

负载鬼臼毒素聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒的制备、性质表征和抗肿瘤活性

曹思思, 金 琪, 张 丹, 方 松*

中国人民解放军中部战区总医院 药剂科, 湖北 武汉 430070

摘要: **目的** 制备负载鬼臼毒素聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒 (PPT-loaded PLGA NPs), 并考察其对人乳腺癌 MCF-7 细胞的抗肿瘤活性。**方法** 采用乳化-溶剂蒸发法制备 PPT-loaded PLGA NPs, 以聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA)、聚乙烯醇 (PVA)、*D*- α -维生素 E 聚乙二醇 1000 琥珀酸酯 (TPGS) 质量浓度作为自变量, 以粒径分布、包封率作为因变量, 采用中心复合设计-响应面法进行处方优化。使用透射电镜观察微观形态, 采用透析法考察 PPT-loaded PLGA NPs 在不同 pH 值释放介质中的体外释药特性, 考察其对人乳腺癌 MCF-7 细胞的抗肿瘤作用。**结果** PPT-loaded PLGA NPs 的最优处方为: PLGA 质量浓度为 120.0 mg/mL, PVA 质量浓度为 20.0 mg/mL, TPGS 质量浓度为 2.5 mg/mL。制备的 PPT-loaded PLGA NPs 呈规则球形结构, 实测粒径 (163.6 ± 4.2) nm、包封率 (89.4 ± 0.6) %。PPT-loaded PLGA NPs 体外释药速率具有缓释性, 48 h 累积释放率达 90%。PPT-loaded PLGA NPs 对人乳腺癌 MCF-7 细胞表现出良好的体内外抗肿瘤活性。**结论** 成功制备了 PPT-loaded PLGA NPs, 其具有良好的缓释效果和体内外抗肿瘤活性。

关键词: 负载鬼臼毒素 PLGA 纳米粒; 鬼臼毒素; 粒径分布; 包封率; 累积释放率; 抗肿瘤活性

中图分类号: R282.4

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2025)09-2215-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.09.010

Preparation, characterization, and anti-tumor activity of podophyllotoxin loaded PLGA nanoparticles

CAO Sisi, JIN Qi, ZHANG Dan, FANG Song

Department of Pharmacy, Central Hospital of Central Theater, Wuhan 430070, China

Abstract: Objective To prepare podophyllotoxin loaded PLGA nanoparticles (PPT-loaded PLGA NPs) and to evaluate the anti-tumor activity against human MCF-7 breast cancer cells. **Methods** PPT-loaded PLGA NPs were prepared by emulsification - solvent evaporation method. PLGA concentration, PVA concentration, and TPGS concentration were used as variable factors, particle size distribution and encapsulation rate were used as evaluation indexes, and central composite design - response surface method was used to optimize the prescription. The microscopic morphology was observed with transmission electron microscope. The *in vitro* release characteristics of PPT-loaded PLGA NPs in different pH value release media were investigated by dialysis method. The anti-tumor activities of PPT-loaded PLGA NPs against human MCF-7 breast cancer cells were studied. **Results** The optimal formulation of PPT-loaded PLGA NPs was as followed: with PLGA concentration of 120.0 mg/mL, PVA concentration of 20.0 mg/mL, and TPGS concentration of 2.5 mg/mL. PPT-Loaded PLGA NPs was distributed in a spherical shape, the average particle size was (163.6 ± 4.2) nm, and the encapsulation rate was (89.4 ± 0.6)%. The *in vitro* release rate of PPT-loaded PLGA NPs exhibited sustained release, with a cumulative release rate of 90% after 48 h. PPT-loaded PLGA NPs showed good antitumor activity *in vitro* and *in vivo* against human MCF-7 breast cancer cells. **Conclusion** PPT-loaded PLGA NPs are successfully prepared with good sustained release and anti-tumor activities *in vitro* and *in vivo*.

Key words: podophyllotoxin loaded PLGA nanoparticles; podophyllotoxin; particle size distribution; encapsulation rate; cumulative release rate; anti-tumor activity

收稿日期: 2025-05-12

基金项目: 湖北省卫生健康科研项目 (WJ2021M218)

