

载姜黄素 pH 敏感聚合物胶束的制备、表征及体内外抗非小细胞肺癌研究

侍慧慧¹, 周美玲², 柳 晔³, 张可娇⁴, 李飞飞^{1*}

1. 南京医科大学康达学院, 江苏 连云港 222000

2. 东南大学医学院, 江苏 南京 210009

3. 射阳县人民医院, 江苏 盐城 224300

4. 哈尔滨医科大学, 黑龙江 哈尔滨 150081

摘要: 目的 合成两亲性聚合物聚乙二醇-聚 *L*-天冬氨酸 [methoxy poly(ethylene glycol)-*b*-poly(β -benzyl *L*-aspartate), PEG-*b*-PBLA] 和 pH 敏感性聚合物 [octadecylamine-*p*(API-Asp)₁₀, OAPI], 并利用 PEG-*b*-PBLA 包载 OAPI 和抗肿瘤药物姜黄素, 构建 pH 敏感性载药胶束, 考察其理化性质, 并评价其体内外抗非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 效果。方法 利用甲氧基聚乙二醇胺 [methoxy poly(ethylene glycol) amine, mPEG₂₀₀₀-NH₂] 引发 *L*-天冬氨酸-4-苄酯-*N*-羧基环内酸酐 [benzyl (*S*)-2,5-dioxoxazolidine-4-acetate, BLA-NCA] 开环聚合制备两亲性聚合物 PEG-*b*-PBLA。利用硬脂胺引发 BLA-NCA 开环聚合和氨解反应合成具有 pH 敏感特性的聚合物 OAPI。采用透析法制备载姜黄素的具 pH 敏感特性胶束 (C-NP), 并对其粒径、稳定性和 pH 响应性体外药物释放等性质进行了考察。最后, 利用 NSCLC A549 细胞、三维肿瘤球模型以及 A549 细胞建立的荷瘤小鼠模型考察了 C-NP 胶束的体内外抗肿瘤效果。**结果** 透射电子显微镜结果显示, 所制备的 C-NP 呈类球形, 具有明显的核壳结构, 且分布均匀, 其粒径为 (165.32 $\pm$ 1.53) nm, ζ 电位为 (-5.24 $\pm$ 0.42) mV, 载药量为 (5.27 $\pm$ 0.14) %, 包封率为 (88.46 $\pm$ 3.28) %, 临界胶束浓度为 4.82 μ g/mL。体外稳定性实验显示在生理条件下, C-NP 具有较好的稳定性, 敏感性实验显示在酸性条件下, C-NP 不稳定, 具 pH 敏感特性。体外药物释放结果表明, 在 pH 5.0 的介质中孵育 72 h 后, C-NP 的累积释放量高达 (81.44 $\pm$ 5.90) %, 表明 C-NP 胶束具有良好的 pH 敏感性。细胞毒性实验、肿瘤球生长抑制实验证明 C-NP 能增强姜黄素体外抗肿瘤活性。细胞共定位实验显示, 相比较 pH 不敏感组 C-B-NP, C-NP 可以在酸性溶酶体中快速分解, 从而逃逸发挥抗肿瘤效应。体内药效学实验结果表明, C-NP 组显著抑制了荷瘤裸鼠的肿瘤生长。**结论** 成功构建了载有姜黄素的 pH 敏感性胶束 C-NP, 其具有良好的理化性质和 pH 敏感性, 且通过多种模型初步证实其对 NSCLC 非小细胞肺癌具有较强的抑制作用。

关键词: pH 敏感; 非小细胞肺癌; 姜黄素; 纳米递药系统; 聚合物; 胶束

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)19-6264-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.19.008

Preparation, characterization and anti-non-small cell lung cancer efficacy of curcumin-loaded pH sensitive polymer micelles

SHI Hui-hui¹, ZHOU Mei-ling², LIU Ye³, ZHANG Ke-jiao⁴, LI Fei-fei¹

1. Kangda College of Nanjing Medical University, Lianyungang 222000, China

2. School of Medicine, Southeast University, Nanjing 210009, China

3. The People's Hospital of Sheyang County, Yancheng 224300, China

4. Harbin Medical University, Harbin 150081, China

Abstract: Objective To synthesize the amphiphilic polymer methoxy poly(ethylene glycol)-*b*-poly(β -benzyl *L*-aspartate) (PEG-*b*-PBLA) and pH-sensitive polypeptide (OAPI), then, PEG-*b*-PBLA was used to construct pH-sensitive drug-carrying micelles containing

收稿日期: 2023-04-13

基金项目: 2021 年度江苏省高校基础科学 (自然科学) 面上项目 (21KJD350004); 2020 年度江苏省高校基础科学 (自然科学) 面上项目 (20KJD350007); 江苏省大学生创新创业训练计划项目 (202113980003Y); 南京医科大学康达学院 2021 年度科研发展基金 (KD2021KYJJZD010); 南京医科大学康达学院第二期 “科研创新团队项目” (KD2023KYCXTD003)

作者简介: 侍慧慧, 女, 硕士, 讲师, 研究方向为新型靶向递药系统。Tel: (0518)80689664 E-mail: shihuihui@njmu.edu.cn

***通信作者:** 李飞飞, 女, 副教授, 主要从事药物递送策略及其制剂研究。E-mail: fl@foxmail.com

OAPI and curcumin, finally, the physicochemical properties and anti-non-small cell lung cancer (NSCLC) effects of the micelles were evaluated *in vivo* and *in vitro*. **Methods** The methoxy poly(ethylene glycol) amine (mPEG₂₀₀₀-NH₂) was utilized to initiate benzyl (S)-2,5-dioxooxazolidine-4-acetate (BLA-NCA) to synthesize the amphiphilic polymer PEG-b-PBLA by the ring-opening polymerization, and the pH-sensitive polypeptide OAPI was synthesized by ring-opening polymerization of BLA-NCA triggered by stearamine and ammonolysis reaction. Then, the pH sensitive micelle (C-NP) containing curcumin was prepared by dialysis method. The particle size, stability and pH-sensitive drug release properties of C-NP were investigated. Finally, the *in vitro* and *in vivo* anti-tumor effects of C-NP micelle were evaluated by using A549 cells, three-dimensional tumor ball models and tumor bearing mice model of NSCLC. **Results** The prepared C-NP showed a uniform spherical shape with obvious core-shell structure, uniform distribution under transmission electron microscopy. Its particle size was (165.32 ± 1.53) nm, ζ potential was (-5.24 ± 0.42) mV, drug loading was $(5.27 \pm 0.14)\%$, and encapsulation efficiency was $(88.46 \pm 3.28)\%$. The critical micellar concentration was $4.82 \mu\text{g/mL}$. *In vitro* stability experiments showed that under physiological conditions, C-NP had good stability, sensitivity experiments showed that under acidic conditions, C-NP was unstable, with pH sensitive characteristics. *In vitro* release results showed that the cumulative release of C-NP reached $(81.44 \pm 5.90)\%$ after 72 h incubation in pH 5.0 medium, indicating that C-NP micelles had good pH sensitivity. The cytotoxicity, tumor spheroid growth inhibition experiments revealed C-NP can enhance the anti-tumor activity *in vitro*. The cell colocalization experiment showed that, compared with the pH-insensitive group C-B-NP, C-NP could be decomposed rapidly in acid lysosomes, thus escaping to play an anti-tumor effect. *In vivo* pharmacodynamic experiment results showed that C-NP group significantly inhibited tumor growth in nude mice. **Conclusion** In this experiment, the pH sensitive C-NP micelle was successfully constructed, which has good physicochemical properties, pH sensitivity, and strong inhibitory effect on NSCLC preliminarily confirmed by a variety of models.

