

共载多西他赛和藤黄酸白蛋白纳米粒的处方优选和质量评价

郑宇¹, 李小芳^{1*}, 吴超群², 赵甜甜¹, 马祖兵¹, 孙强¹

(1. 成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室——省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137;
2. 凯里学院, 贵州 凯里 556000)

[摘要] 目的:利用星点设计-效应面法优化共载多西他赛(DTX)和藤黄酸(GA)白蛋白纳米粒(DTX-GA-BSA NPs)的处方,制备 DTX-GA-BSA NPs 并评价其质量。采用两药相互作用指数(CDI)筛选 DTX 和 GA 的最佳协同配比,为该纳米粒的应用与推广提供实验依据。**方法:**采用 NabTM法制备 DTX-GA-BSA NPs,以牛血清白蛋白(BSA)为载体材料。利用 Design-Expert 8.0.6 软件设计实验和处理数据,以粒径和多分散性指数(PDI)的总评“归一值”(OD)以及包封率为评价指标,测定 DTX-GA-BSA NPs 的粒径,PDI,包封率和 Zeta 电位。利用噻唑蓝比色法分别测定 DTX 和 GA 对 MGC-803 和 HGC-27 细胞增殖的单独和协同抑制作用。**结果:**DTX-GA-BSA NPs 的最优处方为 BSA 质量浓度 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,水油体积比(水相与油相的体积比)1:17,药载比(药物与载体的质量比)1:10;模型预测值与实测值偏差较小,具有优良的预测性。DTX-GA-BSA NPs 的平均粒径 135.8 nm,PDI=0.09,Zeta 电位 -21.4 mV。当 DTX 和 GA 浓度分别为 $0.004, 0.12 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,二者对 MGC-803 细胞的协同增殖抑制作用最显著;当 DTX 和 GA 浓度分别为 $0.004, 1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,二者对 HGC-27 细胞的协同增殖抑制作用最显著。**结论:**优选的 DTX-GA-BSA NPs 处方工艺稳定可靠,建立的数学模型具有良好预测能力和实用性。DTX 和 GA 联用对 MGC-803, HGC-27 细胞均具有协同作用,但不呈浓度依赖性。

[关键词] 多西他赛;藤黄酸;白蛋白纳米粒;星点设计-效应面法;总评“归一值”;两药相互作用指数;NabTM法
[中图分类号] R22;R28;R94;Q2;C37 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)16-0104-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20190846

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190101.1122.010.html>

[网络出版时间] 2019-01-04 11:55

Optimization of Formulation of Co-loaded Docetaxel and Gambogic Acid Albumin Nanoparticles and Evaluation of Its Quality

ZHENG Yu¹, LI Xiao-fang^{1*}, WU Chao-qun², ZHAO Tian-tian¹, MA Zu-bing¹, SUN Qiang¹
(1. Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Key Laboratory of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources in Sichuan Province, Key Laboratory Breeding Base of Co-founded by Sichuan Province and Ministry of Science and Technology, Chengdu 611137, China; 2. Kaili University, Kaili 556000, China)

[Abstract] **Objective:** The formulation of co-loaded docetaxel (DTX) and gambogic acid (GA) albumin nanoparticles (DTX-GA-BSA NPs) was optimized by central composite design-response surface methodology to prepare DTX-GA-BSA NPs, and its quality was evaluated. The optimal synergistic ratio of DTX and GA was screened by coefficient of drug interaction (CDI). **Method:** NabTM method was used to prepare DTX-GA-BSA NPs with bovine serum albumin (BSA) as the carrier material. Design-Expert 8.0.6 software was used to

[收稿日期] 20181031(018)

[基金项目] 四川省科技厅支撑项目(2015SZ0039);四川省人民医院青年基金项目(2016QN08)

[第一作者] 郑宇,在读硕士,从事中药新制剂、新剂型、新技术研究,E-mail:1219839332@qq.com

[通信作者] *李小芳,教授,博士生导师,从事中药新制剂、新剂型、新技术研究,Tel:028-61800234,E-mail:lixiaofang918@163.com

