071 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $P < 0.01$; MCF-7: $0.473 \pm 0.024 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $1.196 \pm 0.022 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $P < 0.05$)。体内研究表明, ACGs-NSps 每天口服给药 ($3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 抑瘤率 (67.23%) 优于同剂量油溶液的抑瘤率 (53.11%), 与隔天静脉注射 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ACGs-NSps 的抑瘤率 (70.34%) 相当。纳米混悬剂的制备, 有效解决了 ACGs 的溶解性和给药问题。P188 是 FDA 批准的静脉注射辅料, 以 P188 为稳定剂的 ACGs 纳米粒, 有望成为可在临床上应用的抗肿瘤药物。

关键词: 番荔枝内酯; 泊洛沙姆 P188; 纳米混悬剂; 抗肿瘤活性; 急性毒性

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 12-2113-09

Preparation of annonaceous acetogenins nanosuspensions using poloxamer 188 as a stabilizer and their *in vitro* and *in vivo* investigation

Ji Yu-bin^{1#}, Gao Yi-xuan^{1,2#}, Xu Hao^{1,2}, Zhang Xue-jie^{1,2}, Wang Xiang-tao^{1,2*}

(1. Life Sciences and Environmental Sciences Center, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China; 2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

Abstract: Annonaceous acetogenins (ACGs) are effective part extracted and separated from *Annona squamosa* seeds, they have good antitumor activity against a variety of tumor cells. However, the solubility of ACGs is poor with serious toxic and side effects, which greatly limits their application in clinical practice. In

收稿日期: 2018-07-25; 修回日期: 2018-08-17.

基金项目: 国家自然科学基金-广东联合基金资助项目 (U1401223).

#共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 86-10-57833266, Fax: 86-10-57833264, E-mail: xtaowang@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-2018-0677

this study poloxamer 188 (P188) was selected as a drug carrier or a stabilizer to prepare ACGs nanosuspensions (ACGs-NSps) using anti-solvent precipitation. The nanosuspensions were examined *via* dynamic light scattering (DLS) method to examine size of the nanosuspensions. Transmission electron microscopy was used to observe their morphology. HPLC assay was used to measure their drug loading content and the *in vitro* drug release. The stability of ACGs-NSps at room temperature, in various physiological media and plasma, and the hemolytic test and lyophilization were all investigated. MTT assay was performed to study the cytotoxicity of ACGs-NSps against four tumor cell lines. 4T1 bearing tumor model was used to assess their *in vivo* antitumor therapeutic efficacy. The obtained ACGs-NSps were spherical, the average particle size was 169.4 ± 1.25 nm, the polydispersity index (PDI) value was 0.130 ± 0.020 , the zeta potential was -19.8 mV and the drug loading content was 48.18%. ACGs-NSps were stable at room temperature for at least 15 days. They could be lyophilized in the presence of 0.5% glucose and 2.0% P188. ACGs-NSps showed sustained *in vitro* drug release, and the cumulative drug release reached 80.82% within 144 hours. ACGs-NSps maintained their particle size in various physiological media, and plasma with no hemolysis and then met demands of both oral and intravenous administration. In contrast to free ACGs, ACGs-NSps displayed significantly higher cytotoxicity against 4T1 (IC_{50} , $0.892 \pm 0.124 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ vs $2.495 \pm 0.108 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $P < 0.05$), HeLa (IC_{50} , $0.747 \pm 0.051 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ vs $2.204 \pm 0.064 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $P < 0.01$), HepG2 (IC_{50} , $2.265 \pm 0.081 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ vs $4.159 \pm 0.071 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $P < 0.01$), and MCF-7 (IC_{50} , $0.473 \pm 0.024 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ vs $1.196 \pm 0.022 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $P < 0.05$). The *in vivo* study demonstrated that the daily oral administration of ACGs-NSps ($3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) resulted in higher tumor inhibition rate compared to ACGs/oil solution (67.23% vs 53.11%), comparable to the intravenous injection of $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ACGs-NSps every other day (70.34%). Nanosuspensions effectively solved the problem of ACGs insolubility and difficulty in drug delivery. Using P188, a pharmaceutical adjuvant approved by FDA for *iv* injection, the resultant ACGs-NSps appear promising as an anti-tumor drug that can be used in clinic.

Key words: annonaceous acetogenins; poloxamer 188; nanosuspension; antitumor activity; acute toxicity

番荔枝内酯 (ACGs), 又称番荔枝素, 是由番荔枝科植物中分离的抗肿瘤有效部位, 由一系列结构类似的化合物组成^[1]。这些化合物在结构上通常含有 35~37 个碳原子的长链脂肪酸、1 个 α, β 不饱和键、0~3 个四氢呋喃环和 γ -内酯环^[2-4]。番荔枝内酯及从中分离得到的单一化合物对多种癌细胞均表现出强烈的抗肿瘤活性^[5]。泡番荔枝辛 (bullatacin) 是活性最强的番荔枝内酯化合物之一。从 ED_{50} 看, 对 A549 和 MCF-7 的生长抑制作用是多柔比星的 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 倍^[6], 对人白血病细胞 HL-60 的杀伤作用是一线抗癌药紫杉醇的 300 倍^[7]。ACGs 还能逆转许多肿瘤细胞系的多重耐药性 (multidrug resistance, MDR)^[8]。然而, ACGs 的溶解性差 (小于 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和较窄的治疗窗口限制了药物递送和体内抗肿瘤研究^[9, 10]此外, ACGs 是植物来源的有效部位, 是一系列具有类似结构的天然成分的混合物, 给制剂的制备也带来一些困难。目前报道的 ACGs 的制剂有乳剂^[11]、滴丸剂^[12]和固体分散剂^[13]等, 在体内研究中还有使用 ACGs 的油溶液^[14], 但这 4 种剂型载药量都很低。ACGs 本身是脂溶性长脂肪链内酯类成分, 乳剂中大量油相的存在给 ACGs 的含量测定带来很大困难。且滴丸、固体分散体和油溶液只能口服, 无法静脉注射给药。

