

和厚朴酚纳米混悬剂的制备及其体内外研究

季宇彬^{1#}, 周欣欣^{1,2#}, 国瑞琪^{2,3}, 聂凡茹^{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; 3. 哈尔滨工业大学生命科学与技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150080)

摘要: 和厚朴酚 (honokiol, HK) 具有多种药理学活性, 但难溶于水, 稳定性差, 限制了其临床应用。本研究拟制备其纳米混悬剂以解决上述问题。采用反溶剂沉淀法, 使用聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)、牛血清白蛋白 (BSA) 为复合稳定剂, 制备 HK 纳米混悬剂; 用动态光散射测定其粒径大小, 透射电镜观察其形态, 在室温及不同介质中放置观察 HK 纳米混悬剂稳定性; 体外透析测定其释放情况; MTT 法检测 HK 纳米混悬剂对 4T1 乳腺癌细胞的生长抑制; 在 4T1 荷瘤小鼠模型上考察其体内的抗肿瘤效果。结果表明, 制备的 HK 纳米混悬剂为类球形, 载药量为 48.62%, 稳定性较好, 平均粒径为 (83.40 ± 1.042) nm, 多分散系数为 0.223 ± 0.011 , zeta 电位为 (-42.2 ± 1.2) mV; 体外缓慢释放药物; HK 纳米混悬剂对 4T1 细胞毒性明显高于溶液组 (IC_{50} , $8.36 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $37.58 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $P < 0.05$)。在体内, HK 纳米混悬剂对肿瘤的抑制具有良好的剂量依赖性; 中、高剂量的 HK 纳米混悬剂 (40 和 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 2 天 1 次) 对肿瘤抑瘤率分别为 55.67% 和 67.28%, 显著高于紫杉醇注射液 (47.9%)。而高剂量 HK 原料药 ($60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 每天口服给药, 肿瘤抑瘤率只有 54.13%。综上, 本研究制备的 HK 纳米混悬剂粒径小、载药量高、稳定性较好, 解决了难溶和难给药问题, 显著提高了体内外抗肿瘤作用, 有望成为一种有前景的抗肿瘤制剂。

关键词: 和厚朴酚; 纳米混悬剂; 乳腺癌; 抗肿瘤

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 01-0133-08

Honokiol nanosuspensions: preparation, *in vitro* and *in vivo* evaluation

Ji Yu-bin^{1#}, Zhou Xin-xin^{1,2#}, Guo Rui-qi^{2,3}, Nie Fan-ru^{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; 3. School of Life Science and Technology, Harbin Institute of Technology, Harbin 150080, China)

Abstract: Honokiol (HK) have extensive pharmacological activities, but its poor solubility and instability restricted its clinical application and efficacy exertion. HK nanosuspensions (HK-NSps) were designed in this study in order to solve the problems. HK-NSps were prepared by antisolvent precipitation method, using polyvinylpyrrolidone (PVP) and bovine serum albumin (BSA) as a combined stabilizer. The particle size was measured using dynamic light scattering method, the morphology was observed by transmission electron microscopy. The size change and drug content of HK-NSps in various physiological media during the storage at ambient temperature was examined to evaluate their storage stability. Dialysis method was used to study their drug release *in vitro*. MTT assay was used to assess their *in vitro* cytotoxicity against 4T1 breast cancer cell line. Anti-tumor effect *in vivo* was also investigated in 4T1 tumor-bearing mice. HK-NSps were prepared with high drug loading content of 48.62%, nearly spherical shape and good storage stability. The average particle

收稿日期: 2017-08-07; 修回日期: 2017-09-25.

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 / Fax: 86-10-57833264, E-mail: xtaowang@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0766

size was (83.40 ± 1.042) nm, the polydispersity index (PDI) value was 0.223 ± 0.011 , the zeta potential was (-42.2 ± 1.2) mV. HK-NSPs showed sustained *in vitro* drug release and enhanced cytotoxicity in contrast to free HK against 4T1 cells (IC_{50} , $8.36 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ vs $37.58 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $P < 0.05$). The *in vivo* study on 4T1 tumor-bearing mice demonstrated that HK-NSPs showed good dose-dependent tumor inhibition rate (TIR). In contrast to $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ of PTX injection (TIR, 47.9%), medium and high dose of HK-NSPs displayed improved therapeutic efficacy (TIR, 55.67% for $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 67.28% for $60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $P < 0.05$). In contrast, the high dose of HK crude drug ($60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) had TIR of only 54.13% even administrated every day. In conclusion, HK-NSPs were prepared with small size, high drug-loading capacity, and good stability. The improved *in vitro* and *in vivo* antitumor efficacy demonstrated that HK can be a promising antitumor drug in combination with nanosuspensions technology.

