doi:10.3969 / j.issn.1006 - 4931.2022.18.012

壳寡糖修饰盐酸川芎嗪 PLGA 微球体外评价*

吴铄珺，王曙东，苏　华，刘文雅△

（中国人民解放军东部战区总医院药剂科，江苏 南京　210012）

摘要：目的　评价壳寡糖修饰的盐酸川芎嗪聚乳酸 - 羟基乙酸共聚物（PLGA）微球（COS - LTH - MS）的体外特性。**方法**　以 PLGA 为载体材料，采用复乳 - 溶剂挥发法，制备 COS - LTH - MS 并初步判断其缓释特性。设实验组［0.014，0.028，0.056，0.112，0.224，0.448 mg / mL 的 COS - LTH - MS（载药量为 20.02%）］、对照组（相应质量浓度空白微球）、空白组（培养基），采用 CCK - 8 法检测 COS - LTH - MS 的细胞毒性；另设 LTH 溶液组、LTH - MS 组和 COS - LTH - MS 组，通过高效液相色谱（HPLC）法测定 MCF - 7 及 A549 细胞内 LTH 质量浓度；采用激光共聚焦显微镜观察 MCF - 7 及 A549 细胞荧光强度。**结果**　COS - LTH - MS 表面光滑圆整、尺寸可控，载药量达 19.05%，包封率为 68.16%，体外释放 24 h 达到平稳状态，累积释放量 78.23%。COS - LTH - MS 细胞低毒性质量浓度为 0.056 mg / mL，作用 24 h；LTH 出峰时间约为 9 min，峰形良好，阴性对照无干扰，线性关系拟合良好，平均加样回收率为 98.72%，*RSD* 为 1.04%（$n = 9$）；COS - LTH - MS 组各时点 LTH 质量浓度均显著高于 LTH - MS 组（$P < 0.05$），且给药 8 h 后 A549 细胞 COS - LTH - MS 组显著优于 LTH 溶液组（$P < 0.01$），MCF - 7 细胞 COS - LTH - MS 组均显著优于 LTH 溶液组和 LTH - MS 组（$P < 0.01$）；COS - LTH - MS 组的荧光强度显著高于 LTH 溶液组和 LTH - MS 组，且 MCF - 7 细胞荧光强度更高。**结论**　该微球制备工艺简单，修饰后微球对肿瘤细胞有更强靶向性。

关键词：盐酸川芎嗪；微球；壳寡糖；细胞靶向性；体外评价

中图分类号：R927.11；R944.9　　**文献标志码：A**　　**文章编号：1006 - 4931（2022）18 - 0053 - 04**

In Vitro Evaluation of Ligustrazine Hydrochloride - Loaded PLGA Microspheres Modified with Chitosan Oligosaccharide

WU Shuojun, WANG Shudong, SU Hua, LIU Wenya

(Department of Pharmacy, General Hospital of Eastern Theater Command of the PLA, Nanjing, Jiangsu, China　210012)

Abstract: Objective　To evaluate the ligustrazine hydrochloride - loaded polylactic acid glycolic acid (PLGA) microspheres modified with chitosan oligosaccharide (COS - LTH - MS) them *in vitro*. **Methods**　PLGA was taken as carrier material, COS - LTH - MS was prepared by double emulsion - solvent evaporation method and its slow - release characteristics were preliminarily evaluated. In this experiment, the test group [0.014, 0.028, 0.056, 0.112, 0.224, 0.448 mg / mL COS - LTH - MS (drug loading of 20.02%)], the control group (corresponding mass concentration of blank microspheres) and the blank group (culture medium) were set up. The cytotoxicity of COS - LTH - MS was detected by CCK - 8 method. In addition, the LTH solution group, LTH - MS group and COS - LTH - MS group were set up to determine the concentration of LTH in MCF - 7 and A549 cells by the high - performance liquid chromatography (HPLC) method. The fluorescence intensity of MCF - 7 and A549 cells was observed by laser confocal microscope (LSCM). **Results**　The surface of COS - LTH - MS was smooth and round, the size was controllable, the drug loading was 19.05%, the entrapment efficiency was 68.16%, the *in vitro* release reached a stable state after 24 h, and the cumulative release was 78.23%. The low toxic mass concentration of COS - LTH - MS for cells was 0.056 mg / mL, and the reaction time was 24 h. The peak time of LTH was about 9 min, the peak shape was good, the negative control had no interference, the linear relationship was good, and the average recovery rate was 98.72% with an *RSD* of 1.04% ($n = 9$). The mass concentration of LTH in the COS - LTH - MS group was significantly higher than that in the LTH - MS group at all time points ($P < 0.05$). After 8 h of administration, the A549 cells in the COS - LTH - MS group were significantly better than those in the LTH solution group ($P < 0.01$), the MCF - 7 cells in the COS - LTH - MS group were significantly better than those in the LTH solution group and the LTH - MS group ($P < 0.01$), and the fluorescence intensity in the COS - LTH - MS group was significantly higher than that in the LTH solution group and LTH - MS group, and the fluorescence intensity of MCF - 7 cells was higher. **Conclusion**　The preparation process of the microspheres is simple, and the modified microspheres were much more targetable to tumor cells.

