

坎地沙坦-雷公藤红素共载还原敏感胶束的体内外抗肿瘤作用

李禄辉¹, 郭允², 刘伟芬¹, 余文洁³, 蒲晓辉^{3*}, 乔永辉^{4*}

1. 河南应用技术职业学院 医药健康学院, 河南 开封 475004

2. 郑州卫生健康职业学院 药学院, 河南 郑州 450199

3. 河南大学 药学院, 河南 开封 475004

4. 河南中医药大学 中医药科学研究院, 河南 郑州 450046

摘要: **目的** 探索坎地沙坦(CD)与雷公藤红素(CEL)共载还原敏感型胶束的体内外协同抗肿瘤作用。**方法** 以透明质酸-1,6-己二胺-坎地沙坦(HHCD, 非氧化还原敏感性对照)、透明质酸-胱氨-坎地沙坦(HCCD, 氧化还原敏感性)作为前药聚合物材料,通过溶剂挥发法分别制备 HHCD、HCCD 及负载 CEL 的 HHCD/CEL、HCCD/CEL 聚合物胶束。采用 MTT 法考察 CD 与 CEL 的抗肿瘤作用联合指数,并比较 4 种聚合物胶束(HHCD、HCCD、HHCD/CEL、HCCD/CEL, CEL 与 CD 质量比为 1:2)溶液和游离药 CD、CEL (0.3、0.6、1.2、2.5、5.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 对人肝癌细胞 HepG-2 及正常肝细胞 HL-7702 的细胞毒性;利用阿霉素(DOX)的自发光特性,以 DOX 为阳性对照,制备 HHCD/DOX 和 HCCD/DOX 胶束,通过 HepG-2 细胞摄取实验评价肿瘤细胞对胶束的摄取能力;利用小鼠成纤维细胞 NIH-3T3,考察游离 CD、HHCD、HHCD/CEL、HCCD、HCCD/CEL (药物质量浓度均为 3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 对上清液中胶原蛋白 I (Col-I)、转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 含量的影响。建立 H22 荷瘤小鼠肝癌模型,以小鼠的体质量变化、存活率以及肿瘤体积为依据,对 CD、CEL、CD/CEL、HHCD、HHCD/CEL、HCCD、HCCD/CEL (2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 的抗肿瘤活性以及安全性进行评价;ELISA 法检测肿瘤组织 Col-I、TGF- β 1 含量。**结果** 细胞实验结果显示,游离药物 CEL 与 CD 的质量比为 1:2 时,联合指数最小,为 0.736 (<1),表明 2 药具有协同作用。与对照组比较,游离 CEL 使正常肝细胞 HL-7702 存活率显著降低 ($P<0.05$ 、0.001),HHCD 和 HCCD 具有较好的生物相容性;与其他给药组相比,HCCD/CEL 聚合物胶束表现出最佳 HepG-2 细胞毒性 ($P<0.05$ 、0.01、0.001),其中 HHCD/CEL 胶束在 1.2、2.5、5.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度与 HCCD/CEL 胶束有显著性差异 ($P<0.001$);HCCD 胶束能有效被肿瘤细胞摄取;与对照组比较,游离 CD 组、HCCD/CEL 组 Col-I 表达显著降低 ($P<0.05$ 、0.01);与 HHCD/CEL 组相比,HCCD/CEL 组 Col-I 表达显著降低 ($P<0.05$);与对照组比较,CD、HHCD、HCCD、HHCD/CEL、HCCD/CEL 组的 TGF- β 1 含量显著下降 ($P<0.05$),HHCD/CEL 和 HCCD/CEL 聚合物胶束呈更强作用趋势。体内抗肿瘤实验结果表明,与模型比较,给药组都体现出一定的抗肿瘤活性 ($P<0.001$),HCCD/CEL 胶束与 HHCD/CEL 胶束相比有更好的抗肿瘤活性 ($P<0.05$);除坎地沙坦组外,其余各给药组小鼠的存活率均为 100%;在整个实验周期中,各给药组小鼠体质量之间均未出现无显著差异;与模型组比较,HCCD/CEL 组 Col-I、TGF- β 1 含量显著降低 ($P<0.001$);且 HCCD/CEL 组 Col-I、TGF- β 1 含量显著低于 HHCD/CEL 组 ($P<0.01$),HHCD 组 Col-I、TGF- β 1 含量显著低于 HCCD 组 ($P<0.05$)。**结论** CD 与 CEL 共载还原敏感型胶束具有较好的细胞选择性毒性和生物安全性,可通过调控细胞外微环境实现良好的协同抗肿瘤作用。

关键词: 坎地沙坦; 雷公藤红素; 纳米胶束; 肝癌; 抗肿瘤

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2026)08-2719-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.08.009

Study on anti-tumor effect of candesartan-celastrol co-loaded reduction sensitive micelles *in vitro* and *in vivo*

LI Luhui¹, GUO Yun², LIU Weifen¹, YU Wenjie³, PU Xiaohui³, QIAO Yonghui⁴

1. School of Medicine and Health, Henan Technical Institute, Kaifeng 475004, China

2. School of Pharmacy, Zhengzhou Healthy Vocational College, Zhengzhou 450199, China

收稿日期: 2026-02-25

基金项目: 河南省科技攻关项目 (252102310435, 252102311282, 262102310408); 河南省高等学校重点科研项目 (25B350003, 26A350004)

作者简介: 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

乔永辉 (1986—), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向为中药药物新剂型及中药分析。E-mail: yhqiao@hactcm.edu.cn