Key words: honokiol; nanosuspension; breast cancer; antitumor

和厚朴酚 (honokiol, HK) 是厚朴中最为主要的两个活性成分之一, 具有多种生物学活性, 如抗菌、抗炎、中枢性肌肉松弛、神经抑制、降低胆固醇、抗血小板凝聚和抗肿瘤等^[1-4]。和厚朴酚几乎不溶于水, 很难制备成普通的水溶性注射剂, 这使其药效不能充分发挥, 限制了其体内作用^[5]。研究显示^[6, 7], HK 可有效抑制 MCF-7、4T1 等多种乳腺癌细胞的增殖。Zhang 等^[7]研究了 HK 脂质体联合多柔比星抑制 4T1 细胞增殖的机制, 但其仅限于体外研究, 且主要内容则为联合用药和逆转多药耐药性。HK 单独用于抑制乳腺癌细胞的体内研究不多见。乳腺癌作为我国女性高发的恶性肿瘤, 临床多用的手术治疗严重影响了患者的日后生活质量。而 HK 广泛的抗肿瘤作用^[8-12], 有望给患者带来新的应对手段。

针对 HK 制剂的研究报道并不少见, 大多通过物理包封或化学偶联的方法制备 HK 脂质体^[13]、胶束^[14]等高分子载药系统, 以改善其理化性质, 提高其生物利用度。纳米混悬剂 (NSPs) 作为一种新剂型, 在药物中加入少量表面活性剂作为稳定剂高度分散于分散介质中, 形成粒径在 $10 \sim 1000$ nm 的亚微粒交替分散系统。本文应用沉淀法制备纳米混悬剂, 先将难溶性药物溶解, 再将其滴入反溶剂中, 使药物达到饱和而析出结晶^[15]。

据文献^[16, 17]报道, 聚乙烯吡咯烷酮 (polyvinylpyrrolidone, PVP) 可置换粒子表面 H_2O 及 OH^- 产生吸附层, 降低粒子表面自由能, 防止粒子聚集。随着 PVP 增加, 粒子在溶液中稳定性亦随之增加, 并且疏水性的 HK 与血浆蛋白较好结合, 同时血浆蛋白也是一种优良静脉注射辅料, 可以作为稳定剂来制备 HK 纳米混悬剂, 应用牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 作为一种稳定剂亦可防止 HK 被氧化, 并使给药系统具有一定的靶向性, 结构中多个疏水

性的部位能与中性及带负电疏水性相结合, 提高药物在水溶液中的稳定性, 自身形成的交联结构保护药物免被破坏。本文利用 PVP 和 BSA 作为联合稳定剂制备 HK 纳米混悬剂 (HK-NSPs), 将 HK 包封在纳米粒内核改善其氧化不稳定的缺点, 体内外研究均显示显著提高了抗肿瘤效果。

材料与方法

仪器和材料 Zetasizer Nano ZS 90 型粒度仪/电位仪 (英国 Malvern Instruments 公司); Ultimate 3000 Series 高效液相色谱仪 (美国 Dionex 有限公司); Maisch Symmetry C18 色谱柱 ($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); Tecan M1000 多功能连续波长酶标仪 (瑞士); JEM-1400 透射电子显微镜 (日本电子株式会社)。HK (上海士峰生物科技有限公司, 纯度 98.0%, 批号 35354-74-6); 聚乙烯吡咯烷酮 (K30, 批号 0712109, 分析纯)、羟丙基甲基纤维素 (hydroxypropyl methyl cellulose, HPMC)、Tween-80 (批号 1082106)、实验用水为去离子水、丙酮、二甲基亚砜 (DMSO) (国药集团化学试剂有限公司); BSA (北京冬哥生物科技有限公司, 批号 20110310); 聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol, PVA, 货号: P4019, 美国 Alfa Aesar 公司); 泊洛沙姆 (Poloxamer 188, P-188, 货号: P-7000, 美国 Sigma 公司); 紫杉醇注射液 (paclitaxel, PTX, 北京协和药厂, 国药准字 H10980069, 批号 151108); 乙腈 (色谱纯, HiPure Chem 公司)。

动物及细胞培养 健康 Balb/c 小鼠, 雌性, 体重 $18 \sim 20 \text{ g}$ (北京维通利华实验动物技术有限公司, SPF 级, 合格证号: 11400700215055, 许可证编号: SCXK (京) 2016-0011)。4T1 乳腺癌细胞株 (北京协和医学院基础医学研究所细胞中心); RPMI 1640 培养基、胎牛血清、青霉素和链霉素双抗 (美国 Gibco 公司);

96 孔无菌培养板 (美国 Corning 公司)。

HK-NSps 制备及条件筛选

稳定剂种类考察 分别精密称取 HPMC、PVA、PVP、P-188、Tween-80、BSA、P-188/BSA 和 PVP/BSA (含量均为 0.25%, m/v) 作为稳定剂溶解于 20 mL 去离子水, HK 100 mg 溶解于 4 mL 丙酮, 在超声条件下 (25 °C、250 W), 将有机相注入到水相中制备纳米混悬剂, 45 °C 减压旋转蒸发除去丙酮, 考察不同稳定剂对 HK-NSps 粒径的影响。

超声功率的考察 精密称取 BSA 50 mg、PVP 50 mg 作为稳定剂共同溶解于 20 mL 去离子水, HK 100 mg 溶解于 4 mL 丙酮, 分别在 100 W、250 W 和 500 W 超声功率, 超声温度 25 °C 下将有机相注入到水相中制备纳米混悬剂, 45 °C 减压旋转蒸发除去丙酮, 考察不同功率对 HK-NSps 粒径的影响。

