

依维莫司磷脂-壳聚糖自组装纳米粒的制备、表征和体外抗肿瘤研究

纪刚剑¹, 安靖¹, 武华军¹, 熊婉娟¹, 谢向阳²

1. 武汉市第三医院 药学部, 湖北 武汉 430060

2. 武汉东湖学院 护理与健康管理学院 (生命科学与化学学院), 湖北 武汉 430212

摘要: **目的** 制备依维莫司磷脂-壳聚糖自组装纳米粒 (EVR-LC/CH NPs), 考察其药剂学特性、在 Caco-2 单层细胞模型中的跨膜转运性能, 并评价其对人乳腺癌 MCF-7 细胞的抗肿瘤效果。 **方法** 采用离子凝胶法制备 EVR-LC/CH NPs。通过测定粒径分布、Zeta 电位、透射电镜形态观察以及体外药物释放行对 EVR-LC/CH NPs 进行表征; 利用 Caco-2 单层细胞模型评价 EVR-LC/CH NPs 的跨膜转运性能; 比较 EVR-LC/CH NPs 与依维莫司原料药的体外抗肿瘤效果。 **结果** EVR-LC/CH NPs 的最佳处方为磷脂与药物质量比 6:1, 磷脂与壳聚糖质量比 20:1, pH 值为 4~5。在该条件下制备的 EVR-LC/CH NPs 的平均粒径为 (151.5 ± 5.3) nm, PDI 为 0.213 ± 0.006 , Zeta 电位为 (39.1 ± 0.5) mV。透射电镜下可清晰观察到其具有“核-壳”结构; 体外释放研究表明, EVR-LC/CH NPs 呈现双相释放模式, 且具有良好的 pH 值响应特性; Caco-2 单层细胞转运实验显示, EVR-LC/CH NPs 能有效促进药物在 Caco-2 单层细胞中的跨膜转运; 与依维莫司原料药相比, EVR-LC/CH NPs 对人乳腺癌 MCF-7 细胞的抑制作用更显著。 **结论** 制备的 EVR-LC/CH NPs 能够有效调控药物的体外释放行为, 增强药物的跨膜转运能力, 并显著提高药物的抗肿瘤效果。

关键词: 依维莫司磷脂-壳聚糖自组装纳米粒; 依维莫司; 粒径分布; Zeta 电位; 跨膜转运; 抗肿瘤

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2026)09-2558-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2026.09.009

Preparation, characterization and *in vitro* antitumor of everolimus phospholipid-chitosan self-assembled nanoparticle

Ji Gangjian¹, An Jing¹, Wu Huajun¹, Xiong Wanjuan¹, Xie Xiangyang²

1. Department of Pharmacy, Wuhan Third Hospital, Wuhan 43006, China

2. College of Nursing and Health Management & College of Life Sciences and Chemistry, Wuhan Donghu University, Wuhan 430212, China

Abstract: Objective To prepare everolimus phospholipid-chitosan self-assembled nanoparticles (EVR-LC/CH NPs), investigate their pharmaceutical properties, transmembrane transport performance in the Caco-2 monolayer cell model, and to evaluate their antitumor effects on human breast cancer MCF-7 cells. **Methods** EVR-LC/CH NPs were prepared using the ion gelation method. The characterization of EVR-LC/CH NPs was conducted by measuring particle size distribution, Zeta potential, transmission electron microscopy morphology, and *in vitro* drug release behavior determination. The transmembrane transport performance of EVR-LC/CH NPs was evaluated using the Caco-2 monolayer cell model. The *in vitro* antitumor efficacy of EVR-LC/CH NPs was compared with that of the active pharmaceutical ingredient of everolimus. **Results** The optimized formulation for EVR-LC/CH NPs was as follows: the ratio of phospholipid to drug was 6:1, the ratio of phospholipid to chitosan was 20:1, and the pH value was pH 4 – 5. Under these conditions, the EVR-LC/CH NPs had an average particle size of (151.5 ± 5.3) nm, a PDI of 0.213 ± 0.006 , and a Zeta potential of (39.1 ± 0.5) mV. Transmission electron microscopy clearly observed a "core-shell" structure. The *in vitro* release studies showed a biphasic release pattern with excellent pH-responsive properties. Caco-2 monolayer cell transport experiments showed that EVR-LC/CH NPs effectively promoted transmembrane transport of the drug in Caco-2 monolayer cells. Compared to the active pharmaceutical ingredient of everolimus, EVR-LC/CH NPs exhibited more significant inhibitory effects on human breast cancer MCF-7 cells. **Conclusion** The prepared EVR LC/CH NPs can effectively regulate the *in vitro* release behavior of drugs, enhance the

收稿日期: 2026-04-27

基金项目: 湖北省科技计划项目 (2019CFC886)

作者简介: 纪刚剑 (1986—), 男, 主管药师, 硕士, 研究方向为纳米制剂给药系统。E-mail: jigangjian1999@163.com

transmembrane transport ability of drugs, and significantly improve the antitumor effect of drugs.

