

核壳型聚乳酸-羟基乙酸共聚物磁性纳米系统 用于中药复方多组分的时空递释

章 越^{1,2,3}, 丁陈陈^{1,2,3}, 温 露¹, 陈 钢^{1,2,3*}

(广东药科大学 1. 药学院, 2. 广东省药物新剂型重点实验室,
3. 广东省局部精准递药制剂工程技术研究中心, 广东 广州 510006)

摘要: 本研究的目的是构建可共载丹参-三七复方多组分且在特定部位能实现程序性释药的羟丙基- β -环糊精-聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA) 磁性纳米递药系统, 旨在为中药复方多组分制剂的设计提供参考。以不饱和醇溶液法制备羟丙基- β -环糊精包合物, 以复乳法制备 PLGA 磁性纳米粒, 再将两者共孵育制备成核壳型磁性纳米体系。应用激光共聚焦显微镜、透射电镜及激光粒度仪表征纳米粒的形貌特征及粒径分布; 磁滞回线和磁铁吸附实验表征纳米粒的磁学性质; 体外细胞摄取实验考察纳米粒的靶向分布行为; 荧光纳米粒的细胞内分布实验考察其释药次序; 共载丹参-三七复方多组分纳米粒的体外释放实验考察内核药物和外壳药物的释放差异。结果表明, 该纳米系统具有核壳结构; 饱和磁化强度约为 $3.0 \times 10^{-4} \text{ emu} \cdot \text{g}^{-1}$, 具有超顺磁性; 在外置磁铁下, L929 细胞可实现对磁性纳米粒的靶向摄取; 包载罗丹明 B 和香豆素-6 两种荧光物质的纳米粒在 L929 细胞内可呈现程序性释放行为; 纳米粒中丹参-三七复方多组分的体外释放具有外壳速释-内核缓释的双相释放动力学特征。综上, 本研究所制备的羟丙基- β -环糊精-PLGA 纳米系统具有时空递释功能, 有望在剂型设计层面上实现中药多组分的作用最优化。

关键词: 中药复方; 多组分; 纳米递药系统; 释药; 磁靶向

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 12-1968-08

Core-shell magnetic poly (lactic-co-glycolic acid) nanosystem for tempo-spatially controlled release kinetics of multiple components of traditional Chinese medicine formula

ZHANG Yue^{1,2,3}, DING Chen-chen^{1,2,3}, WEN Lu¹, CHEN Gang^{1,2,3*}

(1. School of Pharmacy, 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Advanced Drug Delivery, 3. Guangdong Provincial Engineering Center of Topical Precise Drug Delivery System, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Traditional Chinese medicine (TCM) formula is one of the unique cultural treasures of Chinese. However, only a few studies have been carried out to deliver TCM formula with utilization of nanocarriers. The purpose of this study was to prepare the hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex-over-a-poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticle (HP- β -CD-PLGA NP) for co-delivery and sequential release of five main effective ingredients of Danshen and Sanqi to a specific target, which can provide strategies for design of intelligent drug delivery system of TCM formula. PLGA can be employed as scaffolds for sustained release of both hydrophobic and hydrophilic drugs. HP- β -CD could encapsulate the hydrophobic drugs by forming inclusion complexes.

收稿日期: 2018-04-12; 修回日期: 2018-05-12.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81773917, 81573618).

*通讯作者 Tel: 86-20-39352117, Fax: 86-20-39352129, E-mail: cg753@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0333

Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) embedded inside PLGA nanoparticles that allow a spatio-specific targeting. HP- β -CD inclusion complex was prepared by an unsaturated alcohol solution method. PLGA NP loaded with SPION was obtained through double emulsion-organic solvents evaporation. Then core-shell PLGA nanosystem was formed by co-incubation of the above two materials. The nanoparticulate system was characterized by confocal laser scanning microscopy (CLSM), laser particle size instrument and transmission electron microscope. Magnetic property was determined by magnet adsorption and vibrating sample magnetometer (VSM). Targeted distribution was investigated by cell uptake and sequential release of multiple components was observed by intracellular distribution of fluorescent probes. Release difference of five components between core and shell of HP- β -CD-PLGA NP was measured by high performance liquid chromatography. The results demonstrated that NP had a unique core-shell structure and possessed superparamagnetism. Magnetic NP could be ingested site-specifically by L929 cells with the aid of magnetic field, and coumarin-6 and rhodamine B were released from NP sequentially in the L929 cells. *In vitro* release of multiple components of Danshen and Sanqi from NP exhibited double phase time-controlled release kinetics of quick-release shell and sustained-release core. Therefore, the spatio-temporal nanoplatform has a great capacity for unlocking the full therapeutic potential of displaying synergistic efficacy of TCM formula in the formulation design.

