

叶酸修饰角鲨烯化西达本胺前药自组装纳米粒的构建与增强胰腺癌微环境递药的实验研究

陈凯迪^{1,2}, 冯迪¹, 周红³, 李玮², 戚雨薇¹, 黄晔⁴, 赵山¹, 谷满仓^{1,2*}

(1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 311402; 2. 浙江中医药大学中医药科学院, 浙江 杭州 311402; 3. 浙江大学医学院附属第一医院, 浙江 杭州 310003; 4. 浙江省皮肤病防治研究所, 浙江 湖州 313200)

摘要: 本研究针对化药及中药亲水性小分子抗肿瘤药物难以突破胰腺癌致密间质渗透屏障达到肿瘤组织深部发挥药效的关键问题, 将亲脂性分子角鲨烯 (squalene, SQ) 与亲水性抗肿瘤药物西达本胺 (chidamide, CHI) 以胰酶响应键连接形成前药分子 (SQ-CHI), 进一步制备叶酸修饰的前药自组装纳米粒 (FA-SQ-CHI NPs)。作者表征了前药分子和纳米粒; 研究其体外释放特性与空白载体细胞毒性; 比较该前药纳米粒在 PSN-1 单层细胞和 PSN-1/HSPC 共培养肿瘤球模型中的药效和渗透过程。结果显示成功构建了 SQ-CHI 前药分子和 FA-SQ-CHI NPs。纳米粒为规则球形, 分散良好, 粒径为 (173.3 ± 1.5) nm, 载药量为 (59.02 ± 0.8) %, 具有胰酶响应释药特性。前药纳米粒可显著增强 CHI 在 PSN-1/HSPC 肿瘤球中的渗透和肿瘤细胞杀伤作用。综上, 通过构建叶酸修饰的角鲨烯化西达本胺前药自组装纳米粒, 可显著增强西达本胺胰腺癌微环境的渗透和抗肿瘤药效, 为化药及中药亲水性小分子药物在抗胰腺癌的应用提供新的靶向递药系统构建思路。

关键词: 西达本胺; 角鲨烯; 叶酸; 胰腺癌; 渗透性

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)12-3261-07

The development of folate modified squalene-chidamide prodrug self-assembled nanoparticles to enhance the drug delivery in pancreatic cancer microenvironment

CHEN Kai-di^{1,2}, FENG Di¹, ZHOU Hong³, LI Wei², QI Yu-wei¹, HUANG Ye⁴, ZHAO Shan¹, GU Man-cang^{1,2*}

(1. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311402, China; 2. Academy of Chinese Medical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311402, China; 3. The First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China; 4. Institute of Dermatology Prevention and Treatment, Huzhou 313200, China)

Abstract: This research aimed at the key issue that chemical drugs and Chinese medicine hydrophilic small molecule anti-tumor drugs were difficult to break through the dense interstitial permeability barrier of pancreatic cancer to achieve the key problem of drug efficacy in the deep part of tumor tissue. To solve this problem, the lipophilic molecule squalene (SQ) and the hydrophilic anti-tumor drug chidamide (CHI) were linked by a trypsin responsive bond to form a prodrug (SQ-CHI) and a folic acid modified prodrug self-assembled nanoparticles (FA-SQ-CHI NPs) were further developed. The feature of prodrug molecules and nanoparticles were characterized. The *in vitro* release characteristics and cytotoxicity of blank vector were investigated. The efficacy and permeability

收稿日期: 2021-08-06; 修回日期: 2021-08-27.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81673607, 81774011, 81703713); 浙江省自然科学基金资助项目 (LY19H280001).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-571-61768535, E-mail: gmancang@zcmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1145

of the prodrug nanoparticles in the PSN-1 monolayer cell and PSN-1/HSPC co-cultured tumor spheroids model was evaluated. The results showed that SQ-CHI prodrug molecules and FA-SQ-CHI NPs were successfully developed. The nanoparticles were regular spherical, well-dispersed, with a particle size of (173.3 ± 1.5) nm, a drug load of (59.02 ± 0.8) % and showed trypsin responsive release ability. The prodrug nanoparticles can significantly enhance the penetration and anti-proliferation effects of CHI in the PSN-1/HSPC tumor spheroids. In conclusion, the construction of folic acid-modified SQ-CHI prodrug self-assembled nanoparticles can significantly enhance the penetration of CHI in the pancreatic cancer microenvironment *in vitro*. This research would provide a new idea for the construction of targeted drug delivery system for chemical drugs and Chinese medicine hydrophilic small molecule drugs in the application of anti-pancreatic cancer.

