

• 药剂与工艺 •

重楼皂苷 VI 金属有机骨架纳米制剂的制备及抗肿瘤活性初步评价

陈红月, 尹东阁, 林舒婷, 荆霄鸿, 孙宇菲, 常榕蓉, 冯 洋, 吴辰瑶, 曲昌海, 董晓旭, 倪 健*, 尹兴斌*

北京中医药大学中药学院, 北京 102488

摘要: **目的** 采用等网状金属有机骨架-1 (isorecticular metal-organic framework-1, IRMOF-1) 包载中药抗肿瘤活性成分重楼皂苷 VI (polyphyllin VI, PPVI) 并包覆穿膜肽构建靶向纳米制剂 (PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1), 对其进行表征和体外抗肿瘤药效初步评价。 **方法** 通过“三乙胺沉淀法”和“反应包覆法”制备 PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1; 利用粒径与 ζ 电位测定、扫描电子显微镜 (scanning electron microscopy, SEM) 分析、傅里叶变换红外光谱 (Fourier-transform infrared spectroscopy, FTIR) 分析、热重分析 (thermogravimetric analysis, TGA)、气体吸附 (Brunauer-Emmett-Teller, BET) 分析、X 射线光电子能谱 (X-ray photoelectron spectroscopy, XPS) 分析对其粒径、形貌、热稳定性、比表面积等性质进行表征; 溶血实验评价纳米材料的生物安全性; CCK-8 法评价材料安全性并检测纳米粒对人胰腺癌 PANC-1 细胞增殖的影响; 荧光显微镜观察材料及纳米粒对 PANC-1 细胞核形态的影响; 激光共聚焦实验考察纳米粒的体外靶向性; 克隆形成实验、划痕实验考察纳米粒对细胞增殖、迁移的影响; 流式细胞仪检测纳米粒对细胞凋亡率和细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平的影响; 激光共聚焦实验考察纳米粒对细胞线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 的影响。 **结果** 成功制备了靶向纳米粒 PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1, 为干燥的白色粉末状。纳米粒外观为类球形, 粒径为 (177.47 ± 3.97) nm, ζ 电位为 (-7.94 ± 0.14) mV; PPVI@IRMOF-1 的载药量为 (43.02 ± 0.08) %; 纳米材料具有良好的生物安全性; 靶向肽修饰后能够明显增强肿瘤细胞对药物的摄取, 显著抑制细胞增殖, 促进细胞中 ROS 的产生和 MMP 的下降, 诱导肿瘤细胞的凋亡。 **结论** 制备的纳米粒形状均一, 载药量较高, 安全性良好, 增强了 PPVI 的抗肿瘤疗效, 能够为 PPVI 抗肿瘤制剂的开发提供参考。 **关键词:** 重楼皂苷 VI; 金属有机骨架材料; 靶向制剂; 抗肿瘤; 胰腺癌

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)09-3313-16

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.09.006

Preparation and preliminary evaluation of anti-tumor activity of polyphyllin VI metal-organic framework nanoparticles

CHEN Hongyue, YIN Dongge, LIN Shuting, JING Xiaohong, SUN Yufei, CHANG Rongrong, FENG Yang, WU Chenyao, QU Changhai, DONG Xiaoxu, NI Jian, YIN Xingbin

School of Chinese Material Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: Objective A targeted nanoformulation (PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1) was constructed by encapsulating the traditional Chinese medicine antitumor active component polyphyllin VI (PPVI) within isorecticular metal-organic framework-1 (IRMOF-1) and coating it with a cell-penetrating peptide. The study aims to characterize the nanoformulation and conduct a preliminary evaluation of its *in vitro* antitumor efficacy. **Methods** PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1 was fabricated via the “triethylamine precipitation method” and “reaction coating method”; The physicochemical properties of the nanoformulation, including particle size, morphology, thermal stability, and specific surface area, were characterized by particle size and ζ -potential measurement, scanning electron microscopy (SEM), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), thermogravimetric analysis (TGA), Brunauer-Emmett-Teller (BET) gas

收稿日期: 2025-12-05

基金项目: 北京市自然科学基金项目 (7262198); 国家中医药管理局高水平建设学科—中药药剂学 (zyyzdxk-2023272)

作者简介: 陈红月, 女, 硕士研究生, 主要从事中药新剂型与新技术的研究。E-mail: 20240935229@bucm.edu.cn

*通信作者: 倪 健, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事中药新剂型与新技术的研究。E-mail: njtcm@263.net

尹兴斌, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事中药新剂型与新技术研究。E-mail: yxhtcm@163.com

adsorption, and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). Hemolysis assay was used to assess the biosafety of nanomaterials. CCK-8 assay was adopted to evaluate the material safety and detect the effect of nanoparticles on the proliferation of human pancreatic cancer PANC-1 cells. The effect of materials and nanoparticles on the nuclear morphology of PANC-1 cells was observed by fluorescence microscopy; The targeting capability of the nanoparticles *ex vivo* was assessed by laser scanning confocal microscopy; The effects of nanoparticles on cell proliferation and migration were examined using colony formation and scratch assays, respectively; Flow cytometry was employed to determine the impact of the nanoparticles on the cellular apoptosis rate and intracellular reactive oxygen species (ROS) levels; The effect of nanoparticles on the mitochondrial membrane potential (MMP) of cells was examined by laser confocal microscopy. **Results** The targeted nanoformulation PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1 was successfully fabricated as a dry white powder. The nanoparticles exhibited a quasi-spherical morphology with an average particle size of about (177.47 ± 3.97) nm and a ζ potential of (-7.94 ± 0.14) mV; The drug loading capacity (DLC) of PPVI@IRMOF-1 was $(43.02 \pm 0.08)\%$; The nanomaterial showed excellent biocompatibility; Notably, targeted peptide modification can significantly enhance the drug uptake of tumor cells, significantly inhibit cell proliferation, promote the production of ROS and the decrease of MMP in cells, and induce apoptosis of tumor cells. **Conclusion** The prepared PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1 nanoparticles possess uniform morphology, high drug loading capacity, and good biocompatibility. Moreover, the nanoformulation significantly enhances the *in vitro* antitumor efficacy of PPVI, providing a reference for the development of PPVI-based antitumor formulations.

Key words: polyphyllin VI; metal-organic framework materials; targeted nanoformulation; anti-tumor; pancreatic cancer

胰腺癌又被称为“癌中之王”，是一种恶化程度极高的消化系统癌症^[1]。目前，其发病率和死亡率仍呈逐年上升趋势，预测到2030年，胰腺癌将成为第2大癌症死亡原因^[2]。胰腺癌的临床治疗以手术治疗为主，近年来也出现了以靶向治疗和免疫治疗为代表的新型辅助治疗手段^[3]，但现有的治疗手段仍难以突破其高转移率、高耐药性、高复发性及复杂肿瘤微环境带来的局限，因此，深度探究胰腺癌的发病机制，寻找潜在的治疗靶点，研发高效、低毒的新型抗胰腺癌药物迫在眉睫。在胰腺癌体外研究中，人胰腺癌细胞系（PANC-1）是应用最广泛的模型之一，其生物学特性与临床胰腺癌患者肿瘤细胞具有较高相似度。中药及其活性成分因多靶点、多途径发挥作用的独特优势，在抗肿瘤研究领域备受关注^[4]。重楼皂苷 VI（polyphyllin VI, PPVI）作为传统中药重楼的主要活性成分，已被大量研究证实具有显著的抗肿瘤作用，对肝癌、肺癌、乳腺癌等多种恶性肿瘤均表现出显著的抗癌活性^[5-8]，可通过抑制肿瘤细胞增殖、阻滞细胞周期、诱导细胞自噬凋亡、抑制癌细胞糖酵解等多种途径发挥抗癌效应。但其在胰腺癌中的作用机制尚未完全明确。虽然 PPVI 抗肿瘤效果显著，但其水溶性差、生物利用度低、细胞毒性大等问题严重限制了其应用，靶向纳米制剂的构建有助于改善这些问题。

金属有机骨架（metal organic frameworks, MOFs）是一类由无机金属离子或金属簇与有机配体通过配位键形成的具有周期性网络结构的晶态多孔材料^[9-11]，具有极高的孔隙率和比表面积、表面

可修饰、生物相容性好等优点，是良好的药物递送载体，近年来在中药研究领域也有广泛使用^[12-13]。IRMOF-1（又称 MOF-5）是一种最为经典的 MOFs 材料，其制备方法相对简单，可修饰性强，在载药领域独具优势^[14-16]，可用于包载 PPVI，制备纳米制剂。同时进一步在纳米粒表面修饰胰腺靶向肽（pancreatic targeting peptide, PTP），能特异性结合胰腺癌，可以实现药物的胰腺癌靶向^[17]。本实验选择了孔径与 PPVI 相匹配的 IRMOF-1 进行载药，并靶向修饰后构建了纳米靶向粒子，初步评价了其对于 PANC-1 细胞的抑制作用，研究设计框架示意图见图 1，为 PPVI 新型靶向纳米制剂的开发提供参考，以期促进 PPVI 在胰腺癌治疗中的应用。

1 仪器与材料

1.1 仪器

MS105DU 型分析天平、TGA2+型热重分析仪，梅特勒-托利多国际贸易（上海）有限公司；SB-5200 型超声波清洗机，宁波新芝生物科技股份有限公司；ZNCL-S-5D 型多点智能磁力搅拌器，河南爱博特科技发展有限公司；BY-G20 型医用离心机，北京白洋医疗器械有限公司；DZF-6050 型真空干燥箱，上海博迅医疗生物仪器股份有限公司；Agilent1260 型高效液相色谱仪，安捷伦科技有限公司；LGJ-20G 型冷冻干燥机，四环福瑞科仪科技发展（北京）有限公司；ZEN-3600 型马尔文激光粒度仪，英国马尔文仪器有限公司；Regulus 8100 型超高分辨场发射扫描电镜，日立高新技术公司；Nicolet 6700 型傅里叶红外光谱仪、ESCALAB 250Xi 型 X 射线光电子