Key words: everolimus phospholipid-chitosan self-assembled nanoparticles; everolimus; size distribution; Zeta potential transmembrane transport; antitumor effect

依维莫司属于哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)抑制剂,通过特异性抑制 mTOR 信号通路(如蛋白质合成、细胞周期进程、代谢调节等)发挥药理作用^[1],其在恶性肿瘤的靶向治疗、器官移植后免疫抑制维持治疗中占有重要地位^[2-3]。尽管依维莫司的作用机制明确且临床疗效显著,但其口服生物利用度较低,约为 16%^[4],这主要源于两个方面:首先,依维莫司属于生物药剂学分类系统(BCS) II 类药物,水中溶解度极低(约 1 $\mu\text{g/mL}$),导致其在胃肠道体液中的溶出速率严重受限,成为口服吸收的关键限速步骤^[5];其次,依维莫司是外排转运体 P-糖蛋白(P-gp)的底物,经被动扩散进入肠上皮细胞的药物会被 P-gp 介导的主动外排作用重新泵回肠腔,从而显著降低药物吸收量^[6]。磷脂-壳聚糖自组装纳米粒(LC/CH NPs)是一种基于天然生物材料的纳米递送系统,其形成主要依赖于带负电的磷脂与带正电的壳聚糖之间通过静电吸引、氢键、疏水相互作用驱动的超分子自组装过程^[7]。该体系兼具两类组分的独特优势:磷脂作为天然两亲性脂质,具有优良的生物相容性和安全性,可高效包载疏水性药物^[8];壳聚糖作为一种阳离子多糖,具有良好的生物可降解性、生物黏附性和黏膜渗透增强作用,有助于促进药物跨上皮转运^[8]。二者的结合不仅实现了材料功能的互补,且通过协同组装构建了结构稳定的“核-壳”型纳米粒,为药物递送提供了多功能平台^[9]。本研究设计、制备了依维莫司磷脂-壳聚糖自组装纳米粒(EVR-LC/CH NPs),并对其药剂学性质、体外释药行为、跨膜转运性能以及抗肿瘤细胞活性进行了评价,为改善依维莫司口服生物利用度、靶向递送、控释给药等领域应用探索一种潜在的递送平台。

1 仪器与试药

MYP11-2 恒温磁力搅拌器(上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司);Zetasizer Ultra 型纳米粒度及 Zeta 电位分析仪(英国马尔文公司);JEM-1400 型透射电镜(日本日立公司);RC-12MD 溶出试验仪(天津市精拓仪器科技有限公司)。

依维莫司原料药(浙江康润制药有限公司,质量分数 99.8%,批号 S20250115);壳聚糖(脱乙酰

度: >95%,相对分子质量 $1.00 \times 10^5 \sim 1.50 \times 10^5$,青岛博益特生物材料股份有限公司);大豆磷脂(上海爱康精细化工有限公司);盐酸(四川金山制药有限公司);DMEM 培养基(广州洁特生物科技有限公司);二甲基亚砜(DMSO,北京索莱宝科技有限公司);四甲基偶氮唑蓝(MTT,北京索莱宝科技有限公司);Caco-2 细胞株(南京万木春生物科技有限公司);人乳腺癌 MCF-7 细胞株(武汉尚恩生物技术有限公司)。

2 方法与结果

2.1 EVR-LC/CH NPs 的制备

采用离子凝胶法制备 EVR-LC/CH NPs^[10]。称取处方量的壳聚糖,分散于 50 mL 0.2 mol/L 稀盐酸溶液中,持续磁力搅拌至完全溶解,溶液经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,收集滤液,并加蒸馏水定容至 50 mL,作为水相备用;另称取处方量的大豆磷脂和依维莫司原料药,共同溶解于 5 mL 乙醇中,搅拌溶解,作为有机相备用;在 2500 r/min 磁力搅拌条件下,使用配备 22G 针头的注射器将有机相以 2 mL/min 恒速注入到 50 mL 壳聚糖水相中,并使用 0.2 mol/L 氢氧化钠溶液调节体系 pH 4.0~5.0,持续磁力搅拌 30 min;再将上述溶液进行减压旋蒸除去乙醇,补加蒸馏水定容至 50 mL,即得。

2.2 粒径、Zeta 电位测定

精密量取 EVR-LC/CH NPs 混悬液 0.5 mL,用 pH 4.5 稀盐酸溶液稀释至 5.0 mL(稀释 10 倍),摇匀。使用动态光散射仪测定纳米粒的粒径分布、粒径多分散性(PDI);使用电泳光散射仪测定 Zeta 电位。测定前,所有样品均在 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 恒温条件下平衡 5 min,每个样品平行测定 3 次,取平均值。

