坎地沙坦-雷公藤红素共载还原敏感胶束的制备及制剂学评价

李禄辉1,郭 允2,余文洁3, 蒲晓辉3*

1. 河南应用技术职业学院 医药学院,河南 开封 475004

- 2. 郑州卫生健康职业学院 基础医学系,河南 郑州 450199
- 3. 河南大学 药学院, 河南 开封 475004

摘 要:目的 制备坎地沙坦(CD)-雷公藤红素(CEL)共载还原敏感胶束,并对其进行制剂学评价。方法 以合成的具 有还原敏感性的透明质酸-胱氨-CD(HCCD)作为聚合物材料,透明质酸-1,6-己二胺-CD(HHCD)作为非还原敏感对照, 单因素法进行制备方法、溶剂、CEL与HCCD质量比的筛选,制备HHCD、HCCD、HHCD/CEL、HCCD/CEL4种聚合 物胶束。采用花-丙酮法测定样品的临界胶束浓度;应用电位粒径测定仪分析各胶束粒径、聚合物分散性指数(PDI)、 Zeta电位;HPLC法检测载药量、包封率;透射电镜法观察形态;进行各胶束储存稳定性、血浆稳定性、冻干粉复溶稳 定性考察及溶血情况考察;考察0、10µmol·L⁻¹、10、20 mmol·L⁻¹谷胱甘肽(GSH)对胶束粒径的影响;考察在含0、 10µmol·L⁻¹、10、20 mmol·L⁻¹ GSH 的释放介质中HHCD/CEL、HCCD/CEL 体外释放行为。结果 制备的HHCD、HCCD 的临界胶束浓度值约为4.5µg·mL⁻¹,4种胶束的粒径在200 nm 左右,PDI均小于0.2,且分布较为均匀;4种聚合物胶束的 电位分别为-24.7、-29.2、-25.9、-32.1 mV;4种胶束的载药量和包封率分别在8.9%和73%以上;4种胶束的形态均呈类球 形,稳定性良好,不发生溶血;HHCD/CEL胶束在浓度为0、10µmol·L⁻¹、10、20 mmol·L⁻¹的GSH条件下粒径均无明显变 化,而HCCD/CEL胶束在GSH的浓度为10、20 mmol·L⁻¹时粒径发生明显的变化;在GSH浓度为0、10µmol·L⁻¹时,2种 聚合物胶束中的药物在48h内的释放量均在21%左右。在GSH的浓度为10 mmol·L⁻¹时,HCCD/CEL中的2种药物在24h 内累积释放量分别为40%、50%左右;在GSH浓度为20 mmol·L⁻¹时,HCCD/CEL 具有良好的稳定性、还原敏感性。 关键词:雷公藤红素;坎地沙坦;还原敏感胶束;制备;表征

中图分类号: R943 文献标志码: A 文章编号: 1674 - 6376(2025)06 - 1557 - 11 **DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.06.016

Formulation and assessment of pharmaceutical properties of candesartancelastrol co-loading reduction sensitive micelles

LI Luhui¹, GUO Yun², YU Wenjie³, PU Xiaohui³

- 1. School of Medicine, Henan Technical Institute, Kaifeng 475004, China
- 2. Department of Basic Medicine, Zhengzhou Health Vocational College, Zhengzhou 450199, China
- 3. School of Pharmacy, Henan University, Kaifeng 475004, China

Abstract: Objective To prepare redox-sensitive prodrug micelles co-loaded with candesartan (CD) and celastrol (CEL) and evaluate their pharmaceutical properties. **Methods** The synthesized hyaluronic acid-cystamine-candesartan (HCCD) with reductive sensitivity was used as the polymer material, and hyaluronic acid-1,6-hexanediamine-candesartan (HHCD) was used as the non-reductive sensitive control. The preparation method, solvent, and the mass ratio of CEL to HCCD were screened by the single-factor method to prepare four types of polymer micelles: HHCD, HCCD, HHCD/CEL, and HCCD/CEL. The critical micelle concentration (CMC) of the samples was determined by the pyrene-acetone method. The particle size, polydispersity index (PDI), and Zeta potential of each micelle were analyzed by a particle size analyzer. The drug loading and encapsulation efficiency were detected by HPLC. The morphology was observed by transmission electron microscopy. The storage stability, plasma stability, and reconstitution stability of the freeze-dried

```
收稿日期: 2025-01-25
```

基金项目:河南省科技攻关项目(232102311178,252102311282);河南省高等学校重点科研项目(24A350002,25B350003);开封市科技攻 关项目(2403002)

作者简介:李禄辉(1980—),男,副教授,研究方向为药物新剂型及质量分析。E-mail: 120800813@qq.com

^{*}通信作者:蒲晓辉(1980—),男,博士,教授,研究方向为药物新剂型及质量分析。E-mail: pgh425@163.com

powder of each micelle were investigated, as well as the hemolysis situation. The effects of 0, 10 μ mol·L⁻¹, 10, and 20 mmol·L⁻¹ glutathione (GSH) on the particle size of the micelles were investigated. The *in vitro* release behaviors of HHCD/CEL and HCCD/CEL in release media containing 0, 10 μ mol·L⁻¹, 10, and 20 mmol·L⁻¹ GSH were also investigated. **Results** The CMC values of HHCD and HCCD were approximately 4.5 μ g·mL⁻¹. The particle sizes of the four types of micelles were around 200 nm, and the PDI was less than 0.2, with a relatively uniform distribution. The potentials of the four types of micelles were -24.7, -29.2, -25.9, and -32.1 mV, respectively. The drug loading and encapsulation efficiency of the four types of micelles were above 8.9% and 73%, respectively. The morphologies of the four types of micelles were all spherical-like, with good stability and no hemolysis. The particle size of HHCD/CEL micelles did not change significantly under GSH concentrations of 0, 10 μ mol·L⁻¹, 10, and 20 mmol·L⁻¹, while the particle size of HCCD/CEL micelles changed significantly at GSH concentrations of 10 and 20 mmol·L⁻¹. At GSH concentrations of 0 and 10 μ mol·L⁻¹, the cumulative release of the two drugs in the two types of micelles within 24 h was approximately 21%. At a GSH concentration of 20 mmol·L⁻¹, the cumulative release of CD and CEL in HCCD/CEL reached approximately 70% and 80% within 24 h and 48 h, respectively. **Conclusion** The prepared reductive-sensitive micelles HCCD/CEL have good stability and reductive sensitivity.