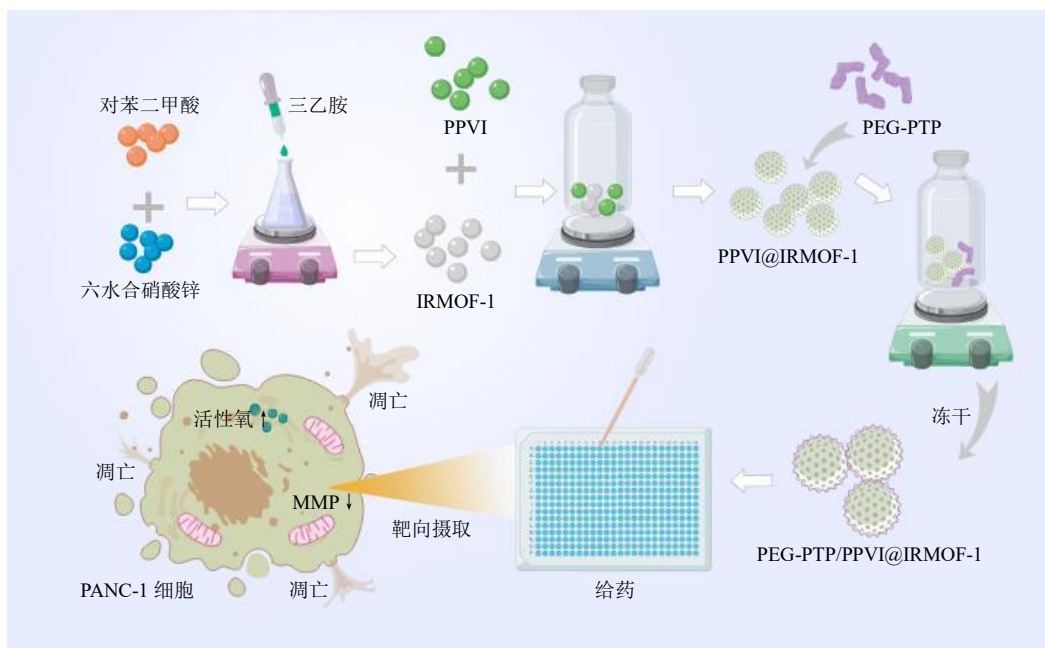


图1 研究设计框架示意图

Fig. 1 Schematic illustration of research design framework

能谱仪、Thermo Attune NxT 型流式细胞仪，赛默飞世尔科技（中国）有限公司；Tristar II Plus 3.03 型物理吸附仪，美国麦克仪器公司；Epoch 型酶标仪，美国伯腾仪器有限公司；IX73P1F 型荧光倒置显微镜，奥林巴斯（中国）有限公司；Leica TCS SP8 型超高分辨率激光共聚焦显微镜，德国莱卡控股有限公司。

1.2 药物与试剂

PPVI，批号 14859，质量分数 $\geq 98.0\%$ ，上海诗丹德标准技术服务有限公司；香豆素 6 (coumarin 6, C6)，批号 S09HS194319，质量分数 $\geq 98.0\%$ ，上海源叶生物科技有限公司；六水合硝酸锌（批号 C10095674，质量分数 $\geq 98.0\%$ ）、对苯二甲酸（批号 C16749971，质量分数 99.0%），上海麦克林生化科技股份有限公司；三乙胺（批号 20220901）、二甲基亚砜（批号 20230601），天津市大茂化学试剂合伙企业（有限合伙）；*N,N*-二甲基甲酰胺（*N,N*-dimethylformamide, DMF），批号 20250905，福晨化学试剂有限公司；三氯甲烷，批号 20240116，北京市通广精细化工公司委托制造；PEG-PTP，批号 RS0251942，西安瑞辉生物科技有限公司；DMEM 培养基（批号 6125388）、0.25%胰蛋白酶（批号 3117072）、PBS（批号 6125192），Gibco 生物科技公司；胎牛血清，货号 35-081-CV，美国康宁公司；青霉素-链霉素-两性霉素 B 混合溶液（批号

20250510）、4%组织固定液（批号 20231228）、4',6-二脒基-2-苯基吲哚（4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI，批号 BGA0050818），北京百瑞极生物科技有限公司；Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒（批号 103123240527）、线粒体膜电位（mitochondrial membrane potential, MMP）、活性氧检测试剂盒（批号 A376250606）检测试剂盒（批号 A350A250626），上海碧云天生物技术股份有限公司；CCK-8 试剂盒，批号 K001062351，兰博利德生物科技有限公司。

1.3 细胞

人胰腺癌细胞系 PANC-1，购自大连美仑生物技术有限公司；人胰管上皮细胞系 HPDE6-C7，购自厦门逸漠生物科技有限公司；小鼠三阴性乳腺癌细胞 4T1，购自广州源井生物科技有限公司；小鼠乳腺上皮细胞 HC11，购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 纳米粒的合成

2.1.1 IRMOF-1 的合成 将 1 mmol 对苯二甲酸与 2.7 mmol 六水合硝酸锌，溶解于 25 mL DMF 中，超声混匀，置磁力搅拌器上 800 r/min 搅拌 5 min，逐滴加入 1.375 mL 三乙胺，溶液由澄清变白色浑浊状，持续搅拌 2 h 后离心，弃去上清液得到乳白色沉淀，DMF 洗涤 3 次，并用氯仿浸泡 3 d，每 24 h 更换 1 次氯仿，除去残留的 DMF，浸泡完成后离心

取沉淀, 100 °C 真空活化 12 h, 即得 IRMOF-1。呈白色粉末状, 于干燥器内保存。

2.1.2 PPVI@IRMOF-1 的合成 精密称取 PPVI 40 mg, 溶于 8 mL 甲醇中, 超声溶解得到药液。精密称取 10 mg 按照“2.1.1”项下方法制备的 IRMOF-1 置于 20 mL 西林瓶中, 加入药液, 600 r/min 室温搅拌 3 d。4 000 r/min 离心(离心半径 10 cm) 10 min, 收集沉淀, 甲醇洗涤 3 次, 40 °C 下真空干燥过夜, 即得 PPVI@IRMOF-1, 呈白色粉末状。收集上清及洗涤液, 备用。

2.1.3 PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1 的合成 精密称取 2 mg PEG-PTP, 置于 20 mL 西林瓶中, 加入 5 mL 去离子水。取“2.1.2”项下方法制得的 PPVI@IRMOF-1, 精密称定 10 mg, 置于西林瓶内, 超声溶解后 500 r/min 搅拌 60 min。6 000 r/min 离心(离心半径 10 cm) 5 min 后弃去上清, 冻干, 即得 PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1, 呈白色粉末状。

2.2 载药量的测定

2.2.1 色谱条件 Agilent 1260 型高效液相色谱仪; Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水; 梯度洗脱: 0~9 min, 35%~44%乙腈; 9~20 min, 44%乙腈; 柱温 25 °C; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 203 nm; 进样量 10 μL。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取适量 PPVI 对照品, 加甲醇配制成质量浓度为 196.60 μg/mL 的 PPVI 对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 收集“2.1.2”项下的上清液和洗涤液, 置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 即得供试品溶液。

2.2.4 线性关系考察 精确称取适量的 PPVI 对照品, 加甲醇制备质量浓度为 800.0 μg/mL 的 PPVI 对照品溶液, 依次稀释 2 倍, 得到质量浓度分别为 12.5、25.0、50.0、100.0、200.0、400.0、800.0 μg/mL 的 7 个对照品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件进行检测, 绘制标准曲线并进行线性回归分析, 得回归方程 $Y=3.6127X-5.9862$, $R^2=0.9994$, 结果表明 PPVI 在 12.5~800.0 μg/mL 线性关系良好。

2.2.5 精密度考察 精确吸取质量浓度为 200 μg/mL 的 PPVI 对照品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件, 连续进样 6 针, 记录峰面积, 并计算其 RSD 值。结果显示, 连续进样 6 针的 PPVI 峰面积的 RSD 为 0.63%, 表明该仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性考察 精确吸取“2.2.3”项下方法制

备的供试品溶液 1 mL, 按照“2.2.1”项下色谱条件, 分别在制备后 0、2、4、6、12、24 h 进样测定, 记录峰面积并计算其 RSD 值。结果显示不同时间点 PPVI 峰面积的 RSD 为 1.80%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.7 重复性考察 按照“2.2.3”项下方法制备 6 份供试品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件对其进行检测, 记录峰面积并计算 PPVI@IRMOF-1 中 PPVI 质量分数的 RSD 为 1.08%, 批间差异小, 表明该方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率考察 精密称取 10 mg IRMOF-1, 置于 10 mL 量瓶中, 按照制剂中指标含量的 80%、100%、120% 加入 PPVI 对照品, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 每质量浓度平行操作 3 份, 按照“2.2.1”项下色谱条件检测峰面积, 计算其加样回收率和 RSD 值。结果显示, PPVI 的平均加样回收率分别为 97.29%、95.66%、98.90%, RSD 值分别为 2.035%、0.372%、1.572%, 表明该方法加样回收率符合要求。

2.2.9 载药量的测定 按照“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件对各供试品溶液进行检测, 液相结果见图 2。根据色谱峰面积计算未载入的药物质量, 记为 $M_{\text{上清}}$, 根据公式计算纳米粒中 PPVI 的载药量。结果表明, PPVI@IRMOF-1 的载药量为 $(43.02 \pm 0.08)\%$ 。

$$\text{载药量} = (M_{\text{加}} - M_{\text{上清}}) / M_{\text{总}}$$

$M_{\text{加}}$ 为载药时加入的 PPVI 质量, $M_{\text{总}}$ 为干燥后纳米粒的质量, 即载入的 PPVI 质量加材料质量

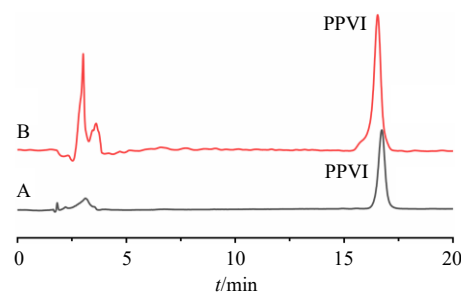


图 2 PPVI 对照品 (A) 和 PPVI@IRMOF-1 上清液 (B) 的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of PPVI reference substance (A) and supernatant of PPVI@IRMOF-1 (B)

2.3 纳米粒的表征

2.3.1 粒径与 ζ 电位测定 称取 IRMOF-1、PPVI@IRMOF-1 和 PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1 适量, 分散于 10 mL 甲醇中, 适当超声使其均匀分散, 得样品溶液, 移取适量至马尔文塑料样品池内, 利用马尔

文激光粒度仪测定粒径与 ζ 电位, 结果见图3、4, 粒径、 ζ 电位分布见表1。结果表明粒径较集中, 大

小均匀, IRMOF-1、PPVI@IRMOF-1 和 PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1 粒径依次增大。

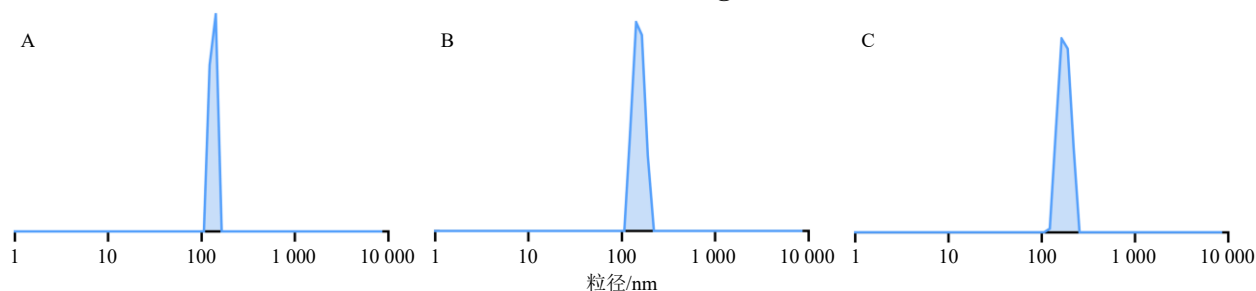


图3 IRMOF-1 (A)、PPVI@IRMOF-1 (B) 和 PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1 (C) 的粒径分布

Fig. 3 Particle size distributions of IRMOF-1 (A), PPVI@IRMOF-1 (B), and PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1 (C)

