

## 藤黄酸纳米混悬剂的制备及抗肿瘤作用

季宇彬<sup>1#</sup>, 聂凡茹<sup>1,2#</sup>, 周欣欣<sup>1,2</sup>, 王向涛<sup>1,2\*</sup>

- (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:** 藤黄酸 (gambogic acid, GA) 是藤黄科植物藤黄中提取的具有良好选择性和高效抗肿瘤活性的化合物, 但其溶解性差, 限制了进一步的体内研究和临床应用。本研究通过将其制备成纳米混悬剂来解决此问题。采用碱溶酸法制备藤黄酸纳米混悬剂 (GA-NSps), 以粒径和分散指数 (PDI) 为指标选择稳定剂; 采用动态光散射法、透射电镜考察 GA-NSps 粒径和形态, 在生物介质中的稳定性; 透析法测量 GA-NSps 体外释放; MTT 比色法考察 GA-NSps 细胞毒性作用; 建立 H22 荷瘤小鼠模型, 考察 GA-NSps 体内抗肿瘤作用。结果表明, 泊洛沙姆为 GA-NSps 的优良稳定剂; 药载比 7 : 1 时, 所制备的 GA-NSps 近似规则球形, 分布均匀, 粒径为  $135.9 \pm 5.1$  nm, zeta 电位为  $-35.1 \pm 1.36$  mV, PDI 为  $0.26 \pm 0.01$ , 在多种生物介质中均可以稳定存在; 体外释放缓慢, 312 h 累计释放量为 90.26%。MTT 结果显示, 藤黄酸制备成纳米混悬剂后, 体外抗肿瘤活性显著提高, GA-NSps 和藤黄酸的  $IC_{50}$  值分别为 0.851 8 和  $2.104 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 两者相比具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。在荷瘤鼠药效学实验中, GA-NSps 显示出良好的量效关系, 高剂量组的肿瘤抑制率 (72.35%) 高于紫杉醇注射液组 (66.80%,  $P < 0.05$ )。综上, 本研究制备的 GA-NSps 载药量高、稳定性良好, 增强了藤黄酸的抗肿瘤效果, 为藤黄酸的剂型研究奠定了基础。

**关键词:** 藤黄酸; 纳米混悬剂; 肝癌; 抗肿瘤

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 03-0453-07

## Preparation of gambogic acid nanosuspensions and their anti-tumor efficacy

Ji Yu-bin<sup>1#</sup>, Nie Fan-ru<sup>1,2#</sup>, Zhou Xin-xin<sup>1,2</sup>, Wang Xiang-tao<sup>1,2\*</sup>

(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:** Gambogic acid (GA), the main active ingredient in gamboge, has been reported to have good anti-tumor activity with excellent selectivity. However, its clinical application is limited by the poor water solubility. GA nanosuspensions were designed in this study in order to solve this problem. GA nanosuspensions were prepared by microprecipitation method based on pH adjustment. Suitable stabilizer was screened according to the size and polydispersity index (PDI) of the resultant nanosuspensions. Dynamic light scattering method was used to measure the particle size and transmission electron microscopy was used to observe the morphology. The stability was studied in different medium. The drug release was evaluated using a dialysis method. MTT assay was used to assess their cytotoxicity *in vitro* against cancer cell line. Anti-tumor effect *in vivo* was investigated on H22-bearing mice. In result, Poloxamer (P188) was found to be a good stabilizer.

收稿日期: 2017-10-16; 修回日期: 2017-11-14.

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.

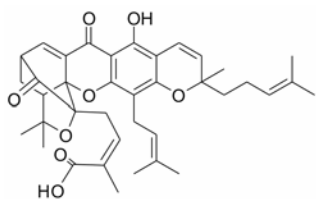
\*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-57833264, E-mail: xtaowang@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-1005

The resultant GA nanosuspensions (GA-NSps) were  $135.9 \pm 5.1$  nm in diameter, with PDI value being  $0.26 \pm 0.01$  and the zeta potential being  $-35.1 \pm 1.36$  mV. GA-NSps were nearly spherical. They were quite stable in various physiological media. GA-NSps exhibited a sustained drug release pattern, with the cumulative release reaching 90.26% within 312 h. In MTT assay, GA-NSps had a stronger cytotoxicity against HepG2 cells than the free drug ( $IC_{50}$ ,  $0.8518 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  vs  $2.104 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $P < 0.05$ ). The pharmacodynamics study suggest that the antitumor effect of GA-NSps was dose-dependent. The anti-tumor effect at the high dose is better than that of paclitaxel (72.35% vs 66.80%,  $P < 0.01$ ). In summary, we prepared GA-NSps with high drug loading capacity, small particle size and good stability, and provided a solid basis for the effective dosage form of gambogic acid.

