

活性氧/谷胱甘肽双重响应型紫杉醇前药纳米粒的制备与评价

王昌海, 张馨雨, 焦煜雯, 郭明雪, 赵玥瑛, 张泽康, 杜守颖, 王金铃*, 陆洋(北京中医药大学, 北京 100105)

摘要: 目的 设计具有活性氧/谷胱甘肽双重响应的紫杉醇前药纳米粒(ProPTX-SS-NPs), 为紫杉醇的应用提供新思路和新方法。方法 以粒径和 PDI 为指标, 考察前药纳米粒的最佳制备方法和工艺; 通过电镜观察前药纳米粒的形貌并对其粒径、电位、包封率、载药量等进行考察; 考察纳米粒在活性氧和谷胱甘肽环境下的体外释放特性; 通过细胞试验考察前药纳米粒的体外细胞毒性和细胞摄取情况。结果 采用最佳工艺制备的纳米粒粒径为 $(130.20 \pm 2.18) \text{ nm}$, 分散系数为 0.12 ± 0.01 , Zeta 电位为 $(-8.45 \pm 0.01) \text{ mV}$, 载药量为 $(10.27 \pm 1.36) \%$, 包封率为 $(93.22 \pm 2.20) \%$ 。前药纳米粒具有良好的活性氧和谷胱甘肽响应特性, 并且能够显著抑制 MCF-7、HepG2 和 MDA-MB-231 增殖。其对 MDA-MB-231 细胞的抑制作用最为显著, 半数抑制浓度 IC_{50} $(0.71 \pm 0.11) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 而 PTX 的 IC_{50} 为 $(22.38 \pm 3.27) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结论 ProPTX-SS-NPs 具有良好的肿瘤微环境响应性能, 具备显著的抗肿瘤活性, 是一种极具潜力和应用前景的抗肿瘤纳米系统。

关键词: 肿瘤微环境; 纳米粒; 紫杉醇; ROS 响应; GSH 响应; 细胞毒性

中图分类号: R944 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2023)17-2414-13

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20222849

引用本文: 王昌海, 张馨雨, 焦煜雯, 等. 活性氧/谷胱甘肽双重响应型紫杉醇前药纳米粒的制备与评价[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(17): 2414-2426.

Preparation and Evaluation of Reactive Oxygen Species/Glutathione Dual Responsive Paclitaxel Prodrug Nanoparticle

WANG Changhai, ZHANG Xinyu, JIAO Yuwen, GUO Mingxue, ZHAO Yueying, ZHANG Zekang, DU Shouying, WANG Jinling*, LU Yang(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100105, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To design paclitaxel prodrug nanoparticles with dual reactive oxygen species/glutathione response (ProPTX-SS-NPs), providing new ideas and methods for the application of paclitaxel. **METHODS** The optimal preparation method and process of prodrug nanoparticles was investigated by using particle size and PDI as indicators; the morphology of prodrug nanoparticles was observed through electron microscopy and their particle size, potential, encapsulation efficiency, drug loading capacity, etc were investigated; the *in vitro* release characteristics of nanoparticles in reactive oxygen species and glutathione environments were investigated; the *in vitro* cytotoxicity and cellular uptake of prodrug nanoparticles were investigated through cell experiments. **RESULTS** The nano particle size prepared by the optimal process was $(130.20 \pm 2.18) \text{ nm}$, with the PDI of 0.12 ± 0.01 , the Zeta potential of $(-8.45 \pm 0.01) \text{ mV}$, the drug load of $(10.27 \pm 1.36) \%$, and the encapsulation rate of $(93.22 \pm 2.20) \%$. The prodrug nanoparticles showed reactive oxygen species and glutathione dual responsive release ability, and could significantly inhibit the proliferation of MCF-7, HepG2, and MDA-MB-231. Its inhibitory effect on MDA-MB-231 cells was the most significant. The IC_{50} of prodrug nanoparticles on MDA-MB-231 cells was $(0.71 \pm 0.11) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, while the IC_{50} of PTX was $(22.38 \pm 3.27) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. **CONCLUSION** ProPTX-SS-NPs have excellent tumor microenvironment response performance and significant anti-tumor activity, which is a highly potential and promising anti-tumor nanosystem.

KEYWORDS: tumor microenvironment; nanoparticle; paclitaxel; ROS-response; GSH-response; cytotoxicity

肿瘤的发病率和致死率逐年增加, 严重威胁着人们的健康和生活^[1]。紫杉醇(paclitaxel, PTX)是一种具有显著抗肿瘤活性的化疗药物, 已广泛应用于乳腺癌、卵巢癌及非小细胞肺癌等肿瘤的一线治疗^[2]。然而, PTX 自身缺乏对肿瘤组织的选择性, 静脉注射分布到正常组织后常会引起很强的不良反应。目前, 临床上已有一些靶向制剂

用于减少 PTX 正常组织分布, 如白蛋白溶剂型纳米 PTX(ABI-007)、PTX 脂质体(力扑素)^[3], 但靶向效率仍难以令人满意, PTX 在正常组织部位的分布仍然难以避免, 这在很大程度上限制了其在临床上的进一步应用^[4-5]。因此本研究拟构建一种活性氧(reactive oxygen species, ROS)/谷胱甘肽(glutathione, GSH)双重刺激响应的 PTX 前药纳

基金项目: 国家自然科学基金项目(82173987)

作者简介: 王昌海, 男, 硕士生 E-mail: 476466271@qq.com

*通信作者: 王金铃, 女, 博士, 副研究员 E-mail: wangjinling22@163.com

米粒, 这种双重响应条件将限制分布到正常组织的 PTX 药物的释放, 从而降低不良反应发生率。

肿瘤微环境是指肿瘤细胞在生长过程中, 由肿瘤细胞及细胞外间质相互作用后形成的肿瘤细胞生长的特殊环境^[6]。不同于正常细胞微环境, 肿瘤微环境^[7]及肿瘤细胞内^[8]具有高浓度的还原型 GSH 以及高水平的 ROS。因此, 可以针对肿瘤微环境及肿瘤细胞内高浓度 GSH 和 ROS 的特点设计智能响应型药物递送系统, 以增强药效和降低毒性。

前体药物也称前药, 是指将母药进行可逆的化学修饰, 使其在体外无生物活性或低活性, 经过体内代谢后变为有活性的母药而发挥药理作用的药物^[9]。笔者所在课题组前期以苯硼酸频哪醇酯为侧链合成了 ROS 敏感的 PTX 前药, 具有 ROS 敏感的前药可在肿瘤细胞内高水平的 ROS 刺激下降解释放出有活性的母药 PTX 发挥抗肿瘤作用^[10], 而在非肿瘤部位仍保持无活性或者低活性的前药状态, 进而有效抑制化疗药物的不良反应。但前药仍存在溶解性不理想、体内循环代谢快等不足^[11]。

纳米给药系统将化疗药物包封于纳米级载体材料中, 可以实现药物的功能化修饰, 如赋予药物递送系统 ROS 和 GSH 等刺激响应, 靶向递送等^[12]。另一方面, 纳米给药系统还会通过高通透性和滞留效应(enhanced permeability and retention effect, EPR)在肿瘤部位蓄积, 降低药物在正常组织的分布而减少不良反应。除此之外, 纳米给药系统的构建还有利于克服临床研究中普遍存在的多药耐药难题^[13]。

因此, 本研究以 GSH 敏感的两亲性化合物 mPEG_{5k}-SS-PLGA_{60k} 作为聚合物材料, 包载课题组前期合成的 ROS 敏感^[13]的苯硼酸-PTX 前药(ProPTX), 制备了一种具有 ROS 和 GSH 双重响应的 ProPTX-SS-NPs 前药纳米粒, ProPTX 与 mPEG-SS-PLGA 的结构式见图 1。mPEG_{5k}-SS-PLGA_{60k} 是一种两亲性嵌段聚合物, 亲水端 PEG 链能够延长药物半衰期, 改善药物水溶性; 亲脂端 PLGA 链具有活性反应基团, 可用于制剂的进一步功能化修饰。PEG^[14]和 PLGA^[15]均有良好的生物相容性, 可以在体内被降解为无毒物质, 目前二者均被 FDA 批准于药用。此外, 构建的纳米粒自身可以通过 EPR 效应在肿瘤部位蓄积, 且其只有在肿瘤微环境中高浓度的 GSH 刺激下才会发生解体, 而解体释放的 ProPTX 只能在高浓度的

ROS 刺激下才会释放具有强生物活性的 PTX。这种双重响应模式大大限制了 PTX 在正常组织的释放, 能够有效降低 PTX 的不良反应。基于此, 本研究以粒径和分散系数(polymer dispersity index, PDI)为指标, 考察前药纳米粒的最佳制备工艺并对其进行表征。并进一步考察最佳工艺制备的纳米粒的体外响应性释放能力以及毒性, 以期制备出高肿瘤特异性的 PTX 抗肿瘤药物。