作者简介: 曹思思 (1988—), 女, 湖北武汉人, 药师, 学士, 研究方向为医院药学。E-mail: 523924919@qq.com

*通信作者: 方 松 (1987—), 男, 湖北武汉人, 主管药师, 学士, 研究方向为医院药学。E-mail: 328902491@qq.com

鬼臼毒素是从鬼臼属植物盾叶鬼臼 *Podophyllum peltatum* L. 或桃儿七 *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying 根茎中提取的木脂素类化合物^[1]。研究表明,鬼臼毒素通过抑制细胞微管聚合、阻断拓扑异构酶 II 活性和减少细胞对核苷的摄取展现出显著的抗病毒、抗菌和抗肿瘤活性^[2],尤其在直肠癌、肺癌和乳腺癌治疗中具有较大潜力^[3]。然而,鬼臼毒素的低水溶性 ($<0.1\text{ mg/mL}$)、口服后的生物利用度差^[4-5],需要高剂量才能达到足够的血浆水平,这会导致严重的不良反应,阻碍了其临床应用^[6]。为解决这一问题,研究者开发了多种药物递送系统以提高鬼臼毒素的溶解度和生物利用度^[7-8]。纳米粒作为一种新型递送载体,具有延长循环时间的特性,能够利用实体瘤的增强渗透和滞留效应提高药物在肿瘤组织中富集,同时降低全身毒性,在癌症治疗中展现出广阔前景^[9]。聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA) 因优异的生物相容性、可降解性 (降解产物为乳酸、乙醇酸) 已被欧洲药品管理局和美国食品药品监督管理局批准用于纳米粒开发^[10-11]。此外, *D*- α -维生素 E 聚乙二醇琥珀酸酯 (TPGS) 作为一种两亲性三嵌段共聚物,能够通过疏水嵌段锚定在纳米粒表面,增强稳定性,而亲水的聚乙二醇 (PEG) 层则形成水合位阻屏障,延长体内循环时间^[12]。本研究以 PLGA 为载体材料,联合聚乙二醇 (PVA) 和 TPGS 共同作为乳化剂,采用乳化-溶剂蒸发法制备负载鬼臼毒素 PLGA 纳米粒 (PPT-loaded PLGA NPs),并通过抗肿瘤活性实验评估了其对乳腺癌 MCF-7 细胞的抑制效果,旨在为鬼臼毒素的临床应用提供科学依据和技术支持。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Ultra Turrax 型高剪切乳化机 (德国伊卡公司); Zetasizer Nano ZS90 动态光散射纳米粒度电位仪 (英国马尔文公司); TH-F120 型场发射透射电子显微镜 (国仪量子技术股份有限公司); RE-2000B 型旋转蒸发器 (郑州华辰仪器有限公司); DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器 (郑州科泰实验设备有限公司); 96 孔细胞培养板 (赛默飞世尔科技有限公司)。

1.2 试药

鬼臼毒素 (福建华海药业有限公司,批号 240611,质量分数 98.5%); 鬼臼毒素对照品 (中国食品药品检定研究院,批号 111645-201803,质量分

数 99.6%); 聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (LA/GA 50:50,相对分子质量 24 000~38 000,上海麦克林生化科技股份有限公司); 聚乙烯醇 (PVA,相对分子质量 13 000~23 000,德国默克公司); *D*- α -维生素 E 聚乙二醇 1000 琥珀酸酯 (TPGS,德国默克公司); 二氯甲烷 (南京化学试剂股份有限公司); DMEM 培养基 (德国默克公司),二甲基亚砜 (DMSO,德国默克公司),四甲基偶氮唑蓝 (MTT,德国默克公司); 人乳腺癌 MCF-7 细胞株 (苏州海星生物科技有限公司)。

1.3 实验动物

SPF 级 Balb/c 雌性小鼠 (周龄 6~7 周,体质量 20~30 g),实验动物由浙江维通利华实验动物技术有限公司提供,生产许可证号: SCXK (浙) 2019-0001。实验期间所有动物均饲养于屏障环境,环境参数恒定控制为:温度 (24.0 ± 1.0) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 55%~65%,采用 12 h 昼夜循环光照系统,自由摄食饮水。动物实验操作严格遵循实验动物伦理委员会相关规范要求。

2 方法与结果

2.1 PPT-loaded PLGA NPs 的制备

采用乳化-溶剂蒸发法制备 PPT-loaded PLGA NPs^[13]。将处方量的 PPT 和 PLGA 加入到 10 mL 二氯甲烷中,经超声处理使其完全溶解,形成有机相。将处方量的 PVA 和 TPGS 溶解于 100 mL 蒸馏水中,作为水相。在 1 000 r/min 的磁力搅拌条件下,将有机相缓慢加入到水相中,并持续搅拌 10 min,初步乳化。随后,将混合液置于高速剪切设备中,以 20 000 r/min 速度进一步乳化 15 min,形成稳定的初级乳液。将该乳液转移至旋转蒸发器中,在减压条件下去除二氯甲烷,药液经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,去除可能存在的不溶性微粒。向滤液中补加蒸馏水至总体积为 100 mL,终产品在 4~8 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下密闭保存。

2.2 粒径、多分散性指数 (PDI) 和 Zeta 电位测定

通过动态光散射技术测量 PPT-loaded PLGA NPs 的粒径分布、PDI。仪器参数设置:散射角为 173 $^{\circ}$,折射率为 1.33,使用 4.0 mV He-Ne 激光器,检测波长为 633 nm。利用电泳迁移率测定 Zeta 电位。样品均用蒸馏水稀释,在测量前,样品需在室温下平衡 5 min。

2.3 HPLC-UV 法检测鬼臼毒素^[15]

2.3.1 色谱条件 乙腈-水 (70:30) 为流动相,

体积流量 1.0 mL/min，检测波长为 292 nm，柱温为 30 ℃。

2.3.2 对照品溶液的配制 精密称取鬼臼毒素对照品 10.0 mg，加入到 50 mL 量瓶中，加入 10.0 mL 乙腈，超声溶解，用流动相加至刻度，摇匀，即得。

2.3.3 供试品溶液的配制 精密移取 PPT-loaded PLGA NPs 5.0 mL 加入到 50 mL 量瓶中，加入 10.0 mL 乙腈，超声溶解破乳，用流动相加至刻度，摇匀，经 0.45 μm 微孔滤膜滤过，收集滤液，即得。