纳米混悬剂是一种以少量辅料将难溶性药物制备成的纳米大小的颗粒, 具有极高的载药量, 可高效递送难溶药物^[15, 16], 同时可兼顾口服和静脉注射等多种给药途径^[17]。本课题组先后以 PCL-mPEG 和 TPGS 等为主要辅料, 报道了 ACGs 纳米混悬剂的制备, 显示其在解决 ACGs 溶解性的同时, 既能口服给药, 也能静脉注射, 显著提高了其体内抗肿瘤作用^[18, 19]。但这些辅料缺乏药用规格, 所制备的 ACGs 载药纳米粒在临床上暂时还不具备应用的可能性。为此, 本研究采用 FDA 批准可用于静脉注射, 且在国能通过商业途径获得药用规格的辅料为载体, 尝试制备 ACGs 纳米粒, 考察是否具有较好的稳定性和能否显著提高体内抗肿瘤药效, 以便为 ACGs 走向临床应用奠定基础^[20]。

材料与amp;方法

仪器和材料 Zetasizer Nano ZS 90 型粒度仪/电位仪 (英国 Malvern Instruments 公司); Ultimate 3000 高效液相色谱仪 (美国 Dionex 公司); Venusil C18 Plus 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); Tecan Infinite M1000 PRO 全波长多功能酶标仪 (瑞士 TECAN 公司); JSM-IT500 扫描电子显微镜 (日本电子株式会社)

社); KM-200DE 超声仪 (昆山市美美超声仪器有限公司); PLPHR 2-4 LD Plus 低温冻干机 (德国 CHRIST 有限公司); JN-3000 温控型高压均质机 (广州聚能仪器有限公司); RYJ-12B 药物透皮扩散仪 (上海黄海药检有限公司); MCO-18AC 二氧化碳培养箱 (日本 Sanyo 公司); 番荔枝总内酯 (批号 20180112)、番荔枝内酯 K19 由药用植物研究所黄文华研究员实验室提供; 泊洛沙姆 (P-188, 批号 P-7000)、泊洛沙姆 P407 (批号 P2443-250G) (美国 Sigma 公司); 卵磷脂 (SPC, 批号 A4140170, 广州汉方中药研发有限公司); 人血清白蛋白 (HSA, 批号 70024-90-7, 北京诺其雅盛生物科技有限公司); 葡萄糖 (批号 170228, 北京化工厂); 紫杉醇注射剂 (PTX, 批号 170903, 北京协和药厂)。

动物及细胞培养 Balb/c 小鼠, 雌性, 体重 17~18 g; 昆明小鼠, 雌雄各半, 体重 19~21 g, 北京华卓康动物技术有限公司提供, SPF 级, 合格证号: 11401300078017, 许可证编号: SCXK (京) 2014-004; 4T1 鼠乳腺癌细胞株、HeLa 宫颈癌细胞株、HepG2 肝癌细胞株、MCF-7 人乳腺癌细胞株 (北京协和医学院细胞中心); RPMI 1640 培养基、高糖 DMEM 培养基、胎牛血清、青链霉素双抗 (美国 Gibco 公司); 96 孔无菌培养板 (美国 Corning 公司)。

番荔枝内酯纳米混悬剂的制备及条件筛选

载体种类筛选 精密称量药物载体 P188、P407、SPC 和 HSA (0.1% 含量的载体, m/v) 各 5 mg, 分别溶于 5 mL 纯水中; 另称量 ACGs 5 mg, 用 200 μL 的有机溶剂 (甲醇、无水乙醇或丙酮) 溶解, 室温和超声 (250 W) 条件下将有机溶液缓慢滴入 5 mL 水相中, 形成带有乳光的液体, 即番荔枝内酯纳米混悬剂 (ACGs-NSps), 37 $^{\circ}\text{C}$ 减压旋转蒸发除去有机溶剂, 调整水相体积至 5 mL, 测定其粒径、电位和多分散指数 (polydispersity index, PDI) 值, 筛选出最合适的载体。

药载比筛选 精密称取 ACGs 各 5 mg, 按照 ACGs 和 P188 的重量比 (药载比) 为 1:1、5:1 和 1:5 称取相应的辅料, 按上述方法制备 ACGs-NSps 并测定, 筛选出合适的药载比。

超声功率筛选 精密称取 ACGs 10 mg, 用无水乙醇 0.5 mL 溶解, 室温下分别在 100、150、200 和 250 W 的功率下, 超声滴注到 10 mL 水相中 (含 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ P188), 按上述方法制备 ACGs-NSps 并测定, 筛选出合适的超声功率。

制备温度筛选 精密称取 ACGs 10 mg, 0.5 mL 无水乙醇溶解, 250 W 的超声功率下, 分别在温度为

4、25、37 和 45 $^{\circ}\text{C}$ 下滴注到 10 mL 水相中 (含 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ P188), 按上述方法制备 ACGs-NSps 并测定, 筛选出合适的制备温度。

采用最优制备工艺, 平行 3 次制备 ACGs-NSps, 测其粒径和表面电位。

ACGs-NSps 粒径和形态 用双纯水将 ACGs-NSps 稀释至 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 取 5 μL 滴在 300 目的铜网上, 5 min 后吸去多余液体, 自然晾干, 用 2% (w/v) 乙酸铀染色, 晾干 3 h, 使用 JEM-1400 电子显微镜观察药物颗粒的形态。

ACGs 的 HPLC 含量测定 参照文献^[6]建立番荔枝内酯 HPLC 色谱条件, 由于番荔枝内酯是混合物, 其成分中 K19 (squamocin) 含量最多, 因此将 K19 作为成分指标, 绘制标准曲线。精密称取 ACGs 10 mg 用甲醇溶解后转移到 10 mL 棕色量瓶中, 摇匀定容至刻度, 得到 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的母液, 用色谱甲醇依次稀释, 得到质量浓度分别为 5、10、25、50、75 和 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准溶液, 各取样品 20 μL 于 HPLC 进行分析, 测得的色谱峰面积 (Y) 对 ACGs 标准溶液浓度 (X) 进行线性回归得出标准曲线方程。

