

聚水杨酸氧化还原响应型纳米载药系统的制备及体外评价

冯旭曼, 张仔怡, 史薇, 郭晨曦, 杨雅欣, 刘占军* (华北理工大学药学院, 河北 唐山 063210)

摘要: 目的 将聚水杨酸(poly-salicylic acid, PSA)连接到羧甲基壳聚糖上, 使其形成自组装纳米粒(nanoparticles, NPs), 并进行表征和体外评价。方法 以 *O*-羧甲基壳聚糖(*O*-carboxymethyl chitosan, OCMC)作为亲水骨链, 通过二硫键将 PSA 连接在羧甲基壳聚糖上。利用核磁共振氢谱(¹H-NMR)、红外光谱(IR)确证聚合物的结构; 采用超声法制备自组装 NPs, 并对其粒径、Zeta 电位进行表征; 采用芘荧光探针法测定 NPs 的临界聚集浓度(critical aggregation concentration, CAC); 测定载 DOX NPs 包封率和载药量; MTT 试验考察载药 NPs 的体外抗肿瘤活性。结果 OCMC 二硫键连接 PSA NPs(OCMC-SS-PSA NPs)的粒径为(148.5±2.3)nm; CAC 值为(0.069 3±0.001 3)mg·mL⁻¹; 还原响应性和 pH 敏感性良好。DOX/OCMC-SS-PSA NPs 的粒径为(160.5±1.7)nm, 载药量为(17.43±0.56)%, 包封率为(89.67±1.23)%。MTT 试验表明 OCMC-SS-PSA NPs 具有良好的生物安全性; 细胞摄取试验表明 DOX/OCMC-SS-PSA NPs 在细胞内滞留时间更长。结论 OCMC-SS-PSA NPs 粒径较小, 具有良好的还原响应性、pH 敏感性和生物安全性。OCMC-SS-PSA NPs 可作为兼具还原响应性和 pH 敏感性的纳米给药系统。

关键词: 聚水杨酸; *O*-羧甲基壳聚糖; 肝癌; 氧化还原响应

中图分类号: R944

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2023)12-1687-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20224120

引用本文: 冯旭曼, 张仔怡, 史薇, 等. 聚水杨酸氧化还原响应型纳米载药系统的制备及体外评价[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(12): 1687-1693.

Preparation and *in Vitro* Evaluation of Redox-responsive Nano-drug Delivery System of Poly-salicylic Acid

FENG Xuman, ZHANG Ziyi, SHI Wei, GUO Chenxi, YANG Yaxin, LIU Zhanjun* (College of Pharmacy, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To connect poly-salicylic acid(PSA) to carboxymethyl chitosan to form self-assembled nanoparticles(NPs), and conduct characterization and *in vitro* evaluation. **METHODS** *O*-carboxymethyl chitosan(OCMC) was used as a hydrophilic bone chain to connect PSA to carboxymethyl chitosan through disulfide bond. The structure of the copolymer was confirmed by ¹H-NMR and IR. Self assembled NPs were prepared by ultrasonic method, and their particle size and Zeta potential were characterized. The critical aggregation concentration(CAC) of NPs was determined by pyrene fluorescence probe method. The encapsulation efficiency and drug loading of DOX loaded NPs were determined. MTT assay was used to investigate the anti-tumor activity of drug loaded NPs *in vitro*. **RESULTS** The particle size of OCMC disulfide bonded poly-salicylic acid NPs(OCMC-SS-PSA NPs) was (148.5±2.3)nm; CAC value was (0.069 3±0.001 3)mg·mL⁻¹; its reduction sensitivity and pH sensitivity was good. The particle size of DOX/OCMC-SS-PSA NPs was (160.5±1.7)nm, the drug loading was (17.43±0.56)%, and the encapsulation efficiency was (89.67±1.23)%. MTT test showed that OCMC-SS-PSA NPs had good biological safety; the cell uptake experiment showed that DOX/OCMC-SS-PSA NPs stayed longer in the cells. **CONCLUSION** OCMC-SS-PSA NPs have small particle size, good reduction responsiveness, pH sensitivity and biosafety. OCMC-SS-PSA NPs can be used as a new nano drug delivery system with both reduction response and pH sensitivity.

KEYWORDS: poly-salicylic acid; *O*-carboxymethyl chitosan; liver cancer; redox-responsive

《中国人群肝癌筛查指南(2022, 北京)》指出中国肝癌人群存在生存率低、死亡率高的情况, 中国肝癌患者的 5 年生存率仅为 12.1%。针对癌症, 医学治疗手段不断发展, 而传统治疗手段导致的获得性耐药、相关不良反应等是阻碍抗肿瘤药物发挥最大疗效和临床效益的主要挑战^[1-2]。临床上常用的抗肿瘤药物有甲氨蝶呤、多柔比星

(doxorubicin, DOX)、紫杉醇、氟尿嘧啶等^[3-6], 但这些药物都有水溶性差, 在血液循环中保留时间短, 且对正常组织危害性大的缺点。为解决这些缺点, 近年来发展纳米递送系统, 研究通过构建合理的纳米递送系统, 有效提高化疗药物的抗肿瘤效果^[7-8]。