Key words: chidamide; squalene; folic acid; pancreatic cancer; permeability

胰腺癌 (pancreatic adenocarcinoma, PDAC) 是恶性程度较高的消化道肿瘤, 5年生存率仅有8%~9%^[1]。目前胰腺癌的治疗以手术和化疗药物为主, 预后差且易产生耐药性^[2]。胰腺癌肿瘤微环境十分复杂, 包含多种类型炎症细胞、肿瘤相关成纤维细胞和细胞外基质等, 约占组织总量的50%以上^[3]。致密、高组织间隙液压及乏氧的肿瘤间质渗透屏障严重阻碍了化药及中药亲水性小分子药物递送至胰腺癌深部, 有利于肿瘤生长^[4]。如何突破胰腺癌间质渗透屏障发挥化药及中药抗肿瘤作用已成为关键问题。

西达本胺 (chidamide, CHI) 是一种新型组蛋白去乙酰化酶抑制剂 (histone deacetylase inhibitors, HDACI), 目前主要应用于血液系统肿瘤的治疗^[5], 临床前研究证实其对胰腺癌、乳腺癌等实体肿瘤也具有较好的抗肿瘤活性, 可以逆转肿瘤细胞耐药性^[6]。但是CHI亲水性较强, 同时具有对实体肿瘤组织分布特性差、肿瘤微环境渗透效率低等缺点, 严重阻碍其抗胰腺癌临床应用。

角鲨烯 (squalene, SQ) 是天然合成胆固醇脂质的前体物质, 生物安全性、生物相容性好^[7]。化疗药物和中药活性小分子经角鲨烯修饰, 改善亲水性小分子药物与细胞膜的生物相容性, 从而增强其入胞效率^[8],

目前已广泛应用于抗癌、抗氧化和作为药物载体等^[9]。Kotelevets 等^[10]将顺铂与角鲨烯连接制备纳米粒 (nanoparticles, NPs), 降低了顺铂耐药性和毒性的同时提高了其抗结肠癌的疗效。本研究利用酰胺键连接西达本胺与角鲨烯分子, 该共价键在常规生理条件下难以发生断裂, 而在胰腺癌细胞内高表达的胰蛋白酶或组织蛋白酶可触发酰胺键水解断裂^[11], 实现CHI-SQ纳米粒在胰腺癌细胞内响应性释药的特性。

综上, 本研究将角鲨烯与西达本胺连接形成前药分子, 制备叶酸 (folic acid, FA) 修饰自组装纳米粒。该纳米粒为粒径均一的类球形, 具有良好的载药量和包封率, 兼具胰酶响应性, 同时借助叶酸对胰腺癌细胞表面高表达的叶酸受体 (folate receptor, FR) 的特异性结合实现主动靶向^[12], 可显著增强以CHI为代表的亲水性化药与中药小分子药物在胰腺癌肿瘤微环境的渗透作用和对癌细胞的杀伤作用 (图1)。

材料与方法

主要试剂与药品 西达本胺 (CHI, 批号: 20200803; 深圳微芯生物科技股份有限公司); 1,1',2-三角鲨烯酸 (1,1',2-Tris-norsqualenoyl acid, SQ-COOH; 美国 Sigma

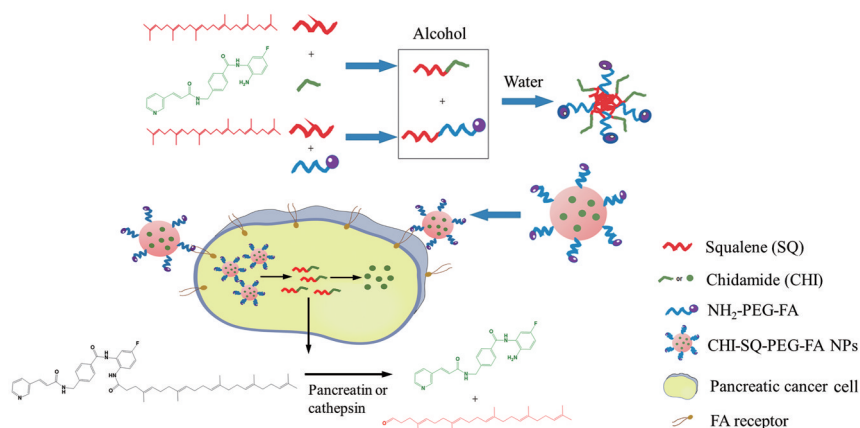


Figure 1 The construction and cell entry mechanism of chidamide-squalene-polyethylene glycol-folic acid nanoparticles (FA-SQ-CHI NPs). PEG: Polyethylene glycol

公司); 聚乙二醇-氨基 (PEG₂₀₀₀-NH₂)、叶酸-聚乙二醇-氨基 (FA-PEG₂₀₀₀-NH₂) (上海苕硕生物科技有限公司); MTS 试剂 (美国 Promega 公司); CellTiter-Glo 细胞增殖检测试剂盒 (美国 Invitrogen 公司); 香豆素 6 (coumarin 6, 上海源叶生物科技有限公司); 人胰腺癌细胞株 PSN-1、胰腺星状细胞株 HPaStec (HPSC) (美国 ATCC 公司); RPMI 1640 培养液、IMDM 培养液 (美国 Gibco 公司)。

