

## 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

李禄辉<sup>1</sup>, 郭允<sup>2</sup>, 侯先巧<sup>3</sup>, 蒲晓辉<sup>3\*</sup>

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 制备包载三苯基膦-阿霉素 (TPP-DOX, TD) 和槲皮素 (Que) 的还原敏感性抗肿瘤耐药纳米混合胶束, 并对其进行制剂学评价。方法 以还原敏感性聚合物材料聚乙二醇-脱氧胆酸-二硫键-聚天冬氨酸苄酯 (mPEG-DCA-SS-PBLA, PDSP) 和非还原敏感性聚合物材料聚乙二醇-脱氧胆酸-碳碳键-聚天冬氨酸苄酯 (PDCP) 为载体, 通过溶剂挥发法分别包载 TD 和 Que, 制备还原敏感性纳米胶束 PDSP@TD、PDSP@Que 和非还原敏感性纳米胶束 PDCP@TD、PDCP@Que。应用激光粒度仪分析各胶束粒径、聚合物分散性指数 (PDI), Zeta 电位仪分析其 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、稀释稳定性、血浆稳定性、冻干粉复溶稳定性考察; 考察  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $10$ 、 $20 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  谷胱甘肽 (GSH) 对胶束粒径的影响; 考察在含  $0$ 、 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $10 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $20 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  GSH 的释放介质中各胶束体外释放行为。结果 制备的 PDSP@TD、PDCP@TD 胶束粒径约为  $180 \text{nm}$ , PDSP@Que、PDCP@Que 胶束的粒径约为  $230 \text{nm}$ ; 胶束的 Zeta 电位均在  $-17.4 \text{mV}$  以下; 4 种胶束的载药量和包封率分别在  $6.3\%$  和  $65.3\%$  以上; 4 种胶束的形态均呈类球形, 物理稳定性良好; 在浓度为  $10$ 、 $20 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 GSH 存在下, PDSP@TD 和 PDSP@Que 粒径发生较为明显的变化; 游离药物 TD 和 Que 在含有  $20 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  GSH 的释放介质中  $48 \text{h}$  时的累积释放率均小于  $30\%$ , PDCP@TD 和 PDCP@Que 在所有介质中  $48 \text{h}$  内的累积释放率均在  $38\%$  左右, PDSP@TD、PDSP@Que 及混合胶束在  $20 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  GSH 释放介质中  $48 \text{h}$  内累积释放率均在  $78\%$  左右。结论 制备的还原敏感性纳米胶束具有良好的稳定性、肿瘤细胞内还原敏感性, 可以用于后续体内外抗肿瘤耐药研究。

**关键词:** 抗肿瘤耐药; 还原敏感性; 混合纳米胶束; 阿霉素; 槲皮素

中图分类号: R943 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2024) 07-1563-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.07.015

## Formulation and assessment of reduction-responsive hybrid nano-micelles containing triphenylphosphine-adriamycin and quercetin for combating drug resistance in cancer treatment

LI Luhui<sup>1</sup>, GUO Yun<sup>2</sup>, HOU Xianqiao<sup>3</sup>, PU Xiaohui<sup>3</sup>

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

**Abstract: Objective** To prepare a reduction-responsive hybrid nano-micelles containing triphenylphosphine-doxorubicin (TPP-DOX, TD) and quercetin (Que), and to evaluate its pharmacokinetics. **Methods** The redox-sensitive polymer material poly(ethylene glycol)-deoxycholic acid-disulfide-poly(aspartic acid benzyl ester), PDSP, and the non-redox-sensitive polymer material poly(ethylene glycol)-deoxycholic acid-carbon-carbon bond-poly(aspartic acid benzyl ester), PDCP, were used as the carrier. TD and Que were loaded onto the polymers by solvent evaporation, respectively, to prepare redox-sensitive nanovesicles PDSP@TD and

收稿日期: 2024-02-12

基金项目: 河南省科技攻关项目(232102311178); 河南应用技术职业学院名师工作室项目(2022-03); 河南应用技术职业学院教师创新团队项目(2022-02)

第一作者: 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

PDSP@Que, and non-redox-sensitive nanovesicles PDSP@TD and PDSP@Que. The particle size, polydispersity index (PDI), and Zeta potential of the nanovesicles were analyzed using a laser particle size analyzer. The drug loading and encapsulation efficiency were determined by HPLC. The morphology of the nanovesicles was observed by transmission electron microscopy. The stability of the nanovesicles in storage, dilution, plasma, and freeze-dried powder reconstitution was evaluated. The effects of  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $10 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , and  $20 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  GSH on the particle size of the nanovesicles were examined. The *in vitro* release behavior of the nanovesicles in release media containing 0,  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $10$ , and  $20 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  GSH was also investigated. **Results** The particle size of the prepared PDSP@TD and PDSP@TD micelles was approximately 180 nm, while the particle size of PDSP@Que and PDSP@Que micelles was around 230 nm, with a zeta potential below  $-17.4 \text{mV}$ . All of four micelles exhibited LC and EE values exceeding 6.3% and 65.3%, respectively. TEM imaging revealed that all of four micelles displayed spherical morphology and demonstrated excellent physical stability under various conditions. Under the condition of 10 and  $20 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  GSH, the particle size of PDSP@TD and PDSP@Que changes noticeably. The cumulative release rate of free drugs TD and Que in the release medium containing  $20 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  GSH is less than 30% within 48 h, while the cumulative release rate of PDSP@TD and PDSP@Que in all mediums was around 38% within 48 h, and the cumulative release rate of PDSP@TD, PDSP@Que, and the mixed vesicle in the release medium containing  $20 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  GSH was around 78% within 48 h. **Conclusion** The reduction-sensitive hybrid nano-micelles prepared exhibit excellent stability, and tumor cell-specific reduction sensitivity, rendering them suitable for subsequent investigations on *in vitro* and *in vivo* antitumor drug resistance.

