

透明质酸修饰的载大黄素多壁碳纳米管递药系统的制备及对乳腺癌细胞的抑制作用研究^Δ

李瑜多*, 杜娟#, 刘云龙, 耿峰, 陈小兵(齐齐哈尔医学院附属第二医院药学部临床药学室, 黑龙江 齐齐哈尔 161000)

中图分类号 R94;R737.9 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)12-1463-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.12.08



摘要 **目的** 制备透明质酸(HA)修饰的负载大黄素(EMD)的多壁碳纳米管(MWCNTs)递药系统(HA-MWCNTs-EMD),并研究其对乳腺癌细胞的体外抑制作用。**方法** 将EMD负载于MWCNTs,制得递药系统MWCNTs-EMD;进一步以HA进行修饰,制得递药系统HA-MWCNTs-EMD;对上述两种递药系统进行表征。以游离EMD为参照,考察上述两种递药系统的体外释药情况,检测两种乳腺癌细胞(MCF-7、MDA-MB-231细胞)对系统中EMD的摄取情况,并检测两种递药系统对两种乳腺癌细胞表面糖蛋白分化群44(CD44)表达、活力、凋亡、乳酸脱氢酶(LDH)释放量的影响。**结果** MWCNTs-EMD、HA-MWCNTs-EMD的包封率均为 $(63.52 \pm 2.74)\%$,载药量分别为 $(25.01 \pm 1.83)\%$ 、 $(12.13 \pm 1.96)\%$,粒径分别为 (865.95 ± 2.16) 、 (351.86 ± 1.68) nm,多分散性指数分别为 0.54 ± 0.02 、 0.23 ± 0.01 ,Zeta电位分别为 (23.87 ± 0.14) 、 (-42.79 ± 0.39) mV。MWCNTs-EMD、HA-MWCNTs-EMD在2、4、6、8、10、12、24 h时的EMD累积释放量均显著低于同期游离EMD,而HA-MWCNTs-EMD显著高于同期MWCNTs-EMD($P < 0.05$);两种乳腺癌细胞对MWCNTs-EMD、HA-MWCNTs-EMD中EMD的摄取量均显著高于其对游离EMD的摄取量($P < 0.05$);与游离EMD组比较,MWCNTs-EMD、HA-MWCNTs-EMD组两种细胞的凋亡率、LDH释放量均显著升高,表面CD44的表达(MWCNTs-EMD组除外)、细胞活力均显著下调或降低,且HA-MWCNTs-EMD的作用更显著($P < 0.05$)。**结论** 成功制备负载EMD的新型递药系统HA-MWCNTs-EMD;该递药系统具有一定的缓释作用,可明显降低乳腺癌细胞活力,促进其凋亡并增加LDH释放,且上述抗乳腺癌作用明显强于游离EMD和MWCNTs-EMD。

关键词 大黄素;多壁碳纳米管;透明质酸;递药系统;乳腺癌;抑制作用

Preparation of HA-modified emodin-contained multi-walled carbon nanotubes drug delivery system and its inhibitory effect on breast cancer cells

LI Yuduo, DU Juan, LIU Yunlong, GENG Feng, CHEN Xiaobing (Dept. of Clinical Pharmacy, the Second Affiliated Hospital of Qiqihar Medical College, Qiqihar, Heilongjiang 161000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To prepare hyaluronic acid (HA)-modified emodin (EMD)-contained multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) drug delivery system (HA-MWCNTs-EMD) and explore its *in vitro* inhibitory effect on breast cancer cells. **METHODS** EMD was loaded onto MWCNTs to prepare a drug delivery system MWCNTs-EMD; subsequently, the system was further modified with HA to obtain the drug delivery system HA-MWCNTs-EMD. The two drug delivery systems mentioned above were characterized. With free EMD as the reference, the drug release *in vitro* of the above two drug delivery systems was investigated; the uptake of EMD by two breast cancer cells (MCF-7, MDA-MB-231 cells) was detected. The impacts of the above two drug delivery systems on the expression of surface glycoprotein differentiation group 44 (CD44), activity, apoptosis and lactate dehydrogenase (LDH) release of two breast cancer cells were detected. **RESULTS** The encapsulation efficiencies of MWCNTs-EMD and HA-MWCNTs-EMD were both $(63.52 \pm 2.74)\%$, with drug loading rates of $(25.01 \pm 1.83)\%$ and $(12.13 \pm 1.96)\%$, particle sizes of (865.95 ± 2.16) and (351.86 ± 1.68) nm, polydispersity indexes of 0.54 ± 0.02 and 0.23 ± 0.01 , and Zeta potentials of (23.87 ± 0.14) and (-42.79 ± 0.39) mV, respectively. The 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 24-hour cumulative release rates of EMD in MWCNTs-EMD and HA-MWCNTs-EMD were significantly lower than those in free EMD, while the cumulative release rate of HA-MWCNTs-EMD was significantly higher than that of MWCNTs-EMD ($P < 0.05$); the EMD uptakes of MWCNTs-EMD and HA-MWCNTs-EMD

^Δ 基金项目 黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目 (No.2022-KYYWF-0785)
* 第一作者 主管药师。研究方向:药理学。E-mail:lydiacz@163.com
通信作者 副主任药师。研究方向:临床药学、药剂学。E-mail:22647357@qq.com

by the two types of breast cancer cells were significantly higher than their uptake of free EMD ($P<0.05$). Compared with the free EMD group, the MWCNTs-EMD and MWCNTs-EMD groups showed significantly higher apoptosis rate and LDH release, significantly lower surface CD44 expression (except for the MWCNTs-EMD group) and cell viability in both cell types, and the effect of HA-MWCNTs-EMD was more pronounced ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** A novel drug delivery system HA-MWCNTs-EMD loaded with EMD is developed successfully; the drug delivery system has a certain slow-release effect, which can significantly reduce the activity of breast cancer cells, promote their apoptosis and increase the release of LDH, and the above anti-breast cancer effect is significantly stronger than that of free EMD and MWCNTs-EMD.

