

基于藻酸双酯钠的阿霉素/塞来昔布纳米药物晶体的制备及其抗肿瘤作用研究

张韬¹, 李玉因², 钱占寅², 李春雨^{3*}

1. 天津市第一中心医院 药学部, 天津 300192

2. 天津医科大学 药学院, 天津 300070

3. 天津医科大学 国际医学院, 天津 300070

摘要: **目的** 制备基于藻酸双酯钠的阿霉素/塞来昔布纳米药物晶体 (PPDC), 并考察其体外抗肿瘤作用。**方法** 采用纳米沉淀法制备 PPDC 混悬液, 分别表征 PPDC 的形态、粒径、电位、药物晶型、药物包载情况、释药性能, 通过细胞摄取、细胞毒性、细胞侵袭、细胞黏附评价 PPDC 对 4T1 细胞的抑制作用。**结果** PPDC 混悬液呈规则球形, 分散性良好, 分布较窄, 载药量高。塞来昔布、阿霉素以无定型稳定状态存在于 PPDC 中。PPDC 在体外释放 72 h 时携带的药物能够有效释放。体外细胞实验表明, PPDC 能被 4T1 细胞摄取, 细胞毒作用具有浓度相关性, 并显著抑制细胞侵袭和细胞黏附。**结论** PPDC 有效解决塞来昔布的难溶性、稳定剂毒性大等问题, 与阿霉素共载实现两药协同抑制肿瘤细胞生长和转移的作用。

关键词: 阿霉素/塞来昔布纳米药物晶体; 阿霉素; 塞来昔布; 藻酸双酯钠; 药物晶型; 释药性能; 细胞黏附

中图分类号: R944 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2022)11-2475-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.11.008

Preparation and its antitumor effect of doxorubicin/celecoxib drug nanocrystals based on polysaccharide sulfate

ZHANG Tao¹, LI Yu-nan², QIAN Zhan-yin², LI Chun-yu³

1. Department of Pharmacy, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China

2. School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

3. International Medical School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: Objective To prepare doxorubicin/celecoxib drug nanocrystals (polysaccharide sulfate/PVP/doxorubicin/celecoxib, PPDC) based on polysaccharide sulfate (PSS), and study its antitumor effect *in vitro*. **Methods** PPDC suspension was prepared by nano precipitation method. The morphology, particle size, potential, drug crystal form, drug loading, and drug release performance of PPDC were characterized, respectively. The inhibition of PPDC against 4T1 cells was evaluated by cell uptake, cytotoxicity, cell invasion, and cell adhesion. **Results** PPDC suspension was regular spherical, with good dispersion, narrow distribution, and high drug loading. Celecoxib and doxorubicin existed in PPDC in an amorphous and stable state. Drug loaded by PPDC can be effectively released after 72 h *in vitro* release. *In vitro* cell experiments showed that PPDC could be taken up by 4T1 cells, and its cytotoxicity was concentration dependent, significantly inhibiting cell invasion and cell adhesion. **Conclusion** PPDC can effectively solve the problems such as insolubility of celecoxib and high toxicity of stabilizer, and achieve the synergistic effect with doxorubicin in inhibiting growth and metastasis of tumor cells.

Key words: doxorubicin/celecoxib drug nanocrystals; doxorubicin; celecoxib; polysaccharide sulfate; drug crystal form; drug release performance; cell adhesion

癌细胞中的酶表达通常处于异常水平, 其中环氧合酶-2 在乳腺癌、结肠癌和宫颈癌等多种肿瘤细

胞中均过表达, 而在正常细胞中表达水平较低, 因此环氧合酶-2 在肿瘤发展进程中起着关键作用^[1-2]。

收稿日期: 2022-04-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81803101); 天津市自然科学基金资助项目 (19JCQNJC12300)

