

薯蓣皂苷元丝素蛋白纳米粒的制备、表征及其对前列腺癌荷瘤裸鼠肿瘤的抑制作用

董亚楠¹, 任书强², 石 岩³, 董娇娇⁴, 王风云^{1*}

1. 河南应用技术职业学院, 河南 郑州 450042

2. 郑州健康学院, 河南 郑州 450064

3. 郑州市中心医院, 河南 郑州 450001

4. 北京大学肿瘤医院, 北京 100002

摘要:目的 制备薯蓣皂苷元丝素蛋白纳米粒(diosgenin silk fibroin nanoparticles, Doi-SF-NPs), 并进行理化性质、肿瘤靶向性和体内抗肿瘤作用评价。方法 单因素考察 Doi-SF-NPs 主要影响因素, 采用 Box-Behnken 设计-响应面法(Box-Behnken design-response surface methodology, BBD-RSM) 优化 Doi-SF-NPs 处方工艺。使用透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM) 和傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR) 法进行表征。考察 Doi-SF-NPs 在不同 pH 值磷酸盐缓冲液(PBS) 中的释药行为。采用 MTT 法和 Annexin V/PI 双染法考察 Doi-SF-NPs 对人前列腺癌 PC3 细胞的生长抑制及促凋亡作用。建立前列腺癌荷瘤裸鼠模型, 比较薯蓣皂苷元原料药和 Doi-SF-NPs 在肿瘤组织中质量浓度, 采用相对摄取率和峰浓度比值考察 Doi-SF-NPs 肿瘤靶向性。将前列腺癌荷瘤裸鼠分为模型(生理盐水)组、阳性对照(顺铂, 2.0 mg/kg)组、薯蓣皂苷元原料药(10 mg/kg)组及 Doi-SF-NPs 低、高剂量(5、10 mg/kg)组, 比较 Doi-SF-NPs 体内抗肿瘤效果。评价 Doi-SF-NPs 安全性。结果 Doi-SF-NPs 最佳处方: 丝素蛋白与薯蓣皂苷元质量比为 11.94:1, 有机相与水相体积比为 5.99:1, 制备时间为 2.75 h。Doi-SF-NPs 平均包封率、载药量、粒径和 ζ 电位分别 $(84.07 \pm 0.70)\%$ 、 $(6.41 \pm 0.05)\%$ 、 (164.29 ± 4.43) nm 和 (-23.01 ± 1.17) mV。薯蓣皂苷元与丝素蛋白通过氢键络合作用形成 Doi-SF-NPs。Doi-SF-NPs 外貌呈类圆形纳米颗粒。Doi-SF-NPs 在 pH 5.5、6.0 PBS 中累积释放度较高, 具有明显的 pH 值敏感性。薯蓣皂苷元原料药和 Doi-SF-NPs 对 PC3 细胞半数抑制浓度(median inhibition concentration, IC_{50}) 分别为 72.44、55.68 $\mu\text{mol/L}$ 。Doi-SF-NPs 比薯蓣皂苷元原料药更有效地诱导了 PC3 细胞凋亡。Doi-SF-NPs 在肿瘤组织内相对摄取率为 3.23, 峰浓度比值为 2.60, 证明 Doi-SF-NPs 能明显增加肿瘤组织的蓄积量。Doi-SF-NPs (10 mg/kg) 将薯蓣皂苷元原料药(10 mg/kg) 抑瘤率由 29.47% 提高至 66.18%。Doi-SF-NPs 未对荷瘤裸鼠主要脏器产生影响, 使用安全性高。结论 Doi-SF-NPs 可提高薯蓣皂苷元肿瘤靶向性, 显著提高了抗肿瘤药效, 有望开发成抗肿瘤药物。

关键词: 薯蓣皂苷元; 丝素蛋白; 纳米粒; Box-Behnken 设计-响应面法; 前列腺癌; 肿瘤靶向; 抗肿瘤; 安全性评价

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2026)19-7587-15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.19.009

Preparation and characterization of diosgenin silk fibroin nanoparticles and their inhibitory effects on tumors in prostate cancer-bearing nude mice

DONG Yanan¹, REN Shuqiang², SHI Yan³, DONG Jiaojiao⁴, WANG Fengyun¹

1. Henan Vocational College of Applied Technology, Zhengzhou 450042, China

2. Zhengzhou Health College, Zhengzhou 450064, China

3. Zhengzhou Central Hospital, Zhengzhou 450001, China

4. Peking University Cancer Hospital, Beijing 100002, China

Abstract: Objective To prepare diosgenin silk fibroin nanoparticles (Doi-SF-NPs) and evaluate their physicochemical properties,

收稿日期: 2026-04-23

基金项目: 2025 年度河南省高等学校重点科研项目(25B310010); 2024 年度河南应用技术职业学院校级科研课题(2024-KJ-69); 2025 年度河南省科技攻关课题(252102310468); 2026 年度河南省科技攻关课题(262102310551)

作者简介: 董亚楠(1987—), 女, 硕士, 副教授, 研究方向为临床药学及基础医学。Tel: (0371)67592759 E-mail: dyn11212020@126.com

***通信作者:** 王风云(1973—), 女, 汉族, 硕士, 教授, 研究方向为临床肿瘤治疗。Tel: (0371)67673862 E-mail: 1346709427@qq.com

tumor targeting and *in vivo* anti-tumor effects. **Methods** The main influencing factors of Doi-SF-NPs were investigated by single factor experiments, and Box-Behnken design-response surface methodology (BBD-RSM) was employed to optimize prescription process of Doi-SF-NPs. Doi-SF-NPs was characterized by transmission electron microscopy (TEM) and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). Drug release behavior of Doi-SF-NPs in phosphate buffer saline solution with different pH values was investigated. MTT method and Annexin V/PI double staining method were used to investigate the inhibitory and proapoptotic effects of Doi-SF-NPs on PC3 cells, respectively. The nude mouse of prostate cancer was established, compared the concentrations of diosgenin and Doi-SF-NPs in tumor tissues, and then evaluated the tumor targeting ability of Doi-SF-NPs using the relative uptake rate and ratio of peak concentration. The nude mouse model of prostate cancer was divided into model (normal saline) group, positive control (cisplatin, 2.0 mg/kg) group, diosgenin (10 mg/kg) group, low-dose Doi-SF-NPs (5 mg/kg) group and high-dose Doi-SF-NPs (10 mg/kg) group, the *in vivo* anti-tumor effects of Doi-SF-NPs was compared with diosgenin. Safety evaluation of Doi-SF-NPs was also performed. **Results** Optimal prescription process of Doi-SF-NPs nanoparticles as follows: The mass ratio of silk fibroin to diosgenin was 11.94:1, the volume ratio of the organic phase to aqueous phase was 5.99:1, and the preparation time was 2.75 h. Average envelopment efficiency, drug loading, particle size and ζ potential were $(84.07 \pm 0.70)\%$, $(6.41 \pm 0.05)\%$, (164.29 ± 4.43) nm and (-23.01 ± 1.17) mV, respectively. Diosgenin formed Doi-SF-NPs with silk fibroin through hydrogen bonding. The appearance of Doi-SF-NPs was spherical nanoparticles. Doi-SF-NPs existed higher cumulative release in phosphate buffer solution of pH 5.5 and 6.0, which demonstrated that Doi-SF-NPs had obvious pH-sensitivity. MTT method results showed that IC_{50} of diosgenin and Doi-SF-NPs on PC3 cells were 72.44 and 55.68 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Doi-SF-NPs more effectively induced apoptosis of PC3 cells than that of diosgenin. The relative uptake rate of Doi-SF-NPs in tumor tissue was 3.23, and the peak concentration ratio was 2.60, which demonstrating that Doi-SF-NPs could significantly increase the accumulation in tumor tissue. Doi-SF-NPs (10 mg/kg) increased the tumor inhibition rate of diosgenin (10 mg/kg) from 29.47% to 66.18%. Doi-SF-NPs did not affect the major organs of tumor-bearing nude mouse, which showed that the safety of Doi-SF-NPs was high. **Conclusion** Doi-SF-NPs could improve the tumor targeting of diosgenin and significantly enhanced anti-tumor efficacy. Therefore, Doi-SF-NPs had the potential to be developed into an antitumor drug.

Key words: diosgenin; silk fibroin; nanoparticles; Box-Behnken design-response surface methodology; prostate cancer; tumor targeting; anti-tumor; safety evaluation

前列腺癌是男性较为常见的一种代谢异常疾病,国内外发病率在逐年攀升。化疗是临床治疗前列腺癌的主要方法,但化疗药物存在毒性大、靶向差、预后不良等问题^[1]。中医药在治疗前列腺癌方面积累了较多经验,在降低不良反应、提高生活质量等方面显示出独特优势^[2-3]。薯蓣皂苷元俗称皂素,属于异螺甾烷的衍生物,可从豆科、薯蓣科等植物中提取得到。国内外研究证实薯蓣皂苷元具有显著的抗前列腺癌作用^[4-5],该成分毒副作用极小,可作为防治前列腺癌的候选药物。薯蓣皂苷元结构上含疏水糖苷配基,导致水溶性极差,研究表明薯蓣皂苷元在 pH 2.0~7.4 磷酸盐缓冲液(PBS)溶解度均低于 10.0 $\mu\text{g/mL}$ ^[6],同时也影响了溶出度,极大影响了薯蓣皂苷元体内生物利用度及药效。在薯蓣皂苷元结构上引入亲水性基团可有效提高其水溶性^[7],但同时也可能使其药理活性受到影响^[8]。因此,医药研究者期望借助纳米递药系统来解决薯蓣皂苷元溶解度及溶出度问题,相关研究报道有纳米偶联物、自组装纳米粒、纳米复合物等^[7],虽然有效改善了薯蓣皂苷元理化性质缺陷,但这些纳米制

剂体内肿瘤靶向性较差,不利于薯蓣皂苷元抗肿瘤药效充分发挥。新型纳米递药系统常使用化学合成的高分子材料作为载体,但存在有机试剂残留、稳定性差、研发成本高、安全性存疑等缺陷^[8]。相比之下,天然来源成分具有稳定高、价格低廉、安全性好等优势,用于构建新型递药系统时可极大降低研发成本,也有助于扩大天然成分应用范围,从而推动中药新药研发高质量发展^[9]。

丝素蛋白是从天然蚕丝中提取的一种蛋白质,具有优异的生物降解性和自组装特性^[10],可负载药物形成丝素蛋白纳米粒(silk fibroin nanoparticles, SF-NPs),被美国 FDA 批准用于新型递药系统的载体材料。丝素蛋白的促内皮化特性和抗炎性也为其在临床应用提供了潜在优势,有望减少患者的并发症、提高治疗效果。丝素蛋白按二级结构可以分为以无规卷曲和 α -螺旋为主的 Silk I 构象和以 β -折叠为主的 Silk II 构象,其中 Silk II 构象是丝素蛋白的一种疏水且稳定的构象^[10],也是丝素蛋白纳米粒主要存在形式。在弱酸性环境中丝素蛋白的 β -折叠结构的易被破坏,触发快速释药,从而表现出 pH 敏