Key words: pH sensitive; non-small cell lung cancer; curcumin; nano delivery systems; polymer; micelle

非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 约占肺癌病例的 85%, 是中国癌症相关死亡的主要原因之一^[1-2]。目前, 化疗仍然是 NSCLC 治疗的主要方法^[3-4]。然而, 水溶性低、血浆清除快、毒副作用等极大地限制了化疗药物在临床上的应用。此外, 肿瘤细胞耐药性的产生使患者不得不提高剂量或选择其他药物, 给治疗带来了巨大的困难。

由于氧气供给不足, 肿瘤细胞只能通过无氧酵解的方式进行能量代谢, 这会造成乳酸的积累; 与此同时, 肿瘤细胞膜上的离子交换蛋白也在源源不断的将细胞内部 H⁺ 运输到细胞外, 避免造成自身酸中毒。这些细胞反应也在不同程度上造成肿瘤微环境 pH 降低, 整体呈现酸性环境。与生理条件下的正常组织 (pH 7.2~7.4) 相比, 肿瘤微环境具有酸性 pH (pH 6.5~7.2) 的特点^[5-7]。除了肿瘤微环境的胞外酸性之外, 在肿瘤细胞内也存在从早期内涵体 (pH 6.0~6.5), 晚期内涵体 (pH 5.0~6.0) 到溶酶体 (pH 4.5~5.0) 的 pH 梯度环境。而纳米粒及胶束等载药系统一般可通过细胞内吞等途径进入肿瘤细胞内, 并首先分布于内涵体和溶酶体的酸性环境中。

利用肿瘤的这些性质, 人们设计了多种具有对肿瘤胞外和胞内 pH 具有响应性质的纳米药物递送系统^[8-11], 其在生理 pH 条件下可以携带和保护药物

分子到达肿瘤组织, 进而在细胞内外的酸性环境作用下, 可以在肿瘤微环境或肿瘤细胞内快速释放药物, 有利于维持治疗药物有效浓度, 提高治疗效果。基于上述优势, 很多 pH 响应型聚合物载体已被相继开发和报道^[12-13]。

姜黄素具有抗炎^[14]、抗氧化^[15]、抗病毒、抗肿瘤^[16-18]等多种药理活性。近年来, 研究表明在肺癌中姜黄素可诱导 NSCLC 细胞和肺腺癌细胞凋亡。Zhang 等^[19]研究表明姜黄素通过调节表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 和 Toll 样受体 4 (Toll like receptor 4, TLR4) /髓样分化因子 88 (molecule myeloid differentiation factor 88, MyD88) 通路协同抑制 NSCLC 细胞的增殖和迁移。且姜黄素对正常细胞毒性低。因此, 姜黄素是良好的抗 NSCLC 药物。然而, 生物利用度低^[20]、水溶性差、血液循环中不稳定、代谢速度快等缺点限制了其在临床上的应用。因此, 开发合适的递药系统, 提高姜黄素的生物利用度, 是具有潜力的抗 NSCLC 治疗方法。基于此, 本实验将构建一种具有 pH 敏感作用的靶向纳米递药系统, 递送姜黄素用于抗 NSCLC 治疗。

1 仪器与材料

1.1 仪器

AUW120D/220D 型电子天平, 日本岛津公司;

Bio safer 1200E 型超声波细胞破碎器、Multifuge X1R 型台式高速冷冻离心机、RF-10AXL 型荧光检测器、Thermo Fisher Multiskan FC 型酶标仪、Bio Mate 3S 型紫外可见分光光度计, 美国赛默飞世尔科技公司; KQ 5200 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; DF-101S 型集热式磁力加热搅拌器, 上海仪昕科学仪器有限公司; 85-2 型恒温磁力搅拌器, 江苏省金坛市西城新瑞仪器厂; R2006KB 型旋转蒸发器, 上海申生科技有限公司; Alpha-2 LD 型冷冻干燥机, 德国 Christ 公司; Tensor27 型傅里叶红外光谱仪, 德国 Bruker 公司; Zetasizer Nano-S90 型马尔文激光粒度仪, 英国 Malvern 公司; 透析袋, 截留相对分子质量 3500、1000, 上海源叶生物科技有限公司; Direct-Q3 型纯水/超纯水一体化系统, 默克密理博公司; LSM710 型激光共聚焦显微镜 (CLSM), 德国 Carl Zeiss 公司。

1.2 试剂

硬脂胺 (质量分数 97.0%, 批号 20200516)、姜黄素 (质量分数 98.0%, 批号 20200703)、1-(3-氨基丙基)咪唑 [*N*-(3-aminopropyl)-imidazole, API, 质量分数 97.0%, 批号 20210424], 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 甲氧基聚乙二醇胺 [methoxy poly(ethylene glycol) amine, mPEG₂₀₀₀-NH₂, 质量分数 98.00%, 批号 E11305], 上海芫圣生物科技有限公司; *L*-天冬氨酸-4-甲酯-*N*-羧基环内酸酐 [benzyl (*S*)-2,5-dioxooxazolidine-4-acetate, BLA-NCA], 质量分数 98.00%, 批号 20210301, 四川嘉瑛莱科技有限公司; 无水二氯甲烷、*N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF)、甲醇、氯仿、二甲基亚砜 (DMSO), 国药集团化学试剂有限公司; RPMI-1640 完全培养基、青-链霉素、0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液, 美国 Gibco 公司; 四季青胎牛血清 (FBS), 浙江天杭生物科技有限公司; 四甲基偶氮唑蓝 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 试剂盒、Lyso-Tracker Red、Hoechst, 江苏碧云天生物技术公司; 琼脂糖, 上海阿拉丁试剂有限公司; 激光共聚焦培养皿, 无锡耐思生命科技股份有限公司。

1.3 细胞与动物

A549 细胞购自中国科学院上海细胞库。

BALB/c 裸鼠, 雄性, 体质量 (16±2) g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。严格按照动物饲养标准进行饲养, 许可证号 SYXK(苏)2020-0022。所有动物实验均经过南京医科大学实验动物

福利伦理委员会审核通过^[21], 伦理编号 IACUC-2104029。

2 方法与结果

2.1 两亲性聚合物聚乙二醇-聚 *L*-天冬氨酸 [methoxy poly(ethylene glycol)-b-poly(β -benzyl *L*-aspartate), PEG-b-PBLA] 的合成与表征^[22]

mPEG₂₀₀₀-NH₂ (50 mg, 0.01 mmol) 完全溶解于 5 mL 无水 DMF 中备用。将 BLA-NCA (75 mg, 0.3 mmol) 溶于 20 mL 无水 DMF 后加入到 mPEG₂₀₀₀-NH₂ 溶液中, 氮气保护下, 40 °C 搅拌反应 48 h。反应结束后将产物在剧烈搅拌条件下逐滴滴入到预冷的无水乙醚中, 得到白色沉淀, 离心, 得到粗产物, 再次将粗产物溶于 DMF, 用预冷的无水乙醚沉淀, 离心, 最后在室温真空干燥, 得到终产物 PEG-b-PBLA。产物用 DMSO-*d*₆ 溶解, 核磁共振仪检测其核磁图谱。PEG-b-PBLA 的 ¹H-NMR 如图 1 所示, δ 3.26 为 PEG 中重复单元亚甲基质子的特征峰, δ 7.28 是 PBLA 中苯环的特征峰, PBLA 中其余峰的位置在 δ 4.54、5.00。该核磁表明 mPEG₂₀₀₀-NH₂ 成功引发了 BLA-NCA 的开环聚合, 生成了 PEG-b-PBLA。

2.2 pH 敏感性聚合物 [octadecylamine-p(API-Asp)₁₀, OAPI] 的合成与表征^[23]

将硬脂胺 0.1 g 溶解在 20 mL 无水二氯甲烷中, BLA-NCA 1 g 溶解于 10 mL 无水 DMF 中, 将 2 个反应液混合, 氮气保护下 40 °C 搅拌反应 48 h, 反应结束后旋蒸除去无水二氯甲烷, 剩余液体在冷乙醚中沉淀, 于 0 °C 下 3000 r/min 离心 (离心半径 10

