

· 药剂与炮制 ·

雷公藤红素-薏苡仁油微乳的制备及其体外抗肿瘤活性评价

李萍^{1,2}, 黄萌萌², 刘玉萍², 鞠建明^{2*}, 陈彦^{2*}

(1. 安徽中医药大学, 合肥 230012; 2. 江苏省中医药研究院, 南京 210028)

[摘要] 目的:制备雷公藤红素-薏苡仁油微乳(CC-MEs)并对其理化性质及体外抗肿瘤活性进行评价。方法:通过考察雷公藤红素在不同介质中的溶解度,筛选CC-MEs的最佳油相、乳化剂及助乳化剂。采用水滴定法制备微乳,根据其粒径,多分散指数(PDI),Zeta电位,包封率和载药量筛选CC-MEs的最佳处方,并对制备微乳的形态、稳定性和体外释放进行考察。通过四甲基偶氮唑盐法考察CC-MEs对宫颈癌HeLa细胞的毒性,评价其体外抗肿瘤活性。结果:CC-MEs最佳处方为雷公藤红素10 mg,薏苡仁油既为药物又兼作油相(用量400 mg),聚氧乙烯化蓖麻油450 mg,聚乙二醇400 150 mg;制备的微乳外观形态圆整,平均粒径(31.63±0.63) nm, PDI 0.06±0.01, Zeta电位(-10.14±1.35) mV, 48 h时雷公藤红素体外累积释放度(19.89±0.59)%,具有一定的缓释特性。CC-MEs对HeLa细胞具有较好的增殖抑制作用,其半数抑制浓度以薏苡仁油计为20.7 mg·L⁻¹,以雷公藤红素计为0.82 μmol·L⁻¹,联合用药指数0.93,表明两药联用具有协同作用。结论:CC-MEs粒径小且分布均匀、稳定性好、辅料用量少。雷公藤红素与薏苡仁油组分配伍制剂能够增强对HeLa细胞的增殖抑制作用,二者具有协同抗肿瘤功效。

[关键词] 雷公藤红素; 薏苡仁油; 微乳; HeLa细胞; 抗肿瘤活性

[中图分类号] R283.6; R945; R284.1; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)06-0001-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017060001

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161228.1107.004.html>

[网络出版时间] 2016-12-28 11:07

Preparation of Celastrol-Coicis Semen Oil Microemulsions and Evaluation of Its *in Vitro* Antitumor Activity

LI Ping^{1,2}, HUANG Meng-meng², LIU Yu-ping², JU Jian-ming^{2*}, CHEN Yan^{2*}

(1. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China;

2. Jiangsu Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare celastrol-Coicis Semen oil microemulsions (CC-MEs) and evaluate its physicochemical properties and *in vitro* anticancer activity. **Method:** The optimal oil phase, emulsifier and co-emulsifier of CC-MEs were selected by examining solubility of celastrol in different media. According to determination of particle size, Zeta potential, morphology, encapsulation efficiency and drug loading, the prescription was optimized. The stability and *in vitro* release of the microemulsions was investigated. The cytotoxicity of CC-MEs on cervical cancer HeLa cell was studied by MTT assay and its *in vitro* anti-tumor activity was evaluated. **Result:** Optimum prescription was as following: celastrol of 10 mg, Coicis Semen oil of 400 mg as

[收稿日期] 20160726(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373979, 81673606); 江苏省自然科学基金项目(BK20151048); 江苏省中医药局重点科技项目(ZD201509)

[第一作者] 李萍,在读硕士,从事中药新型给药系统研究, Tel:18256960663, E-mail:liping901230@163.com

[通讯作者] *鞠建明,博士,研究员,从事中药质量控制及新产品开发研究, Tel:13951876731, E-mail:jjm405@sina.com;

