

共载高三尖杉酯碱/雷公藤甲素的靶向纳米粒制备及体外抗肿瘤评价

孙承文¹, 王 帅², 章民昊², 李文超³, 王艳春⁴, 顾 鹏^{2*}

1. 江南大学附属医院 泌尿外科, 江苏 无锡 214062

2. 无锡市锡山人民医院 泌尿外科, 江苏 无锡 214105

3. 东南大学附属中大医院 泌尿外科, 江苏 南京 210009

4. 河南中医药大学第三附属医院 康复中心, 河南 郑州 450003

摘要: 目的 制备共载高三尖杉酯碱(homoharringtonine, HHT)和雷公藤甲素(triptolide, TRL)-前列腺特异性膜抗原(prostate specific membrane antigen, PSMA)靶向肽修饰脂质-聚合物纳米粒(PSMA-targeting peptide-modified lipid-polymer nanoparticles co-loaded with HHT and TRL, HHT/TRL-PSMA-Lips), 优化其制备工艺, 并进行体外抗前列腺癌肿瘤作用评价。方法 测定 HHT 与 TPL 的溶解度及油水分分配系数($\lg P$), 合成 PSMA 靶向肽修饰 PEG 化磷脂。采用乳化-溶剂挥发法制备 HHT/TPL-PSMA-Lips, 采用中心复合设计-响应面法(central composite design-response surface methodology, CCD-RSM)优化处方, 并考察其粒径、 ζ 电位、包封率等指标。考察制剂在不同介质中的体外释放行为。并采用 MTT 法、流式细胞术考察纳米粒对前列腺癌细胞的体外抑制及诱导凋亡作用, 采用细胞摄取实验考察纳米粒的肿瘤细胞靶向效果。结果 HHT 与 TPL 在不同介质中的溶解度均较低, 亲脂性较强。合成 PSMA 靶向肽修饰 PEG 化磷脂的相对分子质量为 4 643.8。采用最优处方的制备的 HHT/TPL-PSMA-Lips 粒径均一, 平均粒径为 (209.12 ± 3.24) nm, ζ 电位为 (-34.4 ± 2.5) mV, 综合包封率为 $(81.20 \pm 0.40)\%$ [HHT $(80.73 \pm 0.86)\%$, TPL $(82.00 \pm 0.40)\%$], 体外释放实验证明, HHT/TPL-PSMA-Lips 可有效提高 HHT 和 TPL 的溶解度, 并具有一定的 pH 响应性释放效果。细胞实验表明, HHT/TPL 联合给药组显示出高于单一药物组的前列腺肿瘤细胞抑制作用, 及诱导凋亡效果, HHT/TPL-Lips 可提高抗肿瘤活性, 靶向修饰的纳米粒 HHT/TPL-PSMA-Lips 显示出对前列腺肿瘤细胞最强的抑制效果。细胞摄取实验表明, PSMA 靶向肽的修饰可有效提高纳米制剂在肿瘤细胞的摄取。结论 制备的 HHT/TPL-PSMA-Lips 不仅可解决药物的溶解性问题, 并可显著提升肿瘤靶向作用以及抗肿瘤效果, 为中药新制剂用于前列腺癌的治疗提供了新思路。

关键词: 高三尖杉酯碱; 雷公藤甲素; 前列腺癌; 靶向纳米粒; 抗肿瘤

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)18-7281-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.18.017

Preparation and *in vitro* anti-tumor evaluation of targeted nanoparticles co-loaded with homohardenine/triptolide

SUN Chengwen¹, WANG Shuai², ZHANG Minhao², LI Wenchao³, WANG Yanchun⁴, GU Peng²

1. Department of Urology, Affiliated Hospital of Jiangnan University, Wuxi 214062, China

2. Department of Urology, Xishan People's Hospital of Wuxi City, Wuxi 214105, China

3. Department of Urology, Zhongda Hospital Affiliated to Southeast University, Nanjing 210009, China

4. The Rehabilitation Center of the Third Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China

Abstract: Objective To prepare prostate specific membrane antigen (PSMA)-targeting peptide-modified lipid-polymer nanoparticles co-loaded with homoharringtonine and triptolide (HHT/TPL-PSMA-Lips), optimize its preparation process, and evaluate its *in vitro* anti-prostate cancer activity. **Methods** The solubility and oil-water partition coefficient ($\lg P$) of HHT and TPL were determined, and PSMA-targeting peptide-modified PEGylated phospholipids were synthesized. HHT/TPL-PSMA-Lips was prepared by the

收稿日期: 2026-03-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(U1804181); 河南省中医药专项课题(2024ZY2134); 无锡市卫生健康委科研青年项目(Q202307); 无锡市卫生健康委中青年后备拔尖人才项目(HB2023117); 中国博士后科学基金第 73 批面上资助(2023M730572)

作者简介: 孙承文, 男, 副主任医师, 研究方向为泌尿系肿瘤。E-mail: awen1698@126.com

*通信作者: 顾 鹏, 男, 博士, 副主任医师, 研究方向为泌尿系肿瘤。E-mail: gdp_88@163.com

emulsification-solvent evaporation method, and the formulation was optimized using central composite design-response surface methodology (CCD-RSM). Indicators including particle size, ζ potential, and encapsulation efficiency were investigated. The *in vitro* release behavior of the formulation in different media was evaluated. MTT assay and flow cytometry were used to assess the *in vitro* inhibitory effect and apoptosis-inducing activity of the nanoparticles on prostate cancer cells, while cell uptake assay was performed to verify the tumor cell targeting efficiency of the nanoparticles. **Results** HHT and TPL showed low solubility in various media and strong lipophilicity. The molecular weight of the synthesized PSMA-targeting peptide-modified PEGylated phospholipids was 4 643.8. HHT/TPL-PSMA-Lips prepared with the optimal formulation exhibited uniform particle size, with an average particle size of (209.12 ± 3.24) nm, a ζ potential of (-34.4 ± 2.5) mV, and a comprehensive encapsulation efficiency of $(81.20 \pm 0.40)\%$ [HHT $(80.73 \pm 0.86)\%$, TPL $(82.00 \pm 0.40)\%$]. *In vitro* release experiments demonstrated that HHT/TPL-PSMA-Lips could effectively improve the solubility of HHT and TPL, and exhibit a certain pH-responsive release property. Cell experiments showed that the HHT/TPL combined administration group displayed stronger inhibitory effect on prostate cancer cells and better apoptosis-inducing activity than the single drug groups. HHT/TPL-Lips enhanced the anti-tumor activity, and the targeted modified nanoparticles (HHT/TPL-PSMA-Lips) showed the strongest inhibitory effect on prostate cancer cells. Cell uptake assay indicated that modification with PSMA-targeting peptide could effectively enhance the cellular uptake of the nanoformulation in tumor cells. **Conclusion** The prepared HHT/TPL-PSMA-Lips not only solves the solubility problem of the drugs but also significantly enhances tumor targeting and anti-tumor efficacy, providing a new approach for the development of new traditional Chinese medicine formulations for the treatment of prostate cancer.

Key words: homoharringtonine; triptolide; prostate cancer; targeted nanoparticle; anti-tumor

前列腺癌 (prostate cancer, PC) 是一种雄激素驱动的恶性肿瘤, 尽管雄激素剥夺治疗 (androgen deprivation therapy, ADT) 是治疗转移性前列腺癌的标准方法^[1-2], 但大多数患者最终会发展为去势抵抗性前列腺癌 (castration resistant prostate cancer, CRPC) ^[3-4]。传统化疗药物如多西他赛缺乏肿瘤特异性, 全身毒性大^[5]; 新型内分泌药物如恩杂鲁胺、阿比特龙, 易产生获得性耐药, 针对 CRPC 仍缺少有效的治疗手段, 开发新治疗策略显得尤为重要。

近年来中药活性成分在 CRPC 治疗中展现出了优异的效果^[8]。高三尖杉酯碱 (homoharringtonine, HHT) 是一种从不同三尖杉属 *Cephalotaxus* Sieb. et Zucc. ex Endl. 植物中提取的植物生物碱, 如三尖杉 *Cephalotaxus fortunei* Hook. f. 或海南粗榧 *C. hainanensis* H. L. Li 的枝叶及树皮。味苦, 性冷, 传统功效为清热解毒、消肿散结, 苗药《中华本草》记载其具收敛止血、清热解毒、抗癌之效。现代中药药理将其归为抗肿瘤类中药活性成分。

HHT 于 1990 年被《中国药典》收载。2012 年, 被美国 FDA 批准用于慢性粒细胞白血病的治疗^[7]。HHT 通过结合 60S 核糖体亚基, 阻断蛋白合成延伸、提前终止翻译, 快速下调雄激素受体 (androgen receptor, AR)、AR 剪接变体 7 (AR splice variant 7, AR-V7) 等短半衰期癌蛋白^[8]。研究表明, HHT 不仅广泛用于白血病治疗, 且对胰腺癌、结肠癌、乳腺癌等多种实体瘤均表现出一定的抑制作用^[9], 但目前用于前列腺癌研究的报道甚少。

雷公藤甲素 (triptolide, TPL) 来源于卫矛科雷公藤属植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 的根、根皮或全株, 属于环氧二萜内酯类化合物^[10]。传统功效为祛风除湿、解毒杀虫、活血通络。现代药理证实其具备抗炎、广谱抗肿瘤的药用活性, 是中药抗肿瘤研究的热点活性成分。研究报道, TPL 具有广谱高效的抗肿瘤性能, 通过上调 miR-320b 靶向抑制 AR 等多靶点多途径发挥抗肿瘤作用, 且抑制前列腺癌细胞增殖和转移^[11]。TPL 可与其他活性成分联合使用, 增强抗肿瘤效果^[12]。