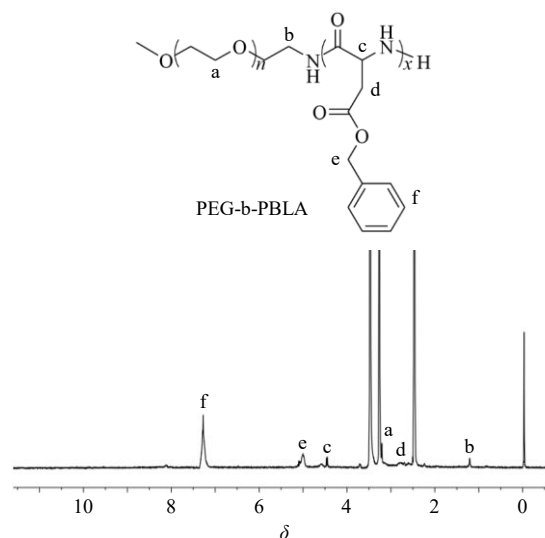


图 1 PEG-b-PBLA 的 ¹H-NMR 图

Fig. 1 ¹H-NMR spectrum of PEG-b-PBLA

cm) 5 min, 收集沉淀真空干燥 24 h 后得到 pH 不敏感聚合物 OPBLA。称取 OPBLA 0.2 g 和 API 1 g 溶于 10 mL 无水 DMF 中, 25 °C 氮气保护搅拌反应 12 h。反应结束后用透析袋(相对分子质量 1000)透析 24 h, 期间每隔 4 h 换 1 次水。冻干得到产物 OAPI。采用 KBr 压片法制样, 红外光谱仪检测其红外吸收光谱图, 同时产物用 DMSO- d_6 溶解, 核磁共振仪检测其核磁图谱。

BLA-NCA、OPBLA 和 OAPI 的红外图谱表征结果见图 2。BLA-NCA 中 1800、1700 cm^{-1} 的 2 个吸收峰, 对应于 NCA 中 2 个羰基峰。开环反应后, 在 1740 cm^{-1} 处出现了酯键伸缩振动特征吸收峰说明成功引发开环反应。与 API 反应后, 酯键对应的峰消失, 同时位于 1658 cm^{-1} 处的酰胺键的 C=O 的吸收峰增加, 说明聚氨基酸侧基由苄氧羰基转变为酰胺键, 证明了酰胺反应成功。

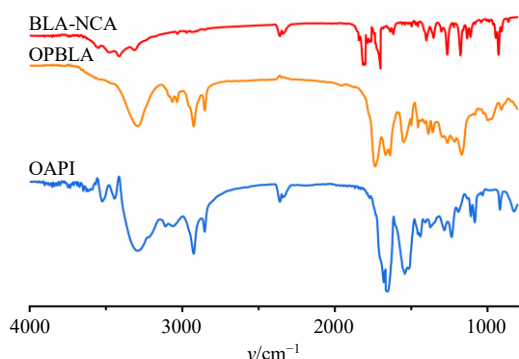


图 2 BLA-NCA、OPBLA、OAPI 的 FTIR 谱图

Fig. 2 FTIR spectrum of BLA-NCA, OPBLA and OAPI

OAPI 的核磁表征结果见图 3, δ 7.60、7.12、6.87 为咪唑环的特征峰, δ 1.23、0.83 为十八胺的特征峰, 表明了 OAPI 的成功合成。

FITC 标记的 pH 敏感聚合物和 pH 不敏感聚合物的制备过程如下: 称取 100 mg 的 pH 敏感的 OAPI 或 pH 不敏感的聚合物 OPBLA, 完全溶解在 20 mL DMSO 中, 室温下与 30 mg 的 FITC 避光反应 12 h。反应产物透析 2 d 去掉未反应上的 FITC 和 DMSO。

2.3 pH 敏感 (C-NP) / 非敏感 (C-B-NP) 胶束制备及表征

2.3.1 C-NP、C-B-NP 胶束的制备 采用透析法^[24]制备 pH 敏感胶束。称取姜黄素 2 mg、PEG-b-PBLA 20 mg、酸敏感聚合物 OAPI 20 mg 溶于 DMSO 10 mL 中, 在高速搅拌的条件下, 缓慢滴加至 25 mL 超纯水中, 高速搅拌 30 min 后装入透析袋中, 透析 24 h 后即得胶束溶液。

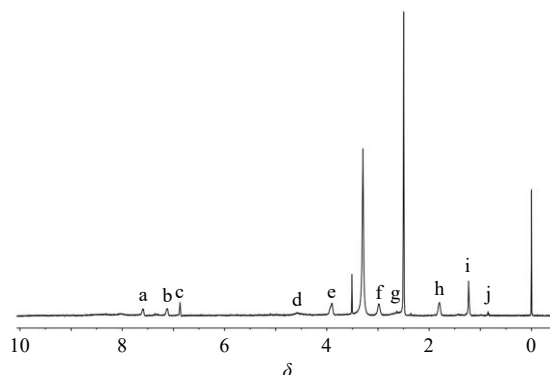
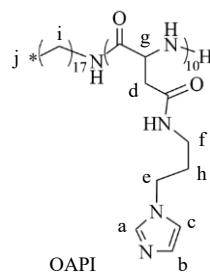


图 3 OAPI 的核磁图

Fig. 3 ^1H -NMR spectrum of OAPI

非敏感型胶束制备过程和上述方法一致, 仅用酸不敏感聚合物 OPBLA 代替酸敏感聚合物 OAPI。

FITC 标记的胶束的制备方法和上述一致, 除了将敏感聚合物 OAPI 或不敏感聚合物 OPBLA 替换成 FITC 标记的聚合物。

2.3.2 胶束的粒径、 ζ 电位及其分布和形态考察 取适量组装好的胶束, 使用马尔文粒度仪测定粒径, ζ 电位和多分散系数 (polydispersity index, PDI)。取适量制备好的纳米粒滴加到铜网上, 自然晾干, 于透射电镜下观测并摄片记录。

如图 4 所示, 本实验制备的 C-NP 胶束在透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 下呈类球形, 形状规则, 分布窄而均匀, 结果粒度仪结果相符合 (图 5)。 ζ 电位结果如图 6 所示, 该胶束电位带负电荷, 说明胶束之间存在较强的排斥力, 显示出胶束良好的稳定性。

2.3.3 胶束包封率和载药量测定 首先通过紫外分光光度计测量姜黄素在 426 nm 处的紫外吸光度 (A) 值来建立标准曲线。精密称 10.0 mg 姜黄素, 用乙醇与水 (10:1) 混合溶液溶解后定容至 10 mL, 配置成 1 mg/mL 的姜黄素溶液。将母液逐级稀释到设定好的质量浓度梯度, 测量每个质量浓度在 426 nm 处的 A 值, 建立标准曲线为 $Y=0.1531X+0.2992$, $R^2=0.9999$, 线性范围为 0.5~20.0 $\mu\text{g/mL}$ 。称取一定量待测样品, 在与标准曲线测定时相同的条件下,

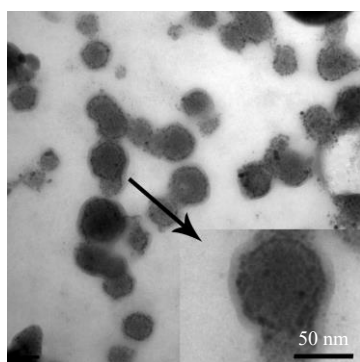


图 4 C-NP 的 TEM 图

Fig. 4 TEM image of C-NP

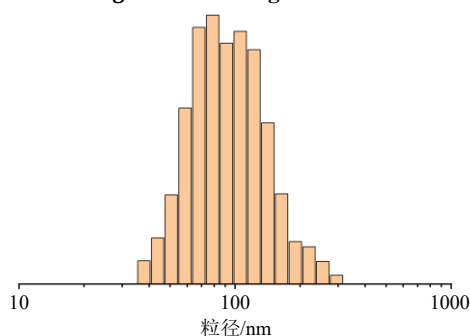


图 5 C-NP 的粒径分布图

Fig. 5 Size distribution of C-NP

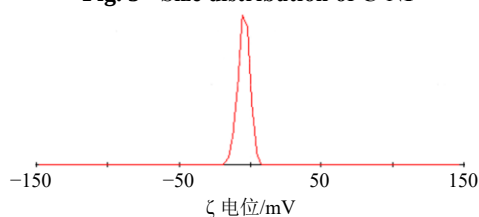


图 6 C-NP 的 ζ 电位图

Fig. 6 ζ Potential of C-NP

测定其 A 值, 并通过标准曲线计算得到样品中姜黄素的含量。可以通过公式计算包封率和载药量。

包封率 = 胶束中所含的药物质量 / 药物加入量

载药量 = 胶束中所含的药物质量 / 胶束的总质量

C-NP 和 C-B-NP 胶束的粒径、PDI 和 ζ 电位、包封率和载药量结果如表 1 所示。

2.4 胶束体内外性质评价

2.4.1 临界胶束浓度 (critical micelle concentration, CMC) 的测定

采用芘荧光探针法检测聚合物的

表 1 胶束的粒径、PDI、 ζ 电位、包封率和载药量结果Table 1 Particle size, PDI, ζ potential, entrapping efficiency and drug loading results of C-NP and C-B-NP

