

紫杉醇还原敏感型聚合物胶束的制备及其逆转肿瘤多药耐药的研究

张梦欣, 于英杰, 董 优, 宋 煜*

福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122

摘 要: **目的** 合成还原敏感型透明质酸-熊果酸聚合物(hyaluronic acid-cystamine-ursolic acid, HSU)和非还原敏感型透明质酸-熊果酸聚合物(hyaluronic acid-ursolic acid, HU), 包载紫杉醇制备成聚合物胶束(PTX-HSU 和 PTX-HU), 对二者的逆转肿瘤多药耐药性进行研究。**方法** 通过傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)、氢核磁共振波谱(hydrogen nuclear magnetic resonance spectroscopy, ^1H -NMR)法对 HSU 和 HU 进行表征; 通过差示扫描量热(differential scanning calorimetry, DSC)和 X 射线衍射(X-ray diffraction, XRD)法对 PTX-HSU 进行物相鉴定; 通过体外释放实验考察 PTX-HSU 和 PTX-HU 的体外释放行为; 选择人乳腺癌细胞 MCF-7 和人乳腺癌紫杉醇耐药细胞株 MCF-7/ADR 细胞为细胞模型, 通过噻唑蓝比色法(MTT)实验、细胞摄取实验以及胞内谷胱甘肽(glutathione, GSH)测定实验, 对 HSU 逆转肿瘤多药耐药(multidrug resistance, MDR)进行研究。**结果** 通过 FT-IR、 ^1H -NMR 表征证明了 HSU 和 HU 的成功合成; DSC、XRD 图谱说明紫杉醇以分子状态或无定形存在于 HSU 胶束骨架中; 体外释药实验中 PTX-HSU 在 3 h 内快速释放高达 80% 的紫杉醇, 展现出还原响应快速释药性能; MTT 实验表明载药胶束均呈现浓度依赖性的细胞毒性, 其中 PTX-HSU 呈现出一定的 MDR 逆转效果; 细胞摄取实验表明 MCF-7/ADR 对 HSU 展现出更多的摄取量, 胞内 GSH 测定实验表明 HSU 降低了 MCF-7/ADR 细胞内的 GSH 表达水平($P < 0.001$)。**结论** PTX-HSU 作为还原敏感型聚合物胶束可通过增加细胞摄取量、下调胞内 GSH 表达水平以实现逆转 MCF-7/ADR 细胞的多药耐药性。

关键词: 还原敏感型; 聚合物胶束; 逆转肿瘤多药耐药性; 熊果酸; 紫杉醇; 主动靶向; 透明质酸

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)24-8055-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.24.010

Preparation of paclitaxel-loaded reduction-sensitive polymer micelles and their reversal effect on multidrug resistance in tumor

ZHANG Meng-xin, YU Ying-jie, DONG You, SONG Yu

School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

Abstract: Objective To synthesize reduction-sensitive hyaluronic acid-cystamine-ursolic acid (HSU) and non-reduction-sensitive hyaluronic acid-ursolic acid (HU), prepare paclitaxel-loaded polymeric micelles (PTX-HSU and PTX-HU), investigate the reversal effect on tumor multidrug resistance (MDR) of the polymeric micelles. **Methods** HSU and HU were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and hydrogen nuclear magnetic resonance spectroscopy (^1H -NMR). The phase identification of PTX-HSU was carried out by differential scanning calorimetry (DSC) and X-ray diffraction (XRD). The *in vitro* release behavior of PTX-HSU and PTX-HU was investigated by *in vitro* release assay. Human breast cancer cell MCF-7 and human breast cancer paclitaxel resistant cell line MCF-7/ADR were selected as cell models, and thiazole blue colorimetry (MTT) assay, cell uptake assay and intracellular glutathione (GSH) assay were performed to investigate the reversal effect of multidrug resistance in HSU. **Results** The synthesis of HSU and HU was verified by FT-IR and ^1H -NMR. DSC and XRD patterns indicated that paclitaxel existed in the HSU micelle skeleton in the molecular state or amorphous form. It was observed that more than 80% of paclitaxel in PTX-HSU was released during three hours in the assay of drug release *in vitro*, which showed a reductive-responsive rapid drug release behavior. The drug-loaded polymeric micelles showed concentration-dependent cytotoxicity by the MTT assay, and PTX-HSU showed a certain reversal

收稿日期: 2023-06-14

基金项目: 福建省科技厅引导性项目(2020Y0051); 福建中医药大学校管科研平台专项资助项目(X2018002-重点); 福建省中药学重点实验室开放课题资助项目(X2018005)

作者简介: 张梦欣, 硕士研究生, 主要从事药物新制剂与新剂型的研究。E-mail: zmx1015093@163.com

*通信作者: 宋 煜, 博士, 硕士研究生导师, 主要从事药物新制剂与新剂型的研究。Tel: (0591)22861135 E-mail: songecho@163.com

effect of MDR. The cellular uptake of PTX-HSU *in vitro* was examined in MCF-7/ADR cells by flow cytometry, which assay demonstrated that MCF-7/ADR exhibited increased uptake of HSU. The intracellular GSH assay showed that HSU decreased the expression of GSH in MCF-7/ADR cells ($P < 0.001$). **Conclusion** As a reduction-sensitive polymeric micelle, PTX-HSU can be used to reverse multidrug resistance in MCF-7/ADR cells by increasing cellular uptake and down-regulating intracellular GSH expression.

Key words: reduction sensitive type; polymer micelle; reverse tumor multidrug resistance; ursolic acid; paclitaxel; active targeting; hyaluronic acid

目前,化疗仍是临床治疗乳腺癌的主要方式之一^[1-4]。临床研究表明,多药耐药(multidrug resistance, MDR)的存在是造成化疗失败和肿瘤复发的主要原因^[5-10]。MDR^[11]是指癌细胞因接触一种化疗药物产生耐药性的同时,对其他多种不同结构、不同作用机制的化疗药物同样存在耐药性。研究表明,乳腺癌MDR是多种细胞机制共同作用的结果,主要作用机制包括跨膜蛋白过度表达^[12]、谷胱甘肽及其酶系统^[13]、凋亡基因表达异常^[14]、药物作用靶点改变^[15]等,致使癌细胞对化疗药摄取量减少、外排量增加以及增加了对化疗药凋亡作用的抗性等。基于乳腺癌MDR的病理特征,只考虑一种因素无法解决化疗过程中出现的耐药性问题,因此只有从多途径、多因素、多靶点、多角度上进行逆转才可以更好地寻求合理的解决方案。

