

丁酸前药BBA纳米晶的构建及其对结肠癌细胞的抑制作用

林燕¹, 兰华琪¹, 吕诺男¹, 熊梦佳¹, 王诚棣¹, 吴越¹, 孙小端², 杜兴杰³, 刘中兵¹, 钟志容¹

1. 西南医科大学药学院(泸州 646000); 2. 西南医科大学附属医院药学部(泸州 646000); 3. 西南医科大学附属医院中药部(泸州 646000)

【摘要】目的 本研究将丁酸与5-氨基水杨酸(5-aminosalicylic acid, 5-ASA)通过化学反应合成2-丁酰氧基-5-丁酰胺基苯甲酸(2-butyloxy-5-butylaminobenzoic acid, BBA), 作为治疗结肠癌的前体药物, 利用纳米技术制备BBA纳米晶缓释制剂, 并探讨BBA纳米晶对结肠癌细胞的抑制作用。**方法** 采用溶剂反溶剂沉淀法制备BBA纳米晶, 通过核磁共振扫描、红外光谱仪和透射电镜等进行物理化学表征; 使用高效液相色谱法检测含量; 并通过MTT实验检测不同浓度的BBA、BBA纳米晶、空白纳米晶、5-氟尿嘧啶、5-氨基水杨酸和丁酸钠与结肠癌细胞SW620共同孵育24、48、72 h后细胞的存活率, 以探索BBA纳米晶对结肠癌细胞SW620的抑制效果。**结果** 本实验成功制备了BBA纳米晶。MTT结果显示, 作用时间为24 h时, 各个浓度条件下BBA纳米晶与BBA对结肠癌细胞SW620的抑制率较低, 两组间差异无统计学意义($P > 0.05$); 作用时间分别为48 h和72 h, 药物浓度为30 μm 和40 μm 时, BBA纳米晶对结肠癌细胞SW620的体外抑制效果低于阳性对照5-氟尿嘧啶组, 但明显优于其余各同浓度给药组; BBA纳米晶与BBA, 两组间比较对结肠癌细胞SW620的抑制率差异有统计学意义($P < 0.05$), 从而表明BBA纳米晶具有缓释性, 并对结肠癌细胞SW620有较好的抑制作用。**结论** 本研究成功制备了丁酸前药BBA纳米晶, 并证明了该新型药物制剂对结肠癌细胞具有抑制作用, 这一结果将为结肠癌的临床治疗提供新的思路和方法。

【关键词】 结肠癌; 丁酸; 5-氨基水杨酸; 纳米晶

【中图分类号】 R943

文献标志码 A

DOI: 10.3969/j.issn.2096-3351.2024.02.006

Construction of BBA nanocrystals and its inhibitory effect on colon cancer cells

LIN Yan¹, LAN Huaqi¹, LV Nuonan¹, XIONG Mengjia¹, WANG Chengzhi¹, WU Yue¹, SUN Xiaoduan², DU Xingjie³,
LIU Zhongbing¹, ZHONG Zhirong¹

1. School of Pharmacy, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 2. Department of Pharmacy, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 3. Department of Pharmacy, The Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China

【Abstract】Objective In this study, 2-butyloxy-5-butylaminobenzoic acid (BBA) was synthesized with butyric acid and 5-aminosalicylic acid, which can be used as the prodrug for the treatment of colon cancer. The sustained-release preparation of BBA nanocrystals expected with good targeting and high bioavailability was prepared by using nanotechnology, which could effectively solve the problems of antitumor drug solubility and pharmaceutical properties. **Methods** BBA nanocrystals were prepared by solvent-antisolvent precipitation, and were characterized by NMR scanning, infrared spectrometer and transmission electron microscopy. High-performance liquid chromatography (HPLC) was used to detect the content of BBA. The cell viability of SW620 cells treated with different concentrations of BBA, BBA nanocrystals, blank nanocrystals, 5-fluorouracil (5-FU), 5-aminosalicylic acid (5-ASA) and sodium butyrate (NaB) were detected by MTT assay. **Results** BBA nanocrystals were successfully prepared. MTT results showed that the *in vitro* inhibitory effect of BBA nanocrystals on colon cancer cells of SW620 was slightly lower than that of the positive control group of 5-FU ($P > 0.05$), but was similar to the other groups at the same concentration, indicating that BBA nanocrystals showed desire inhibitory effect on colon cancer cells SW620 *in vitro* ($P < 0.05$). **Conclusion** In the present study, we successfully prepared the nanocrystals of BBA as the pro-drug of butyric, which proved that the new drug preparation showed an inhibitory effect on colon cancer cells, and might provide an extremely significant new idea and original approach for the clinical treatment of colon cancer.

【Key words】 Colon cancer; Butyric acid; 5-Aminosalicylic acid; Nanocrystals

结肠癌是最常见的消化道恶性肿瘤,国内的一项流行病学数据显示,结肠癌的发病率跃居世界第3位,已成为危害人类健康的重要疾病^[1-4]。化学治疗在其

防治过程中占有重要地位,但目前临床治疗结肠癌的常规药物易产生耐药性,缓释效果差,缺乏靶向特异性,生物利用度低,在杀伤肿瘤细胞的同时也对正常细

基金项目: 四川省科技厅项目(2022YFS0627, 2022YFS0188); 泸州市科技计划项目(2023JYJ023); 大学生创新创业训练计划(202310632075, 202210632003); 教育部“春晖计划”合作科研项目(202200618)

通信作者: 钟志容, E-mail: zhongzhirong@126.com

引用本文: 林燕, 兰华琪, 吕诺男, 等. 丁酸前药BBA纳米晶的构建及其对结肠癌细胞的抑制作用[J]. 西南医科大学学报, 2024, 47(2): 123-129.

