还原敏感型多柔比星/吲哚美辛共载聚合物胶束的制备及体外抗肿瘤评价

杨福伟[1,2]，许嘉敏[1]，方文杰[1]，邱立朋[1*]，陈敬华[1*]
(1. 江南大学生命科学与健康工程学院，江苏无锡 214122；
2. 泰安市中心医院(青岛大学附属泰安市中心医院、泰山医养中心)肿瘤精确干预与转化医学实验室，山东泰安 271000)

摘要：本研究以二硫键连接聚乙二醇和非甾体抗炎药吲哚美辛，合成得到还原敏感型两亲性聚合物聚乙二醇 - 胱胺 - 吲哚美辛（PCI）。PCI 可通过超声法自组装成胶束，负载抗肿瘤模型药多柔比星，得到标题共载聚合物胶束。透射电镜观察结果显示，制得的胶束呈类球形，动态光散射法测得其粒径为 (202.0±7.7) nm，多分散性指数为 0.260±0.012。载药胶束中多柔比星的包封率和载药率分别为 (90.71±3.78)％和 (18.82±0.52)％。多柔比星在含有谷胱甘肽（GSH）的磷酸盐缓冲液（PBS）中 24 h 累积释放率为 80％，而在不含 GSH 的 PBS 中 24 h 仅能释放 40％左右，提示制品的释药行为具有明显的还原敏感特征。细胞毒性试验结果显示，PCI 载体对人肝癌细胞（HepG2 细胞）具有有限的杀伤作用，而共载胶束对 HepG2 细胞具有更好的杀伤效果。然而，相对于游离多柔比星，共载胶束与 HepG2 细胞共孵育 24 h 后的细胞毒性较弱。细胞摄取试验结果显示 HepG2 细胞对胶束的摄取作用呈时间依赖性。

关键词：还原敏感性；共载；聚合物胶束；多柔比星；吲哚美辛；抗肿瘤活性
中图分类号：R944.9　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2023)01-0085-08
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.01.010

Preparation of Redox-sensitive Polymeric Micelles Co-loaded with Doxorubicin and Indometacin and Evaluation of Antitumor Activity *in vitro*

YANG Fuwei[1,2], XU Jiamin[1], FANG Wenjie[1], QIU Lipeng[1*], CHEN Jinghua[1*]
(*1. School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122; 2. Tumor Precise Intervention and Translational Medicine Laboratory, the Affiliated Taian City Central Hospital of Qingdao University, Taian 271000*)

ABSTRACT: Redox-responsive amphiphilic polymer, polyethylene glycol-cystamine-indometacin (PCI), was synthesized by conjugation of polyethylene glycol and the nonsteroidal anti-inflammatory agent indomethacin with disulfide bonds. The self-assembled micelles were prepared from the polymers by ultrasonic method to load the model antineoplastic agent, doxorubicin. Then, the title co-loaded polymeric micelles were obtained. The observation of transmission electron microscopy (TEM) revealed that the micelles were spherical in shape, and the results of dynamic light scattering showed that the average particle size and polydispersity index were (202.0±7.7) nm and 0.260±0.012, respectively. The encapsulation efficiency and drug loading of doxorubicin in the micelles were (90.71±3.78)％ and (18.82±0.52)％, respectively. The cumulative release of doxorubicin from the micelles reached 80％ in phosphate buffer (PBS) with glutathione (GSH) within 24 h, while in PBS without GSH was only about 40％. It was attributed to the redox-sensitive characteristics of disulfide bonds. The results of cytotoxicity experiments showed that the naked carriers had a certain antitumor effect on human hepatoma cells (HepG2 cells), while the co-loaded micelles presented enhanced antitumor effect on HepG2 cells. However, compared with free doxorubicin, the cytotoxicity of co-loaded micelles was weaker after 24 h co-incubation with HepG2 cells. The results of uptake experiments revealed that the cellular uptake of micelles in HepG2 cells was time-dependent.

Key Words: redox-sensitive; co-loaded; polymeric micelle; doxorubicin; indomethacin; antitumor activity

世界卫生组织国际癌症研究机构发布的全球最新癌症负担数据表明中国恶性肿瘤患者的新发病例和死亡人数世界排名第一，恶性肿瘤仍然是中国人生命健康的最大威胁[1—2]。目前，中国在肿瘤临床治疗方面仍以化疗为主。然而，化疗药物大多水溶性不佳、不良反应大、半衰期短，大大限制了临床应用[3]。例如，多柔比星（doxorubicin，**1**）可应用于乳腺癌、尿路上皮癌、血液肿瘤等多种恶性肿瘤的治疗，但却因骨髓抑制、心脏毒性及消化道不良反应等限制了临床应用。