作者简介: 张韬 (1993—), 女, 药师, 博士, 研究方向为药理学。E-mail: star20120703@163.com

*通信作者: 李春雨 (1985—), 男, 副教授, 博士, 从事肿瘤综合治疗和纳米递药系统研究。E-mail: wd2526@163.com

研究表明, 环氧合酶-2 抑制剂塞来昔布能通过下调环氧合酶-2 表达发挥包括抑制细胞增殖、降低细胞侵袭和转移等作用, 进而重塑肿瘤微环境, 达到抗肿瘤疗效^[3-4]。塞来昔布还能增加肿瘤细胞的化疗敏感性, 有效逆转肿瘤耐药^[5]。然而, 塞来昔布的水溶性差、溶出度低、生物利用度低等问题限制了其临床应用^[6]。纳米技术可为改善塞来昔布溶解度提供合适手段^[7]。由广谱化疗药阿霉素制备的盐酸阿霉素脂质体注射液作为第一个获临床批准的脂质体包裹抗癌药物对多种恶性肿瘤具有活性, 减少了心脏毒性, 大幅度提高了抗肿瘤疗效。为避免肿瘤细胞/组织的耐药发展、发挥环氧合酶-2 抑制剂诱导凋亡的效果, 有研究将塞来昔布负载于阿霉素脂质体中, 二者协同抑制多个关键信号通路, 显示出良好的抗癌效果^[8]。考虑到脂质体易受到载药量和稳定性等因素的影响, 研究者也常将这类难溶性药物制成纳米药物晶体^[9-10]。纳米药物晶体是一种无需过多载体材料、只依靠少量的表面活性剂或高分子材料便能使药物达到稳定纳米状态的药物递送体系, 具有载药量高、增加溶解度、提高生物利用度等优势^[11]。常用的表面活性剂十二烷基硫酸钠 (SDS) 对机体有刺激毒性, 生物安全性差^[12]。来自海带的小分子硫酸多糖藻酸双酯钠 (PSS) 含有与 SDS 类似的磺酸基团, 具有一定的表面活性。此外, PSS 还具有抗血栓、改善微循环作用, 能通过抑制肿瘤部位血小板的活化改善肿瘤微环境^[13-14]。因此, 本研究利用天然无毒的 PSS 作为纳米药物晶体的表面活性剂, 制备了一种高效共载阿霉素与塞来昔布的阿霉素/塞来昔布纳米药物晶体 (PPDC), 并进行了体外抗肿瘤作用研究, 以期阿霉素和塞来昔布体内实现药物靶向递送与协同抗肿瘤提供安全有效的策略和依据。

1 仪器与试剂

Zetasizer Nano ZS 粒度分析仪 (Malvern 公司), V-570 紫外分光光度计 (日本分光株式会社), HT7700 透射电子显微镜 (日立), RF-5301PC 荧光分光光度计 (岛津公司), ALPHA1-2/LD plus 冷冻干燥机 (Christ 公司), DSC 214 Polyma 差示扫描量热仪 (耐驰公司), 恒温孵箱 (Thermo Scientific Forma), 激光扫描共聚焦显微镜 (Zeiss 公司), Accuri C6 流式细胞仪 (BD 公司), Multiskan GO 酶标仪 (Thermo Scientific)。

盐酸阿霉素 (大连美仑生物技术有限公司, 质

量分数 >98%, 批号 DO911A), 塞来昔布 (大连美仑生物技术有限公司, 质量分数 >99%, 批号 DO217A), PSS (中国海洋大学); 聚乙烯吡咯烷酮 K30 (PVP-K30, 上海胜浦新材料有限公司, 批号 BBM5030), DMEM 培养基 (大连美仑生物技术有限公司, 货号 MA0212), 三乙胺、二甲基亚砜 (DMSO) (天津市科密欧化学试剂有限公司) 均为分析级别试剂, 胎牛血清 (美国 Life Technologies 公司, 货号 10270-106)、双抗 (美国 Life Technologies 公司, 货号 15070-063), DAPI 细胞核染料、纤黏蛋白 (泛博生物化学有限公司), 封片剂 (美国 Thermo 公司), 噻唑蓝 (MTT, 美国 Sigma-Aldrich 公司)。

鼠源乳腺癌 4T1 细胞系购自国家典型培养物保藏中心, 培养条件为含 10% 胎牛血清、1% 双抗的 DMEM 培养基。

2 方法与结果

2.1 PPDC 的制备

依据本课题组优化的处方, 采用纳米沉淀法制备^[15]。分别称取适量的盐酸阿霉素、塞来昔布原料药粉末, 配制 8、80 mg/mL 的 DMSO 储备液, 等体积混合, 同时加入盐酸阿霉素 3 个当量的三乙胺脱盐, 搅拌过夜。分别称取 1 mg PVP-K30、5 mg PSS 固体粉末于西林瓶中, 加入 3.7 mL 超纯水, 搅拌至充分溶解, 滴加 300 μ L 阿霉素/塞来昔布混合脱盐液, 在室温下搅拌 20 min, 即得 PPDC 混悬液。