Key words: ligustrazine hydrochloride; microsphere; chitosan oligosaccharide; cell targeting; *in vitro* evaluation

川芎嗪是中药川芎的主要有效成分，可有效抑制　肺癌细胞、乳腺癌细胞等多种肿瘤细胞的增殖与迁移，

*基金项目：中国人民解放军东部战区总医院课题［2017053］。

第一作者：吴铄珺，女，硕士，药师，研究方向为药物制剂研发，（电子信箱）1019424142@qq.com。

△通信作者：刘文雅，女，硕士，主管药师，研究方向为医院制剂和靶向制剂，（电子信箱）aya_a@sina.com。

诱导凋亡和自噬[1-2]。川芎嗪主要以盐酸川芎嗪(LTH)和磷酸川芎嗪形式存在,其分子中的甲基易被氧化代谢,存在代谢快、半衰期短、生物利用度低等缺点,临床使用须频繁给药,易致蓄积性中毒。将其制成缓释制剂,有利于提高疗效及降低毒副作用[3]。查阅文献发现,利用MCF-7及A549细胞培养模型,可检测川芎嗪纳米粒的细胞毒性。细胞摄取试验结果表明,修饰后的主动靶向纳米粒的摄取量、荧光强度均显著高于川芎嗪溶液[4]。为此,本研究中以聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)为载体材料,制备壳寡糖修饰的盐酸川芎嗪缓释微球(COS-LTH-MS)并进行体外评价,旨在为中药抗肿瘤制剂的开发提供实验室数据。现报道如下。

1 仪器、试药与细胞[5]

1.1 仪器

ER-182A型电子分析天平(日本A&D公司);Waters 1525型高效液相色谱仪,含717型自动进样器、2487型紫外检测器、Waters Empower色谱软件(美国Waters公司);Nicolet 5700型傅里叶变换红外光谱仪(美国Thermo公司);85-2型温控磁力搅拌器(江苏金怡仪器科技有限公司);SM-650D型超声波细胞粉碎机(南京贝帝实验仪器有限公司);TM3000型台式扫描电镜(上海辛茨精密仪器有限公司);ZS90型纳米粒径测定仪(厦门亿恩达科技有限公司);Eppendorf 5427型低速离心机(北京欣兴强森生物科技有限公司);Bio-Rad iMark酶标仪(上海麦莎生物科技有限公司);Thermo CO_2培养箱(赛默飞世尔科技<中国>有限公司);TCS SP2型激光共聚焦显微镜(德国Leica公司)。

1.2 试药

盐酸川芎嗪原料药(北京燕京药业有限公司,批号为180605);盐酸川芎嗪对照品(中国食品药品检定研究院,批号为110817-200305,含量98%);聚乙烯醇(PVA,上海五四试剂厂,批号为181022);PLGA(济南岱罡生物工程有限公司,批号为181115);壳寡糖(COS,青岛博智汇力生物科技有限公司,批号为190103);2-(*N*-吗啉)乙磺酸(MES,爱尔兰Megazyme公司,批号为181025);1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC,批号为800107)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS,批号为A1016),均购自美国Sigma公司;RPMI 1640培养基(批号为30030)、胎牛血清(FBS,批号为11012),均购自美国Gibco公司;CCK-8试剂盒(日本同仁化学研究所,批号为CK04);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为双蒸水。