近年来，高分子聚合物胶束因其特殊的核 - 壳结构、小粒径、高载药量等性质在抗肿瘤药递送领域备受关注，它能克服抗肿瘤药特异性不足、生物利用度有限和水溶性差等问题[4—7]。然而，大多数基于生物可降解的脂肪族聚酯的传统聚合物胶束在体内的释药效果并不理想。胶束到达肿瘤部位后药物的释出量不足被认为是一个影响疗效的主要问题。肿瘤与正常组织的生理化学环境和代谢环境不同，肿瘤组织普遍存在缺氧、弱酸性和谷胱甘肽（glutathione，GSH）高表达等特点。肿瘤细胞内微环境的 GSH 浓度比正常组织高 100 ～ 1 000 倍，针对此特点，开发具有氧化还原敏感性的胶束成为近年研究热点之一，尤其是生物可降解的生物高分子材料作为药物载体的研究更是炙手可热。二硫键是一种还原敏感性共价键，广泛存在于蛋白质中，对稳定蛋白质的三维结构及活性调节具有重要作用，还可提高蛋白质的热力学稳定性，保护蛋白质在极端的环境中不受破坏。二硫键在正常生理条件的 GSH 浓度下可稳定存在，在肿瘤细胞的 GSH 浓度下则易断裂[8—9]。此外，针对单一药物治疗时疗效差、易产生耐药性的情况，本研究希望通过共载 2 种药物，达到协同治疗肿瘤的作用。

炎症可通过环氧合酶（COX，能促进花生四烯酸转化为前列腺素）诱导肿瘤的发生，并且促进肿瘤的发展及转移[10—12]。吲哚美辛（indomethacin，**2**）既可抑制前列腺素的合成，又可通过增加脂氧化酶产物及其他一些作用（如抗炎）而有助于肿瘤辅助治疗；还可减轻化疗引起的不良反应、增强化疗效果、缓解肿瘤发热疼痛等。

本试验拟采用生物相容性的聚乙二醇（**4**）为亲水端，通过胱胺（**3**）的二硫键连接 **2**，合成还原敏感性前药载体聚乙二醇 - 胱胺 - 吲哚美辛（polyethylene glycol-cystamine-indometacin，PCI），再用以制备载 **1** 的聚合物胶束（**1**/PCI 胶束），以期获得一种既可增加 **1** 的溶解性，又能通过增强渗透和滞留（EPR）效应来实现减毒增效的肿瘤微环境敏感型胶束，并对其性质进行考察。

1　仪器与试药

RE2000a 型旋转蒸发仪（郑州科泰实验设备有限公司）；FreeZone 2.5 L 型冷冻干燥机（美国 Labconco 公司）；Zetasizer Nano ZS 型纳米粒度仪和 Multiskan Go 型酶标仪（英国 Malvern 公司）；JEM 2100 型透射电镜（TEM，日本 JEOL 公司）；JY92 IIN 型超声波细胞粉碎机（宁波新芝生物科技股份有限公司）；TENSOR Ⅱ型傅里叶变换红外光谱仪（德国布鲁克公司）；UV 2550 型紫外分光光度计和 RF-6000 型荧光分光光度计（日本 Shimadzu 公司）；超滤杯［截留分子量（MWCO）1 000，南通海之星实验器材有限公司］；CO_2 恒温细胞培养箱（美国赛默飞世尔科技公司）；CytoFLEX A00-1-1102 型流式细胞仪（美国 Beckman Coulter 公司）。

1 盐酸盐（浙江海正药业股份有限公司，含量≥ 98%，批号 3321980）；**2**（含量≥ 98.0%，批号 J1408050）、**3** 二盐酸盐（含量≥ 99%，批号 GC080124）、1-（3- 二甲基氨基丙基）-3- 乙基碳二亚胺（EDC，含量≥ 98.0%，批号 HRR6RXR6）、*N*- 羟基丁二酰亚胺（NHS，含量≥ 98.0%，批号 R8ARD5KE）和 1- 羟基苯并三唑（HOBT，含量≥ 98.0%，批号 GC240133）（上海安耐吉化学有限公司）；**4**（上海亚亦生物科技有限公司，含量≥ 98.0%，批号 6734-

收稿日期：2022-02-24

基金项目：国家重点研发计划项目（2021YFC2103100）、江苏省自然科学基金（BK20201344）

作者简介：杨福伟（1982—），男，博士研究生，专业方向：肿瘤靶向给药系统。

通信作者：陈敬华（1971—），男，教授，从事药剂学和生物医用材料学的研究。

E-mail：chenjinghua@jiangnan.edu.cn

邱立朋（1984—），男，副教授，从事药物新剂型、智能药物递送系统和多糖聚合物纳米载体的研究。

E-mail：qiulp@jiangnan.edu.cn

2664-2K-1G）；二甲基亚砜（DMSO，批号 20200421）、四氢呋喃（THF，批号 20200526）（国药集团化学试剂有限公司）；二氯甲烷（DCM，上海泰坦科技股份有限公司，批号 G8101413）；噻唑蓝（MTT，上海生工生物工程有限公司，含量≥ 98.0%，批号 A100793）；胰酶（美国 Sigma-Aldrich 公司）；新生牛血清（浙江天杭生物科技股份有限公司）；细胞培养基（DMEM，美国 Gibco Invitrogen 公司）；其他试剂均为市售分析纯。