处方	平均粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV	包封率/%	载药量/%
C-NP	165.35 $\pm$ 2.56	0.11 $\pm$ 0.02	-5.24 $\pm$ 0.42	88.46 $\pm$ 3.28	5.27 $\pm$ 0.14
C-B-NP	169.78 $\pm$ 1.73	0.14 $\pm$ 0.02	-4.33 $\pm$ 0.15	83.36 $\pm$ 2.16	5.93 $\pm$ 0.42

CMC^[25-26]。将 PEG-b-PBLA (10 mg) 溶于芘的丙酮溶液中, 用氮气吹干丙酮。将胶束溶液分别稀释成质量浓度为 0.01~100.00 $\mu\text{g/mL}$, 其中芘的质量浓度设定为 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 。超声处理后, 65 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。最后, 用荧光分光光度计进行检测 (荧光测量条件: 激发波长 (λ_{ex}) 为 335 nm, 发射波长 (λ_{em}) 为 373、384 nm), 以 PEG-b-PBLA 溶液质量浓度的对数值为横坐标, 384、373 nm 处样品的荧光光度值之比 (I_{384}/I_{373}) 为纵坐标做图, 2 条拟合直线的交点为胶束 CMC 值。结果如图 7 所示, 当聚合物质量浓度低于 CMC 时, 聚合物以芘的弱荧光形式存在。因此, I_{384}/I_{373} 的比值基本稳定。但当质量浓度在 CMC 以上逐渐增加时, I_{384}/I_{373} 的比值发生了显著变化, 表明胶束形成, 芘被包裹在胶束中。经拟合计算, 该胶束的 CMC 为 4.82 $\mu\text{g/mL}$, 胶束具有较低的 CMC, 有助于胶束在体液稀释的情况下稳定存在。

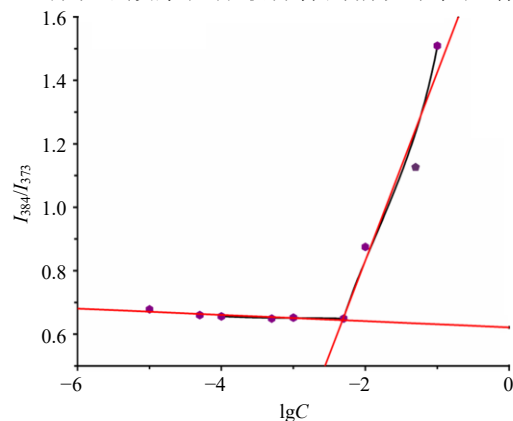


图 7 PEG-b-PBLA 的 CMC

Fig. 7 CMC of PEG-b-PBLA

2.4.2 胶束稳定性研究

通过模拟体内生理条件来考察胶束的粒径变化情况, 制备 C-NP 和 C-B-NP 胶束, 分别置于 PBS (0.01 mol/L, pH 7.4) 缓冲体系和含 10% FBS 的 PBS (0.01 mol/L, pH 7.4) 缓冲体系中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育, 在设定好的时间间隔取样并测定其粒径。结果见表 2, 通过 DLS 对水合粒径进行为期 24 h 的检测, C-NP 和 C-B-NP 在 2 种介质中的粒径均稳定在 160~180 nm, 没有明显大的波动。该结果表明, 制备的纳米载体稳定性较好。

2.4.3 胶束酸敏感性研究

将制备好的 C-NP 和 C-B-NP 胶束分成 2 份, 分别置于 PBS (0.01 mol/L, pH 7.4) 缓冲体系和醋酸盐缓冲体系 (0.01 mol/L, pH 5.0) 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育。2 h 后用马尔文粒度仪测其粒径。粒度仪检测结果见图 8。由图中可见, pH 5.0 的条件下, C-NP 的粒径发生显著改变, 而 C-B-NP

表 2 C-NP 和 C-B-NP 在 PBS 和 PBS+10% FBS 中 24 h 内的粒径变化

Table 2 Particle size changes of C-NP and C-B-NP in PBS and PBS + 10% FBS over 24 h

t/h	C-NP 粒径/nm		C-B-NP 粒径/nm	
	PBS	PBS+10% FBS	PBS	PBS+10% FBS
0	166.46±1.22	170.57±0.99	168.98±0.46	167.95±1.24
2	168.87±1.09	176.36±1.27	174.38±0.97	181.46±1.54
4	162.99±0.98	168.33±1.52	172.62±1.27	179.23±0.98
6	170.35±1.36	164.98±0.63	177.54±1.65	180.55±1.45
8	165.52±1.27	170.87±0.26	172.28±1.35	175.75±1.22
10	172.89±0.46	176.34±1.23	175.44±0.78	182.85±1.50
12	176.47±0.83	165.86±1.37	179.58±1.58	183.28±1.42
24	178.33±1.59	170.95±1.08	170.35±1.05	180.43±1.28

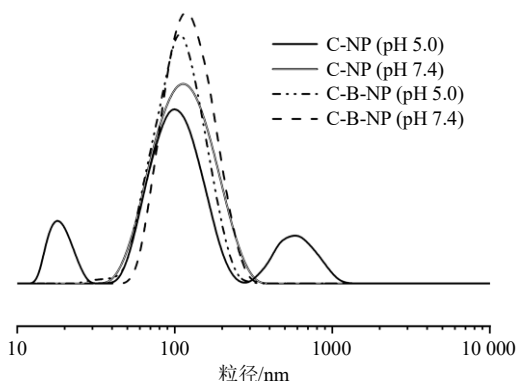


图 8 C-NP 和 C-B-NP 在不同 pH 条件下的粒径变化

Fig. 8 Particle size changes of C-NP and C-B-NP at different pH conditions

的粒径无明显波动, 该结果验证了本实验制备的纳米载体具有 pH 响应特性, 这将有利于负载药物的快速释放。

2.4.4 胶束体外释放研究 采用透析法考察姜黄素的体外释放行为。释放介质为 pH 7.4 和 pH 5.0 的缓冲液。姜黄素完全释放后介质中姜黄素质量浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 。取制备的胶束 5 mL, 加入到截留相对分子质量为 3500 的预溶胀透析管内, 并将透析管置于装有 50 mL 释放介质的烧杯中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min 恒温摇床中振荡进行释放实验。分别于 2、4、6、8、10、12、24、36、48、60、72 h 取出 1 mL 释放外液, 同时补加等量 37 $^{\circ}\text{C}$ 空白释放介质。样品用紫外分光光度计测量, 计算累积释放率。姜黄素释放结果见图 9。结果显示, 在 pH 5.0 环境下中, 姜黄素释放增加。72 h 结束时在 pH 5.0 的介质中, C-NP 和 C-B-NP 的累积释放率分别为 (81.44 $\pm$ 5.90)% 和 (4.38 $\pm$ 0.61)%, 而在 pH 7.4 的介质中,