3. School of Pharmacy, Henan University, Kaifeng 475004, China

4. Academy of Traditional Chinese Medicine Sciences, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

Abstract: Objective To explore the synergistic anti-tumor effects of co-loaded candesartan and celastrol in redox-sensitive micelles *in vitro* and *in vivo*. **Methods** Using hyaluronic acid-1,6-hexanediamine-candesartan (HHCD, non-redox-sensitive control) and hyaluronic acid-cystamine-candesartan (HCCD, redox-sensitive) as prodrug polymer materials, HHCD, HCCD, and their drug-loaded counterparts HHCD/CEL and HCCD/CEL polymeric micelles were prepared via solvent evaporation. The combination index of the antitumor effects of CD and CEL was evaluated using the MTT method, and the cytotoxicity of four types of polymer micelle solutions (HHCD, HCCD, HHCD/CEL, HCCD/CEL, with a mass ratio of CEL to CD of 1 : 2), as well as free drugs CD and CEL (0.3, 0.6, 1.2, 2.5, 5.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), was compared against human hepatocellular carcinoma HepG-2 cells and normal liver HL-7702 cells. Taking advantage of the spontaneous fluorescence of DOX, DOX was used as a positive control to prepare HHCD/DOX and HCCD/DOX micelles, and the cellular uptake of these micelles by HepG-2 cells was assessed. Using NIH-3T3 mouse fibroblasts, the effects of free CD, HHCD, HHCD/CEL, HCCD, and HCCD/CEL (all at a drug concentration of 3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) on the levels of collagen I (Col-I) and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in the supernatant were investigated. A murine H22 tumor-bearing model of hepatocellular carcinoma was established, and the antitumor activity and safety of CD, CEL, CD/CEL, HHCD, HHCD/CEL, HCCD, and HCCD/CEL (2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) were evaluated based on changes in body weight, survival rate, and tumor volume. The levels of Col-I and TGF- β 1 in tumor tissues were determined by ELISA. **Results** Cellular experiments showed that the lowest combination index ($0.736 < 1$), indicating synergistic effects, was achieved when the mass ratio of free drug CEL to CD was 1 : 2. Compared with the control group, free CEL significantly reduced the survival rate of normal liver cells HL-7702 ($P < 0.05$, 0.001), whereas HHCD and HCCD exhibited better biocompatibility. Among all treatment groups, HCCD/CEL polymer micelles demonstrated the highest cytotoxicity against HepG-2 cells ($P < 0.05$, 0.01 , 0.001). Notably, HHCD/CEL micelles showed significant differences from HCCD/CEL micelles at concentrations of 1.2, 2.5, and 5.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($P < 0.001$). HCCD micelles were effectively internalized by tumor cells. Compared with the control group, both the free CD group and the HCCD/CEL group showed significantly reduced Col-I expression ($P < 0.05$, 0.01); compared with the HHCD/CEL group, the HCCD/CEL group also exhibited significantly lower Col-I expression ($P < 0.05$). Compared with the control group, TGF- β 1 levels were significantly decreased in the CD, HHCD, HCCD, HHCD/CEL, and HCCD/CEL groups ($P < 0.05$), with HHCD/CEL and HCCD/CEL polymer micelles showing a stronger inhibitory trend. *In vivo* anti-tumor experiments revealed that all treated groups exhibited significant anti-tumor activity compared with the model group ($P < 0.001$), and HCCD/CEL micelles showed superior anti-tumor efficacy compared with HHCD/CEL micelles ($P < 0.05$). Except for the candesartan-treated group, the survival rates of mice in all other treatment groups reached 100%. Throughout the entire experimental period, no significant differences in body weight were observed among the treated groups. Compared with the model group, the HCCD/CEL group showed significantly reduced levels of Col-I and TGF- β 1 ($P < 0.001$). Moreover, the levels of Col-I and TGF- β 1 in the HCCD/CEL group were significantly lower than those in the HHCD/CEL group ($P < 0.01$), and the HHCD group had significantly lower levels than the HCCD group ($P < 0.05$). **Conclusion** The candesartan-celastrol co-loaded reduction-sensitive prodrug micelles showed favorable selective cytotoxicity and biological safety. By modulating the extracellular microenvironment, they achieve effective synergistic antitumor effects. **Key words:** candesartan; celastrol; polymer-prodrug micelles; liver cancer; antitumor

肝癌作为全球高发的恶性肿瘤之一，其高侵袭性、转移性及化疗耐药性严重制约了临床治疗效果^[1]。化疗仍是中晚期肝癌的主要治疗手段，但肿瘤多药耐药（MDR）的产生及化疗药物的强毒性、低靶向性等问题，往往导致治疗失败并严重影响患者生活质量^[2-3]。因此，开发兼具靶向性、协同抗肿瘤活性及生物安全性的新型递药系统，成为改善肝癌治疗现状的关键方向。

坎地沙坦（CD）作为血管紧张素II受体拮抗剂，可通过抑制肿瘤基质胶原生成、促进血管正常化，为抗癌药物穿透肿瘤实质开辟通路^[4-5]；雷公藤红素

（CEL）可以调控磷脂酰肌醇 3-激酶（PI3K）-蛋白激酶 B（Akt）、信号传导转录激活因子 3（STAT3）等关键信号通路，有效诱导肿瘤细胞凋亡、抑制血管生成^[6-8]，二者协同应用有望实现“破坏肿瘤土壤+杀灭肿瘤种子”的双重抗肝癌效应。然而，CD 与 CEL 均存在水溶性差、生物利用度低、靶向性不足等问题，且 CEL 的潜在肝肾毒性进一步限制了其临床应用^[9-11]。本课题组^[12]前期已成功制备坎地沙坦-雷公藤红素共载还原敏感胶束（HCCD/CEL），通过制剂学评价证实该胶束具有粒径均一（约 200 nm）、载药包封率高（均超 73%）、

还原响应性释药及良好稳定性等优势,有效解决了 2 种药物的递送难题,为后续活性验证奠定了坚实基础。

本研究在前期制剂制备的基础上,进一步开展系统的活性与安全性评价:体外层面,通过 MTT 法考察胶束对肝癌 HepG-2 细胞的协同毒性及对正常肝细胞 HL-7702 的生物安全性,结合细胞摄取实验明确其细胞内化能力,并通过 NIH-3T3 细胞验证其对细胞外基质[胶原蛋白 I (Col-I)、转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)]的调控作用;体内层面,评估其抗肿瘤疗效及组织安全性。通过体外与体内实验的相互印证,全面阐明 HCCD/CEL 胶束的抗肿瘤潜力与生物安全性,为该递药系统的后续临床转化提供充分的实验依据。

1 材料

1.1 仪器

SpectraMax M2e 多功能酶标仪(上海赛默医疗器械有限公司);Nikon 倒置荧光显微镜(上海博讯仪器有限公司);高速离心机(湖南赫西仪器装备有限公司);JY92-IIDN 数字型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技有限公司);电子天平[赛利多斯科学仪器(北京)有限公司]。

1.2 药品与主要试剂

CEL(批号 JZ21052314)、阿霉素(DOX,批号 JZ19122710),南京景竹生物科技有限公司;CD(批号 B2021060,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);四甲基偶氮唑蓝(MTT)(批号 C11410250)、DMEM 培养基(批号 20220928)、Hoechst 33342(批号 C0031)、磷酸盐缓冲液(PBS,批号 20221012)、青链霉素混合液(批号 20220923)、胰蛋白酶(批号 20230131),北京索莱宝科技有限公司;血清(批号 S829012029,美国 Invigentech 公司);TGF- β 1 ELISA 试剂盒(批号 202303)、Col-I ELISA 试剂盒(批号 202303),上海酶研生物有限公司;4 种聚合物胶束 HHCD、HCCD、HHCD/CEL、HCCD/CEL 均为河南大学药学院蒲晓辉教授课题组自制^[12],制备方法及验证均已正式发表,方法如下:以前期合成的透明质酸-1,6-己二胺-坎地沙坦(HHCD,非氧化还原敏感性对照)、透明质酸-胱氨-坎地沙坦(HCCD,氧化还原敏感性)作为前药聚合物材料,通过优化后的最佳方法(溶剂挥发法)分别制备 HHCD、HCCD 及负载 CEL 的 HHCD/CEL、HCCD/CEL 聚合物胶束。

1.3 细胞与实验动物

HepG-2 细胞、人正常肝细胞 HL-7702 均来自中国科学院细胞库;小鼠胚胎成纤维细胞(NIH-3T3)由河南大学基础医学院赵世振副教授赠予;肝癌 H22 细胞由河南大学药学院杜刚军教授课题组赠予。

