透明质酸-甘草次酸复合物的制备及其体外抗肝纤维化评价

朱溶月，周李樾，杨嘉玉，刘艳华*
（宁夏医科大学药学院，宁夏银川 750004）

摘要：通过化学键合透明质酸（HA）和甘草次酸（GA）制备具有CD44受体靶向作用的HA-GA复合物，用以制备聚合物胶束，并采用MTT比色法和酶联免疫吸附分析法等对其制剂学性质和体外抗肝纤维化活性进行评价。结果显示，HA-GA复合物的临界胶束浓度为9.6 μg/mL，形成的聚合物胶束粒径为217.0 nm，GA含量为18.9%。HA-GA聚合物胶束比GA溶液的细胞毒性强，同时能抑制肝星状细胞分泌转化生长因子β1，表现出了良好的体外抗肝纤维化活性。

关键词：透明质酸；甘草次酸；复合物；聚合物胶束；肝纤维化；肝星状细胞
中图分类号：R944.9　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2023)05-0766-07
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.05.017

Preparation and *in vitro* Anti-hepatic Fibrosis Evaluation of Hyaluronic Acid-glycyrrhetinic Acid Composite

ZHU Rongyue, ZHOU Liyue, YANG Jiayu, LIU Yanhua*
(*School of Pharmacy, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004*)

ABSTRACT: Hyaluronic acid(HA) and glycyrrhetinic acid(GA) were chemically bonded to prepare the HA-GA composite with CD44 receptor targeting property, then the polymeric micelles of HA-GA composite were obtained. The pharmaceutical properties and anti-hepatic fibrosis activity *in vitro* were evaluated by MTT assay and enzyme linked immunosorbent assay. The results showed that the critical micelle concentration of the HA-GA composite was 9.6 μg/mL, the particle size of the polymeric micelles was 217.0 nm, and the GA content was 18.9%. Compared with the GA solution, HA-GA polymeric micelles showed potent cytotoxicity, meanwhile could inhibit the secretion of transforming growth factor β1 by hepatic stellate cells, exhibiting well anti-hepatic fibrosis activity *in vitro*.

Key Words: hyaluronic acid; glycyrrhetinic acid; composite; polymeric micelle; hepatic fibrosis; hepatic stellate cell

肝纤维化（hepatic fibrosis，HF）是向肝硬化和肝癌发展的重要病理过渡期[1—2]。研究[3]表明，HF可以被药物治愈并逆转成为正常肝脏。而位于肝血窦周围的肝星状细胞（hepatic stellate cell，HSC）是发生HF的主要细胞。活化的HSC可分泌过量的纤维化胶原，同时表达纤维化相关产物α-平滑肌肌动蛋白（α-SMA）[4—5]。因此HSC成为了治疗HF的关键细胞。尽管目前尚无获批的特效药物，但大量体内外研究表明一些药物，如临床治疗肝癌的一线药物索拉非尼，一种转化生长因子-β（TGF-β）抑制剂，可明显减轻HF程度[6]。

甘草次酸（glycyrrhetinic acid，GA）来源于中药甘草，有研究[7]显示GA可通过调节TGF-β/Smad通路对HSC产生抑制作用。但GA疏水性较强，导致其治疗效果较差，限制了临床应用。

目前，利用两亲性聚合物胶束包载、递送疏水性药物已成为一种有效的递药方法。采用化学键合形式构成的两亲性复合物可自发形成聚合物胶束，以提高载药量、延缓释放速率、提高递送效率[8—9]。HSC表面存在大量CD44受体，透明质酸（HA）作

收稿日期：2022-10-26
基金项目：宁夏自然科学基金项目(2022AAC02035)
作者简介：朱溶月(1980—)，女，硕士研究生，专业方向：药物制剂及辅料。
通信作者：刘艳华(1982—)，女，博士生导师，教授，从事药物新剂型与新技术研究。
E-mail：lyanhua1214@126.com

为 CD44 受体的配体之一，具有较好的生物相容性和生物安全性[10]。因此，本研究将 HA 与 GA 化学键合，构建了两亲性复合物 HA-GA，并考察其体外抗 HF 活性。