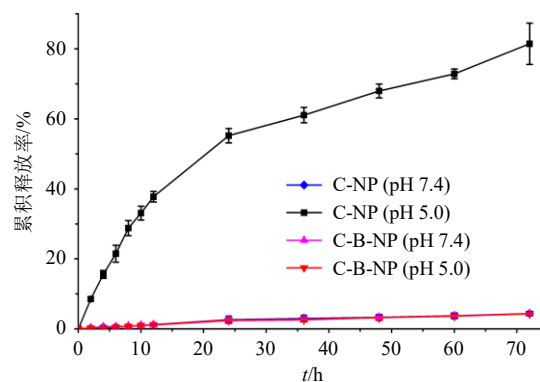


图 9 不同 pH 值条件下 C-NP 和 C-B-NP 中姜黄素的释放曲线

Fig. 9 Curcumin release profiles of C-NP and C-B-NP at different pH conditions

C-NP 和 C-B-NP 的累积释放率分别只有 (4.33 $\pm$ 0.25)% 和 (4.31 $\pm$ 0.14)%。

由表 3 可知, pH 7.4 时, C-B-NP 和 C-NP 中姜黄素的体外释放, Higuchi 方程拟合最好, 回归系数 R^2 分别是 0.989 和 0.987; pH 5.0 时, C-NP 的体外释放比较符合 Higuchi 方程, 回归系数 R^2 是 0.978。pH 5.0 时 C-NP 的体外释放初期较快, 随后呈现持续而缓慢的释放, 释药机制可能是扩散和骨架溶蚀相结合。

2.4.5 细胞毒作用 采用 MTT 法测定载药纳米胶束对 A549 细胞的体外杀伤效果, 评价其抗肿瘤效果。将游离姜黄素、C-B-NP 和 C-NP 作为实验组, 用不含血清的培养液稀释至姜黄素浓度为 5~80 $\mu\text{mol/L}$ 。未处理的细胞作为阴性对照组, 仅加培养液作为空白对照组。在 96 孔板中以 5×10^3 个/孔的密度接种对数生长期的 A549 细胞。24 h 后, 实验组加入含药的培养基, 空白对照组只更换新的培养基, 每组 4 个复孔。培养 24、48、72 h 后, 吸去培养液, 每孔加入 20 μL 的 MTT (5 mg/mL) 溶液。4 h 后, 弃去培养液, 每孔加入 200 μL DMSO, 避光振荡 10 min, 充分溶解结晶物甲瓚。用酶标仪检测 570 nm 处的吸光度 (A) 值, 使用 Graphpad Prism 9 软件计算各组的细胞存活率和半抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC_{50}) 值, 结果见表 4、5。结果显示, 游离姜黄素和载药纳米胶束组对 A549 细胞均表现出剂量相关性和时间相关性增殖抑制作用。与 C-B-NP 组相比, C-NP 组表现出显著的肿瘤细胞杀伤效果, 其增强的细胞毒性可能是由于 pH 敏感快速释放药物作用^[27]。

2.4.6 细胞共定位实验 通过“质子海绵效应”, 咪

表 3 C-NP 和 C-B-NP 在 pH 7.4、5.0 体外释放模型
Table 3 *In vitro* release model of C-NP and C-B-NP at pH 7.4 and 5.0

模型	C-NP		C-B-NP	
	pH 7.4	pH 5.0	pH 7.4	pH 5.0
零级释放	$Q=0.058\ 2\ t+0.361\ 6$, $R^2=0.958$	$Q=0.959\ 0\ t+19.409\ 0$, $R^2=0.905$	$Q=0.057\ 9\ t+0.341\ 2$, $R^2=0.970$	$Q=0.058\ 2\ t+0.451\ 0$, $R^2=0.952$
一级释放	$\ln(100-Q)=-0.000\ 6\ t+$ $4.601\ 0$, $R^2=0.954$	$\ln(100-Q)=-0.000\ 6\ t+$ $4.602\ 0$, $R^2=0.959$	$\ln(100-Q)=-0.000\ 6\ t+$ $4.600\ 0$, $R^2=0.971$	$\ln(100-Q)=-0.000\ 6\ t+$ $4.600\ 0$, $R^2=0.959$
Higuchi	$Q=11.033\ 9\ t^{1/2}-10.413\ 0$, $R^2=0.987$	$Q=10.012\ 0\ t^{1/2}-0.963\ 0$, $R^2=0.978$	$Q=0.587\ 8\ t^{1/2}-0.812\ 2$, $R^2=0.989$	$Q=0.593\ 5\ t^{1/2}-0.809\ 6$, $R^2=0.985$
Weibull	$\ln[\ln(100/(100-Q))]=0.036\ 5\ t-$ $5.302\ 5$, $R^2=0.790$	$\ln[\ln(100/(100-Q))]=0.033\ 3\ t-$ $1.554\ 1$, $R^2=0.788$	$\ln[\ln(100/(100-Q))]=0.036\ 2\ t-$ $5.302\ 4$, $R^2=0.804$	$\ln[\ln(100/(100-Q))]=0.033\ 8\ t-$ $5.133\ 7$, $R^2=0.808$
Ritger-Peppas	$\lg Q=0.842\ 9\ \lg t-0.890\ 3$, $R^2=0.980$	$\lg Q=0.594\ 1\ \lg t+0.861\ 1$, $R^2=0.962$	$\lg Q=0.832\ 9\ \lg t-0.881\ 4$, $R^2=0.988$	$\lg Q=0.773\ 3\ \lg t-0.765\ 6$, $R^2=0.985$

表 4 游离姜黄素、C-B-NP、C-NP 在 24、48、72 h 时 A549 细胞的细胞存活率 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)
Table 4 Cell survival rate of A549 cells by free curcumin, C-B-NP and C-NP at 24, 48, 72 h ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

样品	24 h 时 A549 细胞存活率/%				
	5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
游离姜黄素	96.48 $\pm$ 2.73	80.27 $\pm$ 1.82	75.95 $\pm$ 1.05	56.74 $\pm$ 1.21	40.97 $\pm$ 1.13
C-B-NP	99.62 $\pm$ 2.57	86.63 $\pm$ 2.26	82.56 $\pm$ 2.34	69.92 $\pm$ 1.97	49.47 $\pm$ 1.56
C-NP	98.50 $\pm$ 2.19	83.42 $\pm$ 2.64	77.93 $\pm$ 1.33	60.61 $\pm$ 1.49	42.31 $\pm$ 1.24***
样品	48 h 时 A549 细胞存活率/%				
	5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
游离姜黄素	85.98 $\pm$ 2.86	71.23 $\pm$ 2.44	65.44 $\pm$ 1.35	56.38 $\pm$ 1.27	23.56 $\pm$ 2.11
C-B-NP	95.37 $\pm$ 3.17	83.75 $\pm$ 2.43	79.33 $\pm$ 2.66	64.48 $\pm$ 2.11	28.91 $\pm$ 1.48
C-NP	92.21 $\pm$ 2.59	76.73 $\pm$ 2.17	69.05 $\pm$ 1.94	58.38 $\pm$ 1.65	24.48 $\pm$ 1.27**
样品	72 h 时 A549 细胞存活率/%				
	5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
游离姜黄素	81.18 $\pm$ 3.25	63.48 $\pm$ 2.14	51.57 $\pm$ 1.53	42.62 $\pm$ 1.29	10.07 $\pm$ 1.64
C-B-NP	82.26 $\pm$ 1.55	75.31 $\pm$ 2.35	68.45 $\pm$ 3.11	59.27 $\pm$ 1.23	15.98 $\pm$ 1.84
C-NP	80.34 $\pm$ 2.34	70.47 $\pm$ 2.53	66.92 $\pm$ 2.62	54.26 $\pm$ 2.08	12.33 $\pm$ 1.39***

与 C-B-NP 组比较: ** $P<0.01$ *** $P<0.001$

** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs C-B-NP group

唑环可以促进纳米颗粒从内涵体中逃逸。因此,通过激光共聚焦显微镜进一步研究了 C-NP 的胞内转运过程。将灭菌后的盖玻片放入 6 孔板中,以 2×10^5 个/孔的密度接种 A549 细胞。24 h 后弃去培养液,用 PBS 洗涤 3 遍,加入 FITC 标记的 C-NP 和 C-B-NP, 37 °C 下孵育 4 h。结束后用预冷的 PBS 洗涤 3 遍;随后,每孔加入 2 mL Lyso-Tracker Red,置于培养箱中染色 30 min, PBS 漂洗 3 遍;然后,每孔加入 2 mL 4% 多聚甲醛 PBS 溶液,在室温下固定 15

min, PBS 洗涤 3 遍;最后,用 2 mL Hoechst 室温染色 10 min,再用 PBS 洗涤 3 遍,将盖玻片取出,立起晾干,置于滴有数滴抗荧光淬灭封片液的载玻片上,固定,用 CLSM 观察。