design the experiment and process the data, overall desirability (OD) of particle size and polydispersity index (PDI), encapsulation rate were taken as indexes. The particle size and Zeta potential of the nanoparticles were measured. Individual and synergistic inhibitory effects of DTX and GA on the proliferation of MGC-803 and HGC-27 cells were determined by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay, respectively. **Result:** The optimum prescription of DTX-GA-BSA NPs was as follows: BSA concentration of $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, water-oil phase volume ratio of 1:17, drug-loading ratio (mass ration of drug to carrier) of 1:10. The average particle size of DTX-GA-BSA NPs was 135.8 nm and PDI was 0.09, Zeta potential was -21.4 mV . The deviation between the predicted value and the observed value of the model was small, the model had good predictability. For MGC-803 cell, when the concentrations of DTX and GA were 0.004, $0.12 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively (mass ratio of DTX to GA was 1:23), the CDI value was the smallest and the synergistic proliferation inhibition was the most significant. For HGC-27 cell, when the concentrations of DTX and GA were 0.004, $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively (mass ratio of DTX to GA was 1:195), the synergistic proliferation inhibition was the most significant. **Conclusion:** The optimized formulation of DTX-GA-BSA NPs is stable and reliable. The established mathematical model has good predictive ability and practicability. DTX combined with GA has synergistic effect on MGC-803 and HGC-27 cells without concentration dependence.

[**Key words**] docetaxel; gambogic acid; albumin nanoparticles; central composite design-response surface methodology; overall desirability; coefficient of drug interaction; NabTM method

据国家癌症中心公布的《中国胃癌流行病学现状》报告,2012 年全球胃癌新发 95.1 万例,死亡 72.3 万例。其中,中国的发病和死亡例数均占到了全球将近一半,且发病率依然呈上升趋势。目前,治疗胃癌多采用手术切除、化疗或放疗,但治疗后 5 年内的生存率仍然不足 20%^[1-5]。肿瘤具有一定的适应力且对多种细胞毒性药物产生抗性,这也是化疗失败的主要原因——多药耐药性 (MDR)。将纳米技术应用于逆转 MDR 现象是当今新药研究的前沿课题,纳米技术寻求使用直径为 1~100 nm 的药物输送载体,其由几种不同的材料组成,向癌细胞输送抗癌药物,并克服 MDR^[6-7]。

多西他赛 (DTX) 是合成紫杉醇过程中的中间产物,是美国食品药品监督管理局 (FDA) 于 1998 年批准上市的紫杉烷类抗癌药物^[3]。藤黄酸 (GA) 是从藤黄科植物藤黄树的干燥树脂中提取并纯化而得的有效成分之一^[8]。多项临床前研究表明,GA 对多种恶性肿瘤 (包括实体和血液系统癌症) 具有抗癌特性,但对人体正常细胞具有耐药性。GA 还可以通过下调存活蛋白表达和诱导细胞凋亡使人胃癌细胞对 DTX 敏感^[9]。在胃肠细胞中,GA 通过抑制对 DTX 诱导细胞凋亡的基因,β-微管蛋白 III, tau 和存活蛋白的 mRNA 表达,起到致敏 DTX 的作用^[10]。此外,由于 DTX 和 GA 水溶性很差,现有注射剂多辅助溶剂给药,但助溶剂黏性大、具有溶血性,且在临床实验中,多数患者会产生刺激性和过敏反

应^[8,11]。因此,开发一种新的剂型,以提高 DTX 和 GA 在水中的溶解度,减少溶剂带来的毒性和不良反应,同时 GA 协同 DTX 可以提高药物疗效,克服 MDR。载体选择牛血清白蛋白 (BSA),因其具有更高的治疗指数和安全性^[12],相较于助溶剂能显著降低不良反应,已成为近年来新型药物传递系统研究的热点^[13]。

本实验针对 DTX 和 GA 水溶性差且 DTX 的耐药性问题,利用白蛋白纳米粒增加药物水溶性和避免大剂量用药带来的副作用,将协同抗胃癌的 DTX 和 GA 共载于 BSA 中,制成共载 DTX 和 GA 白蛋白纳米粒,为 DTX 和 GA 的新型给药系统研究提供一种新的有效策略。

1 材料

BB15 型 CO₂ 细胞恒温培养箱 (美国 Thermo Fisher 公司),CKX-41 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司),Multiskan FC 型酶标仪 (美国 Thermo Fisher 公司),Universal 320/320R 型离心机 (德国 Hettich 公司),JY92-IIDN 型超声波破碎仪 (成都航瑞科技有限公司),Nano-ZS 型激光粒度和 Zeta 电位测定仪 (英国 Malvern 公司),AH-BASIC 型高压匀质机 (加拿大 ATS 公司),BP211D 型精密电子天平 (德国 Sartorius 公司),Airstream Class II 型超净工作台 (新加坡 Esco 公司),TS-200 型脱色摇床 (数显) (海门市其林贝尔仪器制造有限公司),EYEL4 型旋转蒸发仪 (上海爱朗仪器有限公司),e2695 型高效液相