*陈彦,博士,研究员,从事中药新型给药系统及生物药剂学研究, Tel:13805157904, E-mail:ychen202@hotmail.com

material and oil phase, cremophor RH40 of 450 mg and polyethylene glycol 400 (PEG-400) of 150 mg. CC-MEs displayed the spherical surface with mean particle size of (31.63 ± 0.63) nm, polydispersity index (PDI) of 0.06 ± 0.01 and Zeta potential of (-10.14 ± 1.35) mV. The cumulative *in vitro* release rate of celastrol was $(19.89 \pm 0.59)\%$ in 48 h with a sustained-release characteristics. MTT experiment showed that 50% inhibitory concentrations (IC_{50}) of CC-MEs were $0.82 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ counted as celastrol and $20.7 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ counted as Coicis Semen oil; the combination index (CI) was 0.93, indicating that celastrol and Coicis Semen oil had a synergistic effect. **Conclusion:** CC-MEs presents small particle size, well-distributed, good stability and less excipients. In addition, preparations with the compatibility of celastrol and Coicis Semen oil can enhance the inhibitory effect on proliferation of HeLa cell.

[**Key words**] celastrol; Coicis Semen oil; microemulsions; HeLa cell; antitumor activity

雷公藤红素是雷公藤的主要有效成分,具有抗炎、抑制肿瘤细胞增殖和诱导肿瘤细胞凋亡等作用^[1],尤其对肺癌细胞(A549)^[2],肝癌细胞(HepG2)^[3],宫颈癌细胞(HeLa)^[4]抗增殖作用显著。但由于雷公藤红素毒性较大^[5],临床应用受到较大限制。薏苡仁油是中药薏苡仁中的主要抗肿瘤组分,以其为主要成分的康莱特注射液在临床上主要用于肝癌和肺癌的辅助治疗^[6],具有较好的疗效。现代药理研究表明薏苡仁油在治疗宫颈癌方面有一定优势^[7-8],其主要是通过影响细胞核因子- κB (NF- κB)和细胞因子白细胞介素-2(IL-2)的表达来发挥抗肿瘤及免疫调节作用^[9]。由于雷公藤红素和薏苡仁油水溶性较差,限制了二者口服制剂的应用。

微乳是由油相、水相、表面活性剂形成的热力学稳定的分散体系,可以荷载难溶性抗肿瘤药物,提高药物的溶解度,促进药物的口服吸收并提高其抗肿瘤活性^[10],且微乳释药较缓,在降低药物毒性方面也存在一定优势。然而微乳辅料用量较大,易对胃肠道产生刺激作用。课题组前期研究发现薏苡仁油可替代普通油相荷载难溶性成分,如灵芝三萜和依托泊苷,制备微乳,进而促进难溶性有效成分的溶解和吸收^[11]。故本实验对薏苡仁油作为油相荷载雷公藤红素制备雷公藤红素-薏苡仁油微乳(CC-MEs)的可行性进行研究,筛选制备CC-MEs的最佳油相、乳化剂和助乳化剂,根据粒径、电位、包封率、载药量和多分散指数(PDI)优选CC-MEs的最佳处方,并对所制备微乳的理化性质及体外抗HeLa细胞增殖活性进行评价。以期通过微乳制剂形式增溶雷公藤红素和薏苡仁油,在降低微乳辅料用量的同时降低制剂的毒性,并进一步探讨雷公藤红素和薏苡仁油二者联用抗宫颈癌细胞增殖的有效性,为高效低毒抗宫颈癌口服药物的研发提供参考。

1 材料

1260型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), Nano-ZS型激光散射粒度测定仪(英国马尔文公司), JEM-2100型透射电子显微镜(日本JEOL公司), AT201型1/10万电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司), TG16W型台式高速离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司), Milli-Q型纯水系统(美国Millipore公司), HERAcell 150型CO₂培养箱和SpectraMax 190型全波长酶标仪(美国热电集团)。

