黄芪多糖杂化载体口服中药递药体系的构建及其抗肿瘤应用

褚欣虹[1#], 张瑞萱[1#], 沈诗阳[2], 王 辉[1], 孙玉姣[1], 李英鹏[1*]

(1. 天津中医药大学中药学院, 天津 301617; 2. 天津中医药大学中西医结合学院, 天津 301600)

摘要: 本研究以中药黄芪来源的黄芪多糖为天然载体, 以中药莪术中具有抗肿瘤活性的疏水性成分莪术醇(curcumol, CUL) 为模型药物, 构建药载一体的纳米免疫递药系统CUL@AHNP, 并系统评估其体外性质、口服吸收性能及抗肿瘤免疫活性。CUL@AHNP经高压均质法制备, 粒径约为116.4 nm, 呈球形结构, 表面带负电, 具备良好的分散性和稳定性。体外实验结果表明, CUL@AHNP可显著增强CUL对乳腺癌4T1细胞的抑制作用, 并有效诱导免疫原性细胞死亡, 激活抗肿瘤免疫应答。细胞摄取及肿瘤球渗透实验验证其具备优良的跨膜转运及组织穿透能力。体内研究显示, 口服给药的CUL@AHNP可显著抑制肿瘤生长, 增强$CD8^+$及$CD4^+$ T细胞的浸润密度, 且与化疗药物多柔比星联合使用时表现出一定的协同抗肿瘤效果, 并未见明显的肝肾毒性反应。本研究所有动物实验均获得天津中医药大学动物实验伦理委员会批准 (No. 2023114)。本研究构建了基于黄芪多糖的口服纳米免疫递药系统, 为中药治疗乳腺癌提供了更安全、高效的治疗选择。

关键词: 口服给药; 黄芪多糖; 免疫治疗; 莪术醇; 抗肿瘤

中图分类号: R943 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2026)05-1819-11

Construction of an oral traditional Chinese medicine delivery system with hybridized carriers of astragalus polysaccharides and its antitumor application

CHU Xin-hong[1#], ZHANG Rui-xuan[1#], SHEN Shi-yang[2], WANG Hui[1], SUN Yu-jiao[1], LI Ying-peng[1*]

(*1. School of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China; 2. School of Integrative Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301600, China*)

Abstract: In this study, we employed astragalus polysaccharides (APS), derived from the traditional Chinese medicine Astragalus, as a natural carrier, and curcumol (CUL), a hydrophobic component with antitumor activity in the traditional Chinese medicine *Curcuma longa*, as a model drug, to construct a drug-loaded integrated nanoimmune drug delivery system, CUL@AHNP, and systematically evaluate its *in vitro* properties, oral absorption properties, and antitumor immune activity. The CUL@AHNP was prepared by high-pressure homogenization, resulting in a particle size of approximately 116.4 nm. It exhibited a spherical structure, a negatively charged surface, and good dispersion and stability. *In vitro* experiments demonstrated that CUL@AHNP could significantly enhance the inhibitory effect of CUL on breast cancer 4T1 cells and effectively induce immunogenic cell death (ICD) and activate anti-tumor immune responses. Assays measuring cellular uptake and tumor sphere penetration verified the sub *stance's* excellent transmembrane transport and tissue penetration ability. *In vivo* studies demonstrated that the oral administration of CUL@AHNP led to a substantial inhibition of tumor growth and an enhancement in the infiltration density of $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells. The combination of CUL@AHNP and the

收稿日期: 2025-05-14; 修回日期: 2025-07-13.
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82374050).
#共同第一作者.
*通讯作者 Tel: 86-22-59596221, E-mail: liyingpeng@tjutcm.edu.cn
DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-0546

chemotherapeutic drug doxorubicin (DOX) exhibited a certain degree of synergistic antitumor effect, without causing significant liver or kidney toxicity. All animal experiments had been approved by the Experimental Animal Ethics Committee of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine (No. 2023114). In conclusion, this study constructed an oral nanoimmune drug delivery system based on astragalus polysaccharides, which provides a safer and more efficient therapeutic option for the treatment of breast cancer with traditional Chinese medicine.

Key words: oral administration; astragalus polysaccharide; immunotherapy; curcumol; antitumor

乳腺癌是全球女性中发病率和死亡率较高的恶性肿瘤, 现有治疗手段虽能延长生存期, 但仍存在毒副作用大、复发率高等问题[1]。近年来, 随着肿瘤免疫治疗和中药干预策略的发展, 开发毒性更低、作用更温和、适合长期应用的治疗手段成为肿瘤综合治疗的重要方向。口服中药抗癌制剂因使用便捷、患者依从性高而备受关注, 但传统制剂普遍存在溶解性差、胃肠稳定性低、生物利用度不足等问题, 严重限制了其临床应用[2]。如何构建兼具优良口服吸收性能与免疫调控作用的新型中药递药系统, 成为当前药剂学研究的重要挑战。

黄芪多糖 (astragalus polysaccharide, APS) 作为一种天然活性多糖, 因其促进肠道药物转运与调节免疫反应的双重特性, 成为潜力突出的递药材料[3]。APS能够通过肠道上皮屏障的特定途径 (如M细胞介导) 提高药物吸收, 同时激活T细胞、树突状细胞等免疫效应细胞, 增强机体的抗肿瘤免疫能力[4]。这种“促进吸收同时激活免疫”的机制, 为开发口服免疫递药系统提供了新思路。

本课题组前期构建了透明质酸−硬脂酸甘油酯 (hyaluronic acid-glycerol monostearate, HGS) 接枝物作为新型口服纳米载体, 证实其具备良好的肠道转运性能[5]。在此基础上, 本研究提出采用APS杂化修饰HGS表面, 构建兼具肠道靶向与免疫调控功能的口服递药平台 (图1)。APS的引入不仅有望进一步提升药物的口服吸收率, 还可赋予系统显著的免疫调节优势, 旨在实现药代动力学与药效学的双重优化。

针对递送药物的选择, 莪术 (Curcumae Rhizoma) 作为传统中药“活血化瘀”的代表, 长期应用于乳腺等肿瘤的干预治疗[6]。其中活性成分莪术醇 (curcumol, CUL) 具有多靶点抗肿瘤活性, 可通过诱导细胞凋亡、抑制侵袭转移、调节肿瘤免疫微环境等机制发挥作用[7]。莪术醇药性温和、毒性低, 适合于肿瘤的长期治疗, 但其水溶性差、胃肠道吸收率低, 成为口服应用开发的主要障碍[8]。

基于以上研究背景, 本研究设计并构建了黄芪多糖杂化-HGS纳米载体系统, 用于包载中药活性小分子莪术醇, 旨在提升其口服生物利用度, 并依托APS的免疫调节特性增强整体抗肿瘤效应。该策略从抑制肿瘤增殖与调节免疫应答两个维度出发, 力求突破中药小分子口服递送的技术瓶颈, 并为乳腺癌等恶性肿瘤的治疗提供一种安全高效的新型中药递药系统。

材料与方法

药品与试剂 黄芪多糖、聚氧乙烯 (40) 硬脂酸酯 (S27818、S51667, 上海源叶生物科技有限公司); 莪术醇 (D105513, 南京狄尔格医药科技有限公司); 大豆磷脂 (SPC-98A, 上海艾伟拓医药科技有限公司); 山嵛酸甘油酯 (Compritol 888 ATO, 法国佳法赛公司); 辛酸/癸酸三甘油酯 (MIGLYOL® 829, 北京凤礼精求商贸有限公司); 2% 磷钨酸 (180328, 河南锐欣实验用品有