尽管 HHT 和 TPL 均显示出一定的抗肿瘤活性, 但单药应用均存在局限性。HHT 在水中微溶、生物利用度低, 病灶部位有效药物浓度低^[13], 对实体瘤, 尤其是 CRPC 的疗效有限, 临床应用中还观察到剂量相关性的心脏毒性 (如心律失常、心肌损伤) ^[14]。TPL 虽抗肿瘤活性强, 但存在溶解度差、缺乏靶向性、治疗窗极窄的问题, 对肝脏、肾脏、生殖系统及消化道具有显著毒性, 传统口服或注射制剂难以在安全剂量范围内达到有效治疗浓度^[15-16]。因此, 单一药物难以满足 CRPC 治疗的临床需求。HHT 主要通过抑制蛋白质合成、诱导肿瘤细胞凋亡发挥作用; TPL 则通过抑制核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)、磷脂酰肌醇-3-羟激酶/蛋白激酶 B (phosphatidylinositol-3-hydroxykinase/protein kinase B, PI3K/Akt) 等多条信号通路, 增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。二者联用有望实现多靶点协同, 达到“增效减毒”的目的。此外, 根据中医“相须”

配伍理论, HHT 的清热解毒、活血消肿, 与 TPL 的祛风湿、解毒通络功效相近, 合用可增强“清热化痰、解毒散结”之效, 与前列腺癌“湿热瘀毒互结”的核心病机相契合。因此, HHT 与 TPL 联合用药具有明确的现代药理和中药理论依据。

然而 HHT 与 TPL 均存在溶解度及生物利用度差、缺乏靶向性的问题, 单纯联合用药仍难以获得理想的治疗效果。纳米递送系统可有效改善难溶性药物的溶解性、延长体内循环时间、实现肿瘤部位的靶向富集, 近年来广泛用于中药活性成分的共递送研究^[17]。脂质-聚合物纳米粒作为一类新型递药系统, 兼具脂质体的生物相容性与聚合物纳米粒的结构稳定性, 具有显著优势^[18-19]。但纳米载体仅依赖高通透性和滞留 (enhanced permeability and retention, EPR) 效应的被动靶向缺乏细胞层面的选择性, 肿瘤递送效率仍有限, 对前列腺癌细胞的特异性杀伤效果不足。前列腺特异性膜抗原 (prostate specific membrane antigen, PSMA) 是前列腺细胞膜上的一种 II 型跨膜糖蛋白^[20]。研究发现, PSMA 在 85% 以上的前列腺癌细胞中过量表达在, 在正常的血管内皮细胞中不表达^[17]。将 PSMA 靶向肽 (氨基酸序列: Gly-Arg-Phe-Leu-Thr-Gly-Gly-Thr-Gly-Arg-Leu-Leu-Arg-Ile-Ser, GRFLTGGTGRLRLIS) 与纳米载体偶联, 利用 PSMA 受体介导的内吞特性, PSMA 靶向肽修饰纳米粒可被高效内化入胞, 实现药物向前列腺癌细胞的精准递送, 提高对肿瘤细胞的抑制效果, 降低不良反应^[21]。

本研究选用大豆磷脂、胆固醇, PEG-PLGA 作为载体材料, 构建共载 HHT/TPL 的 PSMA 靶向肽修饰的脂质-聚合物复合纳米粒 (PSMA-targeting peptide-modified lipid-polymer nanoparticles co-loaded with homoharringtonine and triptolide, HHT/TPL-PSMA-Lips), 并进行处方优化, 药剂学评价及体外抗前列腺癌活性和靶向性评价。本研究为改善 HHT 与 TPL 的溶解特性及实现共递送提供了实验依据, 并为探索中药复方创新制剂在前列腺癌高效靶向递送中的应用拓展了新的方向。

1 仪器与材料

1.1 仪器

HZ-9212SB 型水浴恒温振荡器, 太仓华利达实验设备有限公司; Avatar 370 型傅里叶变换红外光谱仪, 美国 Nicolet 公司; LC-20A-DAD-FD 型高效液相色谱仪, 日本 Shimadzu 公司; JEM-2100 (HR)

型高分辨透射电子显微镜、JEM-7001F 型扫描电子显微镜, 日本电子株式会社 JEOL; HZ-9212SB 型旋转蒸发仪, 瑞士 Buchi 公司; 90Plus PALS 型粒度分析仪, 美国 Brookhaven 公司; AXIMA Performance 型基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪, 日本 Shimadzu 公司。

1.2 药物及试剂

TPL 对照品 (批号 JA238167, 质量分数 96.8%)、HHT 对照品 (批号 JB332946, 质量分数 $\geq 98.0\%$)、HHT 原料药 (批号 J16IB220394, 质量分数 $> 98.0\%$), 上海源叶生物科技有限公司; PSMA 靶向肽, 批号 TP-20074710, 南京肽谷生物科技有限公司; DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal (批号 YS-D2241), 重庆渝德医药科技有限公司; 甲醇, 批号 FP59ABC1402, 色谱纯, 湖北弗顿科学技术有限公司; 香豆素 6 (coumarin 6, C6), 质量分数 98.0%, 批号 H2131154, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 大豆磷脂 (批号 C10163670, 质量分数 90.0%)、二氯甲烷 (批号 C16133091)、胆固醇 (批号 E1718038, 质量分数 $> 95.0\%$)、磷酸 (批号 C10478516)、正辛醇 (批号 C12619767), 上海麦克林生化科技股份有限公司; TPL 原料药, 批号 P3844176, 质量分数 $> 98.0\%$, Adamas-Beta, 上海泰坦科技股份有限公司。

1.3 细胞

小鼠前列腺癌细胞 (RM-1-PSMA) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

2 方法和结果

2.1 PSMA 靶向肽修饰 PEG 化磷脂的合成及表征

称取 PSMA 靶向肽 44.5 mg 及 DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal 50.0 mg, 精密称定, 溶于 30 mL *N,N*-二甲基甲酰胺 (*N,N*-dimethylformamide, DMF) 中, 氮气保护下, 避光条件下 25 °C 搅拌 24 h。双蒸水透析 (截留相对分子质量 3 500) 48 h, 冻干, 得 PSMA 靶向肽修饰 PEG 化磷脂。合成路线示意图如图 1 所示。采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight, MALDI-TOF) 测定相对分子质量。

本研究中, 在 PSMA 靶向多肽末端增加半胱氨酸 (Cys-GRFLTGGTGRLRLIS), 半胱氨酸的巯基与 DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal 末端的马来酰亚胺基团, 可通过巯基-马来酰亚胺点击化学反应, 在温和条件下实现共价链接。结果如图 2 所示, 采用 MALDI-TOF 测定产物的平均相对分子质量, 为 4 643.8, 与理论相

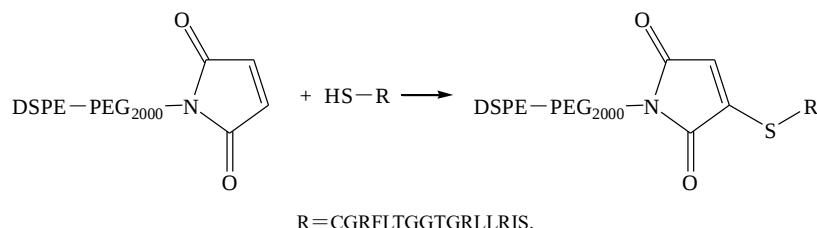
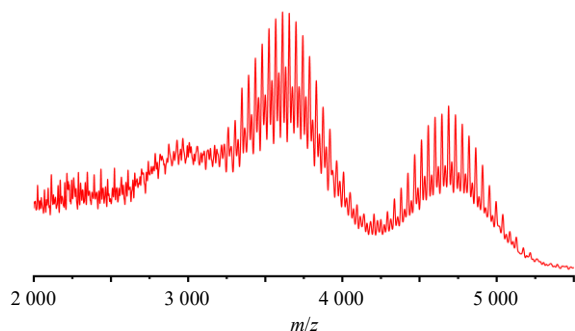
图 1 PSMA 靶向肽与 DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal 反应的示意图Fig. 1 Schematic diagram of reaction between PSMA-targeting peptide and DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal

图 2 PSMA 靶向肽修饰 PEG 化磷脂 MALDI-TOF 图谱

Fig. 2 MALDI-TOF spectrum of PSMA-targeted peptide-PEGylated phospholipid

对分子质量 4 589.1 接近, 证明 PSMA 靶向肽修饰 PEG 化磷脂合成成功。

2.2 HHT/TPL-PSMA-Lips 的制备

2.2.1 HHT/TPL 脂质-聚合物纳米粒的制备 采用乳化溶剂挥发法制备 HHT/TPL 脂质-聚合物纳米粒 (HHT/TPL-Lips), 称取一定质量的 HHT/TPL 及大豆磷脂、胆固醇、PEG-PLGA 于圆底烧瓶中, 加入二氯甲烷, 超声, 使其充分溶解, 得到有机相。在搅拌下, 将有机相逐滴滴入水溶液中, 45 °C 搅拌 1 h, 旋转蒸发, 去除有机溶剂, 得 HHT/TPL-Lips。

2.2.2 靶向肽修饰 HHT/TPL 脂质-聚合物纳米粒的制备 称取一定质量的 HHT/TPL 及辅料大豆磷脂、胆固醇、PEG-PLGA, 均匀混合溶解后, 采用“2.2.1”项下方法制备靶向肽修饰的 HHT/TPL 脂质-聚合物纳米粒 (HHT/TPL-PSMA-Lips)。并通过加入 C6 制备荧光标记的纳米粒 (HHT/TPL-PSMA-FLips)。

2.3 HHT 与 TPL 的含量测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Symmetry C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm, 美国 Waters 公司); 流动相为甲醇-0.2%磷酸水溶液 (32:68), 体积流量为 1 mL/min; 进样量为 20 μL; 检测波长为 227 nm; 柱温为 30 °C。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取 HHT 对照品 10.0 mg、TPL 对照品 10.0 mg, 分别置于 10 mL 量