**Key words:** antitumor drug resistance; reduction sensitivity; hybrid nano-micelles; doxorubicin; quercetin

肿瘤耐药的发生导致治愈率极低,而耐药机制发生的复杂性使得寻找高效低毒的抗肿瘤多药耐药(MDR)技术对改善肿瘤的药物治疗效果至关重要。有研究通过聚合物抑制<sup>[1]</sup>、还原敏感性胶束<sup>[2]</sup>等来减少药物外排<sup>[3]</sup>问题,但存在用药比难控制、外周组织内泄露<sup>[4]</sup>、抗MDR效率低<sup>[5]</sup>等问题,限制了这些药物的临床应用。

纳米给药系统(NDDS)因其特殊的尺寸效应和理化特性,拥有单纯药物所不具备的优势,成为抗肿瘤药物研究的热点之一。研究还发现,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,因为肿瘤中还原剂和活性氧的细胞内、外浓度不同<sup>[6-8]</sup>。例如,人体血浆和正常组织中的谷胱甘肽(GSH)浓度为 $2\sim 20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,而肿瘤细胞微环境中的GSH浓度是正常组织的 $100\sim 1000$ 倍,尤其是在某些耐药肿瘤细胞中,GSH浓度可达 $10\sim 20 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。这种高GSH水平已被广泛用作纳米药物传递系统中二硫键响应的还原条件,它促进了化疗化合物在肿瘤细胞中的快速释放,从而增强了抗肿瘤活性<sup>[9]</sup>。

本研究利用NDDS的优点,探索出以聚乙二醇-脱氧胆酸(PEG-DCA)的功能化衍生物PEG-DCA-二硫键-聚天冬氨酸苄酯(PDSP)为载体,分别装载槲皮素(Que)和三苯基膦-阿霉素(DOX)(triphenylphosphine-doxorubicin, TD)制备还原敏感型胶束PDSP@Que、PDSP@TD,并按一定比例将2个载药胶束混合制成混合胶束。同时,还以PEG-DCA-碳碳键-聚天冬氨酸苄酯(PDCP)为载

体,按同法制备非还原敏感性纳米混合胶束,并以此为对照制剂,研究还原敏感混合胶束的各种制剂学性质,为后期的体内外抗肿瘤耐药活性研究提供参考。

## 1 材料

### 1.1 药品与试剂

阿霉素(DOX,质量分数98%,批号JZ19122710,南京狄格尔医药科技有限公司); Que(质量分数95%,批号JZ21021019,南京狄格尔医药科技有限公司);PDSP、PDCP(二者的具体合成方法见文献报道<sup>[10]</sup>)、TD为本实验室自制;其他试剂均为分析纯。

TD合成方法:以催化剂二环己基碳二亚胺(DCC)和*N*-羟基丁二酰亚胺(NHS)在无水*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)中对(3-丙羧基)三苯基溴化磷活化4 h,再用三乙胺对DOX脱盐1 h,之后将活化好的(3-丙羧基)三苯基溴化磷缓慢逐滴加入到DOX溶液中, $35\text{ }^\circ\text{C}$ 、氮气保护下进行酰胺键合反应24 h。随后用乙醚沉淀,氯仿溶解后水洗,再柱分离纯化,即得产物TD。

### 1.2 主要仪器

S10-3型恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器有限公司);BSA224S型分析天平(德国Sartorius公司);NS1001L型高压匀质机(意大利GEA Niro Soavi公司);Nano-ZS90 ZetaSizer粒度仪(英国Malvern公司);e2695-2489型高效液相色谱仪(美国Waters公司);透射电镜(日本JEOL公司);ZWY-103D型恒温振荡仪(上海智诚分析仪器制造有限公司);TGL-

16G型台式离心机(上海安亭仪器科技有限公司); DZF-6030型真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司)。

### 1.3 动物

6~8周的雌性SD大鼠购买于河南省实验动物中心,体质量(200±20)g,实验动物生产许可证号SCXK(豫)2017-0001。动物实验均经河南大学动物伦理委员会批准(HUSOM2017-068)。

## 2 方法与结果

### 2.1 纳米胶束的制备方法筛选

**2.1.1 单载药纳米胶束的制备方法筛选** 为提高纳米胶束的载药量和包封率,本研究对单载药纳米胶束的制备方法进行了筛选,分别采用薄膜分散法、透析法、超声法、溶剂挥发法制备PDSP@TD和PDSP@Que,以所制备纳米胶束的粒径、载药量和包封率为主要考察指标,筛选最优制备方法。

(1)薄膜分散法:分别称取10 mg聚合物材料和1 mg药物,精密称定,用15 mL氯仿溶解完全,将磁力搅拌器的转速设为1 800 r·min<sup>-1</sup>,在此转速下搅拌30 min,随后有机溶剂被旋转蒸发仪旋干,干燥过夜。隔天取出后用超纯水10 mL在55℃水浴锅中进行水化,水化后的溶液在80 W功率下超声10 min,即得胶束溶液。

(2)透析法:分别称取10 mg聚合物材料和1 mg药物,精密称定,用1 mL二甲基亚砜(DMSO)溶解完全,在1 800 r·min<sup>-1</sup>的转速下缓慢滴加到盛有适量超纯水的茄形瓶中,搅拌30 min,将反应液转移至透析袋中,透析袋截留相对分子质量为2 000,蒸馏水透析24 h,用离心机离心,收集上清液,即得胶束溶液。

(3)超声法:分别称取10 mg聚合物材料和1 mg药物,精密称定,用2 mL超纯水溶解完全,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3 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min,收集上清液,即得胶束溶液。

(4)溶剂挥发法:分别称取10 mg聚合物材料和1 mg药物,精密称定,用2 mL丙酮溶解完全,将其缓慢滴加到盛有15 mL超纯水的小烧杯中,以1 800 r·min<sup>-1</sup>的转速搅拌12 h,直至有机溶剂挥发完全,用细胞粉碎机处理后离心,收集上清液,即得胶束溶液。