PVP 与 BSA 比例的考察 精密称取 BSA 和 PVP 作为稳定剂共同溶解于 20 mL 去离子水 (三者质量比满足 $m_{HK}/m_{(BSA+PVP)}=1/1$), HK 100 mg 溶解于 4 mL 丙酮, 在超声条件下 (25 °C、250 W) 将有机相注入到水相中, 分别在 PVP/BSA 比例为 1:3、1:1 和 3:1 下制备纳米混悬剂, 45 °C 减压旋转蒸发除去丙酮, 考察不同比例条件下对 HK-NSps 粒径的影响。

制备温度的考察 精密称取 BSA 50 mg、PVP 50 mg 作为稳定剂共同溶解于 20 mL 去离子水, HK 100 mg 溶解于 4 mL 丙酮, 分别在 5 °C、25 °C 和 45 °C 超声温度, 超声功率 250 W 下将有机相注入到水相中制备纳米混悬剂, 45 °C 减压旋转蒸发除去丙酮, 考察不同超声温度下对 HK-NSps 粒径的影响。

HK-NSps 的体外评价

透射电镜表征 以 HK 含量计, 将制备的 HK-NSps 用去离子水稀释至 0.1 $g \cdot L^{-1}$, 取 5 μL 滴在 300 目的铜网上, 5 min 后吸去多余样品, 于阴凉晾干, 10 min 后用 0.5% 醋酸铀溶液 5 μL 染色 90 s, 自然晾干 3 h, 于透射电镜下观察、拍照, 加速电压为 80 kV。

载药量的测定 参照文献^[18]建立 HK 高效液相色谱条件, 建立标准曲线: 精密称取 HK 5 mg 于 25 mL 棕色量瓶中, 乙醇溶解、定容至刻度, 摇匀, 得到 200 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 母液, 以色谱乙醇逐步稀释, 得到一系列浓度分别为 200、150、100、75、50、20、10、5 和 1 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 标准溶液, 各取 20 μL 进行 HPLC 分析, 以色谱峰面积 (Y) 对 HK 标准溶液浓度 (X , $\mu g \cdot mL^{-1}$) 进行加权最小二乘法, 得到 HK 标准曲线方程 $Y = 0.7943X - 0.5558$, $R^2 = 0.9998$, 线性范围为 1~200 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 。

取制备的 HK-NSps 10 mL 冻干, 精密称量冻干

粉的重量为 W_2 。用甲醇充分溶解破坏纳米粒, 使 HK 释放, HPLC 测定冻干粉中 HK 所占重量为 W_1 。按照如下公式计算载药量 (DL):

$$DL = (W_1/W_2) \times 100\%$$

HK-NSps 室温放置稳定性考察 精密吸取 HK-NSps 溶液 3 mL, 在室温下 (25 °C) 放置, 考察其粒径随时间的变化, 分别在 0、2、4、6、10、15 和 30 天取样, 用 Zetasizer nano ZS 考察其平均粒径随时间的变化。另精密吸取 HK-NSps 4 mL, 用甲醇充分溶解破坏纳米粒, 使 HK 释放, HPLC 测定 15 天内 HK 含量变化。

不同介质中的粒径稳定性考察 精密吸取 HK-NSps 1 mL, 分别滴加到等体积的 2×PBS (磷酸盐缓冲液, pH 7.4)、1.8% NaCl 溶液和 10% 葡萄糖溶液, 于 4 倍体积的人工胃液、人工肠液中 37 °C 孵育, 不同时间点取样测定粒径变化。

人工胃肠液 是按照《中国药典》中的方法进行配制。人工胃液: 取 1 $mol \cdot L^{-1}$ 稀盐酸 16.4 mL, 加蒸馏水 800 mL, 胃蛋白酶 10 g, 混匀, 加水稀释至 1 L; 人工肠液: 磷酸二氢钾 6.8 g 加水 500 mL, 用 0.1 $mol \cdot L^{-1}$ NaOH 调 pH 6.8, 另取胰蛋白 10 g, 加水溶解, 两液混合, 加水稀释至 1L。

使用时取配制的人工胃肠液各 4 mL 放置于离心管中, 10000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 10 min 后, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 与 HK-NSps 按 4/1 体积比混合, 从 0 h 开始间隔测定粒径。

体外释放 精密吸取 HK-NSps 溶液 1 mL 于透析袋 (MWCO 8000~14000) 中, 放置在 50 mL 具塞锥形瓶中, 以 40 mL 含有 0.2% Tween-80 的 PBS 为释放介质, 100 $r \cdot min^{-1}$ 磁力搅拌下在 37 °C 恒温释放。分别在 15、30 min 和 1、2、4、6、8、10、12、24、36、48、60、72、84 h 取 1 mL 释放外液, HPLC 测量释放介质中的药物含量, 计算累计释放率。每次取样后立即补充等温、新鲜的释放介质 1 mL, 每 24 h 完全更换释放外液。另取 HK 乙醇溶液和 HK 混悬液 (将 HK 药物粉末直接分散在纯水中超声而得), 以同样的方法考察体外释放。释放介质满足漏槽条件, 同一样品平行实验 3 份。