1 仪器与试药

FD-1C 型冷冻干燥机（北京德天佑科技发展有限公司）；ARX-300 型核磁共振仪（德国 Bruker 公司）；UV-2600 型紫外 - 可见分光光度计（日本 Shimadzu 公司）；CH1600D 型荧光分光光度计（上海棱光技术有限公司）；ZS90 型马尔文激光粒度仪（英国 Malvern 公司）；HT7800 型透射电镜（日本 Hitachi 公司）；1260 型高效液相色谱仪（美国 Agilent 公司）；BG-2 型激光共聚焦显微镜（日本 Olympus 公司）。

GA（南京景竹生物科技有限公司，含量 97%，批号 JZ16122301）；HA（华熙福瑞达生物医药有限公司，批号 B12627012）；*N*- 羟基丁二酰亚胺（NHS）、尼罗红、1- 乙基 -(3- 二甲基氨基丙基)-3- 乙基碳二亚胺（EDC）和 4-(4,6- 二甲氧基三嗪 -2- 基)-4- 甲基吗啉盐酸盐（DMTMM，批号 S1050216）均购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司；氘代二甲基亚砜（DMSO-d_6，美国 CIL 公司）；二氯甲烷、乙二胺、甲醇、乙酸乙酯、石油醚（分析级）均购于天津市大茂化学试剂厂；3-(4,5- 二甲基 -2- 噻唑基)-2,5- 二苯基四氮唑溴盐（MTT，北京索莱宝科技有限公司）；RPMI 1640 培养基、DMEM 培养基（美国 HyClone 公司）；胎牛血清［依科赛生物科技（太仓）有限公司］；多聚甲醛（国药集团化学试剂有限公司）；兔抗小鼠 α-SMA 单克隆抗体、菁染料（Cy3）标记的山羊抗兔单克隆抗体（美国 Abcam 公司）；TGF-β1 试剂盒（苏州卡尔文生物科技有限公司）。

C57BL/6 小鼠，雄性，5 ～ 6 周龄，18 ～ 22 g，由宁夏医科大学实验动物中心提供，实验动物生产许可号 SCXK（宁）2020-0001，实验动物福利伦理委员会号 IACUC-NYLAC-2020-197。

大鼠肝星状细胞（HSC-T6 细胞）和人正常肝细胞系（L02 细胞）购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。HSC-T6 细胞置含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中，L02 细胞置含 10% 胎牛血清的 RPMI 164 培养基中，分别于 37 ℃、5% CO_2 孵育箱（相对湿度 95%）中培养。

2 方法与结果

2.1 HA-GA 复合物的制备

照文献[11]报道的方法合成 HA-GA 复合物，合成路线如图 1 所示。取 GA（1.41 g，3 mmol）溶于甲醇 30 mL 中，搅拌至溶解后，加入 DMTMM（0.967 g，3 mmol），室温下搅拌、活化 1.5 h，旋蒸除去溶剂，加入乙二胺 30 mL，室温搅拌 12 h，再旋蒸除去乙二胺，得到的固体用乙醇溶解，纯化后得中间体 GA-N。在圆底烧瓶中加入蒸馏水（10 mL）和 HA（60 mg，0.01 mmol），室温搅拌至溶解后，加入 GA-N（38.4 mg，0.05 mmol），同时滴加适量无水乙醇，搅拌 3 h 至溶液澄清。加入 DMTMM（0.967 g，3 mmol），室温搅拌至反应完全。溶液置透析袋（截留分子量 3 500）中，于蒸馏水中透析 2 d 除去杂质。于 －80 ℃预冻 12 h，转移至冷冻干燥机中，－40 ℃冷冻 8 h 后，于 12 ℃加热升华 4 h，得到白色粉末产物，即为 HA-GA 复合物。

