

活性氧响应型透明质酸修饰的鬼臼毒素纳米胶束的处方优化与体外评价

谷丽艳¹, 孙朝渭¹, 董禹何¹, 李学涛^{2,3}, 于洋^{1,2,3*}

1. 辽宁中医药大学中医脏象理论及应用教育部重点实验室, 辽宁 沈阳 110847

2. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600

3. 沈阳市中药靶向递送重点实验室, 辽宁 沈阳 110000

摘要: 目的 制备活性氧响应型透明质酸修饰的鬼臼毒素纳米胶束 (reactive oxygen species-responsive hyaluronic acid-modified podophyllotoxin nano-micelles, HA-oxi-Ms/Pod), 并对其处方优化、理化表征以及体外生物活性评价。方法 采用薄膜分散法制备 HA-oxi-Ms/Pod; 利用 Box-Benhken 设计-响应面法 (Box-Benhken design-response surface method, BBD-RSM) 对影响其包封率的 3 个因素 [聚乙烯己内酰胺-聚乙酸乙烯酯-聚乙二醇接枝共聚物 (Soluplus) 与维生素 E 琥珀酸酯聚乙二醇 1000 (TPGS₁₀₀₀) 质量比、Soluplus 与鬼臼毒素质量比、水化温度] 进行优化; 利用激光散射粒度仪测定胶束的粒径和 ζ 电位; 利用透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 观察胶束的形态; 利用透析袋法考察胶束的体外释放行为; 采用 CCK-8 法考察胶束对卵巢癌细胞的毒性; 采用流式细胞仪和荧光显微镜考察细胞摄取情况; 利用 Transwell 实验评价胶束对人卵巢癌 SK-OV-3 细胞迁移能力的影响。结果 HA-oxi-Ms/Pod 的最佳制备工艺为 Soluplus 与 TPGS₁₀₀₀ 质量比 2:1, Soluplus 与鬼臼毒素质量比 40:1, 水化温度 30 °C; 按最佳处方以 Soluplus、TPGS₁₀₀₀、DSPE-PEG₂₀₀₀-活性氧响应键-PEG₅₀₀₀ 及 DSPE-PEG₂₀₀₀-HA 为膜材, 制备的 HA-oxi-Ms/Pod 包封率为 (94.28±0.51)%; 激光散射粒度仪测得 HA-oxi-Ms/Pod 的粒径为 (104.85±1.03) nm, 活性氧响应后粒径缩短为 (86.94±0.62) nm; HA-oxi-Ms/Pod 的 ζ 电位为 (-6.40±0.43) mV, 活性氧响应后 ζ 电位为 (-4.7±0.29) mV; TEM 观察结果显示, HA-oxi-Ms/Pod 为类球形。体外释放结果显示, 在第 30 小时, 鬼臼毒素游离药体外释放率为 (87.12±6.62)%, Pod-Ms 体外释放率为 (40.04±3.18)%, HA-oxi-Ms/Pod 体外释放率为 (35.42±3.91)%, HA-oxi-Ms/Pod+H₂O₂ 体外释放率为 (80.73±1.82)%, 表明 HA-oxi-Ms/Pod 中装载的鬼臼毒素能够在氧化环境中响应性的释放。细胞毒实验结果表明, HA-oxi-Ms/Pod 的半抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀) 值为 18.94 μ mol/L; 体外细胞摄取实验和 Transwell 实验结果表明, 与非靶向 Pod-Ms 相比, 透明质酸的修饰明显增加了卵巢癌细胞对胶束的摄取, HA-oxi-Ms/Pod 具有更显著抑制卵巢癌细胞迁移的能力。结论 成功制备的 HA-oxi-Ms/Pod 展现出良好的药物包封和释放特性, 透明质酸的修饰显著增强了其对卵巢癌细胞的靶向能力, 表明其在肿瘤治疗中具有潜在应用价值。

关键词: 鬼臼毒素; 活性氧响应型胶束; 透明质酸; 靶向药物递送; 卵巢癌

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)22-7663-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.22.010

Optimization of formulation and *in vitro* evaluation of reactive oxygen species-responsive hyaluronic acid-modified podophyllotoxin nano-micelles

GU Liyan¹, SUN Zhaowei¹, DONG Yuhe¹, LI Xuetao^{2,3}, YU Yang^{1,2,3}

1. Key Laboratory of Ministry of Education for TCM Viscera State Theory and Applications, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China

2. School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

3. Shenyang Key Laboratory of Targeted Delivery of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110000, China

收稿日期: 2024-05-21

基金项目: 辽宁省教育厅科学技术研究重点攻关项目 (202064); 辽宁省教育厅高校基本科研项目 (JYTQN2023471); 辽宁中医药大学中医脏象理论及应用教育部重点实验室开放基金资助 (zyzx2301)

作者简介: 谷丽艳 (1979—), 女, 博士研究生, 博士后, 研究方向为中医药防治乳腺增生与心血管疾病临床与实验研究。

E-mail: syguliyang@163.com

*通信作者: 于洋 (1994—) 女, 博士研究生, 博士后, 讲师, 研究方向为新型给药系统研究。E-mail: yuqn0702@163.com

Abstract: Objective To prepare reactive oxygen species (ROS)-responsive hyaluronic acid (HA)-modified podophyllotoxin (Pod) nano-micelles (HA-oxi-Ms/Pod), optimize formulation, characterize physicochemical properties, and evaluate *in vitro* bioactivity. **Methods** HA-oxi-Ms/Pod were prepared using thin film dispersion method. The Box-Behnken surface response method was employed to optimize the preparation process by examining the effects of three factors (Soluplus/TPGS₁₀₀₀ mass ratio, Soluplus/Podophyllotoxin mass ratio, and hydration temperature) on encapsulation efficiency. The particle size and ζ potential of the micelles were measured using laser scattering particle size analysis. The morphology of micelles was observed using transmission electron microscopy (TEM). The *in vitro* release behavior of micelles was studied using the dialysis bag method. The cytotoxicity of the micelles against ovarian cancer cells was assessed using the CCK-8 assay. Cellular uptake was examined by flow cytometry and fluorescence microscopy, and the effect of the micelles on the migration ability of ovarian cancer cells was evaluated using the Transwell assay. **Results** The optimal preparation conditions for HA-oxi-Ms/Pod were Soluplus at 40 mg, Soluplus/TPGS₁₀₀₀ mass ratio of 2:1, Soluplus/Pod mass ratio of 40:1, and a hydration temperature of 30 °C. Using the optimized formulation, the encapsulation efficiency of HA-oxi-Ms/Pod prepared with Soluplus, TPGS₁₀₀₀, DSPE-PEG₂₀₀₀-ROS-responsive linkage-PEG₅₀₀₀, and DSPE-PEG₂₀₀₀-HA as the membrane materials was (94.28 ± 0.51)%. The particle size of HA-oxi-Ms/Pod measured by laser scattering was (104.85 ± 1.03) nm, which decreased to (86.94 ± 0.62) nm after ROS response. The ζ potential of HA-oxi-Ms/Pod was (-6.40 ± 0.43) mV, which changed to (-4.70 ± 0.29) mV after ROS response. TEM revealed that HA-oxi-Ms/Pod were spherical. *In vitro* release studies showed that at 30 h, the release rate of free podophyllotoxin was (87.12 ± 6.62)%, Pod-Ms was (40.04 ± 3.18)%, HA-oxi-Ms/Pod was (35.42 ± 3.91)%, and HA-oxi-Ms/Pod + H₂O₂ was (80.73 ± 1.82)%, indicating that the podophyllotoxin loaded in HA-oxi-Ms/Pod could be responsively released in an oxidative environment. Cytotoxicity assays showed that the IC₅₀ value of HA-oxi-Ms/Pod was 18.94 μ mol/L. *In vitro* cellular uptake and Transwell assays demonstrated that hyaluronic acid modification significantly increased the uptake of micelles by ovarian cancer cells and that HA-oxi-Ms/Pod had a more pronounced ability to inhibit the migration of ovarian cancer cells compared to non-targeted Pod-Ms. **Conclusion** HA-oxi-Ms/Pod have been successfully prepared and can be further applied in tumor prevention and treatment research.

