

大麻二酚-羟丙基壳聚糖-油酸纳米胶束的制备及体外抗肿瘤活性

李睿¹, 武稚娟¹, 路丽艳¹, 田湘涵¹, 陈志豪¹, 曾诗琴¹, 陈珏¹, 王颖莉², 阮文辉^{3*}

1. 山西中医药大学 中药与食品工程学院, 山西 晋中 030619

2. 山西中医药大学 实验管理中心, 山西 晋中 030619

3. 山西省药品审评中心(山西省医药与生命科学研究院), 山西 太原 030006

摘要: **目的** 通过接枝反应将油酸(OA)修饰于羟丙基壳聚糖(HPCS)分子链, 合成 HPCS/OA 聚合物载体, 制备大麻二酚纳米胶束(CBD-HPCS/OA-NMs), 并研究其抗肿瘤活性。**方法** 以粒径、多分散系数(PDI)、Zeta 电位为评价指标, 采用单因素实验筛选 HPCS/OA 空白纳米胶束的制备方法, 通过核磁共振氢谱(¹H-NMR)、傅里叶红外光谱(FT-IR)表征其结构, 并测定其临界胶束浓度(CMC)。采用透析法制备 CBD-HPCS/OA-NMs, 测定其粒径、PDI、Zeta 电位、包封率、载药量、溶解度等关键理化性质; 通过透射电镜(TEM)观察其形貌; 评价胶束在模拟生理环境与细胞培养环境中的体外稳定性, 以及体外释药行为; 通过溶血性实验考察生物安全性, CCK-8 法评估 CBD-HPCS/OA-NMs 对 SKOV3 卵巢癌细胞的增殖抑制作用; 借助荧光显微镜分析 SKOV3 细胞对 CBD-HPCS/OA-NMs 的摄取情况; 通过细胞划痕实验考察 CBD-HPCS/OA-NMs 对 SKOV3 细胞迁移能力的影响, 初步阐明其抗肿瘤作用。**结果** 成功合成 HPCS/OA 聚合物载体, 其最优处方工艺为: OA 用量 0.6 mL、反应时间 6 h、反应温度 60 °C, 此条件下制备的 HPCS/OA 空白纳米胶束 CMC 为 0.010 2 mg·mL⁻¹。透射电镜下 CBD-HPCS/OA-NMs 呈规则球形, 粒径、PDI、Zeta 电位分别为 (194.80±1.2) nm、0.27±0.01、(39.13±3.46) mV, 包封率为 (72.85±0.37)%, 载药量为 (29.14±0.21)%, 其在水中的溶解度为 290 μg·mL⁻¹, 相较于游离 CBD 提高了近 743 倍; 稳定性实验结果表明, CBD-HPCS/OA-NMs 在模拟生理与细胞培养环境中储存 168 h 粒径均无显著变化 ($P>0.05$), 提示胶束稳定性良好; 溶血性实验结果表明 CBD-HPCS/OA-NMs 有较小的溶血率, 生物相容性好; CCK-8 结果显示, HPCS/OA 空白纳米胶束无细胞毒性, 给药 24 h 后 CBD-HPCS/OA-NMs 对 SKOV3 细胞的半数抑制浓度(IC₅₀)为 8.51 μg·mL⁻¹; 荧光显微镜观察证实, SKOV3 细胞对 CBD-HPCS/OA-NMs 的摄取效率显著强于游离 CBD; 细胞划痕实验表明, CBD-HPCS/OA-NMs 对 SKOV3 细胞迁移的抑制效果显著优于游离 CBD ($P<0.05$)。**结论** 制备的 CBD-HPCS/OA-NMs 能有效改善 CBD 的水溶性与稳定性, 兼具良好生物安全性与体外抗肿瘤活性。

关键词: 羟丙基壳聚糖; 油酸; 大麻二酚; 聚合物胶束; SKOV3 细胞; 水溶性; 细胞摄取; 细胞迁移; 抗肿瘤

中图分类号: R979.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2025)11-3226-13

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.11.015

Preparation and *in vitro* anti-tumor activity of cannabidiol-hydroxypropyl chitosan-oleic acid nanomicelles

LI Rui¹, WU Zhijuan¹, LU Liyan¹, TIAN Xianghan¹, CHEN Zhihao¹, ZENG shiqin¹, CHEN Jue¹, WANG Yingli², RUAN Wenhui³

1. College of Traditional Chinese Medicine and Food Engineering, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

2. Experimental Management Center, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

3. Shanxi Center of Drug Evaluation (Shanxi Institute of Medicine and Life Science), Taiyuan 030006, China

Abstract: Objective Oleic acid (OA) was modified onto the hydroxypropyl chitosan (HPCS) molecular chain through grafting reaction to synthesize the HPCS/OA polymer carrier. Cannabidiol nanomicelles (CBD-HPCS/OA-NMs) were prepared and their anti-tumor activities were studied. **Methods** Taking particle size, polydispersity index (PDI), and Zeta potential as evaluation indicators, the preparation method of blank nanomicelles of HPCS/OA was screened by single-factor experiments. Its structure was characterized

收稿日期: 2025-07-15

基金项目: 山西省应用基础研究计划项目(201801D221278); 企业横向项目(2022-05); 中药药剂学学科经费项目(2025XK35)

作者简介: 李睿(1979—), 女, 硕士, 副教授, 从事天然成分新型载药体系研究。E-mail: 46116288@qq.com

*通信作者: 阮文辉, 博士, 高级工程师, 从事天然成分新型载药体系研究。E-mail: 24730890@qq.com

by nuclear magnetic resonance hydrogen spectroscopy ($^1\text{H-NMR}$) and fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), and its critical micelle concentration (CMC) was determined. CBD-HPCS/OA-NMs was prepared by dialysis method, and its key physicochemical properties such as particle size, PDI, Zeta potential, encapsulation efficiency, drug loading and solubility were determined. The morphology was observed by transmission electron microscope (TEM). The *in vitro* stability and drug release of micelles in simulated physiological and cell culture environments were evaluated. The biological safety was investigated through hemolytic experiments. The inhibitory effect of CBD-HPCS/OA-NMs on the SKOV3 ovarian cancer cells was evaluated by the CCK-8 method. The uptake of CBD-HPCS/OA-NMs by SKOV3 cells was analyzed by fluorescence microscopy. The effect of CBD-HPCS/OA-NMs on the migration ability of SKOV3 cells was investigated through cell scratch assay, and its anti-tumor effect was preliminarily clarified.

Results The HPCS/OA polymer carrier was successfully synthesized. The optimal prescription process is as follows: OA dosage 0.6 mL, reaction time 6 h, and reaction temperature $60\text{ }^\circ\text{C}$. The CMC of HPCS/OA blank nanomicelles prepared under this condition was $0.010\text{ }2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. The CBD-HPCS/OA-NMs showed a regular spherical shape under TEM. The particle size, PDI and Zeta potential were $(194.80 \pm 1.2)\text{ nm}$, 0.27 ± 0.01 and $(39.13 \pm 3.46)\text{ mV}$, respectively. The encapsulation efficiency was $(72.85 \pm 0.37)\%$, and the drug loading was $(29.14 \pm 0.21)\%$. Its solubility in water is $290\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, which is 743 times higher than that of free CBD. Stability test results showed that CBD-HPCS/OA-NMs had no significant change in particle size after 168 h storage in simulated physiological and cell culture environment ($P > 0.05$), indicating good stability of micelles. The hemolytic test results indicated that CBD-HPCS/OA-NMs had a relatively low hemolysis rate and good biocompatibility. The CCK-8 results showed that the blank nanomicelles of HPCS/OA had no cytotoxicity. The median inhibitory concentration (IC_{50}) of CBD-HPCS/OA-NMs on SKOV3 cells was $8.51\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ after 24 h of administration. Fluorescence microscopy observation confirmed that the uptake efficiency of CBD-HPCS/OA-NMs by SKOV3 cells was significantly stronger than that of free CBD. The cell scratch assay indicated that the inhibitory effect of CBD-HPCS/OA-NMs on the migration of SKOV3 cells was significantly better than that of free CBD ($P < 0.05$). **Conclusion** The CBD-HPCS/OA-NMs prepared in this study can effectively improve the water solubility and stability of CBD, and has both good biological safety and *in vitro* anti-tumor activity.