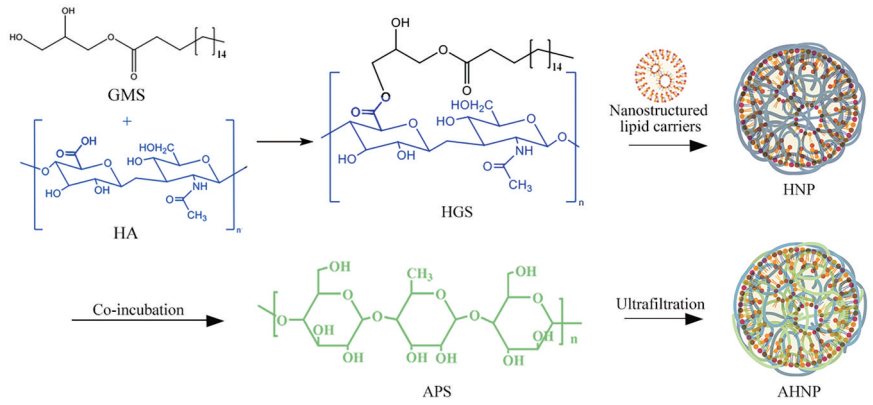


Figure 1 Schematic diagram of AHNP. GMS: Glycerol monostearate; HA: Hyaluronic acid; HGS: Hyaluronic acid-glycerol monostearate; HNP: Hyaluronic acid nanoparticles; APS: Astragalus polysaccharide; AHNP: APS-HGS hybrid nanoparticles

限公司); 胰酶、RPMI-1640基础培养基、FITC-CD45抗体、APC-eFlour780-CD3e抗体、PE-CD8抗体、APC-CD4抗体 (25200072、C11875500BT、11-0451-85、47-0031-82、12-0081-82、17-0042-82, 赛默飞世尔科技公司); 胎牛血清 (FSP500, 苏州依科赛生物科技股份有限公司); 青链霉素混合液、噻唑兰 (P1400、M8180, 北京索莱宝生物科技公司); 氢氧化钠 (1310-73-2, 上海迈瑞尔化学技术有限公司); 组织解离试剂盒 (130-096-730, 德国美天旎生物技术有限公司); 通用型组织固定液 (北京兰杰柯科技有限公司); 生理盐水 (科兴药业有限公司); 多柔比星盐酸盐 (E081569, 安徽泽升科技股份有限公司)。

仪器 高压均质机 (ATS AH-BASIC, 安拓思纳米技术有限公司); 激光粒度分析仪 (BT-9300ST, 丹东百特仪器有限公司); 透射电子显微镜 (JEM-1400 FLASH, 日本电子株式会社); 共聚焦荧光显微镜 (Stellaris 8)、正置荧光显微镜 (Leica THUNDER) (德国徕卡仪器有限公司); 倒置显微镜 (TS2-FL, 日本尼康株式会社); 恒温培养箱 (CellXpert C170, 德国艾本德股份公司); 酶标仪 (Multiskan FC, 赛默飞世尔科技公司); 组织处理器 (gentleMACS™, 德国美天旎生物技术有限公司); 流式细胞仪 (BD FACSymphony™ A1, 美国贝克顿·迪金森公司); 病理切片机 (SM2010R, 上海徕卡仪器有限公司); 全自动血液细胞分析仪 (BC-2800vet, 深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司); 全自动生化分析仪 (Chemray 800, 深圳雷杜生命科技有限公司)。

细胞 小鼠乳腺癌细胞 (mouse breast cancer cells, 4T1) 购自国家生物医学实验细胞资源库。

实验动物 BALB/c雌性小鼠, 6～8周龄, 购买自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 动物许可证为SCXK (京) 2021-0006。在光暗交替的环境下饲养, 保持在室温22 ± 2 ℃和湿度40%～70%条件下, 所有动物正常饮食, 保持自由饮水。实验动物的饲养和操作规程均遵守天津中医药大学实验动物饲养和使用的相关规定, 本研究所有动物实验均获得天津中医药大学动物实验伦理委员会批准 (No. 2023114)。

以黄芪多糖和透明质酸为载体制备莪术醇纳米制剂 采用高压均质法制备不同质量比的黄芪多糖和透明质酸修饰的莪术醇纳米制剂。HGS按照课题组既有方法合成[5]。称取15 mg HGS、不同质量的APS (0、7.5、15、30 mg) 及173 mg聚氧乙烯硬脂酸酯, 溶解于5 mL蒸馏水中, 形成水相; 称取10 mg CUL和30 mg大豆磷脂溶解于2 mL无水乙醇中, 另称取20 mg山嵛酸甘油酯和10 mg辛酸/癸酸三甘油酯溶于2 mL三氯甲烷中, 混合形成油相。随后, 在磁力搅拌条件下将油相缓慢加入水相中, 随后探头超声乳化5 min。所得初乳进一步经过高压均质处理, 直至乳液转为澄清透明, 得到低、中、高含量黄芪多糖纳米制剂 (CUL@A_LHNP、CUL@A_MHNP、CUL@A_HHNP) 和不含黄芪多糖的纳米制剂 (CUL@HNP)。

粒径与形貌表征 将样品均匀分散于水中, 使用激光粒度分析仪测定其粒径、多分散指数 (polymer dispersity index, PDI) 和zeta电位, 以评估制剂的粒径分布均匀性及体系稳定性。随后, 将样品分散于水中后滴加于铜网上, 晾干备用。采用透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 对样品进行高分辨率成像, 观察其粒子内部结构与表面形貌, 进一步分析其粒径与形貌特征。在此基础上, 采用与TEM相同的样品制备方法, 将样品置于高角环形暗场扫描透射电子显微镜 (high angle angular dark field-scanning transmission electron microscopy, HAADF-STEM) 中, 结合能量色散X射线光谱 (energy dispersive spectrometer, EDS) 技术分析其元素分布情况。

稳定性考察 将纳米制剂置于4 ℃条件下静置保存30天, 定期测定其粒径变化, 以评估其在低温条件下的储存稳定性。分别取1 mL纳米制剂, 用1 mL模拟胃液 (pH = 1.2) 和模拟肠液 (pH = 6.8) 进行稀释, 置于37 ℃的培养箱中。在模拟胃液中, 于0.5、1.0、1.5、2.0 h测定粒径变化; 在模拟肠液中, 于1、2、3、4、5、6、7 h进行粒径测定, 综合评价其在胃肠环境下的结构稳定性。

体外释药行为评价 采用透析法考察制剂的体外释放特性。将游离莪术醇 (CUL)、CUL@HNP和CUL@AHNP分别置于透析袋 (MWCO: 3 500 Da) 中, 每组平行设置3份。密封后将透析袋浸入模拟胃液 (SGF) 中, 置于恒温水浴振荡器, 在100 r·min^{-1}下持续振荡。在不同时间点 (30 min和1、2、4、6、8 h) 取出透析液样品, 并补充等体积新鲜释放介质, 样品经适当处理后用于后续药物释放量检测。

CUL的浓度通过气相色谱法测定, 色谱分析条件如下: 色谱柱为HP-5毛细管柱 (30 m × 0.25 mm, 膜厚0.25 μm); 载气为氦气 (纯度99.99%), 流速1.2 mL·min^{-1}; 进样量1 μL, 进样口温度270 ℃, 检测器温度280 ℃。柱温程序如下: 初始温度60 ℃维持2 min, 以10 ℃·min^{-1}升至160 ℃, 再以7 ℃·min^{-1}升至220 ℃并维持2 min, 最后以30 ℃·min^{-1}升至250 ℃并维持2 min。总分析时间为25.57 min。

细胞毒性实验 将对数生长期的细胞以每孔3×10^{3}个细胞的密度接种于96孔板中, 于37 ℃、5%

CO_2的细胞培养箱中孵育过夜, 待细胞完全贴壁后更换为含不同浓度药物的培养基, 每组设3个复孔, 继续孵育24 h。随后弃去培养基, 加入100 μL质量浓度为5 mg·mL^{-1}的MTT溶液, 避光孵育4 h。弃去上清后加入150 μL DMSO, 震荡15 min, 在490 nm波长下使用酶标仪测定各孔吸光度值。

平板克隆 将对数生长期细胞以每孔500个细胞的密度接种于6孔板中, 在37 ℃、5% CO_2条件下孵育24 h, 使其充分贴壁。随后更换为经培养基稀释的纳米制剂溶液, 每组设3个复孔, 继续孵育10天, 促进单细胞克隆集落的形成。培养结束后弃去上清, PBS清洗2次, 用甲醇固定15 min, 接着加入结晶紫染色液, 染色2 h。倒掉结晶紫, 用水清洗干净, 用水充分清洗并晾干, 拍照并进行集落计数。

