

# 载紫杉醇的大黄酸偶联物胶束的体外释放及抗肿瘤研究

黄彩霞, 欧阳惠枝, 黄秋萍, 陆伟利, 王晓颖\*, 徐伟\* (福建中医药大学药学院, 福州 350122)

**摘要:**目的 研究载紫杉醇的大黄酸偶联物(PTX/TPGS-CR)胶束的体外释放行为及其体外抗肿瘤效果。方法 采用透析法,以泰素(Taxol®)为对照,考察PTX/TPGS-CR胶束在不同释放介质中的释药行为。采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法,以Taxol®为对照,评估PTX/TPGS-CR胶束对小鼠乳腺癌4T1细胞的细胞毒性。通过流式细胞仪检测PTX/TPGS-CR胶束对人宫颈癌HeLa细胞的细胞周期、凋亡的影响。通过划痕实验考察PTX/TPGS-CR胶束对HeLa、4T1细胞迁移的影响。结果 体外释放实验结果显示,在pH 7.4磷酸盐缓冲液(PBS)中,PTX/TPGS-CR胶束在12和72 h内分别累积释放50.84%和71.38%;在模拟肿瘤微环境pH 5.8 PBS中,PTX/TPGS-CR胶束在12 h内累积释放79.19%,且72 h几乎完全释放。细胞毒试验结果显示,PTX/TPGS-CR胶束对4T1细胞表现出较强的肿瘤细胞增殖抑制作用,并呈时间和浓度依赖性,72 h时半抑制浓度(IC<sub>50</sub>)为0.321 9 nmol·mL<sup>-1</sup>。PTX/TPGS-CR胶束能引起HeLa、4T1细胞发生早期凋亡和晚期凋亡;可使HeLa细胞在PTX阻滞G2/M期的基础上同时增加G0/G1期阻滞,抑制细胞分裂增殖。PTX/TPGS-CR胶束能抑制HeLa、4T1细胞迁移,减少肿瘤转移。结论 PTX/TPGS-CR胶束具有很好的pH响应释药特征,在血液环境中缓释药物,而在肿瘤微环境中实现快速释药;具有很好的肿瘤增殖抑制效果,促进细胞凋亡,抑制肿瘤细胞迁移,具有较好的肿瘤治疗潜力。

**关键词:**紫杉醇;聚合物胶束;体外释放;抗肿瘤;细胞实验

doi:10.11669/cpj.2024.15.007 中图分类号:R944 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)15-1408-08

## In Vitro Release and Anti-Tumor Studies of Paclitaxel-Loaded Rhein Conjugate Micelles

HUANG Caixia, OUYANG Huizhi, HUANG Qiuping, LU Weili, WANG Xiaoying\*, XU Wei\* (College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To study the *in vitro* release behavior and anti-tumor effect of paclitaxel-loaded rhein conjugate (PTX/TPGS-CR) micelles. **METHODS** The *in vitro* drug release behavior of PTX/TPGS-CR micelles in different release media was investigated by dialysis method with Taxol® as the control. The cytotoxicity of PTX/TPGS-CR micelles on mouse breast cancer 4T1 cells was evaluated by MTT assay with Taxol® as a control. The effect of PTX/TPGS-CR micelles on the cell cycle and apoptosis of human cervical carcinoma HeLa cells was detected by flow cytometry. The effect of PTX/TPGS-CR micelles on the migration of HeLa and 4T1 cells was investigated by scratch experiments. **RESULTS** The results of *in vitro* release assay showed that 50.84% and 71.38% of PTX in PTX/TPGS-CR micelles were released in pH 7.4 phosphate buffer (PBS) within 12 and 72 h, respectively, 79.19% of PTX in PTX/TPGS-CR micelles were released in pH 5.8 PBS which simulated the tumor microenvironment within 12 h, and almost all of PTX in the micelles was released within 72 h. The results of the cytotoxicity assay showed that PTX/TPGS-CR micelles had a strong inhibitory effect on the proliferation of 4T1 cells and displayed a time-and-concentration-dependent characteristic, with IC<sub>50</sub> of 0.321 9 nmol·mL<sup>-1</sup> at 72 h. PTX/TPGS-CR micelles could induce early apoptosis and late apoptosis in HeLa and 4T1 cells. PTX/TPGS-CR micelles can induce HeLa cells arrest in G2/M phase (arrested by PTX) and G0/G1 phase, which inhibited cell division and proliferation. PTX/TPGS-CR micelles can inhibit the migration of HeLa and 4T1 cells and reduce tumor metastasis. **CONCLUSION** PTX/TPGS-CR micelles have good pH-responsive drug release characteristics, which can release drugs slowly in the blood environment and rapidly in the tumor microenvironment. PTX/TPGS-CR micelles could inhibit tumor cells proliferation and migration and promote cell apoptosis. PTX/TPGS-CR micelles have a good tumor treatment potential.

**KEY WORDS:** paclitaxel; polymeric micelle; *in vitro* release; anti-tumor; cell experiment

聚合物胶束(polymeric micelles, PMs)是一类由结构的聚集体<sup>[1-3]</sup>。其具有良好的自组装能力、增溶两亲性聚合物在水性溶剂中自发形成的具有壳-核疏水性药物的能力;可根据药物应用需要选择适宜

**基金项目:**国家自然科学基金项目资助(81603301);福建省科技厅引导性项目资助(2020Y0050)

**作者简介:**黄彩霞,女,硕士研究生 研究方向:中药制剂与炮制加工 \* **通讯作者:**王晓颖,女,博士,教授,硕士生导师 研究方向:缓控释及靶向药物制剂研究 Tel:(0291)22861135;徐伟,男,博士,教授,博士生导师 研究方向:中药药效物质基础及作用机制研究 Tel:(0591)22861693

的胶束载体材料;可通过在胶束的亲水链段连接特异性抗体、配体或某些刺激敏感系统等,实现药物定位传递<sup>[4-6]</sup>。

羧甲基壳聚糖(carboxymethyl chitosan, CMCS)为壳聚糖水溶性衍生物,具有良好的生物相容性、抗菌活性及生物降解性等<sup>[7-8]</sup>。CMCS上具有多种官能团,例如-NH<sub>2</sub>、-OH和-COOH,具有良好的可修饰性<sup>[9]</sup>。大黄酸(rhein, R)是一种广泛存在于中草药中的蒽醌类化合物,具有多种药理活性。近年来发现该成分可通过调控多种分子、信号途径来发挥抗肿瘤作用<sup>[10]</sup>,且与抗肿瘤药物紫杉醇(paclitaxel, PTX)在体外实验中表现出协同抗肿瘤作用<sup>[6]</sup>。目前,作为P-糖蛋白抑制剂的D- $\alpha$ -生物酚聚乙二醇1 000琥珀酸酯(D- $\alpha$ -tocopheryl polyethylene glycol 1 000 succinate, TPGS)能减少由能量依赖性外排泵引起的药物流出<sup>[11-12]</sup>,已经被广泛应用于逆转癌症多药耐药(multidrug resistance, MDR)的研究。