2.2 PPDC 的形态表征、粒径、电位

使用超纯水将 PPDC 混悬液稀释 20 倍, 滴加到铜网上, 自然晾干, 置于透射电子显微镜下观察形貌, 见图 1。可见 PPDC 混悬液呈规则球形, 分散性良好。

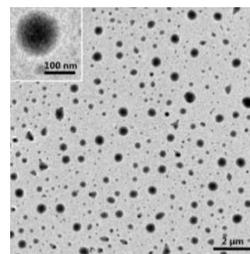


图 1 PPDC 的透射电子显微镜图

Fig. 1 TEM of PPDC

PPDC 混悬液稀释样品通过粒度分析仪测定其粒径分布、表面电荷, 见图 2。粒度仪测得粒径为 (131.9 ± 5.4) nm, 多分散系数为 0.126, 分布较窄, 电位为 (-35.3 ± 4.2) mV。

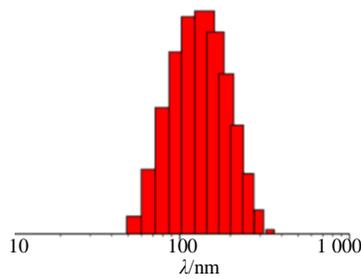


图 2 PPDC 的粒径分布

Fig. 2 Particle size distribution of PPDC

2.3 PPDC 的药物晶型

将 PPDC 混悬液透析冻干, 分别称取 5~10 mg 塞来昔布、阿霉素原料药及其物理混合粉末(塞来昔布、阿霉素的比例为 10:1)、PSS 原料、PPDC 混悬液冻干粉末, 置于标准铝坩锅中, 以空白铝坩锅为参比, 氮气保护(保护气体积流量为 60 mL/min、吹扫气体积流量为 40 mL/min), 程序升温速率为 10 °C/min, 升温范围为 30~290 °C, 进行差示热扫描分析测定, 各样品热分析曲线见图 3。塞来昔布、阿霉素原料药的吸热峰分别出现在 165.5、217.6 °C, 混合粉末只出现塞来昔布的特征吸热峰, 阿霉素的峰消失。PPDC 中塞来昔布吸热峰出现在 150.2 °C, 与塞来昔布原料药相比, 其吸热峰向左移动, 峰强度大大减弱, 且阿霉素特征峰消失, 这是由于塞来昔布、阿霉素在 PPDC 纳米晶体中结晶度下降, 粒径减小, 表面积增大, 其降温速率加快, 导致相变温度降低。同时在 244.8 °C 出现向上的放热峰, 这与 PSS 原料药在 236.2 °C 出现的特征峰一致。PPDC 的 DSC 曲线中塞来昔布、阿霉素的吸热峰出现大幅度变化, 说明二者的结晶度发生明显改变, 以无定型稳定状态存在于 PPDC 中。

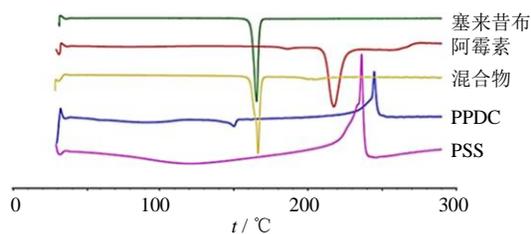


图 3 各样品的 DSC 曲线

Fig. 3 DSC curves of each sample

2.4 PPDC 的药物包载情况

参考相关文献方法^[16-17]利用荧光分光光度法测定 PPDC 中阿霉素, 评价药物包载情况。建立阿霉素(激发波长 480 nm、发射波长 570 nm)荧光标

准曲线。利用荧光分光光度计得阿霉素浓度与荧光强度的标准曲线回归方程 $Y=176.7800X+1.0539$, $R^2=0.9997$ 。称取定量 PPDC 冻干粉末, 超纯水溶解稀释后测定其中阿霉素的荧光强度, 根据标准曲线计算浓度, 然后计算载药量、包封率。