Key words: hydroxypropyl chitosan; oleic acid; cannabidiol; polymer micelles; SKOV3 cells; water solubility; cell uptake; cell migration; anti-tumor

桑科植物大麻 *Cannabis sativa* L. 是兼具经济价值与药用历史的重要作物, 其药用记载最早见于《神农本草经》, 后续在《证类本草》《本草纲目》等多部中医药经典古籍中均有记载, 具有补中益气、致幻、镇痛等功效^[1-2]。大麻二酚 (CBD) 是大麻素中的活性成分, 具有多种生物活性且无精神依赖性 & 成瘾性, 具有低毒性、高安全性的特点^[3]。研究表明, CBD 具有丰富的药理活性, 包括抗肿瘤、抗癫痫、免疫调节、镇痛、抗氧化、抗惊厥、抗焦虑等^[4-7], 因此在新药研发、保健品及化妆品领域的应用开发中备受关注。

美国华盛顿大学健康数据和评估研究所 (IHME) 2019 年发布的全球死因和疾病负担的统计数据显示, 肿瘤是全球及中国排名第 2 大死因: 在全球的死因构成中占比 17.83%, 在我国占比更是高达 25.50%^[8]。在此背景下, CBD 的抗肿瘤活性受到越来越多的关注。临床前研究证实, CBD 可通过多重机制抑制恶性肿瘤进展, 包括促进细胞凋亡和自噬、引起细胞周期阻滞、调节肿瘤微环境、调控相关受体表达等, 进而抑制卵巢癌、

乳腺癌、胶质瘤等多种肿瘤细胞的增殖、侵袭、转移及血管生成^[9-12]。

尽管欧美地区已上市 CBD 口腔喷雾剂、口服溶液等制剂, 用于缓解癌症相关疼痛, 但 CBD 自身存在水溶性差、生物利用度低、稳定性不佳等问题, 严重限制了其临床应用与制剂开发^[13]。因此, 研发 CBD 新型给药系统以突破上述瓶颈, 具有重要的学术价值与应用前景。

近年来纳米胶束受到广泛关注, 具有制备过程简单、生物利用度高、释放缓慢、靶向病灶、增加药物溶解度等优点, 且具有适合规模化生产等优势, 成为给药系统研究的重点方向, 为 CBD 给药难题的解决提供了新思路。羟丙基壳聚糖 (HPCS) 是壳聚糖的改性形式, 与传统壳聚糖相比, 其具有更好的溶解性、稳定性和生物相容性, 在医学、生物医学和材料领域显示出巨大应用潜力^[14]。油酸 (OA) 是一种天然存在的饱和脂肪酸, 以甘油酯的形式存在于动植物油脂中, 其分子结构由双亲碳链和羧基构成, 羧基头基的存在赋予其良好的自组装活性^[15-16]。在纳米胶束构建中, HPCS 作为亲水

性片段可构成胶束的壳层结构,既能提高药物水溶性,又能延长药物体内循环时间;OA 作为疏水性片段可形成胶束的内核结构,用于包载难溶性药物以避免药物与外界环境接触,二者协同实现药物的高效负载与稳定递送。

人卵巢癌细胞 SKOV3 是肿瘤发生机制研究及抗癌药物疗效评价的经典模型细胞^[17]。基于此,本研究以羟丙基壳聚糖/油酸(HPCS/OA)为载体,采用透析法制备大麻二酚纳米胶束(CBD-HPCS/OA-NM_s)并对其理化性质进行系统表征;同时以 SKOV3 细胞为研究对象开展体外抗肿瘤活性评价,旨在为 CBD 抗肿瘤制剂的研发提供实验参考与理论依据。

1 材料

1.1 试剂

CBD(质量分数 98%,批号 Yz090825),南京源植生物科技有限公司;HPCS(质量分数 98%,批号 LZ-060805),陕西林洲生物科技有限公司;1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC,质量分数 98.5%,批号 C17131829)、OA(批号 C15072198)、苾(批号 C12790936),上海麦克林生化科技有限公司;透析袋(截留相对分子质量 $8 \times 10^3 \sim 1.4 \times 10^4$,批号 409C021),金客隆(北京)生物技术有限公司;磷酸盐缓冲溶液(PBS,批号 P1020),北京索莱宝科技有限公司;RPMI 1640 培养基(批号 WHB825X101),武汉普诺赛生命科技有限公司;CCK-8 试剂盒(批号 MA2018-2-Dec-23G),Boster 公司;Hoechst 33342 染色液(批号 A035250114),上海碧云天生物技术有限公司;胰酶消化液(批号 BL501A),北京兰杰柯科技有限公司。

1.2 仪器

B13-3 智能恒温定时磁力搅拌器,上海司乐仪器有限公司;BSA224S 电子天平,德国 Sartorius 公司;Waters e2695 高效液相色谱仪,沃特世科技(上海)有限公司;LGJ-10C 冷冻干燥机,四环福瑞科仪科技发展(北京)有限公司;ZEN 3600 马尔文激光粒度仪,上海林理科技有限公司;NICOLETIS10 傅里叶变换红外光谱仪,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;JNM-ECZ600R 型核磁共振氢谱仪,日本 JEOL 公司;KQ-300E 超声波清洗机,昆山市超声仪器有限公司;759S 紫外分光光度计,上海棱光技术有限公司。

1.3 细胞

SKOV3 卵巢癌细胞(批号 277802)购自中国医学科学院上海细胞研究所。

1.4 动物

雌性 Balb/c-nu 裸鼠(SPF 级),4~5 周龄,体质量 (18 ± 2) g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,动物许可证号 SCXK(京)2024-0001,实验经山西中医药大学动物实验伦理审查委员会批准(伦理批号 AWE202503106)。

2 方法与结果

2.1 HPCS/OA 空白纳米胶束的制备

称取 2 g HPCS 溶解于 90 mL 纯水中备用;取适量体积 OA 和 1.90 g EDC,与 60 mL 无水乙醇混合均匀,缓慢滴入 HPCS 水溶液中,于适宜温度下反应一定时间。反应结束后,将反应液用纯水透析处理 2 d,透析液经冷冻干燥,即得 HPCS/OA 聚合物。精确称取 8 mg HPCS/OA 聚合物粉末溶解于 10 mL 纯水中,搅拌,冰浴超声 15 min,经 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,滤液冻干得 HPCS/OA 空白纳米胶束粉末。

2.2 临界胶束浓度(CMC)的测定

采用苾-丙酮法测定样品的 CMC^[18]。配制 $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 苾-丙酮储备液,加入系列质量浓度 $(0.0001 \sim 0.1000 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1})$ HPCS/OA 水溶液,使苾终浓度为 $6 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 涡旋振荡 6 min, 25°C 水浴超声(450 W、40 kHz) 40 min,室温下避光静置过夜,荧光分光光度计测定溶液中苾的荧光发射光谱(激发波长 334 nm,激发带宽和发射带宽分别为 10 nm 和 5 nm,扫描范围为 360~480 nm)记录 I_{373}/I_{393} ;以浓度(C)的对数值($\lg C$)为横坐标, I_{373}/I_{393} 为纵坐标作图,切线交点即为 CMC。

2.3 粒径、多分散系数(PDI)、Zeta 电位的测定

通过 ZEN 3600 马尔文激光粒度仪测定纳米胶束理化性质:超纯水稀释 HPCS/OA 空白纳米胶束至 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,混匀静置 5 min;测定条件: 25°C 、检测角度 173° 、平衡时间 120 s,平行测 3 次,记录粒径、PDI、Zeta 电位。

2.4 单因素筛选 HPCS/OA 空白纳米胶束的制备方法

纳米胶束的 CMC、粒径、PDI 和 Zeta 电位对递药系统的制剂稳定性、载药量及体内分布起到关键性作用^[19]。因此,本研究选择反应温度(40、50、

60、70、80 °C)、反应时间(4、5、6、7、8 h)、OA 投料量(0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 mL)分别制备 HPCS/OA 空白纳米胶束,考察其对 CMC、粒径、PDI 和 Zeta 电位指标的影响。

2.4.1 反应温度考察 固定反应时间 6 h, OA 用量 0.6 mL, 考察反应温度对 HPCS/OA 空白纳米胶束的影响,实验结果如表 1 所示。当温度由 40 °C 升至 80 °C 时,纳米胶束的粒径及 PDI 均先降低后升

高, Zeta 电位呈现先升高后降低的趋势,这可能是由于随着温度升高,分子的热运动加剧,导致分子间的相互作用力发生改变,进而对胶束的形成与稳定产生作用^[20]。当反应温度为 60 °C 时粒径最小、分散性最好、Zeta 电位的绝对值最大,此时 CMC 为 0.020 4 mg·mL⁻¹, 粒径为 (149.00±2.56) nm, PDI 为 0.27±0.03, Zeta 电位为 (40.56±1.60) mV, 有利于粒子的储存稳定^[21]。因此,选择反应温度为

表 1 反应温度对 HPCS/OA 空白纳米胶束的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Effect of reaction temperature on HPCS/OA blank nanomicelles ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

反应温度/°C	CMC/(mg·mL ⁻¹)	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
40	0.016 3	171.80±2.51	0.36±0.02	16.52±1.70
50	0.032 1	154.50±2.52	0.35±0.01	23.59±1.30
60	0.020 4	149.00±2.56	0.27±0.03	40.56±1.60
70	0.012 5	162.60±2.47	0.32±0.01	35.82±1.20
80	0.043 0	179.80±2.45	0.35±0.02	16.45±1.80

