丹参酮ⅡA-甘草酸自组装纳米胶束的制备及体外抗脑胶质瘤评价

梁启凡[1,2],崔季维[1,2],张新茹[1,2],郭雨苗[1],王若宁[1,2],狄留庆[1,2]
(1. 南京中医药大学药学院,江苏 南京 210023;2. 江苏省中药高效给药系统工程技术研究中心,江苏 南京 210023)

摘要:目的 将丹参酮ⅡA(Tanshinone ⅡA,Tan ⅡA)封装于甘草酸(Glycyrrhizic acid,GL)中自组装得到胶束,考察其制备工艺并对产物进行表征,同时进行体外抗胶质瘤细胞活性评价。**方法** 采用薄膜分散法制备载丹参酮ⅡA-甘草酸自组装胶束(Tan ⅡA-GL/Micelle,TGM)。测定 TGM 的粒径、多分散系数以及 Zeta 电位;透射电子显微镜观察 TGM 的形态特征;高效液相色谱法测定 TGM 的包封率;透析袋法考察 TGM 的药物释放情况。倒置荧光显微镜考察 TGM 体外跨血脑屏障(Blood-brain barrier,BBB)的能力;定量考察细胞摄取的具体机制;MTT 法考察游离 Tan ⅡA、游离 GL 和 TGM 分别对鼠源性脑胶质瘤细胞 GL261 的细胞毒性;流式细胞仪检测游离 Tan ⅡA、游离 GL 及 TGM 对 GL261 的细胞凋亡作用。**结果** 薄膜分散法是制备载丹参酮ⅡA-甘草酸自组装胶束的最佳工艺方法;TGM 粒径约为(121.87±5.85)nm,Tan ⅡA 包封率为(88.54±14.27)%,呈类球形形态,制剂均一稳定;可在 5 h 左右释放包载药物。TGM 具有良好的跨 BBB 能力;脑胶质瘤细胞摄取自组装胶束的机制为通过网格蛋白介导的胞吞来进行制剂的摄取;对于脑胶质瘤细胞 GL261 具有良好的细胞毒性;细胞凋亡实验结果表明,TGM 相较于 Free Tan ⅡA、Free GL 组显著提高细胞凋亡水平,促细胞凋亡率分别由 12.28%、13.32%上升至 31.16%。**结论** GL 与 Tan IIA 通过自组装形成了纳米胶束,有效克服 Tan ⅡA 生物利用度低、水溶性差等缺点。TGM 可有效跨越 BBB,通过网格蛋白介导的胞吞途径被脑胶质瘤细胞摄取,具有良好的细胞毒性与促细胞凋亡能力。

关键词:丹参酮ⅡA;甘草酸;自组装胶束;薄膜分散法;抗胶质瘤活性
中图分类号:R283 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-0482(2022)06-0534-07
DOI:10.14148/j.issn.1672-0482.2022.0534
引文格式:梁启凡,崔季维,张新茹,等. 丹参酮ⅡA-甘草酸自组装纳米胶束的制备及体外抗脑胶质瘤评价[J]. 南京中医药大学学报,2022,38(6):534-540.

Preparation and *in vitro* Evalution of Glycyrrhizic Acid Self-Assembled Micelles Loading Tanshinone ⅡA

LIANG Qi-fan[1,2], *CUI Ji-wei*[1,2], *ZHANG Xin-ru*[1,2], *GUO Yu-miao*[1], *WANG Ruo-ning*[1,2], *DI Liu-qing*[1,2]
(1. *School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing* 210023, *China;* 2. *Jiangsu Engineering Research Center for Efficient Delivery System of TCM, Nanjing* 210023, *China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE Encapsulate tanshinone ⅡA (Tan ⅡA) in glycyrrhizic acid (GL) self-assembled micelles, to investigate the preparation process and characterization, and evaluate the anti-glioma cell activity *in vitro*. **METHODS** Thin film dispersion method was used to prepare self-assembled micelles loaded with tanshinone ⅡA glycyrrhizic acid (TGM, Tan ⅡA-GL/Micelle). The particle size, polydispersity index (PDI) and Zeta potential of TGM were measured. The typical morphological characteristics of TGM were observed by transmission electron microscopy (TEM). HPLC was employed to determine the encapsulation rate of TGM, then the drug release of TGM under different pH conditions was investigated by dialysis bag method. The *in vitro* blood-brain barrier (BBB)-crossing ability of TGM was inspected by inverted fluorescence microscopy. Quantitative cell uptake experiment to investigate the specific mechanism of cell uptake. The cytotoxicity of free Tan ⅡA, GL and TGM on GL261 cells was investigated by MTT assay. The apoptotic effects of free Tan ⅡA, GL and TGM on GL261 cells were detected by flow cytometry. **RESULTS** Thin film dispersion method was the best method to prepare self-assembled micelles loaded with tanshinone ⅡA glycyrrhizic acid. The particle size of TGM was about (121.87±5.85) nm, and the encapsulation efficiency of Tan ⅡA was (88.54±14.27)%, which was almost spherical in shape and the preparation was uniform and stable. TGM was capable of effective BBB-penetrating and the mechanism of uptake of self-assembled micelles by glioma cells was the uptake of preparations by clathrin-mediated endocytosis. TGM enhanced GL261 cell apoptosis from 12.28% (Free Tan ⅡA) and 13.32% (Free GL) to 31.16% (TGM), providing a promising potential to the GBM treatment. **CONCLUSION** The TGM nano-micelles are self-assembled from GL and Tan IIA, which effectively overcomes low bio-

