转铁蛋白修饰酶敏感索拉非尼与补骨脂酚胶束的理化性质考察及体外药效学评价

邹乃建[1]，孔　亮[2]，常　雷[1]，鹿英强[1*]

（1. 辽宁中医药大学附属医院，辽宁沈阳 110032；2. 辽宁中医药大学药学院，辽宁大连 116600）

摘要：肾细胞癌的肿瘤间和肿瘤内异质性非常高，导致化疗药物的治疗效果不佳。近年来，多靶点药物联用和纳米给药系统在抑制恶性肿瘤生长和转移方面展现了巨大潜力。该研究针对肿瘤微环境中基质金属蛋白酶 2（MMP-2）的高活性，采用薄膜分散法构建了一种共载索拉非尼与补骨脂酚的 MMP-2 响应性纳米胶束，并系统考察了索拉非尼与补骨脂酚的协同作用，优化了药物配比，评估了纳米胶束的理化性质及体外抑制肾癌细胞生长和转移的能力。结果显示，该纳米胶束通过 EPR 效应被动靶向和转铁蛋白受体介导内吞作用相结合的双重靶向策略，提高了药物靶向性和稳定性，并有效降低了药物剂量和毒性，展现出对肿瘤细胞生长、侵袭及转移的强效抑制作用，为肾细胞癌及其他恶性肿瘤的靶向治疗提供了新的思路和策略。

关键词：索拉非尼；补骨脂酚；肾细胞癌；纳米给药系统；纳米胶束；转铁蛋白；基质金属蛋白酶；药效学

中图分类号：R944.9；R96　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2025)04-0488-12

引用：邹乃建，孔　亮，常　雷，等．转铁蛋白修饰酶敏感索拉非尼与补骨脂酚胶束的理化性质考察及体外药效学评价［J］．中国医药工业杂志，2025, 56(4): 488-499．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.04.009

Investigation on Physicochemical Properties and *in vitro* Pharmacodynamic Evaluation of Transferrin-modified Enzyme-sensitive Nanomicelles Co-loaded with Sorafenib and Bakuchiol

ZOU Naijian[1], KONG Liang[2], CHANG Lei[1], LU Yingqiang[1*]

(*1. Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032; 2. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600*)

ABSTRACT: Renal cell carcinoma exhibits extremely high inter- and intra-tumor heterogeneity, which has led to unsatisfactory therapeutic outcomes for chemotherapeutic agents. In recent years, the combination of multi-target drugs and nanocarrier systems has shown tremendous potential in inhibiting the growth and metastasis of malignant tumors. This study focused on the highly expressed matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in the tumor microenvironment and employed the film dispersion method to construct novel MMP-2-responsive nanomicelles co-loading sorafenib and bakuchiol. The research systematically investigated the synergistic effects of sorafenib and bakuchiol, optimized the drug ratio, evaluated the physicochemical properties of the nanomicelles, and assessed their ability to inhibit the growth and metastasis of renal cancer cells *in vitro*. Results demonstrated that the nanomicelles enhanced drug targeting and stability through a dual-targeting strategy combining passive targeting via the EPR effect and transferrin receptor-mediated endocytosis, effectively reduced drug dosage and toxicity. The nanomicelles exhibited strong inhibitory effects on the growth, invasion, and metastasis of tumor cells, offering a new approach and strategy for targeted therapy in renal cell carcinoma and other malignant tumors.

Key Words: sorafenib; bakuchiol; renal cell carcinoma; nano drug delivery system; nanomicelle; transferrin; matrix metalloproteinase; pharmacodynamics

肾细胞癌（renal cell carcinoma，RCC）是泌尿生殖系统常见的恶性肿瘤，其发病率为3%～5%，且发病率和死亡率均随年龄增长而增加[1—2]。目前，RCC的治疗方式主要是手术联合化疗，但术后的转移和复发率高，且由于其肿瘤间和肿瘤内异质性非常高，化疗效果也不佳[3]。

索拉非尼（sorafenib，SOR）是晚期或转移性肾细胞癌的一线和二线抗肿瘤药物，可靶向多种酪氨酸激酶，抑制肿瘤血管生成和肿瘤细胞增殖[4]。SOR的常见不良反应[5]包括皮疹、高血压、胃肠道反应，特别是对于已有出血倾向的患者，还可能增加出血风险。补骨脂酚（bakuchiol，BK）是一种具有抗肿瘤活性的天然化合物，主要存在于十字花科植物中。BK可通过调控细胞周期和肿瘤细胞凋亡来抑制肿瘤细胞增殖和扩散。同时，BK还具有抗氧化活性，可中和体内产生的自由基，减少对细胞DNA的氧化损伤，从而减少DNA突变、恶性肿瘤发生的风险[6]。然而，BK使用过程中可能导致胃肠道不适和甲状腺激素水平变化。有研究[7]表明，BK在高剂量下还可能对DNA产生一定的毒性。除了上述不良反应，SOR和BK的溶解性较差、体内半衰期短、易产生耐药性，严重制约了其临床应用。

近年来，多靶点药物联用给肿瘤治疗带来了新曙光。与单一药物化疗相比，联合用药的抗肿瘤活性更强，并且可降低肿瘤细胞产生耐药性的风险。但是，联合用药的递送更具挑战性[8]。纳米给药系统的发展为提高药物生物利用度、减轻不良反应开拓了新路径[9]。纳米给药系统可通过EPR效应而被动靶向至肿瘤部位，并可响应肿瘤微环境或肿瘤部位高表达的酶或蛋白实现药物控释。不仅如此，纳米给药系统易于修饰，可通过表面修饰靶向基团而实现主动靶向，进一步改善提高药物生物利用度[10]。基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinase，MMP）在肿瘤微环境中高表达[11]，可通过降解基质蛋白提供通路，促进肿瘤细胞的侵袭和转移[12]；转铁蛋白受体（transferrin receptor，TfR）也是一种在许多恶性肿瘤细胞表面高表达的受体[13]，可作为主动靶向策略的一种选择。

为实现SOR和BK的靶向共递送，本研究构建了一种共载药MMP-2响应性逐级靶向纳米胶束（以下简称“共载药酶敏感靶向胶束”）。该纳米胶束首先通过EPR效应被动靶向到肿瘤部位，然后通过MMP-2敏感肽（PVGLIG）实现MMP-2响应，使PEG5000外层脱落并暴露出转铁蛋白（transferrin，TF）靶向配体，通过TfR介导的内吞作用进入细胞并释放药物以达到治疗效果。

1 仪器与试药

1260型高效液相色谱仪仪（美国安捷伦公司）；XS105型十万分之一天平（瑞士Mettler Toledo公司）；RE52CS型旋转蒸发仪（上海亚荣生化仪器厂）；SHZ-D型循环水式真空泵（巩义市予华仪器有限公司）；Litesizer 500型纳米粒度及ζ电位分析仪（奥地利安东帕有限公司）；JEM-1200EX型透射电镜（日本电子株式会社）；FACSCalibu流式细胞仪（美国BD公司）；Ti-S型倒置荧光显微镜（日本尼康公司）；FX Pro型动物成像系统（美国Carestream公司）；Transwell共培养小室（美国Corning公司）。