色谱仪(美国 Waters 公司)。

藤黄酸(GA, 自制, 批号 20180510, 纯度 98%); 多西他赛(DTX)原料药, GA 对照品和 DTX 对照品(上海源叶生物科技有限公司, 批号分别为 EE060142, P11J9L52599, P11J9L62401, 纯度依次为 99%, 98%, 98%); 牛血清白蛋白(BSA)和噻唑蓝(MTT)(德国 BioFroxx 公司, 批号分别为 EZ2921B398, EZ2811A179), RPMI 1640 液体培养基、青霉素-链霉素溶液和 0.25% 胰蛋白酶(美国 Hyclone 公司, 批号分别为 AD17321268, J170027, J170046), 胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司, 批号 20170711), 二甲基亚砜和聚山梨酯-80(成都市科隆化学品有限公司), 水为超纯水, 甲醇、乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

胃癌细胞细胞株 MGC-803 细胞系和 HGC-27 细胞系由四川大学微生物室提供, 本实验室接种保存。

2 方法和结果

2.1 DTX 和 GA 的含量测定

2.1.1 色谱条件 Diamosil-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 柱温 25 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 进样量 20 μL; DTX 流动相乙腈-水(57:43), 检测波长 230 nm; GA 流动相甲醇-水(90:10), 检测波长 360 nm。

2.1.2 线性关系考察 分别精密称取 DTX 对照品 11.01 mg 和 GA 对照品 10.01 mg, 加甲醇溶解并定容至 10 mL, 得质量浓度分别为 1.101, 1.001 g·L⁻¹ 的对照品溶液。分别精密吸取 DTX 和 GA 对照品溶液 4, 8, 10, 12, 16, 20 μL 注入高效液相色谱仪, 以峰面积为纵坐标, 进样量为横坐标, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 重复操作 3 次, 绘制标准曲线。得 DTX 和 GA 的回归方程分别为 $Y = 681\ 547X - 20\ 446$ ($R^2 = 0.999\ 9$), $Y = 1.693 \times 10^6 X - 3.076 \times 10^6$ ($R^2 = 0.999\ 2$), 线性范围分别为 4.404 ~ 22.02, 4.004 ~ 20.02 μg。

2.2 共载 DTX 和 GA 白蛋白纳米粒(DTX-GA-BSA NPs)的制备 采用 NabTM 法^[14] 制备 DTX-GA-BSA NPs。将 BSA 溶于注射用水中, 超声使溶解, 得水相; 分别精密称取 DTX 和 GA 溶于油相[二氯甲烷-乙醇=(2:1)]中, 将含药油相迅速转移到水相中, 使用超声波破碎仪, 以 40% 的频率超声乳化 10 min(超声 2 s, 停 2 s)。将混悬液减压蒸发除去有机溶剂(40 °C), 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 得 DTX-GA-BSA NPs 混悬液。

2.3 DTX-GA-BSA NPs 混悬液的包封率测定 采用超滤离心法测定包封率。取 DTX-GA-BSA NPs 混悬液 2 mL 于 4 mL 超滤离心管(截留相对分子质量 30 kDa)中, 4 500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取滤液, 加入流动相稀释至 10 mL 量瓶中, 定容, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 得混悬液中游离药物的质量($W_{游}$); 另取 DTX-GA-BSA NPs 混悬液 1 mL 于 5 mL 离心管中, 加入甲醇 2 mL, 涡旋 10 min, 4 500 r·min⁻¹ 离心 4 min, 取上清液 1 mL, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 得混悬液中总药物的质量($W_{总}$)。按公式包封率 = $(W_{总} - W_{游})/W_{总} \times 100\%$ 计算。

2.4 星点设计-效应面法优化处方 在预试验基础上, 固定药物总质量, 选择 BSA 质量浓度、药载比(药物与载体的质量比)和水油体积比(水相和油相的体积比)为自变量。以粒径(Y_1)和多分散性指数(PDI, Y_2)的总评“归一值”(overall desirability, OD)以及包封率(Y_3)为评价指标, 采用三因素五水平的星点试验优化处方。由于 2 个指标值均越小越好。因此选用 $d_i = (Y_{max} - Y_i)/(Y_{max} - Y_{min})$ 以及 $OD = (d_1 \times d_2 \times d_3 \cdots d_k)^{1/k}$ 进行计算, 2 个指标的数值均为越大越好, 试验安排及结果见表 1。采用 Design-Expert 8.0.6 软件处理表 1 中所得实验数据, 进行多元线性回归和二次多项式拟合。得多元二次回归方程 $OD = 0.62 - 0.26A - 0.043B + 0.12C + 0.046AB - 0.023AC - 0.017BC - 0.052A^2 - 8.995 \times 10^{-3} B^2 - 0.089C^2$ ($R^2 = 0.958\ 0, P < 0.000\ 1$), $Y_3 = 57.78 - 1.42A + 0.86B - 10.03C + 1.31AB - 4.38AC - 1.74BC - 1.36A^2 - 3.61B^2 + 2.07C^2$ ($R^2 = 0.847\ 8, P = 0.004\ 4$), OD 回归方程的方差分析见表 2。