Key words: celastrol; candesartan; reduction sensitive micelle; manufacture; characterization

肝癌是一种全球范围内常见的恶性肿瘤,其高 发病率与死亡率对人类健康构成了严峻的挑战。尽 管传统的化疗和放疗手段在肝癌的治疗历程中已 取得了一定的成效,但这些疗法的副作用大、易复 发和转移等局限性同样不容忽视^[1]。

联合用药策略为肝癌治疗带来了新的曙光。通过 巧妙地结合不同药物的作用机制,联合用药能够显著 增强对肿瘤细胞的杀伤力,同时有效减少耐药性的产 生。更重要的是,还能通过降低单一药物的剂量,减 轻副作用,提升患者生活质量。因此,联合用药已成 为肿瘤治疗中延长生存期、改善预后的关键手段^[2]。

雷公藤红素(CEL)作为一种具有多重药理作 用的中药成分,近年来在抗癌研究中展现出了巨大 潜力。坎地沙坦(CD)被发现具有减少肿瘤基质胶 原生成、促进肿瘤血管正常化的独特功效,能够显 著增强抗癌药物对肿瘤实质的渗透能力^[3]。因此, 将 CEL 与 CD 联合用药,有望产生强大的协同作 用,共同抑制肿瘤的增殖、侵袭与转移。

CEL 与 CD 在临床应用中面临水溶性差、生物 利用度低、缺乏肿瘤靶向性,以及 CEL 潜在的肝脏、 肾脏、生殖系统及骨髓毒性等局限^[4-6],严重阻碍了 其广泛应用。为了克服这些难题,本课题组创造性地 引入了纳米递药系统 (NDDS),凭借其尺寸效应、 性质可调性、载药多样性及靶向性等独特优势,为 CEL 与 CD 的临床应用提供了新的解决方案^[7]。

因肿瘤中还原剂和活性氧的细胞内、外浓度不同,还原和氧化还原敏感的聚合物前药胶束可以更精确地在肿瘤细胞内释放药物^[8],本研究基于前期合成的还原敏感性聚合物前药透明质酸(HA)-胱

氨(CYS)-CD(HCCD),通过优化工艺,制备 HCCD 胶束及负载 CEL 的 HCCD/CEL 聚合物胶束,以非 还原性聚合物前药 HA-1,6-己二胺(HEX)-CD (HHCD)作对照,并进行制剂学性质评价,以期 为后续药理药效研究奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

马尔文 Nano-ZS90 电位粒径测定仪(英国马尔 文公司); DZF-6050 型真空干燥箱(精宏有限责任 公司); 磁力搅拌器(河南爱博特科技发展有限公 司); 高效液相色谱仪 LC-20AT(日本岛津仪器有限 公司); 荧光分光光度计 F-4600(株式会社日立高 新技术集团)。

1.2 药品与试剂

CEL(批号JZ21052314,质量分数95.3%),购自南京景竹生物科技有限公司;CD(批号B2021060,质量分数99.5%),购自上海阿拉丁生化科技有限公司;色谱甲醇(批号20221013),购自天津四友精细化学品有限公司;二甲基亚砜(批号2021060702),购自成都市科隆化学品有限公司;丙酮(批号210319),购自洛阳浩华化学试剂有限公司;无水乙醇(批号20220915),购自天津市富字精细化工有限公司;0.9%的氯化钠溶液(批号14B22060501),购自山东齐都药业有限公司。

HCCD、HHCD 均由河南大学蒲晓辉教授实验 室合成,合成方法如下:把 CYS 作为连接臂,通过 酰胺反应将其一端氨基接枝到 HA 上,得到产物 HA-CYS,将 CYS 的另一端氨基与 CD 上的羧基以 酰胺键的形式结合,合成 HA-CYS-CD (HCCD)。 另外,用 HEX 代替 CYS 作为连接臂,通过酰胺 键将 HEX 与 HA 反应,得到产物 HA-HEX,将 CD 上的羧基与 HEX 上的氨基以酰胺键的形式结 合,合成最终对照聚合物材料 HA-HEX-CD (HHCD),采用红外、核磁对合成的两种前药进行 表征,确认 2 种前药均合成成功,终产率分别为 36.7%、36.5%。本部分内容另行发表。

2 方法与结果

2.1 CD、CEL HPLC 分析方法的建立

2.1.1 溶液的制备

(1) CD、CEL 对照溶液的制备:精密称取适量 CD、CEL,分别用甲醇溶解,定容,使样品的质量浓度分别为 400、100 μg·mL⁻¹,即得对照储备液。

(2)供试品溶液的制备:称取按照"2.2.1"项 下最优制备方法制备的聚合物胶束 HCCD、 HCCD/CEL、HHCD、HHCD/CEL适量,分别置于 量瓶中,用甲醇溶解,定容,即得供试品溶液,CEL 的质量浓度约为 20 μg·mL⁻¹。

2.1.2 色谱条件 KROMASIL ODS-1 色谱柱 (200 mm×4.6 mm, 5 µm); 柱温 25 ℃,体积流量 1.0 mL·min⁻¹,进样量 20 µL。其中,CD 的流动相为甲醇-0.1%磷酸缓冲液(60:40),检测波长为 251 nm; CEL 的流动相为甲醇-0.1%醋酸水(93:7),检测波长为 425 nm。

2.1.3 专属性试验 取 "2.1.1 (1)"项下的对照储 备液,用甲醇进行稀释,使 CD 和 CEL 的质量浓 度分别为 20、100 μg·mL⁻¹,样品经 0.22 μm 有机 滤膜滤过,按 "2.1.2"项下的色谱条件进样,记录 色谱图,结果见图 1。由图 1 可知 CD 保留时间在 3.4 min, CEL 保留时间在 5.3 min,阴性对照品溶液 则在这 2 处均无吸收,不会对二者测定造成干扰,



图 1 阴性对照品(A)、CD 对照品(B)、CEL 对照品 (C)、胶束中 CD(D)、胶束中 CEL(E)高效液相色谱图 Fig. 1 HPLC chromatogram of negative control (A), CD reference substance (B), CEL reference substance (C), CD in micelles (D), CEL in micelles (E)

