

RGD修饰的载多柔比星“核-壳”型纳米粒的制备、表征及其抗肿瘤作用研究^Δ

李庆龄^{1*}, 刘金光^{2#}, 祖琦¹, 于庆龙², 孙士真²(1. 山东中医药高等专科学校中医系, 山东烟台 264199; 2. 烟台药物研究所, 山东烟台 264000)

中图分类号 R943;R979.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)16-2017-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.16.11



摘要 目的 制备精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)修饰的载多柔比星(DOX)“核-壳”型纳米粒(RGD@DOX-LPNs), 并对其表征和抗肿瘤作用研究。方法 通过纳米沉淀法制备RGD@DOX-LPNs, 观察其外观和微观形态, 检测其粒径、多分散性指数(PDI)、Zeta电位, 并进行差示扫描量热、X射线衍射分析, 检测其包封率和载药量, 考察其稳定性, 分析其体外释放情况、体外黏液扩散情况和肿瘤细胞摄取情况[以香豆素6(COU)定位]、体内组织分布及胃肠道滞留情况[以11-氯-1,1'-二正丙基-3,3',3'-四甲基-10,12-三亚甲基咪唑三碳花青碘盐(IR780)定位]。以4T1荷瘤小鼠为对象, 评价所得制剂对其瘤体体积、瘤重、细胞凋亡率的影响。结果 所制RGD@DOX-LPNs为橙色透明液体, 其颗粒大小均一且近球形; 纳米粒粒径为(159.67±8.02)nm, PDI为0.15±0.06, Zeta电位为(-19.70±0.79)mV; 经RGD修饰后, DOX的热吸收峰和晶型衍射峰均消失; RGD@DOX-LPNs的包封率为(72.65±4.37)%, 载药量为(4.62±0.38)%; 于4、25℃下放置7d后的外观、粒径、包封率均无明显变化; 其4h的累积释放量约为73%, 低于DOX原料药(1h内近乎释放完全); COU-LPNs第1段薄片COU的量显著低于同段RGD@COU-LPNs, 而第2~5段薄片COU的量则显著高于RGD@COU-LPNs($P<0.01$); 肠细胞对RGD@COU-LPNs中COU的摄取量明显多于COU-LPNs($P<0.05$); RGD@IR780-LPNs的离体组织荧光强度均强于IR780-LPNs, 且显示出更强的胃肠道滞留性。与DOX原料药及普通纳米粒(DOX-LPNs)比较, RGD@DOX-LPNs的抑瘤率更高(65.74%), 并可使荷瘤小鼠瘤体体积显著缩小、瘤重显著降低、细胞凋亡率显著升高($P<0.01$)。结论 成功制备了RGD@DOX-LPNs; 该制剂具有一定的缓释作用, 可增加肠细胞对DOX的摄取, 增强DOX的胃肠道黏液滞留性和抗乳腺癌活性。

关键词 多柔比星; RGD; 脂质聚合物纳米粒; 抗肿瘤作用

Preparation and characterization of RGD modified “core-shell” nanoparticles loaded with doxorubicin and study on their anti-tumor effects