Key words: traditional Chinese medicine compound formula; multi-component; nanoparticulate drug delivery system; drug release; magnetic targeting

中药为保障人类健康及繁衍生息做出了巨大的贡献,其通常是在中医药理论指导下辩证施治,按照“君、臣、佐、使”的配伍原则通过多成分、多靶点和多途径的特点发挥治疗或调理作用^[1]。中药的这些功效归根结底都是由其药效物质组分来实现的,针对疾病的表里虚实、轻重缓急,以多种组分配伍的形式达到标本兼治的目的^[2]。如何有效地递送中药复方多组分是防治疾病的关键。目前中药多组分的递送研究多强调释药的同步性,但根据中医方剂配伍理论和中药药性理论,中药的多组分递送模式不应是传统的单元型而应是多元化的,每一个制剂单元应该根据各组分的理化性质、生物学特征及药理学作用对其递释行为进行相应的调控^[2]。因此,结合中药特点,利用现代化制剂技术实现多组分有效的空间分布和多元化递释行为,优化组分间的配伍效应,充分发挥其协同作用,是科学、合理的选择。

纳米递药系统已在小分子化学药物、多肽蛋白及基因药物等的递送上显示出优于传统制剂的巨大优势^[3,4],将纳米技术引入中药剂型的研究开发可能是实现中药制剂现代化的一种有效途径^[5]。当前采用纳米递药系统对中药单体的递释研究较多^[6-8],而少有对中药复方组分的报道,究其原因主要在于中药复方组分繁多,不同组分的理化性质差异较大,难以实现多种亲、疏水性药物的共载^[9]。而且,即使有研究应用纳米递药系统实现了对多种中药组分的包载和缓释^[10,11],也不能精确控制不同组分的释放次序及空间分布^[12]。

为此,本研究构建了一种核壳型聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA) 磁性纳米递药系统,以克服目前中药复方多组分剂型设计的不足。以经典药对丹参-三七中理化性质差异较大的 5 种有效组分作为模型药物,即三七中的水溶性组分三七总皂苷,主要包括三七皂苷 R1 (R1)、人参皂苷 Rg1 (Rg1) 和人参皂苷 (Rb1); 丹参中的水溶性组分丹酚酸 B (Sal B) 和脂溶性组分丹参酮 IIA (TS IIA)。在该纳米递送系统的设计中 (图 1),利用羟丙基- β -环糊精 (HP- β -CD) 的

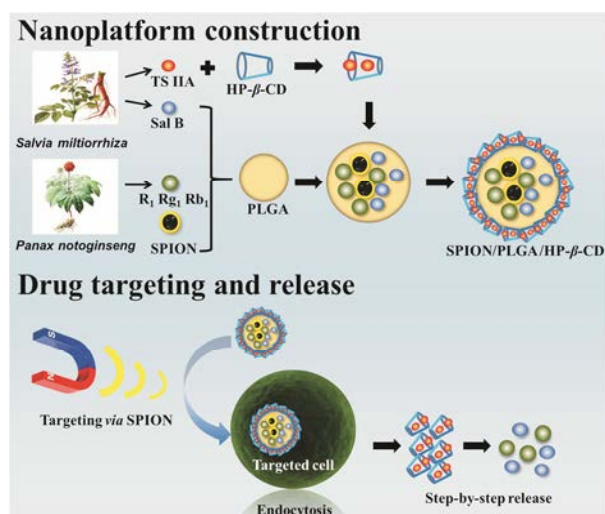


Figure 1 Schematic illustration of multiple components loading process and release properties of core-shell magnetic PLGA nanosystem. SPION: Super-paramagnetic iron oxide nanoparticles; PLGA: Poly-*D*, *L*-lactide-co-glycolide; HP- β -CD: Hydroxypropyl- β -cyclodextrin; TS IIA: Tanshinone IIA; Sal B: Salvianolic acid B; R1: Notoginsenoside R1; Rg1: Ginsenoside Rg1; Rb1: Ginsenoside Rb1

疏水性内腔装载脂溶性组分 TS IIA, 应用复乳法将其余 4 种水溶性组分及超顺磁性的四氧化三铁纳米粒 (SPION) 包载于 PLGA 纳米粒的内核里, 然后将 HP- β -CD 包合物与 PLGA 纳米粒共孵育, 形成具有核壳结构的复合磁性纳米体系。在外加磁场作用下, 该复合纳米粒可被细胞靶向摄取并迅速内吞, 外壳 HP- β -CD 包合物携带腔内脂溶性组分从载体脱落, 接着内核 PLGA 纳米粒中的药物伴随 PLGA 的降解而逐渐释放。

材料与方法

主要仪器 LSM710 激光共聚焦显微平台 (德国卡尔蔡司公司); T18 型组织分散机 (德国 IKA 公司); ZD-85A 型气浴恒温振荡器 (金坛市荣华仪器制造有限公司); TDL80-2B 台式离心机 (上海安亭科学仪器厂); JY92-IIA 超声波细胞粉碎机 (宁波新芝生物科技有限公司); DelsaTM Nano C 激光粒度仪 (美国 Beckman Coulter 公司); MPMS XL-7 磁性性质测量系统 (美国量子设计公司); RE-52A 旋转蒸发仪 (上海亚荣生化设备有限公司); LGJ-10 型冻干机 (北京松源华兴科技发展有限公司); NightOWL II LB 983 型小动物活体成像系统 (德国伯托公司); LC-20AT 液相泵、SIL-20A 自动进样器、SPD-M20A 二极管阵列检测器、CTO-10ASvp 柱温箱、DGU-20Asr 真空在线脱气机 (日本岛津公司)。