本研究所合成聚合物胶束载体还原敏感型透明质酸-熊果酸聚合物(hyaluronic acid-cystamine-ursolic acid, HSU)中的熊果酸除自身具有明显的抗肿瘤活性外,还具有多靶点逆转MDR的功能^[16];透明质酸作为CD44配体,可通过乳腺癌细胞表面过度表达CD44受体进而介导促进药物细胞内吞^[17];与正常生理环境相比,肿瘤环境下的谷胱甘肽(glutathione, GSH)浓度高至100~1000倍,而二硫键连接臂所构建的还原敏感型胶束能够在肿瘤微环境高还原响应下快速释放化疗药物进而减少药泵外排^[18]。因此,本研究联合以上3种策略所构建的还原敏感型载体用于递送化疗药紫杉醇,考察PTX-HSU的体外释放行为,并对该载药胶束的细胞毒性、细胞摄取和胞内GSH进行研究,以期实现逆转乳腺癌多药耐药性的目标。

1 仪器与材料

1.1 仪器

JY92-2D型超声波细胞破碎仪,宁波新芝生物科技公司;Alpha1-2 LD plus型冷冻干燥机,德国Christ公司;Nicolet iS5型傅里叶变换红外光谱仪,赛默飞世尔科技公司;Nicomp™ 380ZLS型激光粒径测定仪(DLS),美国Santa Barbara公司;Avance

III 500型核磁共振波谱仪,瑞士Bruker公司;H7650型透射电子显微镜(TEM),日本日立公司;DKZ系列电热恒温振荡水槽,上海一恒科技公司;Infinite M200 PRO型酶标仪,瑞士Tecan公司;LC 2030型高效液相色谱仪,岛津公司;DMi8-M型倒置荧光显微镜,德国Christ公司。

1.2 材料

熊果酸(批号F1928106,质量分数≥98%)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS,质量分数≥98%)、碳二亚胺盐酸盐(EDC,质量分数≥98%)、己二酸二酰肼(ADH,质量分数≥98%)、甲酰胺(分析纯)、二甲基亚砜(DMSO,分析纯)、二甲基甲酰胺(DMF,分析纯),阿拉丁生化科技公司;紫杉醇,批号902-1812401,质量分数≥98%,福建南方制药股份有限公司;胱胺二盐酸盐(CYS),质量分数≥97%,梯希爱化成工业发展公司;透明质酸,相对分子质量9850,江苏海华生物科技有限公司;透析袋,截留相对分子质量(M_{wco})3500,上海源叶生物科技有限公司;RMPI 1640基础培养基、胎牛血清, Gibco公司;MTT、香豆素-6(coumarin-6, C6,质量分数98%), Sigma公司。

1.3 细胞

人乳腺癌紫杉醇敏感细胞株MCF-7细胞、人乳腺癌紫杉醇耐药细胞株MCF-7/ADR细胞,上海艾研生物科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 HSU与HU的合成

合成路径如图1所示。本实验将熊果酸和透明质酸中的-COOH通过酰胺化反应分别连接在CYS或ADH两端的-NH₂上,得到具有还原敏感型的HSU和非还原敏感型的HU。

2.1.1 HSU的合成 称取透明质酸(0.8 mmol)置烧瓶中,甲酰胺溶解,加入EDC(1.6 mmol)和NHS(1.6 mmol),冰浴0.5 h,加入CYS(8 mmol),搅拌反应24 h后,冰丙酮沉淀、抽滤,适量水复溶,0.8 μm微孔滤膜滤过,超纯水透析(M_{wco} 3500)48 h后,冷冻干燥,即得HA-CYS纯品。