精密量取1 mL单载药纳米胶束溶液置于10 mL量瓶内,加入适量色谱甲醇,将量瓶水浴超声20 min,再用色谱甲醇定容至刻度,混合均匀,经0.45 μm滤膜滤过后,取续滤液进样,按照以下色谱条件<sup>[11]</sup>进样:Hypersil C<sub>18</sub>色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),以甲醇-0.3%磷酸(pH 3.0)为流动相,按梯度程序洗脱(0~9 min,60:40,λ=373 nm;9~15 min,80:20,λ=480 nm),体积流量为1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温设为30℃,进样量为20 μL。根据标准曲线计算样品中药物浓度,再根据下列公式计算各胶束溶液的载药量和包封率。

载药量=载药胶束中药物的质量/载药胶束质量

包封率=载药胶束中药物的质量/初始投药量

用激光粒度仪分析各胶束粒径、聚合物分散性指数(PDI);Zeta电位仪分析其Zeta电位。

结果见表1、2,经溶剂挥发法制备的纳米胶束PDSP@TD和PDSP@Que的粒径、载药量和包封率均优于其他3种方法,因此本研究选择溶剂挥发法制备各种单载药纳米胶束用于后续研究。

表1 4种方法制备的纳米胶束PDSP@TD表征( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 1 Results of of nano-micelles prepared by four methods of PDSP@TD ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

方法	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	载药量/%	包封率/%
薄膜分散法	280.7±20.2	0.265±0.102	-20.1±3.3	6.0±3.0	58.3±0.3
透析法	320.0±18.1	0.321±0.210	-19.0±4.8	4.3±1.2	74.0±1.0
超声法	467.0±15.8	0.561±0.342	-13.4±3.1	5.5±2.2	63.0±2.5
溶剂挥发法	190.3±19.6	0.178±0.123	-16.9±4.2	9.2±2.3	78.0±2.3

**2.1.2 溶剂对各纳米胶束制剂学性质的影响** 取10 mg的聚合物材料和1 mg的TD或Que于西林瓶中,每组有机溶剂平行3份,分别用1 mL甲醇+1 mL氯仿、1 mL乙醇+1 mL氯仿、1 mL甲醇+1 mL丙酮3组有机溶剂溶解,将其缓慢加入盛有15 mL超

纯水的小烧杯中,以1 800 r·min<sup>-1</sup>的转速搅拌12 h,待有机溶剂挥发完全,超声波细胞粉碎机在以60 W功率,工作5 s、间歇10 s的工作状态下工作10 min。将溶液以3 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min,收集上清液,即得胶束溶液,并测量粒径、载药量和包封率。

表2 4种方法制备的纳米胶束PDSP@Que表征( $\bar{x}\pm s, n=3$ )Table 2 Results of nano-micelle prepared by four methods of PDSP@Que( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

方法	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	载药量/%	包封率/%
薄膜分散法	335.2±17.6	0.337±0.134	-20.0±3.4	6.0±0.3	60.2±2.0
透析法	369.0±15.2	0.264±0.048	-17.3±3.6	5.3±0.1	59.0±3.0
超声法	521.3±18.2	0.432±0.210	-16.8±2.4	4.1±0.3	55.2±0.6
溶剂挥发法	230.6±18.0	0.126±0.123	-20.0±4.2	6.3±2.0	63.0±2.1

结果如表3、4所示,以甲醇和丙酮作为混合有机溶剂制备的PDSP@TD纳米胶束较其他有机溶剂,有相对较小的粒径和较高的载药量和包封率。而乙醇和氯仿作为混合有机溶剂制备的PDSP@Que纳米胶束较其他有机溶剂,有相对较小

的粒径和较高的载药量和包封率。由此来看,2种药物的最佳溶剂有一定差异,这可能归因于2种药物的溶解性差异。本研究将分别选择甲醇+丙酮(1:1)和乙醇+氯仿(1:1)为后续TD、Que胶束制备所用溶剂。

表3 不同有机溶剂制备的纳米胶束PDSP@TD表征( $\bar{x}\pm s, n=3$ )Table 3 Results of nano-micelles PDSP@TD prepared by different organic solvents( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

溶剂	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	载药量/%	包封率/%
甲醇+丙酮	189.0±17.8	0.130±0.125	-17.4±3.5	8.9±2.3	76.30±3.06
甲醇+氯仿	266.7±18.3	0.212±0.201	-25.2±2.3	8.0±3.2	66.01±1.27
乙醇+氯仿	290.3±15.1	0.178±0.125	-22.0±4.2	7.4±1.0	60.32±0.34

表4 不同有机溶剂制备的纳米胶束PDSP@Que表征( $\bar{x}\pm s, n=3$ )Table 4 Results of nano-micelle PDSP@Que by different organic solvents( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

溶剂	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	载药量/%	包封率/%
甲醇+丙酮	310.4±20.5	0.365±0.122	-24.5±2.3	6.6±0.5	59.22±1.33
甲醇+氯仿	298.0±18.2	0.165±0.075	-19.2±4.0	5.5±0.4	63.06±2.12
乙醇+氯仿	235.3±17.4	0.203±0.154	-20.4±3.5	7.0±1.2	67.00±3.02