主要仪器 Z127016/00062 型 600MHz 核磁共振波谱仪 (美国 Bruker 公司); SU8010 型场发射扫描电子显微镜 (日本日立公司); Nano-ZS90 激光粒度测定仪 (美国马尔文公司); LSM880 型激光共聚焦显微镜 (德国卡尔·蔡司股份公司); CytoFlex 型分析型流式细胞仪 (美国贝克曼公司); 多功能酶标仪 sgaerggH1M (美国伯腾仪器有限公司)。

CHI-SQ 的制备与验证 取 SQ-COOH 120 mg 溶解于适量 *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF), 随后逐步加入三乙胺 (TEA) 50 μ L、*N*-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 42 mg 以及 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸 (EDCI) 69 mg; 另取西达本胺 60 mg 溶解于适量 DMF 中, 加入上述反应体系中, 补充二氯甲烷 (DCM) 3 mL 以及 TEA 100 μ L, 氮气保护反应 72 h。采用快速柱层析法分离纯化并冷冻干燥, ¹H NMR 鉴定结构。

角鲨烯-聚乙二醇-叶酸复合物 (SQ-PEG-FA) 制备与验证 取 SQ-COOH 41.12 mg 溶解于适量 DMF, 随后逐步加入 NHS 15.71 mg 以及 EDCI 24.59 mg, 氮气保护反应 90 min。取 FA-PEG-NH₂ 20 mg 溶解于适量 DMF, 滴加入上述反应体系, 氮气保护反应 72 h。结束后用超滤离心管 (分子截留量 3 kDa), 以 10 000 r·min⁻¹ 转速离心 30 min, 超纯水洗涤, 收集洗涤液并冻干, ¹H NMR 鉴定结构。

SQ-CHI-PEG-FA NPs 制备工艺优化与表征 分别用无水乙醇溶解 SQ-CHI 和 SQ-PEG-FA 制备成储备液。采用单因素考察 SQ-CHI 与 SQ-PEG-FA 不同质量比 (1:0、1:0.05、1:0.5、1:0.7), 水相和油相不同体积比 (1:1、1:5、1:10、1:20) 以及不同超声时间 (5、15、30、45 min) 对纳米粒粒径分布与 zeta 电位的影响。

按最佳制备工艺将 SQ-CHI 储备液与 SQ-PEG-FA 储备液按适当比例混合, 然后逐滴加入去离子水中, 充分混匀 5 min, 减压除去乙醇, 探头超声 30 min 即得 CHI-SQ-PEG-FA NPs 混悬液。检测纳米粒粒径分布与 zeta 电位, 采用透射电子显微镜和扫描电子显微镜观察纳米粒外观形态。

载药量测定 使用超高效液相色谱法 (UPLC 法) 测定纳米粒载药量。色谱条件: 色谱柱为 ACQUITY

UPLC[®] BEH C18 柱 (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μ m); 体积流量 0.2 mL·min⁻¹; 柱温 23 $^{\circ}$ C; 进样量 5 μ L; 检测时间 10 min; 流动相 0.1% 甲酸溶液: 乙腈 (75:25, v/v); 检测波长 258 nm。供试品制备步骤如下: 将 CHI-SQ-PEG-FA NPs 复溶, 高速离心 (12 000 r·min⁻¹, 30 min), 取上清液用 0.22 μ m 微膜过滤得续滤液。测定续滤液中 CHI 的含量, 按公式 (1) 计算纳米粒的载药量 (DL%)。

$$DL\% = \frac{\text{Amount of CHI in NPs}}{\text{Amount of NPs}} \times 100\% \quad (1)$$

体外药物释放研究 精密移取 2 mL 新鲜 CHI 储备液或 CHI-SQ-PEG-FA NPs 置于透析袋 (3 kDa) 内, 以含有不同浓度胰酶 (0%、0.05%、0.1%、0.25%) 的透析介质透析, 于不同时间 (0.1、0.5、1、2、4、6、8、10、12、24、30、36、48、72 h) 取样 1 mL, 补加等量同温的释放介质。采用 UPLC 法 (色谱条件同上) 测定各时间点药物释放量。

MTS 法检测细胞活力研究 将 PSN-1 细胞经胰酶消化后接种于 96 孔细胞板中 (每孔 3 000~5 000 个), 培养 2 h 使细胞贴壁。每孔加入 100 μ L 空白培养液以及不同浓度 SQ-PEG, 或者含游离 CHI、CHI-SQ-PEG NPs 或 CHI-SQ-PEG-FA NPs 培养液。继续培养 96 h 后, 弃去原培养液, 每孔加入 MTS 工作液继续培养, 4 h 后取出并震荡 15 s, 采用酶标仪测定 *A* 值 (490 nm), 计算细胞增殖率。

