

新型酶响应型水凝胶合成及其在预防三阴性乳腺癌术后复发研究

付之光¹, 陶成², 王宇¹, 温宁^{3*}, 胡琳^{4*}

1. 空军特色医学中心, 北京 100142
2. 北京化工大学化学工程学院, 北京 100029
3. 中国人民解放军总医院第一医学中心, 北京 100853
4. 首都医科大学附属北京朝阳医院, 北京 100020

摘要 应用溶剂—反溶剂法制备舒尼替尼纳米粒, 通过迈克尔加成反应将药物装载入水凝胶, 即合成新型酶响应型舒尼替尼纳米粒水凝胶; 通过扫描电镜、粒径分析、药物溶出率计算等方法对新材料进行鉴定和表征; 进一步体内外功能试验评估该材料的抗肿瘤及防复发作用; 最后对该材料进行初步安全性评价。实验结果表明, 实现了酶响应型舒尼替尼纳米粒水凝胶的成功制备, 舒尼替尼纳米粒在水凝胶中分布均匀, 粒径约 400 nm, 稳定性良好; 新材料表现出优异的控缓释作用, 在体外抑制肿瘤细胞及血管内皮细胞活性, 在体内促进小鼠肿瘤细胞凋亡、阻抑肿瘤复发; 局部给药过程中, 小鼠耐受性良好, 新材料无明显毒副作用。

关键词 酶响应型水凝胶; 舒尼替尼纳米粒; 三阴性乳腺癌; 术后复发

三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)是特指雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)和人类表皮生长因子受体-2(human epidermal growth factor-2, HER-2)表达阴性的一种乳腺癌。与其他类型乳腺癌相比, TNBC 侵袭性高、预后差, 约 46% TNBC 患者术后复发, 复发后中位生存期仅 13.3 个月, 现

有预防和姑息治疗措施效果不佳, 严重威胁女性生命健康, 因此亟待探索预防 TNBC 术后复发, 改善预后的新策略^[1-2]。近年来, 材料学与医学交叉融合, 以水凝胶为代表的高分子材料成为研究热点, 酶响应型水凝胶则是在载体结构网中加入酯或肽键, 使其可被特定的酶切割, 实现药物的“精准”递送^[3]。本课题组前期成功制备了基质金属蛋白酶

收稿日期: 2022-04-15; 修回日期: 2022-07-13

作者简介: 付之光, 博士, 研究方向为抗肿瘤生物医用材料, 电子信箱: xiaochuan8668@126.com; 温宁(通信作者), 教授, 研究方向为抗肿瘤生物医用材料, 电子信箱: weningchn@163.com; 胡琳(通信作者), 博士, 研究方向为抗肿瘤生物医用材料, 电子信箱: huling0210@126.com

引用格式: 付之光, 陶成, 王宇, 等. 新型酶响应型水凝胶合成及其在预防三阴性乳腺癌术后复发研究[J]. 科技导报, 2022, 40(22): 97-104; doi: 10.3981/j.issn.1000-7857.2022.22.010

响应型水凝胶(matrix metalloproteinase response hydrogel, MRH), 以此为载体, 装载吡咯菁绿和阿霉素, 实现了口腔鳞癌的光化联合治疗^[4]。舒尼替尼是一种多靶点的抗血管生成药物, 临床中可用于多种实体瘤的治疗, 对肿瘤的复发有显著抑制作用^[5]。本研究在此基础上, 继续探索MRH的生物医用功效, 首次装载舒尼替尼纳米粒(sunitinib nanoparticles, nano-su), 合成新型纳米载药系统——酶响应型舒尼替尼纳米粒水凝胶(sunitinib nanoparticles @ matrix metalloproteinase-response hydrogel, NSMRH), 通过体内外试验对NSMRH进行理化性能表征与鉴定, 证实了其良好的抑制肿瘤细胞活性及抵抗肿瘤复发的作用, 同时评估了其可靠的生物安全性, 为早期三阴性乳腺癌术后复发的防治提供新的思路。

1 实验过程

1.1 材料

人三阴性乳腺癌细胞(MDA-MB-231)购自美国ATCC公司; 胎牛血清购自Gibco公司; 苹果酸舒尼替尼(Sunitinib)购自aladdin公司; 基质金属蛋白酶多肽交联剂HS-MMP-SH购自JenKem Technology公司; 聚乙二醇购自Sigma公司(7181, CAS: 25322-68-3); 透明质酸(HA)购自Bloomage Freda公司。