人肝癌细胞（HepG2 细胞，中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库）。

2 方法与结果

2.1 两亲性聚合物 PCI 的合成与表征

两亲性聚合物 PCI 的合成路径如图 1 所示，首先合成聚乙二醇 - 胱胺（PC）。称取 **4**（100 mg，0.05 mmol）、EDC（17.26 mg，0.09 mmol）和 NHS（47.9 mg，0.4 mmol），溶于无水 DMSO 5 mL 中，充分溶解后避光冰浴搅拌 2 h，常温再搅拌 1 h。将 **3** 二盐酸盐（100 mg，0.44 mmol）和吡啶 100 μL 溶于无水 DMSO 4 mL 中，然后将其逐滴加入上述溶液中，继续室温、避光搅拌 24 h。反应后的混合液用去离子水透析（MWCO 1 000）2 d，然后冻干得到 PC（76.5 mg，0.036 mmol）[13]，产率约为 71%。

称取 **2**（50 mg，0.15 mmol）溶于 DCM 4 mL 中，加入 EDC（30 mg，0.15 mmol）、HOBT（20 mg，0.15 mmol），冰浴条件下活化 2 h，常温下再搅拌 1 h，然后逐滴加入 PC 的 DCM 溶液（0.01 mmol/L）4 mL，常温下反应 24 h。反应液用去离子水透析（MWCO 1 000）2 d，冻干得到最终产物 PCI（51.8 mg，0.02 mmol），产率约为 58%。

如图 1 所示，在 EDC 的催化下，**2** 结构中的羧基和 **4** 结构中的羧基与 **3** 上的氨基反应形成酰胺键，得到了 PCI。在 PCI 的 ^{1}H NMR 图谱（图 2）中，δ 6.70、6.96、7.06、7.61 和 7.72 是 **2** 分子中苯环上的氢，δ 2.87 是 **3** 上的氢，δ 3.84 是 **4** 分子中甲氧基上的氢，这表明 PCI 已成功合成。根据 **2** 苯环 C、D、E 位上的氢和 **4** 分子 G 位甲氧基上氢的峰面积计算得 **2** 的接枝率为 56.57%。

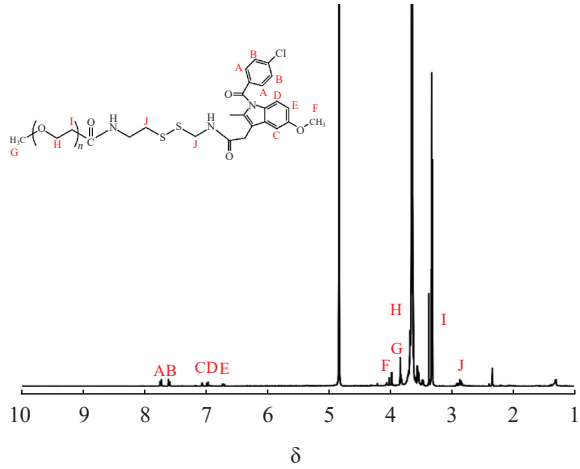


图 2 PCI 的 ^{1}H NMR 图谱

Fig.2 ^{1}H NMR Spectrum of PCI

另外，通过红外光谱（IR）和紫外光谱（UV）法确证两亲性共聚物 PCI 的结构。由图 3A 可知，PC 的 IR 图谱中在 1 669 cm^{-1} 的位置出现了 C=O 的伸缩振动峰，证明 **4** 与 **3** 通过酰胺键合成成功。在图 3B 中，PCI 在 264 和 312 nm 波长处各有一个

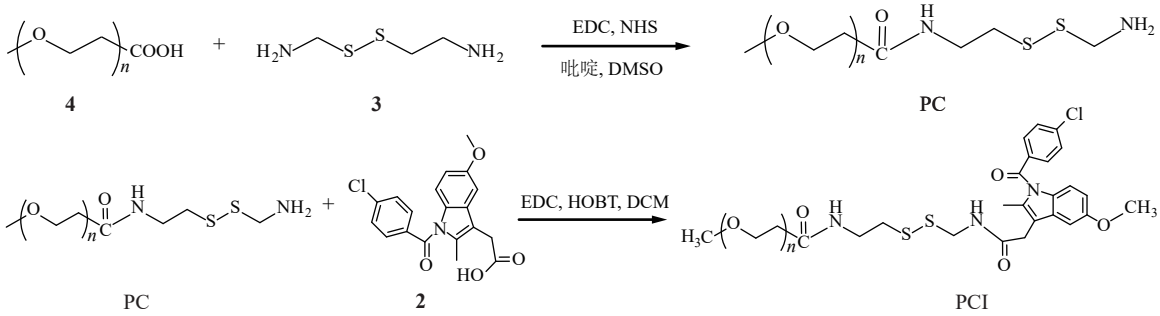
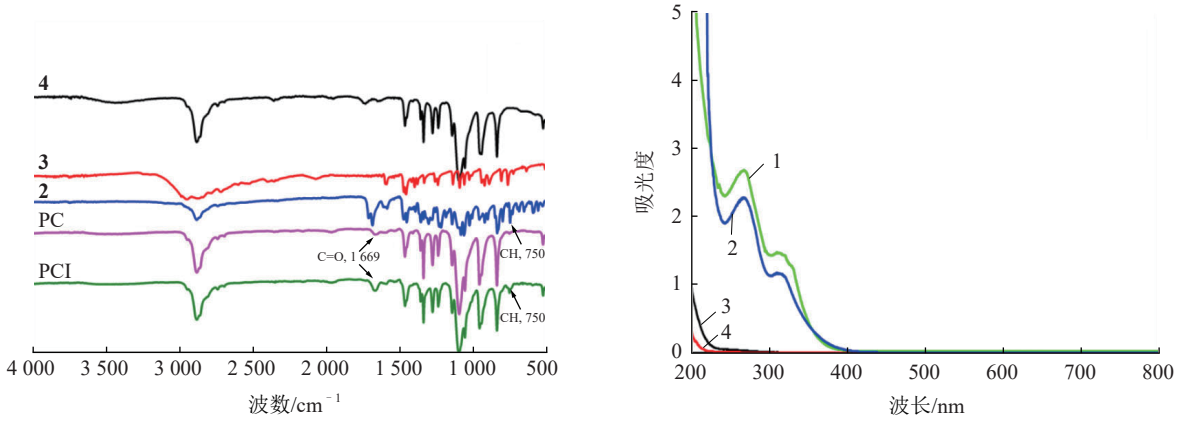


