

# 去氢骆驼蓬碱脂质体制备工艺优化及抗肝癌活性

张光财, 史阔豪, 武康雄, 李茜\* (陕西科技大学食品与生物工程学院, 西安 710021)

**摘要:** 目的 制备去氢骆驼蓬碱脂质体并对其制备工艺进行优化, 评价脂质体的相关表征及对肝癌细胞的毒性。方法 用薄膜水化法制备去氢骆驼蓬碱脂质体。以包封率作为评价指标, 以大豆卵磷脂和药物的质量比、大豆卵磷脂与胆固醇的质量比和超声时间作为评价因素对脂质体包封率的影响。并对脂质体的粒径、Zeta 电位、外观和稳定性进行评价。CCK-8 法对比去氢骆驼蓬碱和去氢骆驼蓬碱脂质体的抗肝癌细胞增殖活性。**结果** 最优制备工艺: 大豆卵磷脂和药物的质量比为 11.4 : 1, 大豆卵磷脂与胆固醇的质量比为 4.4 : 1, 超声时间为 33 min。在此条件下制备的脂质体的包封率为 81.88%, 粒径为 143.65 nm, Zeta 电位为 -12.68 mV, 低温环境稳定性良好, 具有缓释效应。去氢骆驼蓬碱脂质体的抗肝癌细胞增殖活性大于裸药。**结论** 所制得的去氢骆驼蓬碱脂质体包封率和稳定性均符合标准。将去氢骆驼蓬碱制备成为脂质体能提高其抗肝癌细胞增殖活性。

**关键词:** 去氢骆驼蓬碱; 脂质体; 制备工艺; 抗肝癌活性

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2022)13-1677-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.13.003

引用本文: 张光财, 史阔豪, 武康雄, 等. 去氢骆驼蓬碱脂质体制备工艺优化及抗肝癌活性[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(13): 1677-1684.

## Optimization of the Preparation Process of Harmine Liposomes and Their Anti-hepatocarcinoma Activity

ZHANG Guangcai, SHI Kuohao, WU Kangxiong, LI Han\* (School of Food and Biological Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To prepare harmine liposomes and optimize their preparation process, and to evaluate the characteristics of liposomes and their toxicity to liver cancer cells. **METHODS** The harmine liposomes were prepared by membrane hydration method. Taking the encapsulation rate as the evaluation index, the influence of the mass ratio of soybean lecithin to drug, the mass ratio of soybean lecithin to cholesterol and the ultrasound time as evaluation factors on the encapsulation rate of liposomes was studied. The particle size, Zeta potential, appearance and stability of liposomes were evaluated. The CCK-8 method was used to compare the anti-proliferative activity of harmine and harmine liposomes on liver cancer cells. **RESULTS** The optimal preparation process was as follows: the mass ratio of soybean lecithin to drug was 11.4 : 1, the mass ratio of soybean lecithin to cholesterol was 4.4 : 1, and the ultrasound time was 33 min. The encapsulation efficiency of liposomes prepared under these conditions was about 81.88%, the particle size was 143.65 nm, the Zeta potential was -12.68 mV, which stability was good in low temperature environment with slow release effect. The anti proliferative activity of harmine liposomes on liver cancer cells was greater than that of naked drugs. **CONCLUSION** The encapsulation rate and stability of the prepared harmine liposomes meet the standard. The preparation of harmine as a liposome can improve the its proliferative activity on liver cancer cells.

**KEYWORDS:** harmine; liposome; preparation process; anti-hepatocarcinoma activity

中药骆驼蓬(*Peganum harmala* L.)系蒺藜科骆驼蓬属植物, 为植物骆驼蓬和多裂骆驼蓬的全草, 主要分布于中国的西北干旱地区<sup>[1]</sup>, 是维吾尔族、哈萨克族和蒙古族长时间使用的民族药物。其味辛、苦, 性凉, 有毒<sup>[2]</sup>, 常用于治疗偏瘫、头痛、经脉软弱和银屑病等<sup>[3-4]</sup>。维药骆驼蓬子仅收载于《卫生部药品标准·维吾尔药分册》, 为软膏, 需外敷, 每日1~2次。去氢骆驼蓬碱(又称哈尔明碱、

肉叶云香碱)是其主要的活性成分之一, 对胃癌、宫颈癌、肝癌等均具有抑制作用<sup>[5-9]</sup>。但去氢骆驼蓬碱的水溶性差, 生物利用度低<sup>[10]</sup>, 且具有严重的神经毒性, 轻者可致昏迷, 重者甚至死亡, 极大地影响了其临床应用<sup>[11-12]</sup>。因此, 亟需利用现代药剂学手段对去氢骆驼蓬碱进行多种剂型改造。

脂质体作为一种新型的药物载体, 因其与细胞膜的组成相似, 能显著增强细胞摄取能力<sup>[13]</sup>, 所以

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(81803784); 中国博士后面上项目(211956); 陕西省自然科学基金项目(2019JQ-779); 陕西科技大学科研启动基金项目(2016BJ-57)

**作者简介:** 张光财, 男, 硕士生 E-mail: zhangguangcai321@sina.com

**\*通信作者:** 李茜, 女, 博士, 副教授 E-mail: lihan@sust.edu.cn

具有良好的生物相容性,并且能够提高传统药物的水溶性和稳定性,降低药物的不良反应发生率。脂质体对粒径有着严格的要求,<100 nm 会被淋巴系统清除,>300 nm 又不易离开循环系统。同时为了达到更好的治疗效果,脂质体应该保证较高的包封率和良好的稳定性<sup>[14]</sup>。基于此,本课题采用薄膜水化法<sup>[15]</sup>研制去氢骆驼蓬碱脂质体,并且通过单因素试验以及响应面法优化去氢骆驼蓬碱脂质体的制备工艺,旨在提高去氢骆驼蓬碱的疗效,降低不良反应发生率,以期提供一种具有良好载药脂质体和抗肿瘤活性的去氢骆驼蓬碱制备方法。