细胞摄取实验 以天然荧光分子香豆素6 (coumarin 6, C6)为模型药物, 参照前述方法制备包载C6的纳米制剂, 用于评估其对细胞摄取的影响。将对数生长期细胞以2×10^{5}个细胞的密度接种于12孔板中, 在37 ℃条件下孵育过夜, 待细胞贴壁。随后弃去原有培养基, 分别加入含有游离C6或C6纳米制剂的培养基, C6质量浓度均为500 ng·mL^{-1}, 处理时间为2或4 h。处理结束后弃去培养基, PBS清洗两次, 收集细胞, 通过流式细胞仪检测细胞内荧光强度。

肿瘤球体渗透实验 将细胞以每孔500个细胞的密度接种于超低吸附96孔板中, 置于37 ℃的培养箱中, 培养过程中每隔2天更换一次新鲜培养基, 2～3天形成3D肿瘤细胞微球, 当球体直径达到300～400 μm时开始给药。给药后刺激6 h, 随后使用温PBS洗涤3D 4T1细胞微球2次, 以去除未结合的游离样品。固定过程使用4%多聚甲醛, 在室温下固定30 min。固定后, 使用共聚焦激光扫描显微镜, 以20×放大倍数和z-堆叠模式 (每层厚度为10 μm)捕获荧光图像。

免疫荧光 经过指定的处理后, 将细胞用4%多聚甲醛溶液固定10 min, 然后用0.1% Triton X-100室温通透10 min, 5% BSA封闭30 min。将细胞与抗HMGB-1抗体 (稀释度1∶200) 或抗CRT抗体 (稀释度1∶200) 在4 ℃下孵育过夜。次日, 用Alexa Fluor™ 488标记的二抗 (稀释度1∶500) 染色细胞1 h, 并在室温下用DAPI染色细胞核10 min。使用共聚焦显微镜拍摄荧光图像。

乳腺癌小鼠模型的建立及治疗方案 在适应饲养1周后, 将25只BALB/c雌性小鼠通过腹股沟第三乳腺脂肪垫每只注射2×10^{6}个4T1细胞悬液, 建立乳腺癌原位小鼠模型。每2天观察肿瘤体积, 待肿瘤体积达到约100 mm^{3}时, 随机分为5组, 每组5只, 分别为空白对照组、CUL@HNP组、CUL@AHNP组、DOX组和DOX与CUL@AHNP联用组。CUL@HNP和CUL@AHNP制剂通过口服灌胃给药, 每日20 mg·kg^{-1}; DOX溶解于无菌生理盐水, 腹腔注射, 每2天2 mg·kg^{-1}, 联用组每日灌胃CUL@AHNP制剂, 并且每两日腹腔注射DOX, 剂量同上。所有给药方案持续10天, 实验期间每日测量并记录小鼠肿瘤体积及体重。实验结束后, 所有小鼠通过脱颈处死, 收集肿瘤组织并记录肿瘤质量。通过比较各组小鼠肿瘤大小, 评估药物的抗肿瘤效果。

苏木精−伊红 (Hematoxylin and eosin, H&E) 染色 取肿瘤或器官组织, 固定于4%多聚甲醛溶液中, 随后进行梯度酒精脱水、二甲苯透明处理并石蜡包埋, 切片厚度为4 μm。脱蜡水化后, 苏木精染核5 min, 流水冲洗返蓝10 min, 1%盐酸酒精分化3 s, 伊红染胞质1 min; 依次经梯度酒精脱水、二甲苯透明, 中性树胶封片。通过显微镜观察细胞核 (蓝色) 与细胞质/基质 (粉红色) 结构, 评估组织病理学特征, 并进行形态学分析。

免疫组化 取石蜡包埋后的肿瘤组织切片, 进行脱蜡、水化及抗原修复处理。用3%过氧化氢溶液阻断内源性过氧化物酶活性, 随后用3% BSA封闭30 min, 接着加入配制的Ki67一抗, 4 ℃孵育过夜。洗涤后加入HRP标记的二抗, 室温孵育50 min; 采用3,3′-二氨基联苯胺 (3,3′-diaminobenzidine, DAB)显色液进行显色, 苏木素复染细胞核3 min, 脱水封片后显微镜观察。

流式细胞术检测肿瘤组织中T细胞数量 将收集的肿瘤组织剪碎成2～4 mm的小块, 使用组织解离试剂盒和gentleMACS™组织处理器进行消化和机械解离, 通过筛网过滤得到单细胞悬液。根据细胞沉淀的大小, 加入不同体积的PBS, 调整细胞浓度至每毫升1×10^{6}个细胞, 4 ℃保存。染色时, 取100 μL细胞悬液, 4 ℃、1 600 r·min^{-1}离心5 min, 弃上清, 使用FITC偶联的CD45抗体、APC-eFlour780偶联的CD3e抗体、PE偶联的CD8抗体、APC偶联的CD4抗体对细胞进行染色, 冰上避光染色40 min, 离心洗涤并收集细胞。最后, 通过流式细胞仪定量检测肿瘤组织中的T细胞。

肿瘤组织的免疫荧光实验 取各组小鼠部分肿瘤组织, 4%多聚甲醛固定、脱水及石蜡包埋后制备4 μm切片。经脱蜡水化及抗原修复后, 分别加入CRT和HMGB1一抗, 4 ℃孵育过夜, PBS洗涤后, 使用Alexa Fluor 594标记的二抗避光孵育1 h, DAPI染核后封片。使用共聚焦显微镜采集荧光图像。

肝功能和肾功能评价 将采集的小鼠新鲜血液在4 ℃下3 000 r·min^{-1}离心15 min, 以分离血清, 使用全自动生化分析仪检测小鼠肝肾功能。肝功能指标通过测

定丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 和天门冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 活性进行评估。ALT活性通过丙氨酸底物法测定, AST活性通过天门冬氨酸底物法测定。肾功能指标则通过测定尿素 (urea) 水平, 采用尿素酶–谷氨酸脱氢酶法, 严格按照试剂说明书的要求设置反应温度及样本与试剂的比例。每个样本的测定均重复3次。

统计学分析 所有数据分析均采用GraphPad Prism 8.0软件进行, 结果以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间差异采用 t 检验或单因素方差分析进行统计分析, $P < 0.05$ 表示各组数据间的差异具有统计学意义。

结果

1 CUL@AHNP的粒径及形貌表征

利用高压均质法成功制备了4种载药纳米粒, 包括不含黄芪多糖的CUL@HNP及含低、中、高浓度黄芪多糖的CUL@AHNP (CUL@A_LHNP, CUL@A_MHNP, CUL@A_HHNP)。粒径、PDI及zeta电位测定结果如表1所示。所有纳米粒粒径在116.4～128.3 nm之间, 结合粒径分布图及TEM图像可见 (图2A), 各组粒径分布集中且形态均一, 均呈球形结构, 符合纳米药物递送系统的基本要求。各组PDI值均小于0.4, 说明所得纳米粒分散性良好。Zeta电位绝对值处于28～32 mV区间, 表明其表面电荷排斥作用有效防止聚集, 为体内递送提供了物理基础。

HAADF-STEM联合能谱分析进一步展示了样品中元素的分布情况 (图2B), 碳元素主要集中在粒子内部, 而氧和磷元素则分布于外围。这表明纳米粒的外层可能由黄芪多糖、透明质酸及磷脂的亲水端组成, 形成稳定的亲水壳层, 从而包裹内部的亲脂性药物核心, 以提高纳米粒的结构完整性和生物稳定性。

Table 1 Particle size, polymer dispersity index (PDI) and zeta potential of preparations. CUL: Curcumol; CUL@A_LHNP: 7.5 mg APS; CUL@A_MHNP: 15 mg APS; CUL@A_HHNP: 30 mg APS. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