2.3 包封率测定

精密量取 EVR-LC/CH NP 混悬液 5.0 mL,置于离心管中,以 20 000 r/min 的转速高速离心 60 min。离心后,精密移取上清透明液体 2.0 mL 置 10 mL 量瓶中,加入流动相至刻度,即得游离药物待测溶液(记为 $W_{\text{游离}}$);另精密量取 EVR-LC/CH NPs 混悬液 0.5 mL,置于 50 mL 量瓶中,加入少量乙醇,于水浴条件下超声处理,再用流动相稀释至刻度,即得总药物待测溶液(记为 $W_{\text{总}}$)。两种待测溶

液分别采用 HPLC 测定依维莫司的质量浓度^[11], 计算包封率[包封率 = $(W_{\text{总}} - W_{\text{游离}}) / W_{\text{总}}$]。

2.4 处方筛选

2.4.1 磷脂与药物质量比考察 按照 EVR-LC/CH NPs 的制备工艺, 固定处方中磷脂与壳聚糖投料质量比为 20 : 1, 并调节 pH 值至 4.5, 考察磷脂与药物质量比在 1 : 1~10 : 1 对 EVR-LC/CH NPs 关键质量属性的影响, 结果见表 1。结果显示, 当磷脂与药物质量比由 1 : 1 增加至 4 : 1 时, 纳米粒的平均粒径呈下降趋势, 包封率呈上升趋势, 而当磷脂

与药物质量比进一步由 6 : 1 增加至 10 : 1 时, 纳米粒的粒径呈增长趋势, 包封率则进入平台期, 表明适当的磷脂与药物质量比有利于形成粒径较小、分布均匀的纳米粒; 而当磷脂相对过量时, 会引发磷脂分子间的过度疏水作用, 导致纳米粒发生融合或聚集, 从而粒径增大; 同时有限的药物量已不足以占据全部磷脂载体, 致使包封率达到饱和。而不同磷脂与药物质量比对纳米粒的 Zeta 电位影响较小。基于上述研究结果, 确定 EVR-LC/CH NPs 处方中磷脂与药物质量比为 6 : 1。

表 1 磷脂与药物质量比对 EVR-LC/CH NPs 关键质量属性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of lecithin and drug mass ratio on key quality attributes of EVR-LC/CH NPs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

磷脂与药物质量比	粒径分布/nm	PDI	Zeta 电位/mV	包封率/%
1 : 1	235.6 ± 8.4	0.202 ± 0.007	38.1 ± 0.7	86.6 ± 0.7
2 : 1	203.9 ± 6.0	0.215 ± 0.006	37.6 ± 0.2	90.2 ± 1.2
4 : 1	165.3 ± 5.2	0.226 ± 0.011	39.5 ± 0.5	93.3 ± 0.5
6 : 1	153.6 ± 6.7	0.217 ± 0.007	38.4 ± 0.1	95.6 ± 0.7
8 : 1	191.4 ± 4.9	0.227 ± 0.009	37.5 ± 0.3	95.4 ± 0.6
10 : 1	242.2 ± 7.2	0.238 ± 0.010	37.9 ± 0.2	96.8 ± 2.2

2.4.2 磷脂与壳聚糖质量比考察 按照 EVR-LC/CH NPs 的制备工艺, 固定处方中磷脂与药物质量比为 6 : 1, 调节 pH 值至 4.5, 考察磷脂与壳聚糖质量比在 5 : 1~45 : 1 对 EVR-LC/CH NPs 关键质量属性的影响, 结果见表 2。结果表明, 当磷脂与壳聚糖质量比由 5 : 1 增加至 20 : 1 时, 纳米粒的粒径、PDI、包封率均呈下降趋势, 但超过该比例后, 粒径和 PDI 均出现增长趋势, 包封率持续降低, 表明在较低磷脂与壳聚糖质量比下, 适度增加磷脂有助于形成更致密的疏水内核并降低体系黏度, 从而降低粒径分布, 而当磷脂与壳聚糖质量比超过临界

值, 壳聚糖的相对不足削弱了其作为空间稳定剂和静电交联剂的功能, 导致颗粒疏水相互作用增强, 引发聚集, 粒径增大^[12]。同时壳聚糖的减少直接降低了其通过静电作用捕获和稳定磷脂-药物复合物的能力, 致使包封率下降。基于上述研究结果, 确定 EVR-LC/CH NPs 处方中磷脂与壳聚糖质量比为 20 : 1。

2.4.3 溶液体系 pH 值考察 按照 EVR-LC/CH NPs 的制备工艺, 固定处方中磷脂与药物质量比为 6 : 1, 磷脂与壳聚糖质量比为 20 : 1, 调节 pH 值在 3.0~6.0 对 EVR-LC/CH NPs 关键质量属性的影响,