## 1 仪器与试剂

LC 2030 高效液相色谱仪(日本岛津仪器有限公司);GL124-1SCN 电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司);KH5200DE 数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司);RE-52A 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);SHZ-D(III)循环水式多用真空泵(巩义市宇翔仪器有限公司);GZX-GF101-2-BS-II/H 电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械有限公司);TG16-WS 台式高速离心机(湖南湘仪实验仪器开发有限公司);Litesizer 500 纳米激光粒度仪(奥地利安东帕有限公司);Hitachi HT7800 120 kv 透射电子显微镜(日立高新技术有限公司);THZ-92BS 恒温振荡器(上海川一实验仪器有限公司);Varioskan flash 酶标仪(Thermo Fisher Scientific)。

甲醇、氯仿、乙腈、乙酸铵均为色谱纯,均购自天津市天力化学试剂有限公司;水为超纯水;去氢骆驼蓬碱(纯度:98%;自制);大豆卵磷脂(批号:S30870;纯度:>90%);胆固醇(批号:S11040;纯度:95%)均购自上海源叶生物科技有限公司;其他试剂均为分析纯。

肝癌 HepG2 细胞株和 BEL-7402 细胞株均购自江苏凯基生物技术股份有限公司;CCK-8 试剂盒(博士德生物工程有限公司,批号:16123C60);胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司,批号:18050302);DMEM 高糖培养基(生工生物工程股份有限公司,批号:K0704200);青链霉素双抗(北京索莱宝科技有限公司,批号:K2708200);生理盐水(华润双鹤药业股份有限公司,批号:H20173104)。

## 2 方法与结果

### 2.1 去氢骆驼蓬碱脂质体的制备<sup>[16]</sup>

精密称取 2 mg 去氢骆驼蓬碱、适量大豆卵磷

脂和胆固醇,溶于甲醇与氯仿(1:2)的混合液中,于 40 °C 下减压旋蒸除去溶剂,在圆底烧瓶壁上形成一层质地均匀的薄膜后,加入超纯水水化,冰水浴超声(100 W)至形成脂质体混悬液,再经过 0.22 μm 微孔滤膜整粒,即得去氢骆驼蓬碱脂质体。

### 2.2 空白脂质体的制备

称取适量大豆卵磷脂和胆固醇,溶于甲醇与氯仿(1:2)的混合液中,于 40 °C 下减压旋蒸除去溶剂,在圆底烧瓶壁上形成一层质地均匀的薄膜后,加入超纯水水化,冰水浴超声至形成脂质体混悬液,再经过 0.22 μm 微孔滤膜整粒,即得空白脂质体。

### 2.3 去氢骆驼蓬碱脂质体测定方法的建立

**2.3.1 色谱条件** 色谱柱:Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-乙酸铵缓冲液(冰乙酸 3 mL+乙酸铵 3.4 g+水 500 mL)(21:79);流速:1 mL·min<sup>-1</sup>;柱温:35 °C;检测波长:330 nm;进样量:10 μL。

**2.3.2 专属性考察** 分别精密移取 10 μL 空白脂质体溶液和载药脂质体溶液,进样测定,将 2 个样品的色谱图进行对比,结果见图 1,载药脂质体溶液有明显的色谱保留峰,而空白脂质体溶液则没有明显的色谱保留峰,表明在该色谱条件下能够准确地检测出样品中去氢骆驼蓬碱的含量。

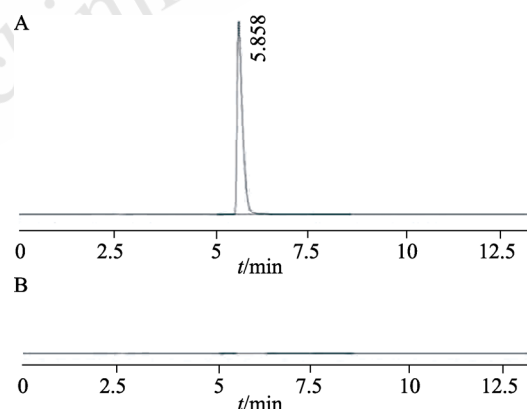


图 1 去氢骆驼蓬碱脂质体(A)和空白脂质体(B)高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of harmine liposome(A) and blank liposome(B)

**2.3.3 标准曲线的绘制** 精密称取 2 mg 去氢骆驼蓬碱,使用甲醇定容至 10 mL,制备成 0.2 mg·mL<sup>-1</sup> 的标准溶液。将标准溶液稀释配制成浓度为 4, 10, 20, 30, 40, 50 μg·mL<sup>-1</sup> 的系列梯度浓度溶液。按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,以浓度为 X 轴,

以峰面积为  $Y$  轴, 绘制标准曲线, 线性方程为  $Y=34\,521X+18\,800(R^2=0.999\,2)$ , 表明去氢骆驼蓬碱在  $4\sim50\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  内线性关系良好。

**2.3.4 仪器精密度试验** 配制  $4, 20, 40\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的去氢骆驼蓬碱对照品溶液。按“2.3.1”项下色谱条件, 每个浓度的样品连续进样 6 次, 记录色谱图。计算得峰面积 RSD 值分别为  $0.99\%, 0.30\%, 0.22\%(n=6)$ , 均  $<3\%$ 。结果表明仪器精密度良好。

**2.3.5 稳定性试验** 配制浓度为  $10\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的去氢骆驼蓬碱溶液作为质控溶液。分别于  $0, 2, 4, 6, 12, 24\,\text{h}$  按“2.3.1”项下色谱条件进样测定。实验测得峰面积的 RSD 值为  $0.80\%(n=6)$ ,  $<3\%$ 。结果表明该脂质体在  $24\,\text{h}$  内稳定性良好。