油酸聚乙二醇甘油酯(Labrafil M 1944 CS), 肉豆蔻酸异丙酯(IPM)和橄榄油均购自法国Gattefosse公司;雷公藤红素(泽朗医药科技有限公司,纯度 $\geq 99\%$), 薏苡仁油(自制,采用超临界萃取法制备,总甘油三酯质量分数以甘油三油酸酯计为70%), 聚氧乙烯化蓖麻油(cremophor RH40,德国BASF公司), 聚山梨酯-20(tween-20)和tween-80(成都市科龙化工试剂厂), 乳化剂OP-10(OP-10,上海久亿化学试剂有限公司), 辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯(labrasol)和聚乙二醇-400(PEG-400)(国药集团化学试剂有限公司), 胎牛血清(杭州四季青生物工程有限公司), RPMI-1640培养基和胰蛋白酶溶液(美国Gibco公司), 二甲基亚砜(DMSO,南京化学试剂有限公司), 四甲基偶氮唑盐(MTT,江苏Sunshine公司), 人宫颈癌细胞HeLa细胞株(中国科学院上海生命科学院生物化学与细胞生物学研究所)。

2 方法与结果

2.1 雷公藤红素在各介质中的溶解度测定

2.1.1 供试品溶液的制备 分别精密量取油相(IPM, 橄榄油, 薏苡仁油和Labrafil M 1944 CS), 乳化剂(tween-80, tween-20, cremophor RH40, OP-10和labrasol)和助乳化剂(PEG-400, 乙醇, 异丙醇和1,2-丙二醇)1 mL, 加入过量雷公藤红素, 在37℃恒温

气浴振荡 ($100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 24 h, 于 $13\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液 $100 \mu\text{L}$ 用甲醇稀释至 50 mL, 即得。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取雷公藤红素对照品 4.50 mg 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 得 $450 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备液。

2.1.3 线性关系考察 精密量取雷公藤红素储备液适量, 加甲醇稀释至质量浓度分别为 90.0, 45.0, 30.0, 22.5, 18.0, 15.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 分别于 426 nm 处测定吸光度 $A^{[12]}$ 。以 A 为纵坐标, 对照品质量浓度为横坐标, 得回归方程 $Y = 0.015\,8X - 0.063\,8$ ($R^2 = 0.999$), 线性范围 15.0 ~ 90.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.1.4 溶解度的测定 按上述方法测定雷公藤红素在不同介质中的含量, 计算溶解度。结果表明雷公藤红素在 IPM, 橄榄油, 薏苡仁油和 Labrafil M 1944 CS 中溶解度分别为 (16.72 ± 0.51), (18.98 ± 0.47), (27.81 ± 0.49), (28.65 ± 0.32) $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 在 tween-80, tween-20, cremophor RH40, OP-10 和 labrasol 中溶解度分别为 (22.96 ± 0.37), (20.61 ± 0.43), (24.46 ± 0.23), (14.11 ± 0.13), (21.69 ± 0.27) $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 在 PEG-400, 乙醇, 异丙醇和 1,2-丙二醇中溶解度分别为 (33.62 ± 0.31), (16.25 ± 0.41), (9.30 ± 0.22), (7.84 ± 0.34) $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

雷公藤红素在不同油相中溶解度经 SPSS 17.0 软件 t 检验分析, 雷公藤红素在薏苡仁油中的溶解度与 Labrafil M 1944 CS 相比, 无显著性差异, 且薏苡仁油具有抑制 HeLa 细胞增殖的作用^[13], 既可作为药物又可替代普通油相制备微乳, 说明选择薏苡仁油作为油相荷载雷公藤红素具有可行性。雷公藤红素在乳化剂 cremophor RH40 和助乳化剂 PEG-400 中溶解性最好, 且两者生物相容性较好^[14], 故选用 cremophor RH40 和 PEG-400 作为乳化剂和助乳化剂, 制备雷公藤红素-薏苡仁油微乳 (CC-MEs)。

2.2 CC-MEs 的制备 前期采用伪三元相图法^[15] 筛选出最佳空白处方为薏苡仁油 400 mg, cremophor RH40 450 mg, PEG-400 150 mg, 故以此为载体荷载雷公藤红素, 并考察雷公藤红素荷载量。精密称取薏苡仁油 400 mg, cremophor RH40 450 mg, PEG-400 150 mg 于西林瓶中, 分别加入雷公藤红素 5, 10, 20, 40 mg, 每份样品重复 3 份, 在磁力搅拌器下搅拌 1 h, 混匀, 得非水相。采用水滴定法逐滴加水至非水相中, 直至形成澄清透明的溶液, 搅拌均匀, 于量瓶中加水定容至 5 mL, 即得。