**Key words:** gambogic acid; nanosuspension; hepatocellular carcinoma; antitumor

藤黄为藤黄科植物藤黄树 (*Garcinahanbaryi* Hook.f.) 的树干切割后分泌的胶状树脂<sup>[1]</sup>, 功效为消肿攻毒、祛腐敛疮<sup>[2]</sup>。从藤黄中已分离得到了藤黄酸 (gambogic acid, GA,  $\text{C}_{38}\text{H}_{44}\text{O}_8$ , 图 1)、异藤黄酸和新藤黄酸等成分, 其中藤黄酸为活性最强的有效成分<sup>[3-5]</sup>。藤黄酸具有抗肿瘤作用, 对人肺癌小细胞 NCI-H1993<sup>[6]</sup>、人白血病细胞 K562<sup>[7]</sup>、胃癌细胞<sup>[8]</sup>、人胰腺癌 SW1990<sup>[9]</sup>和人结肠癌细胞 HT-29<sup>[10]</sup>等具有明显的抑制作用, 其机制涉及诱导细胞凋亡<sup>[11]</sup>、阻滞细胞周期于 S 期<sup>[12]</sup>、抑制相关肿瘤血管生成和逆转机体多药耐药性<sup>[13, 14]</sup>等。但藤黄酸水溶性差 (室温溶解度仅为  $0.3245 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 口服生物利用度低, 限制了其体内研究和临床应用<sup>[15]</sup>。而静脉注射给药常需加入 L-精氨酸、葡甲胺、赖氨酸等助溶剂或聚氧乙烯蓖麻油、聚山梨酯等增溶剂<sup>[16]</sup>, 但助溶剂和增溶剂的加入会引起一系列不良反应, 如过敏、心血管毒性<sup>[17]</sup>和肾毒性<sup>[18]</sup>等。



**Figure 1** The structure of gambogic acid (GA)

纳米制剂是解决藤黄酸溶解性问题的一个可行的方案。纳米级药物粒径小、表观溶解度高, 更重要的是可通过 EPR 效应<sup>[19, 20]</sup>富集在肿瘤组织中。国内外学者已尝试将藤黄酸制备成脂质体<sup>[21]</sup>、胶束<sup>[22]</sup>、囊泡<sup>[23]</sup>和磁性纳米粒<sup>[24]</sup>等, 但载药量均偏低 ( $< 20\%$ ), 同时制备方法略显复杂, 有机溶剂的使用也给其产业化带来了一定难度。

考虑到藤黄酸结构上有 1 个羧基, 可在碱性溶液中形成羧酸盐, 加酸酸化能恢复原来的羧基而从溶液中析出, 本研究尝试通过这一特性使用微沉淀法

将藤黄酸制备成纳米混悬剂, 并对其处方工艺、理化性质和体外药效进行考察, 以便为藤黄酸提供一种可静脉注射的剂型, 为藤黄酸的抗肿瘤研究和临床应用奠定基础。

## 材料与方法

**主要仪器** Zetasizer Nano ZS 型粒度仪 (英国 Malvern Instruments 公司); Waters Symmetry 反相 C18 色谱柱 ( $5 \mu\text{m}$ ,  $250 \text{mm} \times 4.6 \text{mm}$ , 美国 Waters 公司); U3000 高效液相色谱仪 (戴安有限公司); MCA-15AC 细胞培养箱 (日本 SANYO 公司); Biotek 酶联免疫检测仪 (美国伯腾仪器公司); JEM-1400 透射电子显微镜 (日本电子株式会社)。

**药物和试剂** 藤黄酸 (南京春秋生物有限公司, 含量  $> 98.0\%$ , 批号 20160805); 牛血清蛋白 (bull serum albumin, BSA, 北京冬歌生物科技有限公司, 批号 20110310); 泊洛沙姆 (Poloxamer 188, P188, Sigma 公司, 批号 018K0029); 聚乙二醇-聚乙内酯 (mPEG<sub>2000</sub>-PCL<sub>2000</sub>, 济南岱罡有限公司, 批号 20150521); 十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, sodium salt, SDS, 西安海斯夫生物科技有限公司, 批号 20151203); 聚乙烯吡咯烷酮 (polyvinyl pyrrolidone, PVP, 无锡科技实验二厂, 批号 0712109); 紫杉醇注射液 (paclitaxel, PTX, 北京协和药厂, 批号 161108); H22、HepG2 细胞 (中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心); RPMI 1640、DMEM 培养基和胎牛血清 (美国 Gibco 公司); 磷酸盐缓冲液、青链霉素 (规格  $100 \text{u} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) (北京索莱宝科技有限公司)。实验用水为去离子水, 甲醇、乙腈为色谱纯, 其余试剂或药品均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司。

