

包载三苯基膦-阿霉素和槲皮素的纳米混合胶束的体外抗肿瘤耐药性与线粒体靶向作用研究

李禄辉¹, 郭允², 侯先巧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 研究包载三苯基膦-阿霉素 (TPP-DOX, TD) 和槲皮素 (Que) 的纳米混合胶束的体外抗肿瘤耐药与线粒体靶向作用。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。通过 MTT 法考察游离 TD、DOX 对人乳腺癌 DOX 耐药细胞株 MCF-7/ADR 的耐药性, 考察 TD 与 DOX、PDSP@TD 与 PDSP@Que 作用于 MCF-7/ADR 细胞联合使用的最佳协同比, 考察 TD、Que、PDCP@TD、PDCP@Que、PDSP@TD、PDSP@Que、PDCP@TD+PDCP@Que、PDSP@TD+PDSP@Que 对正常肝细胞 HL-7702 和 MCF-7/ADR 的毒性; 采用 HPLC 法对 MCF-7/ADR 细胞摄取 DOX、TD、Que、TD+Que、PDSP@TD、PDSP@Que、PDCP@TD、PDCP@Que、PDSP@TD+PDSP@Que、PDCP@TD+PDCP@Que 结果进行定量测定; 通过对 MCF-7/ADR 细胞核及线粒体染色、细胞内 ROS 及线粒体跨膜电位检测来验证胶束的线粒体靶向性。结果 TD、Que、DOX 对 MCF-7/ADR 细胞的耐药指数 (RI) 分别为 126.76、2.54、1.65; 游离药物 TPP-DOX 和 Que 以及纳米胶束 PDSP@TD 和 PDSP@Que 在质量比分别为 1:2 和 1:1 时均具有较强的协同作用; PDSP@TD+PDSP@Que 相比于游离 TD 和 Que 对 HL-7702 细胞的毒性显著降低 ($P<0.05$ 、0.01、0.001), 对 MCF-7/ADR 细胞毒性较 TD 及 PDCP@TD+PDCP@Que 组显著增强 ($P<0.05$ 、0.01); MCF-7/ADR 细胞对 PDSP@TD+PDSP@Que 的摄取率最高; DOX 给药后主要聚集在细胞核中, PDSP@TD+PDSP@Que 给药后 DOX 大多数都聚集在线粒体内, 细胞内 ROS 含量明显增加, 较 DOX、TD、PDSP@TD 对线粒体膜电位的破坏作用更强 ($P<0.05$ 、0.01、0.001)。结论 PDSP@TD+PDSP@Que 相较于游离药物具有较好的生物安全性及抗肿瘤活性, 能较好的逆转 MCF-7/ADR 细胞对 DOX 的耐药, 且具有较好的线粒体靶向性。

关键词: 三苯基膦-阿霉素; 槲皮素; 纳米胶束; 线粒体靶向; 肿瘤耐药

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2025)04-0833-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.04.005

Study on *in vitro* anti-tumor drug resistance and mitochondrial targeting effect of nanohybrid micelles loaded with triphenylphosphine-doxorubicin and quercetin

LI Luhui¹, GUO Yun², HOU Xianqiao³, PU Xiaohui³

1. School of Medicine and Pharmacy Technical Institute, Henan Applied Technology Vocational College, 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 study the *in vitro* anti-tumor resistance and mitochondrial targeting effects of reduction sensitive nano mixed micelles loaded with triphenylphosphine-doxorubicin (TPP-DOX, TD) and quercetin (Que). **Methods** The redox-sensitive polymer material poly (ethyleneglycol)-deoxycholic acid-disulfide-poly (aspartic acid benzyl ester), PDSP, and the non-redox-sensitive polymer

收稿日期: 2024-08-21

基金项目: 河南省科技攻关项目 (232102311178); 河南省高等学校重点科研项目 (25B350003); 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)

作者简介: 李禄辉 (1980—), 男, 副教授, 研究方向: 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: 药物新剂型及质量分析。E-mail: pgh425@163.com

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 PDSP@Que, and non-redox-sensitive nanovesicles PDCP@TD and PDCP@Que. The resistance of human breast cancer DOX-resistant cell line MCF-7/ADR to free TD and DOX was investigated by MTT assay. The optimal synergistic ratio of TD and DOX, PDSP@TD and PDSP@Que in combination with MCF-7/ADR cells was examined. The toxicity of TD, Que, PDCP@TD, PDCP@Que, PDSP@TD, PDSP@Que, PDCP@TD + PDCP@Que, and PDSP@TD + PDSP@Que on normal liver cells HL-7702 and MCF-7/ADR was evaluated. The uptake of DOX, TD, Que, TD+Que, PDSP@TD, PDSP@Que, PDCP@TD, PDCP@Que, PDSP@TD + PDSP@Que, and PDCP@TD + PDCP@Que by MCF-7/ADR cells was quantitatively determined by HPLC. The mitochondrial targeting of the micelles was verified by nuclear and mitochondrial staining of MCF-7/ADR cells, intracellular ROS detection, and mitochondrial membrane potential measurement. **Results** The resistance indices (RI) of TD, Que, and DOX to MCF-7/ADR cells were 126.76, 2.54, and 1.65, respectively. Free drugs TPP-DOX and Que, as well as nanomicelles PDSP@TD and PDSP@Que, showed strong synergistic effects at mass ratios of 1:2 and 1:1, respectively. The toxicity of PDSP@TD + PDSP@Que to HL-7702 cells was significantly lower than that of free TD and Que ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), and the toxicity to MCF-7/ADR cells was significantly higher than that of TD and PDCP@TD + PDCP@Que ($P < 0.05, 0.01$). The uptake rate of PDSP@TD + PDSP@Que by MCF-7/ADR cells was the highest. After DOX administration, it mainly accumulated in the cell nucleus, while after PDSP@TD + PDSP@Que administration, most of the DOX accumulated in the mitochondria, and the intracellular ROS content significantly increased. The damage to the mitochondrial membrane potential was stronger than that of DOX, TD, and PDSP@TD ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** PDSP@TD + PDSP@Que has better biocompatibility and antitumor activity than free drugs, can better reverse the resistance of MCF-7/ADR cells to DOX, and has better mitochondrial targeting.