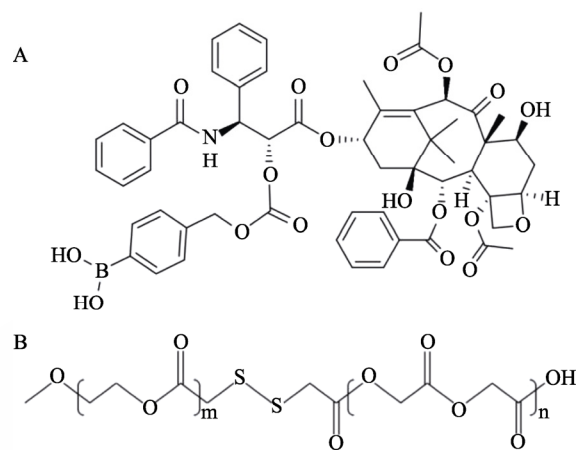


图1 苯硼酸-紫杉醇(ProPTX)(A)和 mPEG-SS-PLGA 聚合物(B)结构图

Fig. 1 Structure of phenylboronic acid-paclitaxel(ProPTX)(A) and mPEG-SS-PLGA polymer(B)

1 材料和仪器

1.1 材料

PTX(批号: ASU167; 纯度: 98%)、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)(批号: KCDG31)均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; ProPTX(自制, 纯度: 98%); 过氧化氢(H₂O₂, 北京拜尔迪生物科技有限公司, 纯度: 30%); mPEG_{5k}-PLGA_{60k}(75 : 25, 济南岱罡生物科技有限公司); mPEG_{5k}-SS-PLGA_{60k}(批号: RM019284)、DSPE-PEG_{5k}(批号: RF019255)、DSPE-PEG_{5k}-Mannose(批号: RJ01911; 纯度: 99%)均购自西安瑞禧生物有限公司; 维生素 E 聚乙二醇琥珀酸酯(TPGS, 北京正程生物科技有限公司, 批号: ZYL012-230107); 其他试剂均为分析纯或色谱纯。

人乳腺癌 MCF-7 细胞、人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞、人肝癌 HepG2 细胞系均来自北京协和医学细胞库。RPMI1640 培养液(批号: 8123348)、DMEM 培养液(批号: 8123328)均购自美国 Corning 公司; GIBCO 澳洲胎牛血清(北京百诺威生物科技有限公司, 批号: 15140-122); MTT 试剂盒(美国 Sigma, 批号: 298-93-1)。

1.2 仪器

BS224S 型十万分之一电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); DF-101S 集热式恒温磁力搅拌器(巩义市予华仪器责任有限公司); R-200 旋转蒸发器(瑞士 BUCHI); LC-20ADXR 高效液相色谱仪(日本岛津公司); ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm, 美国 Agilent 科技公司); Multiskan GO 型全波长扫描酶标仪(美国 Thermo 公司); MDS-650 超声破碎仪(北京中科科仪仪器有限公司); Nano-ZS 型粒度测定仪(英国 Malvern 公司)。

2 方法与结果

2.1 ProPTX-SS-NPs 的制备

2.1.1 探头超声法 称取 1 mg ProPTX、5 mg mPEG_{5k}-SS-PLGA_{60k} 和 1 mg DSPE-PEG_{5k}, 溶于 1 mL 丙酮中, 在冰浴探头超声下, 逐滴加入 10 mL 含 0.02% TPGS 的蒸馏水中(超声 8 min, 功率 150 W, 工作 3 s, 间歇 3 s)。超声结束后, 室温磁力搅拌至丙酮完全挥发, 过 0.45 μm 滤膜, 即得 ROS 和 GSH 肿瘤微环境响应的 PTX 前药纳米粒 ProPTX-SS-NPs。

制备空白载体纳米粒: 不加入 ProPTX, 称取 5 mg 的 mPEG_{5k}-SS-PLGA_{60k} 聚合物材料和 1 mg 的 DSPE-PEG_{5k}, 制备方法同上, 即得 pH 敏感的空白载体纳米粒(Blank-SS-NPs); 将 mPEG_{5k}-SS-PLGA_{60k} 替换为非 pH 敏感的 mPEG_{5k}-PLGA_{60k}, 同法制备即得 pH 不敏感的空白载体纳米粒(Blank-PP-NPs)。

2.1.2 透析法 称取 1 mg ProPTX、5 mg mPEG_{5k}-SS-PLGA_{60k} 和 1 mg DSPE-PEG_{5k}, 溶于 1 mL 丙酮并转移到透析袋内, 用去离子水 1.5 L 透析 24 h。透析后在 3 667 ×g 离心 10 min, 上清液过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得 ProPTX-SS-NPs。

2.1.3 乳化溶剂挥发法 称取 1 mg ProPTX、5 mg mPEG_{5k}-SS-PLGA_{60k} 和 1 mg DSPE-PEG_{5k} 置 10 mL 量瓶中, 用丙酮充分溶解并稀释至刻度, 摇匀。用针头逐滴缓慢加至 5 mL 电磁搅拌下的去离子水中。室温下真空旋转除去丙酮后用去离子水定容至 10 mL, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得 ProPTX-SS-NPs。

2.2 PTX 前药体外分析方法的建立

2.2.1 检测波长的测定 称取 ProPTX 对照品适量, 乙腈溶解, 另取 DSPE-PEG_{5k}、mPEG_{5k}-SS-PLGA_{60k}、PTX 适量, 用乙腈溶解, 在 190~400 nm 波长下进行全波长扫描。结果显示, ProPTX 在 225 nm 处有最大吸收; PTX 在 227 nm 处有最大吸

收; mPEG_{5k}-SS-PLGA_{60k} 空白载体在 269 nm 处有最大吸收, 在 225 nm 和 227 nm 处几乎没有干扰, 故本研究选择 227 nm 作为测定 PTX 的检测波长, 选择 225 nm 作为测定 ProPTX 的检测波长。

2.2.2 色谱条件的建立 色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 60%乙腈-水; 等度洗脱 15 min; 检测波长: 225 nm; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 进样体积: 10 μL; 柱温: 30 ℃。

2.2.3 方法专属性考察 用乙腈分别配制一定浓度的溶液与空白载体溶液, 分别取 10 μL 续滤液按“2.2.2”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图, 结果见图 2。由图 2 可知, 辅料对测定无干扰, 方法专属性较好。

2.2.4 标准曲线的制备 精密称取 ProPTX 粉末适量, 乙腈溶解制备储备液, 用乙腈配制成的 ProPTX 浓度为 5, 10, 20, 50, 100, 200, 400 μg·mL⁻¹ 的对照品溶液, 精密吸取 10 μL 续滤液按“2.2.2”项下色谱条件进行测定, 记录峰面积, 并以峰面积(y)对质量浓度(x)进行线性回归。

计算得到 ProPTX 的线性回归方程为 $y = 14\,781x - 1\,747.3$, $R^2 = 1$; 线性范围在 5~400 μg·mL⁻¹, 浓度和峰面积线性关系良好。

2.2.5 精密度试验 取浓度分别为 5, 50, 100 μg·mL⁻¹ 的 ProPTX 混合溶液各 6 份, 分别在日内和日间重复测定, 考察日内和日间精密度, 结果见表 1。

表 1 日内和日间精密度(n=3)

Tab. 1 Intra- and inter-day precision(n=3)

ProPTX 浓度/ μg·mL ⁻¹	RSD/%	
	日内精密度	日间精密度
5	0.53	2.39
50	0.38	3.25
100	0.82	2.74

由表 1 可知, ProPTX 日内、日间的 RSD 均 < 5%, 说明该方法精密度符合方法学要求。

2.2.6 回收率试验 精密称取适量空白纳米载体, 加入 ProPTX 储备液, 溶解并摇匀。用乙腈稀释至浓度均为 5, 50, 100 μg·mL⁻¹ 溶液, 取续滤液按“2.2.2”项下色谱条件下测定峰面积, 按照标准曲线计算回收率。结果显示, 在 3 个浓度下, ProPTX 的回收率均在 85%~115%, 符合方法学要求, 见表 2。

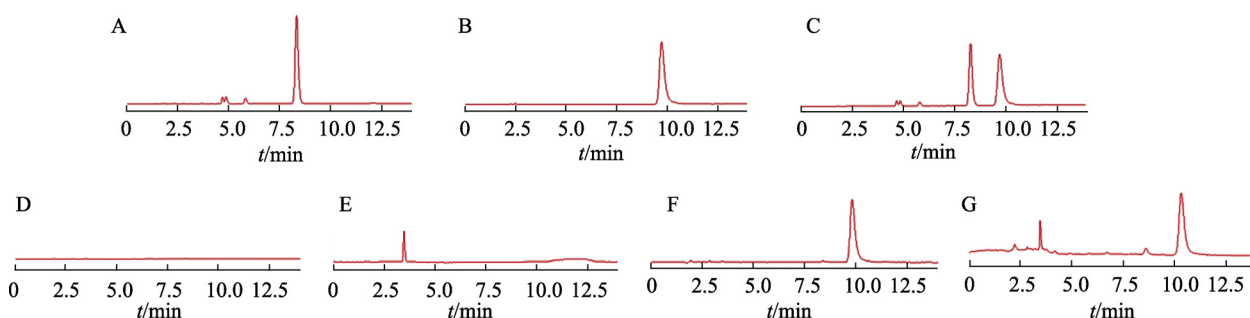


图 2 HPLC 图谱

A-PTX; B-ProPTX; C-PTX 和 ProPTX 物理混合; D-mPEG_{5k}-SS-PLGA_{60k}; E-mPEG_{5k}-PLGA_{60k}; F-mPEG_{5k}-SS-PLGA_{60k} 与 ProPTX 混合溶液; G-mPEG_{5k}-PLGA_{60k} 与 ProPTX 混合溶液。

Fig. 2 HPLC chromatograms

A-PTX; B-ProPTX; C-the physical mixture of PTX and ProPTX; D-mPEG_{5k}-SS-PLGA_{60k}; E-mPEG_{5k}-PLGA_{60k}; F-the physical mixture of mPEG_{5k}-SS-PLGA_{60k} and ProPTX; G-the physical mixture of mPEG_{5k}-PLGA_{60k} and ProPTX.