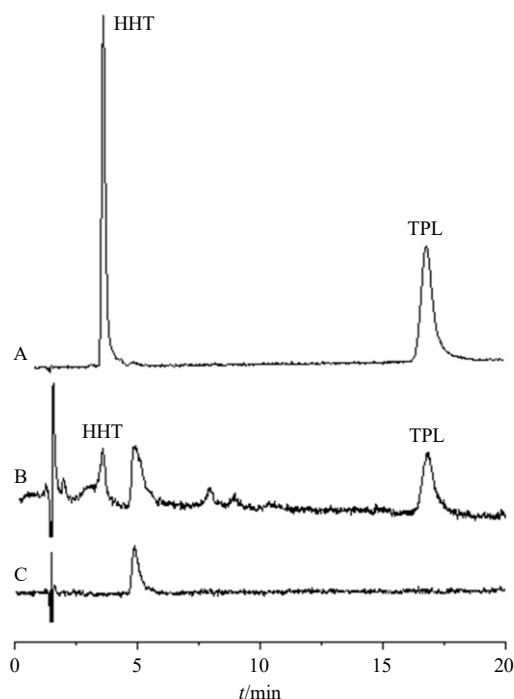
瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 制得质量浓度均为 1.0 mg/mL 的单药对照品储备液, 4 °C 避光保存。临用前, 分别取适量 2 种单药对照品储备液, 用甲醇逐级稀释并混合, 配制成系列质量浓度的混合对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 精密量取载药纳米粒混悬液适量, 置于量瓶中, 加入甲醇破乳, 涡旋混匀, 加甲醇定容至刻度, 摇匀; 取部分溶液经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。临用前用甲醇稀释至合适质量浓度, 按照“2.3.1”项下色谱条件进行 HPLC 测定。

2.3.4 线性关系考察 分别吸取系列质量浓度的 HHT、TPL 混合对照品溶液, 按照“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 以药物质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线, 进行线性回归, 结果显示, HHT 回归方程为 $Y=1574.0X-710.17$, $R^2=0.9999$, TPL 回归方程为 $Y=1172.8X+89.769$, $R^2=0.9999$, 结果表明 2 药在 1~200 μg/mL 线性关系良好, 符合含量测定要求。

2.3.5 专属性考察 分别取空白辅料溶液、HHT 单药对照品溶液、TPL 单药对照品溶液、两药混合对照品溶液、载药纳米粒破乳样品溶液, 按照“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果如图 3 所示, HHT 和 TPL 峰形良好、分离完全; 空白辅料在 2 药出峰位置无明显干扰峰, 表明该色谱方法专属性良好, 辅料不影响药物含量测定。

2.3.6 精密度考察 日内精密度: 取低、中、高 3 个质量浓度 (2、20、200 μg/mL) 的 HHT 及 TPL 对照品溶液, 于同 1 d 内连续进 6 次, 测定峰面积并计算 RSD 值。日间精密度: 取上述 3 个质量浓度的 HHT 及 TPL 对照品溶液, 连续 3 d 每日进样测定 1 次, 计算峰面积 RSD 值。结果显示, HHT 与 TPL 日内精密度的 RSD 分别为 0.87%~1.24%、0.76%~1.15%, 日间精密度的 RSD 分别为 1.02%~1.56%、0.93%~1.32%, 结果表明该方法精密度良好。



A-HHT 和 TPL 混合对照品溶液; B-载药纳米粒破乳样品溶液;
C-空白辅料。
A-mixed reference substances solution of HHT and TPL; B-
broken-emulsion sample solution of drug-loaded nanoparticles; C-
blank auxiliary materials.

图 3 体外样品 HPLC 图

Fig. 3 HPLC of samples *in vitro*

2.3.7 稳定性考察 取同一批载药纳米粒破乳样品溶液, 室温 (20 °C) 下避光放置, 分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 时间点进样测定, 记录峰面积并计算 RSD 值, 考察样品室温稳定性。结果显示, 24 h 内 HHT 与 TPL 峰面积的 RSD 分别为 1.18%、1.05%, 表明样品溶液在室温 24 h 内稳定性良好。

2.3.8 重复性考察 取同一批载药纳米粒样品, 按照样品破乳处理方法平行制备 6 份供试品溶液, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过后, 依照“2.3.1”项下色谱条件项下方法进样测定, 记录 HHT 与 TPL 的峰面积, 代入对应标准曲线计算药物含量并求得 RSD 值。结果显示, HHT、TPL 质量分数的 RSD 均小于 2%, 表明该测定方法重复性良好。

2.3.9 加样回收率考察 取已知含量的载药纳米

粒样品, 分别加入低、中、高 3 个水平的 HHT 和 TPL 对照品溶液, 每个水平 3 份, 按样品处理方法破乳定容后, HPLC 测定药物含量, 计算加样回收率。结果显示, HHT、TPL 的平均加样回收率分别为 99.74%、99.08%, RSD 分别为 1.12%、1.01%, 均符合药物含量测定的方法学要求。

2.4 平衡溶解度和油水分配系数 (lgP) 的测定

2.4.1 平衡溶解度 分别考察素在双蒸水、pH 6.5 PBS 以及 pH 7.4 PBS 中的平衡溶解度。将上述溶剂或溶液分别取 1 mL, 放置于 1.5 mL 离心管中, 向其中加入过量的药物, 然后将其放入 37 °C 的恒温水浴振荡器中振荡 48 h 后, 以 10 000 r/min 的转速 (7 400×g) 离心 10 min, 取上清, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 并将其稀释至合适质量浓度, 按照“2.3.1”项下色谱条件进样分析, 检测药物质量浓度, 测定其平衡溶解度。

2.4.2 lgP 采用不同介质饱和的正辛醇 2 mL, 分别加入过量的 HHT 和 TPL, 涡旋混合均匀, 置于 37 °C 恒温水浴振荡器中振荡 24 h, 以 10 000 r/min 的转速 (7 400×g) 离心 15 min, 取上清, 得到 HHT 及 TPL 的饱和正辛醇溶液。取 1 mL 药物的饱和正辛醇溶液, 分别加入 1 mL 双蒸水、pH 6.5 PBS 或 pH 7.4 PBS (用正辛醇预饱和), 经 37 °C 恒温振荡 48 h 后, 以 10 000 r/min 的转速 (7 400×g) 离心 10 min。分别取水相及油相, 用甲醇稀释至一定倍数, 按照“2.3.1”项下色谱条件进样, 检测药物质量浓度, 水相中药物含量记为 C_w , 油相中药物含量记为 C_o 。lgP 的计算方式如公式所示。

$$\lg P = \lg(C_o/C_w)$$

结果如表 1 所示, HHT 在水及 pH 6.5、7.4 PBS 3 种介质中的平衡溶解度均在 4~6 mg/mL。而 TPL 在 3 种介质中的平衡溶解度都极低, 仅为约 0.06 mg/mL。通过纳米技术改善药物的平衡溶解度, 具有重要的临床应用需求。

由表 1 可知, HHT 和 TPL 在不同介质中的 lgP 均大于 0。lgP 反映了物质在油水两相中的分配情况, lgP 值越大表明亲油性越强; 反之, lgP 值越小

表 1 HHT 和 TPL 在不同介质中的平衡溶解度和 lgP ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Equilibrium solubility and lgP of HHT and TPL in different medias ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	平衡溶解度/(mg·mL ⁻¹)			lgP		
	双蒸水	pH 6.5 PBS	pH 7.4 PBS	双蒸水	pH 6.5 PBS	pH 7.4 PBS
HHT	4.564±0.017	5.666±0.038	4.769±0.044	0.401±0.012	0.379±0.010	0.395±0.017
TPL	0.061±0.004	0.068±0.006	0.063±0.002	0.636±0.006	0.628±0.007	0.631±0.006

亲水性越强。HHT 和 TPL 的 $\lg P$ 均较高,表明 2 种活性成分都具有较强的亲脂性,且 TPL 的亲脂性略高于 HHT。平衡溶解度和 $\lg P$ 的测定结果可为纳米粒的制备提供指导。

2.5 HHT/TPL-PSMA-Lips 的处方优化

2.5.1 包封率的测定方法 采用超滤离心法测定 HHT/TPL-PSMA-Lips 的包封率。取 0.5 mL HHT/TPL-PSMA-Lips 置于 10 mL 量瓶中,加入甲醇溶解定容,按照上述“2.3.1”项下色谱条件,分别测定 HHT、TPL 的含量,记为 $C_{H总}$ 、 $C_{T总}$;另取 0.5 mL HHT/TPL-PSMA-Lips 置于超滤离心管(滤膜孔径 $0.45\ \mu\text{m}$)中,以 12 000 r/min 转速 ($10\ 700\times g$) 离心 10 min,取滤液,甲醇稀释,分别测定 HHT、TPL 的含量,记为 $C_{H游离}$ 、 $C_{T游离}$ 。按照下列公式计算 HHT 及 TPL 的包封率(encapsulation efficiency, EE),并计算二者的综合包封率($EE_{综}$)^[22]。

$$EE = (C_{总} - C_{游离}) / C_{总}$$

$$EE_{综} = EE_{HHT} \times 0.5 + EE_{TPL} \times 0.5$$

表 2 HHT/TPL-PSMA-Lips 处方优化的 CCD-RSM 实验设计与结果

Table 2 CCD-RSM test design and results of HHT/TPL-PSMA-Lips prescription optimization

序号	X_1	X_2	X_3	X_4	$EE_{HHT}/\%$	$EE_{TPL}/\%$	$EE_{综}/\%$	序号	X_1	X_2	X_3	X_4	$EE_{HHT}/\%$	$EE_{TPL}/\%$	$EE_{综}/\%$
1	0.670 (-1)	2 (-1)	3.4 (0)	1.00 (0)	61.81	60.59	61.20	16	4.835	6	4.8	1.00	66.19	66.41	66.30
2	9.000 (+1)	2	3.4	1.00	62.16	62.44	62.30	17	0.670	4	2.0	1.00	65.02	63.58	64.30
3	0.670	6 (+1)	3.4	1.00	63.08	63.32	63.20	18	9.000	4	2.0	1.00	60.75	61.85	61.30
4	9.000	6	3.4	1.00	61.42	60.98	61.20	19	0.670	4	4.8	1.00	65.22	63.38	64.30
5	4.835 (0)	4 (0)	2.0 (-1)	0.67 (-1)	69.83	68.77	69.30	20	9.000	4	4.8	1.00	61.52	60.88	61.20
6	4.835	4	4.8 (+1)	0.67	67.83	66.57	67.20	21	4.835	2	3.4	0.67	68.64	69.16	68.90
7	4.835	4	2.0	1.33 (+1)	68.08	68.52	68.30	22	4.835	6	3.4	0.67	72.03	70.57	71.30
8	4.835	4	4.8	1.33	69.78	69.02	69.40	23	4.835	2	3.4	1.33	74.76	73.84	74.30
9	0.670	4	3.4	0.67	63.67	62.73	63.20	24	4.835	6	3.4	1.33	78.95	77.65	78.30
10	9.000	4	3.4	0.67	62.17	63.43	62.80	25	4.835	4	3.4	1.00	78.11	76.49	77.30
11	0.670	4	3.4	1.33	64.48	63.72	64.10	26	4.835	4	3.4	1.00	79.88	81.32	80.60
12	9.000	4	3.4	1.33	68.66	67.94	68.30	27	4.835	4	3.4	1.00	80.48	81.72	81.10
13	4.835	2	2.0	1.00	70.44	69.76	70.10	28	4.835	4	3.4	1.00	79.27	79.13	79.20
14	4.835	6	2.0	1.00	78.92	77.28	78.10	29	4.835	4	3.4	1.00	75.87	76.73	76.30
15	4.835	2	4.8	1.00	68.87	68.93	68.90								