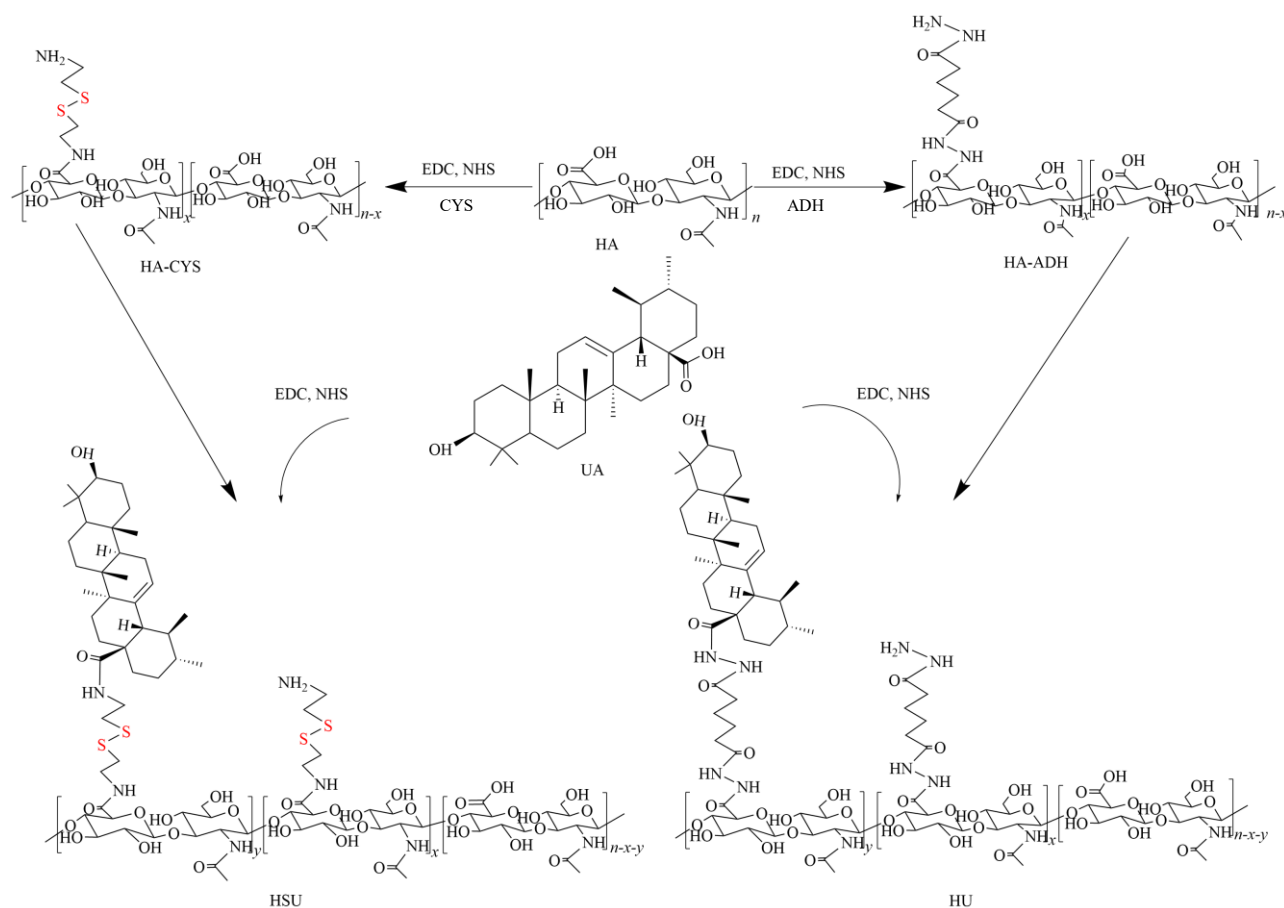


图 1 HSU/HU 的合成路径图

Fig. 1 Synthesis path diagram of HSU/HU

称取熊果酸 (0.1 mmol), 置烧瓶中, 30 mL DMF-甲酰胺 (1:1) 混合溶剂溶解, 加入 EDC (0.7 mmol) 和 NHS (0.7 mmol), 冰浴 4 h, 加入 HA-CYS (0.2 mmol), 室温反应 24 h 后, 冰丙酮沉淀, 抽滤, 适量水复溶后, 离心, 上清液 0.8 μm 膜滤过, 超纯水透析 (M_{wco} 3500) 48 h 后, 冷冻干燥, 即得 HSU 纯品。

2.1.2 HU 的合成 称取透明质酸 (0.8 mmol) 置烧瓶中, 超纯水溶解, 加入 EDC (1.6 mmol) 和 ADH (7.5 mmol), 冰浴 1 h, 室温下保持 pH 4.75 反应 2 h, 调节反应溶液至 pH 7.0, 0.8 μm 微孔滤膜滤过, 超纯水透析 (M_{wco} 3500) 48 h 后, 冷冻干燥, 即得 HA-ADH 纯品。

称取熊果酸 (0.5 mmol), 置烧瓶中, 40 mL DMF-甲酰胺混合溶剂溶解, 加入 EDC (4.6 mmol) 和 NHS (4.6 mmol), 冰浴 4 h, 加入 0.1 g HA-ADH, 室温反应 24 h 后, 冰丙酮沉淀, 抽滤, 适量水复溶后, 离心, 上清液 0.8 μm 膜滤过, 超纯水透析 (M_{wco} 3500) 48 h 后, 冷冻干燥, 即得 HU 纯品。

2.2 结构表征

2.2.1 FT-IR 分析 分别称取透明质酸、HA-CYS、HA-ADH、HU 和 HSU 适量, KBr 压片法, FT-IR 表征结构。HSU、HU 及反应原料的 FT-IR 图谱如图 2 所示。1618 cm^{-1} 和 1715 cm^{-1} 两处吸收峰分别是透明质酸和熊果酸结构中 $-\text{COOH}$ 的对称伸缩振动峰 ($\nu_{\text{C=O}}$); 而在 HSU 与 HU 图谱中, 并未出现熊果酸

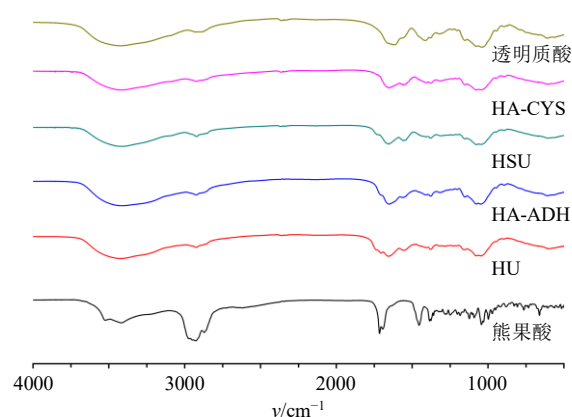


图 2 合成原料及聚合物 FT-IR 图

Fig. 2 FT-IR diagram of synthetic materials and polymers

的特征峰, 推测其已被掩盖, 熊果酸经反应已生成新键; HA-CYS 图谱中 1653 、 1558 cm^{-1} 处吸收峰和 HA-ADH 图谱中 1644 、 1559 cm^{-1} 处吸收峰分别对应酰胺键对称伸缩振动峰 ($\nu_{\text{C=O}}$, 酰胺 I 带) 和面内弯曲振动峰 ($\beta_{\text{C=O}}$, 酰胺 II 带), 证明 HA-CYS 和 HA-ADH 的成功合成; 根据 HSU 图谱中 1653 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$, 酰胺 I 带)、 1558 cm^{-1} ($\beta_{\text{C=O}}$, 酰胺 II 带) 和 HU 图谱中 1646 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$, 酰胺 I 带)、 1541 cm^{-1} ($\beta_{\text{C=O}}$, 酰胺 II 带) 处出现酰胺键特征峰, 推测 HSU 图谱和 HU 图谱中出现的酰胺键可能为熊果酸与 2 中间体反应生成的新酰胺键吸收峰, 但与原来中间体酰胺键吸收峰重叠。为证实 HSU 和 HU 合成成功, HSU 和 HU 的结构需要通过 $\text{H}^1\text{-NMR}$ 进一步表征。