纳米载药系统可有效改善多重耐药的问题^[9],

基金项目: 河北省自然科学基金项目(H2021209024)

作者简介: 冯旭曼, 女, 硕士生 E-mail: 742228521@qq.com

*通信作者: 刘占军, 男, 博士, 教授 E-mail: liuzhanjun929@sina.com

其中聚合物胶束给药系统^[10]由两亲性聚合物以简单的方式在水中自组装而成,形成内核疏水外壳亲水的结构,且需亲水链和疏水链的溶解性差异极大^[11],以用来改善难溶性药物的溶解性。在纳米胶束结构中引入具有刺激敏感特性的二硫键(-SS-),以规避药物提早泄露的问题,实现药物在肿瘤部位持续、缓慢地释放药物的功能^[12]。

聚水杨酸(poly-salicylic acid, PSA)是水杨酸(salicylic acid, SA)在制作阿司匹林的过程中获得的副产物,具有强疏水性,形成纳米粒(nanoparticles, NPs)时作为疏水内核,负载疏水性药物,具有生物安全性高、不良反应小的优点,且具有一定的肿瘤靶向作用和肿瘤聚集作用^[13]。羧甲基壳聚糖的抗菌活性比壳聚糖强,且具有更好的生物相容性^[14-15],在抗肿瘤药物传递系统中应用广泛^[16]。因此本研究将 PSA 作为聚合物 NPs 的疏水端接枝在羧甲基壳聚糖上,探索将其作为新型的纳米材料的可能性。

1 仪器与试剂

FTIR-8400S 红外光谱分析仪(日本岛津公司);ZEN3690 型激光粒度分析仪(英国 Malvern 仪器公司);F-320 荧光分光光度计(天津港东科技股份有限公司);布鲁克 600 MHz 核磁共振波谱仪(德国布鲁克仪器公司);JEM-2800F 型聚焦双束扫描电子显微镜(美国 FEI 仪器有限公司);Lambda 35 紫外可见分光光度计(珀金埃尔默仪器有限公司);iMark 全自动酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);Agilent 1260-API500 高效液相色谱仪(美国 Agilent);RET 恒温加热搅拌器[艾卡(广州)仪器设备有限公司]。

SA(上海阿拉丁试剂有限公司,批号:69-72-7);*O*-羧甲基壳聚糖(*O*-carboxymethyl chitosan, OCMC)(成都欧恩瑞思化学试剂有限公司,货号:R623058;相对分子质量:10 kDa);胱胺二盐酸盐(cystamine dihydrochloride, CYS)(批号:56-17-7)、谷胱甘肽(GSH,批号:70-18-8)、亚硫酸氯(批号:7719-09-7)均购自上海麦克林生化科技有限公司;*N*-羟基琥珀酸亚胺(NHS,分析纯)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl,分析纯)均购自天津市福晨化学试剂厂;四甲基偶氮唑蓝(MTT, Eallbio,批号:190114);吡啶(批号:C2119052)、盐酸 DOX(DOX·HCl,批号:25316-40-9,纯度:98%)、*N,N* 二甲基甲酰胺(*N,N* dimethyl

formamide, DMF, 批号:68-12-2)均购自上海阿拉丁试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 化合物的合成

2.1.1 OCMC-SS-的合成 利用 EDC/NHS 介导的酰胺化反应,使二硫键中的氨基与 OCMC 中的羧基反应形成酰胺键,将二硫键连接到 OCMC 的骨架上。取 OCMC 143 mg 溶于 5 mL 纯水,常温环境下搅拌至完全溶解,加入 EDC·HCl 151 mg、NHS 91 mg 继续搅拌活化约 1 h,加入 CYS 102 mg 氮气保护,反应 24 h,透析 72 h,冻干即得 OCMC-SS-化合物。

2.1.2 PSA 的合成 在冰浴的条件下,称取 SA 溶于亚硫酸氯中(SA 与亚硫酸氯的摩尔比为 2:1),缓慢滴加吡啶 5 mL,常温条件下搅拌反应 6 h,之后用稀释的盐酸进行沉淀,用 0.1%的盐酸去除残余吡啶,冻干得白色粉末,即为 PSA。合成路线见图 1A。

2.1.3 OCMC-SS-PSA 的合成 在 40 °C 条件下,取 OCMC-SS-化合物溶于 3 mL 甲酰胺溶液,冷却至室温后加入 DMF 稀释至 5 mL。另取 PSA 30 mg,溶于 5 mL DMF 中,加入 EDC·HCl 60.8 mg、NHS 36.5 mg,常温下活化 0.5 h,将 PSA 滴加到 OCMC-SS-溶液中,搅拌 24 h,透析 72 h,冻干得 OCMC-SS-PSA 化合物。合成路线见图 1B。

