

还原响应型甲氨蝶呤/羟基喜树碱纳米粒的制备及体外评价

徐洪婷^a, 费煊婷^a, 陈若乔^a, 胡巧红^{a,b*} (广东药科大学, a.药学院, b.广东省药物新剂型重点实验室和广东省局部精准药物递药制剂工程技术研究中心, 广州 510006)

摘要: 目的 合成药物-聚合物偶联物透明质酸-二硫键-甲氨蝶呤-亚油酸(hyaluronic acid-disulfide bond-methotrexate-linoleic acid, HA-SS-MTX-LA), 并以其为载体包载羟基喜树碱(hydroxycamptothecin, HCPT)制备纳米粒(nanoparticles, NPs)(HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs), 考察该 NPs 的体外释药行为及体外抗肿瘤活性。方法 在 1-乙基-(3-(二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐、*N*-羧基琥珀酰亚胺的催化下, 通过酰胺化反应合成药物-聚合物偶联物 HA-SS-MTX-LA, 并采用核磁共振氢谱、傅里叶变换红外光谱确证其化学结构。采用超声法制备 HA-SS-MTX-LA NPs, 以临界聚集浓度和粒径为指标, 筛选获得 LA 和 HA-SS-MTX 的最佳投料比。以 HCPT 为模型药物, 采用乳化溶剂挥发法包载药物, 考察 HA-SS-MTX-LA NPs 的共载药性能。通过体外释放试验考察 HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs 的还原响应性, 采用 MTT 法考察其体外抗肿瘤活性。结果 成功制得 HA-SS-MTX-LA NPs, LA 和 HA-SS-MTX 的最佳摩尔投料比为 1 : 1, 临界聚集浓度为 $60.50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, NPs 粒径为 $(226.6\pm 2.5)\text{nm}$, PDI 为 0.180 ± 0.036 。HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs 的粒径为 $(257.59\pm 1.41)\text{nm}$, PDI 为 0.132 ± 0.009 , 包封率为 $(72.46\pm 0.73)\%$, 载药量为 $(11.51\pm 0.32)\%$ 。体外释放结果表明药物在高浓度谷胱甘肽条件下可快速释放, MTT 试验结果表明 HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs 对 HepG2 细胞和 Bel-7402 细胞生长具有显著的抑制作用。结论 制得的 HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs 粒径均匀, 包封率和载药量较高, 具有良好的共载药性能、还原响应性和抗肿瘤活性, 同时可进一步提高 HCPT 和 MTX 的体外抗肿瘤效果。

关键词: 透明质酸; 甲氨蝶呤; 药物-聚合物偶联物; 纳米粒; 羟基喜树碱

中图分类号: R944 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2023)12-1694-10

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20230012

引用本文: 徐洪婷, 费煊婷, 陈若乔, 等. 还原响应型甲氨蝶呤/羟基喜树碱纳米粒的制备及体外评价[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(12): 1694-1703.

Preparation and *in Vitro* Evaluation of Reduction-responsive Methotrexate/Hydroxycamptothecin Nanoparticles

XU Hongting^a, FEI Xuanting^a, CHEN Ruoqiao^a, HU Qiaohong^{a,b*} (Guangdong Pharmaceutical University, a.School of Pharmacy, b.Guangdong Provincial Key Laboratory of Advanced Drug Delivery Systems and Guangdong Provincial Engineering Center of Topical Precise Drug Delivery System, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To synthesize drug-polymer conjugate hyaluronic acid-disulfide bond-methotrexate-linoleic acid (HA-SS-MTX-LA), prepare nanoparticles(NPs)(HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs) with it as a carrier by encapsulating hydroxycamptothecin(HCPT), and investigate its *in vitro* drug release behavior and *in vitro* antitumor activity. **METHODS** The drug-polymer conjugate HA-SS-MTX-LA was synthesized by amidation reaction under the catalysis of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide and *N*-hydroxy succinimide, and its structure was confirmed by hydrogen nuclear magnetic spectroscopy and Fourier transform infrared spectroscopy. HA-SS-MTX-LA NPs were prepared by ultrasound method. The critical aggregation concentration and particle size were used as indicators to optimize the feeding ratio of LA to HA-SS-MTX. Using HCPT as a model drug, HCPT-loaded HA-SS-MTX-LA NPs(HA-SS-MTX-LA@HCPT) were prepared by emulsifying solvent evaporation method to investigate the drug co-loading property. The reduction responsiveness of HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs was evaluated by *in vitro* release test. The anti-tumor activity *in vitro* of drug-loaded nanoparticles was assessed by MTT assay. **RESULTS** HA-SS-MTX-LA NPs was prepared successfully. The optimal feeding ratio of LA to HA-SS-MTX was 1 : 1, the critical aggregation concentration was $60.50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, and the particle size was $(226.6\pm 2.5)\text{nm}$ with PDI of 0.180 ± 0.036 . The particle size of HA-SS-MTX-LA@ HCPT NPs was $(257.59\pm 1.41)\text{nm}$ with PDI of 0.132 ± 0.009 . The encapsulation efficiency and drug loading of HCPT were $(72.46\pm 0.73)\%$ and $(11.51\pm 0.32)\%$, respectively. The *in vitro* release results showed that the drug could be rapidly released under high concentration of glutathione. The results of MTT experiment indicated that HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs had a significant inhibitory effect on the growth of HepG2 liver cancer cells and Bel-7402 liver cancer cells. **CONCLUSION** The HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs have uniform particle size, with high encapsulation efficiency and drug loading, good drug co-loading ability, good reduction responsiveness and anti-cancer activity. The anti-tumor effect of HCPT and MTX *in vitro* is further improved.

KEYWORDS: hyaluronic acid; methotrexate; drug-polymer conjugate; nanoparticles; hydroxycamptothecin

作者简介: 徐洪婷, 女, 硕士生 E-mail: hongting0915@163.com

*通信作者: 胡巧红, 女, 博士, 教授 E-mail: hu_qiaohong@163.com

在过去的几十年中,为了实现更有效和更安全的抗肿瘤治疗,也由于传统肿瘤疗法的内在局限性,各种纳米技术飞速发展并广泛应用^[1]。利用纳米技术设计功能性生物材料用于递送药物,能够显著增加药物的溶解度和生物利用度,提高药物的稳定性^[2]。然而,普通纳米粒(nanoparticles, NPs)由于释放位置选择性及靶向能力有限等问题,在递送抗肿瘤药物时易导致抗肿瘤效果不佳、不良反应严重的后果,为了解决此类问题,针对肿瘤微环境响应的靶向 NPs 受到关注;在 NPs 表面修饰靶头,使其具有靶向性而减轻不良反应也被广泛研究。除此之外,由于肿瘤细胞具有异质性,在肿瘤细胞的生长过程中,子细胞基因发生改变,使肿瘤细胞的生长速度、药物敏感性、侵袭能力等方面产生差异,单包埋药物治疗范围有限,运用纳米载体共递送不同分子靶点的抗肿瘤药物,能够减轻单一药物大剂量使用的不良反应,通过多条代谢途径加强对肿瘤细胞的杀伤和抑制作用^[3]。