**动物** 健康昆明小鼠, 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: 11400700225312, 许可证编号: SCXK (京) 2016-0011。

**HPLC测定条件的建立** HPLC色谱柱选择反相C18柱, 检测波长360 nm, 流动相为甲醇-醋酸水溶液(93:7, v/v), 流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温25℃, 进样量20 μL。精密称取藤黄酸1 mg, 置于10 mL量瓶中, 加入适量甲醇充分溶解, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 得质量浓度为100 μg·mL<sup>-1</sup>的母液。以此为基础, 配制质量浓度分别为0.1、1、5、10和50 μg·mL<sup>-1</sup>溶液, 测定检测波长处的峰面积(A)值, 并以A为纵坐标, 质量浓度(C, μg·mL<sup>-1</sup>)为横坐标绘制标准曲线图, 计算其回归方程。

**藤黄酸纳米混悬剂制备条件筛选** 通过单因素实验, 考察不同稳定剂、超声功率、药载比、加酸量对藤黄酸纳米混悬剂(GA-NSps)制备的影响。称取一定质量的藤黄酸溶于0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH(1.0 mL)中; 分别称取一定质量不同的稳定剂溶解于0.1 mol·L<sup>-1</sup> HCl(1.0 mL)中, 于25℃、一定超声条件下缓慢滴加到上述NaOH中。测试的稳定剂为SDS、P188、mPEG<sub>2000</sub>-PCL<sub>2000</sub>和BSA; 选择GA:P188质量比例分别为1:3、1:1、3:1、5:1、7:1和9:1; 超声功率分别设定为50、100、250和500 W, 其中酸的加入量分别为完全中和时的60%、70%、80%、90%和100%。

### 藤黄酸纳米混悬剂的体外评价

**粒径、电位、多分散指数考察** 用Zetasizer Nano ZS型电位仪测定纳米混悬剂的粒径、粒度分布和表面电位。

**透射电镜形态考察** 将GA-NSps稀释到藤黄酸理论质量浓度为100 μg·mL<sup>-1</sup>, 取6.0 μL滴到300目铜网上, 静置5 min, 滤纸吸干, 室温放置10 min, 滴加6.0 μL醋酸铀于铜网上染色5 min, 再用滤纸吸干, 室温放置过夜, 透射电镜下加速电压为120 kV时观察纳米混悬剂的形态、大小和分布情况。

**载药量的考察** 取GA-NSps 100 μL, 用乙醇900 μL破坏, HPLC测定药物浓度, 计算药物总质量; 取纳米混悬剂3 mL冻干称重, 即为纳米混悬剂的总质量( $m_{\text{总}}$ )。平行实验3份, 按照公式计算载药量(DL):  $DL = m_{\text{GA}} / m_{\text{总}} \times 100\%$ 。其中,  $m_{\text{GA}}$ 为纳米混悬剂中GA的质量。

**不同介质中的粒径稳定性考察** 精密吸取GA-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、10%葡萄糖溶液中, 或4倍体积的人工胃液、人工肠液中, 37℃孵育, 不同时间点取样测定粒径变化。

**体外释放考察** 取药物质量浓度为1 mg·mL<sup>-1</sup>

的GA-NSps 1 mL, 置于透析袋中, 在37℃, 于50 mL含0.2% Tween 80和5%乙醇的PBS释放介质中进行透析。分别在不同时间点各取1 mL释放外液, 计算累积释放度。另取GA物理混悬液(将GA粉末直接分散在纯水中超声而得)及GA甲醇溶液, 以同样的方法考察体外释放。

**体外细胞毒性实验** 体外培养HepG2细胞至对数期, 用含10%胎牛血清的DMEM培养液将细胞配成细胞数 $1 \times 10^5$ /mL的单细胞悬液, 接种到96孔板。5% CO<sub>2</sub>、37℃细胞培养24 h后, 吸去培养液, 将GA-NSps、GA的DMSO溶液及稳定剂P188分别用不加胎牛血清的培养基稀释至不同浓度, 同时以无药物、不含胎牛血清的培养基作为空白对照。孵育24 h后, 吸去样品溶液, 每孔加MTT溶液(5 mg·mL<sup>-1</sup>, PBS配制)20 μL; 继续孵育4 h后, 吸去孔内培养上清液, 每孔加DMSO 200 μL, 振荡20 min, 测量在570 nm波长下的吸光度值(A), 按照公式计算细胞抑制率(CI),  $CI = (A_{\text{空白对照组}} - A_{\text{实验组}}) / A_{\text{空白对照组}} \times 100\%$ 。