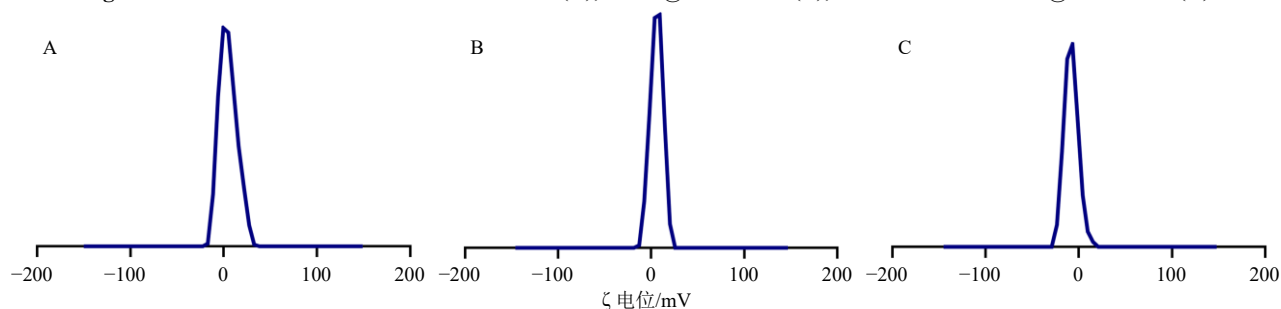


图4 IRMOF-1 (A)、PPVI@IRMOF-1 (B) 和 PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1 (C) 的 ζ 电位分布

Fig. 4 ζ potential distributions of IRMOF-1 (A), PPVI@IRMOF-1 (B), and PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1 (C)

表1 纳米粒的粒径与 ζ 电位分布 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

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

成分	粒径/nm	ζ 电位/mV	PDI
IRMOF-1	134.43 \pm 8.20	4.40 \pm 0.38	0.80 \pm 0.18
PPVI@IRMOF-1	151.63 \pm 4.20	6.19 \pm 0.27	0.40 \pm 0.07
PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1	177.47 \pm 3.97	-7.94 \pm 0.14	0.49 \pm 0.13

2.3.2 扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 分析 称取适量的 IRMOF-1、PPVI@IRMOF-1 和 PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1 分别溶于甲醇并超声分散, 取少量分散液滴于硅片表面, 挥干甲醇, 固定硅片, 喷金, 最后用 SEM 观察拍照。结果见图 5。从图片中可以看出, IRMOF-1 为类球形结构, 表面圆整、光滑, 粒径为 135 nm 左右。用 IRMOF-1 包载 PPVI 后形状未发生明显改变,

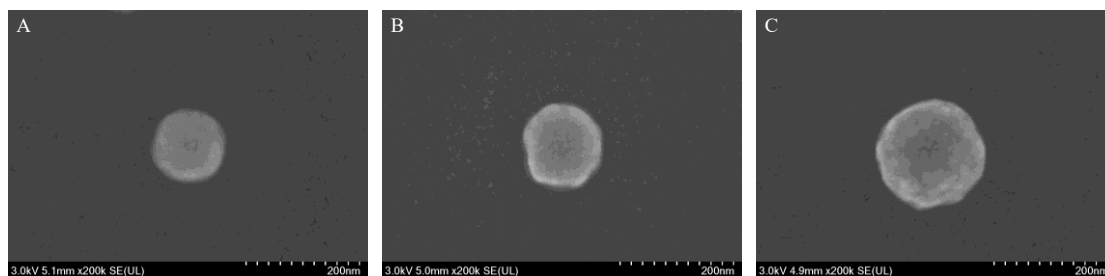


图5 IRMOF-1 (A)、PPVI@IRMOF-1 (B) 和 PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1 (C) 的 SEM 图

Fig. 5 SEM images of IRMOF-1 (A), PPVI@IRMOF-1 (B), and PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1 (C)

粒径变大, 为 150 nm 左右。修饰后的载药粒子表面粗糙, 有小突起出现, 粒径在 180 nm 左右, 表明靶向肽成功修饰在了载药粒子表面。SEM 的粒径结果与马尔文粒径仪的测试结果基本一致。

2.3.3 傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) 分析 称取适量 PPVI、

IRMOF-1、PPVI@IRMOF-1 和 PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1 的样品, 在玛瑙研钵中与溴化钾放置混合均匀, 充分研磨后, 将混合物压成薄片, 在 4000~400 cm^{-1} 扫描获得 FTIR 图。结果见图 6。IRMOF-1 的 FTIR 图中 3500~3300 cm^{-1} 处的宽吸收峰为-OH 伸缩振动峰, 1700~1380 cm^{-1} 的 2 个

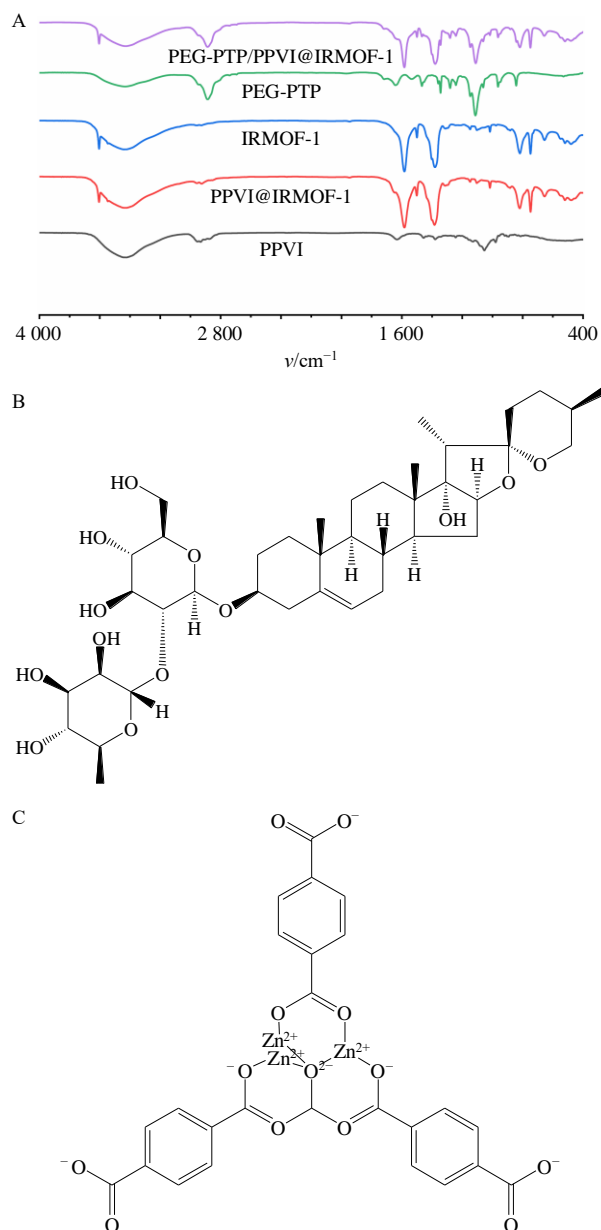


图6 PPVI、IRMOF-1、PPVI@IRMOF-1、PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1和PEG-PTP/PPVI的FTIR分析图(A)、PPVI结构式(B)、IRMOF-1结构式(C)

Fig. 6 FTIR spectra of PPVI, IRMOF-1, PPVI@IRMOF-1, PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1 and PEG-PTP (A), chemical structure of PPVI (B), chemical structure of IRMOF-1 (C) 强峰为羧酸官能团中 C=O 的反对称和对称伸缩振动峰, 523 cm^{-1} 处为 Zn_4O 四面体金属簇中的 Zn-O 键吸收峰, $1\ 300\sim 400\text{ cm}^{-1}$ 处为 IRMOF-1 的框架结构振动峰, 以上结果说明了 IRMOF-1 的成功合成; PPVI@IRMOF-1 的红外图谱与 IRMOF-1 基本相似, $800\sim 1\ 000\text{ cm}^{-1}$ 处 PPVI 笛体母核峰被掩盖, 但 $2\ 800\sim 3\ 000\text{ cm}^{-1}$ 区域出现了 PPVI 中饱和 C-H 的伸缩振动峰, 说明 PPVI 被成功包载; PEG-PTP/

PPVI@IRMOF-1 中出现了 PEG-PTP 的特征峰, 如 $2\ 890\text{ cm}^{-1}$ 处亚甲基- CH_2 -对称伸缩振动峰和 $1\ 110\text{ cm}^{-1}$ 附近醚键-C-O-C-伸缩振动峰, 说明 PEG-PTP 成功修饰在载药纳米粒表面。

2.3.4 热重分析 (thermogravimetric analysis, TGA) 称取适量 IRMOF-1、PPVI@IRMOF-1 和 PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1、PPVI 粉末于热重仪中, 仪器在氮气环境中, 以 $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速率从 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 升高至 $600\text{ }^\circ\text{C}$, 记录样品质量与温度变化的关系, 得到 TGA 曲线, 结果见图 7。由图可知, IRMOF-1 作为载体能够在 $430\text{ }^\circ\text{C}$ 以内保持相对稳定, 热稳定性较强。当温度达到 $300\text{ }^\circ\text{C}$ 时, PPVI 质量急剧下降, 可能是高温条件下发生了分解, PPVI@IRMOF-1 和 PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1 在 $430\text{ }^\circ\text{C}$ 内质量变化较小, 由此可见, IRMOF-1 的包载可以提高 PPVI 的热稳定性。

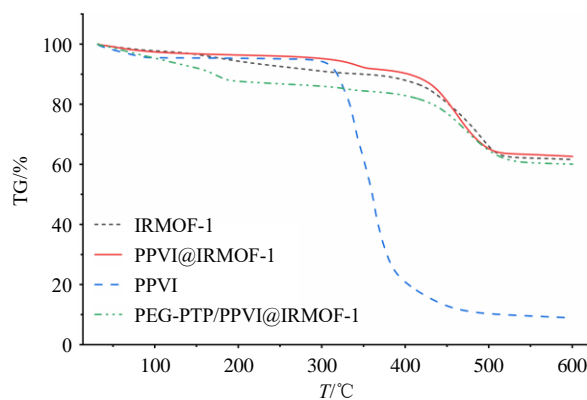


图7 IRMOF-1、PPVI@IRMOF-1、PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1和PPVI的TGA曲线
Fig. 7 TGA curves of IRMOF-1, PPVI@IRMOF-1, PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1, and PPVI

2.3.5 气体吸附 (Brunauer-Emmett-Teller, BET) 分析 称取适量 IRMOF-1, 加热至 $120\text{ }^\circ\text{C}$, 并在此温度下维持 6h, 记录吸附和脱附过程中的曲线变化。结果如图 8 所示, 所制备的纳米粒比表面积为 $119.212\ 0\text{ m}^2/\text{g}$ 。

2.3.6 X 射线光电子能谱 (X-ray photoelectron spectroscopy, XPS) 分析 将干燥后的 IRMOF-1 样品均匀铺展在导电胶上, 依次完成全谱扫描与特征元素窄区高分辨扫描, 对数据进行结合能校准、背景扣除。结果见图 9。样品的全谱图中, 在结合能 284.80 、 531.71 、 $1\ 021.89\text{ eV}$ 处出现明显的特征峰, 分别对应 IRMOF-1 骨架的 C、O、Zn 元素, 与 IRMOF-1 的化学组成完全一致; Zn 2p 高分辨谱图呈现典型的“双峰结构”, 结合能分别为 $1\ 021.89$ 、