本课题组前期通过丁二酸酐(SA)开环反应,合成TPGS-SA中间体,然后通过酰化反应,将TPGS-SA与疏水性R接枝于亲水骨架CMCS上,制备了两亲性TPGS修饰的羧甲基壳聚糖-大黄酸偶联物(TPGS-CR)并确定了其结构<sup>[13]</sup>。该偶联物能在水中自组装成胶束并能包载PTX,课题组优化了载PTX的TPGS-CR偶联物胶束(PTX/TPGS-CR PMs)制备工艺,并对其安全性进行了初步研究<sup>[14]</sup>。本实验将进一步研究PTX/TPGS-CR PMs在不同释放介质中的释药行为,考察PTX/TPGS-CR PMs的细胞毒性及其对细胞周期、细胞凋亡及迁移的影响,为其体内抗肿瘤研究提供依据。

## 1 材料

### 1.1 试剂

TPGS-CR偶联物(自制);PTX/TPGS-CR胶束[自制,PTX载药量为(44.17 $\pm$ 0.64)%];紫杉醇(PTX,上海金和药业有限公司,批号:201801004,纯度>98%);多西紫杉醇(DTX,上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:20180322,纯度>98%);泰素®(Taxol®,百时美施贵宝,批号:7J04591);四甲基偶氮唑蓝(MTT,德国Bio Froxx公司,1334MG250);96孔细胞培养板、流式细胞管(12 mm $\times$ 75 mm,5 mL)(康宁公司);细胞周期检测试剂盒(凯基生物科技有限公司,KGA512);细胞凋亡检测试剂盒(大连美伦生物技术有限公司,MA0334);二甲亚砜(DMSO,国药集团试剂有限公

司,分析级);聚氧乙烯蓖麻油(阿拉丁试剂有限公司,C1812053);乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器

高效液相色谱仪(LC20-AT型,日本岛津公司);电热恒温振荡水槽(DKZ型,上海一恒科技公司);细胞培养箱(Thermo 311型,美国Thermo公司);多功能酶标仪(Infinite M200Pro型,瑞士TECAN公司);十万分之一电子天平(MS105DU型,瑞士METTLER TOLEDO集团);流式细胞仪(FACSCanto™ II型,美国碧迪公司);倒置显微镜(CKX31型,日本OLYMPUS公司)。

### 1.3 细胞株

人宫颈癌(HeLa)细胞、小鼠乳腺癌(4T1)细胞购自中国科学院上海细胞库。

## 2 方法

### 2.1 PTX含量测定方法的建立

**2.1.1 HPLC法色谱条件** 色谱柱:Platisil ODS(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu$ m);流动相:乙腈-水(55:45),流速:1.0 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>;柱温:30  $^{\circ}$ C;检测波长:227 nm;进样量:20  $\mu$ L。

**2.1.2 标准曲线的制备** 精密称定PTX 3.0 mg,置10 mL的量瓶中,加乙腈稀释至刻度线,得300  $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup>的储备液。以乙腈为溶剂,逐步稀释该储备液得质量浓度分别为25、20、15、10、7.5、5、2.5、1  $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup>的PTX溶液。于10 mL离心管中加各浓度的PTX溶液200  $\mu$ L和内标DTX(50  $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup>)的乙腈溶液100  $\mu$ L,挥干溶剂后,加入5 mL的空白释放介质。所有样品分别用二氯甲烷3 mL进行萃取,涡旋5 min,收集2.5 mL二氯甲烷萃取液至5 mL离心管中,真空抽干溶剂,用200  $\mu$ L乙腈涡旋5 min复溶,14 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup>离心10 min,取上清液按“2.1.1”项下色谱条件测定,记录PTX和DTX的峰面积。以A<sub>PTX</sub>与A<sub>DTX</sub>的峰面积比值(Y)对PTX质量浓度( $\rho$ )作图,得回归方程,每分析批建立1条标准曲线。

**2.1.3 精密度** 配制PTX低、中、高(2、5、10  $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup>)质量浓度的样品按“2.1.2”项下方法处理分析样品,当天连续测定5次,连续测定3 d,计算日内、日间精密度。

**2.1.4 提取回收率** 使用PTX低、中、高(2、5、10  $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup>)质量浓度的样品测得峰面积A<sub>1</sub>。取空白介质同“2.1.2”项下方法处理分析样品,在萃

取所得的上清液中加入低、中、高质量浓度的 PTX 标准液,之后操作同前,测得峰面积  $A_2$ 。 $A_1/A_2$  即为提取回收率。

## 2.2 体外释放实验

采用透析法,以 pH 7.4、5.8、4.5 的磷酸盐缓冲液(PBS)加水杨酸钠(浓度为  $0.8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )作为释放介质,评估 PTX/TPGS-CR PMs 在不同释放介质中的释放 PTX 的情况。

取 PTX/TPGS-CR PMs 冻干品,精密称定,加入 0.9% 氯化钠注射液探头超声溶解稀释,加释放介质稀释至含 PTX 质量浓度为  $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,立即取 1 mL 于透析袋[截留相对分子质量(MWCO) = 14 000]内,密封后浸没于盛有 100 mL 释放介质的烧杯内,在  $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  和  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  下进行 PTX/TPGS-CR PMs 在不同 pH 释放介质中的体外释放实验。按设定时间间隔(0.25、0.5、1、2、4、6、8、12、24、36、48、60 和 72 h),取释放液 5 mL 置于 10 mL 离心管(其内有已挥干乙腈溶剂的内标 DTX  $5 \mu\text{g}$ )中,同时补充等体积的空白释放介质,样品用二氯甲烷 3 mL 进行萃取(pH 为 5.8 和 4.5 的释放液萃取前调 pH 为中性),涡旋 5 min,收集二氯甲烷萃取液 2.5 mL 于 5 mL 离心管中,真空抽干溶剂,用 200  $\mu\text{L}$  乙腈涡旋 5 min 复溶,  $14\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,取上清液,按“2.1.1”项下 HPLC 法色谱条件测定释放液中的 PTX 量,计算累积释放量,绘制释放曲线。实验以 PTX 市售制剂 Taxol<sup>®</sup> 注射液为对照。每种介质中的释放平行操作 3 份,并使透析袋透过面积大小相等。累积释放百分率( $Q_t$ )的计算见公式 1。

$$Q_t(\%) = (\rho_n \times V + \sum_{n=1}^{n-1} \rho \times V_0) / M \times 100\%$$