感特点^[11]；溶酶体酶在肿瘤细胞中过度表达，而溶酶体酶可降解丝素蛋白^[12]，增加了所载药物在肿瘤部位的释放几率；肿瘤细胞中谷胱甘肽和活性氧也可对丝素蛋白二硫键及 β -折叠产生破坏作用^[13]，利于药物在肿瘤部位定位释放，因此丝素蛋白纳米粒对 pH、溶酶体酶、谷胱甘肽及活性氧具有选择性响应特征，非常适合作为抗肿瘤药物的载体。鉴于此，本研究使用天然来源的丝素蛋白作为载体材料，构建薯蓣皂苷元丝素蛋白纳米粒(diosgenin silk fibroin nanoparticles, Doi-SF-NPs)，Box-Behnken 设计-响应面法(Box-Behnken design-response surface methodology, BBD-RSM)优化 Doi-SF-NPs 处方工艺，并对结合机制、理化性质、体内外抗肿瘤药效等方面进行评价，为后续研究奠定实验基础，也为薯蓣皂苷元应用于前列腺癌的治疗提供参考资料。

1 仪器与材料

1.1 仪器

85-2 型磁力搅拌器型磁力搅拌器，上海江星仪器有限公司；AUW220D 型电子天平，日本岛津公司；KM-23 型超声仪，广州科盟清洁技术有限公司；1200 型高效液相色谱仪，美国 Agilent 公司；EYEL4 型旋蒸仪，上海泉杰仪器有限公司；C5050 型高速离心机，上海元析仪器有限公司；Zetasizer Nono ZS-90 型粒度测定仪，英国马尔文公司；CE7 型自动溶出仪，美国 Sotax 公司；20S-TWIN 型透射电子显微镜，美国 FEI 公司；NicolettiS10 型傅里叶变换红外光谱仪，上海柜谷科技发展有限公司；Aiphal-2L 型真空冷冻干燥机，德国 CHRIST 公司；FSH-2A 型匀浆机，上海旌派仪器有限公司；细胞培养箱，上海普和希健康医疗器械有限公司；Mono422 型酶标仪，美国 BioTek Instruments 公司；LSR Fortessa 型流式细胞仪，美国 BD 仪器公司；DS-Ri2 型光学显微镜，日本 Nikon 公司。

1.2 材料

薯蓣皂苷元原料药，批号 20221015，质量分数为 95.0%，南京清韵生物科技有限公司；薯蓣皂苷元对照品，批号 111539-202303，质量分数为 96.8%，中国食品药品检定研究院；甘露醇，批号 F982E，广州合诚实业有限公司；丝素蛋白，批号 W293432，上海阿拉丁试剂有限公司；戊巴比妥钠，批号 090206，西安科昊生物科技有限公司；二甲基亚砜(DMSO)，批号 34824985V，北京兰杰柯科技有限公司；顺铂，批号 DR0540，北京军科弘创生物技术

有限公司；DMEM 培养基，批号 PM150110，武汉普诺赛生命科技有限公司；FITC-Annexin V/PI 细胞凋亡试剂盒，批号 40302ES20，苏州优逸兰迪生物科技有限公司；丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、肌酐和血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)试剂盒(批号 C009-2-1、C010-2-1、C011-2-1、C013-2-1)均购于南京建成生物工程研究所。

1.3 细胞与动物

前列腺癌 PC3 细胞，批号 20250310，中国科学院上海生科院细胞资源中心。Balb/c 裸鼠体质量为 18~22 g，雄性，4~6 周龄，购自河南省实验动物中心，动物生产许可证号 SCXK(豫)2022-001。动物实验经河南应用技术职业学院伦理委员会批准，批准号为 DW202411-002。

2 方法与结果

2.1 Doi-SF-NPs 的制备

取 25 mg 薯蓣皂苷元溶于 60 mL 无水乙醇，作为有机相；称取处方量丝素蛋白溶于一定体积的纯化水中，作为水相。将水相滴至有机相中，涡旋 5 min，得白色乳浊液。置于冰浴中，在 100 W 功率下超声一定时间。置于 40 °C 水浴中，600 r/min 磁力搅拌一定时间，以除尽乙醇。将混悬液使用 0.45 μ m 水膜(有机尼龙材质)进行滤过，除去不溶性颗粒，即得 Doi-SF-NPs。

2.2 Doi-SF-NPs 中薯蓣皂苷元含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil-C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)；流动相为甲醇-0.05%甲酸水溶液(70:30)；检测波长为 210 nm；体积流量为 1.0 mL/min；进样体积为 10 μ L；柱温为 30 °C。

2.2.2 线性关系考察 用乙腈配制 200 μ g/mL 薯蓣皂苷元对照品储备液，采用甲醇-0.05%甲酸水溶液(70:30)稀释成 10.00、5.00、2.50、1.00、0.50、0.05 μ g/mL，测定各质量浓度(X)对照的峰面积(Y)，得标准曲线回归方程 $Y=20.418\ 1\ X+1.028\ 0$ ， $r=0.999\ 9$ ，因此薯蓣皂苷元在 0.05~10.00 μ g/mL 线性关系良好。

2.2.3 Doi-SF-NPs 供试品溶液的制备 取 Doi-SF-NPs 混悬液 1 mL，置于 100 mL 量瓶中，加入 DMSO 50 mL，超声 5 min，放冷后采用甲醇-0.05%甲酸水溶液(70:30)稀释定容。以 10 000 r/min 离心(离心半径为 6.4 cm)5 min，精密吸取 1 mL 上清液至

10 mL 量瓶中, 采用甲醇-0.05%甲酸水溶液 (70 : 30) 稀释定容, 即得 Doi-SF-NPs 供试品溶液。

2.2.4 专属性考察 取丝素蛋白, 按照“2.2.3”项下方法制备阴性样品溶液 (不含薯蓣皂苷元), 另取 Doi-SF-NPs 供试品溶液和薯蓣皂苷元对照品溶液 (2.50 $\mu\text{g/mL}$) 分别进样测定, 结果见图 1。在检测波长为 429 nm 的条件下, 丝素蛋白未对薯蓣皂苷元色谱峰产生干扰, 专属性高。

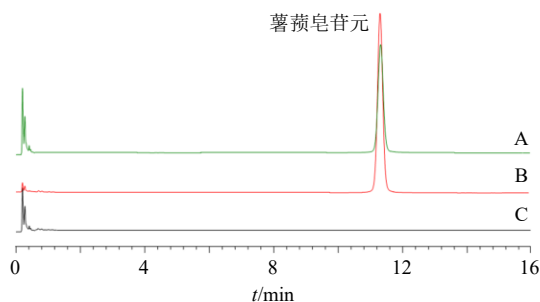


图 1 Doi-SF-NPs 样品 (A)、薯蓣皂苷元对照品 (B) 和阴性样品溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of Doi-SF-NPs sample (A), diosgenin reference substance (B) and negative sample solution (C)

2.2.5 精密度考察 取 10.00、1.00、0.05 $\mu\text{g/mL}$ 薯蓣皂苷元对照品溶液, 同日内分别连续进样测定 6 次, 薯蓣皂苷元峰面积的 RSD 分别为 0.21%、0.24%、0.66%; 每天测试 1 次, 连续进样测试 6 d, 薯蓣皂苷元峰面积的 RSD 分别为 0.24%、0.30%、0.29%, 结果表明该仪器日内、日间精密度良好。

2.2.6 稳定性考察 取 Doi-SF-NPs 供试品溶液, 置于室温 (25 $^{\circ}\text{C}$), 于 0、3、6、9、12、24 h 分别进样测定薯蓣皂苷元, 其峰面积的 RSD 为 1.07%, 结果表明 Doi-SF-NPs 供试品溶液稳定性良好。

2.2.7 重复性考察 吸取 Doi-SF-NPs 混悬液 1 mL, 按照“2.2.3”项下方法制备 Doi-SF-NPs 供试品溶液 6 份, 测得薯蓣皂苷元质量分数的 RSD 为 1.40%, 结果表明该方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率考察 精密吸取已测知薯蓣皂苷元含量的 Doi-SF-NPs 混悬液 0.5 mL, 置于 100 mL 量瓶中, 共 9 份, 分成低、中、高 3 组。按照标示量分别加入薯蓣皂苷元对照品 50%、100%、150%, 制备供试品溶液后测定薯蓣皂苷元总含量, 根据原始薯蓣皂苷元的含量计算加样回收率。结果显示, 薯蓣皂苷元的平均加样回收率为 98.17%, RSD 值为 1.71%, 结果表明该方法可用于测定 Doi-SF-NPs 中薯蓣皂苷元含量。

2.3 Doi-SF-NPs 包封率、载药量、粒径和 ζ 电位的测定

取 Doi-SF-NPs 混悬液, 使用 0.45 μm 微孔水膜滤过, 除去不溶性颗粒, 精密吸取 1 mL 至超滤管内管 (截留相对分子质量 3 000), 8 000 r/min 离心 (离心半径为 6.4 cm) 6 min, 除去游离薯蓣皂苷元, 超滤管内管截留 Doi-SF-NPs, 使用 DMSO 溶解该 Doi-SF-NPs 后, 测定被包封薯蓣皂苷元的量 (W_1)。根据投药量 (W_0), 计算 Doi-SF-NPs 中薯蓣皂苷元的包封率。再根据薯蓣皂苷元和丝素蛋白的总质量 ($W_{\text{总}}$), 计算 Doi-SF-NPs 中薯蓣皂苷元的载药量。使用纯化水将 Doi-SF-NPs 混悬液稀释 100 倍, 取 4 mL 混悬液至比色皿中, 于粒度分析仪上测定其粒径和分散指数 (polydispersity index, PDI)。取稀释后的 Doi-SF-NPs 混悬液至专用电槽中, 将电槽外壁擦干, 待两端液面齐平后, 于粒度分析仪上测定 Doi-SF-NPs 的 ζ 电位。

$$\text{包封率} = W_1/W_0$$

$$\text{载药量} = W_1/W_{\text{总}}$$

2.4 Doi-SF-NPs 处方工艺单因素考察

2.4.1 丝素蛋白与薯蓣皂苷元质量比的考察 有机相与水相体积比为 6 : 1, 超声时间 3 min, 制备时间为 3 h 条件下考察丝素蛋白与薯蓣皂苷元质量比对 Doi-SF-NPs 包封率、载药量和粒径的影响, 结果见表 1。Doi-SF-NPs 包封率随着丝素蛋白与薯蓣皂苷元用量比的增加而逐渐增加, 说明增加丝素蛋白用量利于提高包封率, 但丝素蛋白与薯蓣皂苷元质量比超过 12 : 1 后包封率提高幅度趋缓, 而载药量下降幅度较大。Doi-SF-NPs 粒径总体呈下降后增长趋势, 这是由于丝素蛋白用量比较低时体系乳化能力不足^[14], 药物也可能吸附在 Doi-SF-NPs 表面, 导致粒径较大; 但丝素蛋白用量比过高时, Doi-SF-NPs 相互聚集倾向变大, 导致粒径增长。可见丝素蛋白

表 1 丝素蛋白与薯蓣皂苷元质量比的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of mass ratio of silk fibroin to diosgenin ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

丝素蛋白与薯蓣皂苷元用量比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
8 : 1	62.04 $\pm$ 1.42	6.84 $\pm$ 0.09	197.63 $\pm$ 7.25
10 : 1	67.22 $\pm$ 1.50	6.06 $\pm$ 0.06	176.35 $\pm$ 3.50
12 : 1	82.91 $\pm$ 1.56	6.35 $\pm$ 0.12	168.57 $\pm$ 5.85
14 : 1	83.95 $\pm$ 1.42	5.65 $\pm$ 0.06	165.17 $\pm$ 8.12
16 : 1	84.38 $\pm$ 1.21	5.07 $\pm$ 0.10	175.10 $\pm$ 4.91