1.2 方法

1.2.1 聚乳酸-聚乙二醇-聚乳酸(PDLLA-PEG-PDLLA)的合成

30 g 聚乙二醇(分子量 9-10 kDa)与 10 g D, L-丙交酯(分子量 144 Da)加入到圆底烧瓶中, 在 110℃下抽真空 6 h 除去水分, 然后向圆底烧瓶中通入氩气排出氧气, 并在氩气保护下加入一定质量的催化剂辛酸亚锡, 待搅拌混合好后, 温度调整为 135℃反应 24 h。将反应产物用二氯甲烷全部溶解后, 用正戊烷沉降, 反复进行 3 次, 对聚合物进行纯化, 除去未反应的单体和催化剂; 最终产品真空干燥, 得到 PDLLA-PEG-PDLLA 聚合物。

1.2.2 丙烯酸酯基透明质酸(HA-AC)的合成

4.0 g(20 mmol)催化剂 EDC 存在下, 透明质酸

(2.0 g, 50 kDa, 含有 5.28 mmol 羧基)与 25.0 g(143.5 mmol)的己二酸二酰肼(ADH)在 pH=4.75 的水中反应, 室温过夜。反应结束后在超纯水中透析(MWCO=8000 Da)纯化 5 d。将纯化的中间产物(HA-ADH)冻干并在 -20℃下储存待用。准确称量 2.0 g 的 HA-ADH 与 N-丙烯酰氧基琥珀酰亚胺(NHS-Ac)(1.40 g, 8.28 mmol)在 HEPES 缓冲液(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH=7.2)中反应, 室温过夜, 然后在超纯水中透析(MWCO = 8000 Da)3~4 d, 冻干并在 -20℃下储存待用。

1.2.3 液相反溶剂沉淀法制备舒尼替尼纳米粒

称取 20 mg 的舒尼替尼粉末, 在室温下, 将其溶于 1 mL 的 DMSO 中, 记为药物溶液。分别按照舒尼替尼与 PDLLA-PEG-PDLLA 的质量比 1/0、1/10、1/20 和 1/50 将 0、200、400、和 1000 mg 的 PDLLA-PEG-PDLLA 充分溶解于 PBS(150 mM, pH=7.4, 室温)中, 得到 4 份含有 PDLLA-PEG-PDLLA 的聚合物溶液作为反溶剂相。以药物溶液与反溶剂 1/20 的比例将药物溶液快速加入反溶剂中, 磁力搅拌 30 min, 记为混合液。混合液用超纯水透析(MWCO=3500, 4℃), 透析后冷冻干燥即得到舒尼替尼纳米粒(nano-su)。

1.2.4 酶响应型舒尼替尼纳米粒水凝胶(NSMRH)的合成与表征

在室温条件下, 将 50 mg/mL nano-su 冻干品加入 PBS 中超声震荡, 然后用 nano-su 溶液溶解聚合物 HA-AC, 再用 TEA 缓冲液溶解具有 MMP-2 响应的巯基化交联剂 HS-MMP-SH(浓度 100 mg/mL), 以 3/2 体积比混合后形成 NSMRH。通过扫描电镜、稳定性检测等方法对新材料进行鉴定和表征。

1.2.5 体外药物溶出试验

在室温条件下, 首先利用紫外-可见分光光度计(UV-vis)测定拟合得到 sunitinib 的标准曲线($Y=0.0624 \cdot X-0.02898, R^2=0.99934$)。称取一定量的 nano-su 冻干品, 加入 PBS(5 mL, pH=7.4)中超声震荡 30 min 后置于透析袋(MWCO=3500 Da)中, 绑紧后置入盛有 20 mL PBS(pH=7.4)的瓶中, 37℃水浴。实验组 PBS 中加入 1.5 μg/mL MMP-2 酶的新鲜 PBS(pH=7.4, 3 mL)。定时从瓶中取出待测样品(3 mL), 并补充新鲜 PBS(pH=7.4, 3 mL)。测得待

测样品的吸光值 Abs, 根据标准曲线的方程式计算出待测样品的浓度, 测得释放第 i 天的 nano-su 浓度记作 C_i , 质量为 W_i , 释放前浓度记作 C_0 , 质量为 W_0 , 计算累积释放溶出率 = $\sum W_i / W_0 \times 100\%$ 。比较组间药物累积溶出率。