药品和试剂 SPION (粒径约 20 nm, 批号 ZY151016, 上海克拉玛尔试剂公司); 丹参酮 IIA (含量 $\geq 98.0\%$, 批号 150106)、三七总皂苷 (R1: 26.1%, Rg1: 36.5%, Rb1: 31.8%, 批号 040902) (深圳美荷生物有限公司); 丹酚酸 B (含量 $\geq 98.0\%$, 批号 111562, 上海历鼎生物科技有限公司); 香豆素-6 (含量 $\geq 98\%$)、罗丹明 B (含量 $\geq 95\%$) (美国 Sigma-Aldrich 公司); HP- β -CD (含量 $\geq 97\%$, 相对分子质量 1541.54, 批号 C1505029, 阿拉丁试剂有限公司); PLGA (LA : GA = 50 : 50, 分子质量约 10 kDa, 山东省医疗器械研究所); Span-80 (上海申宇医药化工厂); 油酸聚乙二醇甘油酯 (LABRAFILM 1944 CS, 法国嘉法狮公司); 聚乙烯醇 (PVA, 相对分子质量约 31 000, 美国 Sigma 公司); DAPI (上海碧云天生物科技有限公司); a-MEM 培养基 (美国 Hyclone 公司); L929 细胞 (小鼠成纤维细胞, 购自中国科学院上海细胞库); 甲醇和乙腈 (色谱纯, 迪马科技有限公司); 无水乙醇 (分析纯, 天津市百世化工有限公司); 二氯甲烷和乙酸乙酯 (分析纯, 天津富宇精细化工有限公司); 蒸馏

水 (屈臣氏集团有限公司)。

核壳型纳米体系的构建

羟丙基- β -环糊精包合物的制备 本文分别制备香豆素-6 包合物及 TS IIA 包合物。具体方法: 加入 5 mg 香豆素-6 (或 50 mg TS IIA) 和 500 mg HP- β -CD 于 10 mL 无水乙醇中, 超声 10 min, 50 °C 搅拌 4 h 后常温搅拌 4 h。接着将混悬液转移至旋转蒸发仪中, 至完全蒸干, 残渣用蒸馏水溶解后过 0.22 μm 微孔滤膜, 滤液冻干保存备用。

微球的制备 分别制备 PLGA 微球和 HP- β -CD-PLGA 微球。具体方法: 称取 PLGA 125 mg 与罗丹明 B 10 mg 溶于 1 mL 二氯甲烷与乙酸乙酯的混合溶液中, 涡旋混匀作为油相, 取 100 μL 蒸馏水加入油相中涡旋混匀。在组织分散机下搅拌形成初乳, 再倾倒入 2% PVA 水溶液 4 mL 中并于组织分散机下再次搅拌形成复乳, 将制得的复乳转移至 1% PVA 水溶液 25 mL 中, 并于磁力搅拌器中搅拌 4 h, 挥干有机溶剂, 低速离心, 取上清液, 即得罗丹明 B-PLGA 微球。接着, 取罗丹明 B-PLGA 微球溶液 10 mL, 加入香豆素-6 包合物水溶液 1 mL, 磁力搅拌 30 min 后, 于 100 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 室温振荡 6 h 后低速离心, 取上清液, 即得香豆素-6-HP- β -CD-罗丹明 B-PLGA 微球。

纳米粒的制备 分别制备包载荧光物质纳米粒和共载丹参-三七复方多组分纳米粒。首先制备香豆素-6 包合物及 TS IIA 包合物, 方法同上所述。然后, 制备罗丹明 B-PLGA 纳米粒和共载 4 种水溶性药物 (Sal B、R1、Rg1 和 Rb1) 的 PLGA 纳米粒, 具体方法: 称取 PLGA 125 mg 和罗丹明 B 10 mg (或 Sal B 18 mg) 溶于二氯甲烷与乙酸乙酯的混合溶液 1 mL 中, 涡旋混匀, 加入 LABRAFILM 1944 CS 和 Span-80 各 50 mg, 混匀作为油相; 取蒸馏水 (或三七总皂苷水溶液) 100 μL , 作为内水相加入油相中涡旋混匀, 于冰水浴中超声形成初乳, 再倾倒入 2% PVA 水溶液 4 mL 中, 于冰水浴中超声形成复乳, 将制得的复乳倾倒入 1% PVA 水溶液 25 mL 中并转移至旋转蒸发仪中, 于 40 °C 下挥干有机溶剂, 低速离心, 取上清液, 冻干保存备用。最后, 将香豆素-6 包合物与罗丹明 B-PLGA 纳米粒 (或 TS IIA 包合物和共载 4 种水溶性药物的 PLGA 纳米粒) 共孵育制备荧光纳米粒 (或共载丹参-三七复方 5 种有效组分的纳米粒)。采用超滤管法测定共载丹参-三七复方多组分纳米粒的包封率 (各组分的 HPLC 色谱条件参考前期实验所建立的方法^[10]), R1、Rg1、Rb1、Sal B 及 TS IIA 的包封率分别为 78.97%、85.22%、85.64%、76.59% 和 94.70%。