DOI: 10.3969/j.issn.2096-3351.2024.02.006

胞产生毒性^[5],例如紫杉醇、姜黄素等存在溶解性差、非特异性分布导致生物利用度低、不良反应大,在制剂开发中受到限制^[6-7]。因此,构建新型递药系统是解决目前临床治疗结肠癌问题的有效途径^[8],开发新型的靶向治疗结肠癌缓控释药物具有重要的社会效益和经济效益。肿瘤的发生发展往往伴随着炎症的发生,本项目拟制备丁酸与5-氨基水杨酸前体药物,2-丁酰氧基-5-丁酰胺基苯甲酸(2-butyl oxide-5-butylaminobenzoic acid, BBA),利用纳米沉淀法制备 BBA 纳米晶缓控释制剂。前体药物 BBA 在结肠肿瘤部位的酸性条件下水解,生成的丁酸和5-氨基水杨酸分别发挥抗癌和抗炎双重疗效;同时,利用纳米晶所具有的“缓释长效、靶向性好、生物利用度高”等诸多优势,可有效解决 BBA 溶解性、成药性等难题;抗癌和抗炎二者双管齐下,以期实现对结肠癌安全有效的治疗。

1 材料与仪器

1.1 实验试剂

5-氨基水杨酸(上海易恩化学技术有限公司);丁酰氯(济南万得丰环保科技有限公司);丁酸酐(上海凯茵化工有限公司);10% Gibco 胎牛血清,0.25% 胰蛋白酶,1% 青霉素-链霉素(成都市科隆化学品有限公司)。

1.2 实验仪器

旋转蒸发仪(上海耀特仪器设备有限公司);真空干燥仪(江苏天宸干燥工程有限公司);电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司);400 M 核磁共振波谱仪(瑞士 Bruker 公司);Metabo GE 700 超声仪(巩义市予华仪器公司);傅立叶红外光谱仪(岛津科技有限公司);磁力搅拌器(济南欧莱博技术有限公司);LC-2030 型高效液相色谱仪(SHIMADZU 岛津);DG3022 酶标仪(常州市中贝仪器有限公司)。

2 方法

2.1 BBA 纳米晶的制备

2.1.1 合成5-丁酰胺基-水杨酸 5-丁酰胺基-水杨酸的合成参照文献报道进行^[9]:称取0.4 g(1.3 mmol)5-氨基水杨酸置于25 mL 单口圆底烧瓶中,加入8 mL 饱和碳酸氢钠溶液搅拌溶解,在4 °C 的冰水条件下冰浴10 min,用移液枪缓慢滴加配好的含有丁酰氯0.13 mL 的丙酮溶液4 mL。滴加完毕后,于25 °C 恒温水浴的环境中磁力搅拌4 h使其均匀反应。反应完全后,在旋转蒸发仪上50 °C 90 r/min 旋蒸除去烧瓶中的丙酮和多余水分,在蒸发后得到的红棕色粘稠状液体中加入1 mL 浓盐酸进行酸化,进行抽滤后,得到深巧克力色的沉淀,最后在真空干燥箱中40 °C 干燥36 h后得到第一步的产物5-丁酰胺基-水杨酸。

2.1.2 合成BBA 于干燥洁净的25 mL 圆底烧瓶中加入

第一步所得产物5-丁酰胺基-水杨酸0.32 g(1.09 mmol)和6 mL 的丁酸酐,一边振摇一边缓慢滴加2滴浓硫酸,振摇圆底烧瓶至固体物质充分溶解。然后用磁力搅拌器水浴加热,将水浴温度控制在75 °C ~ 85 °C 之间,反应4 h后撤去水浴装置。将烧瓶中的反应液移入事先盛装100 mL 冰水的烧杯中,用洁净的玻璃杯搅拌10 min,放置3 h。待烧杯中的液体完全分层后,用移液枪吸出下层水层,于杯口覆盖适当大小的滤纸在真空干燥箱中以40 °C 的真空干燥条件干燥48 h后得到第二步产物BBA。

2.1.3 BBA 的 NMR 分析 将适量的 BBA 溶解在装有650 μ L 的 DMSO 核磁管内,放入核磁共振仪,对其进行 ¹H NMR 和 ¹³C-NMR 图谱分析。

2.1.4 BBA 纳米晶制备 本研究采用溶剂反溶剂沉淀法制备 BBA 纳米晶:3 mg BBA 连同稳定剂(3.7 mg 维生素 E 聚乙二醇琥珀酸酯和 7.5 mg 枸橼酸)加入 3 mL 乙醇中完全溶解,设置温度为 40 °C,于旋转蒸发仪上蒸干溶液,产物成膜,附着于烧瓶内壁,加入 3.5 mL 30 mM NaHCO₃ 溶液,再于探头超声仪上冰水浴探头超声 5 min(80 w, 1 s),即得 BBA 纳米晶混悬液。

2.2 BBA 纳米晶制剂的表征

2.2.1 透射电镜扫描 将调整至适宜浓度的 BBA 纳米晶混悬液滴加在透射电镜专用的铜网上,以浓度为 2% 的磷钨酸溶液对样品进行负染,在室温条件下自然挥干液体后再用透射电镜在加速电压为 80 kV 下观察纳米晶体的形态。