Key words: triphenylphosphine-doxorubicin; quercetin; nanomicelles; mitochondrial targeting; tumor drug resistance

癌症已经成为威胁全球人类健康的重要因素之一，化疗是其主要治疗手段。但是肿瘤细胞多药耐药 (MDR) 是癌症治愈率低及易复发的主要原因之一。MDR 的发生机制复杂，涉及许多方面，主要是由于跨膜转运蛋白过度表达导致药物外排增加、凋亡信号传导通路异常、耐药基因异常表达、DNA 修复能力增强等因素，引起细胞对药物的敏感性减弱，从而导致不同程度的肿瘤耐药^[1-2]。因此针对肿瘤细胞 MDR 机制，探索更有效地 MDR 逆转方法，对提高肿瘤治愈率至关重要。

聚合物抑制剂已被广泛用于逆转 MDR，如维生素 E 聚乙二醇琥珀酸酯 (TPGS)、普朗尼克 188、聚氧乙烯蓖麻油 EL 等，但多数抑制剂合成困难、成本较高且抗 MDR 效率低^[3]。本课题组前期设计合成了聚乙二醇单甲醚-脱氧胆酸 (mPEG-DCA) 聚合物抑制剂作为药物外排蛋白抑制剂，实验表明其具有强于 TPGS 等的抗肿瘤 MDR 作用，且制备简便、成本低廉。基于此，本研究前期以 mPEG-DCA 的功能化衍生物 PEG-DCA-SS-PBLA (PDSP) 为载体，分别装载槲皮素 (Que) 和三苯基磷-阿霉素 (TPP-DOX, TD) 制备还原敏感型胶束 PDSP@Que、PDSP@TD，并将 2 个载药胶束按一定比例混合制备成混合纳米胶束^[4]。研究表明将 TPP 嫁接于 DOX 上合成 TD 作为线粒体靶向药物

可发挥线粒体靶向作用^[5]，槲皮素通过下调 P-糖蛋白 (P-gp) 的表达逆转 DOX 耐药，同时载体材料 PDSP 作为药物外排蛋白抑制剂减少药物外排，三者协同发挥抗 MDR 作用。除此之外，制备的还原敏感型纳米胶束，具有改善药物溶解度、提高药物靶向性、实现药物特异性释放降低药物毒性等优点。

本研究通过 MTT 法考察了 PDSP@Que、PDSP@TD 对人乳腺癌 DOX 耐药细胞株 MCF-7/ADR 的耐药性、药物联合使用的最佳协同比，同时对胶束的体外生物安全性以及抗肿瘤活性进行评价，为后续相关研究奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

二氧化碳细胞恒温培养箱 (吴江长胜烘箱设备制造有限公司); 高压蒸汽灭菌锅 (山东威斯顿设备制造有限公司); -80°C 超低温冰箱 (安徽中科都菱商用电器有限公司); 高速离心机 (湖南赫西仪器装备有限公司); 细胞培养超净工作台 (北京亚泰克隆仪器技术有限公司); SpectraMax M2e 多功能酶标仪 (上海寰熙医疗器械有限公司); Nikon 倒置荧光显微镜 (上海博讯仪器有限公司)。

1.2 主要试剂

DOX (质量分数 98%, 批号 JZ19122710)、Que

(质量分数 95%, 批号 JZ21021019), 南京狄格尔医药科技有限公司; PDSP 为本实验室自制 (具体合成方法见文献报道^[6]); RPMI 1640 培养液 (美国 Corning cellgro 公司); 胎牛血清 (浙江天杭生物科技股份有限公司); 胰蛋白酶、3-(4,5-二甲基噻唑基)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT)、青链霉素混合液 (北京索莱宝科技有限公司); Hoechst33258、Mito Tracker Green (上海懋康生物科技股份有限公司); JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒、活性氧 (ROS) 检测试剂盒 (翌圣生物科技上海有限公司); 其他试剂均为分析纯。

1.3 细胞

正常肝细胞 HL-7702 来自北京冬歌博业生物技术有限公司; 人乳腺癌细胞 MCF-7、MCF-7/ADR 细胞株购自上海名劲生物科技有限公司。

2 方法

2.1 细胞培养

MCF-7/ADR 细胞的培养: 准备 MCF-7/ADR 细胞专用完全培养基, 在细胞长到 70%~80% 时, 去掉培养液, 加入含有 $400 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ DOX 的培养液, 继续培养, 期间会有少数细胞漂浮是正常现象, 通过换液可以清除, 传代 3 次以后进行实验。

正常肝细胞 HL-7702 培养: 使用含有 10% 胎牛血清 (FBS) 的 RPMI 1640 培养液 (含有碳酸氢钠、青霉素-链霉素双抗、pH 值为 7.5), 置于 37°C 培养箱培养, 观察细胞状态, 适当换液, 细胞长满以后传代, 多传代几次以后用于实验。

MCF-7 细胞的培养: 同正常肝细胞 HL-7702 的培养方式。

2.2 制剂制备及溶液配制

混合纳米胶束 PDSP@TD/Que 的制备方法: 称取 10 mg 聚合物材料 PDSP 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 $1800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 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 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 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 收集上清液, 即得胶束溶液。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、PDSP@Que, 将 PDSP@TD 与 PDSP@Que 按 1:1 混合, 得混合胶束 PDSP@TD+PDCP@Que^[4]。

同时以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) 为载体制备 PDCP@TD、PDCP@Que^[4]。

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 $2000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度搅拌 10 min, 制得 2 种原料药混悬液。

2.3 MCF-7/ADR 细胞耐药性验证

将 MCF-7 和 MCF-7/ADR 细胞传代 3 次以后用于实验, 将细胞培养至对数生长期, 以每孔 5×10^3 的密度配制 96 孔板需要的细胞悬液, 将悬液混合均匀后接种于 96 孔板内, 每孔 100 μL 。将 CO_2 培养箱的温度设置为 37°C , 将 96 孔板在培养箱内孵育 24 h, 取出 96 孔板, 确认细胞密度达到实验条件, 弃去板内培养基, 取培养板边缘孔设置为空白对照孔 (每孔加空白培养基 100 μL), 并在培养板内部选择至少 3 个细胞培养孔不加药物溶液作为阴性对照孔, 其他孔内依次加入 100 μL 含不同质量浓度药物的培养基 (对于 DOX 来说, 处理 MCF-7 细胞的质量浓度分别为 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45、0.50、0.55 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 处理 MCF-7/ADR 细胞的质量浓度分别为 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 对于 TD 来说, 处理 MCF-7 细胞的质量浓度分别为 1、3、5、10、20、30、40、50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 处理 MCF-7/ADR 细胞的质量浓度分别为 1、4、9、15、27、45、58、72 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 对于 Que 来说, 处理 MCF-7 细胞的质量浓度分别为 1、4、10、15、26、35、57、70 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 处理 MCF-7/ADR 细胞的质量浓度分别为 1、6、16、35、42、66、78、86 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。加药后的 96 孔板放置培养箱内孵育, 孵育 48 h 后, 在孔内加入 10 μL MTT 溶液, 继续在培养箱内孵育 4 h, 弃去 MTT 溶液, 加入 100 μL DMSO, 振荡使结晶完全溶解, 酶标仪测量吸光度 (A) 值, 计算细胞半数抑制浓度 (IC_{50})、相关耐药指数 (RI)。