2.2 HA-GA 复合物的表征

取适量 HA-GA 复合物粉末溶于 DMSO-d_6，使样品终质量浓度为 3 mg/mL，采用 ^{1}H NMR 技术鉴定 HA-GA 复合物的化学结构。结果表明，HA 的特征峰出现在 δ 1.99（*N*- 乙酰基甲基质子）和 δ 3.0 ～ 4.5（亚甲基和羟基），GA 的特征峰出现在于 δ 0.7 ～ 1.5（甲基），证明 HA-GA 被成功制备。

将 HA、GA、HA-GA 复合物分别配制成一定浓度溶液，进行紫外扫描。结果表明，HA-GA 复合物的紫外吸收光谱在 255 nm 波长处出现了 GA 的特征吸收峰，也说明制备成功（图 2A）。

临界胶束浓度（critical micelle concentration，CMC）是表征聚合物胶束在水中自组装特性和结构稳定性的重要参数。采用尼罗红法测定 HA-GA 复合物的 CMC。精密称取 HA-GA 复合物 10 mg，用去离子水溶解并定容至 10 mL，再用去离子水稀释至不同质量浓度，分别加入尼罗红的二氯甲烷溶液（尼罗红终浓度为 6×10^{-7} mol/L）。搅拌下缓慢挥除二氯甲烷，采用荧光分光光度计测定荧光强度。结果如图 2B 所示，HA-GA 复合物显示出较低的

CMC 值（9.6 μg/mL），说明 HA-GA 聚合物胶束在水中具有良好的自组装能力和结构稳定性。

2.3 HA-GA 聚合物胶束的制剂学表征

2.3.1 粒径、ζ 电位、稳定性

精密称取 HA-GA 复合物冻干品，溶解成终质量浓度为 1 mg/mL 的水溶液，探头超声 10 min，利用激光粒度仪检测纳米胶束的粒径和 ζ 电位。结果表明，HA-GA 聚合物胶束的平均粒径为（217.0±3.5）nm，PDI 为 0.158±0.02（n=3），可见胶束粒径大小合适，有利于靶向递送。所得聚合物胶束的 ζ 电位约为 －20 mV，主要是 HA 电离出来的羧基基团荷负电所致，该电位值有利于维持胶束在体内的稳定性。

取 HA-GA 聚合物胶束溶液滴至铜筛网上，用 1%磷钨酸溶液负染，晾干后采用透射电镜考察聚合物胶束的形态。结果（图 3）显示，HA-GA 聚合物胶束呈球形，分布较均匀。

取 HA-GA 胶束溶液 500 μL 于 EP 管中，高速离心（3 000×g）10 min，去除沉淀后，上清液中加入适量甲醇超声破坏，过 0.22 μm 滤膜后取上清液进行紫外检测。结果表明，HA-GA 聚合物胶束中 GA 的载药量为 18.9%，证明聚合物胶束有较好的载药能力。

HA-GA 聚合物胶束在 4 ℃保存 9 d，粒径由（217.0±2.0）nm 增加至（223.9±3.4）nm，可认为聚合物胶束有较好的体外稳定性（n=3）。

2.3.2 溶血性测试

通过眼眶取血的方式采集健康雄性小鼠新鲜血液，稀释到 2%后取 200 μL，加入含有不同质量浓度的 HA-GA 聚合物胶束溶液 800 μL，使 HA-GA 胶束的终质量浓度为 0.01、0.05、0.1、1 和 5 mg/mL；同法制备含磷酸盐缓冲液（PBS，pH 7.4）或 0.5%