图 1 PCI 的合成路线

Fig.1 Synthetic Route of PCI



1—**1**；2—PCI；3—**3**；4—**4**。

A　　B

图 3　不同样品的 IR 图（A）和 UV 图（B）

Fig.3　IR Spectra (A) and UV Spectra (B) of Different Samples

与 **2** 相对应的吸收峰，进一步证明 PCI 合成成功。

2.2　PCI 胶束临界胶束浓度（CMC）的测定

CMC 是用来评价聚合物材料形成胶束能力的一个参数，本试验利用芘探针法测定了聚合物 PCI 的 CMC。取适量芘的丙酮溶液（浓度为 6.0×10^{-5} mol/L）于 10 mL 量瓶中，微热烘干丙酮。精密称取 PCI 40 mg，分散于蒸馏水 10 mL 中，探头超声 30 min（超声功率 200 W，工作 2 s，间歇 1 s），作为母液。用蒸馏水将母液稀释为 PCI 质量浓度 5×10^{-4} ～ 2 mg/mL 的溶液。然后将不同质量浓度的 PCI 溶液分别加入到含芘的量瓶中（使芘的终浓度为 6×10^{-7} mol/L），于 65 ℃加热 3 h 后，将混合液振荡过夜，利用荧光分光光度计测定芘的荧光强度。工作参数为：激发波长 336 nm，发射波长 373、384 nm。以 373 和 384 nm 处的荧光强度比值（I_1/I_3）为纵坐标、PCI 质量浓度的对数值为横坐标作图，结果如图 4 所示，拐点处即为 CMC 值[14]。

CMC 值越小说明聚合物越容易形成胶束，且形成的胶束越稳定。由图 4 可见，聚合物 PCI 的 CMC 值小于 0.01 mg/mL，说明 PCI 在较低的质量浓度下能容易地形成胶束，有助于保持胶束在生理条件下的稳定性。

2.3　**1**/PCI 胶束（载药胶束）的制备

首先制备游离 **1**。精密称取 **1** 盐酸盐 10 mg，

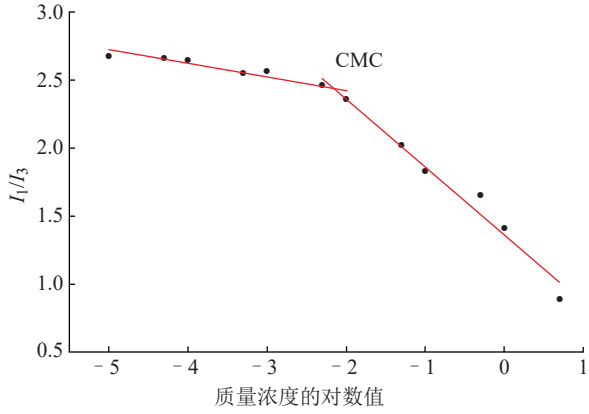


图 4　PCI 胶束的 CMC

Fig.4　CMC of PCI Micelles

溶于无水甲醇 10 mL 中，加入三乙胺 100 μL，室温、避光搅拌 24 h。反应结束后，避光条件下旋蒸除去甲醇，加入 THF 10 mL 使 **1** 复溶，避光保存。

通过溶剂挥发 - 超声法制备载药胶束。称取 PCI 10 mg 溶于 pH 7.4 磷酸盐缓冲液（PBS）10 mL 中，加入上述含有 **1** 的 THF 溶液 2 mL，避光搅拌过夜，待 THF 完全挥发后，冰浴下超声 20 min，经 0.45 μm 的滤膜过滤，即得载药胶束。