参考相关文献方法^[16-17]利用紫外分光光度法测定 PPDC 中塞来昔布, 评价药物包载情况。建立塞来昔布(254 nm)紫外标准曲线。利用紫外分光光度计得到塞来昔布浓度与吸光度的标准曲线回归方程 $Y=0.0404X-0.0614$, $R^2=0.9991$ 。称取定量 PPDC 冻干粉末, 超纯水溶解稀释后测定其中塞来昔布的吸光度值, 根据各自的标准曲线计算浓度, 然后计算载药量、包封率。

将 PPDC 中阿霉素、塞来昔布的荧光值和吸光度分别带入方程, 计算得到阿霉素、塞来昔布的包封率分别为 $(71.5 \pm 4.3)\%$ 、 $(80.1 \pm 6.6)\%$; 载药量分别为 $(4.5 \pm 0.7)\%$ 、 $(50.1 \pm 3.8)\%$ 。

载药量 = 纳米药物中阿霉素或塞来昔布的质量 / (纳米药物 + 载体)

包封率 = 纳米药物中阿霉素或塞来昔布的质量 / 投入阿霉素或塞来昔布的质量

2.5 PPDC 的释药性能

在 PBS 缓冲液(pH 7.4)中, 动态透析考察纳米药物晶体的释药性能。沸水活化透析袋(截留相对分子质量 1000), 加入 1.5 mL PPDC 混悬液, 放入装有 25 mL PBS 缓冲液的离心管中, 置于 37 °C 恒温避光振荡。按预设时间从离心管中取样留存, 并更换全新 PBS 缓冲液。分别测定各时间点释放溶液中阿霉素、塞来昔布的质量浓度, 绘制药物流释放曲线。PPDC 在 pH 7.4 PBS 释放介质中的药物释放曲线见图 4。可见前 12 h 释放较快, 随后减慢, 并逐渐达到平台期, 最终阿霉素的累积释放量为 42.5%, 塞来昔布释放量为 67.8%。PPDC 在体外释放 72 h 时携带的药物能够有效释放, 为后续发挥药物疗效提供保证。

2.6 PPDC 的细胞摄取

分别利用激光共聚焦显微镜和流式细胞仪定性定量考察乳腺癌细胞对 PPDC 的摄取情况。4T1 细胞以 6×10^4 个/孔的密度接种于共聚焦皿和细胞孔板, 在不同时间点更换分别含有阿霉素和 PPDC(阿霉素质量浓度均为 1 μg/mL)的完全培养基, 使药物与细胞的作用时间分别为 0.5、6、12 h。弃去培养液, 细胞经 4% 多聚甲醛溶液固定, DAPI 染色,

封片，暗处放置过夜。使用激光共聚焦显微镜观察培养皿中细胞内阿霉素的荧光分布。孔板中细胞经消化、离心收集，PBS 重悬后通过流式细胞仪检测阿霉素荧光信号。

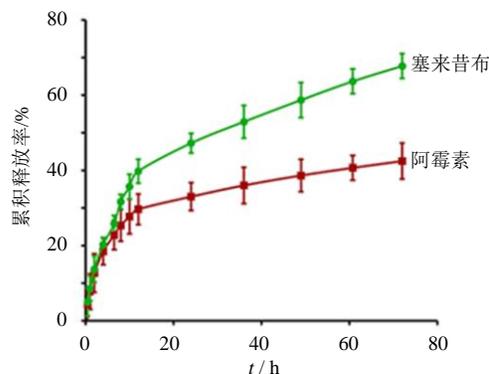


图 4 PPDC 的体外释药曲线

Fig. 4 Drug release curves of PPDC *in vitro*

图 5 为激光共聚焦显微镜观察的药物入胞情况 (阿霉素为红色荧光, DAPI 为蓝色荧光), 在 0.5 h 时游离阿霉素组红色、蓝荧光基本重合, 说明阿霉素已基本入核, 随着给药时间延长, 胞内荧光增强。PPDC 组中, 0.5、6 h 时红色荧光基本分布在细胞质中, 在 12 h 时才观察到红、蓝荧光重合, 表明阿霉素从纳米体系中释放进入细胞核。流式细胞仪定量检测曲线 (图 6) 和其平均荧光强度 (表 1) 的结果基本与共聚焦观察一致。在给药 0.5 h 时, PPDC 入胞量较少, 6、12 h PPDC 胞内荧光大幅度增多, 这是由于 PPDC 纳米粒多以胞吞方式入胞, 速度慢于扩散入胞的游离阿霉素, 并且 PPDC 表面负电荷与细胞膜表面负电荷排斥, 致使其被细胞摄取的速度减慢^[18-19]。以上结果表明 PPDC 可以成功将阿霉素递送至细胞, 并释放进入细胞核, 发挥作用。