与薯蓣皂苷元质量比对 Doi-SF-NPs 影响较大,后续以 12:1 为中心对丝素蛋白与薯蓣皂苷元用量比 10:1~14:1 进行优化。

2.4.2 有机相与水相体积比的考察 丝素蛋白与薯蓣皂苷元质量比 12:1, 超声时间 3 min, 制备时间为 3 h 条件下考察有机相与水相体积比对 Doi-SF-NPs 的影响, 结果见表 2。丝素蛋白主要有 Silk I、Silk II 等构象, 其中 Silk I 构象含有很大比例的 α -螺旋结构以及无规则卷曲, Silk II 构象具有有序、稳定的 β -折叠结构, 一般经有机溶剂、超声等来诱导丝素蛋白由 Silk I 形式向 Silk II 形式转化^[14], 从而形成 Doi-SF-NPs。随着有机相与水相体积比的增加包封率和载药量均呈先增加后减小趋势, 可能是有机相体积较低时影响了丝素蛋白向 Silk II 形式转化^[15], 影响了 Doi-SF-NPs 载药, 故包封率及载药量较低; 有机相体积过高时体系出现大量絮状沉淀, 使用 0.45 μm 水膜滤过时, 部分薯蓣皂苷元也被除去, 故包封率及载药量下降。Doi-SF-NPs 粒径呈减小后增长趋势, 可见有机相与水相体积比对 Doi-SF-NPs 影响较大, 后续以 6:1 为中心对有机相与水相体积比 5:1~7:1 进行优化。

表 2 有机相与水相体积比的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effects of volume ratio of organic phase to aqueous phase ($\bar{x} \pm s, n=3$)

有机相与水相体积比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
4:1	68.77 $\pm$ 1.27	5.18 $\pm$ 0.04	184.20 $\pm$ 5.11
5:1	75.80 $\pm$ 1.24	5.73 $\pm$ 0.11	173.57 $\pm$ 6.75
6:1	83.27 $\pm$ 0.62	6.35 $\pm$ 0.08	164.43 $\pm$ 4.48
7:1	77.45 $\pm$ 0.59	5.89 $\pm$ 0.06	182.03 $\pm$ 6.84
8:1	74.75 $\pm$ 0.57	5.69 $\pm$ 0.04	233.80 $\pm$ 7.35

2.4.3 超声时间的考察 丝素蛋白与薯蓣皂苷元质量比 12:1, 有机相与水相体积比 6:1, 制备时间为 3 h 条件下考察超声时间对 Doi-SF-NPs 的影响, 结果见表 3。当不进行超声处理时 Doi-SF-NPs 粒径较大, 且包封率及载药量均相对较低, 所以引入超声工艺是必要的, 有助于诱导丝素蛋白向 Silk II 形式转化形成结构稳定的 Doi-SF-NPs。随着超声时间的延长包封率和载药量呈先增大后下降趋势, 可见诱导丝素蛋白由 Silk I 形式向 Silk II 形式转化时超声时间不易过长^[15], 因此最终选择超声 2 min 来制备 Doi-SF-NPs。

2.4.4 制备时间的考察 丝素蛋白与薯蓣皂苷元用量比 12:1, 有机相与水相体积比 6:1, 超声时间

表 3 超声时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effects of ultrasonic time ($\bar{x} \pm s, n=3$)

超声时间/min	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
0	62.12 $\pm$ 1.18	4.64 $\pm$ 0.06	673.97 $\pm$ 54.17
1	81.96 $\pm$ 1.52	6.34 $\pm$ 0.05	356.83 $\pm$ 34.01
2	83.41 $\pm$ 0.68	6.35 $\pm$ 0.07	178.47 $\pm$ 5.61
3	83.05 $\pm$ 0.92	6.34 $\pm$ 0.06	176.17 $\pm$ 5.49
4	79.06 $\pm$ 1.26	6.22 $\pm$ 0.05	225.77 $\pm$ 6.25

为 2 min 条件下考察制备时间对 Doi-SF-NPs 的影响, 结果见表 4。随着制备时间的延长包封率和载药量均呈先增加后减小趋势, 可能是制备时间较短时体系中乙醇未处理完全, 从而对 Doi-SF-NPs 结构稳定性产生影响, 药物易泄漏, 故包封率及载药量较低; 制备时间过长时可能使薯蓣皂苷元降解, 也可能对 Doi-SF-NPs 结构稳定性产生影响^[15], 使包封率及载药量下降。Doi-SF-NPs 粒径呈减小后增长趋势, 可见制备时间对 Doi-SF-NPs 影响较大, 后续以 3 h 为中心对制备时间 2~4 h 进行优化。

表 4 制备时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effects of prepare time ($\bar{x} \pm s, n=3$)

制备时间/h	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
1	57.27 $\pm$ 1.18	4.29 $\pm$ 0.07	188.68 $\pm$ 6.66
2	67.71 $\pm$ 1.42	5.16 $\pm$ 0.05	180.19 $\pm$ 5.35
3	83.04 $\pm$ 1.00	6.38 $\pm$ 0.06	174.30 $\pm$ 5.54
4	77.32 $\pm$ 0.97	5.83 $\pm$ 0.06	198.69 $\pm$ 6.99
5	75.33 $\pm$ 0.93	5.74 $\pm$ 0.06	227.11 $\pm$ 3.90

2.5 Box-Behnken 设计-效应面法 (Box-Behnken design-response surface method, BBD-RSM) 优化 Dio-SF-NPs 处方工艺

2.5.1 优化方案设计 选择丝素蛋白与薯蓣皂苷元质量比 (X_1)、有机相与水相体积比 (X_2) 和制备时间 (X_3) 分别作为 Doi-SF-NPs 主要影响因素, 各因素设置低 (-1)、中 (0)、高 (+1) 水平。包封率 (Y_1)、载药量 (Y_2) 和粒径 (Y_3) 分别作为 Doi-SF-NPs 质量指标, 为简化 Doi-SF-NPs 处方工艺优化过程, 将 Y_1 、 Y_2 和 Y_3 转换为总评归一值 (overall desirability, OD), 以得到包封率和载药量均较高, 且粒径较小的最佳处方工艺。OD 值计算过程为采用 $d_{\max}=(M_i-M_{\min})/(M_{\max}-M_{\min})$ 计算包封率 d_1 和载药量 d_2 ; 采用 $d_{\min}=(M_{\max}-M_i)/(M_{\max}-M_{\min})$ 计算粒径 d_3 , 其中, M_i 、 $M_{\max}$ 和 $M_{\min}$ 分别为实测值、最大值和最小值; 采用 $OD=(d_1d_2d_3)^{1/3}$ 计算 OD 值。处方工艺组合及测得结果见表 5。

表 5 试验组合及相应结果 ($n=3$)Table 5 Experiments combinations and corresponding results ($n=3$)

试验号	X_1	X_2	X_3/h	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	Y_3/nm	OD
1	12:1 (0)	6:1 (0)	3 (0)	83.16	6.42	165.88	0.953
2	10:1 (-1)	7:1 (+1)	3	68.43	6.11	185.41	0.408
3	12:1	5:1 (-1)	2 (-1)	72.15	5.43	180.63	0.455
4	10:1	6:1	2	65.48	5.84	185.17	0.270
5	14:1 (+1)	6:1	2	73.69	4.81	190.34	0.242
6	12:1	7:1	2	69.44	5.33	189.23	0.307
7	12:1	6:1	3	84.68	6.45	170.47	0.935
8	10:1	6:1	4 (+1)	65.54	5.91	196.44	0.148
9	14:1	7:1	3	70.84	4.57	186.30	0.000
10	10:1	5:1	3	63.91	5.76	185.46	0.000
11	12:1	7:1	4	71.95	5.56	195.71	0.253
12	14:1	5:1	3	74.18	4.88	183.99	0.325
13	12:1	6:1	3	82.51	6.36	169.86	0.892
14	12:1	6:1	3	84.07	6.40	164.36	0.979
15	14:1	6:1	4	73.67	4.76	198.43	0.000
16	12:1	5:1	4	70.71	5.37	195.65	0.224
17	12:1	6:1	3	82.99	6.46	172.84	0.884

2.5.2 模型拟合及方差分析 根据表 5 中 17 组实验数据 (含 5 个中心点实验), 并使用 Design Expert 软件 (版本 V12.0.1) 得到 OD 多元 2 次项方程: $OD=0.93-0.03 X_1-4.65 \times 10^{-4} X_2-0.08 X_3-0.18 X_1 X_2-0.30 X_1 X_3+0.04 X_2 X_3-0.45 X_1^2-0.30 X_2^2-0.32 X_3^2$, 将该方程作为 OD 值的数学模型。方差分析结果见表 6, 数学模型方程 P 值 $<0.000 1$, 模型系数 R^2 和修正系数 R_{adj}^2 分别为 0.992 5 和 0.982 8, 失拟项 $P=0.135 2$ ($P>0.05$), 说明该模型具有极显著性意义, 拟合值和测定值之间相关性良好, 且干扰因素对拟合值未产生显著性影响。据 P 值分析结果可知数学模型方程中 X_3 、 $X_1 X_2$ 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 项具有极显著差异 ($P<0.01$)。

2.5.3 响应面分析及 Doi-SF-NPs 最佳处方确定 使用 Design Expert 软件 (版本 V12.0.1) 分别绘制丝素蛋白与薯蓣皂苷元用量比 (X_1)、有机相与水相

表 6 数学模型方差分析

Table 6 Variance analysis of mathematical model

来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值
模型	9	2.03	0.23	116.48	$<0.000 1$
X_1	1	8.38×10^{-3}	8.38×10^{-3}	4.32	0.076 2
X_2	1	1.73×10^{-4}	1.73×10^{-4}	0.09	0.773 8
X_3	1	0.05	0.05	27.16	0.001 2
$X_1 X_2$	1	0.13	0.13	69.25	$<0.000 1$
$X_1 X_3$	1	3.59×10^{-3}	3.59×10^{-3}	1.85	0.215 6
$X_2 X_3$	1	7.81×10^{-3}	7.81×10^{-3}	4.03	0.084 7
X_1^2	1	0.83	0.83	430.31	$<0.000 1$
X_2^2	1	0.38	0.38	196.00	$<0.000 1$
X_3^2	1	0.43	0.43	220.25	$<0.000 1$
残差	7	0.01	1.94×10^{-3}		
失拟项	3	7.01×10^{-3}	2.34×10^{-3}	1.42	0.359 5
总偏差	4	6.56×10^{-3}	1.64×10^{-3}		
总离差	16	2.05			

体积比 (X_2) 和制备时间 (X_3) 与 OD 值的响应面图。结果见图 2, 均呈抛物线曲面, 且开口向下, 表明 OD 值存在有峰值, 提示随着 X_1 、 X_2 和 X_3 增加 OD 值先升后降, 其中 $X_1 X_2$ 对应等高线图为扁长椭圆形, 说明丝素蛋白与薯蓣皂苷元用量比 (X_1) 和有机相与水相体积比 (X_2) 交互作用较强。在确定 Doi-SF-NPs 处方时选择 OD 值最大值作为优化目标, 得 Doi-SF-NPs 最佳处方: 丝素蛋白与薯蓣皂苷元质量比为 11.94:1, 有机相与水相体积比为 5.99:1, 制备时间为 2.75 h, 预测 OD 值为 0.989。