磁性荧光纳米粒的制备 此方法同罗丹明 B-PLGA 纳米粒的制备所述, 区别仅在于油相的组成中需加入适量 SPION。

微球和纳米粒的形貌表征

微球的激光共聚焦显微镜观察 将微球溶液稀释后于激光共聚焦显微镜下观察, 香豆素-6 的激发波长为 458 nm, 发射波长为 505 nm; 罗丹明 B 的激发波长为 540 nm, 发射波长为 625 nm。

纳米粒的粒径测定及透射电镜观察 将 PLGA 纳米粒溶液和 HP- β -CD-PLGA 纳米粒溶液稀释后于激光粒度仪下测定粒径及粒度分布。分别取 100 μ L 的 PLGA 纳米粒溶液和 HP- β -CD-PLGA 纳米粒溶液, 滴于铜网上, 吸附 5 min 后, 滴加 2% 磷钨酸染液负染 3 min, 用滤纸吸去多余的染液, 晾干后, 于透射电镜下观察。

纳米粒的磁靶向行为考察

磁滞回线 (VSM) 测定 将冻干后的磁性 PLGA 纳米粒粉末置于 2 K Oe 的磁场中, 300 K 下, 采用振动探针式磁强计对粉末样品的磁学性质进行测定, 根据结果绘制 VSM 曲线。

磁铁吸附实验 将磁性纳米粒溶液稀释后转移至 2 mL 带盖离心管中, 在离心管上方置永磁铁 1 枚, 吸附 1 h 后, 移去永磁铁后观察吸附情况。另取等量磁性纳米粒溶液同等操作, 但不放置永磁铁, 对比观察 1 h 后的吸附情况。

磁性荧光纳米粒的体外细胞摄取 取生长状态良好的对数生长期 L929 细胞悬液并调整细胞数为每毫升 3.5×10^5 个, 于细胞培养皿中细胞数为每毫升 3.5×10^5 个, 加入细胞悬液 1 mL, 培养 24 h, 待细胞贴壁后, 吸弃完全培养基, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 2 次, 再分别向每个皿中加入由基础培养基稀释 500 倍的磁性荧光纳米粒稀释液 1 mL (荧光探针为罗丹明 B)。设置对照组 (无纳米粒)、无外加磁场组及有外加磁场组 (永磁铁固定于细胞培养皿一侧), 培养 1 h 后, PBS 洗涤 3 次, 10% 福尔马林固定 30 min, PBS 洗涤 3 次, 加入 DAPI 染色 10 min, PBS 洗涤 3 次, 用锡箔纸包覆避光, 4 $^{\circ}$ C 下存放待检, 实验过程中避光操作。将细胞培养皿置于活体荧光成像系统下观察, 固定激发波长为 540 nm 再分别拍摄不同组荧光摄取情况, 对比得到不同组的荧光强度分布图。

纳米粒的程序性释放行为考察

荧光纳米粒的细胞内分布 取生长状态良好的对数生长期 L929 细胞悬液并调整细胞数为每毫升 3.5×10^5 个, 于共聚焦培养皿中加入细胞悬液 1 mL,

培养 24 h, 待细胞贴壁后, 吸弃完全培养基, PBS 洗涤 2 次, 再分别向每个皿中加入由基础培养基稀释 250 倍的共载香豆素-6 和罗丹明 B 的荧光纳米粒稀释液, 培养 1、3、12、36 和 48 h 后, PBS 洗涤 3 次, 10% 福尔马林固定 30 min, PBS 洗涤 3 次, 加入 DAPI 染色 10 min, PBS 洗涤 3 次, 用锡箔纸包覆避光, 4 $^{\circ}$ C 下存放待检, 实验过程中避光操作。将处理好的细胞样品置于激光共聚焦显微镜下观察, 激发波长和发射波长如下: DAPI 激发波长 340 nm、发射波长 480 nm; 香豆素-6 激发波长 458 nm、发射波长 505 nm; 罗丹明 B 激发波长 540 nm、发射波长 625 nm。

纳米粒的体外释放 取已除去游离药物的纳米粒冻干粉适量, 加适量蒸馏水复溶, 得到 4 mL 纳米粒胶体溶液并置于处理好的透析袋中, 扎紧透析袋两端, 将透析袋完全浸没于盛有 26 mL 蒸馏水的具塞锥形瓶中, 以 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速在 37 $^{\circ}$ C 下恒温振荡, 分别于 5、10、15、30 min 和 1、2、4、6、8、12、24、36、48 和 72 h, 取锥形瓶外释放介质 1 mL, 同时补充等量同温新鲜释放介质。样品溶液加等量甲醇涡旋混匀, 过 0.22 μ m 微孔滤膜后, 按复方组分测定 HPLC 色谱梯度洗脱条件^[10]测定各组分含量, 计算累积释放度, 绘制纳米粒中各组分药物的累积释放曲线。另取共载丹参-三七复方 5 种组分药物的“非核壳型” PLGA 纳米粒 (制备参考前期工作^[11]) 同法处理, 绘制其累积释放曲线。另外, 将 5 种组分配制成与纳米粒中各组分药物含量相当的游离药物组, 同法处理作为对照组。