同样胶束中 CD 和 CEL 保留时间均一致,表明该方法专属性强。

2.1.4 CD 和 CEL 线性范围的建立 将"2.1.1 (1)" 中项下的 CD 对照储备液依次稀释为 100.0、80.0、 40.0、20.0、10.0、5.0、2.5 μg·mL⁻¹,过 0.22 μm 滤 膜,在"2.1.2"项的色谱条件下进样,记录样品的 峰面积。以样品的质量浓度作为 *X* 轴,样品峰面积 作为 *Y* 轴,即得 CD 的线性回归方程 *Y*=40 687 *X*-33 133 (*R*²=0.999 7)。将 CEL 的对照储备液依次 稀释为 400.0、300.0、200.0、100.0、50.0、25.0、 12.5 μg·mL⁻¹,同法操作,即得 CEL 的线性回归方 程 *Y*=26 404 *X*-25 347 (*r*²=0.999 8),结果表明 CD 和 CEL 在线性范围内线性关系良好。

2.1.5 重复性试验 取 "2.2.1"项下方法的筛选溶 剂挥发法制备 HHCD/CEL,按 "2.1.1 (2)"项下供 试品溶液的制备方法制备供试品溶液 6 份,按"2.1.2" 项下的色谱条件进样,依据峰面积计算样品的浓度, 并计算 RSD。CD 和 CEL 的重复性 RSD 分别为 0.67%、0.46%。

2.1.6 精密度试验 将"2.1.1 (1)"项下的对照 储备液取适量转到量瓶中,甲醇稀释,定容,使 CD和CEL的质量浓度分别为20、100μg·mL⁻¹, 过滤后转移到样品瓶,按"2.1.2"项下的色谱条 件进样,重复进样3次,连续3d,依据峰面积 计算样品的浓度,并计算RSD。CD和CEL的目 间精密度RSD分别为0.73%、0.64%,日内精密 度RSD分别为0.46%、0.66%,表明该方法的精 密度良好。

2.1.7 稳定性试验 取 "2.1.1 (1)"项下的对照储 备液适量,稀释至低、中、高 3 个质量浓度 (CD 和 CEL 的质量浓度分别为 5、25、80 µg·mL⁻¹和 25、 100、300 µg·mL⁻¹),每个质量浓度各 3 份,在室温 (25 ℃)条件下存放,分别于 0、2、4、6、8、10、 12 h 进行取样,滤过,按 "2.1.2"项下色谱条件进 样,依据峰面积计算样品的质量浓度以及 RSD 值。 CD、CEL 在 12 h 内的不同质量浓度下的 RSD 值均 低于 2%,表明样品的稳定性良好。

2.1.8 加样回收率试验 取供试品溶液 (*n*=9)适 量置于量瓶中,将对照品储备液稀释为低、中、 高 (*n*=3)3 个浓度 (CD 和 CEL 的质量浓度分别 为5、25、80 μg·mL⁻¹和 25、100、300 μg·mL⁻¹), 分别等体积加入到上述 9 个供试品溶液中,用甲醇 稀释并定容,滤过,在"2.1.2"项的色谱条件下进 样,依据峰面积计算出样品的质量浓度,计算样品 的加样回收率及 RSD 值。加样回收率均在 98%~ 102%, RSD 也均小于 2%,表明该方法回收率良好。

2.2 聚合物胶束的制备

2.2.1 制备方法的筛选 分别采用溶剂挥发法、 薄膜分散法和透析法制备 HCCD、HCCD/CEL 胶 束溶液,以粒径、聚合物分散性指数 (PDI)、Zeta 电位、载药量、包封率作为考察指标进行制备方 法的筛选。

(1)溶剂挥发法:精密称取 HCCD 6 份,每 份约为 10 mg,分别置于 EP 管内。其中 3 份中加 入 1 mg 的 CEL,制备载药聚合物胶束,其他制备 空白胶束。6 份样品均用 2 mL 无水乙醇溶剂超声溶 解,备用。然后用量筒量取 15 mL 超纯水置于烧杯 中,将其放置在磁力搅拌器上,将磁力搅拌器的转 速调为 1 800 r·min⁻¹,待转速稳定后将胶束溶液逐 滴滴加到烧杯中,搅拌至有机溶剂挥发完全,超声 波细胞粉碎机在 60 W 功率,工作 5 s、间歇 10 s 的 工作状态下工作 10 min,再将溶液以 635.92 g 离心 10 min,即得胶束溶液。

(2)薄膜分散法:精密称取 HCCD 6 份,每 份约 10 mg,置于茄形瓶中,称取 3 份 1 mg 的 CEL 分别将其置于其中 3 份前药聚合物中,制备载药胶 束,其余的则制备空白胶束,二者均用 2 mL 的无 水乙醇水浴超声(100 W)溶解,随后向茄形瓶中 加入转子,将茄形瓶置于磁力搅拌器上,使其高 速旋转,转速为 1 800 r·min⁻¹,大约 2 h 后,将茄 形瓶内的转子取出,再用旋转蒸发仪将茄形瓶内 的有机溶剂旋干,即可在茄形瓶内层看到一层薄 且完整的膜。随后将茄形瓶置于恒温烘箱中,过 夜,次日用量筒量取 15 mL 超纯水置于茄形瓶中 进行水浴超声(100 W)水化,同时在 1 800 r·min⁻¹ 转速下高速旋转 2 h,随后应用超声波细胞粉碎机 在 60 W 功率,工作 5 s、间歇 10 s 超声 10 min,再 将溶液以 635.92×g 离心 10 min,即得胶束溶液。

(3)透析法:精密称取 HCCD 6 份,每份约 10 mg,置于 10 mL 烧杯中。称取 3 份 1 mg 的 CEL,分别与 3 份前药聚合物材料混合,用于制 备载药胶束,其余用于制备空白胶束;上述 6 份 物料均用 1 mL 的二甲基亚砜 (DMSO)溶解,备 用。量取 5 mL 的超纯水置于小茄形瓶中,调整 磁力搅拌器的转速,转速设置为 1 800 r·min⁻¹, 待转速稳定后将上述 6 份物料溶液分别逐滴加入 到 6 个茄形瓶中,加入完全后再继续搅拌 15 min, 随后分别转移到透析袋(截留相对分子质量 1 000) 中,用超纯水进行透析,分别于 2、4、8、12 h 更 换新的透析液,然后将透析袋内的液体应用超声 波细胞粉碎机在 60 W 功率,工作 5 s、间歇 10 s, 超声 10 min,再将溶液以 635.92×g 离心 10 min, 即得 3 份载药胶束溶液和 3 份空白胶束溶液。