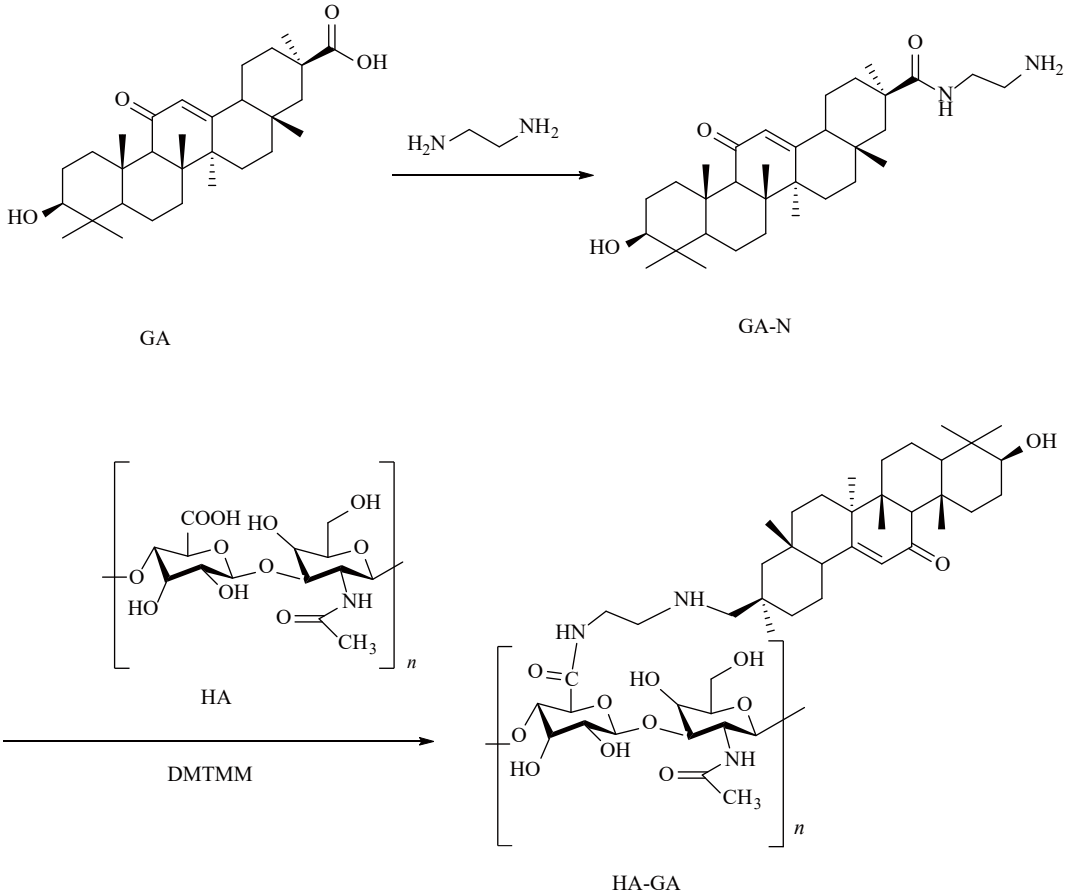


图 1　HA-GA 复合物的合成路线

Fig.1　Synthetic Route of HA-GA Composite

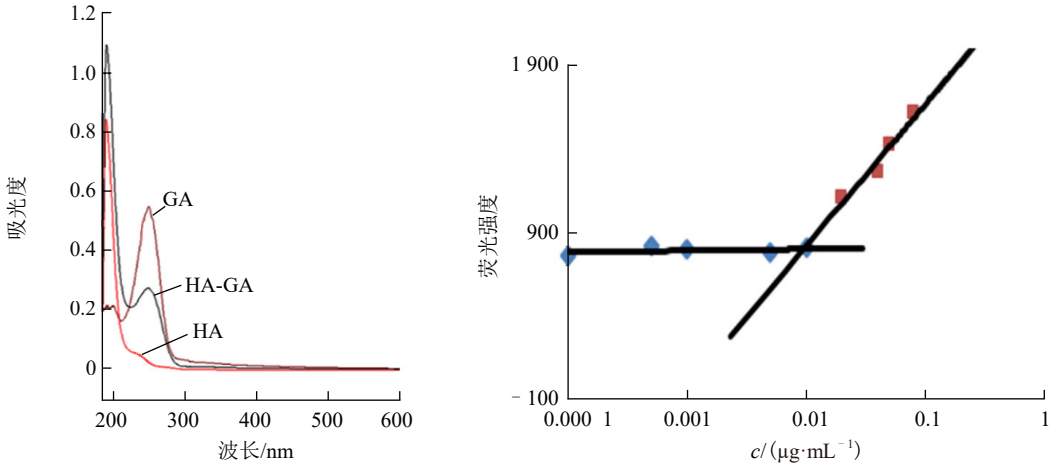


图 2 紫外吸收光谱（A）和 HA-GA 复合物的 CMC（B）

Fig.2 Ultraviolet Absorption Spectra (A) and CMC (B) of HA-GA Composite

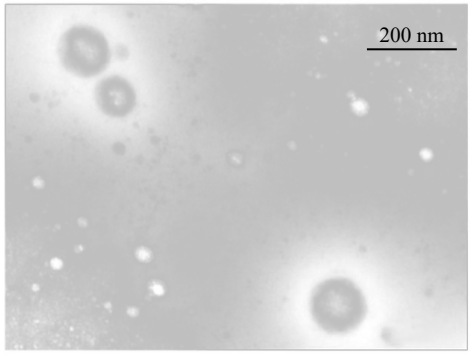


图 3 HA-GA 聚合物胶束的透射电镜照片

Fig.3 Transmission Electron Microscopic Image of HA-GA Polymeric Micelles

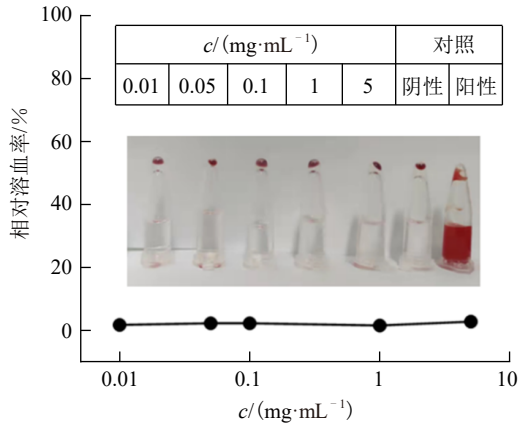


图 4 HA-GA 聚合物胶束的溶血性测试结果

Fig.4 Hemolytic Test Results of HA-GA Polymeric Micelles

Triton X-100 的红细胞悬液，分别作为阴性组和阳性组。在 37 ℃孵育 4 h 后，离心（1 000×*g*）15 min，将上清液置 96 孔板中。用酶标仪于 540 nm 波长处测定每个样品吸光度。按式①计算相对溶血率。

$$\text{相对溶血率} = [(A_s - A_n)/(A_p - A_n)] \times 100\% \quad ①$$

式中：A_s、A_n 和 A_p 分别代表样品、阴性对照和阳性对照血样的吸光度。