统计学分析 释放实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 Matlab 软件对各组释放数据进行处理, 使用 anova1 命令进行方差分析, 以 $P < 0.01$ 表示有显著性差异。

结果

1 微球和纳米粒的形貌

通过共聚焦显微镜观察到, 在单一绿色通道下出现的绿色荧光条带位于微球的外部, 而在单一红色通道下出现的红色荧光位于微球的内部, 且红绿荧光出现的位置有清晰的界线; 在红绿混合通道下显示绿色荧光呈圆形条带状包裹于球形红色荧光外圈 (图 2A)。两种荧光物质的分布说明, 罗丹明 B-PLGA 微球构成微球体系的内核, 香豆素-6-HP- β -CD 包含物构成微球体系的外壳。

经电镜观察到, PLGA 纳米粒呈规则球形, 且边界清晰; 而 HP- β -CD-PLGA 纳米粒为不规则球形, 外层明显呈模糊状, 边界不清晰 (图 2B), 提示可能存

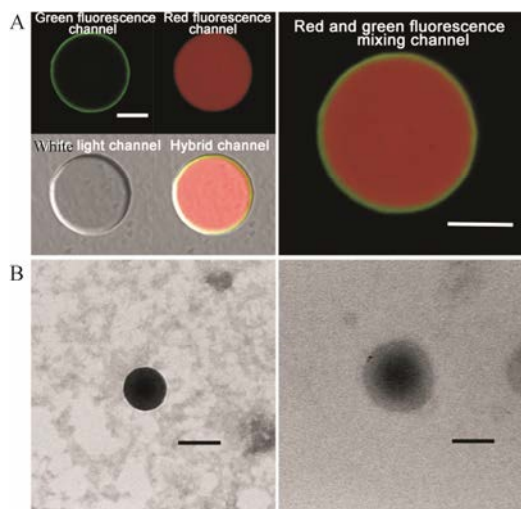


Figure 2 Nanocomposites characterization. A: Confocal microscopy image of a single microspheres demonstrated the core-shell compartmentalization of coumarin-6 (green) and rhodamine B (red). The scale bar represents 5 μm ; B: Transmission electron microscope images of a single nanoparticle without HP- β -CD shell (left) and nanoparticle with HP- β -CD shell (right). The scale bar represents 100 nm

在核壳结构。

为了进一步说明 PLGA 纳米粒和 HP- β -CD-PLGA 纳米粒在粒子尺寸上是否有差异, 采用动态光散射法进行粒径测定 (图 3)。结果显示, PLGA 纳米粒平均粒径在 145 ± 5 nm 左右, HP- β -CD-PLGA 纳米粒平

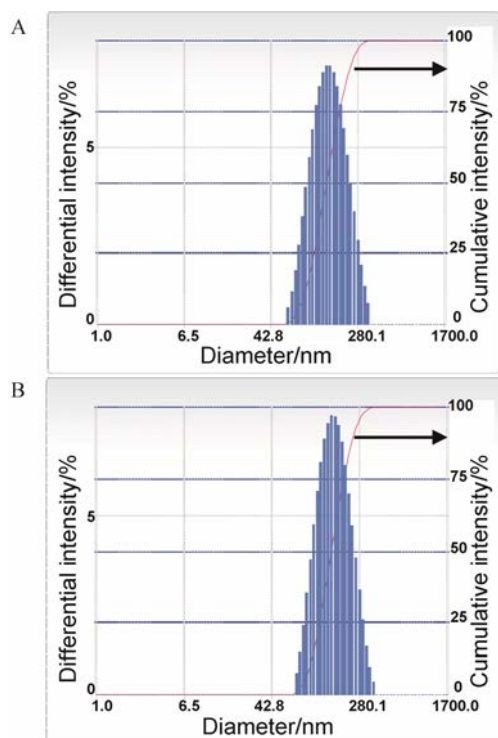


Figure 3 Particle size distribution of nanoparticle without HP- β -CD shell (A) and nanoparticle with HP- β -CD shell (B)

均粒径在 160 ± 4.5 nm 左右, 修饰包合物后纳米粒的粒径略微增大, 进一步说明可能存在核壳结构, 与上述激光共聚焦及电镜的观察结果一致。

2 纳米粒的磁靶向行为

磁性纳米粒的 VSM 结果显示, 当外加磁场强度达到 2 K Oe 左右时, VSM 曲线基本达到水平, 提示磁性 PLGA 纳米粒已达到饱和磁感应强度, 其饱和磁化强度约为 $3.0 \times 10^{-4} \text{ emu} \cdot \text{g}^{-1}$ (图 4A)。