结果如图 10 所示,在 C-NP 组进入细胞后,红色荧光(代表溶酶体)和绿色荧光(代表 FITC 标记的胶束)明显分离,这表明其主要分布在细胞质中,而 C-B-NP 组中红色荧光(代表溶酶体)和绿色荧光(代表 FITC 标记的胶束)基本重叠,表明其主要

表 5 游离姜黄素、C-B-NP 和 C-NP 在 24、48、72 h 对 A549 细胞的 IC_{50} ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 IC_{50} of free curcumin, C-B-NP and C-NP on A549 cells at 24, 48, 72 h ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	$IC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$		
	24 h	48 h	72 h
游离姜黄素	54.20 $\pm$ 1.59	32.81 $\pm$ 0.67	17.91 $\pm$ 2.41
C-B-NP	87.30 $\pm$ 3.41	48.75 $\pm$ 2.35	34.75 $\pm$ 2.56
C-NP	60.12 $\pm$ 2.98***	37.50 $\pm$ 2.37***	27.23 $\pm$ 1.58***

与 C-B-NP 组比较: *** $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs C-B-NP group

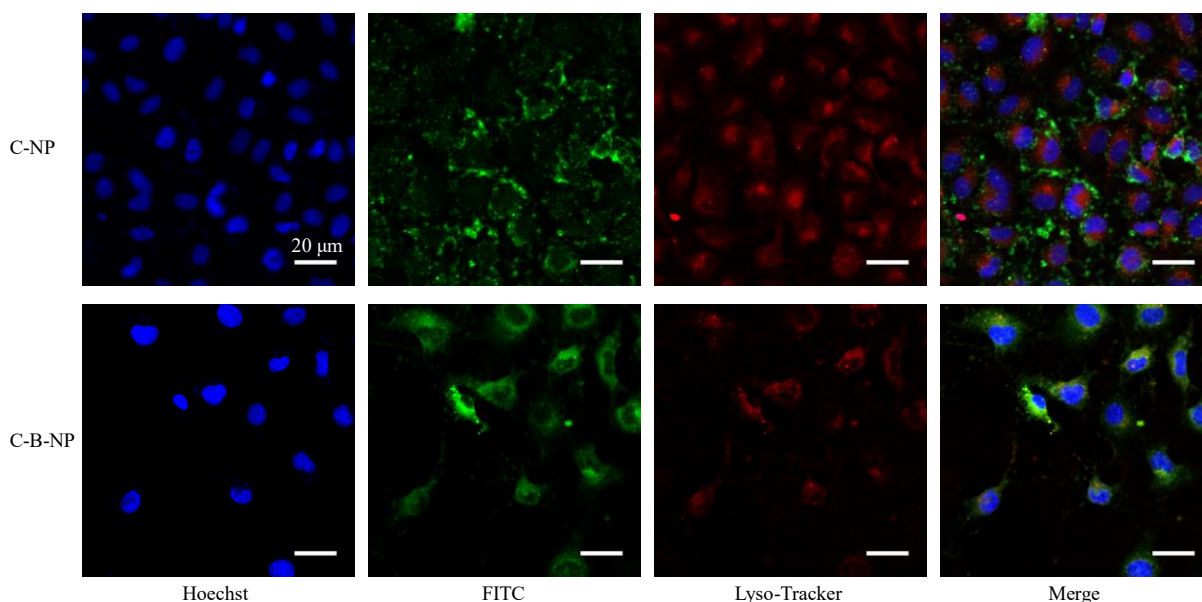


图 10 FITC 标记的 C-NP 和 C-B-NP 在 A549 细胞内的分布情况

Fig. 10 Cellular intracellular localization assay of FITC-labeled C-NP and C-B-NP after incubation with A549 cells

精密称取琼脂糖适量,加入不含血清的 1640 培养液,加热至 80 °C 充分溶解琼脂糖,灭菌后以每孔 80 μL 加入到 96 孔板中。将对数生长期的 A549 细胞按 2000 个/孔的密度接种于琼脂糖包被的孔板中,于 37 °C 培养箱中常规培养 1 周。

按照上述方法建立 A549 肿瘤球,接种 1 周后(记作第 0 天)显微镜下观察肿瘤球的形态与大小,取大小均匀、圆整致密的肿瘤球进行实验。加入游离姜黄素、C-NP、C-B-NP(用不含血清的 1640 培养液稀释至姜黄素最终质量浓度为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的孔作为实验组,仅加不含血清的 1640 培养液的孔作为空白对照组,在 37 °C 培养箱常规培养。每隔 3 d 弃去培养液,加入 100 μL 上述溶液。显微镜下观察并拍照。

如图 11 显示,空白对照组中(不含血清的 1640 培养液培养)肿瘤球体积随着孵育时间延长而变大,

分布在溶酶体中。这些结果也证实了 C-NP 可以在酸性溶酶体中快速分解,随后药物从溶酶体中逃逸而进入细胞质中。

2.4.7 肿瘤球生长抑制评价 目前,大多数肿瘤体外细胞实验使用的传统的单层平面培养,该方法培养的肿瘤细胞并未考虑到肿瘤内部微环境与细胞间的相互作用,与实际中肿瘤的生长环境差别较大。采用三维多细胞瘤球(3D-MTS)作为体外的渗透模型,其具有活体肿瘤组织的许多特征,存在延续的低氧细胞群,以及细胞的异质性^[28]等。

结构比较致密,这表明肿瘤细胞仍在增殖。然而,肿瘤球的生长可以被 C-NP 或 C-B-NP 抑制,这表明了纳米药物对肿瘤细胞增殖的抑制作用。特别是与 C-B-NP 组相比,C-NP 组的细胞毒性更明显,使用 C-NP 处理的三维多细胞瘤球在实验结束时失去三维结构。这些结果表明,pH 敏感 C-NP 纳米胶束可以释放姜黄素,然后深入到三维多细胞瘤球的核心区域,进一步导致三维多细胞瘤球中的肿瘤细胞被清除。

2.4.8 体内抗 NSCLC 药效研究 为了进一步研究 C-NP 体内的抗肿瘤治疗效果,本实验评估了其对于 A549 皮下瘤裸鼠的肿瘤生长抑制作用。将 A549 细胞接种于 BALB/c 裸鼠右前肢腋下皮下,构建 NSCLC 皮下移植瘤模型,如图 12 所示,已成功接种。待肿瘤体积长到 100 mm^3 左右。将荷瘤小鼠随机分成 4 组,分别为对照组、姜黄素组、C-B-NP 组