表 2 ProPTX 的回收率($n=3$)

Tab. 2 Recovery rate of ProPTX($n=3$)

浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	回收率/%	RSD/%
5	98.38	0.51
50	99.26	0.25
100	104.32	0.67

2.2.7 释放介质中的稳定性试验 分别考察 ProPTX 在 pH 7.4、pH 6.5、pH 5.5 和 pH 4.5 的 PBS 缓冲液中的稳定性,将浓度为 $50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 ProPTX 溶液,置于 $(37\pm 0.5)^\circ\text{C}$ 的恒温振荡器中, $100\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡 48 h, 分别于 4, 8, 16, 24, 48 h 取样, 样品用 $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 取续滤液按“2.2.2”项下色谱条件测定 ProPTX 的浓度。结果表明, ProPTX 在各种 pH 条件下 48 h 内稳定, 见表 3。

表 3 ProPTX 在 pH 7.4, 6.5, 5.5, 4.5 PBS 中的稳定性($n=3$)
Tab. 3 Stability of ProPTX in PBS at pH 7.4, 6.5, 5.5, 4.5($n=3$)

时间/h	RE/%			
	pH 7.4	pH 6.8	pH 5.5	pH 4.5
4	0.37	-2.31	-1.93	0.25
8	0.79	-1.02	0.01	0.64
16	0.43	-1.93	-0.29	-1.22
24	-1.21	0.99	0.33	-2.31
48	0.31	1.10	0.06	-0.97

2.3 工艺优化

以包封率、粒径和 PDI 为指标, 对制备过程中的制备方法(透析法、探头超声法、乳化溶剂挥发法); 有机溶剂的选择[丙酮、乙醇、二氯甲烷、丙酮/乙醇(1:1)]; 稳定剂种类(TPGS、F68、PVA、F127); 稳定剂含量(0.5%, 0.2%, 0.1%, 0.05%,

0.03%, 0.02%, 0.01%, 0% TPGS); 超声功率(100, 200, 300, 400 W); 超声时间(2, 4, 6, 8, 10 min); 有机相与水相的比例(1:5, 1:10, 1:15, 1:20); 药物与材料(1:0, 1:1, 1:3, 1:5, 1:8, 1:10)等因素进行逐步的工艺筛选和优化, 以确定最佳制备工艺。

2.3.1 纳米粒制备方法的确定 纳米粒常用制备方法^[16]主要有 3 种, 即探头超声法、透析法和乳化溶剂挥发法, 以包封率和粒径为指标, 考察载体材料 mPEG_{5k}-PLGA_{60k} 与药物比为 5:1 时的最佳制备方法。结果显示, 与溶剂挥发法和透析法相比, 探头超声法制备的纳米粒中 ProPTX 的包封率较高, 粒径较小且均一, 见表 4。因此, 本研究选择探头超声法作为纳米粒的制备方法。

表 4 不同方法所制备纳米粒的包封率和粒径($\bar{x}\pm s, n=3$)
Tab. 4 Entrapment efficiency and particle size of nanoparticles prepared by different methods($\bar{x}\pm s, n=3$)

方法	包封率/%	粒径/nm	PDI
探头超声法	93.76 $\pm$ 1.23	112.34 $\pm$ 1.18	0.15 $\pm$ 0.01
透析法	64.45 $\pm$ 3.27	166.70 $\pm$ 2.86	0.23 $\pm$ 0.09
乳化溶剂挥发法	84.10 $\pm$ 4.27	126.31 $\pm$ 2.27	0.22 $\pm$ 0.01

2.3.2 有机溶剂的选择 采用探头超声法制备纳米粒过程中, 常用的有机溶剂有乙醇、二氯甲烷、丙酮、丙酮与乙醇混合等^[17-18]。以包封率和粒径为指标, 载体材料 mPEG_{5k}-PLGA_{60k} 与药物比为 5:1, 筛选探头超声法制备纳米粒的最佳有机溶剂, 结果见表 5。结果显示, 探头超声法中, 使用丙酮制备的纳米粒具有较高的包封率, 粒径较小且更为均一, 所以选择丙酮为最佳有机溶剂用于后续的制剂制备。

表 5 溶剂对纳米粒包封率及粒径的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 5 Effect of solvent on entrapment rate and particle size of nanoparticles($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

溶剂	包封率/%	粒径/nm	PDI
丙酮	95.25±2.31	114.60±1.02	0.15±0.01
二氯甲烷	81.06±5.39	148.38±3.29	0.31±0.09
乙醇	87.76±6.23	178.37±1.29	0.25±0.01
丙酮/乙醇(1:1)	91.56±3.23	132.36±1.09	0.25±0.01

2.3.3 稳定剂的选择 在探头超声法制备纳米粒的过程中,常用的稳定剂主要有TPGS、F68、PVA、F127等^[19]。以包封率和粒径为指标,载体材料mPEG_{5k}-PLGA_{60k}与药物比为5:1,筛选探头超声法制备纳米粒的最佳稳定剂,结果见表6。

表 6 稳定剂对纳米粒包封率及粒径的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 6 Effect of stabilizers on entrapment rate and particle size of nanoparticles($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

稳定剂	包封率/%	粒径/nm	PDI
0.5%TPGS	92.40±4.37	139.46±0.30	0.14±0.06
0.5%F68	75.08±8.38	105.17±0.82	0.13±0.02
0.5%PVA	94.60±2.21	132.70±1.48	0.17±0.01
0.5%F127	80.05±4.23	145.23±3.20	0.36±0.16

由表6可知,4种稳定剂制备的载药纳米粒粒径均在100~200 nm,TPGS和PVA为稳定剂制备的纳米粒包封率相对较高,粒径和PDI均较小。故进一步对使用PVA和TPGS制备的2种制剂的储存稳定性进行考察,发现PVA组制剂室温稳定性较差,其粒径在10 d后逐渐增大。结合文献^[14,20]调研推测,这可能是由于一部分前药与PVA结构上的邻二羟基形成复合物发生聚集所致;而以TPGS作为稳定剂的制剂其澄清度、粒径15 d内均较稳定,因此本研究选择TPGS为最佳稳定剂用于后续制剂的制备。

2.3.4 稳定剂含量的考察 在保持其他实验处方条件不变(药物浓度0.1 mg·mL⁻¹、药载比1:5,有机溶剂为丙酮、稳定剂为TPGS)的情况下,以包封率和粒径为指标,考察稳定剂的含量在探头超声法制备纳米粒过程中对纳米粒的影响,以筛选最佳稳定剂含量。结果显示,随着稳定剂含量的增加,粒径和包封率均逐渐增大,但当TPGS含量>0.02%时,包封率均>95%,趋于稳定,粒径在120 nm左右,较为合适。因此,选择0.02%的TPGS为最佳稳定剂含量。结果见表7。

表 7 稳定剂含量对纳米粒包封率及粒径的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 7 Effect of stabilizer content on entrapment rate and particle size of nanoparticles($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

稳定剂 TPGS 含量/%	包封率/%	粒径/nm	PDI
0.5	97.60±2.34	142.72±1.48	0.07±0.01
0.2	96.05±2.23	147.12±2.02	0.20±0.01
0.1	95.34±3.23	136.22±1.05	0.10±0.01
0.05	96.09±1.23	128.56±2.86	0.14±0.06
0.03	97.38±2.39	125.83±1.65	0.16±0.01
0.02	96.27±4.38	115.38±1.26	0.19±0.04
0.01	75.26±8.39	114.13±1.15	0.47±0.05
0	62.08±6.49	237.36±2.33	0.43±0.05