KEYWORDS emodin; multi-walled carbon nanotubes; hyaluronic acid; drug delivery system; breast cancer; inhibitory effect

乳腺癌是最常见的女性恶性肿瘤,其发病率居高不下,位于我国妇科恶性肿瘤前列,且呈年轻化趋势,严重威胁女性的身心健康和生命安全^[1-2]。目前,中医药在乳腺癌治疗领域的应用备受学者重视^[3]。大黄素(emodin, EMD),又称1,3,8-三羟基-6-甲基蒽醌,是提取自传统中药大黄的天然蒽醌类衍生物,具有显著的抗癌活性,能够抑制乳腺癌细胞的生长、增殖、侵袭^[4-5]。然而,该成分对肿瘤细胞的靶向性较弱,且生物利用度不高^[6],故有必要设计并构建能提升 EMD 抗癌效果的递药系统。

碳纳米管(carbon nanotubes, CNTs)是一种新型递药系统,根据石墨烯层数分为单壁碳纳米管、双壁碳纳米管和多壁碳纳米管(multi-walled carbon nanotubes, MWCNTs)3种类型,其中MWCNTs较其余类型具有更大的比表面积及更好的分散性。研究表明,CNTs能将药物分子递送至肿瘤细胞,且其表面存在的不同官能团有助于靶向肿瘤细胞,从而明显提升药物的生物利用度并延长药物的半衰期^[7-8]。透明质酸(hyaluronic acid, HA)是一种高级多糖,具有低毒性、低免疫反应、可生物降解、可吸收等特性,能选择性地结合高表达于乳腺癌等多种实体瘤细胞表面的糖蛋白分化群44(cluster of differentiation 44, CD44),被广泛用于抗癌药物CNTs主动靶向递药系统的研发领域^[9]。鉴于现有 EMD 相关递药系统的研发成果^[9-10],本课题组推测 HA 修饰的负载 EMD 的 MWCNTs 主动靶向递药系统可能有助于进一步增强 EMD 对乳腺癌的抗癌活性。基于此,本研究拟制备 HA 修饰的负载 EMD 的 MWCNTs 递药系统(以下简称“HA-MWCNTs-EMD”),并探究其对乳腺癌细胞的体外抑制作用,以期提升 EMD 相关制剂在乳腺癌治疗中的递药效率提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括 Attune NxT 型流式细胞仪、Multiskan SkyHigh 型全波长自动酶标仪、EVOS 型荧光倒置显微镜(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),

Tecnai F20 型透射电子显微镜(美国 FEI 公司), Nano-ZS90 型激光纳米粒度仪(英国 Malvern 公司), UV 2550 型紫外分光光度计(日本 Shimadzu 公司), EClassical 3200L 型超高效液相色谱(UPLC)仪(大连依利特分析仪器有限公司), OLS5100-LAF 型激光共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司), VCX2500 型超声波破碎仪(美国 Sonics 公司), HH.CP-01T 型细胞培养箱(上海川昱实验仪器有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

EMD 对照品(批号 110756-201913,纯度 96.0%)购自中国食品药品检定研究院;氨基化 MWCNTs(批号 XFM62,外径 8~15 nm,长度 50 μm ,纯度 >95%)购自南京先丰纳米材料科技有限公司;HA 对照品(批号 LM1078,纯度 $\geq 95.0\%$)购自上海联迈生物工程有限公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)检测试剂盒、磺酰罗丹明 B(sulforhodamine B, SRB)检测试剂盒、TUNEL 检测试剂盒、FITC 荧光标记的鼠抗 CD44 抗体、FITC 荧光标记的山羊抗人免疫球蛋白 G 抗体(批号分别为 ab102526、ab235935、ab66108、ab30405、ab81051)均购自英国 Abcam 公司;MCF-7 细胞专用培养基、Leibovitz's L-15 基础培养基、青-链霉素双抗、胎牛血清(批号分别为 CM-0149、PM151010、PB180120、164210-50)均购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.3 实验细胞

人乳腺癌细胞 MCF-7、MDA-MB-231(批号分别为 CL-0149、CL-0150)均购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 递药系统的制备与表征

2.1.1 负载 EMD 的 MWCNTs 递药系统的制备

取 EMD 对照品和氨基化 MWCNTs 各 10 mg,分散于 10 mL 无水乙醇中,超声(功率 400 W,频率 40 kHz)处理 6 h;经截留分子量为 100 kDa 的超滤膜,离心(9 000 r/min, 30 min),过滤;收集固体,于室温下真空干燥 30 min 后,分散于 10 mL 水中,再次超声(功率 400 W,频率