2.5.4 Doi-SF-NPs 工艺验证 平行制备 3 批 Doi-SF-NPs, 处方验证结果见表 7。计算得平均包封率、载药量和粒径分别为 $(84.07 \pm 0.70) \%$ 、 $(6.41 \pm 0.05) \%$ 和 $(164.29 \pm 4.43) nm$, 按照 “2.5.1” 项下方法计算得实际 OD 值为 0.982 ± 0.004 。以预测 OD 值 0.989 为参考, 实际 OD 值相对偏差为 -0.71%, 说明 OD 数学模型适用性较高。Doi-SF-NPs 粒径分布见图 3-A, 另测得 PDI 值为 0.166 ± 0.013 , ζ 电位为 $(-23.01 \pm 1.17) mV$, 见图 3-B。

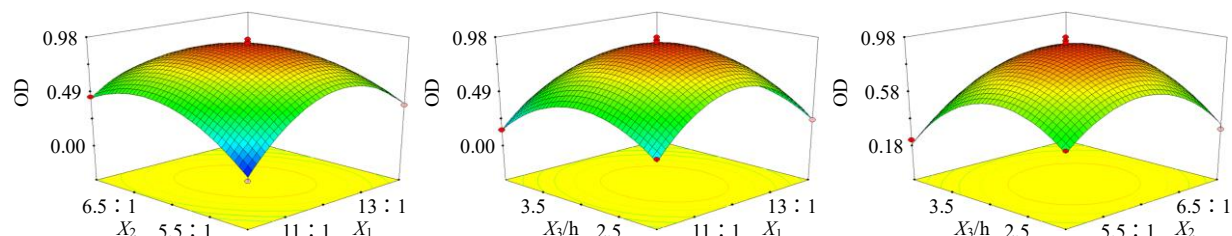


图 2 自变量与响应值三维图

Fig. 2 Three-dimensional plots of independent factors and response values

表 7 处方验证结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

批次	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	OD 值
1	84.35 ± 0.75	6.43 ± 0.07	165.43 ± 5.21	0.977
2	83.92 ± 0.25	6.42 ± 0.03	163.82 ± 5.24	0.985
3	83.96 ± 1.09	6.38 ± 0.04	163.61 ± 4.58	0.981

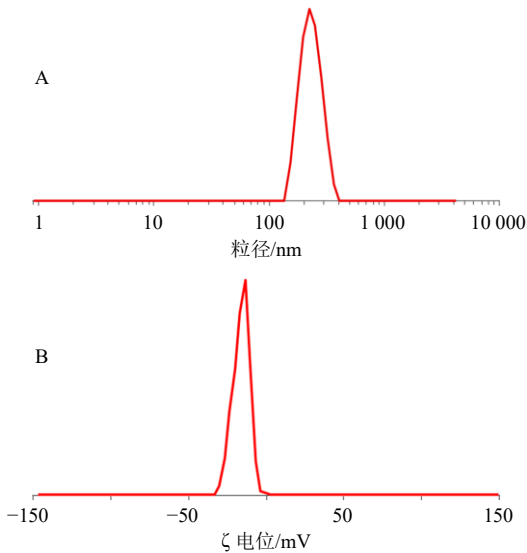


图 3 Dio-SF-NPs 的粒径分布 (A) 和 ζ 电位 (B)
 Fig. 3 Particle size distribution (A) and ζ potential (B) of Dio-SF-NPs

2.6 Dio-SF-NPs 理化性质表征

2.6.1 透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 观察 取 Doi-SF-NPs 混悬液涂敷在 TEM 专用铜网上, 静置 30 min 后加 1.5% 磷钨酸钠 (pH 7.0) 染色, 干燥后用加速电压为 80 kV 的 TEM 观察 Doi-SF-NPs 微观形貌。结果见图 4, Doi-SF-NPs 为类圆形纳米颗粒。TEM 观察 Doi-SF-NPs 粒径时属于干燥径, 而粒度分析仪测定的是水化径, 所以二者粒径数据存在一定的差别。

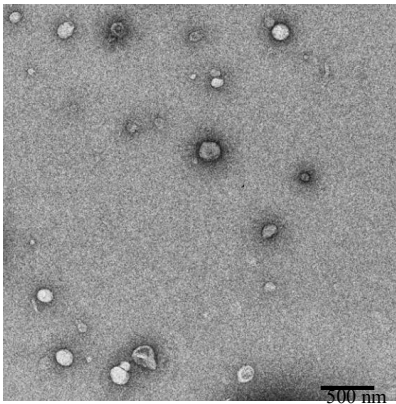


图 4 Dio-SF-NPs 的 TEM 图
 Fig. 4 TEM diagram of Dio-SF-NPs

2.6.2 傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR) 分析 取 Doi-SF-NPs 混悬液敞口置于 -60 °C 超低温冰箱中预冻 3 d, 取出后立即置于 -30 °C 冻干机中, 抽真空, 3 d 后即得 Doi-SF-NPs 粉末。FT-IR 测试条件: 室温 (25 °C) 环境, 相对湿度低于 30%, 在 400~4 000 cm^{-1} 扫描 32 次, 分辨率为 4 cm^{-1} 。取薯蓣皂苷元原料药、丝素蛋白、物理混合物 (薯蓣皂苷元与丝素蛋白质量比同 Doi-SF-NPs) 和 Doi-SF-NPs 粉末适量, 按照样品与 KBr 质量比 1 : 100 加入 KBr 研细, 压片, 各样品 FT-IR 测试结果见图 5。在薯蓣皂苷元原料药 FT-IR 图谱中, 3 438 cm^{-1} 处吸收峰由薯蓣皂苷元-OH 伸缩振动引起, 2 953、2 850 cm^{-1} 处吸收峰系由不对称和对称的 C-H 伸缩振动引起, 1 490 cm^{-1} 处吸收峰由 C=C 伸缩振动引起, 这些吸收峰是薯蓣皂苷元特征吸收峰。在丝素蛋白 FT-IR 图谱中, 酰胺 I (C=O)、酰胺 II (N-H)、酰胺 III (C-N) 特征吸收峰分别位于 1 659、1 544、1 238 cm^{-1} , 是丝素蛋白特征吸收峰。物理混合物 FT-IR 图谱仅是薯蓣皂苷元和丝素蛋白吸收峰的简单叠加, 两者之间无络合作用。Doi-SF-NPs 的 FT-IR 图谱与物理混合物存在较大差别, 薯蓣皂苷元在 3 438、1 490 cm^{-1} 处特征吸收峰消失, 丝素蛋白在 1 659、1 544、1 238 cm^{-1} 处吸收峰发生红移, 因此推测薯蓣皂苷元与丝素蛋白存在氢键络合作用。

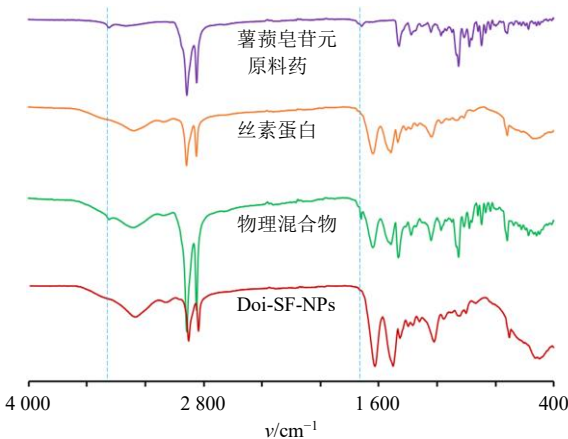


图 5 各个样品的 FT-IR 图
 Fig. 5 FT-IR spectrum of various samples

2.6.3 Doi-SF-NPs 在不同 pH 介质中的释药行为比较 取 Doi-SF-NPs 和薯蓣皂苷元原料药至一端尼龙绳已扎紧的透析袋中 (截留相对分子质量 8 000), 使薯蓣皂苷元含量均为 5 mg, 分别加入 pH 5.5 PBS (含 1% SDS) 5 mL, 尼龙绳将另一端扎紧后放入转

篮中,置于体积为 1.0 L、温度为 $(37.0 \pm 0.2)^\circ\text{C}$ 的 pH 5.5 PBS (含 1% SDS) 中,开启溶出仪,转篮转速为 75 r/min。分别于 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、9.0、12.0、18.0、24.0、36.0、48.0 h 取样 5 mL,并立即补加 pH 5.5 PBS (含 1% SDS) 5 mL,8 000 r/min 离心 10 min (离心半径为 6.4 cm) 后测定上清液中薯蓣皂苷元含量,计算各时间点累积释放率。同法考察 Doi-SF-NPs 和薯蓣皂苷元原料药在 pH 6.0、6.8、7.4 PBS 中释药情况,结果见图 6。

Doi-SF-NPs 在 pH 5.5、6.0 PBS 释药速率和释放度明显大于 pH 6.8、7.4 PBS,说明 Doi-SF-NPs 具有 pH 敏感性(图 6-A)。丝素蛋白的 Silk II 构象在 pH 6.0 PBS 环境中稳定性最差^[13],故 Doi-SF-NPs 在 pH 6.0 PBS 释药速率和释放度最大。

薯蓣皂苷元体外释药无 pH 值敏感性(图 6-B),说明 Doi-SF-NPs 表现出的 pH 值敏感性与薯蓣皂苷元自身溶解度无关^[16],而与丝素蛋白 Silk II 构象的理化性质有关。释药模型见表 8,Doi-SF-NPs 在 pH 5.5、6.0、6.8、7.4 PBS 中释药行为均与 Weibull 模型拟合度最高。

2.7 Doi-SF-NPs 溶血实验

使用注射用生理盐水配制 2% 的红细胞悬液,分

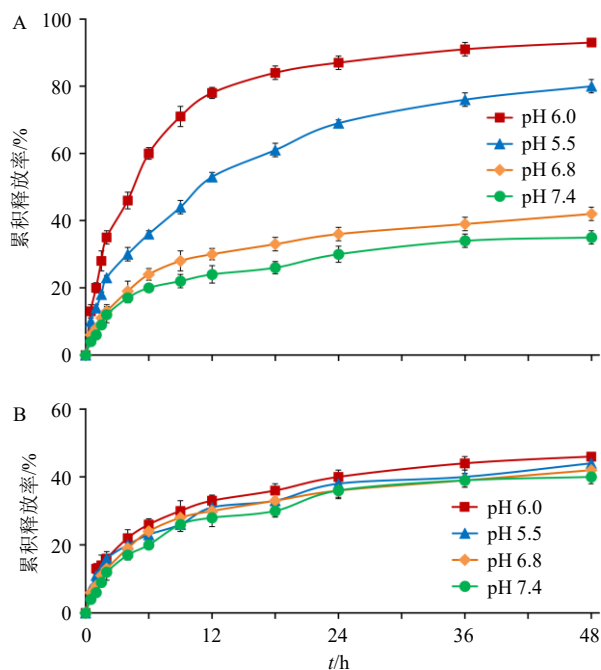


图 6 Doi-SF-NPs (A) 和薯蓣皂苷元原料药 (B) 在不同 pH 值 PBS 中体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 6 *In vitro* release curves of Doi-SF-NPs (A) and diosgenin bulk drug (B) in PBS with different pH values ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