表 2 磷脂与壳聚糖质量比对 EVR-LC/CH NPs 关键质量属性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of lecithin and chitosan mass ratio on key quality attributes of EVR-LC/CH NPs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

磷脂与壳聚糖质量比	粒径分布/nm	PDI	Zeta 电位/mV	包封率/%
5 : 1	241.6 ± 6.3	0.289 ± 0.005	37.6 ± 0.8	96.3 ± 0.7
10 : 1	218.1 ± 5.2	0.375 ± 0.011	38.3 ± 0.2	95.2 ± 0.3
20 : 1	154.3 ± 7.7	0.221 ± 0.008	38.2 ± 0.6	95.3 ± 0.6
30 : 1	183.1 ± 7.1	0.251 ± 0.006	38.7 ± 0.3	93.5 ± 0.4
40 : 1	233.2 ± 4.8	0.263 ± 0.012	37.9 ± 0.5	90.7 ± 0.2
45 : 1	268.4 ± 8.3	0.295 ± 0.007	38.6 ± 0.4	87.3 ± 0.6

结果见表 3。当溶液 pH 值在 3.0~3.5 时，壳聚糖氨基被充分质子化，但过量的 H⁺反会屏蔽 EVR-LC/CH NPs 表面远程静电排斥作用，破坏磷脂膜结构完整性，导致粒子间发生聚集和沉淀^[13]；当溶液 pH 值升高至 5.5~6.0 时，壳聚糖氨基质子化程度下降，Zeta 电位降低至 10~20 mV，此时粒径虽然

较小，但静电排斥力已显著减弱，体系处于亚稳定状态，长期储存存在聚集风险^[14]。当溶液 pH 值在 4.0~5.0 时，EVR-LC/CH NPs 表现出良好的粒径分布和包封率，同时避免过低 pH 值带来的膜结构破坏和静电屏蔽效应，以及过高 pH 值导致的亚稳定状态。因此本研究确定溶液体系 pH 值为 4~5。

表 3 溶液体系 pH 值对 EVR-LC/CH NPs 关键质量属性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)				
Table 3 Effects of pH value of solution on key quality attributes of EVR-LC/CH NPs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)				
溶液体系 pH 值	粒径分布/nm	PDI	Zeta 电位/mV	包封率/%
3.0	685.6±13.8	0.436±0.016	56.4±1.6	92.9±0.2
3.5	236.8±5.9	0.232±0.005	48.9±0.4	94.7±0.5
4.0	163.1±6.1	0.224±0.007	42.2±0.7	95.4±0.4
4.5	155.6±4.7	0.215±0.006	38.8±0.5	95.8±0.7
5.0	151.8±5.6	0.216±0.004	33.6±0.3	94.9±0.5
5.5	154.5±4.3	0.225±0.009	22.1±0.4	96.5±0.6
6.0	152.7±5.8	0.237±0.007	11.5±0.2	93.9±0.4

根据单因素处方筛选结果，最终确定 EVR-LC/CH NPs 最佳处方为磷脂与药物质量比 6：1，磷脂与壳聚糖质量比 20：1，pH 值为 4~5。

2.5 表征

2.5.1 粒径、Zeta 电位测定 EVR-LC/CH NPs 的粒径、Zeta 电位测定结果见图 1。结果显示，EVR-LC/CH NPs 的平均粒径为 (151.5±5.3) nm，PDI 为 0.213±0.006，Zeta 电位为 (39.1±0.5) mV。该粒径分布比较集中 (PDI<0.25)，表明纳米粒具有良好的均一性；Zeta 电位为正值且绝对值大于 30 mV，提示纳米粒表面带有较强的正电荷，有利于通过静电斥力维持胶体体系的物理稳定性，并可能增强其与带负电的肠上皮细胞膜之间的黏附相互作用，促进药物跨膜吸收^[15]。

2.5.2 微观形态观察 EVR-LC/CH NPs 的微观形貌见图 2。样品前处理步骤如下：取适量 EVR-

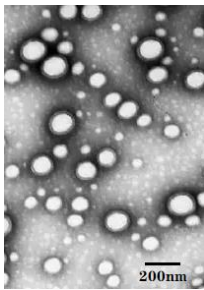


图 2 EVR-LC/CH NPs 透射电镜照片
Fig. 2 Transmission electron microscopy of EVR-LC/CH NPs