LI Qingling¹, LIU Jinguang², ZU Qi¹, YU Qinglong², SUN Shizhen²(1. Dept. of Traditional Chinese Medicine, Shandong College of Traditional Chinese Medicine, Shandong Yantai 264199, China; 2. Yantai Institute of Pharmaceutical Science, Shandong Yantai 264000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To prepare Arg-Gly-Asp (RGD)-modified doxorubicin (DOX)-loaded “core-shell” nanoparticles (RGD@DOX-LPNs), characterize the nanoparticles, and investigate their antitumor effects. **METHODS** RGD@DOX-LPNs were prepared using the nanoprecipitation method. Their morphology was examined by visual inspection and electron microscopy. Particle size, polydispersity index (PDI), and Zeta potential were determined, and differential scanning calorimetry (DSC) and X-ray diffraction (XRD) were employed. Encapsulation efficiency (EE), drug loading (DL), and stability were evaluated. The *in vitro* release kinetics, mucus diffusion, and tumor cell uptake [tracked using coumarin 6 (COU)] were investigated. The *in vivo* tissue distribution and gastrointestinal retention [labeled with 11-chloro-1, 1'-dipropyl-3, 3, 3', 3'-tetramethyl-10, 12-trimethyleneindotricarbocyanine iodide (IR780)] were investigated. Using 4T1 tumor-bearing mice as the experimental subjects, the effects of the prepared formulation on tumor volume, tumor weight, and cell apoptosis rate were evaluated. **RESULTS** RGD@DOX-LPNs presented as orange transparent liquid with uniform and near-spherical particles. The particle size was (159.67±8.02) nm, PDI was 0.15±0.06, and Zeta potential was (-19.70±0.79) mV. After modification with RGD, the thermal absorption peak and crystalline diffraction peak of DOX disappeared. EE and DL of RGD@DOX-LPNs were (72.65±4.37)% and (4.62±0.38)%, respectively. No obvious changes in appearance, particle size, or EE were observed after storage at 4℃ and 25℃ for 7 days. The cumulative drug release at 4 h was approximately 73%, which was lower than that of free DOX (almost completely released within 1 h). The amount of COU

^Δ基金项目 山东省医药卫生科技项目(No.202303111530)
*第一作者 主治医师, 讲师, 硕士。研究方向: 肿瘤免疫微环境、生殖内分泌与代谢性疾病。E-mail: liqingling@sdcctcm.edu.cn
#通信作者 工程师, 硕士。研究方向: 药物新型给药系统。E-mail: jgliu@simmyt.ac.cn

in the first segmental mucus layer of COU-LPNs was significantly lower than that in the corresponding segment of RGD@COU-LPNs, whereas it was significantly higher in the 2nd to 5th segmental mucus layers compared to RGD@COU-LPNs ($P < 0.01$). Cellular uptake of RGD@COU-LPNs was significantly higher than that of COU-LPNs ($P < 0.05$). The isolated tissue fluorescence intensity of RGD@IR780-LPNs was stronger than that of IR780-LPNs, indicating better small intestinal retention. Compared with free DOX and unmodified nanoparticles (DOX-LPNs), RGD@DOX-LPNs exhibited a higher tumor inhibition rate of 65.74%, significantly reduced tumor volume and weight, and increased apoptosis rate ($P < 0.01$). **CONCLUSIONS** RGD@DOX-LPNs are successfully prepared with sustained release properties, which can improve gastrointestinal mucus retention, enhance cellular uptake of DOX, and have potent antitumor activity against breast cancer.

KEYWORDS doxorubicin; RGD; lipid-polymer hybrid nanoparticles; anti-tumor effect

乳腺癌是女性最高发的恶性肿瘤^[1],其临床治疗以手术治疗、放疗和化疗等为主。多柔比星(doxorubicin, DOX)是一种蒽环类药物,以细胞核为最终靶点,具有很强的抗肿瘤活性。目前,DOX已被制备成脂质体等多种递药系统,以解决其心肾毒性强、生物利用度低等问题^[2-3],但靶向性仍有待提高。细胞黏附肽能够介导多种载体的内吞作用,刺激性低,且在一定浓度范围内对宿主细胞无毒害作用,是一种应用广泛的新型药物递送材料^[4-5]。基于此,本研究选择细胞黏附肽精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp, RGD)修饰的脂质聚合物纳米粒(lipid-polymer hybrid nanoparticles, LPNs)为载体,制备载DOX的“核-壳”型纳米粒(简称“RGD@DOX-LPNs”),通过提高药物在胃肠道黏液中的滞留性来改善其靶向吸收性能;同时,通过构建4T1乳腺癌荷瘤小鼠模型,初步评价该制剂的抗肿瘤作用,以期对DOX相关制剂的研发及临床应用提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括8453型紫外-可见分光光度计(美国Agilent公司)、Nano ZS 90型激光粒度仪(英国Malvern Panalytical公司)、JEM-1230型透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)(日本JEOL公司)、RC12AD型体外溶出仪(天津天大天发科技有限公司)、DSC3型差示扫描量热仪(differential scanning calorimeter, DSC)(瑞士Mettler Toledo公司)、Ultima IV型X射线衍射仪(X-ray diffractometer, XRD)(日本Rigaku公司)、Forma Series™ II Water Jacket型CO₂细胞培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司)、TCS SP8型激光共聚焦显微镜(德国Leica公司)、NEWTON 7.0型小动物活体成像系统(法国Viber公司)等。