共培养细胞模型构建及细胞活力研究 将处于对数期的 PSN-1 与 HPSC 细胞悬液按 2:7 比例混合, 以每孔 5 000 个细胞置于超低吸附细胞板中形成体外共培养肿瘤球模型。将不同纳米药物和 DMSO 分别与肿瘤球共孵育 48、96、144 h 后, 加入等体积的 CellTiter-Glo 试剂, 将细胞培养板放置于轨道式振荡器振摇 15 min, 室温避光放置 30 min, 吸取细胞裂解液至黑色 96 孔内, 采用多功能酶标仪检测发光信号值 (检测波长 562 nm)。

单层培养细胞摄取纳米药物的研究 首先制备香豆素 6 标记 CHI-SQ-PEG-FA/C6 NPs。然后取处于对数生长期的单层培养 PSN-1 细胞常规培养 24 h, 分别加入空白培养液、游离香豆素 6、CHI-SQ-PEG/C6 NPs 或 CHI-SQ-PEG-FA/C6 NPs 的无血清培养液 (各组含 5 μ mol·L⁻¹ CHI 或 2.6 μ mol·L⁻¹ 香豆素 6) 孵育 4、12 和 24 h, 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 染色, 使用荧光显微镜测定香豆素 6 荧光强度 (Ex = 360 nm, Em = 477 nm)。

流式细胞术 取处于对数生长期的单层培养 PSN-1 细胞, 分别加入空白培养液、游离香豆素 6、CHI-SQ-PEG/C6 NPs 或 CHI-SQ-PEG-FA/C6 NPs 的培养液

(各组合含 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CHI 或 $2.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 香豆素 6) 于细胞培养箱孵育 4、12 和 24 h, 采用流式细胞仪定量分析细胞摄取情况。

肿瘤球模型摄取研究 取 PSN-1/HPSC 共培养肿瘤球模型, 分别加入含游离香豆素 6、CHI-SQ-PEG/C6 NPs 和 CHI-SQ-PEG-FA/C6 NPs, 在无血清培养液中培养 (香豆素 6 的终浓度为 $2.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 12 h 后加入 0.5 mL DAPI ($0.2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 孵育, 采用激光共聚焦显微镜观察药物在肿瘤球内分布情况。

统计学分析 采用软件 SPSS 20.0 进行统计分析, 两组间均数采用 *t* 检验进行比较, 多组间均数采用单因素方差分析进行比较, 实验数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 进行表示, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结果与讨论

1 各产物验证

图 2A、B 所示, δ 2.80~2.90、 δ 5.15~5.20 为角鲨烯链上的质子峰, 对比游离 CHI 和 FA-PEG-NH₂ 说明成功连接角鲨烯, CHI-SQ 和 SQ-PEG-FA 成功合成。

2 纳米粒处方优选及表征

图 3A~C 所示, 当 SQ-CHI 和 SQ-PEG 质量比 1:0.7, 有机相与水相体积比 1:10, 超声时间 30 min, 所制备的纳米粒粒径最小, 分布最均匀。图 4A 所示, 最优处方工艺条件下所制备的纳米粒粒径为 $(173.3 \pm 1.5) \text{ nm}$, PDI 为 (0.2 ± 0.2) , zeta 电位为 $(-13.1 \pm 0.9) \text{ mV}$ 。图 4B、C 所示, CHI-SQ-PEG-FA NPs 粒径分布均匀, 具有

典型“核壳”结构。CHI 经 SQ 修饰后, 更易形成自组装纳米粒, 同时 SQ-PEG 片段可以增加纳米粒稳定性^[13]。UPLC 法测得纳米粒的载药量为 $(59.02 \pm 0.77) \%$ 。

3 体外药物释放

胰腺癌患者丝氨酸蛋白酶 1 基因 (*PRSSI*) 突变, 因此肿瘤细胞胰蛋白酶分泌水平较正常细胞高^[9], 故本实验针对前药纳米粒对胰蛋白酶的释药响应性展开相关研究。结果如图 5 所示, CHI-SQ-PEG-FA NPs 释放 CHI 的量随胰蛋白酶浓度增加而提高 (0.05%、0.1%、0.25%)。当胰酶浓度为 0.25% 时, 纳米粒 72 h 释放 CHI 的累积释放率达 $(80.22 \pm 4.22) \%$, 而在不含有胰蛋白酶的介质中纳米药物的 CHI 累积释放率仅为 $(33.04 \pm 3.03) \%$, 提示 CHI-SQ-PEG-FA NPs 具有胰蛋白酶响应性, 可实现胰腺癌细胞特异性释药。

4 体外药效研究

图 6A 所示, 不同浓度 SQ-PEG 处理 PSN-1 细胞后细胞存活率均高于 90%, 显示了空白载体低的细胞毒性, 且对肿瘤细胞本身并无药效。

图 6B 所示, 高浓度前药纳米粒与 CHI 游离药物 ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对单层培养的 PSN-1 细胞生长抑制率分别为 $(88.38 \pm 0.13) \%$ (CHI-SQ-PEG NPs) 和 $(89.87 \pm 3.69) \%$ (CHI-SQ-PEG-FA NPs), 但两者之间没有显著差异 ($P > 0.05$)。图 6C 所示成功构建 PSN-1/HPSC 共培养肿瘤球模型, 该肿瘤球轮廓清晰, 边缘光滑, 且较稳定。图 6D 所示, 相比游离 CHI, CHI-SQ-PEG-FA NPs 在共培养肿瘤球模型中具有更强的肿瘤生长抑制作用 ($P < 0.01$)。肿瘤球模型可以在体外模拟胰腺癌微