2.2.2 红外光谱扫描 将 BBA、BBA 纳米晶和空白纳米晶三种冻干粉各 3 mg 样品与 100 mg 的 KBr 晶体在干燥状态下于玛瑙研钵里混合研磨,然后将混合粉末用液压机压片,在 12 MPa 压力下停留 15 s 将混合粉末样品压制成厚度为 1 mm 左右的均匀半透明 KBr 薄片后放入红外光谱仪测定。

2.3 BBA 纳米晶含量测定

2.3.1 高效液相色谱法检测 本实验采用高效液相色谱法(HPLC)测定 BBA 含量。色谱柱:Agilent ZORBAXSB-C18 柱(4.6*250 mm, 5 μ m);流动相:乙腈/乙酸(0.1 mol/L, 50:50);检测波长:240 nm;流速:1 mL/min;柱温:30 °C;进样量:20 μ L。

2.3.2 检测波长的确定 精密称取 5 mg BBA,置于 50 mL 的容量瓶中,加入 HPLC 级甲醇使其完全溶解后定容,得到 BBA 储备液(100 μ g/mL)。量取 BBA 储备液少量,用 HPLC 级甲醇稀释至适宜浓度,以 HPLC 级甲醇作为空白对照,用紫外分光光度计在 200 nm ~ 700 nm 波长范围内对样品进行扫描,以确定 BBA 样品的最大吸收波长。

2.3.3 HPLC 方法学考察

2.3.3.1 专属性考察 精密称取 BBA 适量,用 HPLC 级

甲醇将其溶解并配制成适宜浓度的溶液,用0.22 μm 微孔滤膜过滤后加入进样瓶。取空白纳米晶和载药纳米晶0.5 mg,分别加入1 mL的HPLC级甲醇溶液,水浴超声30 min后在涡旋仪器上混合5 min,再在4 000 $\times\text{g}$ 条件下离心4 min进行破乳处理后,用移液枪小心吸取EP管内的上层清液置于5 mL容量瓶中,加入HPLC级甲醇定容,即得BBA纳米晶和空白纳米晶破乳液,以0.22 μm 微孔滤膜过滤。取上述三种溶液样品按2.3.1项含量测定方法测定样品的高效液相色谱图并记录。

2.3.3.2 线性关系考察 精密称取BBA 100 mg,置于200 mL容量瓶中,用HPLC级甲醇稀释定容,制得0.5 mg/mL的BBA母液。取母液0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、12、25 mL,分别置于25 mL容量瓶中,用HPLC级甲醇稀释定容,摇匀,配制成10、20、40、60、80、100、120、140、160、180、240、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的BBA溶液。按2.3.1项下色谱条件进样,记录样品的吸收峰面积并绘制标准曲线。

2.3.3.3 精密度实验 日内精密度试验:精密量取适宜体积的BBA储备液置于5 mL容量瓶中,以HPLC级甲醇定容,配制成低、中、高浓度分别为18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、36 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、54 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的不同浓度BBA溶液各3份。在4 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中储存,按2.3.1项色谱条件在一天中5个不同的时间点进样测定,每一个时间点测3次求平均值记录峰面积。

日间精密度试验:精密量取适宜体积的BBA储备液于5 mL容量瓶中,以HPLC级甲醇定容,配制成高、中、低浓度分别为437 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、184 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、101.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的BBA溶液各3份。在4 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中储存,按2.3.1项色谱条件在连续5 d相同的时间点进样测定,每一个时间点测3次求平均值记录峰面积。

2.3.3.4 重复性考察 制备BBA纳米晶混悬液1 mL,加4 mL的HPLC级甲醇溶液,涡旋5 min,在4 000 $\times\text{g}$ 条件下离心4 min进行破乳处理后,用移液枪小心吸取EP管内上层液体于5 mL的容量瓶后再次加入HPLC级甲醇定容至刻度线,从中量取相同体积的6份样品,分别再用HPLC级甲醇稀释至适宜浓度,用0.22 μm 微孔滤膜过滤刚配制的相同体积6份样品,按2.3.1项色谱条件测定6份滤液样品中的BBA的含量,每份测定3次求平均峰面积并记录。

2.3.3.5 回收率测定 精密量取2 mg BBA于10 mL容量瓶中,加入4 mg空白纳米晶混悬,用HPLC级甲醇定容至10 mL,进行纳米晶的破乳处理(涡旋5 min,4 000 $\times\text{g}$ 离心4 min,取离心后的上层清液配制成浓度为680 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、340 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、68 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液各3份),按2.3.1项色谱条件高效液相色谱进行回收率的进样检测,每个浓度测量3次,求平均峰面积并记录。

2.4 BBA纳米晶的体外研究

2.4.1 细胞培养 本实验采用小鼠结肠癌细胞系SW620,用含10%的Gibco胎牛血清(FBS)和1%青霉素-链霉素配制的DMEM培养液,于温度为37 $^{\circ}\text{C}$ 、浓度为5%的 CO_2 气体环境下进行常规细胞培养。实验时取生长状态良好的SW620结肠癌细胞,用0.25%的胰蛋白酶消化SW620结肠癌细胞,调整成适宜浓度以作备用。

2.4.2 MTT实验 本实验采用MTT[3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑鎓溴化物]法检测细胞活性,测定步骤为:

①接种SW620结肠癌细胞:用胰酶消化生长良好的SW620结肠癌细胞后,加入空白培养液停止消化,离心后倒掉管中液体,再加入适量的DMEM培养液充分混匀SW620结肠癌细胞,将管内细胞浓度调整为 4×10^4 cells/mL,用移液枪在96孔细胞培养板中每孔接种100 μL 的配置好的混悬液,并在上下两排加入无细胞的PBS作为空白细胞对照孔;