HK-NSps 体内药效学研究

HK-NSps 对小鼠乳腺癌 (4T1) 细胞的抑制率 将 HK-NSps 以不含胎牛血清的培养基稀释成不同浓度备用, 同时将 HK 以 DMSO 溶解后以同样的培养基稀释成不同浓度。在 37 °C、5% CO_2 细胞培养箱中用含 10% 胎牛血清、100 $u \cdot mL^{-1}$ 青-链霉素的 1640 培养液

培养 4T1 细胞, 细胞生长到对数期时用培养液配成单个细胞悬液, 以每孔 1×10^4 个细胞接种于 96 孔板中, 继续培养 4T1 细胞。24 h 后弃去培养液, 各孔加 200 μL 含 HK 质量浓度分别为 0 (对照组)、0.5、2.5、5、10、15、20、25 和 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 HK-NSPs 和 HK 溶液, 每个浓度 6 个复孔, 置于细胞培养箱中继续培养。24 h 后各孔加入以 PBS 配制的 5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 无菌 MTT 溶液 20 μL , 继续孵育 4 h 后终止培养, 吸去每孔内液并加入 DMSO 200 μL , 充分震荡 10 min, 用酶标仪测其在 570 nm 波长处测定光吸收值 (A)。计算不同浓度对 4T1 细胞抑制率 (CI), 并根据 GraphPad Prism 软件计算半数抑制浓度 (IC_{50})。

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

HK-NSPs 体内药效学实验 液氮冻存的鼠源性 4T1 细胞复苏, 培养到对数期后消化成细胞悬液, 用 PBS 调整 4T1 细胞悬液浓度至每毫升 1×10^7 个瘤细胞。取 Balb/c 小鼠, 于右侧腋窝皮下接种 4T1 细胞悬液 0.2 mL, 接种一段时间后筛选出肿瘤大小相对一致且肿瘤体积约 200 mm^3 的小鼠 60 只进行实验。

将筛选出的 60 只 Balb/c 小鼠随机分为 6 组: HK-NSPs 高剂量组 (60 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、中剂量组 (40 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和低剂量组 (20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 均腹腔注射给药 (ip), 阳性药紫杉醇注射剂组 (4 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ip), HK 原料药混悬液灌胃组 (60 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ig) 和生理盐水对照组 (NS, ip)^[19,20]。HK 原料药混悬液灌胃组每天给药 1 次, 其余 5 组每两天给药 1 次, 各组均连续给药 6 次。

在实验中, 对小鼠生存状态进行观察并每次给药前对小鼠体重及瘤体积进行称重及测量, 绘制小鼠体重、瘤体积变化曲线 (肿瘤体积的计算公式为: $V = 0.5 ab^2$, 其中 a 为肿瘤的长径, b 为肿瘤的短径)。第 6 次给药 24 h 后, 将动物脱颈处死, 完整剥离皮下转移瘤体, 称量其质量 (W), 计算实际抑瘤率 (IR)。

$$\text{IR} = (1 - W_{\text{实验组}} / W_{\text{对照组}}) \times 100\%$$

统计学处理 实验所得所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 利用 SPSS 15.0 软件进行统计学分析, 数据采用单因素方差分析, 两组间分析采用 LSD 检验, 若 $P < 0.05$ 则认为差异有显著性意义。

结果

1 稳定剂的确定

选择 HPMC、PVA、PVP、P-188、Tween-80、BSA、P-188/BSA 和 PVP/BSA 一系列不同的稳定剂制备 HK-NSPs, 通过测定其粒径及 PDI (图 1) 确定了 BSA 和 PVP 联合作为稳定剂有更小的粒径及 PDI

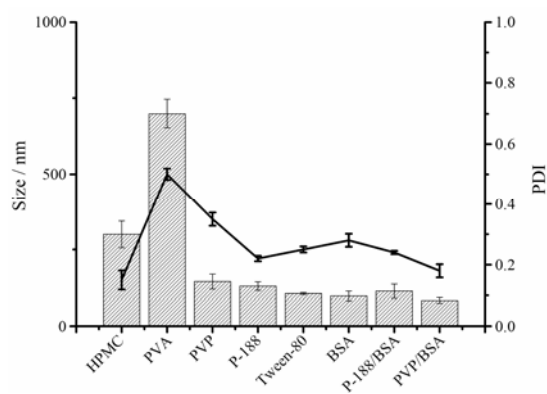


Figure 1 The influence of different stabilizer systems on the particle size and polydispersity index of honkiol nanosuspensions (HK-NSPs). $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. PDI: Polydispersity index; HPMC: Hydroxypropyl methyl cellulose; PVA: Polyvinyl alcohol; PVP: Polyvinylpyrrolidone; P-188: Poloxamer 188; BSA: Bovine serum albumin

值, 可作为 HK-NSPs 的稳定剂。

2 超声功率

不同超声功率对纳米混悬剂的粒径影响情况如图 2。在一定范围内随着超声强度的增大, HK-NSPs 的粒径减小。当超声强度达到 250 W 后, 再增加强度 (500 W), 粒径未见太大变化, 最终确定 250 W 为最佳超声功率。