1.3 细胞

人乳腺癌MCF-7细胞株、人肺腺癌A549细胞株,均由美国菌种保藏中心(ATCC)提供。

2 方法与结果

2.1 COS-LTH-MS制备

采用复乳-溶剂挥发法[6]。称取PLGA约200 mg,溶于5 mL乙酸乙酯-二氯甲烷(3∶2,*V*/*V*)的混合溶液中,作为有机相,备用。取盐酸川芎嗪150 mg,精密称定,溶于5 mL水中,取0.5 mL作为内水相,缓慢加入有机相中,冰浴下超声(功率250 W,频率40 Hz,下同)处理形成油包水(*W*/*O*)的初乳,缓慢倾入10 mL的1%PVA溶液中,超声处理10 min形成复乳(*W*/*O*/*W*),倾入15 mL的1%PVA溶液中,磁力搅拌4 h,使有机溶剂挥发,高速离心,收集固化的微球[7],用水洗涤3遍,冷冻干燥[8],得到盐酸川芎嗪微球(LTH-MS),分散于适量MES缓冲液(pH 5.0)中,加入35 mg EDC和15 mg NHS活化,将上述壳寡糖溶液加入上述反应体系中,室温下搅拌48 h,离心分离后冷冻干燥,得COS-LTH-MS[5]。初步检测,该微球表面形态光滑圆整、尺寸可控;载药量达19.05%,包封率为68.16%,体外释放24 h达到平稳状态,累积释放量78.23%,显示出一定的缓释特性。

2.2 微球体外靶向性考察

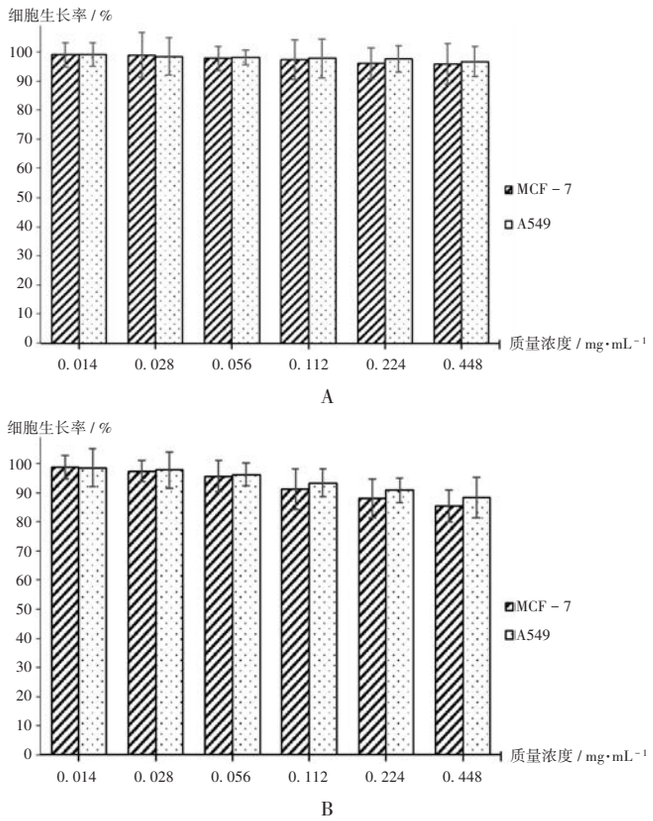
2.2.1 细胞毒性

采用CCK-8法。取对数生长期的MCF-7和A549细胞(1×10^4个),用胰酶消化后进行细胞计数,铺入96孔板中培养。分为实验组[0.014,0.028,0.056,0.112,0.224,0.448 mg/mL的COS-LTH-MS(载药量为20.02%)]、对照组(相应质量浓度的空白微球)及空白组(培养基),各设3个平行孔,进行24 h常规培养[9]。实验当天,换无血清培养液,加1%牛血清蛋白(BSA),各组给予相应微球或培养基处理[5]。作用24 h后,每孔加入10 μL的CCK-8溶液,继续培养4 h后测定其在450 nm波长处的吸光度(*OD*)值[5]。细胞生长率=实验组*OD*值/空白组*OD*值×100%。