分别取聚合物胶束溶液 1 mL,置于比色皿中, 通过 Nano-ZS90 电位粒径测定仪测定其粒径、PDI、 Zeta 电位,记录数据。取聚合物胶束溶液 1 mL,用 甲醇稀释至 CEL 的质量浓度约为 20 μg·mL⁻¹,经 0.22 μm 滤膜滤过,将样品转移至进样瓶,随后按 "2.1.2"项下的色谱条件进样,测定峰面积,计算 样品浓度,计算样品的载药量和包封率^[9]。

载药量=载药胶束中药物的质量/载药胶束的质量

包封率=载药胶束中药物的质量/初始投药量

3 种不同方法制备聚合物胶束的结果见表 1。3 种方法中除薄膜分散法的粒径较大外,其余 2 种方 法的粒径和 PDI 的差别不是很明显,以载药量和包 封率为依据,溶剂挥发法更具优势,故后续实验采 用溶剂挥发法作为制备方法。

方法	制剂	粒径/nm	PDI	Zeta电位/mV	载药量/%	包封率/%
透析	HCCD	214.4 ± 9.7	0.18 ± 0.08	-23.4 ± 4.3	8.3 ± 0.8	_
	HCCD/CEL	179.3 ± 8.4	0.20 ± 0.03	-25.7 ± 2.7	9.4±2.0 (CD)	60.3 ± 0.1
					$10.1\pm0.0~(\text{CEL})$	
薄膜分散	HCCD	262.2 ± 4.4	0.17 ± 0.02	-29.2 ± 1.7	8.8 ± 1.1	—
	HCCD/CEL	301.5 ± 2.9	0.19 ± 0.16	-29.8 ± 1.0	8.5 ± 0.9 (CD)	33.8 ± 0.1
					5.6 ± 0.0 (CEL)	
溶剂挥发	HCCD	212.6 ± 9.4	0.13 ± 0.07	-29.2 ± 3.7	10.6 ± 0.2	_
	HCCD/CEL	207.9 ± 4.4	0.17 ± 0.04	-32.1 ± 0.9	10.9 ± 2.0 (CD)	83.7 ± 1.2
					11.9 ± 0.0 (CEL)	

	表1	制备方法的筛选结果 ($ar{x}$ ±s, $n=$ 3)	
Table 1	Screeni	ing results of preparation methods ($\overline{x} \pm s$,	n=3)

2.2.2 溶剂的筛选 选用溶剂挥发法,筛选甲醇、乙醇和丙酮,胶束的制作方法同"2.2.1"项下的"(1) 溶剂挥发法",粒径、PDI、Zeta 电位、载药量、包 封率检测方法见 "2.2.1"项。结果见表 2,由表 2

知,不同的溶剂制备的胶束的粒径、PDI等无明显 差异,以载药量和包封率为依据,无水乙醇作为溶 剂包封率更高,故在后续实验中选用无水乙醇作为 溶剂。

表 2 溶剂的筛选结果 ($\overline{x} \pm s, n=3$) Table 2 Selection results of solvents ($\overline{x} \pm s, n=3$)

				(· · · ·	,	
有机溶剂	制剂	粒径/nm	PDI	Zeta电位/mV	载药量/%	包封率/%
甲醇	HCCD	197.4 ± 5.2	0.18 ± 0.04	-24.9 ± 0.6	10.0 ± 1.6	—
	HCCD/CEL	174.4 ± 4.4	0.21 ± 0.01	-34.0 ± 1.8	10.9 ± 0.8 (CD)	44.2 ± 1.36
					7.4 ± 1.4 (CEL)	
乙醇	HCCD	212.6 ± 9.4	0.13 ± 0.07	-29.2 ± 3.7	10.6 ± 0.2	
	HCCD/CEL	207.9 ± 4.4	0.17 ± 0.04	-32.1 ± 0.9	10.9 ± 2.0 (CD)	83.7 ± 1.17
					11.9 ± 2.2 (CEL)	
丙酮	HCCD	208.9 ± 8.5	0.15 ± 0.03	-16.0 ± 1.5	9.9 ± 6.5 (CD)	—
	HCCD/CEL	179.8 ± 3.2	0.25 ± 0.01	-30.7 ± 1.4	$10.1 \pm 4.5 (CD)$	71.2 ± 0.25
					10.8 ± 0.2 (CEL)	

2.2.3 CEL 与 HCCD 质量比的筛选 选用 CEL 与 HCCD 质量比分别为 1:5、1.0:7.5、1:10 进行 考察,选用无水乙醇为溶剂,样品的制作方法同 "2.2.1"项下的"(1)溶剂挥发法",粒径、PDI、 Zeta 电位、载药量、包封率检测方法见"2.2.1"项,

结果见表 3。在被包载药物 CEL 1 mg 不变的前提 下,增加 HCCD,胶束制剂的粒径、PDI 及载药量 并无明显变化,HCCD 为 5 mg 时有较高的载药量 和包封率,故后续实验采用 CEL 与 HCCD 质量比 分别为1:5。

表 3 CEL 与 HCCD 质量比筛选结果 ($\overline{x} \pm s, n=3$) Table 3 CEL and HCCD quality ratio screening results ($\overline{x} \pm s, n=3$)

CEL与HCCD质量比	粒径/nm	PDI	Zeta电位/mV	载药量/%	包封率/%		
1:5	207.9 ± 4.4	0.17 ± 0.04	-32.10 ± 0.92	10.9 ± 0.4 (CD)	83.7 ± 1.2		
				11.9 ± 0.2 (CEL)			
1.0:7.5	206.4 ± 18.7	0.16 ± 0.10	-24.13 ± 3.63	10.4 ± 0.3 (CD)	75.4 ± 9.1		
				8.9±1.1 (CEL)			
1:10	219.5 ± 12.8	0.18 ± 0.07	-25.12 ± 1.81	9.6±0.1 (CD)	74.3 ± 8.7		
				6.8±3.9 (CEL)			