40 kHz)处理6 h;用孔径为5 mm的滤膜过滤,以除去游离的EMD;滤液经冷冻干燥,即得负载EMD的MWCNTs递药系统(以下简称“MWCNTs-EMD”),得率为62.35%。

2.1.2 HA-MWCNTs-EMD的制备

取HA对照品40 mg,以磷酸盐缓冲液(PBS)溶解,配制成质量浓度为2 mg/mL的溶液。取该溶液20 mL,加入“2.1.1”项下MWCNTs-EMD 20 mg,充分悬浮1 h后,离心(9 000 r/min,30 min);取沉淀,以水洗涤3次;收集沉淀,于室温下干燥,即得HA-MWCNTs-EMD,得率为67.20%。

2.1.3 递药系统的表征

(1)包封率和载药量:采用紫外分光光度法于254 nm波长下检测样品中EMD的质量浓度。以EMD吸光度(Y)对其质量浓度(X)进行线性回归,得回归方程为 $Y=0.011\ 3X+0.012\ 1$ ($r=0.999\ 7$),EMD检测质量浓度的线性范围为0.2~80 g/mL;精密度、准确度、回收率等方法学考察均符合2020年版《中国药典》(四部)的相关要求。

取“2.1.1”项下制备MWCNTs-EMD时首次离心过滤所得的上清液,以及经孔径5 mm滤膜过滤的滤液(含游离EMD),分别用水适量稀释,按上述紫外分光光度法检测溶液中EMD的量,两者之和即为制备MWCNTs-EMD时未被包封EMD的量;取“2.1.2”项下制备HA-MWCNTs-EMD时经水洗涤3次后的上清液(含游离EMD),分别用水适量稀释,按上述紫外分光光度法检测溶液中EMD的量,三者之和即为制备HA-MWCNTs-EMD时未被包封EMD的量;EMD总量为递药系统制备时所加EMD的量;递药系统总量为最终所得制剂的量。按如下公式分别计算包封率和载药量:包封率=(EMD总量-未被包封EMD的量)/EMD总量 $\times 100\%$,载药量=(EMD总量-未被包封EMD的量)/递药系统总量 $\times 100\%$ 。每样品平行测定3次。结果显示,MWCNTs-EMD、HA-MWCNTs-EMD的包封率均为 $(63.52\pm 2.74)\%$,载药量分别为 $(25.01\pm 1.83)\%$ 、 $(12.13\pm 1.96)\%$ 。

(2)粒径和Zeta电位:按“2.1.1”“2.1.2”项下方法分别制备3批MWCNTs-EMD、HA-MWCNTs-EMD。取上述制剂各1 mg,以水2 mL分散后,使用透射电子显微镜观察其微观形态,并采用激光纳米粒度仪测定其粒径、多分散性系数(polydispersity index, PDI)和Zeta电位。结果显示(图1、图2、表1),MWCNTs-EMD、HA-MWCNTs-EMD均呈管状,MWCNTs-EMD粒径更大且分散性更高,而HA-MWCNTs-EMD则较为聚集,粒径较

小且分散性低;MWCNTs-EMD、HA-MWCNTs-EMD的粒径均呈正态分布;MWCNTs-EMD荷正电,而HA-MWCNTs-EMD荷负电。

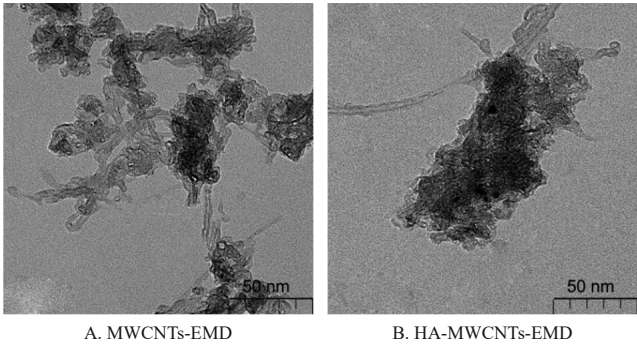


图1 各递药系统微观形态的透射电子显微镜图

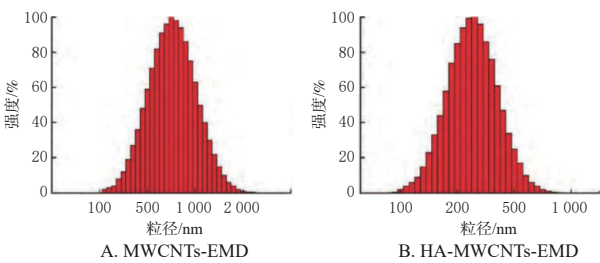


图2 各递药系统的粒径分布图

表1 各递药系统的平均粒径、PDI、Zeta电位比较($\bar{x}\pm s, n=3$)

递药系统	粒径/nm	PDI	Zeta电位/mV
MWCNTs-EMD	865.95 ± 2.16	0.54 ± 0.02	23.87 ± 0.14
HA-MWCNTs-EMD	351.86 ± 1.68	0.23 ± 0.01	-42.79 ± 0.39