公式(1)

公式中, $\rho_n$  为第  $n$  次取样时释放液中 PTX 的质量浓度, $V$  为总释放介质体积, $V_0$  为取样体积, $M$  为用于释放的 PTX 总量。

## 2.3 细胞培养及传代

当培养瓶中细胞贴壁达 80% ~ 90% 后可进行传代培养。将质量分数 0.25% 胰蛋白酶预热。弃旧培养基,加入 1 ~ 2 mL PBS,洗涤后弃去,洗涤 2 次。加 1 mL 胰酶,培养箱中孵育消化,细胞变圆且间隙增大、轻拍瓶壁见细胞脱落时即可停止,加入 2 mL 完全培养基终止消化。轻敲打瓶壁上的细胞,使脱落成细胞悬浮液,  $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 4 min,弃上清液,加适量完全培养液重悬,1:3 ~ 1:4 比例传代,继续培养。

## 2.4 细胞毒性实验

取处于对数生长的 4T1 细胞,消化并调整浓度至  $5 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ ,向 96 孔板中加入 100  $\mu\text{L}$  细胞悬浮液,孵育 24 h,小心吸去培养液。加入用完全培养液稀释配制的浓度梯度实验药液,每孔 150  $\mu\text{L}$ ,每个浓度平行 6 个孔,含细胞不给药物即正常组,设置空白对照组。试验药液包括 Taxol<sup>®</sup> 注射剂的混合溶剂(蓖麻油聚氧乙烯醚-无水乙醇 = 1:1)组、TPGS-CR 偶联物组、Taxol<sup>®</sup> 组和 PTX/TPGS-CR PMs 组。混合溶剂和 TPGS-CR 偶联物浓度按其在相应浓度的 Taxol<sup>®</sup> 和 PTX/TPGS-CR PMs 中的量计算。加药后 24、48 和 72 h 取出,吸除上清液,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  PBS 稀释的 MTT 溶液( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),孵育 4 h,轻轻吸弃上清。每孔用 150  $\mu\text{L}$  的 DMSO 溶解甲瓚结晶。酶标仪测定吸光度值(570 nm)。细胞的存活率按公式 2 计算:

$$\text{细胞存活率}(\%) = (A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{正常组}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$$

公式(2)

公式中, $A_{\text{实验组}}$  是实验组的吸光度, $A_{\text{正常组}}$  是空白培养基处理细胞的吸光度, $A_{\text{空白}}$  是空白培养基的吸光度。

## 2.5 细胞凋亡实验

将 HeLa 细胞接种  $3 \times 10^5$  个细胞于 6 孔板上,培养 24 h 贴壁,弃去培养液,PBS 轻轻冲洗细胞 2 次,设置正常对照组、PTX/TPGS-CR PMs ( $10 \text{ nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 组,每组设置 3 个复孔,每孔加入含药和非含药完全培养基 2.5 mL。继续培养,作用时间截止后进行凋亡测定。操作步骤如下:分别收集各复孔上清液,用 PBS 清洗后再次收集,加不含乙二胺四乙酸(EDTA)的质量分数 0.25% 胰蛋白酶消化并收集,用  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  PBS 洗涤 3 遍。每管加 200  $\mu\text{L}$  预冷的  $1 \times$  Binding Buffer,重悬细胞。加入 Annexin V-FITC 后加入碘化丙啶(propidium iodide, PI)工作液(各 5  $\mu\text{L}$ ),小心混匀。室温条件下避光染色 15 min。加入 300  $\mu\text{L}$   $1 \times$  Binding Buffer,混匀后,过 200 目细胞筛网,移入流式管,立即上机检测。

## 2.6 细胞周期实验

将  $3 \times 10^5$  个 HeLa 细胞接种于 6 孔板上,培养 24 h,PBS 冲洗细胞 2 遍,分别加入完全培养基、Taxol<sup>®</sup>、PTX/TPGS-CR PMs (PTX 浓度为  $0.2 \text{ nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 培养,每孔 2 mL,每组平行 3 份。收集各培养液,消化收集到离心管中, $4 \text{ }^\circ\text{C}$  PBS 重悬清洗 2 次,体积分数 70% 冷乙醇 0.5 mL 固定过夜,  $2\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 4 min,经  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  PBS 清洗 3 次,用

细胞周期检测试剂盒进行染色,避光孵育 1 h,流式细胞仪测不同组别和处理时间对细胞周期的影响,Modfit 5.0 软件分析实验数据。

### 2.7 细胞划痕实验

取对数期生长的迁移作用较强的 4T1、HeLa 细胞,分别接种  $3 \times 10^5$  个细胞于 6 孔板中,每组 3 个复孔,每孔含培养基 2.5 mL,至细胞分布均匀。将 6 孔板于培养箱中培养 24 h(此时细胞密度应大于 90%)。24 h 后弃上清,清洗 2 遍,200  $\mu$ L 枪头沿 6 孔板底部十字标记,垂直于底部快速划出空白划痕带,每孔划痕枪头尽量使用同一枪头,用 PBS 清洗 3 遍洗去刮下的细胞,并在倒置显微镜下检查划痕处是否清洗干净。设置对照组、PTX/TPGS-CR PMs ( $10 \text{ nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 组,每孔加含药和不含药空白培养基 2.5 mL 以避免由于细胞增殖导致的迁移假象。置于倒置显微镜下进行 0 h 的拍照( $\times 100$ )。拍照完毕后放入培养箱中培养,24 和 48 h 后于倒置显微镜下进行观察拍照。

## 3 结果

### 3.1 PTX 含量测定方法的建立

PTX 含量的测定按“2.1.1”项下条件分析。以  $A_{\text{PTX}}$  与  $A_{\text{DTX}}$  的比值( $Y$ )对释放介质中 PTX 的质量浓度( $\rho$ ,  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )作图,得回归方程为  $Y = 0.0612\rho + 0.226$  ( $r^2 = 0.999$ ),结果表明,PTX 在  $1 \sim 20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内线性关系良好。