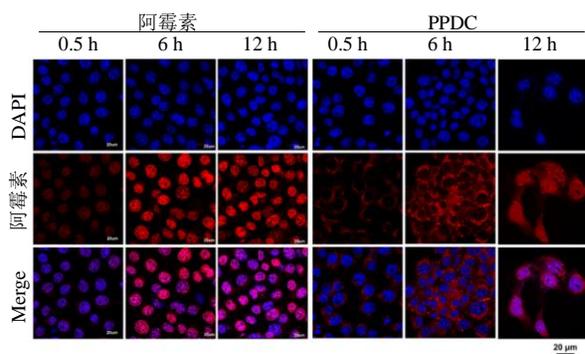


图 5 阿霉素和 PPDC 细胞摄取激光共聚焦显微镜观察图
Fig. 5 Cell uptake of doxorubicin and PPDC by laser scanning confocal microscopy

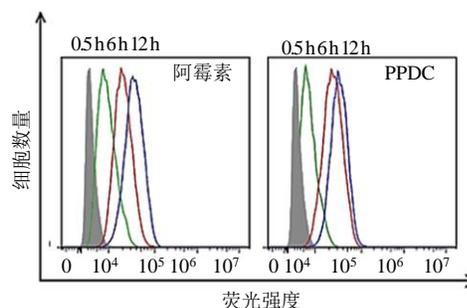


图 6 阿霉素和 PPDC 的细胞摄取流式细胞计数曲线

Fig. 6 Cell uptake of doxorubicin and PPDC by flow cytometry counting curve

表 1 阿霉素和 PPDC 的 4T1 细胞摄取平均荧光强度 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Mean fluorescence intensity of 4T1 cells uptake of doxorubicin and PPDC ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	平均荧光强度		
	0.5 h	6 h	12 h
阿霉素	11 077.67 ± 1 282.09	30 100.00 ± 3 915.35	40 733.33 ± 2 437.89
PPDC	8 555.67 ± 1 404.23	28 804.33 ± 1 908.57	37 768.67 ± 3 415.07

2.7 PPDC 的细胞毒性

利用 MTT 实验评价药物对 4T1 细胞的毒性作用。4T1 细胞以 5×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板, 孵育过夜后, 更换为含不同浓度阿霉素、塞来昔布和 PPDC 的 DMEM 完全培养液, 设置空白不加药组, 每个浓度设置 6 个重复孔。置于 5% CO₂、37 °C 恒温孵箱中培养 48 h。弃掉培养液, 每孔加入 100 μL 1 mg/mL MTT 试剂, 孵育 4 h 后弃去液体, 每孔加入 200 μL DMSO, 避光振摇 10 min, 酶标仪检测 490 nm 处各孔吸光度值。利用 GraphPad Prism 5.0 软件处理数据, 并进行统计学分析 (组间比较 *t* 检验)。细胞存活率见表 2、3。可见游离塞来昔布处理组的细胞存活率均达到 83% 以上, 说明该浓度范围内塞来昔布基本无毒。随着阿霉素浓度的增加, 细胞存活率逐渐下降, 说明阿霉素和 PPDC 的细胞毒作用具有浓度相关性。PPDC 的杀伤作用更强, 在阿霉素质量浓度为 1 μg/mL 时细胞存活率显著低于游离阿霉素处理组 ($P < 0.05$), 表明更低用量的 PPDC 便能显著抑制 4T1 细胞增殖, 实现了两种药物的有效联合, 体外抗肿瘤疗效更优。

2.8 PPDC 的细胞侵袭

通过细胞侵袭实验考察 PPDC 纳米晶体对 4T1 细胞侵袭转移的抑制作用。将含有基质胶的培养基

表 2 不同浓度塞来昔布对 4T1 细胞的细胞毒性 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 2 Cytotoxicity of celecoxib at different concentrations on 4T1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