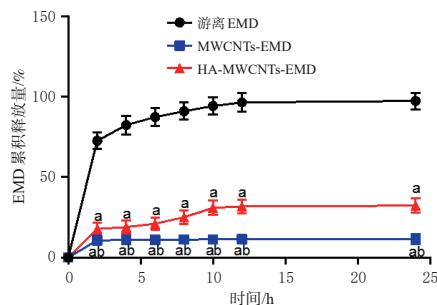
2.2 体外释药情况考察

采用UPLC法测定透析样品中EMD的质量浓度。色谱柱为ACQUITY UPLC BEH C₁₈(2.1 mm $\times$ 50 mm, 1.7 μ m),流动相为甲醇-水-乙酸(60:35:65, V/V/V),激发波长、发射波长分别为495、545 nm,柱温为35 $^{\circ}$ C,流速为0.3 mL,进样量为3 μ L。以EMD峰面积(Y)对其质量浓度(X)进行线性回归,得回归方程为 $Y=0.010\ 9X+0.011\ 8$ ($r=0.998\ 9$),EMD检测质量浓度的线性范围为2.01~40.20 μ g/mL;精密度、准确度、回收率等方法学考察均符合2020年版《中国药典》(四部)的相关要求。

采用透析法评价制剂的体外释药情况。取EMD对照品和“2.1.1”“2.1.2”项下的MWCNTs-EMD、HA-MWCNTs-EMD各适量(以EMD计,均为50 μ g),以水1 mL分散,再置于透析袋中。将透析袋两端扎紧,置于30 mL释放介质(PBS)中,于37 $^{\circ}$ C下以100 r/min的转速振摇;分别于0、2、4、6、8、10、12、24 h时取出透析样品1 mL,并补充等温等体积释放介质。向透析样品中加入甲醇,稀释并定容至2 mL,再采用上述UPLC法测定透析样品中EMD的量,并按下式计算累积释放量:累积释放量=透析样品中EMD的量/EMD总量 $\times 100\%$ 。采用

SPSS 26.0 软件进行统计学分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用SNK-*q*检验;检验水准 $\alpha=0.05$ (统计方法下同)。

结果显示(图3),与游离EMD相比,MWCNTs-EMD、HA-MWCNTs-EMD在2~24 h各时间点的累积释放量均显著降低($P<0.05$),而HA-MWCNTs-EMD在上述时间点的累积释放量均显著高于同期MWCNTs-EMD($P<0.05$)。



a: 与游离EMD相比, $P<0.05$;b: 与同期HA-MWCNTs-EMD相比, $P<0.05$ 。

图3 不同递药系统中EMD的累积释放量比较

2.3 乳腺癌细胞对不同递药系统内EMD的摄取情况检测

2.3.1 细胞培养

取MCF-7细胞,接种于MCF-7专用培养基中;取MDA-MB-231细胞,接种于MDA-MB-231专用培养基(Leibovitz's L-15基础培养基+1%青-链霉素双抗+10%胎牛血清)中,于37℃、5%CO₂、相对湿度95%条件下培养。

2.3.2 细胞摄取情况检测

采用细胞摄取实验检测。取MCF-7、MDA-MB-231细胞,按“2.3.1”项下条件培养,待传代2次后,接种于激光共聚焦专用24孔板内,培养24 h后吸弃培养液,细胞经PBS漂洗3次后随机分为游离EMD组、MWCNTs-EMD组、HA-MWCNTs-EMD组,每组设置6个复孔。3组细胞分别以EMD、MWCNTs-EMD、HA-MWCNTs-EMD溶液(药液以不含血清的专用培养基为溶剂,终浓度以EMD计均为40 μmol/L^[11])培养;3 h后,收集细胞,以预冷的PBS清洗,经4%多聚甲醛溶液固定、Hoechst33258染色后,使用激光共聚焦显微镜观察,采集各组细胞图像并定量分析各组细胞的EMD摄取量(即实验组细胞荧光强度与游离EMD组细胞荧光强度的比值)。

结果显示(图4、表2;限于篇幅,MDA-MB-231细胞的相关结果可扫描本文首页二维码链接页面中“增强出版”板块查看附图1),与游离EMD组相比,MWCNTs-EMD、HA-MWCNTs-EMD组两种细胞的EMD摄取量均