Preparation	Particle size/nm	PDI	Zeta potential/mV
CUL@HNP	124.4 ± 12.3	0.293 ± 0.019	−31.9 ± 0.9
CUL@A_LHNP	122.8 ± 9.5	0.301 ± 0.031	−29.1 ± 0.7
CUL@A_MHNP	116.4 ± 1.8	0.311 ± 0.029	−28.8 ± 2.5
CUL@A_HHNP	128.3 ± 8.1	0.385 ± 0.113	−28.8 ± 2.3

2 CUL@AHNP的稳定性评估

对于口服纳米制剂而言, 在胃肠道复杂环境中保持稳定性是其实现高效递药的关键前提。载药纳米粒在4 ℃储存7天内粒径基本保持不变, 体现出良好的低温储存稳定性 (图3A)。且4种纳米制剂在37 ℃模拟胃液和肠液稀释条件下均能维持稳定的粒径分布, 表明其在消化道环境中具有良好的结构稳定性与分散性 (图3B、C)。这种胃肠道适应性为口服递药提供了必要保障, 有助于提高药物的体内利用率, 降低降解风险。进一步通过体外释放研究评估纳米制剂的缓释行为 (图3D)。结果显示, CUL@HNP和CUL@A_MHNP有一定的缓释作用, 并在8 h内的累积释放率分别为 (89.09 ± 0.49)%和 (84.81 ± 1.96)%, 说明APS的加入减缓了CUL的释放速率。

3 CUL@AHNP抑制乳腺癌细胞的增殖

为评估CUL@AHNP的抗肿瘤潜力, 采用MTT实验评估其对乳腺癌4T1细胞的细胞毒性 (图4A～F)。结果表明, 随着药物浓度的增加, 细胞存活率显著下降。与游离的APS和CUL相比, CUL@HNP和CUL@AHNP在6.25～100 μg·mL^{-1}均展现出更强的细胞毒性, 尤其在浓

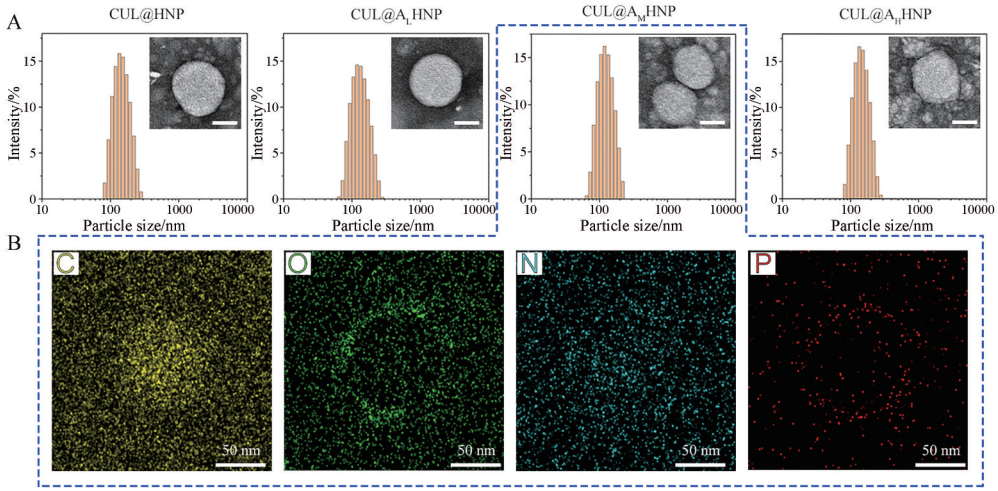


Figure 2 Characterization of preparation particle size and morphology. A: Particle size distribution and transmission electron microscope (TEM) images of CUL@HNP and CUL@AHNP. Scale bar = 100 nm; B: Energy spectrum analysis of CUL@A_MHNP. Scale bar = 50 nm

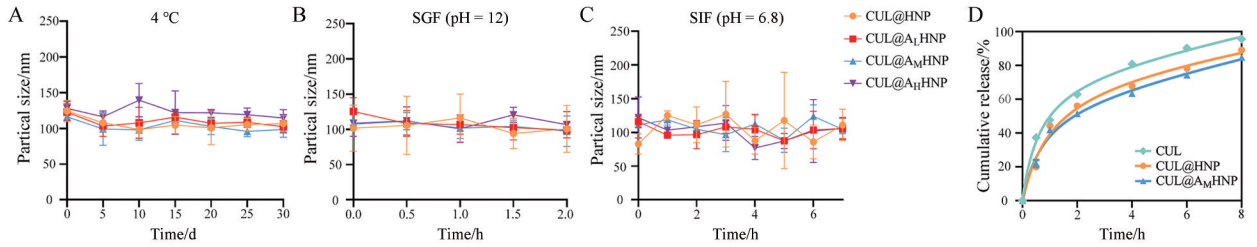


Figure 3 Stability assessment of CUL@HNP and CUL@AHNP. A: Storage stability in 4 ℃; B: Stability in simulated gastric fluid (SGF); C: Stability in simulated intestinal fluid (SIF); D: *In vitro* release of CUL from CUL solution and nanoparticles. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

度高于 50 μg·mL^{-1}时, 细胞存活率降至 10% 以下。进一步通过拟合细胞活性曲线计算 IC_{50} 值, 载药纳米制剂的 IC_{50} 均在 8.1～8.7 μg·mL^{-1}, CUL@HNP、CUL@A$_L$HNP、CUL@A$_M$HNP 和 CUL@A$_H$HNP 间无显著差异, 但远低于 CUL (110 μg·mL^{-1}) 和 APS (> 800 μg·mL^{-1}), 说明纳米化显著提升了药物活性, 可能与溶解性改善有关。

为进一步评估其对 4T1 细胞增殖能力的影响, 进行了平板克隆实验。CUL@HNP 及 CUL@AHNP 处理的克隆集落数量和密度明显减少, 部分集落形态不规则、体积缩小 (图 4G)。且对克隆数目进行了统计分析 (图 4H), 结果显示 CUL@A$_M$HNP 和 CUL@A$_H$HNP 的抑制效果更为显著。上述结果表明, 这些纳米制剂可有效抑制乳腺癌细胞的增殖与克隆形成能力, 具有良好的抗肿瘤应用价值。

4 CUL@AHNP 促进肿瘤渗透与细胞摄取

纳米药物在实体瘤治疗中常面临药物摄取与穿透受限的问题。本研究将香豆素 6 (C6) 包载入各类纳米粒中, 通过流式细胞术检测细胞内荧光强度 (图 5A～D)。与游离 C6 相比, C6@HNP 及 C6@AHNP 均显著提高了 4T1 细胞的药物摄取水平, 且在 2 和 4 h 的处理时间下, C6@A$_M$HNP 与 C6@A$_H$HNP 组的荧光强度更高, 表明其具有更强的摄取促进作用。通过共聚焦显微镜观察制剂对三维肿瘤球的渗透行为 (图 5E)。6 h 处理后, C6@A$_M$HNP 与 C6@A$_H$HNP 在球体核心区域的荧光信号最强, 明显优于其他组, 说明其在改善药物穿透肿瘤组织方面具有优势。

通过对 CUL@AHNP 的综合评价结果可见, CUL@A$_M$HNP 在细胞毒性、细胞摄取效率及肿瘤球渗透深度等关键指标上均表现出更为均衡和优越的性能。相比之下, 尽管 CUL@A$_H$HNP 在部分方面也具备一定优势, 但其粒径较大、PDI 相对较高, 可能在体内分布和组织渗透方面存在一定局限性。综上考虑, 后续试验采用 CUL@A$_M$HNP 作为代表性制剂进行深入研究。