Key words: podophyllotoxin; reactive oxygen species-responsive micelles; hyaluronic acid; targeted drug delivery; ovarian cancer

鬼臼毒素 (podophyllotoxin) 是一种存在于小檗科的八角莲属、桃儿七属和山荷叶属等多种植物中, 具有多种生理活性的芳基四氢萘型木脂素^[1]。研究表明, 鬼臼毒素具有抗癌、抗菌、抗炎、抗病毒等多种生理活性, 其中抗肿瘤表现最为出色^[2-4]。然而, 鬼臼毒素存在的水溶性低、靶向性差、对正常细胞和肿瘤细胞无差别杀伤、对机体产生严重的不良反应等问题, 严重阻碍了其应用^[5]。为了解决上述问题, 构建活性氧响应型纳米递药系统可能是一个有效策略。活性氧响应型纳米胶束, 能够利用肿瘤组织中的高浓度活性氧这一特性, 实现药物的精准释放^[6]。纳米胶束具有“核-壳”结构, 其中亲脂性的内核可以包载水溶性差的药物, 亲水性的外壳可以增加药物在水中的溶解度^[7]。此外, 通过在纳米胶束表面修饰合适的靶向配体, 可以赋予其主动靶向性, 将治疗药物精准地送至目标部位^[8]。

透明质酸 (hyaluronic acid) 是一种水溶性天然阴离子多糖, 具备无毒、可生物降解、无免疫原性等优异性质, 能够调节细胞黏附、增殖、迁移和分化等多种细胞行为^[9]。透明质酸能够识别肿瘤组织中过表达的分化簇 44 (cluster of differentiation 44,

CD44)^[10], 因此, 将透明质酸修饰在纳米胶束表面, 可以将治疗药物有选择性地递送到肿瘤组织, 实现精准靶向和减毒增效的作用^[11]。

基于此, 本研究采用薄膜水合法制备了活性氧响应型透明质酸修饰的鬼臼毒素胶束 (reactive oxygen species-responsive hyaluronic acid-modified podophyllotoxin micelles, HA-oxi-Ms/Pod)。在 HA-oxi-Ms/Pod 中, 聚乙二醇 5000 (PEG₅₀₀₀) 位于最外层, 形成水化层, 以增强胶束的增强渗透和滞留 (enhanced permeability and retention, EPR) 效应, 同时隐藏主动靶向配体透明质酸, 以减少正常细胞对胶束的摄取、减轻不良反应^[12]。当胶束到达肿瘤组织后, 在高浓度活性氧环境下, 活性氧响应键断裂, PEG₅₀₀₀ 水化层脱落, 暴露出靶向分子透明质酸, 进而通过主动靶向作用增加癌细胞的摄取, 如图 1 所示。本研究通过 Box-Behnken 设计-响应面法 (Box-Behnken design-response surface method, BBD-RSM) 优化制剂处方工艺, 并进一步对 HA-oxi-Ms/Pod 的粒径、 ζ 电位、微观形态、卵巢癌细胞毒性、体外靶向性、抑制卵巢癌细胞侵袭能力进行考察, 以为鬼臼毒素制剂研发提供参考。

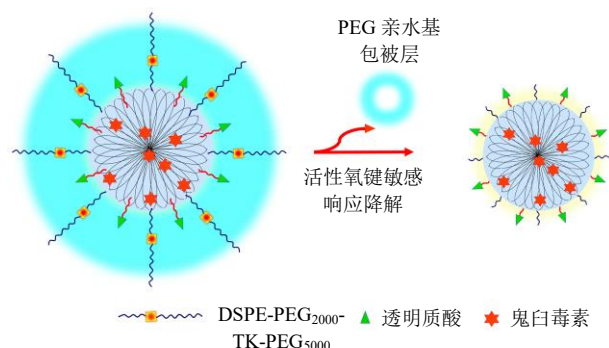


图 1 HA-oxi-Ms/Pod 示意图

Fig. 1 Schematic diagram of HA-oxi-Ms/Pod

1 仪器与材料

1.1 仪器

FA1004 型电子天平, 上海越平科学仪器有限公司; RE52CS 型旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; KQ3200E 型超声波清洗器, 超声功率 150 W, 工作频率 40 kHz, 昆山市超声仪器有限公司; Agrest 1100 型高效液相色谱仪, UV 检测器, 大连依利特分析仪器有限公司; Litesizer 500 型激光散射粒度仪, 奥地利安东帕公司; JEM-1200EX 型透射电子显微镜 (TEM), 日本 JEOL 公司。

1.2 药品与试剂

鬼臼毒素对照品 (批号 P105537, 质量分数 $\geq 98\%$)、香豆素 (批号 C104161)、4',6-双脒基-2-苯基吡啶 (DAPI, 批号 D106471), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 聚乙烯己内酰胺-聚乙酸乙烯酯-聚乙二醇接枝共聚物 (Soluplus), 德国巴斯夫公司; 维生素 E 琥珀酸酯聚乙二醇 1000 (TPGS₁₀₀₀), 大连美仑生物技术有限公司; 二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-酮缩硫醇-聚乙二醇 5000 (DSPE-PEG₂₀₀₀-TK-PEG₅₀₀₀)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-透明质酸 (DSPE-PEG₂₀₀₀-HA), 西安瑞禧生物科技有限公司; 葡聚糖凝胶 Sephadex G-50、pH 7.4 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS), 北京索莱宝科技有限公司; 其余常见溶剂均为色谱级纯度。

人卵巢腺癌 SK-OV-3 细胞, 亿奥邦生物研究有限公司。

2 方法与结果

2.1 HA-oxi-Ms/Pod 的制备

称取处方量的 Soluplus、TPGS₁₀₀₀、鬼臼毒素、DSPE-PEG₂₀₀₀-TK-PEG₅₀₀₀、DSPE-PEG₂₀₀₀-HA 溶于甲醇中, 减压蒸干溶剂, 此时圆底烧瓶底部形成一

层均匀透明薄膜, 向其中加入 PBS, 超声水合后薄膜脱落, 静置后溶液透明, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 收集滤液即得。

采用相同的方法制备不添加鬼臼毒素的空白胶束 (blank-micelles, B-Ms), 不添加 DSPE-PEG₂₀₀₀-TK-PEG₅₀₀₀ 和 DSPE-PEG₂₀₀₀-HA 的鬼臼毒素胶束 (Pod-Ms), 不添加 DSPE-PEG₂₀₀₀-TK-PEG₅₀₀₀ 的透明质酸修饰的鬼臼毒素胶束 (HA-Ms/Pod)。

2.2 鬼臼毒素含量测定的方法学建立

2.2.1 空白溶液的制备 精密吸取 1 mL 的 B-Ms 和适量甲醇, 置于 5 mL 棕色量瓶中, 超声破乳, 定容至刻度, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 备用。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密吸取 1 mL 的 HA-oxi-Ms/Pod 和适量甲醇, 置于 5 mL 棕色量瓶中, 超声破乳, 定容至刻度, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 备用。