2.3 粒径和 Zeta 电位测定及形态观察 CC-MEs 稀释 10 倍, 取 1 mL 加至马尔文激光散射粒度测定仪的样品池中, 在室温下测定各微乳的平均粒径, Zeta 电位及多分散指数 (PDI), 见表 1。结果表明不同雷公藤红素荷载量制备的 CC-MEs 粒径均较小, 约 30 nm, 分布较窄, 均带有负电荷。取 CC-MEs (载雷公藤红素 10 mg) 稀释 5 倍的微乳液 1 滴, 滴于载有 Formvar 支持膜的铜网上, 放于蜡板上, 晾干, 滴加 2% 磷钨酸 1 滴, 晾干, 用滤纸吸走多余的液体, 放于透射电镜下观察微乳的外观形态, 见图 1。结果表明制备的 CC-MEs 形态圆整, 边缘清晰, 粒径分布较均匀。

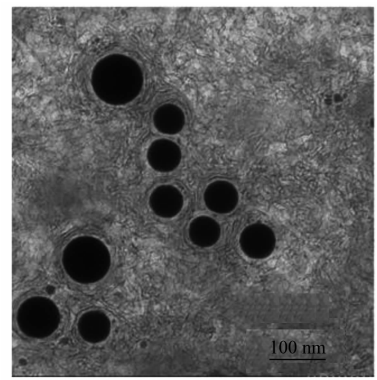


图 1 CC-MEs 的透射电镜
Fig. 1 TEM of CC-MEs

2.4 雷公藤红素的含量测定

2.4.1 色谱条件 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 流动相甲醇-2% 乙酸 (90:10), 流速 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 426 nm, 进样量 5 μL 。

2.4.2 对照品溶液的制备 精密称取雷公藤红素对照品 3.20 mg 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 得 $320 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备液。

2.4.3 供试品溶液的制备 量取 CC-MEs 1 mL, 加甲醇稀释至 10 mL, 超声 (200 W, 40 kHz) 10 min 破乳, 于 $13\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 精密吸取上清液 0.5 mL 置于 5 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 即得。

2.4.4 线性关系考察 精密量取雷公藤红素储备液适量, 用甲醇稀释至质量浓度分别为 160.0, 80.0, 40.0, 20.0, 10.0, 5.0, 2.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 按 2.4.1 项下色谱条件测定, 以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 得回归方程 $Y = 5.025X - 12.626$ ($R^2 = 0.999\,8$), 线性范围 2.5 ~ 160.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.4.5 精密度试验 取 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 雷公藤红素对照品溶液, 按 2.4.1 项下色谱条件重复进样 6 次,

计算日内精密度 RSD 0.9%, 表明仪器精密度良好。

2.4.6 稳定性试验 取同一批供试品溶液, 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 h 按 2.4.1 项下色谱条件测定, 计算雷公藤红素峰面积的 RSD 1.2%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定性较好。

2.4.7 重复性试验 取供试品溶液 6 份, 按 2.4.1 项下色谱条件测定, 计算雷公藤红素峰面积的 RSD 1.5%, 表明该方法重复性较好。

2.4.8 加样回收率试验 量取空白微乳 6 份, 每份 1 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 各加入雷公藤红素对照品 1.0 mg, 用甲醇稀释至刻度, 得 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

样品溶液。按 2.4.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.4.1 项下条件测定, 计算平均回收率 98.4%, RSD 1.5%, 表明该方法准确可靠。

2.5 包封率和载药量的测定 将含不同质量雷公藤红素的微乳经 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 分别精密量取续滤液 1 mL, 按 2.4.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.4.1 项下色谱条件测定, 计算包封率。精密量取过膜后的微乳 1 mL 冷冻干燥, 得冻干物, 称重, 得微乳冻干物质量, 加入甲醇 10 mL 复溶, 涡旋 2 min, 于 $13\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液进样, 测定微乳冻干物复溶后雷公藤红素浓度, 计算载药量, 见表 1。