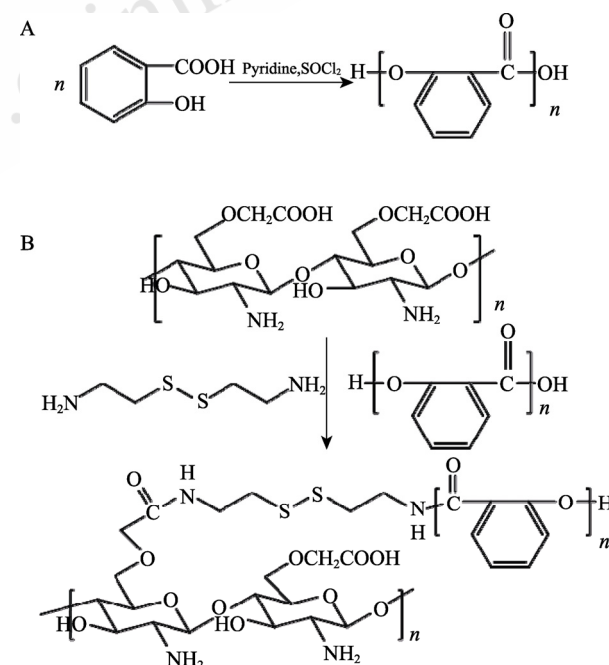


图1 合成路线

A-PSA 合成路线; B-OCMC-SS-PSA 合成路线。

Fig. 1 Synthesis route

A-PSA synthesis route; B-OCMC-SS-PSA synthesis route.

2.2 化合物的表征检测

2.2.1 $^1\text{H-NMR}$ 检测及结果 以 D_2O 为溶剂对 OCMC 和 OCMC-SS- 进行 $^1\text{H-NMR}$ 检测分析; 以氘代 DMF 为溶剂对 PSA 和 OCMC-SS-PSA 进行检测分析。

结果显示, OCMC 在 δ 3.20~4.12 显示出糖环骨架质子较宽的吸收峰。 δ 2.0 处左右的特征峰归属于 *N*-乙酰葡萄糖胺上的甲基氢。相较于 OCMC, OCMC-SS- δ 2.51~3.20 处的峰为-SS-的亚甲基质子峰。在 PSA 的 $^1\text{H-NMR}$ 图中, δ 6.87~8.65 为其特征峰。在 OCMC-SS-PSA 图中出现 PSA 和-SS-的特征峰, δ 2.34~3.34 为糖环骨架质子峰和-SS-吸收峰。因此初步判定 PSA 偶联到 OCMC 骨架上。 $^1\text{H-NMR}$ 见图 2。

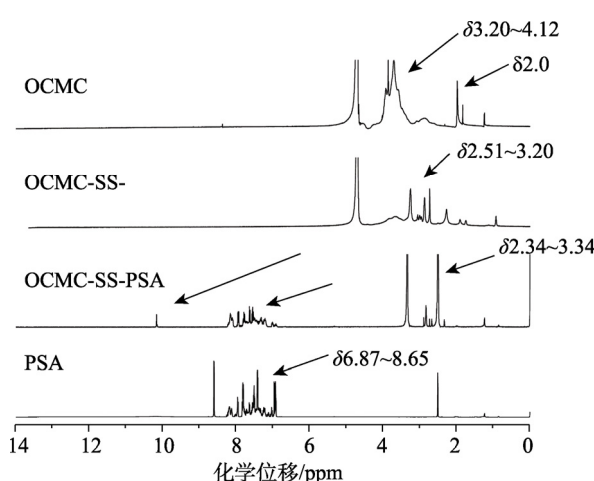


图 2 OCMC、中间体及产物的核磁共振氢谱图

Fig. 2 $^1\text{H-NMR}$ spectrogram of OCMC, intermediates and products

2.2.2 红外光谱(IR)检测及结果 采用近红外法对 OCMC、OCMC-SS-、PSA、OCMC-SS-PSA 进行表征测试。

结果显示, 与 SA 比较, PSA 在 1750 cm^{-1} 处有典型的酯键吸收峰, 且 SA 在 3238 cm^{-1} 处的羟基峰基本消失。与 OCMC 比较, OCMC-SS- 1596 cm^{-1} 处的吸收峰消失且出现了 1652 cm^{-1} (酰胺 I 带) 处吸收峰和 1572 cm^{-1} (酰胺 II 带) 处吸收峰, 证明 CYS 通过酰胺反应连接上了 OCMC。与 OCMC-SS- 比较, OCMC-SS-PSA 1572 cm^{-1} 处的吸收峰消失, 且 PSA 图谱中 1689 cm^{-1} 处的吸收峰几乎消失, 证明 PSA 与 CYS 发生酰胺反应。结果见图 3。

2.3 OCMC-SS-PSA NPs 的制备及表征

2.3.1 OCMC-SS-PSA NPs 的制备 取 1 mg 的

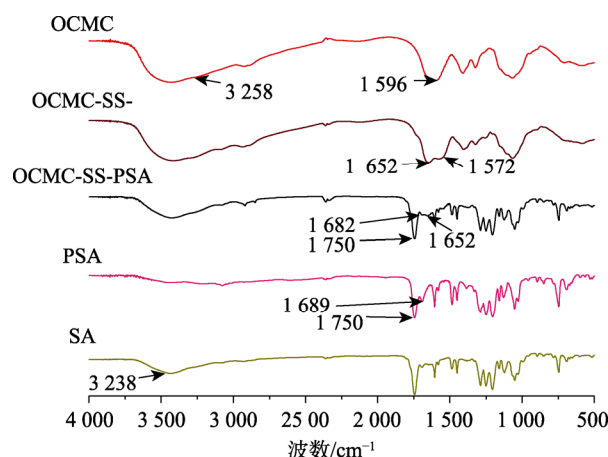


图 3 OCMC、OCMC-SS-、OCMC-SS-PSA、PSA 和 SA 的红外光谱图

Fig. 3 Infrared spectra of OCMC, OCMC-SS-, OCMC-SS-PSA, PSA and SA

OCMC-SS-PSA 化合物溶解在 5 mg 超纯水中, 在 100 W 的冰浴中使用探针式超声处理 10 min。所得样品溶液通过 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 孔径的微孔膜过滤。即得 OCMC-SS-PSA NPs 溶液, 在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存。