显著升高($P<0.05$);与MWCNTs-EMD组相比,HA-MWCNTs-EMD组两种细胞的EMD摄取量亦显著升高($P<0.05$)。

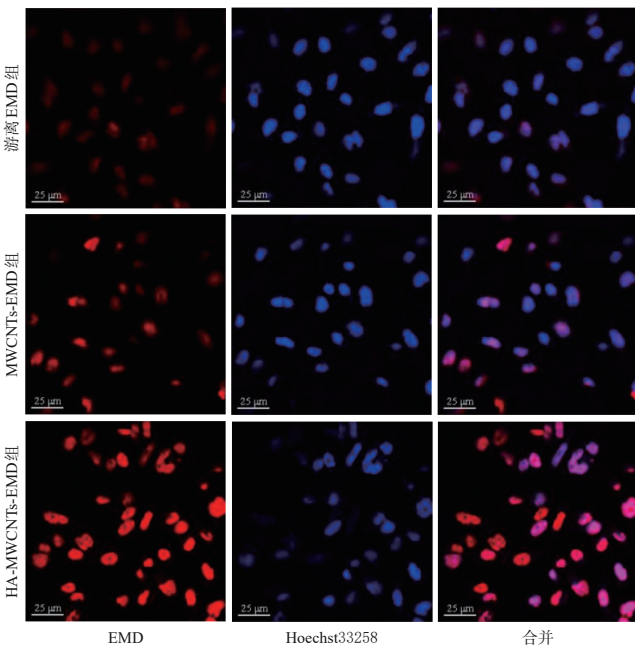


图4 经不同递药系统处理后MCF-7细胞的激光共聚焦图

表2 两种细胞对各递药系统中EMD的摄取量比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

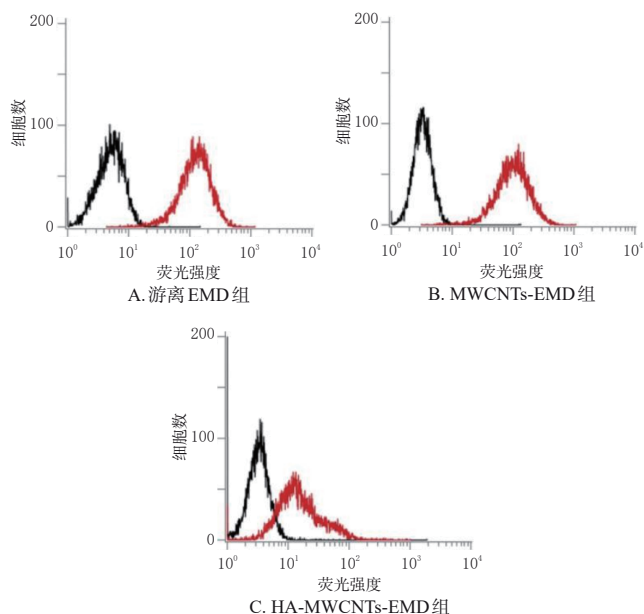
组别	MCF-7细胞	MDA-MB-231细胞
游离EMD组	1	1
MWCNTs-EMD组	2.94±0.48 ^a	3.05±0.43 ^a
HA-MWCNTs-EMD组	5.03±0.57 ^{ab}	6.12±0.56 ^{ab}

a: 与游离EMD组相比, $P<0.05$;b: 与MWCNTs-EMD组相比, $P<0.05$ 。

2.4 不同递药系统对乳腺癌细胞表面CD44表达的影响检测

采用流式细胞实验检测。取MCF-7、MDA-MB-231细胞,按“2.3.1”项下条件培养,待传代2次后按“2.3.2”项下方法分组(每组设置6个复孔)、处理。培养3 h后,收集各组细胞,以预冷的70%乙醇固定并制成 1×10^6 个/mL的单细胞悬液;将上述悬液平分为两份,一份加入10 μg/mL FITC荧光标记的CD44抗体,另一份加入10 μg/mL FITC荧光标记的免疫球蛋白G抗体,避光孵育20 min;收集细胞,以PBS清洗后,使用流式细胞仪检测,以CD44抗体的荧光强度表示其表达水平。

结果显示(图5、表3;限于篇幅,MDA-MB-231细胞的相关结果可扫描本文首页二维码链接页面中“增强出版”板块查看附图2),与游离EMD组、MWCNTs-EMD组相比,HA-MWCNTs-EMD组两种细胞表面CD44的表达均显著下调($P<0.05$)。



红色:CD44阳性细胞;黑色:CD44阴性细胞。

图5 不同递药系统对MCF-7细胞表面CD44表达影响的流式细胞图

表3 不同递药系统对MCF-7、MDA-MB-231细胞表面CD44表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	MCF-7细胞	MDA-MB-231细胞
游离EMD组	132.35 ± 14.62	164.25 ± 16.13
MWCNTs-EMD组	129.87 ± 15.41	157.92 ± 17.42
HA-MWCNTs-EMD组	65.30 ± 11.59 ^{ab}	80.13 ± 12.67 ^{ab}

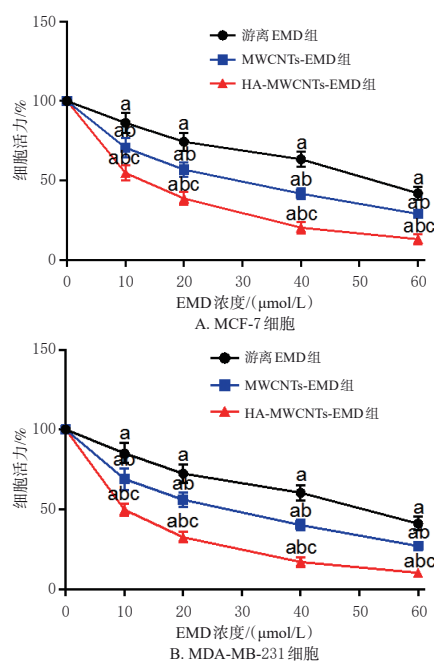
a: 与游离EMD组相比, $P < 0.05$; b: 与MWCNTs-EMD组相比, $P < 0.05$ 。