透明质酸(hyaluronic acid, HA)是具有良好的生物相容性和生物可降解性的亲水性聚合物,结构中含有羧基和羟基,被广泛用于疏水分子改造或纳米载体材料中^[4]。此外,HA 可特异性结合肿瘤细胞表面过度表达的 CD44 受体^[5],从而具有靶向性。甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)可以竞争性抑制细胞二氢叶酸还原酶,影响叶酸的代谢,从而使肿瘤细胞凋亡^[6]。此外,多种肿瘤细胞表面高度表达叶酸受体,MTX 因其化学结构与叶酸相似,能与肿瘤细胞表面的叶酸受体结合,从而兼具靶向作用和治疗作用^[7]。羟基喜树碱(hydroxycamptothecin, HCPT)是一种广谱抗肿瘤药物,对消化道肿瘤疗效显著。但其水溶性不佳,不良反应大,将其包载于 NPs 的疏水空腔中可增加其溶解性和靶向性,降低不良反应^[8]。

本研究设计将 MTX、亚油酸(linoleic acid, LA)通过酰胺化反应共价键合到 HA 上合成一种新型的还原敏感型的药物-聚合物偶联物透明质酸-二硫键-甲氨蝶呤-亚油酸(hyaluronic acid-disulfide bond-methotrexate-linoleic acid, HA-SS-MTX-LA),并采用超声法制得 HA-SS-MTX-LA NPs。用其包载 HCPT,研究共载药纳米粒的体外释药行为和体外抗肿瘤活性。

1 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公

司),色谱柱为 Phenomenex C₁₈ 键合硅胶柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 90Plus Zeta 型纳米粒度和 Zeta 电位分析仪(美国 Brookhaven 公司); FreeZone 6L 真空冷冻干燥机(美国 LABCONCO 公司); T18 digital ultra turrax 分散机(德国 IKA 公司); Avance III HD 600 MHz 核磁共振波谱仪(美国 Bruker 公司); Spectrum 100 傅里叶红外光谱仪(美国 Perkin Elmer 公司); Multiskan FC 酶标仪(Thermo); 5424R 台式低温高速离心机(Eppendorf); SCIENTZ-II D 超声波细胞破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司); H-7650 透射电子显微镜(日本 Hitachi 公司)。

MTX(武汉巨胜科技有限公司,批号:20211105); HCPT(成都兰贝植化科技有限公司,批号:210920;纯度:99.8%); MTT(批号:MB4698)、HA(批号:M0220A,相对分子质量:10 kDa)均购自大连美仑生物技术有限公司;甲醇(色谱纯,北京迈瑞达科技有限公司);乙腈(色谱纯,美国默克公司);胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司,批号:22090201); DMEM 高糖培养基(批号:8122114)、青霉素-链霉素(批号:2321138)、胰酶(批号:1928609)均购自 Gibco;水为蒸馏水;其余试剂均为分析纯。人肝癌细胞 HepG2 和 Bel-7402 受赠于广东药科大学药学院药物化学系。1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐[1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, EDCI](上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:J221307); N-羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxy succinimide, NHS)(广州市齐云生物技术有限公司,批号:201908);二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO,批号:C14206253)、胱胺二盐酸盐(cystamine dihydrochloride, CYS,批号:C13193104)均购自上海麦克林生化科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 HA-SS-MTX-LA 的合成

HA-SS-MTX-LA 的合成路线见图 1。

2.1.1 HA-CYS 的合成 称取 HA 100 mg,溶于 10 mL PBS(pH=7.2~7.4)中,依次加入 3 倍摩尔量的 NHS 和 EDCI,搅拌溶解后,室温下活化 2 h,然后加入 HA 5 倍摩尔量的胱胺二盐酸盐,室温搅拌反应 24 h。然后透析 3 d,以去除未反应的小分子物质,冻干,4℃保存备用。

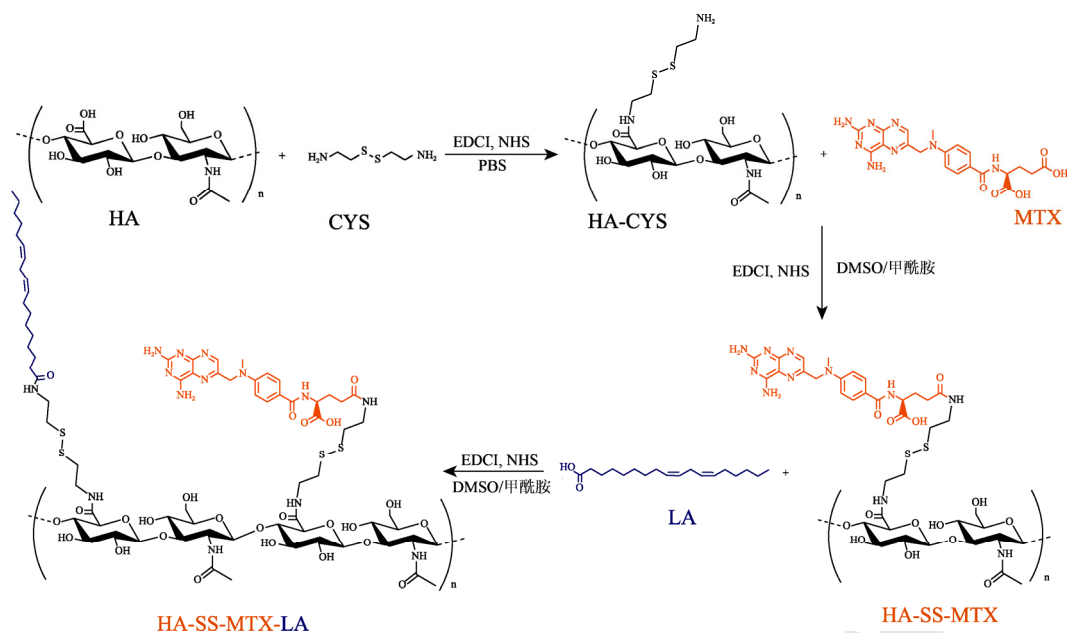


图1 HA-SS-MTX-LA合成路线

Fig. 1 Synthetic route of HA-SS-MTX-LA

2.1.2 HA-SS-MTX的合成 参考文献方法^[9]并作适当修改,称取60 mg MTX溶于DMSO中,依次加入3倍摩尔量的NHS和EDCI,在室温下搅拌2 h。另称取2倍摩尔量的HA-CYS冻干品于3 mL甲酰胺中,40℃溶解,冷却至室温后用DMSO稀释到5 mL,制得HA-CYS溶液。将HA-CYS溶液加入上述MTX反应液中并在室温下搅拌24 h,然后透析3 d,冻干,4℃避光保存备用。