根据上述制备条件的优化,拟订的最优方法如下:称取10 mg 聚合物材料和1 mg 药物(TD 或 Que),精密称定,用2 mL 混合有机溶剂(分别为甲醇+丙酮和乙醇+氯仿)溶解完全,将其缓慢滴加到盛有15 mL 超纯水的小烧杯中,以1 800 r·min<sup>-1</sup>的转速搅拌12 h待有机溶剂挥发完全,超声波细胞粉碎机在以60 W 功率,工作5 s、间歇10 s的工作状态下工作10 min。将溶液以3 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min,收集上清液,即得胶束溶液。不同聚合物材料和不同药物所制备的单载药纳米胶束分别标记为PDSP@TD、PDCP@TD、PDSP@Que、PDCP@Que,将PDSP@TD与PDSP@Que、PDCP@TD与PDCP@Que按1:1混合,即得混合胶束PDSP@TD/Q、PDCP@TD/Q。另外取1 mg TD和Que原料药,加入到15 mL 超纯水中,用磁力搅拌以2 000 r·min<sup>-1</sup>的速度搅拌10 min,制得2种原料药水混悬液。

## 2.2 制剂学表征

### 2.2.1 纳米胶束的粒径、PDI、Zeta 电位、载药量和

包封率测定 按最佳制备工艺分别制备3批PDSP@TD、PDCP@TD、PDSP@Que和PDCP@Que纳米胶束,随后用激光粒度仪、Zeta 电位仪和HPLC 色谱仪分析其粒径、PDI、Zeta 电位、载药量和包封率,结果如图1、表5所示,最优制备工艺所制得的纳

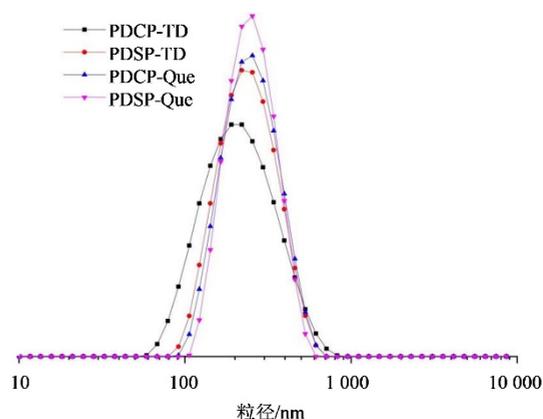


图1 纳米胶束的粒径分布

Fig. 1 Particle size distribution of nano-micelles

表5 4种纳米胶束的粒径、PDI、Zeta 电位、载药量和包封率( $\bar{x}\pm s, n=3$ )Table 5 Size, PDT, Zeta, drug loading and encapsulation rate of four kinds of nano-micelles( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

胶束	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	载药量/%	包封率/%
PDSP@TD	189.0±10.8	0.132±0.125	-17.4±1.5	9.8±1.2	77.1±1.4
PDCP@TD	180.0±12.2	0.201±0.032	-19.0±1.4	10.4±2.8	82.0±4.1
PDSP@Que	235.3±13.4	0.203±0.154	-20.4±2.5	6.3±0.4	65.3±2.7
PDCP@Que	228.0±11.3	0.125±0.320	-22.0±1.2	7.1±0.7	70.0±3.0

米胶束具有良好的重现性,表明该制备工艺稳定,可以用于后续研究。

**2.2.2 纳米胶束的形貌表征** 取制备的4种单载药纳米胶束溶液,稀释至一定倍数,用微量移液枪吸取适量胶束溶液缓慢滴加到铜网上,将铜网置于真空干燥箱中干燥,随后用透射电子显微镜观察胶束的形貌。

用透射电子显微镜观察到4种纳米胶束 PDSP@TD、PDCP@TD、PDSP@Que、PDCP@Que 形态如图2所示,均为类球形。纳米胶束 PDSP@TD 和 PDCP@TD 粒径在 190 nm 左右,纳米胶束 PDSP@Que 和 PDCP@Que 粒径在 230 nm 左右,粒子大小分布均匀。

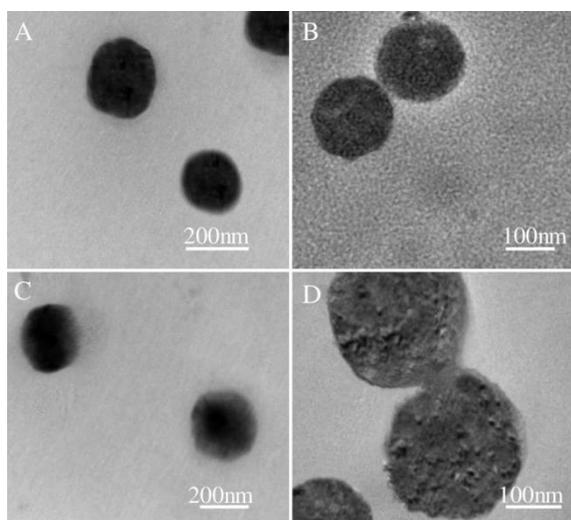


图2 PDSP@TD(A)、PDCP@TD(B)、PDSP@Que(C)、PDCP@Que(D)纳米胶束的透射电镜图

Fig. 2 TEM images of PDSP@TD (A), PDCP@TD (B), PDSP@Que (C), and PDCP@Que (D) nano-micelles

### 2.3 纳米胶束的稳定性考察

对4种单载药纳米胶束分别进行储存稳定性、稀释稳定性、血浆稳定性、冻干粉复溶稳定性考察。取制备的纳米胶束 PDSP@TD、PDCP@TD、PDSP@Que、PDCP@Que 分装于西林瓶中,平行3份,置于4℃冰箱和室温中保存10 d,分别在1、2、4、

6、8、10 d测定其粒径变化。取制备的4种单载药纳米胶束于EP管中,每个样品平行3份,稀释至5、10、25、50、100倍,测定粒径。取制备的4种单载药纳米胶束与含有10%的大鼠血浆混合后于37℃、100 rmin<sup>-1</sup>的摇床中孵育24 h,分别在2、4、6、12、24 h取样测粒径。称取适量4种单载药纳米胶束,分别于冻干前及冻干复溶后,测粒径、PDI、Zeta 电位、载药量和包封率。

4种纳米胶束 PDSP@TD、PDCP@TD、PDSP@Que、PDCP@Que 在室温和4℃冰箱中存放的粒径变化如图6-A所示,4种纳米胶束的粒径变化范围均在20 nm以内,表明制备的纳米胶束具有较好的储存稳定性。