通过GraphPad Prism 5.0软件计算CI为50%时药物浓度(IC<sub>50</sub>)。

**体内药效学实验** 于每只小鼠右侧腋窝皮下接种H22肝癌细胞悬液0.2 mL。肿瘤生长至第7天, 筛选出肿瘤大小相对一致的小鼠, 随机分成6组: 阴性对照组, 生理盐水(ig); 阳性对照组, 紫杉醇注射液8 mg·kg<sup>-1</sup>(iv); 纳米混悬剂对照组, 5 mg·kg<sup>-1</sup>GA-NSps(ip); 纳米混悬剂低、中、高剂量组, 剂量分别为7.5、15、30 mg·kg<sup>-1</sup>GA-NSps(ig)。每隔两天给药1次。每日观察其行为状态变化; 隔日称量小鼠体重, 并用电子游标卡尺测量肿瘤的长和宽, 计算瘤体积(V)。给药第8天后停药, 脱颈椎处死小鼠, 完整剥离腋窝皮下转移瘤体, 按公式计算抑瘤率(IR)。  $IR = (V_{\text{对照组}} - V_{\text{给药组}}) / V_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。

**统计学方法** 所有的数据均使用SPSS18.0软件进行统计学分析, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

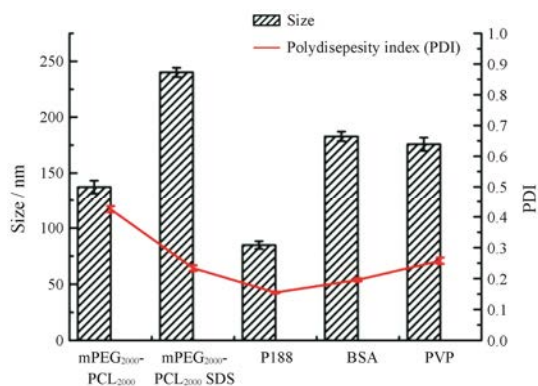
## 结果

### 1 藤黄酸HPLC分析方法的建立

藤黄酸保留时间为10.05 min, 色谱峰峰型良好, 且无杂质峰干扰, 检测专属性较好。计算其回归方程为 $y = 0.4915x + 0.4504$  ( $R^2 = 0.9997$ ), 线性范围为0.1~100 μg·mL<sup>-1</sup>。

### 2 稳定剂

由图2可见, 以稳定剂P188制备的纳米混悬剂粒径最小, 且PDI值最小, 室温放置过程中也较稳定,

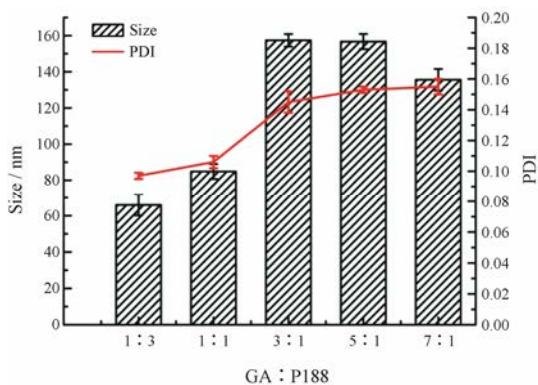


**Figure 2** The influence of different stabilizer systems on the particle size and polydispersity index (PDI) of gambogic acid nanosuspensions (GA-NSps).  $n=3, \bar{x} \pm s$ . mPEG<sub>2000</sub>-PCL<sub>2000</sub>: Polyethylene glycol-polycaprolactone<sub>2000</sub>; SDS: Dodecyl sulfate, sodium salt; P188: Poloxamer 188; BSA: Bovine serum albumin; PVP: Polyvinylpyrrolidone

故选择 P188 作为 GA-NSps 的稳定剂。推测可能与其具有较强的表面活性作用有关: P188 是聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物, 其中聚氧乙烯占 80%。聚氧乙烯链段比例越大, 亲水亲油平衡值 (HLB) 越高。P188 的 HLB 值为 29, 属于高表面活性稳定剂。

### 3 药载比

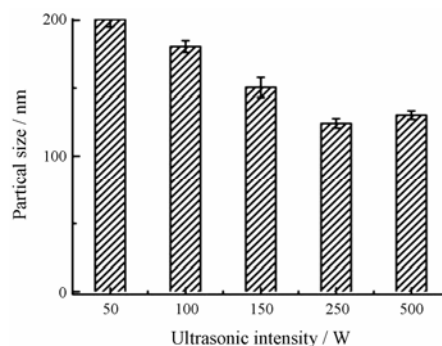
由图 3 可知, 药载比 3:1 和 5:1 时粒径最大, 1:3 和 1:1 时粒径均较小, 而 7:1 时粒径也不大。平均粒径均在 160 nm 以下。从载药量来看, 药载比 7:1 时载药量最高, 提高药载比到 9:1 时会产生沉淀而导致纳米混悬剂的制备无法成功。综合考虑, 选择药载比 7:1 进行后续研究。