LC/CH NPs，用 pH 4.5 稀盐酸溶液进行适当稀释，滴加少量于覆有碳支持膜的铜网表面，使样品液均匀铺展，并用滤纸沿铜网边缘轻轻吸去多余液体。随后采用 2%磷钨酸染液进行负染色，将铜网置于红外灯下干燥。在加速电压为 100 kV 的透射电镜下观察样品形貌，分析 EVR-LC/CH NPs 的粒径分布、表面结构，并评估其分散性、形态均一性情况。透射电镜图像显示，EVR-LC/CH NPs 呈球形，形态规整，表现出良好的形态均一性。图像中可见清晰的“核-壳”结构，其内部致密区域是由磷脂构成的脂质核，外围较浅的层状包覆层，推测是由壳聚糖分子通过静电相互作用组装形成的水化外壳。该结构为疏水性药物依维莫司提供了理想的包载微环境，药物主要分布于磷脂双分子层的疏水区域或脂质-水界面处^[16]。另外，需要说明的是，透射电镜样品在制备过程中经历了干燥处理，可能导致水化

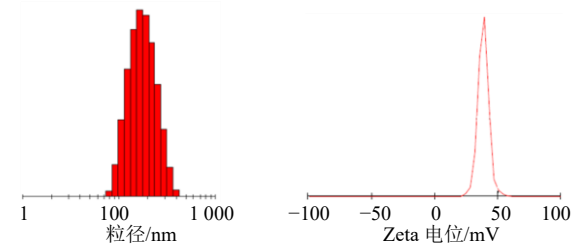


图 1 EVR-LC/CH NPs 粒径分布和 Zeta 电位
Fig. 1 Size distribution and Zeta potential of EVR-LC/CH NPs

壳层发生部分皱缩或变形,这可能是图像中部分颗粒外缘呈现轻微皱褶或波纹状结构的原因,属于制样过程产生的假象。

2.6 体外药物释放

采用透析法考察 EVR-LC/CH NPs 的体外药物释放行为。取 EVR-LC/CH NPs 加入预处理好的透析袋(截留相对分子质量 12 000~14 000)中,排尽袋内空气后密封两端。将透析袋置于盛有 500 mL 释放介质的烧杯中,介质分别为 pH 1.2 盐酸溶液、pH 4.5 醋酸盐缓冲液、pH 7.4 磷酸盐缓冲液,3 种介质中均加入 0.5% 聚山梨酯 80。烧杯置于(37.0±0.5)℃ 恒温水浴中,以 100 r/min 的转速进行磁力搅拌,保持透析袋内外介质充分交换。于预设时间点(1、2、4、6、8、12、18、24 h)分别移取 5 mL 释放介质(同时立即补加等体积同温空白介质),取样液经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,弃去初滤液,取续滤液采用 HPLC 法测定依维莫司的质量浓度^[11],绘制体外释药曲线,见图 3。

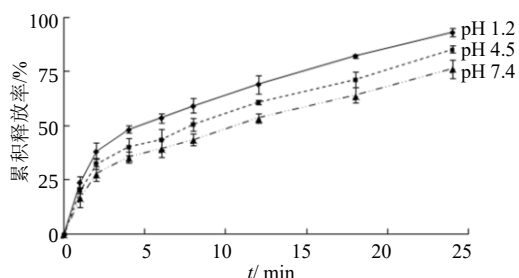


图 3 EVR-LC/CH NPs 的体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 3 *In vitro* release profile of EVR-LC/CH NPs ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

释放曲线结果显示, EVR-LC/CH NPs 在 3 种介质中依维莫司均呈现明显的双相释放模式:初期(0~2 h)存在明显的突释效应,随后转为缓慢而持续的释放阶段。该释放特征可能与纳米粒的结构及其在释放介质中的动态变化有关:突释效应主要归因于吸附于颗粒表面或近表面的药物快速扩散,以及壳聚糖外壳在介质中溶胀形成的孔隙促进了部分药物的逸出;后续的持续释放阶段则反映药物从磷脂疏水核内部逐渐分配和扩散过程。此外, EVR-LC/CH NPs 在酸性介质中的释放速率显著高于中性介质,这主要归因于壳聚糖的 pH 值依赖性溶解特性:在酸性介质中,壳聚糖分子中氨基质子化程度增高,分子链舒展并加速溶蚀,导致外壳孔隙率增加、结构松散,从而促进药物向外扩散;而在近中