4种纳米胶束 PDSP@TD、PDCP@TD、PDSP@Que、PDCP@Que 在稀释5、10、25、50、100倍后粒径变化如图3-B所示,PDCP@TD 和 PDCP@Que 在稀释5倍的情况下粒径有所减小,之后随着稀释倍数的增大粒径变化趋于稳定,表明纳米胶束具有较好的稀释稳定性。

制备的纳米胶束 PDSP@TD、PDCP@TD、PDSP@Que、PDCP@Que 在含有10%的大鼠血浆溶液中孵育后的粒径变化如图3-C所示,PDSP@TD、PDCP@TD、PDSP@Que 和 PDCP@Que 粒径随着时间的延长先略微增加,再有所回落,但总体上粒径变化不大,推测纳米胶束在进入血液循环中可能吸附了一定量的血浆蛋白,但吸附平衡后能保持基本稳定,这表明纳米胶束结构稳定,而没有发生重组或聚集<sup>[12]</sup>。用考马斯亮蓝检测血浆共孵育后纳米胶束溶液中蛋白含量,对照组孵育0.9%氯化钠溶液,结果见图3-D,随着孵育时间的增加,4种纳米胶束溶液中的蛋白含量均有所增加,表明纳米胶束发生了一定程度的蛋白吸附反应<sup>[13]</sup>。

冻干前及冻干粉复溶后的粒径、PDI、载药量和包封率结果如表6所示,采用溶剂挥发法制备的 PDSP@TD、PDCP@TD 纳米胶束为红色蓬松粉末,PDSP@Que、PDCP@Que 纳米胶束为黄色蓬松状粉

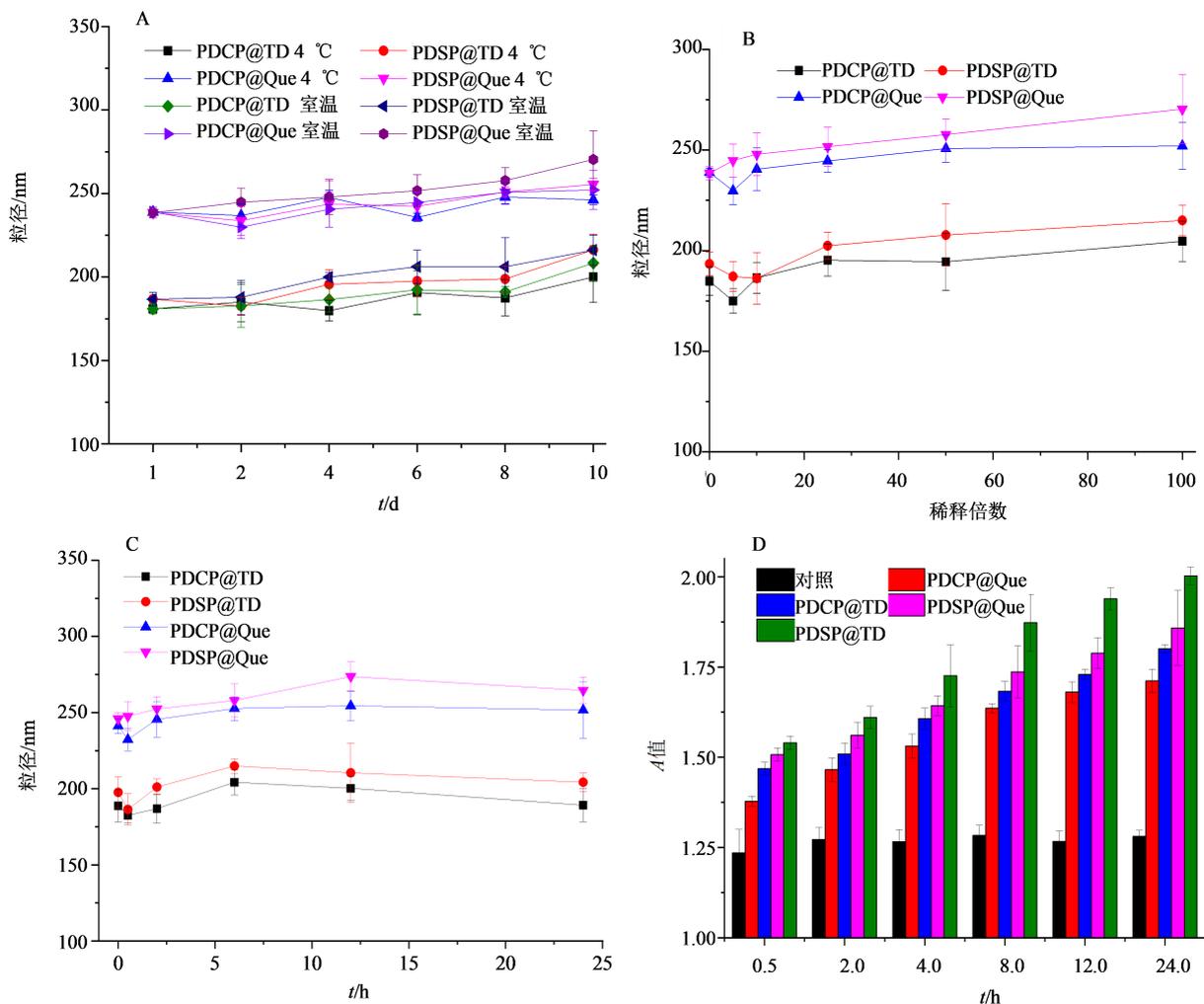


图3 纳米胶束贮存(A)、稀释(B)、血浆(C)、蛋白吸附(D)稳定性研究( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Fig. 3 Storage (A), dilution (B), plasma (C), and protein adsorption (D) stability test of nano-micelles( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