低、中、高 3 种浓度的 PTX 样品的日内精密度分别为  $(2.06 \pm 0.04)$  ( $5.02 \pm 0.06$ ) 及  $(10.04 \pm 0.19)$ ,相对标准偏差(RSD)分别为 1.94%、1.16% 及 1.89%;日间精密度分别为  $(2.08 \pm 0.03)$  ( $5.06 \pm 0.06$ ) 及  $(9.97 \pm 0.18)$ ,RSD 分别为 1.54%、1.25% 及 1.81%;RSD 均  $< 2\%$ ,表明该方法日内、日间精密度良好。

低、中、高 3 种浓度的 PTX 样品的回收率分别为  $(99.28 \pm 1.28)\%$ 、 $(99.08 \pm 1.88)\%$  以及  $(99.02 \pm 1.97)\%$ ,RSD 分别为 1.29%、1.90% 及 1.99%。

上述实验数据表明,PTX 含量测定符合方法学要求。

### 3.2 体外释放实验

PTX/TPGS-CR PMs 及 Taxol<sup>®</sup> 在不同释放介质中的释放曲线见图 1。实验结果显示,在 pH 值 7.4 PBS 中,Taxol<sup>®</sup> 释药速度较快,12 h 时已释放 71.45%,24 h 累计释放率达到 80% 以上。由于

Taxol<sup>®</sup> 中 PTX 处于游离状态,且其相对分子质量较小,可以自由通过透析袋,因而快速释药并达到平衡状态。而 PTX/TPGS-CR PMs 12 h 释放 50.84%,72 h 内累积释放 71.38%,PTX/TPGS-CR PMs 中药物释放速度显著慢于 Taxol<sup>®</sup>。说明 PTX/TPGS-CR PMs 在模拟血液环境 pH 条件下有一定的缓释特征,该缓释行为有利于递送 PTX 至肿瘤部位,减少 PTX 对正常组织的损伤。

PTX/TPGS-CR PMs 在模拟肿瘤微环境的 pH 值 5.8 PBS 中释放较快。数据显示,12 h PTX 累积释放了 79.19%,72 h 基本释放完全,呈现速释的效果。推测 PTX/TPGS-CR PMs 在体内达到肿瘤微环境后,快速释药,能使 PTX 更好地发挥抗肿瘤作用。而模拟肿瘤溶酶体内环境的 pH 值 4.5 PBS 中,PTX/TPGS-CR PMs 36 h 内释放速度较缓,其中,12 h 仅释放 26.9%,其原因有待进一步研究。

用 Origin 软件对体外释药数据进行零级、一级、Higuchi、Weibull 模型拟合结果见表 1。Taxol<sup>®</sup> 在 pH 值 7.4 PBS 和 PTX/TPGS-CR PMs 在 pH 7.4、5.8、4.5 PBS 中的释放动力学模型皆以 Weibull 模型拟合效果最好(表 1), $r^2$  分别 0.991、0.972、0.980 及 0.990。

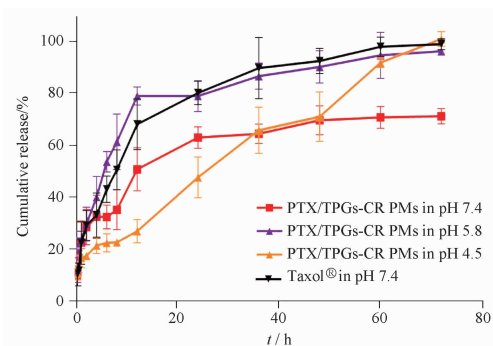


图 1 载紫杉醇 D- $\alpha$ -生物酚聚乙二醇 1 000 琥珀酸酯修饰的羧甲基壳聚糖-大黄酸偶联物胶束(PTX/TPGS-CR PMs)体外释放曲线。 $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 1 *In vitro* release curves of PTX/TPGS-CR PMs.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

### 3.3 细胞毒性实验

TPGS-CR 偶联物与 PTX/TPGS-CR PMs 对 4T1 细胞的细胞毒结果见图 2。等于或高于与 PTX  $10 \text{ nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$  对应的溶剂浓度的混合溶剂组,随着时间的延长细胞存活率急剧下降,存活率低。而 TPGS-CR 偶联物在 48 h 内对 4T1 细胞的存活率并没有显著影响,细胞存活率均在 90% 以上;相对于蓖麻油聚氧乙烯醚的强非特异细胞毒性相比,

表 1 PTX/TPGS-CR PMs 体外释放曲线拟合方程

Tab. 1 *In vitro* release curve fitting equation of PTX/TPGS-CR PMs

Model	Taxol® in pH 7.4		PTX/TPGS-CR PMs in pH 7.4		PTX/TPGS-CR PMs in pH 5.8		PTX/TPGS-CR PMs in pH 4.5	
	Equation	$r^2$	Equation	$r^2$	Equation	$r^2$	Equation	$r^2$
Zero-order kinetics	$Q_t = 1.208t + 30.641$	0.786	$Q_t = 0.791t + 27.122$	0.777	$Q_t = 1.053t + 36.920$	0.695	$Q_t = 1.256t + 14.34$	0.989
First-order kinetics	$Q_t = 94.256(1 - e^{-0.108t})$	0.960	$Q_t = 67.885(1 - e^{-0.133t})$	0.858	$Q_t = 89.893(1 - e^{-0.164t})$	0.946	$Q_t = 117.74(1 - e^{-0.023t})$	0.918
Higuchi	$Q_t = 11.690t^{1/2} + 12.526$	0.938	$Q_t = 7.654t^{1/2} + 15.275$	0.927	$Q_t = 10.431t^{1/2} + 20.234$	0.876	$Q_t = 11.04t^{1/2} - 0.336$	0.954
Weibull	$Q_t = 101.76(1 - e^{-(0.076(t+0.49))^{0.744}})$	0.991	$Q_t = 73.46(1 - e^{-(0.078(t+1.7))^{0.077}})$	0.972	$Q_t = 93.9(1 - e^{-(0.125(t+0.47))^{0.76}})$	0.980	$Q_t = 178.95(1 - e^{-(0.0103(t+11.55))^{1.12}})$	0.990

TPGS-CR 偶联物具有较好的安全性。随着TPGS-CR 偶联物浓度进一步升高及作用时间的延长,72 h 时,与 PTX 50 nmol · mL<sup>-1</sup> 对应浓度的 TPGS-CR 偶联物在 4T1 细胞上显示出一定程度的细胞增殖抑制效果(72 h 抑制率为 32.31%)。说明随作用时间的延长,TPGS-CR 偶联物也能够发挥一定的抗肿瘤作用,有助于所装载的 PTX 杀伤肿瘤细胞。