2.2.2 $\text{H}^1\text{-NMR}$ 分别将适量透明质酸、HA-CYS、HA-ADH、HSU 和 HU 溶于 D_2O , 熊果酸溶于 $\text{DMSO-}d_6$, $\text{H}^1\text{-NMR}$ 表征结构, 并计算 CYS、ADH 以及熊果酸的取代度 (degree of substitution, DS, 定义为每 100 个透明质酸单体上 CYS 和 ADH 的嫁接个数)。HSU (D_2O)、HU (D_2O) 及反应原料透明质酸 (D_2O)、HA-CYS (D_2O)、HA-ADH (D_2O)、熊果酸 ($\text{DMSO-}d_6$) 的 $\text{H}^1\text{-NMR}$ 图如图 3 所示。透明质酸特征峰出现在 $\delta 2.03$ (3H, $-\text{NH-CO-CH}_3$) 处和 $\delta 3.25\sim 4.78$ (2H- CH_2 -、H、-OH); 与透明质酸相比, 合成中间体 HA-CYS 和 HA-ADH 分别在 $\delta 2.84$ (2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ -, CYS 特征峰) 和 $\delta 1.69$ (2H, $-\text{NHNHCOCH}_2\text{CH}_2\text{-CH}_2$ -, ADH 特征峰)、 $\delta 2.18\sim 2.33$ (2H, $-\text{NHNHCOCH}_2\text{CH}_2$ -, ADH 特征峰) 处出现的吸收峰, 证明中间体合成成功, 与 FT-IR 结果一致。按照透明质酸 ($\delta 2.0$)、CYS ($\delta 2.9$) 和 ADH ($\delta 2.6$) 的特征峰面积, 计算出中间体 CYS 和 ADH 的 DS, 分别为 $(31.13\pm 1.13)\%$ 和 $(50.75\pm 2.63)\%$; 在此基础上, HSU $\text{H}^1\text{-NMR}$ 图在 $\delta 0.97\sim 1.10$ 、 $1.28\sim 1.29$ 和 HU $\text{H}^1\text{-NMR}$ 图在 $\delta 1.28\sim 1.29$ (HU $\text{H}^1\text{-NMR}$ 图中 $\delta 0.97\sim 1.10$ 处吸收峰由于磁各向异性的缘故, 向低场移动, 被 HA-ADH 中 $\delta 1.14$ 覆盖, 因此消失) 处出现的吸收峰归属于熊果酸角

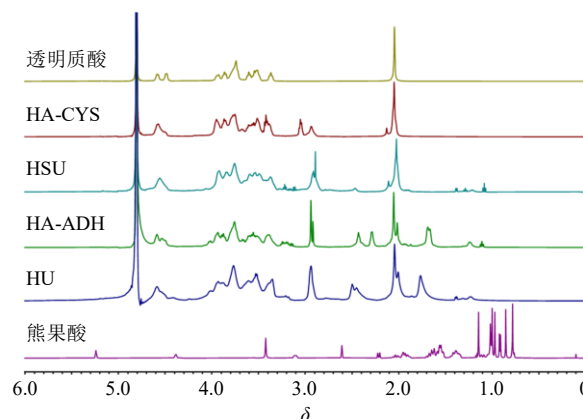


图 3 合成原料及聚合物的 $\text{H}^1\text{-NMR}$ 图

Fig. 3 $\text{H}^1\text{-NMR}$ diagram of synthetic materials and polymers

甲基的特征吸收峰, 结合 FT-IR 推测的结果, 判断熊果酸已成功接枝, HSU 和 HU 合成成功。通过熊果酸角甲基氢 ($\delta 1.28$) 与透明质酸中 N -乙酰基中甲基氢 ($\delta 2.0$) 的吸收峰面积比值, 计算出 HSU 和 HU 中熊果酸的取代度分别为 $(3.12\pm 0.17)\%$ 和 $(3.33\pm 0.47)\%$, 除了中间化学连接臂结构不同, 二者取代度相差不大, 因此, HU 可以做 HSU 的对比参照。

2.3 PTX-HSU 的制备

固定 HSU 载体投料量为 18 mg, 紫杉醇与 HSU 质量比为 1 : 1.8, 以粒径、多分散指数 (polydispersity index, PDI)、包封率、载药量为考察指标。精密称取 HSU 载体 18 mg, 加水 3 mL, 室温溶解 30 min, 逐滴滴加 25 mg/mL 的紫杉醇乙醇溶液 400 μL 于载体水溶液中, 剧烈搅拌 15 min, 冰浴探头超声 30 min, 重蒸水透析过夜, 0.8 μm 滤膜滤过, 即得载药胶束溶液。PTX-HU 同法可制得。

取 500 μL 胶束溶液稀释至 5 mL, 通过激光粒度测定仪分别测定 PTX-HSU 及 PTX-HU 的平均粒径、PDI 和 ζ 电位。结果见表 1。PTX-HSU 和 PTX-HU 胶束 ζ 电位稳定在 $-18\sim -20\text{ mV}$, 这是因为透明质酸结构中的 $-\text{COOH}$ 在水中解离为带负电荷 COO^- , 较大的 ζ 电位表明粒子间存在较大的斥力, 说明该胶束制剂物理稳定性良好。

表 1 粒径及分布、 ζ 电位 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 1 Particle size and distribution, ζ potential ($\bar{x}\pm s, n=3$)

样品	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV	载药量%	包封率%
PTX-HSU	152.8 ± 8.5	0.105 ± 0.010	-20.98 ± 3.44	33.11 ± 2.36	89.27 ± 9.52
PTX-HU	183.4 ± 3.7	0.176 ± 0.009	-18.69 ± 2.79	30.40 ± 1.90	85.00 ± 10.10

2.4 载药量与包封率的测定

精密量取 100 μL PTX-HSU 和 PTX-HU 胶束溶液，甲醇稀释定容至 10 mL，参照本研究前期所建立的方法学，采用 HPLC 法进行测定^[19]。

紫杉醇含量测定色谱条件：色谱柱为 Agilent 5 TC-C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)；流动相为甲醇-水 (75:25)；体积流量为 1 mL/min；进样量为 20 μL ；柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$ ；检测波长为 227 nm。分别按照以下公式计算紫杉醇的载药量和包封率。

载药量 = 物理包载于胶束中的紫杉醇质量 / 载药胶束总质量

包封率 = 物理包载于胶束中的紫杉醇质量 / 载药投入紫杉醇质量

所制备的 PTX-HSU 和 PTX-HU 均具有较高的紫杉醇包封率 (表 1)，分别为 (89.27 $\pm$ 9.52)% 和 (85.00 $\pm$ 10.10)%；同时具有良好的负载效果，其载药量分别为 (33.11 $\pm$ 2.36)% 和 (30.40 $\pm$ 1.90)%。

2.5 PTX-HSU 的物相鉴定

称取紫杉醇、HSU、紫杉醇与 HSU 的物理混合物 (含量比与 PTX-HSU 相同) 及 PTX-HSU 适量，分别进行 DSC 分析和 XRD 测试。

2.5.1 DSC 紫杉醇、HSU、紫杉醇与 HSU 物理混合物、PTX-HSU 冻干粉针的 DSC 图谱如图 4 所示。219.9 $^{\circ}\text{C}$ (吸热峰) 和 240.8 $^{\circ}\text{C}$ (放热峰) 分别为紫杉醇的熔融峰和降解峰，说明紫杉醇是以结晶态存在；241.3 $^{\circ}\text{C}$ 放热峰为 HSU 中修饰的熊果酸降解峰；紫杉醇的 2 个特征峰 (222.75、242.5 $^{\circ}\text{C}$) 出现在紫杉醇和 HSU 的物理混合物中，而未在 PTX-HSU 载药胶束图谱中出现；PTX-HSU 载药胶束图谱中仅出现了 HSU 中熊果酸的降解峰 (241.4 $^{\circ}\text{C}$)；说明紫杉醇可能以分子状态或无定形形式存在于 HSU 胶束骨架中。