2.1.3 HA-SS-MTX-LA的合成 当HA-SS-MTX与LA的摩尔比为1:1时,操作如下:称取HA-SS-MTX 52.9 mg,在40℃下溶解在3 mL甲酰胺中,冷却至室温后用DMSO稀释到5 mL,制得HA-SS-MTX溶液。另称取28 mg LA溶解在5 mL DMSO中,加入3倍摩尔量的NHS和EDCI,在室温下搅拌2 h。将HA-SS-MTX溶液加入该LA溶液中,室温避光搅拌24 h,然后透析3 d,第1天透析介质为乙醇/水(3:1),第2,3天透析介质为去离子水,冻干,4℃避光保存备用。

按照上述方法分别制备HA-SS-MTX与LA的摩尔投料比为1:0.3,1:0.5和1:2的HA-SS-MTX-LA。

2.2 HA-SS-MTX-LA的结构表征

2.2.1 核磁共振氢谱检测 取适量HA、HA-CYS、HA-SS-MTX和HA-SS-MTX-LA溶解于氘代水中,LA溶解于氘代三氯甲烷中,MTX溶解于氘代DMSO,采用核磁共振波谱仪测定各样品的核磁共

振氢谱。HA-CYS在1.9 ppm的信号属于HA骨架上的N-乙酰基的甲基质子,2.7~2.9 ppm的特征峰是CYS的亚甲基质子峰^[10],3.3~3.8 ppm的特征峰是HA骨架上的糖环质子峰^[11],4.4 ppm处的特征峰是HA通过羧基和CYS的氨基反应产生的酰胺键与CYS相连,与文献报道一致^[9],见图2。HA-SS-MTX在7.5,8.0,8.6 ppm处出现了MTX中芳香环质子特征峰,说明MTX已连接到HA骨架上^[12]。HA-SS-MTX-LA在0.81,1.5 ppm处出现了LA的质子特征峰,说明LA成功接枝到HA骨架上。综上,HA-SS-MTX-LA成功合成。根据

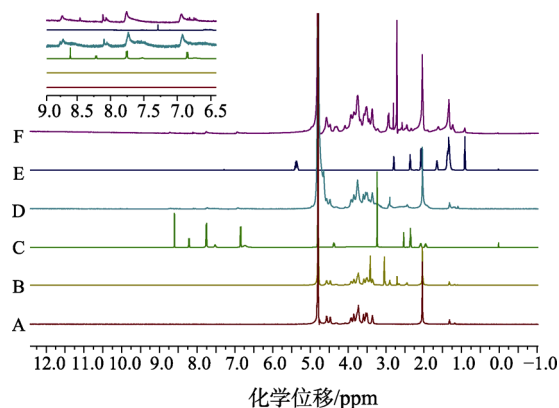


图2 化合物的核磁共振氢谱图

A-HA; B-HA-CYS; C-MTX; D-HA-SS-MTX; E-LA; F-HA-SS-MTX-LA(1:1)。

Fig. 2 ¹H-NMR spectra of compounds

A-HA; B-HA-CYS; C-MTX; D-HA-SS-MTX; E-LA; F-HA-SS-MTX-LA(1:1)。

N-乙酰基的特征峰与 MTX 中芳香环特征峰的积分比、LA 质子特征峰的积分比分别计算了 MTX 和 LA 连接到 HA 骨架上的量^[13], MTX 取代度为 12.5%; HA-SS-MTX 与 LA 的摩尔比为 1 : 0.3, 1 : 0.5, 1 : 1 和 1 : 2 时的 LA 取代度分别为 0.1%, 2.5%, 3.25% 和 4.6%。

2.2.2 傅里叶变换红外光谱检测 取产物粉末适量, 与溴化钾粉末研匀后压片, 采用傅里叶变换红外光谱仪测定各样品的红外光谱。HA 的特征峰主要有 3 400 cm⁻¹ 左右的羧基的-OH 伸缩振动吸收, 1 740 cm⁻¹ 左右的羧基的羰基吸收峰和 1 613 cm⁻¹ 的酰胺的羰基吸收峰^[14]; HA-CYS、HA-SS-MTX 和 HA-SS-MTX-LA 的酰胺的羰基吸收峰较 HA 向高波数方向位移至 1 640 cm⁻¹。与 HA 相比, HA-CYS 的图谱没有显示出显著的变化, 可能是由于其特征吸收带被 HA 的吸收带所掩盖^[15]。HA-SS-MTX 和 HA-SS-MTX-LA 的 3 300 cm⁻¹ 左右的伸缩振动吸收峰较 HA 的向低波数发生位移, 原因可能是羧基的 O-H 伸缩振动减少, 酰胺的 N-H 伸缩振动增加, 且有氢键的产生。在 HA-SS-MTX 的红外图谱中, 在 1 601 cm⁻¹ 和 1 511 cm⁻¹ 出现了 MTX 的芳香环的碳碳骨架振动特征峰, 在 691 cm⁻¹ 显示了单取代苯环的 C-H 面外弯曲振动的特征峰, 表明 HA-SS-MTX 成功合成。在 HA-SS-MTX-LA 的红外图谱中, 3 080 cm⁻¹ 是碳碳双键上的-CH 吸收峰, 1 640 cm⁻¹ 是 C=C 吸收峰和酰胺的羰基吸收峰的重叠峰, 表明 HA-SS-MTX-LA 成功合成。结果见图 3。

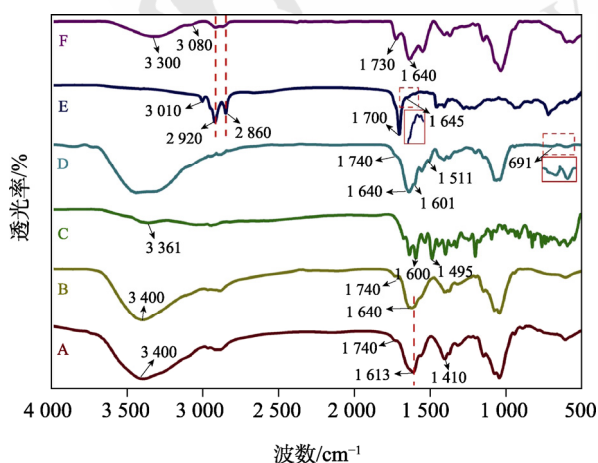


图3 化合物的傅里变换叶红外光谱图

A-HA; B-HA-CYS; C-MTX; D-HA-SS-MTX; E-LA; F-HA-SS-MTX-LA(1 : 1)。

Fig. 3 FI-IR spectra of compounds

A-HA; B-HA-CYS; C-MTX; D-HA-SS-MTX; E-LA; F-HA-SS-MTX-LA(1 : 1)。

2.3 临界聚集浓度(critical aggregation concentration, CAC)的测定

采用芘荧光探针法测定 HA-SS-MTX-LA 的 CAC。芘的荧光发射光谱在 330~350 nm 内有 5 个振动峰, 其中以 I₁(372 nm)和 I₃(383 nm)对质量浓度的对数作图, 交点处对应的质量浓度即为 CAC 值, 结果见图 4。HA-SS-MTX 与 LA 的摩尔投料比为 1 : 0.3, 1 : 0.5, 1 : 1 和 1 : 2 时的 CAC 分别为 84.17, 78.28, 60.50, 53.9 μg·mL⁻¹。随着 LA 取代度的增加, CAC 逐渐降低。