②SW620结肠癌细胞的培养:待细胞在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%浓度的 CO_2 和饱和湿度条件下孵育良好后,在接种了SW620结肠癌细胞的96孔板中加入不同浓度的BBA、BBA纳米晶和空白纳米晶(每种药物每个浓度组设五复孔)并放入 CO_2 孵箱中继续孵育培养;

③MTT试剂的显色:分别在24、48和72h时间点,每孔加入MTT液(4 mg/mL)20 μL ,取出后小心吸弃孔内的MTT培养液,每孔加入100 μL DMSO,振荡10 min,使结晶充分溶解;

④比色:将结晶充分溶解后的96孔细胞培养板在DG3022酶联仪上于570 nm处检测吸光度(OD570),重复测定3次并记录求平均值。

⑤细胞存活率计算:将所选适宜相同浓度的5-氟尿嘧啶(5-FU)、丁酸钠(NaB)、5-氨基水杨酸(5-ASA)、BBA、BBA纳米晶、空白纳米晶溶液共同孵育24 h、48 h、72 h后(其中5-FU作为阳性对照)通过MTT检测SW620细胞与制剂在孵育不同时间段后的细胞存活率。

由测得的吸光度值计算细胞存活率,计算公式为:细胞存活率(Cell Viability, %)= $[A(\text{加药}) - A(\text{空白})] / [A(0\text{加药}) - A(\text{空白})] \times 100$ 。

3 结果

3.1 BBA合成产物的核磁共振扫描结果

3.1.1 中间产物2-羟基-5-丁酰胺苯甲酸 如图1所示,第一步产物2-羟基-5-丁酰胺苯甲酸的核磁共振氢谱和碳谱显示核磁共振氢谱中(g)处出现了化学位移为9.84的单峰,则表明了酰胺的存在,即生成了第一步产物2-羟基-5-丁酰胺苯甲酸。

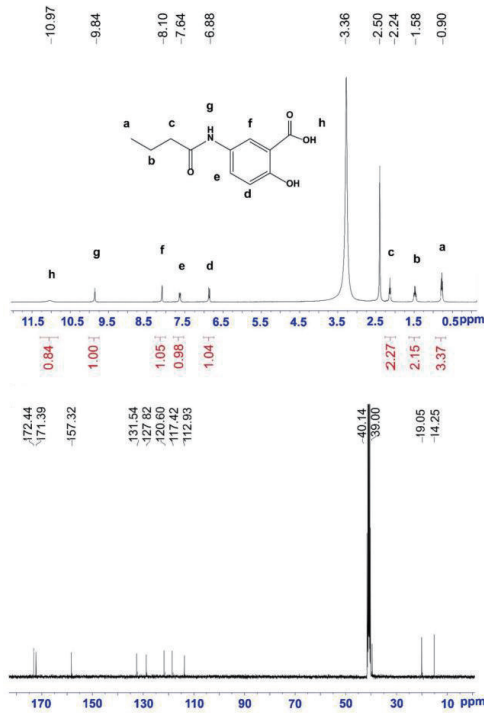


图1 2-羟基-5-丁酰胺苯甲酸的结构表征

Figure 1 Structural characterization of 2-hydroxy-5-butylamidebenzoic acid
注:A:核磁共振氢谱;B:核磁共振碳谱。

3.1.2 2-丁酰氧基-5-丁酰胺基苯甲酸 图2显示了第二步产物BBA样品的核磁共振氢谱,相比于第一步产物2-羟基-5-丁酰胺苯甲酸核磁共振氢谱,在0.95位移处出现了三重峰裂分的甲基峰,在1.7化学位移处出现了多重峰的亚甲基,在2.54位移处出现了三重峰的亚甲基,说明在第一步合成的基础上完成了羟基的酯化,合成了第二步产物BBA。

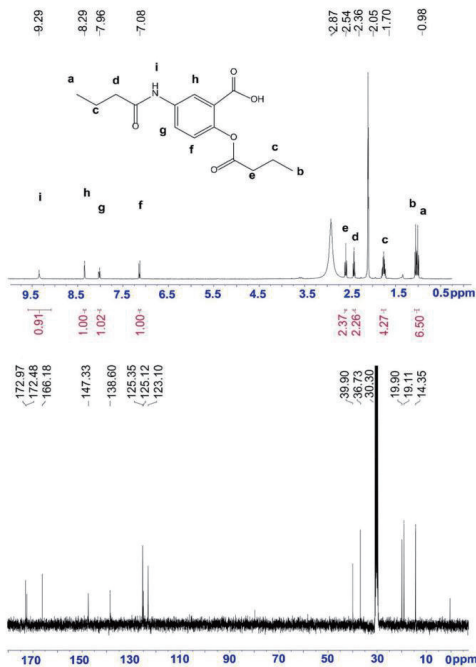


图2 BBA的结构表征

Figure 2 Structural characterization of BBA
注:A:核磁共振氢谱;B:核磁共振碳谱。

3.2 透射电镜扫描结果

透射电镜扫描结果如图3所示,纳米晶呈现不规则形状,可以看出多数BBA纳米晶的粒径在70 nm ~ 150 nm,粒径分布均匀,与测定的粒径范围相符。

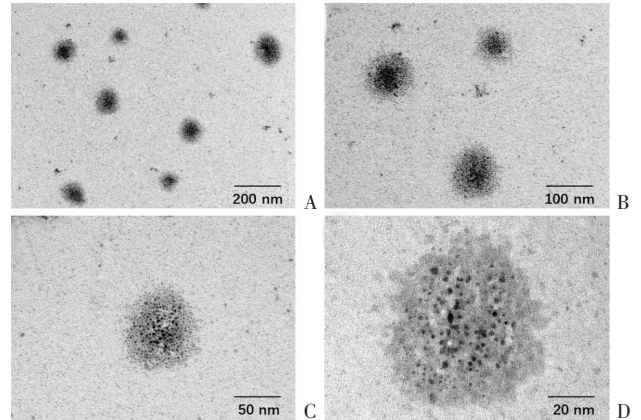


图3 透射电镜检测BBA纳米晶的形貌结构

Figure 3 morphology detection of BBA nanocrystals by transmission electron microscopy