**2.3.6 重复性试验** 配置浓度为  $10\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的去氢骆驼蓬碱 6 份, 按“2.3.1”的色谱条件下进样测定。试验测得峰面积的 RSD 值为  $1.39\%(n=6)$ , 表明重复性良好。

**2.3.7 回收率试验** 制备空白脂质体, 加入对照品溶液分别制备浓度为  $8, 10, 12\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的样品, 每个浓度平行配制 3 份, 按“2.3.1”项下色谱条件进样测定。然后计算得到各个组的药物浓度, 考察该实验方法的加样回收率, 结果显示,  $8, 10, 12\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  去氢骆驼蓬碱的平均回收率分别为  $98.71\%, 99.35\%, 102.52\%$ ,  $\text{RSD}<2\%$ 。结果表明该分析方法的回收率符合要求。

## 2.4 去氢骆驼蓬碱脂质体处方优化

**2.4.1 包封率测定** 采用超滤离心法<sup>[17]</sup>测定其包封率。精密移取去氢骆驼蓬碱脂质体  $3\,\text{mL}$ , 放置于截留量为  $100\,\text{kDa}$  的超滤离心管中,  $2\,570\times g$  离心  $20\,\text{min}$ 。取上清液加入适量甲醇, 然后按“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 计算得到游离药物的浓度, 记为  $C_{\text{游}}$ 。取同一批次没有离心的脂质体, 加入适量的甲醇在超声条件下破乳  $10\,\text{min}$ , 使其破乳完全, 然后通过 HPLC 进样测定, 将结果代入“2.3.3”项下得到的标准曲线, 通过计算得到药物的总浓度, 记为  $C_{\text{总}}$ 。根据公式计算包封率: 包封率( $\%$ )= $(C_{\text{总}}-C_{\text{游}})/C_{\text{总}}\times 100\%$ 。

**2.4.2 脂药比的筛选** 精密称取去氢骆驼蓬碱  $2\,\text{mg}$ , 保持脂醇比为  $6:1$ , 水化温度为  $50\,^{\circ}\text{C}$ , 超声时间为  $40\,\text{min}$ (功率:  $100\,\text{W}$ )这 3 个条件不变, 依次设定脂药比分别为  $5:1, 10:1, 15:1, 20:1$  和  $25:1$  制备脂质体, 测定包封率, 结果见图 2。脂药比对去氢骆驼蓬碱脂质体的包封率具有较

为显著的影响。随着卵磷脂的比例不断增大, 脂质体的包封率呈先上升后下降趋势, 当脂药比为  $10:1$  时, 脂质体的包封率最高。

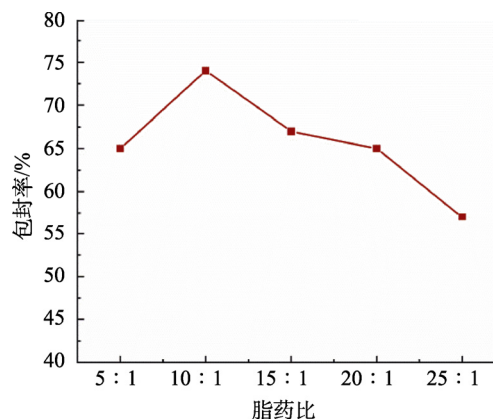


图 2 脂药比对包封率的影响

Fig. 2 Effect of lipid-drug ratio on encapsulation rate

**2.4.3 脂醇比的筛选** 保持脂药比为  $10:1$ , 水化温度为  $50\,^{\circ}\text{C}$ , 超声时间为  $40\,\text{min}$  不变(功率:  $100\,\text{W}$ ), 依次设定脂醇比分别为  $2:1, 4:1, 6:1, 8:1$  和  $10:1$  制备脂质体, 测定包封率, 结果见图 3。脂醇比对去氢骆驼蓬碱脂质体的包封率具有较为显著的影响, 当脂醇比为  $4:1$  时, 脂质体的包封率最高。

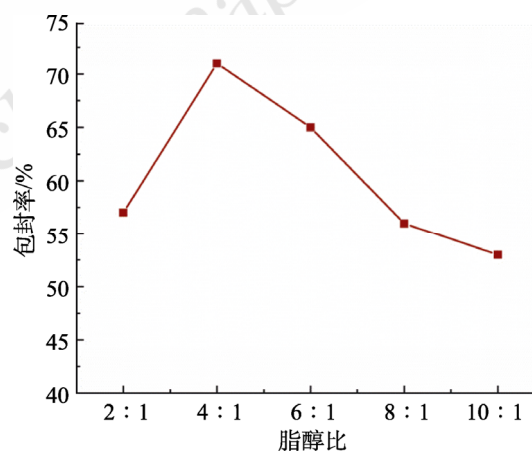


图 3 脂醇比对包封率的影响

Fig. 3 Effect of lipid-alcohol ratio on encapsulation rate

**2.4.4 水化温度的筛选** 设定水化温度分别为  $40, 45, 50, 55, 60\,^{\circ}\text{C}$ , 保持脂醇比为  $4:1$ , 脂药比为  $10:1$ , 超声时间为  $40\,\text{min}$ (功率:  $100\,\text{W}$ ), 制备脂质体并测定其包封率, 结果见图 4。当水化温度  $>50\,^{\circ}\text{C}$  时, 随着温度的升高, 包封率略微降低。推测原因可能是随着水化温度的升高, 去氢骆驼蓬碱泄漏也随之增加, 引起包封率降低。但图中