Taxol® 和 PTX/TPGS-CR PMs 均对 4T1 细胞有一定的抑制增殖作用,并随作用时间延长抑制能力增强,同时呈现浓度依赖性抑制作用效果。72 h 时,Taxol® 和 PTX/TPGS-CR PMs 对 4T1 细胞的半抑制浓度

(IC<sub>50</sub>)分别为 0.257 3 和 0.321 9 nmol · mL<sup>-1</sup>,表明 Taxol® 及 PTX/TPGS-CR PMs 对 4T1 细胞皆具有良好的杀伤作用。在实验测试浓度范围内,大于 PTX 5 nmol · mL<sup>-1</sup> 时,Taxol® 的肿瘤杀伤作用很大程度上是由于其增溶剂蓖麻油聚氧乙烯醚引起的,这也是 Taxol® 常引起不良反应的原因。而 PTX/TPGS-CR PMs 的细胞杀伤作用在 48 h 内及低于 PTX 10 nmol · mL<sup>-1</sup> 的 72 h 内与 TPGS-CR 偶联物无关。TPGS-CR 偶联物的安全性决定了其形成的胶束包载并在体内递送 PTX 时,能减少 PTX 对机体的毒副作用。

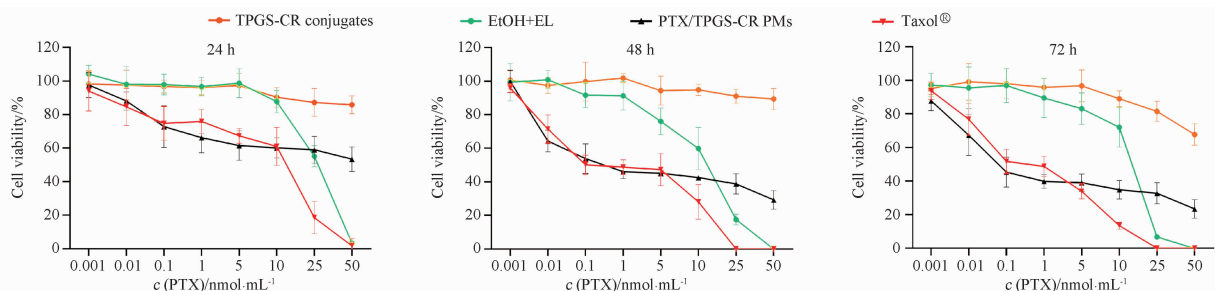


图 2 D-α-生物酚聚乙二醇 1 000 琥珀酸酯修饰的羧甲基壳聚糖 - 大黄酸 (TPGS-CR) 偶联物与 PTX/TPGS-CR PMs 对 4T1 细胞的细胞毒性。n = 6,  $\bar{x} \pm s$

Fig. 2 Cytotoxicity of TPGS-CR conjugates and PTX/TPGS-CR PMs on 4T1 cells. n = 6,  $\bar{x} \pm s$

### 3.4 细胞凋亡实验

流式细胞仪检测 PTX/TPGS-CR PMs 对 HeLa、4T1 细胞的凋亡影响,结果见图 3。左上限为物理损伤细胞,左下限为正常细胞,右上限为晚调细胞,右下限为早调细胞。PTX/TPGS-CR PMs 对 HeLa、4T1 细胞凋亡率的影响见表 2。PTX/TPGS-CR PMs 浓度为 10 nmol · mL<sup>-1</sup> 时,HeLa、4T1 细胞凋亡率随着作用时间延长逐渐增加。HeLa 细胞的存活率与凋亡率相关<sup>[14]</sup>,可见 PTX/TPGS-CR PMs 对 HeLa 细胞的抑制作用主要是通过引起 HeLa 发生凋亡实现的。结合上述 4T1 细胞毒实验,PTX/TPGS-CR PMs 对 4T1 细胞的杀伤作用在一定程度上与其影响了 4T1 细胞凋亡有关。

### 3.5 细胞周期实验

流式细胞仪检测各制剂作用于 HeLa 细胞后的细胞周期检测结果见图 4,表 3。可见,0.2 nmol · mL<sup>-1</sup> PTX 浓度下,PTX/TPGS-CR PMs 和 Taxol® 使 HeLa 细胞的细胞产生了明显的变化,Control 组的细胞周期主要分布在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期。两组制剂均能使更多细胞阻滞于 G<sub>2</sub>/M 期,抑制作用随时间延长而更加明显。与 Taxol® 相比,PTX/TPGS-CR PMs 还能使较多细胞阻滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期,可能由于载体材料中大黄酸具有阻滞细胞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期作用<sup>[15]</sup>。由此可见,TPGS-CR PMs 与 PTX 能共同阻滞细胞周期,从而共同抑制肿瘤细胞有丝分裂,促进早期凋亡。