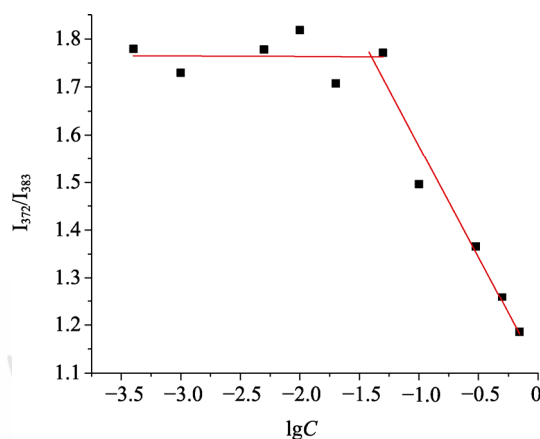


图4 HA-SS-MTX-LA(1 : 1)的 I₃₇₂/I₃₈₃-lg C 图

Fig. 4 Plot of I₃₇₂/I₃₈₃-lg C of HA-SS-MTX-LA (1 : 1)

2.4 HA-SS-MTX-LA NPs 的制备及粒径、Zeta 电位测定

采用超声法制备 HA-SS-MTX-LA NPs。称取 HA-SS-MTX-LA 置于蒸馏水中, 冰浴探头超声 10 min, 然后过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得自载药 NPs 悬液。测定其粒径和 Zeta 电位, 结果见表 1。HA-SS-MTX-LA NPs 粒径在 226.6~338.5 nm, 随着 LA 取代度的增加, 粒径呈现先减少后增加的趋势, 在 HA-SS-MTX 与 LA 的摩尔比为 1 : 1 时最小。HA-SS-MTX-LA NPs 的 Zeta 电位介于-23.07~-22.58 mV, 说明该 NPs 较稳定。综合粒径和 CAC 值, 选取 HA-SS-MTX 和 LA 的最佳摩尔投料比为 1 : 1。

表1 HA-SS-MTX-LA NPs 的粒径和 Zeta 电位($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 1 Particle size and Zeta potential of HA-SS-MTX-LA NPs($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

样品(HA-SS-MTX : LA)	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
HA-SS-MTX-LA(1 : 0.3)	338.5±3.6	0.189±0.027	-22.58±0.21
HA-SS-MTX-LA(1 : 0.5)	282.6±4.5	0.213±0.019	-22.61±0.13
HA-SS-MTX-LA(1 : 1)	226.6±2.5	0.180±0.036	-23.07±0.17
HA-SS-MTX-LA(1 : 2)	269.7±1.3	0.193±0.042	-22.97±0.11

2.5 HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs 的制备及处方优化

2.5.1 HCPT 含量测定方法的建立 采用 HPLC 测定 HA-SS-MTX-LA@HCPT 中 HCPT 的含量。

①色谱条件：色谱柱为 Phenomenex C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相为乙腈-水(25 : 75)；流速为 1.0 mL·min⁻¹；检测波长为 267 nm；柱温为 25 ℃；进样量为 20 μL。②专属性测定：分别称取适量 HCPT 原料药、HA-SS-MTX-LA NPs 及 HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs 溶于甲醇或水中，分别按①项下色谱条件进行测定，记录色谱图。结果显示：HCPT 的出峰时间大约在 9 min，峰形良好，且载体无干扰。检测限为 0.01 μg·mL⁻¹，定量限为 0.05 μg·mL⁻¹。③HCPT 标准曲线的制备：称取 HCPT 约 2.5 mg，用甲醇溶解并定容至 100 mL，得 25 μg·mL⁻¹ 的母液。分别移取不同体积的母液，适当稀释得 0.05, 0.1, 0.5, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0 μg·mL⁻¹ 的 HCPT 系列浓度，测定峰面积(A)。以 A 值对浓度(C)线性回归，得标准曲线方程 $A=85.701C-0.2769(R^2=0.9998)$ ，表明 HCPT 在 0.05~15.0 μg·mL⁻¹ 线性关系良好。④精密性：取适量 HCPT 母液，分别制成 0.05, 2.5, 15 μg·mL⁻¹ 的 HCPT 样品液，日内连续测定 3 次，计算日内精密性；连续测定 3 d，计算日间精密性。结果 3 种浓度的日内精密性 RSD 分别为 1.93%, 0.78% 和 0.11%，日间精密性 RSD 分别为 0.64%, 1.87% 和 0.30%，均满足方法学要求。⑤稳定性试验：移取同一 HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs 悬液 1 mL 于 5 mL 棕色量瓶中，加甲醇定容，超声 10 min。于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 测定峰面积，根据标准曲线计算 HCPT 浓度并计算 RSD。结果 RSD 值为 0.19%，满足方法学要求。

2.5.2 HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs 的制备 参考文献方法^[16]并作改进，采用乳化溶剂挥发法制备 HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs。精密称取 20 mg HCPT，置于 20 mL 棕色量瓶中，加入甲醇-二氯甲烷(1 : 1)混合溶剂超声溶解，定容，得 1 mg·mL⁻¹ 的 HCPT 溶液。精密称取 5 mg HA-SS-MTX-LA，置于西林瓶中，加入一定量的 HCPT 溶液，并补加甲醇-二氯甲烷(1 : 1)混合溶剂至 3 mL，待 HA-SS-MTX-LA 完全溶解后，在 15 000 r·min⁻¹ 下，将此溶液逐滴滴入适量蒸馏水中，室温下均质 5 min，形成初乳。将此初乳于探头超声条件下以

一定功率超声乳化数分钟后，34 ℃旋蒸 10 min 除去有机溶剂，所得 HA-SS-MTX-LA@HCPT 纳米悬液过 0.8 μm 微孔滤膜后，用蒸馏水定容至 25 mL，冰箱 4 ℃保存，备用。

2.5.3 HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs 中 HCPT 包封率和载药量测定 移取 HA-SS-MTX-LA@HCPT 纳米悬液 1 mL 于 5 mL 棕色量瓶中，用甲醇破坏 NPs 结构并溶解药物后，定容，摇匀。HPLC 测定其中 HCPT 浓度，计算包封率。HA-SS-MTX-LA@HCPT 纳米悬液冻干后，称重，同法测定，计算载药量。