2.3.5 有机相-水相比比例考察 在探头超声法制备纳米粒的过程中,有机相和水相比比例同样会影响纳米粒的理化性质。因此,在保持其他处方条件不变(药物浓度0.1 mg·mL⁻¹、药载比1:5,有机溶剂为丙酮、稳定剂为TPGS、稳定剂含量为0.02%)的情况下,以包封率和粒径为指标,对有机相-水相比比例进行考察,以筛选出最佳比例。结果显示,随着有机相-水相比比例的减小,包封率逐渐降低,粒径逐渐增大。对比油水比1:5和1:10,包封率接近,粒径都较为合适,满足使用要求。但考虑到纳米制剂需要在室温搅拌下挥去有机相,为缩短制剂制备时间,故选择1:10用于后续制剂的制备。结果见表8。

表 8 有机相-水相比比例对纳米粒包封率及粒径的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 8 Effect of the phase ratio of organic to aqueous on entrapment rate and particle size of nanoparticles($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

有机相/水相	包封率/%	粒径/nm	PDI
1:5	94.58±5.13	110.50±1.78	0.22±0.02
1:10	94.43±3.38	129.50±0.60	0.18±0.01
1:15	87.75±5.15	155.40±1.86	0.13±0.01
1:20	81.74±7.08	179.10±2.65	0.17±0.02

2.3.6 超声功率的考察 在探头超声法制备纳米粒的过程中,探头超声功率也会影响纳米粒的状态。因此,在保持其他处方工艺条件不变(药物浓度0.1 mg·mL⁻¹、药载比1:5,有机溶剂为丙酮、稳定剂为TPGS、稳定剂含量为0.02%、有机相和水相比比例为1:10)的情况下,本研究又以包封率和粒径为指标,对超声功率进行考察,以期筛选最佳超声功率。结果显示,随着超声功率的增大,

包封率逐渐增大, 粒径逐渐减小。这可能是因为超声功率增大使破碎能力增强, 从而使粒径减小。超声功率在 300 W 和 400 W 时, 粒径和包封率无显著差别, 考虑到仪器能耗, 本研究选择 300 W 为最佳超声功率。结果见表 9。

表 9 超声功率对纳米粒包封率及粒径的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)
Tab. 9 Effect of ultrasonic power on entrapment rate and particle size of nanoparticles ($\bar{x} \pm s, n=3$)

超声功率/W	包封率/%	粒径/nm	PDI
100	82.41±2.54	136.40±2.03	0.21±0.01
200	88.88±5.31	124.30±1.42	0.13±0.02
300	92.74±2.33	123.50±0.56	0.16±0.03
400	92.02±6.31	116.30±1.12	0.18±0.01

2.3.7 超声时间的考察 在探头超声法制备纳米粒过程中, 探头超声时间也影响纳米粒的状态, 因此, 在保持其他实验工艺条件不变(药物浓度 0.1 mg·mL⁻¹、药载比 1:5, 有机溶剂为丙酮、稳定剂为 0.02% 的 TPGS、有机相和水相比比例为 1:10、超声功率在 300 W)的情况下, 以包封率和粒径为指标, 对超声时间进行考察, 以筛选最佳超声时间。结果显示, 随着超声时间的延长, 包封率逐渐增大, 粒径逐渐减小。当超声时间≥6 min 时, 包封率和粒径趋于稳定, 且具有较好的 PDI。考虑到实验时间和仪器能耗, 最终选择 6 min 为最佳超声时间。结果见表 10。

表 10 超声时间对纳米粒包封率及粒径的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)
Tab. 10 Effect of ultrasonic time on entrapment rate and particle size of nanoparticles($\bar{x} \pm s, n=3$)

超声时间/min	包封率/%	粒径/nm	PDI
2	86.23±7.34	138.40±1.48	0.21±0.01
4	85.27±3.47	142.90±0.52	0.13±0.01
6	92.72±2.28	121.80±1.27	0.14±0.03
8	94.46±4.38	127.70±1.46	0.13±0.01

2.3.8 药载比的考察 在探头超声法制备纳米粒的过程中, 保持其他处方工艺条件不变(药物浓度 0.1 mg·mL⁻¹、有机溶剂为丙酮、稳定剂为 0.02% 的 TPGS、有机相和水相比比例为 1:10、超声功率在 300 W、超声时间为 6 min)的情况下, 以包封率和粒径为指标, 对纳米粒的药载比进行考察, 以筛选出最佳药载比。结果显示, 随着载体材料的增多, 包封率逐渐增大, 粒径先降低后增大。在药载比降低至 1:3 后, 包封率趋于稳定(>90%), 粒径在 122 nm 左右, 且具有较好的 PDI, 结果见表 11。

表 11 不同药载比对纳米粒包封率及粒径的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab. 11 Effect of drug load ratio on entrapment rate and particle size of nanoparticles($\bar{x} \pm s, n=3$)

药载比	包封率/%	粒径/nm	PDI
1:0	63.40±10.37	194.50±2.74	0.47±0.02
1:1	75.34±3.28	157.37±6.87	0.29±0.05
1:3	90.25±5.19	122.10±2.20	0.10±0.01
1:5	94.88±2.54	111.61±2.86	0.04±0.01
1:8	96.91±2.21	120.12±2.26	0.21±0.02
1:10	97.48±2.45	178.50±1.52	0.08±0.01

在室温条件下, 以药载比为 1:1、1:3 和 1:5 制备的制剂贮存 30 d, 进行稳定性考察。结果显示, 仅药载比为 1:5 时, 纳米粒的包封率和粒径在 30 d 无显著变化, 见图 3。因此, 本研究选择药载比为 1:5 为最优处方。

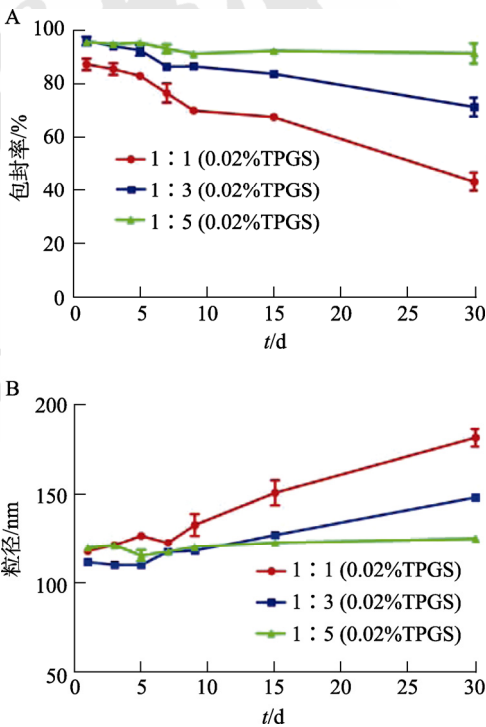


图 3 药载比对纳米粒包封率和粒径的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

A—包封率随时间的变化曲线; B—粒径随时间的变化曲线。

Fig. 3 Effect of drug load ratio on the encapsulation efficiency and size of nanoparticles($\bar{x} \pm s, n=3$)

A—curve of encapsulation efficiency over time; B—curve of particle size over time.

综上, ProPTX 前药的最佳制备工艺为 1 mg ProPTX、5 mg mPEG_{5k}-SS-PLGA_{60k} 和 1 mg DSPE-PEG_{5k} 溶于 1 mL 丙酮, 冰浴探头超声条件下逐滴加入 10 mL 含 0.02% TPGS 的蒸馏水(超声 8 min, 功率 150 W, 工作 3 s, 间歇 3 s), 超声结束后磁

力搅拌挥干丙酮并过 0.45 μm 滤膜, 即得 ProPTX。

2.4 冻干保护剂的选择

以粒径变化、冻干粉的外观、复溶后的状态为指标, 考察常用的冻干保护剂蔗糖、葡萄糖、海藻糖、甘露醇对 PTX 前药纳米粒的冻干保护作用。取 4 支西林瓶, 分别加入 2 mL ProPTX-SS-NPs 溶液, 分别加入 4 种冻干保护剂(海藻糖、甘露醇、葡萄糖、蔗糖)作为赋形剂, 混匀后于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下预冻 2 h, 再放入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中过夜, 最后取出置于冷冻干燥机中冻干 36 h, 即得 PTX 前药纳米粒的冻干粉。以冻干粉的外观、复溶后制剂的粒径和稳定性为指标, 考察不同冻干保护剂及不同比例的冻干保护剂对制剂冻干的保护作用, 结果见图 4。

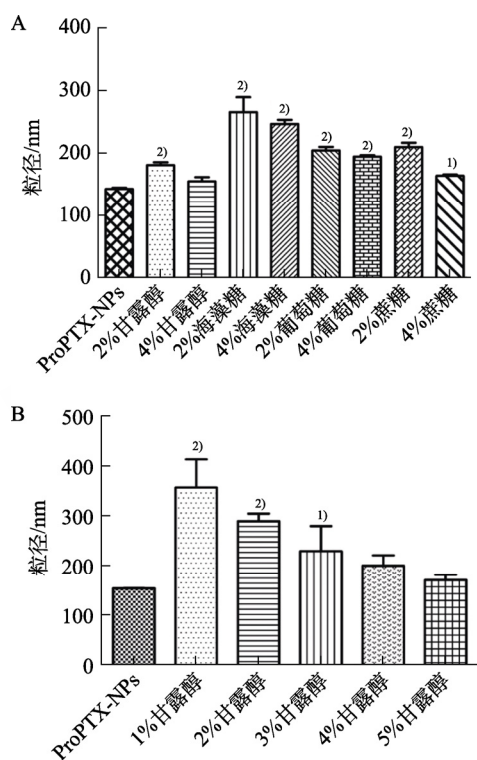


图 4 不同冻干保护剂(A)和不同含量甘露醇冻干保护剂(B)对制剂冻干复溶后粒径变化考察($\bar{x} \pm s$, $n=3$)与 ProPTX-NPs 相比, 1) $P<0.05$, 2) $P<0.01$ 。

Fig. 4 Different lyophilized protective agents(A) and different contents of mannitol(B) were used to investigate the change of particle size of the preparation after lyophilized resolution($\bar{x} \pm s$, $n=3$) Compared with ProPTX-NPs, 1) $P<0.05$, 2) $P<0.01$.