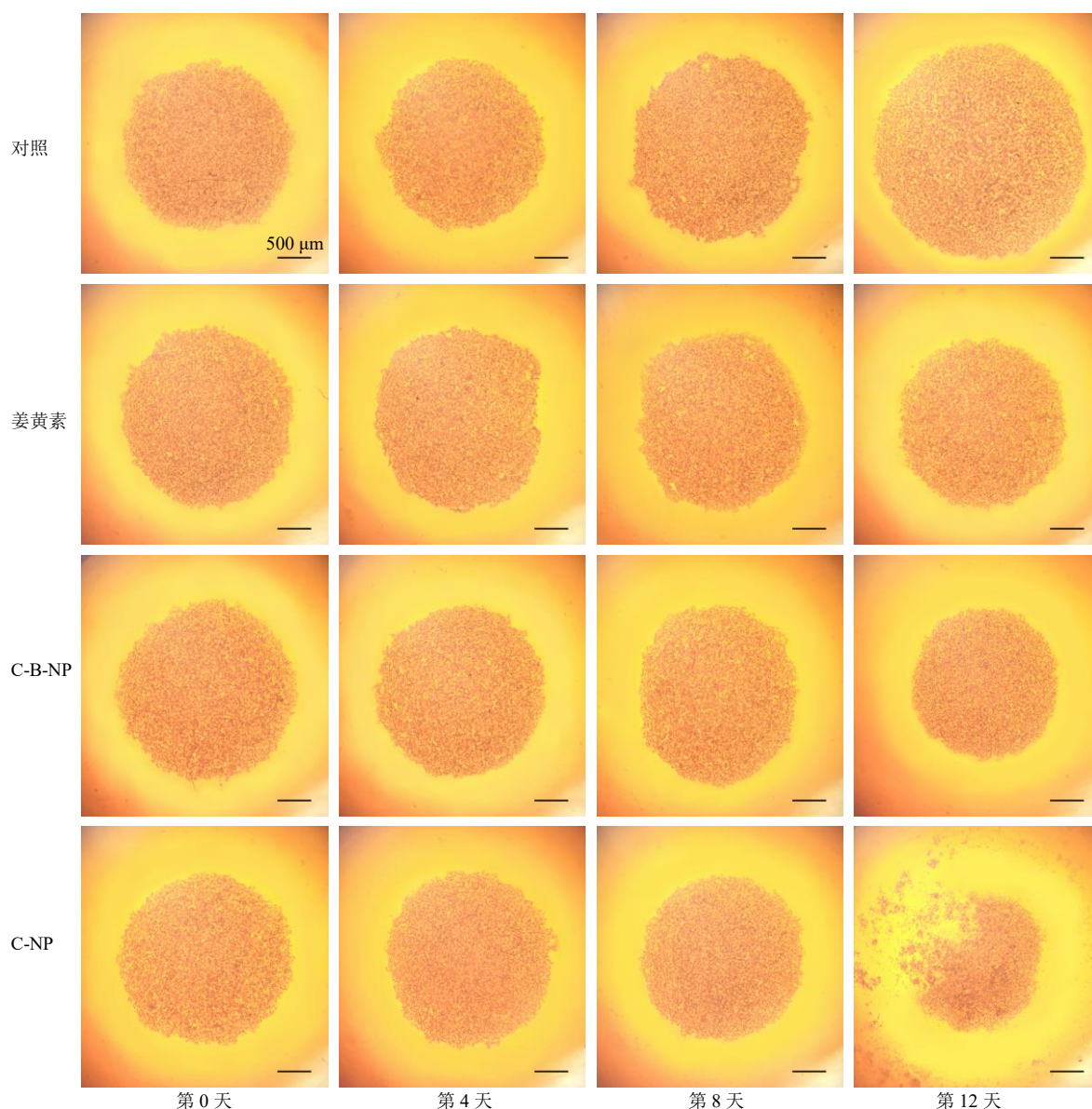


图 11 分别于第 0、3、6 天用无血清 1640、姜黄素、C-B-NP 和 C-NP 共孵育后的 A549 肿瘤球在第 0、4、8、12 天的形貌
Fig. 11 Morphology of A549 tumor spheres on day 0, 4, 8, 12 after co-incubation with serum-free 1640, curcumin, C-B-NP and C-NP on day 0, 3, 6, respectively



图 12 小鼠成功接瘤的图像

Fig. 12 Images of successful tumor grafting in mice

和 C-NP 组，每组 6 只，分别于第 0、3、6 天通过尾 iv 生理盐水、姜黄素、C-B-NP 和 C-NP，姜黄素的给药剂量为 25 mg/kg。瘤体生长过程中，每 3 天用游标卡尺测量 2 个维度的肿瘤直径，称量小鼠的体质量，绘制小鼠体质量变化曲线。用游标卡尺测量瘤体长、短径，按公式计算肿瘤体积。

$$\text{肿瘤体积} = 0.5 \times \text{长径} \times \text{短径}^2$$

实验结束时所有小鼠均颈椎脱臼处死，取出肿瘤组织并称定质量，按公式计算各实验组的抑瘤率。

$$\text{抑瘤率} = (\text{对照组瘤体平均质量} - \text{实验组瘤体平均质量}) / \text{对照组瘤体平均质量}$$

由表 6 可以发现，除了游离药物治疗组中小鼠

体质量明显减轻外, 其余组在治疗过程中没有观察到明显体质量变化。

如表 7、8 所示, 通过监测肿瘤体积、肿瘤质量, C-NP 组在所有组中表现出最高的肿瘤生长抑制

率, 肿瘤质量 C-NP 组与对照组、姜黄素组、C-B-NP 组均显著性降低, 具有统计学差异 ($P < 0.01$ 、 0.001), 表明 C-NP 对于皮下瘤的生长有一定的抑制作用。

表 6 各组小鼠体质量变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 6 Weight changes of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

样品	体质量/g					
	0 h	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d
对照	17.98 $\pm$ 0.61	18.14 $\pm$ 0.69	19.49 $\pm$ 0.92	17.96 $\pm$ 0.61	18.89 $\pm$ 0.53	18.68 $\pm$ 0.54
姜黄素	18.92 $\pm$ 0.71	17.03 $\pm$ 0.81	17.66 $\pm$ 0.97	17.03 $\pm$ 0.89	16.94 $\pm$ 0.46***	16.19 $\pm$ 0.71***
C-B-NP	18.92 $\pm$ 0.80	17.52 $\pm$ 0.72	17.67 $\pm$ 0.48	17.41 $\pm$ 0.66	17.90 $\pm$ 0.83	19.16 $\pm$ 0.59
C-NP	18.98 $\pm$ 0.40	18.23 $\pm$ 0.62	17.87 $\pm$ 0.33	18.17 $\pm$ 0.89	17.76 $\pm$ 0.77	17.63 $\pm$ 0.64

与对照组比较: *** $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs control group

表 7 各组小鼠肿瘤体积变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 7 Changes in tumor volume of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

样品	肿瘤体积/mm ³					
	0 d	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d
对照	101.42 $\pm$ 4.88	163.28 $\pm$ 16.99	266.60 $\pm$ 31.26	373.88 $\pm$ 26.84	471.03 $\pm$ 45.91	590.90 $\pm$ 49.80***
姜黄素	103.86 $\pm$ 14.06	143.71 $\pm$ 12.66	175.31 $\pm$ 19.56	267.34 $\pm$ 33.87	335.19 $\pm$ 39.92	426.57 $\pm$ 33.88**
C-B-NP	98.20 $\pm$ 12.89	142.74 $\pm$ 17.96	187.62 $\pm$ 23.64	271.67 $\pm$ 28.84	318.70 $\pm$ 32.86	366.50 $\pm$ 28.47**
C-NP	104.93 $\pm$ 15.09	133.43 $\pm$ 15.22	173.71 $\pm$ 14.97	256.68 $\pm$ 26.56	297.70 $\pm$ 29.61	329.43 $\pm$ 29.28

与 C-NP 组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 表 8 同

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs C-NP group, same as table 8

表 8 各组肿瘤质量及抑制率 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 8 Tumor mass and inhibition rate of each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	瘤体质量/g	抑瘤率/%
对照	0.57 $\pm$ 0.04***	—
姜黄素	0.47 $\pm$ 0.02***	17.54
C-B-NP	0.27 $\pm$ 0.02**	52.63
C-NP	0.13 $\pm$ 0.01	77.19

2.5 数据统计与分析

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 20.0 统计软件, 两组间比较用 t 检验, 各组间数据的比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 以 $P < 0.01$ 和 $P < 0.001$ 为差异有统计学意义。所有数据图片由 Graphpad Prism 和 Origin 9.0 绘图软件绘制。

3 讨论

本实验通过 mPEG₂₀₀₀-NH₂ 与 BLA-NCA 发生开环聚合反应成功制备了聚合物载体, 以姜黄素为模型药物, 通过透析法制备了包载 pH 敏感聚合物的胶束 C-NP。其外观圆整, 大小比较均匀, 表面光

滑。其粒径在 160 nm 左右, ζ 电位为 (-5.24 ± 0.42) mV, 包封率为 (88.46 ± 3.28)%, 载药量为 (5.27 ± 0.14)%。该胶束的 CMC 为 $4.82 \mu\text{g/mL}$, 可保证其在体液稀释的情况下稳定存在。体外释放实验和敏感性实验表明该胶束在酸性环境下能够快速释放药物, 具 pH 敏感特性, 其释放符合 Higuchi 方程。稳定性实验表明不论是 C-B-NP 还是 C-NP 均有较好的稳定性。

细胞毒性实验结果显示 C-NP 对 A549 细胞的毒性呈现浓度依赖性和时间依赖性, 从 IC₅₀ 值看, 与 C-B-NP 组相比, C-NP 组对 A549 细胞具有更强的细胞毒性。细胞共定位实验表明 C-NP 可以在酸性溶酶体环境中快速分解, 释放抗肿瘤药物。肿瘤球生长抑制实验中, 从肿瘤球的外观来看, C-NP 对肿瘤球的抑制作用更强。