SOR（批号S125098）和BK（批号B123652）（上海阿拉丁生化科技有限公司）；D-*α*-维生素E聚乙二醇琥珀酸酯（D-*α*-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate，TPGS1000，P-糖蛋白抑制剂，批号MB2036）、香豆素（coumarin，Cou）、1,1'-二辛基-3,3,3',3'-四甲基吲哚三碳菁碘（1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindotricarbocyanine iodide，DiR）均购自大连美仑生物技术有限公司；聚乙烯己内酰胺-聚乙酸乙烯酯-聚乙二醇接枝共聚物（Soluplus，德国巴斯夫集团）；DSPE-PEG2000购自北京艾伟特医药科技有限公司；DSPE-PEG2000-PVGLIG-PEG5000、DSPE-PEG2000-TF（西安瑞禧生物科技有限公司合成）；MMP-2（美国Sigma-Aldrich公司）；细胞活力（活死细胞染色）检测试剂盒、Annexin V/PI双染试剂盒均购自北京中生奥邦生物科技有限公司；DMEM培养基、胰蛋白酶、FBS、青霉素/链

收稿日期：2024-08-06
基金项目：国家自然科学基金项目（82204629）
第一作者：邹乃建（1989—），男，硕士，主治医师，从事中西医结合治疗泌尿系统疾病的研究。
通信作者：鹿英强（1981—），男，硕士，副主任医师，从事中西医结合治疗泌尿系统疾病的研究。
E-mail：yingqiang_1126@163.com

霉素均购自北京索莱宝科技有限公司；其他试剂均为分析级试剂，水为纯净水。

小鼠肾癌细胞（RenCa 细胞）购买自北京中生奥邦生物科技有限公司。细胞在 DMEM 培养基（添加 10% FBS 和 1% 青霉素 / 链霉素）中，于 37 ℃、5% CO_2 条件下培养。

雄性 BALB/c 裸鼠，体质量（20±2）g，购自辽宁长生生物科技有限公司，实验动物许可证号 SYXK（辽）2024-0006。动物试验方案通过辽宁中医药大学动物研究伦理委员会的批准，伦理许可编号 210000420230204。

2　方法与结果

2.1　胶束的制备与表征

采用薄膜分散法制备。精密称取 Soluplus 40 mg、TPGS1000 10 mg、DSPE-PEG2000 2 mg、DSPE-PEG2000-PVGLIG-PEG5000 2 mg、DSPE-PEG2000-TF 2 mg、SOR 0.5 mg、BK 2 mg 于 15 mL 离心管中，用甲醇 5 mL 溶解并转移至 50 mL 圆底烧瓶中，水浴（40 ℃）减压旋转蒸发，待圆底烧瓶底部形成一层薄膜后加入 pH 7.4 的 PBS 5 mL 水化，于 0.22 μm 微孔滤膜上挤出 2 次，即得共载药酶敏感靶向胶束（PVGLIG-TF-S/B-NMs）。制备时不加入 DSPE-PEG2000-PVGLIG-PEG5000，其余同上，得到共载药靶向胶束（TF-S/B-NMs）。

此外，用 Cou 作为荧光探针代替 SOR 和 BK，同法制备各种类型的胶束用于评价体外细胞摄取情况；用 DiR 作为荧光探针，同法制备普通 DiR 胶束、靶向 DiR 胶束和酶敏感 DiR 胶束，用于评价胶束的体内靶向性。

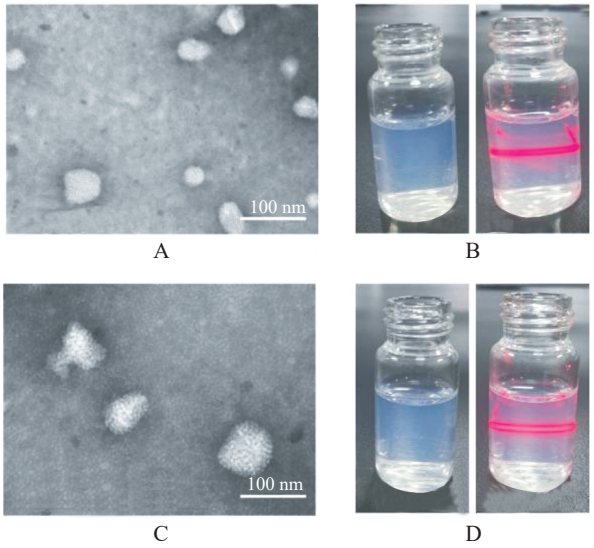
使用纳米粒度及ζ电位分析仪检测共载药靶向胶束和共载药酶敏感靶向胶束的粒径、PDI 和ζ电位值。采用 TEM 表征胶束的形态，结果如图 1 所示。

采用 HPLC 法测定制备过程中过膜前后胶束中 SOR 和 BK 的含量。色谱条件：色谱柱 Agilent ZORBAX SB-Aq C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 甲醇和水（体积比 85 ∶ 15）；检测波长 230 nm；流速 1 mL/min；进样量 20 μL。在该色谱条件下，SOR 和 BK 的峰面积（A）与质量浓度（c）线性关系良好，线性回归方程为分别为：A_{SOR}=829.32c_{SOR}－783.4，R^2=0.990 0；A_{BK}=2 048.1c_{BK}－2 344.4，R^2=0.992 2。包封率（EN）和载药量（DL）的计算公式如下。

$$EN=(A_{过膜后药物}/A_{过膜前药物})\times 100\%$$

$$DL=(C_1/C_2)\times 100\%$$

式中：C_1 为胶束中药物量；C_2 为胶束总量。



A—共载药靶向胶束的 TEM 照片（×10 000）；B—共载药靶向胶束在日常光和激光下的外观；C—共载药酶敏感靶向胶的 TEM 照片（×10 000）；D—共载药酶敏感靶向胶束胶束在日常光和激光下的外观。

图 1　TF-S/B-NMs 和 PVGLIG-TF-S/B-NMs 胶束的 TEM 和外观照片

Fig.1　TEM and Appearance Images of TF-S/B-NMs and PVGLIG-TF-S/B-NMs Micelles

结果显示，共载药靶向胶束的平均粒径为（62.68±0.77）nm，PDI 为（0.17±0.06），ζ电位为（－2.53±0.55）mV；共载药酶敏感靶向胶束的平均粒径为（69.04±0.67）nm，PDI 为（0.05±0.01），ζ电位为（－4.80±0.80）mV。可见，2 种胶束制品的粒径及其分布（PDI<0.200）有助于发挥 EPR 效应以及细胞内吞作用。2 种胶束表面都带负电荷，有利于降低血浆蛋白的非特异性吸附，延长在血液循环中的滞留时间。同时，2 种胶束均具有单分散的球形形貌（图 1A、图 1C），室温下静置时外观均澄清透明，且在激光照射下有明显的丁达尔现象，表明 2 种胶束具有良好的形态均匀性、分散性和稳定性。共载药酶

敏感靶向胶束的包封率为 (93.8±1.5) %，载药量为 (4.27±0.25) % (n=3)。

2.2 载药纳米胶束的稳定性考察

取“**2.1**”项下制备的共载药酶敏感靶向胶束，每管 2 mL 分装，置 4 ℃冰箱中。随后每 7 d 各取样 1 mL，照“**2.1**”项下 HPLC 法测定 SOR 和 BK 在不同胶束制剂中的包封率的变化，考察贮存稳定性。平行试验 3 次，结果如图 2A 所示。