通过 Design-Expert 8.0.6 软件分析得知, 包封率的 $R^2 = 0.847\ 8, P = 0.004\ 4$, 尽管回归方程达到显著, 但模型对实际情况拟合较差, 故不用作响应值预测。由表 2 可知, OD 的 $F = 25.34, P < 0.000\ 1$, 多元相关系数 $R^2 = 0.958\ 0$, 说明该回归方程达到显著, 对实际情况拟合良好, 可用作响应值预测。各自变量对 OD 影响排序为 $A > C > B$, 交互项 AB, AC 和 BC 对 OD 均影响不显著, 二次项 B^2 对 OD 的影响不显著, 但二项式 A^2 和 C^2 对 OD 的影响显著, 说明各因素间的交互作用不大。为了更加了解各个自变量之间的影响及其对因变量的影响。依据回归方程绘制了三维效应面图, 见图 1。结果发现当 BSA 质量浓度一定时, OD 随着药载比的增加而降低; 当药载

表 1 DTX-GA-BSA NPs 处方工艺优选的星点试验分析

Table 1 Central composite experimental analysis for optimizing formulation of DTX-GA-BSA NPs

No.	A BSA 质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	B 药载比	C 水油体积比	粒径(Y_1) /nm	PDI (Y_2)	包封率 (Y_3)/%	OD
1	20.00	0.30	12.00	231.97	0.354	55.04	0
2	12.50	0.30	4.00	186.57	0.351	71.40	0.083
3	16.96	0.42	16.76	205.60	0.313	35.80	0.234
4	12.50	0.50	12.00	186.17	0.196	49.72	0.606
5	16.96	0.42	7.24	217.53	0.318	71.80	0.163
6	12.50	0.30	20.00	173.50	0.205	55.00	0.665
7	5.00	0.30	12.00	144.87	0.147	52.00	0.957
8	8.04	0.18	7.24	160.73	0.217	64.93	0.704
9	12.50	0.10	12.00	169.03	0.243	44.56	0.596
10	8.04	0.42	16.76	170.30	0.209	44.50	0.674
11	8.04	0.18	16.76	155.30	0.128	53.40	0.938
12	16.96	0.18	16.76	189.63	0.299	32.30	0.344
13	8.04	0.42	7.24	166.13	0.285	70.15	0.480
14	16.96	0.18	7.24	216.67	0.315	68.52	0.174
15~20	12.50	0.30	12.00	182.37	0.202	57.80	0.619

注:15~20 号为重复性试验。

表 2 OD 回归方程的方差分析

Table 2 Variance analysis of regression equation of OD

方差来源	SS	<i>f</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
模型	1.280	9	25.34	<0.000 1
A	0.890	1	158.64	<0.000 1
B	0.026	1	4.57	0.058 3
C	0.200	1	35.36	0.000 1
AB	0.017	1	2.99	0.114 3
AC	4.371×10^{-3}	1	0.78	0.398 7
BC	2.415×10^{-3}	1	0.43	0.527 0
A ²	0.039	1	7.01	0.024 4
B ²	1.166×10^{-3}	1	0.21	0.658 6
C ²	0.110	1	20.41	0.001 1
残差	0.056	10		
失拟项	0.056	5		
纯误差	0.000	5		
总离差	1.340	19		

比一定时,OD 随 BSA 质量浓度的增加而降低。当 BSA 质量浓度一定时,OD 随水油体积比的增加而增加;当水油体积比一定时,OD 随 BSA 质量浓度的增加而降低。当药载比一定时,OD 随水油体积比的增加而增加;当水油体积比一定时,OD 随药载比

的增加而缓慢增加。在 Design-Expert 8.0.6 软件处理的基础上,分析上述数据,得最佳处方为 BSA 质量浓度 $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,水油体积比 17.04:1,药载比 0.1(1:10)。为了方便实验设计,修正为 BSA 质量浓度 $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,水油体积比 17:1,药载比 1:10。

2.5 验证试验^[9] 称取同一批 GA(2 mg)和 DTX(1 mg)各 3 份,根据最佳处方制备 DTX-GA-BSA NPs,结果发现该制剂的外观为均匀透明淡黄色溶液,OD 分别为 1.133,1.154,1.119,平均值 1.135,OD 真实值与预测值的偏差 3.7%,说明该工艺稳定性良好。