在药效学实验中, 本实验同时监测各组小鼠的体质量、肿瘤大小作为一种间接的系统毒性指标。结果表明, 在这些治疗剂量下, C-NP 和 C-B-NP 组相对安全, 这一现象可以归因于 C-NP 的综合作用,

包括长循环, EPR 效应, 程序化的药物释放。与游离药物组和 C-B-NP 相比, C-NP 组具有更强的抗肿瘤治疗潜力。

综上所述, 本实验成功制备了包载 pH 敏感聚合物的胶束 C-NP, 构建了 pH 响应型的纳米递药系统。通过体内外生物学评价证明了 C-NP 可以显著增强抗肿瘤活性。此外, 本实验充分说明 pH 敏感控释纳米递药系统在临床使用上具有很大的应用潜力, 它不仅仅可以搭载姜黄素还可以搭载其他药物甚至可以在未来搭载多种药物的不同组合, 有望于在未来广泛应用于各种疾病的治疗。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Wagle N S, *et al.* Cancer statistics, 2023 [J]. *CA A Cancer J Clinicians*, 2023, 73(1): 17-48.
- [2] Russell É, Conroy M J, Barr M P. Harnessing natural killer cells in non-small cell lung cancer [J]. *Cells*, 2022, 11(4): 605.
- [3] Xie H Y, Yao J, Wang Y X, *et al.* Exosome-transmitted circVMP1 facilitates the progression and cisplatin resistance of non-small cell lung cancer by targeting miR-524-5p-METTL3/SOX2 axis [J]. *Drug Deliv*, 2022, 29(1): 1257-1271.
- [4] Lian G Y, Wan Y P, Mak T S K, *et al.* Self-carried nanodrug (SCND-SIS₃): A targeted therapy for lung cancer with superior biocompatibility and immune boosting effects [J]. *Biomaterials*, 2022, 288: 121730.
- [5] Liu X, Liu Y, Guo Y J, *et al.* Metabolizable pH/H₂O₂ dual-responsive conductive polymer nanoparticles for safe and precise chemo-photothermal therapy [J]. *Biomaterials*, 2021, 277: 121115.
- [6] Ma M C, Chen Y F, Zhao M D, *et al.* Hierarchical responsive micelle facilitates intratumoral penetration by acid-activated positive charge surface and size contraction [J]. *Biomaterials*, 2021, 271: 120741.
- [7] 单晓甜, 毛静, 邱立朋, 等. pH 敏感聚合物胶束的制备及体外抗肿瘤活性研究 [J]. *中国新药杂志*, 2020, 29(7): 810-815.
- [8] Yuan Y, Liu J, Yu X N, *et al.* Tumor-targeting pH/redox dual-responsive nanosystem epigenetically reverses cancer drug resistance by co-delivering doxorubicin and GCN5 siRNA [J]. *Acta Biomater*, 2021, 135: 556-566.
- [9] Du T T, Wang Y C, Luan Z Y, *et al.* Tumor-associated macrophage membrane-camouflaged pH-responsive polymeric micelles for combined cancer chemotherapy-sensitized immunotherapy [J]. *Int J Pharm*, 2022, 624: 121911.
- [10] 郝单丽, 王杰, 谢冉, 等. pH 敏感多西紫杉醇纳米胶束的制备及其增强小鼠的抑瘤活性研究 [J]. *药学学报*, 2020, 55(8): 1914-1922.
- [11] 王琪, 朱嘉, 贾莉, 等. pH/氧化还原双敏感聚合物的合成与 siRNA 复合胶束的制剂学性质 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2019, 36(7): 570-579.
- [12] Niu Y M, Zhu J H, Li Y, *et al.* Size shrinkable drug delivery nanosystems and priming the tumor microenvironment for deep intratumoral penetration of nanoparticles [J]. *J Control Release*, 2018, 277: 35-47.
- [13] Zhu J H, Huo Q, Xu M, *et al.* Bortezomib-catechol conjugated prodrug micelles: Combining bone targeting and aryl boronate-based pH-responsive drug release for cancer bone-metastasis therapy [J]. *Nanoscale*, 2018, 10(38): 18387-18397.
- [14] Maleki Dizaj S, Alipour M, Dalir Abdolahinia E, *et al.* Curcumin nanoformulations: Beneficial nanomedicine against cancer [J]. *Phytother Res*, 2022, 36(3): 1156-1181.
- [15] Wang J N, Wang F H, Li F Z, *et al.* A multifunctional poly(curcumin) nanomedicine for dual-modal targeted delivery, intracellular responsive release, dual-drug treatment and imaging of multidrug resistant cancer cells [J]. *J Mater Chem B*, 2016, 4(17): 2954-2962.
- [16] Bagheri M, Fens M H, Kleijn T G, *et al.* *In vitro* and *in vivo* studies on HPMA-based polymeric micelles loaded with curcumin [J]. *Mol Pharm*, 2021, 18(3): 1247-1263.
- [17] 朱晨, 刘东, 张程亮, 等. 姜黄素及其类似物辅助奥沙利铂治疗的研究进展 [J]. *中国医院药学杂志*, 2020, 40(21): 2284-2288.
- [18] 单秋杰, 詹小兰, 李玉. 姜黄素-聚甲基丙烯酸甲酯纳米粒子的制备及对肺癌 A549 细胞的影响 [J]. *医药导报*, 2020, 39(5): 682-686.
- [19] Zhang L F, Tao X Y, Fu Q F, *et al.* Curcumin inhibits cell proliferation and migration in NSCLC through a synergistic effect on the TLR4/MyD88 and EGFR pathways [J]. *Oncol Rep*, 2019, 42(5): 1843-1855.
- [20] D'Angelo N A, Noronha M A, Kurnik I S, *et al.* Curcumin encapsulation in nanostructures for cancer therapy: A 10-year overview [J]. *Int J Pharm*, 2021, 604: 120534.
- [21] Kavithaa K, Paulpandi M, Ramya S, *et al.* Sitosterol-fabricated chitosan nano complex induces apoptotic cell death through mitochondrial dysfunction in lung cancer animal model: An enhanced synergetic drug delivery system for lung cancer therapy [J]. *New J Chem*, 2021, 45(20): 9251-9263.
- [22] Wu T, Xiao H, Lu L J, *et al.* Polymeric vector-mediated targeted delivery of anti-PAK1 siRNA to macrophages for

- efficient atherosclerosis treatment [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2019, 5(9): 4455-4462.
- [23] Shi H H, Xu M, Zhu J H, *et al*. Programmed co-delivery of platinum nanodrugs and gemcitabine by a clustered nanocarrier for precision chemotherapy for NSCLC tumors [J]. *J Mater Chem B*, 2020, 8(2): 332-342.
- [24] López-Cano J J, Sigen A, Andrés-Guerrero V, *et al*. Thermo-responsive PLGA-PEG-PLGA hydrogels as novel injectable platforms for neuroprotective combined therapies in the treatment of retinal degenerative diseases [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(2): 234.
- [25] 杜煌, 常达, 唐二军, 等. 离子液体中 ATRP 合成 MCC-g-PMAA 及其分子对阿司匹林控释的应用 [J]. 化工学报, 2016, 67(S2): 164-170.
- [26] 姜珊珊, 贾卫茹, 王健, 等. 基于分子对接技术的三元混合胶束对多西他赛的增溶效应及安全性 [J]. 沈阳药科大学学报, 2021, 38(1): 13-20.
- [27] Zhang X J, Chen D W, Ba S A, *et al*. Poly(l-histidine) based triblock copolymers: pH induced reassembly of copolymer micelles and mechanism underlying endolysosomal escape for intracellular delivery [J]. *Biomacromolecules*, 2014, 15(11): 4032-4045.
- [28] Rosales C I, Zhao J, Gutgesell L M, *et al*. Three-dimensional treatment-resistant breast cancer spheroids as a predictive model of *in vivo* response to endocrine therapy [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(13 Suppl): 3738-3748.

[责任编辑 郑礼胜]

• 公益广告 •