2.5 不同递药系统对乳腺癌细胞活力的影响检测

采用SRB法检测。取MCF-7、MDA-MB-231细胞,按“2.3.1”项下条件培养,待传代2次后以 1×10^4 个/孔接种于96孔板中,培养过夜;收集细胞,分别用相应浓度的EMD、MWCNTs-EMD、HA-MWCNTs-EMD(终浓度以EMD计均分别为0、10、20、40、60 $\mu\text{mol/L}$ ^[11])处理,并设置不含细胞、不含药物的调零组,每浓度设置6个复孔。培养24 h后,收集细胞,用预冷的10%三氯乙酸溶液固定,加入0.4%SRB溶液染色20 min,再以1%乙酸溶液清洗,使用全波长自动酶标仪检测各组细胞的吸光度,并按下式计算细胞活力:细胞活力(%)=(各浓度EMD处理细胞的吸光度-调零组细胞的吸光度)/(0 $\mu\text{mol/L}$ EMD处理细胞的吸光度-调零组细胞的吸光度) $\times$ 100%。

结果显示(图6),与0 $\mu\text{mol/L}$ 游离EMD、MWCNTs-EMD、HA-MWCNTs-EMD相比,其余浓度的游离EMD、MWCNTs-EMD、HA-MWCNTs-EMD均可显著降低上述两种细胞的活力($P < 0.05$)。与同浓度游离EMD相比,经MWCNTs-EMD、HA-MWCNTs-EMD处理的上述

两种细胞的活力均显著降低($P < 0.05$);与同浓度MWCNTs-EMD相比,经HA-MWCNTs-EMD处理的两种细胞的活力亦显著降低($P < 0.05$)。



a: 与0 $\mu\text{mol/L}$ EMD相比, $P < 0.05$; b: 与同浓度游离EMD相比, $P < 0.05$; c: 与同浓度MWCNTs-EMD相比, $P < 0.05$ 。

图6 不同递药系统对两种细胞活力的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

2.6 不同递药系统对乳腺癌细胞凋亡和LDH释放量的影响检测

采用TUNEL染色法检测细胞凋亡情况。取MCF-7、MDA-MB-231细胞,按“2.3.1”项下条件培养,待传代2次后将细胞分为空白对照组和游离EMD组、MWCNTs-EMD组、HA-MWCNTs-EMD组,每组设置6个复孔。4组细胞分别以不含血清的专用培养基或EMD、MWCNTs-EMD、HA-MWCNTs-EMD溶液(以不含血清的专用培养基为溶剂,终浓度以EMD计均为40 $\mu\text{mol/L}$ ^[11])培养;24 h后,收集细胞,经预冷的PBS清洗、4%多聚甲醛溶液固定、TUNEL染色、4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)复染后,使用荧光显微镜观察各组细胞的凋亡情况(凋亡细胞呈绿色),并按下式计算细胞凋亡率:细胞凋亡率(%)=凋亡细胞数/总细胞数 $\times$ 100%。

采用比色法检测细胞的LDH释放量。取MCF-7、MDA-MB-231细胞,按“2.3.1”项下条件培养,待传代2次后按前述TUNEL实验分组(每组设置6个复孔)、处理。培养24 h后,收集细胞上清液,离心(1 000 r/min, 10 min),按照LDH检测试剂盒说明书方法检测上清液中LDH水平,即为各组细胞的LDH释放量。

结果显示(图7、表4;限于篇幅,MDA-MB-231细胞

的相关结果可扫描本文首页二维码链接页面中“增强出版”板块查看附图3),与空白对照组相比,游离EMD组、MWCNTs-EMD组、HA-MWCNTs-EMD组凋亡细胞有所增多,其凋亡率、LDH释放量均显著升高($P<0.05$);与游离EMD组相比,MWCNTs-EMD组、HA-MWCNTs-EMD组凋亡细胞亦有所增多,凋亡率、LDH释放量亦显著升高($P<0.05$);与MWCNTs-EMD组相比,HA-MWCNTs-EMD组凋亡细胞亦有所增多,凋亡率、LDH释放量亦显著升高($P<0.05$)。

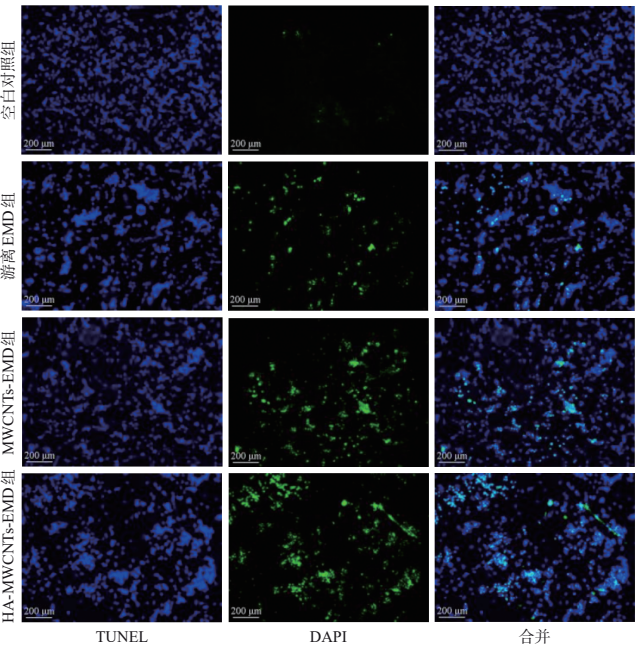


图7 不同递药系统对MCF-7细胞凋亡影响的显微图(TUNEL染色)