载药量测定 精密吸取 ACGs-NSps 5 mL 冻干称重, 即为 ACGs-NSps 的总质量 (W_1); 加入甲醇 5 mL 溶解并释放出 ACGs, 甲醇定容到 25 mL, 稀释到检测范围内, 取 200 μL 进行 HPLC 测定, 计算 5 mL ACGs-NSps 中药物质量 (W_2)。所有样品均平行 3 份, 通过下式计算载药量 (drug loading, DL):

$$\text{DL} = W_2 / W_1 \times 100\%$$

ACGs-NSps 室温放置的粒径稳定性 将制备的 ACGs-NSps 在室温下放置, 在第 0、1、3、5、7 和 15 天中, 取样品 1 mL 测定粒径及其分布, 并观察是否有肉眼可见的混浊、沉淀或悬浮物。每个样品均平行 3 份。

生理介质中 ACGs-NSps 的粒径稳定性 用 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 和 1.0% 胃蛋白酶配制人工胃液, 1.0% 胰酶和 pH 6.8 的磷酸二氢钾溶液配制人工肠液, 与 ACGs-NSps (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 按照 4:1 体积比混合, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育, 在 0、2、4、6 和 8 h, 测定指标同上。

将 ACGs-NSps (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 与 8% NaCl、10% Glu 溶液和 2 \times pH 7.4 磷酸盐缓冲液 (PBS) 按照体积比 1:1 混合, 测定指标同上。

体外血浆稳定性实验研究 观察血浆成分 (血清白蛋白和酶) 是否与 ACGs-NSps 相互作用并诱导聚集, 将 ACGs-NSps (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 与小鼠血浆 (1:4, v/v) 混合, 测定指标同上。

溶血性测定 前期研究中发现 ACGs 具有较强的溶血性, 故使用健康的小鼠红细胞进行溶血实验, 考察以 P188 为载体的 ACGs-NSps 是否能够静脉注射给药。将新鲜小鼠血液 $5\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 沉淀的红细胞用 0.9% NaCl 多次离心洗涤至上清无血色, 稀释成 4% (v/v) 的红细胞悬液。取获得的红细胞悬液 0.5 mL 分别与 0.5 mL 去离子水 (阳性对照)、0.5 mL 的 0.9% NaCl (阴性对照) 和 0.5 mL 不同质量浓度的 ACGs-NSps (0.25、0.5、1.5、2 和 2.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 以生理盐水为分散介质) 混合, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h, $5\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 在 540 nm 处测定上清液的吸光度 (A) 值。另取 0.5 mL 不同质量浓度的 ACGs-NSps (0.25、0.5、1.5、2 和 2.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 以生理盐水为分散介质), 加入生理盐水 0.5 mL, 同样条件下测定 A 值, 作为样品对照。根据以下公式计算溶血百分比 (hemolytic rate, HR):

$$\text{HR} = (A_{\text{样品}} - A_{\text{阴性对照}}) / (A_{\text{阳性对照}} - A_{\text{阴性对照}}) \times 100\%$$

药物体外释放 采用透析袋扩散法考察 ACGs-NSps 的体外释放。将 ACGs-NSps (4 mL, 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 置于截留相对分子质量 8 000~14 000 的透析袋内并浸入 2 L PBS (pH 7.4, 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 中, 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $100\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下搅拌。在特定时间间隔内, 从透析袋中精密吸取样品 50 μL , 加入 450 μL 甲醇中破坏和溶解 ACGs-NSps, 释放出游离药物, $13\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 采用 HPLC 分析含量。这种方法实测的是透析袋内剩余的药物含量, 通过与透析袋内原有的药物对比, 以减量法计算 ACGs 的累积释放度。释放介质每 24 h 更换 1 次。所有样品平行 3 份进行测定。

ACGs-NSps 冻干复溶 取 ACGs-NSps 2 mL 直接冻干, 剩余 ACGs-NSps 平均分成 3 组, 每组平行 3 份 (每份 5 mL), 以 0.5% 葡萄糖、1.5% 葡萄糖、0.5% 葡萄糖+2% P188 作为冻干保护剂, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冻 6 h, 冷冻干燥, 加入去离子水 5 mL 复溶, 观察状态, 测其粒径及其分布。

ACGs-NSps 对肿瘤细胞的体外抗肿瘤作用研究 使用 4T1、HeLa、MCF-7 和 HepG2 细胞系通过 MTT 法测定 ACGs-NSps 的细胞毒性。取消化后的细胞 150 μL 接种于 96 孔板 (每孔 1.0×10^4 个细胞) 于培养箱温育过夜。加入不同浓度的 ACGs-NSps 或游离 ACGs 的 DMSO 溶液, 孵育 48 h 后, 取 MTT 溶液 ($5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 20 μL 加入细胞后孵育 4 h。除去培养基, 每孔加入 200 μL DMSO 以溶解结晶, 在摇床上震荡 10 min 后, 通过酶标仪在 570 nm 波长下检测最大 A 值, 计算细胞抑制率 (cell inhibitory rate, CIR):