整体趋势显示,水化温度对包封率的影响没有显著性差异。

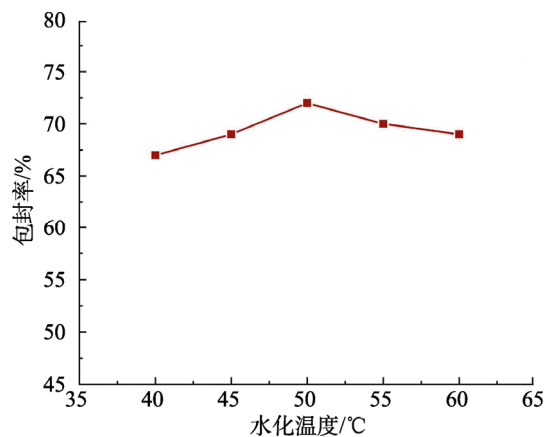


图4 水化温度对包封率的影响  
Fig. 4 Effect of hydration temperature on the encapsulation rate

**2.4.5 超声时间的筛选** 保持脂醇比为 4 : 1, 脂药比为 10 : 1, 水化温度为 50 °C 不变。设定超声功率为 100 W, 超声时间选为 20, 30, 40, 50, 60 min, 制备各条件下的脂质体并测定其包封率, 结果见图 5。当水浴超声时间>30 min, 随着超声时间延长, 包封率呈现下降的趋势。当超声时间为 30 min 时, 脂质体的包封率最大。推测过长时间的超声会破坏脂质体的稳定性, 导致包封率下降。

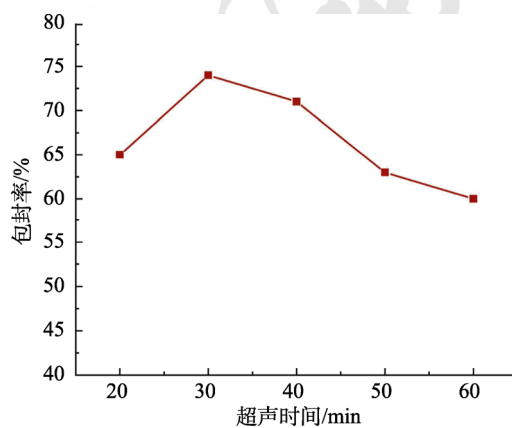


图5 超声时间对包封率的影响  
Fig. 5 Effect of ultrasound time on liposome encapsulation rate

**2.4.6 响应面法优化脂质体制备工艺** 根据单因素试验的结果及响应面设计原理,选择脂药比(A)、脂醇比(B)、超声时间(C)作为考察因素。采用响应面法进行工艺优化,总评包封率为响应值,进行 3 因素 3 水平的试验。试验设计见表 1。试验结果见表 2。

表 1 响应面试验的因素和水平

Tab. 1 Factor and levels for response surface test

| 水平 | A 脂药比  | B 脂醇比 | C 超声时间/min |
|----|--------|-------|------------|
| -1 | 5 : 1  | 2 : 1 | 20         |
| 0  | 10 : 1 | 4 : 1 | 30         |
| 1  | 15 : 1 | 6 : 1 | 40         |

表 2 优化脂质体制备工艺的试验结果

Tab. 2 Experimental results of optimizing the liposome preparation process

| 试验号 | A  | B  | C  | 包封率/% |
|-----|----|----|----|-------|
| 1   | -1 | -1 | 0  | 61    |
| 2   | 1  | -1 | 0  | 68    |
| 3   | -1 | 1  | 0  | 71    |
| 4   | 1  | 1  | 0  | 73    |
| 5   | -1 | 0  | -1 | 67    |
| 6   | 1  | 0  | -1 | 65    |
| 7   | -1 | 0  | 1  | 69    |
| 8   | 1  | 0  | 1  | 75    |
| 9   | 0  | -1 | -1 | 56    |
| 10  | 0  | 1  | -1 | 58    |
| 11  | 0  | -1 | 1  | 63    |
| 12  | 0  | 1  | 1  | 74    |
| 13  | 0  | 0  | 0  | 82    |
| 14  | 0  | 0  | 0  | 82    |
| 15  | 0  | 0  | 0  | 81    |
| 16  | 0  | 0  | 0  | 80    |
| 17  | 0  | 0  | 0  | 83    |

对表 2 中的数据进行计算,结果见表 3。得到脂药比、脂醇比和超声时间与去氢骆驼蓬碱脂质体包封率的二次多项回归方程: $Y=81.60+1.63A+3.50B+4.38C-1.25AB+2.00AC+2.25BC-3.55A^2-9.80B^2-9.05C^2$ 。

表 3 响应面试验模型的方差分析

Tab. 3 Analysis of variance for response surface experimental model

| 方差来源           | 平方和      | 自由度 | 均方     | F 值    | P 值      | 显著性 |
|----------------|----------|-----|--------|--------|----------|-----|
| 模型             | 1 194.99 | 9   | 132.78 | 38.81  | <0.000 1 | 2)  |
| A 脂药比          | 21.13    | 1   | 21.13  | 6.17   | 0.041 9  | 1)  |
| B 脂醇比          | 98.00    | 1   | 98.00  | 28.64  | 0.001 1  | 2)  |
| C 超声时间         | 153.13   | 1   | 153.13 | 44.75  | 0.000 3  | 2)  |
| AB             | 16.00    | 1   | 16.00  | 4.68   | 0.067 4  |     |
| AC             | 20.25    | 1   | 20.25  | 5.92   | 0.045 2  | 1)  |
| BC             | 6.25     | 1   | 6.25   | 1.83   | 0.218 6  |     |
| A <sup>2</sup> | 53.06    | 1   | 53.06  | 15.51  | 0.005 6  | 2)  |
| B <sup>2</sup> | 404.38   | 1   | 404.38 | 118.19 | <0.000 1 | 2)  |
| C <sup>2</sup> | 344.85   | 1   | 344.85 | 100.79 | <0.000 1 | 2)  |
| 残差             | 23.95    | 7   | 3.42   |        |          |     |
| 失拟项            | 18.75    | 3   | 6.25   | 4.81   | 0.081 7  | 不显著 |
| 纯误差            | 5.20     | 4   | 1.30   |        |          |     |
| 总误差            | 1 218.94 | 16  |        |        |          |     |

注: 1)  $P<0.05$ , 2)  $P<0.01$ 。

Note: 1)  $P<0.05$ , 2)  $P<0.01$ .