收稿日期: 2022-03-05
基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(81903557);国家自然科学基金面上项目(82074024);江苏省自然科学基金(BK20190802);南京中医药大学中药学一流学科开放课题(2020YLXK019);南京中医药大学自然科学基金青年项目(NZY81903557)
第一作者: 梁启凡,男,硕士研究生,E-mail:523511853@qq.com
通信作者: 王若宁,女,副教授,主要从事中药新剂型与新技术研究,E-mail:ruoningw@njucm.edu.cn;
狄留庆,男,教授,主要从事中药新剂型与新技术研究,E-mail:diliuqing@njucm.edu.cn

availability and poor water solubility of Tan IIA. TGM can effectively cross the blood-brain barrier and be taken up by glioma cells through clathrin-mediated endocytosis, with good cytotoxicity and pro-apoptotic ability.

KEYWORDS: tanshinone ⅡA; glycyrrhizic acid; self-assembled micelles; film dispersion method; anti-glioma

丹参酮ⅡA(Tanshinone ⅡA,TanⅡA)为中药丹参中提取的脂溶性菲醌类化合物,是传统中药丹参的主要有效成分。《本草纲目》中即有记载丹参用于“活血,通心包络,治疝痛”[1],现已广泛应用于临床心血管疾病治疗和辅助治疗[2]。最新研究表明,TanⅡA具有明显的抗肿瘤活性,可通过抑制肿瘤细胞增殖与分化、诱导肿瘤细胞凋亡、抵抗新生血管生成抑制实体瘤生长[3-4]。研究发现,TanⅡA能够通过上调ADPRTL1和CYP1A1的表达,诱导人脑胶质瘤细胞生长周期停滞于G0/G1期,同时上调Notch-1表达并抑制p-c-Myc、p-MMP-9以及p-Bcl-2表达,诱导细胞发生氧化损伤并促进细胞凋亡,从而达到抑制肿瘤细胞生长的目的[4-5]。此外,通过激活IL-15信号传导,TanⅡA能够显著增加T-bet、GATA-3、Id2以及ETS-1的表达,激活JAK激酶并同时促进转录激活因子STAT5的磷酸化和活化,增加丝裂原活化蛋白激酶p38磷酸化以改善胶质瘤免疫抑制微环境,促进自然杀伤细胞分化[6]。然而,TanⅡA溶解度低、口服生物利用度差等性质限制了其临床使用。通过磺酸化修饰对TanⅡA进行化学结构改造能够提高TanⅡA水溶性。但是,单一的治疗模式难以应对复杂的肿瘤微环境;此外,多重生物屏障,例如血脑屏障(Blood brain barrier,BBB)的存在严重阻碍了药物在病变部位的累积,削弱了治疗效果。因此,如何高效递送TanⅡA至胶质瘤部位已成为该领域的研究重点。

中药化学成分来源广泛,结构独特,极易发生分子间相互作用而产生聚集或自组装形成聚集体或自组装颗粒[7]。如甾体、三萜类成分的刚性骨架、柔性的烷基侧链和多手性中心的结构特点使其容易因疏水作用、氢键作用以及π-π堆积作用中的一种或多种共同影响而自组装形成自组装纳米粒。甘草酸(Glycyrrhizic acid,GL)源于中药甘草的根部皂苷,是一种两亲性分子,亲水部分由葡萄糖醛酸残基构成,疏水部分是甘草酸残基,能够在水中聚集形成自组装胶束,可以作为药物载体用于改善药物吸收[8]。GL不仅具有人工合成纳米材料一样的药物包封能力,还具有优于人工合成纳米材料的生物可降解性、生物相容性和安全性。GL通过半胱天冬酶依赖性和独立性途径、内质网应激和线粒体依赖性途径诱导细胞凋亡,通过减少活性氧的产生和激活内皮细胞中的ERK途径来降低肿瘤细胞活性,通过抑制活性亚基p65进而抑制NF-κB来抑制增殖和诱导细胞凋亡[9]。调节性T细胞(Regulatory cells,Tregs)和骨髓衍生抑制细胞(Myeloid-derived suppressor cells,MDSCs)可以通过Cox2/PGE2通路促进肿瘤免疫抑制微环境的形成。GL可以通过抑制pSTAT3诱导Tregs和MDSC下调,改善肿瘤免疫抑制的微环境,实现肿瘤的有效治疗[10]。胶质瘤微环境中同样存在大量的Tregs和MDSCs,为GL与TanⅡA联用以及多途径协同治疗胶质瘤提供了理论基础。

基于此,本研究利用了GL能够自组装形成胶束的特性,采用薄膜分散法将TanⅡA包封在胶束内制备制剂TGM。本研究从载丹参酮ⅡA-甘草酸自组装胶束的制备与表征、体外跨BBB能力评价及体外抗脑胶质瘤活性评价等方面考察其特性。