$$\text{RI} = \text{IC}_{50(\text{MCF-7/ADR})} / \text{IC}_{50 \text{ MCF-7}}$$

2.4 混合给药比例筛选

将达到实验条件的 MCF-7/ADR 细胞, 以每孔 5×10^3 个细胞均匀接种于 96 孔板, 在细胞培养箱中培养 24 h, 待细胞长到合适密度时, 将培养液弃去, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗 1 遍, 加入质量浓度为 1.9、3.8、7.6、15.2、30.4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (以药物含量计) 的含药培养基 (包括 TD、Que、PDSP@TD、PDSP@Que 的单药及混合药物, 其中游离 TD 与游

离 Que 的混合比例为 1.00 : 0.25、1.0 : 0.5、1 : 1、1 : 2、1 : 3, PDSP@TD 与 PDSP@Que 的混合比例为 1.00 : 0.25、1.0 : 0.5、1 : 1、1 : 2、1 : 3), 空白对照和阴性对照组设置方式同“2.3”项, 将 96 孔板放入培养箱中继续培养 48 h 后, 每孔加入 10 μ L MTT, 继续在培养箱中培养 4 h, 弃去培养基, 加入 100 μ L DMSO, 用酶标仪在 570 nm 处测量其 *A* 值, 计算 IC₅₀, 计算联合指数 (CI), 当 CI=1 时, 2 种药物是加和效应, 当 CI<1 时, 2 种药物是协同作用, 当 CI>1 时, 2 种药物是拮抗效应。

$$CI = C_a/IC_{50a} + C_b/IC_{50b}$$

a、b 代表 2 种药物, IC_{50a} 和 IC_{50b} 表示 2 种药物单独使用时的 IC₅₀, C_a 和 C_b 表示二者联用时的 IC₅₀

2.5 细胞毒性实验

将 HL-7702、MCF-7 和 MCF-7/ADR 细胞培养至对数生长期, 接种于 96 孔板, 细胞密度约为每孔 5×10^3 , 在培养箱中培养 24 h, 观察孔内细胞状态, 随后将培养液弃去, 用 PBS 清洗 1 遍, 加入质量浓度为 1.9、3.8、7.6、15.2、30.4 μ g·mL⁻¹ 的含药培养基, 空白对照和阴性对照组设置方式同“2.3”项, 将 HL-7702 细胞继续培养 24、48 h, 将 MCF-7 和 MCF-7/ADR 细胞继续培养 48 h, 每孔加入 10 μ L MTT, 继续在培养箱中培养 4 h, 弃去培养基, 加入 100 μ L DMSO, 用酶标仪在 570 nm 处检测 *A* 值, 计算细胞存活率。

2.6 细胞摄取实验

将达到实验要求的 MCF-7/ADR 接种于 6 孔板, 细胞密度为每孔 1×10^5 , 每孔加入细胞悬浮液 1 mL, 6 孔板在细胞培养箱内孵育 24 h, 待细胞长满紧贴于孔底后将孔内培养液弃去, 在培养板内加入 1 mL 含药物质量浓度为 15.2 μ g·mL⁻¹ 的培养基 (DOX、TD、Que、TD + Que、PDSP@TD、PDSP@Que、PDCP@TD、PDCP@Que、PDSP@TD+PDSP@Que、PDCP@TD+PDCP@Que), 在细胞培养箱中继续孵育, 分别在 0.5、2.0、6.0、12.0 h 进行取样 (每个时间点平行 3 份), 收集细胞悬液于 EP 管中, 加入适量色谱甲醇, 在细胞粉碎仪下进行细胞破碎, 超声 15 min, 再以 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 收取上清液, 备用。采用 HPLC 对上述样品进行分析, 并根据峰面积代入回归方程, 计算含量及摄取率^[6]。

2.7 线粒体靶向性验证

2.7.1 细胞核和线粒体染色 将 MCF-7/ADR 细胞

培养至对数生长期用于实验, 以每孔 1×10^5 接种在 6 孔板内, 每孔 1 mL 细胞悬浮液, 在细胞培养箱中培养 24 h, 弃去培养液, 对照组不加药, 在其他孔内加入含药培养基 (DOX、TD、PDSP@TD、PDSP@TD+PDSP@Que) 使药物质量浓度为 15.2 μ g·mL⁻¹。在孵育 24 h 后加入相应的 Hoechst33258 和 Mito Tracker Green 染液处理细胞, 随后显微镜下观察染色结果。

2.7.2 细胞内 ROS 检测 细胞接种、分组及给药同“2.7.1”项, 给药后孵育 2、4、6 h, 按照 ROS 检测试剂盒书操作, 加入 DCFH-DA 探针, 与细胞充分接触, 在细胞培养箱中孵育 20 min, 用培养基洗涤细胞 2 次, 用荧光显微镜观察荧光变化。

2.7.3 线粒体跨膜电位的检测 细胞接种、分组及给药同“2.7.1”项, 给药孵育 4 h 后, 应用 JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒检测线粒体跨膜电位。

2.8 统计学方法

采用 Origin2019 统计学软件进行统计分析, 结果使用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本间比较使用 *t* 检验。

3 结果

3.1 MCF-7/ADR 细胞的耐药性评价

结果见表 1, 游离 DOX 对 MCF-7 的 IC₅₀ 为 0.36 μ g·mL⁻¹, 对 MCF-7/ADR 的 IC₅₀ 为 46.27 μ g·mL⁻¹, 游离 TD 对 MCF-7 的 IC₅₀ 为 10.68 μ g·mL⁻¹, 对 MCF-7/ADR 的 IC₅₀ 为 27.10 μ g·mL⁻¹, 游离 Que 对 MCF-7 的 IC₅₀ 为 26.04 μ g·mL⁻¹, 对 MCF-7/ADR 的 IC₅₀ 为 43.05 μ g·mL⁻¹。DOX 的 RI 高达 126.76, 在黎昆东等^[7]对 MCF-7/ADR 细胞耐 DOX 的耐药性研究结果中显示 RI 为 188, 与本实验结果相似, 表明耐药细胞 MCF-7/ADR 对于 DOX 具有较强的耐药性, 而 TD 耐药指数为 2.54, Que 耐药指数为 1.65, 两者具有较小的耐药指数, 表明药物 TD 和 Que 可能有一定的抗耐药作用^[8]。