结果如图 4 所示，相对于阳性对照组，HA-GA 聚合物胶束的溶血率很小，在不同质量浓度下均未表现出溶血现象，即使是在 5 mg/mL 的质量浓度下也未出现溶血现象，说明 HA-GA 聚合物胶束的血液安全性较好，可用于静脉注射给药。

2.3.3 HA-GA 聚合物胶束的体外释放分析

聚合物胶束的体外释放试验是反映纳米制剂中药物释放行为的重要指标。本项采用动态透析法考察 GA 溶液和 HA-GA 聚合物胶束溶液的释药行为。取 GA 溶液和 HA-GA 聚合物胶束溶液，各 2 份，分别置透析袋（M_w=3 500）内，束紧袋口，置 PBS（pH 7.4 和 5.0）50 mL 中，于（37±0.5）℃、100 r/min 振摇条件下试验，分别于 0.5、1、2、3、4、8、12、24 和 48 h 时取样 3 mL，同时补充同温等量相应释放介质。采用紫外法测定药物含量，并计算累

积释放率，绘制体外释放曲线。设置 3 组平行试验，结果如图 5 所示。

如图 5A 所示，在模拟生理 pH 值（pH 7.4）环境下，GA 溶液组在 24 h 内累积释放率为 76.1%，HA-GA 聚合物胶束中 GA 的累积释放率为 9.8%。可能的原因是 HA-GA 复合物通过化学键合形成，在模拟生理 pH 值条件下不易发生化学键断裂，因此包载于聚合物胶束中的 GA 在模拟生理 pH 值中释放缓慢，表明该胶束可在血液中长时间循环，有利于药物有效蓄积于纤维化肝脏中。而在模拟细胞内涵体的 pH 值（pH 5.0）环境下，HA-GA 聚合物胶束中 GA 的累积释放率较高，说明化学键在该 pH 值下发生断裂，GA 被释放。综上所述，HA-GA 聚合物胶束在细胞内低 pH 值环境中可有效释放 GA、具有增强药效的潜力。