2.6 DTX-GA-BSA NPs 的表征

2.6.1 粒径及 Zeta 电位测定和透射电镜观察 采用纳米激光粒度仪分别测定纳米粒的平均粒径(测定波长 $\lambda = 633 \text{ nm}$,测定角度 173 度,温度 25 °C)和 Zeta 电位,结果计算 DTA-GA-BSA NPs 平均粒径 135.8 nm, PDI = 0.09, Zeta 电位 - 21.4 mV。见图 2。

2.6.2 体外溶出度的测定 参照 2015 年版《中国药典》(四部)溶出度与释放度测定法的要求,采用动态膜透析法进行测定。精密吸取 DTX-GA-BSA NPs 混悬液 1 mL 加至预处理过的透析袋中扎紧两端,悬置在盛有释放介质磷酸盐缓冲液(pH 7.4,含

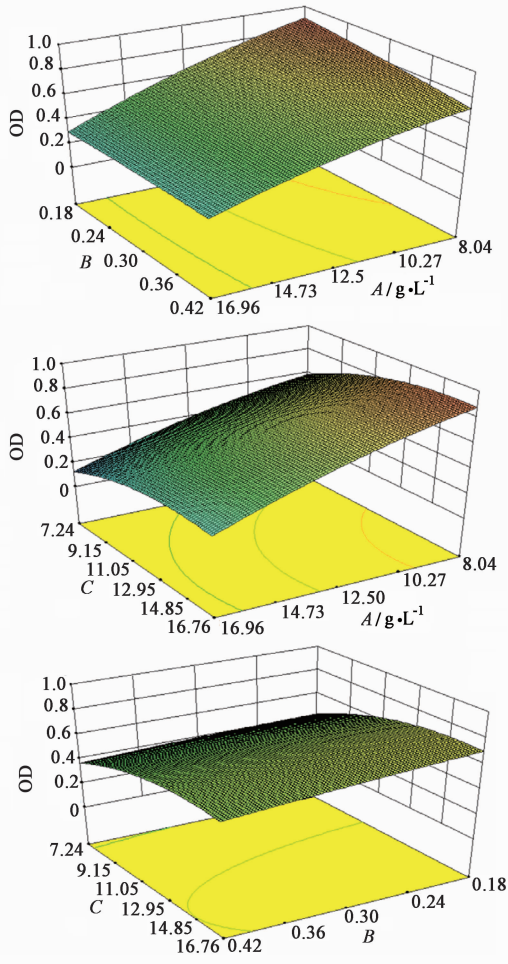


图 1 各自变量对 DTX-GA-BSA NPs 处方影响的三维效应面
Fig. 1 Three-dimensional response surfaces of effect of each variable on formulation of DTX-GA-BSA NPs

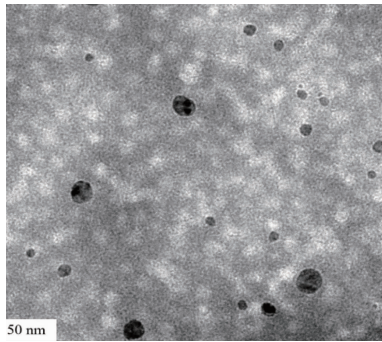


图 2 DTX-GA-BSA NPs 的透射电镜 ($\times 38\ 000$)
Fig. 2 TEM of DTX-GA-BSA NPs ($\times 38\ 000$)

0.5% 聚山梨酯-80) 199 mL 中, $60\ r \cdot \min^{-1}$ 匀速搅拌, 温度 (37 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 。分别在 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24 h 时吸取透析液 2 mL, 同时补入等量同温度释放介质。过 $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜, 取续滤液测定, 计算其累计释放度, 见图 3。结果发现 DTX-GA-BSA NPs 开始释放较快, 24 h 后累计释放度达

72.8%, 说明 DTX-GA-BSA NPs 混悬液具有延缓药物释放的作用。

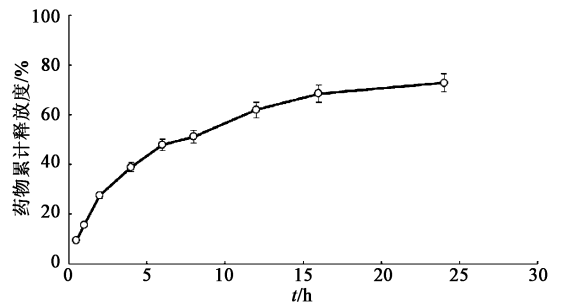


图 3 DTX-GA-BSA NPs 的体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 3 *In vitro* release curve of DTX-GA-BSA NPs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.6.3 DTX-GA-BSA NPs 混悬液的稳定性考察
将制备的 DTX-GA-BSA NPs 混悬液放置在 $25\ ^{\circ}\text{C}$ 的避光条件下观察, 选择粒径和 PDI 为评价指标, 考察 DTX-GA-BSA NPs 的稳定性, 见图 4。结果发现前 5 周 DTX-GA-BSA NPs 的粒径和 PDI 趋于稳定, 呈缓慢增长; 第 5 周以后两者均增长明显, 第 9 周出现药物粒子沉降。表明在 $25\ ^{\circ}\text{C}$ 的避光环境中, DTX-GA-BSA NPs 混悬液在 5 周内的稳定性良好。