$$\text{CIR} = (1 - A_{\text{实验组}} / A_{\text{空白对照组}}) \times 100\%$$

ACGs-NSps 对 4T1 荷瘤小鼠的体内抗肿瘤药效研究 将密度长到 80%~90% 的小鼠 4T1 细胞悬浮于培养基 (每毫升 1.0×10^7 细胞) 中, 并在无菌条件下皮下注射 0.2 mL 到小鼠的右腋下。当肿瘤达到 100 mm^3 时, 将小鼠随机分成 5 组 (每组 10 只): 0.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ACGs-NSps 静脉注射组; 3 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ACGs-NSps 灌胃组; 3 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ACGs 油溶液 (原药溶于大豆油) 灌胃组; 静脉注射 6 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ PTX 作为阳性对照组; 静脉注射 0.9% 生理盐水作为阴性对照组。静脉注射组每两天给药 1 次, 灌胃组每天给药, 共给药 14 天。每两天监测体重和肿瘤体积。停药后解剖处理小鼠, 称量肿瘤和肝脾的重量, 计算体内肿瘤抑制率 (tumor inhibition rate, TIR) 和肝脾指数 (liver index, LI; spleen index, SI):

$$\text{TIR} = (1 - W_t / W_n) \times 100\%$$

$$\text{LI} = W_L / W_M$$

$$\text{SI} = W_S / W_M$$

其中, W_n 为阴性对照组的平均肿瘤重量, W_t 为实验组的平均肿瘤重量, W_L 为肝的重量, W_S 为脾的重量, W_M 为小鼠的体重。

统计学分析 使用 SPSS 软件的单因素方差分析来检验实验组之间的统计分析, * $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

结果

1 ACGs-NSps 的制备及条件筛选

1.1 载体种类的筛选 由表 1 可以看出, 在各种载体中, 当用 P188 为 ACGs 载体时粒径相对最小, 平均粒径为 163.2 nm, PDI 值为 0.080, zeta 电位为 -26.4 mV 。因此, ACGs-NSps 的制备选用 P188 作为载体。

1.2 药载比筛选 由图 1A 可见, 3 种药载比的 ACGs-NSps 的粒径都不大, 但 ACGs 和 P188 的药载比例为 1:1 时粒径较小, 粒径分布也较好。因此, 使用药载比 1:1 的 ACGs-NSps。

Table 1 Particle size, polydispersity index (PDI) value and zeta potential of annonaceous acetogenins nanosuspensions (ACGs-NSps) with different stabilizer. SPC: Soya lecithin; HAS: Human serum albumin. $n=3$, $\bar{x}\pm s$

Stabilizer	Drug /stabilizer ratio	Size/nm	PDI	Zeta /mV
P188	1 : 1	163.2 \pm 1.153	0.080 \pm 0.011	-26.4
P407	1 : 1	192.5 \pm 1.756	0.151 \pm 0.034	-15.6
SPC	1 : 1	210.7 \pm 13.60	0.291 \pm 0.031	-20.3
HSA	1 : 1	367.5 \pm 26.53	0.383 \pm 0.005	-18.9

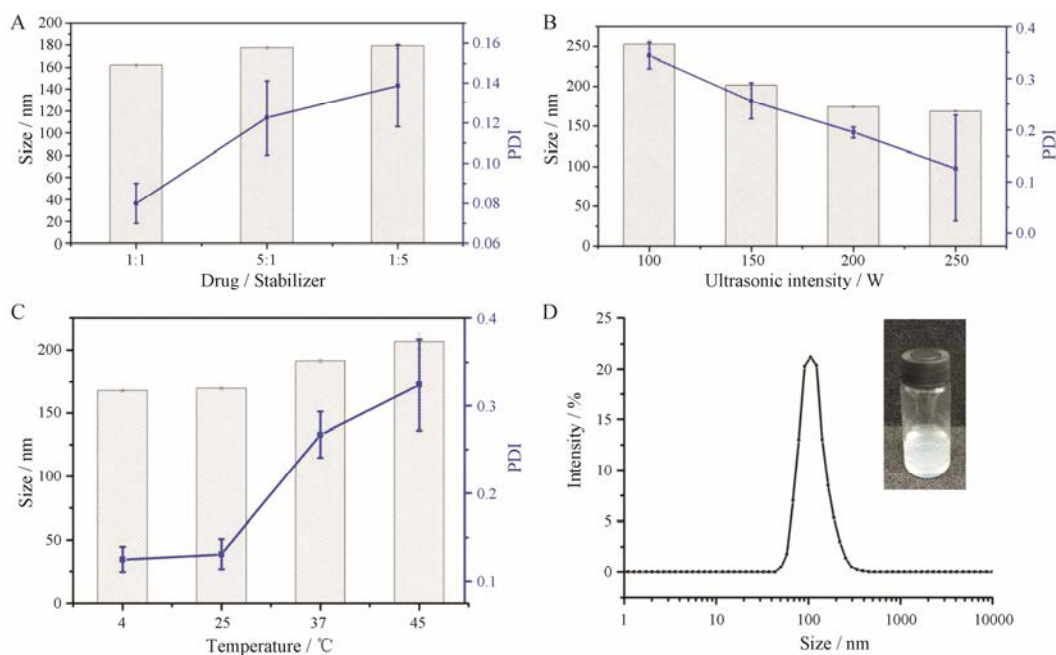


Figure 1 Particle size and PDI of ACGs-NSps with different drug-stabilizer ratios (A). The impact of ultrasonic intensity on ACGs-NSps (B). The impact of different preparation temperature on particle size of Quercetin-NSps (C). $n=3$, $\bar{x} \pm s$. Particle size, distribution and image of ACGs-NSps (D)

1.3 超声功率筛选 由图 1B 可见, 粒径随功率大小的变化, 当超声功率逐渐增强, 制备的粒径也不断变小。功率为 200 W 和 250 W 时粒径接近, 为便于后续研究, 选择 250 W 作为 ACGs-NSps 的制备功率。

1.4 制备温度筛选 由图 1C 可见, 随着制备温度升高, 所得纳米粒的粒径也随之增大。温度为 4 °C 和 25 °C 时粒径接近。从制备方便考虑, 选择 25 °C 作为 ACGs-NSps 的最适制备温度。