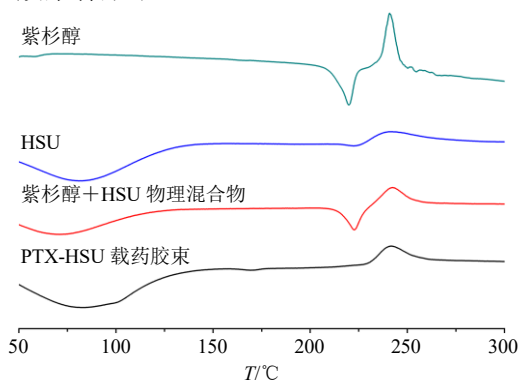


图 4 DSC 图谱

Fig. 4 DSC patterns

2.5.2 XRD 紫杉醇、HSU、紫杉醇与 HSU 物理混合物、PTX-HSU 载药胶束的 XRD 图谱如图 5 所示。XRD 图谱中 5 $^{\circ}$ 、9 $^{\circ}$ 和 12 $^{\circ}$ 处 3 个强吸收峰以及 15 $^{\circ}$ ~30 $^{\circ}$ 若干弱杂峰为紫杉醇特征峰；HSU 的 XRD 图谱在 5 $^{\circ}$ ~30 $^{\circ}$ 无任何吸收峰；紫杉醇与 HSU 物理混合物则在 XRD 图谱中出现了紫杉醇的特征峰，而 PTX-HSU 载药胶束图谱与 HSU 图谱相似，在 5 $^{\circ}$ ~30 $^{\circ}$ 无任何吸收峰。综合以上图谱数据，说明紫杉醇以分子状态或无定形存在于纳米胶束骨架中。

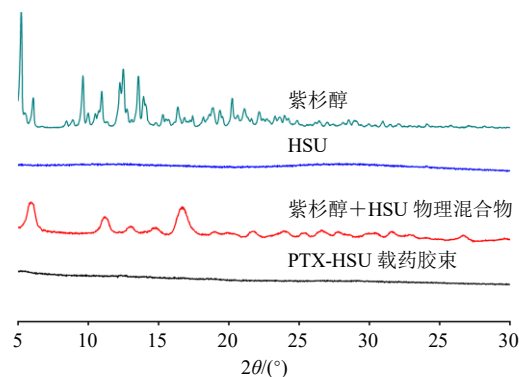


图 5 XRD 图谱

Fig. 5 XRD patterns

2.6 PTX-HSU 体外释药动力学考察

配制紫杉醇质量浓度为 0.5 mg/mL 的 PTX-HSU 和 PTX-HU 溶液，分别取 1 mL 置于透析袋 (M_{wco} 14 000) 内，放入 50 mL 含有不同 GSH 浓度 (0、10 mmol/L) 的水杨酸钠 (1 mol/L) 的 PBS (pH 7.4) 缓冲液中，100 r/min 恒定转速和 37 $^{\circ}\text{C}$ 温度下，考察紫杉醇制剂的体外释放特性。分别在 0、1、3、6、8、10、12 h 用相同体积的新鲜释放介质更新释放介质，HPLC 测定释放介质中的紫杉醇质量浓度，计算各取样时间点紫杉醇的累积释放量。

体外释药结果如图 6 所示。当 GSH 浓度为 0 mmol/L 时，PTX-HSU 和 PTX-HU 在 12 h 时累积释药量分别为 76.31% 和 67.24%，二者释药趋势一致，均无快速释药的趋势；而在 GSH 浓度为 10 mmol/L 时，PTX-HU 累积释放量仅为 61.17%，而 PTX-HSU 累积释放量则已经达到 89.18%；PTX-HU 载药胶束无论是 0 $\mu\text{mol/L}$ 或是 10 mmol/L 的 GSH 释放介质中，累积释放量相差不大；相对来说，PTX-HSU 在 0 $\mu\text{mol/L}$ 的 GSH 释放介质中的 12 h 累积释放量与 PTX-HU 释放趋势一致，但是在 10 mmol/L 的 GSH 释放介质中在 3 h 内释放量急剧增加，呈现出快速释放现象，推测原因可能是因为 HSU 分子结构中的二硫键被释放介质中的 GSH 切断，促使处于 PTX-

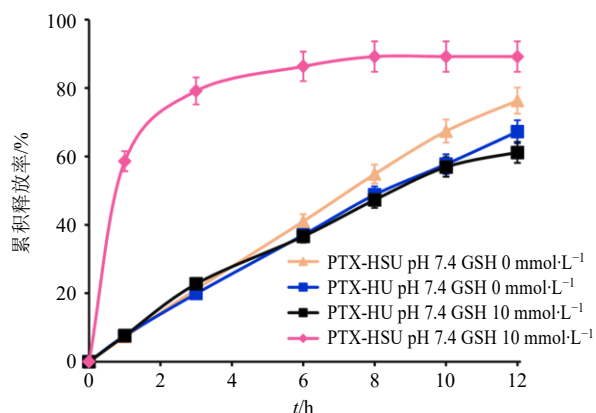


图 6 载药胶束的体外释放结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Results of *in vitro* release of drug loaded micelles ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

HSU 载药胶束核心的紫杉醇快速释放, 证明 HSU 具有还原响应快速释药的能力。

2.7 体外逆转耐药

MCF-7 和 MCF-7/ADR 细胞分别以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板, 细胞贴壁 24 h 后, 弃去培养基,