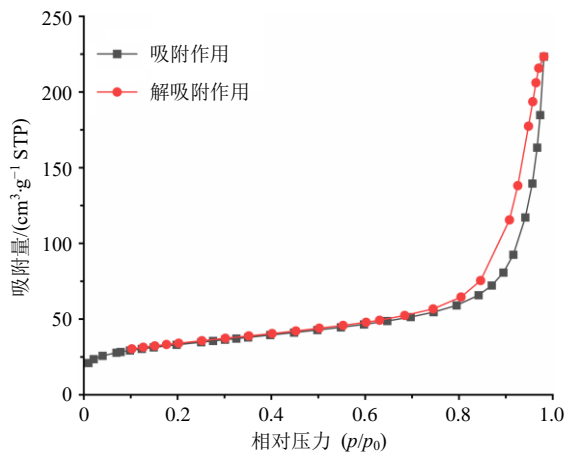


图 8 IRMOF-1 的等温吸附-脱附曲线

Fig. 8 Isothermal adsorption-desorption curve of IRMOF-1

1 044.89 eV, 与 Zn^{2+} 的标准结合能高度吻合, 分别对应 Zn 2p_{3/2} 和 Zn 2p_{1/2} 特征峰, 证明 IRMOF-1 中 Zn 元素以 +2 价形式存在, 与 IRMOF-1 中 Zn^{2+} 作为配位中心的理论结构一致, 表明了金属有机骨架 IRMOF-1 的成功合成。

2.4 PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1 稳定性考察

精密称取 1 mg PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1, 分别分散于 15 mL PBS、含 10% 血清培养基中, 等量分装至透明离心管, 设置 -4 °C 与常温 2 个温度组, 在预定时间点 (24、48、72 h) 拍照观察 2 组分散液的颜色均匀性、分层情况、是否沉淀等外观状态, 结果见图 10; 并于第 24、48、72 小时取样检测粒径, 结果见表 2。结果显示, 72 h 内 -4 °C 组与常温组纳米粒在 2 种分散介质中颜色均匀, 无沉淀析出和分层现象, 粒径测试结果显示粒径无明显变化, 说明该纳米粒具有较好的稳定性。

2.5 IRMOF-1 及纳米粒的安全性初步评价

2.5.1 细胞培养及传代 待 PANC-1 细胞处于指数生长期时, 弃去原细胞培养基 (含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素混合液的 DMEM 培养基), 加入 3 mL 的 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 加入 1 mL 胰酶消化 1~2 min, 待细胞形态变圆、细胞间隙逐渐变大时弃去胰酶, 加入完全培养基终止消化, 吹打至细胞从壁上脱落后收集到离心管中, 置低速离心机中 1 000 r/min 离心 (离心半径 10 cm) 5 min, 弃去上清, 加入 3 mL 完全培养基, 吹打均匀后以 1 : 4 比例接种至新培养瓶内, 置培养箱内培养, 定期观察细胞状态及生长情况。

2.5.2 CCK-8 法检测细胞存活率 将处于对数生长

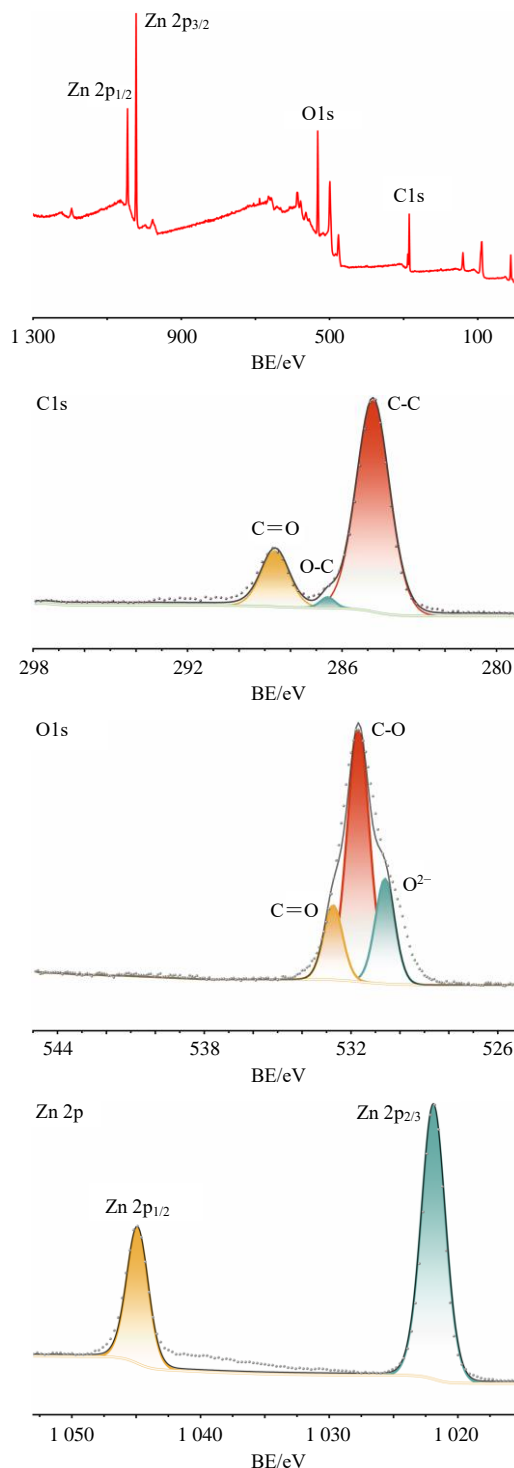


图 9 IRMOF-1 的 XPS 图

Fig. 9 XPS spectrum of IRMOF-1

期的 PANC-1 和 HPDE6-C7 细胞以 7 000 个/孔的密度接种于 96 孔板中。培养 12 h 后弃去培养基, 除对照组外, 加入含不同质量浓度 IRMOF-1 (0、1.0、4.0、8.0、12.0、16.0、20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的培养液, 培养 24 h 后弃去培养液, CCK-8 法检测细胞在 450 nm 处的吸光度 (A) 值, 根据公式计算细胞存活率。同

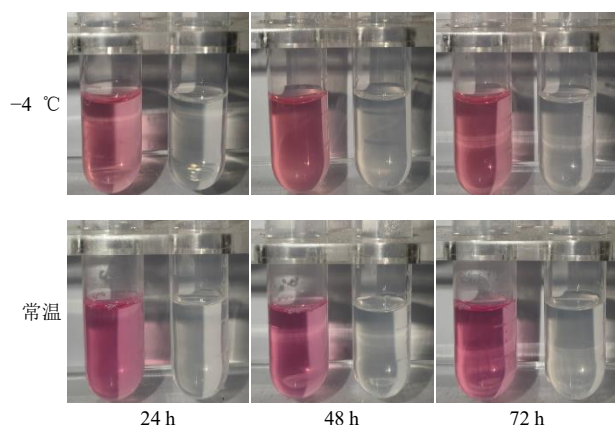


图 10 纳米制剂在-4 °C和常温下储存 24、48、72 h 时的外观状态

Fig. 10 Appearance of nanof ormulation during storage at -4 °C and ambient temperature for 24, 48, 72 h

表 2 纳米制剂稳定性考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Investigation on stability of nanopreparations ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

温度	介质	粒径/nm		
		24 h	48 h	72 h
-4 °C	PBS	171.20±6.20	179.43±12.35	172.13±16.59
	含 10%血清培养基	166.60±4.82	172.83±14.01	182.03±13.54
常温	PBS	177.93±12.10	173.13±3.92	183.90±9.87
	含 10%血清培养基	169.70±7.34	178.47±6.26	186.30±7.78

法加入含不同质量浓度 PEG-PTP (0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 μg/mL) 的培养液, 检测 PEG-PTP 对 PANC-1 细胞增殖的影响。结果如表 3、4 所示, 与对照组相比, 各剂量组 IRMOF-1 (1~20 μg/mL) 作用于 PANC-1 细胞和 HPDE6-C7 细胞的存活率均无显著性差异, 这表明在 0~20 μg/mL 的实验给药剂量下, IRMOF-1 具有良好的生物安全性, 不同质量浓度 (0~5 μg/mL) PEG-PTP 组细胞的存活率与对照组无显著性差异, 对细胞增殖无影响。

细胞存活率 = $(A_{\text{实验}} - A_{\text{调零}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{调零}})$

2.5.3 DAPI 染色实验观察 将处于对数生长期的

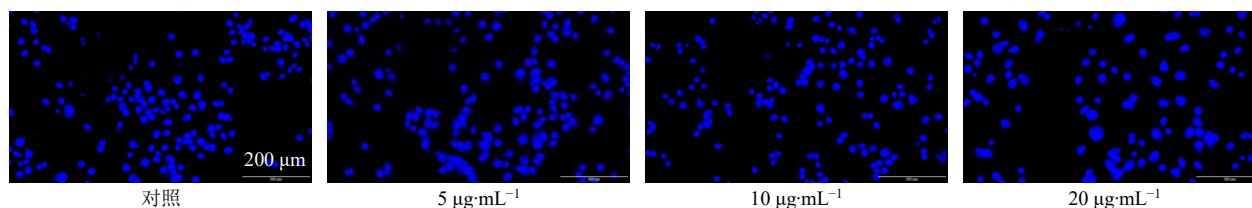


图 11 不同质量浓度的 IRMOF-1 作用于 PANC-1 细胞后的 DAPI 染色荧光图 (×100)

Fig. 11 DAPI-stained fluorescence images of PANC-1 cells treated with IRMOF-1 at different concentrations (×100)

表 3 IRMOF-1 作用于 PANC-1 细胞和 HPDE6-C7 细胞的细胞存活率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Cell viability of PANC-1 cells and HPDE6-C7 cells treated with IRMOF-1 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

IRMOF-1/ (μg·mL ⁻¹)	细胞存活率/%	
	HPDE6-C7	PANC-1
0	100.00±0.00	100.00±0.00
1.0	103.16±8.09	98.84±5.70
4.0	92.59±5.25	97.25±1.17
8.0	101.06±7.39	97.49±5.55
12.0	99.36±3.05	96.93±0.64
16.0	90.55±3.76	99.70±4.05
20.0	87.19±4.51	97.39±2.21

表 4 PEG-PTP 作用于 PANC-1 细胞的存活率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Cell viability of PANC-1 cells treated with PEG-PTP ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

PEG-PTP/ (μg·mL ⁻¹)	细胞存活率/ %	PEG-PTP/ (μg·mL ⁻¹)	细胞存活率/ %
0	100.00±0.00	3.0	103.13±5.98
0.5	101.21±7.42	4.0	106.77±9.22
1.0	100.18±7.49	5.0	105.26±8.20
2.0	103.12±5.52		

PANC-1 细胞以 4×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板中, 培养 12 h 后弃去培养基, 分别加入 2 mL 低、中、高质量浓度的 IRMOF-1 (5、10、20 μg/mL) 培养液。培养 24 h 后弃去培养基, 4% 的组织固定液固定 15 min, 加入 DAPI 染液置 37 °C 培养箱染色 15 min, 洗涤后每孔加入 1 mL PBS, 在荧光显微镜下观察, 并随机拍照。各组细胞核形态见图 11。不同质量浓度的 IRMOF-1 作用于 PANC-1 细胞后, 细胞核形态圆整, 边缘清晰, 无细胞核固缩、分裂现象, 与对照组相比无明显差异, 这同样说明了 IRMOF-1 在 0~20 μg/mL 的给药范围内对细胞核无明显影响, 有良好的生物安全性。