综上, 以 P188 为载体制备 ACGs-NSps 的最优方案: 药载比 1 : 1, 将 ACGs 的乙醇溶液在 25 °C 和 250 W 超声滴注到水相, 减压旋转蒸发除去有机溶剂。按照最优方案制备的 ACGs-NSps 实物照片和粒径分布如图 1D 所示, 平均粒径约 160 nm 左右, 粒径分布均匀。

2 ACGs-NSps 的表征

2.1 ACGs 的标准曲线的建立 通过标准曲线方法建立得到 ACGs 标准曲线方程 $Y=0.0975X-0.0385$, $R^2=0.9999$, 检测范围为 $5\sim 100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。药物浓度和峰面积符合线性关系, 精密性、准确度和最低检测限均良好, 符合测定要求。

2.2 ACGs-NSps 的形态和载药量 电镜下 ACGs-NSps 呈圆整的球形 (图 2), 实测载药量为 48.18%, 与理论值比较接近。

2.3 ACGs-NSps 放置稳定性 ACGs-NSps 在室温下连续放置 15 天, 期间测定 6 次粒径, 发现粒径尺

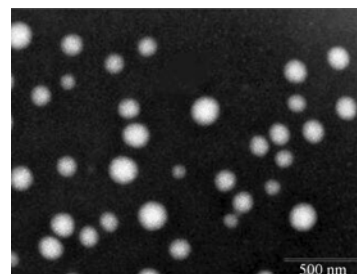


Figure 2 Transmission electron microscope images of ACGs-NSps

寸变化不大 (图 3A), 溶液未见沉淀浑浊现象, 说明 ACGs-NSps 可在此时间内稳定存放。

2.4 ACGs-NSps 在生理介质中的粒径稳定性和溶血性 制备的 ACGs-NSps 与生理盐水、PBS 或 5% 葡萄糖在 37 °C 孵育 4 h 后, 粒径略有增加 (图 3B); 孵育 8 h 时, 粒径增加不到 30 nm, 说明以 P188 为稳定剂制备的 ACGs-NSps 具有较好的生理介质稳定性。与人工胃液或人工肠液孵育 8 h 后也是如此, 同时未见有肉眼可见的颗粒物出现。

血浆含有各种血清白蛋白和酶, 可能吸附在纳米粒的表面并改变其表面性质。这些变化可能导致粒径增大甚至形成大颗粒聚集, 带来堵塞血管等潜在的安全隐患。为此, 将 $1\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ACGs-NSps 与小鼠血浆于 37 °C 温育, 定时测定粒径尺寸和 PDI 值。结果孵育 8 h 内, ACGs-NSps 粒径略有增加, 但未见大颗粒出现。

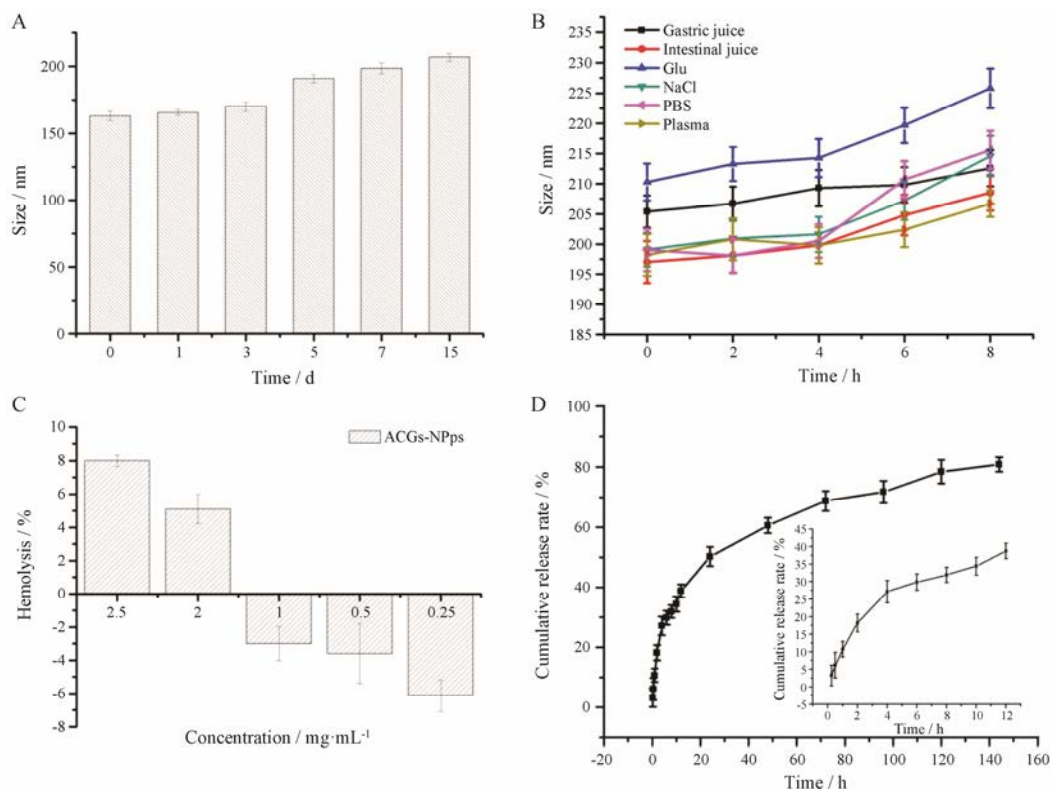


Figure 3 The characterization of ACGs-NSPs. The placement stability of ACGs-NSPs (A). The particle size change of ACGs-NSPs in different media (B). Hemolysis rate of ACGs-NSPs in different concentrations (C). Cumulative ACGs release from ACGs-NSPs in PBS at 37°C with in 144 h (D). $n=3, \bar{x} \pm s$

纳米粒系统在静脉内给药时不应该有溶血现象。ACGs 自身具有强烈的溶血作用，但制备成纳米混悬剂后发现，当药物稀释到 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时溶血率低于 10%； $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 及更低浓度时，完全不溶血 (图 3C)。