2.3.4 测定方法 取鬼臼毒素对照品溶液和 PPT-loaded PLGA NPs 供试品溶液，进样测定，采用外标法计算鬼臼毒素的质量浓度。

2.4 包封率测定

采用低温超速离心法测定 PPT-loaded PLGA NPs 的包封率^[14]。取 5.0 mL 载药纳米粒，置于超速离心管中，于 4 ℃、15 000 r/min 条件下离心 20 min，弃去含游离药物的上清液后，向沉淀物中加入 10.0 mL 乙腈充分溶解纳米粒，转移至 50 mL 量瓶，流动相加至刻度，得到包封药物的待测溶液（ $W_{\text{包封}}$ ）；另平行取 5.0 mL 载药纳米粒直接加入到 50 mL 量瓶中，加入 10 mL 乙腈破乳，并加入流动相至刻度，得到总药物待测溶液（ $W_{\text{总}}$ ）。计算 PPT-loaded PLGA NPs 的包封率（EE）。

$$EE=W_{\text{包封}}/W_{\text{总}}$$

2.5 处方优化

在纳米粒的质量评价中，粒度分布和包封率常被选为关键指标^[16]。前期实验显示，处方中的 PLGA 质量浓度、PVA 质量浓度和 TPGS 质量浓度是影响 PPT-loaded PLGA NPs 质量的关键参数。鉴于此，本研究确定以 PLGA 质量浓度（ X_1 ）、PVA 质量浓度（ X_2 ）和 TPGS 质量浓度（ X_3 ）作为自变量，以 PPT-loaded PLGA NPs 的粒径分布（ Y_1 ）和包封率（ Y_2 ）作为因变量，按照表 1 设定的 3 个自变量梯度水平，采用中心复合设计-响应面法（CCD-RSM）生成 17 组验证处方的实验矩阵，见表 2。通过系统考察 3 个自变量对纳米粒包封效率、粒径特征的协同作用，建立自变量与因变量响应值之间的数学模型，最终建立了数学预测模型，以确定最优的处方组成。

应用中心复合设计-响应面法实验软件对表 2 中的实验数据进行统计分析，采用多元二次模型拟合，清晰揭示自变量与因变量之间的内在相关性，方差分析结果见表 3，拟合方程为 $Y_1=-13.67+1.83$

表 1 变量及水平

Table 1 Variables and levels

水平	自变量		
	$X_1/(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$	$X_2/(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$	$X_3/(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$
-1	75	15	1
0	0	20	2
1	175	25	3

表 2 实验设计及结果

Table 2 Experimental design and results

序号	X_1	X_2	X_3	Y_1/nm	$Y_2/\%$
1	0	0	0	192.3	88.3
2	0	0	-1	177.1	91.3
3	-1	0	-1	94.3	83.7
4	-1	-1	1	149.3	69.4
5	1	0	0	86.4	63.4
6	1	-1	1	188.8	86.1
7	-1	-1	-1	153.2	73.6
8	0	-1	0	176.8	74.5
9	1	0	-1	196.1	91.2
10	0	0	0	187.7	89.5
11	0	0	0	143.8	80.2
12	0	0	0	237.3	89.4
13	0	0	0	176.7	88.6
14	1	0	1	168.3	87.5
15	-1	0	1	94.9	72.5
16	0	0	0	195.3	89.1
17	1	-1	-1	251.8	90.8

$$X_1+1.11 X_2+62.06 X_3+0.03 X_1 X_2-0.29 X_1 X_3+0.24 X_2 X_3-0.04 X_1^2-0.20 X_2^2-10.84 X_3^2 \left(R^2=0.9594\right);$$

$$Y_2=-18.37+0.65 X_1+5.39 X_2+1.29 X_3-0.06 X_1 X_2+0.02 X_1 X_3-0.15 X_2 X_3-0.02 X_1^2-0.10 X_2^2-0.90 X_3^2 \left(R^2=0.9744\right)。$$

通过软件生成的 3D 响应面图可以直观地分析 3 个自变量 PLGA 质量浓度（ X_1 ）、PVA 质量浓度（ X_2 ）和 TPGS 质量浓度（ X_3 ）与 PPT-loaded PLGA NPs 的粒径分布（ Y_1 ）和包封率（ Y_2 ）之间的关系，结果见图 1。

3D 响应面图可知：处方中增加 PLGA 质量浓度会导致纳米粒粒径显著增大，这可能是由于 PLGA 质量浓度的增加会提高有机相的体系黏度，降低了剪切应力，减缓有机相向水相的扩散，从而产生更大的粒径；处方中 PVA 可以占据有机相和水相的界面，从而降低界面张力，增加剪切应力，因此增加 PVA 质量浓度会促进了纳米粒粒径减小；处

表 3 PLGA 质量浓度、PVA 质量浓度和 TPGS 质量浓度对粒径分布、包封率影响的方差分析结果
Table 3 ANOVA results for the effect of PLGA concentration, PVA concentration, and TPGS concentration on particle size distribution and encapsulation efficiency