1　材料

Nano-ZS90激光粒度分析仪,英国Malvern仪器有限公司;JY92-ⅡN超声波细胞破碎仪,宁波新芝生物科技有限公司;HT9800透射电子显微镜(Transmission electron microscope,TEM),日本日立公司;Gallios流式细胞仪,美国贝克曼库尔特公司;倒置荧光显微镜,Zeiss公司;酶标仪,PerkinElmer公司。

丹参酮ⅡA,大连美仑生物技术有限公司;甘草酸,北京百灵威科技有限公司;香豆素6,碧云天有限公司;荧光染料DiI,苏州宇恒生物科技有限公司;四水合氯化锰、四甲基偶氮唑盐(MTT),美国Sigma公司;Annexin V-FITC/PI凋亡试剂盒,南京建成有限公司;DMEM培养液、0.25%胰蛋白酶、青-链霉素溶液、磷酸缓冲盐溶液,美国Hyclone公司;胎牛血清,美国Gibco公司。

鼠源性脑胶质瘤GL261细胞,南京贝佳生物公司;鼠源性脑微血管内皮细胞bEnd.3细胞,中科院上海细胞库。

2　方法和结果

2.1　TGM的制备

分别采用乳化蒸发法、超声分散法和薄膜分散法制备制剂。乳化蒸发法制备TGM:精密称取一定

量 Tan Ⅱ A 用氯仿配制成 2 mg · mL^{-1} 溶液，分别取 5、15、25 mg GL 用 4.5 mL 超纯水溶解。吸取 500 μL Tan Ⅱ A 的氯仿溶液于 GL 水溶液中，超声处理 15 min(200 W、2 s 开/1 s 关)，使体系充分乳化呈白色乳液状，转移至 100 mL 茄型瓶中，30 ℃减压旋转蒸发除尽氯仿，用 0.8 μm 滤膜过滤得到 TGM。

超声分散法制备 TGM：精密称取一定量 Tan Ⅱ A 用无水乙醇配制成 1 mg · mL^{-1} 溶液，分别取 5、15、25 mg GL 用 9 mL 超纯水溶解。取 Tan Ⅱ A 的乙醇溶液 1 mL 逐渐滴入 GL 的水溶液中，密封搅拌 2.5 h，随后在冰浴条件下进行超声处理，超声处理 15 min(200 W、2 s 开/1 s 关)，用 0.8 μm 滤膜过滤得到 TGM。

薄膜分散法制备 TGM：精密称取一定量 Tan Ⅱ A 用无水乙醇配制成 1 mg · mL^{-1} 溶液，分别取 5、15、25 mg GL，转移至 100 mL 茄型瓶中，于 45 ℃减压旋转蒸发除去无水乙醇，瓶壁上形成均匀薄膜，随后加入 5 mL 超纯水，轻微振荡使药物薄膜完全溶解于水中。随后将溶液转至 20 mL 西林瓶中，在冰浴条件下超声破碎 5 min(200 W、2 s 开/1 s 关)，用 0.8 μm 滤膜过滤得到 TGM 溶液。

使用动态光散射激光粒度仪对多种制备方法下 TGM 的粒径、PDI 和 Zeta 电位进行测定，如表 1～3 所示，通过乳化蒸发法和超声分散法制备的 3 种投料比的 TGM，粒径和 PDI 过大，制剂参数变化范围大，TGM 无法通过 EPR 效应聚集至胶质瘤部位发挥相应疗效。如图 1 所示，薄膜分散法制备的 TGM 相比之下粒径和 PDI 稳定且均较小，投料比为 1∶15 和 1∶25 的制剂溶液清澈无浑浊，出现明显丁达尔效应。则薄膜分散法确定为最终制备方法。

表 1　乳化蒸发法制备 TGM 的粒径、PDI 和 Zeta 电位($\bar{x}\pm s$，$n=3$)

Table 1　Determination of particle size, PDI and Zeta potential of TGM prepared by emulsion evaporation ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

投料比(Tan Ⅱ A∶GL)	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
1∶5	441.6±43.6	0.400±0.113	−26.8±3.0
1∶15	386.2±33.0	0.587±0.081	−19.7±1.3
1∶25	703.6±299.9	0.748±0.228	−26.3±0.9

表 2　超声分散法制备 TGM 的粒径、PDI 和 Zeta 电位($\bar{x}\pm s$，$n=3$)

Table 2　Determination of particle size, PDI and Zeta potential of TGM prepared by ultrasonic dispersion ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

投料比(Tan Ⅱ A∶GL)	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
1∶5	422.3±60.6	0.612±0.089	−19.7±1.3
1∶15	266.3±10.2	0.144±0.084	−14.0±1.0
1∶25	199.5±3.7	0.238±0.026	−17.0±0.3

表 3　薄膜分散法制备 TGM 的粒径、PDI 和 Zeta 电位($\bar{x}\pm s$，$n=3$)

Table 3　Determination of particle size, PDI and Zeta potential of TGM prepared by thin film dispersion method ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

投料比(Tan Ⅱ A∶GL)	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
1∶5	259.07±3.15	0.314±0.052	−17.4±2.7
1∶15	251.93±14.11	0.358±0.038	−28.0±1.4
1∶25	121.87±5.85	0.227±0.033	−22.3±1.2