2.4　抑制 HSC 增殖的试验

采用 MTT 法考察 HA-GA 聚合物胶束的体外抗 HF 活性。分别取对数生长期的 HSC-T6 和 L02 细胞接种于 96 孔板中，于恒温培养箱中孵育 12 h，弃去旧培养液，对照组更换为新鲜培养液 100 μL，试验组分别加入 100 μL 用培养液稀释的系列质量浓度（0.05、0.1、0.5、1 和 5 μg/mL）的 GA 溶液、HA 和 GA 的物理混合溶液（HA+GA，HA 和 GA 的质量比 1 ∶ 1）、HA-GA 聚合物胶束溶液，置恒温培养箱中孵育 72 h。每孔加入 MTT 溶液（5 mg/mL）50 μL，继续孵育 4 h，弃去上清液，每孔加入 DMSO 100 μL，采用酶标仪测量 570 nm 处的吸光度，照式②计算细胞存活率，结果如图 6 所示。

$$细胞存活率=\frac{D_{样品}}{D_{对照}}\times 100\% \qquad ②$$

由图 6A 可见，HSC-T6 细胞的存活率呈现浓度依赖性。与 GA 溶液组相比，HA-GA 聚合物胶束组对 HSC-T6 细胞的毒性较强，提示有 HA 修饰的聚合物胶束可通过 CD44 受体介导的内吞途径促进细胞摄取，增强对 HSC 增殖的抑制作用；而 HA+GA 未呈现出增强的抑制作用，说明只有经过键合作用才可以提高 GA 的细胞摄取效率。对于 L02 细胞，HA-GA 聚合物胶束的抑制作用较弱（图 6B），这可能是由于 L02 细胞表面表达的、能特异性结合 HA 的受体较少，因此被摄取的胶束相对较少，说明 HA-GA 聚合物胶束对正常肝细胞的安全性较高。

2.5　对 TGF-β1 的抑制作用

GA 为 TGF-β/Smad 通路抑制剂，为了探究其对 TGF-β 的抑制作用，考察了不同剂量聚合物胶束和游离 GA 溶液对 HSC 分泌 TGF-β1 的影响。采用 ELISA 法对细胞培养上清液中的 TGF-β1 进行测定。取对数生长期的 HSC-T6 细胞接种于 24 孔板中，置恒温培养箱中孵育 12 h，弃去旧培养液，对照组更换为新鲜培养液（PBS），试验组则分别加入不同质