1.2.6 体外细胞存活率检测

分别通过 MTT 法及活细胞/死细胞双染试剂盒 (Calcein-AM/PI) 检测 NSMRH 对 MDA-MB-231 细胞存活的影响。(1) 将生长状态良好的 MDA-MB-231 细胞 (4×10^3 个/孔) 铺于 96 孔板中, 待细胞贴壁后, 加入 NSMRH (浓度 0、12.5、25、50 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。48 h 后移除孔中的含药培养液, 再加入含有 5 mg/mL MTT 的 100 μL DMEM 的混合物。4 h 后孔内换为 100 μL 的 DMSO。检测各孔 570 nm 处的 OD 值, 绘制浓度-存活率曲线 (细胞存活率% = 实验组 (OD₅₇₀)/空白组 (OD₅₇₀))。(2) 将生长状态良好的 MDA-MB-231 细胞铺于 6 孔板中, 培养约 12 h 后, 加药处理 (NSMRH 最终浓度是 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 继续孵育 48 h。将 5 μL calcein AM、15 μL PI 与 DMEM (1 mL) 混匀后, 每孔加 100 μL , 30 min 后孔中换成 80 μL DMEM 再检测 (Calcein AM: 495/515 nm, PI: 535/617 nm) 激光共聚焦拍照。(3) 通过 AlamarBlue 法检测 NSMRH 对人脐静脉内皮细胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC) 存活影响。将生长状态良好的 HUVEC 细胞铺于 96 孔板中, 培养约 12 h 后, 加入不同浓度 NSMRH, 加药处理后细胞继续孵育 48 h, 然后孔中换成 100 μL 新鲜的 DMEM, 再加入 10 μL 的 AlamarBlue。4 h 后, 检测各孔在 570 nm 和 600 nm 处的 OD 值, 绘制 SUN 浓度-存活率曲线 (细胞存活率% = 实验组 (OD₅₇₀-OD₆₀₀)/空白组 (OD₅₇₀-OD₆₀₀))。

1.2.7 NSMRH 预防术后复发的体内试验及

安全性评价

将含有 GFP 标签的 MDA-MB-231 细胞接种于雌性 BALB/c 裸鼠皮下 (2×10^6 cells/100 μL)。当小鼠皮下肿瘤生长至 150 mm³ 时, 开始进行实验, 将 12 只荷载乳腺癌肿瘤的雌性 BALB/c 裸鼠分成 3 组, 每组 4 只, 分别为 PBS 组、sunitinib 组和 NSMRH 组。切除各只小鼠荷载的肿瘤体积的 2/3, 并在其

局部注射 NSMRH, 浓度为 10 mg/kg, 200 μL , 最后将小鼠皮肤缝合好。利用小动物活体光学成像系统 (IVIS) 评测乳腺癌小鼠模型术后复发的情况。在观察期间, 动物死亡或者瘤体生长至 1000 mm³ 时即可认为动物因肿瘤死亡, 记录死亡时间, 测量肿瘤体积。取复发肿瘤组织, 行免疫荧光 TUNNEL 染色、CD31 蛋白染色, 以及 Caspase-3 蛋白染色, 评价 NSMRH 对血管生成以及肿瘤凋亡的影响。通过动态记录实验动物一般意识状态、体重, 对肿瘤及重要脏器行苏木精-伊红 (H&E) 染色, 评估 NSMRH 局部用药的耐受性与安全性。

1.3 统计学分析

所有实验均行 3 次独立重复试验, 结果均采用均数 (\bar{x}) \pm 标准差 (SD), 使用 GraphPad Prism 7.0 进行统计分析。两组比较采用 t 检验, 3 组及以上比较采用 one-way anova 检验, $P < 0.05$ 被认为是有统计学差异 (*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$, ***表示 $P < 0.001$)。

2 结果与分析

2.1 NSMRH 的合成及表征

成功制备酶响应型舒尼替尼纳米粒水凝胶 (NSMRH), 其合成示意图如图 1(a) 所示。该载药水凝胶呈黄色, 电镜显示形貌良好, 状态稳定 (图 1(b) 和图 1(c))。舒尼替尼纳米粒在水凝胶中分布均匀, 其粒径大小在 400 nm 左右 (图 1(d) 和图 1(e))。稳定性试验结果显示 (图 1(f)), NSMRH 放置 1 周后, 在 30 d 内, 其 nano-su 粒径大小保持稳定, 表明 NSMRH 具备良好的稳定性能。药物溶出试验提示 (图 1(g)), NSMRH 中 nano-su 在 24 h 后, 呈现稳定缓释, 观察至 72 h 左右, 其释放效率基本保持不变。当溶液中加入 MMP-2 时, 可观察到 nano-su 释放效率明显增加, 这可能是由于 MMP-2 与水凝胶表面的酶响应肽链反应, 加速了 NSMRH 的降解及药物的释放。因此, 我们得到了一个性能稳定, 缓控释良好, 且具有特异性 MMP-2 响应型新材料 NSMRH。