另取“**2.1**”项下的共载药酶敏感靶向胶束，加入终浓度为 10%的 FBS，于不同时间点 (0、2、4、8、12、24 h) 取样 1 mL，照“**2.1**”项下 HPLC 法测定 SOR 和 BK 在胶束中包封率的变化，考察血清稳定性。平行试验 3 次，结果如图 2B 所示。

结果显示，共载药酶敏感靶向胶束在 4 ℃下贮存 28 d，包封率随着贮存时间的延长而下降，但变化小于 6%；在含 10% FBS 的条件下，不同时间测得的包封率变化较小，显示出良好的血清稳定性。

2.3 MMP-2 响应性评价

采用 MMP-2 敏感肽降解试验考察共载药酶敏感靶向胶束的酶敏感性。取该胶束溶液 6 mL，添加 MMP-2 母液 (500 μg/mL) 60 μL，于 37 ℃培养箱中孵育，分别于不同时间点 (0、2、4、6、8 h) 取样 1 mL，采用动态光散射法检测胶束粒径，以评价其刺激响应性。平行试验 3 次，结果如图 3 所示。

结果显示，加入 MMP-2 溶液 8 h 后，共载药酶敏感靶向胶束的平均粒径缩小了约 10 nm，说明其中的酶敏感多肽 PVGLIG 对 MMP-2 的响应较灵敏，能有效使胶束外层的 PEG5000 剥离，有利于 TF 靶头的暴露，从而增加肿瘤细胞对胶束的摄取。

2.4 SOR 和 BK 的协同作用评价

将 RenCa 细胞以每孔 2×10^4 个细胞的密度接种至 96 孔板，孵育 12 h 后按棋盘法每孔加入 20 μL 药

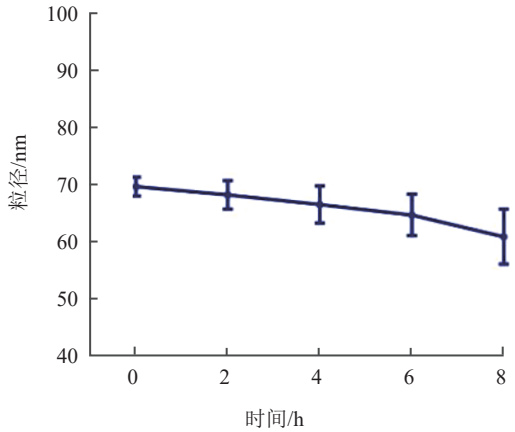
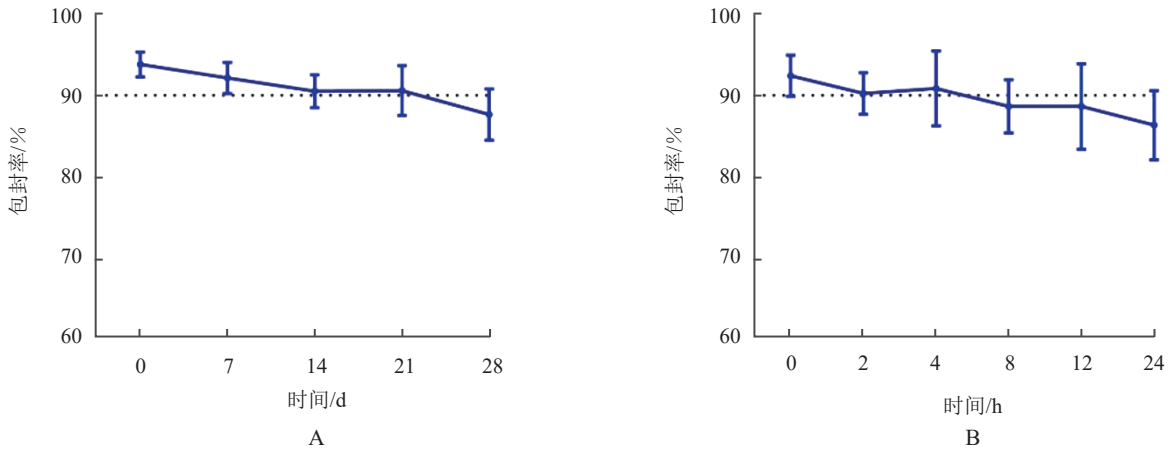


图 3 SOR 和 BK 共载药酶敏感靶向胶束的 MMP-2 响应性评价 (n=3)

Fig.3 MMP-2 Responsiveness Evaluation of SOR and BK Co-loading Enzyme-sensitive Nanomicelles (n=3)



A—4 ℃下贮存 28 d；B—血清稳定性。

图 2 SOR 和 BK 共载药酶敏感靶向胶束的稳定性 (n=3)

Fig.2 Stability of SOR and BK Co-loading Enzyme-sensitive Nanomicelles (n=3)

物。依据文献[14—15]及预试验结果确定游离 SOR 和游离 BK 的给药浓度：游离 SOR 为 0、0.31、0.62、1.25、2.5、5、10 μmol/L；游离 BK 为 0、10、20、40、60、80、100 μmol/L。给药后细胞继续培养 48 h，然后使用磺酰罗丹明 B（Sulforhodamine B，SRB）比色法评估细胞活力。使用 SynergyFinder 网页版（https://synergyfinder.fimm.fi）计算 SOR 和 BK 的协同评分与“抑制指数”（即 100－细胞活力）。响应面模型和零相互作用效力（zero interaction potency，ZIP）评分大于 0 被认为具有协同作用，得分大于 10 被认为具有强协同作用[16]。本研究中游离 SOR 和游离 BK 组合的 2D 和 3D 协同图如图 4 所示，红色区域的渐变表示协同作用的强度。

结果显示，游离 SOR 和游离 BK 的 ZIP Synergy 评分为 7.146，在抑制 RenCa 细胞增殖方面表现出了较高的协同效应。图 4A 所示的白色矩形内是协同作用较强时 2 种药物的浓度。综合考虑 SynergyFinder 对药物浓度的推荐范围和纳米胶束的包载能力，最终选择 SOR 和 BK 物质的量比例为 1 ∶ 7 进行后续试验。

2.5　RenCa 细胞对胶束的摄取

采用荧光倒置显微镜定性分析 RenCa 细胞摄取不同胶束的情况。RenCa 细胞以每孔 1×10^5 个的密度接种于 6 孔板中，各组设置 3 个平行复孔，置 37 ℃、5% CO_2、相对湿度 90%的培养箱中培育 24 h 后，分别加入空白对照（Blank-NMs）、游离 Cou、Cou 胶束（Cou-NMs）、靶向（TF-Cou-NMs）、酶敏感靶向 Cou 胶束（PVGLIG-TF-Cou-NMs）、酶敏感靶向 Cou 胶束+MMP2 各 300 μL。继续孵育 2 h 后用 PBS（pH 7.4）洗涤、4% 多聚甲醛固定 10 min，用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚（4',6-diamidino-2-phenylindole，DAPI）荧光染料避光染色 6 min，采用荧光倒置显微镜观察细胞内的荧光分布情况。

另取 RenCa 细胞同法处理后，用 PBS 洗 3 次，经胰蛋白酶消化、离心，在 PBS 500 μL 中重悬，采用流式细胞仪定量测定 RenCa 细胞摄取 Cou 后的平均荧光强度。结果如图 5、6 所示。