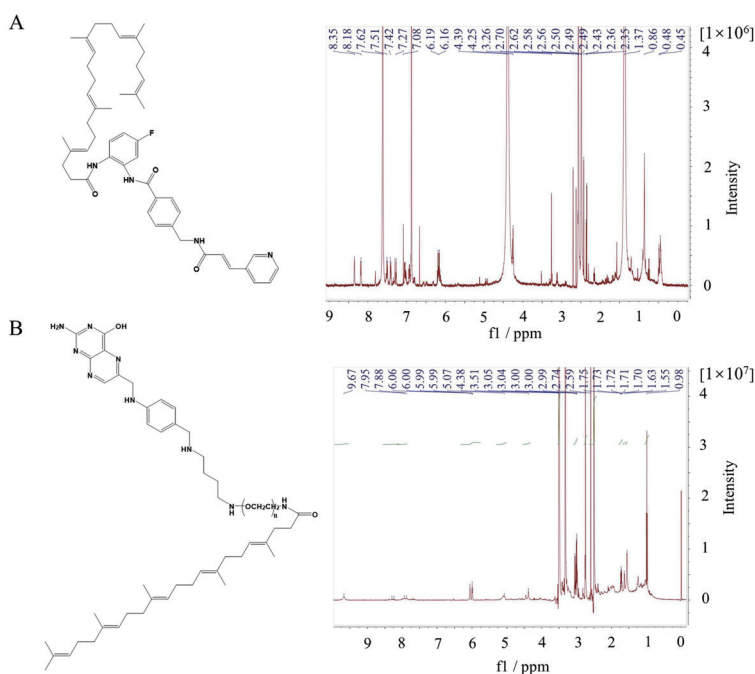


Figure 2 ¹H nuclear magnetic resonance (NMR) of CHI-SQ (A) and SQ-PEG-FA (B)

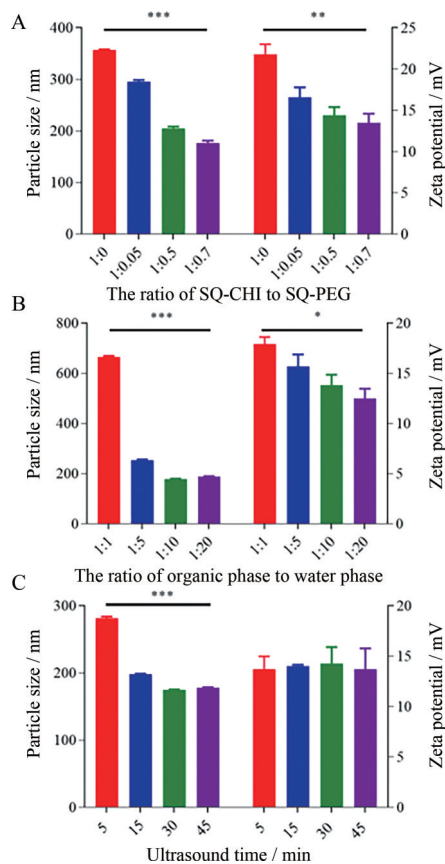


Figure 3 The preparation procedure optimization for CHI-SQ-PEG-FA NPs. A: The particle size and zeta potential of CHI-SQ-PEG NPs prepared with different mass ratios of SQ-CHI and SQ-PEG; B: Different volume ratios of organic phase and water phase; C: Different ultrasound time. $n = 3, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.01$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

环境致密的药物渗透屏障, 阻碍小分子药物进入胰腺癌组织内发挥药效^[14], 因此相比游离 CHI, CHI-SQ-PEG-FA NPs 可能更易渗透入肿瘤球内部发挥药效。

5 体外摄取研究

为了进一步探究角鲨烯化西达本胺纳米粒与游离西达本胺体外药效存在差异的原因。本课题选用香豆素 6 (C6) 作为荧光示踪剂, 将其结合在纳米粒内, 并且比较了纳米粒与游离药物的肿瘤细胞摄取特性。结果如图 7A~C 所示, 单层培养的 PSN-1 细胞对游离 C6 摄取较快, 给药后 4 h 即达到峰值, 且荧光信号很快消除。这可能是由于游离 C6 滞留于肿瘤细胞表面, 并很快被代谢与排除有关^[15]; 而对 CHI-SQ-PEG-FA/C6 NPs 和 CHI-SQ-PEG/C6 NPs 摄取较慢, 给药后 12 h 才达到峰值, 但荧光信号消除较慢。流式细胞实验结果 (图 7D) 也得到了相同趋势, 且 CHI-SQ-PEG-FA/C6 NPs 和 CHI-SQ-PEG/C6 NPs 组的荧光强度显著高于游离药物组 ($P < 0.05$)。CHI 经角鲨烯化制备成纳米粒后可被肿瘤

