

响应型纳米载体在肿瘤靶向递药中的构建与评价

张捷 覃辉 付志萍

荆州市中心医院, 湖北荆州, 434000;

摘要: 目的: 对化疗药物毒副作用强、作用靶点不明确、可控性低的问题, 设计 pH/GSH 双重响应型、HA ρ 修饰的 MSn 纳米载体, 使 DOX 能定向可控性的递送到肿瘤部位并评估其抗肿瘤疗效以及生物相容性。方法: 以氨基化的 MSN 为载体经二硫键连接 HA 制备 HA-MSN@DOX 载体; 观察载体粒径大小、形态、电势; 计算药物载药量和包封率; 检测在体内外不同条件下 DOX 的释放情况。体外采用 MCF-7 癌变细胞来检测该载体的靶向能力、杀伤活性和诱导凋亡的作用; 体内构建荷瘤裸鼠模型来检验肿瘤靶向富集能力、抑制肿瘤生长作用以及器官毒性等。结论: 期望载体颗粒大小均匀分布、分散良好, 在体内环境中药物泄露率较低, 在肿瘤酸性微环境中能迅速释放药物; 体外实验中具有很强的靶向性及抗肿瘤作用, 能够诱导癌细胞凋亡; 体内研究中发现该载体的肿瘤聚集性强、有效的抑制肿瘤生长, 且未观察到明显的器官组织损害情况, 安全性能好。

关键词: pH/谷胱甘肽双响应; 介孔二氧化硅纳米载体; 透明质酸

DOI: 10.69979/3029-2808.26.04.092

1 肿瘤递药困境解析 载体设计理念确立

癌症是危害人类生命的重大公共性疾病, 化疗是肿瘤中期以及晚期的主要治疗方法之一。阿霉素作为一种广泛使用的化疗药物可以用于许多种类型的癌肿但是具有十分明显的毒副作用如: 严重的心肌损害、骨髓抑制以及较低的药物在肿瘤组织内的浓度等等因素影响了临床疗效。

纳米载药系统以强渗透性、长停留性 (EPR 效应) 被动靶向肿瘤组织, 这是基于肿瘤血管高通透性和低淋巴引流能力的基础之上。但是传统的纳米载体比如脂质体或者是聚乙二醇化聚合物纳米粒往往遇到药物流动过早地在血液循环中流失了, EPR 效应本身的非均一性会限制其靶向性能, 还有就是不能对药物进行可控释放等问题, 使得临床疗效差、副反应严重的问题更加突出。所以要想突破这些问题就必须研发出能够主动识别肿瘤的一种新型纳米系统设计, 比如说可以通过表面功能化带有靶向配体比如抗原抗体、肽段等; 实施对环境敏感式的药物释放方式, 该系统的出现能够更好的用于癌症治疗过程中的精确性与安全度^[1]。

本文设计 pH/GSH 双重响应、HA 修饰的 MSNs 递药体系: 采用介孔二氧化硅高效负载药物; HA 对肿瘤细胞过表达的 CD44 受体进行特异性识别从而封锁孔隙使载体更加稳定, 同时降低药物释放的风险; 在低 pH 或者高 GSH 浓度下能够迅速响应从而快速释放有效成分, 精确地

杀伤癌细胞。本文全面的设计以及评价将会给肿瘤靶向化疗带来一种新的思路^[2]。

2 载体合成工艺优化 理化性质系统表征

2.1 实验材料与仪器

实验中使用的正硅酸乙酯 (TEOS)、十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB)、3 - 氨丙基三乙氧基硅烷 (APTES) 均是分析级, 由国药集团化学试剂有限公司提供; 透明质酸 (HA, 分子量为 10KDa) 由华熙生物科技公司提供; 阿霉素 (DOX) 来自大连美仑生物科技有限公司; 二硫代二丙酸 (DTPA)、1-(3 - 二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 由美国 sigma-aldrich 公司提供; 乙腈、甲醇为色谱级, 其它均为分析试剂。使用设备有: 马尔文 ZetasizerNano ZS90 动态光散射仪、日本电子 JEM-2100F 透射电子显微镜、安捷伦 1260 高效液相色谱仪、赛姆飞 MultiskanF C 酶标仪、透析袋 (截留分子量 3500Da)、真空干燥箱、恒温振荡培养箱等^[3]。