60 °C 进行后续实验。

2.4.2 反应时间考察 固定反应温度 60 °C, OA 用量 0.6 mL, 考察反应时间对 HPCS/OA 空白纳米胶束的影响,实验结果如表 2 所示。当反应时间由 4 h 升至 8 h 时,粒径、PDI、Zeta 电位变化趋势同反应温度对空白纳米胶束的影响。这可能是由于时间过短未反应完全,胶束性质不稳定;而当反应时间过长时,可能会引发过度聚合或者交联反应,导致胶束粒径偏大,稳定性降低^[22]。当反应时间为 6 h 时,粒径

和 PDI 最小, Zeta 电位绝对值最大,此时的 CMC 为 0.021 6 mg·mL⁻¹。因此选择最佳反应时间为 6 h。

2.4.3 OA 用量考察 固定反应温度 60 °C,反应时间 6 h,考察 OA 投料量对 HPCS/OA 空白纳米胶束的影响,实验结果如表 3 所示,各指标变化趋势与反应时间对 HPCS/OA 空白纳米胶束的影响一致。这可能是由于 OA 投料量低会导致胶束内核疏水作用不足,难以形成紧密内核,导致粒径较大,稳定性一般;而当 OA 投料量过高时,纳米胶束内核

表 2 反应时间对 HPCS/OA 空白纳米胶束的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Effect of reaction time on HPCS/OA blank nanomicelles ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

反应时间/h	CMC/(mg·mL ⁻¹)	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
4	0.031 4	175.00±2.47	0.34±0.03	29.17±1.30
5	0.025 3	162.50±2.42	0.15±0.01	29.22±1.60
6	0.021 6	161.20±2.41	0.13±0.02	36.55±1.20
7	0.032 5	207.00±2.46	0.18±0.03	36.22±1.40
8	0.043 6	225.50±2.49	0.20±0.02	34.50±1.30

表 3 OA 投料量对 HPCS/OA 空白纳米胶束的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 3 Effect of OA dosing rate on HPCS/OA blank nanomicelles ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

OA 投料量/mL	CMC/(mg·mL ⁻¹)	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
0.40	0.031 7	263.20±2.58	0.26±0.02	14.04±1.70
0.50	0.023 6	168.50±2.52	0.24±0.02	27.99±1.50
0.60	0.015 4	132.20±2.54	0.15±0.03	39.01±1.40
0.70	0.072 8	160.20±2.56	0.33±0.03	27.59±1.20
0.80	0.080 5	253.50±2.57	0.37±0.01	25.49±1.60

疏水作用过强,胶束易发生聚集或融合,导致粒径增大,且聚集程度不均使 PDI 显著升高^[23]。当 OA 投料量为 0.60 mL 时,纳米胶束的 CMC 为 $0.0154 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,粒径为 $(132.20 \pm 2.54) \text{ nm}$,PDI 为 0.15 ± 0.03 ,Zeta 电位为 $(39.01 \pm 1.40) \text{ mV}$ 。因此选择最优 OA 投料量为 0.6 mL。

2.5 HPCS-OA 空白纳米胶束的结构表征

2.5.1 FT-IR 分析 取适量的 OA、HPCS 及 HPCS/OA 聚合物粉末置于检测器上,经 NICOLETIS10 型傅里叶红外变换光谱仪进行红外光谱扫描,扫描范围为 $400 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$ 。结果如图 1 所示,与 HPCS 相比,HPCS/OA 聚合物的红外光谱图中 3373 cm^{-1} 处酰胺基团 ($-\text{CONH}$) 的 $-\text{NH}$ 基团伸缩振动峰信号增强, 1643 cm^{-1} 处出现酰胺基团 ($-\text{CONH}$) 的 $\text{C}=\text{O}$ 基团伸缩振动峰^[24], 2933 cm^{-1} 和 2850 cm^{-1} 处分别出现 OA 的 C-H 对称和不对称伸缩振动特征峰,证明 HPCS/OA 聚合物成功合成。

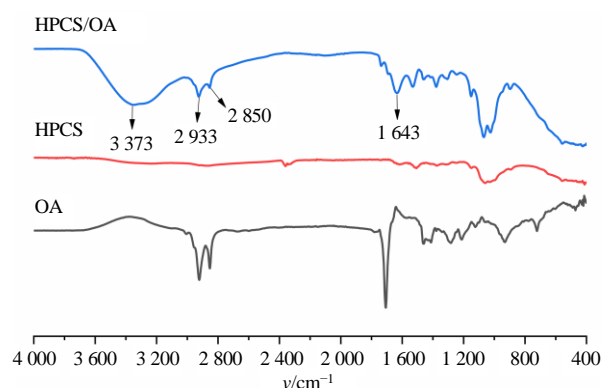


图 1 HPCS/OA 的 FI-IR 图谱
Fig. 1 FI-IR spectra of HPCS/OA

2.5.2 $^1\text{H-NMR}$ 分析 将 HPCS 及 HPCS/OA 聚合物分别溶于重水中,在核磁共振仪器中测试(工作频率 600 MHz)获得 $^1\text{H-NMR}$ 谱图。结果如图 2 所示, $\delta 1.06$ 处的质子峰归属于 HPCS 中存在环氧丙烷上 $-\text{CH}_3$ 的质子特征峰, $\delta 3.41$ 处的特征峰归属于 C-1 上的 H 质子, $\delta 3.26$ 处归属于 O-取代葡萄糖胺单元中 C-5 上的 H, $\delta 3.26 \sim 3.05$ 分别归属于 C-3、C-6、O-羟丙基中亚甲基上的 H, $\delta 3.05 \sim 2.73$ 分别归属于 O-羟丙基化糖单元中 C-6、C-2 和 C-4 上的 H^[25]。与 HPCS 相比,HPCS/OA 聚合物的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图中, $\delta 4.76$ 处出现了新的信号峰,归属于 OA 分子中烯基 ($-\text{CH}=\text{CH}-$) 上的 H,表明成功引入 OA 结

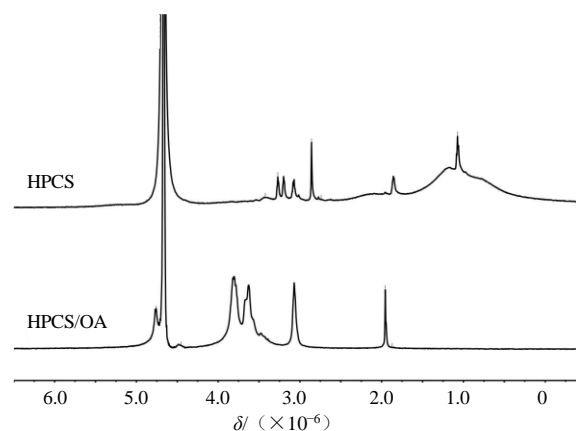


图 2 HPCS-OA 的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱
Fig. 2 $^1\text{H-NMR}$ spectra of HPCS-OA

构片段;此外,与 $-\text{NH}_2$ 连接的 C-2 以及邻近的 C-1、C-3 上的 H 化学位移显著向低场偏移,进一步提示发生了酰胺反应,证明 HPCS/OA 聚合物已成功合成。

2.5.3 CMC 的测定 按 OA 用量 0.6 mL、反应时间 6 h、反应温度 60°C 制备 HPCS/OA 空白纳米胶束,其 CMC 测定方法同“2.2”项。结果见图 3,通过对曲线进行分段线性拟合,获得两拟合直线交点对应的 CMC 值为 $0.0102 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,表明 HPCS-OA 空白纳米胶束在较低浓度下即可于水溶液中自发形成胶束,具有较好的稳定性。

2.6 CBD-HPCS/OA-NMs 的制备

称取 10 mg HPCS/OA 空白纳米胶束溶解于

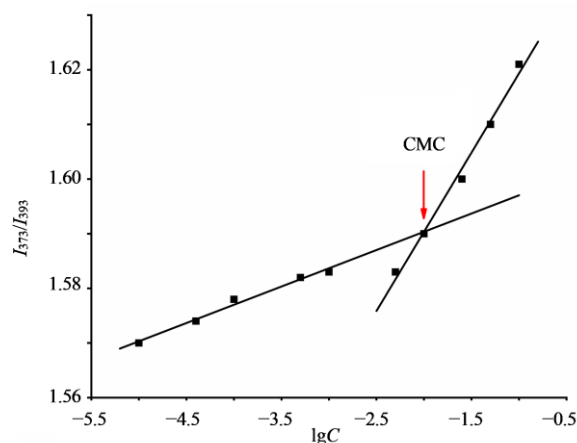


图 3 不同 HPCS-OA 浓度对应的 I_{373}/I_{393}
Fig. 3 I_{373}/I_{393} values corresponding to different HPCS/OA concentrations

10 mL 超纯水, 作为溶液①; 称取 5 mg CBD 溶于 10 mL 无水乙醇中, 得溶液②。将溶液②缓慢滴入溶液①中, 搅拌 6 h, 将混合溶液转移至透析袋(截留相对分子质量 $8 \times 10^3 \sim 1.4 \times 10^4$) 中, 超纯水透析 1 d, 冰浴超声(450 W、40 kHz) 15 min, 经 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 收集滤液, 即得 CBD-HPCS/OA-NMs, 滤液进一步经冻干得 CBD-HPCS/OA-NMs 粉末。