1.2 主要药品与试剂

DOX原料药(批号P2125318,纯度>98.0%)、DOX对照品(批号S20240426,纯度≥98.0%)、RGD-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(distearoyl phosphatidylethanolamine, DSPE)-聚乙二醇2000(polyethylene glycol 2000, PEG2000)(批号TYJ0221-04,纯度>95.0%)、11-氯-1,

1'-二正丙基-3,3',3'-四甲基-10,12-三亚甲基吡啶三碘化物(批号P2561884)、香豆素6(coumarin 6, COU)对照品(批号P2682904,纯度>98.0%)、磷酸盐缓冲液(PBS,批号P2946743)均购自烟台希杰优生物科技有限公司;聚乳酸-羟基乙酸共聚物[poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA;乳酸与羟基乙酸的质量比为50:50,批号20240826]购自大连美仑生物科技有限公司;大豆卵磷脂(批号790648-1)购自德国Lipoid公司;TUNEL细胞凋亡试剂盒(批号2403210001)购自北京索莱宝科技有限公司;RPMI-1640培养基(批号6124357)购自美国Gibco公司;胎牛血清(批号SA240119)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;小肠黏液取自新鲜宰杀猪的小肠(空肠);乙腈等试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为超纯水。

1.3 细胞与动物

人结肠腺癌细胞Caco-2(编号SCSP-5027)和小鼠4T1乳腺癌细胞(编号SCSP-5056)均购自中国科学院细胞库。SPF级雄性ICR小鼠,4周龄,体重18~22 g,购自济南朋悦实验动物科技有限公司,生产许可证号为SCXK(鲁)2022 0006。所有动物均饲养于滨州医学院实验动物中心(温度22~25 °C,相对湿度50%~70%,每12 h光暗交替)内,自由摄食、饮水。本研究方案经滨州医学院动物伦理委员会批准(编号为动研批第2023-402号)。

2 方法与结果

2.1 制剂制备

采用纳米沉淀法制备^[6]:取磷脂25 mg(大豆卵磷脂15 mg+RGD-DSPE-PEG2000 10 mg),用无水乙醇0.25 mL溶解,再分散到40 mL水中,于65 °C水浴中搅拌30 min,作为水相。取PLGA 40 mg和DOX原料药10 mg,用80%乙腈20 mL溶解,作为有机相。将有机相倒入水相中,于室温下以150 r/min搅拌2 h,随后旋转蒸发去除乙腈,经0.8 μm滤膜过滤,即得RGD@DOX-LPNs。

不加DOX,同法制备RGD-LPNs;不加DOX和RGD-DSPE-PEG2000,同法制备LPNs;不加RGD-DSPE-PEG2000,同法制备DOX-LPNs;分别以荧光探针

COU 或示踪指示剂 IR780 代替 DOX, 同法制备 COU-LPNs、RGD@COU-LPNs 和 IR780-LPNs、RGD@IR780-LPNs, 备用。

2.2 表征

2.2.1 外观、微观形态观察和粒径、多分散性指数、Zeta 电位检测

取 RGD-LPNs 和 RGD@DOX-LPNs 适量, 进行外观观察, 结果显示, RGD-LPNs 为有淡蓝色乳光的透明液体(图 1A 左), 包载 DOX 后为橙色透明液体(图 1A 右)。取 RGD@DOX-LPNs 1 mL, 置 50 mL 容量瓶中, 用水定容, 摇匀, 取适量滴加至覆盖碳支持膜的铜网上, 自然晾干后, 使用 TEM 观察其微观形态, 结果(图 1B)显示, RGD@DOX-LPNs 颗粒大小均一且近球形。另取上述稀释后的 RGD@DOX-LPNs 溶液, 使用激光粒度仪测定其粒径、多分散性指数(polydispersity index, PDI)和 Zeta 电位, 每样品平行检测 3 次, 结果显示, 其粒径为 (159.67 ± 8.02) nm, PDI 为 0.15 ± 0.06 , Zeta 电位为 (-19.70 ± 0.79) mV ($n=3$)。