2.2 NSMRH 在体外影响细胞存活能力研究

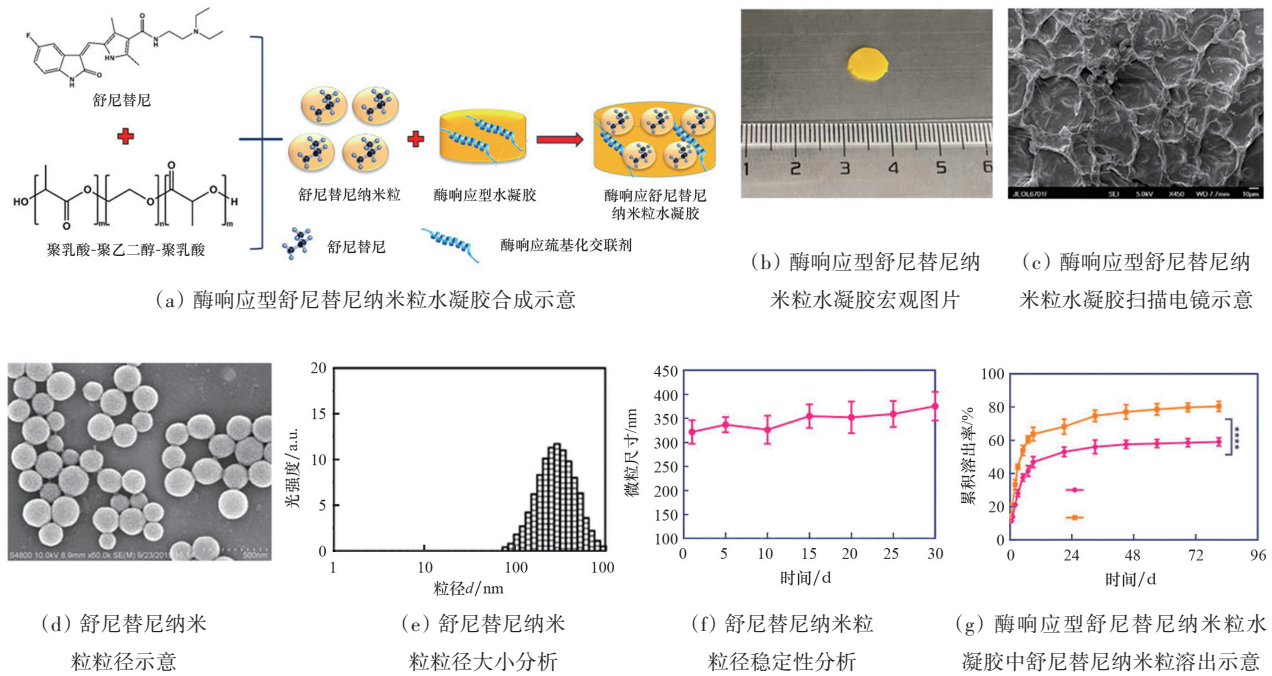


图1 酶响应型舒尼替尼纳米粒水凝胶的合成与表征

体外细胞存活实验中,首先通过MTT法检测NSMRH对三阴性乳腺癌细胞MDA-MB-231存活能力的影响,如图2(a)所示,无论是舒尼替尼组还

是NSMRH组,均对细胞存活有明显的浓度梯度依赖性抑制作用,当舒尼替尼浓度达到50 μg/mL后,细胞存活率保持在20%左右。进一步应用活细胞/

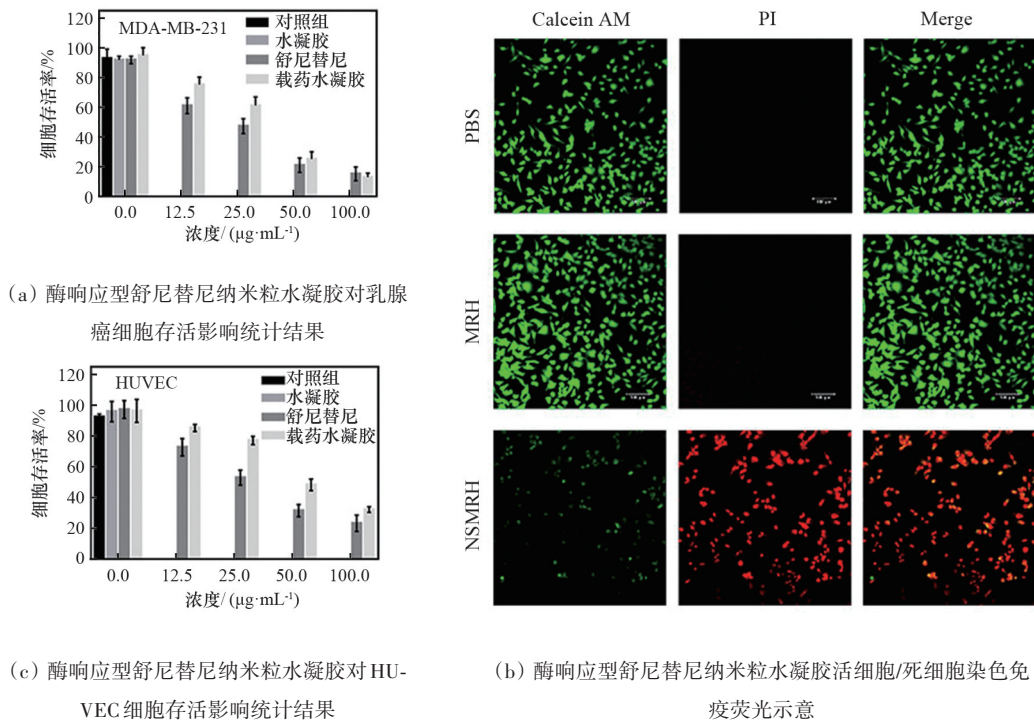


图2 酶响应型舒尼替尼纳米粒水凝胶在体外对细胞存活影响

死细胞免疫荧光染色对上述结论进行验证(图2(b)),发现50 $\mu\text{g/mL}$ NSMRH能够显著诱导MDA-MB-231细胞死亡,该实验表明NSMRH对肿瘤细胞存活能力的影响,主要来自于其杀伤肿瘤效应,而非抑制增殖能力。考虑到舒尼替尼是一个血管生成因子抑制剂,因此进一步评估NSMRH能否抑制血管内皮细胞的活性。图2(c)结果表明,与MDA-MB-231细胞类似,NSMRH可以显著抑制人脐静脉内皮细胞HUVEC的增殖,且该抑制作用呈现浓度梯度依赖性。值得注意的是,在对照组中,发现未载药水凝胶组(MRH)对2种细胞存活能力均无明显抑制作用,提示该材料在体外细胞水平毒性较弱。以上试验均表明,NSMRH在体外能够显著抑制肿瘤细胞及血管内皮细胞的活性。

2.3 NSMRH体内预防局部复发研究