注:A:标尺长度为200 nm;B:标尺长度为100 nm;C:标尺长度为50 nm;D:标尺长度为20 nm。加速电压为80 kV。

3.3 红外扫描结果

如图4所示,BBA的酰胺键在 $3300 \cdot \text{cm}^{-1}$ 附近处有明显凸起的特征峰,苯环在 $1633 \cdot \text{cm}^{-1}$ 附近处有经平滑处理后呈现出较宽的特征峰;BBA样品的部分特征峰在空白纳米晶和载药纳米晶的红外光谱中明显减弱甚至消失,如 $3300 \cdot \text{cm}^{-1}$ 附近可以明显看出BBA结构中酰胺键的N-H键伸缩振动峰减弱,可以由此判断BBA被包入了纳米晶。

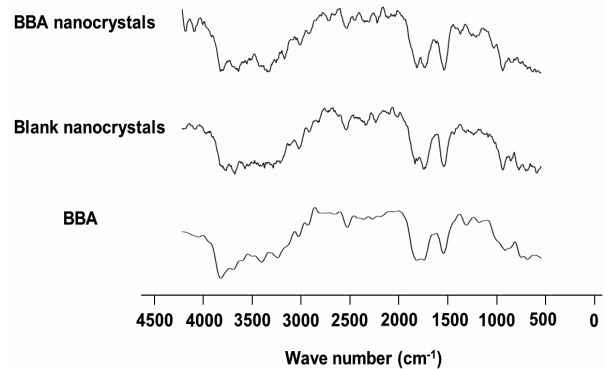


图4 BBA、BBA纳米晶和空白纳米晶的红外光谱图

Figure 4 Infrared spectroscopy of BBA, BBA nanocrystals, and blank nanocrystals

3.4 HPLC 检测方法验证

3.4.1 检测波长的确认 通过紫外分光光度计对BBA溶液进行全波长扫描,最终选择240 nm作为BBA最佳适用UV检测波长,检测的灵敏度为0.01 AUFS。

3.4.2 专属性考察 专属性实验结果如图5所示,BBA在2.3.1项下色谱条件的保留时间为6.4 min,BBA纳米晶的破乳液保留时间为6.37 min,空白纳米晶的破乳液

在6.4 min左右处没有明显的吸收峰,故空白纳米晶在2.3.1项色谱条件不会对BBA的测定造成干扰,证明该色谱条件完全满足BBA的体外含量测定的要求。

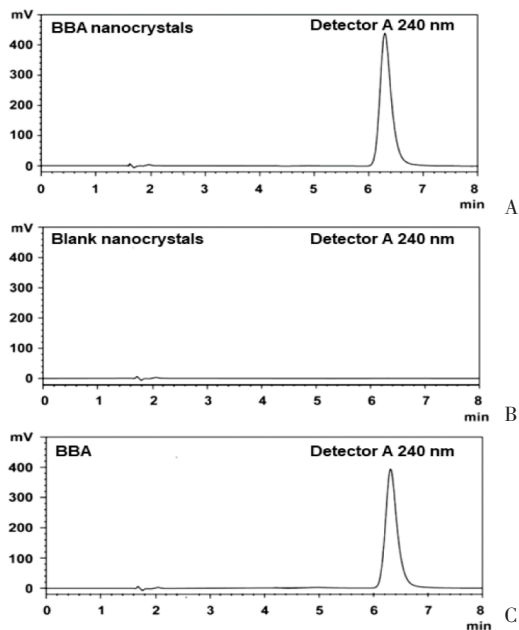


图5 高效液相色谱图

Figure 5 Liquid chromatography

注:A:BBA;B:空白纳米晶;C:BBA纳米晶。

3.4.3 标准曲线的绘制 按2.3.1项色谱条件进样测定,以所测得的BBA峰面积(X)对浓度(Y)进行线性回归,得到标准曲线的回归方程为: $y = 48265x + 2 \times 10^6$ ($R^2 = 0.9966$)。表明BBA在浓度1 $\mu\text{g/mL}$ ~ 500 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内线性关系良好,见图6。

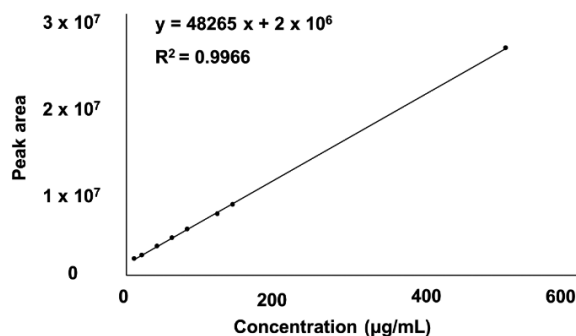


图6 BBA标准浓度曲线

Figure 6 BBA standard concentration curve

3.4.4 精密度、重复性、回收率考察

3.4.4.1 日内精密度 按2.3.1项色谱条件下进样检测,测得样品峰面积如表1所示。根据峰面积计算出BBA溶液低浓度的日内标准偏差为0.33%,中浓度的日内标准偏差为0.15%,高浓度的日内标准偏差为0.13%,均小于1.5%,表明该方法日内精密度良好,符合限度要求。

