

共载姜黄素/小檗碱自微乳给药系统的制备及评价[△]

韩 华^{1*}, 梁绿圆², 季 珂¹, 魏炳琦³, 任翎嘉², 苏洁欣², 关延彬^{1#} (1. 河南中医药大学药学院, 郑州 450040; 2. 河南中医药大学儿科医学院, 郑州 450040; 3. 河南中医药大学仲景学院, 郑州 450040)

中图分类号 R943;R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)20-2487-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.20.11



摘要 目的 制备共载姜黄素/小檗碱的自微乳给药系统(CUR/BER-SMEDDS),并对其理化性质和体外抗肿瘤作用进行评价。方法 以CUR、BER为模型药物,在筛选油相种类、乳化剂、助乳化剂及二者质量比优化范围的基础上,以粒径和载药量为评价指标,以油相的质量百分比、乳化剂与助乳化剂的质量比为因素,采用星点设计-效应面法优化其处方并验证;对优化所得CUR/BER-SMEDDS的理化性质、体外溶出度、体外抗肿瘤作用进行评价。结果 CUR/BER-SMEDDS最优处方的油相为中链甘油三酯(30.97%),乳化剂为聚氧乙烯40氢化蓖麻油(46.77%),助乳化剂为聚乙二醇400(22.26%),乳化剂与助乳化剂质量比为2.10:1。验证实验表明,CUR/BER-SMEDDS的平均粒径为(58.90±5.41)nm,平均载药量为(94.94±3.87)mg/g,与预测值的相对偏差分别为-2.90%、-0.14%。按最优处方所制CUR/BER-SMEDDS加水乳化后为淡黄色澄清透明液体,其微粒呈圆球形。体外溶出实验结果显示,制成SMEDDS后,CUR在人工肠液、人工胃液,BER在人工肠液中的累积溶出度均明显高于对应原料药。体外抗肿瘤实验结果显示,CUR/BER-SMEDDS对PC-3、DU-145细胞的IC₅₀分别为(17.38±2.84)、(20.89±1.26)μmol/L,均显著低于CUR、EBR单药($P<0.05$)。结论 优化所得CUR/BER-SMEDDS制备工艺稳定、可行;所制CUR/BER-SMEDDS改善了药物的溶出速度,且具有更强的体外抗前列腺癌作用。

关键词 姜黄素;小檗碱;自微乳给药系统;处方优化;星点设计-效应面法;抗前列腺癌作用

Preparation and evaluation of curcumin/berberine co-loaded self-microemulsion drug delivery system

HAN Hua¹, LIANG Lüyuan², JI Ke¹, WEI Bingqi³, REN Lingjia², SU Jiexin², GUAN Yanbin¹ (1. School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450040, China; 2. School of Pediatrics, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450040, China; 3. School of Zhongjing, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450040, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To prepare curcumin/berberine co-loaded self-microemulsion drug delivery system (CUR/BER-SMEDDS) and evaluate its physicochemical properties and *in vitro* anti-tumor effects. **METHODS** Using CUR and BER as model drug, based on the screening of the type of oil phase, emulsifier, co emulsifier and their mass ratio, the formulation of CUR/BER-SMEDDS were optimized by central composite design-response surface methodology, taking particle size and drug loading as evaluation parameters, with the mass percentage of oil phase and the mass ratio of emulsifier to co emulsifier as factors, and verification test was conducted. CUR/BER-SMEDDS prepared by optimized formulation were evaluated in terms of physicochemical properties, *in vitro* dissolution and *in vitro* anti-tumor effects. **RESULTS** The optimized formulation of CUR/BER-SMEDDS included that the oil phase was medium chain triglyceride (30.97%), the emulsifier was polyoxyl 40 hydrogenated castor oil (46.77%), the co emulsifier was polyethylene glycol 400 (22.26%), and the mass ratio of emulsifier to co emulsifier was 2.10:1. The validation experiments showed that mean particle size of CUR/BER-SMEDDS was (58.90±5.41) nm, the average drug loading was (94.94±3.87) mg/g, and the relative deviations from the predicted values were -2.90% and -0.14%, respectively. The CUR/BER-SMEDDS prepared by optimal formulation was light yellow, clear and transparent liquid after emulsified with water, and its particles were spherical. The results of dissolution test *in vitro* showed that after SMEDDS was made, the cumulative dissolution of CUR in artificial intestinal fluid and artificial gastric fluid and that of BER in artificial intestinal fluid were significantly higher than those of its raw material. Results of *in vitro* anti-tumor experiment showed that IC₅₀ values of CUR/BER-SMEDDS for PC-3 cells and DU-145 cells were (17.38±2.84) and (20.89±1.26) μmol/L, which were all lower than those of CUR and EBR significantly ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** The optimized preparation process of CUR/BER-SMEDDS is stable and feasible. The drug release of

CUR/BER-SMEDDS is more complete than that of single drug, and has stronger anti-prostate cancer effect *in vitro*.