表4 不同递药系统对MCF-7、MDA-MB-231细胞凋亡率、LDH释放量的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	MCF-7细胞		MDA-MB-231细胞	
	凋亡率/%	LDH释放量/(U/L)	凋亡率/%	LDH释放量/(U/L)
空白对照组	1.35±0.43	161.42±35.13	1.35±0.43	156.93±32.16
游离EMD组	34.91±1.37 ^a	275.39±38.62 ^a	34.91±1.37 ^a	283.37±39.60 ^a
MWCNTs-EMD组	58.26±1.81 ^{ab}	439.25±42.73 ^{ab}	58.26±1.81 ^{ab}	461.21±43.27 ^{ab}
HA-MWCNTs-EMD组	84.02±2.06 ^{abc}	635.16±50.24 ^{abc}	84.02±2.06 ^{abc}	695.19±51.43 ^{abc}

a: 与空白对照组相比, $P<0.05$; b: 与游离EMD组相比, $P<0.05$; c: 与MWCNTs-EMD组相比, $P<0.05$ 。

3 讨论

目前,临床治疗乳腺癌的常用方法是手术切除和化疗,但多柔比星、顺铂、紫杉醇等化疗药物都缺乏特异性,且会对正常细胞产生明显的毒副作用,还会因肿瘤细胞耐药而导致治疗中断,严重影响患者的治疗效果和生活质量^[1-2,12]。传统中药的安全性较高,故在乳腺癌治疗领域得以广泛应用^[13]。蒽醌类衍生物广泛存在于鼠李科、茜草科、豆科、虎杖科等药用植物中,具有明显的抗癌活性,因而备受学界关注。EMD是源自传统中药大黄的一种蒽醌类衍生物,有显著的抗乳腺癌作用^[4-5],

可减轻乳腺癌小鼠体内的炎症反应,抑制肿瘤细胞的生长和肺转移^[14]。然而,该成分的生物利用度较低,故其在抗癌领域的应用前景有限^[6]。研究表明,通过结构修饰或构建纳米载体系统可有效克服EMD这一缺陷,进而提升其抗癌活性^[6]。CNTs是常用于构建递药系统的纳米材料,具有良好的细胞膜穿透性,可通过化学键合或者物理封装的方式包载穿透性较差的药物,并将其送入目的细胞内,以提升药物的生物利用度^[15]。Mumtaz等^[16]通过纳米技术构建了一种新型递药系统,可将喜树碱、姜黄素、芦荟大黄素等天然成分输送到实验动物大脑内的特定部位,进而增强其对胶质母细胞瘤的抑制作用。本研究以氨基化MWCNTs为载体,制备了负载EMD的新型递药系统MWCNTs-EMD。相关体外释药和细胞摄取实验结果显示,与游离EMD相比,该递药系统可明显降低药物的24 h累积释放量,并可显著提高两种乳腺癌细胞(MCF-7、MDA-MB-231细胞)对药物的摄取量,表明MWCNTs-EMD具有一定的缓释作用,并能提高靶向至乳腺癌细胞的EMD递送量。进一步的细胞活力、凋亡、LDH释放量检测结果显示,游离EMD和MWCNTs-EMD均可显著降低两种乳腺癌细胞的活力,显著升高其凋亡率和LDH释放量,表明两者均可有效抑制乳腺癌细胞的增殖,诱导其凋亡并增加乳腺癌预后指标LDH的释放。同时,本研究结果还表明,相较于游离EMD,MWCNTs-EMD对乳腺癌细胞的抑制作用更强,提示以MWCNTs制备新型递药系统可提升EMD对乳腺癌的抑制作用。

CNTs表面疏水性较强,在细胞中易聚集,但若借助表面修饰方法将一些亲水性基团接枝到CNTs表面,可有效改善递药系统的分散性和稳定性。HA是常用于CNTs递药系统表面修饰的亲水多糖,可与肿瘤细胞表面的CD44特异性结合,进而明显提升其细胞靶向性和抗癌药物递送效率,提高药物在肿瘤部位的浓度以及抗癌活性,故在抗癌药物递药系统研发领域具有广阔的应用前景^[17-18]。本研究结果显示,MWCNTs-EMD的Zeta电位为(23.87±0.14)mV,荷正电。HA为阴离子多糖,可通过静电吸附作用包裹在MWCNTs-EMD表面,遂以此构建HA-MWCNTs-EMD。表征结果显示,所制HA-MWCNTs-EMD的Zeta电位为(-42.79±0.39)mV,荷负电;且该递药系统分布均匀,粒径及PDI均小于MWCNTs-EMD。体外释药实验结果显示,相同时间内,HA-MWCNTs-EMD中EMD的累积释放量较游离EMD低,但较MWCNTs-EMD高。这表明HA-MWCNTs-EMD具有一定的缓释作用;但HA作为典型的亲水多糖,可增加递药系统的水溶性,促使系统包载的EMD被