结果显示, 使用海藻糖、葡萄糖、蔗糖作为冻干保护剂时, 与 ProPTX-NPs 相比, 制剂冻干复溶后粒径变化大($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 且冻干后容

易成团、复溶效果不佳, 见图 4A。而使用甘露醇作为冻干保护剂时, 制剂冻干后表观光滑、松散, 加入适量纯水后可迅速分散, 且 4%的甘露醇冻干复溶后粒径无显著性差别, $\text{PDI}<0.2$, 因此选择 4%的甘露醇作为最佳冻干保护剂, 见图 4B。

2.5 制剂的表征

2.5.1 粒径、Zeta 电位及形貌表征 使用马尔文粒度仪在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下测定的粒径和电位, 平行操作 3 次, 结果取平均值, 并使用透射电镜对 ProPTX-SS-NPs 的形貌进行表征。结果显示, 载药纳米粒粒径均一, 在 130 nm 左右, Zeta 电位均为 -8 mV 左右, 结果见图 5~6 和表 12。纳米粒表面带负电荷, 使其能够通过电荷相互排斥作用而避免纳米粒的聚集, 从而保证了纳米粒的稳定性。

2.5.2 包封率和载药量 取 ProPTX-SS-NPs 溶液 100 μL , 加入 900 μL 乙腈稀释。涡旋 10 min, 经 $10\ 650 \times g$ 离心 10 min, 取上清 800 μL 装瓶。HPLC 测定 ProPTX-SS-NPs 中 ProPTX 的含量。按下列公式计算药物的包封率和载药量。

包封率(%)=纳米粒中药物的含量/药物的总质量 $\times 100\%$

载药量(%)=冻干纳米粒中药物的含量/冻干纳米粒的质量 $\times 100\%$

计算结果显示, 载药纳米粒包封率为 $(93.22 \pm 2.20)\%$, 载药量为 $(10.27 \pm 1.36)\%$, 满足纳米制剂标准。

2.5.3 稳定性考察 选用含 10%胎牛血清的 PBS (pH 7.4)为孵育介质, 与纳米粒溶液混合(5:1)后, 置于恒温振荡器中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $100\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡孵育 24 h。以粒径变化为评价指标, 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 取样, 测定纳米粒的粒径以考察 ProPTX-NPs 和 ProPTX-SS-NPs 2 种前药纳米粒的胶体稳定性。

结果显示, 当 2 种前药纳米粒与孵育介质共孵育后, 在 2 h 时, 纳米粒的粒径均略有下降, 但在 4 h 时粒径有所增加且逐渐平稳, 且与原制剂的粒径近似。在后续的 20 h, 粒径基本保持不变。结果见图 7。这种现象说明, BSA 可以被吸附到纳米粒的表面起到稳定剂的作用, 使得纳米粒的结构更加稳定, 具有更好的胶体稳定性^[10]。实验结果验证了 2 种前药纳米粒在模拟的生理条件下具有良好的胶体稳定性, 可用于后续研究。

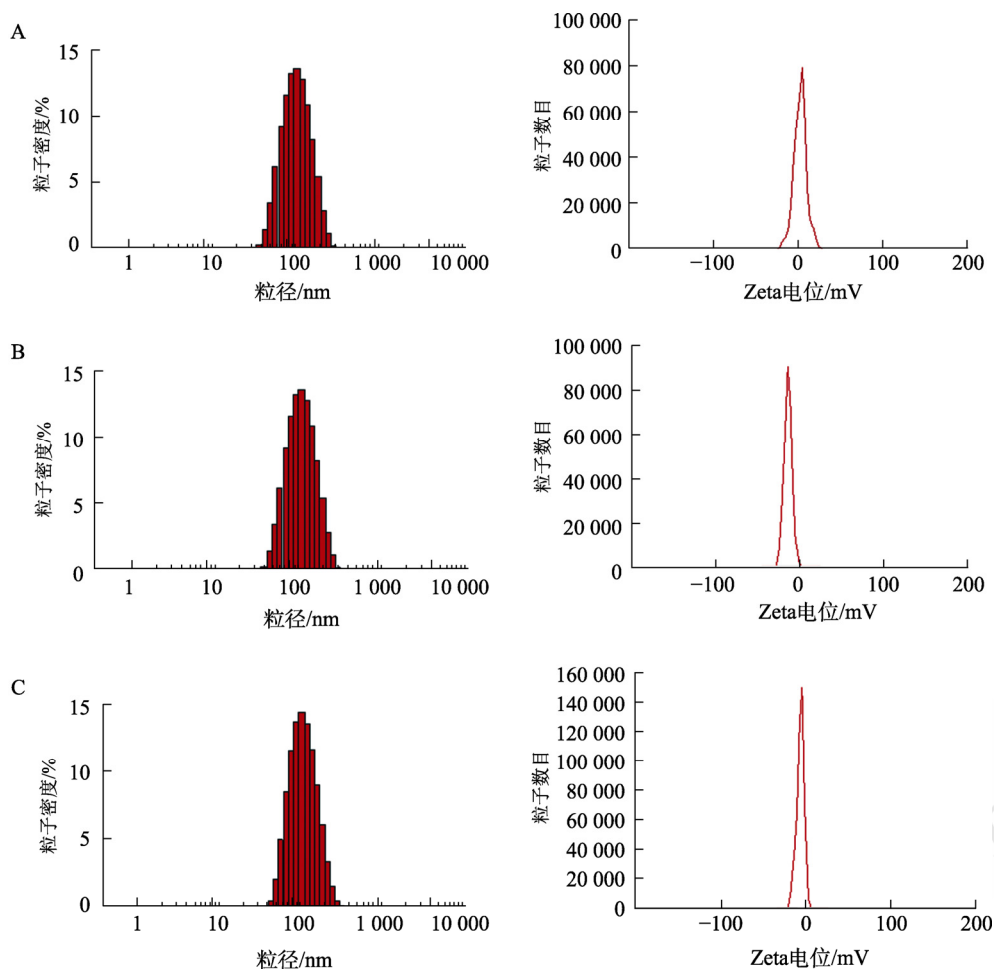


图 5 Blank-PP-NPs(A)、ProPTX-NPs(B)和 ProPTX-SS-NPs(C)粒径和电位($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Size and potential of Blank-PP-NPs(A), ProPTX-NPs(B) and ProPTX-SS-NPs(C)($\bar{x} \pm s, n=3$)

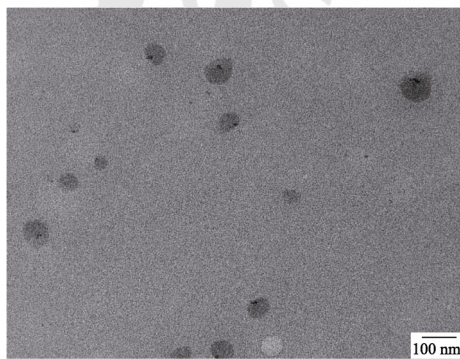


图 6 ProPTX-SS-NPs 在扫描电镜下的形貌

Fig. 6 Morphology of ProPTX-SS-NPs observed by SEM

表 12 纳米粒的粒径及电位($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab. 12 Particle size and potential of nanoparticles($\bar{x} \pm s, n=3$)

纳米粒	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
Blank-PP-NPs	110.24 $\pm$ 3.57	0.27 $\pm$ 0.02	-6.47 $\pm$ 0.01
ProPTX-NPs	116.60 $\pm$ 1.57	0.13 $\pm$ 0.03	-7.20 $\pm$ 0.70
ProPTX-SS-NPs	130.20 $\pm$ 2.18	0.12 $\pm$ 0.01	-8.45 $\pm$ 0.01

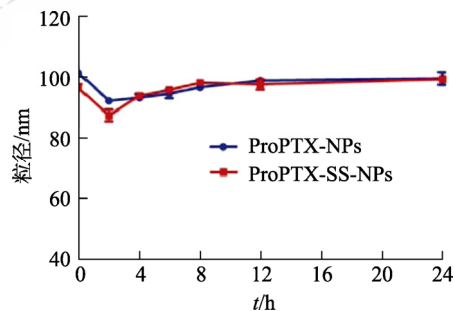


图 7 ProPTX-NPs 和 ProPTX-SS-NPs 纳米粒在含 10%胎牛血清的 PBS(pH 7.4)中的粒径变化($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 Particle size changes of ProPTX-NPs and ProPTX-SS-NPs nanoparticles in PBS containing 10% fetal bovine serum (pH 7.4) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.6 肿瘤微环境响应考察