表1 日内精密度考察结果表($n = 5$)

Table 1 Intraday precision test results($n = 5$)

| Con ($\mu\text{g/mL}$) | Peak area | | | | | Mean \pm SD | RSD(%) |
|--------------------------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|-------------------------------|--------|
| 36 | 2 776 440 | 2 776 439 | 2 401 360 | 24 219 120 | 3 574 247 | 2 790 080.20 \pm 424 721.20 | 0.15 |
| 18 | 1 289 380 | 1 991 585 | 2 354 125 | 3 438 002 | 3 367 987 | 2 488 215.60 \pm 821 939.10 | 0.33 |
| 54 | 4 046 995 | 2 860 870 | 3 053 050 | 3 928 842 | 3 632 595 | 3 504 470.00 \pm 470 923.80 | 0.13 |

3.4.4.2 日间精密度 同理,日间精密度实验中,不同时间点BBA溶液进样测得峰面积,结果如表2所示,根据峰面积计算BBA溶液,低浓度的样品测定结果的日间标准偏差为0.41%,中浓度的样品测定结果的日间标

准偏差为0.62%,高浓度的样品测定结果的日间标准偏差为0.31%,均小于1.5%,表明该方法日间精密度良好,符合分析要求。

表2 日间精密度考察结果表($n = 5$)

Table 2 Daytime precision test results ($n = 5$)

| Con ($\mu\text{g/mL}$) | Peak area | | | | | Mean \pm SD | RSD (%) |
|--------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------------------------------|---------|
| 437 | 45 435 959 | 51 703 765 | 31 999 307 | 24 905 588 | 24 615 539 | 35 732 031.60 \pm 10 990 759.70 | 0.31 |
| 184 | 17 064 001 | 36 366 274 | 13 442 729 | 9 307 245 | 7 667 464 | 16 769 542.60 \pm 10 331 698.80 | 0.62 |
| 101.7 | 11 494 837 | 14 718 936 | 7 431 451 | 5 521 218 | 5 456 264 | 8 924 541.20 \pm 3 633 794.30 | 0.41 |

3.4.4.3 重复性 按2.3.1项色谱条件测得样品峰面积数据如表3所示,通过计算,峰面积的RSD为0.14%,表

明该色谱方法重复性良好。

表3 重复性考察结果表

Table 3 Repetitive investigation results

| Con ($\mu\text{g/mL}$) | Peak area | | | | | Mean \pm SD | RSD (%) | |
|--------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------------|-------------------------------|------|
| 36.31 | 2 652 763 | 2 873 338 | 2 142 773 | 2 283 904 | 1 870 420 | 2 518 437 | 2 390 272.50 \pm 332 038.30 | 0.14 |

3.4.4.4 加样回收率 按2.3.1项色谱条件对样品进样检测,每个浓度同法测定3次,计算平均峰面积并记录。计算其含量及回收率。实验结果如表4所示。高中低3个浓度的BBA平均回收率均在99.0%~101%,RSD小于1.5%,证明该方法满足测定要求。

表4 加样回收率考察结果

| Con ($\mu\text{g/mL}$) | Found ($\mu\text{g/mL}$) | Recovery(%) | Mean \pm SD | RSD (%) |
|--------------------------|----------------------------|-------------|-------------------|---------|
| 415 | 414.22 | 99.81 | 100.07 \pm 0.24 | 0.28 |
| | 414.54 | 99.89 | | |
| | 416.35 | 100.32 | | |
| 196.5 | 196.76 | 100.13 | 99.93 \pm 0.27 | 0.39 |
| | 195.23 | 99.35 | | |
| | 195.96 | 99.72 | | |
| 19.65 | 19.58 | 99.69 | 99.92 \pm 0.99 | 0.76 |
| | 19.41 | 98.79 | | |
| | 19.71 | 100.31 | | |

注:实验测得BBA纳米晶的封装率为85% \pm 1%。

3.5 BBA纳米晶对结肠癌细胞的抑制作用

如图7A所示,作用时间为24 h时,在考察的各个浓度条件下BBA纳米晶与BBA对结肠癌细胞SW620的抑制率较低,两组间无明显差异($P > 0.05$)。作用时间分别为48 h(图7B)和72 h(图7C),药物浓度为30 μm 和40 μm 时,BBA纳米晶对结肠癌细胞SW620的体外抑制效果虽然低于同浓度阳性对照组5-FU,但明显优于其余各同浓度给药组(图7D);BBA纳米晶与BBA,两组间显示出有差异($P < 0.05$),表明BBA纳米晶对结肠癌细胞SW620有较好的抑制作用。不同浓度的3种制剂与SW620结肠癌细胞孵育48 h后(图7B),30 μM 的BBA组SW620结肠癌细胞的存活率为58.52%,同浓度的BBA纳米晶组的SW620结肠癌细胞存活率为49.32%,BBA纳米晶能使SW620结肠癌细胞存活率明显降低,说明BBA纳米晶对SW620结肠癌细胞的抑制生长作用较强。作用时间为72 h时(图7C),结果与作用48 h趋势一致。综上,本实验制备的BBA纳米晶在较长时间内对癌细胞SW620具有较好的体外抑制活性。