表 1 MCF-7/ADR 耐药性考察
Table 1 Investigation of drug resistance of MCF-7/ADR

药物	IC ₅₀ / (μ g·mL ⁻¹)		RI
	MCF-7	MCF-7/ADR	
DOX	0.36	46.27	126.76
TD	10.68	27.10	2.54
Que	26.04	43.05	1.65

3.2 混合用药比例筛选结果

CI 计算结果见表 2, 实验设置的所有药物组最终得到的 CI 均小于 1, 游离药物 TD 和 Que 质量比为 1 : 2 时, CI 值最小为 0.555, 随着质量比增加为 1 : 3 时 CI 反而增大为 0.635, 纳米胶束 PDSP@TD 和 PDSP@Que 在质量比为 1 : 1 时 CI 值最小为 0.421, 质量比增加到 1 : 2 时 CI 值为 0.425。由此可知游离药物 TD 和 Que 以及纳米胶束 PDSP@TD 和 PDSP@Que 在质量比分别为 1 : 2 和 1 : 1 时均具有相对较小 CI, 具有较强的协同作用。游离药物和纳米胶束具有最强协同作用时的质量比有所不同, 可能是因为游离药物和纳米胶束进入细胞内的方式不同^[9]。此外, 在前期体外释放实验中为了验证药物释放是否会相互影响, 将混合纳米胶束在高谷胱甘肽浓度下进行考察, 结果表明混合纳米胶束与单药组纳米胶束的释放具有同步性。在细胞内纳米胶束 PDSP@TD 和 PDSP@Que 以 1 : 1 进行药物释放, 而游离药物在细胞内进入的方式可能存在差异, 导致不能以 1 : 1 的比例达到最佳协同作用。混合给药后 PDSP@TD 和 PDSP@Que 的 IC₅₀<游离药物, 混合给药纳米胶束具有较强的细胞杀伤力。

表 2 MCF-7/ADR 在给药后的 IC ₅₀ 和 CI			
Table 2 IC ₅₀ and CI of MCF-7/ADR after administration			
药物	IC ₅₀ / (μg·mL ⁻¹)		CI
	TD	Que	
TD	27.100	—	—
Que	—	43.050	—
TD : Que (1.00 : 0.25)	16.810	4.200	0.718
TD : Que (1.0 : 0.5)	13.560	6.780	0.660
TD : Que (1 : 1)	10.130	10.130	0.610
TD : Que (1 : 2)	5.846	14.593	0.555
TD : Que (1 : 3)	8.398	11.922	0.635
PDSP@TD	17.730	—	—
PDSP@Que	—	28.000	—
PDSP@TD : PDSP@Que (1.00 : 0.25)	12.160	3.040	0.521
PDSP@TD : PDSP@Que (1.0 : 0.5)	10.080	5.040	0.490
PDSP@TD : PDSP@Que (1 : 1)	7.005	7.005	0.421
PDSP@TD : PDSP@Que (1 : 2)	5.106	10.213	0.425

3.3 细胞毒性实验结果

不同药物对于正常肝细胞 HL-7702 作用 24、48 h 的存活率曲线如图 1-A、B 所示, 24 h 结果显示在低浓度作用下 PDSP@TD + PDSP@Que、PDCP@TD+PDCP@Que 以及单独的 4 个制剂对正常细胞基本无毒, 而游离药物 Que 和 TD 随着浓度的增大存活率降低, 在 30.4 μg·mL⁻¹ 时存活率分别为 68%和 62%。48 h 细胞毒性实验结果显示, 随着浓度增大以及时间累积, PDSP@TD+PDSP@Que、PDCP@TD+PDCP@Que 以及单独的 4 个制剂有极小的毒性, 当质量浓度增大为 30.4 μg·mL⁻¹ 时, 游离药物 Que 和 TD 的细胞存活率为 65%和 60%。由此可知药物被纳米胶束包载以后对正常细胞的毒性大大减小, 生物安全性较好。

MCF-7 和 MCF-7/ADR 细胞 48 h 的 MTT 实验结果如图 1-C、D 所示, 对于 MCF-7 细胞, 游离药物 TD 和 Que 在低浓度作用下杀伤能力较弱, 随着浓度的增大, 4 种单独纳米胶束给药后的细胞存活率相对于游离药物有明显下降趋势, PDSP@TD + PDSP@Que 组的存活率较游离药物 TD 及 PDCP@TD+PDCP@Que 组显著下降 (P<0.05、0.01), 而 PDSP@TD+PDSP@Que 在质量浓度达到 30.4 μg·mL⁻¹ 时存活率在 40%以下。对于 MCF-7/ADR 细胞, 相同浓度下的药物作用相同时间, 在低浓度时游离药物细胞存活率和 MCF-7 相比较高, 随着给药浓度的增大, 细胞存活率逐渐下降, 4 种单独纳米胶束给药后的细胞存活率相对于游离药物有明显下降趋势, PDSP@TD+PDSP@Que 组的存活率较游离药物 TD 及 PDCP@TD+PDCP@Que 组显著下降 (P<0.05、0.01), 当 PDSP@TD + PDSP@Que 质量浓度达到 30.4 μg·mL⁻¹ 时对于耐药细胞的杀伤力和不耐药细胞杀伤力作用相当, 表明混合纳米胶束具有抗耐药作用。

3.4 MCF-7/ADR 细胞摄取实验结果

通过 HPLC 测量细胞内药物摄取含量, 结果见表 3。游离药物 DOX、TD、Que 在 0.5 h 时的摄取率分别为 (7.35±1.01)%、(11.32±0.31)%、(10.02±1.12)%, 随着摄取时间的增加, 在 12 h 的时候摄取量分别增加至 (12.61±0.32)、(19.23±2.21)%、(16.98±2.00)%, 摄取量增加了 5.26%、7.91%、6.96%。游离混合药物 TD+Que 在 0.5 h 摄取量是 (13.75±1.06)%, 在 12 h 时的摄取量增加至 (24.28±1.21)%, 摄取量增加了 10.53%。纳米胶