2.2.3 对照品溶液的制备 精确称取 10.0 mg 鬼臼毒素于 100 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 配制 0.10 mg/mL 的鬼臼毒素对照品母液。稀释母液制成质量浓度为 0.003、0.004、0.005、0.008、0.009、0.010 mg/mL 的系列对照品溶液, 低温避光保存, 备用。

2.2.4 鬼臼毒素色谱条件 色谱系统采用依利特高效液相色谱 (HPLC); 色谱柱为 Ultimate XB-C₁₈ (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm) 柱; 以乙腈-水 (68 : 32) 作为流动相; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长 292 nm; 每次进样量为 20 μL ; 理论塔板数以鬼臼毒素峰计算为 10 870。

2.2.5 专属性考察 精密吸取 20 μL 的鬼臼毒素对照品溶液 (0.004 mg/mL)、供试品溶液和空白溶液, 注入高效液相色谱仪进行分析, 结果如图 2 所示, 鬼臼毒素色谱峰在 3.6 min 左右出现, 空白溶液无干扰, 说明此色谱条件可用于该脂质体中鬼臼毒素的含量测定, 该方法专属性良好。

2.2.6 线性关系考察 按“2.2.4”项下色谱条件对“2.2.3”项中系列鬼臼毒素对照品溶液进样分析, 以系列鬼臼毒素对照品溶液的质量浓度为横坐标 (X), 对应的峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 进行线性回归, 得线性回归方程 $Y = 59\,804 X + 95.873$, $R^2 = 0.9948$ 。结果表明, 鬼臼毒素在 0.003 ~ 0.010 mg/mL 线性关系良好。

2.2.7 精密度试验 取“2.2.3”项下鬼臼毒素对照品溶液, 同 1 d 内连续进样 6 次, 计算日内精密度; 连续进样 5 d, 计算日间精密度。结果, 日内精密度 RSD 为 0.29%, 日间精密度 RSD 为 0.65%, 证明该

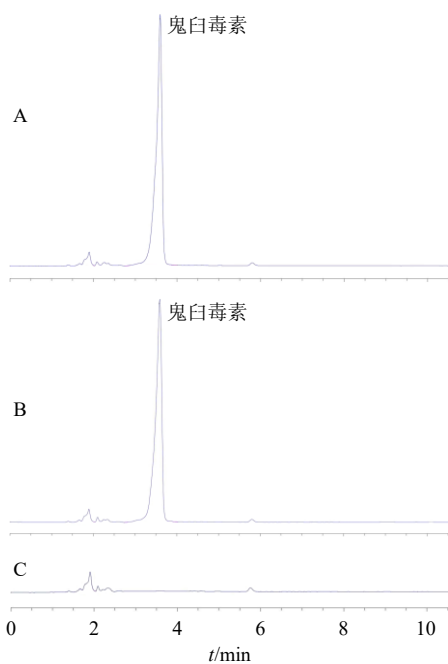


图 2 鬼臼毒素对照品溶液 (A)、HA-oxi-Ms/Pod 供试品溶液 (B)、空白溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of podophyllotoxin reference substance solution (A), HA-oxi-Ms/Pod test sample solution (B) and blank solution (C)

仪器精密度良好。

2.2.8 重复性试验 按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按照“2.2.4”项下色谱条件进行 HPLC 分析，结果鬼臼毒素峰面积的 RSD 为 0.99%，结果表明该方法重复性良好。

2.2.9 稳定性试验 按“2.1”项下方法制备 HA-oxi-Ms/Pod，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，分别在制备后 0、2、4、8、12、24 h 时进样测定，结果鬼臼毒素峰面积的 RSD 为 1.04%，结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.10 加样回收率试验 精密吸取 1 mL B-Ms、1

mL 鬼臼毒素对照品溶液于 10 mL 棕色量瓶中，加甲醇超声破乳、定容，制成供试品溶液，平行 6 份，进样分析。结果鬼臼毒素的平均加样回收率为 100.01%，RSD 为 0.78%，表明该方法符合要求。

2.3 HA-oxi-Ms/Pod 的处方工艺优选

2.3.1 胶束包封率的测定 参考课题组之前的工作，利用 HPLC 法测定胶束的包封率^[13]。取 0.5 mL 胶束溶液至 5 mL 量瓶中，甲醇定容至刻度，过 0.45 μm 微孔滤膜，收集滤液，得过柱前溶液。取 0.5 mL 胶束溶液至葡聚糖凝胶柱 Sephadex G-50 顶部，然后加入 0.5 mL PBS 缓冲液洗脱 1 次，将 2 次洗脱液合并，甲醇定容至 5 mL，过 0.45 μm 微孔滤膜，收集滤液，得过柱后溶液。按照“2.2.4”项下色谱条件进样分析，记录过柱前、后溶液中鬼臼毒素的峰面积，根据下列公式计算胶束中鬼臼毒素的包封率。

$$\text{包封率} = \frac{\text{过柱后鬼臼毒素含量}}{\text{过柱前鬼臼毒素含量}}$$

2.3.2 处方优选 选用 BBD-RSM 实验设计方法，以 Soluplus 与 TPGS₁₀₀₀ 质量比 (X_1)、Soluplus 与鬼臼毒素质量比 (X_2) 和水化温度 (X_3) 3 个因素为自变量，以 HA-oxi-Ms/Pod 中鬼臼毒素的包封率 (Y) 为因变量，通过考察药物包封率 Y ，对 HA-oxi-Ms/Pod 处方进行改良，得到最优处方。在前期预试验的基础上，3 个自变量设定范围： X_1 0.5 : 1~3.5 : 1， X_2 80 : 1~20 : 1， X_3 10~50 °C。实验方案与包封率测定结果见表 1。

利用 Design-Expert 8.0.6.1 软件拟合方程如下：
 $Y = 94.720 - 0.0487 X_1 + 6.560 X_2 - 2.390 X_3 - 1.960 X_1 X_2 - 2.170 X_1 X_3 + 2.220 X_2 X_3 - 6.550 X_1^2 - 12.310 X_2^2 - 6.970 X_3^2$ ， $R^2 = 0.9967$ ， $P < 0.05$ 。拟合结果表明，该实验设计可以明确地对比 Y 值的大小，判定以此方法来筛选 HA-oxi-Ms/Pod 的最优制备工艺，是切实可行的。方差分析结果见表 2，结果表明因

表 1 BBD-RSM 实验设计与包封率测定结果 (处方量为 5 mL)

Table 1 Experimental design and encapsulation efficiency results of BBD-RSM (prescription dosage is 5 mL)

序号	X_1	X_2	$X_3/^\circ\text{C}$	$Y/\%$	序号	X_1	X_2	$X_3/^\circ\text{C}$	$Y/\%$
1	3.5 : 1 (+1)	20 : 1 (+1)	30 (0)	81.31	10	2.0 : 1 (0)	40 : 1 (0)	30 (0)	95.06
2	3.5 : 1 (+1)	80 : 1 (-1)	30 (0)	71.16	11	2.0 : 1 (0)	20 : 1 (+1)	10 (-1)	81.77
3	3.5 : 1 (+1)	40 : 1 (0)	10 (-1)	85.24	12	2.0 : 1 (0)	40 : 1 (0)	30 (0)	94.66
4	2.0 : 1 (0)	80 : 1 (-1)	10 (-1)	74.02	13	2.0 : 1 (0)	40 : 1 (0)	30 (0)	95.13
5	2.0 : 1 (0)	80 : 1 (-1)	50 (+1)	64.69	14	2.0 : 1 (0)	40 : 1 (0)	30 (0)	93.49
6	0.5 : 1 (-1)	80 : 1 (-1)	30 (0)	66.51	15	0.5 : 1 (-1)	40 : 1 (0)	50 (+1)	81.51
7	3.5 : 1 (+1)	40 : 1 (0)	50 (+1)	76.25	16	0.5 : 1 (-1)	40 : 1 (0)	10 (-1)	81.83
8	0.5 : 1 (-1)	20 : 1 (+1)	30 (0)	84.50	17	2.0 : 1 (0)	20 : 1 (+1)	50 (+1)	81.31
9	2.0 : 1 (0)	40 : 1 (0)	30 (0)	95.27					