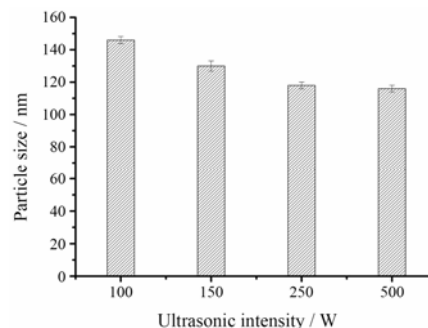


Figure 2 The impact of ultrasonic intensity on HK-NSPs. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

3 PVP 与 BSA 比例

PVP 与 BSA 比例对 HK-NSPs 的制备有一定的影响, 结果见表 1。当 PVP/BSA 接近 1:1 时, 粒径、PDI 及 zeta 电位均为最优。因此, 选择 PVP/BSA 为 1:1 用于制备 HK-NSPs。

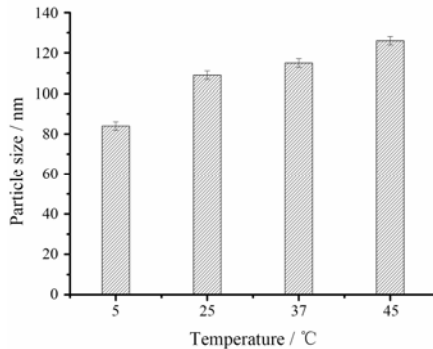
4 制备温度的选择

在制备过程中温度对纳米混悬剂的粒径也会有影响, 见图 3。随温度升高, 纳米混悬剂的粒径增大, 5 $^{\circ}\text{C}$ 下纳米混悬剂的粒径可达到最小。因此, 选用 5 $^{\circ}\text{C}$ 作为最佳温度。

根据以上筛选结果, 最终确定 HK-NSPs 制备最

Table 1 Particle size and distribution of HK-NSps

PVP/BSA	Size /nm	PDI	Zeta /mV
1 : 3	118.0 ± 2.5	0.21 ± 0.009	-27.6 ± 0.21
1 : 1	110.5 ± 3.8	0.12 ± 0.015	-44.3 ± 1.00
3 : 1	135.9 ± 3.4	0.21 ± 0.005	-24.7 ± 0.35

**Figure 3** The impact of different preparation temperature on particle size of HK-NSps. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

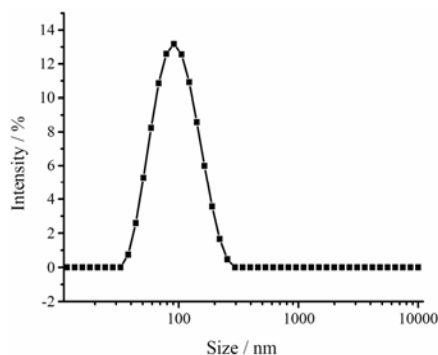
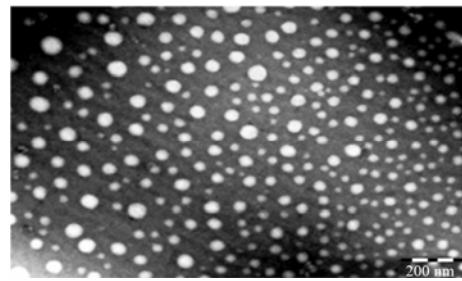
佳处方: 精密称取 BSA 10 mg、PVP 10 mg 作为稳定剂共同溶解于 4 mL 去离子水中, 作为水相; 精密称取 20 mg HK 溶解于 0.8 mL 丙酮, 超声条件下 (5 °C、250 W) 将有机相注入到水相中。45 °C 减压旋转蒸发除去丙酮, 利用 Zetasizer nano ZS 测量粒径、PDI 值和 zeta 电位, 粒径分布如图 4 所示, 和厚朴酚纳米混悬剂的平均粒径为 (83.40 ± 1.042) nm, PDI 值为 0.223 ± 0.011, zeta 电位为 (-42.2 ± 1.2) mV, 说明 HK-NSps 粒径较小、粒径分布均匀。

5 透射电镜表征与载药量

经透射电镜下观察 HK-NSps 呈类球形, 分布较为均匀, 平均粒径为 50 nm 左右, 如图 5。HK-NSps 载药量为 48.62%, 这与理论值 50% 略有差距, 可能是实验过程中样品转移所带来的误差。

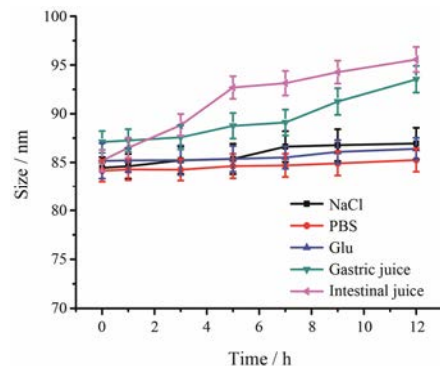
6 HK-NSps 在室温放置与在不同介质中粒径的稳定性

纳米混悬剂在室温下放置 0、2、4、8 h 和 2、4、

**Figure 4** Particle size and distribution of HK-NSps**Figure 5** Transmission electron microscope images of HK-NSps

10、15、30 天, 粒径分别为 83.4、83.47、83.42、84.24、85.14、85.41、86.09、86.13 和 86.21 nm, 粒径基本在 85 nm 左右, 并未见明显增加。室温放置 15 天内, HK 含量在 0、1、3、5、11、15 天分别为 18.11、17.87、17.91、18.02、17.92 和 18.01 mg, 含量基本保持在 18 mg 左右, 故可判定在 25 °C 下, HK-NSps 放置稳定, 但 4 mL HK-NSps 中药物含量未达到理论值 20 mg, 可能是实验过程中样品转移所带来的误差。