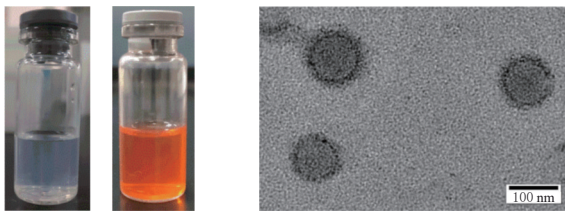


图 1 相关制剂的外观、微观形态观察图

2.2.2 DSC 和 XRD 分析

取 DOX 原料药、DOX+磷脂+PLGA 的物理混合物、RGD-LPNs、RGD@DOX-LPNs 各适量, 进行 DSC 分析(测试温度为 $30 \sim 300$ °C, 扫描速率为 10 °C/min, 测试气体为氮气)和 XRD 分析(扫描范围为 $3 \sim 80$ °, 扫描速率为 10 °/min)。结果(图 2)显示, 在 DOX 原料药中, 可观察到明显的吸热峰和尖锐的晶型衍射峰, 表明 DOX 是具有一定结晶度的分子; 在物理混合物中, 仍能观测到部分吸热峰和晶型衍射峰, 表明 DOX 在物理混合物中仍以晶型存在; 在 RGD-LPNs、RGD@DOX-LPNs 中, 吸热峰和晶型衍射峰均消失, 表明制成纳米粒后, DOX 晶型发生变化, 其可能以无定型或分子状态存在。

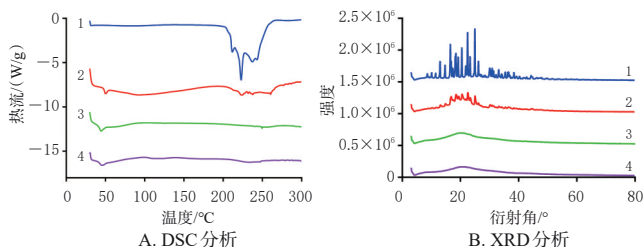


图 2 相关制剂的 DSC、XRD 分析图谱

2.3 包封率和载药量测定

采用超滤离心法^[7]检测 DOX 的包封率。取 DOX-LPNs、RGD@DOX-LPNs 各适量, 以紫外-可见分光光度计于 233 nm 波长处测定其中 DOX 的量 M_0 (定量方法的方法学考察符合 2020 年版《中国药典》(四部)的相关规定); 同时, 取等体积 DOX-LPNs、RGD@DOX-LPNs, 置于超滤离心管中, 以 3 000 r/min 离心 10 min, 取滤液适量, 使用紫外-可见分光光度计于 233 nm 波长处测定 DOX 的量 M_1 ; 按下式计算 DOX 的包封率: 包封率 (%) = $M_0/M_1 \times 100\%$ 。每样品平行测定 3 次。

采用质量法计算 DOX 的载药量。取 RGD-LPNs、RGD@DOX-LPNs 各 1 mL, 冷冻干燥后称重, 分别得两者的质量 M_2 、 M_3 , 按下式计算载药量: 载药量 (%) = $(M_3 - M_2)/M_1 \times 100\%$ 。每样品平行测定 3 次。

采用 GraphPad 6.02 软件对数据进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组比较采用 t 检验; 多组比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD- t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ (下同)。

结果显示, DOX-LPNs、RGD@DOX-LPNs 中 DOX 的包封率分别为 $(76.14 \pm 3.53)\%$ 、 $(72.65 \pm 4.37)\%$, 载药量分别为 $(4.82 \pm 0.29)\%$ 、 $(4.62 \pm 0.38)\%$, 组间比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$), 提示 RGD 的修饰不会影响纳米粒中药物的包封率和载药量。