2.2　TGM 的表征

2.2.1　TEM 扫描　取适量的 TGM 以 PBS 缓冲液稀释，滴加至超薄碳支持膜铜网上，静置后滤纸吸去液体。滴加 2%的磷钨酸溶液进行染色，滤纸吸去液体，进行 TEM 扫描。

TGM 呈现大小均一的圆球状，粒径为 150 nm 左右，与粒径测量结果基本吻合(图 2)。

2.2.2　包封率测定　通过高效液相色谱法测定 TGM 中 Tan Ⅱ A 和 GL 的包封率(Entrapment efficiency，EE)。其中，Tan Ⅱ A 的色谱方法：色谱柱为 Thermo BDS HYPERSIL C_{18}(250 mm × 4.6 mm，5 μm)，流动相为甲醇∶水 = 90∶10，检测波长为 269 nm，流速为 1.0 mL · min^{-1}，柱温为 30 ℃，进样量为 10 μL；GL 的色谱方法：色谱柱为 Thermo BDS HYPERSIL C_{18}(250 mm×4.6 mm，5 μm)，流动相为甲醇∶0.1%磷酸水溶液 = 70∶30，检测波长为

250 nm,流速为 1.0 mL·min^{-1},柱温为 30 ℃,进样量为 10 μL。取适量 TGM 于离心管中,加入 10 倍体积色谱级甲醇,水浴超声 10 min,12 000 r·min^{-1},离心 10 min 取上清,按照上述液相条件测定 TanⅡA 和 GL 含量计算 EE。EE(%)=(药物测得质量/药物实际投入质量)×100%。

如表 4 所示,后续通过 HPLC 测定 3 种投料比制备 TGM 的药物包封率,结果表明,当投料比为 1∶25 时,通过薄膜分散法制备 TGM,粒径和 PDI 分别为(121.87±5.85) nm、0.227±0.033,Zeta 电位稳定为(-22.3±1.2) mV,TanⅡA 包封率最高为(88.54±14.27)%。因此,最终的制备工艺为上述薄膜分散法。

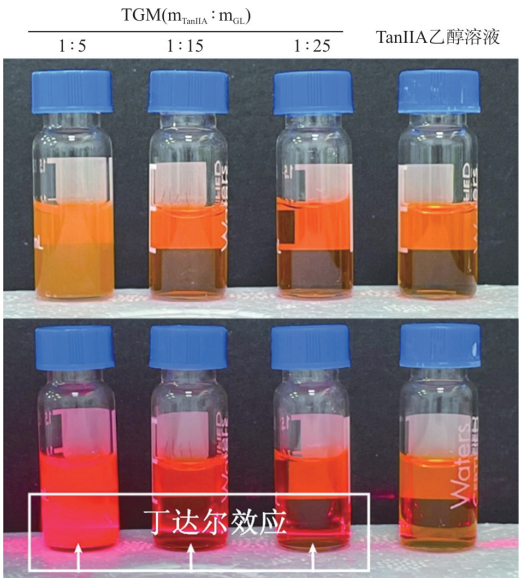


图 1　薄膜分散法制备不同比例 TGM 制剂拍摄图

Fig. 1　Photographs of different proportions of TGM preparations prepared by thin film dispersion method

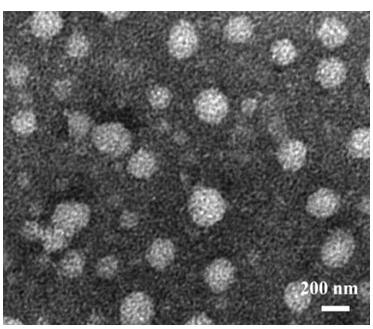


图 2　TGM 的 TEM 图

Fig. 2　TEM image of TGM

表 4　HPLC 测定 TGM 的 TanⅡA 包封率($\bar{x}\pm s$,$n=3$)

Table 4　Determination of TanⅡA encapsulation efficiency of TGM by HPLC ($\bar{x}\pm s$,$n=3$)

投料比(TanⅡA∶GL)	EE of TanⅡA/%
1∶5	35.88±12.77
1∶15	76.04±4.75
1∶25	88.54±14.27

2.2.3　药物释放　吸取 2 mL TGM 加入处理好的透析袋(截留分子量为 8 000~14 000)中。释放介质分别为含 2% 吐温-80 的 PBS 缓冲液(0.1 mol·L^{-1},pH 7.4),漏槽条件。置于恒温摇床内(37 ℃,150 r·min^{-1})。分别在 0.5、1、2、4、6、8、10、12、24 h 时收集透析袋外的释放介质,并立即补充等体积的新鲜相应释放介质。释放的药物通过 HPLC 法进行测定,计算累计药物释放率,并绘制药物累计释放曲线。