包封率(%)=NPs 中药物的质量/投药量×100%

载药量(%)=NPs 中药物的质量/NPs 总质量×100%

2.5.4 HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs 处方工艺优化 以包封率和载药量的综合评分为指标，采用 Box-Behnken 设计-响应面法优化 HCPT 投药量(A)、水相/油相体积比(B)和超声时间(C)，采用 Design-expert 13 软件设计 3 因素 3 水平的 Box-Behnken 设计-响应面试验，综合评价各因素对响应值的影响[综合评分=(包封率/最大包封率×0.5+载药量/最大载药量×0.5)×100]。试验设计与结果见表 2，方差分析结果见表 3。

表 2 Box-Behnken 设计-响应面试验设计与结果
Tab. 2 Design and results of Box-Behnken design-response surface experiments

序号	A 投药量/mg	B 水相/油相体积比	C 超声时间/min	包封率/%	载药量/%	综合评分
1	0.2	2	15	59.26	1.51	39.45
2	1.0	2	15	51.87	5.37	48.62
3	0.2	10	15	79.93	3.00	56.55
4	1.0	10	15	60.79	11.40	74.80
5	0.2	6	10	85.77	3.55	61.83
6	1.0	6	10	65.31	10.89	75.62
7	0.2	6	20	86.71	5.78	70.16
8	1.0	6	20	56.24	14.34	82.43
9	0.6	2	10	57.17	3.37	44.73
10	0.6	10	10	55.90	6.49	54.87
11	0.6	2	20	44.42	3.02	36.13
12	0.6	10	20	65.70	8.16	66.33
13	0.6	6	15	73.65	9.82	76.71
14	0.6	6	15	78.78	10.50	82.06
15	0.6	6	15	80.43	9.65	80.04
16	0.6	6	15	76.42	10.58	80.97
17	0.6	6	15	76.64	9.51	77.37

表 3 Box-Behnken 设计-响应面模型的方差分析结果
Tab. 3 Variance analysis result of Box-Behnken design-response surface model

来源	平方和	自由度	均方	F	P
Model	3 910.82	9	434.53	73.44	<0.000 1
A	357.62	1	357.62	60.44	0.000 1
B	873.81	1	873.81	47.68	<0.000 1
C	40.47	1	40.47	6.84	0.034 6
AB	20.60	1	20.61	3.48	0.104 3
AC	0.58	1	0.58	0.10	0.763 9
BC	100.61	1	100.61	17.00	0.004 4
A ²	7.02	1	7.02	1.19	0.312 1
B ²	2 283.21	1	2 283.21	385.89	<0.000 1
C ²	133.39	1	133.39	22.54	0.002 1
残差	41.42	7	5.92		
失拟项	20.17	3	6.72	1.27	0.398 7
纯误差	21.25	4	5.31		
总差	3 952.23	16			

通过 Design-Expert 13 软件对结果进行模型拟合, 得到二次多项方程: 综合评分=79.43+6.69A+10.45B+2.25C+2.27AB-0.379 8AC+5.02BC-1.29A²-23.29B²-5.63C², 进一步对结果进行分析, 得到三维响应面图, 见图 5。由表 3 可知, 该模型具有显著性差异($P<0.001$); 失拟项中 P 为 0.398 7, 表示失拟项不显著, 说明该模型拟合程度较好, 可信度高。一次项中投药量(A)和水相/油相体积比(B)对综合评分的影响极显著, 超声时间(C)不显著; 二次项中 B² 和 C² 对综合评分的影响均显著, A² 不显著, 交互项中 AB、AC、BC 对综合评分的影响均不显著, 参照表 3 中 F 值的大小可得出结论: 3 个因素对综合评分的影响程度为投药量(A)>水相/油相体积比(B)>超声时间(C)。

对回归拟合方程进行求解, 得出 HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs 的最优处方工艺为 A=0.762、B=6.9、C=15.704, 此条件下, 预测包封率为 73.58%, 载药量为 11.83%, 综合评分为 83.67。根据试验和实际操作可行性, 调整修正后的 NPs 最优处方工艺: 投药量为 0.8 mg, 水相/油相体积比为 7, 超声时间为 15 min。在此条件下进行验证试验, 得到 NPs 的包封率为(72.46±0.73)%、载药量为(11.51±0.32)%, 综合评分为 81.93±0.75, 同模型预测值的相对误差仅为 2.07%, 说明响应面法对 NPs 的处方工艺优化得到的处方条件参数准确可靠, 具有一定应用价值。

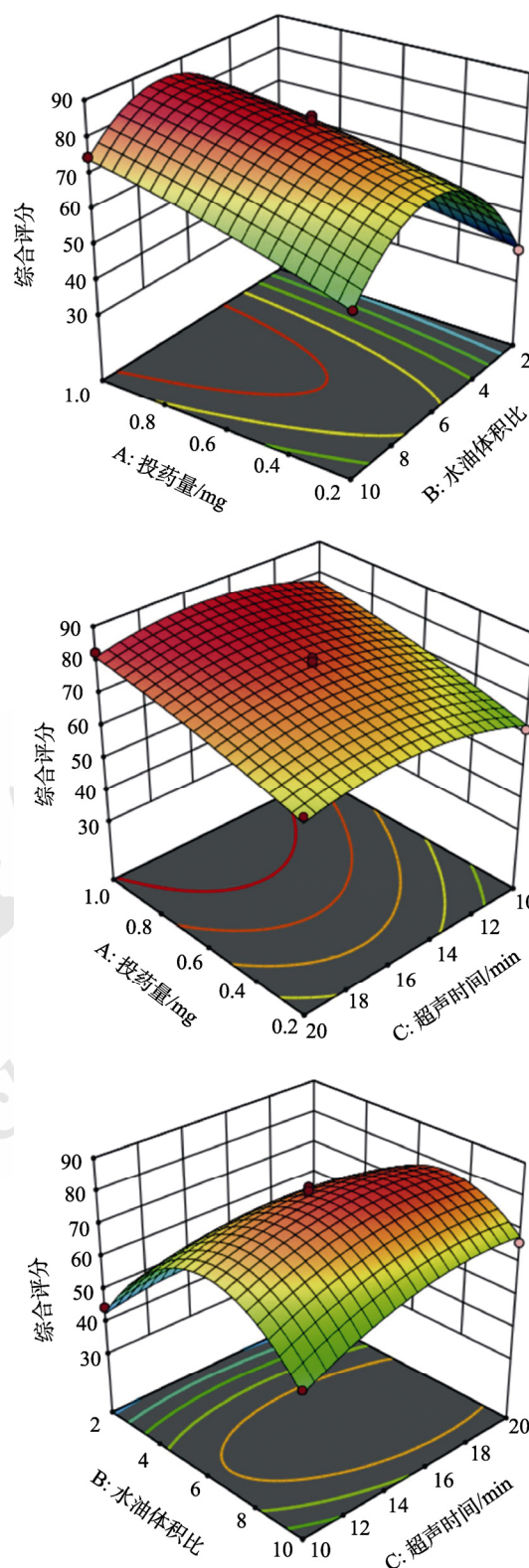


图 5 两因素交互作用对综合评分影响的响应面图
Fig. 5 Response surface diagram of two-factor interaction affecting comprehensive score