不同紫杉醇质量浓度 (0.001、0.01、0.1、1、10、100 $\mu\text{g/mL}$) 的不同组 (对照、紫杉醇、PTX-HSU、PTX-HU) 含药培养基培养 48 h 后, 弃去含药培养基, 100 μL /孔加入 MTT 溶液 (1 mg/mL), 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4 h 后, 弃去培养液, 加入 150 μL DMSO, 570 nm 波长测定吸光度。计算紫杉醇各制剂的半抑制浓度 (50% inhibiting concentration, IC_{50}), 按照公式和分别计算耐药倍数和逆转倍数^[20]。结果表明 (表 2), 紫杉醇各制剂组对 2 种乳腺癌细胞均呈现出浓度相关性的细胞毒性, 且 PTX-HSU 制剂组的 IC_{50} 明显低于 PTX-HU 和紫杉醇组, 说明 HSU 胶束作为载体可增强紫杉醇对肿瘤细胞的杀伤作用。

$$\text{耐药倍数} = \text{IC}_{50}\text{-PTX-MCF-7/ADR} / \text{IC}_{50}\text{-PTX-MCF-7}$$

$$\text{逆转倍数} = \text{IC}_{50}\text{-PTX-MCF-7/ADR} / \text{IC}_{50}\text{-PTX-HSU 或 PTX-HU-MCF-7/ADR}$$

$\text{IC}_{50}\text{-PTX-MCF-7/ADR}$ 为紫杉醇对 MCF-7/ADR 细胞的 IC_{50} , $\text{IC}_{50}\text{-PTX-MCF-7}$ 为紫杉醇对 MCF-7 细胞的 IC_{50} , $\text{IC}_{50}\text{-PTX-HSU 或 PTX-HU-MCF-7/ADR}$ 为 PTX-HSU 或 PTX-HU 对 MCF-7/ADR 细胞的 IC_{50}

表 2 体外逆转 MDR 细胞毒性结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Results of *in vitro* reversal of MDR cytotoxicity ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	MCF-7 细胞存活率/%			MCF-7/ADR 细胞存活率/%		
	紫杉醇	PTX-HU	PTX-HSU	紫杉醇	PTX-HU	PTX-HSU
0.001	85.59 $\pm$ 1.46	80.34 $\pm$ 1.36	76.34 $\pm$ 0.63*	99.11 $\pm$ 1.68	97.63 $\pm$ 1.49	96.37 $\pm$ 3.20
0.01	72.81 $\pm$ 3.59	52.94 $\pm$ 0.97*	41.11 $\pm$ 1.20**#	98.16 $\pm$ 1.22	97.55 $\pm$ 3.64	94.62 $\pm$ 1.11
0.1	30.20 $\pm$ 1.90	25.46 $\pm$ 0.29	24.23 $\pm$ 1.04*	94.00 $\pm$ 1.00	93.15 $\pm$ 2.18	93.33 $\pm$ 0.78
1	24.39 $\pm$ 0.17	21.41 $\pm$ 0.15*	20.62 $\pm$ 0.96*	87.03 $\pm$ 2.19	84.74 $\pm$ 0.39	66.32 $\pm$ 3.63**##
10	19.72 $\pm$ 0.14	13.48 $\pm$ 0.41***	11.93 $\pm$ 0.07****#	72.93 $\pm$ 3.01	70.97 $\pm$ 1.09	41.88 $\pm$ 4.50*****
100	12.98 $\pm$ 0.20	9.64 $\pm$ 0.36*	9.30 $\pm$ 0.18**	42.18 $\pm$ 0.27	41.46 $\pm$ 0.95	30.14 $\pm$ 0.94*****

与紫杉醇组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与 PTX-HU 组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs paclitaxel group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs PTX-HU group

在 MCF-7 的细胞毒性结果中, 紫杉醇、PTX-HU 以及 PTX-HSU 组的 IC_{50} 分别为 0.028、0.013、0.006 $\mu\text{g/mL}$, 其中 PTX-HU 制剂组 IC_{50} 是紫杉醇组的 2.15 倍, 推测这可能是 MCF-7 细胞表面过度表达 CD44 受体 (透明质酸靶向受体), MCF-7 细胞通过受体介导的内吞作用增加对 PTX-HU 的摄取, 使得更多的紫杉醇进入细胞内; 而 PTX-HSU 组 IC_{50} 分别是 PTX-HU 组和紫杉醇组的 2.17 倍和 4.67 倍, 推测一方面可能是由于在受体介导的主动靶向摄取载药胶束后肿瘤细胞内强还原敏感环境切断了 HSU 胶束中还原感二硫键, 使得 PTX-HSU 中紫杉醇相对紫杉醇组更多进入细胞的基础上, 快速从胶束内释放出来, 显著提高了抗肿瘤活性; 另一方面,

熊果酸自身就具有杀伤肿瘤细胞的能力, 可能是 HSU 胶束断裂后的疏水端熊果酸起到了杀伤 MCF-7 细胞的作用。

在 MCF-7/ADR 的细胞毒性结果中, 紫杉醇、PTX-HU 以及 PTX-HSU 组的 IC_{50} 分别为 15.01、13.09、1.39 $\mu\text{g/mL}$ 。为考察 MCF-7/ADR 细胞对紫杉醇的耐药强度以及是否可以作为体外逆转 MDR 的细胞模型, 通过计算得到 MCF-7/ADR 细胞对紫杉醇的耐药倍数为 533, 表明此细胞对紫杉醇呈现出较强的耐药性, 可以作为逆转 MDR 的细胞模型。MTT 结果表明, 紫杉醇各制剂组均显示出浓度依赖性的细胞毒性, 通过各组制剂的 IC_{50} 值计算 MDR 逆转倍数发现, PTX-HSU 组和 PTX-HU 组相对紫

杉醇组逆转倍数分别为 10.79 倍和 1.15 倍,且 PTX-HSU 组是 PTX-HU 组的 9.41 倍,表明 HSU 载药系统在逆转乳腺癌 MDR 方面呈现出明显的优势。原因推测一方面可能是由于 HSU 通过透明质酸受体介导的内吞和连接臂 CYS 还原敏感快速释药增效紫杉醇;另一方面可能与 HSU 中疏水端熊果酸具有多靶点杀伤肿瘤耐药细胞的活性有关。