2.3.2 OCMC-SS-PSA NPs 粒径测定及形貌观察 采用马尔文粒度仪测试粒径、PDI 和 Zeta 电位, 所有的测试均在 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 下进行, 最终结果为 3 次测试结果的平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$)。采用扫描电镜对 NPs 溶液进行观察。结果显示, OCMC-SS-PSA NPs 的粒径为 $(148.5 \pm 2.3)\text{ nm}$, Zeta 电位为 $-(24 \pm 0.25)\text{ mV}$, PDI 为 (0.152 ± 0.031) 。OCMC-SS-PSA NPs 的 Zeta 电位为负值, 提供了粒子之间的排斥力, 增加了胶束的稳定性。PDI < 0.2, 证明 NPs 分散性较好。从扫描电镜可以看出, OCMC-SS-PSA NPs 粒径较小, 可通过自组装形成均匀的球形, 分散性较好。结果见图 4。

2.3.3 临界聚集浓度 (critical aggregation concentration, CAC) 的测定及体外稳定性考察 采用苾探针方法测定 OCMC-SS-PSA 的 CAC 值。配制质量浓度为 $0.012\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的苾溶液以及质量浓度为 0.001, 0.005, 0.010, 0.025, 0.050, 0.100, 0.250, $0.500\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的一系列 OCMC-SS-PSA 溶液。取 8 个 10 mL 小棕瓶, 分别加入苾溶液 $100\text{ }\mu\text{L}$, 风干后加入不同质量浓度的样品溶液, 水浴超声 40 min, 避光静置 8 h。设置荧光分光光度计的激发波长为 334 nm , 测定各溶液中苾的荧光吸收, 得到苾的第 3 个峰与第 1 个峰的谱带强度之比 (I_3/I_1), 用所得到的比值对质量浓度的对数作图, 交点处对应的质量浓度即为胶束的 CAC 值。

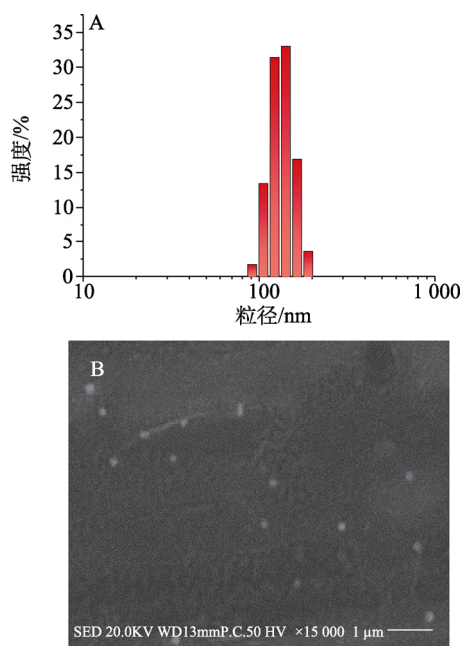


图 4 OCMC-SS-PSA NPs 粒径分布(A)和扫描电子显微镜图(B)

Fig. 4 Particle size distribution(A) and scanning electron microscope picture(B) of OCMC-SS-PSA NPs

精确称取 OCMC-SS-PSA 冻干粉末,分散在去离子水中,超声混匀,配成 3 种浓度(0.1, 0.5, 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),静置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱,用马尔文粒度分析仪连续检测 NPs 在 30 d 的粒径。

结果显示,OCMC-SS-PSA NPs 的 CAC 为 $(0.069\ 3\pm0.001\ 3)\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,说明 OCMC-SS-PSA 不仅易形成 NPs 且具有较好的稳定性。结果见图 5。

2.4 DOX/OCMC-SS-PSA NPs 的制备及理化性质的测定

2.4.1 DOX/OCMC-SS-PSA NPs 的制备 首先将 DOX·HCl 用三乙胺进行脱盐酸处理,避光室温下搅拌 2 h,低压旋蒸除去溶剂。取 2 mg DOX 溶于

2 mL 二氯甲烷。同时,室温下,取 10 mg 的 OCMC-SS-PSA,加入 3 mL 超纯水,搅拌 30 min。将二氯甲烷溶液在搅拌条件下缓慢滴加入水溶液中,避光搅拌 24 h,超声 10 min,离心,取沉淀,透析,冻干。