2.7 CBD 含量测定方法的建立

2.7.1 对照品溶液的制备 精密称取适量 CBD 溶解于乙腈中, 使样品的质量浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 即得对照品储备液。

2.7.2 供试品溶液的制备 分别精密称取 HPSCS/OA 空白纳米胶束与 CBD-HPCS/OA-NMs 粉末 1 mg 置于 10 mL 量瓶中, 加入 1 mL 纯水溶解后用乙腈定容, 即得空白纳米胶束供试品溶液和 CBD-HPCS/OA-NMs 供试品溶液。

2.7.3 色谱条件 采用 Athena C₁₈(250 mm×4.6 mm, $5 \mu\text{m}$) 色谱柱; 流动相为乙腈-0.1%甲酸(80:20); 检测波长 210 nm, 柱温 30°C , 体积流量 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样量 $20 \mu\text{L}$ 。

2.7.4 专属性考察 分别取 CBD 对照品储备液和 HPSCS/OA 空白纳米胶束溶液、空白溶剂、CBD-HPCS/OA-NMs 供试品溶液, 对照品储备液用乙腈进行稀释, 使 CBD 的质量浓度为 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。样品经 $0.22 \mu\text{m}$ 有机微孔滤膜滤过, 按“2.7.3”项下色谱条件进样, 记录色谱图, 结果见图 4。CBD 保留时间在 8.7 min, 空白纳米胶束和空白溶剂在此处

均无色谱峰, 不会对 CBD 测定造成干扰, 方法专属性强, 可满足检测需求。

2.7.5 线性关系考察 取“2.7.1”项下对照品储备液, 用乙腈依次稀释为 2、5、10、20、40、60、80、100、150 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 经 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 按“2.7.3”项色谱条件进样, 记录样品的峰面积。以药物质量浓度为横坐标, 以峰面积为纵坐标, 拟合 CBD 的线性回归方程为: $Y=159\,583 X+288\,834$, $r=0.997\,9$, 线性范围 $2 \sim 150 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.7.6 精密度考察 取“2.7.1”项下对照储备液适量, 用乙腈依次稀释, 使 CBD 的质量浓度分别为 5、20、50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜滤过, 按“2.7.3”项色谱条件进样, 重复进样 3 次, 连续 3 d, 根据峰面积与质量浓度的线性回归方程计算各质量浓度的测得值, 进而计算相对标准偏差(RSD)。CBD 的日内精密度 RSD 分别为 0.54%、0.66%、0.59%, 日间精密度 RSD 分别为 0.51%、0.80%、0.26%, 表明此方法精密度良好。

2.7.7 重复性考察 取“2.7.2”项下 CBD-HPCS/OA-NMs 供试品溶液($n=6$), 经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜滤过, 按“2.7.3”项色谱条件进样, 依据峰面积计算样品的质量浓度, 并计算 RSD 为 0.45%, 表明该方法重复性良好。

2.7.8 稳定性考察 取“2.7.2”项下 CBD-HPCS/OA-NMs 供试品溶液, 分别于室温下放置 0、2、4、6、8、10、12 h 取样, 经 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 按“2.7.3”项色谱条件进样分析, 计算样品的质量浓度及 RSD 值。计算得 CBD 峰面积的 RSD 均小于 2%, 结果表明, 供试品溶液在室温下 12 h 内稳定性良好。

2.7.9 加样回收率考察 取“2.7.2”项下供试品溶液 1 mL($n=9$, 对应 3 个浓度水平, 每个水平平行 3 份), 分别置于 10 mL 量瓶中, 取“2.7.1”项下对照品储备液适量, 用乙腈依次稀释为 5、20、50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 再分别精密量取 1 mL 上述不同质量浓度的对照品溶液, 对应加入 9 个供试品量瓶中, 加乙腈稀释至刻度并摇匀。将混合溶液经 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 按“2.7.3”项下色谱条件进样检测, 根据测得质量浓度与理论质量浓度计算各浓度水平的加样回收率及 RSD。结果显示, CBD 的加样回收率为 99.92%~101.80%, 各质量浓度水平 RSD 均小于 2%, 表明该分析方法准确度良好。

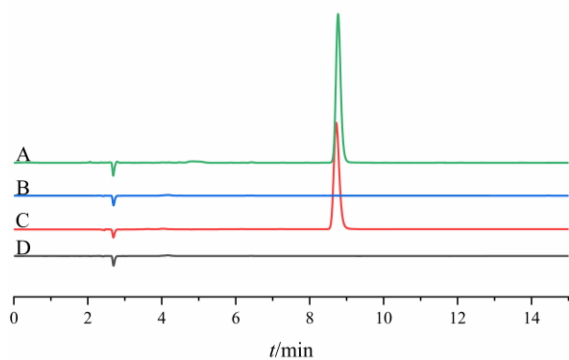


图 4 CBD 对照品溶液(A)、HPSCS/OA 空白纳米胶束溶液(B)、CBD-HPCS/OA-NMs 供试品溶液(C)、空白溶剂(D)的 HPLC 色谱图

Fig. 4 HPLC chromatograms of reference solution of CBD (A), blank HPSCS/OA nanomicelles solution (B), CBD-HPCS/OA-NMs solution (C), and blank solvent (D)

2.8 CBD-HPCS-OA-NMs 的粒径、PDI 和 Zeta 电位的测定

取 CBD-HPCS/OA-NMs 粉末,采用超纯水稀释成 $200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 按“2.3”项下方法测定粒径、PDI 和 Zeta 电位,结果如图 5 所示,制备的 CBD-HPCS/OA-NMs 平均粒径、PDI 及 Zeta 电位分别为 $(194.80\pm 1.20)\text{ nm}$ 、 0.27 ± 0.01 及 $(39.13\pm 3.46)\text{ mV}$ 。

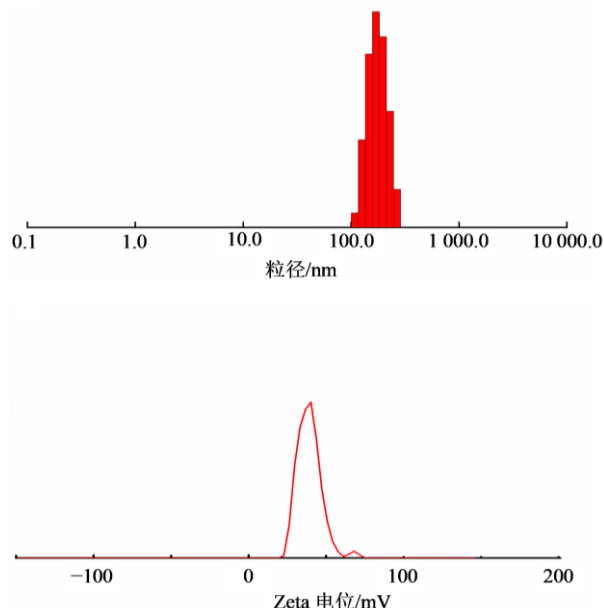


图 5 CBD-HPCS/OA-NMs 的粒径分布 (A) 和 Zeta 电位 (B) 分布

Fig. 5 Particle size distribution (A) and Zeta potential distribution(B) of CBD-HPCS/OA-NMs

2.9 CBD-HPCS-OA-NMs 包封率及载药量的测定

取适量 CBD-HPCS/OA-NMs 溶于 1 mL 纯水,加入 9 mL 乙腈,超声 (450 W、40 kHz) 30 min,经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,按“2.7.3”项下方法进样分析,记录峰面积,根据标准曲线方程计算 CBD 质量浓度,计算包封率为 $(72.85\pm 0.37)\%$,载药量为 $(29.14\pm 0.21)\%$ 。

载药量 = CBD-HPCS/OA-NMs 中 CBD 质量 / CBD-HPCS/OA-NMs 总质量

包封率 = CBD-HPCS/OA-NMs 中 CBD 质量 / 初始投入 CBD 质量

2.10 稳定性考察

精密移取 CBD-HPCS/OA-NMs 至西林瓶中,分别用 pH 7.4 的 PBS (模拟生理环境) 与含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基 (模拟细胞培养环境) 复溶,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中。分别于 0、2、4、6、8、12、24、48、72、168 h 取样,采用马尔文激光

粒度仪测定胶束粒径,每组平行测定 3 次。结果如图 6 所示,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温条件下,经 168 h 持续观察,CBD-HPCS/OA-NMs 在 pH 7.4 的 PBS 及含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中,粒径均无显著变化 ($P>0.05$)。结果表明, CBD-HPCS/OA-NMs 在模拟生理与细胞培养环境中均具有优异的体外稳定性,为后续细胞实验提供了可靠基础。