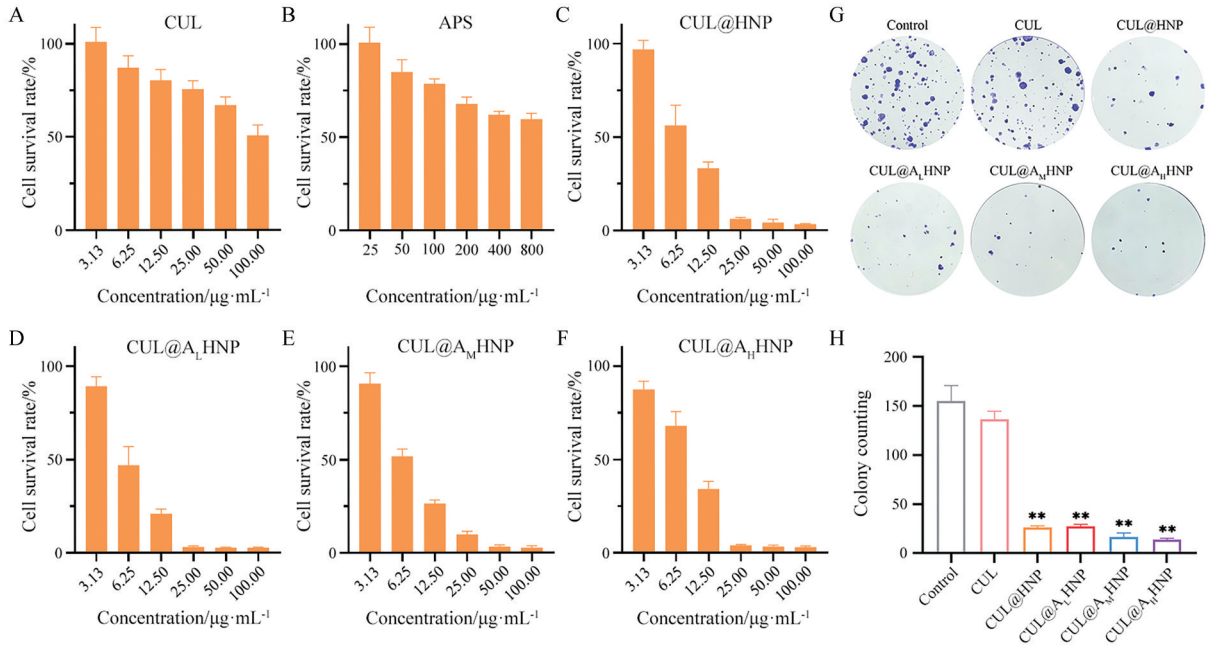


Figure 4 Cytotoxicity and clone formation inhibition of CUL@AHNP on breast cancer cells. A−F: Toxic effects on 4T1 cells; G, H: Effects on clone formation of 4T1 cells. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{**}P < 0.001$ *vs* control group

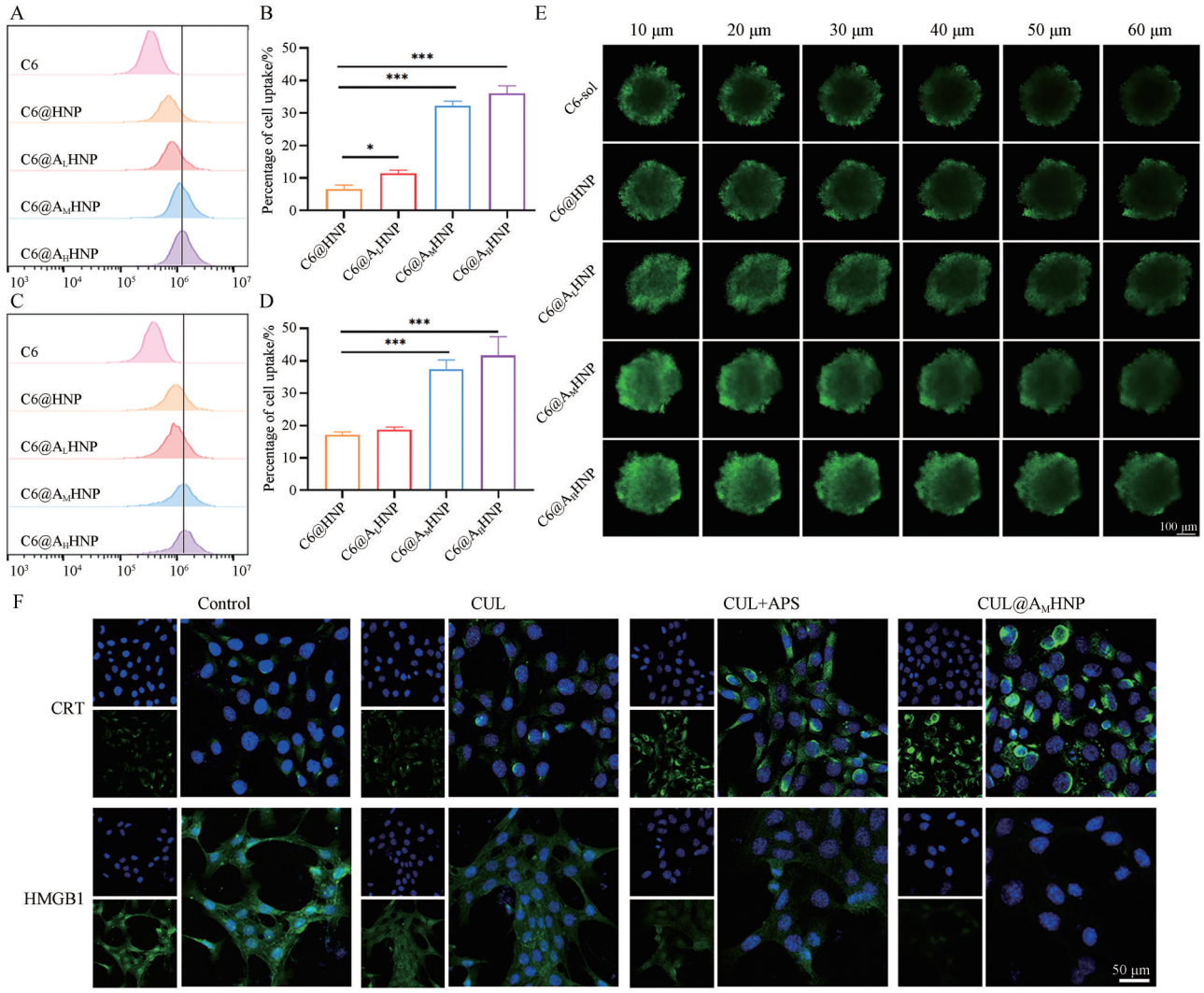


Figure 5 Cellular uptake, tumorsphere penetration, and ICD induction of nanoparticles. A, B: Uptake of C6@AHNP in 4T1 cells after 2 h; C, D: Uptake of C6@AHNP in 4T1 cells after 4 h. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$; E: Penetration ability of C6@AHNP in 3D 4T1 tumorspheres; F: Immunofluorescence detection of CRT exposure and HMGB1 release in 4T1 cells. ICD: Immunogenic cell death; CRT: Calreticulin; HMGB1: High mobility group box protein 1

5 CUL@AHNP诱导乳腺癌细胞免疫原性细胞死亡效应

为了探究CUL@AHNP在抗肿瘤免疫中的作用, 聚焦于其是否能够诱导免疫原性细胞死亡 (immunogenic cell death, ICD)。ICD是一种能够激活机体适应性免疫应答的程序性细胞死亡形式, 其发生过程中, 肿瘤细胞释放或暴露一系列损伤相关分子模式 (damage-associated molecular patterns, DAMPs), 如细胞膜表面钙网蛋白 (calreticulin, CRT) 的外露和高迁移率族蛋白B1 (high mobility group box protein 1, HMGB1) 的胞外释放, 从而增强抗原提呈与T细胞激活, 是肿瘤免疫治疗中的关键环节。因此, 检测了CUL@AHNP处理后4T1细胞中CRT和HMGB1的表达与定位变化, 以评估其诱导ICD的能力 (图5F)。CUL@AHNP处理后, 能够促进细胞膜表面CRT的表达和细胞核中HMGB1的易位, 并且强于游离的CUL, 说明CUL@AHNP能够更显著地诱导肿瘤细胞发生ICD, 为后续激发体内免疫应答奠定基础。