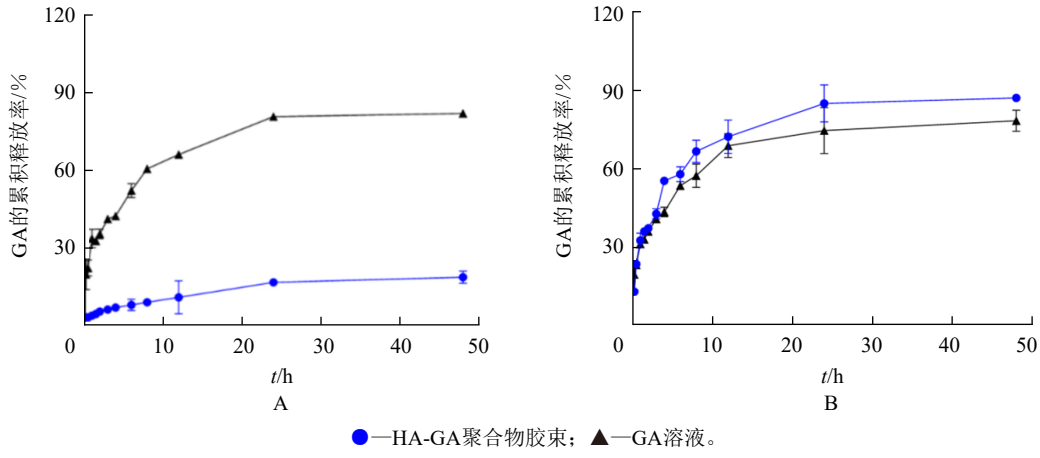


图 5　HA-GA 聚合物胶束中的 GA 在 pH 7.4（A）和 pH 5.0（B）PBS 中的体外释放曲线（*n*=3）

Fig.5　*In vitro* Release Curves of GA from HA-GA Micelles in pH 7.4（A）and pH 5.0（B）PBS（*n*=3）

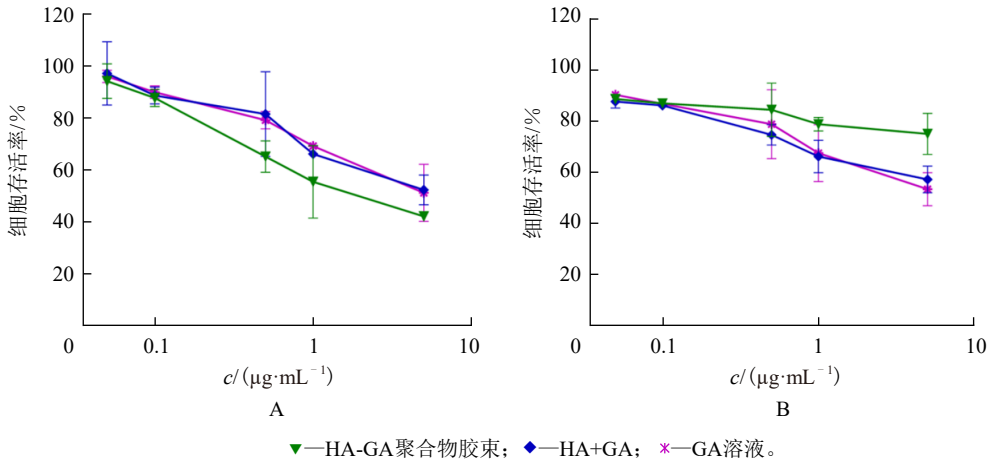


图 6 用不同制剂处理 HSC-T6 细胞（A）和 L02 细胞（B）72 h 后的细胞存活曲线（*n*=3）

Fig.6 Cell Survival Curves of HSC-T6 Cells (A) and L02 Cells (B) Treated with Different Formulations for 72 h (*n*=3)

量浓度（0.1、0.5、5 μg/mL）、用培养液稀释获得的 GA 溶液、HA+GA、HA-GA 聚合物胶束溶液，于恒温培养箱中孵育 72 h。取培养上清液用 TGF-β1 试剂盒进行检测。结果如图 7 所示。与 PBS 组相比，其他各试验组都有统计学差异（P<0.05）。

各试验组均对 HSC-T6 细胞分泌 TGF-β1 有较好的抑制作用。HA+GA 与 GA 溶液的抑制作用相当，而 HA-GA 聚合物胶束抑制 HSC-T6 细胞分泌 TGF-β1 的作用较强，且与药物质量浓度呈正相关趋势。综上所述，HA-GA 聚合物胶束可通过抑制 HSC 中 TGF-β 的分泌，从而增强 GA 抗 HF 的效果。

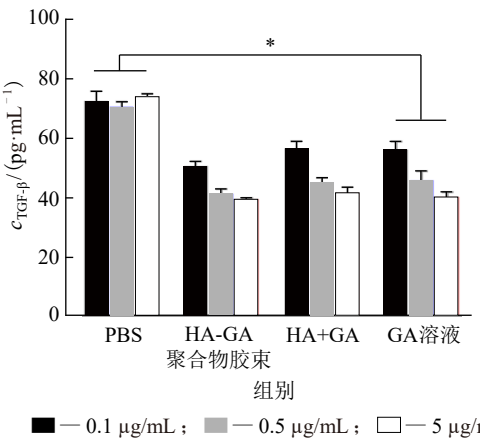


图 7 不同质量浓度制剂处理对 HSC-T6 细胞分泌 TGF-β 的抑制作用（与相应的 PBS 组相比，* 表示 P<0.05；n=3）

Fig.7 Inhibitory Effect on Secretion of TGF-β by HSC-T6 Cells Treated with Different Mass Concentrations of Formulations (Compared with the Corresponding PBS Group, * Represents P<0.05; n=3)