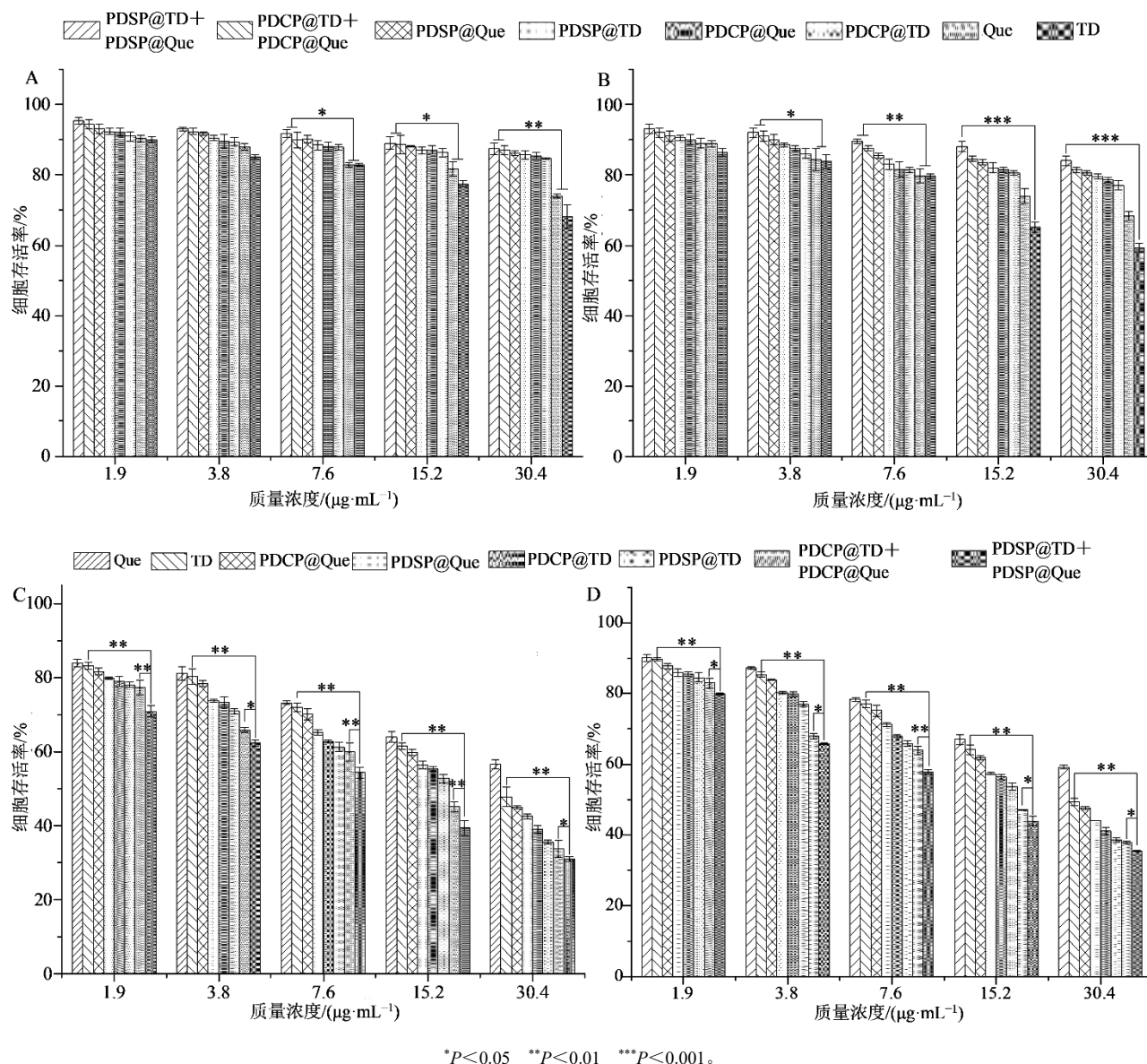


图 1 不同药物对人正常肝细胞 7702 作用 24 h (A) 和 48 h (B) 以及对肿瘤细胞 MCF-7 (C)、MCF-7/ADR (D) 作用 48 h 的细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 1 Cell viability of human normal hepatocytes 7702 for 24 h (A) and 48 h (B) and cell viability of tumor cells MCF-7 (C) and MCF-7/ADR (D) for 48 h treated by different drugs ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

束 PDCP@Que、PDCP@TD、PDSP@Que、PDSP@TD 在 0.5 h 时的摄取量分别是 $(9.32 \pm 0.55)\%$ 、 $(14.32 \pm 0.31)\%$ 、 $(12.30 \pm 0.65)\%$ 、 $(16.66 \pm 0.33)\%$ 在 12 h 时的摄取量分别增加至 $(17 \pm 0.88)\%$ 、 $(26.36 \pm 0.87)\%$ 、 $(23.63 \pm 0.83)\%$ 、 $(35.8 \pm 0.76)\%$ 摄取量分别增加了 7.68%、12.04%、11.33%、19.14%。混合纳米胶束 PDCP@TD+PDCP@Que 在 0.5 h 时 PDCP@Que 的摄取量为 $(8.32 \pm 0.23)\%$ ，12 h 时的摄取量为 $(17.65 \pm 0.65)\%$ ，摄取量增加了 9.33%，PDCP@TD 的摄取量为 $(15.19 \pm 0.53)\%$ ，12 h 时

的摄取量为 $(28.21 \pm 0.54)\%$ ，摄取量增加了 13.02%。混合纳米胶束 PDSP@TD+PDSP@Que 在 0.5 h 时 PDSP@Que 的摄取量为 $(11.23 \pm 0.55)\%$ ，12 h 时的摄取量为 $(26.16 \pm 0.34)\%$ ，摄取量增加了 14.93%，PDSP@TD 的摄取量为 $(17.32 \pm 0.53)\%$ ，12 h 时的摄取量为 $(37.21 \pm 0.33)\%$ ，摄取量增加了 19.89%。上述结果表明相对于游离药物，MCF-7/ADR 对纳米胶束的摄取量要大于游离药物，是由于被材料包载后，增加了药物的摄取，而 TPP 阳离子则使药物在体内蓄积。此外混合纳米胶束