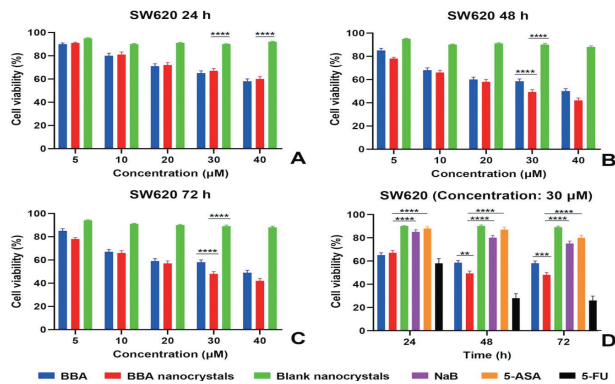


图7 BBA纳米晶的细胞增殖抑制实验

Figure 7 Cell proliferation inhibition of BBA nanocrystals

注:A:24 h;B 48 h;C:72 h;D:各组溶液浓度为30 μM 。

4 讨论

结肠癌的发病率和致死率极高,严重威胁着人们的生命健康。传统治疗结肠癌的药物缓释效果不佳且缺乏靶向性,本课题开发了一种新型的缓控释制剂以改善结肠癌治疗效果。流行病学资料显示,高膳食纤维饮食可以预防或减少结肠癌的发生。目前认为,是丁酸介导了这种保护机制。丁酸是膳食纤维经结肠内菌群酵解产生的一类短链脂肪酸,不仅对维持结肠上皮细胞正常增殖和更新有极其重要的作用^[10-11],而且具有明显的抗结肠癌作用^[12-15]。丁酸治疗结肠癌的作用机制比较复杂,主要包括:①丁酸作为组蛋白去乙酰化抑制剂,促进组蛋白高乙酰化,降低DNA转录活性,抑制结肠癌细胞增殖;②丁酸作为良好的细胞分化诱导剂,明显增强结肠癌细胞的分化诱导,改善细胞的恶性生物学行为,降低癌细胞的恶性程度^[16-17];③丁酸诱导结肠癌细胞凋亡^[18];④抑制结肠癌细胞的浸润性;⑤丁酸抑制炎症产生^[19]。

但由于丁酸带有难闻的气味,味先辣后甜,人体内丁酸的血清半衰期仅6 min,丁酸较差的药代动力学特征和狭窄的安全剂量限制了它以传统的剂型在各种疾病治疗中的应用。同时,丁酸具有弱酸性,对人体有腐蚀性,不能直接服用,既亲水又亲脂,容易挥发。此外,据研究证明,丁酸在治疗时临床疗效差主要是由于代谢太快。为了克服这些缺点,丁酸的新型前体药物受到研究者的关注。另外,有研究显示,将5-氨基水杨酸(5-ASA)用于治疗结肠癌伴随的炎症反应,通过抑制NF- κB 及清除自由基而发挥抗癌作用^[20]。因此,为了克服这些缺点,本课题组制备了丁酸与5-氨基水杨酸前体药物,即BBA,可在结肠肿瘤部位的酸性条件下水解,生成的丁酸和5-氨基水杨酸分别发挥抗癌和抗炎双重疗效,更好地达到了抑制肿瘤生长的目的。

将BBA制备成药物纳米晶,可增大其溶出速率和饱和溶解度。根据Noyes-Whitney和Freundlich-Ostwald方程,当药物的粒径减少到纳米级别时,由于其表面积的增加,其溶出速率和饱和溶解度也随之增大^[21]。纳米晶通过减小药物的粒径,从而使药物对胃肠道黏膜具有一定的黏附性,延长药物在胃肠道内的滞留时间,增加了胃肠道对药物的吸收,进而达到缓释长效的作用,同时提高了药物的生物利用度^[22-25]。随着对纳米晶研究的不断深入,其在生物医学领域的应用前景也正逐步展现。本研究中,BBA纳米晶缓释制剂的制备,将纳米技术和晶型研究进行有机结合,提供了一种安全、稳定和高效的新型给药策略,能够提高BBA的溶出,预期将增强BBA缓释和靶向作用,丰富其给药途径,对于提高BBA成药性具有良好的促进作用^[26]。

本研究对HPLC检测BBA的色谱条件专属性、精密度、重复性、回收率进行了比较,证明该方法能够满足体外分析BBA高效液相色谱分析要求。在BBA纳米晶的细胞增殖抑制实验中,由于其缓释效应,在作用时间较短或低浓度时,BBA纳米晶与BBA相比具有相近的体外抗癌活性。同时,由于BBA药物难溶,选择低浓度进行对比,以便让BBA充分溶解,使其与BBA纳米晶在同一水平进行比较。因此本实验选择30 μM 作为对照试验的浓度。此外,除阳性对照组5-FU外,与NaB和5-ASA相比,经孵育48 h的30 μM BBA组显示出显著的细胞生长抑制效应,进一步证明了本课题合成的药物前体BBA对比于单独的NaB和5-ASA,细胞增殖抑制作用更强。经孵育24 h和48 h后30 μM BBA纳米晶的细胞生长抑制效应较强,从而证明本实验制备的BBA纳米晶在较长时间内对癌细胞SW620具有较好的体外抑制活性。