**Figure 3** Effect of different drug loading ratio on particle size of resultant GA-NSps.  $n=3, \bar{x} \pm s$

### 4 超声功率

如图 4 所示, 在一定范围内, 随着超声强度的增大, GA-NSps 的粒径减小。在 250 W 时粒径达到最小, 继续增加到 500 W, 粒径反而略有增大, 故最终确定 250 W 为最佳超声功率。



**Figure 4** The impact of ultrasonic intensity on GA-NSps.  $n=3, \bar{x} \pm s$

### 5 酸用量

胶体粒子的表面电位越大, 斥力势能大, 粒子越稳定。由表 1 可知, 酸用量在中和用量的 80%~90% 时, 制备的 GA-NSps 粒径较小, 且电位较高。一般电位大于 20 mV 纳米混悬剂相对稳定, 对应的酸用量为 85%。

**Table 1** The influence to zeta of different proportion of acid/alkali of GA-NSps

Acid/%	Zeta/%	Size /nm	PDI	pH
60	-35.7 ± 4.70	1007 ± 5.78	0.941 ± 3.12	8.1
80	-44.5 ± 2.23	185.9 ± 4.16	0.286 ± 2.12	7.0
85	-35.1 ± 1.36	139.0 ± 5.10	0.260 ± 0.01	7.2
90	-10.7 ± 3.23	154.2 ± 3.46	0.246 ± 2.45	6.5
100	-3.88 ± 4.50	166.6 ± 4.18	0.142 ± 3.19	5.6

### 6 冻干保护剂

GA-NSps 1 mL 冻干后直接加入去离子水 1 mL, 样品即便在超声作用下也无法复溶。只有以 0.5% PVP 为冻干保护剂的样品能够在复溶后粒径变化相对较小, 见表 2。故初步选择 0.5% PVP 作为 GA-NSps 冻干保护剂。

**Table 2** Various freeze-drying protective screening of GA-NSps

Lyoprotectant	Content/%	Size of redissolve/nm	PDI
P188	1.5	343.7 ± 4.8	0.20 ± 0.03
	1.0	302.1 ± 6.3	0.20 ± 0.03
PVP	1.0	354.2 ± 5.2	0.23 ± 0.03
	0.5	214.9 ± 7.1	0.20 ± 0.01
Mannitol	1.0	453.6 ± 3.7	1.0 ± 0.03
	0.5	586.1 ± 5.6	1.0 ± 0.04
Trehalose	1.0	1 318 ± 3.2	0.59 ± 0.22
	0.5	485.3 ± 1.8	0.54 ± 0.09

根据以上处方筛选最终确定 GA-NSps 的制备处方: 精密称取 GA 7 mg 快速溶解于 1.0 mL NaOH (0.1 mol·L<sup>-1</sup>) 中, 精密称取 P188 1 mg 快速溶解于

1.0 mL HCl ( $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 中, 超声条件 ( $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、250 W) 下向 GA 的碱溶液中缓慢滴加含 P188 的酸溶液, 酸用量为理论值 (中和用量) 的 85%。

### 7 GA-NSps 制备、粒径与电位

按照以上处方制备 GA-NSps, 测定 GA-NSps 平均粒径为  $139.0 \pm 5.1 \text{ nm}$ , PDI 为  $0.26 \pm 0.01$ , zeta 为  $-35.1 \pm 1.36 \text{ mV}$ , 粒径分布见图 5。

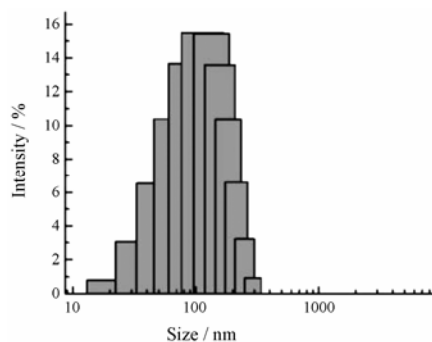


Figure 5 Particle size and distribution of GA-NSps

### 8 透射电镜表征和载药量

由图 6 可见, GA-NSps 近乎为球形, 分布比较均匀, 目测粒径约 50 nm, 比动态光散射法测得的结果小。这主要是动态光散射法测的是纳米颗粒在分散介质中的等效半径, 是在湿态和具有水化层时的粒径。HPLC 测得 GA-NSps 载药量为  $(83.73 \pm 1.03)\%$ , 低于理论载药量 (87.50%), 原因可能是由于药物转移过程中出现了一定的损失。