KEYWORDS curcumin; berberine; self-microemulsion drug delivery system; preparation optimization; central composite design-response surface methodology; anti-prostate cancer effect

[△]基金项目 河南省中医药科学研究专项课题(No.20-21ZY2150); 河南省高校国家级大学生创新创业训练计划项目(No.202110471009)

* 第一作者 硕士研究生。研究方向:药物新剂型。E-mail: 2530572936@qq.com。

通信作者 教授,硕士生导师,博士。研究方向:中药新剂型与新技术。电话:0371-65676656。E-mail:guanyanbin96@126.com

研究表明,多酚类化合物可通过多重机制发挥抗肿瘤作用^[1]。姜黄素(curcumin, CUR)是从姜黄属植物姜黄 *Curcuma longa* L. 根茎中提取的一种多酚类化合物,可通过抑制肿瘤细胞转化、增殖、侵袭、转移和血管生成等发挥抗肿瘤作用^[2]。小檗碱(berberine, BER)是从毛茛科、芸香科等植物中分离出来的异喹啉类生物碱,可通过诱导细胞凋亡而发挥一定的抗肿瘤作用^[3-4]。研究指出,与CUR、BER单用相比,两药联用可更有效地抑制肝癌、乳腺癌、肺癌、骨癌细胞的生长和增殖^[5-7]。本课题组前期实验发现,CUR联合BER对前列腺癌细胞具有较强的增殖抑制作用,但由于溶解性差、生物利用度低等不足,二者的临床应用受到了限制。

利用纳米技术共载抗肿瘤药物,可有利于将药物精准地递送到肿瘤组织,并可实现药物的同时或连续释放^[8-9]。自微乳给药系统(self-microemulsion drug delivery system, SMEDDS)是由药物、油相、乳化剂和助乳化剂等组成的均一透明溶液,在室温条件下遇水可自发乳化形成水包油型(O/W)微乳^[10]。SMEDDS可通过增加难溶性药物溶解度、提高药物胃肠道黏膜渗透性和淋巴转运能力等方式来改善药物的口服吸收^[11]。基于此,本实验利用自微乳化技术,制备共载CUR/BER的SMEDDS(CUR/BER-SMEDDS)以提高2种药物的溶解度和生物利用度;同时,本实验对其作用于人前列腺肿瘤细胞PC-3和DU-145的体外抑制活性进行考察,旨在促进2种药物在抗肿瘤方面的临床应用。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有T6型新世纪紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)、Zetasizer Nano ZS90型纳米粒度分析仪(英国Malvern公司)、Tecna G2型透射电子显微镜(美国FEI公司)、BAS124S型万分之一电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]、H1650W型台式微量高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

CUR原料药(批号M13GS148382,纯度>97%)购自大连美仑生物技术有限公司;BER原料药(批号J12GS151377,纯度>95%)、中链甘油三酯、辛酸甘油酯、噻唑蓝(MTT)均购自上海源叶生物科技有限公司;CUR对照品(批号110825-201804)购自中国食品药品检定研究院,BER对照品(批号RQ18R1031)购自上海瑞永生物科技有限公司,纯度均大于98%;肉豆蔻酸异丙酯购自浙江物美生物科技有限公司;油酸乙酯购自上海飞祥化工厂;辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯(Labrasol)购自上海凯茵化工有限公司;聚氧乙烯40氢化蓖麻油(RH40)购自阿拉丁试剂(上海)有限公司;吐温-80、吐温-20、聚乙二醇400(PEG400)等均为分析纯,水为蒸馏水。

1.3 细胞

人前列腺肿瘤细胞PC-3、DU-145均购自中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所。

2 方法与结果

2.1 CUR/BER-SMEDDS的制备

按处方比例精密称取油相、乳化剂、助乳化剂,混合后,加入过量的CUR和BER原料药(摩尔比2:1)混匀,转移至含水100 mL的烧杯中,在(37.0±0.2)°C的水浴条件下磁力搅拌,即得CUR/BER-SMEDDS。