2.8 体外逆转耐药的细胞机制研究

2.8.1 HSU/HU 对细胞定性摄取的影响 MCF-7/ADR 细胞以 1×10^5 个/孔接种于 24 孔板,按照 0.5 mL/孔接种于 24 孔板,37 °C 培养 24 h 后,弃去培养基,分别加入含有 C6-HSU 和 C6-HU (胶束质量浓度为 80 $\mu\text{g/mL}$) 的培养基,37 °C 孵育 0.5 h 后,弃去培养基,PBS 洗 5 次,于倒置荧光显微镜下成像。结果如图 7 所示,在相同条件下,给以 C6-HSU 干预的细胞内荧光强度显著强于给以 C6-HU 干预的细胞。据文献报道^[17],透明质酸的结构中羧基是透明质酸靶向受体(CD44 受体)的识别位点,其羧基的修饰程度与其靶向性有关;因此,推测可能是由于 HU 结构中透明质酸骨架上的羧基修饰程度大于 HSU,影响了其靶向效率,导致用 C6-HU 干预的细胞内绿色荧光强度较弱;进一步推测,HSU 很可能可以通过增加乳腺癌耐药细胞对其的摄取量,以增加进入细胞内化疗药物的量,相对于单纯的化疗药,在耐药细胞同步外排的作用下,HSU 干预的细胞内化疗药有望具有更多的有效积累药量,来发挥部分逆转 MDR 的作用。

2.8.2 HSU/HU 对细胞定量摄取的影响 细胞以 5×10^5 个/孔的细胞量接种于 6 孔板中,按照 2 mL/孔接种于 6 孔板,37 °C 培养 24 h 后,弃去培养基,分别加入含有 C6-HSU 和 C6-HU (胶束质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$) 的培养基,37 °C 孵化 4 h 后,移去上层供试液,加入预冷 PBS 洗 3 遍终止摄取。往 6 孔板中加入消化液,收集细胞,2000 r/min 离心 3 min,

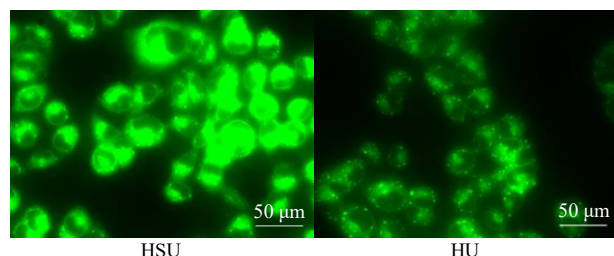


图 7 定性考察细胞对 HSU 与 HU 的摄取情况 ($\times 400$)

Fig. 7 Qualitative examination of cellular uptake of HSU and HU ($\times 400$)

弃去上清液,用预冷 PBS 洗 3 遍后加入 0.7 mL PBS 重悬,在流式细胞仪的 FL2 通道 (E_x 488 nm) 检测 C6 含量,分析结果。在竞争性抑制实验中,预先用质量浓度为 10 mg/mL 的透明质酸溶液孵育 2 h,再重复上述实验步骤。结果如表 3 所示,在相同质量浓度下,HSU-C6 和 HU-C6 组的荧光强度均大于游离 C6 ($P < 0.001$),说明 C6 探针经胶束包载后,在透明质酸的主动靶向作用下促进了细胞对 C6 的摄取。HSU-C6 和 HU-C6 相比,还原敏感型 HSU 胶束组的荧光强度更强,推测是因为 HSU 含有二硫键,可以使 C6 快速释放从而促进 C6 在细胞内的累积。同时,实验结果也表明,随着胶束浓度的增加,荧光强度也随之增加,说明细胞对胶束摄取呈现一定的质量浓度相关性。

表 3 定量考察细胞对 HSU 与 HU 的摄取情况 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 3 Quantitative examination of cellular uptake of HSU and HU ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	荧光强度
C6	—	265.06 ± 6.54
HU-C6	80	$677.61 \pm 30.84^{***}$
透明质酸+HSU-C6	80	$727.17 \pm 22.23^{***}$
HSU-C6	80	$824.15 \pm 13.24^{***\#\#\Delta\Delta}$

与 C6 组比较: $***P < 0.001$; 与 HU-C6 组比较: $###P < 0.001$; 与透明质酸+HSU-C6 组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$

$***P < 0.001$ vs C6 group; $###P < 0.001$ vs HU-C6; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs HA + HSU-C6 group

为进一步阐明胶束摄取机制,采用 10 mg/mL 的透明质酸溶液先与细胞孵育,再加入 HSU 胶束孵育。结果发现,HSU 胶束的摄取被显著抑制,荧光强度均显著低于不加透明质酸孵育的 HSU 组 ($P < 0.01$),此结果表明 HSU 胶束是通过透明质酸受体介导的内吞而被摄取的。

2.8.3 HSU 对胞内 GSH 浓度的影响 MCF-7/ADR 细胞以 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板,37 °C 培养 24 h 后,弃去培养基,用含有 HA-CYS、HSU、HU 的培养基干预 48 h 后,还原型谷胱甘肽测定试剂盒检测细胞内 GSH 水平。结果表明 (表 4),相对于对照组,HA-CYS 均可显著 ($P < 0.05$) 降低细胞内的 GSH 表达水平,推测可能是由于 HA-CYS 中的二硫键与细胞内 GSH 相互作用,胞内 GSH 在此过程中得到消耗;HSU 在 HA-CYS 的基础上,进一步降低了细胞内的 GSH 表达水平 ($P < 0.001$),也可能与 HSU 释放的熊果酸有关,此结果与文献中报道熊果酸可

表 4 胞内 GSH 的测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 4 Determination results of intracellular GSH ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	GSH/(mmol·L ⁻¹)	组别	GSH/(mmol·L ⁻¹)
对照	43.3±4.7	HU	19.2±1.7**
HA-CYS	30.0±8.2*	HSU	7.5±0.7***###Δ

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$; 与 HA-CYS 组比较: ### $P<0.001$; 与 HU 组比较: Δ $P<0.05$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group; ### $P<0.001$ vs HA-CYS group; Δ $P<0.05$ vs HU group

以在一定程度上抑制细胞内 GSH 表达结果一致^[21]。

HU 干预细胞 48 h 后, 相对对照组也显著性降低了细胞内 GSH 表达水平 ($P<0.01$), 推测也可能是 HU 释放了熊果酸有关; 但是经 HU 干预后的胞内 GSH 表达水平显著性地高于 HSU ($P<0.05$), 可能是由于 HU 结构中没有二硫键, 既不能像 HA-CYS 一样消耗细胞内 GSH, 也不能像 HSU 一样快速释放熊果酸所致; 文献报道^[22], 与 GSH 相关的耐药机制主要包括: (1) GST- π 可以催化 GSH 与化疗药物结合, 使化疗药物易于从尿液中排出或代谢为无毒性的醇类物质; (2) GSH 的结构可以作为细胞外排 MRP 泵的底物, GST- π 可以通过调节 GSH 而控制 MRP 的耐药程度。以上机制均表明胞内 GSH 浓度下降后均能减少化疗药外排。因此, 推测 HSU 中的还原敏感二硫键与熊果酸共同作用, 通过降低癌细胞内 GSH 的水平, 进一步降低了肿瘤细胞对紫杉醇的外排和代谢, 来发挥逆转乳腺癌 MDR 的作用。