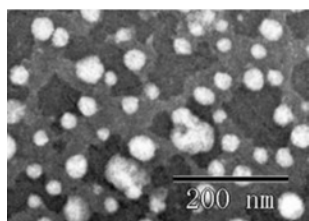


Figure 6 Transmission electron microscope images of GA-NSps

### 9 GA-NSps 在介质中的稳定性

由图 7 可见, GA-NSps 在生理盐水、PBS、5% 葡萄糖溶液、人工胃液和肠液中 5 h 内可稳定存在, 粒径没有明显增大, PDI 比较稳定, 说明 GA-NSps 可调成等渗溶液, 用于静脉给药, 为进一步的体内研究奠定基础。

### 10 GA-NSps 体外释放考察

由图 8 可见, GA-NSps 能相对较均匀地释放, 整体无突释, 在 312 h 时累积释放率达到 90.27%, 具有良好的缓释效果。由于溶解性低, 藤黄酸直接分散于

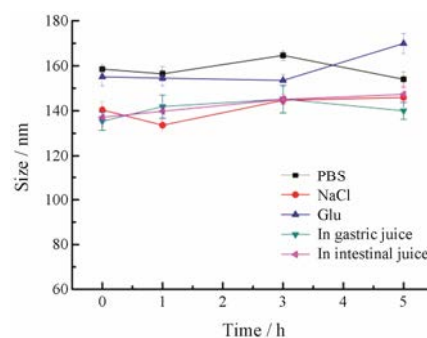


Figure 7 The stability of GA-NSps in different dispersed medium.  $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . PBS: Phosphate buffered saline; Glu: 5% Glucose

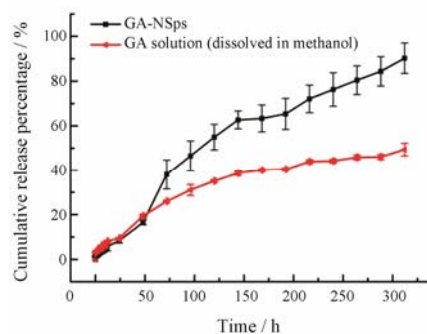


Figure 8 Cumulative GA release from GA-NSps at  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  with in 350 h.  $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$

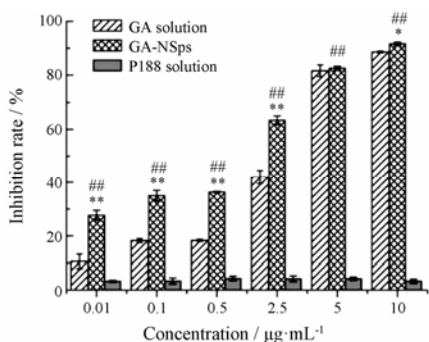
水中检测不到药物释放 (未在图中显示)。藤黄酸甲醇溶液前 50 h 释放较快, 之后释放减慢, 312 h 时累计释放 45.0%, 推测透析作用使甲醇溶液进入透析袋, 藤黄酸析出沉淀导致释放减慢。

### 11 GA-NSps 体外细胞毒性

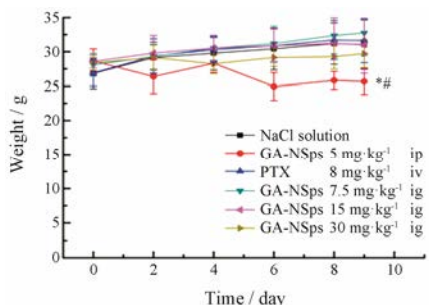
藤黄酸在 DMSO 中溶解性好且放置稳定, 而藤黄酸甲醇溶液放置过程容易出现沉淀, 所以选择将藤黄酸溶解在 DMSO 溶液中作为对照组。如图 9 所示, 与 GA 的 DMSO 溶液相比, GA-NSps 对 HepG2 细胞的杀伤作用更强; 随着浓度的增加, 肿瘤抑制率更高, 表现出明显的剂量依赖性。而稳定剂 P188 对 HepG2 细胞几乎没有任何抑制作用。GA-NSps 和 GA 的 DMSO 溶液对 HepG2 细胞的  $\text{IC}_{50}$  值分别为  $0.851 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $2.104 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 两组之间具有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 说明 GA-NSps 抑瘤效果强于溶液组, 可能是纳米混悬剂能够通过非特异性内吞作用或吞噬作用内化入胞, 使其抑瘤作用增强。

### 12 GA-NSps 体内抗肿瘤效果

给药期间小鼠体重随时间变化曲线见图 10。由图可知, 腹腔注射 GA-NSps 组小鼠体重下降明显, 口服高剂量 GA-NSps 组小鼠体重略有下降, 其他各实验组和紫杉醇注射液组小鼠的体重均平稳增长。与生理