综上，制备的 ACGs-NSPs 在生理盐水、PBS、5% 葡萄糖和血浆中粒径没有明显变化，同时质量浓度低于 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时完全不溶血，从而满足静脉注射给药的基本要求，可以静脉给药。

2.5 药物体外释放 ACGs-NSPs 的体外释放大体有两个阶段：0~12 h 释放相对较快和 12~144 h 释放缓慢，共累积释放了 80.82% (图 3D)，其释放基本符合一级动力学方程 (表 2)。ACGs-NSPs 在前 4 h 大约释放 27%，这可能是由于吸附在纳米混悬剂表面或分布于纳米混悬剂浅表的 ACGs 快速释放的结果。

2.6 ACGs-NSPs 冻干复溶 本文分别选用 0.5% 葡

萄糖、1.5% 葡萄糖和 0.5% 葡萄糖/2% P188 作为冻干保护剂复溶，结果如表 3。直接冻干的 ACGs-NSPs 复溶振荡后有细小悬浮物，超声后粒径尺寸显著增大。当用 0.5% 葡萄糖/2% P188 联合作为冻干保护剂时，冻干的粉末加水后快速分散且平均粒径最小，为 189.5 nm。因而，初步选用 0.5% 葡萄糖/2% P188 为联合冻干保护剂，对 ACGs-NSPs 进行冻干。

Table 3 The particle size of ACGs-NSPs reconstituted after lyophilization using different lyoprotectants. $n=3, \bar{x} \pm s$

Lyoprotectant	Ratio/%	Size/nm	PDI	Zeta/mV
ACGs	—		Precipitation	
Glucose	0.5	222.7	0.283 ± 0.127	-10.11
Glucose	1.5	249.7	0.234 ± 0.089	-12.8
Glucose/P188	0.5	189.5	0.200 ± 0.091	-16.6

3 ACGs-NSPs 体内外药效学研究

3.1 ACGs-NSPs 对肿瘤细胞的毒性实验 由图 4 可知，ACGs-NSPs 在绝大多数浓度下，对 4T1、HeLa、MCF-7 和 HepG2 细胞株的生长抑制作用均显著强于 ACGs 游离药物 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。由 IC_{50} 值 (表 4) 显示，ACGs-NSPs 对 4 种细胞株的体外抗肿瘤也均显著优于 ACGs 游离药物 ($P < 0.05$ 或

Table 2 The fit curves of drug release from ACGs-NSPs in phosphate buffered saline

Type	Equation	R^2
Zera-order	$Q = 0.491 22 t + 22.792 92$	0.900 38
First-order	$Q = 72.145 01 (1 - e^{-0.070 19t})$	0.981 2
Higuchi	$Q = 6.541 8 t^{1/2} + 9.944 9$	0.950 1

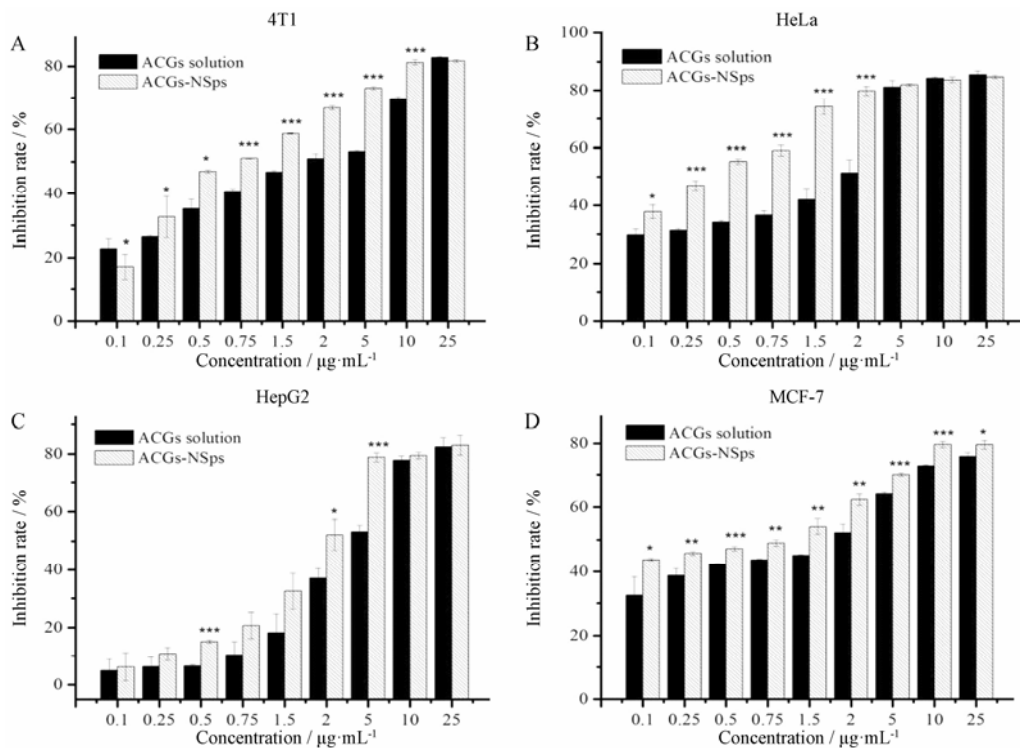


Figure 4 The growth inhibition rate of ACGs-NSPs and ACGs solution against 4T1 cells (A), HeLa cells (B), HepG2 cells (C) and MCF-7 cells (D). $n=6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs ACGs solution

Table 4 IC_{50} values of ACGs-NSPs and ACGs solution against 4T1, HeLa, HepG2 and MCF-7 cell lines. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs ACGs solution

Cell line	IC_{50} value	
	ACGs solution/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	ACGs-NSPs/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
4T1	2.495 ± 0.108	$0.892 \pm 0.124^*$
HeLa	2.204 ± 0.064	$0.747 \pm 0.051^{**}$
HepG2	4.159 ± 0.071	$2.265 \pm 0.081^{**}$
MCF-7	1.196 ± 0.022	$0.473 \pm 0.024^*$