给药24 h后,空白微球在给药浓度范围内对MCF-7和A549细胞基本无毒性。当0.056 mg/mL COS-LTH-MS作用24 h后,MCF-7和A549细胞生长率均在95%以上(图1),表明0.056 mg/mL为COS-LTH-MS的细胞低毒性质量浓度。故选择此质量浓度作为后续试验的给药浓度。

2.2.2 细胞内LTH质量浓度

取对数生长期的MCF-7和A549细胞(1×10^6个),分别接种于T75培养瓶中,分为LTH溶液组、LTH-MS组和COS-LTH-MS组,均分别作用1,2,8,12,24 h后,细胞用磷酸盐缓冲液(PBS)洗3次,用胰酶消化细胞,1 000 r/min离心5 min,弃上清,收集细胞并加甲醇100 μL,-80 ℃反复冻融3次,使细胞破碎。高速离心后



A. 对照组　B. 实验组

图 1　细胞毒性试验结果

A. Control group　B. Test group

Fig. 1　Results of the cytotoxicity test

收集上清液，检测细胞内 LTH 含量。

采用高效液相色谱（HPLC）法测定 LTH 含量。色谱条件[10-11]：色谱柱为 Sepax GP－C_{18} 柱（250 mm × 4. 6 mm，5 μm），流动相为水－甲醇（52∶48，*V* / *V*），流速为 1 mL / min，检测波长为 290 mm，柱温为 35 ℃，进样量为 10 μL。LTH 出峰时间约为 9 min，峰形良好，阴性对照无干扰；成功建立 LTH 质量浓度线性方程；精密度、稳定性、重复性试验结果的 *RSD* 均小于 2. 0%；平均加样回收率为 98. 72%，*RSD* 为 1. 04%（n = 9）。

结果表明，随给药时间的延长，A549 细胞和 MCF－7 细胞内药物质量浓度逐渐升高，体现出一定的浓度依赖性。修饰后的微球由于 PLGA 外层包裹壳寡糖，药物须经壳寡糖缓慢降解后释放，给药 12 h 后，细胞内药物质量浓度达到饱和。2 种细胞内 LTH 质量浓度变化情况见表 1 和表 2。可见，经壳寡糖修饰后的微球能将 LTH 更多地靶向肿瘤细胞中，且 MCF－7 较 A549 细胞更明显。

2. 2. 3　细胞对微球的摄取

采用激光共聚焦显微镜观察。取对数生长期的 MCF－7 及 A549 细胞（1 × 10^4 个），分别接种于共聚焦专用培养皿（直径 60 mm），分组同 2. 2. 2 项，分别加药干预 12 h。弃去培养基，PBS 洗涤 3 次。设置发射光波长为 526 nm，激发光波长为 488 nm，置激光共聚焦显微镜下观察。可见 LTH 溶液组自发绿色荧光，COS－LTH－MS 组的荧光强度显著高于 LTH－MS 组和 LTH 组，MCF－7 细胞较 A549 细胞荧光强度更大，详见图 2。推测可能是经修饰的川芎嗪微球与 MCF－7 细胞特定的配体结合，进入靶向部位，使 MCF－7 细胞内荧光较明显。

3　讨论

新型药物载体系统多有缓释性和靶向性的特点，微球也不例外。高分子化合物均有良好的生物相容性和可降解性，PLGA 是应用和研究较广泛的载体材料之一[12]。为提高 LTH 的生物利用度，增强疗效，将其制备成 PLGA 缓释微球。由于川芎嗪是水溶性药物，药物黏附在微球表面，微球在释放介质中溶胀后经孔道释放的速度较快，释放初期药物存在突释，可能导致血药浓度高