2.6.1 GSH 敏感性 以含有二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT, 模拟 GSH 条件)和不含 DTT(模拟生理条件)的 PBS 缓冲液作为释放介质, 模拟制剂的体内循环过程及胞内的释放行为。分别配置含 0, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DTT

的释放介质各 25 mL 置于透析袋内, 加入 1 mL $0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 前药纳米粒, 37°C 、 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下恒温振荡。在预定时间点(0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 60, 72, 96 h)取 100 μL 药物溶液, 用乙腈稀释至 1 mL, 涡旋 3 min, $10\ 650 \times g$ 离心 10 min, 取上清液 10 μL 用于 HPLC 分析, 结果见图 8。

由图 8A 可知, ProPTX-SS-NPs 在 0, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DTT 条件下, 96 h 内的累积释放率分别为 62%, 67%和 87%, 药物释放量随 DTT 浓度的增加而增大。证明 ProPTX-SS-NPs 具有 GSH 敏感性, 其敏感性与 GSH 的浓度呈正相关; 但 ProPTX-NPs 在 0, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DTT 条件下, 96 h 累积释放率分别为 63%和 59%, 制剂释放量无显著差异, 说明 ProPTX-NPs 不具有 GSH 敏感性。

2.6.2 H_2O_2 敏感性 考察 ProPTX-SS-NPs 在不同浓度 H_2O_2 的 PBS 缓冲液中的释放行为, 以模拟制剂在胞内 PTX 的释放行为。分别配置含 0, 5, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 的释放介质各 25 mL, 加入 1 mL $0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的前药纳米粒, 37°C 、 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下恒温振荡, 在预定的时间点(0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 h)取样, 后续操作同上。采用 HPLC 测定 ProPTX 的含量, 并计算累积释放百分数。

结果显示, 前药纳米粒的 H_2O_2 敏感性与 H_2O_2 浓度呈正相关, 见图 8B。在 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 作用下, ProPTX-SS-NPs 释放的 PTX 前药可迅速转化为 PTX, PTX 48 h 累计释放量达 100%; 而在 5, $0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 中, ProPTX-SS-NPs 纳米粒 48 h 累积释放 PTX 分别为 70%和 0%, PTX 的累积释放量随着 H_2O_2 浓度的降低而显著减小。

2.7 体外细胞毒试验

采用 MTT 法考察 PTX、ProPTX、载药纳米粒 ProPTX-SS-NPs 对 MCF-7、HepG2 和 MDA-MB-231 细胞的生长抑制情况。取对数生长期且生长状态良好的细胞, 以 $5 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ 接种至 96 孔板, 于 5% CO_2 、 37°C 培养箱中孵育 24 h。分别用不同药液处理细胞 24 h, 对照孔加 100 μL 完全培养基。吸除每孔内液, 加入 150 μL 的 DMSO, 避光震荡 10 min 溶解蓝紫色结晶物。使用全波长扫描酶标仪在 570 nm 处测定各孔的吸光度值并计算抑制率, 计算公式: 抑制率(%)= $1-A_{\text{加药孔}}/A_{\text{对照孔}}$ 。

结果显示, PTX、ProPTX、ProPTX-NPs 及 ProPTX-SS-NPs 对 MCF-7、HepG2 和 MDA-MB-231 细胞均具有一定的细胞毒性, 在特定浓度范围内具有浓度依赖性, 见图 9。在较低浓度范围时, PTX 抗肿瘤活性相较于前药和制剂更强; 在 MCF-7 和 HepG2 细胞上, ProPTX、ProPTX-NPs 及 ProPTX-SS-NPs 的 IC_{50} 值均大于 PTX 溶液剂, 结果见表 13。这主要是因为前药进入细胞后, 需要在胞内 ROS 的作用下释放出 PTX 才能发挥抗肿瘤作用, 前药的毒性较低表明肿瘤细胞内 ROS 水平不足以将前药完全或者立刻转化为 PTX, 这种符合一般前药及前药纳米粒无活性或者低活性的特点^[21]。然而, 在 MDA-MB-231 细胞上, ProPTX 的毒性大于 PTX 的毒性, 且 ProPTX 溶液剂、ProPTX-NPs 及 ProPTX-SS-NPs 的 IC_{50} 值均小于 PTX 溶液剂。这可能是因为 MDA-MB-231 对 PTX 具有耐药性, 而 ProPTX 前药形式降低了细胞对 PTX 外排, 使 ProPTX 在胞内蓄积并逐渐释放 PTX 发挥药效, 从而发挥更强的抗肿瘤作用。

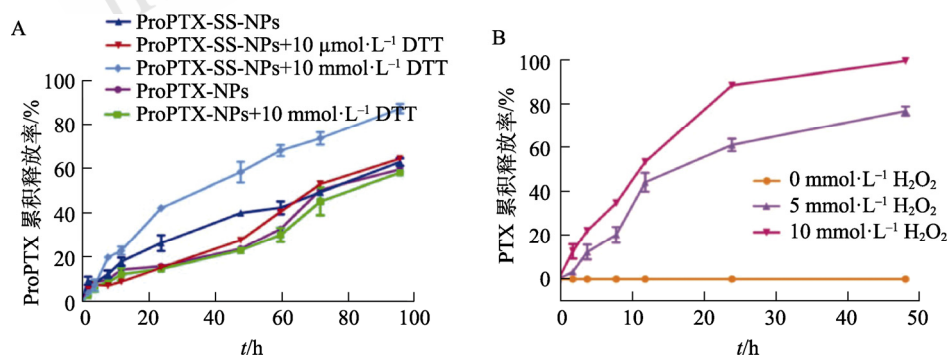


图 8 ProPTX-SS-NPs 和 ProPTX-NPs 在不同浓度的 DTT 作用下前药的累积释放曲线(A)和 ProPTX-SS-NPs 在不同浓度的 H_2O_2 作用下 PTX 累积释放曲线(B)($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 8 Prodrugs cumulative release curves of ProPTX-SS-NPs and ProPTX-NPs under different concentrations of DTT(A) and ProPTX-SS-NPs cumulative release curves of PTX under different concentrations of H_2O_2 (B)($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

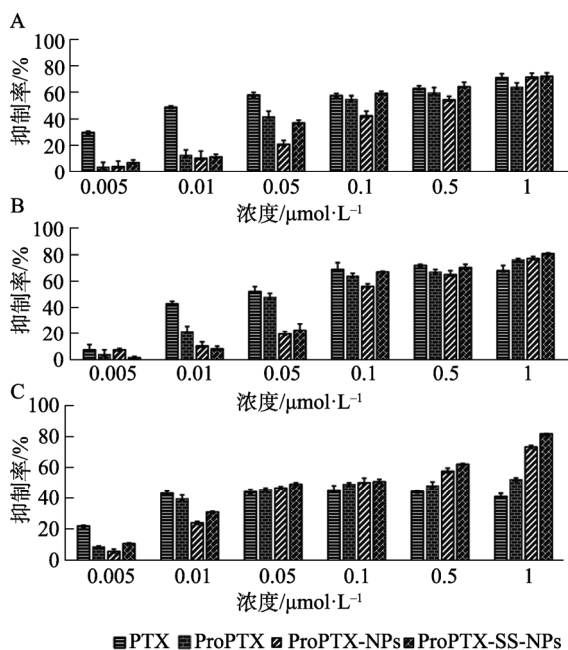


图 9 PTX、ProPTX、ProPTX-NPs 及 ProPTX-SS-NPs 对 MCF-7(A)、HepG2(B) 和 MDA-MB-231(C) 的细胞毒性 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 9 Cytotoxicity of PTX, ProPTX, ProPTX-NPs and ProPTX-SS-NPs to MCF-7(A), HepG2(B) and MDA-MB-231(C) ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

此外, 2 种空白纳米粒 Blank-PP-NPs 和 Blank-SS-NPs 对 3 种肿瘤细胞均具有一定的肿瘤抑制作用, 且 2 种空白制剂的肿瘤抑制作用相当 (5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时抑制率均在 10% 左右), 空白制剂的浓度越大, 肿瘤抑制效果越明显, 分析空白纳米粒具有抗肿瘤的作用主要是由于空白纳米粒的表面覆盖 PEG, 其具有抗肿瘤的作用, 因此, 可协同 PTX 前药发挥抗肿瘤作用, 见图 10。

另外, 在 HepG2 细胞上 ProPTX 的 IC_{50} 是 PTX 的 2 倍, 而在 MCF-7 中 ProPTX 的 IC_{50} 是 PTX 的 4 倍 (表 13), 可能原因有 2 点: ① 苯硼酸具有唾液酸靶向, 而 HepG2 细胞上唾液酸受体高表达^[22-23], 因而 ProPTX 溶液剂在 HepG2 细胞内的蓄积较高; ② 根据文献调研发现 HepG2 细胞中的 ROS 水平显著高于 MCF-7 细胞^[24-25], 使得前药在 HepG2 细胞能更快速地释放出 PTX, 进而抗肿瘤效果更好。