来源	平方和	自由度	平均值	F 值	P 值
粒径分布 (Y ₁)					
模型	34 603.90	9	3 844.88	18.40	0.000 4
X ₁	26 104.66	1	26 104.66	124.90	<0.000 1
X ₂	1 866.75	1	1 866.75	8.93	0.020 3
X ₃	2 375.17	1	2 375.17	11.36	0.011 9
X ₁ X ₂	562.80	1	562.80	2.69	0.144 8
X ₁ X ₃	1 725.78	1	1 725.78	8.26	0.023 9
X ₂ X ₃	11.76	1	11.76	0.06	0.819 3
X ₁ ²	1 207.32	1	1 207.32	5.78	0.047 2
X ₂ ²	291.01	1	291.01	1.39	0.276 5
X ₃ ²	1 325.57	1	1 325.57	6.34	0.039 9
残差	1 463.01	7	209.00		
失拟项	1 433.71	3	286.74	19.57	0.049 3
纯误差	29.31	2	14.65		
总和	36 066.91	16			
包封率 (Y ₂)					
模型	1 222.62	9	135.85	29.55	<0.000 1
X ₁	734.09	1	734.09	159.71	<0.000 1
X ₂	109.74	1	109.74	23.88	0.001 8
X ₃	132.06	1	132.06	28.73	0.001 1
X ₁ X ₂	16.25	1	16.25	3.53	0.102 2
X ₁ X ₃	6.13	1	6.13	1.33	0.286 2
X ₂ X ₃	4.50	1	4.50	0.98	0.355 4
X ₁ ²	199.05	1	199.05	43.30	0.000 3
X ₂ ²	63.92	1	63.92	13.91	0.007 4
X ₃ ²	9.05	1	9.05	1.97	0.203 2
残差	32.18	7	4.60		
失拟项	41.43	3	6.29	16.84	0.0570
纯误差	0.75	2	0.37		
总和	1 254.80	16			

方中 TPGS 质量浓度对纳米粒的粒径影响显著,可能是由于 TPGS 质量浓度高,表面活性剂可以阻止纳米粒的聚结,保护和稳定乳化过程中形成的液滴,从而使乳液液滴更小。

3D 响应面图可知:处方中增加 PLGA 质量浓度会显著提高药物的包封率,这可能是因为随着体系中 PLGA 质量浓度的增大,有机相的黏度增加,从而提高了有机相与水相之间的扩散阻力,促使纳

米粒包裹更多的药物;处方中随着 PVA 质量浓度的增加,药物包封率出现显著的增加趋势,这是由于在乳化过程中 PVA 促使 PLGA 包裹更多的药物分子,从而提高了药物的包封率;处方中随着 TPGS 质量浓度的增加,纳米粒的包封率却显著减小,这是由于较高质量浓度的 TPGS 会对药物产生增溶作用,药物会更多地溶解在水相中,降低了药物的包封率。

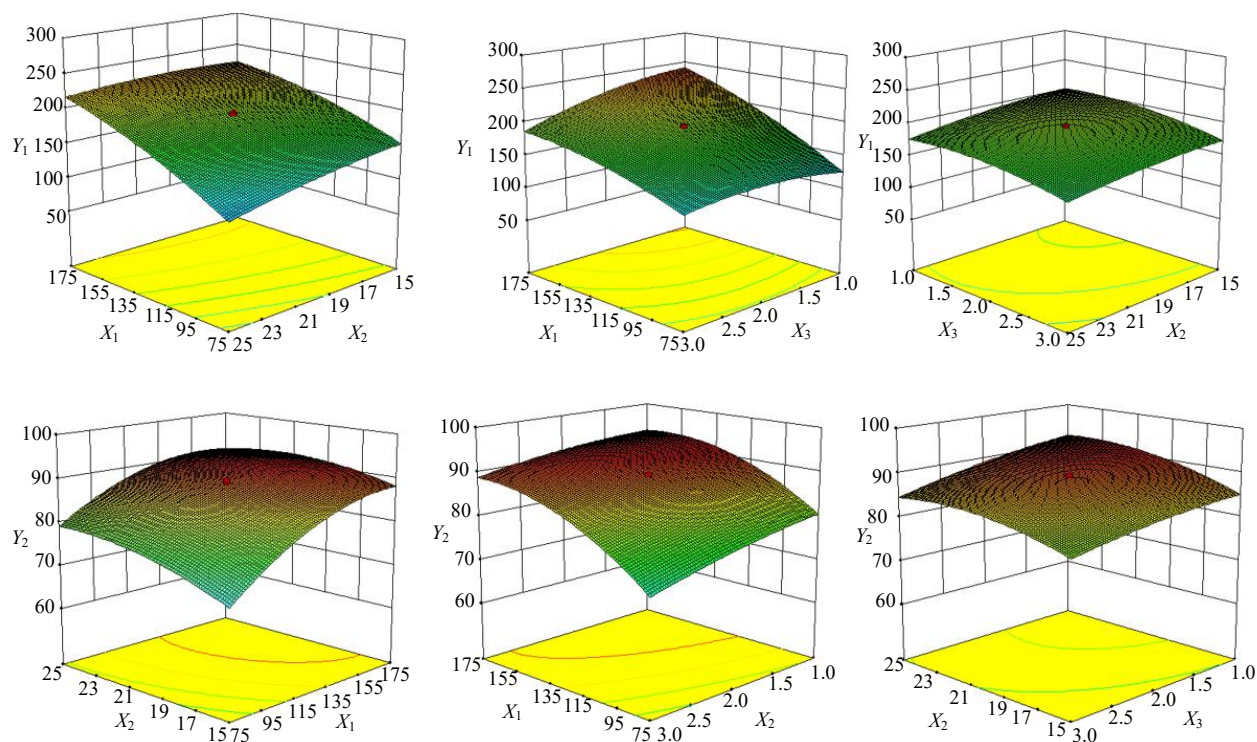


图 1 PLGA 质量浓度、PVA 质量浓度和 TPGS 质量浓度对粒径分布和包封率影响的 3D 响应面图

Fig. 1 3D effect surface diagram of the influence of PLGA concentration, PVA concentration, and TPGS concentration on particle size distribution and encapsulation efficiency