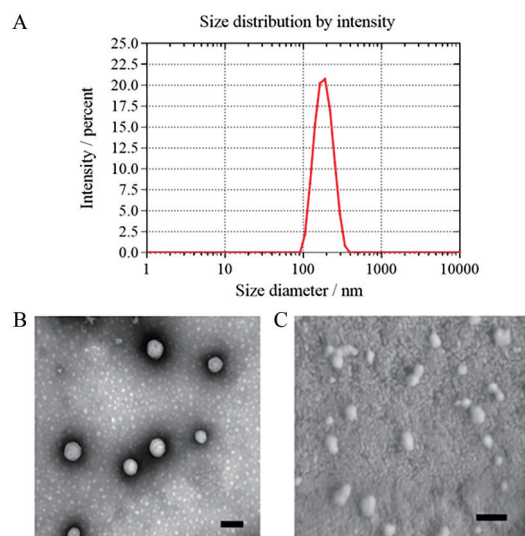


Figure 4 Characterization of CHI-SQ-PEG-FA NPs. A: Particle size distribution of CHI-SQ-PEG-FA NPs; B: Transmission electron microscope image of CHI-SQ-PEG-FA NPs. Scale bar: 200 nm; C: Scanning electron microscope result of CHI-SQ-PEG-FA NPs. Scale bar: 250 nm

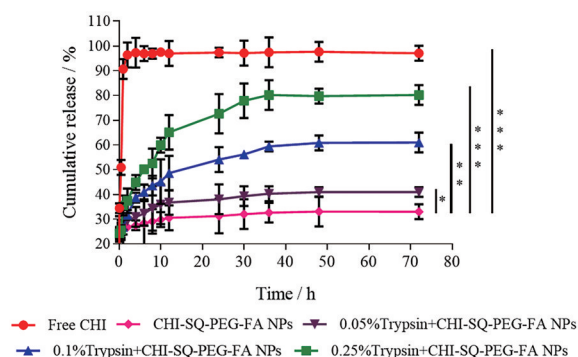


Figure 5 *In vitro* cumulative release curve of free CHI and CHI-SQ-PEG-FA NPs in different concentrations of human trypsin release medium for 72 h. $n = 3, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.01$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs the release rate of CHI-SQ-PEG-FA NPs in human trypsin free medium

细胞高效内吞入胞内部, 抑制细胞外排作用, 从而延长纳米粒在肿瘤细胞内滞留时间^[16]。图 7E 所示, PSN-1/HPSC 共培养体系肿瘤球给药 12 h 后, 游离药物组几乎不可见荧光信号, 前药纳米粒组则具有明显的荧光信号, 且 CHI-SQ-PEG-FA/C6 NPs 组荧光强度显著强于 CHI-SQ-PEG/C6 NPs 组, 提示 CHI 形成前药自组装纳米粒后更易突破胰腺癌肿瘤致密的细胞外间质层渗透入肿瘤球内部, 且在肿瘤球内部的滞留时间显著延长。这可能是由于西达本胺经角鲨烯化形成纳米粒后亲脂性显著提高, 更易利用肿瘤细胞内吞和细胞间传递作用实现肿瘤微环境深渗透; 同时叶酸靶头修饰可使纳

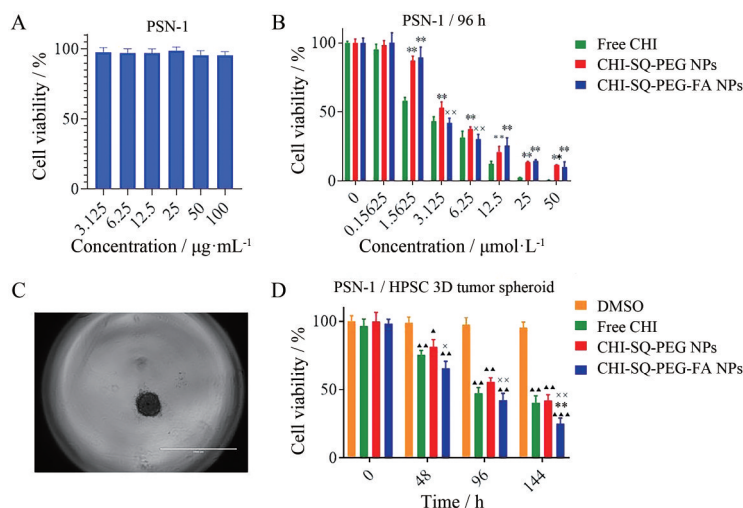


Figure 6 A: The effect of different concentrations of blank SQ-PEG on the proliferation of PSN-1 cells; B: Co-cultivation of different drugs and PSN-1 cells for 96 h; C: PSN-1/HPSC co-cultured tumor spheroids. Scale bar: 1 000 μm; D: CHI-SQ-PEG NPs or CHI-SQ-PEG-FA NPs inhibited proliferation of PSN-1/HPSC co-cultured tumor spheroids. $n = 3, \bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs free CHI group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ vs DMSO group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs CHI-SQ-PEG NPs treatment group