根据 CCD-RSM 设计生成 29 组验证处方的实验矩阵(表 2)。对 CCD 的实验数据进行统计分析,采用多元 2 次模型拟合,阐述自变量与因变量的相互关系。方差分析(表 3)用来评估通过软件回归拟合得到的多元非线性方程模型的优异程度。 F 值和 P 值分别表示拟合方程的显著性和控制组与实验组差异大小, F 值越大、 P 值越小则说明模型拟合程度越好,越显著。由表 3 可知,拟合方程为 $Y=$

2.5.2 HHT/TPL-PSMA-Lips 处方优化 对于共载体系,双药的包封率是关键指标。前期研究中发现,处方中靶向肽修饰磷脂的比例、磷脂与胆固醇比例、磷脂与药物比例及磷脂与聚合物比例均对包封率有较大影响。因此,根据前期预实验结果,选择合适的筛选范围后,确定以下 4 个因素:大豆磷脂/PSMA 靶向肽修饰的磷脂(X_1)、大豆磷脂/胆固醇(X_2)、大豆磷脂/HHT-TPL(X_3)、大豆磷脂/PEG-PLGA(X_4)为自变量;以综合包封率(Y)为因变量,采用中心复合设计-响应面法(central composite design-response surface methodology, CCD-RSM),预测 HHT/TPL-PSMA-Lips 的最优处方。CCD 的因素和水平如表 2 所示。使用 Design-Expert 13 软件对 CCD 试验设计数据进行分析,并建立 4 个自变量与因变量(Y)响应值间的数学模型,通过方差分析进行模型间比较,筛选出最佳拟合模型,以确定最优的处方组成。并根据预测的最优处方制备 HHT/TPL-PSMA-Lips,测定综合包封率。

$1\ 071.920 + 0.853\ 3\ X_1 + 13.440\ X_2 + 16.570\ X_3 + 33.380\ X_4 + 2.400\ X_1X_2 + 0.002\ 5\ X_1X_3 + 5.290\ X_1X_4 + 28.090\ X_2X_3 + 0.640\ X_2X_4 + 2.560\ X_3X_4 + 898.080\ X_1^2 + 76.280\ X_2^2 + 185.950\ X_3^2 + 69.220\ X_4^2$, $R^2=0.905\ 8$, 这一结果表明该模型拟合度较好。该模型的 P 值为 $0.000\ 1$ (<0.05),这表明该模型具有显著性。变异系数为 4.09% ,标准偏差为 2.82% ,表明本实验精密良好,试验误差较小。

表 3 中心复合响应面试验模型方差分析

Table 3 Analysis of variance of Central composite response surface test model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性	方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	1 071.920	14	76.570	9.610	0.000 1	极显著	X_3X_4	2.560	1	2.560	0.321 5	0.579 7	
X_1	0.853 3	1	0.853 3	0.107 2	0.748 3		X_1^2	898.080	1	898.080	112.770	0.000 1	极显著
X_2	13.440	1	13.440	1.690	0.214 9		X_2^2	76.280	1	76.280	9.580	0.007 9	极显著
X_3	16.570	1	16.570	2.080	0.171 2		X_3^2	185.950	1	185.950	23.350	0.000 3	极显著
X_4	33.330	1	33.330	4.190	0.060 0		X_4^2	69.220	1	69.220	8.690	0.010 6	显著
X_1X_2	2.400	1	2.400	0.301 7	0.591 5		残差	111.490	14	7.960			
X_1X_3	0.002 5	1	0.002 5	0.000 3	0.986 1		失拟项	94.350	10	9.440	2.200	0.232 3	不显著
X_1X_4	5.290	1	5.290	0.664 3	0.428 7		误差	17.140	4	4.290			
X_2X_3	28.090	1	28.090	3.530	0.018 4	显著	总误差	1 183.410	28				
X_2X_4	0.640	1	0.640	0.080 4	0.781 0								

自变量对因变量的 3D 响应图(图 4)表明,大豆磷脂/PSMA 靶向肽修饰的磷脂对 HHT/TPL-PSMA 靶向脂质纳米粒包封率有较大影响,PSMA 靶向肽修饰 PEG 化磷脂比例增加,虽有利于靶向性的提升,但会导致包封率的下降。磷脂与药物的比例的增加,有利于包封率的提高,但继续提升磷脂比例,对包封率的提高无效。大豆磷脂/PEG-PLGA 的比例对包封率也有一定影响,PEG-PLGA 比例增加有利于提高纳米粒体内长循环效果,但过高的 PEG-PLGA 会导致包封率的下降。胆固醇是脂质膜流动性的调节剂,胆固醇/磷脂比例的提升,有利于增加脂质膜的稳定性,因此有利于包封率的提高,但过高的胆固醇比例,可能由于脂质膜刚性过强导

致包封率的下降。

以综合包封率“最大化”为指标,经实验模型分析,得到最优处方:大豆磷脂/PSMA 靶向肽修饰 PEG 化磷脂、大豆磷脂/胆固醇、大豆磷脂/HHT-TPL、大豆磷脂/PEG-PLGA 的最优比例分别为 4.8 : 1、4 : 1、3.4 : 1、1 : 1。即大豆磷脂 65.28 mg、PSMA 靶向肽修饰的磷脂 13.6 mg、HHT/TPL 各 9.6 mg、胆固醇 16.32 mg、PEG-PLGA 65.28 mg,平行 3 次上述实验。根据最优处方制备 HHT/TPL-PSMA-Lips,测得综合包封率为 $(81.20 \pm 0.40)\%$,其中 HHT 的包封率为 $(80.73 \pm 0.86)\%$;TPL 的包封率为 $(82.00 \pm 0.40)\%$,与模型预测值 79.2%接近,表明模型具有较好的预测能力。

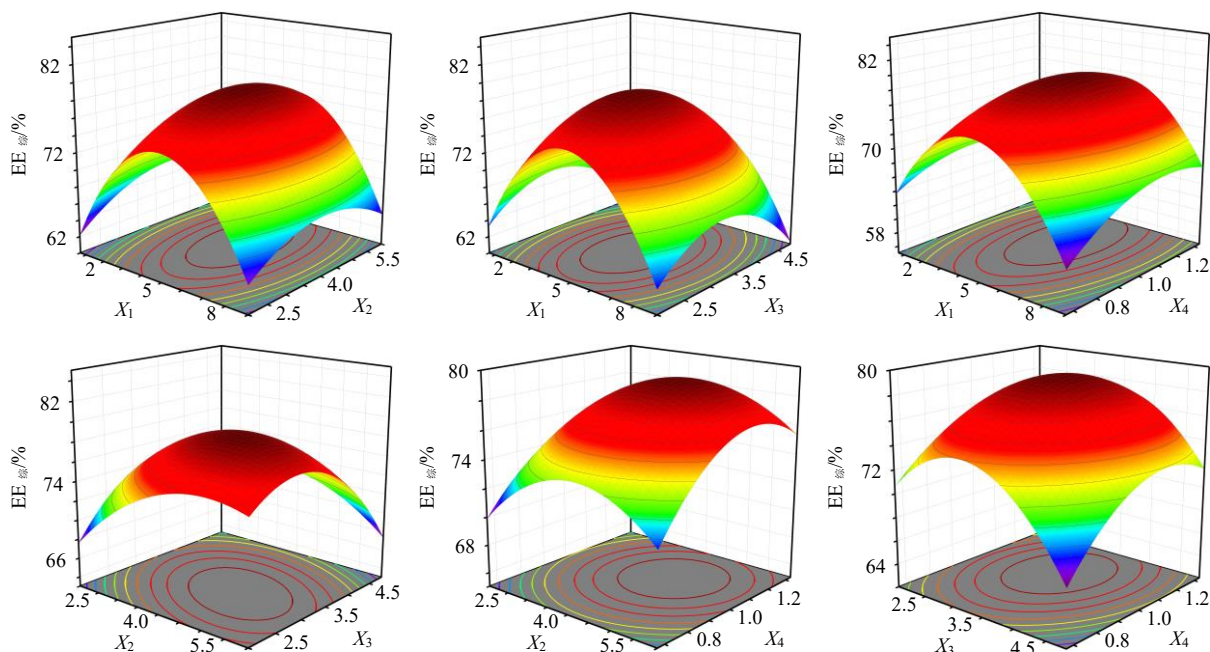


图 4 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 之间交互效应的三维响应面图

Fig. 4 Three-dimensional response surface plots of interaction effect among X_1 , X_2 , X_3 and X_4

2.6 HHT/TPL-PSMA-Lips 纳米粒体外性质评价

2.6.1 外观观察、粒径及 ζ 电位测定 HHT/TPL-PSMA-Lips 置于透明西林瓶中, 采用激光笔照射, 进行粒子运动观察。将载有 HHT/TPL-PSMA-Lips 经过适当稀释后, 采用 Zeta PALS 激光粒度仪测定粒径和 ζ 电位。HHT/TPL-PSMA-Lips 为白色乳状