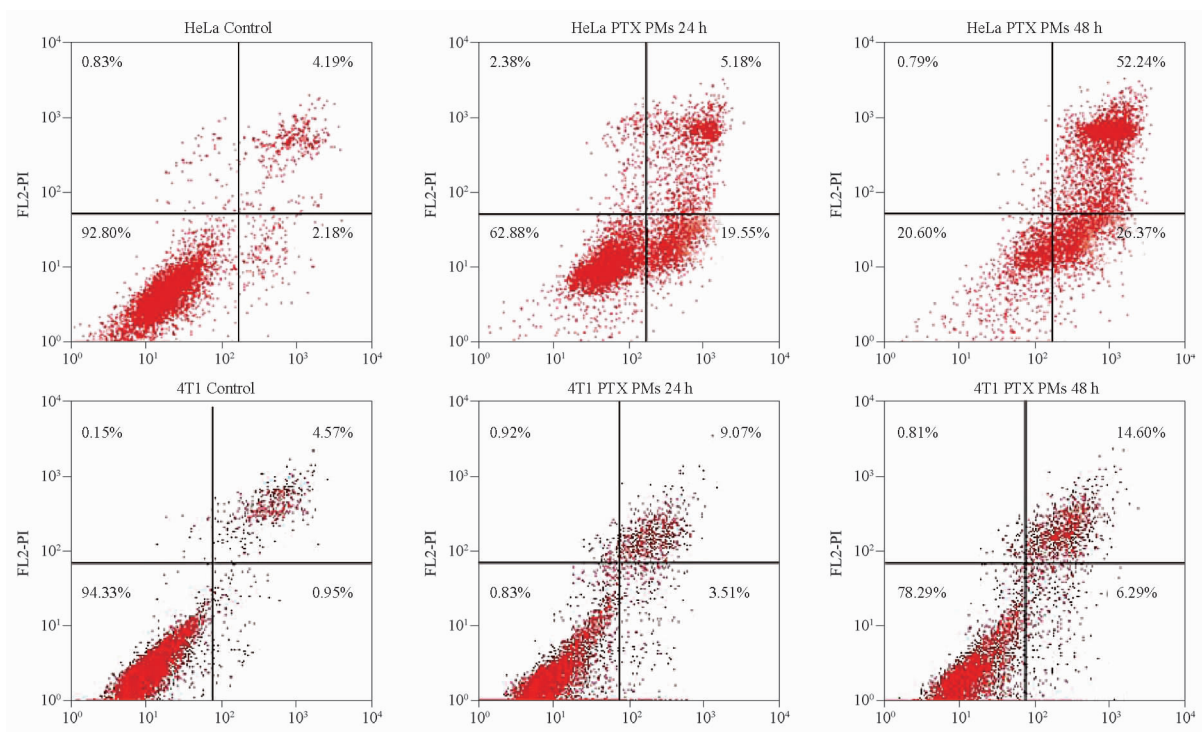


图3 PTX/TPGS-CR PMs 对 HeLa,4T1 细胞凋亡影响的流式细胞图

Fig. 3 Flow cytometry of the effect of PTX/TPGS-CR PMs on apoptosis of HeLa and 4T1 cells

表2 PTX/TPGS-CR PMs 对 HeLa,4T1 细胞凋亡率的影响。n = 3,  $\bar{x} \pm s$

Tab. 2 Effects of PTX/TPGS-CR PMs on apoptosis rate of HeLa and 4T1 cells. n = 3,  $\bar{x} \pm s$

Cells	Groups	t/h	Early apoptosis/%	Late apoptosis/%	Total apoptosis/%
HeLa	Control		3.28 ± 1.31	5.38 ± 1.12	8.66 ± 0.47
	PTX/TPGS-CR PMs	24	18.46 ± 1.21 <sup>2)</sup>	14.07 ± 1.09 <sup>1)</sup>	32.53 ± 1.92 <sup>2)</sup>
	PTX/TPGS-CR PMs	48	29.19 ± 0.86 <sup>2)</sup>	51.58 ± 1.16 <sup>2)</sup>	80.77 ± 0.63 <sup>2)</sup>
4T1	Control		1.01 ± 0.08	5.08 ± 0.71	6.08 ± 0.79
	PTX/TPGS-CR PMs	24	3.32 ± 1.19	8.44 ± 2.1	11.76 ± 3.28
	PTX/TPGS-CR PMs	48	7.04 ± 2.07 <sup>1)</sup>	15.07 ± 1.95 <sup>1)</sup>	22.11 ± 4.02 <sup>1)</sup>

注:与对照组相比,<sup>1)</sup>P < 0.05,<sup>2)</sup>P < 0.01。

Note: <sup>1)</sup>P < 0.05, <sup>2)</sup>P < 0.01, compared with control group.

### 3.6 细胞划痕实验结果

划痕试验结果显示见图 5,24、48 h 后 HeLa 细胞空白组划痕距离均有缩短,PTX/TPGS-CR PMs 干预的细胞划痕间距的缩短程度弱于空白组,表明 10 nmol · mL<sup>-1</sup> PTX/TPGS-CR PMs 对 HeLa 细胞的迁移有抑制效果。PTX/TPGS-CR PMs 对肿瘤细胞迁移的抑制将减少肿瘤细胞在体内的转移,有利于抗肿瘤的治疗。

不同浓度的 PTX/TPGS-CR PMs 抑制 4T1 细胞迁移的结果见图 6,24 h 时,空白对照组的划痕距离明显缩短,48 h 时划痕几乎愈合;不同浓度的 PTX/TPGS-CR PMs 使划痕间距的缩短程度远小于空白对照组;随着剂量增大,划痕间距变化越来越小。结果表明,PTX/TPGS-CR PMs 对 4T1 细胞的迁移能力有明显的抑制作用,并具有浓度依赖性。推测随着

PTX/TPGS-CR PMs 在体内肿瘤部位的累积,将更能够减少肿瘤转移的情况的发生。

## 4 讨论

本研究采用 pH 7.4、5.8、4.5 PBS 作为释放介质,模拟正常血液、肿瘤微环境、肿瘤溶酶体环境的 pH,对 PTX/TPGS-CR PMs 的体外释放行为进行了研究。在体外释放介质中加入 0.8 mol · L<sup>-1</sup>水杨酸钠作为增溶剂,以达到漏槽条件<sup>[16-18]</sup>。体外释放实验前,将 PTX/TPGS-CR PMs(1 mg · mL<sup>-1</sup>)分别置于 37 °C 以上 3 种体外释放介质中,考察了其稳定性。结果显示,PTX/TPGS-CR PMs 在水中粒径为 (194.8 ± 4.5) nm,在 pH 7.4、5.8、4.5 PBS(含 0.8 mol · L<sup>-1</sup>水杨酸钠)中放置后粒径逐渐变大,72 h 后粒径分别为 (265.6 ± 3.9) (270.8 ± 5.8) 和