2.5.4 溶血实验考察 将 250 μL 不同质量浓度的 IRMOF-1 和 PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1 (20、40、60、

80、100、120 μg/mL) 加入到等体积 2% 的红细胞悬液中, 轻轻混匀, 并设置阳性对照组 (250 μL 蒸馏水与等体积 2% 的红细胞悬液混匀) 和阴性对照组 (250 μL PBS 与等体积 2% 的红细胞悬液混匀), 置于 37 °C 恒温水浴中孵育 1 h。

孵育完成后所有样品 1 500 r/min 离心 (离心半径 10 cm) 5 min, 拍照并收集上清液加入 96 孔板

中, 用酶标仪测定 574 nm 处的 A 值。根据公式计算溶血率。结果如图 12 和表 5 所示。同阳性对照组相比, 0~120 μg/mL 的 IRMOF-1 和 PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1 的溶血现象不明显, 溶血率同阴性对照组相比无显著性差异。这说明载体和纳米粒具有良好的生物安全性。

$$\text{溶血率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{阴性对照}}) / (A_{\text{阳性对照}} - A_{\text{阴性对照}})$$

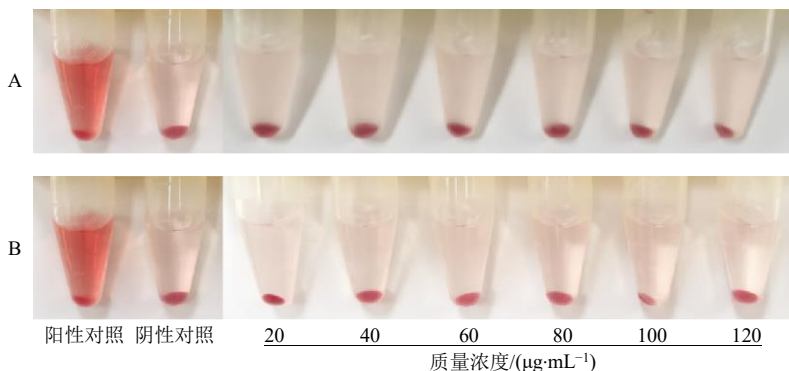


图 12 不同质量浓度的 IRMOF-1 (A) 和 PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1 (B) 作用于红细胞后的溶血现象

Fig. 12 Hemolysis of red blood cells treated with IRMOF-1 (A) and PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1 (B) at different concentrations

表 5 不同质量浓度的 IRMOF-1 和 PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1 作用于红细胞后的溶血率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Hemolysis rate of red blood cells treated with IRMOF-1 and PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1 at different concentrations ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	质量浓度/(μg·mL ⁻¹)	溶血率/%
阳性对照	-	100.00 ± 0.00
IRMOF-1	20	0.35 ± 0.19
	40	1.75 ± 1.30
	60	0.89 ± 0.65
	80	1.43 ± 0.38
	100	-0.62 ± 0.19
	120	0.03 ± 0.82
PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1	20	0.92 ± 0.22
	40	1.69 ± 1.10
	60	0.92 ± 0.58
	80	2.58 ± 0.76
	100	0.03 ± 0.80
	120	2.07 ± 0.59

2.6 体外细胞摄取及细胞选择性研究

2.6.1 时间相关性摄取 将处于对数生长期的 PANC-1 细胞以 3×10^5 的密度接种于激光共聚焦皿中, 培养过夜后, 弃去培养基, 以 C6 作为荧光指示剂, 加入 1 mL 含有 PEG-PTP/C6@IRMOF-1 (C6 质量浓度为 1.0 μg/mL) 的培养液, 分别在给药 0、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0 h 后, 弃去培养液, 同“2.5.3”

项下进行固定、染色操作, 最后在激光共聚焦显微镜下观察并拍照。结果如图 13 所示, 随着给药时间的延长, 绿色荧光的强度也在逐渐增加, 至 4 h 细胞基本摄取完全。这表明该纳米粒能够以时间相关的方式有效地被肿瘤细胞所吞噬。

2.6.2 靶向性评价 将处于对数生长期的 PANC-1 细胞以 3×10^5 个的密度接种于激光共聚焦皿中, 培养过夜后弃去培养基, 分别加入 1 mL 含有 C6、C6@IRMOF-1、PEG-PTP/C6@IRMOF-1 (C6 质量浓度为 1.0 μg/mL) 的培养液, 给药 4 h 后, 弃去培养液, 同“2.5.3”项下进行固定、染色操作, 最后在激光共聚焦显微镜下观察并拍照。结果如图 14 所示, 在 PANC-1 细胞中, 相比于 C6, C6@IRMOF-1 的荧光强度微强于前者, 而 PEG-PTP/C6@IRMOF-1 的荧光明显强于其他 2 组, 这表明加入 PEG-PTP 靶向肽后纳米粒能够更有效地被肿瘤细胞所摄取。

2.6.3 细胞选择性摄取 将处于对数生长期的 PANC-1、4T1、HC11、HPDE6-C7 细胞以 3×10^5 个的密度接种于激光共聚焦皿中, 培养过夜后, 弃去培养基, 分别加入 1 mL 含有 PEG-PTP/C6@IRMOF-1 (C6 质量浓度为 1 μg/mL) 的培养液, 给药 4 h 后, 同“2.5.3”项下进行固定、染色操作, 最后在激光共聚焦显微镜下观察并拍照。同时将对数生长的 PANC-1、4T1、HC11、HPDE6-C7 细胞以 4×10^5 的密度接种于 6 孔板中, 培养 12 h 后吸除培养基, 分

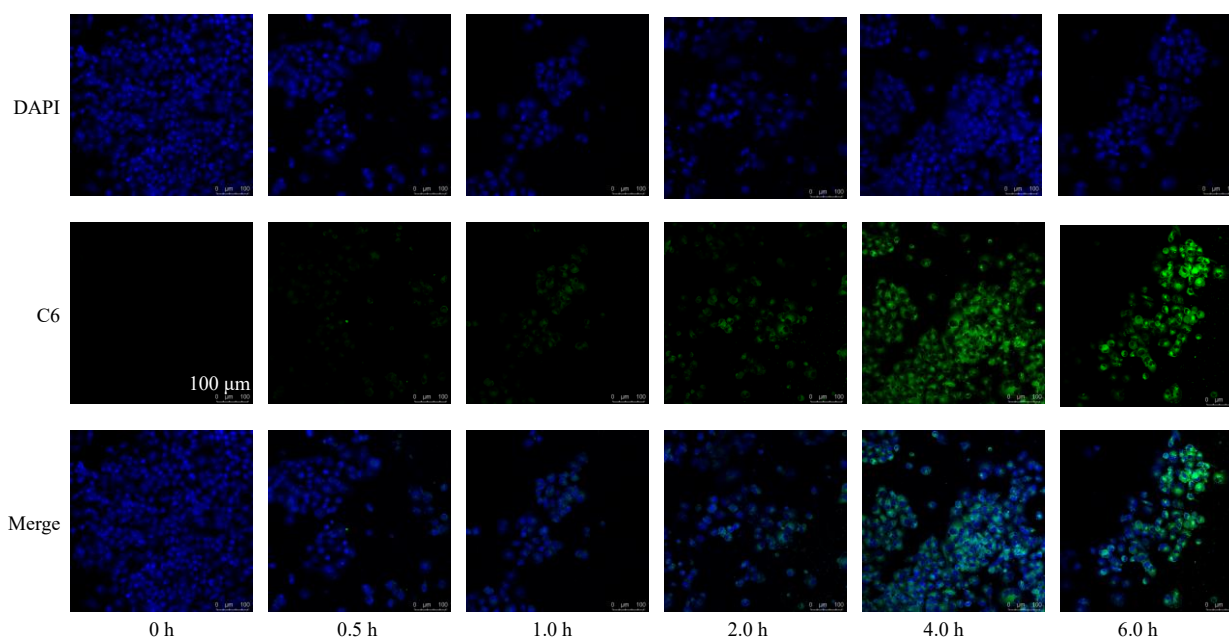


图 13 不同孵育时间 PANC-1 细胞对 PEG-PTP/C6@IRMOF-1 的摄取情况

Fig. 13 Cellular uptake of PEG-PTP/C6@IRMOF-1 by PANC-1 cells at different incubation times

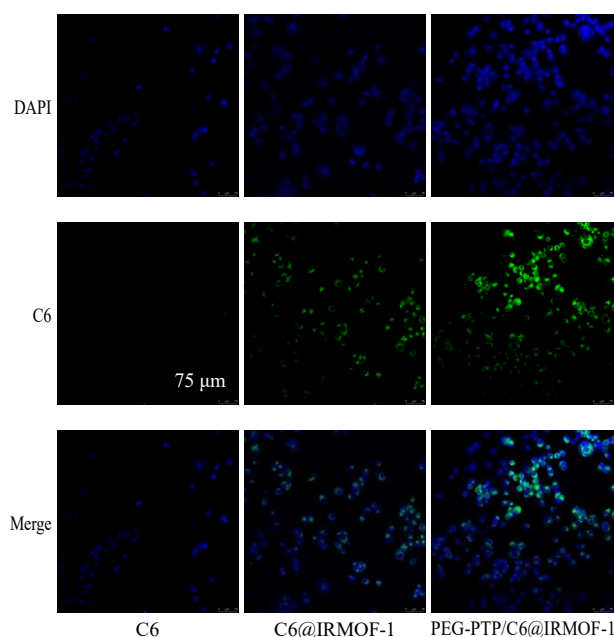


图 14 PANC-1 细胞对 C6、C6@IRMOF-1、PEG-PTP/C6@IRMOF-1 的摄取情况

Fig. 14 Cellular uptake of C6, C6@IRMOF-1, and PEG-PTP/C6@IRMOF-1 by PANC-1 cells

别加入 1 mL 含有 PEG-PTP/C6@IRMOF-1 (C6 质量浓度为 1.0 μg/mL) 的培养液, 4 h 后收集细胞至 15 mL 离心管中, 洗涤 1 次, 随后放入冰盒内避光保存, 利用流式细胞仪进行定量观察。结果见表 6 和图 15。激光共聚焦结果显示, PEG-PTP/C6@IRMOF-1 作用于 PANC-1 细胞时绿色荧光较强, 在其他 3 种细胞中没有表现出明显的绿色荧光, 流式

表 6 不同细胞对 PEG-PTP/C6@IRMOF-1 的摄取比例 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Uptake ratio of PEG-PTP/C6@IRMOF-1 by different cell types ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	细胞摄取比例	组别	细胞摄取比例
PANC-1	98.50 ± 1.47	HPDE6-C7	30.40 ± 2.62***
4T1	47.53 ± 0.38***	HC11	48.30 ± 1.35***

与 PANC-1 组比较: *** $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs PANC-1 group.