液, 在激光笔照射下, 呈现明显的丁达尔效应 (图 5-A)。激光纳米粒度仪测定 HHT/TPL-PSMA-Lips 粒径分布, 结果如图 5-B 所示, HHT/TPL-PSMA-Lips 的粒径为 (209.12 ± 3.24) nm, PDI 为 0.132 ± 0.021 , ζ 电位为 (-34.4 ± 2.5) mV (图 5-C), 粒径基本呈正态分布。

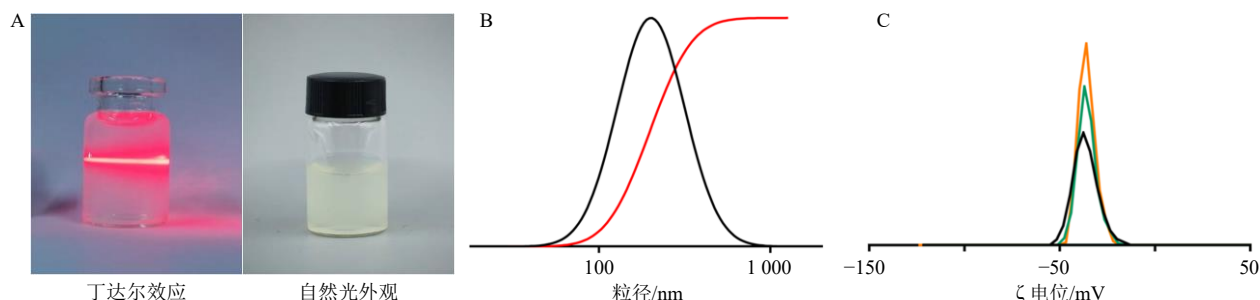


图 5 HHT/TPL-PSMA-Lips 的丁达尔效应和自然光外观 (A)、粒径分布 (B) 和 ζ 电位分布 (C)

Fig. 5 Tyndall effect and natural light appearance (A), particle size distribution (B) and ζ potential distribution (C) of HHT/TPL-PSMA-Lips

2.6.2 微观形态观察 取少量最佳处方 HHT/TPL-PSMA-Lips 溶液, 取 1 滴于覆有碳支持膜的铜网上, 经 2% 的磷钨酸负染色, 室温自然晾干后, 采用透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 观察 HHT/TPL-PSMA-Lips 纳米粒形态。TEM 图片显示, 粒子外观为类球形或球形, 且分散均匀, 粒径为 180~200 nm (图 6)。激光纳米粒度仪测定的粒径为水合粒径, 因此, 略大于 TEM 观测到的粒径结果。

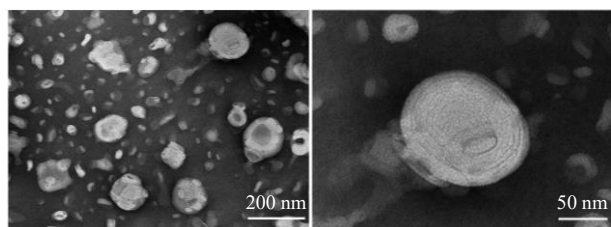


图 6 HHT/TPL-PSMA-Lips 的 TEM 图

Fig. 6 TEM image of HHT/TPL-PSMA-Lips

2.6.3 X 射线衍射 (X-ray diffraction, XRD) 分析 分别称取适量 HHT/TPL 原料药、PEG-PLGA、胆固醇、磷脂、药物与材料混合物以及 HHT/TPL-PSMA-Lips, 压片后采用 X 射线衍射仪进行 XRD 分析。测量条件: 电压 40 kV, 电流 40 mA, 扫描范围 $10^\circ \sim 60^\circ$, 扫描速度 $5^\circ/\text{min}$ 。HHT/TPL 原料药、PEG-PLGA、胆固醇、大豆磷脂、药物与材料混合物以及 HHT/TPL-PSMA-Lips 的 XRD 图谱如图 7 所示, HHT/TPL 原料药在 $10 \sim 50^\circ$ 有明显的结晶峰, 而 PEG-PLGA 以及大豆磷脂则无明显结晶峰。药物与

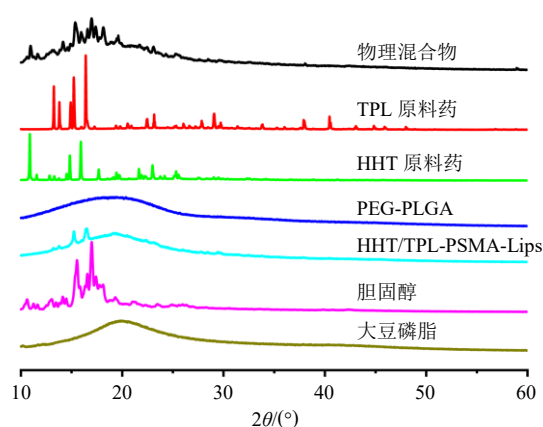


图 7 HHT/TPL-PSMA-Lips、物理混合物及相关辅料的 XRD 图谱

Fig. 7 XRD patterns of HHT/TPL-PSMA-Lips, physical mixture and related excipients

各辅料的物理混合物中, 仍能明显地观察到 HHT/TPL 的结晶峰。而 HHT/TPL-PSMA-Lips 的 XRD 图谱中无明显的药物结晶峰, 表明 HHT/TPL 成功加载纳米粒中, 可能以分子或无定形态存在。

2.6.4 差示扫描量热 (differential scanning calorimetry, DSC) 分析 分别称取适量 HHT/TPL 原料药、PEG-PLGA、胆固醇、磷脂、药物与材料混合物以及 HHT/TPL-PSMA-Lips, 进行 DSC 分析, 研究其热效应行为。工作条件: 以空铝坩埚作参比, 升温范围 $30 \sim 400^\circ\text{C}$, 升温速度 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ 。HHT/TPL 原料药、PEG-PLGA、胆固醇、大豆磷脂、药物与材料混合物以及 HHT/TPL-PSMA-Lips 的 DSC

图谱如图 8 所示, TPL 原料药在约 269 °C 处表现有吸热熔融峰, HHT 原料药于约 150 °C 处呈现特征吸热峰, 2 处特征峰分别为 2 种原料药熔融相变的热学标志。药物与各辅料的物理混合物中, 仍可清晰观察到 TPL 与 HHT 的特征吸热峰。而 HHT/TPL-PSMA-Lip 的 DSC 曲线中未出现 2 种原料药的特征吸热峰, 表明 HHT/TPL 已成功包载于脂质纳米粒中, 在制剂内以无定形态存在。

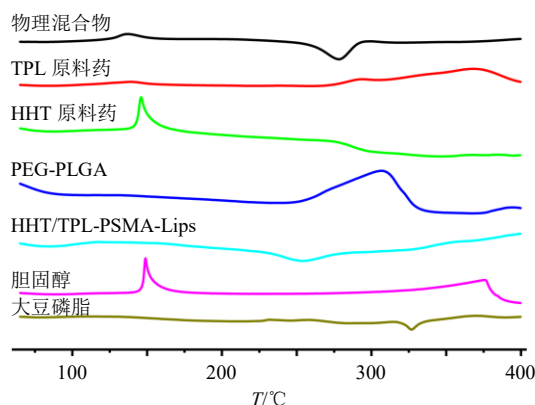


图 8 HHT/TPL-PSMA-Lips、物理混合物及相关辅料 DSC 图谱

Fig. 8 DSC patterns of HHT/TPL-PSMA-Lips, physical mixture and related excipients

2.7 HHT/TPL-PSMA-Lips 体外释放研究

采用透析法, 精密移取 1 mL HHT/TPL-PSMA-Lips 混悬液于透析袋(截留相对分子质量 8 000~12 000)中, 分别置于 pH 6.5、7.4 的 100 mL 释放介质中, 37 °C 恒温水浴、100 r/min 振荡, 分别在 0.5、1、2、4、6、10、12、24、36、48、60、72 h 采集 1 mL 透析液, 并补充等量空白释放介质。采用 HPLC 法测定释放介质中的 HHT 及 TPL 质量浓度, 按累积释放率(Q_n)公式进行计算, 式中, C_n 、 C_i 为第 n 、 i 个取样点药物质量浓度, V_0 为释放介质总体积, V 为单次取样体积, W 为透析袋内初始药物总质量。绘制不同 pH 值条件下的体外释放曲线, 进行体外释药动力模型拟合。

$$Q_n = (C_n V_0 + \sum_{i=1}^{n-1} C_i V) / W$$

游离 HHT、TPL 和 HHT/TPL-PSMA-Lips 在 pH 6.5、7.4 PBS 中的释放情况如图 9 所示。游离 HHT 在 pH 6.5 PBS 中的释放速度略高于在 pH 7.4 PBS 中的释放速度, 这是由于其在弱酸性条件下的溶解度略高于生理条件。TPL 为难溶性药物, 在 2 种释放介质中释放速度都较低。而 HHT/TPL-PSMA-Lips 中 HHT 和 TPL 释放速度明显提高, 其在各介质中