磁铁吸附实验结果显示, 在未加磁场的情况下, 磁性 PLGA 纳米粒在 1 h 后未出现任何沉淀或吸附情况, 仍为稳定的胶体溶液; 当外加磁场 1 h 后, 离心管上部出现了明显的棕色聚集物, 表明纳米粒溶液中磁性纳米粒在磁场的作用下倾向聚集在离心管上部 (即永磁铁的放置位置); 当移除永磁铁后, 轻轻振摇, 团聚消失 (图 4B)。这表明, 该磁性纳米粒具有良好的磁响应性, 可在磁场作用下发生富集和团聚作用, 移除磁场后团聚消失, 可再次形成稳定的胶体溶液。

体外细胞摄取结果显示, 空白对照组中培养皿中间部分呈黑色, 无荧光信号; 无外加磁场组中, 培养皿中荧光分布较为均匀, 无明显的分布趋势, 培养皿中各位置细胞摄取荧光物质的量较为均一; 有外加磁场组中, 培养皿中荧光分布不均匀, 荧光有向外加磁场方向聚集的明显趋势 (图 4C)。这表明, 在外加磁场位置细胞摄取荧光物质的量要高于其他位置,

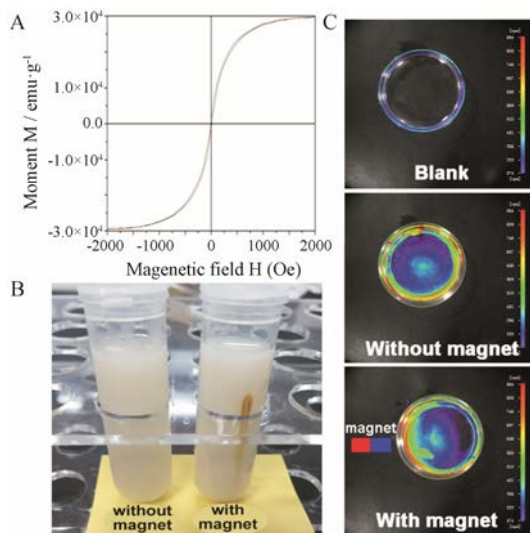


Figure 4 Characterization of site-specific drug delivery. A: VSM curve of the SPION loaded nanoparticles; B: *In vitro* aggregation of the SPION loaded nanoparticles under magnetic field; C: NIRF image of intracellular magnetic targeting. VSM: Vibrating sample magnetometer; NIRF: Near-infrared fluorescence

可能是由于在外加磁场作用下磁性 PLGA 纳米粒向磁场方向聚集, 导致细胞摄取磁性荧光纳米粒的量发生不均衡, 即越靠近磁铁位置的细胞对纳米粒的摄取量就越多, 从而在活体荧光成像下显示出更强的荧光信号, 说明该磁性纳米粒具有物理靶向能力。

3 纳米粒的程序性释放

在激光共聚焦显微镜视野下, 观察到 L929 细胞对荧光纳米粒在不同时间段的摄取结果显示, 1~3 h 时细胞整体呈绿色荧光, 对单个细胞的放大观察也表明细胞内荧光基本为绿色, 几乎未见红色荧光出现; 12 h 时, 细胞内开始出现红色荧光, 同时还可见黄色荧光 (红绿荧光重叠而成), 间接反映此时绿色荧光仍然存在; 36 h 时, 细胞内绿色荧光减弱, 而红色荧光呈弥散状, 分布于整个细胞中; 48 h 时, 细胞内整体呈红色荧光, 几乎无绿色荧光存在 (图 5)。通过上述结果推测, 当纳米粒被细胞摄取后, 其外壳的香豆素-6 先释放, 导致在 1~3 h 时细胞内荧光基本为绿色, 之后内核的罗丹明 B 也慢慢释放, 导致细胞内红色荧光逐渐显现并越来越强, 这表明该核壳型纳米体系具有潜在的程序性释药能力, 即先释放外壳药物, 再释放内核药物。

游离药物组、PLGA 纳米粒组和 HP- β -CD-PLGA 纳米粒组的体外释放曲线图直观分析显示, 游离药物组中各药物释放曲线基本相似并在 10 h 基本释放

完全 (图 6A), PLGA 纳米粒组在前 6 h 内的释放介质

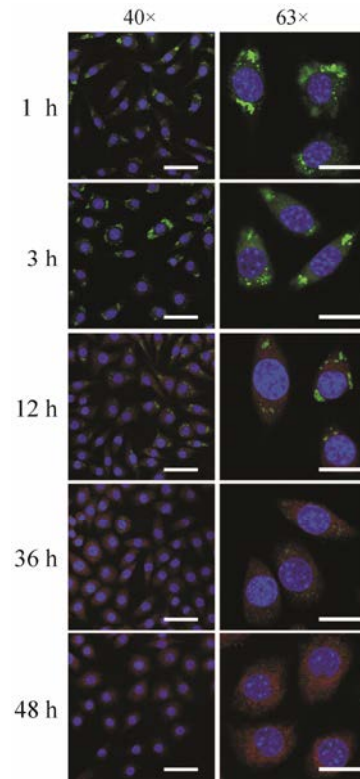


Figure 5 Confocal microscopy images of intracellular drug release within L929 mouse fibroblast cells at predetermined timepoints. The scale bars in left column represent 50 μm and the scale bars in right column represent 20 μm