SPF 级雌性 KM 小鼠 56 只,体质量(28 ± 2)g,8 周龄,购自河南斯克贝斯生物科技股份有限公司,实验动物质量合格证号为 41098321110000 8421,实验动物生产许可证号为 SCXK(豫)2020-0005。所有动物实验均经过河南大学生物医学科研伦理分委员会批准同意,批准号 HUSOM2023-258。

2 方法

2.1 细胞培养

HepG-2 细胞的培养:准备含双抗的 DMEM 培养基、血清、胰酶、培养皿及 PBS,试剂配制时按每 100 毫升含双抗的 DMEM 培养基中添加 10%的血清比例进行调配,配制完成后于 4 °C 条件下保存,后续将细胞置于 37 °C、含 5%CO₂ 的恒温培养箱中进行培养。

HL-7702 细胞的培养:方法同 HepG-2 细胞的培养方式。

2.2 联合用药的协同作用实验

将处于对数生长期的 HepG-2 细胞制成悬浮液,接种在 96 孔板中,每孔各加 100 μ L,每孔 1×10^5 个,随后置于培养箱中,24 h 后弃去上层的培养基。游离药 CEL、CD 及 CEL:CD 联合(1.0:0.5、1.0:1.0、1.0:2.0、1.0:3.0、1.0:5.0 5 个比例)均设置质量浓度梯度分别为 0.400、1.000、2.500、6.250、15.625 μ g $\cdot$ mL⁻¹,设置 5 个复孔,随后将稀释好的溶液加入到板中,将只加入空白培养基的设置作为对照组,把加入药后的 96 孔板置于培养箱中,放置 24、48 h 后,在避光条件下每孔加入 10 μ L 的 MTT,随后再置于培养箱中 4 h,弃去培养基,再向每个孔中加入 0.1 mL 的二甲基亚砜(DMSO),振荡孵育 10 min,使生成的结晶可以充分溶解,使用酶标仪测定在 490 nm 处各孔中的吸光度(A)值,并计算各组细胞的存活率、半数抑制浓度(IC₅₀)以及联合指数(CI)^[13]。

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

a、b 代表 2 种药物, C_a 和 C_b 代表 a 和 b 2 种药物联合应用时使抑制率为 50%时的药物浓度, IC_{50a} 和 IC_{50b} 分别代表 a 和 b 两种药物单独应用时可使抑制率为 50%时的浓度;当

CI=1 时, 表现为叠加效应, 当 CI>1, 表现为拮抗效应, 当 CI<1, 表现为协同效应

2.3 细胞毒性实验

(1) HL-7702 细胞毒性实验: 首先将处于对数时期的 HL-7702 细胞制成细胞悬液, 种植在 96 孔板中, 每个孔各加 100 μL , 细胞密度约为每孔 1×10^5 个, 然后将其置于培养箱中培养 24 h, 24 h 后弃去上层的培养基。将 4 种聚合物胶束 (HHCD、HCCD、HHCD/CEL、HCCD/CEL, CEL:CD=1:2) 溶液和游离药 CD、CEL 用未加血清的培养基稀释, 稀释 5 个质量浓度 (分别为 0.3、0.6、1.2、2.5、5.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 均为药物质量浓度)。随后将稀释好的溶液加入到板中, 每个浓度设置为 5 个复孔, 将只加入空白培养基的设置作为对照组, 将加入药后的 96 孔板置于培养箱中放置 24、48 h 后, 在避光条件下向 96 孔板中各加入 10 μL 的 MTT, 随后置于培养箱中 4 h, 弃去培养基, 再向每个孔中加入 0.1 mL 的 DMSO, 振荡孵育 10 min, 使结晶可以充分溶解, 使用酶标仪测定在 490 nm 处各孔中的 A 值, 计算出各浓度下细胞的存活率。

(2) 肝癌细胞 HepG-2 细胞毒性实验: 实验操作同上述“(1)”项下操作。

2.4 细胞摄取实验

因 DOX 本身具有自发荧光特性, 已被广泛用作纳米药物载体细胞摄取研究的示踪剂^[4]。因此以 DOX 为阳性对照, 采用溶剂挥发法, 即与制备负载 CEL 的 HHCD/CEL、HCCD/CEL 聚合物胶束同样的方法制作了包载 DOX 的 HHCD/DOX 和 HCCD/DOX 胶束溶液。

将正处于对数生长的 HepG-2 细胞接种在 6 孔板中, 使其密度为 2×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 将其放置在培养箱中 24 h。将游离 DOX、HHCD+DOX 混合液、HCCD+DOX 混合液以及 HHCD/DOX、HCCD/DOX 用培养基稀释到质量浓度 0.3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 后加入到 6 孔板 (每孔 1 mL), 4 h 后, 弃去培养基, 用 PBS 清洗 3 次, 每次 1 min, 清洗后用 Hoechst 33342 对细胞核进行染色, 在室温条件下放置约 10 min, 随后将 Hoechst 33342 吸走, 再用 PBS 进行清洗 3 次, 每次 2 min, 最后将清洗液弃去, 在 6 孔板中加入 1 mL 的 PBS, 随后将 6 孔板置于荧光显微镜下观察细胞成像。

2.5 Col-I、TGF- β 1 的含量测定

首先将处于对数生长期的 NIH-3T3 细胞接种

在 12 孔板中, 每孔细胞数为 2×10^5 个, 随后各取 1 mL 游离 CD、HHCD、HHCD/CEL、HCCD、HCCD/CEL (药物质量浓度均为 3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 加入到 12 孔板中, 孵育 24 h。PBS 清洗 3 次, 接着再向每个孔中加入 1 mL 胰酶, 终止消化, 离心, 弃去上清液, 向 EP 管内加入 0.5 mL 的 PBS, 用细胞粉碎机把细胞超声粉碎, 离心, 取上清液。用 ELISA 试剂盒对 Col-I、TGF- β 1 的含量进行测定。

2.6 荷瘤小鼠的肿瘤抑制实验

2.6.1 肝癌小鼠模型的建立 将 H22 细胞解冻后, 吸取 0.3 mL (细胞浓度为 1×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$) 注入到小鼠的腹腔, 待 1 周腹水接种成功后, 在无菌条件下吸取腹部淡黄色的液体, 随后离心, 弃去上清液, 用 0.9% 氯化钠溶液不断地清洗细胞, 直至上清液变为无色透明状态。然后用 0.9% 氯化钠溶液将细胞稀释为 $1 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的细胞悬浮液, 将悬浮液充分摇匀后, 取 0.2 mL 悬浮液接种在小鼠的右腋下。