用 10 mL 的超纯水复溶所得冻干粉,超声 30 min,过 0.45 μm 滤膜,即得 DOX 载药 NPs 溶液。

2.4.2 DOX/OCMC-SS-PSA NPs 粒径测定及形貌观察 结果显示,DOX/OCMC-SS-PSA NPs 的粒径为 $(160.5\pm1.7)\text{nm}$,电位为 $(-21.00\pm0.13)\text{mV}$,PDI 为 (0.142 ± 0.027) 。与空白 NPs 相比,粒径略有变大,推测为药物载入疏水内核,增大了粒径,见图 6。

2.4.3 DOX/OCMC-SS-PSA NPs 中 DOX 的含量测定 建立 DOX 的标准曲线,取 DOX 对照品储备液,用甲醇稀释配制质量浓度为 0.1, 0.4, 1, 4, 8, 10, 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的一系列溶液,HPLC 进样分析,以 DOX 质量浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线,进行线性回归。得 DOX 标准曲线为 $Y=24\ 479.78X-94.66$, $R^2=0.999\ 9$ 。

量取 500 μL pH 5.4 的 DOX/OCMC-SS-PSA NPs 溶液,加入等体积的 DMSO 超声破解,用甲醇稀释,按照中国药典方法进行 HPLC 进样分析^[17-18]。色谱条件: Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5.0 μm);流动相为乙腈-2%冰醋酸溶液(35 : 65);流速 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$;紫外检测波长 481 nm;进样量 20 μL ;柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

根据测定结果,采用公式(1)(2)计算包封率(entrapped efficiency, EE)和载药量(drug loading, DL)。

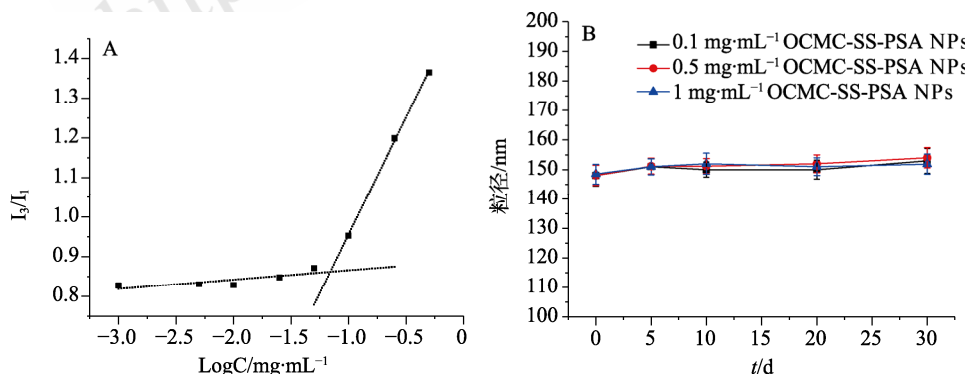


图 5 临界聚集浓度图和粒径变化图

A-OCMC-SS-PSA NPs 的临界聚集浓度对数关系图; B-OCMC-SS-PSA NPs 在 30 d 内粒径变化图。

Fig. 5 Critical aggregation concentration and particle size change diagram

A-Log plot of critical aggregation concentration for OCMC-SS-PSA NPs; B-particle size change diagram of OCMC-SS-PSA NPs within 30 d.

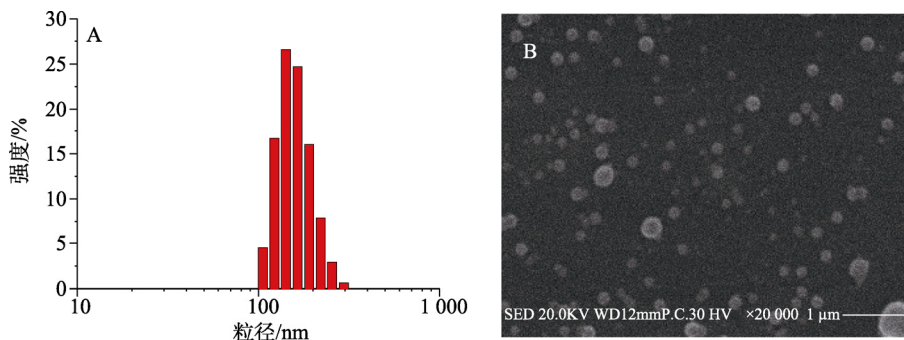


图 6 DOX/OCMC-SS-PSA NPs 粒径分布(A)和扫描电子显微镜图(B)

Fig. 6 Particle size distribution(A) and scanning electron microscope(B) of DOX/OCMC-SS-PSA NPs

$$EE(\%) = \frac{m_1}{m_2} \times 100\% \quad (1)$$

$$DL(\%) = \frac{m_1}{m_{\text{总}}} \times 100\% \quad (2)$$

式中: m_1 为 DOX 在自组装 NPs 中的含量; m_2 为 DOX 的投料量; $m_{\text{总}}$ 为载药 NPs 的总质量。

测定结果显示, DOX/OCMC-SS-PSA NPs 的载药量为 $(17.43 \pm 0.56)\%$, 包封率为 $(89.67 \pm 1.23)\%$ ($n=3$)。

2.4.4 DOX/OCMC-SS-PSA NPs 体外刺激响应下的降解及药物释放 采用透析法研究载药 NPs 的释放情况, 将纳米载药胶束密封于透析袋中(截留分子量 = 3.5 kDa)放置于不同的环境 (pH 5.4、pH 5.4+10 mmol·L⁻¹ GSH、pH 7.4、pH 7.4+10 mmol·L⁻¹ GSH), pH 7.4 模拟正常细胞环境, pH 5.4+10 mmol·L⁻¹ GSH 模拟肿瘤细胞环境。