HK-NSps 在 PBS 缓冲液、NaCl 溶液、葡萄糖溶液、人工胃肠液中均能够稳定存在, 12 h 内在各介质中的平均粒径改变较小 (图 6), 说明 HK-NSps 可用 PBS 缓冲液、NaCl 溶液和葡萄糖溶液调成等渗溶液, 用于注射给药, 同时还可口服给药。

**Figure 6** The stability of HK-NSps in different dispersed medium. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. PBS: Phosphate buffer solution; Glu: Glucose

7 体外释放

HK 溶液体外释放很快, 在 6 h 时累计释放率大约 90%, 其释放行为为透膜的被动扩散; HK 原料药直接分散在水中得到混悬液, 其释放非常缓慢, 36 h 时累积释放仅约 20%, 之后几乎没有释放; 而 HK-NSps 则呈现出适当的释放速率, 在前 12 h 为相对快速的释放, 累积释放达到 70%, 84 h 时完全释放, 结果见图 7。适当的药物释放速率有望使 HK-NSps 在口服给药时获得比物理混悬液更高的生物利用度, 注射

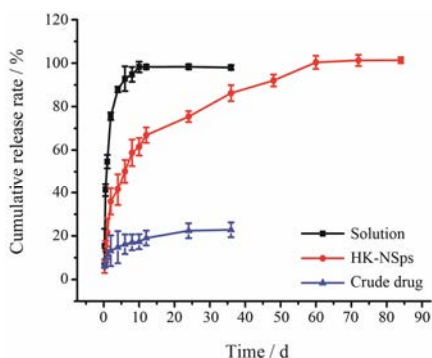


Figure 7 Cumulative HK release from HK-NSps in PBS at 37 °C with in 84 h. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

给药时相对平稳的血药浓度，避免过大的峰谷给药效和治疗带来不利的影响。

8 HK-NSps 对 4T1 细胞的抑制率

在所有受试浓度下，HK-NSps 比相应的溶液对 4T1 乳腺癌细胞具有更强的抑制作用，结果见图 8。利用 GraphPad Prism5 软件计算给药 24 h 后 HK-NSps 和游离 HK 对 4T1 细胞的 IC₅₀ 值分别为 8.36 和 37.58 μg·mL⁻¹；SPSS 数据软件分析显示两者 IC₅₀ 值之间具有显著性差异 ($P < 0.01$)。这说明，将 HK 制备成纳米混悬剂后能够显著增加其体外抗肿瘤活性。纳米粒的体外增效效应在文献中多有报道，并认为其原因可能是肿瘤细胞对载药纳米粒比游离药物具有更高的摄取^[21]。

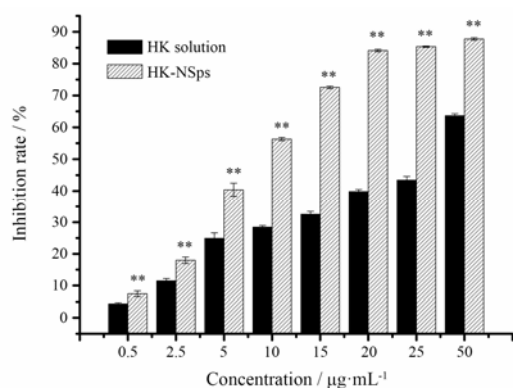


Figure 8 Proliferation inhibition of HK-NSps against 4T1 cells after 24 h of incubation. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs HK solution

9 HK-NSps 对 4T1 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用

各组小鼠肿瘤体积变化趋势见图 9。肿瘤生长速度由快到慢依次为生理盐水组、低剂量 HK-NSps 组 (20 mg·kg⁻¹)、PTX 注射液组 (4 mg·kg⁻¹)、高剂量灌胃组 (60 mg·kg⁻¹)、中剂量 HK-NSps 组 (40 mg·kg⁻¹) 和高剂量 HK-NSps 组 (60 mg·kg⁻¹)。各给药组与生理盐水组相比，抑瘤率均具有明显差异 ($P < 0.001$)，