本研究以制备粒径“最小化”、包封率“最大化”的 PPT-loaded PLGA NPs 为目标,采用中心复合设计-响应面法进行处方优化。经实验模型分析,确定了 PPT-loaded PLGA NPs 的最优处方为: PLGA 质量浓度为 120.0 mg/mL, PVA 质量浓度为 20.0 mg/mL, TPGS 质量浓度为 2.5 mg/mL。该处方下理论预测值为粒径 167.8 nm、包封率 89.6%。验证实验结果显示,制备 3 批 PPT-loaded PLGA NPs 样品的实测粒径(163.6 ± 4.2)nm、包封率(89.4 ± 0.6)%,与预测值高度吻合,证实所建数学模型具有良好的预测能力,见表 4。

2.6 性质表征

使用透射电镜对 PPT-loaded PLGA NPs 的形貌

表 4 负载鬼臼毒素 PLGA 纳米粒的性质测定结果

Table 4 Results of PPT-loaded PLGA NPs properties

批号	粒径分布/nm	包封率/%
20250114-1	159.7	90.1
20250114-2	168.1	89.0
20250114-3	163.0	89.1

进行了分析,取 1 滴稀释后的样品放在 300 目碳涂层铜网格上,用滤纸除去多余的液体,自然风干。加入 1%磷钨酸滴到网格中,染色 5 min,在 120 kV 的加速电压下观察 PPT-loaded PLGA NPs 的微观形态,见图 2。透射电镜照片显示,PPT-loaded PLGA NPs 呈规则球形结构,表面形貌均一,边界清晰,分散状态良好。通过图像统计粒径分布范围为 100~200 nm,略小于动态光散射法测得的流体力学直径,这可能与电镜样品干燥处理时纳米粒脱水收缩有关^[17]。

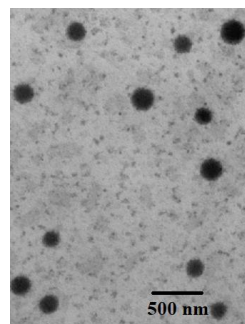


图 2 负载鬼臼毒素 PLGA 纳米粒透射电镜照片

Fig. 2 Transmission electron microscope image of PPT-loaded PLGA NPs

2.7 体外药物释放

采用透析法评价 PPT-loaded PLGA NPs 在不同 pH 值环境中的释药特性^[18]。精密量取 1 mL PPT-loaded PLGA NPs (载药量 15.0 mg/mL) 注入预处理过的相对分子质量为 1×10^4 分子截留透析袋(经去离子水活化 24 h), 两端密封后分别置于含 0.2% 聚山梨酯 80 的 pH 5.0 (模拟肿瘤微环境)、pH 6.0 (组织间隙环境) 和 pH 7.4 (生理条件) 磷酸盐缓冲液中, 释放介质体积均为 200 mL。实验体系置于 $(37.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 恒温磁力搅拌器, 维持 $(100 \pm 5) \text{r/min}$ 持续搅拌。于预设时间点 (2、4、6、8、12、24、48 h) 精密取样 2 mL (同时补加等温、等体积空白介质), 经 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过后, 采用 HPLC-UV 法定量分析药物质量浓度, 计算累积释放率。同法, 取鬼臼毒素原料药溶解在 30% DMSO 水溶液中 (质量浓度为 15.0 mg/mL), 取 1 mL 混悬液加入透析袋内, 按照上述方法操作, 分别选择 0.2% 聚山梨酯 80 的 pH 5.0、6.0、7.4 的磷酸盐缓冲液进行药物释放曲线测定, 见图 3。结果显示, 鬼臼毒素原料药在体外释药速率不具有 pH 值相关性, 均能快速释放; PPT-loaded PLGA NPs 体外释药速率具有缓释性, 其释药过程可分为两个阶段: 初期 (0~8 h) 表现为快速释放模式, 其累积释放率达 40%, 主要源于纳米粒表面吸附的游离药物和核/壳界面区域药物快速解吸附^[19]; 后期 (8~48 h) 转为持续缓释模式, 48 h 累积释放率达 90%, 这是由于载体材料 PLGA 酯键逐步水解, 促使聚合物链段松弛产生扩散通道, 药物通过孔道扩散释放^[19]。

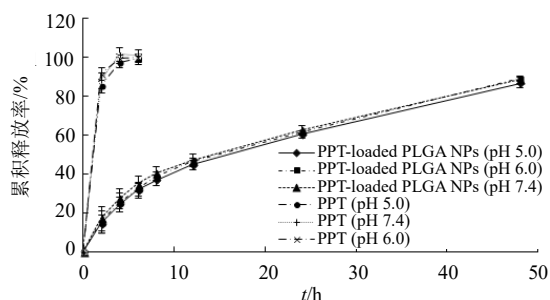


图 3 负载鬼臼毒素 PLGA 纳米粒在不同 pH 值介质中的体外释放曲线 ($n=6$)