称取 2 份 1 mg 的 DOX, 配制 pH 5.4 和 pH 7.4 的浓度为 0.1 mg·mL⁻¹ 的 DOX 溶液, 并稀释成一系列浓度, 进行 HPLC 分析, 得出 DOX 在不同 pH 下的标准曲线。

取 DOX/OCMC-SS-PSA NPs 溶液, 透析袋密封, 将其置于 50 mL 不同介质的烧杯中, 将烧杯置于 37 °C、100 r·min⁻¹ 水浴中。在预定时间吸取 3 mL 释放液, 加入等体积的新鲜介质, 采用 HPLC 测定药物释放量, 并在 32 h 时通过马尔文粒度仪检测 NPs 的降解情况。

不同的 pH 值及 GSH 环境下 DOX/OCMC-SS-PSA NPs 的体外释放情况结果显示, 在 pH 7.4 环境下药物 48 h 累积释放率为 10.2%, 在 pH 5.4 环境下药物 48 h 累积释放率为 61%, 在 pH 7.4+10 mmol·L⁻¹ GSH 环境下药物 48 h 累积释放率为 69%, 在 pH 5.4+10 mmol·L⁻¹ GSH 环境下药物 48 h 累积释放率为 86%。在粒径分布图中观察到,

NPs 在 pH 5.4 环境下比在 pH 7.4 环境下粒径分布宽, 证明 OCMC-SS-PSA NPs 具有一定的 pH 敏感性, 文献指出羧甲基壳聚糖本身有 pH 敏感性, 随着 pH 值的降低, 羧甲基壳聚糖溶解度增加, NPs 孔道增加^[19], 或酸性环境下酰胺键的断裂导致粒径变大, 药物释放; pH 7.4+10 mmol·L⁻¹ GSH 组比 pH 7.4 组的粒径分布宽, pH 5.4+10 mmol·L⁻¹ GSH 组比 pH 5.4 组的粒径分布宽, 颗粒粒径更大。通过对比 pH 5.4 和 pH 5.4+10 mmol·L⁻¹ GSH 这 2 组数据, 可以证明 OCMC-SS-PSA NPs 具有还原响应性。结果见图 7。

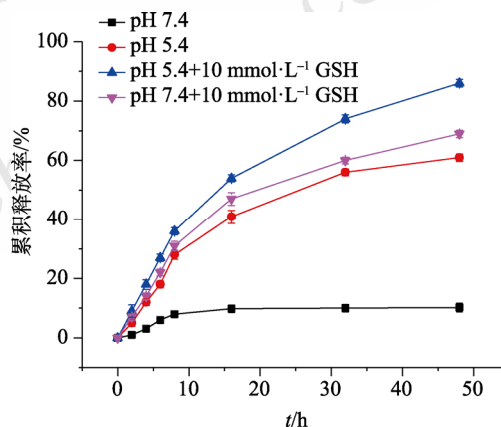


图 7 DOX/OCMC-SS-PSA NPs 在不同条件下药物释放率

Fig. 7 Drug release rate of DOX/OCMC-SS-PSA NPs under different conditions

2.5 体外抗肿瘤活性检测及结果

2.5.1 细胞安全性评价 空白 NPs(OCMC-SS-PSA NPs)对正常肝细胞(HL-7702)和肝癌细胞(HepG2)的不良反应: 将 2 种细胞以 $1 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的密度接种在 96 孔板中培养 24 h(每孔 100 μL), 之后加入不同浓度的 OCMC-SS-PSA NPs(0.01, 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)继续培养 24 h。每孔加入 10 μL 的 MTT($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)溶液, 培养 4 h 后,

弃上清液加入 150 μL 的 DMSO 溶液, 摇床震动 10 min, 用酶标仪在 570 nm 处测 OD 值, 根据公式(3)计算细胞存活率。

采用 MTT 法检测 DOX 和 DOX/OCMC-SS-PSA NPs 对肝癌细胞(HepG2)的不良反应: 将处于生长对数期的 HepG2 细胞消化, 然后在显微镜下计数, 将浓度调至 $1 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$, 每孔加入 100 μL 细胞悬液, 放到培养箱培养 24 h, 使细胞贴壁生长, 弃去培养基, 按照实验组加入含有药物的新鲜培养基。设置空白组、对照组、DOX 组和 DOX/OCMC-SS-PSA NPs 组。按照 DOX 浓度(0.25, 0.5, 1, 5, 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 每组设置 5 个复孔, 培养 48 h, 弃去培养基, 每孔加入 10 μL MTT($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)溶液, 继续培养 4 h, 弃上清加入 150 μL 的 DMSO 溶液, 摇床振荡 10 min, 用酶标仪在 570 nm 处测 OD 值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{\text{OD}_{\text{实验}} - \text{OD}_{\text{空白}}}{\text{OD}_{\text{对照}} - \text{OD}_{\text{空白}}} \times 100\% \quad (3)$$