表 3 不同时间 MCF-7/ADR 对药物的摄取率

Table 3 Percentage of drug uptake by MCF-7/ADR at different times

组别	摄取率/%			
	0.5 h	2.0 h	6.0 h	12.0 h
DOX	7.35±1.01	9.04±0.35	10.22±0.66	12.61±0.23
TD	11.32±0.31	13.65±1.15	16.01±0.76	19.23±2.21
Que	10.02±1.12	11.65±2.10	13.35±3.10	16.98±2.00
TD+Que	13.75±1.06	15.98±1.11	19.38±0.22	24.28±1.21
PDCP@Que	9.32±0.55	11.44±0.87	13.54±0.38	17.00±0.88
PDCP@TD	14.32±0.31	16.80±1.31	22.20±0.65	26.36±0.87
PDSP@Que	12.30±0.65	14.83±0.55	20.30±0.44	23.63±0.83
PDSP@TD	16.66±0.33	22.90±0.26	29.86±0.63	35.80±0.76
PDCP@Que in PDCP@TD+PDCP@Que	8.32±0.23	12.57±0.43	15.18±0.29	17.65±0.65
PDCP@TD in PDCP@TD+PDCP@Que	15.19±0.53	16.70±0.36	23.66±1.02	28.21±0.54
PDSP@Que in PDSP@TD+PDSP@Que	13.23±0.55	16.12±0.66	19.78±0.33	24.16±0.34
PDSP@TD in PDSP@TD+PDSP@Que	19.32±0.53	23.98±0.44	30.15±1.21	36.21±0.33

PDCP@TD + PDCP@Que、PDSP@TD + PDSP@Que 中摄取率较高的原因除了 TPP 的靶向输送药物作用以外, Que 以及载体材料中的 mPEG-DCA^[10]都可以抑制细胞内 P-gp 的表达,很大程度上抑制了耐药细胞对药物的外排作用,在一定程度上发挥了抗耐药作用。

3.5 TPP-DOX 的线粒体靶向性

3.5.1 细胞核和线粒体染色 细胞核和线粒体染色结果如图 2 所示, DOX 荧光颜色为红色, 细胞核 Hoechst33258 荧光颜色为蓝色, 与 DOX 重叠后显粉色, 即游离药物 DOX 处于细胞核内呈粉色; Mitochondria Tracker Green 荧光颜色是绿色, 与 DOX 重叠后显橙色, 即 TD 聚集在线粒体内呈橙色。纳米胶束 PDSP@TD 与游离药物 TD 相比聚集在线粒体内的量增多, 橙色部分增多; 而混合给药后 PDSP@TD+PDSP@Que 纳米胶束荧光显微镜下橙色更多, 表明此时药物大多数都聚集在线粒体内。实验结果表明 TD 以及相关纳米胶束由于 TPP 的存在有线粒体靶向性^[11], 而混合 PDSP@Que 给药后聚集在线粒体内的量更多, 是因为 Que 具有抗耐药作用, 抑制了细胞药物外排作用促使更多的 TD 聚集在线粒体内。

3.5.2 细胞内 ROS 的检测 结果如图 3 所示, DCFH-DA 在细胞内 ROS 含量比较高的时候, 显示较强的绿色荧光, 可以根据细胞内绿色荧光的量来

判定 ROS 的含量。游离 DOX 在 2 h 和 4 h 时荧光强度为 0, 6 h 时有微弱的荧光强度。在作用于细胞 2 h 的时候, 游离药物 TD 的绿色荧光强度极弱, PDSP@TD 的荧光强度较 TD 稍强, 而混合给药的 PDSP@TD+PDSP@Que 的荧光强度较强, 随着作用时间的延长, TD、PDSP@TD、PDSP@TD+PDSP@Que 的荧光强度均有所增强, 在 6 h 时 PDSP@TD+PDSP@Que 的荧光强度达到最强。结果表明 TD 小分子可以使细胞内 ROS 含量增加, 而混合纳米胶束作用细胞后产生的 ROS 含量更高, 以此来达到杀死肿瘤细胞的作用^[12]。

3.5.3 线粒体跨膜电位的检测 肿瘤细胞线粒体具有相对于正常细胞较高的膜电位, JC-1 荧光探针是用于检测线粒体膜电位最常用的荧光物质, 当线粒体膜电位较高时, JC-1 处于聚集状态, 呈现出红色荧光, 当线粒体受到损伤导致膜电位下降时, JC-1 处于单体状态, 发出绿色荧光^[13]。将红绿荧光强度比值即单体与聚集体的比值作为判断依据。如图 4 所示, 游离药物 DOX 显红色荧光, 游离药物 TD、纳米胶束 PDSP@TD、PDSP@TD+PDSP@Que 在作用于 MCF-7/ADR 4 h 后, 游离药物 TD 显示少量的绿色荧光, 此现象说明合成药物 TD 造成线粒体膜电位的变化, 而纳米胶束 PDSP@TD 绿色荧光强度较游离药物有所增加, 且红色荧光强度减弱, 混合胶束 PDSP@TD+