3 讨论

本研究成功合成了还原敏感型和非还原敏感型透明质酸-熊果酸聚合物 HSU 和 HU。其中熊果酸以药载两用的形式, 成功改善了其肿瘤靶向特异性低、水溶性差的缺点, 提高了其生物利用度和临床应用。以 HSU/HU 为载体成功制备了可高效负载紫杉醇的载药胶束 PTX-HSU 和 PTX-HU, 在体外还原性环境中, PTX-HSU 制剂显示出还原响应快速释放药物的能力。PTX-HSU 和 PTX-HU 均呈现出浓度依赖性的细胞毒性, 其中 HSU 不仅可以增强紫杉醇对 MCF-7 细胞的抗肿瘤活性, 而且可以增强紫杉醇对 MCF-7/ADR 细胞的杀伤作用, 在逆转乳腺癌 MDR 方面呈现出一定的优势, 实现了 HSU 对乳腺癌 MDR 的逆转目标。

通过对体外逆转耐药的细胞研究推测出, HSU 是通过: (1) 受体介导的胞吞作用进入 MCF-7/ADR

细胞内, 增加 MCF-7/ADR 细胞对 HSU 的摄取量, 以增加细胞内药物的有效积累来逆转 MDR; (2) 显著性地降低 MCF-7/ADR 细胞中的 GSH 表达水平, 从而减少 GSH 相关的药物外排以逆转 MDR。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Santana-Krímskaya S E, Franco-Molina M A, Zárate-Triviño D G, *et al.* Immunepotent CRP plus doxorubicin/cyclophosphamide chemotherapy remodel the tumor microenvironment in an air pouch triple-negative breast cancer murine model [J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2020, 126: 110062.
- [2] Wu S G, Wang J, Lian C L, *et al.* Evaluation of the 8th edition of the American joint committee on cancer's pathological staging system in prognosis assessment and treatment decision making for stage T1-2N1 breast cancer after mastectomy [J]. *Breast*, 2020, 51: 2-10.
- [3] Rapacon R L, Macalindong S. P10 clinical and pathologic tumor response following response-guided neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer in the Philippine General Hospital - Breast care center [J]. *Breast*, 2020, 50: 158.
- [4] Flores-Balcázar C H, Flores-Luna M L, Villarreal-Garza C M, *et al.* Provider delay in treatment initiation and its influence on survival outcomes in women with operable breast cancer [J]. *Rep Pract Oncol Radiother*, 2020, 25(2): 271-275.
- [5] Palmeira A, Sousa E, Vasconcelos M H, *et al.* Three decades of P-gp inhibitors: Skimming through several generations and scaffolds [J]. *Curr Med Chem*, 2012, 19(13): 1946-2025.
- [6] 袁腾飞, 席荣, 李科. 阿霉素与醋酸棉酚对耐药性乳腺癌细胞协同干预研究 [J]. 全科口腔医学电子杂志, 2020, 7(1): 158.
- [7] Zhou L, Wang H, Li Y P. Stimuli-responsive nanomedicines for overcoming cancer multidrug resistance [J]. *Theranostics*, 2018, 8(4): 1059-1074.
- [8] Shen Q Y, Shen Y R, Jin F Y, *et al.* Paclitaxel/hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex-loaded liposomes for overcoming multidrug resistance in cancer chemotherapy [J]. *J Liposome Res*, 2020, 30(1): 12-20.
- [9] Guo Q, Cao H Y, Qi X H, *et al.* Research progress in reversal of tumor multi-drug resistance via natural products [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2017, 17(11): 1466-1476.
- [10] 赵英迪, 刘克辛. 肿瘤多药耐药与自噬的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(1): 5-13.

- [11] Kathawala R J, Gupta P, Ashby C R Jr, *et al.* The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: A review of the past decade [J]. *Drug Resist Updat*, 2015, 18: 1-17.
- [12] Fedotcheva T, Shimanovsky N, Fedotcheva N. Involvement of multidrug resistance modulators in the regulation of the mitochondrial permeability transition pore [J]. *Membranes*, 2022, 12(9): 890.
- [13] Xiao X, Wang K W, Zong Q Y, *et al.* Polyprodrug with glutathione depletion and cascade drug activation for multi-drug resistance reversal [J]. *Biomaterials*, 2021, 270: 120649.
- [14] Kaur H, Singh A, Kaur K, *et al.* 4-methylthiobutyl isothiocyanate synergize the antiproliferative and pro-apoptotic effects of paclitaxel in human breast cancer cells [J]. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 2023: 1-25.
- [15] Gote V, Nookala A R, Bolla P K, *et al.* Drug resistance in metastatic breast cancer: Tumor targeted nanomedicine to the rescue [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(9): 4673.
- [16] Zong L, Cheng G R, Liu S, *et al.* Reversal of multidrug resistance in breast cancer cells by a combination of ursolic acid with doxorubicin [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 165: 268-275.
- [17] 孙政伟, 安广峰. 透明质酸修饰药物的研究进展 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2016, 35(1): 12-18.
- [18] Li J, Huo M R, Wang J, *et al.* Redox-sensitive micelles self-assembled from amphiphilic hyaluronic acid-deoxycholic acid conjugates for targeted intracellular delivery of paclitaxel [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(7): 2310-2320.
- [19] 汪小林, 于英杰, 张梦欣, 等. 紫杉醇聚合物胶束载药工艺考察及其初步安全性与体外抗肿瘤活性的研究 [J]. *福建中医药*, 2023, 54(5): 32-36.
- [20] Qiu L P, Qiao M X, Chen Q, *et al.* Enhanced effect of pH-sensitive mixed copolymer micelles for overcoming multidrug resistance of doxorubicin [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(37): 9877-9887.
- [21] Ji X, Tang Q, Pang P, *et al.* Redox-responsive chemosensitive polyspermine delivers ursolic acid targeting to human breast tumor cells: The depletion of intracellular GSH contents arouses chemosensitizing effects [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2018, 170: 293-302.
- [22] Geng M, Wang L, Chen X, *et al.* The association between chemosensitivity and P-gp, GST- π and Topo II expression in gastric cancer [J]. *Diagn Pathol*, 2013, 8(1): 198.

[责任编辑 郑礼胜]