由结果可知,该模型的  $F=38.81$ ,  $P<0.0001$ ,说明该模型具有显著性;失拟项  $F=4.81$ ,  $P=0.0817$ ,说明该模型的失拟项不具有显著性。方程的决定系数  $R^2=0.9804>0.95$ ,说明该模型能进行相对准确的预测<sup>[18]</sup>。

根据拟合的结果,保持一个因素水平不变,绘制脂药比、脂醇比和超声时间分别对去氢骆驼蓬碱脂质体包封率的影响,结果见图6~8。

对拟合方程和各个条件的交互作用进行分析,得到去氢骆驼蓬碱脂质体包封率最优制备工艺参

数值为脂药比 11.39 : 1,脂醇比 4.39 : 1,超声时间 32.97 min,模型最大响应预测值为 82.816%。

考虑到实际操作过程的可行性,对最优制备工艺条件参数进行如下调整:设定脂药比 11.4 : 1,脂醇比 4.4 : 1,超声时间为 33 min。然后进行 3 次验证性试验,通过检测计算得出 3 次试验的去氢骆驼蓬碱脂质体包封率分别为 81.61%, 82.21%, 81.82%,平均值为 81.88%,理论预测的相对误差为  $1.14\%<3\%$ 。说明该工艺优化方法具有可行性<sup>[19]</sup>。

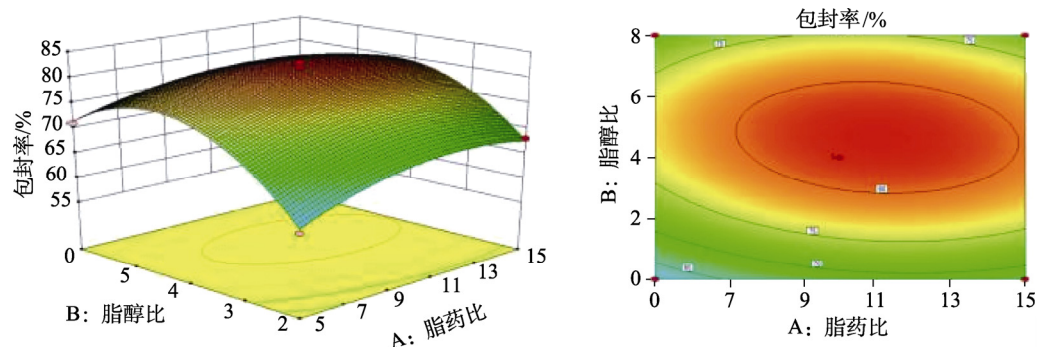


图6 脂药比和脂醇比响应面图

Fig. 6 Response surface diagram of lipid-drug ratio and lipid-alcohol ratio

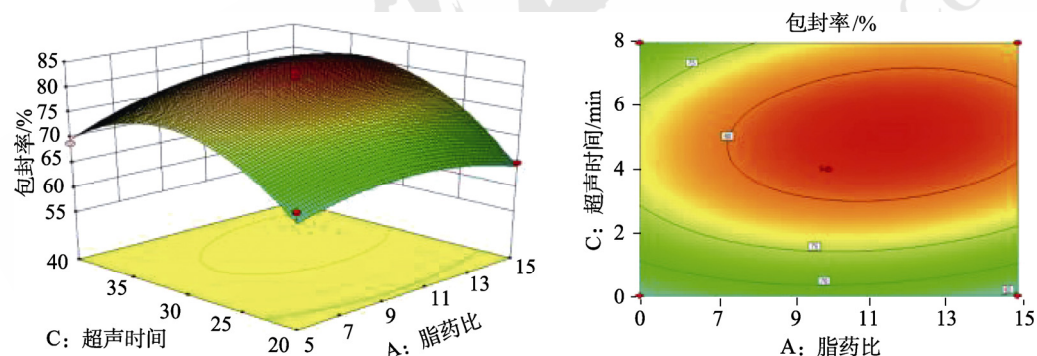


图7 脂药比和超声时间响应面图

Fig. 7 Response surface diagram of lipid-drug ratio and ultrasound time

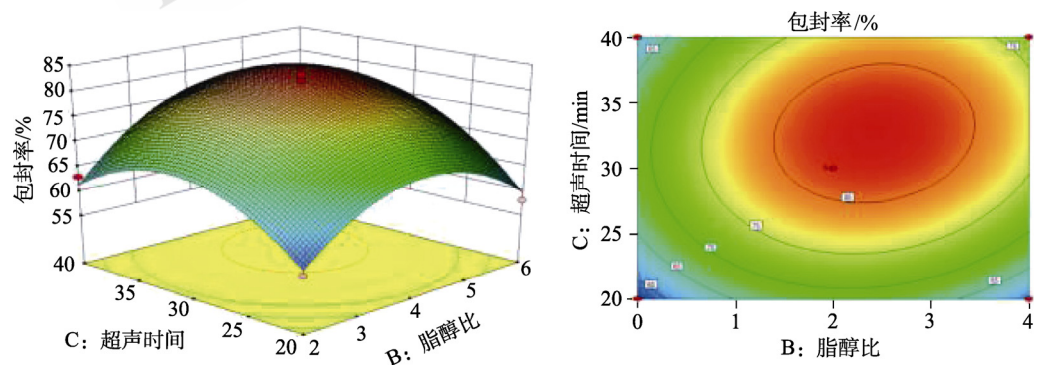


图8 脂醇比和超声时间响应面图

Fig. 8 Response surface diagram of lipid-alcohol ratio and ultrasound time

## 2.5 去氢骆驼蓬碱脂质体的表征

**2.5.1 粒径分布与 Zeta 电位** 取少量最佳制备工艺条件制得的去氢骆驼蓬碱脂质体,用超纯水适当稀释。转移样品溶液于样品池中,采用激光粒度仪对粒径分布与 Zeta 电位进行测量,每组测量 3 次。结果见图 9~10,其粒径约为 143.65 nm,电位为-12.68 mV。