表 1　A549 细胞内川芎嗪质量浓度（$\bar{X} \pm s$，μg / mL）

Tab. 1　Mass concentration of ligustrazine in A549 cells（$\bar{X} \pm s$，μg / mL）

组别	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h
LTH 溶液组	1. 45 ± 1. 5	2. 43 ± 2. 71	5. 80 ± 3. 33	6. 49 ± 2. 42	5. 11 ± 1. 01
LTH－MS 组	3. 19 ± 2. 03	6. 58 ± 1. 25	13. 61 ± 2. 26*	20. 92 ± 4. 5**	10. 81 ± 3. 12*
COS－LTH－MS 组	7. 90 ± 1. 64$^{*\#}$	11. 82 ± 2. 46$^{*\#}$	22. 17 ± 2. 76$^{**\#}$	30. 69 ± 3. 63$^{**\#}$	21. 79 ± 3. 64$^{**\#}$

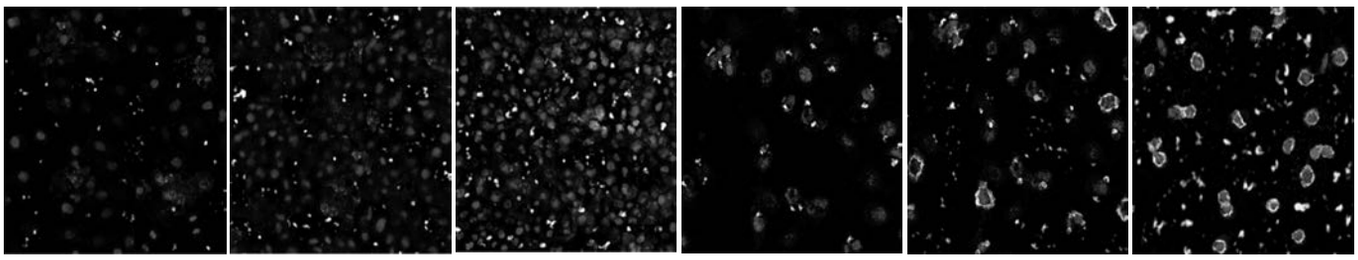
注：与 LTH 溶液组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；与 LTH－MS 组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$。表 2 同。

Note：Compared with those in the LTH solution group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；Compared with those in the LTH－MS group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$（for Tab. 1－2）.

表 2　MCF－7 细胞内盐酸川芎嗪质量浓度（$\bar{X} \pm s$，μg / mL）

Tab. 2　Mass concentration of ligustrazine hydrochloride in MCF－7 cells（$\bar{X} \pm s$，μg / mL）

组别	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h
LTH 溶液组	2. 65 ± 2. 48	4. 54 ± 3. 4	5. 72 ± 2. 53	7. 35 ± 3. 42	5. 15 ± 2. 89
LTH－MS 组	4. 11 ± 2. 02	7. 13 ± 2. 3	19. 93 ± 3. 71**	28. 32 ± 3. 44**	14. 77 ± 3. 21*
COS－LTH－MS 组	11. 50 ± 3. 23$^{*\#}$	18. 38 ± 4. 09$^{*\#}$	34. 52 ± 4. 62$^{**\#\#}$	46. 77 ± 2. 76$^{**\#\#}$	37. 11 ± 4. 87$^{**\#\#}$



A_1 A_2 A_3 B_1 B_2 B_3

A B

A_1, B_1. LTH溶液组 A_2, B_2. LTH－MS组 A_3, B_3. COS－LTH－MS组

A. A549细胞 B. MCF－7细胞

图2 激光共聚焦荧光强度图（×40）

A_1, B_1. LTH solution group A_2, B_2. LTH－MS group A_3, B_3. COS－LTH－MS group

A. A549 cells B. MCF－7 cells

Fig. 2 Fluorescence intensity spectra of laser－scanning confocal microscopy（×40）

于治疗浓度[13]，迫切需要解决。本研究中是采用EDC和NHS活化，将PLGA的羧基端与壳寡糖的游离氨基共价连接，制得壳寡糖修饰的盐酸川芎嗪PLGA微球[5]。体外释药实验表明，修饰后的微球由于PLGA外层包裹壳寡糖，药物须经壳寡糖缓慢降解后释放，突释效应减小，为水溶性中药缓释制剂的研究提供了参考[5]。