6 CUL@AHNP抑制小鼠体内乳腺癌的进程

为验证CUL@AHNP纳米制剂的体内抗肿瘤效果, 构建了BALB/c小鼠乳腺癌原位模型 (图6A)。结果显示, CUL@AHNP组、DOX组及DOX+CUL@AHNP联用组均显著抑制肿瘤生长, 相比之下, CUL@HNP组虽有一定抑制作用, 但无显著性差异 (图6B)。体重变化方面 (图6B), control组、CUL@HNP组、DOX组及联用组小鼠体重略有下降, 可能与肿瘤负荷引发的炎症及代谢异常有关。其中DOX组下降最明显, 提示其心脏毒性可能导致整体状态恶化。而CUL@AHNP组小

鼠体重保持相对稳定, 推测这与黄芪多糖调节免疫、改善整体机能有关。

治疗结束后, 收集肿瘤组织进行称重及组织学分析。CUL@AHNP 组、DOX 组、联用组有明显治疗效果, 3 组之间并无显著性差异 (图 6C、D)。证明 CUL@AHNP 的肿瘤治疗效果与阳性药 DOX 相当, 但毒性显著弱于 DOX。CUL@AHNP 与 DOX 联合用药组未观察到明显的药效协同作用, 可能与联合用药的剂量比例、给药时机及作用机制存在差异有关。尽管如此, 联合用药组的生物毒性还是弱于单独 DOX 组 (图 6B)。由 H&E 染色及免疫组化可知 (图 6E), 肿瘤坏死趋势为联用组 > DOX 组 > CUL@AHNP 组 > CUL@HNP 组 > control 组。各治疗组肿瘤组织中 Ki67 阳性细胞比例下降, 提示细胞增殖活性受到抑制, 其中联用组效果最显著, 提示其在抑制肿瘤细胞增殖方面具有协同优势。

7 CUL@AHNP 增强体内 T 细胞介导的免疫应答

为评估 CUL@AHNP 在体内诱导抗肿瘤免疫的能力, 采用流式细胞术对各组小鼠肿瘤组织中的 T 细胞亚群进行定量分析 (图 7A～C)。与对照组相比, CUL@AHNP 处理明显增强了 $CD8^+$ 细胞毒性 T 细胞 ($CD45^+CD3^+CD8^+$) 和 $CD4^+$ 辅助性 T 细胞 ($CD45^+CD3^+CD4^+$) 的肿瘤内浸润, 分别达到 (22.37 ± 4.08)% 和 (10.44 ± 5.59)%。说明该制剂可有效激活 T 细胞介导的免疫应答。此外, CUL@AHNP 与 DOX 联合使用后提升了 $CD8^+$ 和 $CD4^+$ T 细胞的占比, 其中 $CD4^+$ T 细胞较对照组差异具有统计学意义, 虽然在前文中肿瘤体积数据未见显著协同, 但联合组在免疫细胞激活方面表现出一定的增强趋势, 提示其在免疫调控方面具有协同潜力。而未含黄芪多糖的 CUL@HNP 组对 T 细胞浸润无明显影响, 进一步说明黄芪多糖是促进免疫激活的关键功能组分, 可能通过调节 T 细胞募集及活化, 增强肿瘤免疫微环境的响应性。

8 CUL@AHNP 诱导体内肿瘤 ICD 效应

为验证 CUL@AHNP 在体内诱导 ICD 的能力, 采用免疫荧光染色检测肿瘤组织中关键 ICD 标志分子的表达情况 (图 7D)。在 CUL@AHNP 组、DOX 组和联用组中, CRT 的表达水平发生明显升高, HMGB1 发生细胞

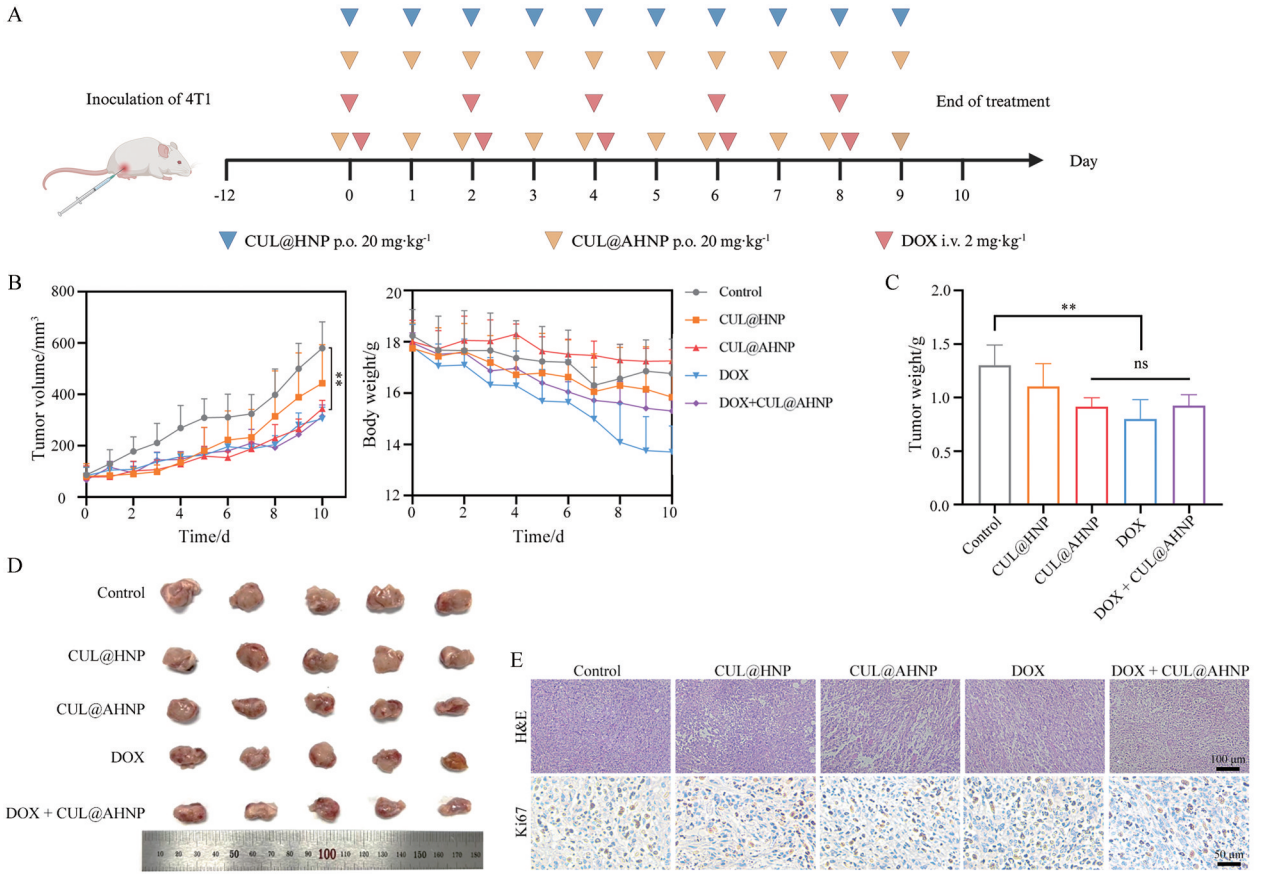


Figure 6 *In vivo* assessment of anti-tumor effect of CUL@AHNP. A: Schematic diagram of drug administration in mice; B: Tumor volume growth curves and body weight change curves of mice; C: Comparison of tumor end mass in different treatment groups. $n = 5$, $\bar{x} \pm s$. $^{**}P < 0.01$, ns: Indicates $P > 0.05$; D: Physical drawings of tumor tissues removed from mice. $n = 5$; E: Hematoxylin and eosin (H&E) staining and immunohistochemistry of tumor tissues