2.8 细胞摄取

2.8.1 荧光示踪纳米粒的制备 由于 ProPTX 无荧光强度, 因此本研究选用荧光强度较强的香豆素-6(C6)作为荧光探针, 应用共聚焦显微镜考察 MDA-MB-231 细胞对溶液剂及不同载药纳米粒的摄取情况。

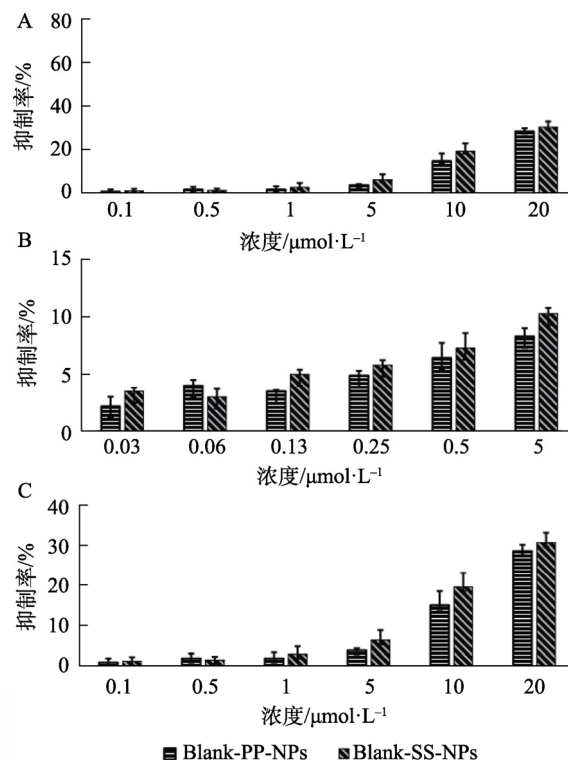


图 10 空白纳米粒对 MCF-7(A)、HepG2(B) 和 MDA-MB-231(C) 的细胞毒性 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 10 Cytotoxicity of blank nanoparticles to MCF-7(A), HepG2(B) and MDA-MB-231(C) ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

表 13 PTX 溶液剂、ProPTX 溶液剂及载药纳米粒分别与 MCF-7、HepG2 及 MDA-MB-231 细胞孵育 48 h 的 IC_{50} 值 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 13 IC_{50} values of PTX solution, ProPTX solution and drug-loaded nanoparticles incubated with MCF-7, HepG2 and MDA-MB-231 cells for 48 h ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

制剂	$\text{IC}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		
	MCF-7	HepG2	MDA-MB-231
PTX 溶液剂	0.02±0.01	0.09±0.01	22.38±3.27
ProPTX 溶液剂	0.08±0.12	0.18±0.01	1.23±0.32
ProPTX-NPs	0.16±0.03	0.39±0.03	1.26±0.60
ProPTX-SS-NPs	0.08±0.01	0.24±0.13	0.71±0.11

C6 载药纳米粒(C6-NPs)的制备: C6 用 DMSO 溶解, 使用 HBSS 溶液稀释到 0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。纳米粒制备方法为“2.1”项下的探头超声法, 将 ProPTX 替换为 C6, 分别制备 C6-NPs 和 C6-SS-NPs。

2.8.2 激光共聚焦显微镜共定位分析 将 MDA-MB-231 细胞以每孔 1×10^5 个的密度均匀地接种于 30 mm² 激光共聚焦皿中, 置于 CO₂ 培养箱中培养 24 h。待细胞贴壁后, 用 PBS 洗涤细胞 2 次, 分别用 1.5 mL 的 C6 溶液、C6-NPs 和 C6-SS-NPs 处理细胞 (浓度均为 0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 孵育 1.5 h。处

理后弃去培养液并用 PBS 洗涤, 4%多聚甲醛固定 20 min。弃去固定液并用 PBS 洗涤, 加入 350 μL 的 DAPI 溶液($5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)共孵育 15~20 min。弃去 DAPI 溶液再次用 PBS 洗涤, 然后于激光共聚焦显微镜下观察细胞形态以及制剂的摄取情况。

结果表明, MDA-MB-231 与不同制剂孵育 1.5 h 后, C6-NPs 和 C6-SS-NPs 的荧光信号值强度显著高于 C6 溶液; 同时, 带有-SS-结构的 C6-SS-NPs 荧光信号强度高于 C6-NPs, 见图 11A。为进一步探讨这种差异是否具有显著性, 本研究进一步采用流式细胞术对摄取量进行定量分析。

2.8.3 流式细胞术测定定量分析 应用流式细胞仪定量考察 MDA-MB-231 细胞对于 C6 溶液、C6-NPs 和 C6-SS-NPs 的摄取量。将 MDA-MB-231 细胞以 $1.5\times 10^5\cdot\text{mL}^{-1}$ 的密度接种到 12 孔板中, 培养 24 h, 待细胞贴壁生长后, 弃去培养液, 用无血清的空白培养液洗 2 遍后, 于培养箱中培养 30 min。分别将细胞与 C6 溶液、C6-NPs 和 C6-SS-NPs(浓度均为 $0.2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)共孵育 2 h。弃去培养液, 加入 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ PBS 终止摄取, 胰酶消化收集细胞, 上流式细胞仪检测摄取量。

结果显示, MDA-MB-231 与不同制剂孵育 2 h 后, C6-NPs 和 C6-SS-NPs 的摄取量显著高于 C6 溶液($P<0.001$); 同时, 带有-SS-结构的 C6-SS-NPs 摄取量高于普通纳米粒 C6-NPs($P<0.05$), 结果见图 11B。这表明将 C6 制备为纳米粒有利于提高 MDA-MB-231 对 C6 的摄取, 且带有-SS-结构的纳米粒能够进一步提高细胞摄取量。

3 讨论

PTX 具有高效的抗肿瘤活性^[26-28], 广泛应用于肿瘤的临床治疗中, 但其不良反应仍然是亟待解决的难题。PTX 由于不具有肿瘤组织选择性, 静脉注射后分布到肿瘤组织杀伤肿瘤细胞的同时, 也会分布到正常组织损伤机体正常细胞, 这是引起不良反应的主要原因。

目前国内外已有多种类型 PTX 制剂用于临床, 如以改善溶解度为目标的 Taxol[®], 以延长药物体内循环和降低药物在正常组织分布的脂质体(如 Lipusum[®]、LEP-ETU[®])和胶束型(如 Genexol-PM[®]、Nanoxel[®])制剂, 以及具备主动靶向的白蛋白溶剂型纳米 PTX(ABI-007)和脂质体(力扑素)。这些制剂多旨在降低药物在正常组织的分布而降低毒性, 然而目前仍只能尽可能地降低药物在正常组织的分布。考虑到药物在正常组织的分布难以避免, 因此, 本研究以限制药物在正常组织的生物活性为思路, 构建只有在肿瘤组织和肿瘤细胞内高浓度的 GSH 和 ROS 双重刺激下才能释放活性药物的制剂, 而正常组织由于 GSH 和 ROS 浓度很低使药物活性被封锁, 只能随体内循环分布到肿瘤部位释放或随循环排出体外。

在本研究中, 笔者利用 mPEG_{5k}-SS-PLGA_{60k} 疏水链(-PLGA_{60k})间的相互作用力和疏水链与药物间的作用力将药物包裹于疏水内核中; 而亲水外壳(-mPEG_{5k})将药物与外界隔离, 其易修饰性可为后期研究的靶向修饰提供基础。同时, PEG 嵌段具有良好的亲水性、生物相容性、低毒性、抗原

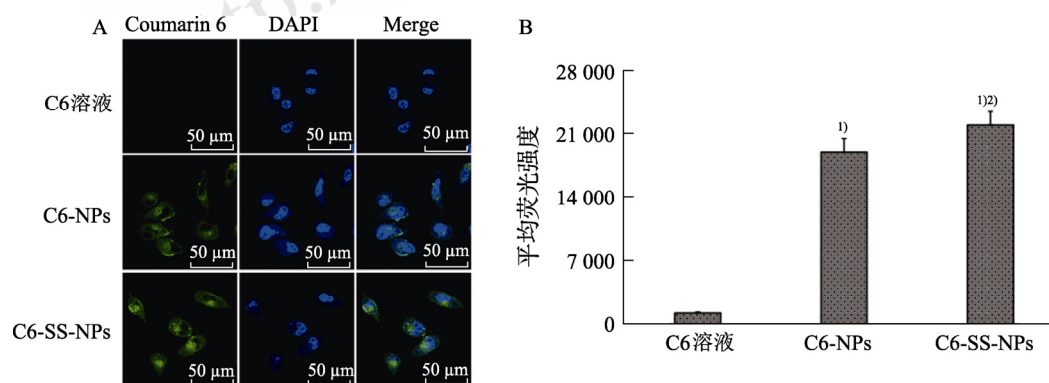


图 11 纳米粒在 MDA-MB-21 细胞上的摄取情况($\bar{x}\pm s, n=3$)

A—C6 溶液和 C6 纳米粒在 MDA-MB-21 细胞上 1.5 h 的摄取情况($60\times$, 标尺= $50\text{ }\mu\text{m}$)。B—C6 溶液及 C6 纳米粒在 MDA-MB-231 细胞孵育 2 h 的摄取情况, 与 C6 溶液相比, ¹⁾ $P<0.001$; 与 C6-NPs 相比, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 11 Uptake of nanoparticles on MDA-MB-21 cells($\bar{x}\pm s, n=3$)

A—the uptake of C6 solution and C6 nanoparticles on MDA-MB-21 cells for 1.5 h($60\times$, scale bar: $50\text{ }\mu\text{m}$). B—the uptake of C6 solution and C6 nanoparticles in MDA-MB-231 cells incubated for 2 h, compared with C6 solution, ¹⁾ $P<0.001$; compared with C6-NPs, ²⁾ $P<0.05$.