2.5.5 HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs 粒径及形态
纳米粒度和 Zeta 电位分析仪测得 HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs 的粒径为(257.59±1.41)nm, PDI

为 0.132 ± 0.009 , Zeta 电位为 $(-21.94 \pm 0.51) \text{ mV}$ 。透射电镜结果见图 6, 由图可知, HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs 为类球形, 无黏连现象。透射电镜显示 NPs 粒径约为 170 nm 左右, 小于纳米粒度仪测定结果, 可能与透射电镜制样时 NPs 失水有关。

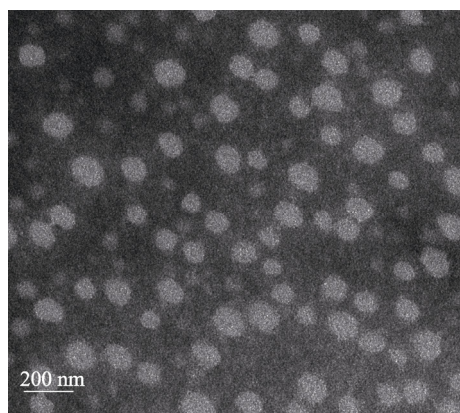


图 6 HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs 的透射电镜图(20 000 $\times$)
Fig. 6 TEM photograph of HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs (20 000 $\times$)

2.5.6 HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs 初步稳定性考察 将制备的 3 批 HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存, 连续 7 d 测定其粒径、PDI 和 HCPT 包封率, 考察其稳定性。粒径和包封率变化见图 7, PDI 在 0.136~0.142, 变化不大, 平均粒径和包封率未发生明显变化, 初步稳定性考察显示该 NPs 稳定性良好。

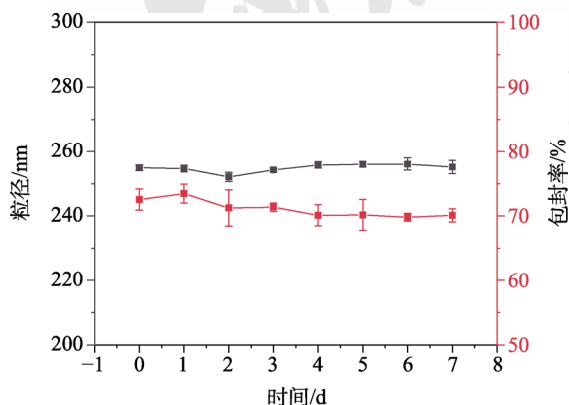


图 7 HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs 初步稳定性($n=3$)
Fig. 7 Preliminary stability of HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs($n=3$)

2.6 HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs 的体外释放

采用动态透析法对 HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs 的体外释放进行考察。精密移取 HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs[其中 MTX 和 HCPT 的载药量分别为 $(10.41 \pm 0.15)\%$, $(11.51 \pm 0.32)\%$] 悬液

5 mL, 置于预先处理好的透析袋中, 透析袋两端固定, 分别以不含 GSH 和含 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH 的 PBS 溶液(含 0.5%吐温 80)作为释放介质, 然后放入装有 100 mL 释放介质的烧杯中, 透析袋完全没入液面以下, 同时以 MTX 原料药溶液、HCPT 原料药溶液作为对照。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床中以 100 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡, 分别于 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48, 72 h 取出 5 mL 释放介质, 并补充等温等量的新鲜释放介质。取出的释放液加 200 μL 冰醋酸酸化 2 h, 样品经微孔滤膜过滤后, 按“2.5.1”项下的色谱条件进样, 测定 HCPT 浓度, 计算 HCPT 的累积释放率并绘制释放曲线, 结果见图 8A。采用 HPLC 测定 MTX 的标准曲线^[17], 拟合得 $A=58.828C-1.2063 (R^2=1)$, 计算 MTX 的累积释放率并绘制释放曲线, 结果见图 8B。

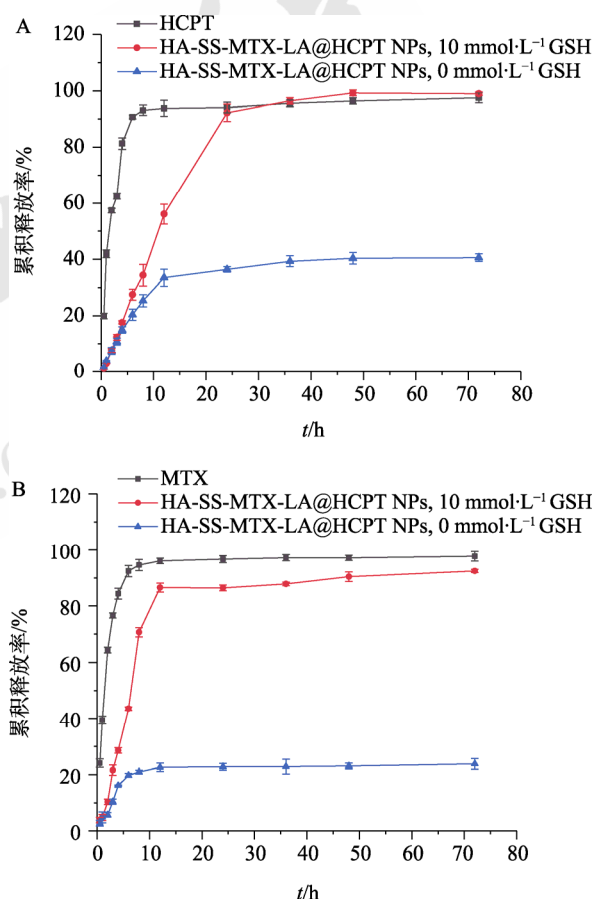


图 8 HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs 的体外释放曲线
A-HCPT; B-MTX。

Fig. 8 *In vitro* drug release profiles of HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs
A-HCPT; B-MTX.