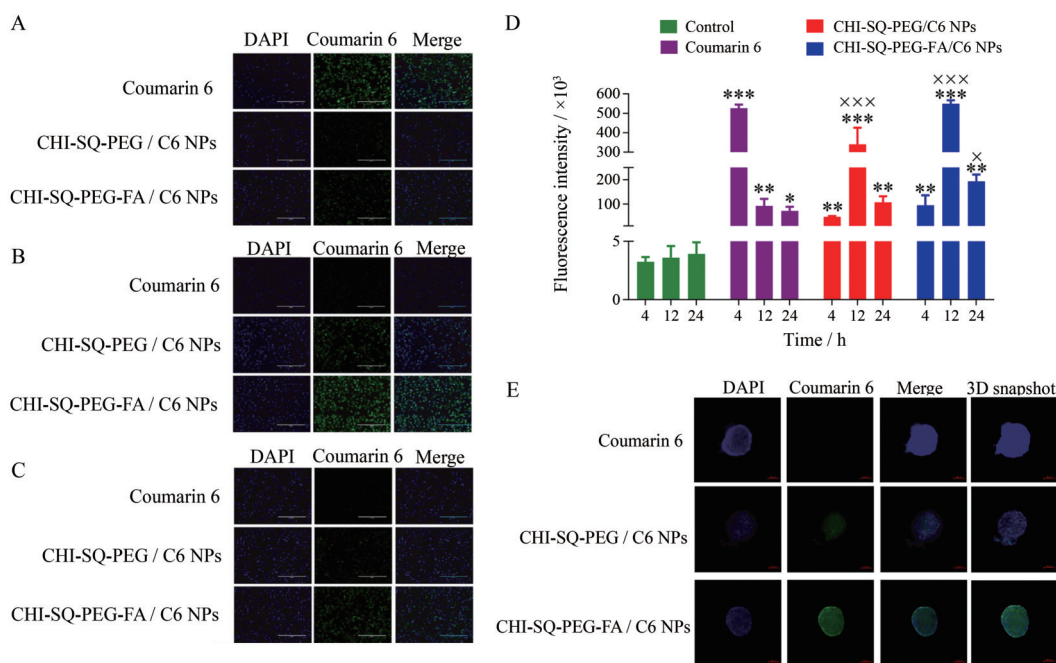


Figure 7 Fluorescence microscope images of PSN-1 treated with free coumarin 6 or different coumarin 6 labeled nanoparticles for 4 h (A), 12 h (B), and 24 h (C). Fluorescent nanoparticles or free coumarin 6 are green, and the nucleus DAPI staining is blue. PSN-1 cells were treated with different fluorescent nanoparticles for 4–24 h (D). Confocal laser confocal image analysis of the fluorescence intensity in PSN-1/HPSC co-culture tumor spheroid after exposure to free coumarin 6, CHI-SQ-PEG/C6 NPs, and CHI-SQ-PEG-FA/C6 NPs for 12 h (E). $n = 3, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.001$ vs coumarin 6 treated group. Microscope magnification: 100 \times ; scale bar: 400 μm. DAPI: 4',6-Diamidino-2-phenylindole

米粒经由胰腺癌细胞表面高表达的叶酸受体介导的内吞作用进一步增强肿瘤细胞的摄取作用,从而提高药物的体内药效^[17]。Bulanadi等^[18]制备了吉西他滨前药脂质纳米粒,降低游离吉西他滨毒性的同时增强药物对胰腺癌肿瘤细胞的渗透作用。通过将亲水性药物分

子与亲脂性材料组成纳米药物从而提高其入胞性能的思路在中药药效成分纳米递送系统构建中也得到广泛利用,如Wang等^[19]将亲水性小分子中药三氧化二砷制备成前药脂质体,使药物更易穿透血脑屏障,提高靶向性。Fan等^[20]基于亲水性小分子中药小檗碱,开发了

一种活性氧 (ROS) 响应聚合物胶束, 以硒代胱胺聚合物作为载体, 显著改善小檗碱的吸收和疗效。

结论与展望

本研究制备了一种叶酸修饰的角鲨烯化西达本胺前药自组装纳米粒, 对纳米粒表征结果表明该纳米粒粒径均一, 为规则类球形, 载药量 (59.00 ± 0.8) %。体外释放结果显示胰酶可促进纳米粒释放 CHI。体外细胞药效和摄取结果表明该前药纳米粒生物安全性好, 可显著增强 CHI 在 PSN-1/HSPC 肿瘤球模型中的渗透和杀伤作用, 提高 CHI 对胰腺癌肿瘤的组织分布性和肿瘤微环境渗透性。但目前本研究仅在细胞水平阐释了该新型前药纳米粒的递药优势, 尚需进一步展开相关体内药效与药动力学研究, 并进一步探讨其主要的肿瘤微环境渗透机制。综上, 本研究可为提高化药与中药亲水性活性小分子胰腺癌微环境深部渗透提供新的制剂思路。