结果如图 3 所示,经自组装胶束包载后的 2 种药物在 4~6 h 左右才释放其中大部分包载药物,制剂的制备有效减缓药物的释放。

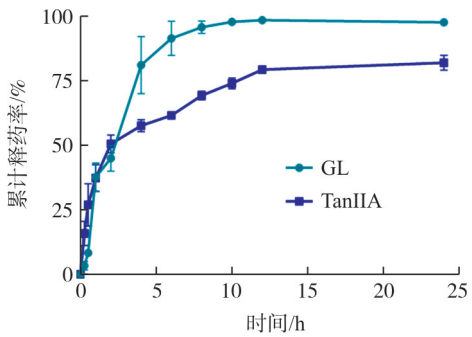


图 3　TGM 药物累计释放考察($\bar{x}\pm s$,$n=3$)

Fig. 3　Investigation of cumulative release of TGM drugs ($\bar{x}\pm s$,$n=3$)

2.3　TGM 跨 BBB 考察

将 Transwell 小室放入 24 孔板中,然后将 bEnd.3 细胞以每孔 6×10^4 的密度接种在 Transwell 小室中,上室 300 μL 细胞液,下室加入 800 μL 完全培养基,每 2 d 更换 1 次培养基。通过显微镜观察细胞的形态并测量跨膜电阻来监测 bEnd.3 单层的紧密度。当 bEnd.3 单层的细胞与下腔室跨膜电阻高于 200 Ω·cm^2 时即可进行实验,在下室将 GL261 细胞以每孔 5×10^4 的密度接种。使用亲脂性染料香豆素 6(Coumarin6,C6)取代了 TanⅡA,制备了 C6-GL 胶束 C6-GL/M,用单培配置成含药培养基,在上室加入 300 μL 含药培养基,于 12 h 后利用倒置荧光显微镜拍摄上室和下室细胞。

TGM 跨 BBB 效率结果见图 4。与 bEnd.3 细胞在上室共孵育后，通过倒置荧光显微镜观察上室与下室的带荧光标记制剂的分布情况。结果如图 4 所示，在下室可以观察到 C6-GL/M 的分布，表明 GL 自组装胶束具有很好的跨 BBB 能力。

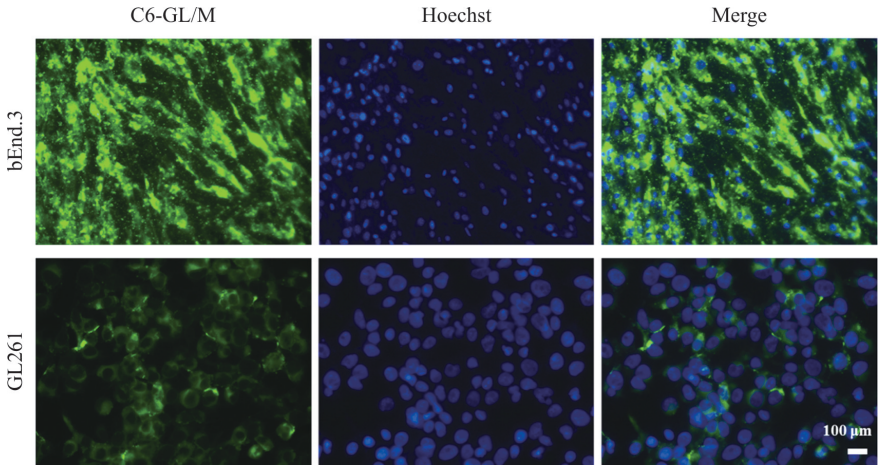


图 4　倒置荧光显微镜观察香豆素 6 标记载体跨 bEnd.3 细胞后的分布情况

Fig. 4　Observation of distribution of coumarin 6-labeled vector across bEnd.3 cells by inverted fluorescence microscope

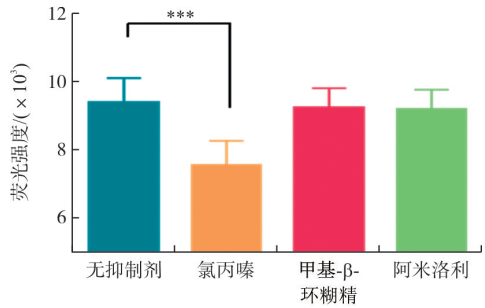
2.4　细胞摄取机制考察

将 GL261 细胞以每孔 1.0×10^4 的密度接种在 96 孔板上，待细胞贴壁后分别加入相应抑制剂在以下条件孵育细胞：①5 mmol·L^{-1} 氯丙嗪以抑制网格蛋白介导的胞吞作用；②10 mmol·L^{-1} 甲基 β-环糊精以抑制小窝蛋白介导的胞吞作用；③5 mmol·L^{-1} 阿米洛利以抑制巨胞饮作用；④不加抑制剂的无血清培养基作为空白对照。用抑制剂预处理贴壁肿瘤细胞 1 h，使用荧光染料 DiI 取代 Tan Ⅱ A，制备 DiI-GL/M，用单培配置成含药培养基，加入含药培养基，孵育 1 h。弃去上层的培养基，加入 100 μL DMSO 溶解细胞以释放 DiI 并用酶标仪进行检测（DiI：$\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$=549/565 nm）。

结果如图 5 所示，通过使用 3 种不同摄取机制的抑制剂，DiI-GL/M 被 GL261 细胞摄取受到氯丙嗪抑制，相对摄取率减少至（80.26±0.03）%，表明 TGM 可以通过网格蛋白介导的细胞内吞途径进入 GL261 细胞内，从而增强 Tan Ⅱ A 内化到肿瘤细胞的能力。