由于 HCPT 难溶于水, 通过在释放介质中加入少量吐温 80 增加 HCPT 的溶解度。由图 8 可知,

HCPT 原料药和 MTX 原料药在 6 h 时累积释放率均已达到 90%，HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs 在 0 mmol·L⁻¹ GSH 中 HCPT 的累积释放率在 30%左右，MTX 的累积释放率在 20%左右。原因可能是 HCPT 是物理包埋，MTX 是共价结合，故 MTX 的释放比 HCPT 更慢。HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs 在 10 mmol·L⁻¹ GSH 中二硫键响应断裂，药物快速释放，HCPT 在 24 h 时累积释放率达 90%，MTX 在 12 h 时累积释放率达到 90%左右，表明 HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs 具有显著的还原响应性。

2.7 HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs 的体外抗肿瘤活性

采用 MTT 法考察 HCPT 溶液、MTX 溶液、HCPT+MTX 混合溶液、HA-SS-MTX-LA NPs 悬液和 HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs 悬液对 HepG2 细胞、Bel-7402 细胞的体外抗肿瘤活性。将细胞以每孔 1×10⁴ 个的密度接种于 96 孔板中，37 ℃培养箱中培养 24 h，弃去培养液，试验组加入 200 μL

不同浓度的 HCPT 溶液、MTX 溶液、HCPT+MTX 混合溶液、HA-SS-MTX-LA NPs 悬液或 HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs 悬液。对照组加入等体积培养基，每组 5 个复孔，培养 48 h 后，每孔加入 10 μL MTT (5 mg·mL⁻¹) 后培养 4 h，终止培养并弃去上清，每孔加入 150 μL DMSO，避光振荡 10 min 后于 490 nm 处测定吸光度(A)，计算细胞抑制率 [细胞抑制率(%)=(A_{对照}-A_{试验})/(A_{对照}-A_{空白})×100%]。

由图 9 可知，Bel-7402 细胞和 HepG2 细胞表现出相同的趋势。与单独给药组相比，HCPT+MTX 混合溶液组对细胞的杀伤作用更强，主要是 MTX 和 HCPT 联合应用产生了协同效应，通过不同的途径和通路抑制肿瘤细胞增殖，诱导肿瘤细胞凋亡。HA-SS-MTX-LA NPs 组比 MTX 溶液组表现出更高的细胞抑制率，可能是 HA 靶向 CD44 受体的作用以及 NPs 中引入了还原响应的二硫键有关。HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs 组较单独给药组有更显著的细胞抑制率，比 HCPT+MTX 混合溶液组

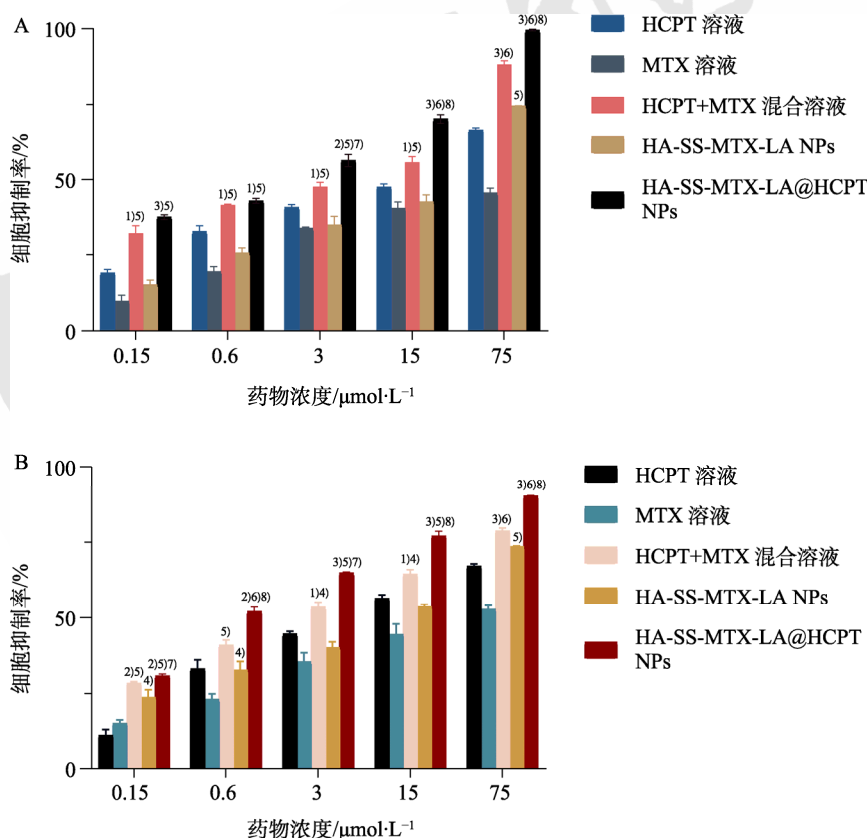


图 9 HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs 对肝癌细胞生长的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

A-Bel-7402 细胞; B-HepG2 细胞; 与 HCPT 溶液组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$; 与 MTX 溶液组相比, ⁴⁾ $P<0.05$, ⁵⁾ $P<0.01$, ⁶⁾ $P<0.001$; 与 HCPT+MTX 混合溶液组相比, ⁷⁾ $P<0.05$, ⁸⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 9 Effect of HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs on growth of liver cancer cell($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

A-Bel-7402 cells; B-HepG2 cells. Compared with HCPT group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$; compared with MTX group, ⁴⁾ $P<0.05$, ⁵⁾ $P<0.01$, ⁶⁾ $P<0.001$; compared with HCPT+MTX mixed solution group, ⁷⁾ $P<0.05$, ⁸⁾ $P<0.01$ 。

表现出显著的抑制细胞增殖现象,表明将两者制成共载药 NPs 具有更好的抗肿瘤效果。

3 讨论

本研究成功制得 HA-SS-MTX-LA NPs,并共载 HCPT 制得 HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs。随着 LA 取代度增大,HA-SS-MTX-LA NPs 粒径呈现先减小后增加的趋势,这可能是因为更多疏水链 LA 的引入可以增强 HA-SS-MTX-LA 分子内/间的疏水作用,有利于形成更加紧密的内核;而随着取代度的进一步增大,粒径并未继续减小,反而增大,这可能是因为过多疏水链的引入降低了 HA-SS-MTX-LA 的溶解度,从而限制了偶联物分子的进一步卷绕。此外,随着 LA 取代度增大,HA-SS-MTX-LA 的 CAC 值呈现减小的趋势,原因可能在于更多 LA 的接枝使偶联物的疏水性增强,会增强分子内/间的疏水作用,可以促进两亲性聚合物的自组装行为。

利用 HA-SS-MTX-LA NPs 的疏水内核包载疏水药物 HCPT 时,预试验曾采用透析法、溶剂扩散法制备 NPs,但有大量药物析出,包封率和载药量均很低。与之相比,采用乳化溶剂挥发法制得的 HA-SS-MTX-LA@HCPT 的包封率和载药量均有明显提高。

体外释放结果表明,HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs 在含 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ GSH 的 PBS 中 24 h HCPT 和 MTX 的累积释放率可达约 90%,而不含 GSH 的 PBS 中的 MTX 累积释放率 $<30\%$,表明 HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs 具有明显的还原响应性。这为 NPs 到达肿瘤细胞后,由于肿瘤环境中较高浓度的 GSH 可以使二硫键断裂,破坏 NPs,释放药物,从而实现定位浓集释药并减轻其不良反应的设计提供了必要的实验依据。