性介质中,壳聚糖溶蚀缓慢,外壳保持相对完整,药物释放更平稳。

2.7 Caco-2 细胞跨膜转运研究

Caco-2 细胞单层是评估 P-gp 外排功能最广泛应用的体外转运模型。取传代 Caco-2 细胞,以每孔 5.0×10^4 个的密度接种到 Transwell 插入式细胞培养皿中,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 21 d,每 3 天更换 1 次培养基。通过测定跨上皮电阻 (TEER) 评价 Caco-2 细胞单层的完整性,当 TEER 值 $\geq 600 \Omega/\text{cm}^2$ 时,即可用于细胞转运研究^[17]。实验前, Caco-2 细胞单层用 37℃ HBSS 洗涤,并于 37℃、5% CO₂ 培养箱中平衡 30 min。将依维莫司原料药、EVR-LC/CH NPs 分别用 HBSS 缓冲液 (pH 7.4) 稀释至 5.0 μg/mL。双向转运实验操作如下:测定顶端 (AP) 至基底外侧 (BL) 方向时,于 AP 侧加入 250 μL 供试液, BL 侧加入 800 μL 空白 HBSS;测定 BL 至 AP 方向时,于 BL 侧加入 250 μL 供试液, AP 侧加入 800 μL 空白 HBSS。于预设时间点 (30、60、90、120 min) 从接收侧取样 100 μL (随即补加等体积空白 HBSS),采用 HPLC 法测定依维莫司的质量浓度^[11]。每组实验平行重复 3 次,取均值。计算表观渗透系数 (P_{app})、外排比 (ER)。

$$P_{\text{app}} = (dQ/dt) / (A \times C_0)$$

$$\text{ER} = P_{\text{app}}(\text{BL} \rightarrow \text{AP}) / P_{\text{app}}(\text{AP} \rightarrow \text{BL})$$

dQ/dt 为药物的跨膜渗透速率, A 为 Transwell 膜的有效面积, C_0 为供试液中药物初始质量浓度, $P_{\text{app}}(\text{BL} \rightarrow \text{AP})$ 表示药物由 BL 至 AP 方向的表现渗透系数, $P_{\text{app}}(\text{AP} \rightarrow \text{BL})$ 表示药物由 AP 至 BL 方向的表现渗透系数

跨膜转运结果显示,依维莫司原料药在 Caco-2 单层模型中 AP→BL 方向的 $P_{\text{app}}(\text{AP} \rightarrow \text{BL})$ 为 $(0.79 \pm 0.18) \times 10^{-6} \text{ cm/s}$, BL→AP 方向的 $P_{\text{app}}(\text{BL} \rightarrow \text{AP})$ 为 $(5.78 \pm 0.57) \times 10^{-6} \text{ cm/s}$, ER 值为 7.31,提示依维莫司为 P-gp 底物,药物与 P-gp 结合后被外排至肠腔,这解释了依维莫司渗透性较差的原因^[18]。相比之下, EVR-LC/CH NPs 的 AP→BL 方向 $P_{\text{app}}(\text{AP} \rightarrow \text{BL})$ 升高至 $(3.52 \pm 0.42) \times 10^{-6} \text{ cm/s}$, BL→AP 方向的 $P_{\text{app}}(\text{BL} \rightarrow \text{AP})$ 降为 $(2.87 \pm 0.36) \times 10^{-6} \text{ cm/s}$, ER 值降至 0.82。

2.8 体外抗肿瘤活性评价

采用 MTT 法评价 EVR-LC/CH NPs 对 MCF-7 人乳腺癌细胞体外抑制作用。取处于对数生长期、状态良好的 MCF-7 人乳腺癌细胞,经胰酶消化后制备成单细胞悬液,调整细胞密度至 5×10^3 个/孔,

接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔加入 200 μL 完全培养基 (含 10% 胎牛血清、双抗)。将培养板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的饱和湿度培养箱中预培养 24 h, 使细胞充分贴壁。预培养结束后, 吸弃孔内上清培养液。分别加入不同质量浓度的依维莫司原料药溶液 (以 DMSO 为助溶剂, 最终 DMSO 浓度 $<0.1\%$) 和 EVR-LC/CH NPs, 药物终质量浓度梯度设定为 1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、32.0、64.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 每个质量浓度设 3 个复孔^[19-20]。同时设置对照组 (仅加入含等量溶剂的培养基, 不加药物) 和空白组 (不含细胞, 仅含培养基)。加药后继续在相同条件下孵育 48 h。孵育结束后, 吸弃含药培养液, 每孔用 pH 7.4 磷酸盐缓冲液 (PBS) 轻柔洗涤 3 次, 以去除残留药物。随后每孔加入 200 μL 新鲜完全培养基和 20 μL MTT 溶液 (5 mg/mL, 用 PBS 配制), 继续孵育 4 h 后, 小心吸弃孔内上清液 (避免触及底部蓝紫色甲臞结晶), 每孔加入 150 μL 二甲基亚砜 (DMSO), 置振荡器上避光振摇 10 min, 使甲臞结晶充分溶解。使用酶标仪在 490 nm 波长处测定各孔的吸光度 (A) 值, 计算细胞抑制率, 见图 4。