2.4　**1**/PCI 胶束的粒径测定及形态观察

取适量胶束溶液，用 PBS 稀释后，采用纳米粒度仪测定粒径及粒度分布。结果如图 5A 所示，**1**/PCI 胶束水化半径为（202.0±7.7）nm，多分散性指

数（PDI）为 0.260±0.012，可认为制备的 **1**/PCI 胶束的粒径均相对较小，粒度分布均匀，较稳定。

取 **1**/PCI 胶束溶液 10 μL，均匀滴在制样专用铜网上，待液滴自然挥干后用 TEM 观察载药胶束形态。结果如图 5B 所示，可见 **1**/PCI 的胶束呈类球形，分布较为均匀。

2.5 载药量和包封率的测定

采用 UV 法在 480 nm 处测定 **1** 的吸光度（*D*）。本试验中，**1** 质量浓度（*c*）在 1 ～ 32 μg/mL 范围内与 *D* 线性关系良好，标准曲线方程为 $D=1.66\times10^{-2}c-1.21\times10^{-2}$，$R^2=0.999\,6$。

利用超速离心法测定载药量（DL）和包封率（EE）。取 **1**/PCI 胶束溶液 1 mL 置 10 mL 量瓶中，用甲酰胺定容，超声破碎载药胶束，使胶束释放出包载的全部药物，采用 UV 法在 480 nm 波长处测定 *D* 值，计算总药量。另取 **1**/PCI 胶束溶液 2 mL 于超滤杯中，离心（1 800×*g*）30 min 以截留载药胶束，采用 UV 法测定滤液的 *D* 值，计算游离 **1** 量。结果表明，**1**/PCI 胶束的包封率和载药量分别为（90.71±3.78）%和（18.82±0.52）%（*n*=3），表明该法所得胶束对疏水性抗肿瘤药的荷载量较高。

精密称取 PCI 聚合物 26 mg（0.01 mmol），溶于去离子水 10 mL 中，加入 GSH（30 mg，100 mmol），充分搅拌 12 h 后取 1 mL，在 320 nm 下测定其 *D* 值，计算得 **2** 的载药量为（9.07±0.61）%（*n*=3）。

2.6 体外释药考察

为了考察 GSH 和 pH 值对 **1**/PCI 胶束释药性能的影响，本试验选择 pH 7.4 和 5.0 的 PBS 分别模拟正常组织与肿瘤组织的微环境，并添加 10 mmol/L GSH 以模拟肿瘤部位的还原环境，用来考察载药胶束的体外释放行为。取 **1**/PCI 胶束 2 mL 装入透析袋（MWCO 1000）中，将透析袋完全浸没于释放介质 20 mL 中，在 37 ℃、100 r/min 的摇床中避光进行释放试验，在设计的每个时间点吸出释放介质 1 mL（及时补充同温等量的相同释放介质）。采用 UV 法测定不同时间点释放介质中 **1** 的含量，计算累积释放率。结果如图 6 所示。

由图 6 可见，**1** 在加有 GSH 的 pH 5.0 和 pH 7.4 的 PBS 中释放较快，6 h 累积释放率超过 65%［pH 5.0 为（67.79±1.51）%，pH 7.4 为（65.23±0.62）%］，显著高于未加 GSH 的 PBS 中的累积释放率［pH 5.0 为（31.41±6.48）%，pH 7.4 为（30.38±3.62）%］。而且，在加入 GSH 的 PBS 中，**1** 的 24 h 累积释放率可达到或接近 80%［pH 5.0 为（88.25±6.16）%，pH 7.4 为（77.60±0.57）%］；而在未加 GSH 的 PBS，**1** 的 24 h 累积释放率在 40%左右［pH 5.0 为（44.68±2.66）%，pH 7.4 为（37.94±4.57）%］。聚合物 PCI 中的二硫键在 GSH 作用下被还原为巯基，发生断裂，进而使胶束分解释放 **1**，因此 **1**/PCI 胶束在肿瘤微环境中能较快释放药物。在 pH 5.0 和