图 5 显示，各胶束组的平均荧光强度高于游离组，说明胶束可以改善香豆素的溶解度；TF-Cou-NMs 和酶敏感 Cou 胶束 +MMP2 组的荧光强度均显

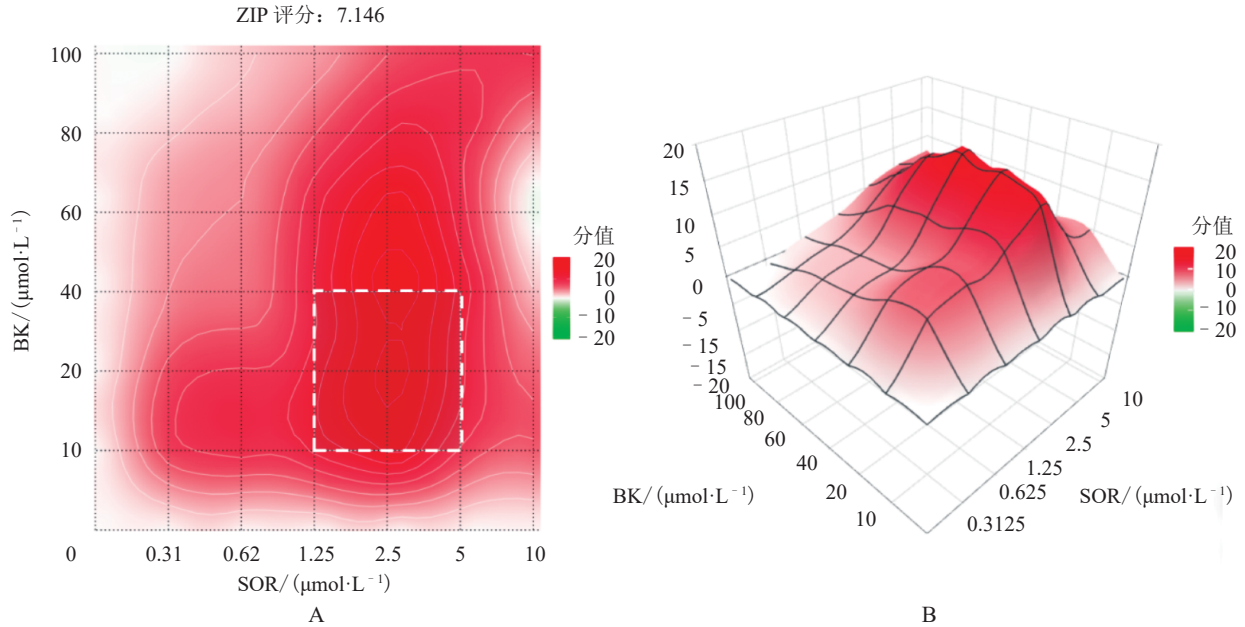
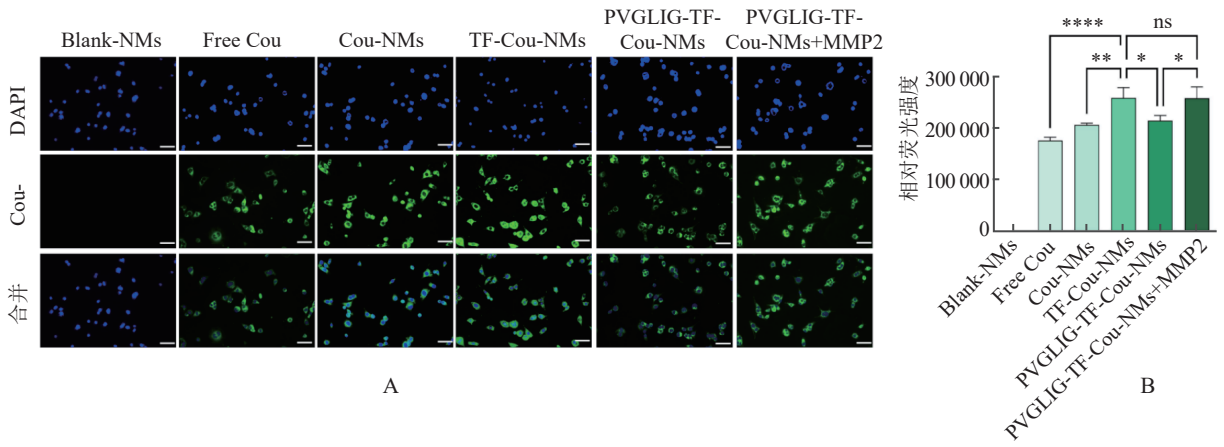


图 4　游离 SOR 和游离 BK 组合的 2D 协同图（A）和 3D 协同图（B）（*n*=3）

Fig.4　2D Codiagram（A）and 3D Codiagram（B）of Combining Free SOR and Free BK（*n*=3）



A—各组细胞的荧光照片（比例尺为 100 μm）；B—各组细胞的相对荧光强度（n=3；ns 表示 P>0.05，* 表示 P<0.05，** 表示 P<0.01，**** 表示 P<0.000 1）

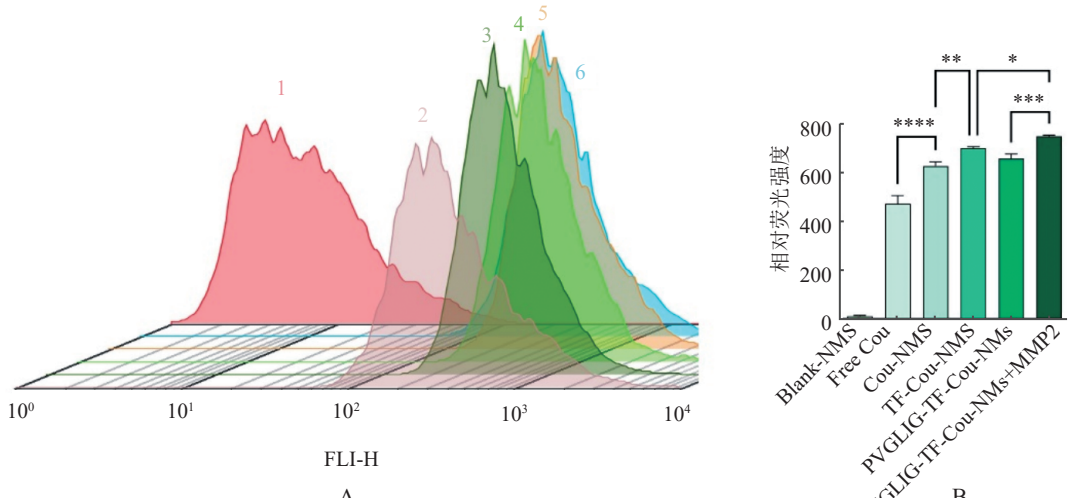
图 5 荧光倒置显微镜定性分析不同纳米胶束在 RenCa 细胞中的摄取情况

Fig.5 Qualitatively Analytic Results of the Uptake of Different Nanomicelles in RenCa Cells by Inverted Fluorescence Microscopy

著高于 Cou-NMs 组，说明纳米胶束经过 TF 修饰可以提高对 RenCa 细胞的主动靶向性，有利于增强药物对肿瘤细胞的杀伤作用。流式细胞术的检测结果（图 6）也从定量的角度印证了上述结论。