5 结论

本课题组成功制备了丁酸前体BBA纳米晶,并评估了该新型药物制剂对结肠癌细胞增殖的抑制作用,证明了所研制的BBA纳米晶缓控释药物具有抑制结肠癌细胞增殖的作用,为研发抗癌效果好而且毒性低的新剂型提供了重要的理论依据。该研究结果不仅展示了BBA纳米晶在结肠癌治疗中的潜在应用,也为未来的抗癌药物开发和临床应用提供了有价值的基础数据。

6 参考文献

- [1] KHAN FA, ALBALAWI R, POTTOO FH. Trends in targeted delivery of nanomaterials in colon cancer diagnosis and treatment[J]. *Med Res Rev*, 2022, 42(1): 227-258.
- [2] FABREGAS JC, RAMNARAIGN B, GEORGE TJ. Clinical updates for colon cancer care in 2022[J]. *Clin Colorectal Cancer*, 2022, 21(3): 198-203.
- [3] OTANI K, KAWAI K, HATA K, *et al.* Colon cancer with perforation[J]. *Surg Today*, 2019, 49(1): 15-20.
- [4] 杜飞,董亚萍,朴成钢. 结肠癌靶向治疗的研究进展[J]. *生命的化学*, 2018, 38(2): 259-266.
- [5] 王若楠,袁鹏辉,杨德智,等. 纳米晶药物的应用及展望[J]. *医药导报*, 2020, 39(8): 1100-1106.
- [6] FAN MX, GENG SC, LIU Y, *et al.* Nanocrystal technology as a strategy to improve drug bioavailability and antitumor efficacy for the cancer treatment[J]. *Curr Pharm Des*, 2018, 24(21): 2416-2424.
- [7] HUANG ZG, LV FM, WANG J, *et al.* RGD-modified PEGylated paclitaxel nanocrystals with enhanced stability and tumor-targeting capability[J]. *Int J Pharm*, 2019, 556: 217-225.
- [8] 文静,许茜,周家华. 叶酸受体介导的肿瘤靶向纳米递药系统[J]. *国际药学研究杂志*, 2011, 38(1): 33-37.
- [9] CHEN L, LIN Y, ZHANG ZJ, *et al.* A novel dual-prodrug carried by cyclodextrin inclusion complex for the targeting treatment of colon cancer[J]. *J Nanobiotechnology*, 2021, 19(1): 329.
- [10] 闰风连,司传平,熊化保. MDSCs在结肠炎相关结肠癌中的作用机制研究进展[J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(9): 1150-1153.
- [11] VUIK FE, NIEUWENBURG SA, BARDOU M, *et al.* Increasing incidence of colorectal cancer in young adults in Europe over the last 25 years[J]. *Gut*, 2019, 68(10): 1820-1826.
- [12] 王健,刘琳,杨小会,等. 丁香活性组分体外抗结肠癌活性及对细胞自噬的影响[J]. *西南医科大学学报*, 2023, 46(2): 167-170, 179.
- [13] 黄慧敏,吴肖肖,王易,等. 过量摄入游离糖对结肠炎小鼠及肠道菌群的影响[J]. *西南医科大学学报*, 2021, 44(6): 619-627.
- [14] 孙佳静. 丁酸钠对生长育肥猪生长性能和肠道健康的影响[D]. 西南大学, 2019: 27-42.
- [15] 杨艳青,李灿委,杨自忠,等. 肠道菌群代谢物——短链脂肪酸的研究进展[J]. *实用医学杂志*, 2022, 38(14): 1834-1837.
- [16] KAYAMA H, OKUMURA R, TAKEDA K. Interaction between the microbiota, epithelia, and immune cells in the intestine[J]. *Annu Rev Immunol*, 2020, 38: 23-48.
- [17] WU HL, SINGER J, KWAN TK, *et al.* Gut microbial metabolites induce donor-specific tolerance of kidney allografts through induction of T regulatory cells by short-chain fatty acids[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2020, 31(7): 1445-1461.
- [18] ZHANG Y, ZHOU L, BAO YL, *et al.* Butyrate induces cell apoptosis through activation of JNK MAP kinase pathway in human colon cancer RKO cells[J]. *Chem Biol Interact*, 2010, 185(3): 174-181.
- [19] YANG WJ, YU TM, HUANG XS, *et al.* Intestinal microbiota-derived short-chain fatty acids regulation of immune cell IL-22 production and gut immunity[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4457.
- [20] CHEN Y, WANG P, ZHANG Y, *et al.* Comparison of effects of aminosalicic acid, glucocorticoids and immunosuppressive agents on the expression of multidrug-resistant genes in ulcerative colitis[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 20656.
- [21] AL-KASSAS R, BANSAL M, SHAW J. Nanosizing techniques for improving bioavailability of drugs[J]. *J Control Release*, 2017, 260: 202-212.
- [22] 高缘,江鲲,李莉,等. 黄芩素纳米混悬液的生物利用度研究[J]. *中国药科大学学报*, 2011, 42(4): 314-318.
- [23] LU Y, LV YJ, LI TL. Hybrid drug nanocrystals[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2019, 143: 115-133.
- [24] LIU Y, SHUAI SY, HUANG GT, *et al.* Nanocrystals based mucosal delivery system: research advances[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2021, 47(11): 1700-1712.
- [25] RANA AK, FROLLINI E, THAKUR VK. Cellulose nanocrystals: Pretreatments, preparation strategies, and surface functionalization[J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 182: 1554-1581.
- [26] CHANG TL, ZHAN HL, LIANG DN, *et al.* Nanocrystal technology for drug formulation and delivery[J]. *Front Chem Sci Eng*, 2015, 9(1): 1509.

(利益冲突:无)

(收稿日期:2023-05-04;修回日期:2023-09-28)