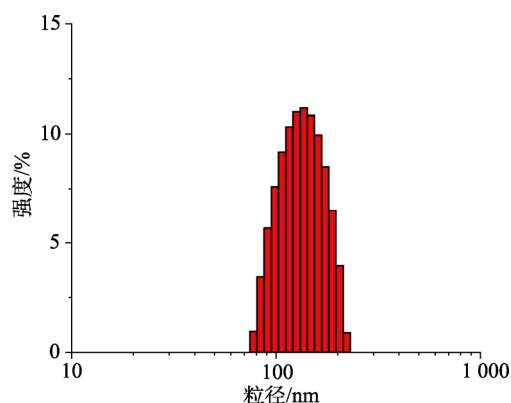


图 9 去氢骆驼蓬碱脂质体的粒径图

Fig. 9 Particle size diagram of harmine liposomes

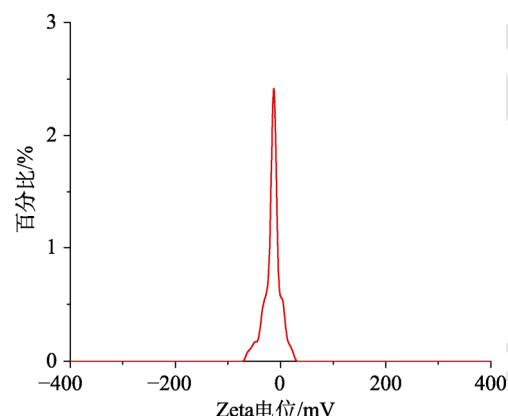


图 10 去氢骆驼蓬碱脂质体的 Zeta 电位图

Fig. 10 Zeta potential diagram of harmine liposomes

**2.5.2 外观表征** 精密移取去氢骆驼蓬碱脂质体溶液 10  $\mu\text{L}$ ,将其滴在干净的铜网上,静置一段时间后用滤纸吸弃多余的液体。然后加入 1%的磷钨酸对脂质体进行负染,待样品干燥后在透射电镜下观察脂质体的外观形态并拍照。去氢骆驼蓬碱脂质体的形状呈圆形,边缘略粗糙,并且具有较好的分散性。结果见图 11。

**2.5.3 不同介质稳定性考察** 精密移取同一批次制作的 3 份去氢骆驼蓬碱脂质体各 1 mL,逐滴溶解于超纯水中,溶液稀释 10 倍,4  $^{\circ}\text{C}$ 和 60  $^{\circ}\text{C}$ 避光密封保存,于不同时间间隔(0, 3, 6, 9, 12, 15 d)

考察粒径的变化情况。结果显示,4  $^{\circ}\text{C}$ 环境下放置的脂质体性状良好,粒径基本无变化。60  $^{\circ}\text{C}$ 储存时,粒径明显增大,粒径从 142 nm 增至 352 nm,第 12 天可见絮状物沉积,这可能是高温加速纳米粒子间的碰撞,导致团聚的概率增加,从而表现为粒径增大。该结果表明脂质体在 4  $^{\circ}\text{C}$ 避光储藏时稳定性良好。结果见图 12。

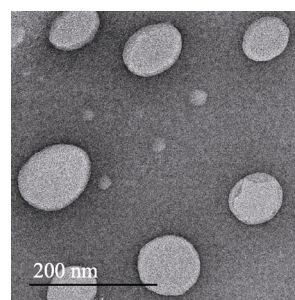


图 11 去氢骆驼蓬碱脂质体的透射电子显微镜图

Fig. 11 Transmission electron microscope image of harmine liposomes

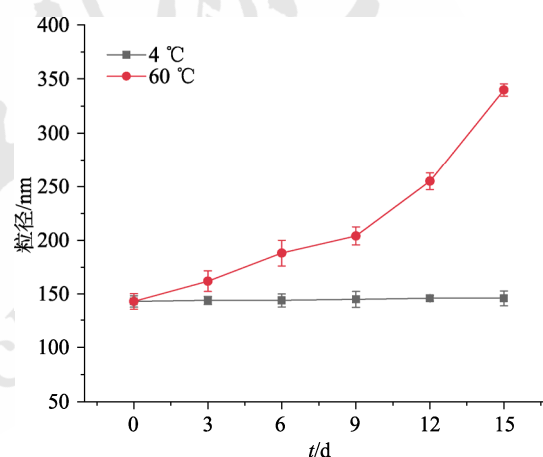


图 12 去氢骆驼蓬碱脂质体的稳定性

Fig. 12 Stability of harmine liposomes

**2.5.4 体外释放行为考察** 试验采用透析袋释放法,考察去氢骆驼蓬碱和去氢骆驼蓬碱脂质体在 PBS 缓冲液(pH 7.4)中的药物释放规律。实验开始之前,先将截留量为 3 500 kDa 的透析袋在超纯水中煮沸,然后浸泡在 pH 7.4 的 PBS 缓冲液中过夜。精密移取 4 mL 相同药物浓度的去氢骆驼蓬碱和去氢骆驼蓬碱脂质体至透析袋中,将透析袋封口置于 pH=7.4 的 PBS 缓冲液中,保持其温度在 37  $^{\circ}\text{C}$ ,用磁力搅拌器以 100  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 温和搅拌。分别在 15, 30 min 和 1, 2, 4, 8, 12, 24 h 时各取样 1 mL,用 HPLC 测定样品中去氢骆驼蓬碱的含量。结果见图 13。