建立裸鼠移植瘤切除后复发模型。选择能够表达GFP绿色荧光蛋白的MDA-MB-231细胞,对雌性BALB/c裸鼠进行接种,得到荷瘤裸鼠模型。当移植瘤生长至150 mm^3 大小时,对其进行部分切

除,在创面进行NSMRH及相关对照组干预,最后将小鼠伤口消毒缝合,观察复发情况。动物实验结果表明,与对照组相比,单纯舒尼替尼组及NSMRH组均能够有效抑制残留肿瘤组织再生,然而随着时间的延长,NSMRH组展现出更为显著的抑制复发能力(图3(a)和3(c))。在实验终点,对瘤体组织进行免疫组化染色,发现NSMRH组凋亡相关标志分子Tunnel和Caspase-3的表达较对照组显著增加,血管内皮标志物分子CD31的表达较对照组显著减少(图3(b)、3(d)和3(f)),提示NSMRH可通过促进肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤新生血管组抑乳腺癌术后复发。

2.4 NSMRH生物安全性评价

初步评估了NSMRH在体内的生物安全性。如图4(a)所示,在荷瘤裸鼠模型给药过程中,定期监测小鼠一般状态及体重变化,发现局部给药后30 d左右,小鼠耐受性良好,体重波动范围不大,未发生明显不良反应事件。对小鼠主要器官H&E染色分析(图4(b)),主要器官(包括脑、心脏、肝脏、

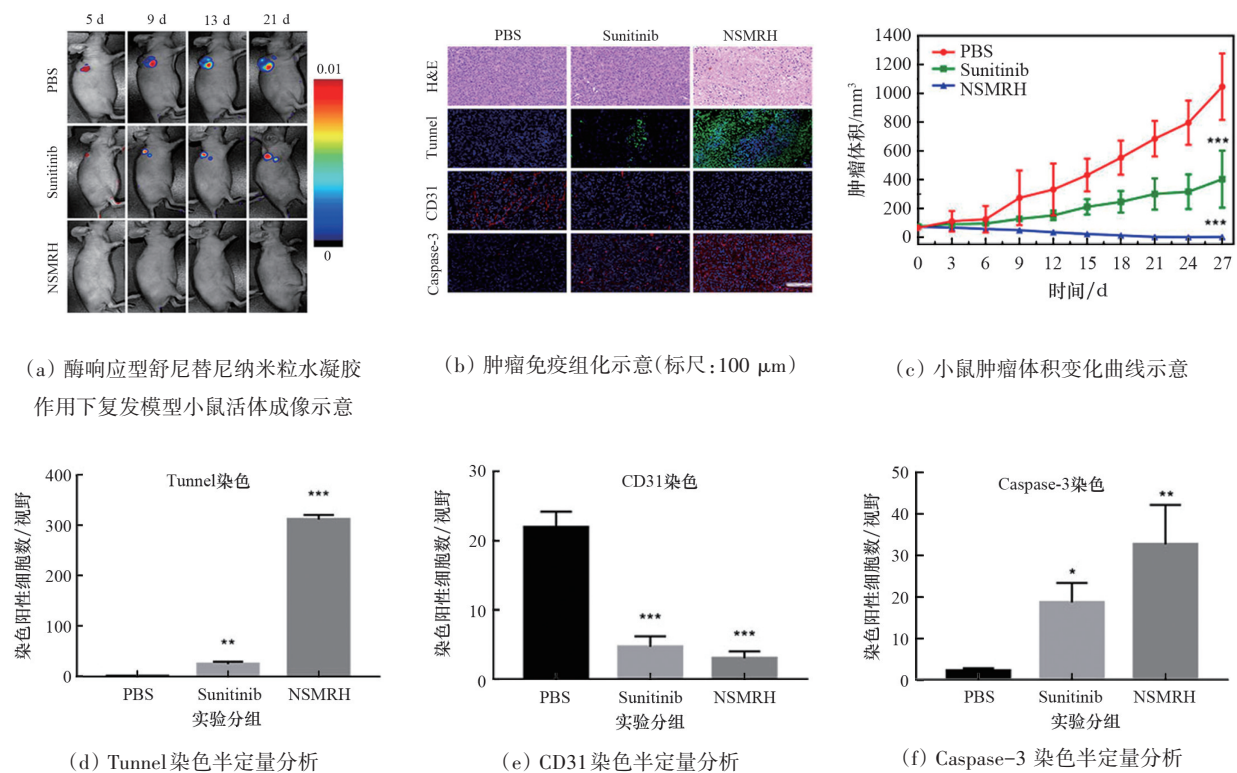
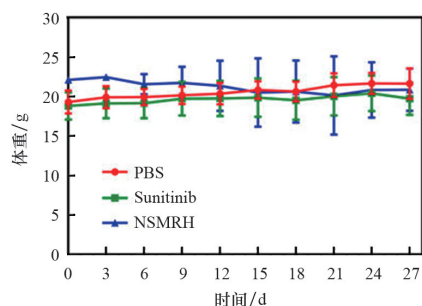