表 8 Dio-SF-NPs 的释药模型

Table 8 Fitting release model of Dio-SF-NPs

释放介质	模型	拟合方程	R^2
pH 5.5 PBS	一级	$\ln(1-M_t/M_\infty) = -0.0326t - 0.2231$	0.9207
	Higuchi	$M_t/M_\infty = 0.1218t^{1/2} + 0.0499$	0.9623
	Weibull	$\ln \ln[1/(1-M_t/M_\infty)] = 0.6258 \ln t - 1.8848$	0.9972
pH 6.0 PBS	一级	$\ln(1-M_t/M_\infty) = -0.0537t - 0.4861$	0.8441
	Higuchi	$M_t/M_\infty = 0.1430t^{1/2} + 0.1424$	0.8564
	Weibull	$\ln \ln[1/(1-M_t/M_\infty)] = 0.6776 \ln t - 1.4233$	0.9743
pH 6.8 PBS	一级	$\ln(1-M_t/M_\infty) = -0.0101t - 0.1496$	0.7522
	Higuchi	$M_t/M_\infty = 0.0625t^{1/2} + 0.0454$	0.9261
	Weibull	$\ln \ln[1/(1-M_t/M_\infty)] = 0.4864 \ln t - 2.3288$	0.9625
pH 7.4 PBS	一级	$\ln(1-M_t/M_\infty) = -0.0078t - 0.1223$	0.7415
	Higuchi	$M_t/M_\infty = 0.0510t^{1/2} + 0.0398$	0.9168
	Weibull	$\ln \ln[1/(1-M_t/M_\infty)] = 0.4887 \ln t - 2.5778$	0.9548

t 代表时间; M_t 和 M_∞ 分别为 t 和 ∞ 时的累积释放率; M_t/M_∞ 为 t 时间累积释放百分率。

t was time; M_t and M_∞ were cumulative release rates at time t and ∞ , respectively; M_t/M_∞ was cumulative release percentage at t .

成阳性(纯化水)组、阴性(注射用生理盐水)组和 Doi-SF-NPs (薯蓣皂苷元质量浓度分别为 0.05、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50、0.60 mg/mL) 组,于 37°C 水浴中孵育 0.5 h,以 3 000 r/min 离心 10 min (离心半径为 6.4 cm)。取上清液,于 429 nm 波长处测定吸光度 (A),并计算溶血率。结果(图 7)显示,Doi-SF-NPs 在薯蓣皂苷元 0.05~0.60 mg/mL 质量浓度的溶血率均低于 5%,表明 Doi-SF-NPs 与血液的相容性较好,可注射给药。薯蓣皂苷元在 0.60 mg/mL 质量浓度时溶血率误差相对较大,可能是随着溶血程度的增加干扰因素对检验结果的影响程度也随之增加所致,但实验结果仍具有一定的参考价值。

$$\text{溶血率} = (A_{\text{样品}} - A_{\text{阴性}}) / (A_{\text{阳性}} - A_{\text{阴性}})$$

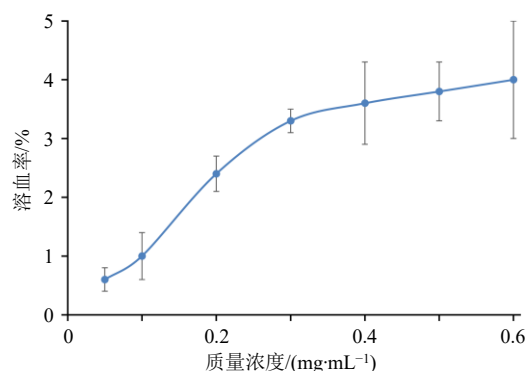


图 7 Doi-SF-NPs 溶血实验考察结果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 7 Investigation results of Doi-SF-NPs hemolysis experiment ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

2.8 Doi-SF-NPs 冻干粉的制备及其稳定性考察

于 Doi-SF-NPs 混悬液中加入质量分数为 5% 甘露醇，溶解后按 2 mL/瓶分装至西林瓶中，敞口置于 -60 ℃ 超低温冰箱中预冻 3 d，取出后立即置于 -30 ℃ 冻干机中，抽真空，3 d 后即得 Doi-SF-NPs 冻干粉。Doi-SF-NPs 混悬液外观见图 8-A，带浅蓝色乳光；冻干粉外观见图 8-B，色泽均匀，无塌陷现象；Doi-SF-NPs 冻干粉复溶后混悬液仍带浅蓝色乳光（图 8-C），使用绿色激光笔侧面照射时可观察到明亮光路，即丁达尔现象（图 8-D），说明 Doi-SF-NPs 冻干粉复溶后可形成胶体分散体系。

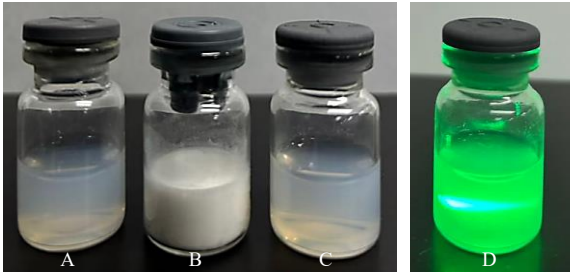


图 8 Doi-SF-NPs 混悬液 (A)、Doi-SF-NPs 冻干粉 (B)、复溶后混悬液 (C) 及其丁达尔实验 (D)
Fig. 8 Doi-SF-NPs suspension (A), Doi-SF-NPs lyophilized powder (B), suspension after reconstitution (C) and its Tyndall effect experiment (D)

将 Doi-SF-NPs 冻干粉密封后置于 -10 ℃ 冰箱中，分别 0、1、2、3、6 月取样，加注射用生理盐水复溶后分别测定质量指标，结果见表 9。Doi-SF-NPs 冻干粉 6 个月后包封率有所下降，但仍大于 80%；粒径有所增长，但仍小于 200 nm；PDI 值仍小于 0.3，说明 Doi-SF-NPs 冻干粉复溶后粒径分布较为均匀；ζ 电位绝对值波动较小，表明 Doi-SF-NPs 冻干粉在低温环境中保存时稳定性良好。

2.9 体外抗肿瘤实验

2.9.1 PC3 细胞培养及生长抑制研究 常规复苏 PC3 细胞，使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液制成浓度为 5.0×10^4 个/mL 的细胞悬液，接种至 96

表 9 Doi-SF-NPs 冻干粉稳定性结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 9 Stability results of Doi-SF-NPs lyophilized powder ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t/月	包封率/%	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
0	82.96 ± 1.26	172.43 ± 4.44	0.168 ± 0.010	-22.16 ± 0.94
1	82.84 ± 0.74	175.64 ± 6.12	0.159 ± 0.007	-23.07 ± 0.72
2	81.77 ± 0.99	176.95 ± 3.47	0.162 ± 0.011	-22.94 ± 1.03
3	81.49 ± 1.13	180.61 ± 5.30	0.166 ± 0.013	-23.01 ± 1.14
6	81.03 ± 1.07	182.90 ± 4.98	0.173 ± 0.009	-22.85 ± 0.81

孔板，每孔体积为 100 μL。在 5% CO₂、37 ℃ 的培养箱内培养 24 h，细胞完全贴壁。采用培养液稀释配制不同浓度的薯蓣皂苷元原料药和 Doi-SF-NPs 药液，设置空白（0.5% MTT 和 DMSO）组、对照（PC3 细胞、0.5% MTT 和 DMSO）组及薯蓣皂苷元原料药（25、50、75、100 μmol/L）组和 Doi-SF-NPs（25、50、75、100 μmol/L）组^[5]，均设 6 个复孔。培养箱内培养 48 h，每孔分别加 0.5% MTT 溶液 20 μL，4 h 后弃去培养液，每孔分别加 DMSO 溶液 100 μL，放置 10 min 后振荡，使甲瓚完全溶解。将培养板放入酶标仪中，在 490 nm 波长下测定 A 值，计算细胞存活率，结果见表 10。与相同浓度薯蓣皂苷元原料药比较（除 0 μmol/L 外），Doi-SF-NPs 在各个浓度下的存活率均极显著性下降（ $P < 0.01$ ），各薯蓣皂苷元原料药和 Doi-SF-NPs 对 PC3 细胞半数抑制浓度（median inhibition concentration, IC₅₀）分别为 72.44、55.68 μmol/L，Doi-SF-NPs 使薯蓣皂苷元的 IC₅₀ 值下降，表明 Doi-SF-NPs 增强了薯蓣皂苷元的抗肿瘤活性。

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

表 10 薯蓣皂苷元和 Doi-SF-NPs 对 PC3 细胞的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 10 Inhibitory effects of diosgenin and Doi-SF-NPs on PC3 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

浓度/ (μmol·L ⁻¹)	细胞存活率/%	
	薯蓣皂苷元原料药	Doi-SF-NPs
0	99.47 ± 0.60	99.77 ± 2.27
25	89.27 ± 1.11	81.70 ± 2.09**
50	72.60 ± 2.04	53.97 ± 2.74**
75	48.80 ± 3.44	40.86 ± 3.25**
100	41.67 ± 3.52	28.37 ± 2.15**

与薯蓣皂苷元原料药比较：** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs diosgenin bulk drug.

2.9.2 流式细胞术检测细胞凋亡 取对数生长期 PC3 细胞，按 5.0×10^4 个/孔接种，置于 5% CO₂、37 ℃ 培养箱内培养 48 h。设置对照组、薯蓣皂苷元原料药组和 Doi-SF-NPs 组，薯蓣皂苷元浓度均为 75 μmol/L，置 5% CO₂、37 ℃ 培养箱内培养 48 h。取出后加入适量 0.25% 胰酶消化液（含 EDTA），贴壁细胞可被轻轻吹下来。收集细胞悬液加入培养皿中，轻轻振荡混匀，2 000 r/min 离心（离心半径为 6.4 cm）5 min，弃去上清液，收集细胞，加 PBS 重悬液清洗，2 000 r/min 离心（离心半径为 6.4 cm）5 min，弃去上清液。重悬后加 FITC 标记的 Annexin-

V 10 μL , 黑暗室温环境中孵育 20 min, 重悬 2 次, 加入碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 5 μL , 孵育 5 min^[17-18], 使用流式细胞仪检测 FITC 和 PI 荧光信

号, 结果见图 9。薯蓣皂苷元原料药和 Doi-SF-NPs 的凋亡率分别为 $(32.69 \pm 0.44)\%$ 、 $(47.06 \pm 0.57)\%$, 表明 Doi-SF-NPs 增强了薯蓣皂苷元的抗肿瘤作用。