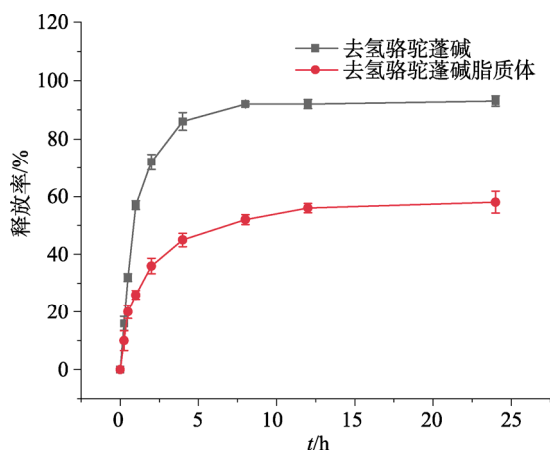


图 13 去氢骆驼蓬碱和去氢骆驼蓬碱脂质体的体外释放  
Fig. 13 In vitro release of harmine and harmine liposomes

由图 13 可知, 裸药前 4 h 释放迅速, 释放率达到 83%。随后释放的速度变小, 直到 8 h 后基本呈现稳定状态, 最终释放率为 95%。纳米粒释药初期附着于其表面的药物快速释放, 形成轻微突释效应, 而后期释药平缓, 24 h 后药物释放率为 57%。在相同时间内, 去氢骆驼蓬碱脂质体组和药物组相比, 释放的速率较小, 持续释放的时间增长。说明将药物做成脂质体, 有利于药物达到缓释的效果, 增加药物的作用时间。

## 2.6 体外细胞毒性试验

采用 CCK-8 法考察去氢骆驼蓬碱脂质体对肝癌细胞的毒性。培养 HepG2 和 BEL-7402 细胞并接种于 96 孔板中, 铺板密度为每孔  $5 \times 10^3$  个, 于  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\%\text{CO}_2$ , 饱和湿度的条件下培养 24 h 至贴壁, 然后使用 100  $\mu\text{L}$  含不同浓度的去氢骆驼蓬碱及其脂质体(0, 12.5, 25, 50, 75, 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )的培养基代替原培养基, 每个浓度 3 个复孔, 继续孵育 24 h 后每孔加入 10  $\mu\text{L}$  的 CCK-8 溶液, 孵育适当时间反应。采用酶标仪在 450 nm 处测定各孔的 OD 值, 计算细胞存活率及  $\text{IC}_{50}$ , 结果见图 14, 对 2 株肝癌细胞 HepG2、BEL-7402 细胞, 相同浓度的载药脂质体( $\text{IC}_{50}$  分别为 54.3  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  和 58.7  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )对细胞生长抑制作用都明显优于裸药( $\text{IC}_{50}$  分别为 74.5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  和 88.7  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 并且经 SPSS 17.0 软件单因素方差分析得到组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结果说明, 将去氢骆驼蓬碱制备成脂质体能提高药物的抗肝癌活性, 这可能与脂质体能够改变药物的油水分配性质相关。

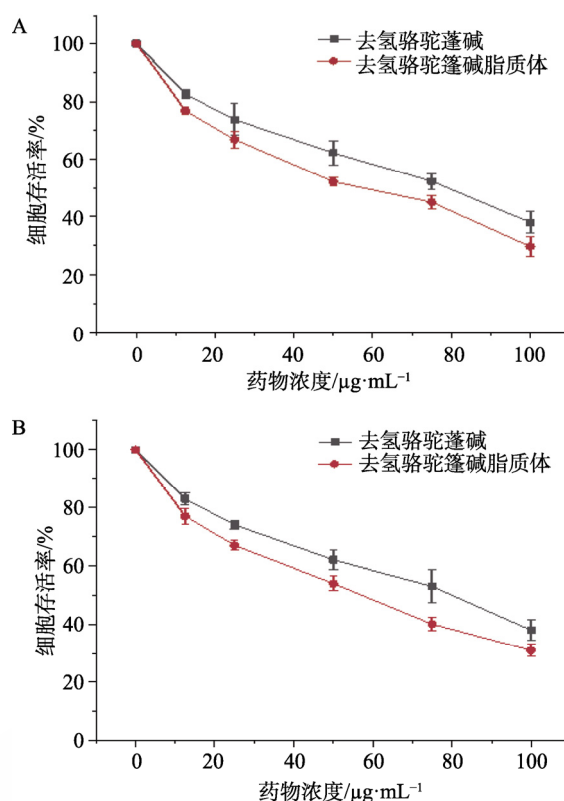


图 14 24 h 不同浓度的去氢骆驼蓬碱、去氢骆驼蓬碱脂质体对 HepG2(A)、BEL-7402(B)细胞存活率的影响

Fig. 14 Effects of harmine and harmine liposomes with different concentrations on the survival rate of HepG2(A) and BEL-7402(B) cells on 24 h point

## 3 讨论

本研究经过前期薄膜水化法和乙醇注入法初步筛选, 因乙醇注入法有明显的不溶物, 故采用薄膜水化法制备去氢骆驼蓬碱脂质体。制成的脂质体为圆形, 平均粒径约为 143.65 nm, 溶解度好, 载药量大, 包封率好, 在  $4^\circ\text{C}$  避光储藏时稳定性良好, 能达到缓释的效果, 可增加药物的作用时间。脂质体制备过程中, 主药用量 2 mg, 脂药比为 11.4 : 1, 脂醇比为 4.4 : 1, 超声时间为 33 min。制备工艺简单可控, 可实现产业化。其中脂药比对脂质体的包封率影响很大, 可能是脂药比影响脂质体包含的药物的有效含量, 从而导致包封率随脂药比的增大而减小。