通过对制剂制备的方法、溶剂、CEL 与 HCCD 质量比的筛选,最终得到以 2 mL 无水乙醇为溶剂, HCCD 的量为 5 mg,CEL 的量为 1 mg,溶剂挥发 法制得的胶束溶液最佳。HHCD、HHCD/CEL 的制 备方法同"HCCD、HCCD/CEL"。

2.3 制剂学表征

2.3.1 临界胶束浓度的测定 为了探究前期合成的 具有两亲性的前药聚合物材料的自组装行为,采用了 芘-丙酮法测定样品的临界胶束浓度。首先取 9 个棕 色西林瓶,在其中加入等体积的 6.0×10⁻⁶ mol·L⁻¹ 的 芘-丙酮溶液,放置于黑暗处 24 h,使丙酮完全挥发; 将最佳制备方法制作的空白胶束样品溶液按照一系 列浓度进行稀释,质量浓度为1×10⁻⁶~1 mg·mL⁻¹, 随后分别取 10 mL 置于上述棕色西林瓶中,水浴超 声 10 min,室温下置于黑暗处 24 h。接下来在荧光 分光光度计上以 353 nm 为激发波长,测定其在发 射波长为 384、373 nm 的光度(*I*)值,以两者 *I*值 的比值作为纵坐标,质量浓度的对数作为横坐标, 对数据进行拟合得到样品的临界胶束浓度曲线,计 算出临界胶束浓度的大致范围^[10]。结果见图 2,在 前药聚合物胶束浓度较小时,2 种聚合物胶束的变 化 范 围 不 明 显, 但 是 随 着 胶 束 浓 度 的 增



Fig. 2 Critical micellar concentration of HCCD and HHCD ($\bar{x} \pm s, n=3$)

加,在超过某个浓度时比值发生明显的变化,发生 变化的浓度即为临界胶束浓度^[11]。如图 2 所示, HHCD 的临界胶束质量浓度为 4.48 μg·mL⁻¹, HCCD 的临界胶束质量浓度为 4.67 μg·mL⁻¹。2 种 材料均具有较低的临界胶束浓度,推测 2 种胶束在 血液循环中均具有较好的稳定性^[12]。

2.3.2 胶束的粒径以及分布 采用最优的制备方 法制备 HHCD、HCCD、HHCD/CEL、HCCD/CEL 胶束溶液,通过 Nano-ZS90 电位粒径测定仪测定其 粒径、PDI、电位,并记录数据。4 种胶束的粒径在 200 nm 左右(图 3), PDI 均小于 0.2, 且分布较为



图 3 胶束 HHCD、HCCD、HHCD/CEL、HCCD/CEL 粒径观察

Fig. 3 Particle size of micelle HHCD、HCCD、 HHCD/CEL、HCCD/CEL 均匀。4 种聚合物胶束的 Zeta 电位分别为-24.7、-29.2、-25.9、-32.1 mV。由于 HA 上存在游离的 羧基,会使载药的聚合物胶束电位值为负值,负电 位能够减少聚合物胶束与血清蛋白的结合并延长 药物的体内循环时间^[13]。

2.3.3 胶束形态的观察 将 HHCD、HCCD、 HHCD/CEL、HCCD/CEL 4 种胶束稀释到适宜的浓 度后,用移液枪吸取 10 µL,滴在铜网上,使其能够 聚集在铜网上,随后转移至 DZF-6050 型真空干燥 箱进行脱水处理,送样通过透射电子显微镜(TEM) 观察,拍照记录。HHCD、HCCD、HHCD/CEL、 HCCD/CEL 4 种胶束的透射电镜图如图 4 所示,4 种聚合物胶束形态均为类球形,载药聚合物胶束比



图 4 HCCD (A)、HHCD (B)、HCCD/CEL (C)、 HHCD/CEL (D) 聚合物胶束的 TEM 图 Fig. 4 TEM images of micelles formed by HCCD (A),

HHCD (B), HCCD/CEL (C), HHCD/CEL (D)

空白胶束的粒径小,可能是由于载药过程中聚合物 胶束的疏水内核与 CEL 之间相互作用形成更紧凑 的纳米结构。在 TEM 中 4 种聚合物胶束的粒径比 动态光散射法测定的结果要小,可能是 TEM 样品 在真空干燥过程中失水导致聚合物胶束的亲水壳 收缩造成^[14]。

2.4 胶束的稳定性研究

2.4.1 储存稳定性 HHCD、HCCD、HHCD/CEL、 HCCD/CEL 4 种胶束置于冰箱(4 ℃)中储存,隔 天取样测定粒径,共取 10 次,每个样品均平行 3 份,记录样品粒径的变化,结果见图 5-A,20 d内 4 种聚合物粒径无明显变化,说明 4 种胶束都有较 好的储存稳定性。

2.4.2 血浆稳定性 将制备的 HHCD、HCCD、 HHCD/CEL、HCCD/CEL 4 种胶束置于 pH 为 7.4 含 10%血浆的 PBS 缓冲液中,将其放在摇床中孵 育 48 h,分别于 0、2、4、6、12、24、48 h 时取样, 测定其粒径变化,结果见图 5-B,在孵育 48 h 内胶 束粒径无明显的变化,在 10%的血浆条件下具有较 好稳定性。



图 5 聚合物胶束 4 ℃储存 20 d 的粒径变化(A)及在含有 10%血浆条件下孵育 48 h 的粒径变化(B)(x ±s, n=3) Fig. 5 Particle size changes of polymer micelles stored at 4 ℃ for 20 d (A) and incubated for 48 h with 10% plasma (B) (x ±s, n=3)

2.4.3 冻干粉复溶稳定性 测定 4 种聚合物胶束 HHCD、HCCD、HHCD/CEL、HCCD/CEL 的粒径、 PDI 以及 HHCD/CEL、HCCD/CEL 的载药量和包封 率,随后冻干;冻干粉用超纯水进行复溶、超声、 离心,再重新测定 4 种胶束的粒径、PDI,以及 HHCD/CEL、HCCD/CEL的载药量和包封率。4 种 聚合物胶束的冻干粉复溶稳定性结果见表 4,冻干 前后聚合物胶束的粒径、载药量和包封率均无明显 变化,表明4种聚合物胶束在冻干后再次复溶时具 有较好的稳定性。