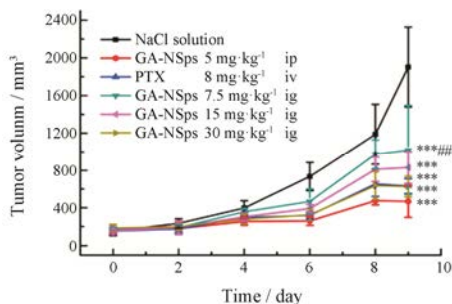
**Figure 9** Proliferation inhibition of GA-NSPs against HepG2 cells after 24 h of incubation.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs GA solution; ## $P < 0.01$  vs P188 solution



**Figure 10** The change of relative body weight of H22 tumor-bearing mice with time.  $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$  vs NaCl solution group; # $P < 0.05$  vs PTX group. PTX: Paclitaxel

盐水组相比, 腹腔注射组小鼠体重显著下降 ( $P < 0.05$ ), 表现出一定的毒副作用。其他各组体重与生理盐水组相比, 没有统计学差异。

给药期间小鼠肿瘤体积随时间变化曲线见图 11, 其中生理盐水组小鼠肿瘤体积增加最快, 口服高剂量 GA-NSPs 组与紫杉醇注射液组相似, 腹腔注射 GA-NSPs 组增长最慢。实验结束时, 各实验组肿瘤体积与生理盐水组均有显著性差异 ( $P < 0.001$ ), 显示藤黄酸具有良好的肿瘤抑制作用。高剂量组和腹腔注射组的抑制率分别达 75.41% 和 72.35%, 均显著高于阳性药紫杉醇注射液组 (66.80%,  $P < 0.05$ ), 提示藤黄



**Figure 11** The change of tumor volume of H22 tumor-bearing mice with time.  $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\*\* $P < 0.001$  vs NaCl solution group; ## $P < 0.01$  vs PTX group

酸作为抗肿瘤药物具有较好的开发前景。口服 GA-NSPs 高、中、低剂量抑瘤率分别为 72.35%、56.34% 和 46.48%, 具有较好的剂量依赖性。而  $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  GA-NSPs 腹腔注射时抑瘤率为 75.41%, 与高剂量 ( $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 口服给药的抑制率相当, 提示 GA-NSPs 口服给药的生物利用度不高, 推测其大约相当于静脉给药的 1/6, 即 17% 左右。

### 讨论

藤黄酸作为一种新型抗肿瘤药物具有很好的应用前景, 然而水溶性差, 限制了其进一步应用。本实验利用泊洛沙姆为稳定剂, 碱溶酸沉法制备 GA-NSPs, 初步解决了难于给药的问题。所制备的 GA-NSPs 近似规则球形、分布均匀, 粒径为  $135.9 \pm 5.1 \text{ nm}$ , 稳定性良好, 载药量高达 ( $83.73 \pm 1.03$ )%。在以往的实验研究中, 所制备的纳米混悬剂操作复杂, 制备时间过长, 同时载药量很低 ( $8.51 \pm 0.95$ )%<sup>[25]</sup>, 而本碱溶酸沉法避免了有机溶剂的使用, 简化了实验步骤, 显著提高了载药量。该方法对于含羧基或内酯环的小分子药物, 如 7-乙基-10-羟基喜树碱、雷公藤甲素等, 具有一定的适宜性<sup>[26]</sup>。

由于紫杉醇注射液的高效低毒作用<sup>[27]</sup>, 故本实验采用紫杉醇注射液作为阳性药。药效学实验结果表明, 腹腔注射 GA-NSPs 组的抑瘤率虽然高于紫杉醇注射液, 但该组小鼠体重降低明显, 提示可能具有较大的毒副作用, 故不建议采取此给药方式。而口服高剂量 ( $30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) GA-NSPs 具有较好抑瘤效果的同时, 安全性相对较高, 不失为 GA-NSPs 一种合理给药方案。本研究为藤黄酸进一步的体内研究和临床应用奠定了基础。

### References

- [1] Hou WJ, Xiao W. Advances in studies on gambogic acid [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2011, 42: 617-620.
- [2] Ou SP, Wang S, Yang QY, et al. Advances in studies on dried resin of *Garcinia hanburyi* processing in toxicity reducing and efficacy enhancing effects [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2011, 42: 2560-2563.
- [3] Li Ping. Study on Phytochemistry and Metabonomics of *Garcinia* (藤黄属植物的化学成分及其代谢组学研究) [D]. Beijing: Minzu University of China, 2016.
- [4] Lv GB, Yang XX, Huang QS. Isolation and structure of neogambogic acid from gamboge (*Garcinia hanburyi*) [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1984, 19: 636-639.