2.5　MTT 法考察 TGM 细胞毒性

取对数生长期的 GL261 细胞以完全培养基重悬（5×10^4 mL^{-1}），接种于 96 孔板中，每孔 100 μL 细胞液，置于 37 ℃，5% CO_2 培养过夜。待细胞贴壁后，吸除培养基，空白对照孔加入无血清培养基 100 μL，给药孔分别加入含有不同浓度游离 Tan Ⅱ A、游离 GL 及 TGM。培养 24 h，加入 MTT（5 mg·mL^{-1}，PBS 溶解）10 μL，37 ℃，5% CO_2 孵育 4 h。吸除每孔溶液，加入 DMSO 150 μL，37 ℃恒温摇床中振荡 10 min，酶标仪测定其在 490 nm 波长下的吸光度（A），计算细胞存活率（%），并计算半数抑制浓度（IC_{50}）值。



注：与无抑制剂组比较，*** $P<0.001$。$\bar{x}\pm s$，$n=6$。

图 5　DiI-GL/M 的细胞摄取机制考察

Fig. 5　Investigation of the cellular uptake mechanism of DiI-GL/M

取对数生长期的 bEnd.3 细胞以完全培养基重悬（5×10^4 mL^{-1}），接种于 96 孔板中，每孔 100 μL 细胞液，置于 37 ℃，5% CO_2 培养过夜。待细胞贴壁后，吸除培养基，空白对照孔加入无血清培养基 100 μL，给药孔分别加入含有不同浓度 Tan Ⅱ A 的 TGM。培养 24 h，加入 MTT（5 mg·mL^{-1}，PBS 溶解）10 μL，37 ℃，5% CO_2 孵育 4 h。吸除每孔溶液，加入 DMSO 150 μL，37 ℃恒温摇床中振荡 10 min，酶标仪测定其在 490 nm 波长下的吸光度（A），计算细胞存活率（%）。细胞存活率（%）=（$A_{给药}-A_{空白}$）/（$A_{对照}-A_{空白}$）。

结果如图 6 所示，单独给药 Tan Ⅱ A 和 GL 时，

两种药物分别都对 GL261 细胞产生浓度依赖性细胞毒性作用,药物的 IC_{50} 值分别为 2.95 μg·mL^{-1} 和 5.15 μg·mL^{-1}。但两种药物联合使用时显著提高了抗肿瘤疗效,当 TGM 中 TanⅡA 的药物浓度为 4 μg·mL^{-1} 时,细胞活力已降低至(34.09±6.58)%,两药联合的 IC_{50} 值为 2.15 μg·mL^{-1},说明两种药物联合使用具有更高效的抗肿瘤作用。

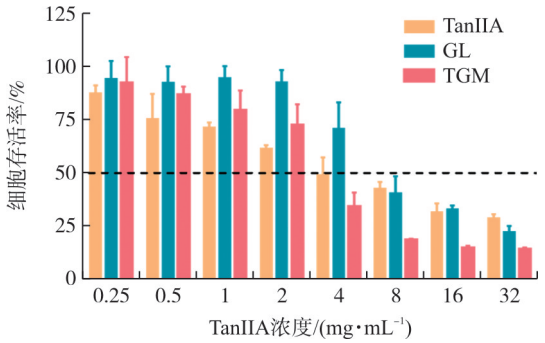


图 6　游离 TanⅡA、游离 GL 和 TGM 对 GL261 细胞的细胞毒性考察($\bar{x}\pm s$,$n=4$)

Fig. 6　Cytotoxicity of free TanⅡA, free GL and TGM on GL261 cells($\bar{x}\pm s$,$n=4$)

结果如图 7 所示,TGM 对小鼠脑微血管内皮细胞的细胞毒性明显弱于小鼠脑胶质瘤细胞,两药联合的 IC_{50} 值为 7.99 μg·mL^{-1}。在制剂给药的浓度下,正常细胞的存活率为(72.04±7.36)%,表明该制剂对正常脑细胞系的细胞毒性弱。

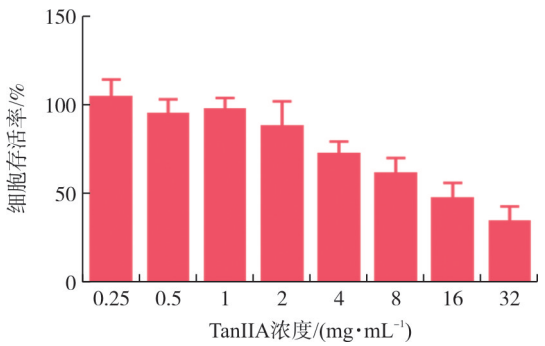


图 7　TGM 对 bEnd.3 细胞的细胞毒性考察($\bar{x}\pm s$,$n=4$)

Fig. 7　Cytotoxicity of TGM on bEnd.3 cells($\bar{x}\pm s$,$n=4$)