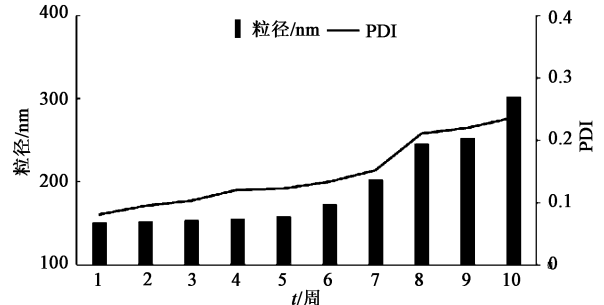


图 4 DTX-GA-BSA NPs 混悬液的稳定性考察
Fig. 4 Investigation of stability of DTX-GA-BSA NPs suspension

2.7 细胞学试验

2.7.1 细胞培养 将人胃癌低分化细胞 MGC-803 细胞和人胃癌中分化细胞 HGC-27 细胞培养在含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 放入 $37\ ^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 饱和湿度的培养箱中培养。24 h 更换培养基 1 次, 待细胞融合时用 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 取 3~4 代的细胞进行后续实验。

2.7.2 细胞增殖抑制试验 采用 MTT 比色法分别测定 DTX 和 GA 对 MGC-803, HGC-27 细胞增殖的单独和协同抑制作用。收集对数期细胞, 调整细胞悬液浓度, 每孔加入细胞悬液 $100\ \mu\text{L}$, 铺板, 使待测细胞密度调至 2×10^3 个/孔, 在 5% CO_2 , $37\ ^{\circ}\text{C}$ 下孵育。待细胞单层铺满孔底 (96 孔平底板), 分别加入含有不同

浓度的 DTX 和(或)GA 培养液 100 μL ,空白组加入不含药的完全培养基。每个实验组设置 5 个复孔。分别培养 48 h 后,加入 MTT 溶液 20 μL 。继续培养 4 h,吸去孔内培养液,每孔加入二甲基亚砷 150 μL ,置摇床上低速振荡 10 min。利用酶标仪于 490 nm 测定吸光度 A 。采用 IBM SPSS Statistics 22.0 软件处理数据,计算半抑制浓度(IC_{50})。

2.7.3 DTX 或 GA 单用对人胃癌细胞增殖的抑制作用^[10] 经反复预试验,将 DTX 浓度梯度设为 0.08,0.04,0.02,0.01,0.005,0.002 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,GA 浓度梯度设为 0.8,0.4,0.2,0.1,0.05,0.025 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。按 2.7.2 项下方法操作,结果 MTT 比色法显示,DTX 和 GA 对 MGC-803 细胞的 IC_{50} 分别为 0.023,0.61 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。DTX 和 GA 对 HGC-27 细胞的 IC_{50} 分别为 0.015,0.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。表明 2 种细胞对 DTX 和 GA 的敏感性明显不同,且 HGC-27 细胞对 2 种药物更为敏感。

2.7.4 DTX 和 GA 联用对人胃癌细胞增殖的协同抑制作用 由于 DTX 对 MGC-803 细胞的 $\text{IC}_{50} = 0.023 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,故选取 DTX 浓度分别为 0.1,0.02,0.004 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;GA 对 MGC-803 细胞的 $\text{IC}_{50} = 0.61 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,故 GA 浓度选取 3,0.6,0.12 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。由于 DTX 对 HGC-27 细胞的 $\text{IC}_{50} = 0.015 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,故选取 DTX 浓度分别为 0.1,0.02,0.004 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;GA 对 HGC-27 细胞的 $\text{IC}_{50} = 0.25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,故其浓度选取 1,0.2,0.04 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。将以上浓度的 2 种药物进行交叉配比(体积比 1:1,均为 50 μL)后分别加入 2 种胃癌细胞株中,采用 MTT 比色法检测其对细胞增殖的抑制作用。采用两药相互作用指数(CDI)来分析药物联合应用的协同作用。CDI 计算公式为 $\text{CDI} = R_{\text{联合用药}} / (R_{\text{GA 单独用药}} \times R_{\text{DTX 单独用药}})$,式中 $R_{\text{单独用药}}$ 为单独用药组 A 与空白组 A 的比值, $R_{\text{联合用药}}$ 为联合用药组 A 与空白组 A 的比值。当 $\text{CDI} > 1$ 时,说明 2 种药物具有拮抗性质;当 $\text{CDI} = 1$ 时,具有单纯的叠加作用;当 $\text{CDI} < 1$ 时,具有协同作用,当 $\text{CDI} < 0.7$ 时,具有显著协同作用^[15-17]。