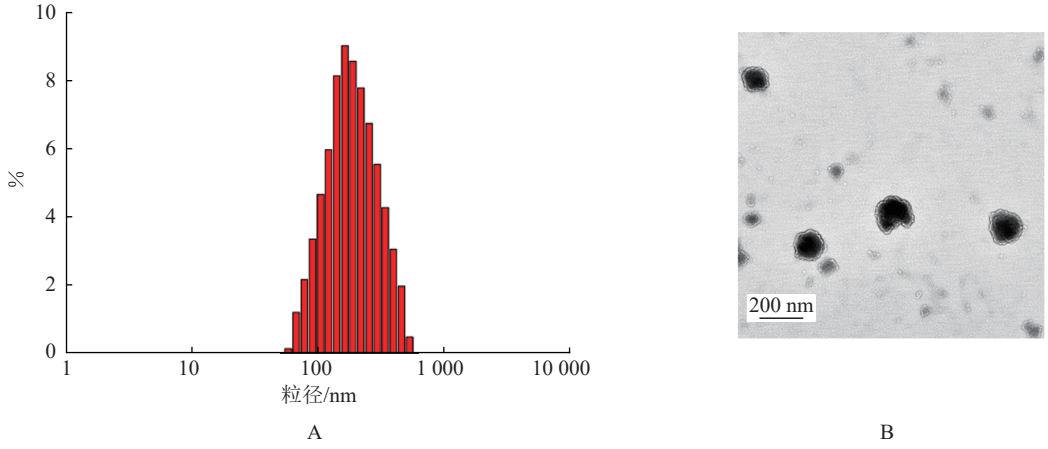


图 5 1/PCI 胶束的粒度分布（A）**和 TEM 照片**（B；×25 000）

Fig.5 Particle Size Distribution（A）and TEM Image（B; ×25 000）of **1**/PCI Micelles

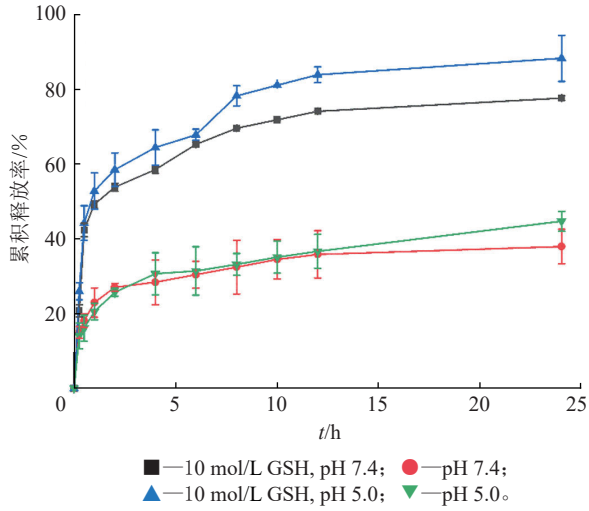


图 6　不同释放介质中 1/PCI 胶束中 1 的体外释放曲线（*n*=3）

Fig.6　*In vitro* Release Curves of **1** from the **1**/PCI Micelles in Different Release Media (*n*=3)

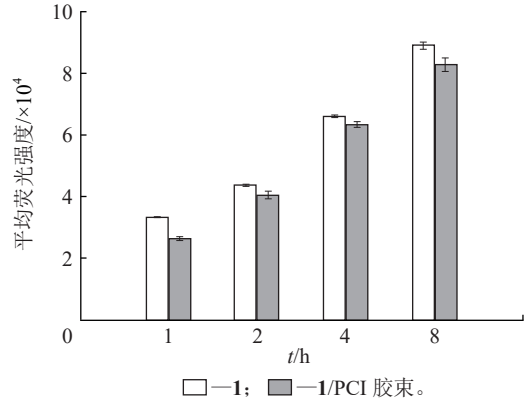


图 7　1 和 1/PCI 胶束与 HepG2 细胞孵育不同时间的细胞摄取情况（*n*=3）

Fig.7　Cellular Uptake of **1** and **1**/PCI Micelles in HepG2 Cells Incubated for Different Time Periods (*n*=3)

pH 7.4 的 PBS 中，**1** 的累积释放率没有显著性差异（$P<0.05$），这是因为聚合物 PCI 中无 pH 敏感性化学键，对环境 pH 值的变化不敏感，说明其在正常生理和酸性环境中都较稳定性，不会造成 **1** 的快速释放。

2.7　**1** 和 **1**/PCI 胶束的细胞摄取考察

将对数生长期的 HepG2 细胞，以每孔 4×10^5 个铺于 6 孔板中，在 37 ℃、5% CO_2 环境中孵育 24 h 使其贴壁生长，然后加入 **1** 终质量浓度为 2.5 μg/mL 的含药培养基 100 μL，孵育 1、2、4、8 h 后，弃去培养基，用 PBS（pH 7.4）洗掉残留培养基，再加入胰酶 400 μL 消化细胞，然后加入培养基 1.6 mL 终止消化，收集细胞，离心去除培养基。将细胞用 PBS（pH 7.4）吹散，经洗涤、离心后再次加入 PBS（pH 7.4）吹散，转移至流式管中，利用流式细胞仪定量考察载药胶束的细胞摄取情况。结果如图 7 所示。

结果显示，HepG2 细胞在 1、2、4、8 h 时摄取的游离 **1** 量略高于 **1**/PCI 胶束，原因可能是由于相对小分子的游离 **1** 而言，大分子的 **1**/PCI 胶束通过胞饮作用被摄取，具有时间、浓度和能量依赖等特性，不易被摄取进入细胞。由于 **1**/PCI 胶束摄取较慢，并且其释药需要破坏胶束结构，所以 **1**/PCI 的毒性比游离 **1** 小，对正常组织的毒性较低。