2.2 CUR和BER含量测定方法的建立

采用紫外分光光度法测定CUR和BER的含量。

2.2.1 溶液的制备 精密称取CUR对照品8.45 mg于20 mL量瓶中,加无水乙醇溶解并定容,配制质量浓度为422.5 μg/mL的母液。精密吸取上述母液5 mL于50 mL量瓶中,加无水乙醇稀释至刻度,配制质量浓度为42.25 μg/mL的CUR对照品溶液,避光保存,备用。精密称取BER对照品11.93 mg于100 mL量瓶中,加无水乙醇溶解并定容,配制质量浓度为119.3 μg/mL的BER对照品溶液,备用。精密吸取某处方设计工艺制备的CUR/BER-SMEDDS溶液1.5 mL,加无水乙醇稀释至6 mL,超声(功率500 W,频率40 kHz,下同)破乳20 min,以12 000 r/min离心10 min,取上清液0.5 mL,用无水乙醇定容至5 mL,即得供试品溶液。

2.2.2 方法学考察 参照2020年版《中国药典》(四部)“分析方法验证指导原则”进行方法学考察^[12]:分别将2种对照品溶液用无水乙醇稀释后,置于紫外-可见分光光度计上进行全波长扫描,最终确定CUR、BER的检测波长分别为425、352 nm。精密移取CUR对照品溶液,分别用无水乙醇稀释至0.845、1.690、3.380、4.225、5.070、6.760、7.605 μg/mL,于425 nm波长处测定吸光度。以吸光度(Y)对CUR质量浓度(X)进行线性回归,得标准曲线方程为 $Y=0.1584X-0.0133$ ($R^2=0.9998$),CUR检测质量浓度的线性范围为0.845~7.605 μg/mL。精密移取BER对照品溶液,分别用无水乙醇稀释至2.386、4.772、7.158、9.544、11.930 μg/mL,于352 nm波长处测定吸光度。以吸光度(Y)对BER质量浓度(X)进行线性回归,得标准曲线方程为 $Y=0.0593X+0.0216$ ($R^2=0.9999$),BER检测质量浓度的线性范围为2.386~11.930 μg/mL。CUR、BER精密密度、重复性、稳定性(12 h)试验的RSD均小于5.00%,平均加样回收率分别为99.8%~101.5%、99.4%~104.4%(RSD均小于5.00%, $n=9$)。

2.3 CUR和BER在不同辅料中溶解度的测定

将过量的CUR和BER原料药(摩尔比1:1)置于2 mL离心管中,分别加入不同的油相、乳化剂、助乳化剂至体系总质量为1 g,超声40 min使充分溶解,以10 000 r/min离心10 min,取上清液,用无水乙醇稀释至适宜浓

度,分别于425、352 nm波长处测定吸光度,代入标准曲线计算含量并计算溶解度。实验重复3次,结果见表1。根据溶解度实验结果,优选药物溶解度较大的中链甘油三酯、辛酸酸甘油酯为油相;Labrasol、吐温-80(同系列选最高值即可)、RH40为乳化剂;PEG400、无水乙醇、1,2-丙二醇为助乳化剂进行后续实验。

表1 药物在不同辅料中的溶解度(n=3, mg/g)

辅料类别	辅料	CUR	BER
油相	油酸乙酯	1.21	0.66
	肉豆蔻酸异丙酯	0.78	0.35
	中链甘油三酯	2.18	1.07
	辛酸酸甘油酯	1.90	0.93
	Labrasol	5.07	5.84
乳化剂	吐温-20	4.04	5.20
	吐温-80	5.09	6.84
	RH40	2.47	2.05
	PEG400	75.29	100.64
助乳化剂	无水乙醇	5.74	7.40
	1,2-丙二醇	4.28	11.58
	丙三醇	1.64	8.52
	异丙醇	1.73	1.94

2.4 空白处方的单因素筛选

2.4.1 油相 固定乳化剂、助乳化剂分别为吐温-80和PEG400,将乳化剂与助乳化剂按质量比2:1混合,形成混合乳化剂。将不同种类油相与上述混合乳化剂分别按质量比1:9、2:8、3:7、4:6、5:5、6:4、7:3、8:2、9:1混合,涡旋振荡3 min。取此混合物1 g转移至含水100 mL的烧杯中,在(37.0±0.2)°C的水浴中磁力搅拌,制备自微乳。按自乳化等级标准表(表2)进行外观评价,结果见表3。由表3可知,以中链甘油三酯与辛酸酸甘油酯为油相时,自乳化效果相差不大;结合溶解度实验发现,以中链甘油三酯为油相更佳;结合安全性考虑,当油相占比为20%~55%时自乳化效果更理想。

表2 自乳化等级标准表

评价级别	乳化时间/min	外观
A	≤3	澄清或微泛蓝
B	≤3	比A级稍不澄清,呈蓝白色
C	≤3	呈亮白色奶状液体
D	>3	呈暗灰白色,略带油状
E	>3	乳化困难,无法形成均一体系,一直都有油滴存在