DTX 和 GA 单用或联用后与 MGC-803,HGC-27 细胞共培养 48 h 后的 MTT 检测情况见表 3。结果发现 CDI 均 < 1 ,说明在一定浓度配比范围内,DTX 和 GA 联用对 MGC-803,HGC-27 细胞均具有协同作用,但不呈浓度依赖性。对于 MGC-803 细胞,当 DTX 和 GA 的浓度分别为 0.004,0.12 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,即 DTX 与 GA 的质量比 1:23 时,CDI 最小,协同增殖

抑制作用最显著。对于 HGC-27 细胞,当 DTX 和 GA 的浓度分别为 0.004,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,即 DTX 与 GA 的质量比 1:195 时,协同增殖抑制作用最显著。

表 3 DTX 和 GA 单用或联用对 MGC-803,HGC-27 细胞增殖的抑制作用

Table 3 Inhibitory effect of DTX and GA used alone or in combination on proliferation of MGC-803 and HGC-27 cells

DTX / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	GA / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	CDI ¹⁾	DTX / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	GA / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	CDI ²⁾
0.004	0	0.241 5	0.004	0	0.565 7
0.004	0.12	0.089 8	0.004	0.04	0.820 6
0.004	0.60	0.738 6	0.004	0.20	0.827 6
0.004	3.00	0.588 8	0.004	1.00	0.099 6
0.020	0	0.379 8	0.020	0	0.316 3
0.020	0.12	0.800 5	0.020	0.04	0.787 9
0.020	0.60	0.537 5	0.020	0.20	0.787 3
0.020	3.00	0.280 5	0.020	1.00	0.163 2
0.100	0	0.967 5	0.100	0	0.307 5
0.100	0.12	0.740 5	0.100	0.04	0.983 6
0.100	0.60	0.888 1	0.100	0.20	0.929 3
0.100	3.00	0.739 8	0.100	1.00	0.178 0

注:1)对于 MGC-803 细胞,2)对于 HGC-27 细胞。

3 讨论

本研究采用星点设计-效应面法优化纳米粒处方^[18-19],制备的 DTX-GA-BSA NPs 粒径较小、稳定性好,且能延缓药物释放,为 DTX 和 GA 新型给药系统研究提供了一种新的有效策略。在此基础上,又通过体外细胞实验证明 DTX 和 GA 对 MGC-803 细胞,HGC-27 细胞具有协同增殖抑制作用,采用 CDI 分析 DTX 和 GA 联合应用的协同性,经过筛选得到 DTX 与 GA 的最佳协同作用比例。后续将继续研究 DTX-GA-BSA NPs 的体外协同抗胃癌的行为,选择 DTX 和 GA 以最佳协同比例共载入纳米粒,进一步评价 DTX-GA-BSA NPs 中 DTX 和 GA 的体外协同抗人胃癌细胞的作用,探讨 BSA 所携带的药物是否能更好地发挥疗效。

获得美国食品药品监督管理局(FDA)批准上市的紫杉醇人血清白蛋白纳米粒注射剂^[20],让白蛋白纳米粒给药成为一个新的研究热点。常用的白蛋白有人血清白蛋白(HSA)和 BSA,因具有生物相容性、生物可降解性、无毒性、非免疫原性等特点^[21]而被广泛应用于纳米粒给药系统。BSA 与 HAS 相似,尽管 HAS 比 BSA 更加顺应人体,但成本相对

较高,故选用 BSA。本研究采用 NabTM法制备 BSA 纳米粒。传统制备 BSA 纳米粒的方法涉及到热变性法和化学交联法,两者分别会对 BSA 产生不可逆的结构改变和非特异性化学交联行为,所得的 BSA 纳米粒生物降解性差且毒性大(残留的甲醛、戊二醛等醛类物质)。NabTM法^[22]能使白蛋白的游离巯基在高剪切力气穴空化的作用下产生新的二硫键^[23],从而让 BSA 交联,并保留 BSA 的全部生物学特征,克服传统制备方法毒性大的缺陷。此外,这类结合与体内天然结合类似,给药后表现出的生物相容性良好。NabTM法操作过程中经常使用的油相三氯甲烷、二氯甲烷等也具有一定毒性,在预实验中,通过在油相中加入乙醇不仅可以减少油相的使用量,同时也可降低纳米粒粒度。

[参考文献]

[1] 左婷婷,郑荣寿,曾红梅,等. 中国胃癌流行病学现状[J]. 中国肿瘤临床,2017,44(1):52-58.