- [5] Kashyap D, Mondal R, Tuli HS, et al. Molecular targets of gambogic acid in cancer: recent trends and advancements [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37: 12915–12925.
- [6] Li D, Yang H, Li RP, et al. Antitumor activity of gambogic acid on NCI-H1993 xenografts *via* MET signaling pathway downregulation [J]. *Oncol Lett*, 2015, 10: 2802–2806.
- [7] Chen J, Zhou M, Zhang Q, et al. Anticancer effect and apoptosis induction of gambogic acid in human leukemia cell line K562 *in vitro* [J]. *Med Sci Monit*, 2015, 21: 1604–1610.
- [8] Zhang Z, Qian H, Yang M, et al. Gambogic acid-loaded biomimetic nanoparticles in colorectal cancer treatment [J]. *Int J Nanomed*, 2017, 12: 1593–1605.
- [9] Xia G, Wang H, Song Z, et al. Gambogic acid sensitizes gemcitabine efficacy in pancreatic cancer by reducing the expression of ribonucleotide reductase subunit-M2 (RRM2) [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36: 107.
- [10] Ye JL, Yu YJ, Wu AL et al. Sensitization of human colon cancer HT-29 cells to TRAIL-induced apoptosis by gambogic acid [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2015, 50: 1252–1257.
- [11] Gu H, Rao S, Zhao J, et al. Gambogic acid reduced bcl-2 expression *via* p53 in human breast MCF-7 cancer cells [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2009, 135: 1778–1782.
- [12] Jang JH, Kim JY, Sung EG, et al. Gambogic acid induces apoptosis and sensitizes TRAIL-mediated apoptosis through downregulation of cFLIP1 in renal carcinoma Caki cells [J]. *Int J Oncol*, 2016, 48: 376–384.
- [13] Zhu X, Zhang H, Lin Y, et al. Mechanisms of gambogic acid-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells in relation to transferrin receptors [J]. *J Chemother*, 2009, 21: 666–672.
- [14] Zhang W, Zhou H, Yu Y, et al. Combination of gambogic acid with cisplatin enhances the antitumor effects on cisplatin-resistant lung cancer cells by downregulating MRP2 and LRP expression [J]. *OncoTargets Ther*, 2016, 9: 3359–3368.
- [15] Hou WJ, Chen BL, Zhao YW, et al. Stability of gambogic acid [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2011, 42: 1755–1758.
- [16] Zhou ZT. Phase I Trial of Human Tolerability and Pharmacokinetics to Gambogic Acid (注射用藤黄酸 I 期临床耐受性及药代动力学试验) [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2006.
- [17] Zhu J, Wang M, Zhu Y. Quantitative cardiotoxicity assessment of gambogic acid using multiple cellular phenotype analysis [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol (中国药理与毒理学杂志)*, 2017, 31: 73–79.
- [18] Wang BN. Research on Extraction and Separation and Pharmacotoxicology of Gambogic Acid and Neogambogic Acid in *Garcinia hanburyi* (藤黄中藤黄酸和新藤黄酸的提取分离及药理毒理研究) [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2015.
- [19] Au JL, Yeung BZ, Wientjes MG, et al. Delivery of cancer therapeutics to extracellular and intracellular targets: determinants, barriers, challenges and opportunities [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 97: 280–301.
- [20] Maeda H. Toward a full understanding of the EPR effect in primary and metastatic tumors as well as issues related to its heterogeneity [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, 91: 3–6.
- [21] Wang LY, Liu YM, Wu LY, et al. Preparation and pharmacokinetics of gambogic acid long-circulating liposomes [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2016, 47: 1309–1314.
- [22] Yan X, Yang Y, He L, et al. Gambogic acid grafted low molecular weight heparin micelles for targeted treatment in a hepatocellular carcinoma model with an enhanced anti-angiogenesis effect [J]. *Int J Pharm*, 2017, 522: 110–118.
- [23] Zhang D, Zou Z, Ren W, et al. Gambogic acid-loaded PEG-PCL nanoparticles act as an effective antitumor agent against gastric cancer [J]. *Pharm Dev Technol*, 2018, 23: 33–40.
- [24] Dai YJ, Wang F, Huang P, et al. Preparation and characterization of magnetic nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> load neogambogic acid [J]. *Guangzhou Chem Ind (广州化工)*, 2016, 44: 71–73, 84.
- [25] Liu CY, Wang W, Zhou JP, et al. Preparation and evaluation of gambogic acid-loaded reconstituted high density lipoprotein nanoparticles [J]. *China Pharm Univ (中国药科大学学报)*, 2013, 44: 311–315.
- [26] Yang XF, Guo RQ, Su WJ, et al. Prescription screening and preparation process of 10-hydroxycamptothecin nanocrystals and industrialization research [J]. *Her Med (医药导报)*, 2016, 35: 1333–1340.
- [27] Zhang CY, Li J, Gao JM, et al. The impurity profiling of paclitaxel and its injection by UPLC-MS/MS [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 965–971.