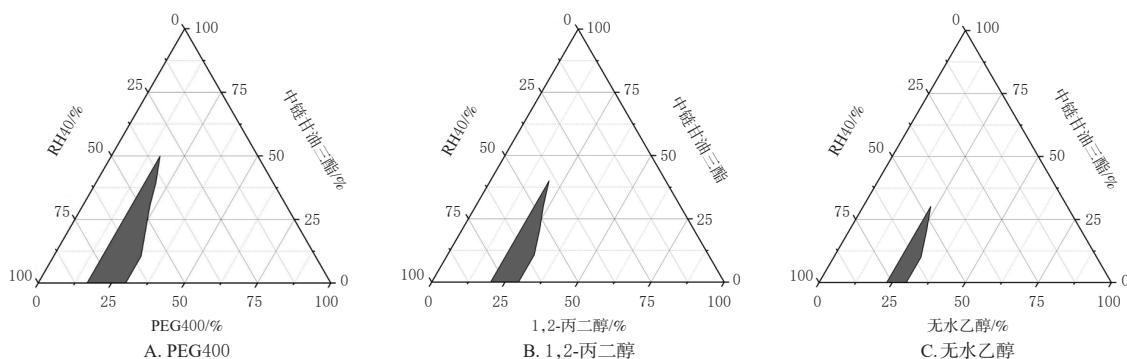


图1 不同助乳化剂所制空白自微乳的伪三元相图

表3 油相与混合乳化剂各质量比下不同种类油相对自乳化的影响

油相种类	1:9	2:8	3:7	4:6	5:5	6:4	7:3	8:2	9:1
中链甘油三酯	A	A	B	B	B	C	C	D	D
辛酸酸甘油酯	A	A	B	B	B	C	C	D	D

2.4.2 乳化剂 固定油相、助乳化剂分别为中链甘油三酯和PEG400,将不同乳化剂与助乳化剂按质量比2:1混合,形成混合乳化剂。将油相与上述混合乳化剂分别按质量比1:9、2:8、3:7、4:6、5:5、6:4、7:3、8:2、9:1混合,再按“2.4.1”项下方法制备自微乳并进行外观评价,结果见表4。由表4可知,RH40的乳化能力优于Labrasol和吐温-80,因此选择RH40为乳化剂进行后续实验。

表4 油相与混合乳化剂各质量比下不同种类乳化剂对自乳化的影响

乳化剂种类	1:9	2:8	3:7	4:6	5:5	6:4	7:3	8:2	9:1
RH40	A	A	A	A	B	B	B	C	C
Labrasol	B	B	B	C	C	D	D	D	E
吐温-80	A	A	B	B	B	C	C	D	D

2.4.3 助乳化剂 固定油相、乳化剂分别为中链甘油三酯、RH40,将乳化剂与不同助乳化剂按质量比2:1混合,形成混合乳化剂。将油相与上述混合乳化剂分别按质量比1:9、2:8、3:7、4:6、5:5、6:4、7:3、8:2、9:1混合,再按“2.4.1”项下方法制备自微乳。分别以油相、乳化剂、助乳化剂的质量百分比为顶点,绘制伪三元相图,选择能形成自微乳区域(以黑色表示)面积最大的助乳化剂,结果见图1。由图1可知,PEG400形成的自微乳区域面积最大,因此选择PEG400为助乳化剂进行后续实验。

2.4.4 乳化剂与助乳化剂质量比范围 以中链甘油三酯为油相,RH40为乳化剂,PEG400为助乳化剂,将乳化剂与助乳化剂分别以质量比3:1、2:1、1:1混合,形成混合乳化剂;随后,将油相与上述混合乳化剂分别按质量比1:9、2:8、3:7、4:6、5:5、6:4、7:3、8:2、9:1混合,再按“2.4.1”项下方法制备自微乳,按“2.4.3”项下方法绘制伪三元相图,结果见图2。由图2可知,当乳化剂与助乳化剂质量比为2:1时,乳化效果相对最佳,故综合考虑将二者质量比范围设为3:1~1:1进行后续实验。