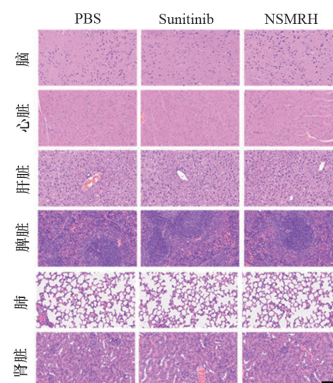
图3 酶响应型舒尼替尼纳米粒水凝胶体内预防复发研究

脾脏、肺和肾)中组织结构未见明显异常,各组间无显著差异。因此,本研究 NSMRH 生物安全性良

好,小鼠耐受程度可。



(a) 小鼠体重变化曲线示意



(b) 小鼠重要脏器H&E染色示意(标尺为100 μm)

图4 酶响应型舒尼替尼纳米粒水凝胶安全性评价

3 结果与讨论

三阴性乳腺癌(TNBC)占全部乳腺癌的10%~29%^[6-8],即便是早期患者,仍有复发风险,大多数死亡发生在治疗后5年内^[9]。初诊分期I、II和III期的TNBC患者3年复发率分别为8%、15%和40%^[10]。因此,如何减少和延缓早期患者复发至关重要。

水凝胶是由亲水性聚合物链交联而成的高分子聚合物^[11-12]。通常情况下,凝胶可由藻酸盐等天然聚合物或聚乙二醇等聚合物制备而成。三维结构水凝胶因具有良好的包封细胞和生物活性分子的能力,被广泛当作理想的药物缓释及靶向递送材料^[13-14]。与其他材料相比,水凝胶凭借其更加稳定的生物相容性、可注射性以及缓控释性能,在药物局部递送研究中占据重要位置^[15]。酶响应型水凝胶可以根据肿瘤微环境中酶的特异性,释放搭载药物,对毒性较强的药物及半衰期短的药物来说意义重大^[16]。基质金属蛋白酶(MMPs)是肿瘤细胞过度分泌的生物大分子,其通过诱导基质降解,帮助肿瘤细胞侵袭转移和复发^[17]。阻断该酶的分泌或抑制该酶的活性,可在一定程度上抑制肿瘤侵袭转移能力,逐渐成为延缓肿瘤发展的一种新策略^[18]。本研究利用三阴性乳腺癌侵袭性高,MMP-2分泌强