[2] 赵恩昊,赵刚,曹晖. 精准医学时代胃癌诊治的现状与进展[J]. 胃肠病学,2018,23(6):321-326.

[3] Cronin K A, Lake A J, Scott S, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, part I: national cancer statistics[J]. Cancer, 2018, 124(13):2785-2800.

[4] 李丹,刘延庆. Survivin 与胃癌的中西医研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(19):124-130.

[5] 耿龙龙,任鹏,李延海,等. 胃癌治疗现状及新进展[J]. 医学理论与实践, 2017, 30(12):1744-1746,1749.

[6] Cerqueira B B, Lasham A, Shelling A N, et al. Nanoparticle therapeutics: technologies and methods for overcoming cancer[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2015, 97(PtA):140-151.

[7] 安艳新,孙力勇,王菁. 胃癌多药耐药细胞中 FOXC1 的表达及其意义[J]. 实用医药杂志, 2017, 34(8):687-689.

[8] 郭鸣睿,王芳,陈立江,等. 藤黄酸长循环纳米粒的制备及其抗肿瘤作用研究[J]. 中国新药杂志, 2018, 27(14):1639-1644.

[9] XU Y, WANG C, DING Y, et al. Nanoparticles with optimal ratiometric co-delivery of docetaxel with gambogic acid for treatment of multidrug-resistant breast cancer[J]. J Biomed Nanotechnol, 2016, 12(9):1774-1781.

[10] ZOU Z Y, WEI J, LI X L, et al. Enhancement of anticancer efficacy of chemotherapeutics by gambogic acid against gastric cancer cells[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2012, 27(5):299-306.

[11] 王杰,王亚杰,郝单丽,等. 多西紫杉醇纳米胶束在小鼠体内的药代动力学及其肿瘤组织分布[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20182310.

[12] 朱钰叶,张玲. 去甲斑蝥素白蛋白纳米粒的制备及质量评价[J]. 中国药师, 2018, 21(3):420-425.

[13] 寇亮,麻燕罗,琨映,等. 白蛋白纳米粒给药载体的研究进展[J]. 西北民族大学学报:自然科学版, 2017, 38(4):9-13.

[14] 杨志杰,侯音璇,林霞,等. 藤黄酸白蛋白纳米粒的制备及稳定性研究[J]. 中国药理学杂志, 2016, 14(4):107-119.

[15] CHEN C H, CHEN M C, WANG J C, et al. Synergistic interaction between the HDAC inhibitor, MPT0E028, and sorafenib in liver cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(5):1274-1287.

[16] QIU B, SUN X, ZHANG D, et al. TRAIL and paclitaxel synergize to kill U87 cells and U87-derived stem-like cells *in vitro* [J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(7):9142-9156.

[17] WAN X A, SUN G P, WANG H, et al. Synergistic effect of paeonol and cisplatin on oesophageal cancer cell lines [J]. Dig Liver Dis, 2008, 40(7):531-539.

[18] LI W I, Anderson K W, Deluca P P. Kinetic and thermodynamic modeling of the formation of polymeric microspheres using solvent extraction/evaporation method[J]. J Control Release, 1995, 37(3):187-198.

[19] Chung T W, HUANG Y Y, LIU Y Z. Effects of the rate of solvent evaporation on the characteristics of drug loaded PLLA and PDLLA microspheres[J]. Int J Pharm, 2001, 212(2):161-169.

[20] 季秀峰,石莉,邓意辉. 白蛋白纳米粒药物传递系统的研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27(12):968-978.

[21] Nosrati H, Salehiabar M, Afroogh S, et al. Bovine serum albumin: an efficient biomacromolecule nanocarrier for improving the therapeutic efficacy of chrysin [J]. J Mol Liq, 2018, 271:639-646.

[22] Langer K, Balthasar S, Vogel V, et al. Optimization of the preparation process for human serum albumin (HAS) nanoparticles [J]. Int J Pharm, 2003, 257(1/2):169-180.

[23] ZHANG H, ZHANG L, YUAN P, et al. Preparation and *in vitro* release characteristics of curcumin in nanosuspensions [J]. China J Chin Mater Med, 2011, 36(2):132-135.

[责任编辑 刘德文]