2.8　PCI 载体的细胞毒性考察

采用 MTT 法考察 PCI 胶束对 HepG2 细胞的毒性作用。用含 10%胎牛血清（FBS）及 1%青霉素 - 链霉素的 DMEM 培养基孵育 HepG2 细胞，将培养状态良好的 HepG2 细胞消化后以每孔 8×10^3 个的细胞密度铺于 96 孔板中，在 37 ℃、5% CO_2 环境中孵育 24 h 后，弃去孔板中的培养基，加入用 DMEM 培养基配制的系列质量浓度的 PCI 载体溶液（PCI 质量浓度依次为 0.78、1.56、3.12、6.25、12.5、25、50、100、200 μg/mL，每个浓度设 6 孔）100 μL，同时设置不加载体的阴性对照组。然后置培养箱中孵育 24 h，弃去培养液，每孔加入 MTT 溶液（0.5 mg/mL）100 μL，继续孵育 4 h 后每孔加入 DMSO 100 μL，于 37 ℃振荡培养 10 min 以溶解蓝紫色结晶物，最后用酶标仪在 570 nm 波长下测定每孔的吸光度值，并计算细胞存活率。结果如图 8 所示。

由图 8 可见，随着 PCI 质量浓度的升高，HepG2 细胞存活率降低，当 PCI 质量浓度为 6.25 μg/mL 时，HepG2 细胞的细胞存活率为（86.08±2.11）%，当 PCI 质量浓度达到 200 μg/mL 时，HepG2 细胞的细胞存活率约为 64%，说明 PCI 载体（含有 **2**、不含有 **1**）对肿瘤有一定的杀伤作用。这可能是由于 PCI 解聚后释放出的 **2** 对 COX 有抑

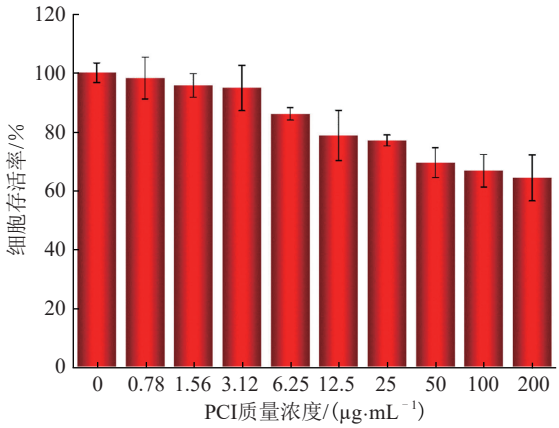


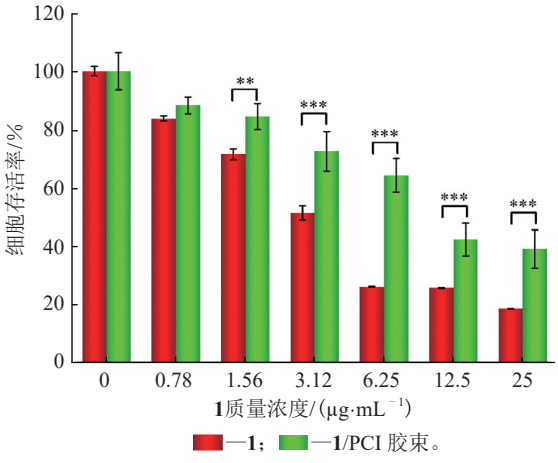
图 8 PCI 的细胞毒性（*n*=3）

Fig.8 Cytotoxicity of PCI (*n*=3)

制作用，但 COX 主要是在肿瘤的诱发和转移阶段起作用[15]，对促进肿瘤细胞增殖的作用有限，所以空白载体 PCI 对 HepG2 细胞的杀伤作用有限。

2.9 1 和 1/PCI 胶束的体外细胞毒性考察

采用 MTT 法考察 **1** 和 **1**/PCI 胶束的体外细胞毒性。细胞培养及铺板同“**2.8**”项。用培养液将 **1** 和 **1**/PCI 胶束稀释至 **1** 质量浓度为 0.78、1.56、3.12、6.25、12.5 和 25 μg/mL，加入培养孔中，于培养箱中孵育 24 h，后续操作同“**2.8**”项。结果如图 9 所示。



** 表示 *P*<0.01；*** 表示 *P*<0.001。

图 9 1 和 1/PCI 胶束的细胞毒性（*n*=3）

Fig.9 Cytotoxicity of **1** and **1**/PCI Micelles (*n*=3)

由图 9 可见，随着游离 **1** 和 **1**/PCI 胶束质量浓度的增加，HepG2 细胞的存活率均有明显下降，表明游离 **1** 和 **1**/PCI 胶束对细胞的生长抑制均呈现出浓度依赖性。游离 **1** 和 **1**/PCI 胶束的 IC_{50} 值分别为（3.58±0.16）和（16.18±0.23）μg/mL。**1**/PCI 胶束的 IC_{50} 值比游离 **1** 高的原因可能是游离 **1** 以被动扩散方式进入细胞，起效更快，而 **1**/PCI 胶束通过胞饮作用进入细胞后还需要经过一个药物释放过程，起效较慢。