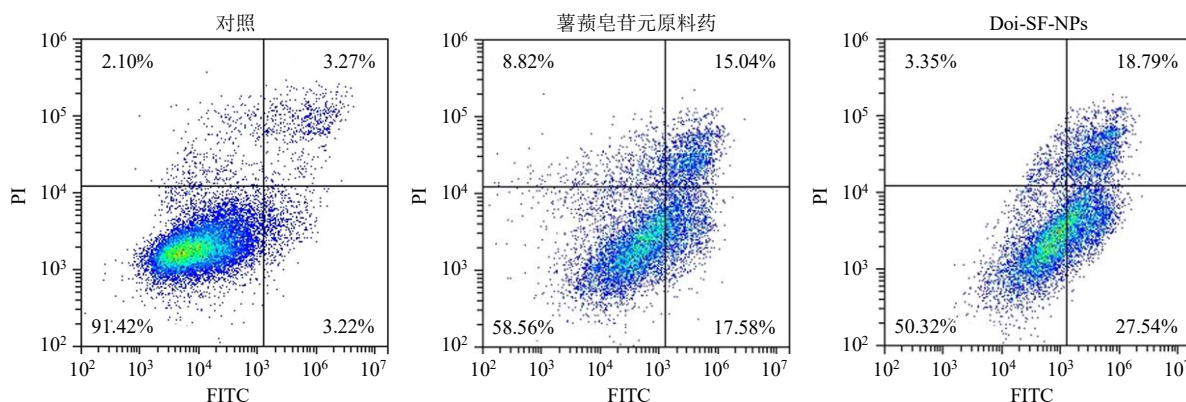


图 9 薯蓣皂苷元原料药和 Doi-SF-NPs 对 PC3 细胞凋亡的影响

Fig. 9 Effects of diosgenin bulk drug and Doi-SF-NPs on PC3 cell apoptosis

2.10 Doi-SF-NPs 体内组织分布研究

2.10.1 肿瘤模型的建立^[19] 取 Balb/c 裸鼠, 脱去右侧腋窝皮下被毛, 注射 100 μL 处于对数生长期的 PC3 细胞悬液 (1.0×10^7 个/mL), 棉球轻按注射部位, 正常饲养。接种 PC3 细胞 2 周后, 肉眼可见明显的肿块, 挤压使之隆起, 立即用游标卡尺测量长 (a) 和宽 (b), 计算肿瘤体积 (V), 选取瘤体体积为 $(155 \pm 5) \text{ mm}^3$ 荷瘤裸鼠作为模型。

$$V = ab^2\pi/6$$

2.10.2 实验方案及肿瘤组织供试品的制备 取禁食过夜的 84 只荷瘤小鼠, 随机分为薯蓣皂苷元原料药组和 Doi-SF-NPs 组, 每组各 36 只, 分别按 10.0 mg/kg 剂量^[20] (以薯蓣皂苷元含量计) 尾 iv 给药, 于 0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、6.00、8.00 h 分别随机取 6 只荷瘤小鼠 ip 2%戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 麻醉, 断颈椎处死并取肿瘤组织, 称定质量后剪碎, 加入 3 倍量生理盐水后匀浆^[21], 精密吸取 0.5 mL 匀浆液至含 2 mL 乙腈的离心管中, 密封涡旋 5 min, 8 000 r/min 离心 (离心半径为 6.4 cm) 10 min, 弃去杂质沉淀, 使用氮气将上清液吹干, 于残渣中加入 0.1 mL 乙腈复溶, 待测。

2.10.3 肿瘤组织对照品溶液配制及标准曲线的绘制 取 1 只荷瘤小鼠 (未给药), ip 2%戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 麻醉, 断颈椎处死并取肿瘤组织, 按照“2.10.2”项下方法处理成残渣, 加入薯蓣皂苷元对照品, 制成质量浓度分别为 20.00、10.00、5.00、2.50、1.00、0.50 $\mu\text{g/mL}$ 的肿瘤组织对照品溶液。按照“2.2.1”项下条件分别测定各质量浓度 (X) 对应

的峰面积 (Y), 拟合得肿瘤组织标准曲线回归方程为 $Y = 33.06X + 34.17$, $r = 0.9986$, 表明肿瘤组织对照品溶液中薯蓣皂苷元在 0.50~20.0 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.10.4 专属性考察 分别吸取肿瘤组织样品溶液、肿瘤组织薯蓣皂苷元对照品溶液和空白组织样品溶液, 按照“2.2.1”项下条件进样测定, 色谱图见图 10。结果表明, 肿瘤组织内源性杂质不干扰薯蓣皂苷元色谱峰, 专属性较高。

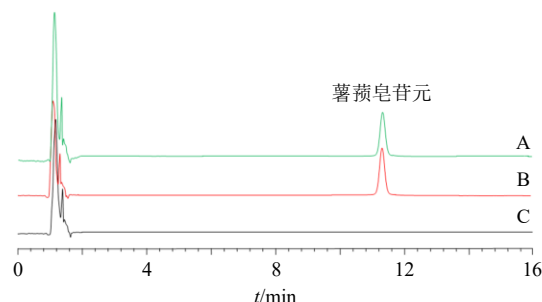


图 10 肿瘤组织样品 (A)、肿瘤组织对照品 (B) 和肿瘤组织空白样品溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 10 HPLC chromatograms of tumor tissue sample (A), tumor tissue reference substance sample (B) and tumor tissue blank sample solution (C)

2.10.5 稳定性考察 取薯蓣皂苷元质量浓度为 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 肿瘤组织质控样品溶液, 分别于制备后 0、3、6、12、18、24 h 进样测定, 测得薯蓣皂苷元峰面积的 RSD 为 6.16%, 结果表明样品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.10.6 重复性考察 取 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 薯蓣皂苷元肿瘤组织质控样品, 平行制备成 6 份供试品溶液, 测得

薯蓣皂苷元质量浓度的 RSD 为 7.09%，结果表明该实验重复性良好。

2.10.7 精密度和准确度考察 取薯蓣皂苷元质量浓度分别为 20.00、5.00、0.50 μg/mL 肿瘤组织质控样品溶液，连续进样 6 次，测得各个样品峰面积的 RSD 分别为 2.14%、5.13%、5.70%，结果表明该实验精密度良好。

根据测得的薯蓣皂苷元峰面积，使用随行标准曲线方程计算薯蓣皂苷元的测得质量浓度，与实际质量浓度相比，计算得相对偏差分别为 6.01%、-2.19%和-3.18%，结果表明该实验准确度较高。

2.10.8 提取回收率 使用空白肿瘤组织配制薯蓣皂苷元质量浓度分别为 20.00、5.00、0.50 μg/mL 的样品，测定薯蓣皂苷元峰面积，带入随行标准曲线计算测得含量。将测得含量与实际含量对比，计算得薯蓣皂苷元的平均提取回收率为 103.42%，RSD 为 7.46%，因此该方法可测定肿瘤组织中薯蓣皂苷元含量。

2.10.9 肿瘤组织中薯蓣皂苷元含量测定结果 根据肿瘤质量和测得薯蓣皂苷元的含量，计算肿瘤组织中质量浓度，结果见表 11，以薯蓣皂苷元为参考计算 Doi-SF-NPs 的相对摄取率（relative uptake efficiency, RUE）和峰浓度比值（peak concentration ratio, C_e ），数值越大表示 Doi-SF-NPs 在肿瘤组织中靶向性越强^[21]。

结果显示，Doi-SF-NPs 在各时间点薯蓣皂苷元质量分数均极显著性大于薯蓣皂苷元注射液（ $P < 0.01$ ），Doi-SF-NPs 的相对摄取率为 3.23，峰浓度比值为 2.60，证明 Doi-SF-NPs 能明显增加肿瘤组织的蓄积量，具有肿瘤靶向作用。

$$RUE = AUC_{Doi-SF-NPs} / AUC_{薯蓣皂苷元}$$
$$C_e = C_{max Doi-SF-NPs} / C_{max 薯蓣皂苷元}$$

AUC 为药-时曲线下面积， C_{max} 为峰浓度

表 11 薯蓣皂苷元和 Doi-SF-NPs 在各时间点肿瘤组织中的质量分数（ $\bar{x} \pm s, n = 6$ ）

Table 11 Concentration of diosgenin and Doi-SF-NPs in tumor tissue at various time points ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

质量分数/(μg·g ⁻¹)			质量分数/(μg·g ⁻¹)		
t/h	薯蓣皂苷元 原料药	Doi-SF-NPs	t/h	薯蓣皂苷元 原料药	Doi-SF-NPs
0.25	0.98±0.39	5.07±1.88**	4.00	1.02±0.34	3.43±0.66**
0.50	6.07±1.92	15.13±3.24**	6.00	0.50±0.17	1.27±0.42**
1.00	4.04±1.03	10.92±2.01**	8.00	0.11±0.04	0.32±0.10**
2.00	1.96±0.55	6.05±1.47**			

与薯蓣皂苷元原料药比较：** $P < 0.01$ 。
** $P < 0.01$ vs diosgenin bulk drug.

2.11 Doi-SF-NPs 体内抗肿瘤实验

2.11.1 实验设计方案 30 只荷瘤裸鼠随机分成 5 组，即模型（生理盐水）组、阳性对照（顺铂，2.0 mg/kg）组、薯蓣皂苷元原料药（DMSO 溶解，10.0 mg/kg）组和 Doi-SF-NPs 低、高剂量（5.0、10.0 mg/kg）组，阳性对照组顺铂 3 d 给药 1 次，其他各给药组每天给药 1 次，连续 15 d，每 3 天测量 1 次肿瘤体积。停药第 3 天荷瘤裸鼠 ip 2%戊巴比妥钠（50 mg/kg），麻醉后眼眶取血 1 mL，加入抗凝剂处理，2 500 r/min 离心（离心半径为 6.4 cm）3 min，保存血浆。将裸鼠安乐处死，剥离瘤块，记录质量，计算抑瘤率。同时取出荷瘤裸鼠心、肝、脾、肺、肾组织，备用。

$$\text{抑瘤率} = 1 - \text{给药组平均瘤质量} / \text{模型组平均瘤质量}$$

2.11.2 抑瘤作用实验结果 各组裸鼠肿瘤体积增长情况结果见表 12，各组抑瘤率见表 13，瘤体外观见图 11。模型组由于无药物的治疗作用，随着时间的增加肿瘤体积越来越大。薯蓣皂苷元原料药组肿瘤体积增长有所变缓，说明薯蓣皂苷元具有一定的抑瘤作用，给药剂量为 10.0 mg/kg 时薯蓣皂苷元抑瘤率为 29.47%。与薯蓣皂苷元原料药相比，Doi-SF-

表 12 各组荷瘤裸鼠肿瘤体积变化（ $\bar{x} \pm s, n = 6$ ）

Table 12 Tumor volume changes of tumor-bearing nude mouse in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	肿瘤体积/mm ³					
		0 d	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d
模型	—	151.17±9.39	170.66±12.24	239.32±18.08	521.17±38.39	796.16±56.41	1 227.50±96.46
阳性对照	2.0	152.50±10.99	166.17±14.20	171.66±17.58**	206.16±12.59**	326.83±23.65**	418.33±38.33**
薯蓣皂苷元	10.0	157.60±11.97	178.17±13.54	228.66±19.66	409.34±34.55**	583.83±62.70**	849.17±43.30**
Doi-SF-NPs	5.0	155.66±7.94	170.32±15.79	209.83±16.70*	382.33±42.74***	512.50±34.86***	630.16±42.38***
	10.0	152.33±8.50	167.03±7.69	206.32±12.17*#	331.50±26.81***#	374.82±49.79***#	456.00±27.17***#

与模型组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ ；与薯蓣皂苷元组比较：# $P < 0.05$ ### $P < 0.01$ ；表 12 同。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group; # $P < 0.05$ ### $P < 0.01$ vs diosgenin group; Same as table 12.