作者贡献: 陈凯迪负责主要实验操作、数据整理和文章撰写; 冯迪、戚雨薇和赵山负责实验操作、数据采集; 周红、李玮和黄晔负责数据整理和审校稿件; 谷满仓负责设计实验方案、撰写与审校稿件。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Wang Y, Yang G, You L, et al. Role of the microbiome in occurrence, development and treatment of pancreatic cancer [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18: 173.
- [2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68: 7-30.
- [3] Chen K, Wang Q, Li MZ, et al. Single-cell RNA-seq reveals dynamic change in tumor microenvironment during pancreatic ductal adenocarcinoma malignant progression [J]. *EBioMedicine*, 2021, 66: 103315.
- [4] Helms E, Onate MK, Sherman MH. Fibroblast heterogeneity in the pancreatic tumor microenvironment [J]. *Cancer Discov*, 2020, 10: 648-656.
- [5] Ito Y, Makita S, Tobinai K. Development of new agents for peripheral T-cell lymphoma [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2019, 19: 197-209.
- [6] Zhang N, Sun P, Jin HZ, et al. Chidamide combined with paclitaxel effectively reverses the expression of histone deacetylase in lung cancer [J]. *Anticancer Drugs*, 2020, 31: 702-708.
- [7] Maksimenko A, Dosio F, Mougin J, et al. A unique squalenoylated and nonpegylated doxorubicin nanomedicine with systemic long-circulating properties and anticancer activity [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111: 217-226.
- [8] Rodríguez-Nogales C, Mura S, Couvreur P, et al. Squalenoyl-gemcitabine/edelfosine nanoassemblies: anticancer activity in pediatric cancer cells and pharmacokinetic profile in mice [J]. *Int J Pharm*, 2020, 582: 119345.
- [9] Sobot D, Mura S, Yesylevskyy SO, et al. Conjugation of squalene to gemcitabine as unique approach exploiting endogenous lipoproteins for drug delivery [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15678.
- [10] Kotelevets L, Chastre E, Caron J, et al. A squalene-based nanomedicine for oral treatment of colon cancer [J]. *Cancer Res*, 2017, 77: 2964-2975.
- [11] Carretas-Valdez MI, Moreno-Cordova EN, Ibarra-Hernandez BG, et al. Characterization of the trypsin-III from *Monterey sardine* (*Sardinops caeruleus*): insights on the cold-adaptation from the A236N mutant [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 164: 2701-2710.
- [12] Strobbe S, Van Der Straeten D. Folate biofortification in food crops [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2017, 44: 202-211.
- [13] Wang Y, Huang P, Hu M, et al. Self-delivery nanoparticles of amphiphilic methotrexate-gemcitabine prodrug for synergistic combination chemotherapy *via* effect of deoxyribonucleotide pools [J]. *Bioconjug Chem*, 2016, 27: 2722-2733.
- [14] Bespalov VG, Alexandrov AV, Vysochina GI, et al. The inhibiting activity of meadowsweet extract on neurocarcinogenesis induced transplacentally in rats by ethylnitrosourea [J]. *J Neurooncol*, 2017, 131: 459-467.
- [15] Shu X, Zhu Z, Cao D, et al. PEG-derivatized birinapant as a nanomicellar carrier of paclitaxel delivery for cancer therapy [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2019, 182: 110356.
- [16] Jiang W, Chen J, Gong C, et al. Intravenous delivery of enzalutamide based on high drug loading multifunctional graphene oxide nanoparticles for castration-resistant prostate cancer therapy [J]. *J Nanobiotechnol*, 2020, 18: 1477-3155.
- [17] Tie Y, Zheng H, He ZY, et al. Targeting folate receptor β positive tumor-associated macrophages in lung cancer with a folate-modified liposomal complex [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5: 6.
- [18] Bulanadi JC, Xue AQ, Gong XJ, et al. Biomimetic gemcitabine-lipid prodrug nanoparticles for pancreatic cancer [J]. *Chempluschem*, 2020, 85: 1283-1291.
- [19] Wang N, Zhang W, Hu D, et al. 'Prodrug-like' acetylmannosamine modified liposomes loaded with arsenic trioxide for the treatment of orthotopic glioma in mice [J]. *J Pharm Sci*, 2020, 109: 2861-2873.
- [20] Fan XX, Xu MZ, Leung EL, et al. ROS-responsive berberine polymeric micelles effectively suppressed the inflammation of rheumatoid arthritis by targeting mitochondria [J]. *Nanomicro Lett (纳微快报)*, 2020, 12: 76.