2.6 胶束的体内靶向性考察

取处于对数生长期的 RenCa 细胞，以每 1 mL 含 1.5×10^6 个细胞的密度，皮下注射 200 μL 到裸鼠左侧腋下区域。当肿瘤体积达到 500 mm^3 时，通过尾静脉注射生理盐水（Blank Control）、游离 DiR、DiR 胶束（DiR-NMs）、靶向 DiR 胶束（TF-DiR-NMs）、酶敏感靶向 DiR 胶束（PVGLIG-TF-DiR-NMs）各 200 μL（相当于每只裸鼠给予 DiR 3 μg）。使用体内



A—流式细胞荧光分布图（1—Blank-NMs；2—游离 Cou；3—Cou-NMs；4—PVGLIG-TF-Cou-MNs；5—TF-Cou-MNs；6—PVGLIG-TF-Cou-MNs+MMP2）；B—各组细胞的相对荧光强度（n=3；ns 表示 P>0.05，* 表示 P<0.05，** 表示 P<0.01，*** 表示 P<0.001，**** 表示 P<0.000 1）

图 6 流式细胞术定量分析 RenCa 细胞中 Cou 的平均荧光强度

Fig.6 Qualitatively Analytic Results of the Mean Fluorescence Intensity of Cou Ingested by RenCa Cells by Flow Cytometry

动物成像系统在不同时间点监测裸鼠体内 DiR 的生物分布情况，结果如图 7 所示。

游离 DiR 组的荧光信号主要位于肝脏，且随着时间延长而逐渐减弱，24 h 时已几乎消失。各胶束组中，酶敏感靶向 DiR 胶束组在所有指定时间点均表现出最强的肿瘤积聚，证明该胶束能够更多地渗透到肿瘤部位，并保持更长的体内停留时间。上述结果显示基于双重靶向策略的酶敏感靶向 DiR 胶束具有优越的肿瘤靶向能力，并且利用 PEG5000 有效提高了体内的稳定性，延长了体内循环时间。

2.7　细胞活力检测

将 RenCa 细胞以每孔 1.5×10^4 个细胞的密度接种到 96 孔板中，每组设置 4 个复孔。每孔给药 20 μL 后继续培养细胞 24 h，根据细胞活力（活死细胞染色）检测试剂盒说明书检测细胞活力，在倒置荧光显微镜下使用 (490±10) nm 的激发波长同时观察活细胞（黄绿色荧光）和死细胞（红色荧光），结果如图 8 所示。

空白胶束组对细胞活力没有明显影响，表明聚合物材料在 24 h 内的安全性良好。其他载药胶束组均对细胞活力有一定的影响。相同药物浓度，共载药靶向胶束组和共载药酶敏感靶向胶束 +MMP2 组对 RenCa 细胞的抑制作用更强。

2.8　纳米胶束诱导细胞凋亡

以每孔 1×10^5 个的密度接种 RenCa 细胞至 6 孔板，待长至 70%时加入各组纳米胶束 (Blank-NMs、游离 S/B(SOR 和 BK 物质的量比为 1 ∶ 6.5)、共载药胶束、共载药靶向胶束、共载药酶敏感靶向胶束、共载药酶敏感靶向胶束 +MMP2) 300 μL。培养 48 h 后收集细胞，照 Annexin V/PI 双染试剂盒说明书加入 Annexin V-FITC 和 PI 进行双染。室温避光反应 15 min，1 h 内利用流式细胞仪检测各组对 RenCa 细胞凋亡的影响，结果如图 9 所示。

流式细胞检测结果显示，在空白对照组中，细

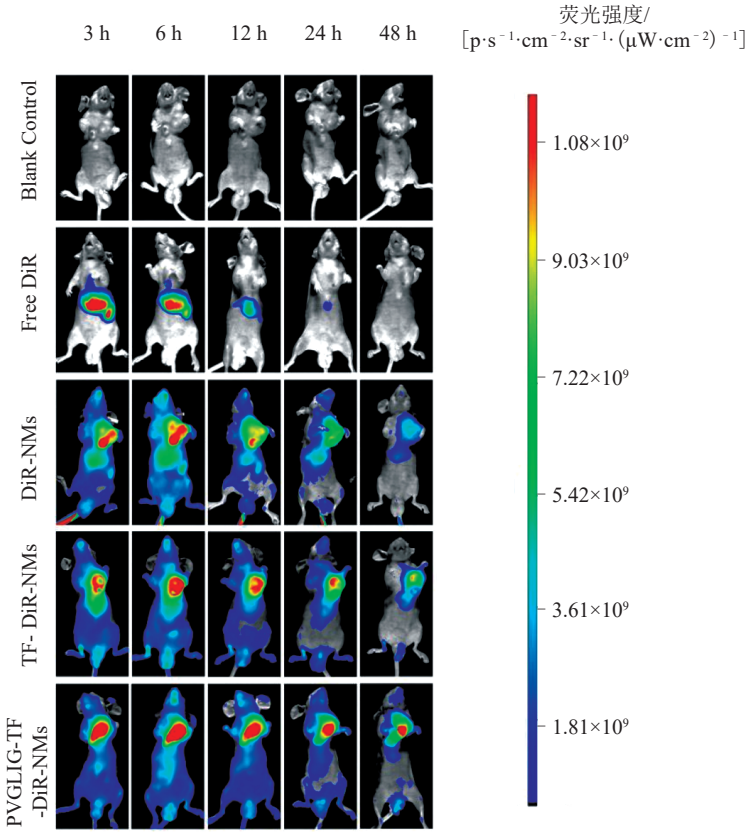
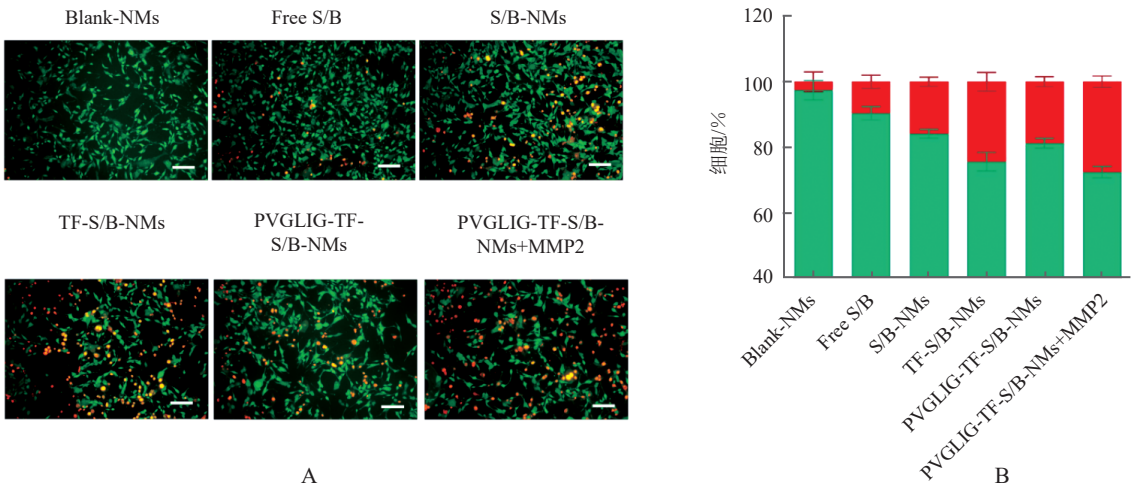


图 7　胶束体内靶向性的考察结构（*n*=3）

Fig.7　Investigation Results of Micellar Targeting *in vivo* (*n*=3)