表 4 聚合物胶束冻干粉复溶结果 ($\overline{x} \pm s, n=3$) Table 4 Re-solubilization results of polymer micelle freeze-dried powder ($\overline{x} \pm s, n=3$)

	胶束	粒径/nm	PDI	CD载药量/%	CEL载药量/%	包封率/%
冻干前	HHCD	201.7 ± 14.4	0.15 ± 0.03	8.94 ± 0.02		
	HHCD/CEL	222.5±27.2	0.18 ± 0.03	9.51 ± 0.01	12.16 ± 0.02	72.97 ± 0.03
	HCCD	216.1±9.5	0.16 ± 0.10	9.50 ± 0.02	_	_
	HCCD/CEL	202.2 ± 23.0	0.17 ± 0.01	9.40 ± 0.04	13.06 ± 0.02	78.38 ± 0.02
冻干后	HHCD	194.3 ± 5.6	0.16 ± 0.05	8.26 ± 0.04		
	HHCD/CEL	198.4 ± 8.7	0.17 ± 0.03	8.14 ± 0.02	12.56 ± 0.11	73.45 ± 0.11
	HCCD	217.0 ± 2.5	0.19 ± 0.03	10.83 ± 0.17		
	HCCD/CEL	203.1 ± 7.9	0.16 ± 0.08	9.06 ± 0.01	13.15 ± 0.02	80.19 ± 0.02

2.5 胶束的溶血实验研究

将 HHCD、HCCD、HHCD/CEL、HCCD/CEL 4 种聚合物胶束的冻干粉复溶,并用 0.9%的氯化钠 溶液稀释为 400、200、100、50、10 µg·mL⁻¹,将4 种胶束分别于与等体积的 2%红细胞悬浮液混合, 将混合的溶液放置在 37 ℃、100 r·min⁻¹转速的条 件下孵育 3 h。将用蒸馏水和 0.9%的氯化钠溶液孵 育的红细胞悬浮液分别设置为阳性对照和阴性对 照。结果见图 6,所有的胶束溶液均无显著溶血, 随后 5 000 r·min⁻¹离心 10 min 后,取上清液,用紫 外-可见分光光度计测定样品上清液在 540 nm 处的 吸光度 (*A*)值,并计算溶血率,结果显示所有胶束 溶液的溶血率均低于 5%,故可推测 4 种聚合物胶 束均具有较好的生物相容性。

溶血率= $(A_{\text{ttill}} - A_{\text{IRTM}}) / (A_{\text{IRTM}} - A_{\text{IRTM}})$





2.6 胶束的还原敏感性研究

取 HHCD/CEL、HCCD/CEL 胶束溶液各 10 mL, 加入不同质量的 GSH, 使浓度分别为 0、10 µmol·L⁻¹ 及 10、20 mmol·L⁻¹, 每个样品均平行 3 份, 置 于恒温振荡器中,将设置温度为 37 ℃、转速为 150 r·min⁻¹, 孵育 24 h 后取出样品,进行粒径检测。

如图 7 所示, HHCD/CEL 胶束在浓度为 0、 10 μmol·L⁻¹ 及 10、20 mmol·L⁻¹ 的 GSH 条件下粒 径均无明显变化,而 HCCD/CEL 胶束在 GSH 浓度 为 0、10 μmol·L⁻¹时粒径也无明显的变化,但在 GSH 的浓度为 10、20 mmol·L⁻¹时粒径发生明显的变化, 出现了多重峰。可能是在高浓度 GSH 时, HCCD/CEL 胶束溶液中的 S-S 键发生了断裂,造成 聚合物材料的结构发生变化,从而使胶束的粒径发 生明显的变化;而 HHCD/CEL 胶束中的 C-C 键不 随 GSH 浓度的变化而发生明显的改变,故 HHCD/CEL 粒径的变化不大。结果表明,目标胶束 HCCD/CEL 具有较好的还原敏感特性。

2.7 胶束的体外释放研究

制备 GSH 浓度为 0、10 µmol·L⁻¹、10、20 mmol·L⁻¹ 的释放介质,并在所有释放介质中加入聚山梨酯 80 (0.5%)。HHCD/CEL、HCCD/CEL 胶束各取 1 mL 置于透析袋内(截留相对分子质量为 2 000),然后 将透析袋放入 20 mL pH 值为 7.4 的 PBS 释放介质 中,放置在 37 ℃、150 r·min⁻¹转速的恒温振荡器 中,孵育,并分别于不同时间点取 1 mL 的释放介 质溶液,留作待测样品,取完样品后向烧杯中加入 1 mL 相应的释放介质,以保持烧杯中释放介质的体 积不变。将样品滤过后,按照 "2.1"项建立的色谱 条件进样,根据样品的峰面积计算样品的含量,最 后计算出样品在不同条件下的累积释放量,结果见 图 8。

在 GSH 浓度为 0、10 μmol·L⁻¹时, 2 种聚合物 胶束中的药物在 48 h 内的释放量均在 21%左右。在 GSH 的浓度为 10 mmol·L⁻¹时, HCCD/CEL 中的 2 种药物在 24 h 内累积释放量分别为 40%、50%, 这 可能是因为随着 GSH 的浓度增加,还原剂对聚合 物胶束 HCCD/CEL 的结构产生一定的破坏;在 GSH 浓度为 20 mmol·L⁻¹时,聚合物胶束 HCCD/CEL 中 的药物 CD、CEL 在 24 h 时累积释放量达到 70%左 右,48 h 时达到 80%左右,很有可能是由于还原剂与 二硫键作用后导致二硫键断裂,纳米胶束的内核破裂 造成药物大量释放。在 GSH 浓度为 20 mmol·L⁻¹时,







图 8 载药胶束中 CD (A) 和 CEL (B) 的体外释放 ($\overline{x} \pm s, n=3$) Fig. 8 In vitro release of CD (A) and CEL (B) from drug-loaded micelles ($\overline{x} \pm s$, n=3)

聚合物胶束 HHCD/CEL 的释放情况与在低浓度时 一致基本都在 20%左右,说明 HHCD/CEL 不具有 氧化还原特性,这与"2.6"项实验结果一致。结 果表明,具有还原敏感特性的聚合物胶束 HCCD/CEL 能够在高浓度 GSH 下快速释放药物 以增强药物效果。