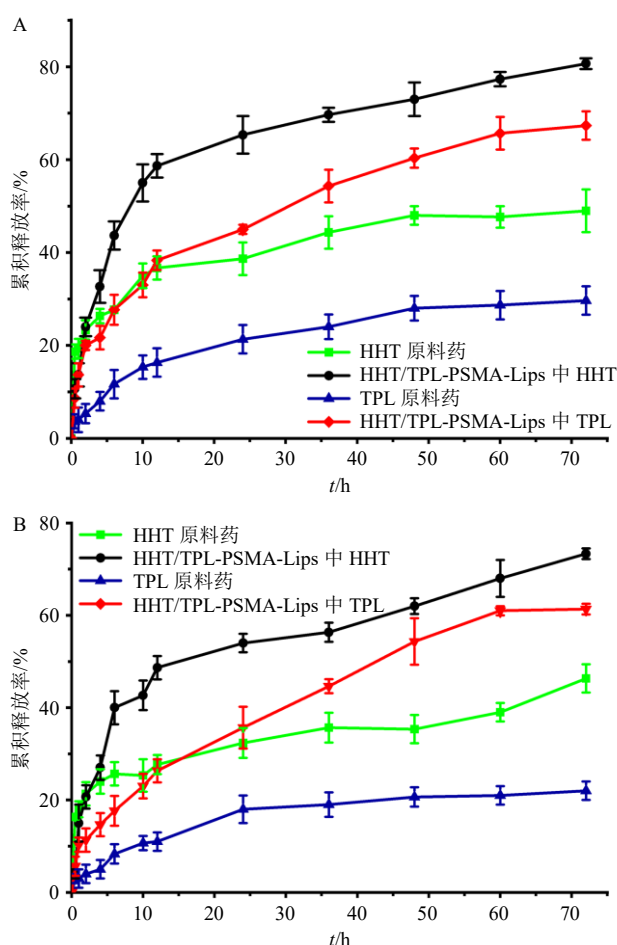


图 9 HHT、TPL 原料药及 HHT/TPL-PSMA-Lips 中的 HHT、TPL 在 pH 6.8、7.4 PBS (A, B) 中的体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 9 *In vitro* release plots of HHT, TPL bulk drug, and their in HHT/TPL-PSMA-Lips in pH 6.8, 7.4 PBS (A, B) ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

释放速度均高于游离药物, 特别是 TPL, 在各时间点的累积释放率显著提高, 表明采用纳米技术可改善难溶性药物的溶解度问题。

此外, HHT/TPL-PSMA-Lips 中 HHT/TPL 在 pH 7.4 PBS 的生理条件下释放速率相对较慢, 而在弱酸性条件下释放度有所增加, 有利于实现在肿瘤弱酸性环境的靶向释放^[23]。对 HHT/TPL-PSMA-Lips 体外释药行为进行模型拟合, 结果如表 4 所示, HHT/TPL-PSMA-Lips 中 2 种药物在 pH 6.5、7.4 PBS 介质中的释放均符合 Ritger-Peppas 模型。其中, HHT 在 pH 6.5 PBS 中的 $n=0.31$, 在 pH 7.4 PBS 中的 $n=0.33$, TPL 在 pH 6.5 PBS 中的 $n=0.36$, 均小于 0.43, 说明其释放机制主要为 Fick 扩散; 而 TPL 在 pH 7.4 PBS 中的 $n=0.52$, 介于 0.43~0.85, 提示其为非 Fick 扩散, 即扩散与溶蚀协同作用。

表4 HHT/TPL-PSMA-Lips在不同释放介质中HHT和TPL的释放拟合数据

Table 4 Fitting data for HHT and TPL release from HHT/TPL-PSMA-Lips in different release media

释放介质	释放动力学模型	拟合方程	
		HHT	TPL
pH 6.5 PBS	零级	$Q_n = 26.580 + 0.940 t$, $R^2 = 0.661 0$	$Q_n = 18.260 + 0.830 t$, $R^2 = 0.831 5$
	一级	$Q_n = 73.990 (1 - e^{-0.150 t})$, $R^2 = 0.947 6$	$Q_n = 61.400 (1 - e^{-0.090 t})$, $R^2 = 0.926 8$
	Higuchi	$Q_n = 9.290 t^{1/2} + 11.980$, $R^2 = 0.865 2$	$Q_n = 7.780 t^{1/2} + 6.880$, $R^2 = 0.971 4$
	Ritger-Peppas	$Q_n = 22.640 t^{0.310}$, $R^2 = 0.930 4$	$Q_n = 14.970 t^{0.360}$, $R^2 = 0.994 6$
pH 7.4 PBS	零级	$Q_n = 21.210 + 0.860 t$, $R^2 = 0.720 4$	$Q_n = 9.720 + 0.820 t$, $R^2 = 0.926 0$
	一级	$Q_n = 63.920 (1 - e^{-0.140 t})$, $R^2 = 0.954 3$	$Q_n = 62.080 (1 - e^{-0.040 t})$, $R^2 = 0.937 7$
	Higuchi	$Q_n = 8.320 t^{1/2} + 8.500$, $R^2 = 0.900 7$	$Q_n = 7.360 t^{1/2} - 0.260$, $R^2 = 0.976 6$
	Ritger-Peppas	$Q_n = 17.910 t^{0.33}$, $R^2 = 0.947 9$	$Q_n = 6.890 t^{0.520}$, $R^2 = 0.976 9$

2.8 HHT/TPL-PSMA-Lips体外抗肿瘤活性

采用MTT法,以前列腺癌细胞RM-1-PSMA为体外肿瘤模型,考察空白载体PSMA-Lips的生物相容性、不同比例HHT/TPL及不同纳米粒制剂的细胞增殖抑制作用。取生长状态良好的RM-1-PSMA细胞,以每孔 1×10^4 个细胞的密度接种于96孔板中,每孔加入100 μ L细胞悬液,置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的培养箱中过夜,加入PSMA-Lips,不同比例HHT/TPL以及不同浓度的HHT-Lips、TPL-Lips、HHT/TPL-Lips或HHT/TPL-PSMA-Lips,孵育24 h后,加入20 μ L MTT溶液(5 mg/mL),避光培养4 h,加入DMSO,振荡混匀。以570 nm检测波长,用酶标仪测定吸光度(A)值,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

首先,采用MTT法考察空白纳米粒对RM-1-PSMA细胞增殖的影响。如表5所示,在0.03~1.00 mg/mL的质量浓度范围内,PSMA-Lips对RM-1-PSMA细胞活性无显著影响,表明载体材料具有良好的生物相容性。进一步考察不同比例HHT/TPL对RM-1-PSMA细胞增殖的影响,结果如表6所示,当HHT与TPL的物质的量比在1:1时,细胞存活率显著低于10:1、5:1、2:1、1:5、1:10组,因此确定HHT/TPL-PSMA-Lips纳米制剂中HHT与

表5 空白脂质体对RM-1-PSMA细胞增殖的抑制作用

($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)Table 5 Inhibitory effect of blank liposomes on proliferation of RM-1-PSMA cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	细胞存活率/ %	质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	细胞存活率/ %
0.03	105.42 $\pm$ 1.51	0.25	124.23 $\pm$ 20.73
0.06	100.93 $\pm$ 1.31	0.50	98.51 $\pm$ 13.89
0.13	129.77 $\pm$ 7.66	1.00	90.62 $\pm$ 1.49

表6 不同比例HHT与TPL对RM-1-PSMA细胞增殖的抑制作用($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 6 Inhibitory effect of HHT and TPL at different molar ratios on RM-1-PSMA cell proliferation

HHT与TPL 比例	细胞存活率/ %	HHT与TPL 比例	细胞存活率/ %
10:1	90.42 $\pm$ 1.84***	1:2	68.82 $\pm$ 4.01
5:1	83.32 $\pm$ 4.79***	1:5	89.64 $\pm$ 4.03***
2:1	73.77 $\pm$ 4.33*	1:10	95.74 $\pm$ 7.01***
1:1	62.61 $\pm$ 3.26		

与1:1组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ 。* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs 1:1 group.

TPL的最佳比例为1:1。HHT-Lips、TPL-Lips、HHT/TPL-Lips和HHT/TPL-PSMA-Lips对RM-1-PSMA细胞抑制作用如表7所示。HHT-Lips、TPL-Lips对前列腺癌细胞RM-1的抑制作用均呈浓度相关性,且HHT/TPL-Lips显示出更强的抑制效果,表明HHT/TPL联合使用可增强抑瘤作用。HHT/TPL-PSMA-Lips组细胞存活率最低,表明靶向肽修饰可通过PSMA介导的主动靶向作用,进一步提高纳米粒对前列腺癌肿瘤细胞的抑制效果。

2.9 HHT/TPL-PSMA-Lips诱导细胞凋亡作用

RM-1-PSMA细胞以 1×10^4 个/mL密度接种于6孔板中,每孔2 mL,于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的细胞培养箱孵育24 h。分别加入空白纳米粒PSMA-Lips、游离HHT、游离TPL、游离HHT/TPL、HHT-PSMA-Lips、TPL-PSMA-Lips、HHT/TPL-PSMA-Lips,孵育24 h后,收集细胞并用PBS洗涤3次,消化离心,重悬于100 μ L结合缓冲液(binding buffer)中,加入5 μ L AnnexinV-FITC和5 μ L PI,避光孵育30 min。采用流式细胞仪检测细胞凋亡率,并利用Flow Jo软件进行数据分析。流式实验结果(图10)表明,

表 7 HHT-Lips、TPL-Lips、HHT/TPL-Lips、HHT/TPL-PSMA-Lips 对 RM-1-PSMA 细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Inhibitory effects of HHT-Lips, TPL-Lips, HHT/TPL-Lips and HHT/TPL-PSMA-Lips on RM-1-PSMA cell proliferation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	细胞存活率/%				
	0.001 mmol·L ⁻¹	0.010 mmol·L ⁻¹	0.100 mmol·L ⁻¹	1.000 mmol·L ⁻¹	10.000 mmol·L ⁻¹
HHT-lips	117.27±3.58	106.84±11.53	83.28±4.89	76.92±2.30	80.14±1.36
TPL-lips	106.90±10.31	103.45±6.00	106.77±7.69	101.93±6.94	95.18±2.01
HHT/TPL-lips	66.39±4.75	65.03±5.18	60.70±2.29	57.05±2.94	55.38±3.00
HHT/TPL-PSAM-lips	37.35±2.67	36.58±2.91	33.64±0.86	31.59±1.02	33.15±3.34