的生物学特点,制备基质金属蛋白酶响应型水凝胶(MRH),从载体层面增加了药物递送的靶向特异性,通过智能调控所载药物的释放速率,进一步优化药物作用,达到疗效。

舒尼替尼是一种成熟的抗血管生成药物,可阻止包括血管内皮生长因子受体(VEGFR)在内的多种受体的激活。FDA已批准舒尼替尼用于治疗肾细胞癌和胃肠间质瘤^[19-20]。此外,舒尼替尼在神经内分泌肿瘤、非小细胞肺癌、结肠癌、原发性肝癌和乳腺癌等多项临床研究中也表现出良好的临床疗效^[21-25]。然而,上述研究中舒尼替尼的给药途径以口服(临床研究)或静脉注射(临床前研究)为主。而本研究成功制备了舒尼替尼纳米粒,将其装载到水凝胶中,以期实现术后局部给药,有效防治乳腺癌复发。就已知文献,这是舒尼替尼改变粒径、改变剂型以及改变给药途径的创新尝试,已申请了实用新型专利(CN 201711358718.8)。以 nano-su 为内核的 NSMRH 的优势在于:(1) 既往载药水凝胶多装载传统化疗药物,药物释放后,缺乏特异性,不良反应较大。而舒尼替尼作为分子靶向药物,特异性较好,作用机制明确,即通过抑制肿瘤新生血管的生成,阻止肿瘤的局部复发。与临床上应用的舒尼替尼相比,舒尼替尼纳米粒的制备,使其稳定性、分散性均得到优化;(2) 酶响应型水凝胶作为载体

可以实现药物的控释和缓释,最大程度地保证了肿瘤周围血药浓度。局部给药的方式也在一定程度上避免了因口服或静脉给药造成的全身毒副作用。

综上所述,本研究设计合成了一种新型智能纳米载药系统 NSMRH,以水凝胶为载体,装载抗血管生成的分子靶向药物舒尼替尼纳米粒,实现了对早期三阴性乳腺癌术后复发的有效干预。在未来的工作中,NSMRH用于预防乳腺癌复发的具体分子机制有待深入探讨,此外,智能水凝胶搭载纳米化分子靶向药物的局部用药尝试,有待于在其他肿瘤类型或其他疾病中进一步论证。

参考文献(References)

- [1] Vagia E, Mahalingam D, Cristofanilli M. The landscape of targeted therapies in TNBC[J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(4): 916–941.
- [2] Zhang L, Fang C, Xu X Q, et al. Androgen receptor, EGFR, and BRCA1 as biomarkers in triple-negative breast cancer: A meta-analysis[J]. *Biomed Research International*, 2015, 2015: 357485.
- [3] Voci S, Gagliardi A, Molinaro R, et al. Recent advances of taxol-loaded biocompatible nanocarriers embedded in natural polymer-based hydrogels[J]. *Gels*, 2021, 7(2): 33–61.
- [4] Wang H H, Fu Z G, Li W, et al. The synthesis and application of nano doxorubicin-indocyanine green matrix metalloproteinase-responsive hydrogel in chemophototherapy for head and neck squamous cell carcinoma[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2019, 14: 623–638.
- [5] Majidpoor J, Mortezaee K. Angiogenesis as a hallmark of solid tumors—clinical perspectives[J]. *Cellular oncology (Dordrecht)*, 2021, 44(4): 715–737.
- [6] Quereda V, Bayle S, Vena F, et al. Therapeutic targeting of CDK12/CDK13 in triple-negative breast cancer[J]. *Cancer Cell*, 2019, 36(5): 545–558.
- [7] Brewster A M, Chavez-MacGregor M, Brown P. Epidemiology, biology, and treatment of triple-negative breast cancer in women of African ancestry[J]. *Lancet Oncology*, 2014, 15(13): e625–e634.
- [8] Acheampong T, Kehm R D, Terry M B, et al. Incidence trends of breast cancer molecular subtypes by age and race/ethnicity in the US from 2010 to 2016[J]. *JAMA Network Open*, 2020, 3(8): e2013226.
- [9] Sui J, Zhao M, Yang Y, et al. Acid-labile polysaccharide prodrug via lapatinib-sensitizing effect substantially prevented metastasis and postoperative recurrence of triple-negative breast cancer[J]. *Nanoscale*, 2020, 12(25): 13567–13581.
- [10] Lluch A, Barrios C H, Torrecillas L, et al. Phase III trial of adjuvant capecitabine after standard neo-/adjuvant chemotherapy in patients with early triple-negative breast cancer (GEICAM/2003–11_CIBOMA/2004–01) [J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2020, 38(3): 203–213.
- [11] Basak S, Nanda J, Banerjee A. Multi-stimuli responsive self-healing metallo-hydrogels: Tuning of the gel recovery property[J]. *Chemical Communication (Camb)*, 2014, 50(18): 2356–2359.
- [12] Wei Y, Zeng Q, Hu Q, et al. Self-cleaned electrochemical protein imprinting biosensor basing on a thermo-responsive memory hydrogel[J]. *Biosens Bioelectron*, 2018, 99:136–141.
- [13] Tessmar J K, Gopferich A M. Matrices and scaffolds for protein delivery in tissue engineering[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007, 59(4/5): 274–291.
- [14] Pan Y F, Wang J C, Cai P X, et al. Dual-responsive IPN hydrogel based on sugarcane bagasse cellulose as drug carrier[J]. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 2018, 118: 132–140.
- [15] Shang J, Theato P. Smart composite hydrogel with pH-, ionic strength- and temperature-induced actuation[J]. *Soft Matter*, 2018, 14(41): 8401–8407.
- [16] Xue B, Kozlovskaya V, Kharlampieva E. Shaped stimuli-responsive hydrogel particles: Syntheses, properties and biological responses[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2017, 5(1): 9–35.
- [17] Yao Q, Kou L F, Tu Y, et al. MMP-responsive 'smart' drug delivery and tumor targeting[J]. *Trends In Pharmacological Sciences*, 2018, 39(8): 766–781.
- [18] Lian G Y, Wang Q M, Mak T S, et al. Inhibition of tumor invasion and metastasis by targeting TGF-beta-Smad-MMP2 pathway with Asiatic acid and Naringenin [J]. *Molecular Therapy-Oncolytics*, 2021, 20: 277–289.
- [19] Brooks C, Sheu T, Bridges K, et al. Preclinical evaluation of sunitinib, a multi-tyrosine kinase inhibitor, as a radiosensitizer for human prostate cancer[J]. *Radiation Oncology*, 2012, 7: 154–163.
- [20] Ebos J M, Lee C R, Christensen J G, et al. Multiple cir-