2.5 CUR/BER-SMEDDS处方的优化

采用星点设计-效应面法优化CUR/BER-SMEDDS的处方。

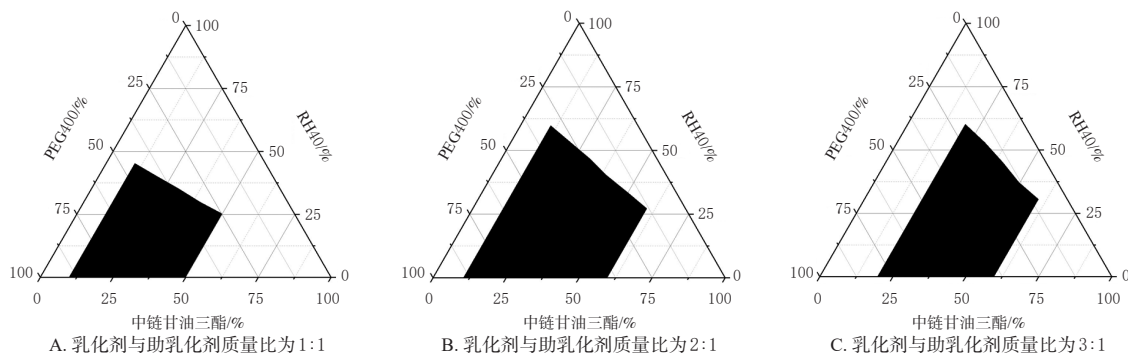


图2 乳化剂与助乳化剂不同质量比所制空白自微乳的伪三元相图

2.5.1 载药量的计算 精密称取各处方自微乳,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液后,分别于425、352 nm波长处测定吸光度,代入标准曲线计算CUR、BER的含量,并计算载药量(%);载药量($\%$) = $(W_1/W_2) \times 100\%$ (式中, W_1 为包载药物的总质量, W_2 为自微乳和药物的总质量)^[13-14]。

2.5.2 处方的优化 根据空白处方的单因素筛选结果,以粒径(Y_1)和载药量(Y_2)为评价指标,采用星点设计-效应面法对油相的质量百分比(X_1)、乳化剂与助乳化剂的质量比(X_2)进行优化。星点设计的因素与水平见表5,星点设计的安排与结果见表6。

表5 CUR/BER-SMEDDS星点设计的因素与水平

水平	A/%	B	水平	A/%	B
-1.414	20.00	1.00:1	1	49.88	2.70:1
-1	25.12	1.29:1	1.414	55.00	3.00:1
0	37.50	2.00:1			

表6 CUR/BER-SMEDDS星点设计的安排与结果

试验号	A/%	B	Y_1/nm	$Y_2/(\text{mg/g})$	试验号	A/%	B	Y_1/nm	$Y_2/(\text{mg/g})$
1	25.12	1.29:1	53.54	95.88	8	37.50	3.00:1	58.75	89.47
2	25.12	2.70:1	120.00	83.79	9	37.50	2.00:1	59.77	90.27
3	49.88	1.29:1	45.91	97.93	10	37.50	2.00:1	61.98	94.62
4	49.88	2.70:1	99.12	82.93	11	37.50	2.00:1	61.21	92.40
5	20.00	2.00:1	136.10	86.43	12	37.50	2.00:1	54.82	96.02
6	55.00	2.00:1	146.90	81.84	13	37.50	2.00:1	58.50	95.60
7	37.50	1.00:1	84.94	90.57					

使用Design-Expert 12软件对表6数据进行统计分析,得 Y_1 和 Y_2 的二次多项式回归方程分别为: $Y_1=59.26+16.87A-8.19B-3.3AB+34.36A^2-0.4630B^2$ ($R^2=0.7970$), $Y_2=90.62-4.200A-0.0457B-0.7275AB-4.090A^2-1.150B^2$ ($R^2=0.7298$),且 P 均小于0.05,表明上述方程拟合度均较高;失拟项的 P 大于0.05,表明未知因素干扰很小,所考察因素可用于分析和预测 Y_1 与 Y_2 的变化。

使用Design-Expert 12软件绘制三维效应面图,结果见图3。由图3可知, Y_1 随着因素A的增加先减小后增大,随着因素B的增大而缓慢减小; Y_2 随着因素A的增加先增大后快速减小,而随着因素B的变动较小。使用Design-Expert 12软件对上述二次多项式回归方程求解,确定最优工艺为油相的质量百分比30.97%、乳化剂与助乳化剂的质量比2.10:1;该条件下,粒径预测值为57.24 nm,载药量预测值为94.81 mg/g。

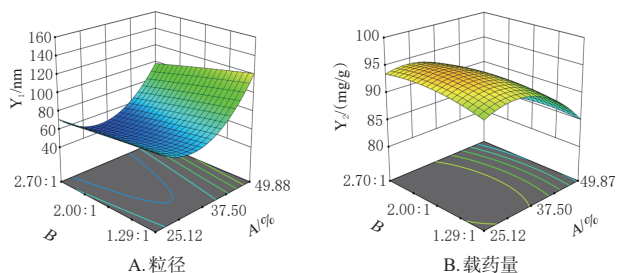


图3 粒径和载药量的三维效应面图

2.5.3 最优处方的验证 按“2.5.2”项下最优处方,即油相(中链甘油三酯)质量百分比为30.97%,乳化剂(RH40)与助乳化剂(PEG400)的质量比为2.10:1(换算得三者的质量比分别为30.97%、46.77%、22.26%),制备3批CUR/BER-SMEDDS,测得其平均粒径为 $(58.90 \pm 5.41)\text{nm}$,与预测值的相对偏差为-2.90%,平均载药量为 $(94.94 \pm 3.87)\text{mg/g}$,与预测值的相对偏差为-0.14%,表明所建模型预测性好、准确度高,最优工艺稳定、可行。