高剂量 HK-NSps 组对肿瘤抑瘤率最高 ($P < 0.001$)。结果显示，高剂量 HK-NSps 组的肿瘤体积与生理盐水组、紫杉醇注射液组、低剂量 HK-NSps 组相比，有显著性差异 ($P < 0.001$)，提示高剂量 HK-NSps 的作用效果明显优于紫杉醇注射液组和低剂量组。实验结束时，按照瘤重计算的抑瘤率 (表 2) 也显示，高剂量 HK-NSps 组的抑瘤率 (67.28%) 最高，其次为中剂量 HK-NSps 组 (55.67%)、原料药高剂量灌胃组 (54.13%) 和 PTX 注射液组 (47.90%)，最后是低剂量 HK-NSps 组 (21.48%)。这些数据说明，HK-NSps 对抑制乳腺癌具有良好的开发前景。

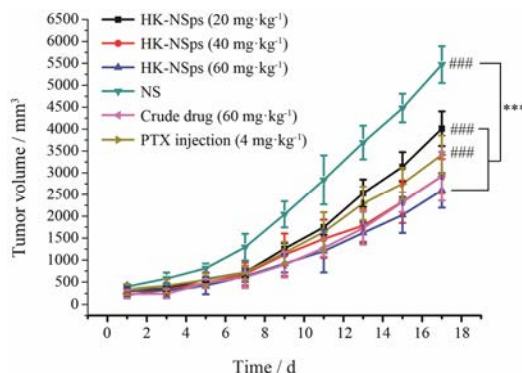


Figure 9 The change of tumor volume of 4T1 tumor-bearing mice after ip administration of HK-NSps, paclitaxel (PTX) injection, normal saline (NS) and ig administration of crud drug. $n=10$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs normal saline group; ### $P < 0.001$ vs 60 mg·kg⁻¹ of HK-NSps

Table 2 The *in vivo* antitumor inhibition rate of HK-NSps (ip), PTX injection (ip), and crude drug (ig) in 4T1 tumor-bearing mice. $n=10$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs normal saline group; # $P < 0.05$ vs PTX injections; [∇] $P < 0.05$ vs HK crude drug

Formulation	Tumor weight/g	Inhibition rate/%
Normal saline	2.284 9 ± 0.152 4	—
PTX 4 mg·kg ⁻¹	1.190 4 ± 0.273 6**	47.90
HK crude drug 60 mg·kg ⁻¹	1.048 0 ± 0.198 3**	54.13
HK-NSps 20 mg·kg ⁻¹	1.794 0 ± 0.163 7 [∇]	21.48
40 mg·kg ⁻¹	1.021 8 ± 0.211 5**	55.67
60 mg·kg ⁻¹	0.747 6 ± 0.147 2 ^{***}	67.28

另外，高剂量 HK 药物粉末混悬液口服给药，其肿瘤体积随时间增长情况与中剂量 HK-NSps 腹腔注射组相近，实验结束时两者的抑瘤率也很接近。这可能与原料药较高的给药频率和给药剂量较大有关。

在实验过程中各组 4T1 荷瘤小鼠的体重变化如图 10 所示。生理盐水对照组的小鼠体重始终呈现出增长的趋势，而高剂量 HK-NSps 组荷瘤小鼠的体重明显低于生理盐水组 ($P < 0.05$)，提示高剂量 HK-NSps

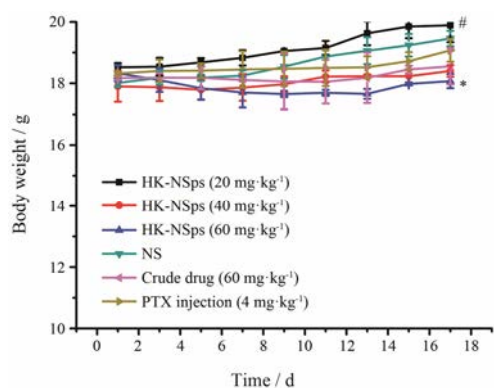


Figure 10 The body weight change of 4T1 tumor-bearing mice after ip administration of HK-NSps, PTX injection, normal saline and ig administration of crude drug. $n=10$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs normal saline group; # $P < 0.05$ vs crude drug

组可能具有一定的毒副作用。其他各组的体重与生理盐水组相比, 统计学分析未见明显差异。

讨论

基于 HK 难溶、化学稳定性差等缺点, 并经前期对甲醇、乙醇和丙酮进行溶剂筛选, 3 种溶剂制备的纳米混悬剂粒径差别不大, 丙酮略小, 且减压旋转蒸发时更容易除去, 故选用丙酮作为有机溶剂。处方筛选最终选择以 PVP 和 BSA 为稳定剂, 采用反溶剂沉淀法制备得到的 HK-NSps 呈类球形、粒径为 (83.40 ± 1.042) nm, 显著提高了其体内抗肿瘤的活性。

在药效学实验中, HK 原料药混悬液灌胃给药, 目的是将其传统给药形式作为对照, 制备的 HK-NSps 呈胶体形式, 粒径小, 药物溶出快, 可注射给药。考察 HK-NSps 注射给药对药效的改善程度, 若采用每天给药, 抗肿瘤效果无疑会比原料药混悬液灌胃给药好, 但难以进一步比较。故本研究采用两天给药 1 次, 考查纳米剂型在减少给药次数和剂量的条件下, 能否保持相似甚至更好的药效。药效研究发现, 高剂量 HK-NSps 组的抑瘤率最高, 但与生理盐水组相比体重明显减轻, 未来在使用剂量方面尚需从药效和安全性两方面考虑, 以进一步探讨和优化。实验还发现, 原料药高剂量灌胃给药, 在较高的给药频率 (每天给药) 下, 也能取得较好的抑瘤率, 其抗肿瘤效果与中剂量的 HK-NSps 相当 (两天给药 1 次)。鉴于中剂量 HK-NSps 总的给药剂量只有原料药组的 2/3, 抑瘤率相近, 说明 HK-NSps 更有优势。

References

[1] Chen SZ. Research progress in anticancer effects and

molecular targets of honokiol in experimental therapy [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2016, 51: 202–207.