表 2 方差分析结果

Table 2 Analysis results of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1 572.370	9	174.710	231.730	<0.000 1	X_2^2	637.630	1	637.630	845.730	<0.000 1
X_1	0.019	1	0.019	0.025	0.878 3	X_3^2	204.460	1	204.460	271.190	<0.000 1
X_2	344.660	1	344.660	457.150	<0.000 1	残差	5.280	7	0.754		
X_3	45.600	1	45.600	60.480	0.000 1	失拟向	3.170	3	1.060	2.010	0.254 5
X_1X_2	15.370	1	15.370	20.380	0.002 7	纯误差	2.100	4	0.526		
X_1X_3	18.790	1	18.790	24.930	0.001 6	总离差	1 577.650	16			
X_2X_3	19.670	1	19.670	26.090	0.001 4	R^2	0.997				
X_1^2	180.420	1	180.420	239.300	<0.000 1	R_{adj}^2	0.992				

素 X_1 对胶束包封率 Y 无显著影响 ($P>0.05$), 交互因素 X_2 、 X_3 对胶束包封率 Y 影响极其显著 ($P<0.001$), 因素 X_1X_2 、 X_2X_3 、 X_1X_3 对胶束包封率 Y 有显著统计学差异 ($P<0.01$), 因素 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 对胶束包封率也有极其显著影响 ($P<0.001$); 实验模型相关系数 $R_{adj}^2=0.992 4$, 表明该实验模型可以很好地反应胶束包封率受 3 因素的影响而改变, 证明用此模型来分析 HA-oxi-Ms/Pod 的处方可行。

使用 Design-Expert 8.0.6.1 软件绘制各因素的三维效应面图和二维等高图, 结果见图 3。对图表进行直观分析, 根据实际情况, 最终确定最优处方工艺为 Soluplus 40 mg, Soluplus 与 TPGS₁₀₀₀ 质量比 2 : 1, Soluplus 与鬼臼毒素质量比 40 : 1, DSPE-

PEG₂₀₀₀-TK-PEG₅₀₀₀ 2 mg, DSPE-PEG₂₀₀₀-HA 2 mg, 水化温度 30 °C, 处方量为 5 mL。

2.3.3 验证实验 为了验证研究中得到的最优 HA-oxi-Ms/Pod 处方是否合理, 按照上述方法制备 3 批 HA-oxi-Ms/Pod 并测定其中鬼臼毒素的包封率, 结果 3 批 HA-oxi-Ms/Pod 中鬼臼毒素的包封率分别为 94.36%、93.61%、94.86%, 平均包封率为 (94.28 ± 0.51) %, 表明所选择的处方工艺可靠。

2.4 HA-oxi-Ms/Pod 的体外评价

2.4.1 粒径和 ζ 电位 向 HA-oxi-Ms/Pod 溶液中添加 1 mmol/L H₂O₂ (即得 HA-oxi-Ms/Pod+H₂O₂), 观察胶束的粒径变化与表面形貌, 评价胶束的活性氧响应能力。利用激光散射粒度仪对 Pod-Ms、HA-oxi-

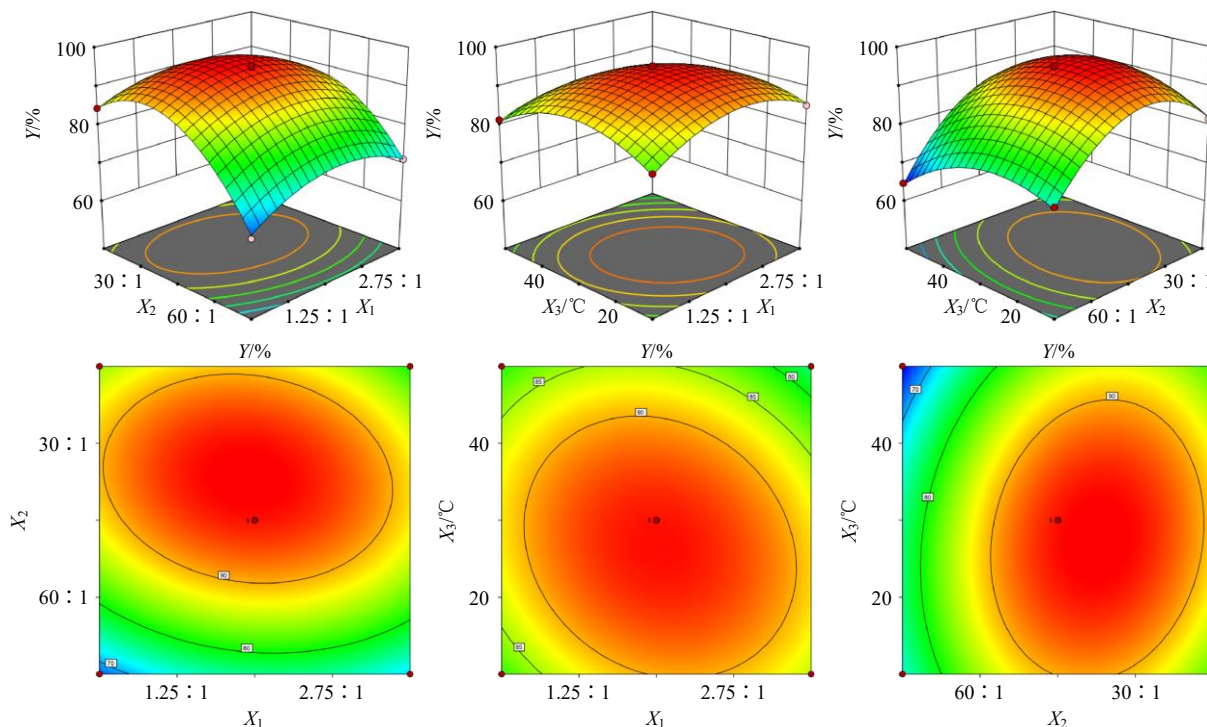


图 3 各因素对胶束包封率影响的效应面图和等高线图

Fig. 3 Effect surface diagrams and contour maps of influence of various factors on micelle encapsulation efficiency

Ms/Pod 和 HA-oxi-Ms/Pod+H₂O₂ 3 种胶束的粒径、ζ 电位进行测定。利用 TEM 观察胶束的微观形貌。实验结果如表 3 和图 4~6 所示, HA-oxi-Ms/Pod 的平均粒径为 (104.85±1.03) nm (图 4), 加入 H₂O₂ 后, 活性氧敏感键断裂, 最外层 PEG₅₀₀₀ 脱落, 粒径收缩至 (86.94±0.62) nm, 其数值仍略大于 Pod-Ms 的 (73.38±0.97) nm, 可能是由于透明质酸修饰在胶束的表面, 增加了胶束的尺寸。HA-oxi-Ms/Pod 的 ζ 电位为 (-6.40±0.43) mV (图 5), 加入 H₂O₂ 后 ζ 电位升高至 (-4.70±0.29) mV, 而 Pod-Ms 的 ζ 电位为 (-1.33±0.17) mV。TEM 观察结果显示, HA-oxi-Ms/Pod 呈类圆形, 加入 H₂O₂ 后, 尺寸有所变小, 并有部分胶束破裂 (图 6)。