$P < 0.01$), 原因是纳米粒与细胞的非特异性相互作用及随后的入胞增加了细胞对载药纳米粒的摄取, 同时说明 ACGs-NSPs 提高了 ACGs 的抗肿瘤活性。从敏感性程度看, MCF-7 对游离的 ACGs 和 ACGs-NSPs 最为敏感, HepG2 最不敏感。

3.2 ACGs-NSPs 对 4T1 荷瘤小鼠的体内抗肿瘤活性

用 4T1 荷瘤鼠对 ACGs-NSPs 的体内抗肿瘤药效进行评估。由各组小鼠肿瘤体积随时间变化曲线 (图 5A) 可知, 阴性对照组的肿瘤体积快速增长, 实验终点时远大于各实验组 ($P < 0.001$); $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量下灌胃给药的油溶液和 ACGs-NSPs 肿瘤体积变化曲线比较接近; $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量下隔天注射给药的 ACGs-NSPs 肿瘤体积增长最为缓慢, 与 $8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PTX 注射液效果相似并略好。

由表 5 可知, 阳性药 PTX 注射液 ($8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, *iv*) 抑瘤率为 55.08%, ACGs 油溶液 ($3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 抑瘤率为 53.11%; 而 ACGs-NSPs 灌胃 ($3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和静脉注射 ($0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 抑瘤率分别为 67.23% 和 70.34%, 均高于阳性对照药, 提示 ACGs 是比 PTX 抗肿瘤活性更强的药物。相同剂量下, 灌胃给药 ACGs-NSPs 的抑瘤率高于 ACGs 油溶液 (分别 67.23% 和 53.11%),

Table 5 The *in vivo* antitumor inhibition rate of ACGs-NSPs, paclitaxel (PTX) injections and ACGs oil solution in 4T1 tumor-bearing mice and the index of liver and spleen. $n=8$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs normal saline group; # $P < 0.05$ vs ACGs oil solution

Formulation	Tumor weight/g	Inhibition rate/%	Liver index	Spleen index
Normal saline	3.540 ± 0.204	—	0.045 ± 0.004	0.031 ± 0.003
PTX injections ($8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, <i>iv</i>)	$1.593 \pm 0.198^{***}$	55.08	0.046 ± 0.005	0.029 ± 0.004
ACGs oil solution ($3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, <i>ig</i>)	$1.664 \pm 0.215^{***}$	53.11	0.054 ± 0.008	0.022 ± 0.005
ACGs-NSPs ($0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, <i>iv</i>)	$1.062 \pm 0.236^{***\#}$	70.34	0.049 ± 0.004	0.032 ± 0.003
ACGs-NSPs ($3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, <i>ig</i>)	$1.160 \pm 0.301^{***\#}$	67.23	0.05 ± 0.004	0.032 ± 0.004

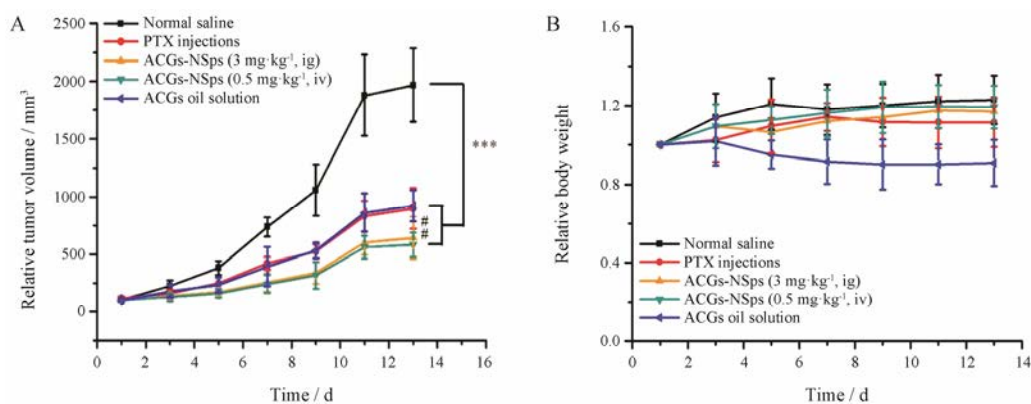


Figure 5 The change of tumor volume of 4T1 tumor-bearing mice after administration of ACGs-NSPs, PTX injections, normal saline and ACGs oil solution (A). $n=10$, $\bar{x} \pm s$. $***P < 0.001$; $\#\#P < 0.01$. The body weight change of 4T1 tumor-bearing mice after administration of ACGs-NSPs, PTX injections, normal saline and ACGs oil solution (B) $n=8$, $\bar{x} \pm s$

显示纳米混悬剂比油溶液具有更好的口服生物利用度。虽然在肝脾指数上, ACGs-NSPs 与油溶液比较没有显著不同 (表 5), 但实验中其他各组小鼠的体重都有所增长, 只有给予油溶液的小鼠体重明显下降 (图 5B), 提示油溶液具有较强的毒副作用。实验过程中也观察到油溶液组小鼠出现静卧和蜷缩等现象, 而其他各组小鼠未见异常行为。这些结果提示, 与油溶液相比, ACGs-NSPs 灌胃同时具有增效和减毒两方面的作用。ACGs-NSPs 静脉注射, 在隔天给药和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的低剂量下, 比灌胃给药 ($3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 具有更高的抑瘤率 (分别为 70.34% 和 67.23%), 除了静脉注射具有完全的生物利用度外, 主要的原因可能在于 ACGs-NSPs 静脉注射改变了 ACGs 的组织分布, 如由于 EPR 效应在肿瘤组织有更高的蓄积^[6]。