表6 4种纳米胶束冻干前及冻干粉复溶后的粒径、PDI、载药量和包封率( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 6 Particle size, PDI, drug load and encapsulation rate of four kinds of nano micelles before lyophilization and after lyophilization( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

胶束	冻干前				冻干复溶后			
	粒径/nm	PDI	载药量/%	包封率/%	粒径/nm	PDI	载药量/%	包封率/%
PDCP@TD	186.30±8.96	0.24±0.08	10.73±2.23	79.50±1.67	206.90±10.79	0.26±0.07	10.00±1.87	76.84±1.43
PDSP@TD	196.33±10.88	0.23±0.04	9.53±1.76	77.93±1.49	212.50±10.91	0.28±0.04	9.15±1.30	77.36±1.50
PDCP@Que	240.67±16.31	0.24±0.06	7.86±1.33	67.45±1.32	238.07±2.16	0.25±0.09	7.54±1.12	66.92±1.05
PDSP@Que	237.83±9.06	0.23±0.09	7.39±0.15	65.36±1.92	247.73±10.11	0.24±0.08	7.29±1.13	64.48±0.67

末,冻干后复溶稳定性好,且具有较为稳定的载药量和包封率。

#### 2.4 GSH对纳米胶束粒径的影响

取制备的4种单载药纳米胶束各3份,每份10 mL,加入还原型GSH,使胶束溶液中GSH浓度为 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $10 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $20 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,混合均匀后以 $100 \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 放于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养振荡箱中孵育24 h,

用激光粒度仪测粒径变化。

4种单载药纳米胶束在不同GSH浓度作用下的粒径变化如图4所示,其中 $0, 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 是模拟正常人体组织中GSH的浓度, $10, 20 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 是模拟肿瘤环境中GSH的浓度。从图中可以看出,在各种浓度的GSH作用下,PDCP@TD和PDCP@Que粒径及分布基本上无变化,表明二者对GSH不敏感;

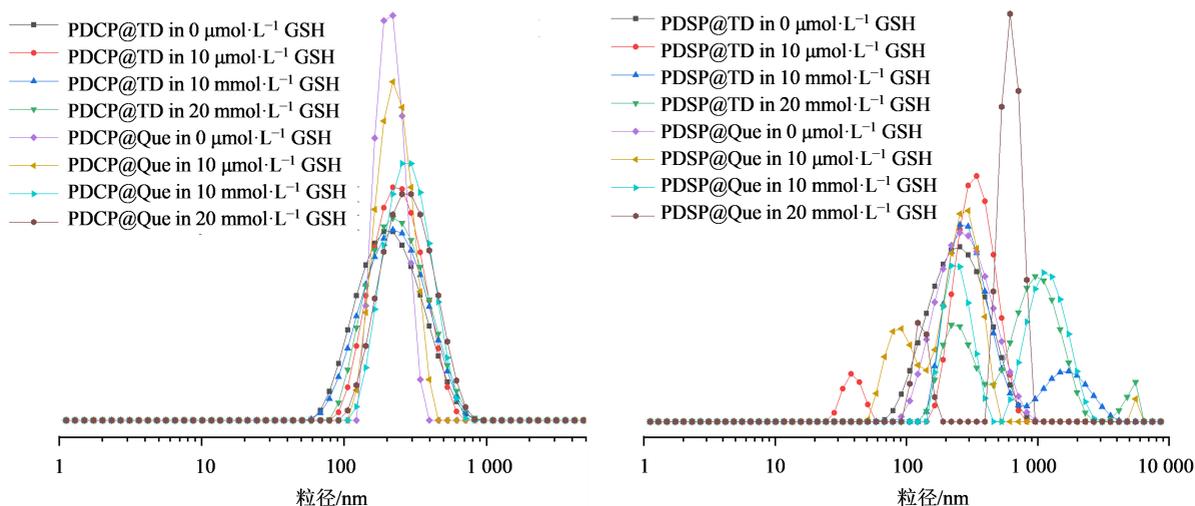


图4 4种单载药纳米胶束在不同GSH浓度作用下的粒径变化( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 4 Particle size change of four nano-micelles in GSH solution with different concentrations ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

在浓度为0、10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的GSH作用下,PDSP@TD和PDSP@Que粒径及分布基本上也无明显的变化,但在浓度为10、20  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的GSH存在下,PDSP@TD和PDSP@Que粒径发生较为明显的变化,尤其是在浓度为20  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的GSH条件下变化更为明显。这是因为PDCP@TD和PDCP@Que中的聚合物材料PDCP不含二硫键,不会发生还原敏感性断键,因此即使在高GSH浓度下胶束粒子结构也不受影响,粒径基本不发生变化;而PDSP@TD和PDSP@Que中的聚合物材料PDSP含有还原敏感的二硫键,在低浓度GSH的环境中二硫键保持稳定,胶束粒径不变,在高浓度GSH的环境中二硫键则发生断裂,使纳米胶束解体、重聚集,从而引起粒径变化。由此来看,纳米胶束PDSP@TD和PDSP@Que注入体内后在血液循环和正常组织中能保持相对稳定的状态,但到达肿瘤部位并进入肿瘤细胞后在高浓度GSH的作用下发生解聚而释放药物,发挥抗肿瘤活性。

## 2.5 纳米胶束的体外释放实验

二硫键容易在高浓度GSH的环境中发生断裂,使聚合物胶束结构发生解聚,从而将其中包载的药物释放到介质中,这为包含二硫键的还原敏感性胶束的设计与构建提供理论支撑。为了验证本研究所设计还原敏感性胶束的释药性能,以含有不同浓度GSH的缓冲溶液为释放介质,模拟体内血液循环、正常组织和肿瘤细胞中的还原性环境,来考察纳米胶束在体内不同部位的释药行为。