2.6.2 肿瘤抑制实验 待肿瘤体积达到 100 mm^3 左右后, 将小鼠随机分组, 共 7 组, 每组 8 只, 分别为: 模型组 (0.9% 的氯化钠溶液)、游离 CD 组、游离 CEL 组、游离 CD/CEL (CEL:CD=1:2) 组、HHCD 组、HHCD/CEL 组、HCCD 组、HCCD/CEL 组, 采用隔天尾 iv 的方式进行给药, 给药剂量为 2 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[15], 每 2 天对小鼠的肿瘤体积和体质量进行监测。在治疗结束后 (第 14 天) 处死小鼠, 对其进行解剖, 保存小鼠的肿瘤组织。

$$\text{肿瘤体积} = a \times b^2 / 2$$

a 为肿瘤的长; b 为肿瘤的宽

2.6.3 肿瘤组织中 Col-I 与 TGF- β 1 的含量测定 取 0.1 g “2.6.2”项下瘤组织, 置入玻璃组织研磨器内, 加入 0.3 mL 的 PBS, 手动研磨至呈均匀的组织匀浆, 离心, 取上清液。用 ELISA 试剂盒对 Col-I、TGF- β 1 的含量进行测定。

2.7 统计学分析

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 联合用药的协同作用实验

为研究游离 CEL 与 CD 对肝癌细胞协同作用的最佳质量比, 首先在不同质量配比下筛选两者的联合效应, 结果见表 1。当游离药物 CEL 与 CD 的质量比为 1:2 时, CI 值最小, 为 0.736 (<1), 表明在此配比下两者协同作用最强。同时, 该配比下

CEL 和 CD 的 IC_{50} 分别为 1.74 和 0.87, 均处于较低水平。虽然质量比为 1:3 时 CEL 的 IC_{50} 更低 (1.23), 但其 CI (0.972) 高于 1:2 配比时的 CI, 说明 1:2 配比在协同效应上更具优势。游离 CEL 单独作用时的 IC_{50} 为 $2.42 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 游离 CD 单独作用时的 IC_{50} 为 $50.76 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。当两者按质量比 1:2 联合使用时, CEL 与 CD 的 IC_{50} 分别降至 1.74、 $0.87 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 表明在该配比下两药对 HepG-2 细胞具有明确的协同抑制作用。

表 1 HepG-2 细胞在给药后的 IC_{50} 和 CI 值 ($\bar{X} \pm s$, $n=5$)

游离药物	$IC_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$		CI
	CEL	CD	
CEL	2.42 ± 0.16	—	—
CD	—	50.76 ± 2.99	—
CEL:CD (1.0:0.5)	1.85 ± 0.12	11.70 ± 1.85	0.995
CEL:CD (1.0:1.0)	1.81 ± 0.03	3.86 ± 1.03	0.824
CEL:CD (1.0:2.0)	1.74 ± 0.08	0.87 ± 0.06	0.736
CEL:CD (1.0:3.0)	1.23 ± 0.16	23.55 ± 0.18	0.972
CEL:CD (1.0:5.0)	0.98 ± 0.18	35.43 ± 0.32	1.103

3.2 细胞毒性实验

3.2.1 HL-7702 细胞毒性 图 1、2 分别是胶束溶液 HHCD、HCCD、HHCD/CEL、HCCD/CEL 和游离药 CD、CEL 作用于 HL-7702 细胞 24、48 h 后细胞存活率的结果。游离药 CD、CEL 的细胞存活率随着药物浓度的增加逐渐降低, 游离 CEL 的毒性比较大。在 24 h 细胞毒性实验中, CEL $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度的细胞存活率在 60% 左右, 48 h 时细胞的存活率不足 50%, 与对照组比较差异显著 ($P<0.05$ 、 0.001), 结果表明游离 CEL 会对正常组织造成一定程度的损害。而在 24 h 时前药聚合物胶束 HHCD 和 HCCD 的存活率在 90% 左右, 48 h 的细胞存活率在 85%, 这也证实前药聚合物胶束溶液具有较好的生物相容性。聚合物胶束 HCCD/CEL 与 HHCD/CEL 结果无明显差异, 可能是在正常组织中无强还原的环境, 前药聚合物胶束 HCCD/CEL 不会发生结构改变, 药物 CEL 的释放是缓慢扩散。

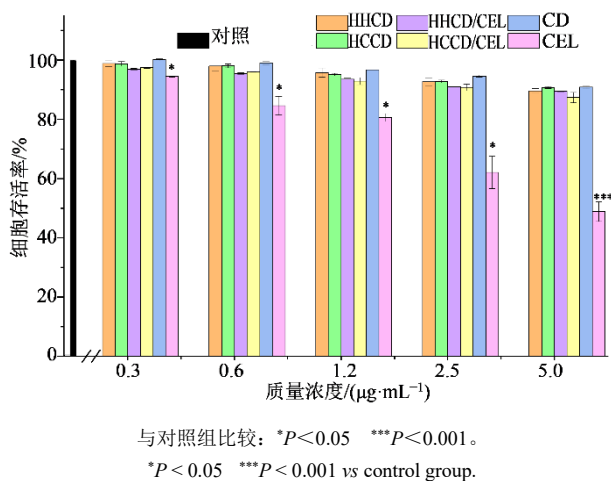


图 1 制剂作用人正常肝细胞 HL-7702 24 h 的细胞存活率 ($\bar{X} \pm s$, $n=5$)

Fig. 1 Cell survival rate of preparations on human normal liver cells HL-7702 for 24 h ($\bar{X} \pm s$, $n=5$)

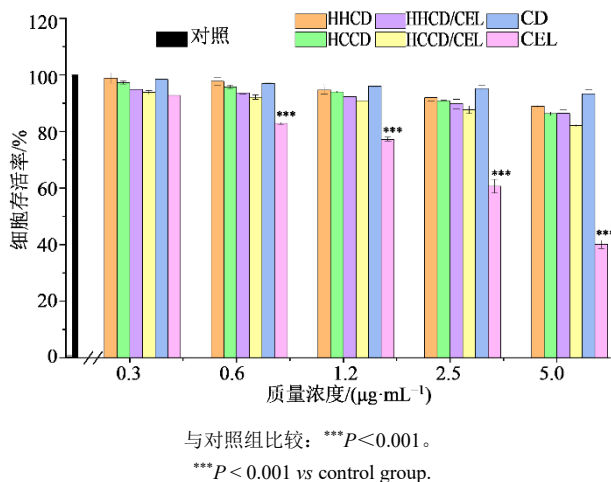


图 2 制剂作用人正常肝细胞 HL-7702 48 h 的细胞存活率 ($\bar{X} \pm s$, $n=5$)

Fig. 2 Cell survival rate of preparations on human normal liver cells HL-7702 for 48 h ($\bar{X} \pm s$, $n=5$)

3.2.2 肝癌细胞 HepG-2 细胞毒性 游离 CD、CEL 和 4 种聚合物胶束 HHCD、HCCD、HHCD/CEL、HCCD/CEL 作用于肝癌 HepG-2 细胞 24、48 h 细胞存活率的结果见图 3、4。随着游离药和前药聚合物胶束浓度的增加, 细胞的存活率逐渐下降。与其他给药组相比, HCCD/CEL 聚合物胶束表现出最佳细胞毒性 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), 其中 HHCD/CEL 胶束在 1.2、2.5、 $5.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度与 HCCD/CEL 胶束有显著性差异 ($P<0.001$), 可能是在肿瘤部位高谷胱甘肽 (GSH) 浓度使 HCCD/CEL 胶束的结构发生改变, 使药物 CEL 能够快速释放达到抑制细胞增殖的