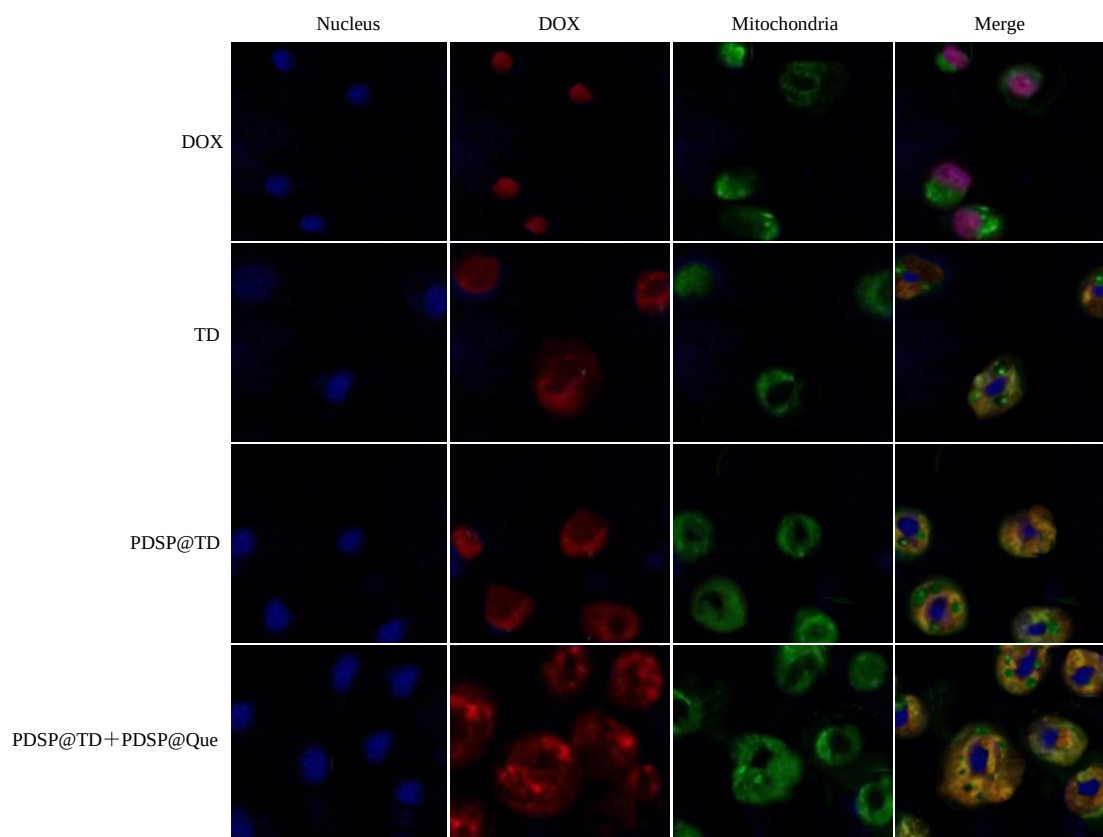


图 2 细胞核、线粒体染色荧光结果

Fig. 2 Fluorescence results of nuclear and mitochondrial staining

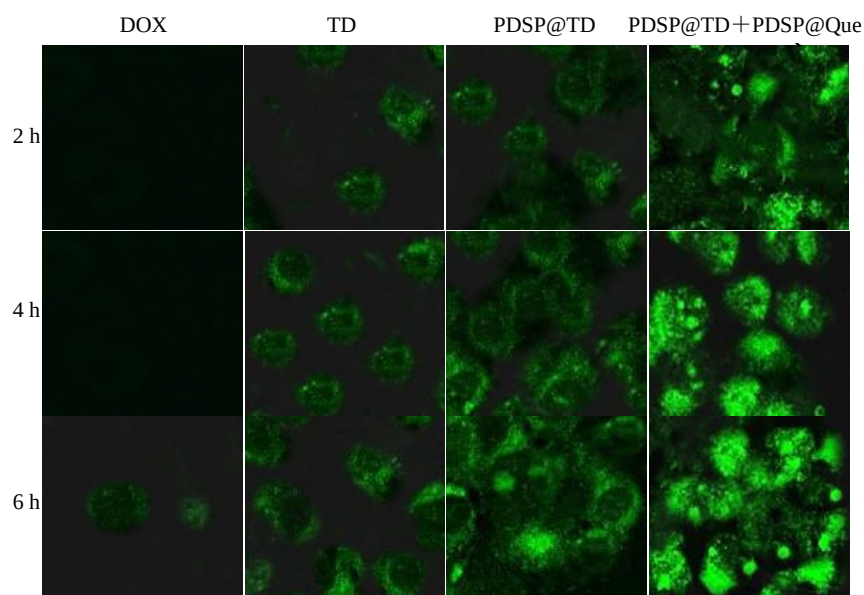


图 3 MCF-7/ADR ROS 检测

Fig. 3 Detection of ROS in MCF-7/ADR

PDSP@Que 绿色荧光强度更强, 红色荧光此时呈散点状分布, 说明单体的量明显大于聚集体的量, 与

其他组比较, 均差异显著 ($P < 0.05$, 0.01 , 0.001), 此时的线粒体膜电位受到了严重的损伤。表明 TD

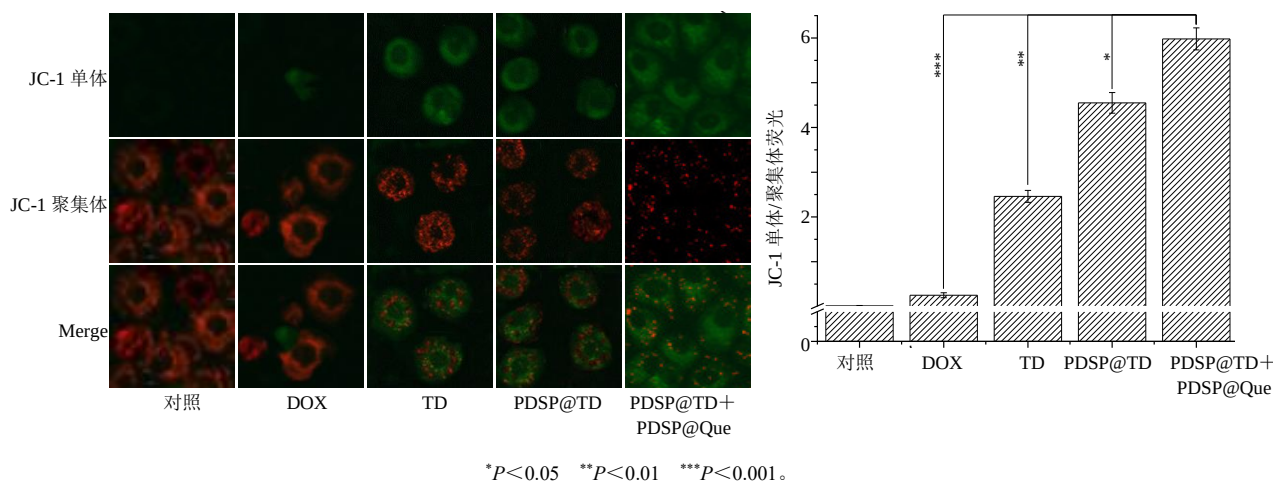


图 4 孵育 4 h 后 JC-1 荧光变化情况

Fig. 4 Fluorescence changes of JC-1 after incubation for 4 h

可以聚集于细胞线粒体致其损伤,混合纳米胶束相比于单独纳米胶束对线粒体膜电位的损伤有更强的作用。

4 讨论

本课题组前期探索性的提出了联合药物外排蛋白抑制剂和线粒体靶向药物的抗肿瘤耐药治疗策略,制备了混合纳米胶束 PDSP@TD + PDSP@Que,本研究通过一系列实验验证了该混合纳米胶束的体外抗耐药性以及抗肿瘤活性。MCF-7/ADR 细胞对 DOX、TD 以及 Que 的耐药性结果显示,TD 及 Que 具有一定抗耐药作用,两者耐药指数相较于 DOX 小了近百倍,表明 TD 可能通过线粒体靶向作用改善 DOX 的肿瘤细胞耐药性,而中药活性成分 Que 因其自身活性亦具有逆转 MDR 作用。为使 2 药联用发挥最佳的药理活性,考察了混合胶束联用的最佳协同比,确定了纳米胶束 PDSP@TD 和 PDSP@Que 在质量比为 1:1 时具有最强的协同作用。