3 讨论

HSC 的活化和增殖是 HF 发生和发展的关键环节。因此，可将活化的 HSC 作为靶点，构建靶向药物，通过抑制 HSC 增殖而阻断 HF 进程。由于活化的 HSC 表面存在大量 CD44 受体，本研究采用聚合物胶束技术，将 CD44 的配体 HA 与抗 HF 药物 GA 通过化学键键合，制备了 HA-GA 聚合物胶束，并对其进行了制剂学表征和体外抗 HF 初步评价。结果显示，HA-GA 聚合物胶束粒径均一、大小合适，且有较好的稳定性和血液相容性。

TGF-β 是目前公认的、较重要的致纤维化细胞因子，不仅能促进 HSC 的增殖和 HF 相关胶原的分泌，还可促进肝内各种细胞合成和分泌促纤维化细胞因子，进一步激活 HSC，促进 HF 向肝硬化的发展。在体外抗 HF 研究中，HA-GA 聚合物胶束能有效抑制 HSC 的增殖，增强药物抗 HF 的作用，并对正常细胞有较高的安全性。同时，ELISA 法证明了 HA-GA 聚合物胶束可减少 HSC 的活化、抑制其增殖和分泌 TGF-β，达到了体外抗 HF 的目的，为临床治疗 HF 提供了新的思路。

参考文献：

[1] LUO J W, ZHANG P, ZHAO T, *et al*. Golgi apparatus-targeted chondroitin-modified nanomicelles suppress hepatic stellate cell activation for the management of liver fibrosis [J]. *ACS Nano*, 2019, **13**(4): 3910-3923.

[2] POILIL SURENDRAN S, GEORGE THOMAS R, MOON M J, *et al*. Nanoparticles for the treatment of liver fibrosis [J]. *Int J Nanomedicine*, 2017, **12**: 6997-7006.

[3] OLEKSII S, SHINJI F, LUO Y S, *et al*. Effects of pirfenidone in acute and sub-chronic liver fibrosis, and an initiation-promotion cancer model in the mouse [J]. *Toxicol Appl Pharm*, 2018, **339**: 1-9.

[4] LI H. Advances in anti hepatic fibrotic therapy with traditional chinese medicine herbal formula [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, **251**: 112442.

[5] ROCKEY D C, BELL P D, HILL J A. Fibrosis—a common pathway to organ injury and failure [J]. *N Engl J Med*, 2015, **373**(1): 95-96.

[6] DUONG H T T, DONG Z X, SU L, *et al*. The use of nanoparticles to deliver nitric oxide to hepatic stellate cells for treating liver fibrosis and portal hypertension [J]. *Small*, 2015, **11**(9): 2291-2304.

[7] RONG J C, HSIANG H W, YING J W. Strategies to prevent and reverse liver fibrosis in humans and laboratory animals [J]. *Arch Toxicol*, 2015, **89**(10): 1727-1750.

[8] CHEN Z J, JAIN A, LIU H, *et al*. Targeted drug delivery to hepatic stellate cells for the treatment of liver fibrosis [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2019, **370**(3): 695-702.

[9] ROCKEY D C. Current and future anti-fibrotic therapies for chronic liver disease [J]. *Clin Liver Dis*, 2008, **12**(4): 939-962.

[10] ELLIS E L, MANN D A. Clinical evidence for the regression of liver fibrosis [J]. *J Hepatol*, 2012, **56**(5): 1171-1180.

[11] 吴　菲, 张龙骧, 李肖成, 等. 载腺嘌呤甘草次酸修饰透明质酸纳米粒的制备及其对肝癌细胞增殖的影响[J]. 中国药理学通报, 2018, **34**(5): 706-712.