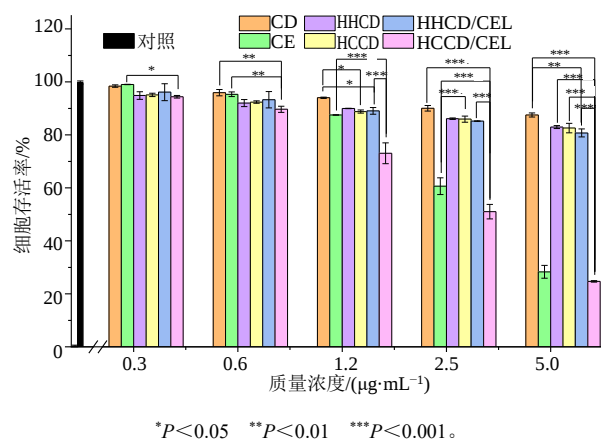


图 3 制剂作用 HepG-2 24 h 的细胞存活率 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 3 Cell survival rate of preparations on HepG-2 for 24 h ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

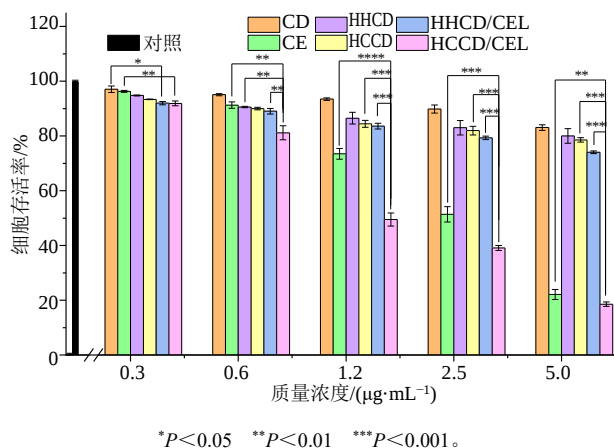


图 4 制剂作用 HepG-2 48 h 的细胞存活率 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 4 Cell survival rate of preparations on HepG-2 for 48 h ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

效果, 这与聚合物胶束的体外释放实验结果一致^[12]。

3.3 细胞摄取实验结果

肿瘤细胞摄取实验结果如图 5 所示, HCCD/DOX 的荧光强度比 HHCD/DOX 强, 可能是由于在肿瘤细胞强还原环境中 HHCD 和 HHCD/DOX 中的“C-C”键没有还原敏感特性, 药物的释放比较缓慢, 使药物积累量少; HCCD/DOX 在肿瘤细胞强还原环境中聚合物前药中“S-S”键的断裂会使药物快速释放。游离 DOX 的荧光强度相比 HCCD/DOX 较弱的原因可能是, 游离 DOX 的摄取量比聚合物胶束 HCCD/DOX 少, 聚合物胶束具有更有利于细胞摄取的尺寸优势。

3.4 Col-I、TGF- β 1 的含量测定

如图 6 所示, 与对照组比较, 游离 CD 组、

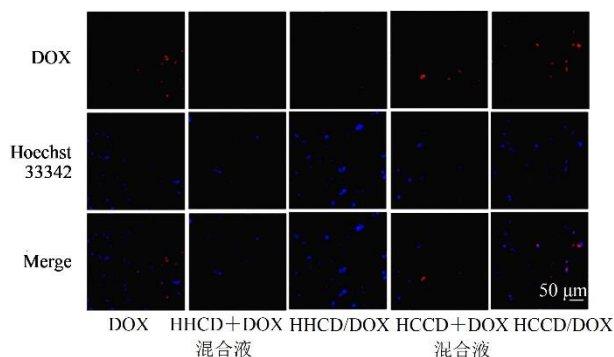


图 5 4 h 后 HepG-2 细胞对于各组药物中 DOX 的摄取

Fig. 5 HepG-2 cell uptake of DOX in each group after 4 h

HCCD/CEL 组 Col-I 表达显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01); 与 HHCD/CEL 组相比, HCCD/CEL 组 Col-I 表达显著降低 ($P<0.05$), 可能是 HCCD/CEL 在肿瘤环境的影响下发生结构剧烈变化, 药物能够迅速地在肿瘤部位释放产生较强的 Col-I 抑制作用。

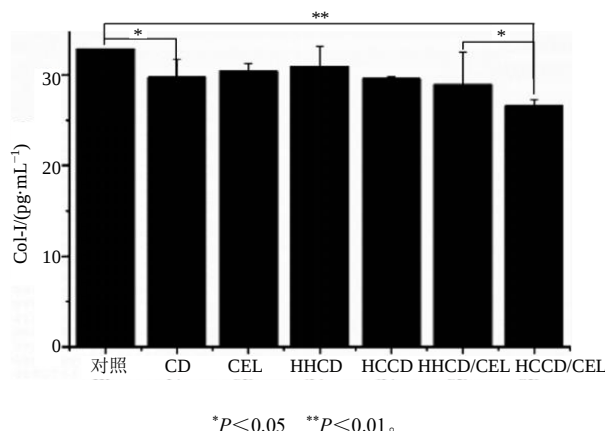


图 6 NIH-3T3 细胞分泌 Col-I 的定量分析 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 6 Quantitative analysis of Col-I secretion from NIH-3T3 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

小鼠胚胎成纤维细胞 NIH-3T3 中 TGF- β 1 的含量测定结果见图 7, 与对照组比较, CD、HHCD、HCCD、HHCD/CEL、HCCD/CEL 组的 TGF- β 1 含量显著下降 ($P<0.05$), HHCD/CEL 和 HCCD/CEL 聚合物胶束呈更强作用趋势。

3.5 荷瘤小鼠的肿瘤抑制实验结果

3.5.1 小鼠肿瘤体积的变化 不同聚合物胶束给药后小鼠肿瘤体积的变化如图 8、9 所示, 肿瘤的生长与时间有关, 与模型组比较, 给药组都体现出一定的抗肿瘤活性 ($P<0.001$)。游离 CD 组肿瘤体积增长缓慢可能是 CD 中的四唑环在内吞捕获过程中表现出缓冲作用, 导致细胞摄取后内体膜的迅速不

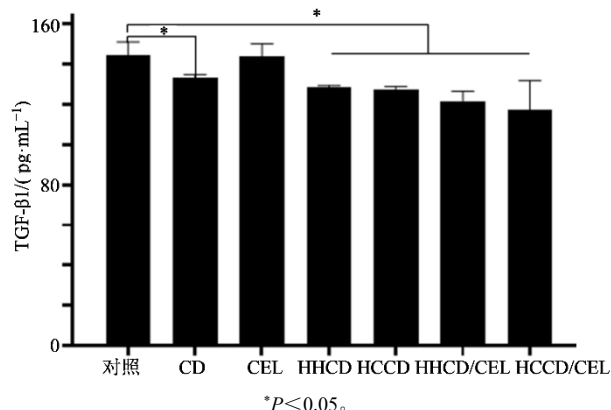


图 7 NIH-3T3 细胞分泌 TGF-β1 的定量分析 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 7 Quantitative analysis of TGF-β1 secretion from NIH-3T3 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