- culating proangiogenic factors induced by sunitinib malate are tumor-independent and correlate with antitumor efficacy[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(43): 17069–17074.
- [21] Symonds L, Jenkins I, Linden H M, et al. A phase II study evaluating the safety and efficacy of sunitinib malate in combination with weekly paclitaxel followed by doxorubicin and daily oral cyclophosphamide plus G-CSF as neoadjuvant chemotherapy for locally advanced or inflammatory breast cancer[J]. *Clinical Breast Cancer*, 2022, 22(1): 32–42.
- [22] Ang Y, Ho G F, Soo R A, et al. A randomized phase II trial evaluating the addition of low dose, short course sunitinib to docetaxel in advanced solid tumours[J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1): 1118–1128.
- [23] Li H, Kuang X W, Liang L, et al. The beneficial role of sunitinib in tumor immune surveillance by regulating tumor PD-L1[J]. *Advancement of Science*, 2021, 8(2): 2001596.
- [24] Grande E, Rodriguez-Antona C, Lopez C, et al. Sunitinib and evofosfamide (TH-302) in systemic treatment-naive patients with grade 1/2 metastatic pancreatic neuroendocrine tumors: The GETNE-1408 trial[J]. *Oncologist*, 2021, 26(11): 941–949.
- [25] Chen L, Xu P, Xiao Q P, et al. Sunitinib malate inhibits intestinal tumor development in male Apc(Min/+) mice by down-regulating inflammation-related factors with suppressing beta-cateinin/c-Myc pathway and re-balancing Bcl-6 and Caspase-3[J]. *International Immunopharmacology*, 2021, 90: 107128.

Synthesis of novel enzyme responsive hydrogel and its applications in prevention of postoperative recurrence of triple negative breast cancer

FU Zhiguang¹, TAO Cheng², WANG Yu¹, WEN Ning^{3*}, HU Lin^{4*}

1. Air Force Medical Center, PLA, Beijing 100142, China
2. Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China
3. The First Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China
4. Beijing Chaoyang Hospital, Beijing 100020, China

Abstract Triple negative breast cancer has a high local recurrence rate and poor prognosis, which seriously threatens women's health. It is urgent to find a new strategy to effectively prevent progressive disease. The intelligent drug delivery system based on new biomedical materials can play a vital role in the comprehensive and synergistic treatment of the disease. In this study, sunitinib nanoparticles were prepared by solvent precipitation. A new enzyme responsive hydrogel was well prepared after loading the nano-drug into it by Michael addition reaction. Then the novel hydrogel was identified and characterized by transmission electron microscope, stability test, and drug dissolution test. Furthermore, the anti-tumor and anti-recurrence effects of the hydrogel was evaluated by function tests both in vitro and in vivo. Finally, the preliminary biosafety evaluation of the hydrogel was performed. The results indicate that the enzyme responsive hydrogel loading sunitinib nanoparticles was successfully prepared. The physicochemical properties of the new hydrogel showed good stability. The particle size of nano-sunitinib was about 400 nm. The dissolution curves showed that sunitinib nanoparticles could release continuously from the hydrogel, and the release efficiency was higher under the exposing of matrix metalloproteinase-2; functional tests showed that the hydrogel exhibited a good anti-tumor effect in vitro, showing a good biological function to promote apoptosis and prevent recurrence in vivo; the biosafety of the hydrogel in vivo was evaluated and showed no obvious toxicity, mice were well tolerated. Such a therapy strategy may inhibit the local recurrence and improve the clinical benefit of patients.

Keywords enzyme responsive hydrogel; sunitinib nanoparticles; triple negative breast cancer; postoperative recurrence ●



(责任编辑 祝叶华)