2.4 稳定性考察

取 RGD@DOX-LPNs 适量, 分别于 4、25 °C 下储存, 并于放置 1、3、5、7 d 时观察其外观变化, 测定其粒径和包封率, 每样品每条件平行测定 3 次。结果(图表略)显示, 在上述条件下, RGD@DOX-LPNs 的外观无明显变化且无沉淀析出, 粒径与初始粒径基本一致, 包封率虽略有下降但整体变化不大, 提示所制 RGD@DOX-LPNs 较为稳定。

2.5 体外释放考察

采用透析法检测。取 DOX 原料药、DOX-LPNs、RGD@DOX-LPNs 各适量, 以 pH7.4 的 PBS 稀释, 制成质量浓度为 $250 \mu\text{g/mL}$ (以 DOX 质量计) 的溶液; 精密量取上述溶液各 5.0 mL 置于透析袋中, 将透析袋两端夹紧后放入释放介质 (PBS) 50 mL 中, 于 37 °C 下以 50 r/min 振荡; 分别于 0.5、1、2、4、8、12、24、36、48 h 时于透析袋内取样 200 μL , 同时补足等温等体积的释放介质。取各取样液, 采用紫外-可见分光光度计于 233 nm 波长处测定其中 DOX 的量, 按下式计算累积释放量: 累积释放量

$$(\%) = \frac{\sum_{i=1}^n c_i \times V_i}{M_0} \times 100\% \quad (\text{式中, } c_i \text{ 为第 } i \text{ 个时间点测得的 DOX 的量, } V_i \text{ 为第 } i \text{ 个时间点的取样体积, } M_0 \text{ 为 DOX 的总量})。$$

每样品平行测定 3 次, 取平均值。结果(图 3)显

示,DOX原料药在0.5 h时的释放已超过95%,1 h内几乎释放完全;DOX-LPNs在4 h时的累积释放量约为73%,24 h时的累积释放率可达90%左右,48 h时近乎释放完全;RGD@DOX-LPNs的体外释放特性与DOX-LPNs相似,提示RGD的修饰对纳米粒中DOX的释放几乎无影响,DOX-LPNs和RGD@DOX-LPNs均有明显的缓释特性。

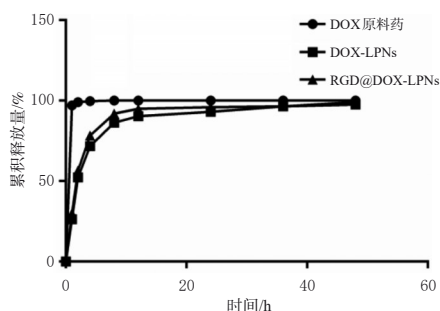
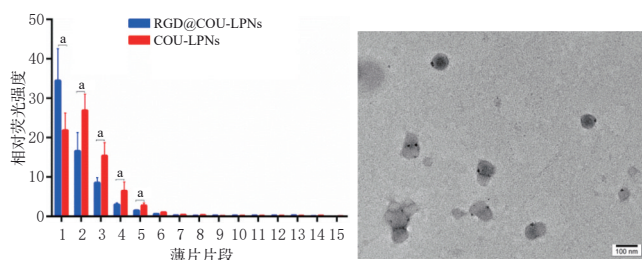


图3 DOX原料药和纳米粒的体外释放曲线

2.6 体外黏液扩散考察

本研究以荧光探针COU替代制剂中的DOX,使用硅胶管旋转法^[8]考察制剂在黏液中的体外扩散行为。取小肠黏液600 μL,加至一端封口的硅胶管(直径5 mm)中,使黏液层高度约为30 mm。将硅胶管置37 °C水浴中平衡15 min,备用。取COU-LPNs、RGD@COU-LPNs各100 μL,轻轻加至黏液层表面,封口后,于37 °C水浴中振荡12 h,再置于-80 °C下冷冻4 h。从加样端开始,将其均匀切成2 mm厚的薄片(共15段),并迅速转移至不同离心管中,加乙腈200 μL,超声20 min后以13 400 r/min离心5 min,取各管上清液进行相对荧光强度检测(用于表示上清液中COU的量,两者成正比),每样品平行测定3次,并取第1段薄片的上清液进行TEM观察。相对荧光强度检测结果(图4A)显示,COU-LPNs第1段薄片COU的量显著低于同段RGD@COU-LPNs,而第2~5段薄片COU的量均显著高于同段RGD@COU-LPNs($P<0.01$),提示COU-LPNs更容易在黏液中扩散和渗透,而经RGD修饰的RGD@COU-LPNs则因被黏液“捕获”而在后续薄片中的量明显降低。TEM观察结果(图4B)显示,在黏液作用下,纳米粒子出现一定的聚集现象,但形态仍为近球形。