细胞摄取实验结果显示,随时间增加细胞摄取量不断增加,其中 TD 细胞摄取量明显高于 DOX,其可能归因于 TPP 上阳电荷的穿膜作用,促使药物被细胞摄取,另外 TPP 的线粒体靶向作用,使得更多的 TD 蓄积于细胞中;此外混合纳米胶束的细胞摄取量大于单一纳米胶束,这可能归因于 Que 通过下调 P-gp 蛋白,从而减少了药物被细胞外排;纳米胶束的细胞摄取量也大于相应的游离药物,表明纳米胶束因其尺度效应可以增加药物的细胞摄取,使得药物具有更强的细胞渗透性,且胶束载体

中 mPEG-DCA 具有抑制药物外排作用,可以增加药物在细胞内滞留;因此,混合纳米胶束因集成了 TPP、Que、mPEG-DCA 及纳米粒等多重抗肿瘤耐药作用而拥有最强的抗耐药作用,使药物被肿瘤细胞摄取最多。细胞毒性结果表明,混合纳米胶束相较于游离药物具有较好的生物安全性,且对耐药细胞具有较强的细胞毒性,为后续体内研究奠定了基础。

随着研究的深入,科学界日益揭示线粒体功能受损诱发的凋亡信号传导紊乱,乃是肿瘤化疗耐药性的关键诱因之一,这一洞见为肿瘤精准治疗及耐药难题的破解开辟了崭新路径。线粒体因此跃升为肿瘤治疗中的核心潜在靶点,其靶向药物在逆转肿瘤耐药方面的潜力备受瞩目。针对线粒体的靶向策略创新迭出,包括直接将治疗分子与靶向基团融合,或利用纳米载体搭载线粒体靶向分子,以实现精准递送^[14-15]。常用的靶向媒介涵盖小分子短肽、线粒体靶向蛋白、TPP 阳离子、地喹氯铵、罗丹明系列、小檗碱及其衍生物、聚羟基丁酸酯、硝基氧化物等多元化分子,这些进展为肿瘤治疗策略注入了新的活力与希望^[16-18]。

本研究为了验证 TD 线粒体靶向性,对细胞核和线粒体进行染色,结果显示 DOX 多蓄积于细胞核中,而 TD 则主要集中在线粒体部位,混合纳米胶束在线粒体部位具有最强的荧光强度。这表明 TPP 能发挥线粒体靶向作用,混合纳米胶束可能逆转肿瘤细胞耐药性从而抑制药物外排,使得 TD 更多的蓄积于线粒体发挥作用。此外线

粒体是细胞产生 ROS 的主要部位, 而 ROS 的产生会导致线粒体膜通透性转运孔开放, 进而引起线粒体跨膜电位降低, 之后通过一系列途径诱导细胞凋亡。因此对细胞内 ROS 含量以及线粒体跨膜电位进行测定, 结果显示混合纳米胶束作用于细胞后产生最多的 ROS, 且对线粒体膜电位变化最为强烈, 进一步证实了混合纳米胶束的线粒体靶向性。

本研究制备的混合纳米胶束具有较好的生物安全性以及体外抗肿瘤耐药活性, 具有较好的线粒体靶向性, 在一定程度上逆转了游离 DOX 的 MDR 作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Wang C D, Li F S, Zhang T A, et al. Recent advances in anti-multidrug resistance for nano-drug delivery system [J]. *Drug Deliv*, 2022, 29(1): 1684-1697.
- [2] Kibria G, Hatakeyama H, Harashima H. Cancer multidrug resistance: Mechanisms involved and strategies for circumvention using a drug delivery system [J]. *Arch Pharm Res*, 2014, 37(1): 4-15.
- [3] Cheng X, Zeng X L, Zheng Y, et al. pH-sensitive pluronic micelles combined with oxidative stress amplification for enhancing multidrug resistance breast cancer therapy [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2020, 565: 254-269.
- [4] 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.
- [5] 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 methodology for the determination of TPP-DOX and Que in nano micelles *in vitro* [J]. *J Henan Univ Med Sci*, 2023, 42(2): 96-101.
- [6] Zhong X C, Bao X Y, Zhong H Q, et al. Mitochondrial targeted drug delivery combined with manganese catalyzed Fenton reaction for the treatment of breast cancer [J]. *Int J Pharm*, 2022, 622: 121810.
- [7] 黎昆东. miR-200a、miR-877 逆转 MCF-7/ADR 细胞耐药性及分子机制研究 [D]. 广州: 广东药科大学, 2018.
Li K D. Reversal of drug resistance and molecular mechanism of miR-200a and miR-877 in MCF-7/ADR cells [D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2018.
- [8] 刘艳秋. 线粒体靶向药物分子的合成及其与阿霉素协同克服肿瘤耐药性的研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2017.
Liu Y Q. Synthesis of mitochondrial targeting drug molecules and overcoming tumor drug resistance in coordination with doxorubicin [D]. Suzhou: Soochow University, 2017.
- [9] Luo S Y, Gu Y, Zhang Y N, et al. Precise ratiometric control of dual drugs through a single macromolecule for combination therapy [J]. *Mol Pharm*, 2015, 12(7): 2318-2327.
- [10] 魏志豪, 孙远梅, 李博, 等. 一种新型两亲性聚乙二醇单甲醚-鹅去氧胆酸聚合物的合成与表征 [J]. *河南大学学报(医学版)*, 2017, 36(4): 256-259.
Wei Z H, Sun Y M, Li B, et al. Synthesis and characterization of amphiphilic polymer poly (ethylene glycol)-chenodeoxycholic acid [J]. *J Henan Univ Med Sci*, 2017, 36(4): 256-259.
- [11] Liu Y Q, Zhang X J, Zhou M J, et al. Mitochondrial-targeting lonidamine-doxorubicin nanoparticles for synergistic chemotherapy to conquer drug resistance [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9(50): 43498-43507.
- [12] Hou H B, Huang X H, Wei G Q, et al. Fenton reaction-assisted photodynamic therapy for cancer with multifunctional magnetic nanoparticles [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11(33): 29579-29592.
- [13] 黄凯, 鲍春龄, 陈维伟, 等. 电针对 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶诱导的帕金森病模型小鼠线粒体功能的影响 [J]. *针刺研究*, 2021, 46(1): 21-26.
Huang K, Bao C L, Chen W W, et al. Effect of electroacupuncture on mitochondrial function in mice with Parkinson's disease [J]. *Acupunct Res*, 2021, 46(1): 21-26.
- [14] Battogtokh G, Choi Y S, Kang D S, et al. Mitochondria-targeting drug conjugates for cytotoxic, anti-oxidizing and