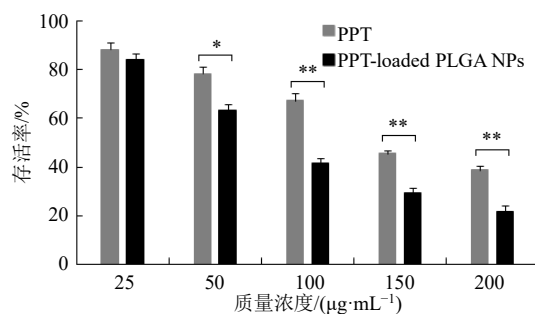
Fig. 3 *In vitro* release profile of PPT-loaded PLGA NPs in different pH medias ($n=6$)

2.8 抗肿瘤活性评价

2.8.1 体外抗肿瘤活性评价 采用四甲基偶氮唑蓝法 (MTT) 评价游离鬼臼毒素、PPT-loaded PLGA

NPs 对人乳腺癌 MCF-7 细胞的毒性。将处于指数生长长期的人乳腺癌 MCF-7 细胞制成 5×10^4 个/mL 的悬浮液, 并以每孔 $100 \mu\text{L}$ 接种到 96 孔板中, 将 96 孔板置于 37°C 、5% CO_2 的培养箱中孵育 24 h, 使细胞贴壁生长。弃掉培养基, 向每孔中分别加入不同质量浓度 (25、50、100、150、200 $\mu\text{g/mL}$) 的游离鬼臼毒素、PPT-loaded PLGA NPs 和空白 PLGA NPs, 在相同条件下继续孵育 48 h, 弃掉药液, 用 pH 7.4 磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗细胞 3 次, 去除残留药物。向每孔中加入 5 mg/mL MTT 溶液 $200 \mu\text{L}$, 继续孵育 4 h, 活细胞内的线粒体脱氢酶可将 MTT 还原为紫色的甲醛结晶, 弃掉上清液, 加入 DMSO $100 \mu\text{L}$, 恒温振荡 20 min, 溶解甲醛结晶, 15 min 后, 使用酶标仪在 570 nm 处测定吸光度 (A) 值。以未加药物的细胞组作为对照组, 以含培养基组作为空白组, 计算细胞增殖存活率, 结果见图 4。

$$\text{存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$



与鬼臼毒素组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs PPT group.

图 4 负载鬼臼毒素 PLGA 纳米粒对人乳腺癌 MCF-7 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 4 Effects of PPT-loaded PLGA NPs on the survival rate of human breast cancer MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

体外抗肿瘤实验结果显示, 经 MTT 法测定鬼臼毒素对人乳腺癌 MCF-7 细胞的半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 151.9 $\mu\text{g/mL}$, PPT-loaded PLGA NPs 的 IC_{50} 为 99.3 $\mu\text{g/mL}$ 。鬼臼毒素和 PPT-loaded PLGA NPs 对人乳腺癌 MCF-7 细胞的抑制效应均呈现浓度相关性, 即随着药物浓度升高, 两组均显著降低了肿瘤细胞的存活率。值得注意的是, 在药物浓度相同下, PPT-loaded PLGA NPs 对乳腺癌细胞的抑制作用高于鬼臼毒素, 这与其独特的纳米特性密切相关, 粒径较小的纳米粒可通过增强与细胞膜的表面吸附作用, 并借助网格蛋白介导的胞吞途径高效

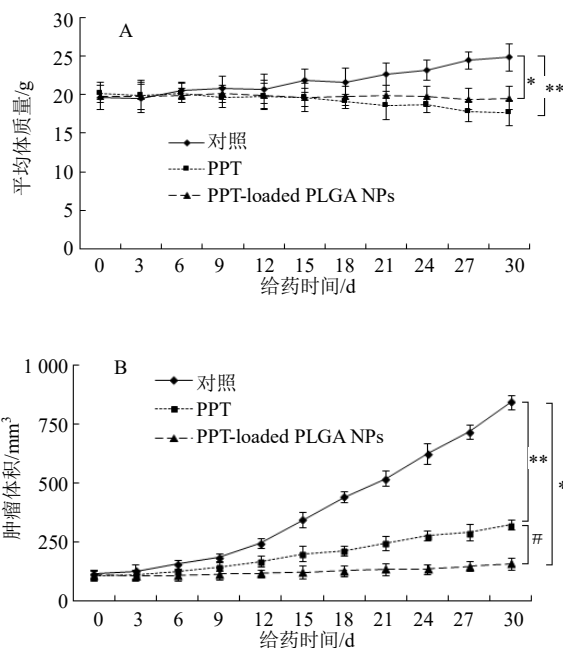
内化至细胞内,从而显著提升药物抗肿瘤效果^[20]。该结果提示纳米制剂可有效克服鬼臼毒素原料药细胞摄取效率低的局限性。此外,空白 PLGA NPs 在 50~600 $\mu\text{g/mL}$ 对乳腺癌细胞活力无显著影响,表明 PLGA NPs 具有良好的生物相容性,其载体材料对肿瘤细胞无直接毒性作用。