2.6 CUR/BER-SMEDDS的表征

2.6.1 外观和微观形态观察 取按“2.5.2”项下最优处方制得的CUR/BER-SMEDDS,在室温下观察其外观;同时,取该制剂适量,加水于37 °C乳化后,加少量磷钨酸染色,于透射电子显微镜下观察其微观形态。结果显示,该制剂为黄色透明液体,加水乳化后为淡黄色澄清透明液体;在透射电子显微镜(图4)下,其微粒呈圆球形。

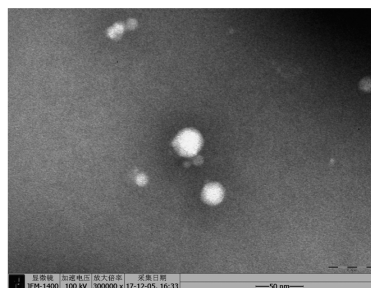


图4 CUR/BER-SMEDDS的透射电子显微镜图

2.6.2 粒径测定 取按“2.5.2”项下最优处方制得的CUR/BER-SMEDDS,加水于37 °C乳化后,用激光粒度仪测定其平均粒径。结果显示,其平均粒径为 $(58.90 \pm 5.41)\text{nm}$,多分散性指数为 0.17 ± 0.03 。

2.7 CUR/BER-SMEDDS体外溶出实验

按2020年版《中国药典》(四部)“溶出度与释放度测定法第三法(小杯法)”进行溶出度考察^[12]。分别以人工胃液、人工肠液(均含1%吐温-80)100 mL为溶出介质,转速为100 r/min,温度为(37.0±0.5)°C。精密称取按“2.5.2”项下最优处方所制CUR/BER-SMEDDS的浓缩液(未加水乳化)、CUR原料药、BER原料药各100 mg,分别装入0号胶囊壳内,投入溶出介质中^[15]。分别于溶出的5、10、15、30、60、90、120 min时取样5 mL(同时补加等温空白溶出介质5 mL),于30 s内过0.22 μm微孔滤膜,滤液稀释后测定吸光度,代入标准曲线计算CUR、BER的浓度,并按下式计算累积溶出度(Q):
$$Q = \frac{C_n V_0 + (C_1 + C_2 + C_3 + \dots + C_{n-1})V}{W} \times 100\%$$
(式中,C_n为第n个取样点的药物浓度;V₀为溶出介质总体积;V为每次取样体积;W为药物总量);同时,绘制溶出曲线,结果见图5。由图5可知,120 min内,在人工胃液中,BER原料药和CUR/BER-SMEDDS浓缩液中BER的累积溶出率相近,而CUR/BER-SMEDDS浓缩液中CUR在2种溶出介质中的累积溶出率均明显高于原料药。10 min时,CUR/BER-SMEDDS浓缩液中CUR和BER在人工肠液中的累积溶出率分别为90.54%、90.71%,在人工胃液中的累积溶出率分别为84.20%、59.45%,而对应CUR和BER原料药在人工肠液中的累积溶出率分别为51.09%、75.92%,在人工胃液中的累积溶出率分别为54.58%、54.22%,表明该自微乳体系释药更迅速完全,有助于解决药物溶解度低的问题。

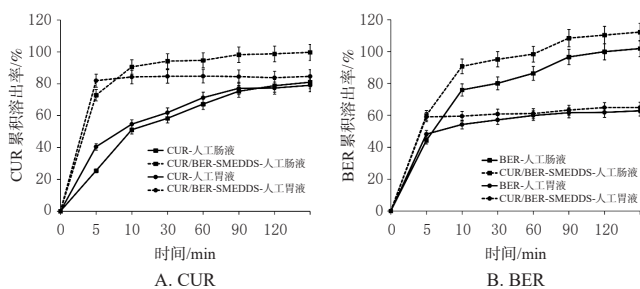


图5 CUR、BER、CUR/BER-SMEDDS的体外溶出曲线

2.8 CUR/BER-SMEDDS对前列腺肿瘤细胞的体外抑制作用考察

采用MTT法进行检测。将前列腺肿瘤细胞PC-3、DU-145分别培养于含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液中,于5%CO₂、37 °C条件(后同)下培养。分别取对数生长期的PC-3、DU-145细胞,按5×10³个/mL、200 μL/孔接种至96孔培养板中,待细胞融合至70%~80%后,弃去上清液,分别加入浓度均为10、20、30、40、50、60 μmol/L的游离CUR培养液(CUR组)、游离BER培养液(BER组)、CUR和BER药物混合培养液(CUR+BER组),