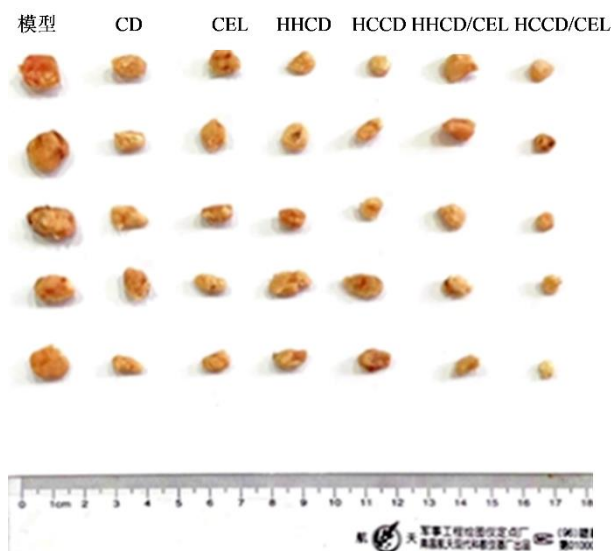


图 8 给药后各组的肿瘤照片

Fig. 8 Tumor photos of each group after administration
稳定和材料的有效内体逃逸。HHCD 和 HCCD 聚合物胶束可能由于制成纳米载体后增加了药物的生物利用度而产生更强的抗肿瘤活性。HCCD/CEL 胶束与 HHCD/CEL 胶束相比有更好的抗肿瘤活性 ($P<0.05$)，其原因可能是聚合物胶束的优势延长了药物在体内的时间，并通过高渗透滞留(EPR)效应增加药物在肿瘤蓄积；再者就是聚合物胶束在肿瘤部位快速释放，增强细胞对于 CEL 的摄取而提高药物对肿瘤细胞的损伤。

3.5.2 肿瘤组织 Col-I 含量的测定 如图 10 所示，与模型组比较，HCCD/CEL 组 Col-I 含量显著降低 ($P<0.001$)；且 HCCD/CEL 组 Col-I 含量显著低于 HHCD/CEL 组 ($P<0.01$)，HHCD 组 Col-I 含量显

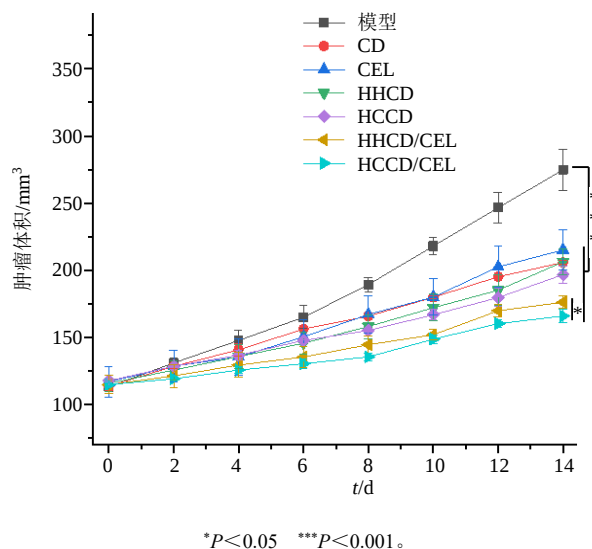


图 9 肿瘤体积变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Fig. 9 Changes in tumor volume ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

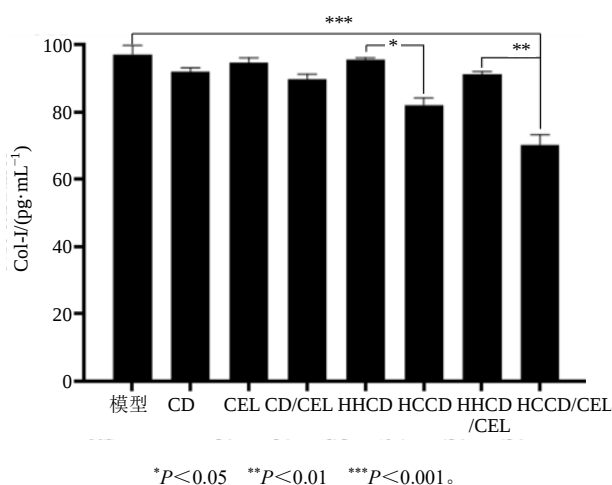


图 10 各给药组肿瘤组织中 Col-I 的含量 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 10 Col-I content in tumor tissues of each treatment group ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

著低于 HCCD 组 ($P<0.05$)。可能是 HCCD/CEL 在肿瘤环境的影响下发生结构剧烈变化，药物能够迅速地在肿瘤部位释放产生较强的 Col-I 抑制作用，这与 NIH-3T3 小鼠胚胎成纤维细胞分泌 Col-I 的定量分析一致。

TGF-β1 是公认的促纤维化核心因子，在肿瘤微环境中，其高表达与肿瘤相关成纤维细胞 (CAFs) 活化、细胞外基质沉积、免疫抑制及肿瘤进展密切相关。因此，降低肿瘤组织中的 TGF-β1 水平，对于抑制肿瘤相关纤维化、改善药物渗透及抗肿瘤免疫均有潜在积极意义。各给药组肿瘤组织中 TGF-β1 的含量测定结果见图 11，与模型组比较，HCCD/

CEL 组 Col-I 含量显著降低 ($P < 0.001$); 且 HCCD/CEL 组 Col-I 含量显著低于 HHCD/CEL 组 ($P < 0.01$), HHCD 组 Col-I 含量显著低于 HCCD 组 ($P < 0.05$)。首先可能是由于载药的前药聚合物材料的纳米性质,使肿瘤细胞更易于摄取聚合物胶束,其次可能是 CEL 可通过作用于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 降低 CAFs 水平,进而抑制 NIH-3T3。

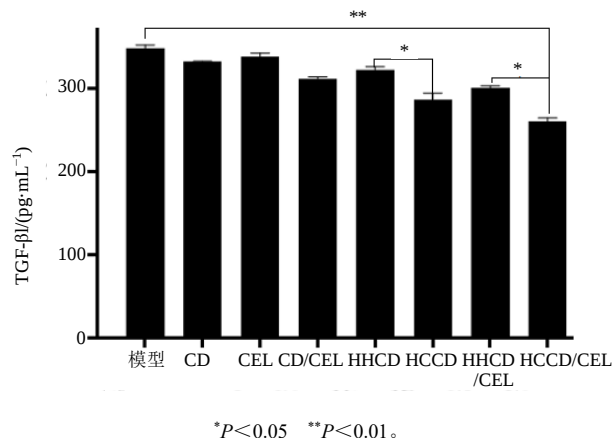


图 11 各给药组肿瘤组织中 TGF-β1 的含量 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 11 Content of TGF-β1 in tumor tissues of each drug administration group ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