表 1 不同雷公藤红素载量下微乳的粒径、包封率、载药量及 Zeta 电位 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Particle size, Zeta potential, encapsulation efficiency and loading rate of CC-MEs with different amount of celastrol ($\bar{x} \pm s, n=3$)

雷公藤红素加入量/mg	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	包封率/%	载药量/%
5	28.75 ± 0.36	0.09 ± 0.01	-16.37 ± 1.00	99.92 ± 1.98	0.40 ± 0.07
10	31.63 ± 0.63	0.06 ± 0.01	-10.14 ± 1.35	96.26 ± 2.13	0.87 ± 0.05
20	32.45 ± 0.27	0.07 ± 0.01	-15.77 ± 2.30	93.14 ± 2.02	1.64 ± 0.03
40	32.80 ± 0.39	0.05 ± 0.01	-8.59 ± 0.63	88.40 ± 1.00	3.17 ± 0.12

结果表明随雷公藤红素加入量的增加, 包封率逐渐降低。当雷公藤红素加入量在 5 ~ 20 mg 时, 微乳的包封率均 > 90%。当雷公藤红素的加入量达 20, 40 mg 时, 包封率 > 85%, 同时载药量较高, 但制备的微乳室温放置 24 h 后药物容易析出, 导致雷公藤红素泄漏。而当雷公藤红素加入量为 5 mg 时, 微乳中雷公藤红素的载药量较低。根据实验需求, CC-MEs 处方可选择雷公藤红素载量 5 ~ 10 mg, 薏苡仁油 400 mg, cremophor RH40 450 mg, PEG-400 150 mg, 加水滴定至澄清透明的微乳形成, 加水定容至一定体积, 对雷公藤红素载量为 10 mg 的 CC-MEs 进行了体外释放性能与稳定性考察。

取上清液按 2.4.1 项下色谱条件测定, 计算雷公藤红素累积释放度, 绘制释药曲线, 见图 2, 结果发现雷公藤红素释放度随着时间的延长而逐渐增加, 在 pH 7.4 的条件下, 药物缓慢释放, 48 h 累积释放度达 $(19.89 \pm 0.59)\%$; 表明在 pH 7.4 条件下微乳稳定性较好, 具有一定的缓释特性, 可避免因药物突释而引起毒副作用, 延长药物作用时间, 减少给药次数。

$$\text{包封率} = \frac{\text{雷公藤红素总量测得值}}{\text{雷公藤红素总量理论值}} \times 100\%$$

$$\text{载药量} = \frac{\text{雷公藤红素总量测得值}}{\text{冻干物质量}} \times 100\%$$

2.6 CC-MEs 体外释放性能考察 分别精密量取已去除游离药物的 CC-MEs 溶液 1 mL, 装入预先处理好的透析袋中, 将透析袋两端密封, 置于 100 mL 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4, 含 0.5% tween-80) 中, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温水浴振荡 ($60 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 分别于 5, 10, 30 min 和 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 h 取释放液 1 mL, 同时补充等量的释放介质。所得样品溶液经 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜滤过, 取续滤液 $800 \mu\text{L}$ 氮气吹干, 加入甲醇 $200 \mu\text{L}$, 涡旋 5 min 使样品充分溶解, $13\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,

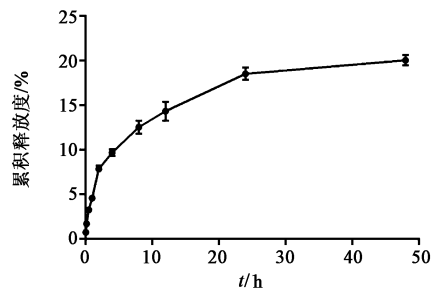


图 2 CC-MEs 的体外累积释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 In vitro release profiles of celastrol in CC-MEs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.7 CC-MEs 的稳定性考察