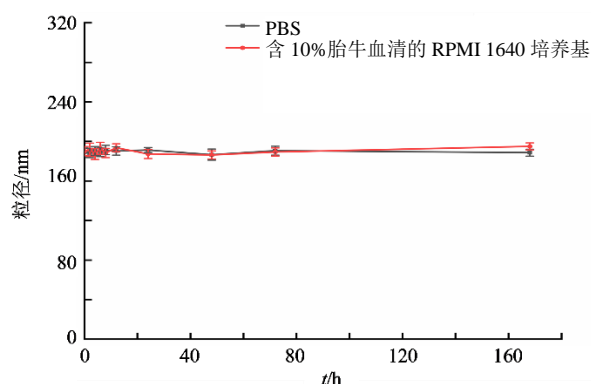


图 6 CBD-HPCS/OA-NMs 的稳定性 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 6 Stability of CBD-HPCS/OA-NMs ($\bar{x}\pm s, n=3$)

2.11 TEM 观察 CBD-HPCS/OA-NMs 外貌

取 CBD-HPCS/OA-NMs 粉末适量,用纯化水配制成质量浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,取适量滴于覆盖有碳膜的铜网上,室温静置挥干,滴加适量 2% 磷钨酸染色约 50 s,滤纸吸去残留液体,待铜网干燥后用 TEM 观察。结果如图 7 所示, CBD-HPCS/OA-NMs 形态规整,外观呈球形或类球形,分散均匀,粒径约 200 nm,与“2.8”项下的测定结果相近,这一现象可能与胶束不同的测量状态、TEM 分析样品时的制备过程、流体动力学直径的水合状态以及 2 种表征技术的原理差异有关^[26]。

2.12 体外释放考察

精密称取 CBD-HPCS/OA-NMs 粉末 2 mg 溶解于 1 mL 纯化水,转移至透析袋内 (截留相对分子

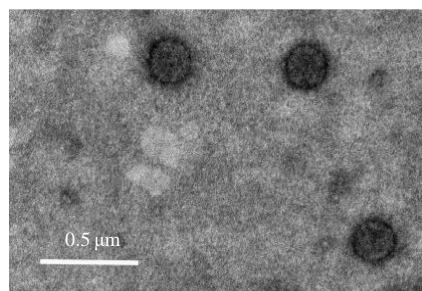


图 7 CBD-HPCS/OA-NMs 的 TEM 图

Fig. 7 TEM images of CBD-HPCS/OA-NMs

质量 $8 \times 10^3 \sim 1.4 \times 10^4$), 置于 20 mL pH 7.4 与 pH 5.4 的 PBS (含有 0.5% 聚山梨酯 80) 中, 37 °C、振荡速率 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 模拟药物体外释放。分别于 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0、24.0、48.0、72.0、96.0、120.0、144.0 h 时取出 1 mL 释放介质按“2.7.3”项色谱条件进行检测, 并补加 1 mL PBS。计算累积释放率 (E_r) [27]。

$$E_r = (V_e \sum_{i=1}^{n-1} C_i + V_0 C_n) / M_{\text{CBD}}$$

V_e 表示置换的缓冲液的体积; V_0 表示缓冲液总体积; C_i 表示第 i 次取样时样品浓度; M_{CBD} 表示混悬液中 CBD 的质量; n 表示置换缓冲液的次数

结果如图 8 所示, CBD-HPCS/OA-NMs 144 h 累积释放率分别为 33.8% (pH 7.4)、54.27% (pH 5.4), 无突释现象。在不同 pH 条件下, 其释药速度有差异, 说明 CBD-HPCS/OA-NMs 中 CBD 的体外释放具有 pH 敏感性。CBD-HPCS/OA-NMs 在 pH 为 5.4 的 PBS 中释放较快, 可能是由于胶束在偏酸性介质中 HPCS/OA 聚合物分子中的氨基 ($-\text{NH}_2$) 发生质子化, 分子结构变得疏松, 孔隙率增大, 药物分子更容易通过载体的孔隙扩散到外部溶液中[26,28]。

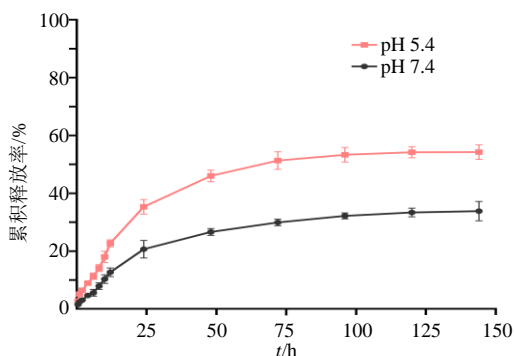
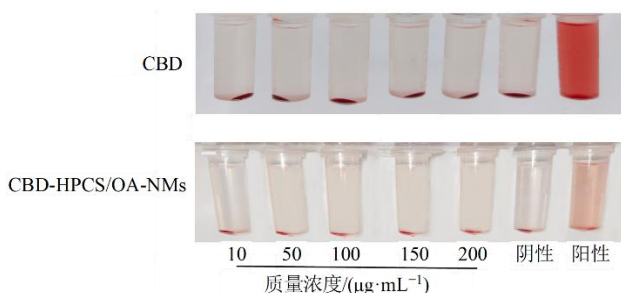


图 8 CBD-HPCS/OA-NMs 在不同 pH 条件下的释放曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 8 Release curves of CBD-HPCS/OA-NMs under different pH conditions ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



2.13 水溶性考察

称取过量 CBD-HPCS/OA-NMs 溶于 10 mL 纯水, 37 °C 以 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 搅拌 48 h, $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 取上清液 1 mL 加 9 mL 乙腈, 混合均匀后超声 (450 W, 40 kHz) 5 min, 经 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 按照“2.7.3”项色谱条件进行测定, 并计算其溶解度。原料 CBD 在水中的溶解度为 $0.39 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ [29], 水溶性研究结果显示, CBD-HPCS/OA-NMs 中 CBD 的溶解度为 $290 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 即 CBD 的水溶性增加了近 743 倍。

2.14 溶血性考察

采用溶血实验来评价载药纳米胶束的生物相容性。将新鲜小鼠血液离心并收集红细胞, 取 $200 \mu\text{L}$ 红细胞于 10 mL 量瓶, 0.9% 氯化钠溶液定容, 即得 2% 红细胞悬浮液[30]。取 CBD-HPCS/OA-NMs 粉末, 用 0.9% 氯化钠溶液, 依次稀释为 10、50、100、150、200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 分别与等体积的 2% 红细胞悬浮液混合; 同时设置阴性对照 (加入等量 0.9% 氯化钠溶液) 和阳性对照 (加入等量超纯水)。将各组样品置于 37 °C 恒温培养箱中孵育 30 min, 孵育结束后观察液体颜色变化, 以 $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 上清液转移至 96 孔板, 利用酶标仪在 450 nm 波长处测定吸光度 (A) 值, 计算溶血率。

$$\text{溶血率} = (A_{\text{待测样品}} - A_{\text{阴性}}) / (A_{\text{阳性}} - A_{\text{阴性}})$$

结果如图 9 所示, 阳性对照组溶液为澄清红色, 由于红细胞大量吸水而破裂, 发生溶血现象; 各给药组均观察到红细胞沉淀现象, 上清液澄清透明, 溶血率均低于 5%, 提示 CBD、CBD-HPCS/OA-NMs 具有较好的生物相容性。

2.15 体外抗肿瘤活性研究

2.15.1 CCK-8 法检测 SKOV3 细胞存活率 SKOV3 卵巢癌细胞培养使用含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液, 置于 37 °C 培养箱培养, 观察

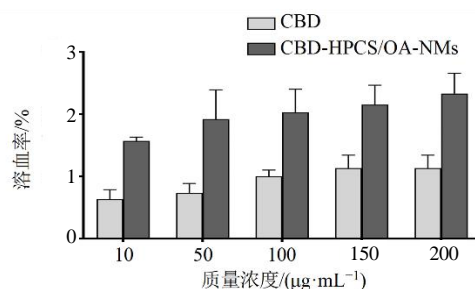


图 9 不同给药组的溶血实验结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 9 Results of hemolysis experiment in different administered groups ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

细胞状态,适当换液,2~3 d 进行传代。将对数生长长期的 SKOV3 细胞接种于 96 孔板,细胞密度约为每孔 2×10^4 个,每组设置 6 个复孔,置于 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中培养过夜。观察孔内细胞状态,随后将培养液弃去,PBS 清洗,分别加入质量浓度为 50、100、250、500、1 000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的含 HPCS/OA 空白纳米胶束培养基和游离 CBD 或 CBD-HPCS/OA-NMs 培养基(以 CBD 计,质量浓度为 1.5、3.0、6.0、12.0、25.0、50.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$);另设空白组(无细胞添加基础培养基)和对照组(有细胞添加基础培养基)。将细胞继续培养 24 h,每孔加入 10 μL CCK-8 检测液,孵育 3 h 后用酶标仪在 450 nm 处检测 A 值,并依据公式计算细胞存活率和半数抑制浓度(IC_{50})值。