结果显示, 经不同浓度的空白 NPs(OCMC-SS-PSA NPs)处理后, 正常肝细胞的存活率为 99.78%, 肝癌细胞的存活率 < 85%, 当 OCMC-SS-PSA NPs 浓度为 1, 5, 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 2 组细胞的存活率差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 表明 OCMC-SS-PSA NPs 对正常肝细胞没有明显毒性, 安全性较好, 可进行动物实验, 结果见图 8A。

随着 DOX 和 DOX/OCMC-SS-PSA NPs 溶液浓度的增加, 2 组肝癌细胞的存活率越来越低, DOX/OCMC-SS-PSA NPs 的毒性稍大于 DOX 的毒性。两者对 HepG2 细胞的抑制作用差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果见图 8B。

2.5.2 细胞摄取试验 通过荧光倒置显微镜对 HepG2 细胞中载 DOX NPs 的摄取情况进行定性分析。将 HepG2 细胞以 $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 接种在 6 孔板中培养 24 h, 充分贴壁后弃去培养基, 分别加入 DOX 溶液和 DOX/OCMC-SS-PSA NPs 溶液, DOX 的浓度为 2.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 每种制剂占 3 个复孔。放入培养箱中继续培养。观察时 PBS 冲洗 2 遍, 放置在荧光倒置显微镜下(物镜为 4 $\times$)观察细胞荧光强度, 拍照记录。

结果显示, 在 4 h 时, DOX 溶液组比 DOX/OCMC-SS-PSA NPs 溶液组的荧光强度高, 可能是因为 DOX 是通过自由扩散的方式进入细胞, 而 DOX/OCMC-SS-PSA NPs 是被动靶向机制。在 8 h

时, DOX/OCMC-SS-PSA NPs 组荧光强度明显高于 DOX 组, 推测因为 DOX/OCMC-SS-PSA NPs 在细胞中滞留时间长于 DOX 在细胞中的滞留时间, 结果见图 9。由细胞摄取试验结果推测得出, DOX/OCMC-SS-PSA NPs 和 DOX 在 4 h 内的摄取量大致相同, 但是 DOX/OCMC-SS-PSA NPs 比 DOX 在细胞中的滞留时间长。

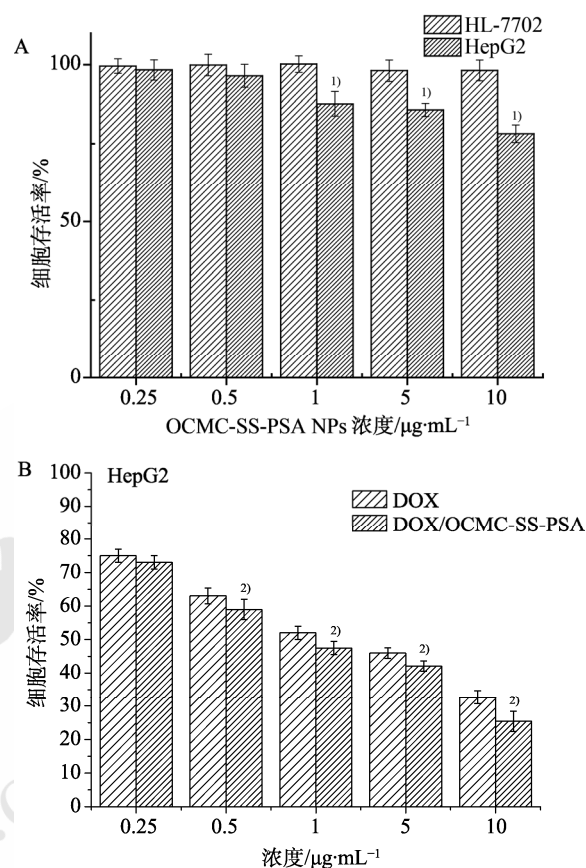


图 8 MTT 试验结果

A-OCMC-SS-PSA NPs 细胞安全性; B-载 DOX 胶束对 HepG2 的细胞毒性; 与 HL-7702 细胞相比, ¹⁾ $P < 0.05$; 与 DOX 组相比, ²⁾ $P < 0.05$ 。

Fig. 8 MTT test results

A-the cell safety of OCMC-SS-PSA NPs; B-cytotoxicity of DOX loaded micelles to HepG2; compared with HL-7702 cell, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with DOX group, ²⁾ $P < 0.05$.

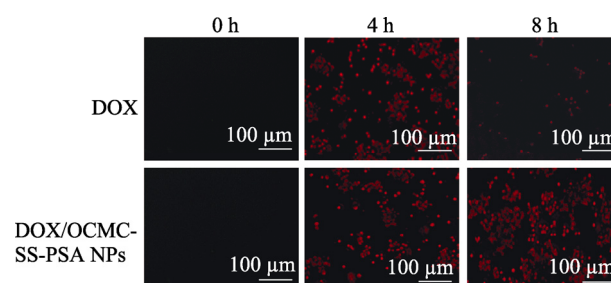


图 9 DOX 溶液和 DOX/OCMC-SS-PSA NPs 溶液在 HepG2 细胞中的摄取

Fig. 9 Uptake of DOX solution and DOX/OCMC-SS-PSA NPs solution in HepG2 cells

3 讨论

本试验成功制备出 PSA, 并用其修饰 OCMC, 制备出具有还原响应性和 pH 敏感性的 OCMC-SS-PSA 纳米载药系统。OCMC-SS-PSA NPs 粒径较小、分散性好, 可以通过实体瘤的高通透性和滞留(EPR)效应聚集在肿瘤部位。通过细胞安全性试验可以看出, OCMC-SS-PSA NPs 具有较好的生物安全性, 在测试范围内不会对正常细胞产生较大的生物毒性, DOX/OCMC-SS-PSA NPs 则能明显抑制肿瘤细胞的生长。细胞摄取试验结果显示, DOX/OCMC-SS-PSA NPs 可以使 DOX 在细胞中滞留较长时间, 延长药物作用时间。