讨论

从可用于静脉注射的辅料中, 筛选出 P188 制备 ACGs-NSPs, 其平均粒径 169.4 nm, PDI 值为 0.130, zeta 电位 -19.8 mV , 载药量高达 48.18%, 室温放置 15 天, 粒径未见显著变化, 以 0.5% 葡萄糖和 2% P188 为联合保护剂进行冻干, 加水分散后粒径相似。ACGs-NSPs 既可静脉注射, 也可口服给药, 成功解决了 ACGs 的难溶和难给药问题。纳米混悬剂通过内吞作用显著提高了 ACGs 对 3 种肿瘤细胞的体外抗肿瘤作用。

在 4T1 荷瘤鼠模型上, 肿瘤体积变化曲线终点时显示的肿瘤抑制情况 (图 5A) 与以瘤重为基础计算的肿瘤抑制率略有不同, 这种情况下通常以瘤重抑瘤率为准。这是因为小鼠肿瘤形状多不规则, 不同测量者的手法和把握尺度松紧也有不同, 这些都会带来一些误差, 而实验结束后剖取肿瘤称重比较客观和准

确, 据此计算出来的肿瘤抑制率也更为可靠。本研究中, ACGs-NSPs 有效提高了 ACGs 的肿瘤治疗效果。

对于细胞毒药物来说, 灌胃给药应关注对胃肠刺激性。本研究药效实验结束后, 对 ACGs-NSPs 灌胃给药组与阴性对照组的胃、小肠和大肠外观进行了检查, 结果未发现有肉眼可见的异常。这可能与 ACGs-NSPs 具有较好的缓释作用、药物局部浓度不高有关。抗肿瘤药物通常需要在较长时间内连续用药, 多次给药对胃肠的反复刺激是否会带来不良反应需要在以后的工作中继续探索。

综上, 以 P188 为稳定剂制备的 ACGs-NSPs 口服给药有望发展成为一种可在临床上应用的有效抗肿瘤药物。

References

- [1] Ye JB, Wen JJ, Lin YQ, et al. Inhibition of annonaceous acetogenins on cell activities of human gastric cancer cells *in vitro* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2017, 48: 2895–2901.
- [2] Yuan F, Bai GG, Miao JJ, et al. Effects of annonaceous acetogenins against multidrug resistant human breast cancer cell line MCF-7/ADR *in vitro* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2014, 45: 2815–2819.
- [3] Li NG, Shi ZH, Tang YP, et al. Progress in total synthesis of annonaceous acetogenins from *Annonaceae* [J]. Chin J Organ Chem (有机化学), 2009, 29: 350–364.
- [4] Wang Y, Qiu HL, Chen JW, et al. Study on acute and cumulative toxicity of total annonaceous acetogenins [J]. Chin J New Drugs Clin Rem (中国新药与临床杂志), 2013, 32: 712–715.
- [5] Xu ZF, Wei XY, Xie HH, et al. Inhibition of oxygen consumption by annonaceous acetogenins in liver cell respiration

- and their structure-activity relationship [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2002, 37: 818–820.
- [6] Hong J, Li Y, Xiao Y, et al. Annonaceous acetogenins (ACGs) nanosuspensions based on a self-assembly stabilizer and the significantly improved anti-tumor efficacy [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2016, 145: 319–327.
- [7] Yu YL, Su KJ, Chen CJ, et al. Synergistic anti-tumor activity of isochailulactone and paclitaxel on human lung cancer cells [J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227: 213–222.
- [8] Pinto NCC, Silva JB, Menegati LM, et al. Cytotoxicity and bacterial membrane destabilization induced by *Annona squamosa* L. extracts [J]. *An Acad Bras Cienc*, 2017, 89: 2053–2073.
- [9] Miao YJ, Shi YY, Xu XF, et al. Three cytotoxic annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa* [J]. *Phytochem Lett*, 2016, 16: 92–96.
- [10] Chen YJ, Jin S, Xi J, et al. New cytotoxic annonaceous acetogenin mimetics having a nitrogen-heterocyclic terminal and their application to cell imaging [J]. *Tetrahedron*, 2014, 70: 4921–4928.
- [11] Pan XP, Wu P, Lin LD. Determination of the total content of annonaceous acetogenins in Anuoning emulsion injection by colorimetry [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2007, 27: 1658–1659.
- [12] Dang YJ, Feng HZ, Zhang L, et al. *In situ* absorption in rat intestinal tract of solid dispersion of annonaceous acetogenins [J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2012, 8: 879–812.
- [13] Xu SS, Li X, Chen JW, et al. Preparation technology and determination of annonaceous acetogenins dripping pill [J]. *Exp Tradit Med Formul (中国实验方剂学杂志)*, 2012, 10: 16–19.
- [14] Chen Y, Xu SS, Chen JW, et al. Anti-tumor activity of *Annona squamosa* seeds extract containing annonaceous acetogenin compounds [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 142: 462–466.
- [15] Dang QL, Kim WK, Nguyen CM, et al. Nematicidal and antifungal activities of annonaceous acetogenins from *Annona squamosa* against various plant pathogens [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59: 11160–11167.
- [16] Liaw CC, Wu TY, Chang FR, et al. Historic perspectives on annonaceous acetogenins from the chemical bench to pre-clinical trials [J]. *Planta Med*, 2010, 76: 1390–1404.
- [17] Tietze R, Zaloga J, Unterweger H, et al. Magnetic nanoparticle-based drug delivery for cancer therapy [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 468: 463–470.
- [18] Gao HL, Jiang XG. The development of novel tumor targeting delivery strategy [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 272–280.
- [19] Sun WJ, Xiao Y, Zhang MZ, et al. Preparation of annonaceous acetogenins nanosuspensions and their antitumor effect [J]. *Drug Eva Res (药物评价研究)*, 2016, 39: 966–972.
- [20] Hong JY, Sun ZH, Li YJ, et al. Folate modified annonaceous acetogenins (ACGs) nanosuspensions and their improved anti-tumor efficacy [J]. *Int J Nanomed*, 2017, 12: 5053–5067.