塞来昔布质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	细胞存活率/%
1	98.50 \pm 10.25
5	95.33 \pm 9.58
10	92.12 \pm 7.11
20	90.70 \pm 8.02
25	83.80 \pm 9.73

表 3 不同浓度阿霉素和 PPDC 对 4T1 细胞的细胞毒性 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 3 Cytotoxicity of doxorubicin and PPDC at different concentrations on 4T1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

阿霉素质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	细胞存活率/%	
	阿霉素组	PPDC 组
0.1	91.40 \pm 6.23	78.45 \pm 5.65
0.5	77.52 \pm 5.58	63.97 \pm 7.54
1.0	70.50 \pm 9.23	45.71 \pm 9.97*
2.0	50.33 \pm 8.06	35.26 \pm 9.75*
2.5	40.89 \pm 6.19	22.11 \pm 7.30*

与相同浓度的阿霉素组比较: * $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs doxorubicin group at the same concentration

加至 Transwell 小室底部, 静置凝固, 置于 24 孔板中。4T1 细胞分别与阿霉素、塞来昔布、阿霉素/塞来昔布物理混合物和 PPDC 预处理给药 24 h, 同时设置不加药物的对照组。收集各组细胞, 调节密度为 1×10^5 个/mL, 并再次加入预处理时所对应的药物 (阿霉素、塞来昔布的质量浓度分别为 1、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 吸取 200 μL 各组细胞悬液, 分别加至 Transwell 上室, 在其下室孔板中加入 600 μL 完全培养基。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中继续培养 24 h。结束后, 对 Transwell 小室底部细胞进行固定、染色观察并计数。利用 GraphPad Prism 5.0 软件 (组间比较 t 检验) 分析数据。细胞侵袭是肿瘤转移的关键步骤, 肿瘤细胞中过表达的环氧合酶-2 能促进上皮-间充质转化加剧细胞转移^[2], 塞来昔布则可以抑制环氧合酶-2 降低肿瘤细胞转移能力。4T1 细胞经药物处理 24 h 的细胞侵袭数量见表 4。可见对照组、游离药物组均有大量的细胞侵袭至小室底部, 阿霉素/塞来昔布物理混合组和 PPDC 组的侵袭细胞数量相对减少, 且经 PPDC 处理的 4T1 细胞侵袭数量显著低于阿霉素/塞来昔布物理混合组 ($P < 0.01$)。表明在相同浓度下, PPDC 介导的阿霉素联

用塞来昔布能显著抑制细胞侵袭能力, 降低细胞侵袭水平。

表 4 4T1 细胞与不同药物共处理 24 h 的细胞侵袭数量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 4 Invasion numbers of 4T1 cells after various treatments for 24 h ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	侵袭细胞数量
对照	109.67 \pm 20.50
阿霉素	76.00 \pm 16.00
塞来昔布	54.33 \pm 11.84
阿霉素/塞来昔布	40.00 \pm 15.39
PPDC	10.33 \pm 4.93**

与阿霉素/塞来昔布物混合组比较: ** $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ vs doxorubicin/celecoxib mixed group

2.9 PPDC 的细胞黏附

细胞黏附也是肿瘤转移的关键环节, 因此通过细胞黏附实验进一步考察 PPDC 对 4T1 细胞转移的抑制作用。将经酒精消毒的玻片用含有纤黏蛋白 (10 ng/mL) 的 DMEM 培养基包被过夜, 铺于 6 孔板底部备用。按 2.8 项下方法设置分组, 并预先给予 4T1 细胞药物预处理, 调节细胞密度, 并与对应药物再次混合 (阿霉素、塞来昔布的质量浓度分别为 1、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。吸取 1 mL 各组细胞悬液, 加至上述 6 孔板, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中培养。在培养 5、15、30 min 时, 取出孔板, 弃去培养液。PBS 洗 2 遍后用冰 4% 多聚甲醛溶液固定, 在显微镜下随机选取视野, 对玻片上的细胞计数。利用 GraphPad Prism 5.0 软件 (组间比较 t 检验) 分析数据。经药物预处理 24 h 后 4T1 细胞在不同时间的黏附数量见表 5。结果显示, 当细胞再次与药物共处理 5、15、30 min 时, PPDC 组的细胞黏附数量均明显低于阿霉素/塞来昔布物理混合组 ($P < 0.05$)。表明塞来昔布抑制细胞黏附的能力显著发挥出来, 再次说明 PPDC 大幅度提高了塞来昔布的溶解度, 增强其药理活性, 发挥了两药抑制肿瘤细胞体外转移的联合作用。