2.7.1 稀释对稳定性的影响 取 CC-MEs 1 mL, 分别加水及生理盐水将其稀释 10, 100 倍, 测定粒径和 PDI。结果粒径均约 30 nm, PDI 在 0.06 左右, 经 SPSS 17.0 软件分析, 不同介质稀释不同倍数后, 微乳的粒径及 PDI 与原液相比, 均无显著性差异。表

明稀释对微乳粒径和 PDI 均无显著性影响。

2.7.2 放置时间对稳定性的影响 将 CC-MEs 在室温条件下保存 30 d, 观察微乳溶液有无分层、絮凝等现象, 室温下测定微乳的粒径及 PDI。结果显示放置 10, 20, 30 d 后, 微乳的粒径均约 30 nm, PDI 约 0.06, 经 SPSS 17.0 软件分析, 放置不同时间后微乳的粒径及 PDI 与放置 0 d 的微乳相比, 无显著性差异。表明 CC-MEs 放置 30 d 内微乳粒径和 PDI 均较稳定, 无显著变化。

2.7.3 高速离心对稳定性的影响 取微乳 1 mL 于离心管中, 于 $13\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 min, 结果显示制备的微乳无明显絮凝和分层现象。

2.7.4 pH 对稳定性的影响 取微乳样品溶液 5 份, 加磷酸缓冲液调节 pH 分别为 2.0, 4.5, 5.5, 6.5 和 7.4, 观察其外观形态的变化并测定其粒径。结果显示不同 pH 下微乳的粒径均约 30 nm, PDI 约 0.06, 经 SPSS 17.0 软件分析, 不同 pH 下微乳的粒径及 PDI 无显著性差异。表明在考察范围内 pH 对微乳的粒径和 PDI 均无显著性影响。

2.8 CC-MEs 体外抗 HeLa 细胞增殖作用考察

2.8.1 药液的配制 称取雷公藤红素 7.20 mg 溶于 1 mL 的 DMSO 中, 用不完全培养基稀释至浓度分别为 0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 作为雷公藤红素 (Cel) 组。精密称取薏苡仁油 400 mg 溶于 1 mL 的 DMSO 中, 用不完全培养基稀释至质量浓度分别为 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 作为薏苡仁油 (Coi) 组。称取雷公藤红素 7.20 mg, 薏苡仁油 400 mg, 加 DMSO 溶解, 用不完全培养基稀释至不同浓度, 按雷公藤红素计浓度分别为 0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 按薏苡仁油计质量浓度分别为 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 作为雷公藤红素-薏苡仁油组分配伍 (Cel-Coi) 组。取 CC-MEs, 用不完全培养基稀释至不同浓度, 设置同 Cel-Coi 组, 作为 CC-MEs 组。

2.8.2 MTT 试验 取对数生长期 HeLa 细胞, 用胰蛋白酶消化使其脱壁, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液重悬成单细胞悬液并进行细胞计数, 在加样槽中用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液稀释至 5×10^4 个/mL, 吹打均匀, 用移液枪吸取含细胞培养液接种于 96 孔细胞培养板, 每孔培养液体积 200 μL , 在 $37\text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中孵育 24 h, 吸弃原培养液。分别加入 Cel 组, Coi 组, Cel-Coi 组和 CC-MEs 组各浓度药物 ($n=6$), 设置不含药物的不完全培养基为空白组。在 $37\text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2 培养箱继

续孵育 24 h, 每孔加入 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ MTT 溶液 20 μL , 培养 4 h 后终止, 弃掉孔中上清液, 每孔加入 DMSO 200 μL , 振荡 10 min, 于 570 nm 处测定每孔的吸光度 A 。数据采用 SPSS 17.0 统计软件处理, 按细胞存活率 = $A_{\text{给药组}}/A_{\text{空白组}}\times 100\%$ 计算药液中细胞存活率, 求出半数抑制浓度 (IC_{50})。计算两药联用指数 (combination index, CI), $\text{CI}<1$ 则表明两者有协同作用^[16]。

$$\text{CI} = \text{CC-MEs 组中雷公藤红素 } \text{IC}_{50} / \text{Cel 组 } \text{IC}_{50} + \text{CC-MEs 组中薏苡仁油 } \text{IC}_{50} / \text{Coi 组 } \text{IC}_{50}$$