取制备的4种单载药纳米胶束各1 mL,每组样

品平行3份,装于截留相对分子质量为2 000的透析袋中,将开口处扎紧,将透析袋同时放于20 mL分别含有0、10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及10、20  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  GSH的PBS释放介质中,同时每种释放介质中均加入适量聚山梨酯80作为助溶剂。为了证实胶束对2种药物的增溶能力,本实验还以2种药物的原料药水混悬液为对照,在含20  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  GSH的PBS释放介质中进行平行实验。在37  $^{\circ}\text{C}$ 、150  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的恒温摇床中进行振荡。在设定的各个时间点进行取样,每次取样后立即补加同等量的新鲜释放介质,以保持容器中释放介质总体积不变。将取出的样品用甲醇稀释至一定的浓度,并经0.22  $\mu\text{m}$ 滤膜滤过,取20  $\mu\text{L}$ 注入HPLC仪,根据峰面积和标准曲线计算含量,最后再计算每个时间点的累积释放量,以时间为横坐标,累积释放率为纵坐标,绘制释放曲线。

各种制剂的释放实验结果见图5,如图5-A、B所示,游离药物TD和Que在含有20  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  GSH的释放介质中在48 h时的累积释放率均小于30%,这归因于药物TD和Que在介质中溶解度较低,进而能透过透析袋的药物分子也很少。PDCP@TD和PDCP@Que在所有介质中48 h内的累积释放量均在38%左右,不同介质中累积释放率无明显差异,表明介质中GSH的浓度不会影响2种胶束中药物的释放速度和程度。

PDSP@TD和PDSP@Que在含0、10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  GSH的介质中48 h内的累积释放率与PDCP@TD和PDCP@Que接近,而随着GSH浓度增大到10、20  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,PDSP@TD在48 h内的累积释放率分

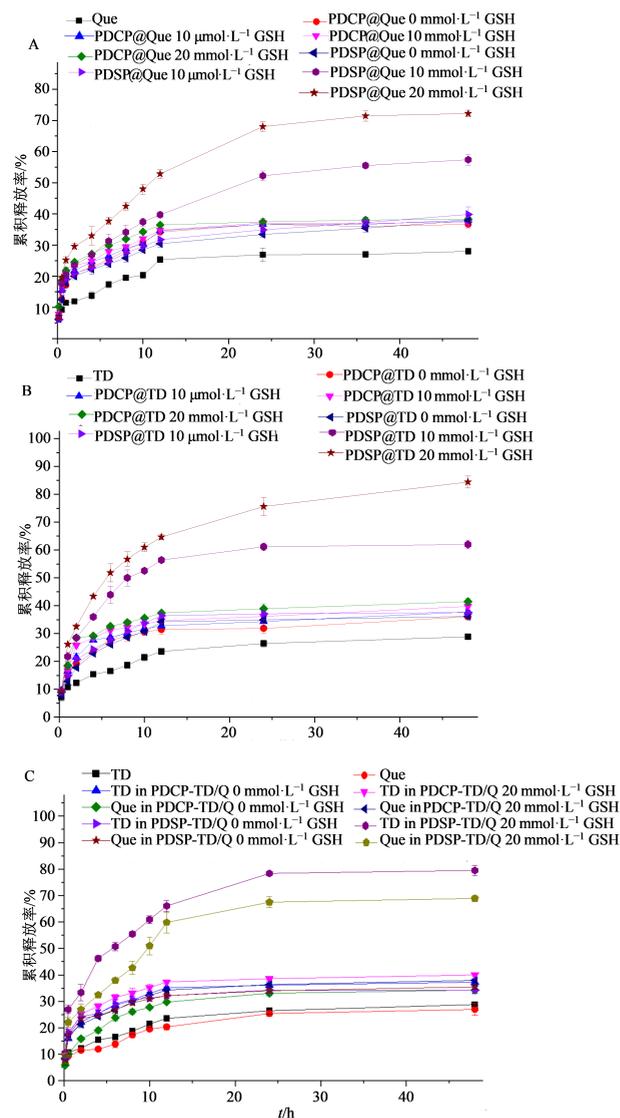


图5 PDSP@Que(A)、PDSP@TD(B)和PDSP@TD/Q(C) 纳米胶束的释放( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 5 Drug release curve of PDSP@Que (A), PDSP@TD (B), and PDSP@TD/Q (C) nano-micelles ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

别增至60%、80%，PDSP@Que在48 h内的累积释放率增至55%、73%；此结果表明低浓度GSH不会影响到纳米胶束PDSP@TD和PDSP@Que中聚合物载体所包含二硫键的稳定性，所以2种胶束的药物释放与PDCP@TD和PDCP@Que相近，而在高浓度GSH环境下由于二硫键的断裂，使胶束结构发生解聚而加速释放药物。结果再次表明PDCP@TD和PDCP@Que不具有还原敏感性，而PDSP@TD和PDSP@Que具有显著的还原敏感性。

为了进一步探索混合胶束中药物的释放是否产生相互影响，本研究又考察了在GSH浓度为0、20 mmol·L<sup>-1</sup>的释放介质中混合胶束PDCP@TD/Q、

PDSP@TD/Q的药物释放行为。由图8-C可知，在GSH浓度为0、20 mmol·L<sup>-1</sup>的介质中，混合纳米胶束中2个药物的释放速度和累积释放率与单载药纳米胶束相比无明显性差异，这表明混合胶束不会改变单个胶束中药物的释放行为。另外，无论是混合胶束还是单载药胶束，它们释放2种药物的速率和程度都几乎接近1:1(如PDSP@TD/Q在GSH浓度为20 mmol·L<sup>-1</sup>的介质中48 h内的累积释放率分别约为70%、80%)，这表明胶束进入体内后可以使2个药物在肿瘤细胞内的释放保持同步，这将有利于2种药物发挥协同抗肿瘤作用<sup>[13]</sup>。