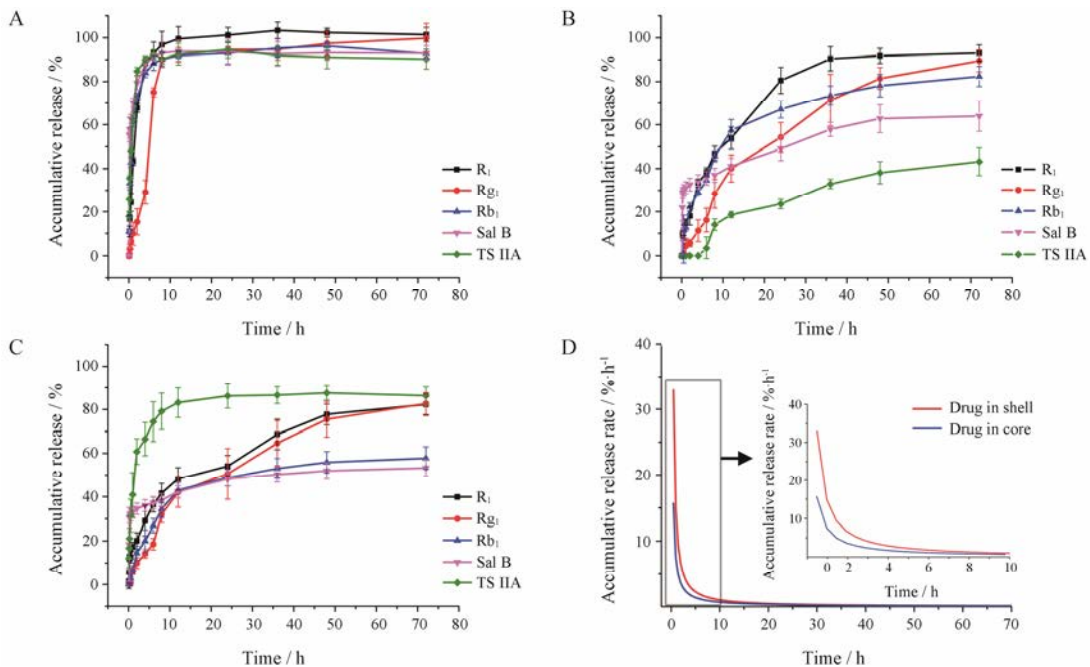


Figure 6 Release kinetics of TS IIA, Sal B and PNS from the nanoparticles. A: Accumulative release of free drugs; B: Accumulative release of TS IIA, Sal B and PNS from PLGA nanoparticles; C: Accumulative release of TS IIA, Sal B and PNS from HP- β -CD-PLGA nanoparticles; D: Accumulative release rate of drug in shell (red curve) and drug in core (blue curve). TS IIA: Tanshinone IIA; Sal B: Salvianolic acid b; PNS: Panax notoginseng saponins

中检测不出 TS IIA, 8 h 后才能检测到 TS IIA, 但 72 h 总累积释放率约为 40% (图 6B); 而 HP- β -CD-PLGA 纳米粒在 5 min 时已经可以在释放介质中检测到 TS IIA 的存在, 且在 8~12 h 内基本释放完全, 累积释放率达 80% (图 6C)。对比可知, TS IIA 在 HP- β -CD-PLGA 纳米粒组中释放更加完全, 且释放速度明显快于 PLGA 纳米粒组, 统计学分析结果也表明, TS IIA 在此两种纳米粒组中的累积释放度具有显著性差异 ($P < 0.001$)。此外, 在 HP- β -CD-PLGA 纳米粒组中, 除 TS IIA 外, 其余 4 种药物则表现出明显的缓释性质, 在 50 h 才达到基本释放完全, 这表明 HP- β -CD-PLGA 纳米粒具有程序性释药行为特征, 即外壳 HP- β -CD 中的 TS IIA 释放较为迅速, 超过 PLGA 内核中其他 4 种成分的释放速度。

为了进一步说明内核药物和外壳药物的释放差异, 采用数学分析, 分别将 TS IIA 和其余 4 种药物各自的累积释放度之和视作外壳药物和内核药物的累积释放度, 并拟合累积释放度曲线的函数方程, 求得得到累积释放速率函数 (图 6D)。结果显示, HP- β -CD-PLGA 纳米粒外壳中药物的累积释放速率在 12 h 内均明显高于内核药物的累积释放速率。

讨论

丹参、三七是经典的中药药对, 药味精简, 疗效确切, 有效组分理化性质各异, 其中 TS IIA 是一类脂溶性较强的成分, 溶出差, 生物利用度低, 通过将其制成环糊精包合物可提高其生物利用度。Sal B 和三七总皂苷是一类水溶性较好的成分, 但容易发生突释, 因此采用 PLGA 将其包裹。而且, 本研究根据组分的药理效用特点将这 5 种成分分别载入“核”和“壳”, 以调控不同组分的释药顺序。