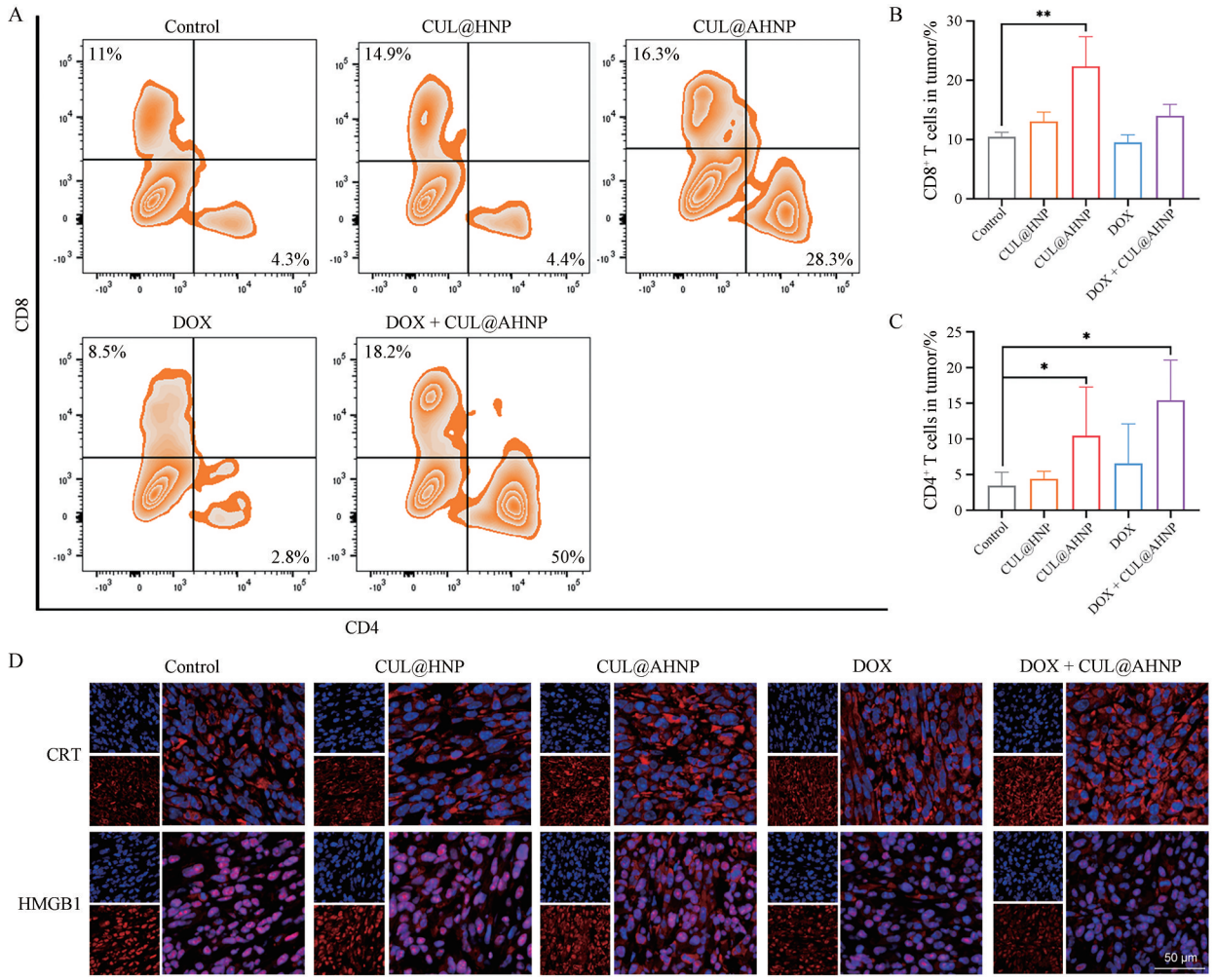


Figure 7 CUL@AHNP enhances T cell mediated immune response and induces ICD effect *in vivo*. A: Flow cytogram of $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells in tumor tissues; B: Proportion of $CD8^+$ T cells quantitative analysis; C: Quantitative analysis of the proportion of $CD4^+$ T cells. $n = 5$, $\bar{x} \pm s$. $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; D: Immunofluorescence analysis of CRT and HMGB1 in tumor tissue sections

核向胞外的易位, 提示肿瘤细胞经历了典型的ICD过程。并且联用组在两项指标中均表现出最强的诱导效果, 优于单药处理, 表明CUL@AHNP不仅自身具备诱导ICD的能力, 还可协同增强DOX的ICD效应, 进而进一步激活肿瘤相关的免疫应答, 提高抗肿瘤治疗效果。

9 CUL@AHNP的体内生物安全性评价

为系统评估CUL@AHNP纳米制剂的体内生物安全性, 首先检测小鼠血清中的肝功能指标 (ALT、AST) 和肾功能指标 (UREA) (图8A～C)。各组的生化指标均维持在正常范围内, 未出现肝细胞损伤或肾功能障碍, 提示制剂在代谢过程中未引起毒性积累, 具有良好的安全性。进一步通过H&E染色观察各组小鼠主要脏器 (心、肝、脾、肺、肾) 组织形态 (图8D)。除DOX组心肌组织出现核异形、纤维排列紊乱、肌纤维断裂及间隙增宽等典型心脏损伤特征外, 其余各组器官组织结构均保持完整, 未见明显病理性改变。相比之下, CUL@AHNP组未见心脏损伤表现, 提示其可能在一定程度上缓解了DOX所致的心脏毒性。该缓解作用可能与黄芪多糖的加入有关。DOX通过诱导活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 产生, 导致脂质过氧化及心肌细胞损伤, 而黄芪多糖具有良好的抗氧化活性, 可清除过量自由基, 降低丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 等氧化应激标志物水平, 从而减轻DOX诱导的氧化损伤[9]。综上所述, CUL@AHNP纳米制剂在发挥抗肿瘤免疫活性的同时, 展现出良好的生物相容性, 并协同缓解DOX相关的系统毒性, 具有良好的临床转化前景。

讨论

中医药在肿瘤治疗中的独特优势日益受到重视。中医学认为, 瘀血阻滞是肿瘤发生的重要病理基础, 而正气亏虚则是其发病的内在根源[10]。基于“扶正祛邪”

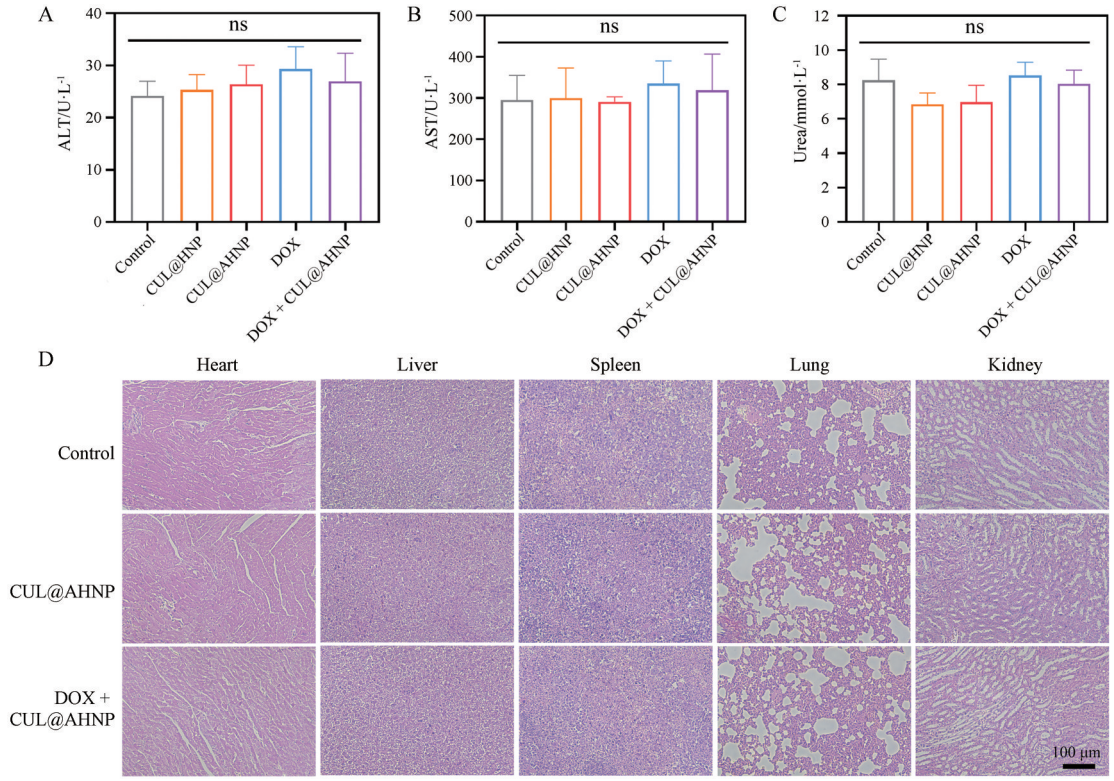


Figure 8 *In vivo* biosafety evaluation of the preparation. A−C: Analysis of serum liver and renal function indices of mice in each group; D: H&E staining of tissue sections of major organs of mice. ALT: Alanine aminotransferase; AST: Aspartate aminotransferase. $n = 5$, $\bar{x} \pm s$