$$\text{抑制率} = 1 - (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

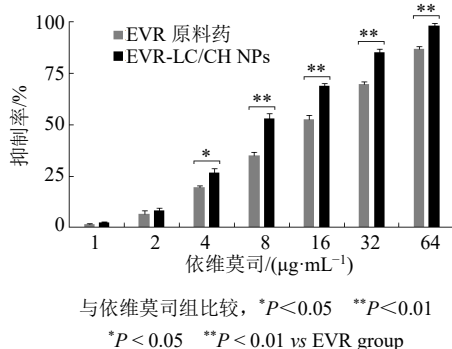


图 4 EVR-LC/CH NPs 对人乳腺癌 MCF-7 细胞抑制

Fig. 4 Inhibitory effect of EVR-LC/CH NPs on human breast cancer MCF-7 cells

MTT 实验结果显示, 依维莫司原料药对人乳腺癌 MCF-7 细胞的半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 $(15.6 \pm 1.1) \mu\text{g}/\text{mL}$, EVR-LC/CH NPs 的 IC_{50} 为 $(8.4 \pm 0.9) \mu\text{g}/\text{mL}$ 。依维莫司原料药和 EVR-LC/CH NPs 对人乳腺癌 MCF-7 细胞的生长抑制作用均呈现明显的浓度相关。在 1.0~64.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 随着给药质量浓度的升高, 两种制剂对肿瘤细胞的抑制率均逐步增加, 表明抗肿瘤活性与药物质量浓度呈正相关。值得注意的是, 当药物质量浓度达到 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及以上时, EVR-LC/CH NPs 对肿瘤细胞的抑制率显著优

于同质量浓度的依维莫司原料药溶液 ($P < 0.05$ 、0.01)。如在 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, EVR-LC/CH NPs 对人乳腺癌 MCF-7 细胞的抑制率约为依维莫司原料药的 1.36 倍; 在 8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 抑制率差异进一步扩大。该差异可能归因于 EVR-LC/CH NPs 的纳米尺度效应 (粒径通常小于 200 nm), 较小的粒径赋予纳米粒更强的细胞膜亲和力, 有利于通过内吞途径高效进入肿瘤细胞; 进入细胞后, 胶束在溶酶体/内涵体的低 pH 值环境 (pH 4.5~5.5) 中发生解离或加速释放药物^[21], 从而在靶部位快速达到有效药物质量浓度, 发挥更强的抗肿瘤作用。

3 讨论

以壳聚糖、磷脂为复合载体, 采用离子凝胶法制备壳聚糖-磷脂自组装纳米粒。其构建核心为荷正电的壳聚糖 (pH <5.0 时 $-\text{NH}_3^+$) 与荷负电的磷脂 ($-\text{PO}_4^-$) 之间的静电吸引, 即在自组装过程中, 磷脂分子凭借疏水相互作用将其长链脂肪酸尾部聚集形成致密的脂质内核, 而亲水的磷酸胆碱头部朝向水相; 与此同时, 壳聚糖分子通过静电作用吸附于脂质核表面, 形成亲水性的外壳, 从而降低界面自由能, 维持纳米结构的动力学和热力学稳定性。药物则通过物理包埋或静电作用装载于脂核中, 包载效率取决于药物脂溶性和与载体相容性。

本研究通过单因素试验考察了 EVR-LC/CH NPs 各处方因素对制剂质量属性的影响。结果显示, 当磷脂与药物质量比为 6:1, 磷脂与壳聚糖质量比为 20:1, pH 值为 4~5 时, 所得 EVR-LC/CH NPs 粒径较小 (约 150 nm)、分布较窄 ($\text{PDI} < 0.25$)、Zeta 电位大于 +30 mV 且包封率大于 90%; 形态学观察显示, EVR-LC/CH NPs 呈规则球形, 粒度分布较集中, 具备典型的“核-壳”分层结构; 体外释放行为研究结果显示, EVR-LC/CH NPs 呈双相释放模式, 且具有良好的 pH 值响应特性, 可实现在胃肠道不同区段的差异化释药。

Caco-2 单层细胞跨膜转运实验评价了纳米制剂的渗透特性。结果表明, 与依维莫司原料药相比, EVR-LC/CH NPs 在 AP $\rightarrow$ BL 方向的 P_{app} (AP $\rightarrow$ BL) 显著提高, 而 BL $\rightarrow$ AP 方向的 P_{app} (BL $\rightarrow$ AP) 显著降低, 外排比 (ER) 从 7.31 降至 0.82。推测 EVR-LC/CH NPs 可通过双重机制促进药物的跨膜吸收: 一方面, 壳聚糖外壳与细胞膜静电吸附后可逆性开启细胞间紧密连接, 增强细胞旁路渗透^[22]; 另一方面, 纳米粒表面特性和处方中的功能辅料 (如磷脂和壳聚