体外抗肿瘤活性试验表明 HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs 对人肝癌细胞 HepG2 细胞和 Bel-7402 细胞的抑制作用最强,这与 NPs 中引入了还原响应的二硫键有关,以及与该 NPs 中有 CD44 受体靶头有关,更与 MTX 和 HCPT 联合给药发挥协同效应有关。HCPT 主要通过抑制拓扑异构酶 I 的活性来发挥抗肿瘤作用,拓扑异构酶 I 是一种与 DNA 复制、重组和转录有关的细胞核内酶。当细胞 DNA 复制时,拓扑异构酶 I 剪切 DNA 双链形成拓扑异构酶 I-DNA 可裂解复合物,HCPT 能与其结合,形成 HCPT-拓扑异构酶 I-DNA 三元复合物,使可

逆的可解离复合物转变成不可逆的复合物,抑制由拓扑异构酶 I 介导的 DNA 裂解和重新连接反应,最终引起 DNA 链断裂,从而导致细胞死亡^[18]。MTX 是一种抗叶酸类抗肿瘤药物,与二氢叶酸还原酶的结合能力比二氢叶酸强 1 000 倍,几乎能不可逆地结合二氢叶酸还原酶,主要抑制二氢叶酸还原酶而使二氢叶酸不能还原成具有生理活性的四氢叶酸,从而使嘌呤核苷酸和嘧啶核苷酸的生物合成过程受阻,使 DNA 的生物合成受到抑制,从而导致细胞死亡^[19]。MTX、HCPT 通过不同机制发挥作用,二者联用可使制剂通过多重机制发挥作用,从而达到更好的抗肿瘤作用。

本研究成功合成药物-聚合物偶联物 HA-SS-MTX-LA,并制得 HA-SS-MTX-LA NPs 和 HA-SS-MTX-LA@HCPT NPs,该 NPs 具有明显的还原响应性和良好的共载药性能,有望能够实现多重靶向,并能在细胞内浓集定位触发释放,从而有利于所包载化疗药在体内疗效的发挥,这些功能将在后续实验中进一步加以确证。

REFERENCES

- [1] SHI J J, KANTOFF P W, WOOSTER R, et al. Cancer nanomedicine: Progress, challenges and opportunities[J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(1): 20-37.
- [2] LIU W Z, MA Z J, WANG Y G, et al. Multiple nano-drug delivery systems for intervertebral disc degeneration: Current status and future perspectives[J]. *Bioact Mater*, 2022(23): 274-299.
- [3] SUN Q H, ZHOU Z X, QIU N S, et al. Rational design of cancer nanomedicine: Nanoproperty integration and synchronization[J]. *Adv Mater*, 2017, 29(14): 1606628.
- [4] KOO H, HUH M S, SUN I C, et al. *In vivo* targeted delivery of nanoparticles for theranosis[J]. *Acc Chem Res*, 2011, 44(10): 1018-1028.
- [5] ZHANG R, JIANG Y Y, HAO L K, et al. CD44/folate dual targeting receptor reductive response PLGA-based micelles for cancer therapy[J]. *Front Pharmacol*, 2022(13): 829590.
- [6] BAHRAMIZADEH M, BAHRAMIZADEH M, KIAFAR B, et al. Development, characterization and evaluation of topical methotrexate-entrapped deformable liposome on imiquimod-induced psoriasis in a mouse model[J]. *Int J Pharm*, 2019(569): 118623.
- [7] SULLIVAN M R, DARNELL A M, REILLY M F, et al. Methionine synthase is essential for cancer cell proliferation in physiological folate environments[J]. *Nat Metab*, 2021, 3(11): 1500-1511.
- [8] YANG J Y, XU J Y, WU X M, et al. Research on the anti-tumor natural products[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国

- 现代应用药学), 2007, 24(4): 277-282.
- [9] ZHANG Y B, LI Y, TIAN H N, et al. Redox-responsive and dual-targeting hyaluronic acid-methotrexate prodrug self-assembling nanoparticles for enhancing intracellular drug self-delivery[J]. Mol Pharm, 2019, 16(7): 3133-3144.
- [10] YIN T J, LIU J Y, ZHAO Z K, et al. Redox sensitive hyaluronic acid-decorated graphene oxide for photothermally controlled tumor-cytoplasm-selective rapid drug delivery[J]. Adv Funct Mater, 2017, 27(14): 1604620.
- [11] CHOI K Y, MIN K H, YOON H Y, et al. PEGylation of hyaluronic acid nanoparticles improves tumor targetability *in vivo*[J]. Biomaterials, 2011, 32(7): 1880-1889.
- [12] LI Y, LIN J Y, WU H J, et al. Novel methotrexate prodrug-targeted drug delivery system based on PEG-lipid-PLA hybrid nanoparticles for enhanced anticancer efficacy and reduced toxicity of mitomycin C[J]. J Mater Chem B, 2014, 2(38): 6534-6548.
- [13] HUERTA-ÁNGELES G, BRANDEJSOVÁ M, KOPECKÁ K, et al. Synthesis and physicochemical characterization of undecylenic acid grafted to hyaluronan for encapsulation of antioxidants and chemical crosslinking[J]. Polymers (Basel), 2019, 12(1): 35.
- [14] SONG Y, WEI S M, YU Y Y, et al. Preparation and evaluation of redox-sensitive hyaluronic acid-glycyrrhetinic acid conjugate micelles[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2022, 39(10): 1322-1329.
- [15] CURCIO M, DIAZ-GOMEZ L, CIRILLO G, et al. Dual-targeted hyaluronic acid/albumin micelle-like nanoparticles for the vectorization of doxorubicin[J]. Pharmaceutics, 2021, 13(3): 304.
- [16] ZHAO S, XIAO Q M, ZHU Q H, et al. Optimization of the preparation of camptothecin loaded mPEG-S-S-C18 nanoparticles by central composite design-response surface method[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2019, 36(10): 1173-1177.
- [17] WEI M, XIAO Y. Determination of methotrexate in human serum by HPLC[J]. Guangxi Med J(广西医学), 2006, 28(2): 248-249.
- [18] CHEN Q H, YU F, LI P, et al. Research on the effect of camptothecin and its derivatives on proliferation and apoptosis of liver cancer cell HepG2[J]. Pract Pharm Clin Rem(实用药物与临床), 2016, 19(3): 272-275.
- [19] FAN Z X, WANG Y Q, XIANG S J, et al. Dual-self-recognizing, stimulus-responsive and carrier-free methotrexate-mannose conjugate nanoparticles with highly synergistic chemotherapeutic effects[J]. J Mater Chem B, 2020, 8(9): 1922-1934.

收稿日期: 2023-01-02
(本文责编: 沈倩)