3 讨论

单一化疗易引起肿瘤耐药, 导致治疗效果不佳, 多药联合是减缓耐药发生的常见治疗策略^[20]。塞来昔布具有多方面抗肿瘤作用, 且能通过抑制细胞 P-糖蛋白泵外排阿霉素避免耐药, 二者联用产生协同增效的抗癌作用^[21]。考虑到塞来昔布的难溶性和药物普遍缺乏肿瘤靶向性的问题, 纳米药物递送

表 5 4T1 细胞与不同药物共处理 24 h 的细胞黏附数量
($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 5 Adhesion numbers of 4T1 cells after various treatments for 24 h ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	黏附细胞数量		
	5 min	15 min	30 min
对照	24.80±2.59	32.20±6.72	53.80±4.21
阿霉素	21.20±2.68	28.80±2.95	37.80±6.53
塞来昔布	14.80±2.17	26.20±3.56	35.00±5.10
阿霉素/塞来昔布	11.00±2.00	25.40±1.14	32.20±3.96
PPDC	2.80±1.48*	12.80±0.84*	20.20±1.30*

与相同处理时间的阿霉素/塞来昔布物理混合组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs doxorubicin/celecoxib mixed group at the same treatment time

系统成为解决这一问题的有效手段^[22], 常见的脂质体虽具有高度的生物相容性, 但由于载药量低和稳定性差等局限性, 高分子聚合物胶束虽然稳定性有所提高, 但往往毒性较大, 组织相容性较低。因此本研究选择将药物制成纳米药物晶体, 通过减少载体用量来提高药物负载率。一般多使用 PVP、SDS 作为稳定剂制备塞来昔布纳米药物晶体, 但 SDS 毒性大, 用量不宜过多, 用量少又难以维持纳米的良好粒径。而纳米药物的粒径尺寸是其发挥高渗透效应靶向滞留在肿瘤血管的关键影响因素^[23]。于是本研究用天然多糖 PSS 和 PVP 作为稳定剂, 降低了表面活性剂的毒性, 制备得到的纳米药物晶体 PPDC 粒径合适, 不易被机体巨噬细胞清除。依靠阿霉素、塞来昔布与 PSS、PVP 之间的疏水作用力, PPDC 具有较高载药量, 有利于维持粒径的均一性和稳定性。此外, 海洋多糖 PSS 本身还具有抗血小板聚集、抗血栓等药理活性, 在血小板过度活化的肿瘤部位也有优势作用。本研究将其引入纳米药物晶体 PPDC 的体系中, 使它发挥表面活性剂和治疗剂的双重作用, 后续将考察其对体内肿瘤微环境血小板的改善情况。