- [2] Shen L, Zhang F, Huang R, et al. Honokiol inhibits bladder cancer cell invasion through repressing SRC-3 expression and epithelial-mesenchymal transition [J]. Oncol Lett, 2017, 14: 4294–4300.
- [3] Pillai VB, Kanwal A, Fang YH, et al. Honokiol, an activator of Sirtuin-3 (SIRT3) preserves mitochondria and protects the heart from doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice [J]. Oncotarget, 2017, 8: 34082–34098.
- [4] Wang N, Wang Z, Nie S, et al. Biodegradable polymeric micelles coencapsulating paclitaxel and honokiol: a strategy for breast cancer therapy *in vitro* and *in vivo* [J]. Int J Nanomedicine, 2017, 12: 1499–1514.
- [5] Wang GJ, Zhao YJ, Dong JM. Synergistic antitumor effects of liposomal honokiol combined with hyperthermia in adenoid cystic carcinoma models [J]. Anhui Med Pharm J (安徽医药), 2016, 20: 1237–1240.
- [6] Cui J. Honokiol: a potent chemotherapy combined with TRAL in human MCF-7 breast cancer models [J]. Med Inf (医学信息), 2011, 24: 3321–3322.
- [7] Zhang Y, Bai HX, Shao YX, et al. Mechanism research on inhibition of 4T1 cells proliferation of the combination of honokiol liposome and adriamycin [J]. Chin J Lab Diagn (中国实验诊断学), 2012, 16: 983–985.
- [8] Lv X, Liu F, Shang Y, et al. Honokiol exhibits enhanced antitumor effects with chloroquine by inducing cell death and inhibiting autophagy in human non-small cell lung cancer cells [J]. Oncol Rep, 2015, 34: 1289–1300.
- [9] Singh T, Prasad R, Katiyar SK. Inhibition of class I histone deacetylases in non-small cell lung cancer by honokiol leads to suppression of cancer cell growth and induction of cell death *in vitro* and *in vivo* [J]. Epigenetics, 2013, 8: 54–65.
- [10] Lin CJ, Chen TL, Tseng YY, et al. Honokiol induces autophagic cell death in malignant glioma through reactive oxygen species-mediated regulation of the p53/PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2016, 304: 59–69.
- [11] Chang KH, Yan MD, Yao CJ, et al. Honokiol-induced apoptosis and autophagy in glioblastoma multiforme cells [J]. Oncol Lett, 2013, 6: 1435–1438.
- [12] Bildstein L, Dubernet C, Couvreur P. Prodrug-based intracellular delivery of anticancer agents [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2011, 63: 3–23.
- [13] Wu DQ. The preparation and characterization of honokiol liposome [J]. Pract Clin J Integr Tradit Chin West Med (实用中西医结合临床), 2014, 14: 86–88.

- [14] Cai Z, Pan WH. Honokiol/Pluronic F-127 micelles: preparation and its *in vitro* anti-tumor study [J]. Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学), 2014, 31: 186–189.
- [15] He YL, Zhang YQ. Preparation methods of insoluble nanosuspension [J]. China Pharm (中国药房), 2016, 27: 556–559.
- [16] Zhou WH, Guo XZ. Preparation of semustine polyvinylpyrrolidone magnetic liposome [J]. J Clin Rehab Tissue Eng Res (中国组织工程研究与临床康复), 2009, 13: 496–500.
- [17] Dong XY, Yao HF, Ren FC, et al. Characteristics and antioxidant activity of bovine serum albumin and quercetin interaction in different solvent systems [J]. Spectrosc Spectral Anal (光谱学与光谱分析), 2014, 34: 162–166.
- [18] Ren H, He Y, Liu F, et al. Study on the HPLC determination of magnolol and honokiol and extraction technology of Houpo [J]. Pharm Clin Chin Mater Med (中药与临床), 2014, 5: 32–34.
- [19] Hong J, Sun Z, Li Y. Folate-modified annonaceous acetogenins nanosuspensions and their improved antitumor efficacy [J]. Int J Nanomedicine, 2017, 12: 5053–5067.
- [20] Guo RQ, Wang QH, Wang XT, et al. Preparation of honokiol liposomes and their *in vitro* and *in vivo* suppression on breast cancer [J]. Drug Eval Res (药物评价研究), 2017, 40: 48–53.
- [21] Hong JY, Li YH, Li YJ, et al. Annonaceous acetogenins nanosuspensions stabilized by PCL-PEG block polymer: significantly improved antitumor efficacy [J]. Int J Nanomedicine, 2016, 11: 3239–3253.