细胞术定量结果显示, PANC-1 细胞对 PEG-PTP/C6@IRMOF-1 的摄取比例显著高于其他 3 种细胞, 由此说明经过 PEG-PTP 修饰的载药粒子具备主动靶向的性能, 具有明显的胰腺癌细胞选择性。

2.7 体外药效学研究

2.7.1 细胞分组 PANC-1 细胞处于对数生长期时, 进行铺板给药, 将细胞随机分为对照组、PPVI 组、IRMOF-1 组、PPVI@IRMOF-1 组和 PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1 组[以 PPVI 的半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀) 计]。

2.7.2 CCK-8 法检测细胞存活率 将对数生长的 PANC-1 细胞以 7 000 个/孔的密度接种于 96 孔板中, 培养 12 h 后弃去培养基, 分别加入 0、2、4、6、8、10、12 μg/mL 的 PPVI、PPVI@IRMOF-1、PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1 药液培养, 24 h 后弃去培养液, 采用 CCK-8 法检测细胞在 450 nm 处 A 值, 根据公式计算细胞存活率, 检测细胞增殖情况, 使用 Graph Pad

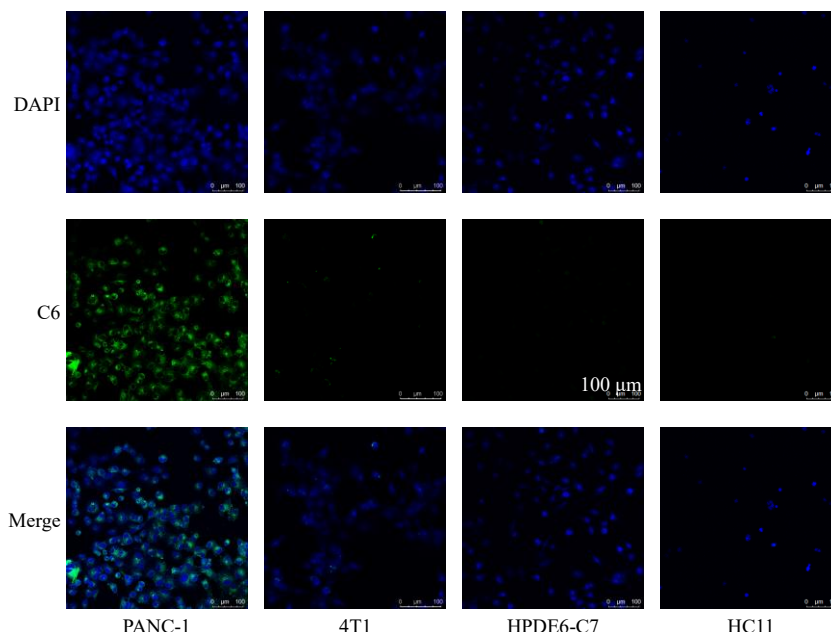


图 15 PANC-1、4T1、HPDE6-C7、HC11 细胞对 PEG-PTP/C6@IRMOF-1 的摄取情况

Fig. 15 Cellular uptake of PEG-PTP/C6@IRMOF-1 by PANC-1, 4T1, HPDE6-C7, and HC11 cells

Prism 9.5 软件进行非线性回归分析，并计算各组的 IC₅₀，结果见表 7。结果显示，PPVI、PPVI@IRMOF-1、PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1 的 IC₅₀ 分别为 6.730、6.012、5.620 μg/mL。由结果可知，随着给药剂量的增加，PANC-1 细胞的存活率逐渐下降，具有明显的剂量相关性。同时，PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1 组细胞存活率与 PPVI 和 PPVI@IRMOF-1 组相比，具有显著性差异，表现出更明显的增殖抑制作用。

2.7.3 DAPI 染色实验 将对数生长的 PANC-1 细胞以 4×10⁵ 的密度接种于 6 孔板中，按照“2.7.1”项

下分组处理细胞，培养 12 h 后吸除培养基，分别加入各药液培养，24 h 后弃去培养液，同“2.5.3”项下方法进行固定、染色操作，最后在荧光显微镜下观察并随机拍照，观察给药处理后细胞核的形态。结果如图 16 所示，给药后 IRMOF-1 组与对照组无明显差别，PPVI 组细胞核开始固缩，PPVI@IRMOF-1 组的细胞核固缩现象更为明显，而 PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1 组基本完全固缩，与对照组相比具有显著性差异，由此说明 PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1 对肿瘤细胞核的损伤能力最强。

表 7 不同质量浓度 PPVI、PPVI@IRMOF-1、PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1 处理 PANC-1 细胞的存活率 (x̄ ± s, n = 3)

Table 7 Cell viability of PANC-1 cells treated with PPVI, PPVI@IRMOF-1, and PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1 at different concentrations (x̄ ± s, n = 3)

组别	细胞存活率/%						
	0 μg·mL ⁻¹	2 μg·mL ⁻¹	4 μg·mL ⁻¹	6 μg·mL ⁻¹	8 μg·mL ⁻¹	10 μg·mL ⁻¹	12 μg·mL ⁻¹
PPVI	100.00 ± 0.00	104.81 ± 2.40	108.15 ± 1.90	52.47 ± 11.15***	40.13 ± 7.11***	12.96 ± 2.91***	9.36 ± 0.50***
PPVI@IRMOF-1	100.00 ± 0.00	102.46 ± 1.71	98.88 ± 2.85	48.09 ± 3.05***	14.23 ± 3.92***	6.54 ± 1.30***	5.53 ± 0.14***
PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1	100.00 ± 0.00	101.83 ± 6.46	88.35 ± 5.42**	39.34 ± 1.50***	11.00 ± 1.45***	4.28 ± 0.71***	1.31 ± 0.93***

与 0 μg·mL⁻¹ 比较: **P < 0.01 ***P < 0.001。

P < 0.01 *P < 0.001 vs 0 μg·mL⁻¹。

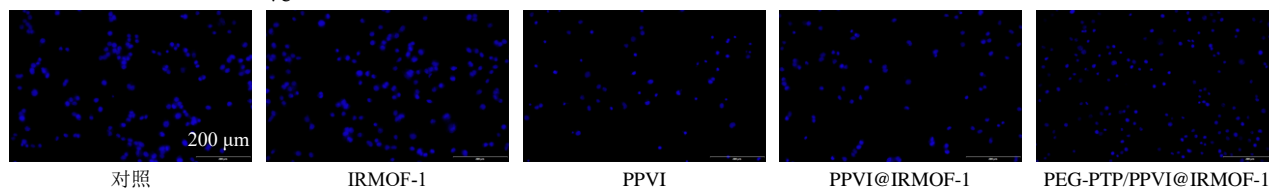


图 16 不同组别 PANC-1 细胞核形态变化

Fig. 16 Nuclear morphology changes of PANC-1 cells in different groups

2.7.4 克隆形成实验 将对数生长的 PANC-1 细胞以 4×10^5 的密度接种于 6 孔板中, 按照“2.7.1”项下分组处理细胞, 培养 12 h 后弃去培养基, 分别加入各药液培养, 24 h 后弃去培养液, 胰酶消化后将细胞收集到 15 mL 离心管中, 1 000 r/min 离心 (离心半径 10 cm) 5 min, 弃去上清, 加入 PBS 重悬后计数, 以 1 000 个/孔的密度重新接种到 6 孔板中, 每 3~4 天更换 1 次培养基, 至单克隆细胞数量 > 50、集落间未相连时, 弃去培养基, 4%组织固定液固定、结晶紫染液染色后用 PBS 缓冲液洗至无色,

置于室温下晾干, 拍照, 并根据公式统计克隆形成率。结果见图 17 和表 8。结果显示, IRMOF-1 组与对照组无明显差别, PPVI 组、PPVI@IRMOF-1 组、PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1 组的抗增殖能力依次增强, 这表明对 PPVI 进行载药后改善了药物的细胞摄取效率, 而 PEG-PTP 修饰则进一步提高了纳米粒的靶向性, 显著提升了药物对克隆细胞的抗增殖效果。

$$\text{克隆形成率} = \frac{\text{实验组克隆形成数}}{\text{对照组克隆形成数}}$$

2.7.5 划痕实验 将对数生长的 PANC-1 细胞接种

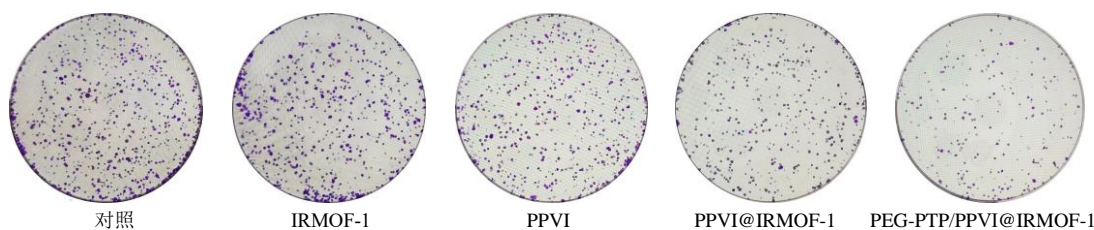


图 17 不同组别 PANC-1 细胞的克隆形成情况

Fig. 17 Colony formation of PANC-1 cells in different groups

表 8 不同组别 PANC-1 细胞的克隆形成率、划痕愈合率、ROS 变化和凋亡检测结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 8 Colony formation rate, wound healing rate, ROS level changes and apoptosis assay results of PANC-1 cells in different groups ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	克隆形成率/%	划痕愈合率/%	ROS 相对荧光强度/%	相对活细胞率/%	相对凋亡率/%
对照	100.00 ± 0.00	56.63 ± 3.32	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	22.04 ± 4.75 ^{△△△}
IRMOF-1	98.68 ± 8.04	52.29 ± 1.73	97.33 ± 3.79	96.80 ± 1.20	28.96 ± 0.85 ^{△△△}
PPVI	62.95 ± 2.97 ^{**}	28.94 ± 4.84 ^{***}	159.00 ± 9.54 ^{***}	72.06 ± 0.78 ^{***}	57.01 ± 1.00 ^{△△△}
PPVI@IRMOF-1	46.04 ± 4.52 ^{***}	13.81 ± 5.02 ^{***}	184.33 ± 1.53 ^{***}	40.34 ± 0.29 ^{***}	90.22 ± 0.43 ^{△△}
PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1	13.67 ± 2.04 ^{***}	3.74 ± 7.39 ^{***}	218.67 ± 13.43 ^{***}	20.90 ± 2.93 ^{***}	100.00 ± 0.00

与对照组比较: ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$; 与 PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1 组比较: ^{△△} $P < 0.01$ ^{△△△} $P < 0.001$ 。

^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs control group; ^{△△} $P < 0.01$ ^{△△△} $P < 0.001$ vs PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1 group.