3.5.3 小鼠的体质量及存活率 不同给药组小鼠的体质量变化如图 12 所示,在 14 d 内模型组小鼠在给药过程中,体质量逐渐增加,游离 CD 和 CEL、HHCD、HCCD、HHCD/CEL、HCCD/CEL 聚合物胶束组体质量下降,说明聚合物胶束具有一定抗肿瘤效果,各给药组之间没有显著差异。

小鼠给药 14 d 后的存活率如图 13 所示,HHCD、HCCD、HHCD/CEL、HCCD/CEL 组小鼠的存活率为 100%,证明制备的聚合物胶束具有较好的安全性。

4 讨论

本研究选用人正常肝细胞 HL-7702 作为毒性评价模型,旨在严谨评估坎地沙坦-雷公藤红素共载纳米胶束(以下简称共载胶束)对正常组织的潜在影响。该细胞在关键代谢酶(如 CYP450)的表达与活性上与人正常肝组织高度相似,故其对外源性化合物所致肝毒性的预测更具生理相关性与可靠性^[16]。在药效评价方面,本研究选用人肝癌细胞 HepG-2,主要基于以下考量:(1) HepG-2 是肝癌研究领域的经典模型,其生物学特性已得到充分验证^[17-18];(2) 该细胞系与正常肝细胞 HL-7702 在代谢谱、氧化应激响应等方面存在系统性差异,为评价药物对肿瘤

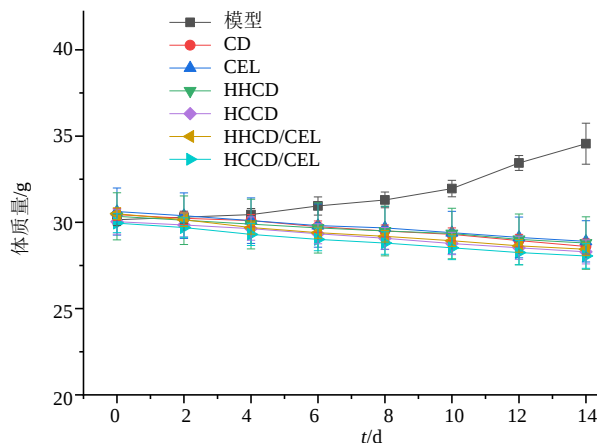


图 12 各组小鼠体质量变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Fig. 12 Changes in body weight of each group of mice ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

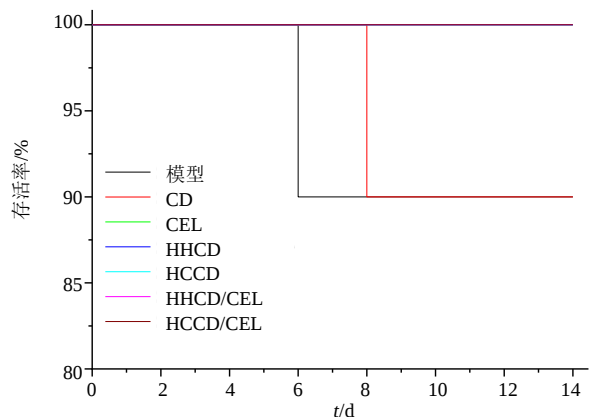


图 13 各组小鼠存活率

Fig. 13 Survival rates of each group of mice

细胞的选择性毒性提供了理想对照^[19-21];(3) HepG-2 细胞固有的高还原性微环境特征,尤其适用于验证本研究设计的还原敏感型胶束的智能化释药行为^[22]。通过整合 HL-7702 的毒性数据与 HepG-2 的药效数据,得以系统评价该共载胶束的治疗窗口与安全性。

基于上述“正常-肿瘤”对比模型,实验结果表明,共载胶束对正常肝细胞 HL-7702 表现出良好的生物相容性;而在肝癌细胞 HepG-2 中,胶束能响应肿瘤细胞内的高还原性微环境触发释药,从而展现出显著增强的细胞毒性。这一差异化效应不仅证实了胶束对肿瘤组织的选择性靶向能力,也间接印证了其依赖于肿瘤内高谷胱甘肽水平的刺激响应性释药机制。此外,2 种细胞在代谢与应激响应方面的内在差异也为深入阐释药物作用的选择性提供了理论依据。

需要注意的是肿瘤的进展与转移常伴随其微环境的动态重塑。有研究指出,多种损伤因素可导致 TGF- β 1 的大量分泌,后者进一步刺激肝星状细胞及肝细胞(包括 HepG-2)合成并过量沉积 Col-I。Col-I 的异常累积致使肿瘤基质硬化,而硬化的基质又可通过整合素-细胞骨架等机械力信号通路反馈激活潜在的 TGF- β 1,由此形成“TGF- β 1 $\rightarrow$ Col-I 沉积 $\rightarrow$ 基质硬化 $\rightarrow$ TGF- β 1 再激活”的自我放大环路,持续驱动纤维化及肿瘤恶性进展。在肝癌微环境中,TGF- β 1 是诱导上皮-间质转化的关键因子,可显著增强癌细胞的迁移与侵袭能力;而异常的 Col-I 基质不仅为这一过程提供了物理支架,其降解片段还能与癌细胞相互作用,进一步传递促迁移信号。已有研究证实,在肝细胞癌中,Col-I 降解酶 MMP-8 与 TGF- β 1 的表达呈显著正相关,二者可通过 PI3K/Akt/Rac1 等信号通路相互激活,协同促进肿瘤侵袭转移,且与患者不良预后密切相关^[23]。

基于此,本研究的评价维度不仅限于评价胶束的直接细胞毒性,更进一步通过 ELISA 定量检测细胞上清中 Col-I 与 TGF- β 1 的含量,旨在直接量化胶束干预下纤维化活性或 TGF- β 1 信号通路的改变。同时,通过检测胶束对小鼠胚胎成纤维细胞(NIH-3T3)分泌 Col-I 及 TGF- β 1 的影响,本研究尝试从“调控肿瘤微环境”的视角探索其潜在疗效。若实验证实该递药系统能有效下调上述关键因子,则预示着其具备软化肿瘤基质、促进药物深度渗透及抑制肿瘤转移的多重潜力。这将使本研究从传统的“杀伤肿瘤细胞”层面,提升至“系统干预肿瘤生态”的新高度,不仅为后续动物实验提供关键体外证据,也为开发兼具抗纤维化与抗肝癌效应的联合治疗策略奠定理论基础。

在体内研究层面,本研究构建了小鼠的肝癌模型,通过隔天尾 iv 方式给药,并根据小鼠肿瘤体积变化,考察 4 种聚合物胶束的体内抗肿瘤活性,通过 ELISA 定量测定各给药组肿瘤组织中 Col-I 与 TGF- β 1 的含量,结果显示聚合物胶束 HCCD/CEL(即共载胶束)具有较好的肿瘤抑制效果。同时,基于小鼠存活率的安全性评价显示,四种聚合物胶束的小鼠存活率在 90%以上,初步证实了其良好的安全性。考虑到 CEL 的细胞毒性,本研究选取游离 CEL 给药量较低(2 mg $\cdot$ kg⁻¹),且从现有数据中并未发现明显毒性,但该结果仍不足以全面评估胶束载药体系的安全性。因此,课题组后续计划通过小