性和免疫原性等^[29]特点,可以弥补 PLGA 段结晶性强、表面疏水以及易被清除的使用局限。除此之外,有研究表明 mPEG 还可以避免体内酶的降解或吞噬,提高药物的稳定性,进而增强药效^[30-31]。最后,聚合物中-SS-的引入使其在正常组织中无活性,而在肿瘤组织部位断裂,从而释放药物发挥抗肿瘤功效。

本研究以包封率、粒径和 PDI 为指标,对制备过程中的制备方法、有机溶剂、稳定剂种类及含量、超声功率及时间、有机相与水相的比例、药物与材料的比例进行逐步的制剂处方的工艺的筛选和优化,确定了制剂 ProPTX-SS-NPs 的最佳制备工艺。进一步使用 H₂O₂ 和 DDT 模拟肿瘤微环境中高 ROS 和 GSH 条件,发现 ProPTX-SS-NPs 按预想的方式发生结构解离,促使药物快速释放,且这种解离并不会发生在肿瘤微环境以外的生理环境中。最后,本研究评价了 ProPTX-SS-NPs 对 MCF-7、HepG2 和 MDA-MB-231 肿瘤细胞株的增殖抑制作用,发现 ProPTX-SS-NPs 可显著抑制这 3 种肿瘤细胞增殖,具有一定的广谱抗肿瘤活性。且对 MDA-MB-231 细胞株的抑制作用能够大于同浓度的 PTX 溶液发挥的抑制作用。综上,本研究以中药单体 PTX 为模型,设计并制备了 1 种肿瘤微环境双重响应的 PTX 智能型前药纳米粒,实现了 PTX 药物的增效减毒。尽管这需要在动物实验中进一步验证,但目前的研究结果已经能够揭示这种智能纳米粒的抗肿瘤潜力及应用前景。

REFERENCES

- [1] LIU Y H, ZHOU C M, YANG T. Preparation and endosome pH sensitivity of hyaluronic acid polymeric micelles[J]. J Funct Polym(功能高分子学报), 2018, 31(3): 255-260, 272.
- [2] SUN B J. Tumor microenvironment redox-responsive prodrug nanassemblies for cancer chemotherapy[D]. Shenyang: Shenyang Pharmaceutical University, 2019.
- [3] CHEN J L, REN L L, CHEN G G. Advances in paclitaxel targeted delivery[J]. Northwest Pharm J(西北药学杂志), 2011, 26(5): 390-392.
- [4] GALLEG0-JARA J, LOZANO-TEROL G, SOLA-MARTÍNEZ R A, et al. A compressive review about taxol®: History and future challenges[J]. Molecules, 2020, 25(24): 5986.
- [5] LI B W. Design, synthesis and application of nanoprodrug system based on bond-cleavage reactions[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018.
- [6] LI R R, PENG F F, CAI J, et al. Redox dual-stimuli responsive drug delivery systems for improving tumor-targeting ability and reducing adverse side effects[J]. Asian J Pharm Sci, 2020, 15(3): 311-325.
- [7] XU X Y, QI X L, WU Z H. Research advances on tumor microenvironment-responsive nanogel-based drug delivery system[J]. Prog Pharm Sci(药学进展), 2020, 44(1): 35-42.
- [8] MIRHADI E, MASHREGHI M, FAAL MALEKI M, et al. Redox-sensitive nanoscale drug delivery systems for cancer treatment[J]. Int J Pharm, 2020(589): 119882.
- [9] ZHOU M J, HAN S P, ARAS O, et al. Recent advances in paclitaxel-based self-delivery nanomedicine for cancer therapy[J]. Curr Med Chem, 2021, 28(31): 6358-6374.
- [10] ZHANG D. Fabrication and evaluation of endogenous albumin-binding paclitaxel prodrug nanoparticles[D]. Shenyang: Shenyang Pharmaceutical University, 2018.
- [11] CUI Y, ZHANG M, DU F S, et al. Facile synthesis of H₂O₂-cleavable poly(ester-amide)s by passerini multicomponent polymerization[J]. ACS Macro Lett, 2017, 6(1): 11-15.
- [12] LIU Y H, LI K Z, DAI Y H, et al. Research progress of paclitaxel nano-preparations[J]. Chin J Pharm Online Ed(中国药理学杂志: 网络版), 2022, 20(5): 180-198.
- [13] WU D. Construction of porous microparticles and phenylboronic acid-functionalized system for small nucleic acid delivery based on the multidrug resistance mechanism[D]. Changchun: Jilin University, 2016.
- [14] PASUT G, VERONESE F M. PEG conjugates in clinical development or use as anticancer agents: An overview[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2009, 61(13): 1177-1188.
- [15] ZHANG K R, TANG X, ZHANG J, et al. PEG-PLGA copolymers: Their structure and structure-influenced drug delivery applications[J]. J Control Release, 2014(183): 77-86.
- [16] KOU L F, GAO L F, YAO Q, et al. Preparation and *in vitro* evaluation of paclitaxel loaded PLGA nanoparticles by emulsion-solvent evaporation method[J]. Chin J Pharm Online Ed(中国药理学杂志: 网络版), 2014, 12(2): 33-42.
- [17] XIANG H B, LIANG Q Z, LI X X, et al. Preparation and optimization of rifapentine-loaded poly(lactic-co-glycolic acid)(PLGA)-based nanoparticles[J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2020, 40(18): 1950-1956.
- [18] WANG X, XUE J, HUANG Y S. Preparation of poly lactic acid-glycolic acid nanoparticles[J]. Chin J Tiss Eng Res(中国组织工程研究), 2012, 16(3): 396-400.
- [19] HU X. Designed fabrication of acidity-activatable nanodrug systems for enhanced tumor therapy[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2019.
- [20] VRBATA D, UCHMAN M. Preparation of lactic acid- and glucose-responsive poly(ϵ -caprolactone)-b-poly(ethylene oxide) block copolymer micelles using phenylboronic ester as a sensitive block linkage[J]. Nanoscale, 2018, 10(18): 8845-8855.

8428-8442.

- [21] ZHANG G Y. Synthesis, characterization and properties of polyphosphoester-based paclitaxel prodrugs[D]. Suzhou: Soochow University, 2013.
- [22] CHE R. Study of novel small molecule tumor-targeting ligands based on carbohydrates[D]. Shanghai: East China Normal University, 2018.
- [23] WEI B. Preparation of multi-functional nano-drug delivery system based on natural polymer and their antitumor efficacy study[D]. Hefei: Anhui University, 2018.
- [24] WU H L. Fabrication, antiproliferative and antioxidant activities of selenium/tellurium nanoparticles functionalized by saccharides[D]. Guangzhou: Jinan University, 2012.
- [25] YAO Y H. Porphyrin compounds: synthesis, characterization and their anticancer activity evaluation *in vitro*[D]. Xi'an: Northwest University, 2017.
- [26] YUAN L T, SUN M J. Research progress of paclitaxel nano-delivery systems based on combination therapy strategy[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2022, 31(22): 2242-2250.
- [27] CUI X J, LU X L, FENG W W. Preparation of paclitaxel-loaded mPEG-PLGA-PLL nanoparticles and their effects on drug-resistant ovarian cancer cells[J]. Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志), 2020, 39(9): 552-557.
- [28] HUANG X Y, WU K, WANG C H, et al. Preparation and *in vitro* evaluation of cRGD-modified paclitaxel nanocrystals[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2022, 31(15): 1517-1523.
- [29] ZHANG C Y. Polypeptide and anti-cancer drug active targeting delivery system[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2014.
- [30] YAN J L. Synthesis of functional poly(ϵ -caprolactone)s and their applications in drug delivery[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2011.
- [31] ZHOU J H. Study on synthesis, characterization and properties of amphiphilic star polymers with polycaprolactones as hydrophobic blocks[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2011.

收稿日期: 2022-08-11

(本文责编: 李艳芳)