3 讨论

肝癌的发生与肿瘤微环境异常紧密相关,其中 癌相关成纤维细胞、血管内皮生长因子(VEGF)与 转化生长因子-β(TGF-β)等起重要作用^[15]。有研究 表明局部肾素-血管紧张素系统(RAS)通过双向调节 血管紧张素转化酶(ACE)/血管紧张素II(AngII)/血 管紧张素II受体1(AT1R)轴与ACE2/Ang(1-7)/Mas 受体轴,精细调控细胞生长、增殖等关键生物学过程,

且与癌症的起始、进展及转移机制紧密相关[16]。有 报道显示,针对 ACE-AngII-AT1R 轴的抗血管紧张 素药物能遏制肿瘤微环境中的炎症反应与异常血 管生成,重构微环境,削弱肿瘤生长与迁徙能力[17], 还能降解基质成分,减轻肿瘤间质压,增加抗癌药 物深部递送[18]。如 CD 作为长效选择性 AT1R 拮抗 剂,通过抑制 TGF-β1 表达及磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶B(AKT)信号通路,可以减少 肿瘤基质胶原生成,促进肿瘤血管正常化,显著增 强了抗癌药物对肿瘤实质的渗透能力。

有研究表明, CEL 通过精准调控 PI3K/AKT、 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)及信号转导和转录 激活因子 3 (STAT3) 等关键信号通路, 有效诱导肿 瘤细胞凋亡、自噬性死亡及免疫原性死亡[19],还能 减少基质金属蛋白酶表达,抑制血管生成,从而有 力遏制了肝癌细胞的增殖、迁移与侵袭^[20]。因此, 将 CEL 与 CD 联合应用,通过 CD 阻断 Ang II /AT1R 信号通路作用,有望破坏肿瘤滋生的"土壤",并增 加 CEL 肿瘤深部灌注,强化其杀灭肿瘤细胞"种 子"的效能^[21];同时,两者协同作用于 PI3K/AKT、 TGF-β1 等关键通路,进一步抑制了肿瘤的增殖、侵 袭与转移。这一策略无疑为肿瘤治疗领域开辟了新 的视野,为患者提供了更加精准、高效且安全的治 疗手段。

本研究利用纳米递药系统的优点,以合成的聚 合物前药 HCCD 与 HHCD 为聚合物材料,共载药 物 CEL 制备 4 种胶束 HCCD、HHCD/CEL、 HCCD/CEL。纳米粒共载药物作为联合给药的前沿 策略,其共载方式直接影响药物的递送效率与协同 功效。现有共载技术涵盖物理共包埋(又分为同区 共载和分区共载)、次序包埋、化学共键合、化学单 键合、分子间力自组装等多样形式^[22-23]。物理包埋 与分子间力自组装法虽操作简便,却易致药物泄露; 相反,化学键合法虽工艺复杂,却有效防止泄露,且 便于智能化改造,为靶向递送搭建稳固平台^[24]。鉴于 此,本研究优选化学单键合法制备共载纳米胶束, 该法利用二硫键作为智能释药桥梁,不仅优化了载 体的载药性能,还显著提升了载药量与包封率,极 大地增强了共载给药系统的成药潜力。

根据最优工艺制备的4种胶束的制剂学性质来 看,4种纳米胶束具有较小的粒径、较大电位的绝 对值、类球形及较高的载药量和包封率,同时还具 有良好的储存稳定性、冻干稳定性、血浆稳定性。 众所周知,较小的粒径和类球形有利于胶束的体内 长循环和肿瘤组织靶向;较大电位的绝对值,暗示 着胶束有较好的胶态物理稳定性,各种稳定性研究 也证实了这一点;高载药量和包封率是确保本研究 中胶束成药性的关键,所以这些特性为后续实验的 开展奠定了良好的基础。

还原敏感性实验及体外释放实验表明聚合物 胶束 HCCD 和 HCCD/CEL 具有明显的还原敏感特 性,在低浓度 GSH 环境中很少释放药物,而高浓度 GSH 环境中可以快速、大量地释放药物,这些结果 暗示着 2 种胶束注射进入体内后将有望在体循环和 正常组织中保持稳定,而进入肿瘤细胞后可以快速 释放药物,从而实现肿瘤靶向,进而有效降低药物 的外周毒副作用,并大大增加其抗肿瘤活性,这可 为后续药物的体内相关研究提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 郭娜,高志棣.不可切除肝癌综合治疗的研究进展
 [J].青岛大学学报:医学版,2024,60(4):623-626.
 Guo N, Gao Z D. Research advancesin comprehensive treatment of unresectable hepatocellalar carcinoma [J]. J Qingdao Univ Med Sci, 2024, 60(4): 623-626.
- [2] 郑宇,董爽,胡祖成,等.参芪扶正注射液联合顺铂协
 同抑制非小细胞肺癌增殖 [J].长春中医药大学学报,
 2024,40(12):1335-1341.

Zheng Y, Dong S, Hu Z C, et al. Study on the synergistic inhibition of proliferation of non-small cell lung cancer by Shenqi Fuzheng injection combined with cisplatin [J]. J Changchun Univ Chin Med, 2024, 40(12): 1335-1341.

[3] 倪爱丹,徐婷婷,顾露囡,等. 坎地沙坦诱导肿瘤血管 正常化增强阿霉素抗肿瘤作用研究 [J]. 中国现代应 用药学, 2021, 38(5): 555-559.
Ni A D, Xu T T, Gu L N, et al. Study on tumor blood vessel normalization to enhance the antitumor effect of advisoration induced her condecators [I]. Chin L Med Apple

adriamycin induced by candesartan [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2021, 38(5): 555-559. [4] 吕英杰, 王帅珂, 吴苹, 等. 雷公藤红素的肝肾毒性分