鼠组织 HE 染色实验进行更深入的验证;探索并对比中高剂量游离药物与聚合物胶束的抗肿瘤活性及组织影响,通过系统比较不同剂量下的小鼠组织切片及免疫组化数据,进一步综合评价该聚合物胶束的安全性及其潜在的抗纤维化作用,以期为此递药系统的后续临床转化提供更为充分的实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Ye X Y, Fang X Z, Li F F, et al. Targeting TIME in advanced hepatocellular carcinoma: Mechanisms of drug resistance and treatment strategies [J]. Crit Rev Oncol, 2025, 211: 104735.
- [2] Lu W, Li Z Y, Pan C, et al. Optimal sequencing of locoregional and systemic therapies for intermediate and advanced hepatocellular carcinoma: A network Meta-analysis [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2025, 151(6): 196.
- [3] 郭娜,高志棣.不可切除肝癌综合治疗的研究进展[J].青岛大学学报(医学版),2024,60(4):623-626.
Guo N, Gao Z D. Research advances in comprehensive treatment of unresectable hepatocellular carcinoma [J]. J QingDao Univ Med Sci, 2024, 60(4): 623-626.
- [4] Zhu F, Yao W, Huang Y, et al. Candesartan induces tumor vascular normalization to improve the efficacy of radiotherapy in the therapeutic window. Ann Transl Med. 2022;10(10):581.
- [5] 倪爱丹,徐婷婷,顾露茵,等.坎地沙坦诱导肿瘤血管正常化增强阿霉素抗肿瘤作用研究[J].中国现代应用药学,2021,38(5):555-559.
Ni A D, Xu T T, Gu L N, et al. Study on tumor blood vessel normalization to enhance the antitumor effect of adriamycin induced by candesartan [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2021, 38(5): 555-559.
- [6] Wang X J. Celastrol protects against diabetic nephropathy by modulating immune-related pathways: A bioinformatics and experimental validation [J]. Am J Transl Res, 2025, 17(4): 2467-2483.
- [7] Zheng Z, Yan G R, Xi N Y, et al. Triptolide induces apoptosis and autophagy in cutaneous squamous cell carcinoma via Akt/mTOR pathway [J]. Anti Cancer Agents Med Chem, 2023, 23(13): 1596-1604.
- [8] 范若兰,陈海兰,赖斌,等.雷公藤红素靶向抑制 STAT3 抗结直肠癌的机制[J].中国药理学通报,2022,38(11):1673-1680.
Fan R L, Chen H L, Lai B, et al. Celastrol exerts anti-colorectal cancer effect via STAT3 inhibition [J]. Chin Pharmacol Bull, 2022, 38(11): 1673-1680.

- [9] Huang T T, Wang Y A, Shen Y P, et al. Preparation of high drug-loading celastrol nanosuspensions and their anti-breast cancer activities *in vitro* and *in vivo* [J]. *Sci Rep*, 2020, 10: 8851.
- [10] Srivastava D, Fatima Z, Kaur C D, et al. Pharmaceutical cocrystal: A novel approach to tailor the biopharmaceutical properties of a poorly water soluble drug [J]. *Recent Pat Drug Deliv Formul*, 2019, 13(1): 62-69.
- [11] Aly U F, Sarhan H A, Ali T F, et al. Applying different techniques to improve the bioavailability of candesartan cilexetil antihypertensive drug [J]. *Drug Des Dev Ther*, 2020, 14: 1851-1865.
- [12] 李禄辉, 郭允, 余文洁, 等. 坎地沙坦-雷公藤红素共载还原敏感胶束的制备及制剂学评价 [J]. *药物评价研究*, 2025, 48(6): 1557-1567.
- Li L H, Guo Y, Yu W J, et al. Formulation and assessment of pharmaceutical properties of candesartancelastrol co-loading reduction sensitive micelles [J]. *Drug Eval Res*, 2025, 48(6): 1557-1567.
- [13] Liu Q, Chen F Q, Hou L, et al. Nanocarrier-mediated chemo-immunotherapy arrested cancer progression and induced tumor dormancy in desmoplastic melanoma [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(8): 7812-7825.
- [14] Lukyanov AN, Hartner WC, Torchilin VP. Doxorubicin as a molecular nanotheranostic agent: effect of doxorubicin encapsulation in micelles or nanoemulsions on the ultrasound-mediated intracellular delivery and nuclear trafficking [J]. *Mol Pharm*, 2010, 8(2): 389-397.
- [15] 张唯唯, 刘小铜, 杨林星, 等. 载雷公藤红素结肠靶向-酶敏感纳米粒的制备、表征及药效学研究 [J]. *中草药*, 2024, 55(11): 3635-3646.
- Zhang W W, Liu X T, Yang L X, et al. Preparation, characterization, and pharmacodynamic study of colon-targeted enzyme-sensitive nanoparticles loaded with tripterine [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2024, 55(11): 3635-3646.
- [16] Xiang P, He R W, Liu R Y, et al. Cellular responses of normal (HL-7702) and cancerous (HepG2) hepatic cells to dust extract exposure [J]. *Chemosphere*, 2018, 193: 1189-1197.
- [17] Stockwell B R, Friedmann Angeli J P, Bayir H, et al. Ferroptosis: A regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease [J]. *Cell*, 2017, 171(2): 273-285.
- [18] Schicht G, Seidemann L, Haensel R, et al. Critical investigation of the usability of hepatoma cell lines HepG2 and Huh7 as models for the metabolic representation of resectable hepatocellular carcinoma [J]. *Cancers*, 2022, 14(17): 4227.
- [19] 张猛. mTORC1 和 mTORC2 在人肝细胞氨基酸代谢关键酶表达中的调控作用 [D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2019.
- Zhang M. The regulatory role of mTORC1 and mTORC2 in the expression of key enzymes involved in amino acid metabolism in human hepatocytes [D]. Hohhot: Inner Mongolia University, 2019.
- [20] 周婉丽. 以大豆油为载体的 PAH4 对肝细胞的氧化应激效应与联合毒性研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2023.
- Zhou W L. Study on the oxidative stress effects and combined toxicity of pah4 on hepatocytes using soybean oil as a carrier [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2023.
- [21] Sheng Z G, Shen C, Fan R M, et al. The critical role of X chromosome-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) in differential synergism induced by pentachlorophenol and copper-1, 10-phenanthroline complex in normal and cancer liver cells [J]. *Toxicol Sci*, 2018, 168: 339-348.
- [22] Liu G, Zhou W, Zhang X, et al. Toxicity and oxidative stress of HepG2 and HL-7702 cells induced by PAH4 using oil as a carrier [J]. *Food Res Int*, 2024, 178: 113988.
- [23] 覃贵慧. MMP-8 与 TGF- β 1 的相互激活诱导肝细胞肝癌上皮间质化及恶性进展的研究 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2016.
- Qin G H. Study on the mutual activation of MMP-8 and TGF- β 1 inducing epithelial-mesenchymal transition and malignant progression of hepatocellular carcinoma [D]. Nanning: Guangxi Medical University, 2016.

[责任编辑 兰新新]