的治疗原则, 黄芪与莪术被国医大师朱良春称为“益气化瘀”的经典药对[11]。其中, 黄芪具有补气固本、增强免疫的作用, 莪术则以活血化瘀、消积散结见长。两者协同应不仅可改善肿瘤微环境, 抑制肿瘤新生血管生成, 还在多项动物模型中表现出优于单药的抑瘤和抗转移效果[12-14]。不仅如此, 这一药对中的活性成分在理化性质上亦具有互补性。APS具有良好的增溶能力, 能够显著改CUL这一疏水性成分的溶解性, 从而提升其口服吸收效率和生物利用度。

在现代治疗需求的推动下, 中药活性成分的口服高效递送与免疫协同激活成为制剂设计的核心问题。乳腺癌作为一种典型的低免疫原性肿瘤, 传统治疗疗效有限, 免疫治疗正逐渐成为继手术、化疗和放疗之后的第四大治疗模式[15]。APS不仅具备增强免疫功能的药理特性, 还能通过M细胞介导的黏膜转运途径实现有效递送[16]。已有研究表明, APS可通过特异性识别高表达GP2的M细胞实现跨上皮转运, 随后被释放至肠道黏膜下层, 作用于树突状细胞 (dentritic cells, DCs) 及T细胞等关键免疫细胞, 从而诱导免疫应答, 推动全身免疫激活[17]。尽管本研究中尚未直接验证M细胞介导的吸收机制, 但这一途径的潜在作用值得进一步探索。

ICD作为免疫治疗中的重要机制, 指在免疫活性微环境中诱发适应性免疫反应的调节性细胞死亡 (regulated cell death, RCD) 形式[18]。经典化疗药物DOX是早期被证实具有ICD诱导能力的药物之一, 其通过阻断DNA和RNA合成, 激活Caspase-8通路杀伤肿瘤细胞[19]。然而, DOX存在较大的毒副作用, 其被动扩散容易损伤正常组织细胞, 增加系统毒性, 甚至上调免疫耐受阈值, 削弱其免疫激活效应[20]。相比之下, 本研究所采用的天然成分莪术醇, 不仅能促进DAMPs释放, 诱导ICD, 还具有毒性温和、不良反应小的优势, 展现出其在乳腺癌免疫治疗中的应用价值。

综上所述, 本研究构建的APS杂化口服纳米递药系统, 基于中医经典药对的协同理念, 实现了乳腺癌治疗中“抑瘤”与“助正”的统一。一方面APS作为载体成分兼具免疫活性与黏膜转运能力, 可高效激活机体免疫系统, 增强肿瘤免疫应答; 另一方面通过改善CUL的溶解性与口服生物利用度, 从而增强其ICD诱导作用。本系统在实现良好口服稳定性的基础上, 有效激活机体免疫系统, 为乳腺癌的治疗提供了一种更安全、高效、便捷的新型口服治疗模式。

致谢: 感谢天津中医药大学测试中心在本研究中提供的设备与技术支持。

作者贡献: 褚欣虹、张瑞萱负责主要实验设计、操作及文

章撰写; 沈诗阳、王辉协助实验操作与数据分析; 孙玉姣、李英鹏提出研究思路, 指导实验开展并参与论文修改。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

[1] Loibl S, Poortmans P, Morrow M, et al. Breast cancer [J]. Lancet, 2021, 397: 1750-1769.

[2] Huang J, Zhu Y, Xiao H, et al. Formation of a traditional Chinese medicine self-assembly nanostrategy and its application in cancer: A promising treatment [J]. Chin Med, 2023, 18: 66.

[3] Li CX, Liu Y, Zhang YZ, et al. Astragalus polysaccharide: A review of its immunomodulatory effect [J]. Arch Pharm Res, 2022, 45: 367-389.

[4] Zhang QW, Li LF, Hao S, et al. A lymphatic route for a hyperbranched heteroglycan from Radix Astragali to trigger immune responses after oral dosing [J]. Carbohydr Polym, 2022, 292: 119653.

[5] Wu YQ, Li JW, Liu L, et al. Hyaluronic acid nanoparticles for targeted oral delivery of doxorubicin: Lymphatic transport and CD44 engagement [J]. Int J Biol Macromol, 2024, 273: 133063.

[6] Zhao P, Qiu JF, Pan CL, et al. Potential roles and molecular mechanisms of bioactive ingredients in Curcumae Rhizoma against breast cancer [J]. Phytomedicine, 2023, 114: 154810.

[7] Wang ZH, Yan PH, Chao X. Progress in the study of curcumol's anti-tumor mechanisms [J]. J Changchun Univ Tradit Chin Med (长春中医药大学学报), 2022, 38: 703-708.

[8] Ma Z, Wang F, Jin X, et al. Preformulation study of curcumenol [J]. J Int Pharm Res (国际药学研究杂志), 2016, 43: 562-565.

[9] Liu YJ, Chen L, Wu H, et al. Delivery of astragalus polysaccharide by ultrasound microbubbles attenuate doxorubicin-induced cardiomyopathy in rodent animals [J]. Bioengineered, 2022, 13: 8419-8431.

[10] Zang WH, Tang DC. Basic research of anti-tumor effect though compatibility of *Astragalus mongholicus* and Rhizoma Curcumae [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med (辽宁中医药大学学报), 2013, 15: 143-145.

[11] Sun RL, Tang DC, Gu JF. Study on intervention effect of Astragali Radix-Curcumae Rhizoma on growth and metastasis of colon cancer in orthotopic transplantation mice model of colon cancer [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2021, 46: 2267-2275.

[12] Yuan DT, Zhang ZM, Gong R, et al. Astragali Radix-Curcumae Rhizoma drug pair inhibits growth of osteosarcoma by affecting cell adhesion and angiogenesis *via* PI3K/Akt/HIF-1α pathway [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2025, 50: 2217-2228.

[13] Zhang S, Tang DC, Jiang XY, et al. Huangqi-Ezhu in inhibiting hepatocellular carcinoma metastasis mediated by cancer-associated fibroblasts [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med (中药药理与临床), 2024. DOI:10.13412/j.cnki.zyyl.20241226.001.

[14] Yang Q, Sun Z, Zhu YM, et al. Astragali Radix-Curcumae Rhizoma combination inhibits proliferation, migration, and invasion of colon cancer HT-29 cells by regulating EMT [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2023, 48: 736-743.

[15] Geurts V, Kok M. Immunotherapy for metastatic triple negative breast cancer: Current paradigm and future approaches [J]. Curr Treat Options Oncol, 2023, 24: 628-643.

[16] Lv WW, Li K, Feng SH, et al. Preliminary study of the transport and absorption mechanism of astragalus polysaccharide-II on M cells [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2024, 59: 2820-2827.

[17] Zhang QW, Hao S, Li LF, et al. M cells of mouse and human Peyer's patches mediate the lymphatic absorption of an *Astragalus* hyperbranched heteroglycan [J]. Carbohydr Polym, 2022, 296: 119952.

[18] Kroemer G, Galassi C, Zitvogel L, et al. Immunogenic cell stress and death [J]. Nat Immunol, 2022, 23: 487-500.

[19] Sritharan S, Sivalingam N. A comprehensive review on time-tested anticancer drug doxorubicin [J]. Life Sci, 2021, 278: 119527.

[20] Kong CY, Guo Z, Song P, et al. Underlying the mechanisms of doxorubicin-induced acute cardiotoxicity: Oxidative stress and cell death [J]. Int J Biol Sci, 2022, 18: 760-770.