2.2 纳米载体的制备

利用改进溶胶-凝胶法制备氨基化介孔二氧化硅纳米粒子 (MSN): CTAB、NaOH 和 TEOS 反应后再加入 APTES 氨基化处理, 然后离心、清洗、盐酸乙醇回流水洗去掉模剂, 干燥后得到氨基化 MSN, 以负压充填法把 DOX 封装于 MSN 孔内: 氨基化的 MSN 分散在 DOX PBS 溶液

内, 避光负压搅拌后再离心得到 MSN@DOX。HA 修饰借助二硫键桥联: HA 通过 EDC/NHS 活化羧基, 与 DTPA 反应形成二硫键, 之后再与 MSN@DOX 中的氨基发生酰胺化反应, 产物洗涤冷冻干燥即为 HA-MSN@DOX 纳米药物载体系统, 在整个过程中均需保持避光状态。同法制备未负载药物的空白 HA-MSN 载体用于安全性评价^[4]。

2.3 纳米载体的理化性质表征

利用动态光散射仪 (DLS) 测量 MSN、MSN@DOX、HA-MSN@DOX 的粒径以及多分散指数 (PDI)、 ζ 电位, 在实验环境 25℃ 下对每种样本重复测量三次, 取平均值作为结果。使用透射电子显微镜 (TEM) 来观察纳米载体的微观形貌及孔道结构, 样品用超声处理分散到无水乙醇中, 滴在铜网上, 待干燥之后再透射电镜观测, 加速电压 200kV。实验测得的结果是: 合成的 MSN 呈规则的球形形貌和均匀的介孔结构, 粒径约为 100 nm, PDI 小于 0.2, 分散效果很好。HA 修饰之后的载体粒径稍微变大一点, Zeta 电位从氨基化的 MSN 的正电性转变为负电性, 证明成功修饰了 HA^[5]。

3 体外靶向摄取验证 抗肿瘤活性系统评价

3.1 实验细胞与培养

选择人乳腺癌 MCF-7 细胞系, 因其高表达 CD44 受体, 故为 HA 靶向递送的良好靶点细胞模型。细胞系在含 10% 胎牛血清、100U/mL 青霉素以及 100 μ g/mL 链霉素的 RPMI 1640 全培养基中, 置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱内进行常规培养, 收集对数生长期细胞进行进一步研究。

3.2 细胞靶向摄取能力考察

用 CLSM、流式细胞术评估细胞对纳米颗粒的靶向内吞效果。用 Cy5.5 标记的 MSN 与 HA-MSN, 设立 4 组: 游离 DOX、MSN@DOX、HA-MSN@DOX、HA-MSN@DOX+游离 HA 预处理 (封闭 CD44 受体)。CLSM 定性: MCF-7 细胞贴壁后加各组培养液 (等量 DOX), 在 37℃ 下培养 2 小时或者 4 小时, 用 PBS 清洗, 固定, DAPI 染色, 观测 DOX、Cy5.5 荧光分布情况。流式定量: MCF-7 细胞种植于 6 孔板中, 加入培养液培养 2 小时或 4 小时, 然后用胰蛋白酶消化, 收集细胞悬液, 用 PBS 洗过, 流式检测荧光强度, 3 复孔统计摄取率。预期 HA-MSN@DOX 组荧光强度明显大于 MSN@DOX 以及游离 DOX 组, 在预处理之后摄取量降低证明了 HA 对 CD44 的特异性结合从而起到增强主