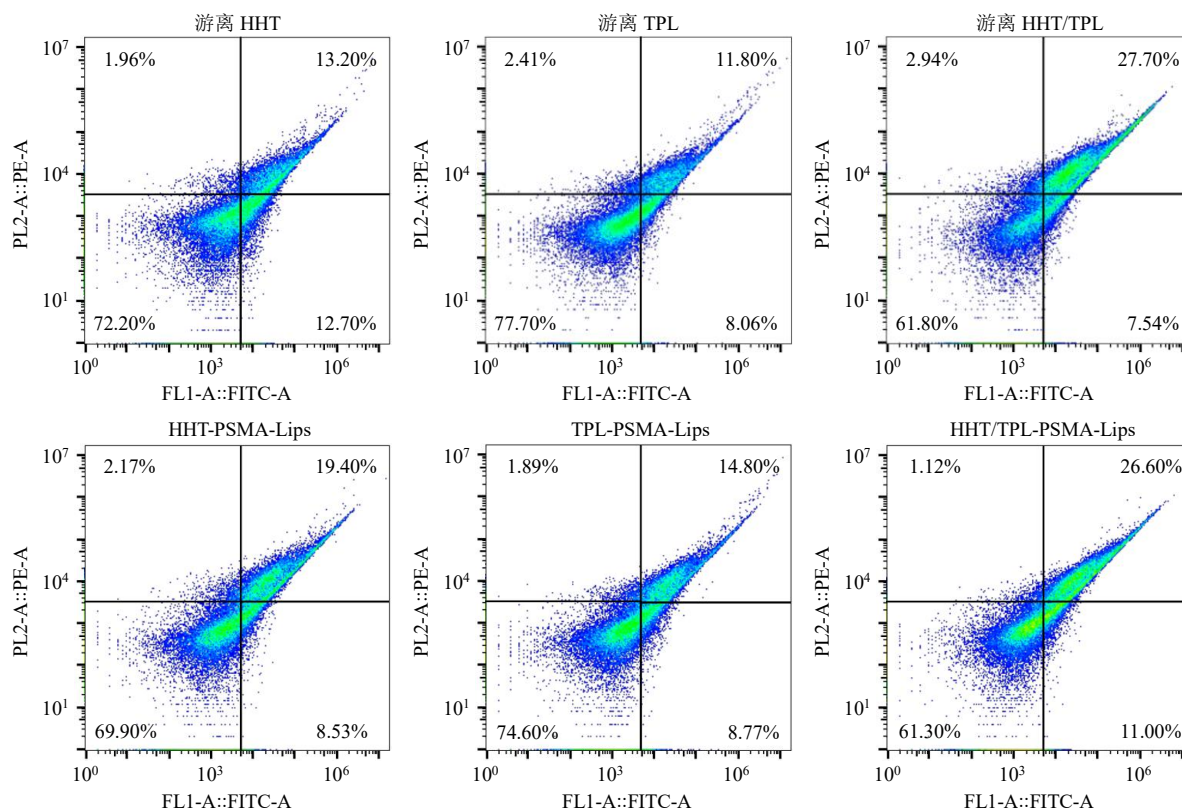


图 10 Annexin-FITC/PI 凋亡流式分析

Fig. 10 Annexin V-FITC/PI apoptosis flow cytometry analysis

游离 HHT 和 TPL 单独处理组的细胞凋亡率分别为 25.9%和 19.86%，HHT/TPL 联合处理组的细胞凋亡率可增加到 35.24%。HHT-PSMA-Lips 和 TPL-PSMA-Lips 的凋亡率分别为 27.93%和 23.57%，于游离药物比，细胞凋亡率有所提高。而 HHT/TPL-PSMA-Lips 表现出最强的细胞凋亡诱导效果，凋亡率达到 37.6%，表明联合给药策略和纳米技术可协同提高促进前列腺癌细胞凋亡作用。

2.10 HHT/TPL-PSMA-Lips 体外肿瘤细胞靶向性

采用细胞摄取实验考察 HHT/TPL-PSMA-Lips 的肿瘤细胞靶向性。C6 具有优异荧光特性，以 C6 为荧光探针制备荧光标记纳米粒 HHT/TPL-FLips 及 HHT/TPL-PSMA-FLips，考察纳米粒在前列腺癌

细胞中的摄取情况。取对数生长期的 RM-1-PSMA 细胞，按照每孔 5×10^3 个接种于 24 孔板中，孵育 24 h 后，分为 C6、HHT/TPL-FLips、HHT/TPL-PSMA-FLips 及 PSMA 靶向肽预处理组。PSMA 靶向肽预处理组先加入游离 PSMA 靶向肽预孵育，随后加入 HHT/TPL-PSMA-FLips。各组孵育 4 h 后，PBS 洗涤 3 次，加入 4%多聚甲醛固定，洗涤，加入 Hoechst 33342 活细胞染色液，洗涤后采用倒置荧光显微镜，观察不同组别细胞中的荧光强度。

游离 C6、HHT/TPL-FLips、HHT/TPL-PSMA-FLips 及 PSMA 靶向肽预处理后 HHT/TPL-PSMA-FLips 在前列腺癌细胞 RM-1-PSMA 中的摄取情况结果如图 11 所示。游离 C6 组在细胞内绿色荧光信

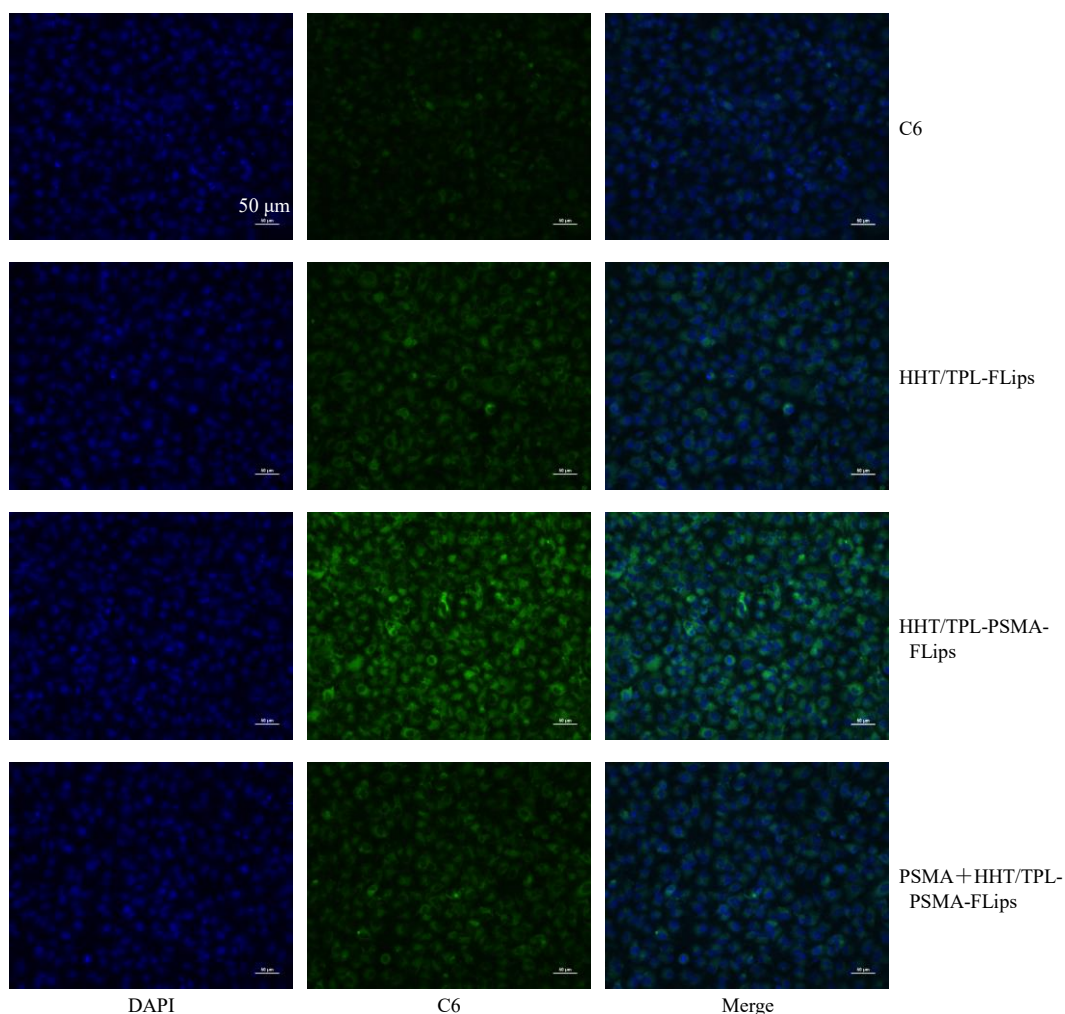


图 11 RM-1-PSMA 细胞对 C6、HHT/TPL-FLips、HHT/TPL-PSMA-FLips 及 PSMA 靶向肽预处理后 HHT/TPL-PSMA-FLips 在 4 h 时的摄取情况

Fig. 11 Uptake of C6, HHT/TPL-FLips, HHT/TPL-PSMA-FLips, and HHT/TPL-PSMA-FLips after PSMA-targeting peptide pretreatment by RM-1-PSMA cells at 4 h

号最弱，表明游离荧光探针在前列腺癌细胞中的摄取能力较低。与游离 C6 组相比，HHT/TPL-FLips 组在细胞内绿色荧光信号增强，表明该制剂可能通过被动靶向作用增加其在肿瘤细胞中的摄取。HHT/TPL-PSMA-FLips 组则显示出最强的绿色荧光信号，表明其修饰的靶向肽与 RM-1-PSMA 过表达的 PSMA 特异性结合，通过主动转运有效提高纳米粒在 PSMA 阳性前列腺癌细胞中的摄取。

相比之下，经 PSMA 靶向肽预处理后，细胞内的绿色荧光强度明显减弱，表明游离 PSMA 靶向肽通过饱和 RM-1-PSMA 细胞表面过表达的 PSMA 受体，竞争性阻断由 PSMA 介导的纳米粒主动摄取，这一结果进一步证实，HHT/TPL-PSMA-FLips 在 RM-1-PSMA 细胞中摄取的增强，确实源于 PSMA 靶向肽介导的主动靶向作用。综上，HHT/TPL-

PSMA-FLips 可通过 PSMA 介导的主动转运，有效增强纳米粒在 PSMA 阳性细胞中的摄取，具有优异的前列腺肿瘤细胞靶向性。

3 讨论

HHT 源自三尖杉，性味苦寒，功擅清热解毒、消肿散结；雷公藤性凉，具有解毒消肿、散结抗癌之功。二者药性相近、功效同质，均归属于清热散结类抗肿瘤中药活性成分，联用符合中药“相须”配伍原则，可协同互补、增强抑瘤药效。现代药理学研究表明，低浓度 TPL 与 HHT 联用可通过 PI3K/Akt 信号通路及其下游蛋白，协同抑制人急性髓系白血病细胞（human acute myeloid leukemia KG-1 α cell line, KG-1 α ）急性髓系白血病细胞增殖并诱导凋亡，为两药联用的协同抗肿瘤活性提供了分子生物学基础^[24]。然而，HHT 及 TPL 均存在剂量相关的不