于 24 孔板中, 按照“2.7.1”项下分组处理细胞, 培养至细胞长满后, 在超净工作台内, 用 10 μ L 移液枪吸头垂直于培养板孔底划出一条均匀的划痕, 划痕完成后, 用 PBS 缓冲液轻柔洗涤细胞以去除划痕产生的细胞碎片, 加入 1 mL 含各药液的无血清培

养基, 置于细胞培养箱中继续培养。分别于 0、24 h 拍照观察划痕愈合情况, 并根据公式计算划痕愈合率。结果如图 18 和表 8 所示, 随培养时间延长, 各组划痕出现了不同程度的愈合, IRMOF-1 组与对照组无明显差别, 划痕愈合最快。PPVI 组、PPVI@

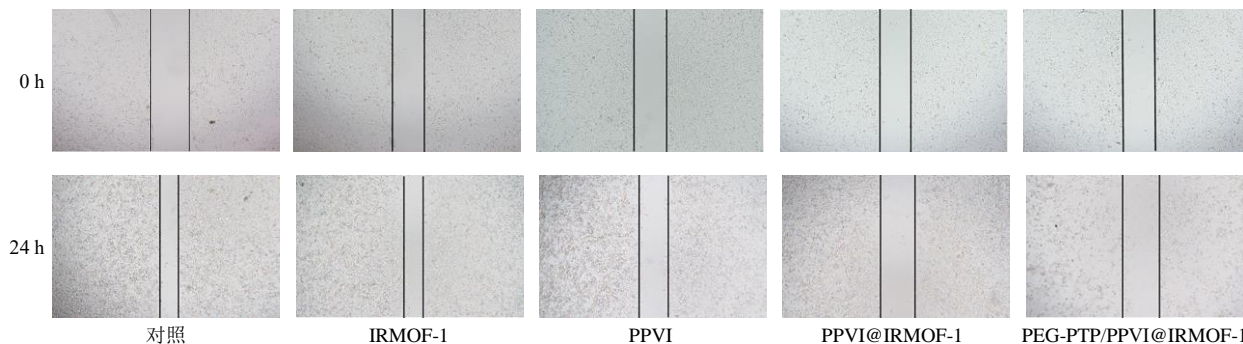


图 18 不同组别 PANC-1 细胞迁移情况

Fig. 18 Cell migration of PANC-1 cells in different groups

IRMOF-1 组划痕愈合速度依次减慢, PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1 组愈合效果最不明显, 这证实了对 PPVI 进行载药及修饰可显著抑制细胞迁移, 且修饰后效果更强。

划痕愈合率 = (0 h 划痕面积 - 24 h 划痕面积) / 0 h 划痕面积

2.7.6 活性氧的测定 将对数生长期的 PANC-1 细胞以 4×10^5 的密度接种于 6 孔板中, 按照“2.7.1”项下分组处理细胞, 培养 12 h 后吸除培养基, 分别加入各药液培养, 24 h 后弃去培养液, 加入 DCFH-DA 探针孵育 20 min, 洗涤后用荧光显微镜定性观察拍照。同时利用流式细胞仪定量考察细胞内活性

氧的水平, 给药 24 h 后收集细胞与培养液至 15 mL 离心管中, 离心后细胞沉淀加入 DCFH-DA 探针孵育 30 min, 每 5 min 颠倒混匀 1 次, 孵育结束后离心、弃去上清, 洗涤, 最后加入 DMEM 重悬细胞, 放入冰盒内避光保存, 利用流式细胞仪进行细胞内荧光检测, 结果见图 19 和表 8。结果表明, IRMOF-1 组和对照组的荧光强度无明显差别, PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1 组的绿色荧光亮度要明显强于 PPVI 组和 PPVI@IRMOF-1 组, 与对照组相比具有显著性差异, 表明靶向载药纳米粒组比载药组和游离药物组具有更强的诱导 ROS 生成的能力。

2.7.7 Annexin V-FITC/PI 双染实验 将对数生长的

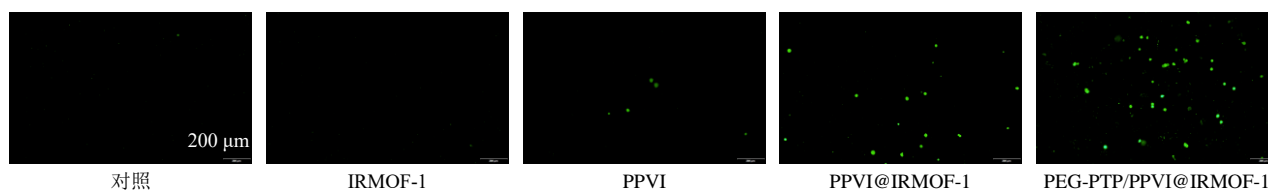


图 19 不同组别 PANC-1 细胞内 DCFH 相对荧光强度

Fig. 19 Relative fluorescence intensity of DCFH in PANC-1 cells in different groups

PANC-1 细胞以 4×10^5 的密度接种于 6 孔板中, 按照“2.7.1”项下分组处理细胞, 培养 12 h 后吸除培养基, 分别加入各药液培养, 24 h 后收集细胞与培养液至 15 mL 离心管中, 离心, 细胞沉淀加入 195 μ L Annexin V-FITC 结合液重悬, 后加入 5 μ L Annexin V-FITC 染液和 10 μ L 碘化丙啶染色液, 轻轻混匀, 室温避光孵育 15 min, 随后放入冰盒内, 避光保存, 于 1 h 内完成细胞凋亡检测, 结果见图 20 和表 8。结果显示实验组与对照组、IRMOF-1 组的活细胞存活率具有显著性差异, 且与游离药物组和载药组相比靶向载药纳米粒组显著促进了细胞的凋亡。

2.7.8 MMP 的测定 将对数生长的 PANC-1 细胞以 4×10^5 的密度接种于 6 孔板中, 按照“2.7.1”项下分组处理细胞, 每组设 3 个复孔, 培养 12 h 后吸除培养基, 分别加入各药液培养, 24 h 后弃去含药培养基, 加入 JC-1 染色工作液孵育 20 min, 洗涤后置于荧光显微镜下观察, 结果见图 21。结果显示, IRMOF-1 组和对照组无明显差别, PPVI 组细胞以红色荧光为主, 仅少量绿色荧光; PPVI@IRMOF-1 组红色荧光减少、绿色荧光明显增多; PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1 组红色荧光几乎消失, 细胞满布绿色荧光, 与游离药物组和载药组相比靶向载药纳米粒组显著促进了 MMP 的下降。

2.7.9 统计学分析 利用 GraphPad Prism 9.5 软件

进行统计分析, 采用单因素方差分析进行多重比较, $P < 0.05$ 认为具有统计学差异。

3 讨论

本研究首次通过金属有机骨架材料将 PPVI 制备成胰腺癌治疗的靶向纳米递送系统, 实验结果显示, 该金属有机骨架载药量较高且具有良好的生物相容性, 能够被肿瘤细胞高效摄取, 效果优于游离的中药成分以及未修饰的纳米制剂, 并通过 CCK-8、划痕实验、克隆形成实验、DAPI 染色、活性氧检测及线粒体膜电位检测等多种方法初步验证了该靶向纳米制剂的抗肿瘤活性, 较 PPVI 有明显的活性增强。研究结果能够为后续 PPVI 深入的抗肿瘤研究奠定基础。

MOFs 又称多孔配位聚合物, 在生物医药领域起步虽晚却发展迅速, 极大的促进了靶向药物递送系统 (targeted drug delivery system, TDDS) 的发展^[18]。金属离子和有机配体组合的多样性丰富了 MOFs 的种类, 如等网状金属有机框架系列 (isorecticular metal-organic frameworks, IRMOFs)、沸石咪唑酯框架系列 (zeolitic imidazolate frameworks, ZIFs)、拉瓦锡研究所材料系列 (Matériaux de l'Institut Lavoisier, MILs) 等, 均凭借其优势广泛应用于中药的研究中^[19-21], 选择了经典的锌基金属有机骨架材料 IRMOF-1 (MOF-5) 包载 PPVI, 其表面存在