A—细胞活力的荧光显微图（比例尺为 100 μm）；B—各组细胞的细胞活力定量分析（■—活细胞；■—死细胞；n=3）。

图 8 细胞活力检测结果

Fig.8 Cell Viability Assay Results

胞总凋亡率（早期＋晚期）仅为 5.11%；各胶束组的细胞总凋亡率高于游离组，共载药靶向胶束组和添加 MMP2 的共载药酶敏感靶向胶束组诱导肿瘤细胞凋亡的能力接近且高于其他各组。

2.9 不同胶束抑制 RenCa 细胞伤口愈合的能力

通过划痕试验考察不同胶束抑制 RenCa 细胞伤口愈合的能力。以每孔 1×10^5 个的浓度将细胞接种至 6 孔板，过夜培养后，用 20 μL 无菌移液管尖端在孔中划出直线，保证直线等粗细，加入新的培养液和不同供试品［Blank-NMs、游离 S/B（SOR 和 BK 物质的量比为 1 ∶ 6.5）、共载药胶束、共载药靶向胶束、共载药酶敏感靶向胶束、共载药酶敏感靶向胶束 +MMP2，给药量均为 300 μL］，分别于给药后的不同时间点（0、12、24 h）使用倒置显微镜观察划痕的愈合速度并拍照记录，结果如图 10 所示。用 Image J 1.53i 软件对划痕面积进行统计分析，按下式计算创面愈合率（R）计算。

$$R=(1-A_t/A_0)\times100\%$$

式中：A_t 代表在 12 或 24 h 时测量的划痕区域面积，A_0 代表在 0 h 时测量的划痕区域面积。

给药 24 h 后 Blank Control 组划痕愈合率超过 60%，其余各给药组对划痕愈合均有一定抑制作用，其中共载药靶向胶束和共载药酶敏感靶向胶束 +MMP2 组的抑制程度的较明显。

2.10 胶束体外抑制 RenCa 细胞侵袭迁移的能力

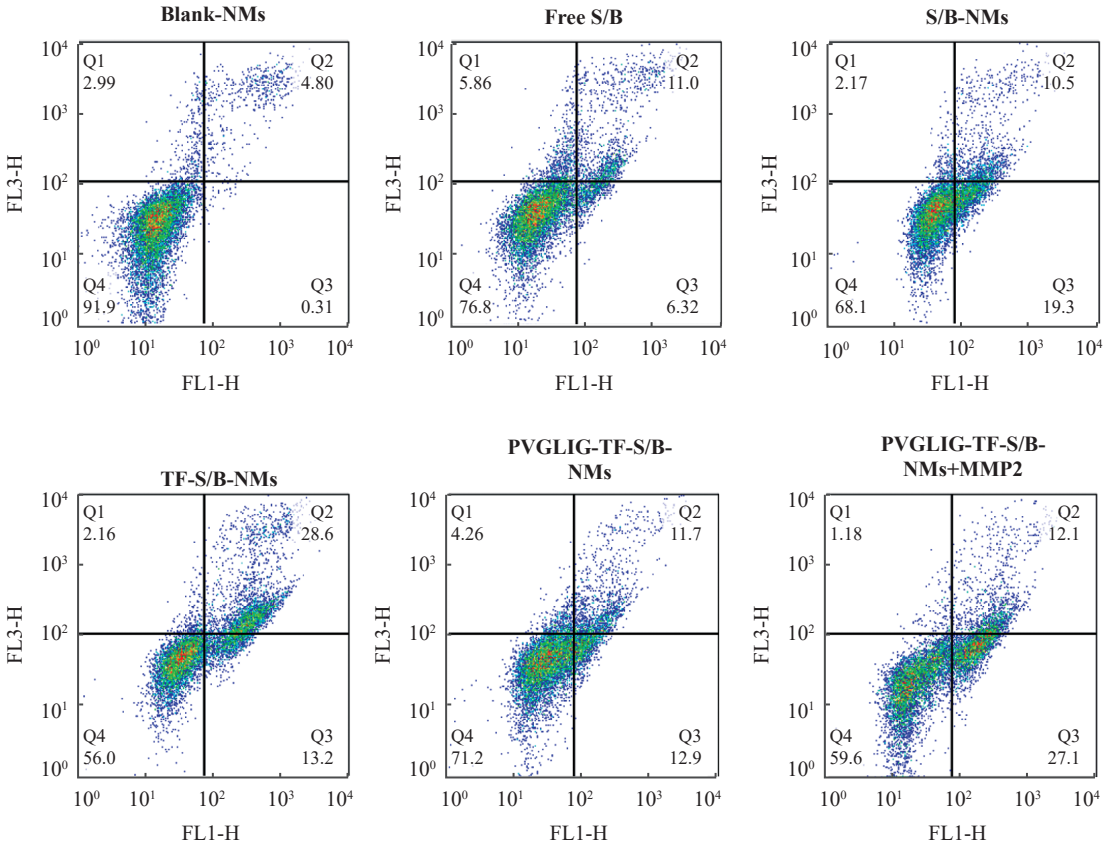
采用 Transwell 共培养小室进行细胞迁移试验。在 Transwell 下室加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基 600 μL，上室加入不同的纳米胶束 20 μL 和用不含 FBS 的 DMEM 培养基复悬的细胞悬液 180 μL，细胞密度为每孔 2×10^4 个。37 ℃培养 24 h 后取出上室，用棉签蘸 PBS（pH 7.4）擦洗 4 次，再经 4% 多聚甲醛固定 20 min，然后用 0.4%结晶紫溶液于室温染色 10 min，完毕后用 PBS（pH 7.4）洗去未结合的结晶紫，室温晾干，倒置显微镜下观察并拍照。用 Image J 2.1.0-1.53C 软件对所拍摄图片的细胞进行计数。照下式计算细胞迁移率（S）。

$$S=C_{\text{制剂组细胞}}/C_{\text{空白对照组细胞}}\times100\%$$

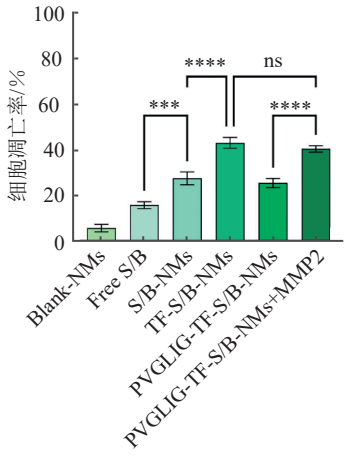
式中：$C_{\text{制剂组细胞}}$和 $C_{\text{空白对照组细胞}}$分别为制剂组和空白对照组细胞的个数。