表 13 体内抑瘤率结果 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 13 Anti-tumor inhibition rate *in vivo* ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

给药组	剂量/(mg·kg ⁻¹)	瘤质量/g	抑瘤率/%
模型	—	2.07±0.28	—
阳性对照	2.0	0.46±0.27**	77.78
薯蓣皂苷元	10.0	1.46±0.30**	29.47
Doi-SF-NPs	5.0	1.13±0.45***	45.41
	10.0	0.70±0.38***	66.18

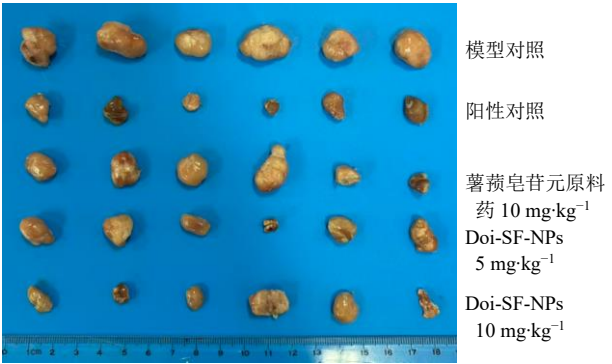


图 11 荷瘤裸鼠的肿瘤外观
Fig. 11 Tumor appearance of tumor-bearing nude mouse

表 14 血液生化指标 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 14 Blood biochemical indexes ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	BUN/(μmol·L ⁻¹)	肌酐/(μmol·L ⁻¹)
正常	—	47.67±5.54	98.17±12.99	7.33±1.97	105.67±14.50
正常裸鼠+Doi-SF-NPs 高剂量	10.0	49.16±7.25	104.50±13.74	7.71±1.88	108.75±15.38
模型	—	68.50±7.23**	172.17±11.46**	14.66±2.50**	155.17±7.44**
阳性对照	2.0	73.33±6.53	183.50±16.79#	17.17±2.93##	158.50±8.31
薯蓣皂苷元	10.0	55.17±6.49##	126.67±14.94##	8.16±1.94##	114.33±14.99##
Doi-SF-NPs	5.0	54.33±7.63##	128.83±11.87##	8.33±3.01##	108.16±16.92##
	10.0	54.50±5.96##	118.33±16.38##	7.50±2.43##	112.33±7.74##

与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。
** $P < 0.01$ vs normal group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group.

极显著性升高 ($P < 0.01$), 说明模型组裸鼠肝、肾功能受损严重。与模型组相比, 阳性对照组 AST 显著性升高 ($P < 0.05$), BUN 极显著性升高 ($P < 0.01$), 说明顺铂加重了肝、肾损伤^[22-23]; 薯蓣皂苷元组和 Doi-SF-NPs 低、高剂量组 ALT、AST、BUN 和肌酐均极显著性下降 ($P < 0.01$), 说明荷瘤裸鼠肝、肾损伤得到明显缓解, 主要与薯蓣皂苷元具有明显的肝、肾功能修复作用有关^[24-25]。

2.12.2 组织 HE 染色 分别取出正常组、正常裸鼠+Doi-SF-NPs 高剂量组、模型组、阳性对照组、薯蓣皂苷元组和 Doi-SF-NPs 高剂量组荷瘤裸鼠肺脏、肝脏、脾脏、肾脏和心脏, 并进行 HE 染色病理切片, 结果见图 12。与正常组相比, 模型组和阳

性对照组的各脏器均有不同程度损伤, 炎症浸润现象明显; 而薯蓣皂苷元组和 Doi-SF-NPs 高剂量组各脏器病理结构正常, 未见炎症浸润现象, 说明薯蓣皂苷元及 Doi-SF-NPs 安全性高于顺铂。

NP 低剂量组肿瘤体积增长趋势进一步变缓, 给药第 9 天后肿瘤体积存在显著性 ($P < 0.05$), 第 15 天肿瘤体积存在极显著性差异 ($P < 0.01$), 抑瘤率提高至 45.41%。Doi-SF-NPs 高剂量组给药第 6 天后肿瘤体积存在显著性 ($P < 0.05$), 第 9 天后肿瘤体积存在极显著性差异 ($P < 0.01$), 抑瘤率进一步提高至 66.18%。

2.12 安全性评价

2.12.1 血液生化指标的检测 为便于评价安全性, 另外设置了正常组和正常裸鼠+Doi-SF-NPs 高剂量 (10.0 mg/kg) 组, 每组 6 只, 按照 “2.11.1” 项下同法取血, 并制备血浆。将血浆经 3 500 r/min 离心 (离心半径为 6.4 cm) 15 min, 取上清测定 ALT 和 AST, 观察对肝功能的影响; 测定 BUN 和肌酐, 观察对肾功能的影响, 结果见表 14。

与正常组相比, 正常组+Doi-SF-NPs 高剂量组 ALT、AST、BUN 和肌酐均出现一定程度升高, 无显著性差异 ($P > 0.05$), 说明 Doi-SF-NPs 未显著影响肝、肾功能; 模型组 ALT、AST、BUN 和肌酐均

与正常组相比, 正常组+Doi-SF-NPs 高剂量组 ALT、AST、BUN 和肌酐均出现一定程度升高, 无显著性差异 ($P > 0.05$), 说明 Doi-SF-NPs 未显著影响肝、肾功能; 模型组 ALT、AST、BUN 和肌酐均

3 讨论

丝素蛋白优异的生物降解性及生物相容性, 使之成为纳米递药系统的理想载体材料, 安全性高于化学合成类高分子化合物载体^[8]。丝素蛋白纳米粒的形成过程实质是丝素蛋白从不稳定的无规卷曲结构 (即 Silk I 构象) 自组装聚集形成稳定的反平行 β -折叠结构 (即 Silk II) 的过程^[10], 在丝素蛋白结构转变的过程中酰胺、羟基、羧基等活泼基团暴露出来, 并与药物分子结构上活泼基团通过氢键、

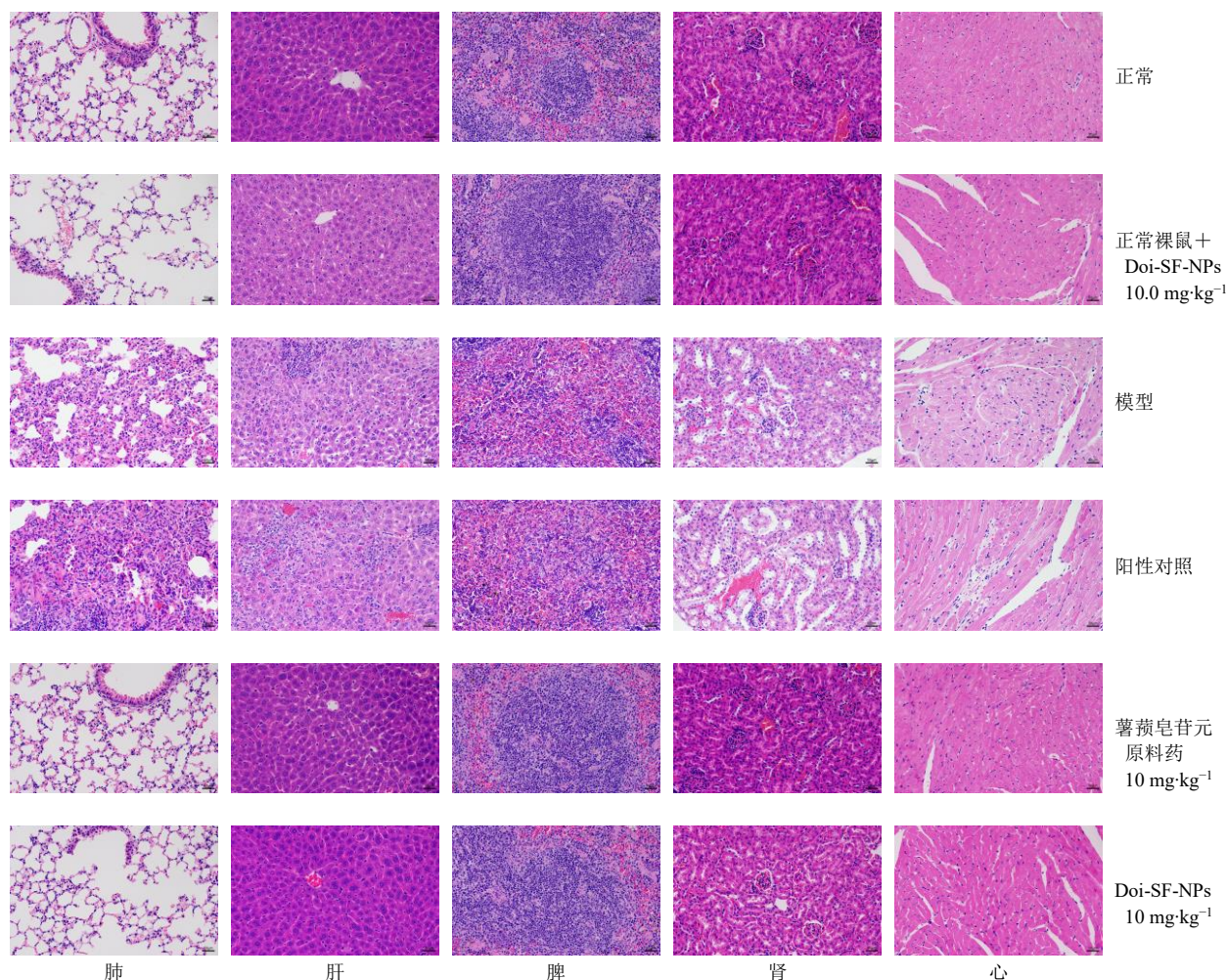


图 12 各组裸鼠重要器官切片的 HE 染色 (×200)

Fig. 12 HE staining of important organ sections from nude mice in each group (× 200)

电荷传递、范德华力等结合在一起,从而使药物包裹于丝素蛋白纳米粒内部^[13],也为提高药物在体内稳定性、控制药物释放等奠定了基础。单因素实验确定丝素蛋白与薯蓣皂苷元用量比、有机相与水相体积比和制备时间是 Doi-SF-NPs 主要影响因素,通过设计 BBD-RSM 优化了 Doi-SF-NPs 处方工艺。最佳处方工艺制备 Doi-SF-NPs 包封率大于 80%,且 Doi-SF-NPs 冻干粉在-10℃冰箱 6 个月后包封率仍未低于 80%,符合《中国药典》2025 年版对微粒制剂包封率的要求。

本研究使用平均截留相对分子质量为 8 000 的透析袋进行了研究,为使薯蓣皂苷元达到漏槽条件,故在介质中加入了 1% SDS,由于 SDS 形成胶束的相对分子质量远大于 8 000,所以胶束无法进入透析袋内部,从而防止了 SDS 形成的胶束对 Doi-SF-NPs 结构的影响。体外释药结果显示,薯蓣皂苷元在不同 pH 值介质中释药行为无明显差异,而 Doi-

SF-NPs 在 pH 5.5、6.0 PBS 介质中释药速率和累积释放率明显高于 pH 6.8、7.4 PBS 介质,证明 Doi-SF-NPs 具有良好的 pH 值敏感性。这是由于 Doi-SF-NPs 中丝素蛋白是以 β -折叠为主的 Silk II 构象存在,这种构象在弱酸性环境稳定性差^[15],Doi-SF-NPs 结构破坏后留下释药通道,利于薯蓣皂苷元定位释放,从而表现出 pH 值敏感特点,可使药物最大程度聚集于弱酸性的肿瘤部位,从而增强抗肿瘤药效。