释放出来,从而提升EMD的释放量。与此同时,EMD摄取实验和CD44表达检测结果显示,HA-MWCNTs-EMD组两种乳腺癌细胞的EMD摄取量均显著高于游离EMD组、MWCNTs-EMD组,而该组两种细胞表面CD44的表达均显著低于游离EMD组、MWCNTs-EMD组,提示HA-MWCNTs-EMD的递送效率较MWCNTs-EMD有明显提升。进一步的细胞活力、凋亡、LDH释放量检测结果显示,与游离EMD组、MWCNTs-EMD组比较,HA-MWCNTs-EMD组两种乳腺癌细胞的活力均显著降低,凋亡率、LDH释放量均显著升高,表明该递药系统对乳腺癌的抑制作用强于游离EMD,且明显强于MWCNTs-EMD。

综上所述,本研究成功制备了负载EMD的新型递药系统HA-MWCNTs-EMD,该系统具有一定的缓释作用,可明显降低乳腺癌细胞活力,促进其凋亡并增加LDH释放,且上述抗乳腺癌作用明显强于游离EMD和MWCNTs-EMD。

参考文献

- [1] THAKUR C, QIU Y R, PAWAR A, et al. Epigenetic regulation of breast cancer metastasis[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2024, 43(2):597-619.
- [2] HIS M, GUNTER M J, KESKI-RAHKONEN P, et al. Application of metabolomics to epidemiologic studies of breast cancer: new perspectives for etiology and prevention[J]. *J Clin Oncol*, 2024, 42(1):103-115.
- [3] WU Q H, YAN H K, KANG Z Y. A review of traditional Chinese medicine for triple negative breast cancer and the pharmacological mechanisms[J]. *Am J Chin Med*, 2024, 52(4):987-1011.
- [4] WANG S Y, YANG S Y, YANG X J, et al. Research progress of traditional Chinese medicine monomers in reversing multidrug resistance of breast cancer[J]. *Am J Chin Med*, 2023, 51(3):575-594.
- [5] SAKALLI-TECIM E, UYAR-ARPACI P, GURAY N T. Identification of potential therapeutic genes and pathways in phytoestrogen emodin treated breast cancer cell lines via network biology approaches[J]. *Nutr Cancer*, 2022, 74(2):592-604.
- [6] ŞEKER KARATOPRAK G, KÜPELİ AKKOL E, YÜCEL Ç, et al. Advances in understanding the role of aloe emodin and targeted drug delivery systems in cancer[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022:7928200.
- [7] SRIVASTAVA N, MISHRA Y, MISHRA V, et al. Carbon nanotubes in breast cancer treatment: an insight into properties, functionalization, and toxicity[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2023, 23(14):1606-1617.
- [8] NABAWI H M S, ABDELAZEM A Z, EL ROUBY W M A, et al. A potent formula against triple-negative breast cancer-sorafenib-carbon nanotubes-folic acid: targeting, apoptosis triggering, and bioavailability enhancing[J]. *Bio-technol Appl Biochem*, 2025, 72(1):86-103.
- [9] KESHARWANI P, CHADAR R, SHEIKH A, et al. CD44-targeted nanocarrier for cancer therapy[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 12:800481.
- [10] LIU H, ZHUANG Y, WANG P P, et al. Polymeric lipid hybrid nanoparticles as a delivery system enhance the anti-tumor effect of emodin *in vitro* and *in vivo*[J]. *J Pharm Sci*, 2021, 110(8):2986-2996.
- [11] CHENG G R, LIU Z Q, ZHENG Z, et al. Cell metabolomics reveals the potential mechanism of aloe emodin and emodin inhibiting breast cancer metastasis[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(22):13738.
- [12] LOIBL S, ANDRÉ F, BACHELOT T, et al. Early breast cancer: ESMO clinical practice guideline for diagnosis, treatment and follow-up[J]. *Ann Oncol*, 2024, 35(2):159-182.
- [13] YUAN J, LIU Y, ZHANG T T, et al. Traditional Chinese medicine for breast cancer treatment: a bibliometric and visualization analysis[J]. *Pharm Biol*, 2024, 62(1):499-512.
- [14] MCDONALD S J, BULLARD B M, VANDERVEEN B N, et al. Emodin reduces surgical wounding-accelerated tumor growth and metastasis via macrophage suppression in a murine triple-negative breast cancer model[J]. *Physiol Rep*, 2023, 11(19):e15813.
- [15] GAYATHRI K, VIDYA R. Carbon nanomaterials as carriers for the anti-cancer drug doxorubicin: a review on theoretical and experimental studies[J]. *Nanoscale Adv*, 2024, 6(16):3992-4014.
- [16] MUMTAZ S M, BHARDWAJ G, GOSWAMI S, et al. Management of glioblastoma multiforme by phytochemicals: applications of nanoparticle-based targeted drug delivery system[J]. *Curr Drug Targets*, 2021, 22(4):429-442.
- [17] FU C P, CAI X Y, CHEN S L, et al. Hyaluronic acid-based nanocarriers for anticancer drug delivery[J]. *Polymers(Basel)*, 2023, 15(10):2317.
- [18] KEARNS O, CAMISASCA A, GIORDANI S. Hyaluronic acid-conjugated carbon nanomaterials for enhanced tumour targeting ability[J]. *Molecules*, 2021, 27(1):48.

(收稿日期:2024-11-07 修回日期:2025-04-14)

(编辑:张元媛)