2.4.2 胶束的体外释放评价 利用透析袋法考察胶束的体外释放行为, 释放介质为含 5%聚山梨酯 80 的 PBS 溶液以及含 5%聚山梨酯 80、1 mmol/L H₂O₂ 的 PBS 溶液。分别吸取 1 mL 的鬼臼毒素对照品溶液、Pod-Ms、HA-oxi-Ms/Pod, 置于截留相对分子质量为 8 000~14 000 的透析袋中, 浸于 20 mL 释放

表 3 胶束粒径、ζ 电位及包封率验证结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Results of micelles particle size, ζ potential, and encapsulation efficiency verification ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

胶束名称	平均粒径/nm	ζ 电位/mV	包封率/%
Pod-Ms	73.38±0.97	-1.33±0.17	94.58±0.47
HA-oxi-Ms/Pod	104.85±1.03	-6.40±0.43	94.28±0.51
HA-oxi-Ms/Pod+H ₂ O ₂	86.94±0.62	-4.70±0.29	85.15±1.69

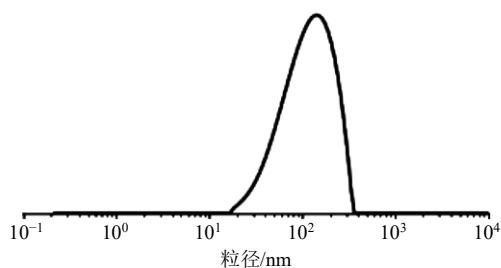


图 4 HA-oxi-Ms/Pod 的粒径分布

Fig. 4 Particle size distribution of HA-oxi-Ms/Pod

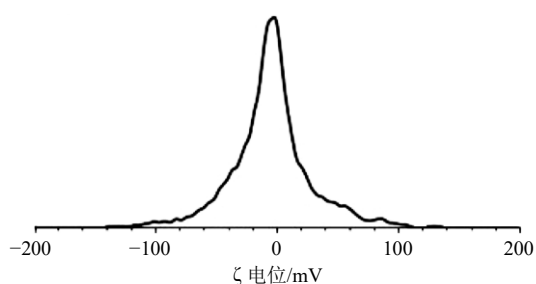


图 5 HA-oxi-Ms/Pod 的 ζ 电位

Fig. 5 ζ potential of HA-oxi-Ms/Pod

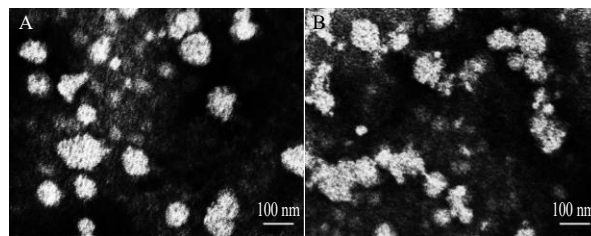


图 6 HA-oxi-Ms/Pod (A) 和 HA-oxi-Ms/Pod+H₂O₂ (B) 的 TEM 图

Fig. 6 TEM of HA-oxi-Ms/Pod (A) and HA-oxi-Ms/Pod + H₂O₂ (B)

介质中, 将释放体系放入摇床中, 于 37 °C、100 r/min 振荡, 分别于设定的时间点 (5、10、20、30 h) 取出 0.5 mL 释放介质, 并及时补充 0.5 mL 新鲜的释放介质, 每种制剂重复 3 次。利用 HPLC 测定各样品中鬼臼毒素的量, 并计算各种制剂在各时间点的药物释放量。

$$\text{体外释放率} = \frac{\text{释放的药物量}}{\text{总药量}}$$

实验结果如图 7 所示, 在第 30 小时, 鬼臼毒素游离药物体外释放率为 (87.12±6.62)%, Pod-Ms 体外释放率为 (40.04±3.18)%, HA-oxi-Ms/Pod 体外释放率为 (35.42±3.91)%, HA-oxi-Ms/Pod+H₂O₂ 体外释放率为 (80.73±1.82)%。实验结果表明, HA-oxi-Ms/Pod 分别与含有/不含有 H₂O₂ 的释放介质共孵育, 在 30 h 内, 与没有 H₂O₂ 的释放介质相比, 释放介质中含有 1 mmol/L H₂O₂ 时鬼臼毒素释放率明显增加。这表明 HA-oxi-Ms/Pod 中装载的鬼臼毒素能够在氧化环境中响应性地释放。由于正常组织和细胞的活性氧水平相对较低, 该特性可以支持胶束在肿瘤的病理环境中选择性地释放药物。

2.4.3 胶束的体外靶向性评价

(1) 荧光探针胶束的制备: 由于鬼臼毒素不具有荧光性, 因此本实验选用具有绿色荧光的香豆素

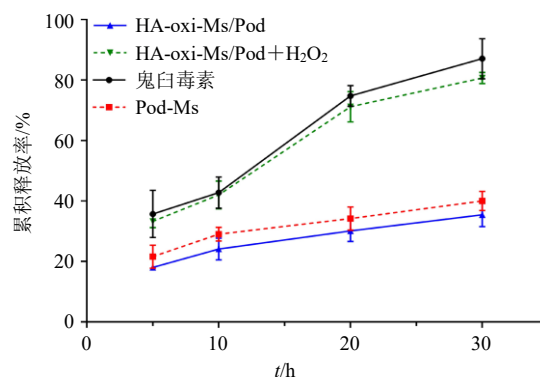


图 7 不同条件下鬼臼毒素的释放曲线

Fig. 7 Release curves of Pod under different conditions

作为荧光探针代替鬼臼毒素，以评价胶束的体外细胞摄取情况。各胶束制备方法同“2.1”项。

(2) 荧光显微镜观察胶束摄取情况：将 SK-OV-3 细胞以 1.3×10^5 /孔的密度接种于 6 孔板中，孵育 24 h 后将 B-Ms、香豆素游离药、Cou-Ms、HA-Ms/Cou、HA-oxi-Ms/Cou 和 HA-oxi-Ms/Cou+H₂O₂ 加到孔中（各孔中香豆素的终浓度均为 3 $\mu\text{mol/L}$ 。以 B-Ms 作为对照，每组 3 个复孔），继续孵育 1 h，DAPI 避光染色 15 min，利用荧光显微镜观察荧光强度并拍照，结果如表 4 和图 8 所示，对照组细胞

表 4 相对荧光强度 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Relative fluorescence intensity ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	相对荧光强度
B-Ms	0.00
香豆素	192.70 \pm 1.65 ^{###}
Cou-Ms	205.36 \pm 1.90 ^{###}
HA-Ms/Cou	226.82 \pm 0.57 ^{###*}
HA-oxi-Ms/Cou	206.22 \pm 4.05 ^{###}
HA-oxi-Ms/Cou+H ₂ O ₂	226.89 \pm 1.77 ^{###*}

与 B-Ms 组比较：^{###} $P < 0.0001$ ；与 Cou-Ms 组比较：^{*} $P < 0.05$ 。
^{###} $P < 0.0001$ vs B-Ms group; ^{*} $P < 0.05$ vs Cou-Ms group.