以薯蓣皂苷元注射液为参考,比较了 Doi-SF-NPs 注射后在肿瘤组织中薯蓣皂苷元的蓄积情况。结果发现,Doi-SF-NPs 各时间点的薯蓣皂苷元浓度均极显著性高于薯蓣皂苷元注射液 ($P<0.01$),且 Doi-SF-NPs 相对摄取率和峰浓度比值得到明显提高(均大于 1),证明 Doi-SF-NPs 能明显增加薯蓣皂苷元在肿瘤组织中的蓄积量。可能是由于 Doi-SF-NPs 中载体材料丝素蛋白对 pH 值、溶酶体酶、谷

胱甘肽及活性氧具有选择性响应特点^[15], 导致丝素蛋白快速降解及 Doi-SF-NPs 结构破坏, 极大降低了释药阻力, 利于使薯蓣皂苷元在肿瘤部位定位释药, 从而提高了薯蓣皂苷元的肿瘤靶向性, 为增强抗肿瘤药效奠定基础^[26]。

空白丝素蛋白纳米粒具有优异的细胞相容性, 不会影响影响细胞增殖^[15], 不会引起非特异性免疫反应及炎症^[13], 表明丝素蛋白纳米粒安全性良好, 所以在体内外抗肿瘤实验中未设置空白丝素蛋白纳米粒组。阳性对照组荷瘤裸鼠的 AST 和 BUN 发生显著性或极显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 说明顺铂对机体具有毒副作用, 主要与顺铂自身毒性及体内肿瘤靶向性较差等原因有关^[21]。薯蓣皂苷元和 Doi-SF-NPs 未表现出明显的毒性反应, 主要与薯蓣皂苷元本身毒性很小有关, 而且薯蓣皂苷元对肝肾功能损伤具有修复作用^[24-25], 因此 Doi-SF-NPs 比顺铂临床推广意义更大。薯蓣皂苷元对前列腺癌荷瘤裸鼠瘤体的抑制作用相对较弱, 说明薯蓣皂苷元抗肿瘤药效未能充分发挥。与薯蓣皂苷元相比, Doi-SF-NPs 显著提高了薯蓣皂苷元抗肿瘤药效, 可能是由于 Doi-SF-NPs 粒径小于 200 nm, 通过肿瘤组织高通透性和滞留效应(EPR 效应)在实体肿瘤中蓄积^[27], 从而利于增强药效; Doi-SF-NPs 通过对 pH 值、溶酶体酶、谷胱甘肽及活性氧的选择性响应进一步提高了薯蓣皂苷元在肿瘤组织中的蓄积量^[28-29], 增强了肿瘤靶向性。

李春晓^[7]分别将玉树皂苷元制备成纳米偶联物、自组装纳米粒、纳米复合物等, 但这些纳米制剂的 pH 值敏感性较差, 可能影响薯蓣皂苷元体内靶向递药, 而且在体内抗肿瘤药效试验过程中出现动物死亡现象, 说明这些纳米制剂存在一定毒性。本研究报道的 Doi-SF-NPs 体外显示出良好的 pH 值敏感性及肿瘤靶向性, 且 Doi-SF-NPs 未对肺脏、肝脏、脾脏、肾脏及心脏产生明显损伤, 表明安全性良好。本研究采用皮下肿瘤模型进行了初步的肿瘤靶向、体内抗肿瘤药效等研究, 但皮下肿瘤模型在支持间质、血管性质等方面与原位肿瘤模型存在较大差异^[30], 故本研究存在一定的局限性, 后续还需借助原位肿瘤模型进行深入研究。

综上, 本研究采用单因素结合 BBD-RSM 筛选出 Doi-SF-NPs 最佳处方工艺, 包封率大于 80%。丝素蛋白和薯蓣皂苷元, 可能以氢键结合在一起形成 Doi-SF-NPs, 改变了薯蓣皂苷元晶型, 提高了累积

释放度, 释药行为表现出 pH 值敏感性特点。通过动物模型验证了 Doi-SF-NPs 具有体内肿瘤靶向富集作用, 提高了薯蓣皂苷元体内抗肿瘤药效, 且使用安全性较高, 因此, Doi-SF-NPs 有望作为抗肿瘤药物应用于前列腺癌的治疗。

将来继续对 Doi-SF-NPs 注射药动力学、组织分布、抗肿瘤机制等进行考察, 进一步丰富研究数据。丝素蛋白结构上含有羟基、氨基、羧基和二硫键等基团, 为 Doi-SF-NPs 表面改造和修饰提供了基础, 后续也将作进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 郑倩倩, 陈璐瑶, 汪涛. 中药有效成分防治前列腺癌的研究进展 [J]. 西部中医药, 2024, 37(7): 83-87.
- [2] 赵朋, 杨拓, 王金铸, 等. 根皮素通过抑制 PDK1-p-PDHA1 轴影响谷氨酰胺代谢介导的前列腺癌研究 [J]. 中草药, 2025, 56(4): 1254-1265.
- [3] 邸一然, 李宵颖, 李宁, 等. 天然产物靶向 AR-铁死亡轴: 抵抗前列腺癌耐药新策略 [J]. 药物评价研究, 2026, 49(2): 693-704.
- [4] Figueira M I, Marques R, Cardoso H J, *et al.* Effect of diosgenin in suppressing viability and promoting apoptosis of human prostate cancer cells: An interplay with the G protein-coupled oestrogen receptor? [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(22): 12006.
- [5] 张锦. 薯蓣皂苷元调控 NEDD4 蛋白表达抑制前列腺癌细胞增殖和迁移的作用及机制研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2021.
- [6] 董亚楠, 柳超, 董姣姣, 等. 薯蓣皂苷元白蛋白纳米粒制备及其体内药动力学研究 [J]. 中成药, 2023, 45(7): 2110-2116.
- [7] 李春晓. 基于薯蓣皂苷元的纳米药物载体构建及性能研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2019.
- [8] 吕小改, 张攀, 李梦, 等. 葡聚糖涂层的芹菜素-玉米醇溶蛋白纳米复合物的制备及理化性质评价 [J]. 化学研究与应用, 2025, 37(10): 2965-2976.
- [9] 尹元元, 耿燕娜, 孙晋鹏, 等. 异甘草素-玉米肽纳米复合物分子模拟对接、制备及体内外评价 [J]. 中草药, 2025, 56(21): 7749-7761.
- [10] 汪芸萱, 应勇, 黄丽, 等. 蚕丝蛋白的体外自组装动力学行为研究 [J]. 广州化工, 2024, 52(23): 25-27.
- [11] Zhang H F, Wang Q H, Wang S D, *et al.* pH-sensitive silk fibroin nanoparticles encapsulating β -hydroxyisovalerylshikonin for targeted pancreatic cancer therapy [J]. *Curr Drug Deliv*, 2025, 22(10): 1469-1480.
- [12] Kunjiappan S, Sankaranarayanan M, Parasuraman P. Sialic

- acid-receptor targeted epirubicin and naringin-loaded sialic acid-conjugated silk fibroin nanoparticles for enhanced lung cancer treatment [J]. *J Polym Environ*, 2026, 34(4): 92.
- [13] Chen B Q, Kankala R K, He G Y, *et al*. Supercritical fluid-assisted fabrication of indocyanine green-encapsulated silk fibroin nanoparticles for dual-triggered cancer therapy [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2018, 4(10): 3487-3497.
- [14] 刘章会, 刘燕, 陈媛媛, 等. 丝素蛋白纳米颗粒的制备及其在食品领域的应用 [J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(14): 334-341.
- [15] 闫羽, 程佳玲, 刘子晗, 等. 丝素蛋白自组装纳米粒的制备、理化表征及细胞相容性研究 [J]. 药学学报, 2023, 58(12): 3715-3721.
- [16] 王涛丽, 张广辉, 张莉, 等. 负载二氢杨梅素 ZIF-8 纳米粒的制备、表征及抗肿瘤评价 [J]. 药物评价研究, 2025, 48(5): 1224-1235.
- [17] 程亚青, 刘爱萍, 李佟, 等. 负载水飞蓟宾的 UCNP-mSiO₂ 的合成、表征及其抗肿瘤性能 [J]. 化学试剂, 2024, 46(10): 7-13.
- [18] 王立红, 吴文丽, 罗永明, 等. 白藜芦醇温敏型凝胶剂的制备及抗膀胱癌细胞研究 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(10): 2334-2342.
- [19] 牛俊豪, 张君. 隐丹参酮调节 TGF- β 1/Smad3 介导的上皮间质转化对抑制前列腺癌小鼠肿瘤生长的影响 [J]. 实用癌症杂志, 2023, 38(4): 529-533.
- [20] 王舒雨, 睢超霞, 王俊巍, 等. 薯蓣皂苷元的抗肿瘤药效学研究 [J]. 河南预防医学杂志, 2021, 32(10): 785-788.
- [21] 田莉, 潘思影, 董晓函, 等. 负载异鼠李素的 ZIF-8 纳米粒的构建、表征及对肺癌荷瘤小鼠的抗肿瘤作用研究 [J]. 中草药, 2025, 56(19): 7040-7054.
- [22] 张景富, 肖雨, 何继江, 等. 原儿茶醛对环磷酰胺诱导急性肾损伤的保护作用及机制研究 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(6): 1217-1223.
- [23] 薛晓菲, 李会晓, 詹丽倩, 等. 半乳糖修饰 pH 敏感型青蒿琥酯纳米囊泡的制备、组织分布与抗肿瘤评价 [J]. 药物评价研究, 2025, 48(9): 2579-2591.
- [24] 路琪, 李菲菲, 孙虹燕. 薯蓣皂苷对糖尿病肾病大鼠 TLR4/NF- κ B/TNF- α 通路及肾间质淋巴细胞浸润的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(7): 816-821.
- [25] 吴林菁, 杨伦智, 杜强, 等. 网络药理学及动物实验探究黄精水提物抗高尿酸血症的药效物质基础及作用机制 [J]. 药物评价研究, 2026, 49(2): 526-536.
- [26] 林舒婷, 尹东阁, 朱荣玥, 等. 基于金属有机骨架材料 IRMOF-10 的重楼皂苷 VII 靶向纳米粒制备、表征及抗三阴性乳腺癌药效评价 [J]. 中草药, 2026, 57(6): 2060-2074.
- [27] 耿玉茹, 吴悦, 张欣茹, 等. 顺铂长循环脂质体的制备及其在小鼠体内抗肿瘤效果的研究 [J]. 中国药剂学杂志: 网络版, 2026, 24(1): 48-62.
- [28] 宫正, 王磊, 樊成武, 等. 牛角瓜强心苷成分的抗肿瘤活性研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2025, 37(2): 271-277.
- [29] 高娟, 李伟宏, 李秀芬, 等. pH 敏感/叶酸修饰白藜芦醇脂质体的制备、表征及对子宫内癌荷瘤小鼠肿瘤的抑制作用 [J]. 中草药, 2025, 56(20): 7368-7383.
- [30] 应卓鹏, 方贾栩, 杨小红, 等. 无需缝合外科嵌入式小鼠原位肝癌肿瘤模型的复制及应用价值 [J]. 中国现代医学杂志, 2024, 34(16): 26-32.

[责任编辑 郑礼胜]