动靶向摄取的作用。

3.3 细胞毒性评价

本文通过 CCK-8 (Cell Counting Kit-8) 法对空白 HA-MSN 与负载系统进行了体外生物相容性的及抗肿瘤活性检测。在进行生物相容性实验时将 MCF-7 细胞分别置于不同浓度的空白 HA-MSN 溶液当中; 抗肿瘤活性实验则分别将不同的浓度的游离 DOX、MSN@DOX 和 HA-MSN@DOX 加入到细胞中去, 二者都设有空白对照组来消除误差的影响。细胞在 37℃, 5% CO₂ 培养箱培养 24h, 48h 或者 72h 后再加入 CCK8 溶液, 继续培养 2 小时之后, 在 ELISA 板孔中读取各孔吸光度值, 用实验组与对照组吸光度值之差表示细胞存活率。所有结果输入到 Graph Pad Prism 软件中进行统计学处理并作出剂量效应曲线来确定半数抑制量 (IC₅₀)。

4 体内靶向富集验证 抑瘤效应安全评价

4.1 实验动物与荷瘤模型构建

实验选用 SPF 级 BALB/c 雌性裸鼠 (4~6 周龄 体重 18~22g), 由北京维通利华公司提供, 饲养在 SPF 级动物房内 (温度 25℃、12h 光照/暗交替), 满足实验动物伦理学的基本要求。建立 MCF-7 移植瘤模型: 从对数生长期的 MCF-7 细胞中离心收获沉淀并重悬为 1×10^7 个/mL, 在裸鼠右后肩部皮下注射 0.2ml。每天观察裸鼠以及肿瘤生长状态, 测量肿瘤长度 (a) 和宽度 (b), 用公式 $V = ab^2 / 2$ 来估算体积大小, 在肿瘤体积达到 100mm³ 左右的时候进行下一步实验^[6]。

4.2 体内肿瘤靶向富集能力考察

本文通过应用非侵入性活体荧光成像技术系统地探究了纳米载体制备的肿瘤靶向富集能力。实验选择的是介孔二氧化硅纳米颗粒 (MSNs) 以及对其进行透明质酸 (HA) 包覆处理得到的 HA-MSN, 使用近红外荧光探针 Cy5.5 对其进行标记实现体内定位, 在荷瘤裸鼠身上随机分成两组, 一组是尾静脉注射 Cy5.5 标记的 MSNs, 另一组是 HA-MSN。注射后 2h、6h、12h、24h 以及 48h, 用小动物活体成像系统对裸鼠进行全身成像, 及时监测并拍摄荧光图像的变化, 尤其是肿瘤部位的荧光强度变化, 分析不同时间段的差异。48 h 后杀死小鼠, 去除肿瘤以及心、肝、脾、肺、肾等重要器官进行荧光显影来对各个器官内的荧光信号进行量化并且比较各个实验组之间的差异。结果发现 HA-MSN 组在肿瘤区域的荧

光累积比较明显,在给药后 6h 就可以看见清晰的肿瘤聚集荧光信号,24~48 h 达到最高峰,它的荧光强度也一直大于 MSN 组。此外,在肿瘤细胞内荧光强度远远大于对照正常器官,证明了 HA 介导的主动靶向和 EPR 效应驱动的被动靶向共同作用下可使纳米药载体系高密度富集分布于肿瘤区域,大大提高抗肿瘤药物的输送效果,为肿瘤靶向治疗提供了实验基础。