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

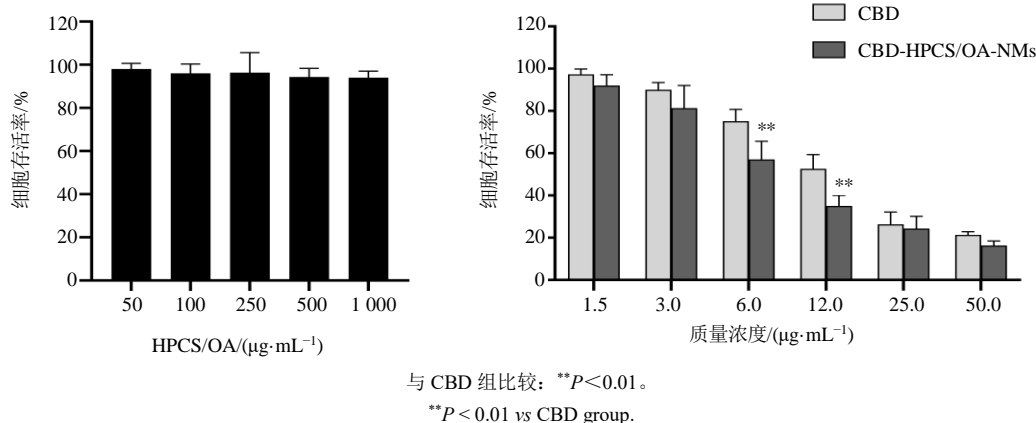


图 10 HPCS-OA 空白纳米胶束和 CBD-HPCS/OA-NMs 的抗肿瘤活性 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 10 Antitumor activity of HPCS-OA blank nanomicelle and CBD-HPCS/OA-NMs ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

2.15.2 SKOV3 细胞摄取实验 以香豆素 6 (C6) 为荧光探针,同“2.6”项,将 CBD 替换为 C6 制备 C6-HPCS/OA-NMs,观察 SKOV3 细胞对胶束的摄取情况。将 SKOV3 细胞以每孔 2×10^5 个细胞的密度接种到 12 孔板,培养 24 h,除去培养基。分别用 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ [32] C6、C6-HPCS/OA-NMs (质量浓度以 C6 计) 处理 4 h,弃掉培养基,PBS 清洗,每孔加入 500 μL Hoechst 33342 染色液染色,避光孵育 20 min,PBS 清洗 3 遍,使用倒置显微镜观察细胞摄取情况。结果如图 11 所示,绿色荧光源于 C6 分子,蓝色荧光为 Hoechst 33342 染色液标记的细胞核,C6 与 C6-HPCS/OA-NMs 的绿色荧光在细胞核周围分布,这一现象表明 C6 已被摄取至细胞质内 [33]。值得注意的是,C6-HPCS/OA-NMs 荧光强度明显强于游离 C6 组,提示难溶性药物被 HPCS/OA 纳米胶束负

结果如图 10 所示,在实验质量浓度范围内,HPSCS/OA 空白纳米胶束作用下 SKOV3 卵巢癌细胞存活率均大于 90%。游离 CBD 和 CBD-HPSCS/OA-NMs 对 SKOV3 卵巢癌细胞活性抑制作用均具有质量浓度相关性,随着药物质量浓度的增加,细胞存活率下降。给药 24 h 后 CBD 和 CBD-HPSCS/OA-NMs 的 IC_{50} 值分别为 13.50、8.51 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。在 6、12 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,CBD-HPSCS/OA-NMs 给药后的细胞存活率相对于游离 CBD 有显著下降趋势($P < 0.01$),低质量浓度组(1.5、3.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)与高质量浓度组(25.0、50.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) CBD-HPSCS/OA-NMs 给药后的细胞存活率与游离 CBD 相比有下降趋势,说明 CBD-HPSCS/OA-NMs 具有较强的肿瘤细胞增殖抑制活性,这可能是由于纳米载药系统递送特性与毒性剂量效应共同作用的结果 [31]。

载后能够被 SKOV3 细胞更高效地摄取,有利于增强药物对肿瘤细胞的杀伤作用。

2.15.3 划痕实验检测 SKOV3 细胞迁移 将对数生长长期的 SKOV3 细胞以每孔 5×10^5 个的浓度接种至 6 孔板,培养过夜,使用 200 μL 无菌移液管尖端垂直于孔板底部划出直线,PBS 轻柔冲洗,对照组加入新的培养液,给药组分别加入 1.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (细胞存活率 $> 90\%$) 的 CBD、CBD-HPSCS/OA-NMs 的培养液(质量浓度以 CBD 计),每组设置 3 个复孔,于给药后 0、24 h 使用倒置显微镜观察划痕的愈合速度并拍照记录,计算划痕愈合率。

$$\text{划痕愈合率} = (\text{初始划痕面积} - \text{给药后 24 h 划痕面积}) / \text{初始划痕面积}$$

结果如图 12 所示,给药 24 h 后,对照组划痕愈合率为 $(30.87 \pm 3.75)\%$,CBD 组划痕愈合率为

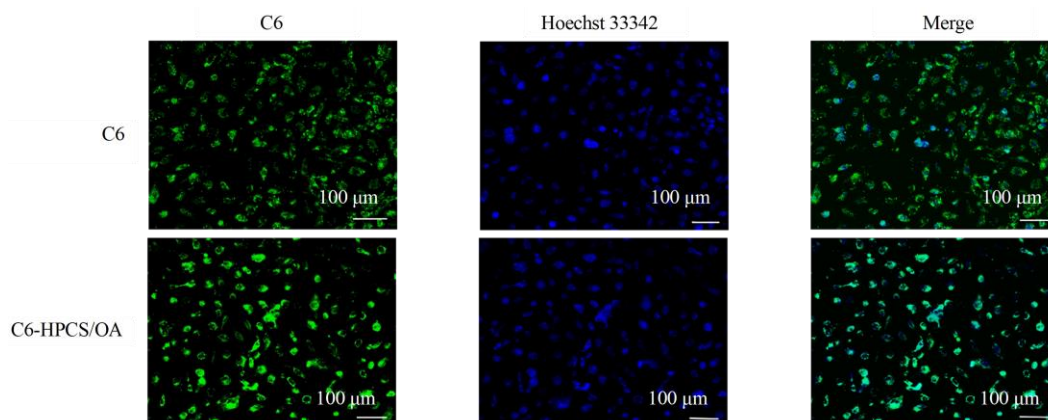
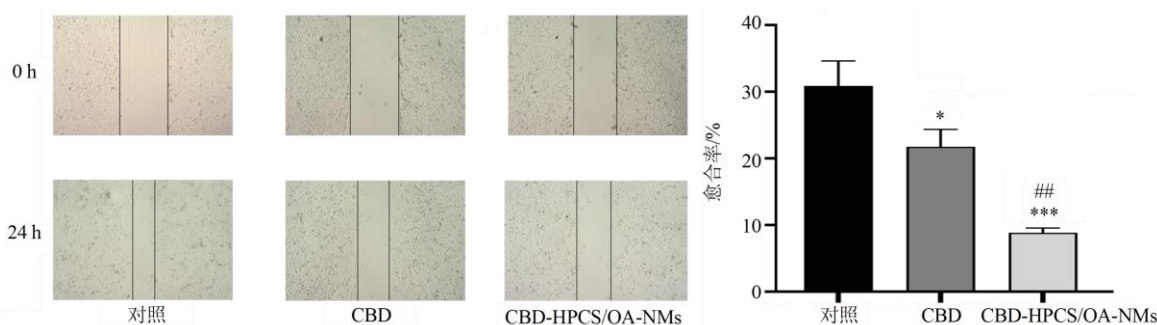


图 11 SKOV3 细胞摄取 C6-HPCS/OA-NMs 实验结果

Fig. 11 Experimental results of SKOV3 cell uptake of C6-HPCS/OA-NMs

与对照组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$; 与 CBD 组比较: ## $P < 0.01$ 。* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs CBD group.图 12 细胞划痕成像及 24 h 划痕愈合率 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Fig. 12 Cell scratch imaging and scratch healing rates at 24 h ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

(21.76 ± 2.57)%, CBD-HPCS/OA-NMs 划痕愈合率为 (8.86 ± 0.68)%, 且 CBD-HPCS/OA-NMs 划痕愈合率相较于对照组和 CBD 组均显著降低 ($P < 0.05$)。

3 讨论

肿瘤细胞具有无限增殖、代谢旺盛、免疫逃逸、易耐药及转移等特性^[34]。卵巢癌作为典型的高度致命性卵巢恶性肿瘤, 全球疾病负担显著, 每年新发 23.9 万例、死亡 15.2 万例, 死亡率居妇科恶性肿瘤首位^[35], 亟需安全有效的治疗策略。CBD 作为非精神活性大麻素成分, 因低毒性、高安全性及优异药理特性, 成为抗肿瘤研究焦点: 黄倩雯等^[36]发现其可下调 DARPP-32 蛋白表达、抑制 PK-Akt-mTOR 通路, 诱导 A2780、OVCAR-3 卵巢癌细胞凋亡并抑制增殖、迁移与侵袭。Ma 等^[37]证实其通过破坏 LAIR-1 介导的线粒体代谢干扰及 PI3K/Akt/mTOR 通路抑制, 阻滞卵巢癌细胞生长; Fu 团队^[38]则发现