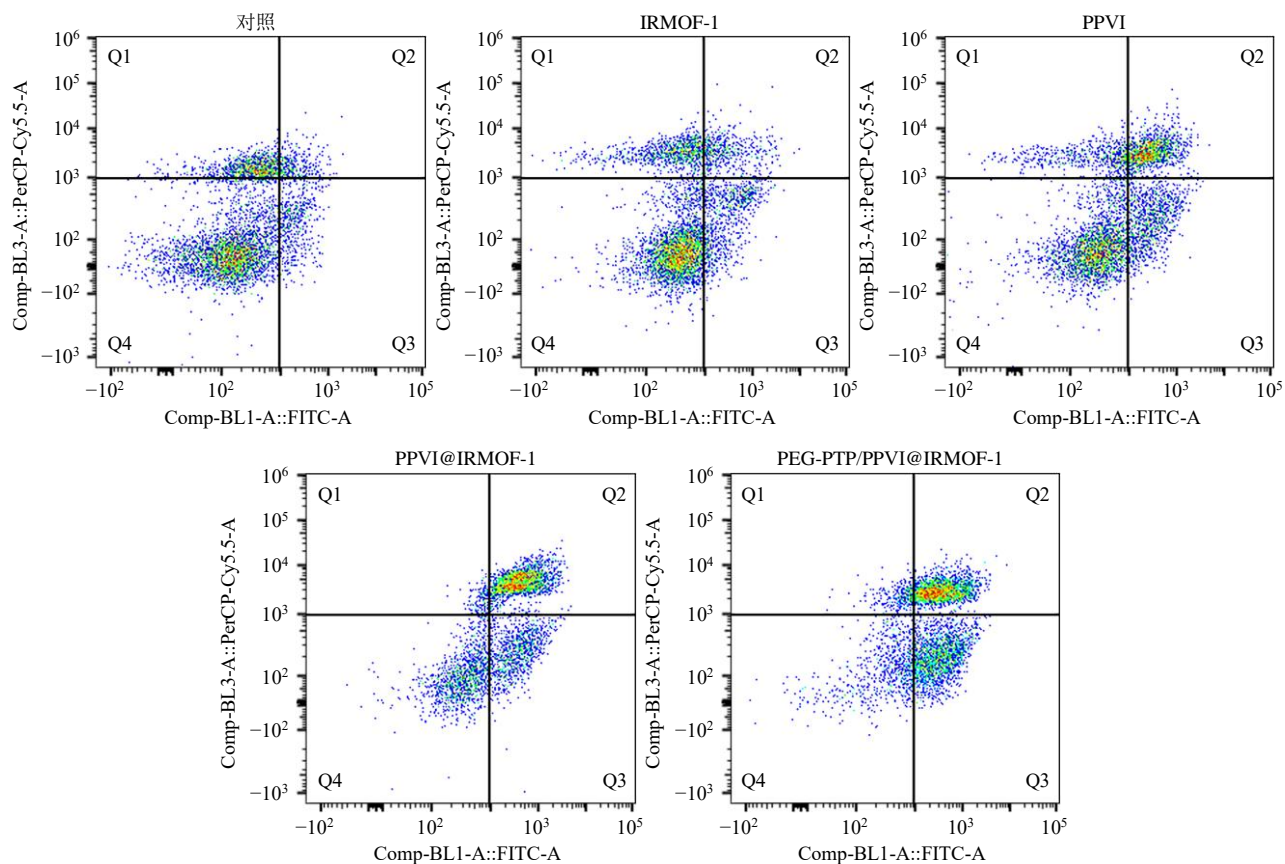


图 20 不同组别 PANC-1 细胞的凋亡检测结果

Fig. 20 Apoptosis assay results of PANC-1 cells in different groups

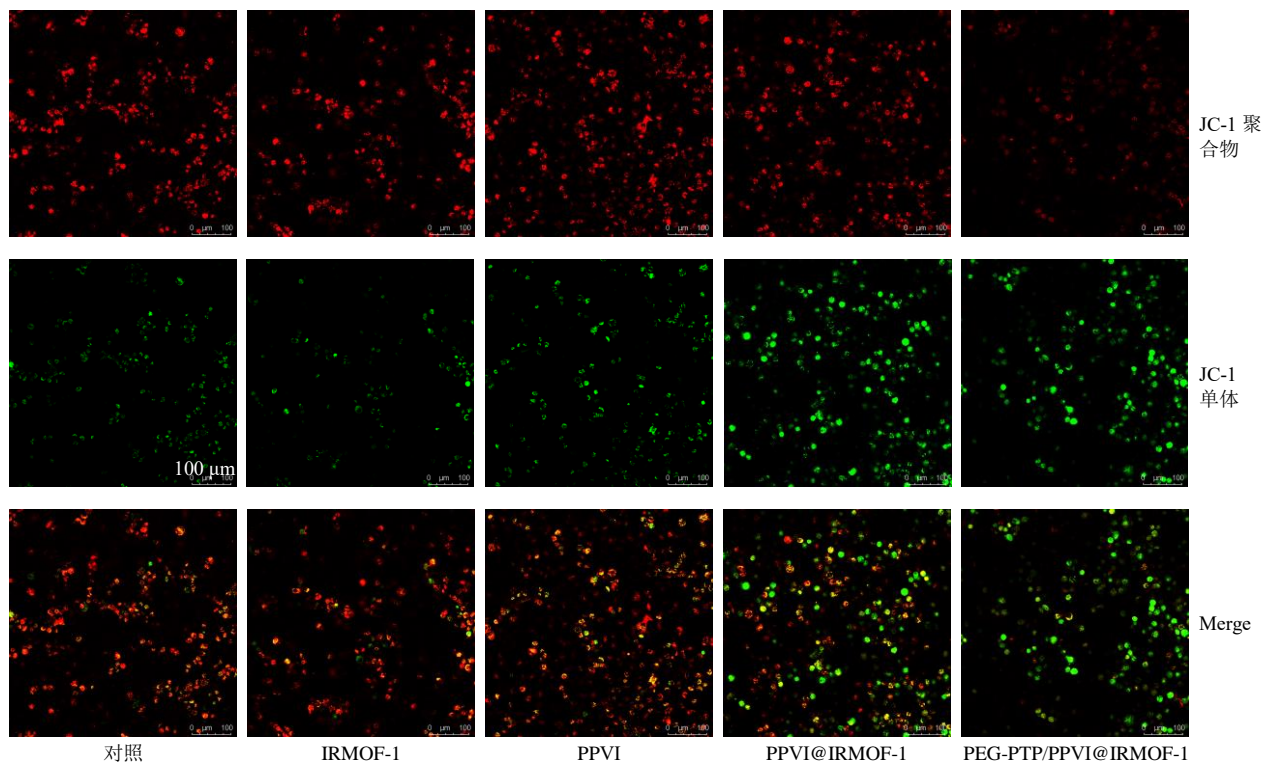


图 21 不同组别 PANC-1 细胞的 MMP 变化

Fig. 21 MMP changes of PANC-1 cells in different groups

一定数量的未配位羧基基团,可修饰性强,便于偶联靶向肽,主动识别并结合肿瘤细胞,能显著提高纳米制剂治疗的高效性和精准性。

胰腺癌约 90%发病源于胰腺导管上皮细胞的不典型增生^[22],此阶段可持续时间达数年至十几年,随后不典型增生细胞恶变形成原位癌,逐渐发展为局限于胰腺内、直径 ≤ 2 cm 的小肿瘤,继续发展肿瘤将突破胰腺包膜,侵袭到周围组织,最后癌细胞通过血液或淋巴系统转移至肝脏、肺、腹膜等远处器官。可见抑制癌细胞的生长与发展是癌症治疗的关键。

PPVI 是来源于中药重楼里的天然抗肿瘤成分,其抗肿瘤机制包括引起癌细胞发生周期阻滞;抑制癌细胞酶活性;通过 c-Jun 氨基末端激酶/丝裂原活化蛋白激酶 p38(c-Jun N-terminal kinase/p38 mitogen-activated protein kinase, JNK/p38)、ROS/JNK、Fas 蛋白/Fas 配体(FS-7 associated surface antigen/Fas ligand, Fas/FasL)、蛋白激酶 B/糖原合成激酶-3 β (protein kinase B/glycogen synthase kinase-3 β , Akt/GSK-3 β)等通路调节凋亡相关基因表达,激活细胞凋亡和自噬;抑制癌细胞的糖酵解等^[23]。根据本研究的结果提示,PEG-PTP/PPVI@IRMOF-1 的促凋亡作用可能与其激活 ROS 介导的线粒体凋亡通路相关,有研究表明,ROS 升高后通过多条通路触发细胞凋亡程序,既可以损伤线粒体导致 MMP 下降及线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, mPTP)开放,触发细胞色素 C(cytochrome C, Cyt-C)等促凋亡因子释放并激活内源性凋亡通路;又可间接激活死亡受体通路中的 Fas/FasL 或肿瘤坏死因子受体 1/肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor receptor 1/tumor necrosis factor- α , TNFR1/TNF- α)信号轴,经半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-8(cysteine-asparticase-8, Caspase-8)介导直接或间接放大凋亡信号,协同促进细胞凋亡^[24-25]。本研究仅从细胞层面初步验证了该靶向纳米制剂的抗肿瘤活性,尚缺乏关键凋亡标志物的验证,如 Caspase-3/9 活化、Bcl-2 相关 X 蛋白/B 细胞淋巴瘤-2 蛋白(Bcl-2-associated X protein/B-cell lymphoma 2, Bax/Bcl-2)表达、Cyt-C 释放等。此外该纳米制剂如何影响了胰腺癌肿瘤微环境以及抗肿瘤机制是否涉及到铁死亡、铜死亡通路或诱导肿瘤糖酵解有待进一步探究,后续还需通过动物实验在体内模型中验证其对胰腺癌细胞的优先靶向能力,并进一

步验证其在体内环境中的适用性与有效性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 宋深磊. 带您了解“癌中之王”: 胰腺癌 [J]. 抗癌之窗, 2025(2): 40-43.
- [2] Park W, Chawla A, O'Reilly E M. Pancreatic cancer: A review [J]. *Jama*, 2021, 326(9): 851.
- [3] Tempero M A, Malafa M P, Chiorean E G, et al. Pancreatic adenocarcinoma, version 1.2019 [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2019, 17(3): 202-210.
- [4] 闫靖楠, 宋忠阳, 祁亚锋, 等. 中药调控肿瘤免疫微环境的作用及机制研究进展 [J]. 中草药, 2025, 56(17): 6477-6492.
- [5] Lin Z F, Liu Y T, Li F Y, et al. Anti-lung cancer effects of polyphyllin VI and VII potentially correlate with apoptosis *in vitro* and *in vivo*: Anti-lung cancer effects of polyphyllin VI and VII [J]. *Phytother Res*, 2015, 29(10): 1568-1576.
- [6] 李茂蓉, 张辉. 重楼皂苷 VI 通过调控 SNRPD1 抑制肝癌细胞增殖的机制研究 [J]. 上海中医药杂志, 2024, 58(4): 79-85.
- [7] Wang P W, Yang Q B, Du X Y, et al. Targeted regulation of Rell2 by microRNA-18a is implicated in the anti-metastatic effect of polyphyllin VI in breast cancer cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 851: 161-173.
- [8] 王晓菲, 李鹏, 杨玥, 等. 重楼皂苷抗炎、抗氧化及抗肿瘤作用机制研究进展 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(12): 2699-2708.
- [9] Dhakshinamoorthy A, Asiri A M, García H. Metal-organic framework (MOF) compounds: Photocatalysts for redox reactions and solar fuel production [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55(18): 5414-5445.
- [10] Furukawa H, Cordova K E, O'Keeffe M, et al. The chemistry and applications of metal-organic frameworks [J]. *Science*, 2013, 341(6149): 1230444.
- [11] Meek S T, Greathouse J A, Allendorf M D. Metal-organic frameworks: A rapidly growing class of versatile nanoporous materials [J]. *Adv Mater*, 2011, 23(2): 249-267.
- [12] Wang K X, Cai M R, Yin D G, et al. Functional metal-organic framework nanoparticles loaded with polyphyllin I for targeted tumor therapy [J]. *J Sci Adv Mater Devices*, 2023, 8(2): 100548.
- [13] 蔡梦如, 姚宇, 尹东阁, 等. 金属有机骨架材料在中药研究的应用进展 [J]. 中草药, 2021, 52(16): 5028-5038.
- [14] Chen G S, Luo J Y, Cai M R, et al. Investigation of metal-organic framework-5 (MOF-5) as an antitumor drug oridonin sustained release carrier [J]. *Molecules*, 2019,

- 24(18): 3369.
- [15] Cai M R, Liang W L, Wang K X, *et al.* Aperture modulation of isoreticular metal organic frameworks for targeted antitumor drug delivery [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2022, 14(32): 36366-36378.
- [16] Cai M R, Qin L Y, You L T, *et al.* Functionalization of MOF-5 with mono-substituents: Effects on drug delivery behavior [J]. *RSC Adv*, 2020, 10(60): 36862-36872.
- [17] Li Y, Wang H B, Wang K, *et al.* Targeted co-delivery of PTX and TR3 siRNA by PTP peptide modified dendrimer for the treatment of pancreatic cancer [J]. *Small*, 2017, 13(2): 1602697.
- [18] Gao Y, Xie J J, Chen H J, *et al.* Nanotechnology-based intelligent drug design for cancer metastasis treatment [J]. *Biotechnol Adv*, 2014, 32(4): 761-777.
- [19] Li Y Q, Zheng Y T, Lai X Y, *et al.* Biocompatible surface modification of nano-scale zeolitic imidazolate frameworks for enhanced drug delivery [J]. *RSC Adv*, 2018, 8(42): 23623-23628.
- [20] Ray Chowdhuri A, Bhattacharya D, Sahu S K. Magnetic nanoscale metal organic frameworks for potential targeted anticancer drug delivery, imaging and as an MRI contrast agent [J]. *Dalton Trans*, 2016, 45(7): 2963-2973.
- [21] Zhang Y, Wang L, Liu L, *et al.* Engineering metal-organic frameworks for photoacoustic imaging-guided chemo-/ photothermal combinational tumor therapy [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10(48): 41035-41045.
- [22] 桑楠. 了解胰腺癌的病因与风险 [J]. *人人健康*, 2025(20): 78-79.
- [23] 陈红月, 尹东阁, 林舒婷, 等. 重楼皂苷VI的现代研究进展 [J/OL]. *中国实验方剂学杂志*, (2025-10-22) [2026-04-13]. <https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20252125>.
- [24] Zhang Y, Bao Y L, Wu Y, *et al.* Alantolactone induces apoptosis in RKO cells through the generation of reactive oxygen species and the mitochondrial pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 8(4): 967-972.
- [25] 何旻倩, 张诗妍, 沈逸竹, 等. 细胞凋亡机制及其信号通路研究进展 [J]. *生物化工*, 2025, 11(4): 228-231.

[责任编辑 郑礼胜]