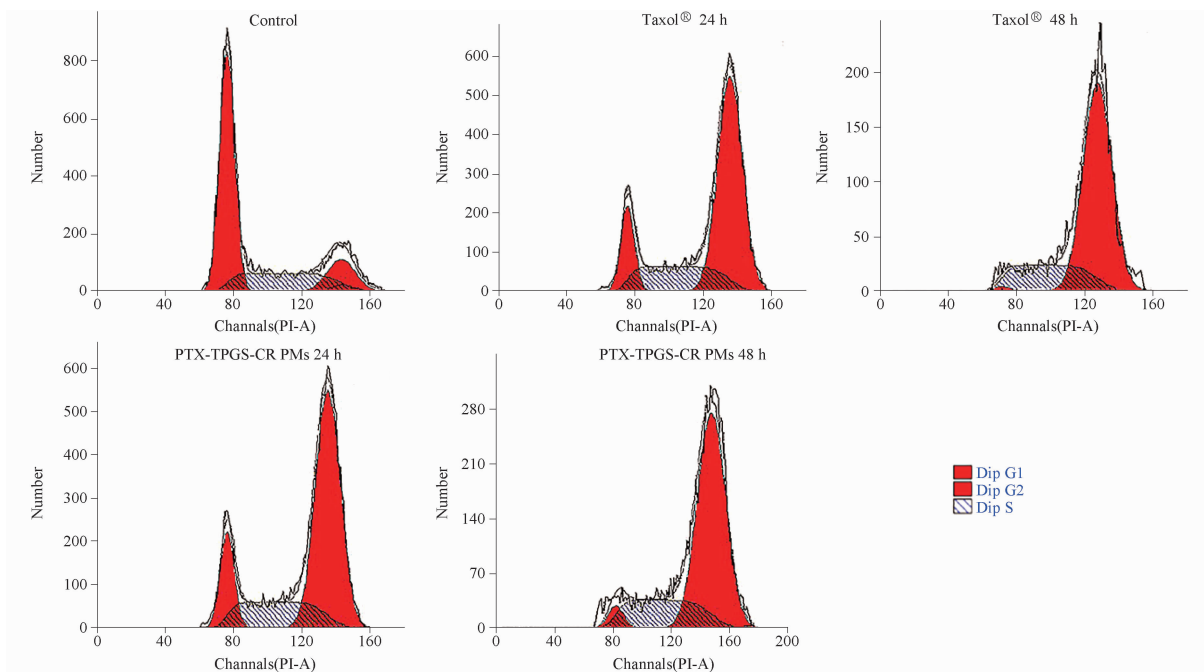


图4 PTX/TPGS-CR PMs 对 HeLa 细胞周期影响的流式细胞图

Fig. 4 Flow cytometry of PTX/TPGS-CR PMs on cell cycle of HeLa cells

表3 PTX/TPGS-CR PMs 对 HeLa 细胞周期的影响。n=3,  $\bar{x} \pm s$

Tab. 3 Effects of PTX/TPGS-CR PMs on HeLa cell cycle.

n=3,  $\bar{x} \pm s$

Groups	t/h	G0/G1 phase/%	S phase /%	G2/M phase /%
Control	-	57.99 ± 0.83	15.65 ± 0.61	26.36 ± 0.27
Taxol®	24	13.83 ± 2.49	22.68 ± 0.97	63.49 ± 3.45
Taxol®	48	0.35 ± 0.35	25.55 ± 0.52	74.04 ± 0.48
PTX/TPGS-CR PMs	24	15.07 ± 2.52	18.84 ± 4.88	66.08 ± 5.24
PTX/TPGS-CR PMs	48	2.69 ± 1.49	25.35 ± 0.52	71.95 ± 1.02

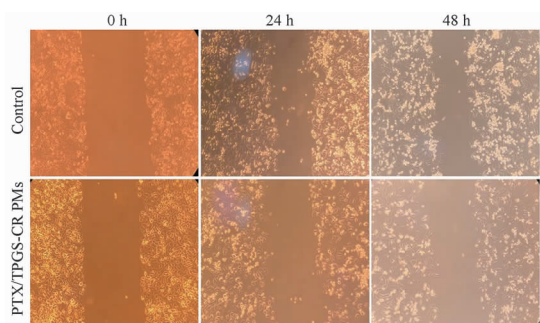


图5 PTX/TPGS-CR PMs 对 HeLa 细胞迁移作用影响(×100)

Fig. 5 Effects of PTX/TPGS-CR PMs on the migration of HeLa cells(×100)

(261.1 ± 7.5) nm,说明该胶束在3种介质中不会发生聚集,粒径变大可能与药物释放有关。

PTX/TPGS-CR PMs 在3种介质中的体外释放行为表现出很好的pH响应释药特征,即其能在血液环境中缓释药物,既能减少药物对正常组织的损伤,又有利于将尽可能多的药物递送到肿瘤部位,

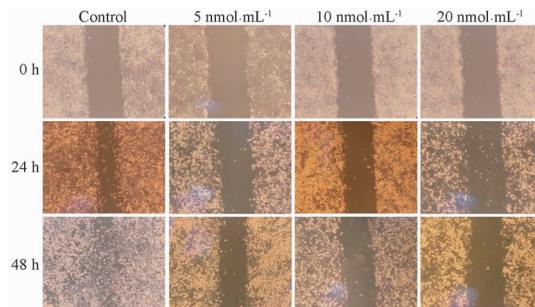


图6 不同浓度的PTX/TPGS-CR PMs对4T1细胞迁移作用的影响(×100)

Fig. 6 Effects of PTX/TPGS-CR PMs on the migration of 4T1 cells(×100)

当其到达肿瘤微环境中能实现快速释药。从释放曲线可以看出,PTX/TPGS-CR PMs的在pH值7.4释放介质中的体外释放行为主要分为速释与缓释部分,速释部分所释放的药物,可能是吸附在胶束表面的游离药物分子,而包载于TPGS-CR胶束中的药物则以相对缓慢的释放速度从TPGS-CR PMs内核中释放出来。但对于其36 h内在pH 4.5 PBS中释放较在pH 7.4缓冲液中释放缓慢的表现,其原因需进一步深入研究。

TPGS-CR 偶联物在48 h内对4T1细胞的存活率并没有显著影响,而在高浓度(50 nmol·mL<sup>-1</sup>)及长时间(72 h)作用时,呈现出一定程度的细胞增殖抑制效果的情况。细胞内存在大量酯酶<sup>[19]</sup>,

推测 TPGS-CR偶联物可能在细胞内酯酶的作用下大黄酒酸和 TPGS 从该偶联物上断裂下来,对肿瘤细胞具有一定的杀伤作用,并将会协同药物发挥杀伤肿瘤细胞的作用。

PTX/TPGS-CR PMs 的细胞毒性具有时间和浓度依赖性,其  $5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度以下与 Taxol<sup>®</sup> 毒性大小相似,更大浓度时 Taxol<sup>®</sup> 毒性显示更强,但 Taxol<sup>®</sup> 的毒性很大程度上是由于其混合溶剂引起的,这也是 Taxol<sup>®</sup> 注射后引起毒副作用<sup>[20-21]</sup>的原因之一。TPGS-CR 偶联物由于在 48 h 内几乎不显示毒性,且其形成的胶束将药物包载于内核中,胶束的细胞杀伤作用涉及胶束释放药物的过程。因此,PTX/TPGS-CR PMs 的细胞毒具有时间依赖性特征。随着作用时间的延长,PTX/TPGS-CR PMs 在肿瘤部位的不断累积,胶束中药物的不断释放,药物与载体材料的协同起效,PTX/TPGS-CR PMs 能更好地起到杀伤肿瘤细胞的作用。