其可破坏卵巢癌细胞脂质代谢, 诱发内质网应激相关凋亡, 提示 CBD 有望作为一种新的肿瘤治疗药物投入临床使用。

然而, CBD 的临床转化面临关键瓶颈: 作为亲脂性药物, 其水溶性极差, 且口服给药受首关效应影响, 生物利用度极低^[39]。聚合物胶束可通过两亲性材料自组装形成核壳结构, 有效提升难溶性药物的溶解度、稳定性及体内药效^[40]。基于此, 本研究设计制备了两亲性 HPCS/OA 空白纳米胶束, 其 CMC 低至 $0.0102 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 即使在体内体液稀释环境下仍能稳定维持结构; 采用透析法负载 CBD 后, 所得 CBD-HPCS/OA-NMs 粒径均一 [$(194.80 \pm 1.2) \text{ nm}$], Zeta 电位绝对值大于 30 mV (满足纳米载体稳定性要求), 载药量与包封率分别达 (29.14 ± 0.21)%、(72.85 ± 0.37)%; TEM 观察显示其形态规整、呈球形或类球形 (尺寸与粒径测定结果相近), 且在模拟生理环境 (pH 7.4 PBS) 及细胞培养环境 (含 10%

胎牛血清的 RPMI 1640) 中, 168 h 内粒径无显著变化; 体外释药无突释现象且具 pH 敏感性——低 pH 环境(如肿瘤微环境)下, HPCS 游离氨基质子化可触发药物释放, 与 Cheng 等^[41]研究结论一致; 溶血实验显示其溶血率<5%, 符合生物材料安全性标准, 对红细胞破坏作用小, 进入血液循环后不易引发溶血反应, 可降低潜在毒性风险^[33]。

体外抗肿瘤活性研究进一步验证了载药胶束的优势: CCK-8 实验对比 HPCS/OA 空白纳米胶束、游离 CBD 及 CBD-HPCS/OA-NMs 的细胞毒性, 发现空白纳米胶束无细胞毒性, 这可能与 HPCS 为天然多糖衍生物^[42], OA 为体内天然不饱和脂肪酸(代谢途径明确)^[43], 两者生物相容性好且降解产物安全有关; 而 CBD-HPCS/OA-NMs 对卵巢癌 SKOV3 细胞活力的抑制作用显著优于游离 CBD, 其机制可能与 CBD-HPCS/OA-NMs 可通过实体瘤高通透性和滞留效应(EPR 效应)富集于肿瘤部位, 并增强细胞膜通透性, 促进药物进入胞内有关^[44]。此外, C6-HPCS/OA 纳米胶束在细胞内摄取能力较强。细胞划痕实验结果表明, 载药纳米胶束相较于 CBD 具有更佳的抑制肿瘤细胞迁移能力, 这可能是由于载药纳米胶束通过网格蛋白介导、小窝蛋白介导等内吞途径高效进入细胞, 或作用于与细胞迁移相关的信号通路, 进而起到抑制卵巢癌细胞增殖的作用^[45-46]。

综上所述, CBD-HPCS/OA-NMs 在提升 CBD 溶解度、增强药物稳定性、提高抗肿瘤活性及保障生物安全性等方面表现优异, 为 CBD 抗肿瘤制剂研发提供了新策略与实验基础, 具有良好开发前景。本课题组后续将聚焦该胶束的体内研究, 深入探索其在卵巢癌动物模型中的药动学、肿瘤靶向性及体内抗肿瘤机制, 进一步评估其临床应用的可行性与安全性, 为推动 CBD 肿瘤治疗的临床转化提供更充分依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 谢冉, 郝单丽, 杨佳颖, 等. 大麻二酚抗肿瘤作用研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(24): 6541-6550.
- [2] Xie R, Hao D L, Yang J Y, et al. A mini-review on anti-tumor effect of cannabidiol [J]. China J Chin Mater Med, 2022, 47(24): 6541-6550.
- [3] 秦振芬, 孟祥霄, 陈伟强, 等. 工业大麻 TCP 基因家族的鉴定及表达分析 [J]. 中草药, 2023, 54(23): 7806-7814.
- [4] Qin Z F, Meng X X, Chen W Q, et al. Genome-wide identification and expression analysis of TCP gene family in *Cannabis sativa* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(23): 7806-7814.
- [5] Sheriff T, Lin M J, Dubin D, et al. The potential role of cannabinoids in dermatology [J]. J Dermatolog Treat, 2020, 31(8): 839-845.
- [6] Castillo-Arellano J, Canseco-Alba A, Cutler S J, et al. The polypharmacological effects of cannabidiol [J]. Molecules, 2023, 28(7): 3271.
- [7] 李申晖, 杨舸, 高岩松, 等. 大麻二酚对 D-半乳糖/三氯化铝诱导的阿尔茨海默病模型小鼠的神经保护作用及机制 [J]. 药物评价研究, 2025, 48(3): 618-626.
- [8] Li S H, Yang G, Gao Y S, et al. Neuroprotective effect and mechanism of cannabidiol on D-galactose/aluminum chloride-induced Alzheimer's disease model mice [J]. Drug Eval Res, 2025, 48(3): 618-626.
- [9] Britch S C, Babalonis S, Walsh S L. Cannabidiol: Pharmacology and therapeutic targets [J]. Psychopharmacology (Berl), 2021, 238(1): 9-28.
- [10] Massi P, Solinas M, Cinquina V, et al. Cannabidiol as potential anticancer drug [J]. Br J Clin Pharmacol, 2013, 75(2): 303-312.
- [11] 肖文, 杨旭. 中国大健康面临的关键问题: 能量摄入过剩和氧化炎症 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(4): 853-861.
- [12] Xiao W, Yang X. A key issue of national health in China: Excess energy intake and oxidative inflammation [J]. China J Chin Mater Med, 2022, 47(4): 853-861.
- [13] Simmerman E, Qin X, Yu J C, et al. Cannabinoids as a potential new and novel treatment for melanoma: A pilot study in a murine model [J]. J Surg Res, 2019, 235: 210-215.
- [14] Jeong S, Yun H K, Jeong Y A, et al. Cannabidiol-induced apoptosis is mediated by activation of Noxa in human colorectal cancer cells [J]. Cancer Lett, 2019, 447: 12-23.
- [15] Zhang X, Qin Y, Pan Z H, et al. Cannabidiol induces cell cycle arrest and cell apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells [J]. Biomolecules, 2019, 9(8): 302.
- [16] Milian L, Mata M, Alcacer J, et al. Cannabinoid receptor expression in non-small cell lung cancer. Effectiveness of tetrahydrocannabinol and cannabidiol inhibiting cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition *in vitro* [J]. PLoS One, 2020, 15(2): e0228909.
- [17] Balachandran P, Elsohly M, Hill K P. Cannabidiol interactions with medications, illicit substances, and alcohol: A comprehensive review [J]. J Gen Intern Med, 2021, 36(7): 2074-2084.
- [18] Prabakaran M. Chitosan-based nanoparticles for tumor-