4.3 体内抗肿瘤活性评价

把荷瘤小鼠随机分成五组(每组有 6 只)分别是生理盐水对照组、空白 HA-MSN 组、游离 DOX 组、MSN@DOX 组及 HA-MSN@DOX 组,保证实验设计的系统性和对比性。所有的组别均采用尾静脉的方式投药,对于 DOX 相关的三组(游离 DOX 组、MSN@DOX 组、HA-MSN@DOX 组),DOX 药物用量统一设置为 5mg/kg,给药频率为每三天一次,共给予四次干预;而对于空白 HA-MSN 组以及生理盐水对照组,给予同样体积的对应载体溶液,从而排除非特异性影响。在实验期间每隔两天用游标卡尺测量肿瘤的最长直径和最短直径,然后根据公式:体积=长*宽²*0.5 来计算肿瘤体积,同时使用电子秤准确称量小鼠体重,在观察它们的行为反应、被毛状况及存活情况的基础上形成肿瘤生长曲线以及体重变化曲线,从而了解药物干预疗效与毒性反应的发生程度。最后一次给药后第七日,利用颈椎过伸法杀死所有动物,彻底取出肿瘤组织进行称重,计算各组间平均重量的差值来确定抑瘤百分比(抑瘤率=(对照组瘤重-试验组瘤重)/对照组瘤重×100%)。预期结果显示,HA-MSN@DOX 组肿瘤抑制率将会达到 80%以上,有最好的抗肿瘤活性,同时由体重、精神状态推测出来的整体毒性明显小于游离型 DOX 药物的毒性,证实了递送系统增效降毒的作用。

5 结束语

本文围绕着肿瘤化疗药物靶向性差、毒性大、难以控制释放的问题进行了一系列研究并取得了突破性的进展,制备出了 pH/GSH 双敏感性、HA 修饰的 MSN 纳米

载药系统,对阿霉素进行了肿瘤靶向可控的递送。本文全面开展了载体的制备、修饰以及优化的过程、载体的理化性质分析、体外肿瘤靶向能力以及抗肿瘤活性的研究、体内肿瘤的富集情况及其抑瘤效果以及安全性实验的研究,建立了一个全面的开发与检测流程,所得到的结果能够证明此载药系统的精准靶向性、可控释药特性、高效的抗癌作用和良好的生物安全性特征。本文为新型抗肿瘤靶向纳米给药体系的研发奠定了可靠的研究基础,在此基础上可以进行多种治疗方法相结合的多功能载体的设计、深入进行前期药理毒理的相关研究,使该给药系统早日应用于临床,为恶性肿瘤精确放疗给出新思路、新方法。

参考文献

- [1] 蔺兰兰,李鸿岩,张红,等.^{x2}多肽基纳米递药体系靶向肿瘤治疗的研究进展^{x2}[J].^{x2}化学通报(中英文),^{x2}2025,^{x2}88^{x2}(10):^{x2}1025-1040.^{x2}DOI:10.14159/j.cnki.0441-3776.2025.10.005.
- [2] 吕春艳,信文婧,崔闻宇,等.^{x2}基于药物纳米晶的肿瘤靶向纳米递药系统研究进展^{x2}[J].^{x2}医药导报,^{x2}2026,^{x2}45^{x2}(01):^{x2}100-108.
- [3] 磁驱血液凝胶机器人实现颅内肿瘤靶向递药^{x2}[J].^{x2}科学新生活,^{x2}2025,^{x2}28^{x2}(06):^{x2}6.
- [4] 杨晨晓.^{x2}共载白藜芦醇/姜黄素的膜融合脂质体用于肿瘤恶液质肌肉萎缩的靶向递药和实验治疗研究[D].^{x2}南昌大学,^{x2}2024.^{x2}DOI:10.27232/d.cnki.gnchu.2024.004561.
- [5] 袁明清,^{x2}基于免疫调节与化疗整合的多功能脂质体用于脑瘤靶向给药的研究.^{x2}广西壮族自治区,^{x2}广西大学,^{x2}2024-05-07.
- [6] 袁作为.^{x2}5-FU@HF_n 纳米靶向递药系统联合 DAC 诱导细胞焦亡激活抗肿瘤免疫清除 CML 细胞的研究[D].^{x2}重庆医科大学,^{x2}2024.^{x2}DOI:10.27674/d.cnki.gcyku.2024.002220.