PTX/TPGS-CR PMs 对 HeLa,4T1 细胞凋亡率也是随作用时间的延长而凋亡率增加,也与药物的不断释放,越来越多药物作用于肿瘤细胞有关,从而引起对肿瘤细胞毒性的增加。从 PTX/TPGS-CR PMs 对 HeLa 的细胞周期的影响上来看,与 Taxol<sup>®</sup> 对比分析,除了 PTX 对细胞周期的影响外,载体材料组成部分(如大黄酸)也可能起到了一定的作用,从而有助于促进细胞凋亡。PTX/TPGS-CR PMs 在细胞划痕试验中所体现出的对不同细胞的抑制迁移作用以及浓度依赖性,也体现了该胶束能够较好地抑制肿瘤的转移,有利于肿瘤治疗。

综上,PTX/TPGS-CR PMs 具有良好的 pH 响应释药的特征,在肿瘤微酸性环境下能实现快速释药从而提高抗肿瘤作用;在细胞水平上能实现提高抑瘤率,促进细胞凋亡,增加在 G0/G1 期的周期阻滞,减少肿瘤细胞迁移,这些作用在一定程度上与其药物释放过程有关。本研究后续将结合该体外释放和细胞实验结果,进一步利用 Balb/c 小鼠建立 4T1 皮下移植瘤模型,进行 PTX/TPGS-CR PMs 抑制体内肿瘤生长和减少 PTX 毒性的药效学研究,以证实 PTX/TPGS-CR PMs 静脉注射给药后在体内抗肿瘤增效减毒的效果。

## REFERENCES

[ 1 ] WANG X Y, ZHENG Y L, QIU L Z, *et al.* Evaluation and anti-tumor mechanism of functionalized chitosan-based polymeric micelles for oral delivery of paclitaxel [J]. *Int J Pharm*, 2022, 625: 122138. DOI:10.1016/j.ijpharm.2022.122138.  
[ 2 ] ZHAO Y, CAO W Q, LIU Y. Recent advances in polymeric nano-sized carrier systems[J]. *Chem J Chin Univ*(高等学校化学学报), 2020, 41(5): 909-923.

[ 3 ] WU C Y, CHEN T K, WANG Q. Research progress of puerarin preparation[J]. *World Chin Med*(世界中医药), 2020, 15(14): 2188-2192.  
[ 4 ] ZHANG X, XU X Y, WANG X Y, *et al.* Hepatoma-targeting and reactive oxygen species-responsive chitosan-based polymeric micelles for delivery of celastrol [J]. *Carbohydr Polym*, 2023, 303: 120439. DOI:10.1016/j.carbpol.2022.120439.  
[ 5 ] WANG X Y, QIU L Z, WANG X Y. Evaluation of intestinal permeation enhancement with carboxymethyl chitosan-rhein polymeric micelles for oral delivery of paclitaxel[J]. *Int J Pharm*, 2020, 573: 118840. DOI:10.1016/j.ijpharm.2019.118840.  
[ 6 ] WANG X Y, GUO Y L, QIU L Z, *et al.* Preparation and evaluation of carboxymethyl chitosan-rhein polymeric micelles with synergistic antitumor effect for oral delivery of paclitaxel[J]. *Carbohydr Polym*, 2019, 206: 121-131.  
[ 7 ] LI M, LIU Y, GONG H. Preparation and performance study of carboxymethyl chitosan composite hydrogels [J]. *Chin J Mar Drugs*(中国海洋药物杂志), 2022, 41(2): 19-27.  
[ 8 ] PEI D T, ZENG Z W, ZHOU X Y. Preparation and characterization of carboxymethyl chitosan/glucose hydrogel in situ cross-linked by enzyme [J]. *Chem Res Appl*(化学研究与应用), 2022, 34(5): 1061-1069.  
[ 9 ] WANG X Y, QIU L Z, LI Q Z, *et al.* Synthesis of PEGylated carboxymethyl chitosan-rhein conjugate and preparation of paclitaxel-loaded polymeric micelles[J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2018, 49(5): 596-602.  
[ 10 ] JIANG L, YANG Y. Research progress on antitumor mechanism of rhuibaric acid[J]. *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2021, 43(10): 2765-2769.  
[ 11 ] GUO Y Y, LUO J, TAN S W, *et al.* The applications of vitamin E TPGS in drug delivery[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2013, 49(2): 175-186.  
[ 12 ] GUO Y, CHU M, TAN S, *et al.* Chitosan-g-TPGS nanoparticles for anticancer drug delivery and overcoming multidrug resistance [J]. *Mol Pharm*, 2014, 11(1): 59-70.  
[ 13 ] QIU L Z, WANG X Y, CAO C X, *et al.* Preparation and characterization of TPGS modified carboxymethyl chitosan-rhein polymeric micelles[J]. *J Shenyang Pharm Univ*(沈阳药科大学学报), 2019, 36(4): 300-307.  
[ 14 ] OUYANG H Z, QIU L Z, WANG X Y, *et al.* Preparation and preliminary evaluation of paclitaxel-loaded TPGS-CR polymeric micelles [J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2020, 55(7): 534-541.  
[ 15 ] SHU L, JIAO W, TING S, *et al.* The natural agent rhein induces beta-catenin degradation and tumour growth arrest [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(1): 589-599.  
[ 16 ] ZHANG Z R. Synthesis and characterization of PLGA copolymer and antitumor activity and mechanism of paclitaxel-containing microspheres[D]. Wuhan: Wuhan University of Technology, 2018.  
[ 17 ] CHEN Z, LI L B. Preparation and *in vitro* Evaluation of Novel Paclitaxel-Loaded Liposomes [J]. *Pharm Biotechnol*(药物生物技术), 2018, 25(2): 108-113.  
[ 18 ] XU C. Construction of co-loaded paclitaxel and siRNA-E7 nanodelivery system encapsulated by HeLa cell membrane and its therapeutic effect on cervical cancer [D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2020.  
[ 19 ] YIN Y G, KONG X Q, LI M, *et al.* Development of an esterase fluorescent probe based on naphthalimide-benzothiazole conjugation and its applications for qualitative detection of esterase in orlistat-treated biosamples [J]. *Anal Chim Acta*, 2022, 1190: 339248. DOI:10.1016/j.aca.2021.339248.  
[ 20 ] ZHAO Y. Clinical adverse drug reactions of paclitaxel for injection (albumin binding type) [J]. *Chin Pract Med*(中国实用医药), 2021, 16(15): 137-139.  
[ 21 ] WANG Y W, MENG L, LIU X. ADR signal mining of paclitaxel for injection(albumin-bound type) based on FDA adverse event database [J]. *J China Pharm*(中国药房), 2021, 32(3): 328-333. (收稿日期:2023-03-05)