- targeted drug delivery [J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 72: 1313-1322.
- [15] Yang Y, Song Z F, Qi W G, et al. Preparation and properties of tumor-targeting lentinan-oleic acid polymer micelles based on folic acid for adriamycin delivery [J]. *React Funct Polym*, 2023, 192: 105717.
- [16] Poustforoosh A, Hashemipour H, Pardakhty A, et al. Preparation of nano-micelles of meloxicam for transdermal drug delivery and simulation of drug release: A computational supported experimental study [J]. *Can J Chem Eng*, 2022, 100(11): 3428-3436.
- [17] 张汉波. 肿瘤还原微环境响应的透明质酸胶束抗肿瘤研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2017.
- Zhang H B. Anticancer effect of hyaluronic acid micelles responsive to reducing microenvironment of tumor [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2017.
- [18] 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 candesartan-celastrol co-loading reduction sensitive micelles [J]. *Drug Eval Res*, 2025, 48(6): 1557-1567.
- [19] 王慧弟, 张金坤, 郭进. 负载 α -常春藤皂苷聚合物胶束的制备与体内外评价 [J]. *药物评价研究*, 2024, 47(1): 123-129.
- Wang H D, Zhang J K, Guo J. Preparation and evaluation *in vitro* and *in vivo* of α -hederin-loaded polymer micelles [J]. *Drug Eval Res*, 2024, 47(1): 123-129.
- [20] 段应军, 吴华强, 王俊恩, 等. 溶剂热法制备小粒径无皂 MMA/St 共聚纳米胶乳粒子 [J]. *应用化学*, 2005, 22(12): 1295-1299.
- Duan Y J, Wu H Q, WANG J E, et al. Preparation of emulsifier-free MMA/st copolymer nanoparticle latex *via* solvothermal method [J]. *Chin J Appl Chem*, 2005, 22(12): 1295-1299.
- [21] 彭澳, 刘雪, 刘洋, 等. 伊曲康唑甘草酸纳米胶束的构建及抗白念珠菌作用研究 [J]. *中南药学*, 2025, 23(2): 430-435.
- Peng A, Liu X, Liu Y, et al. Glycyrrhizic acid nanomicelles loaded with itraconazole and its anti-*Candida albicans* effect [J]. *Cent South Pharm*, 2025, 23(2): 430-435.
- [22] 李丽. 基于酪蛋白美拉德改性产物构建辅酶 Q₁₀/复合物胶束 [D]. 无锡: 江南大学, 2010.
- Li L. Fabrication of Coenzyme Q₁₀/Copolymer Micells with Modified Casein by Maillard Reaction [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2010.
- [23] 刘银春, 张永勤, 董静文, 等. 基于聚半乳糖醛酸的聚合物胶束制备及性能 [J]. *功能高分子学报*, 2024, 37(4): 347-355.
- Liu Y C, Zhang Y Q, Dong J W, et al. Preparation and properties of polymer micelles based on polygalacturonic acid [J]. *J Funct Polym*, 2024, 37(4): 347-355.
- [24] 郑瑞雪. 两性离子化壳聚糖基纳米载药体系的制备及其抗肿瘤性能研究 [D]. 秦皇岛: 燕山大学, 2024.
- Zheng R X. Synthesis of zwitterionic chitosan nanodrug delivering system and evaluation on its anti-tumor efficiency [D]. Qinhuangdao: Yanshan University, 2024.
- [25] Guo W, Cai Z S, Xu Q, et al. Synthesis and properties of dehydroabietyl glycidyl ether grafted hydroxypropyl chitosan [J]. *BioResources*, 2020, 15(2): 4110-4123.
- [26] 方蕾, 赵晓丽, 王珺瑜, 等. 具有不同粒径和相同表面结构纳米银颗粒的制备及表征 [J]. *环境科学研究*, 2019, 32(5): 866-874.
- Fang L, Zhao X L, Wang J Y, et al. Preparation and characterization of nano-silver with different particle sizes and uniform surface coating [J]. *Res Environ Sci*, 2019, 32(5): 866-874.
- [27] 赵海钎, 陈方, 陈涛, 等. 叶酸修饰的 pH 响应共聚物混合胶束用于抗癌药物递送 [J]. *化工学报*, 2025, 76(4): 1702-1710.
- Zhao H Q, Chen F, Chen T, et al. Folate-modified pH-responsive copolymer mixed micelles for anticancer drug delivery [J]. *CIESC J*, 2025, 76(4): 1702-1710.
- [28] 樊蓉蓉, 郗悦玮, 王洁欣, 等. 叶酸修饰 pH 响应壳聚糖衍生物胶束的制备及性能表征 [J]. *北京化工大学学报(自然科学版)*, 2017, 44(3): 26-32.
- Fan R R, Xi Y W, Wang J X, et al. Synthesis and characterization of folate modified pH-responsive micelles of chitosan derivatives [J]. *J Beijing Univ Chem Technol Nat Sci Ed*, 2017, 44(3): 26-32.
- [29] Wang C, Wang J, Sun Y H, et al. Enhanced stability and oral bioavailability of cannabidiol in zein and whey protein composite nanoparticles by a modified anti-solvent approach [J]. *Foods*, 2022, 11(3): 376.
- [30] 孟东东. 姜黄素前药胶束递送紫杉醇用于抗结直肠癌活性研究 [D]. 佳木斯: 佳木斯大学, 2024.
- Meng D D. Prodrug of curcumin micelles for docetaxel in anti-colorectal cancer activity studies [D]. Jiamusi: Jiamusi University, 2024.
- [31] Jain K, Mehra N K, Jain N K. Nanotechnology in drug delivery: Safety and toxicity issues [J]. *Curr Pharm Des*, 2015, 21(29): 4252-4261.
- [32] Li R, Hao R, Xu C, et al. Preparation, optimisation, and properties of *O*-carboxymethyl chitosan-g-cholesterol succinic acid monoester polymer nanomicelles [J].

- Biomed Mater, 2024, 19(5).
- [33] 杨昊楠, 刘丰, 孟箭, 等. 增溶性紫杉醇聚合物胶束抗口腔鳞状细胞癌的实验研究 [J]. 口腔医学研究, 2025, 41(4): 293-300.
- Yang H N, Liu F, Meng J, et al. Preparation of paclitaxel polymer micelles and its anti-oral squamous cell carcinoma effect [J]. J Oral Sci Res, 2025, 41(4): 293-300.
- [34] 周锐奕, 吴晓聪, 雷毅, 等. 大麻二酚在肿瘤治疗中的应用 [J]. 肿瘤代谢与营养电子杂志, 2023, 10(1): 140-148.
- Zhou R Y, Wu X C, Lei Y, et al. Cannabidiol in tumor therapy [J]. Electron J Metab Nutr Cancer, 2023, 10(1): 140-148.
- [35] 叶明侠, 孟元光. 卵巢癌的靶向治疗新进展 [J]. 中国计划生育和妇产科, 2019, 11(10): 30-32, 43.
- Ye M X, Meng Y G. New progress in targeted therapy for ovarian cancer [J]. Chin J Fam Plan Gynecotokol, 2019, 11(10): 30-32, 43.
- [36] 黄倩雯. 大麻二酚对卵巢癌细胞生物学行为的影响及机制探究 [D]. 昆明: 昆明理工大学, 2023.
- Huang Q W. The effects and the mechanism of cannabidiol on biological behavior of ovarian cancer [D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2023.
- [37] Ma L, Zhang H C, Liu C T, et al. A novel mechanism of cannabidiol in suppressing ovarian cancer through LAIR-1 mediated mitochondrial dysfunction and apoptosis [J]. Environ Toxicol, 2023, 38(5): 1118-1132.
- [38] Fu X H, Yu Z X, Fang F, et al. Cannabidiol attenuates lipid metabolism and induces CB1 receptor-mediated ER stress associated apoptosis in ovarian cancer cells [J]. Sci Rep, 2025, 15(1): 4307.
- [39] 栗艳婷, 蔡宝国, 张健. 大麻二酚新剂型的研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(6): 840-847.
- Su Y T, Cai B G, Zhang J. Research progress of novel formulations of cannabidiol [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2022, 39(6): 840-847.
- [40] 于慧敏, 姚梅悦, 李文星, 等. 聚合物胶束在药物缓释递送系统中的应用进展 [J]. 生物化工, 2024, 10(6): 230-233.
- Yu H M, Yao M Y, Li W X, et al. Progress in the application of polymer micelles in sustained-release drug delivery system [J]. Biol Chem Eng, 2024, 10(6): 230-233.
- [41] Cheng H, Zhang H Q, Xu G J, et al. A combinative assembly strategy inspired reversibly borate-bridged polymeric micelles for lesion-specific rapid release of anti-coccidial drugs [J]. Nanomicro Lett, 2020, 12(1): 155.
- [42] 王艺璇, 曲萌菲, 张杭, 等. 醛基化透明质酸/羟丙基壳聚糖自愈合水凝胶的制备与性能 [J]. 复合材料学报, 2023, 40(10): 5884-5891.
- Wang Y X, Qu M F, Zhang H, et al. Preparation and properties of oxidized hyaluronic acid-hydroxypropyl chitosan self-healing hydrogel [J]. Acta Mater Compos Sin, 2023, 40(10): 5884-5891.
- [43] 刘永红, 张丽静, 张洪荣, 等. $\Delta 12$ -脂肪酸脱氢酶及其编码基因研究进展 [J]. 草业学报, 2011, 20(3): 256-267.
- Liu Y H, Zhang L J, Zhang H R, et al. Progress of research on $\Delta 12$ fatty acid desaturases and their coding genes [J]. Acta Pratacult Sin, 2011, 20(3): 256-267.
- [44] 谢冉. 负载大麻二酚纳米胶束的制备及抗乳腺癌作用研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2021.
- Xie R. Anti-tumor effect of CBD-loaded nano micelles on breast cancer [D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences, 2021.
- [45] 李晶, 刘访遥, 陈剑超. 黄芩苷 PEG-PCL 纳米胶束的体外评价、细胞内分布及抗心肌细胞凋亡的研究 [J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(12): 1427-1432.
- Li J, Liu F Y, Chen J C. Study on *in vitro* evaluation, intracellular distribution and anti-apoptosis of baicalin PEG-PCL nanomicelle [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2020, 37(12): 1427-1432.
- [46] 尚迪, 孙冬岩, 陈艳玲, 等. ERK1/2 信号通路卵巢癌的关系 [J]. 肿瘤防治研究, 2023, 50(10): 1015-1021.
- Shang D, Sun D Y, Chen Y L, et al. Correlation between ERK1/2 signal transduction and ovarian cancer [J]. Cancer Res Prev Treat, 2023, 50(10): 1015-1021.

[责任编辑 孙英杰]