细胞侵袭试验需要提前将 20 μL 无菌移液管头、Ep 管置 4 ℃预冷，在冰上给 Transwell 小室铺基质胶（基质胶用无血清培养基 1 ∶ 4 稀释），然后按照每 1 mL 含 3×10^4 个细胞的密度将细胞悬液 180 μL 加入小室中，其他步骤同细胞迁移试验一致。侵袭率（I）计算公式如下。

$$I=C_{\text{制剂组细胞}}/C_{\text{空白对照组细胞}}\times100\%$$



A



B

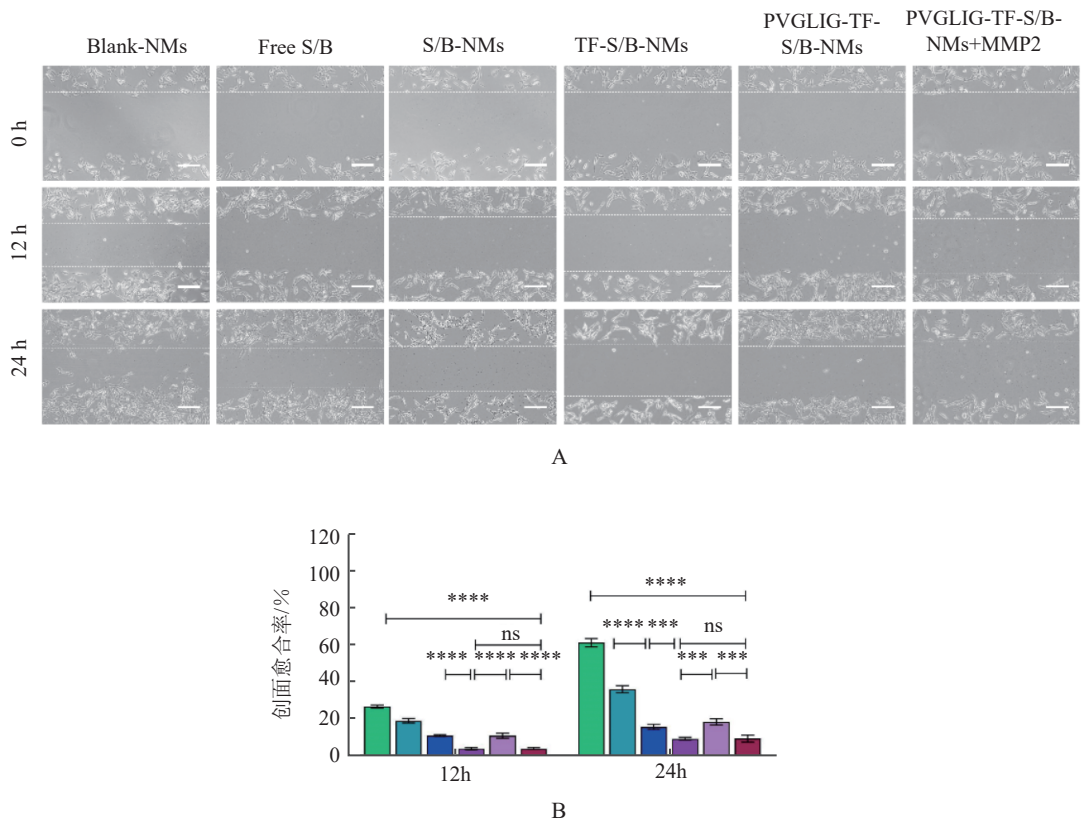
A—流式细胞荧光强度散点图；B—各组细胞的凋亡率（n=3；ns 表示 P>0.05，*** 表示 P<0.001，**** 表示 P<0.000 1）。

图 9　不同胶束对 RenCa 细胞凋亡的影响

Fig.9　Effects of Different Micelles on Apoptosis of RenCa Cells

式中：$C_{制剂组细胞}$和 $C_{空白对照组细胞}$分别为制剂组和空白对照组细胞的个数。

胶束抑制细胞迁移和抑制细胞侵袭的结果如图 11 所示。2 个试验中空白对照组均存在着大量细胞穿过小室，说明 RenCa 细胞具有很强的迁移和侵袭能力。与空白对照组相比，各给药组穿过 Transwell



A—各组细胞划痕试验的显微图（比例尺为 100 μm）；B—各组细胞的创面愈合率（—Blank-NMs；—TF-S/B-NMs；—Free S/B；—PVGLIG-TF-S/B-NMs；—S/B-NMs；—PVGLIG-TF-S/B-NMs+MMP2. n=3；ns 表示 P>0.05，*** 表示 P<0.001，**** 表示 P<0.000 1）

图 10 划痕试验考察不同胶束抑制 RenCa 细胞伤口愈合的能力

Fig.10 Inhibiting Abilities of Different Micelles on Wound Healing of RenCa Cells by Scratch Test

小室的细胞数均有减少，其中共载药靶向胶束和共载药酶敏感靶向胶束 +MMP2 组抑制细胞的迁移和侵袭效果较为显著，迁移率和侵袭率均下降到了 10%以下。

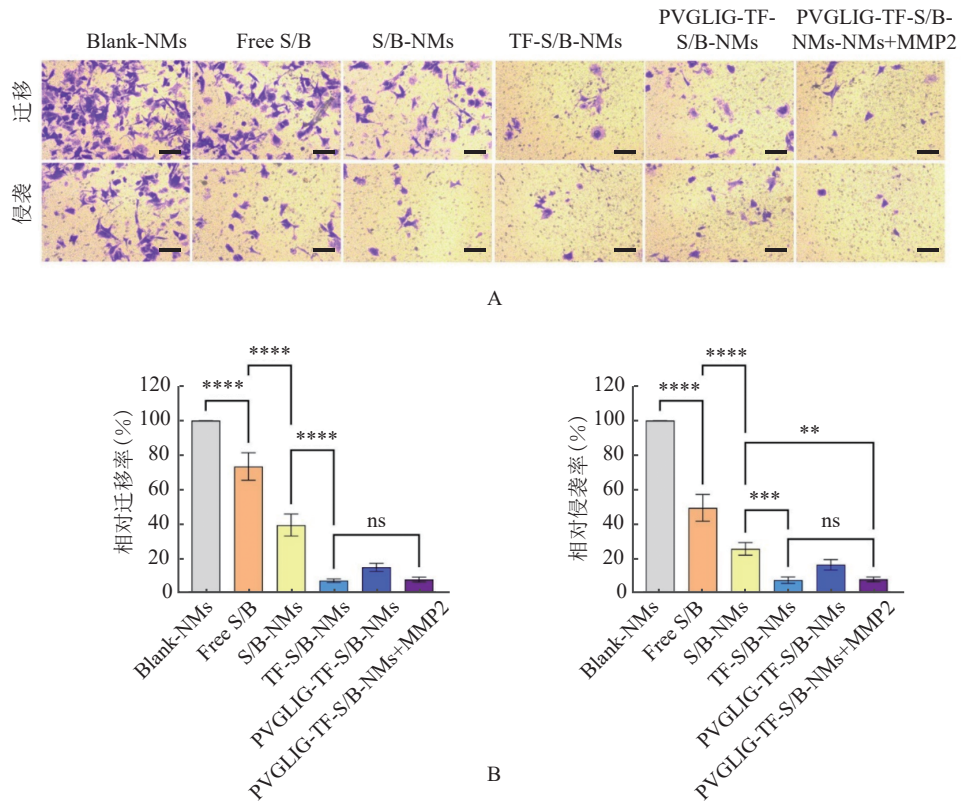
2.11 胶束抑制 RenCa 细胞血管生成拟态（vasculogenic mimicry，VM）通道形成试验

取基质胶每孔 50 μL 加至 96 孔板，振荡摇匀以保证无气泡，立即将 96 孔板置 37 ℃细胞培养箱内 30 min，以确保基质胶凝固。将 RenCa 细胞以每孔 1.5×10^4 个的浓度接种于 96 孔板，每孔分别加入不同配方的纳米胶束 20 μL。继续孵育 6 h，用倒置显微镜下观察不同胶束对拟态血管生成的破坏情况。