不良反应问题,单一药物难以在安全剂量范围内实现对 CRPC 的有效抑制。本研究结合传统中医相须配伍的应用指导,开展 2 种活性成分的纳米靶向递送系统的研究,其设计遵循中药“相须”配伍理论与“剂型改良增效减毒”的思想。以纳米脂质-聚合物为载体、PSMA 配体为靶头,构建了“高效包载、靶向导引”的新型中药制剂。既保留了中药复方协同治疗特色,又借助现代制剂技术解决了药物溶解度差的问题,改善了传统剂型的全身毒性的固有缺陷,体现了中药创新制剂“减毒增效”的内涵。

药物的溶解度和 $\lg P$ 测定是处方前研究的重要内容,对制剂的开发及设计具有重要的指导意义。HHT 在水和 pH 6.5、7.4 PBS 3 种介质中的溶解度均分布在 4~6 mg/mL,根据《中国药典》2025 年版定义,1 g (mL) 溶质能在 100~1 000 mL 溶剂中溶解属于微溶,与文献报道一致^[10]。而 TPL 在 3 种介质中的溶解度极低,影响了其成药性及生物利用度,采用纳米技术,可有效改善 TPL 的溶解度,促进其疗效发挥^[18]。本实验通过脂质-聚合物纳米粒实现了 HHT/TPL 双药共载,XRD 结果显示,药物以分子或无定形存在,因此在体外释放实验中,可观察到 TPL 溶出的显著提升,同时其在弱酸性条件下释放速率略有增加。

HHT/TPL-PSMA-Lips 在不同介质中的药物释放速率显著高于游离药物,机制主要为 3 方面:一是药物被包载进纳米脂质体后,以无定形或分子态分散,无需克服晶体晶格能,溶解度与溶出速率远高于结晶原料药;二是磷脂、PEG-PLGA 等载体具有两亲性,可形成亲水外壳,改善药物润湿性,利于水分子渗入并加速药物扩散;三是纳米粒粒径约 200 nm,大幅增大药物与释放介质的接触比表面积,依据 Noyes-Whitney 方程可显著加快溶出。综上,药物无定形转化、载体增溶润湿及纳米粒径效应 3 者协同,共同提升了制剂的药物溶出释放速率。

PSMA 是前列腺癌相关抗原,在前列腺癌细胞中高度表达,尤其在远处转移的前列腺癌患者中表达显著提升,而在正常的在正常的血管内皮细胞中几乎不表达,因此,其是前列腺癌治疗和的理想靶点^[17]。由此,本研究设计合成 PSMA 靶向肽修饰的 PEG 化磷脂,用于提高纳米粒的靶向性。

GRFLTGGTGRLLRIS 多肽序列已被证明是 PSMA 的靶向多肽,采用靶向肽修饰后,可有效提高载体在前列腺癌肿瘤中的靶向递送效率^[25]。根据

报道,脂质-聚合物杂化纳米粒可通过小窝/脂筏依赖的内吞、网格蛋白介导的内吞和巨胞饮作用等多重途径进入细胞^[26]。而经靶向肽修饰的纳米载体 HHT/TPL-PSMA-FLips 可通过 PSMA 介导的主动靶向内吞,高效内化进入细胞,这种受体介导的内吞作用可显著提高纳米粒的入胞效率。已报道的 PSMA 靶向纳米系统多为递送单一化疗药物(如多西他赛、米托蒽醌),本研究同时递送 HHT 和 TPL 2 种中药活性成分,发挥“相须”配伍协同作用,并与纳米靶向递送技术有机结合,是中药复方多靶点治疗策略的有益尝试。

综上,本研究构建的 PSMA 靶向脂质-聚合物纳米粒共载 HHT 与 TPL,在改善两药溶解性和主动靶向摄取方面展现出明确优势,并为 CRPC 的“中药配伍-纳米递送”联合治疗提供了新的策略。在后续研究中,将对制剂的协同分子机制、体内命运及临床转化潜力进行更为系统的验证和深化。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zhang Z J, Zhang W T, Wang H, *et al.* Immunosuppressive role of benzo[a]pyrene exposure in prostate cancer progression [J]. *J Environ Sci*, 2025, 156: 185-199.
- [2] Pandey S N, Moglad E, Gupta G, *et al.* Creatine kinase in prostate cancer: A biosensor-driven diagnostic paradigm [J]. *Clin Chim Acta*, 2025, 576: 120402.
- [3] 邱衍怡,周晓辉. 去势抵抗性前列腺癌(CRPC)的形成机制及其免疫治疗研究进展 [J]. *药学研究*, 2024, 43(7): 671-676.
- [4] 黄晨超,包旗旗,张荣玉,等. 新型抗前列腺癌药物 ODM-201 的研究进展 [J]. *药学研究*, 2021, 40(6): 351-358.
- [5] 刘重远. Eya2 在前列腺癌中过表达,通过 Akt/Bcl-2 通路调控前列腺癌细胞线粒体功能及多西紫杉醇敏感性 [D]. 沈阳:中国医科大学,2020.
- [6] Chen C, Wang Q W, Liu J W. Curcumin inhibits growth and triggers apoptosis in human castration-resistant prostate cancer cells via IGF-1/PI3K/Akt pathway [J]. *J Int Med Res*, 2025, 53(2): 03000605231220807.
- [7] 韩静,包纯洁,段嘉伦. 中药活性成分作为药物递送纳米载体的研究进展 [J]. *中草药*, 2024, 55(16): 5678-5691.
- [8] Wang W, He L, Lin T, *et al.* Homoharringtonine: Mechanisms, clinical applications and research progress [J]. *Front Oncol*, 2025, 15: 1522273.
- [9] 杜玉梅,唐加峰,黄世莹,等. 高三尖杉酯碱激活

- ATM/p53 通路抑制人肝癌细胞 PLC5 增殖 [J]. 中国药理学通报, 2021, 37(3): 380-385.
- [10] 郑肖庆, 丁樱, 王龙, 等. 雷公藤改善 IgA 血管炎性肾炎肾损伤的作用机制研究进展 [J]. 中草药, 2025, 56(24): 9185-9196.
- [11] 张俊强, 万久恺, 姚浩宇, 等. 雷公藤甲素通过 miR-320bAR 轴对前列腺癌细胞的抑制作用 [J]. 西北药学杂志, 2022, 37(1): 65-70.
- [12] 王锋, 张超, 郑栓. 具有线粒体靶向性的雷公藤甲素 TPP-PEG-PCL 脂质体的制备及其促肝肿瘤细胞凋亡研究 [J]. 中草药, 2021, 52(24): 7473-7483.
- [13] Zhang X Y, Li Z H, Liu J Y, *et al.* Organoid-based drug screening identifies homoharringtonine as a therapeutic agent for anaplastic thyroid cancer via TFEb-mediated lysosomal dysfunction [J]. *Cell Oncol*, 2025, 49(1): 5.
- [14] 张永基, 俞慧, 骆雪纓, 等. 三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱的毒性 [J]. 药学报, 1979, 14(3): 135-40.
- [15] 潘祥, 王均伟, 胡立宏. 雷公藤甲素前药的研究进展 [J]. 南京中医药大学学报, 2020, 36(5): 684-689.
- [16] Kang D, Liu Y, Song Y, *et al.* Triptolide shows high sensitivity and low toxicity against acute myeloid leukemia cell lines through inhibiting WSTF-RNAPII complex [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 811850.
- [17] 王如梦, 张宁, 刘阳, 等. PSMA 基因表达对前列腺癌细胞生物学行为的影响及作用机制研究 [J]. 局解手术学杂志, 2025, 34(11): 943-949.
- [18] 秦灿, 梁爱玲, 刘勇军. 纳米载体在抗癌肽递送中的应用 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2025, 41(6): 833-842.
- [19] Sun L, Zuo C, Ma B, *et al.* Intratumoral injection of two dosage forms of paclitaxel nanoparticles combined with photothermal therapy for breast cancer [J]. *Chin Herb Med*, 2025, 17(1): 156-165.
- [20] Puik J R, Le C, Kazemier G, *et al.* Prostate-specific membrane antigen as target for vasculature-directed therapeutic strategies in solid tumors [J]. *Crit Rev Oncol*, 2025, 205: 104556.
- [21] Nezir A E, Bolat Z B, Saka O M, *et al.* PEtOx-DOPE nanoliposomes functionalized with peptide 563 in targeted BikDDA delivery to prostate cancer [J]. *Turk J Biol*, 2024, 48(3): 174-181.
- [22] Xu Y, Liu Y L, Liu Q, *et al.* Co-delivery of bufalin and nintedanib via albumin sub-microspheres for synergistic cancer therapy [J]. *J Control Release*, 2021, 338: 705-718.
- [23] 袁辉, 衣琪昆, 李士壮, 等. 载小白菊内酯靶向脂质体的制备及体外抗肿瘤研究 [J]. 药学研究, 2024, 43(11): 1045-1052.
- [24] 李鑫, 刘佳艳, 元小红, 等. 雷公藤内酯醇联合高三尖杉酯碱对 KG-1 α 细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 中国实验血液学杂志, 2018, 26(2): 347-353.
- [25] Wang J, Yuan H, Xu J N, *et al.* Advances in PSMA-targeted radionuclide therapy for metastatic castration-resistant prostate cancer [J]. *Cancer Manag Res*, 2025, 17: 1859-1869.
- [26] Li Q X, Xia D N, Tao J S, *et al.* Self-assembled core-shell-type lipid-polymer hybrid nanoparticles: Intracellular trafficking and relevance for oral absorption [J]. *J Pharm Sci*, 2017, 106(10): 3120-3130.

[责任编辑 郑礼胜]