REFERENCES

- [1] SUBHAN M A, YALAMARTY S S K, FILIPCZAK N, et al. Recent advances in tumor targeting via EPR effect for cancer treatment[J]. *J Pers Med*, 2021, 11(6): 571.
- [2] TERPOS E, NTANASIS-STATHOPOULOS I, ROUSSOU M, et al. Long PFS of more than 7 years is achieved in 9% of myeloma patients in the era of conventional chemotherapy and of first-generation novel anti-myeloma agents: A single-center experience over 20-year period[J]. *Ann Hematol*, 2020, 99(6): 1257-1264.
- [3] MOCHIDA Y, CABRAL H, KATAOKA K. Polymeric micelles for targeted tumor therapy of platinum anticancer drugs[J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2017, 14(12): 1423-1438.
- [4] LV H C, TAN R P, LIAO J W, et al. Doxorubicin contributes to thrombus formation and vascular injury by interfering with platelet function[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2020, 319(1): H133-H143.
- [5] LYU W, LIU Y J, WU D L, et al. Health technology assessment of albumin-bound paclitaxel for solid tumors chemotherapy[J]. *Pharm Today(今日药)*, 2022, 32(11): 851-858.
- [6] YUAN H B, GUO H W, LUAN X, et al. Albumin nanoparticle of paclitaxel (abraxane) decreases while taxol increases breast cancer stem cells in treatment of triple negative breast cancer[J]. *Mol Pharm*, 2020, 17(7): 2275-2286.
- [7] KAZEMI S, POURMADADI M, YAZDIAN F, et al. The synthesis and characterization of targeted delivery curcumin using chitosan-magnetite-reduced graphene oxide as nano-carrier[J]. *Int J Biol Macromol*, 2021(186): 554-562.
- [8] REN Z G, SUN S C, SUN R R, et al. A metal-polyphenol-coordinated nanomedicine for synergistic cascade cancer chemotherapy and chemodynamic therapy[J]. *Adv Mater*, 2020, 32(6): e1906024.
- [9] YANG J M, XU D H, LI F Z. Advance in the design and development of nanocarrier-mediated co-delivery for overcoming multidrug-resistant cancer[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药)*, 2020, 37(6): 750-754.
- [10] LANG T Q, DONG X Y, HUANG Y, et al. Ly6C^{hi} monocytes delivering pH-sensitive micelle loading paclitaxel improve targeting therapy of metastatic breast cancer[J]. *Adv Funct Mater*, 2019, 29(33): 1904596.
- [11] LU Y, ZHANG E S, YANG J H, et al. Strategies to improve micelle stability for drug delivery[J]. *Nano Res*, 2018, 11(10): 4985-4998.
- [12] YANG L J, HOU X X, ZHANG Y M, et al. NIR-activated self-sensitized polymeric micelles for enhanced cancer chemo-photothermal therapy[J]. *J Control Release*, 2021(339): 114-129.
- [13] YOU X R, WANG L Y, WANG L, et al. Rebirth of aspirin synthesis by-product: Prickly poly(salicylic acid) nanoparticles as self-anticancer drug carrier[J]. *Adv Funct Materials*, 2021, 31(33): 2100805.
- [14] LIU X F, GUAN Y L, YANG D Z, et al. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan[J]. *J Appl Polym Sci*, 2001, 79(7): 1324-1335.
- [15] DING Y J, WANG B Y, YANG Y T. Preparation of phenytoin sodium carboxymethyl chitosan microsphere and its bacteriostasis experiment research on periodontal common pathogenic bacteria[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药)*, 2018, 35(4): 492-496.
- [16] WANG J, CHEN J S, ZONG J Y, et al. Calcium carbonate/carboxymethyl chitosan hybrid microspheres and nanospheres for drug delivery[J]. *J Phys Chem C*, 2010, 114(44): 18940-18945.
- [17] 中国药典. 一部[S]. 2020: 1149.
- [18] 张广远. 载阿霉素白芨多糖衍生物胶束抗肿瘤作用及体内靶向性研究[D]. 长春: 吉林大学, 2020.
- [19] ZHANG Y, LI C M, QI R Y, et al. Doxorubicin loaded folate modified carboxymethyl chitosan self assembled nanoparticles and *in vitro* release[J]. *J Shenyang Univ Nat Sci(沈阳大学学报: 自然科学版)*, 2017, 29(2): 87-90.

收稿日期: 2022-12-08

(本文责编: 李艳芳)