2.8.2 体内抗肿瘤活性评价 采用异种移植瘤模型评价 PPT-loaded PLGA NPs 的抗肿瘤活性。将处于指数生长期的人乳腺癌 MCF-7 细胞混悬液注入雌性 BALB/c 裸鼠腹腔。10 d 后,从裸鼠腹水中收集乳腺癌细胞,通过离心去除上清液后,用生理盐水稀释至细胞浓度为 1.0×10^7 个/mL。取 200 μL 细胞混悬液接种于雌性 BALB/c 裸鼠腹部皮下,建立皮下肿瘤模型。待肿瘤体积生长至约 100 mm^3 时,将荷瘤裸鼠随机分为 3 组,对照组股 iv 生理盐水, PPT 组股 iv 鬼臼毒素溶液(溶剂为 30% DMSO 水溶液), PPT-loaded PLGA NPs 组股静脉注射 PPT-loaded PLGA NPs,给药剂量均为 30 mg/kg 。各组均采用每日定时单次给药方案,连续给药 30 d。实验期间每 3 天记录动物体质量变化,并通过游标卡尺测量肿瘤长径(L)和短径(W),按公式 $V=(L \times W^2)/2$ 计算肿瘤体积。通过动态监测肿瘤生长曲线和体质量变化评估 PPT-loaded PLGA NPs 的抗肿瘤效果,见图 5。

实验期间各组裸鼠体质量和肿瘤生长动态监测结果显示:对照组在 30 d 干预周期内呈现持续体质量增长(增幅约 26.5%),提示肿瘤进展未被有效控制;PPT 组则出现进行性体质量下降,提示游离药物可能引发系统性不良反应。而 PPT-loaded PLGA NPs 组虽也存在体质量下降现象,但变化幅度相对稳定。肿瘤体积分析显示,对照组肿瘤呈指数型快速增长,而 PPT、PPT-loaded PLGA NPs 组肿瘤增殖速率显著减缓($P < 0.01$)。值得注意的是, PPT-loaded PLGA NPs 组的肿瘤体积增幅较 PPT 组的肿瘤体积增幅明显降低($P < 0.05$),提示 PPT-loaded PLGA NPs 递送系统通过增强肿瘤靶向性和缓释效应显著提升药物的抑瘤效果。

3 讨论

PLGA 纳米粒常见的制备方法包括纳米粒沉淀法、乳化溶剂蒸发法、高压均质法等^[21]。在前期预实验过程中,比较了上述 3 种制备工艺的可行性。结果显示:采用纳米粒沉淀法制备的 PLGA 纳米粒有大量的白色沉淀析出;采用高压均质法制备的



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 PPT 组比较: # $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ vs PPT group.

图 5 不同治疗方案对荷瘤小鼠体质量变化(A)和荷瘤小鼠肿瘤生长曲线(B)的影响

Fig. 5 Effect of different treatment on body weight changes (A) and tumor growth curves (B) of tumor-bearing mice

PLGA 纳米粒则表现出粒径分布不均匀, PDI 较大;而以乳化溶剂蒸发法制备的 PLGA 纳米粒,外观为淡蓝色、有乳光,粒径分布均匀,物理稳定性良好,同时药物包封率也有所提高,且该方法操作简便,重复性也较理想,能够很好地满足实验需求。因此,本研究选择乳化溶剂蒸发法制备 PPT-loaded PLGA NPs。

处方、工艺多种因素均会对 PLGA 纳米粒的性质产生影响,仅通过单因素实验或正交实验设计难以精准预测各因素间的交互作用,而具备实验次数较少、准确度高、优选条件预测性准确等诸多优势的中心复合设计-响应面法被用于 PPT-loaded PLGA NPs 的处方筛选,通过考察处方中的 PLGA 质量浓度、PVA 质量浓度和 TPGS 质量浓度 3 个因素对 PPT-loaded PLGA NPs 制剂性质的影响,获得最优处方。进一步对 PPT-loaded PLGA NPs 微观形态观察和体外释放测定,结果显示 PPT-loaded PLGA NPs 呈规则球形结构,且具备一定缓释效果。

抗肿瘤活性研究结果显示, PPT-loaded PLGA NPs 表现出良好的抗肿瘤活性,推测 PPT-loaded

PLGA NPs 通过以下多重机制协同增强抗肿瘤疗效: (1) 表面修饰的 TPGS 可显著降低单核巨噬细胞系统对纳米粒的识别和清除, 使其血液循环半衰期延长, 从而提升了药物在肿瘤组织蓄积; (2) PPT-loaded PLGA NPs 的缓释特性使药物维持长达 48 h 的持续释放 (体外释放实验显示累积释放率达 90%), 有效延长治疗窗口期; (3) 粒径优化至 100~200 nm 的 PPT-loaded PLGA NPs 可充分利用实体瘤的增强渗透和滞留效应, 通过血管内皮间隙选择性富集于肿瘤微环境。这三者共同作用使载药系统在降低系统毒性的同时, 显著提升局部药物浓度和疗效持续性。