两药摩尔比为2:1)和CUR/BER-SMEDDS培养液(CUR/BER-SMEDDS组),给药浓度参考前期预实验结果设置,同时设置空白SMEDDS组,每组各浓度设置6个复孔。培养24 h后,每孔加入5 mg/mL MTT试剂20 μL,孵育4 h后弃去上清液,以3 500 r/min离心10 min,加DMSO 150 μL振摇后,采用酶标仪于490 nm波长处检测各孔的光密度(OD)值,计算细胞存活率和半数抑制浓度(IC₅₀)。细胞存活率(%)=(OD_{药物}-OD_{空白对照})/(OD_{阴性对照}-OD_{空白对照})×100%(以空白细胞作为阴性对照,空白培养液作为空白对照)。实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 16.0软件进行统计分析,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验,检验水准α=0.05。

细胞存活率检测结果(图6)显示,空白SMEDDS对PC-3、DU-145细胞的生长有微弱影响,但细胞生存率基本都在80%以上(图略);CUR+BER与CUR/BER-SMEDDS对PC-3、DU-145细胞均有明显抑制作用,且作用有随浓度增加而增强的趋势。IC₅₀计算结果(表7)表明,与CUR/BER-SMEDDS组比较,CUR、BER组中2种细胞的IC₅₀均显著升高(P<0.05),说明与单药比较,CUR/BER-SMEDDS能更有效地抑制前列腺肿瘤细胞生长。

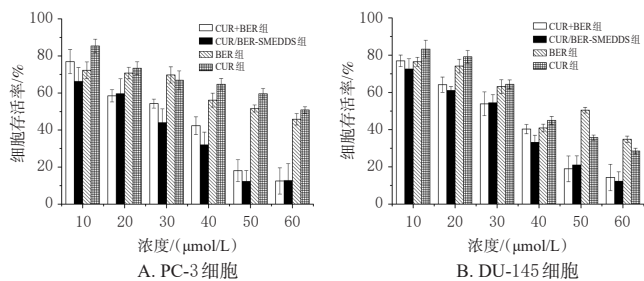


图6 CUR/BER-SMEDDS对前列腺肿瘤细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

表7 各种药物对PC-3、DU-145细胞的IC₅₀($\bar{x} \pm s, n=6, \mu\text{mol/L}$)

组别	PC-3细胞	DU-145细胞
BER组	52.48±3.24 ^a	42.66±2.95 ^a
CUR组	57.54±2.89 ^a	36.31±3.29 ^a
BER+CUR组	20.89±2.14	22.39±2.44
CUR/BER-SMEDDS组	17.38±2.84	20.89±1.26

a: 与CUR/BER-SMEDDS组比较,P<0.05

3 讨论

研究表明,CUR和BER可通过多种机制发挥抗肿瘤作用,可增强常规化疗药物对肿瘤细胞的敏感性^[7]。抑制肿瘤生长需要大量游离药物,但因为CUR、BER的溶解度和生物利用度问题,口服给药很难将足量的药物递送至肿瘤细胞。已有研究表明,两药联用可通过诱导细胞凋亡和自噬来抑制乳腺癌细胞生长^[5-7]。结合CUR和BER独特的化学性质、良好的抗癌活性、较低的毒性

及丰富的资源,本课题组设想将CUR和BER共同包载于SMEDDS中以发挥更强的抗肿瘤作用。结合文献报道,在处方设计前,本课题组通过细胞实验考察了不同摩尔比CUR和BER混合溶液(摩尔比分别为1:1、2:1、3:1、4:1)对前列腺肿瘤细胞PC-3、DU-145存活率的影响发现,当两药摩尔比为1:1时,细胞存活率最低,提示两药联用有较强的抑制活性,为其联合抗前列腺癌作用研究提供了一定的理论基础。在实际制备过程中,如果两药按摩尔比1:1投料,所制自微乳并非按1:1载药,原因可能与药物在载体中溶解度及亲和力不同有关。结合载药量及细胞学实验,在实际制备过程中,本研究将CUR和BER的投药摩尔比设为2:1,结果显示,在适当提高CUR的投药量后,可保证SMEDDS所包载的药物比例接近于发挥最强抗肿瘤活性的药物比例。