### 3 讨论

#### 3.1 纳米胶束制备方法的选择

本研究在前期以具有还原敏感性和非还原性的聚合物PDSP和PDCP为载体，通过薄膜分散法、透析法、超声法和溶剂蒸发法4种方法制备共载TD、Que的纳米胶束，根据粒径、包封率和载药量的测定结果可知，4种方法制备PDSP共载TD、Que纳米胶束的载药量和包封率最高仅有(3.23±1.34)%和(36.10±1.12)%，而PDCP共载TD、Que纳米胶束的载药量和包封率最高也仅有(3.65±3.04)%和(56.46±2.46)%，考虑到后期体外细胞毒性实验和体内抗肿瘤实验的剂量，认为共载纳米粒中2种药物的载药量过低，难以满足后期体内外活性实验的剂量需求。因此，本研究选择了单载药共混的方式制备混合胶束。

#### 3.2 纳米胶束的制剂学性质

根据最优工艺制备的纳米胶束的各种制剂学性质，4种纳米胶束具有较小的粒径、较大电位的绝对值及较高的载药量和包封率，同时还具有良好的储存稳定性、稀释稳定性、冻干稳定性、血浆稳定性，HPLC含量测定结果表明纳米胶束有较高的载药量和包封率，这些特性为后续实验的开展奠定了良好的基础。

#### 3.3 纳米胶束的体外释放性

纳米胶束PDSP@TD和PDSP@Que，由于材料中含有二硫键，容易在高GSH浓度的环境中发生断裂，将包载的药物从材料中释放。因此，该实验过程中以不同浓度GSH作为释放介质，模拟体内正常组织和肿瘤部位的GSH浓度来考察纳米胶束在体内的释放情况。

体外释放实验表明PDSP@TD和PDSP@Que纳米胶束由于包含有二硫键，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,这表明这些还原敏感性纳米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副作用,并大大增加其抗肿瘤活性。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 杨佳,程丽芳,杨书,等.多柔比星与依克立达联载纳米粒逆转乳腺癌多药耐药的体外评价[J].中国药学杂志,2016,51(5):379-385.  
Yang J, Cheng L F, Yang S, et al. Reversal of breast cancer multidrug resistance *in vitro* by doxorubicin and elacridar co-delivery nanoparticle [J]. Chin Pharm J, 2016, 51(5): 379-385.
- [2] 陈大中,高洁,解方园,等.共载阿霉素和依克立达的PLGA纳米粒的制备及表征[J].药学实践杂志,2017,35(3):219-223,251.  
Chen D Z, Gao J, Xie F Y, et al. Preparation and characterization of co-delivery of doxorubicin and elacridar in nanoparticles [J]. J Pharm Pract, 2017, 35(3): 219-223, 251.
- [3] Wang H, Liang Y T, Yin Y, et al. Carbon nano-onion-mediated dual targeting of P-selectin and P-glycoprotein to overcome cancer drug resistance [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 312.
- [4] Wempe M F, Wright C, Little J L, et al. Inhibiting efflux with novel non-ionic surfactants: Rational design based on vitamin E TPGS [J]. Int J Pharm, 2009, 370(1/2): 93-102.
- [5] Wu J, Wang Q, Dong X Q, et al. Biocompatible AIEgen/p-glycoprotein siRNA@reduction-sensitive paclitaxel polymeric prodrug nanoparticles for overcoming chemotherapy resistance in ovarian cancer [J]. Theranostics, 2021, 11(8): 3710-3724.
- [6] Sun B J, Luo C, Yu H, et al. Disulfide bond-driven oxidation- and reduction-responsive prodrug nanoassemblies for cancer therapy [J]. Nano Lett, 2018, 18(6): 3643-3650.
- [7] Song Y W, Miao Y C, Song C P. Behind the scenes: The roles of reactive oxygen species in guard cells [J]. New Phytol, 2014, 201(4): 1121-1140.
- [8] 董丹丹,焦红军,郝海军.根皮素聚乙二醇-聚乳酸纳米胶束的制备、表征及口服药动学研究[J].中草药,2023,54(3):779-788.  
Dong D D, Jiao H J, Hao H J. Preparation and characterization of phloretin-mPEG-PLA nanomicelles and oral pharmacokinetic study [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(3): 779-788.
- [9] Sun B J, Luo C, Cui W P, et al. Chemotherapy agent-unsaturated fatty acid prodrugs and prodrug-nanoplatforams for cancer chemotherapy [J]. J Control Release, 2017, 264: 145-159.
- [10] 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-multi drug resistance effect [J]. Int J Nanomedicine, 2022, 17: 1323-1341.
- [11] 朱姣姣,郭秀春,陈云龙,等.纳米胶束中阿霉素和槲皮素含量测定方法的建立[J].河南大学学报(医学版),2023,42(2):96-101.  
Zhu J J, Guo X c, Chen Y l, et al. Establishment of a method for the determination of amycin and quercetin in nanomicelles [J]. J Henan Univ Med Edit, 2023, 42(2): 96-101.
- [12] Liang D S, Wang A T, Yang Z Z, et al. Enhance cancer cell recognition and overcome drug resistance using hyaluronic acid and  $\alpha$ -tocopheryl succinate based multifunctional nanoparticles [J]. Mol Pharm, 2015, 12(6): 2189-2202.
- [13] 蒲晓辉,宗兰兰,尹丽,等.一种聚乙二醇-去氧胆酸及其衍生物的制备方法和应用:中国,CN107955153B [P]. 2020-12-15.  
Pu X H, Zong L L, Yin L, et al. Preparation method and application of polyethylene glycol deoxycholic acid and its derivatives: China, CN107955153B [P]. 2020-12-15.
- [14] Qiao Y H, Cao Y P, Yu K K, et al. Preparation and antitumor evaluation of quercetin nanosuspensions with synergistic efficacy and regulating immunity [J]. Int J Pharm, 2020, 589: 119830.

[责任编辑 兰新新]