本研究制备的纳米药物晶体 PPDC 既有效解决塞来昔布的难溶性、稳定剂毒性大等问题, 又通过与阿霉素共载实现两药协同抑制肿瘤细胞生长和转移的作用, 为提高难溶性药物生物利用度提供安全可行的途径和策略, 也为开展 PPDC 纳米药物晶体的体内靶向递送药物和协同抗肿瘤作用研究提供了数据支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Gurram B, Zhang S, Li M, *et al.* Celecoxib conjugated fluorescent probe for identification and discrimination of cyclooxygenase-2 enzyme in cancer cells [J]. *Anal Chem*, 2018, 90(8): 5187-5193.
- [2] Goradel N H, Najafi M, Salehi E, *et al.* Cyclooxygenase-2 in cancer: A review [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5): 5683-5699.
- [3] Zappavigna S, Cossu A M, Grimaldi A, *et al.* Anti-inflammatory drugs as anticancer agents [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(7): 2605-2634.
- [4] Jin M Z, Jin W L. The updated landscape of tumor microenvironment and drug repurposing [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 166.
- [5] Toloczko-Iwaniuk N, Dziemiańczyk-Pakiela D, Nowaszewska B K, *et al.* Celecoxib in cancer therapy and prevention - review [J]. *Curr Drug Targets*, 2019, 20(3): 302-315.
- [6] Khafaga A F, Shamma R N, Abdeen A, *et al.* Celecoxib repurposing in cancer therapy: Molecular mechanisms and nanomedicine-based delivery technologies [J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2021, 16(19): 1691-1712.
- [7] Li Y, Li M, Rantanen J, *et al.* Transformation of nanoparticles into compacts: A study on PLGA and celecoxib nanoparticles [J]. *Int J Pharm*, 2022, 611:121278-121288.
- [8] Singh S. Liposome encapsulation of doxorubicin and celecoxib in combination inhibits progression of human skin cancer cells [J]. *Int J Nanomedicine*, 2018, 13: 11-13.
- [9] Farooq M A, Jabeen A, Wang B. Formulation, optimization, and characterization of whey protein isolate nanocrystals for celecoxib delivery [J]. *J Microencapsul*, 2021, 38(5): 314-323.
- [10] Liu Y, Sun C, Hao Y, *et al.* Mechanism of dissolution enhancement and bioavailability of poorly water soluble celecoxib by preparing stable amorphous nanoparticles [J]. *J Pharm Pharm Sci*, 2010, 13(4): 589-606.
- [11] Ji P, Wang L, Chen Y, *et al.* Hyaluronic acid hydrophilic surface rehabilitating curcumin nanocrystals for targeted breast cancer treatment with prolonged biodistribution [J]. *Biomater Sci*, 2020, 8(1): 462-472.
- [12] Welch J, Wallace J, Lansley A B, *et al.* Evaluation of the toxicity of sodium dodecyl sulphate (SDS) in the MucilAir? human airway model *in vitro* [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2021, 125: 105022.
- [13] Shan M, Feng N, Zhang L. Efficacy of heparinoid PSS in treating cardiovascular diseases and beyond-A review of 31 years clinical experiences in China [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2019, 163: 75-93.
- [14] Zhang T, Liu H, Li Y, *et al.* A pH-sensitive nanotherapeutic

- system based on a marine sulfated polysaccharide for the treatment of metastatic breast cancer through combining chemotherapy and COX-2 inhibition [J]. *Acta Biomater*, 2019, 99: 412-425.
- [15] 王银松, 张韬, 李春雨, 等. 藻酸双酯钠抗肿瘤纳米制剂与制备方法: 中国, CN109528737A [P]. 2019-03-29.
- [16] Wang Y, Wan G, Li Z, *et al.* PEGylated doxorubicin nanoparticles mediated by HN-1 peptide for targeted treatment of oral squamous cell carcinoma [J]. *Int J Pharm*, 2017, 525(1): 21-31.
- [17] Rao R N, Meena S, Rao A R. An overview of the recent developments in analytical methodologies for determination of COX-2 inhibitors in bulk drugs, pharmaceuticals and biological matrices [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 39(3-4): 349-363.
- [18] Huang B, Tan Z, Bohinc K, *et al.* Interaction between nanoparticles and charged phospholipid membranes [J]. *Phys Chem Chem Phys*, 2018, 20(46): 29249-29263.
- [19] Tamara A M, Pierre K. The role of hydrophobicity in the cellular uptake of negatively charged macromolecules [J]. *Macromol Biosci*, 2018, 18(2): e1700309.
- [20] Qin S Y, Cheng Y J, Lei Q, *et al.* Combinational strategy for high-performance cancer chemotherapy [J]. *Biomaterials*, 2018, 171: 178-197.
- [21] Zhang S, Guo N, Wan G, *et al.* pH and redox dual-responsive nanoparticles based on disulfide-containing poly (β -amino ester) for combining chemotherapy and COX-2 inhibitor to overcome drug resistance in breast cancer [J]. *J Nanobiotechnol*, 2019, 17(1): 109.
- [22] Shi L, Xu L, Wu C, *et al.* Celecoxib-induced self-assembly of smart albumin-doxorubicin conjugate for enhanced cancer therapy [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10(10): 8555-8565.
- [23] Kang H, Rho S, Stiles W R, *et al.* Size-dependent EPR effect of polymeric nanoparticles on tumor targeting [J]. *Adv Healthc Mater*, 2020, 9(1): e1901223.

[责任编辑 解学星]