鬼臼毒素已经被制备成多种递药系统, 如谷丽艳等^[15]成功将鬼臼毒素制备成 HAIYPRH 修饰的脂质体, 经动物证明其具有较强的脑靶向作用; 此外, 谷丽艳等^[22]制备了活性氧响应型透明质酸修饰的鬼臼毒素纳米胶束, 体内结果显示其对卵巢癌细胞的靶向能力显著增强; 王江等^[7]以海藻酸钠作为载体材料, 将鬼臼毒素制备成凝胶珠载药体系, 该给药系统可降低鬼臼毒素的细胞毒性, 并可能实现结肠癌的靶向给药; Liu 等^[23]以黄芪多糖作为鬼臼毒素的胶束载体, 并在其表面采用磷脂酰聚乙二醇/甲氨蝶呤进行修饰, 用于靶向叶酸受体高表达的卵巢癌细胞的治疗。本研究采用 PLGA 为载体材料, 将载鬼臼毒素制备成 PLGA 纳米粒, 体内外研究结果显示, 其对人乳腺癌 MCF-7 细胞具有良好的抗肿瘤效果, 有望成为乳腺癌治疗一种新的治疗策略。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 蒲香谷, 江丽洁, 陈籽亦, 等. 鬼臼毒素的生物合成及药理活性研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(11): 1557-1567.
- [2] Shah Z, Gohar U F, Jamshed I, *et al.* Podophyllotoxin: History, recent advances and future Prospects [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(4): 603.
- [3] Ardalani H, Avan A, Ghayour-Mobarhan M. Podophyllotoxin: A novel potential natural anticancer agent [J]. *Avicenna J Phytomed*, 2017, 7(4): 285-294.
- [4] Roy A, Zhao Y, Yang Y, *et al.* Selective targeting and therapy of metastatic and multidrug resistant tumors using a long circulating podophyllotoxin nanoparticle [J]. *Biomaterials*, 2017, 137: 11-22.
- [5] 王云, 柯青, 唐之俭, 等. 鬼臼毒素固体脂质纳米粒对非小细胞肺癌 A549 细胞增殖和迁移的影响 [J]. 药物流行病学杂志, 2023, 32(6): 648-654.
- [6] Liang B, Zhou D. ROS-activated homodimeric podophyllotoxin nanomedicine with self-accelerating drug release for efficient cancer eradication [J]. *Drug Deliv*, 2021, 28(1): 2361-2372.
- [7] 王江, 王庆峰, 蒋亦昕, 等. 海藻酸钠/鬼臼毒素凝胶载药体系制备、释放及对结肠癌的抑制效果 [J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(22): 3498-3505.
- [8] 苗健, 孙丽, 高雷, 等. 活性氧响应型鬼臼毒素聚合物前药胶束的制备及其抗口腔癌活性 [J]. 医药导报, 2024, 43(11): 1782-1790.
- [9] Yang M, Li J, Gu P, *et al.* The application of nanoparticles in cancer immunotherapy: Targeting tumor microenvironment [J]. *Bioact Mater*, 2020, 6(7): 1973-1987.
- [10] Singh S, Singha P. Effect of modifications in poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) on drug release and degradation characteristics: A mini review [J]. *Curr Drug Deliv*, 2021, 18(10): 1378-1390.
- [11] Chiu H I, Samad N A, Fang L, *et al.* Cytotoxicity of targeted PLGA nanoparticles: A systematic review [J]. *RSC Adv*, 2021, 11(16): 9433-9449.
- [12] Mehata A K, Setia A, Vikas, *et al.* Vitamin E TPGS-based nanomedicine, nanotheranostics, and targeted drug delivery: Past, present, and future [J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(3): 722.
- [13] 黄华婷, 蔡梦如, 付京, 等. 聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒载中药抗肿瘤成分的研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(22): 7295-7306.
- [14] Lv Y, He H, Qi J, *et al.* Visual validation of the measurement of entrapment efficiency of drug nanocarriers [J]. *Int J Pharm*, 2018, 547(1-2): 395-403.
- [15] 谷丽艳, 孙朝渭, 刘鑫程, 等. HAIYPRH 修饰鬼臼毒素脂质体处方工艺优化及其脑靶向性评价 [J]. 中草药, 2024, 55(24): 8392-8402.
- [16] 魏永鸽, 黄贺梅, 齐园圃, 等. Box-Behnken 设计-效应面法优化吴茱萸碱-羟基乙酸共聚物纳米粒处方及体外释药研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41(23): 2416-2422.
- [17] Arizmendi N, Qian H, Li Y, *et al.* Sesquiterpene-loaded co-polymer hybrid nanoparticle Effects on human mast cell surface receptor expression, granule contents, and degranulation [J]. *Nanomaterials* (Basel), 2021, 11(4): 953.
- [18] 管庆霞, 夏昭睿, 王艳宏, 等. 包载马钱子碱聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒处方工艺优化及其特性研究 [J]. 中草药, 2021, 53(4): 951-961.
- [19] Kumskova N, Ermolenko Y, Osipova N, *et al.* How subtle differences in polymer molecular weight affect doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles degradation and

- drug release [J]. *J Microencapsul*, 2020, 37(3): 283-295.
- [20] Dadpour S, Mehrabian A, Arabsalmani M, *et al*. The role of size in PEGylated liposomal doxorubicin biodistribution and anti-tumour activity [J]. *IET Nanobiotechnol*, 2022, 16(7-8): 259-272.
- [21] Naskar S, Das S K, Sharma S, *et al*. A review on designing poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles as drug delivery systems [J]. *Pharm Nanotechnol*, 2021, 9(1): 36-50.
- [22] 谷丽艳, 孙朝渭, 董禹何, 等. 活性氧响应型透明质酸修饰的鬼臼毒素纳米胶束的处方优化与体外评价 [J]. *中草药*, 2024, 55(22): 7663-7673.
- [23] Liu M, Zhang Z X, Wang J H, *et al*. Immunomodulatory and anti-ovarian cancer effects of novel astragalus polysaccharide micelles loaded with podophyllotoxin [J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 290: 138960.

【责任编辑 解学星】