后续进行的 CCK-8 试验结果表明, 在相同的药物浓度作用下, 去氢骆驼蓬碱脂质体对肝癌细胞 HepG2 和 BEL-7402 的抑制作用强于去氢骆驼蓬碱裸药。这可能是因为去氢骆驼蓬碱脂质体可以防止嵌入的去氢骆驼蓬碱过早分解, 延长其循环时间, 实现缓释效果, 从而达到了提高生物利用度的目的<sup>[20-21]</sup>。

综上所述,本研究使用简单的工艺制备了去氢骆驼蓬碱脂质体,筛选了去氢骆驼蓬碱脂质体的最优处方,确定了去氢骆驼蓬碱脂质体对肝癌细胞 HepG2 和 BEL-7402 的毒性,为进一步的肝癌靶向研究奠定了基础。

## REFERENCES

- [1] GUO L, SUN J, FAN W X, et al. Synthesis and antitumor activities of harmine derivatives[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(5): 385-388.
- [2] HU Y H, FANG Y, LI H L, et al. Advances in pharmacological research of peganine in treating gastric cancer[J]. West J Tradit Chin Med(西部中医药), 2019, 32(9): 151-153.
- [3] WANG J L, WEI L, BAO H Q. Pharmacological mechanism of anti-inflammatory and immunomodulatory effects of alkaloids from *Peganum harmala*: Research advances[J]. Shanghai J Tradit Chin Med(上海中医药杂志), 2019, 53(2): 97-100.
- [4] 李凯, 薛小青, 张洪亮. 骆驼蓬有效成分的提取工艺及抗肿瘤机制研究进展[J]. 新疆中医药, 2015, 33(2): 80-82.
- [5] LI Q. Harmine induces apoptosis of HepG2 cells via mitochondrial signaling pathway[D]. Guangzhou: Jinan University(暨南大学), 2011.
- [6] ZHU Y G, LYU Y X, GUO C Y, et al. Harmine inhibits the proliferation and migration of glioblastoma cells via the FAK/AKT pathway[J]. Life Sci, 2021(270): 119112.
- [7] LI C, WANG Y, WANG C, et al. Anticancer activities of harmine by inducing a pro-death autophagy and apoptosis in human gastric cancer cells[J]. Phytomedicine, 2017(28): 10-18.
- [8] HUANG S M, LI S B, DENG H T, et al. Preparation and effect against cervical cancer invasion in vitro of harmine-loaded photosensitive liposomes[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2022, 47(10): 2643-2651.
- [9] WU L W, ZHANG J K, RAO M, et al. Harmine suppresses the proliferation of pancreatic cancer cells and sensitizes pancreatic cancer to gemcitabine treatment[J]. Onco Targets Ther, 2019(12): 4585-4593.
- [10] SHANG H J, RUAN X D, CHEN X F. Preparation of harmine-loaded polylactic acid nanoparticles and their pharmacokinetic behaviors[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2019, 41(7): 1481-1485.
- [11] ASGARPANAH J, KAZEMIVASH N. Phytochemistry, pharmacology and medicinal properties of *Carthamus tinctorius* L[J]. Chin J Integr Med, 2013, 19(2): 153-159.
- [12] RUZENISA · A, GAO H J, GONG Y H, et al. Study on the neurotoxic effects of harmine and its derivatives DH-004 in mice[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2021, 30(8): 740-746.
- [13] CHEN Y, WU M C, PAN L J, et al. Preparation of 5'-palmitoyl-5-fluorouridine liposomes modified with interleukin-2 and its cell toxicity[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(9): 842-845.
- [14] LI Y X, CHEN L, LI J, et al. Characterization and antitumor activity of resveratrol liposome modified with polyethylene glycol[J]. J Shaanxi Norm Univ(Nat Sci Ed)(陕西师范大学学报: 自然科学版), 2020, 48(1): 92-98.
- [15] TENG F F, DENG P Z, SONG Z M, et al. Enhanced effect in combination of curcumin-and ketoconazole-loaded methoxy poly (ethylene glycol)-poly ( $\epsilon$ -caprolactone) micelles[J]. Biomed Pharmacother, 2017(88): 43-51.
- [16] JIANG L, LI L, HE X, et al. Overcoming drug-resistant lung cancer by paclitaxel loaded dual-functional liposomes with mitochondria targeting and pH-response[J]. Biomaterials, 2015(52): 126-139.
- [17] ZHU X L, LI L H, WANG S S, et al. Preparation and characterization of near-infrared light responsive doxorubicin hydrochloride liposomes[J]. Her Med(医药导报), 2020, 39(8): 1121-1124.
- [18] ZHANG D, LIAO F, ZHOU J, et al. Optimization of preparation technology for total glucosides from *Paeonia lactiflora* liposome by BBD-RSM and its *in vitro* release[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2015, 46(3): 359-364.
- [19] YANG Q, LUO G W, PENG H L, et al. Development and characterization of Juglone liposomes[J]. J Nanchang Univ: Eng Technol(南昌大学学报: 工科版), 2015, 37(3): 234-239.
- [20] XU T, ZHANG M Y, CHEN L, et al. Preparation of co-loaded cisplatin and chlorin e6 liposomes and the evaluation of the antitumor effects *in vitro*[J]. West China J Pharm Sci(华西药科学杂志), 2020, 35(5): 480-486.
- [21] CHEN Y, WU L, LIU W, et al. Preparation and pharmacodynamic evaluation of VEGFR II antibody-modified docetaxel-loaded liposomes[J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2020, 37(9): 782-788.

收稿日期: 2021-08-31

(本文责编: 蔡珊珊)