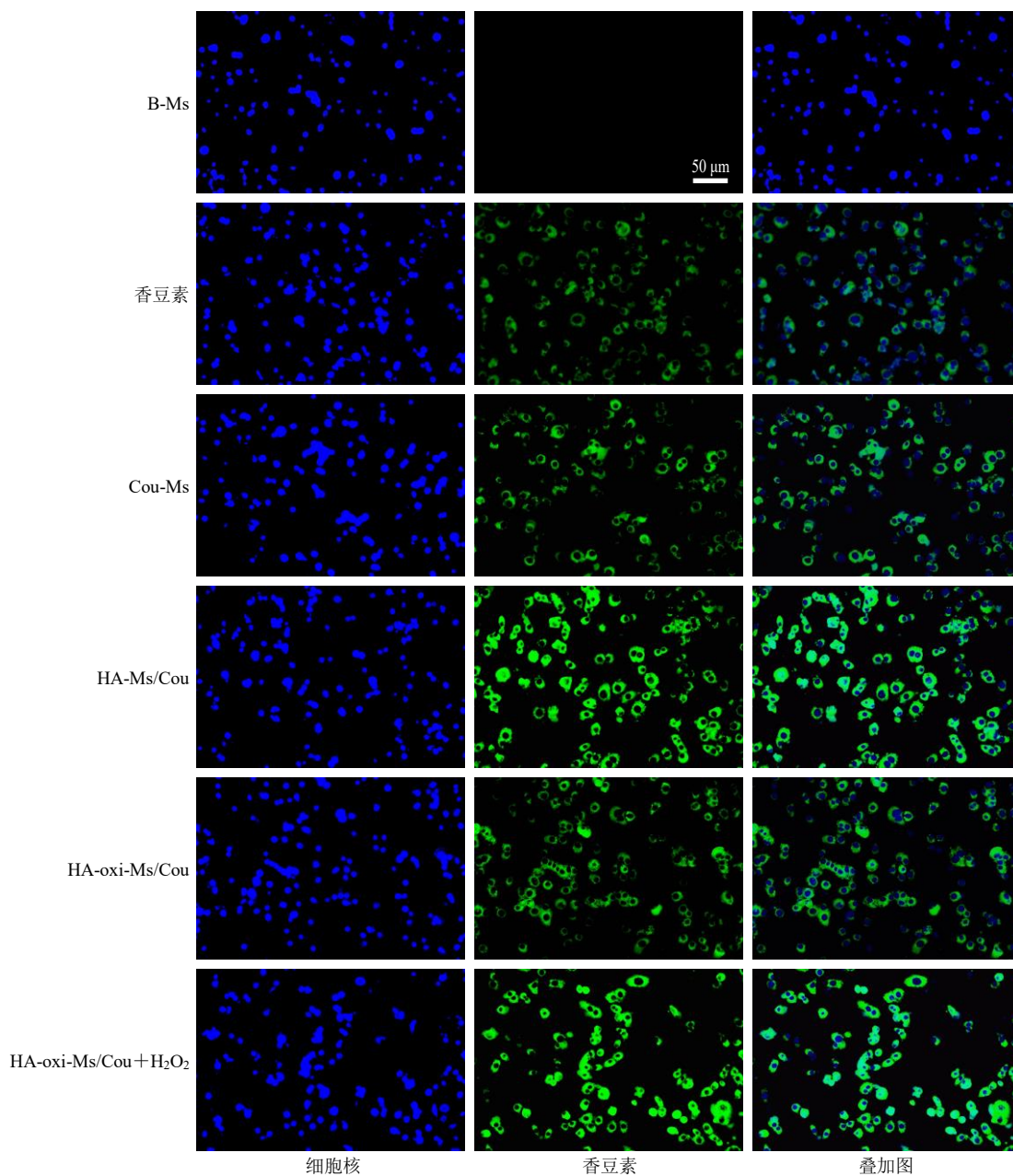


图 8 SK-OV-3 细胞的摄取情况代表性图片

Fig. 8 Representative pictures of SK-OV-3 cells uptake

未见绿色荧光，给药组具有明显绿色荧光，荧光强度为 B-Ms < 香豆素 < Cou-Ms < HA-oxi-Ms/Cou < HA-oxi-Ms/Cou + H₂O₂ < HA-Ms/Cou，表明通过透明质酸修饰胶束，可显著增加 SK-OV-3 细胞对药物的摄取；同时，也进一步证实了 HA-oxi-Ms/Cou 具有活性氧响应能力，PEG₅₀₀₀ 水化层脱落后，其靶向 SK-OV-3 细胞的能力与 HA-Ms/Cou 相当。

(3) 流式细胞仪考察胶束摄取情况：细胞模型的建立同“(2)”项方法，SK-OV-3 细胞在含药培养基中培养 1 h 后，用冷 PBS 洗 3 次，消化后用 300 μL PBS 复悬，采用流式细胞仪测定与细胞结合的香豆素的荧光强度，结果如图 9 和表 5 所示。流式细胞仪的测定结果与荧光显微镜观察结果相一致，进一步验证透明质酸修饰胶束，可以使药物更容易在 SK-OV-3 细胞中蓄积。

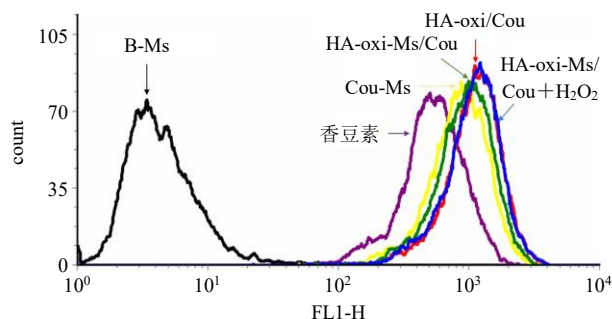


图 9 流式细胞仪分析荧光强度

Fig. 9 Fluorescence intensity analyzed by flow cytometry

表 5 相对荧光强度 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Relative fluorescence intensity ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	相对荧光强度
B-Ms	501.67 ± 164.26
香豆素	930.33 ± 9.29
Cou-Ms	930.33 ± 9.29
HA-Ms/Cou	1 164.33 ± 33.08 ^{####}
HA-oxi-Ms/Cou	1 037.33 ± 15.50 [*]
HA-oxi-Ms/Cou + H ₂ O ₂	1 143.33 ± 35.16 [*]

与 Cou-Ms 组比较：^{*}*P* < 0.05；与 B-Ms 组比较：^{####}*P* < 0.000 1。

^{*}*P* < 0.05 vs Cou-Ms group; ^{####}*P* < 0.000 1 vs B-Ms group.