糖)可能抑制 P-gp 介导的药物外排,降低肠上皮细胞对药物的主动泵出^[23]。因此, EVR-LC/CHNPs 有望显著提高依维莫司的口服生物利用度。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Houghton P J. Everolimus [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(5): 1368-1372.
- [2] 王喆, 张颐. 依维莫司在女性生殖器恶性肿瘤治疗中的应用 [J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(7): 887-891.
- [3] 刘丽, 王华光. 依维莫司在器官移植领域的临床应用 [J]. 中国药业, 2015, 24(13): 3-6.
- [4] Jang S W, Kang M J. Improved oral absorption and chemical stability of everolimus via preparation of solid dispersion using solvent wetting technique [J]. *Int J Pharm*, 2014, 473(1-2): 187-193.
- [5] Kaur S, Singh R, Singh D. Quality by design-steered development of stealth liposomal formulation of everolimus: A systematic optimization and evaluation [J]. *Curr Drug Metab*, 2024, 25(6): 446-464.
- [6] Ma Y, Guan R, Gao S, *et al.* Designing orodispersible films containing everolimus for enhanced compliance and bioavailability [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2020, 17(10): 1499-1508.
- [7] 马庆明, 金玉琼, 曹洁, 等. 壳聚糖-磷脂自组装纳米粒载药系统的研究进展 [J]. 中国医药工业杂志, 2021, 52(5): 619-627.
- [8] 董武军, 王玮珏, 周君卓, 等. 磷脂-壳聚糖自组装纳米粒的研究进展 [J]. 中国药房, 2019, 30(8): 1143-1147.
- [9] Fereig S A, El-Zaafarany G M, Arafa M G, *et al.* Self-assembled tacrolimus-loaded lecithin-chitosan hybrid nanoparticles for *in vivo* management of psoriasis [J]. *Int J Pharm*, 2021, 608: 121114.
- [10] 刘艳菊, 武月丹, 位小杰, 等. 包载金丝桃苷的磷脂酰胆碱/壳聚糖自组装纳米粒的制备、表征及其口服药动学研究 [J]. 中草药, 2025, 56(3): 819-830.
- [11] 孙莉君, 沈海梅, 马海霞. HPLC 法测定依维莫司原料药中依维莫司 [J]. 现代药物与临床, 2015, 30(6): 663-665.
- [12] Ma Q, Gao Y, Sun W, *et al.* Self-Assembled chitosan/phospholipid nanoparticles: From fundamentals to preparation for advanced drug delivery [J]. *Drug Deliv*, 2020, 27(1): 200-215.
- [13] Farrag M, Abri S, Leipzig N D. pH-dependent RNA isolation from cells encapsulated in chitosan-based biomaterials [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 146: 422-430.
- [14] Al-Kassas R, Wen J, Cheng A E, *et al.* Transdermal delivery of propranolol hydrochloride through chitosan nanoparticles dispersed in mucoadhesive gel [J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 153: 176-186.
- [15] Barbieri S, Buttini F, Rossi A, *et al.* Ex vivo permeation of tamoxifen and its 4-OH metabolite through rat intestine from lecithin/chitosan nanoparticles [J]. *Int J Pharm*, 2015, 491(1-2): 99-104.
- [16] Chhonker Y S, Prasad Y D, Chandasana H, *et al.* Amphotericin-B entrapped lecithin/chitosan nanoparticles for prolonged ocular application [J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 72: 1451-1458.
- [17] Yang Q, Xing M, Wang K, *et al.* Application of fucoidan in Caco-2 model establishment [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2022, 15(4): 418.
- [18] Lamoureux F, Picard N, Boussera B, *et al.* Sirolimus and everolimus intestinal absorption and interaction with calcineurin inhibitors: A differential effect between cyclosporine and tacrolimus [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2012, 26(4): 463-472.
- [19] 姬健钧, 邱文奎. 氧化苦参碱通过 COX-2/PINK1/Parkin 信号通路介导的线粒体自噬对 MG63 骨肉瘤细胞的促凋亡机制 [J]. 中国药房, 2024, 35(1): 44-50.
- [20] 刘雪松, 马晓玲, 石磊岭, 等. 骆驼刺正丁醇萃取部位中单体化合物的分离纯化及其对人宫颈癌 HeLa 细胞的影响研究 [J]. 中国药房, 2019, 30(4): 506-512.
- [21] Ning S, Wang C, Zhao L, *et al.* Lecithin/chitosan nanoparticle drug carrier improves anti-tumor efficacy of *Monascus pigment rubropunctatin* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 242(Pt 3): 125058.
- [22] Pyo Y C, Tran P, Kim D H, *et al.* Chitosan-coated nanostructured lipid carriers of fenofibrate with enhanced oral bioavailability and efficacy [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2020, 196: 111331.
- [23] Weinheimer M, Fricker G, Burhenne J, *et al.* The application of P-gp inhibiting phospholipids as novel oral bioavailability enhancers - An *in vitro* and *in vivo* comparison [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2017, 108: 13-22.

[责任编辑 解学星]