为了直观观察释药单元的空间结合方式是否为核壳型, 本研究在两种释药单元里分别载入脂溶性与水溶性荧光染料, 应用激光共聚焦显微镜观察不同荧光染料的分布情况以判断这两种释药单元的结合方式。但鉴于激光共聚焦显微镜分辨率有限, 无法观察到纳米尺寸的物质, 故又采用 PLGA 微球来代替 PLGA 纳米粒, 两者粒径不同, 但组成一致。因此, 由激光共聚焦显微镜直接观察到 HP- β -CD 和 PLGA 微球共孵育形成的核壳结构可以推测 PLGA 纳米粒与 HP- β -CD 也能形成类似结构, 与文献^[13]方法一致。

借助纳米递药系统的设计方法实现对中药复方多组分的时空递释, 有助于充分发挥复方多组分的协同作用, 即可根据疾病病情发生发展的病理机制,

在特定的病灶部位渐次释放相应的药物^[13,14]。值得注意的是, 这种现代化的递送方式与中医药理论并不冲突, 在一定程度上契合了其配伍原则, 如利用磁场定位可使药物在特定疾病部位分布, 类似于“使药”即引经药的作用, 能引方中诸药以达病灶。此外, 所装载的磁性纳米粒还可作为磁共振成像 (MRI) 造影剂^[15], 为疾病诊断提供重要参考。因此, 本文所构建的递药系统还具有潜在的诊疗一体化能力, 兼具传统中医药与现代医学特色。

References

- [1] Cheng TF, Jin HZ, Liu CX, et al. LC-MS/MS-based molecular networking producing enlighten study of Chinese materia medica [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2018, 49: 265–273.
- [2] Jia XB. Cognition of material base of TCM based on the whole concept and development of innovative of TCM [J]. World Sci Technol-Mod Tradit Chin Med (世界科学技术-中医药现代化), 2017, 19: 1430–1434.
- [3] Gao HL, Jiang XG. The progress of novel drug delivery systems [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2017, 52: 181–188.
- [4] Estrada LPH, Champion JA. Protein nanoparticles for therapeutic protein delivery [J]. Biomater Sci, 2015, 3: 787–799.
- [5] Alexander A, Ajazuddin, Patel RJ, et al. Recent expansion of pharmaceutical nanotechnologies and targeting strategies in the field of phytopharmaceuticals for the delivery of herbal extracts and bioactives [J]. J Control Release, 2016, 241: 110–124.
- [6] Hu J, Fu S, Peng Q, et al. Paclitaxel-loaded polymeric nanoparticles combined with chronomodulated chemotherapy on lung cancer: *in vitro* and *in vivo* evaluation [J]. Int J Pharm, 2017, 516: 313–322.
- [7] Taebnia N, Morshedi D, Yaghmaei S, et al. Curcumin-loaded amine-functionalized mesoporous silica nanoparticles inhibit α -synuclein fibrillation and reduce its cytotoxicity-associated effects [J]. Langmuir, 2016, 32: 13394–13402.
- [8] Meli V, Caltagirone C, Falchi AM, et al. Docetaxel-loaded fluorescent liquid-crystalline nanoparticles for cancer theranostics [J]. Langmuir, 2015, 31: 9566–9575.
- [9] Liu Y, Feng N. Nanocarriers for the delivery of active ingredients and fractions extracted from natural products used in traditional Chinese medicine (TCM) [J]. Adv Colloid Interface Sci, 2015, 221: 60–76.
- [10] Zhang X, Chen G, Wen L, et al. Novel multiple agents loaded PLGA nanoparticles for brain delivery *via* inner ear administration: *in vitro* and *in vivo* evaluation [J]. Eur J Pharm Sci,

- 2013, 48: 595–603.
- [11] Cai H, Wen X, Wen L, et al. Enhanced local bioavailability of single or compound drugs delivery to the inner ear through application of PLGA nanoparticles *via* round window administration [J]. *Int J Nanomedicine*, 2014, 9: 5591–5601.
- [12] Sun J, Luo C, Wang Y, et al. The holistic 3M modality of drug delivery nanosystems for cancer therapy [J]. *Nanoscale*, 2013, 5: 845–859.
- [13] Ruiz-Esparza GU, Wu S, Segura-Ibarra V, et al. Polymer nanoparticles encased in a cyclodextrin complex shell for potential site-and sequence-specific drug release [J]. *Adv Funct Mater*, 2014, 24: 4753–4761.
- [14] Wolfram J, Shen H, Ferrari M. Multistage vector (MSV) therapeutics [J]. *J Control Release*, 2015, 219: 406–415.
- [15] Huang DH, Qi XY, Ge YR, et al. Application of magnetic iron oxide nanoparticles in magnetic resonance/photothermal dual-modal imaging [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2017, 52: 481–487.