2.4.4 胶束对 SK-OV-3 细胞的细胞毒性 采用 CCK-8 法对细胞存活率进行考察。以 1.5×10^4 /孔的密度将 SK-OV-3 细胞接种于 96 孔板，培养 24 h 后，根据预实验结果加入不同浓度的 B-Ms、鬼臼毒素、Pod-Ms、HA-Ms/Pod、HA-oxi-Ms/Pod 和 HA-oxi-Ms/Pod + H₂O₂，每个浓度设置 5 个复孔，以 DMEM 培养基为空白对照。继续培养 48 h 后弃掉培养液，向各孔中加入含 10% CCK-8 的培养液，继续孵育 2 h 后，于 450 nm 处测量样品吸光度 (*A*)，计算细胞存活率，各组细胞存活率测定结果见表 6。

$$\text{细胞存活率} = A_1/A_2$$

*A*₁ 为给药组的吸光度数值，*A*₂ 为空白对照组的吸光度数值

实验结果显示，将鬼臼毒素制备成纳米胶束，显著提高其对肿瘤细胞的杀伤作用，其原因可能为胶束增加了鬼臼毒素的水溶性；透明质酸修饰的胶

表 6 不同浓度制剂的细胞毒性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Cell cytotoxicity of preparations with different concentrations ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	SK-OV-3 细胞存活率/%					
	0.005 μmol·L ⁻¹	0.050 μmol·L ⁻¹	0.500 μmol·L ⁻¹	5.000 μmol·L ⁻¹	25.000 μmol·L ⁻¹	50.000 μmol·L ⁻¹
B-Ms	98.45 ± 4.12	98.43 ± 3.87	98.41 ± 1.58	98.28 ± 2.29	98.07 ± 4.03	97.22 ± 4.21
Pod	97.73 ± 3.08	94.58 ± 4.52	92.98 ± 4.95	82.21 ± 5.16	61.43 ± 3.92	35.29 ± 4.14
Pod-Ms	84.66 ± 5.65	81.54 ± 3.18	75.36 ± 3.68	65.54 ± 4.67	55.61 ± 3.49	33.30 ± 3.18
HA-Ms/Pod	83.87 ± 3.37	77.42 ± 4.42	70.03 ± 5.47	59.87 ± 4.08	29.85 ± 2.88	18.51 ± 4.48
HA-oxi-Ms/Pod	86.84 ± 4.76	82.87 ± 5.07	77.45 ± 3.86	64.15 ± 3.83	55.77 ± 5.87	27.06 ± 3.52
HA-oxi-Ms/Cou + H ₂ O ₂	83.14 ± 3.30	79.72 ± 3.22	70.70 ± 3.75	52.52 ± 4.50	33.32 ± 3.79	21.46 ± 4.96

束比普通胶束具有更强的细胞毒性，其原因可能为透明质酸与肿瘤细胞表面过表达的 CD44 相互作用，增强了肿瘤细胞对胶束的摄取，从而增加了鬼臼毒素的功效；此外，HA-oxi-Ms/Pod + H₂O₂ 的细胞毒性与 HA-Ms/Pod 相当，并无显著性差异，且效果优于其他组别，证明了 HA-oxi-Ms/Pod 兼具活性氧响应性及主动靶向性。

2.4.5 胶束抑制 SK-OV-3 细胞迁移能力评价 利

用 Transwell 小室法检测不同给药组对 SK-OV-3 细胞迁移能力的影响。将 Transwell 小室放入 24 孔板中，使用无血清 1640 培养基重悬 SK-OV-3 细胞后，将 180 μL 细胞加至上腔室中；同时，将 600 μL 含血清培养基加至下腔室中；分别将 B-Ms、Pod-Ms、HA-oxi-Ms/Pod、HA-oxi-Ms/Pod + H₂O₂ 以 20 μL/孔加入上腔室中，孵育 12 h 后将小室取出，PBS 清洗小室内 3 次，用棉签刮擦去除小室内细胞，用

4%多聚甲醛固定通过膜迁移的细胞 30 min, 然后用 0.1%结晶紫溶液室温染色 20 min。最后 PBS 冲洗干净, 晾干, 置倒置显微镜下观察并拍照计数, 以迁移过膜的细胞数平均值评估细胞迁移能力。

实验结果如图 10 和表 7 所示, B-Ms、Pod-Ms、HA-oxi-Ms/ Pod、HA-oxi-Ms/Pod+H₂O₂ 抑制 SK-OV-3 细胞迁移能力逐渐增强; 与 HA-oxi-Ms/Pod 相比, HA-oxi-Ms/Pod+H₂O₂ 抑制 SK-OV-3 细胞迁移

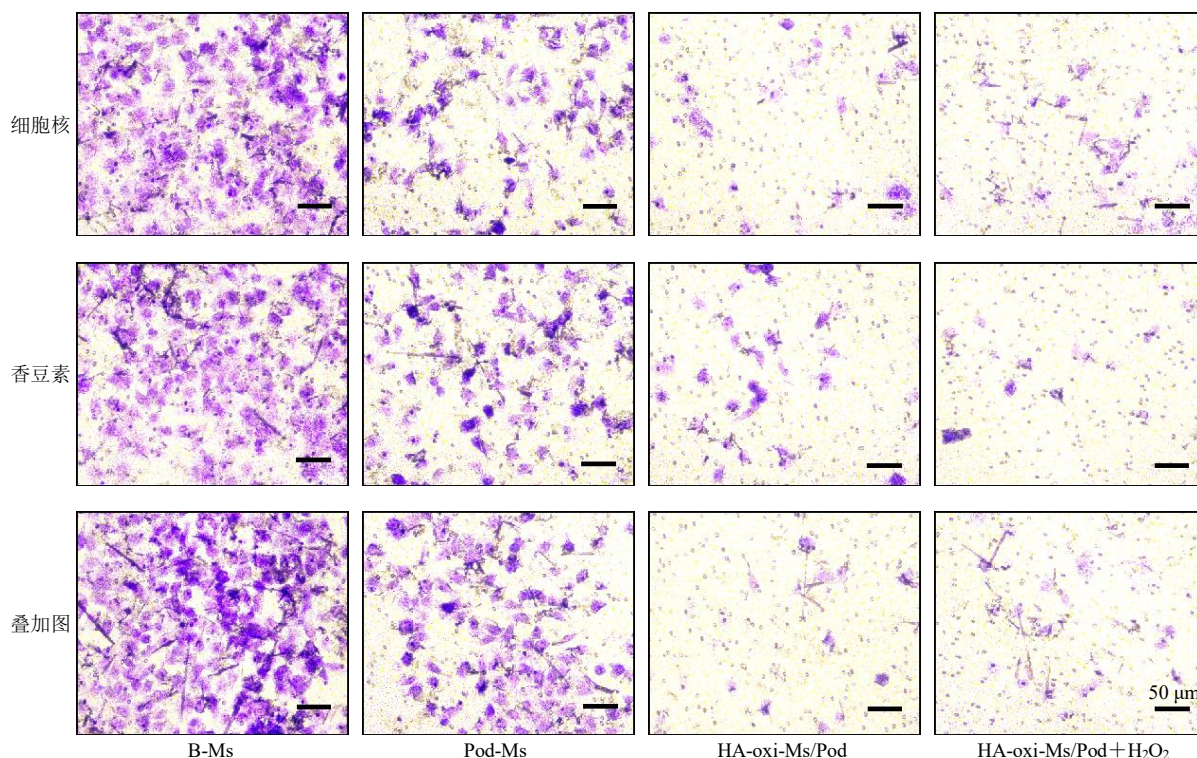


图 10 胶束对 SK-OV-3 细胞迁移能力的影响

Fig. 10 Effects of micelles on migration ability of SK-OV-3 cells

表 7 细胞迁移数 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Cell migration number ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	细胞迁移数
B-Ms	253.00 ± 14.00
Pod-Ms	170.67 ± 13.50
HA-oxi-Ms/Pod	87.67 ± 12.86***
HA-oxi-Ms/Pod+H ₂ O ₂	70.33 ± 5.51***#

与 Pod-Ms 组比较: *** $P < 0.0001$; 与 HA-oxi-Ms/Pod 组比较: # $P < 0.05$ 。

*** $P < 0.0001$ vs Pod-Ms group; # $P < 0.05$ vs HA-oxi-Ms/Pod group.

能力更强, 差异存在统计意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

卵巢癌是妇科恶性肿瘤中致死率最高的一种疾病, 起病隐匿, 病情发展迅速, 严重影响广大女性的健康。化学疗法是目前应用最广泛的治疗方法。然而, 由于治疗药物的水溶性差和不良反应大等问题, 化疗的疗效远未令人满意^[14]。