本研究首先通过溶解度实验筛选出对药物具有较强溶解能力的油相(中链甘油三酯、辛酸甘油酯)、乳化剂(吐温-80、Labrasol、RH40)和助乳化剂(PEG400、1,2-丙二醇、无水乙醇),进而通过绘制伪三元相图与星点设计-效应面法对处方进行优化,结合数据模型进行拟合预测,确定最优处方如下:中链甘油三酯、RH40、PEG400的质量百分比分别为30.97%、46.77%、22.26%。所制CUR/BER-SMEDDS粒径均一、稳定,对CUR和BER均有较好的包载能力,且其溶出度优于CUR、BER原料药。

本研究进一步探讨了CUR/BER-SMEDDS对人前列腺肿瘤细胞PC-3、DU-145的体外抑制作用。结果表明,CUR+BER与CUR/BER-SMEDDS对PC-3、DU-145细胞均有明显的抑制作用,且作用有随浓度增加而增强的趋势;此外,CUR/BER-SMEDDS对2种细胞的IC₅₀均显著低于CUR、BER单药,提示CUR/BER-SMEDDS对肿瘤细胞仍有抑制作用,与CUR+BER无显著差别且优于任一单药。这可能是由于药物经纳米乳包载后仍具有一定的长效释放作用,且剂型的改善可提高药物的溶解度,并有助于药物在肿瘤组织的靶向富集,但具体作用有待后续实验进一步验证。

综上所述,本研究采用自微乳化技术制备了CUR/BER-SMEDDS,所得制剂具有较高的载药能力,并有利于提高药物在胃肠道中的溶出速度,且对前列腺肿瘤细胞的体外抑制作用有所增强。在后续实验中,课题组将就CUR/BER-SMEDDS体内抗肿瘤作用、药动学等开展更全面、深入的研究,为制备具有良好载药能力和靶向性的纳米给药系统,实现精确递药提供更多的理论依据。

参考文献

[1] NIEDZWIECKI A, ROOMI M W, KALINOVSKY T, et al. Anticancer efficacy of polyphenols and their combinations

[J]. *Nutrients*, 2016, 8(9):552.

- [2] 陈美霓,郭巍,郝琴,等. 姜黄素的药理作用、临床应用及机制研究进展[J]. *延安大学学报(医学科学版)*, 2021, 19(3):96-99.
- [3] WANG Y, LIU Y F, DU X Y, et al. The anti-cancer mechanisms of berberine: a review[J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12:695-702.
- [4] LIU Y X, HUA W W, LI Y, et al. Berberine suppresses colon cancer cell proliferation by inhibiting the SCAP/SREBP-1 signaling pathway-mediated lipogenesis[J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 174:113776.
- [5] ZIASARABI P, SAHEBKAR A, GHASEMI F. Evaluation of the effects of nanomicellar curcumin, berberine, and their combination with 5-fluorouracil on breast cancer cells[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2021, 1328:21-35.
- [6] MAITI P, PLEMMONS A, DUNBAR G L. Combination treatment of berberine and solid lipid curcumin particles increased cell death and inhibited PI3K/Akt/mTOR pathway of human cultured glioblastoma cells more effectively than did individual treatments[J]. *PLoS One*, 2019, 14(12):e0225660.
- [7] BALAKRISHNA A, KUMAR M H. Evaluation of synergistic anticancer activity of berberine and curcumin on different models of A549, hep-G2, MCF-7, jurkat, and K562 cell lines[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015:354614.
- [8] 杨建苗,许东航,李范珠. 克服肿瘤多药耐药的药物共递送纳米载体的设计及研究新方向[J]. *中国现代应用药学*, 2020, 37(6):750-754.
- [9] 石金凤,李杰,杨晓琴,等. 中药活性成分协同化疗药物的纳米共载体体系联合抗肿瘤现状分析[J]. *药学报*, 2019, 54(2):258-268.
- [10] 马巧芳,曾佳,沙康,等. 口服自微乳给药系统的研究进展[J]. *药学进展*, 2020, 44(6):466-475.
- [11] 韩冰,关延彬,田雨冬,等. 盐酸小檗碱自微乳释药系统的制备与体外评价[J]. *中药材*, 2018, 41(10):2398-2402.
- [12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[S]. 2020年版. 北京:中国医药科技出版社, 2020:132, 480-483.
- [13] 张婷,王镜,申宝德,等. 共载细叶远志皂苷和β-细辛醚自微乳的制备及体外质量评价[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(24):5988-5995.
- [14] 赵艺宁,韩叶枫,梁建坤,等. 香叶木素自微乳的制备[J]. *中成药*, 2022, 44(5):1588-1593.
- [15] 陈旺,帅丽霞,袁袁,等. 单纯形网格法优选马甲子总三萜自微乳处方[J]. *中药新药与临床药理*, 2022, 33(6):836-841.

(收稿日期:2022-04-19 修回日期:2022-08-21)

(编辑:曾海蓉)