壳寡糖为带正电荷的阳离子碱性低聚糖，具有吸收能力强、生物活性高等优点，同时具备调节免疫、抗肿瘤等生理活性[14－15]。由于其相对分子质量小，易进入细胞，负载的药物可通过受体结合机制和静电吸附作用转移到肿瘤细胞中，从而增加细胞内药物浓度，增强抗肿瘤作用。体外细胞试验也证实，修饰微球的摄入量明显优于未修饰微球，说明壳寡糖修饰微球对肿瘤细胞具有更强的靶向性。未经修饰的微球缺少主动靶向性，在体外细胞试验中其作用明显低于盐酸川芎嗪原料药，推测可能是因有特定的配体与靶细胞的受体结合，细胞表面凹陷，形成内涵体，内涵体在细胞内酸化破裂而释药，或因细胞摄取机制等原因，改变未经修饰的微球在体内的自然分布，从而到达特定的靶向部位，亦可将药物修饰成前体药物，在药理学惰性物质的活性部位被激活，特别是靶功能被激活发挥作用，但明确的机制还有待进一步研究[5]，下一步还将进行体内实验，并考察其在体内的组织分布等情况。制备盐酸川芎嗪靶向微球，可提高肿瘤细胞内药物质量浓度，减缓释放速度，增强靶向作用，应用于抗肿瘤前景良好。

参考文献

[1] 林运鹏，刘阿倩，杜小朋，等. 川芎嗪诱导肺癌细胞凋亡及其机制研究[J]. 临床和试验医学杂志，2018，17(18)：1921－1925.

[2] CAO J，MIAO Q，MIAO S，et al. Tetramethylpyrazine exertsantitumor effects by inducing apoptosis and autophagy inhepatocellular carcinoma[J]. Int Immunopharmacol，2015，26(1)：212－220.

[3] 朱艳华，王兴刚，李冰菲. 盐酸川芎嗪制剂研究综述[J]. 中国药业，2015，24(3)：95－96.

[4] 程荔春. 叶酸壳聚糖川芎嗪纳米粒的制备及体外靶向性研究[D]. 大连：大连医科大学，2012.

[5] 吴铄珺. 壳寡糖修饰的盐酸川芎嗪PLGA微球的制备及体外评价研究[D]. 南京：南京中医药大学，2019.

[6] 冼文娇，王雪儿，张 琳. 聚乳酸－羟基乙酸共聚物载肝细胞生长因子纳米粒的构建及生物学活性评价[J]. 南方医科大学学报，2018，38(12)：217－223.

[7] 王 丽. 磷酸川芎嗪制剂研究进展[J]. 科学技术创新，2018，11(27)：46－47.

[8] 何晋浙，姚丽娜，孙培龙. 响应面试验优化猴头菌素－PLGA微球制备工艺及其体外释药性能[J]. 食品科学，2017，38(6)：242－244.

[9] 胡振夏. 叶酸壳寡糖修饰的纳米粒作为抗肿瘤载体的研究[D]. 武汉：湖北中医药大学，2012.

[10] 孙丹丹，王志国，焦 玥，等. 盐酸川芎嗪在冷冻干燥工艺中的稳定性研究[J]. 药物评价研究，2018，41(1)：100－102.

[11] 林乐珍，赵凯丽，杜 坤，等. 高效液相色谱法测定罗汉松种子挥发油中川芎嗪含量[J]. 中国药业，2019，28(19)：30－32.

[12] 宋效庆，刘 红，陈天杰，等. 淫羊藿苷/载明胶纳米复合物－PLGA缓释系统的制备及工艺优化[J]. 吉林大学学报(医学版)，2018，44(6)：438－443.

[13] WANG TT，ZHANG CY，ZHONG W，et al. Modification of Three－Phase Drug Release Mode of Octreotide PLGA Microspheres by Microsphere－Gel Composite System [J]. AAPS Pharm Sci Tech，2019，20(6)：1－14.

[14] 梁慧培，覃小丽，钟金锋. 壳寡糖制备和生理活性的研究进展[J]. 食品工业科技，2016，37(3)：383－388.

[15] MATTAVEEWONG T，WONGKRASANT P，CHANCHAI S，et al. Chitosan oligosaccharide suppresses tumor progression in a mouse model of colitis－associated colorectal cancer through AMPK activation and suppression of NF－κB and mTOR signaling[J]. Carbohydrate Polymers，2016，145：30－36.

（收稿日期：2021－08－04；修回日期：2022－02－22）