- [4] 古英杰, 王师珂, 关平, 等. 宙公藤红素的所有每任分析及其对高脂饮食小鼠肠道菌群的调节作用 [J]. 现代食品科技, 2020, 36(5): 35-41. Lyu Y J, Wang S K, Wu P, et al. Liver and kidney toxicity of celastrol and its regulating action of gut microbiota on a high-fat diet mice [J]. Mod Food Sci Technol, 2020, 36(5): 35-41.
- [5] 周国梁, 宿树兰, 华永庆, 等. 雷公藤肝毒性机制及 配伍减毒研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(24): 8263-8272.
 Zhou G L, Su S L, Hua Y Q, et al. Research progress on hepatotoxicity mechanism and attenuated compatibility of *Tripterygium wilfordii* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(24): 8263-8272.
- [6] Liu C X, Zhang C N, Wang W X, et al. Integrated metabolomics and network toxicology to reveal molecular mechanism of celastrol induced cardiotoxicity [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2019, 383: 114785.
- [7] 刘雨婷, 王悦全, 张申武, 等. 小分子自组装纳米递药 系统研究进展 [J]. 药学学报, 2023, 58(3): 516-529.
 Liu Y T, Wang Y Q, Zhang S W, et al. Advance on small molecule self-assembled nano-drug delivery system [J].
 Acta Pharm Sin, 2023, 58(3): 516-529.
- [8] 李禄辉, 郭允, 侯先巧, 等. 包载三苯基膦-阿霉素和 槲皮素的还原敏感性抗肿瘤耐药纳米混合胶束的制备

及评价 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(7): 1563-1571.

Li L H, Guo Y, Hou X Q, et al. Formulation and assessment of reduction-responsive hybrid nano-micelles containing triphenylphosphine-adriamycin and quercetin for combating drug resistance in cancer treatment [J]. Drug Eval Res, 2024, 47(7): 1563-1571.

- [9] Du J, Zong L L, Li M M, et al. Two-pronged anti-tumor therapy by a new polymer-paclitaxel conjugate micelle with an anti-multidrug resistance effect [J]. Int J Nanomedicine, 2022, 17: 1323-1341.
- [10] 冷怡林. 姜黄素胶束的制备与体内外抗肿瘤活性研究
 [D]. 开封: 河南大学, 2020.
 Leng Y L. Preparation of curcumin micelle and its antitumor activity *in vitro* and *in vivo* [D]. Kaifeng: Henan University, 2020.
- [11] Wu R, Tian M C, Shu C, et al. Determination of the critical micelle concentration of surfactants using fluorescence strategies [J]. Soft Matter, 2022, 18(47): 8920-8930.
- [12] Langridge T D, Gemeinhart R A. Toward understanding polymer micelle stability: Density ultracentrifugation offers insight into polymer micelle stability in human fluids [J]. J Control Release, 2020, 319: 157-167.
- [13] Yang Y, Li Y J, Chen K, et al. Dual receptor-targeted and redox-sensitive polymeric micelles self-assembled from a folic acid-hyaluronic acid-SS-vitamin E succinate polymer for precise cancer therapy [J]. Int J Nanomedicine, 2020, 15: 2885-2902.
- [14] Zong L L, Wang Y L, Song S Y, et al. Formulation and evaluation on synergetic anti-hepatoma effect of a chemically stable and release-controlled nanoselfassembly with natural monomers [J]. Int J Nanomedicine, 2023, 18: 3407-3428.
- [15] Roles of tumor microenvironment in hepatocelluar carcinoma [J]. Curr Med Chem, 2015, 11(2): 82-93.
- [16] Li R J, Wu C Y, Ke H L, et al. Qing Fei Hua Xian Decoction ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by suppressing oxidative stress through balancing ACE-AngII-AT1R/ACE2-Ang-(1-7)-Mas axis [J]. Iran J Basic Med Sci, 2023, 26(1): 107-113.
- [17] Chen X S, Meng Q W, Zhao Y B, et al. Angiotensin II type 1 receptor antagonists inhibit cell proliferation and angiogenesis in breast cancer [J]. Cancer Lett, 2013,

328(2): 318-324.

- [18] Han X X, Xu Y, Geranpayehvaghei M, et al. Emerging nanomedicines for anti-stromal therapy against desmoplastic tumors [J]. Biomaterials, 2020, 232: 119745.
- [19] Qiu N S, Liu Y, Liu Q, et al. Celastrol nanoemulsion induces immunogenicity and downregulates PD-L1 to boost abscopal effect in melanoma therapy [J]. Biomaterials, 2021, 269: 120604.
- [20] Yang F, Guo Z H, Shi L Q, et al. Antiangiogenic and antitumor therapy for retinoblastoma with hypoxiainducible factor-1α siRNA and celastrol co-delivery nanomicelles [J]. J Biomed Nanotechnol, 2020, 16(10): 1471-1481.
- [21] 陈秋霞,莫灼锚,张诗军.基于"种子-土壤" 学说从 脾防治肝癌转移的策略探讨 [J].中西医结合肝病杂 志,2023,33(11):1031-1034.
 Chen Q X, Mo Z M, Zhang S J. Discussion on prevention and treatment of liver cancer metastasis from spleen based on "seed-soil" theory [J]. Chin J Integr Tradit West Med Liver Dis, 2023, 33(11): 1031-1034.
- [22] 罗开沛, 严春梅, 杨露, 等. 以甘草酸为稳定剂的姜黄素-水飞蓟宾共载纳米混悬剂的制备及体外评价 [J]. 中草药, 2023, 54(15): 4823-4831.

Luo K P, Yan C M, Yang L, et al. Preparation and in vitro evaluation of curcumin and silibinin co-loaded nanosuspension with glycyrrhizic acid as stabilizer [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(15): 4823-4831.

[23] 刘圣圳. 全新的多功能纳米载体与共载前体药物联合 治疗消化道肿瘤的研究 [D]. 北京:中国人民解放军 医学院, 2019.

Liu S Z. Study on the combination of brand-new multifunctional nanocarriers and co-loaded prodrugs in the treatment of digestive tract tumors [D]. Beijing: Medical School of Chinese PLA, 2019.

 [24] 马菊, 吕灵灵, 胡青, 等. 共载阿霉素和 siRNA 的还原 敏感型前药纳米粒的制备及体外评价 [J]. 中国医院 药学杂志, 2024, 44(5): 550-556.
 Ma J, Lyu L L, Hu Q, et al. Preparation and *in vitro*

evaluation of reduction-sensitive prodrug nanoparticles for coloaded DOX and siRNA [J]. Chin J Hosp Pharm, 2024, 44(5): 550-556.

[责任编辑 兰新新]