鬼臼毒素是一种天然芳基四萜木脂素, 研究表明, 鬼臼毒素对多种肿瘤细胞均具有显著的杀伤作

用^[2-3]。鬼臼毒素能够特异性地与细胞分裂过程中的微管结合, 抑制有丝分裂纺锤体的形成^[15]。然而, 鬼臼毒素存在水溶性差及较高的非靶标毒性等问题, 限制了其在临床中的广泛应用^[16]。因此, 开发多策略纳米递药系统, 可以减轻鬼臼毒素不良反应, 增强其靶向性, 提高其抗肿瘤效果。肿瘤细胞通常呈现氧化应激态, 即活性氧的产生与抗氧化防御之间的失衡, 倾向于氧化。在肿瘤细胞内, 活性氧的浓度通常是正常细胞的 100 倍^[17-18]。

活性氧响应键 TK (Thioketal) 是由硫和碳元素构成的酮缩硫醇键, 其能在活性氧环境下被氧化, 从而断裂, 因而被广泛用于设计活性氧响应性药物递送系统。在特定的病理状态(如肿瘤或炎症部位), 含有 TK 键的药物载体可以在这些特定部位选择性地裂解, 从而实现药物的靶向释放, 减少对健康组织的不良反应^[17]。这种递药系统能够提高药物的靶向性, 使药物在 SK-OV-3 细胞中的释放量更高, 增强治疗的效果。近年来, 透明质酸被广泛用于修饰

靶向药物递送系统,其可以与肿瘤细胞表面糖-蛋白中高度表达的 CD44 结合,实现药物递送系统的主动靶向效果^[19-21]。

本研究通过薄膜分散法成功构建一种新型透明质酸修饰活性氧敏感鬼臼毒素纳米胶束,以 BBD-RSM 确定最优处方,经验证胶束包封率为(94.28±0.51)%。进一步对胶束理化性质进行表征,经实验测得 HA-oxi-Ms/Pod 的平均粒径为(104.85±1.03) nm, ζ 电位为(-6.40±0.43) mV,体外释放表现为缓释性质;活性氧响应后胶束粒径缩短,药物的体外释放行为增加,表明该胶束具有活性氧响应能力;通过体外摄取实验,验证透明质酸修饰胶束在 SK-OV-3 细胞中的摄取情况显著高于未修饰胶束,HA-oxi-Ms/Pod 在高浓度活性氧环境中的摄取情况与 HA-Ms/Pod 相当。

此外,本研究进一步通过细胞毒性实验考察 HA-oxi-Ms/Pod 对 SK-OV-3 细胞存活率的影响,结果显示其半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)值为 18.94 μmol/L,活性氧敏感键断裂后 IC₅₀ 值为 6.975 μmol/L,表现出更强的杀伤肿瘤细胞活性。本制剂将为后续卵巢癌等疾病的治疗与研究提供参考,为肿瘤靶向制剂的研发提供实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 田丹丽,梁春坡,陈虹.鬼臼毒素衍生物的合成及细胞毒活性研究[J].中草药,2019,50(18):4281-4287.
- [2] Xiao J Q, Gao M X, Sun Z, *et al.* Recent advances of podophyllotoxin/epipodophyllotoxin hybrids in anticancer activity, mode of action, and structure-activity relationship: An update (2010—2020) [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 208: 112830.
- [3] Shah Z, Gohar U F, Jamshed I, *et al.* Podophyllotoxin: History, recent advances and future prospects [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(4): 603.
- [4] 李晶,李成义,李硕,等.纳米二氧化硅搭载 4'-去甲基表鬼臼毒素对人宫颈癌 HeLa 细胞的增殖抑制作用研究[J].药物评价研究,2017,40(1):28-36.
- [5] Shi R J, Fan H Y, Yu X H, *et al.* Advances of podophyllotoxin and its derivatives: Patterns and mechanisms [J]. *Biochem Pharmacol*, 2022, 200: 115039.
- [6] Cheung E C, Vousden K H. The role of ROS in tumour development and progression [J]. *Nat Rev Cancer*, 2022, 22(5): 280-297.
- [7] Wang Q, Huang C H, Wibowo F S, *et al.* Elesclomol-copper nanoparticles overcome multidrug resistance in cancer cells [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2024, 16(11): 13509-13524.
- [8] Li F R, Yu Y, Du Y M, *et al.* Borneol-modified schisandrin B micelles cross the blood-brain barrier to treat Alzheimer's disease in aged mice [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2024, 15(3): 593-607.
- [9] Riecks J, Parnigoni A, Györfy B, *et al.* The hyaluronan-related genes HAS2, HYAL1-4, PH20 and HYALP1 are associated with prognosis, cell viability and spheroid formation capacity in ovarian cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2022, 148(12): 3399-3419.
- [10] Cheng Q, Liu C Q, Zhao J, *et al.* Unlocking the potential of hyaluronic acid: Exploring its physicochemical properties, modification, and role in food applications [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2023, 142: 104218.
- [11] Zhang R S, Zhao X H, Jia A, *et al.* Hyaluronic acid-based prodrug nanomedicines for enhanced tumor targeting and therapy: A review [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 249: 125993.
- [12] Kong L, Sui G Y, Guo R B, *et al.* A multi-strategy liposome targeting hepatocellular carcinoma cells and stem cells enhances the chemotherapy effect of doxorubicin in hepatocellular carcinoma [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2023, 81: 104188.
- [13] Yu Y, He S Y, Kong L, *et al.* Brain-targeted multifunctional micelles delivering oridonin and phillyrin for synergistic therapy of Alzheimer's disease [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2023, 87: 104794.
- [14] Liang B F, Zhou D X. ROS-activated homodimeric podophyllotoxin nanomedicine with self-accelerating drug release for efficient cancer eradication [J]. *Drug Deliv*, 2021, 28(1): 2361-2372.
- [15] Chen M J, Gong N Q, Sun W, *et al.* Red-light-responsive metallopolymer nanocarriers with conjugated and encapsulated drugs for phototherapy against multidrug-resistant tumors [J]. *Small*, 2022, 18(27): e2201672.
- [16] Shah Z, Gohar U F, Jamshed I, *et al.* Podophyllotoxin: History, recent advances and future prospects [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(4): 603.
- [17] Shi J F, Wang Y H, Wu Y H, *et al.* Tumor microenvironment ROS/pH cascade-responsive

- supramolecular nanoplatform with ROS regeneration property for enhanced hepatocellular carcinoma therapy [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2024, 16(6): 7576-7592.
- [18] Ma S, Song W T, Xu Y D, *et al.* A ROS-responsive aspirin polymeric prodrug for modulation of tumor microenvironment and cancer immunotherapy [J]. *CCS Chem*, 2020, 2(6): 390-400.
- [19] 孙晓峰, 阳松威, 杨硕, 等. 包载紫杉醇的透明质酸功能化乳剂对卵巢癌治疗效果研究 [J]. 中国新药杂志, 2018, 27(18): 2180-2187.
- [20] Deiss-Yehiely E, Brucks S D, Boehnke N, *et al.* Surface presentation of hyaluronic acid modulates nanoparticle-cell association [J]. *Bioconjug Chem*, 2022, 33(11): 2065-2075.
- [21] Serini S, Cassano R, Bruni M, *et al.* Characterization of a hyaluronic acid and folic acid-based hydrogel for cisplatin delivery: Antineoplastic effect in human ovarian cancer cells *in vitro* [J]. *Int J Pharm*, 2021, 606: 120899.

[责任编辑 郑礼胜]