3 讨论

本试验合成了还原敏感型两亲性 PCI，它能在水性环境中自组装形成具有核壳结构的纳米胶束，其内核可以通过疏水作用包载疏水性小分子抗肿瘤药。所制备的胶束水合粒径约为 200 nm，比文献[16]报道的嵌段共聚物胶束粒径稍大，这可能是由于聚乙二醇链较长，疏水基团需要达到一定取代度才能使粒径减小。本试验制备的胶束对 **1** 的载量较高，原因是 **1** 为疏水性药物。

1/PCI 胶束的释药行为具有明显的还原敏感特征。这主要是 PCI 中的二硫键在 GSH 存在的条件下被还原为巯基，发生断裂，亲水端和疏水端分离，导致胶束解聚，进而使药物快速扩散到介质中。但 PCI 对 pH 值的变化无明显响应性，说明其在正常组织中较稳定，不会造成 **1** 快速释放，降低了 **1** 对正常组织的毒性。

从体外的细胞毒性结果和摄取结果看，**1**/PCI 胶束的细胞摄取略小于游离 **1**，其对 HepG2 的毒性明显弱于游离 **1**。此外，虽然文献[15]报道 **2** 通过抑制 COX 能起到降低肿瘤细胞运动和侵蚀、抑制肿瘤生长的作用，但在 **1**/PCI 胶束中未见 **1** 和 **2** 产生明显的协同抗肿瘤作用。

参考文献：

[1] ZHOU J, KROLL A V, HOLAY M, *et al*. Biomimetic nanotechnology toward personalized vaccines [J]. *Adv Mater*, 2020, **32**(13): e1901255.

[2] WAN Y, FU L H, LI C, *et al*. Conquering the hypoxia limitation for photodynamic therapy [J]. *Adv Mater*, 2021, **33**(48): e2103978.

[3] DE LUCA R, LO COCO G, ADDEO R, *et al*. Quality of life in patients with severe skin reactions in course of first-generation epidermal growth factor receptor inhibitors

monoclonal antibodies (our experience with cetuximab) [J]. *World J Oncol*, 2021, **12**(4): 104-110.

[4] IM S, JANG D, SARAVANAKUMAR G, *et al*. Harnessing the formation of natural killer-tumor cell immunological synapses for enhanced therapeutic effect in solid tumors [J]. *Adv Mater*, 2020, **32**(22): e2000020.

[5] HE Y, LI X, MA J, *et al*. Programmable codelivery of doxorubicin and apatinib using an implantable hierarchical-structured fiber device for overcoming cancer multidrug resistance [J]. *Small*, 2019, **15**(8): e1804397.

[6] GAO D, LO P C. Polymeric micelles encapsulating pH-responsive doxorubicin prodrug and glutathione-activated zinc(Ⅱ) phthalocyanine for combined chemotherapy and photodynamic therapy [J]. *J Control Release*, 2018, **282**: 46-61.

[7] BREGA V, SCALETTI F, ZHANG X, *et al*. Polymer amphiphiles for photoregulated anticancer drug delivery [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, **11**(3): 2814-2820.

[8] HE Y, XU Y, HUANG Y, *et al*. Redox sensitive nano-capsules self-assembled from hyaluronic acid-hydroxychloroquine conjugates for CD44-targeted delivery of hydroxychloroquine to combat breast cancer metastasis *in vitro* and *in vivo* [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2022, **210**: 112249.

[9] MAITI C, PARIDA S, KAYAL S, *et al*. Redox-responsive core-cross-linked block copolymer micelles for overcoming multidrug resistance in cancer cells [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, **10**(6): 5318-5330.

[10] KIM H S, SHARMA A, REN W X, *et al*. COX-2 Inhibition mediated anti-angiogenic activatable prodrug potentiates cancer therapy in preclinical models [J]. *Biomaterials*, 2018, **185**: 63-72.

[11] ZHANG C, LONG L, XIONG Y, *et al*. Facile engineering of indomethacin-induced paclitaxel nanocrystal aggregates as carrier-free nanomedicine with improved synergetic antitumor activity [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, **11**(10): 9872-9883

[12] WANG X, CHENG X, HE L, *et al*. Self-assembled indomethacin dimer nanoparticles loaded with doxorubicin for combination therapy in resistant breast cancer [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, **11**(32): 28597-28609.

[13] ZHUANG W, XU Y, LI G, *et al*. Redox and pH dual-responsive polymeric micelles with aggregation-induced emission feature for cellular imaging and chemotherapy [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, **10**(22): 18489-18498.

[14] XU M, ZHANG C Y, WU J, *et al*. PEG-detachable polymeric micelles self-assembled from amphiphilic copolymers for tumor-acidity-triggered drug delivery and controlled release [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, **11**(6): 5701-5713.

[15] LI S, JIANG M, WANG L, *et al*. Combined chemotherapy with cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors in treating human cancers: recent advancement [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, **129**: 110389.

[16] LI J, ZHANG L, LIN Y, *et al*. A pH-sensitive prodrug micelle self-assembled from multi-doxorubicin-tailed polyethylene glycol for cancer therapy [J]. *RSC Adv*, 2016, **6**: 9160-9163.