VM 被认为是一种与肿瘤血管生成有关的重要现象，可能影响肿瘤的生长、侵袭和转移[17]。如图 12 所示，空白对照组已形成明显的由细胞伸长组成的通道，且网格完整、数量多。经不同胶束组处理后的 RenCa 细胞所形成的 VM 通道均发生了不同程度的破坏。共载药靶向胶束和共载药酶敏感靶向胶束 +MMP2 组所形成的 VM 通道短且破碎、网格完整度较差或未形成网格、单个网格面积较小，说明二者能明显抑制 VM 通道形成。

3 总结与讨论

目前针对肿瘤的靶向递送系统主要致力于提高药物在肿瘤部位的蓄积，并通过功能设计实现肿瘤微环境响应，提升药物的治疗效果，降低发生不良反应的风险。本课题设计的载药系统可以自组装成尺寸符合 EPR 效应的纳米胶束，具有更好的稳定性，在一定程度上减少对健康组织和器官的伤害；转铁



A—各组细胞侵袭迁移的显微图（比例尺为 50 μm）；B—各组细胞的相对迁移率；C—各组细胞的相对侵袭率（n=3；ns 表示 P>0.05，** 表示 P<0.01，*** 表示 P<0.001，**** 表示 P<0.000 1）。

图 11　胶束体外抑制 RenCa 细胞侵袭迁移的能力

Fig.11　Ability of Micelles to Inhibit Invasion and Migration of RenCa Cells *in vitro*

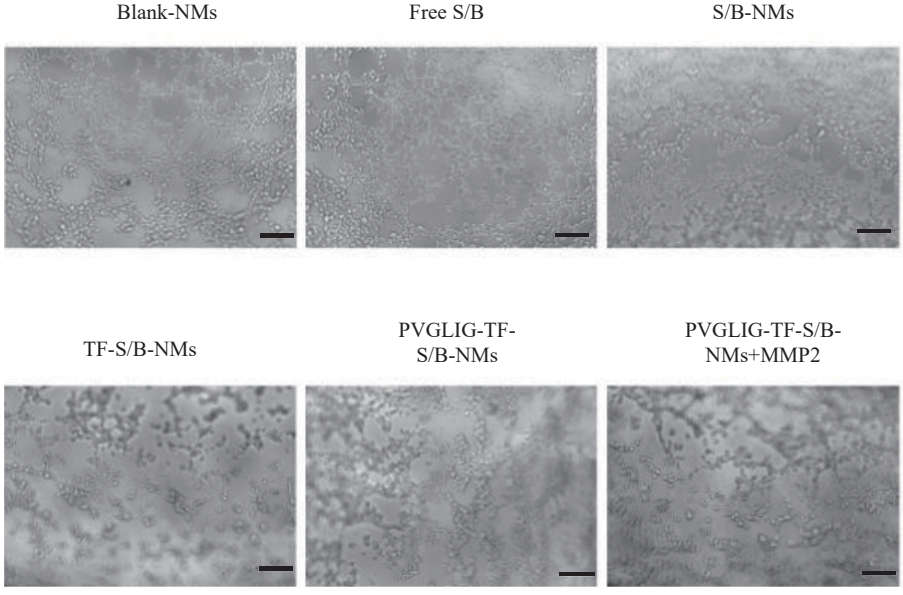


图 12　不同胶束对拟态血管通道的破坏作用（比例尺为 100 μm）

Fig.12　Destruction of Vascular Mimicry Channels by Different Micelles（Scale Bar=100 μm）

蛋白的修饰能使胶束具有主动靶向作用，更多累积到肿瘤组织部位，从而减少药物损失，增大药物利用率；SOR 和 BK 适宜的物质的量比例可以实现协同化疗，降低药物剂量，减轻不良反应。试验结果表明，共载药酶敏感靶向胶束可增加 RenCa 细胞对药物的摄取，诱导肿瘤细胞凋亡，抑制拟态血管形成和肿瘤细胞的侵袭、转移，为肿瘤靶向治疗的进一步研究提供了新思路。

参考文献：

[1] TRAYES K P, COKEBAKES S E H. Breast cancer treatment [J]. *Am Fam Physician*, 2021, **104**(2): 171-178.

[2] NAIK P, DUDIPALA H, CHEN Y W, *et al*. The incidence, pathogenesis, and management of non-clear cell renal cell carcinoma [J]. *Ther Adv Urol*, 2024, **16**: 17562872241232578.

[3] CHEN Y W, WANG L, PANIAN J, *et al*. Treatment landscape of renal cell carcinoma [J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2023, **24**(12): 1889-1916.

[4] MARTÍN-AGUILAR A E, NÚÑEZ-LÓPEZ H, RAMIREZ-SANDOVAL J C. Sorafenib as a second-line treatment in metastatic renal cell carcinoma in Mexico: a prospective cohort study [J]. *BMC Cancer*, 2021, **21**(1): 16.

[5] RANDRUP HANSEN C, GRIMM D, BAUER J, *et al*. Effects and side effects of using sorafenib and sunitinib in the treatment of metastatic renal cell carcinoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, **18**(2): 461.

[6] LIN M X, XU Q, LUO Y, *et al*. Bakuchiol inhibits lung cancer by modulating tumor microenvironment and the expression of PD-L1 [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2023, **37**(9): e23401.

[7] AFZAL N, SIVAMANI R K. Finding the right Bakuchiol: choose wisely [J]. *J Cosmet Dermatol*, 2023, **22**(7): 1967-1968.

[8] POMEROY A E, SCHMIDT E V, SORGER P K, *et al*. Drug independence and the curability of cancer by combination chemotherapy [J]. *Trends Cancer*, 2022, **8**(11): 915-929.

[9] SHEN R Y, JIANG Q, LI P R, *et al*. “Targeted plus controlled” — Composite nano delivery system opens the tumor vascular and microenvironment normalization window for anti-tumor therapy [J]. *Int J Pharm*, 2023, **647**: 123512.

[10] PARK H, OTTE A, PARK K. Evolution of drug delivery systems: from 1950 to 2020 and beyond [J]. *J Control Release*, 2022, **342**: 53-65.

[11] KHOSRAVI G R, MOSTAFAVI S, BASTAN S, *et al*. Immunologic tumor microenvironment modulators for turning cold tumors hot [J]. *Cancer Commun* (Lond), 2024, **44**(5): 521-553.

[12] LYU Y Q, XIAO Q Q, YIN L F, *et al*. Potent delivery of an MMP inhibitor to the tumor microenvironment with thermosensitive liposomes for the suppression of metastasis and angiogenesis [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2019, **4**: 26.

[13] LI J R, ZHANG Z X, ZHANG B L, *et al*. Transferrin receptor 1 targeted nanomedicine for brain tumor therapy [J]. *Biomater Sci*, 2023, **11**(10): 3394-3413.

[14] 龙 雪, 邱琬婷, 曹世杰, 等. 补骨脂酚通过 MAPK 途径诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡的研究 [J]. 现代肿瘤医学, 2020, **28**(5): 729-735.

[15] 方思远. 肝靶向奥沙利铂与索拉菲尼共载脂质体的制备及体外活性研究 [D]. 南京: 东南大学硕士学位论文, 2018.

[16] IANEVSKI A, GIRI A K, AITTOKALLIO T. SynergyFinder 2.0: visual analytics of multi-drug combination synergies [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, **48**(W1): W488-W493.

[17] WEI X X, CHEN Y H, JIANG X J, *et al*. Mechanisms of vasculogenic mimicry in hypoxic tumor microenvironments [J]. *Mol Cancer*, 2021, **20**(1): 7.