2.6　Annexin V-FITC/PI 法考察 TGM 促细胞凋亡能力

取对数生长期的 GL261 细胞以完全培养基重悬(2×10^5 mL^{-1}),接种于 12 孔板中,每孔 1 mL,置于 37 ℃,5%CO_2 培养过夜。待细胞贴壁后,吸除培养基,加入以无血清培养基配制稀释的游离 TanⅡA、游离 GL 及 TGM 的含药培养基,不加药物处理的细胞作为空白对照。培养 24 h 后,收集细胞沉淀,加入结合缓冲液 0.5 mL 重悬细胞,300 目尼龙筛网过滤除去细胞团块,加入 5 μL Annexin V-FITC 染液和 10 μL PI 染液轻轻混合均匀,室温避光孵育 10 min,置于流式管中,流式细胞仪进行凋亡检测。

细胞凋亡结果如图 8 所示,分别将游离 TanⅡA、游离 GL 和 TGM 作用于 GL261 细胞,3 组药物均表现出对 GL261 明显的促凋亡作用。与 Free TanⅡA、Free GL 组相比,TGM 的促细胞凋亡率分别由 12.28%、13.32%上升至 31.16%,其中晚期细胞凋亡比例明显上升。表明 TanⅡA 与 GL 通过自组装形成胶束后,更有利于被脑胶质瘤细胞所摄取,TanⅡA 与 GL 协同作用能发挥出更强的抗脑胶质瘤疗效。

3　讨论

TanⅡA 具有明显的抗脑胶质瘤效果,可以有效抑制肿瘤细胞增殖、诱导分化和凋亡、抑制新生血管形成及肿瘤转移[11-14]。然而,TanⅡA 水溶性差和口服生物利用度低限制了其临床应用[15]。利用纳米技术将中药活性成分负载于纳米载体中,可以有效改善溶解度和生物利用度,增强药物的稳定性以及对病灶部位的靶向性。目前,研究人员尝试了多种方法,如用薄膜水合法和探针超声处理,将 TanⅡA 包载进脂质体内部[16],将 TanⅡA 制备成纳米乳液,改善 TanⅡA 在大鼠小肠中的吸收[17],将 TanⅡA 包载进聚乙二醇制备的纳米颗粒中,有效延长在人体内的循环[18]。本研究采用 GL 自组装胶束,通过薄膜分散法包载 TanⅡA 制备得到 TGM 最终制剂。TGM 制剂溶液均一稳定且澄清,可明显观察到丁达尔效应,TanⅡA 包封率高,4~6 h 稳定释药;在 GL 自组装纳米胶束的包载下将 TanⅡA 运输通过脑微血管内皮细胞,被脑胶质瘤细胞所摄取从而发挥 GL 与 TanⅡA 的抗肿瘤疗效,TGM 相较于游离 TanⅡA 和游离 GL 对 GL261 细胞显示出更强的细胞毒性以及促进细胞凋亡的能力。

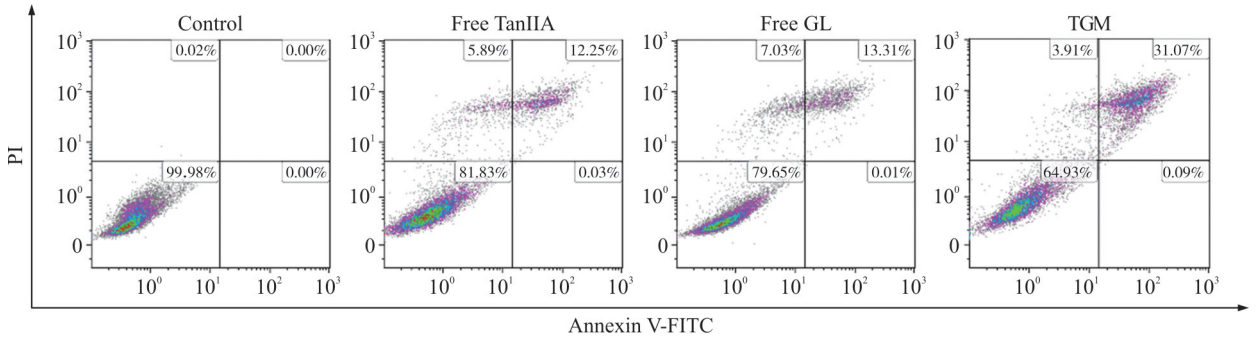


图 8　游离 TanⅡA、游离 GL 和 TGM 对 GL261 细胞的促凋亡作用考察

Fig. 8　Pro-apoptotic effects of free TanⅡA, free GL and TGM on GL261 cells

中药丹参活性成分 TanⅡA 因抗肿瘤、促进血液循环、消除血瘀的功效，近年来已被广泛应用于乳腺癌[19]、肾纤维化[20]等疾病的治疗。但不易通过生物屏障、口服生物利用度低、水溶性差和渗透性低等特性使得 TanⅡA 难以用于脑胶质瘤的治疗[21]。本研究构建的 GL 自组装胶束，可有效装载 TanⅡA 跨越 BBB 达到治疗区域，两药的抗脑胶质瘤疗效协同作用，发挥有效的细胞毒性与促进脑胶质瘤细胞凋亡，有效克服 TanⅡA 难以通过生物屏障、口服生物利用度低、水溶性差等缺点，为 TanⅡA 一类水溶性差、半衰期短且生物利用度低的抗肿瘤中药活性成分的递送系统设计提供了参考。

参考文献：

[1] 李时珍. 本草纲目[M]. 北京：中国书店，1988：21.
LI SZ. Compendium of Materia Medica[M]. Beijing：China Bookstore，1988：21.