结果显示随着各组药物浓度的增大, Cel 组细胞存活率由 $(78.35 \pm 7.93)\%$ 降至 $(18.40 \pm 2.29)\%$, Coi 组细胞存活率由 $(92.48 \pm 4.14)\%$ 降至 $(35.71 \pm 2.94)\%$, Cel-Coi 组细胞存活率由 $(82.66 \pm 6.21)\%$ 降至 $(22.63 \pm 2.39)\%$, CC-MEs 组细胞存活率由 $(80.29 \pm 6.28)\%$ 降至 $(19.91 \pm 2.09)\%$ 。在所测浓度范围内, 各给药组对 HeLa 细胞的细胞毒性呈浓度依赖性, 随着浓度提高, 各给药组细胞生存率逐渐下降, 各组趋势相同。雷公藤红素对 HeLa 细胞的细胞毒性较大, IC_{50} 仅 $0.98\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 而薏苡仁油的 IC_{50} $228.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。结果表明雷公藤红素和薏苡仁油在体外均具有抑制 HeLa 细胞增殖的活性, 其中雷公藤红素效果显著。Cel-Coi 组中雷公藤红素和薏苡仁油的 IC_{50} 较单独给药组显著下降, 分别为雷公藤红素 $0.88\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 薏苡仁油 $22.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。CC-MEs 组抑制 HeLa 细胞增殖作用显著增强, 其雷公藤红素 IC_{50} 仅 $0.82\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 薏苡仁油 IC_{50} $20.7\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 较单独给药组 IC_{50} 均明显降低。CI 0.93, 表明两药联合使用具有协同抑制 HeLa 细胞增殖的作用。

3 讨论

本实验以薏苡仁油作为油相荷载雷公藤红素, 成功制备了粒径约 30 nm 的微乳, 该微乳粒径较小且稳定性好, 体外释药较缓。MTT 试验表明 CC-MEs 组的 IC_{50} 均低于单独给予雷公藤红素和薏苡仁油组, 说明雷公藤红素和薏苡仁油联合给药能增强 CC-MEs 对 HeLa 细胞增殖的抑制作用。

文献报道雷公藤红素、薏苡仁油均有较好的抗肿瘤疗效, 雷公藤红素主要通过诱导 HeLa 细胞自我吞噬达到抗肿瘤效果^[17], 而薏苡仁油除能诱导肿瘤细胞凋亡外, 还可增强机体免疫功能^[18], 但二者水溶性差, 加上雷公藤红素毒性较大, 在一定程度上限制了二者的临床应用, 而本实验以薏苡仁油作为油相制备雷公藤红素微乳, 改善了二者的溶解性, 与

现有文献雷公藤红素微乳比较^[19],大幅降低了微乳中辅料的用量,提高了微乳的总载药量(以雷公藤红素和薏苡仁油总量计达 40%),且雷公藤红素和薏苡仁油联合用药比单用雷公藤红素抗肿瘤活性更强。另据文献报道,纳米粒径在 10~100 nm 时,有利于增加纳米粒子在肿瘤组织中的分布,减少肝脏的摄取并避免肾脏的滤过^[20],本研究制备的微乳粒径小,有利于降低雷公藤红素在肝、肾中的分布,减轻其肝肾毒性,且延长微乳血液循环时间,有利于雷公藤红素的吸收,提高其生物利用度。后续将对其体内抗宫颈癌疗效进行研究,深入探讨中药多组分微乳的体内作用机制,为中药抗肿瘤制剂的研发提供参考。

[参考文献]

[1] Youn G S, Kwon D J, JU S M, et al. Celastrol ameliorates HIV-1 Tat-induced inflammatory responses via NF- κ B and AP-1 inhibition and heme oxygenase-1 induction in astrocytes [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014, 280(1):42-52.

[2] QU D, HE J, LIU C, et al. Triterpene-loaded microemulsion using Coix lacryma-jobi seed extract as oil phase for enhanced antitumor efficacy: preparation and *in vivo* evaluation [J]. *Int J Nanomed*, 2014, 9:109-119.

[3] HAN X, SUN S, ZHAO M, et al. Celastrol stimulates hypoxia-inducible factor-1 activity in tumor cells by initiating the ROS/Akt/p70S6K signaling pathway and enhancing hypoxia-inducible factor-1 α protein synthesis [J]. *PLoS One*, 2014, 9(11):e112470.

[4] HU Y, QI Y, LIU H, et al. Effects of celastrol on human cervical cancer cells as revealed by ion-trap gas chromatography-mass spectrometry based metabolic profiling [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1830(3):2779-2789.

[5] 吴丹,寇芳,吕春明,等.雷公藤红素抗癌作用的研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(11):356-361.

[6] QU D, MA Y, SUN W, et al. Microemulsion-based synergistic dual-drug codelivery system for enhanced apoptosis of tumor cells [J]. *Int J Nanomed*, 2015, 10:1173-1187.

[7] Rastogi N, Duggal S, Singh S K, et al. Proteasome inhibition mediates p53 reactivation and anti-cancer activity of 6-gingerol in cervical cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(41):43310-43325.

[8] YU Y L, LU Y, TANG X, et al. Formulation, preparation and evaluation of an intravenous emulsion containing

Brucea javanica oil and Coix Seed oil for anti-tumor application [J]. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31(4):673-680.

[9] 姚根宏,张国栋,栾建凤,等.薏苡仁诱导急性 T 淋巴细胞白血病 Jurkat 细胞凋亡及其机制 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2009, 17(4):879-882.

[10] 何勤,刘亚圆.肿瘤靶向纳米载药系统的设计与构建 [J]. *药学进展*, 2016, 40(4):261-269.

[11] 袁成甜,贺俊杰,陈彦,等.灵慧方多组分微乳的制备及其抗肿瘤活性研究 [J]. *中草药*, 2014, 45(22):3284-3288.

[12] 吴霞,黄文华,郭宝林,等.雷公藤制剂中雷公藤红素的含量研究 [J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(7):836-838.

[13] Manosroi A, Sainakham M, Chankhampan C, et al. Potent *in vitro* anti-proliferative, apoptotic and anti-oxidative activities of semi-purified Job's tears (*Coix lacryma-jobi* Linn.) extracts from different preparation methods on 5 human cancer cell lines [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 187:281-292.

[14] 贺俊杰,陈彦,杜萌,等.灵芝多组分微乳一步制备方法的探索 [J]. *药学报*, 2013, 48(3):441-446.

[15] 刘明健,瞿鼎,陈彦,等.丁酰半乳糖酯修饰的薏苡仁组分微乳的制备及其体外抗肿瘤活性研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(18):2696-2702.

[16] LI Y, LIN J, HUANG Y, et al. Self-targeted, shape-assisted, and controlled-release self-delivery nanodrug for synergistic targeting/anticancer effect of cytoplasm and nucleus of cancer cells [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7(46):25553-25559.

[17] WANG W B, FENG L X, YUE Q X, et al. Paraptosis accompanied by autophagy and apoptosis was induced by celastrol, a natural compound with influence on proteasome, ER stress and Hsp90 [J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(5):2196-2206.

[18] 吴良村,陈良良,李庆霞,等.康莱特对肿瘤浸润淋巴细胞的体外扩增及抗肿瘤作用的研究 [J]. *中国医药学报*, 2004, 19(11):656-658.

[19] QI X, QIN J, MA N, et al. Solid self-microemulsifying dispersible tablets of celastrol: formulation development, characterization and bioavailability evaluation [J]. *Int J Pharm*, 2014, 472(1/2):40-47.

[20] Danhier F, Feron O, Pr at V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery [J]. *J Control Release*, 2010, 148(2):135-146.

[责任编辑 刘德文]