[2] GAO S，LIU Z，LI H，et al. Cardiovascular actions and therapeutic potential of tanshinone ⅡA [J]. Atherosclerosis，2012，221(2)：604.

[3] XIE J，LIU JH，LIU H，et al. The antitumor effect of tanshinone ⅡA on anti-proliferation and decreasing VEGF/VEGFR2 expression on the human non-small cell lung cancer A549 cell line[J]. Acta Pharm Sin B，2015，5(6)：554-563.

[4] DONG WL，ZHANG YK，CHEN XM，et al. High-dose tanshinone ⅡA suppresses migration and proliferation while promoting apoptosis of astrocytoma cells via Notch-1 pathway[J]. Neurochem Res，2018，43(9)：1855-1861.

[5] WANG J，WANG XJ，JIANG S，et al. Growth inhibition and induction of apoptosis and differentiation of tanshinone ⅡA in human glioma cells[J]. J Neuro Oncol，2007，82(1)：11-21.

[6] KIM WS，KIM DO，YOON SJ，et al. Cryptotanshinone and tanshinone ⅡA enhance IL-15-induced natural killer cell differentiation [J]. Biochem Biophys Res Commun，2012，425(2)：340-347.

[7] ZHAO Q，LUAN X，ZHENG M，et al. Synergistic mechanisms of constituents in herbal extracts during intestinal absorption：Focus on natural occurring nanoparticles[J]. Pharmaceutics，2020，12(2)：128.

[8] SELYUTINA OY，POLYAKOV NE. Glycyrrhizic acid as a multifunctional drug carrier-From physicochemical properties to biomedical applications：A modern insight on the ancient drug[J]. Int J Pharm，2019，559：271-279.

[9] LI S，ZHU JH，CAO LP，et al. Growth inhibitory *in vitro* effects of glycyrrhizic acid in U251 glioblastoma cell line[J]. Neurol Sci，2014，35(7)：1115-1120.

[10] JUIN SK，GHOSH S，MAJUMDAR S. Glycyrrhizic acid facilitates anti-tumor immunity by attenuating Tregs and MDSCs：An immunotherapeutic approach[J]. Int Immunopharmacol，2020，88：106932.

[11] WU WY，YAN H，WANG XB，et al. Sodium tanshinone ⅡA silate inhibits high glucose-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration through activation of AMP-activated protein kinase[J]. PLoS ONE，2014，9(4)：e94957.

[12] ZHANG Y，WEI RX，ZHU XB，et al. Tanshinone ⅡA induces apoptosis and inhibits the proliferation，migration，and invasion of the osteosarcoma MG-63 cell line *in vitro*[J]. Anti Cancer Drugs，2012，23(2)：212-219.

[13] YUN SM，JUNG JH，JEONG SJ，et al. Tanshinone ⅡA induces autophagic cell death via activation of AMPK and ERK and inhibition of mTOR and p70 S6K in KBM-5 leukemia cells[J]. Phytother Res，2014，28(3)：458-464.

[14] ZHANG KJ，LI J，MENG WT，et al. C/EBPβ and CHOP participate in Tanshinone ⅡA-induced differentiation and apoptosis of acute promyelocytic leukemia cells *in vitro*[J]. Int J Hematol，2010，92(4)：571-578.

[15] CAI Y，ZHANG W，CHEN Z，et al. Recent insights into the biological activities and drug delivery systems of tanshinones[J]. Int J Nanomedicine，2016，11：121-30.

[16] FAN LC，TENG HW，SHIAU CW，et al. SHP-1 is a target of regorafenib in colorectal cancer[J]. Oncotarget，2014，5(15)：6243-6251.

[17] MA H，FAN Q，YU J，et al. Novel microemulsion of tanshinone ⅡA，isolated from *Salvia miltiorrhiza* bunge，exerts anticancer activity through inducing apoptosis in hepatoma cells[J]. Am J Chin Med，2013，41(1)：197-210.

[18] LIU X，AN CY，JIN P，et al. Protective effects of cationic bovine serum albumin-conjugated PEGylated tanshinone ⅡA nanoparticles on cerebral ischemia[J]. Biomaterials，2013，34(3)：817-830.

[19] ZHOU J，YU CH，PENG C. Anticancer effect of tanshinones on female breast cancer and gynecological cancer[J]. Front Pharmacol，2022，12：824531.

[20] SUN J，XU ZS，HOU Y，et al. Hierarchically structured microcapsules for oral delivery of emodin and tanshinone ⅡA to treat renal fibrosis[J]. Int J Pharm，2022，616：121490.

[21] ASHOUR AA，RAMADAN AA，ABDELMONSIF DA，et al. Enhanced oral bioavailability of Tanshinone ⅡA using lipid nanocapsules：Formulation，*in-vitro* appraisal and pharmacokinetics[J]. Int J Pharm，2020，586：119598.

（编辑：董宇）