A. 旋转硅胶管扩散实验结果($\bar{x} \pm s, n=3$) B. 第1段薄片的TEM观察图
a: 组间比较, $P<0.01$ 。

图4 硅胶管旋转实验结果和TEM观察图

2.7 细胞摄取情况考察

本研究以荧光探针COU替代制剂中的DOX,使用激光共聚焦显微镜考察肠细胞对制剂中药物的摄取情况。取处于对数生长期的Caco-2细胞,按25 000个/孔接种于共聚焦培养皿中,于37 °C、5%CO₂下培养过夜至贴壁。将细胞分为COU-LPNs组和RGD@COU-LPNs组,每组设置3个复孔。各组细胞分别加入含COU-LPNs和RGD@COU-LPNs(COU的浓度均为1 μg/mL,药物浓度参考前期预实验结果设置)的培养基,培养1 h;弃去培养基,细胞用PBS清洗3次,以4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染核15 min;弃去染液,细胞用PBS清洗3次后,封片,使用激光共聚焦显微镜观察,再以Image J软件进行荧光强度(绿色)定量分析,以比较Caco-2细胞对不同制剂中COU的摄取量(荧光强度与摄取量成正比)。结果(图5)显示,与COU-LPNs组(1.00±0.04)比较,RGD@COU-LPNs组的荧光强度(1.23±0.02)显著升高($P<0.05$),提示经RGD修饰后,Caco-2细胞对制剂中药物的摄取明显增加。

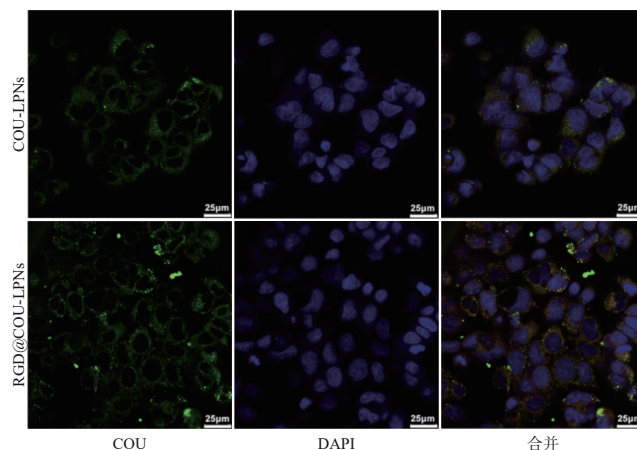


图5 Caco-2细胞对制剂中药物摄取的激光共聚焦图

2.8 体内组织分布及胃肠道滞留研究

本研究以示踪指示剂IR780替代制剂中的DOX,采用荧光成像法考察制剂在小鼠体内的组织分布和胃肠道滞留情况。将小鼠分为IR780-LPNs组和RGD@IR780-LPNs组,每组4只。取IR780-LPNs、RGD@IR780-LPNs各适量,按1 mg/kg(以IR780质量计,药物浓度参考前期预实验结果设置)的剂量灌胃,分别于灌胃后4、8、24、48 h时将其麻醉、处死(每组每个时间点各1只),剖取心、肝、脾、肺、肾、胃和小肠,进行离体组织/器官荧光成像观察并采用Kuant Viber Lourmat软件进行图像分析,比较各组小鼠组织/器官的荧光强度(荧光强度与滞留量成正比)。结果(图6)显示,与IR780-LPNs比较,RGD@IR780-LPNs在小鼠心、肝、脾、肺、肾中的离体组织荧光强度均更强,且后者显示出更强的胃肠道滞留性,与硅胶管旋转实验的检测结果一致。

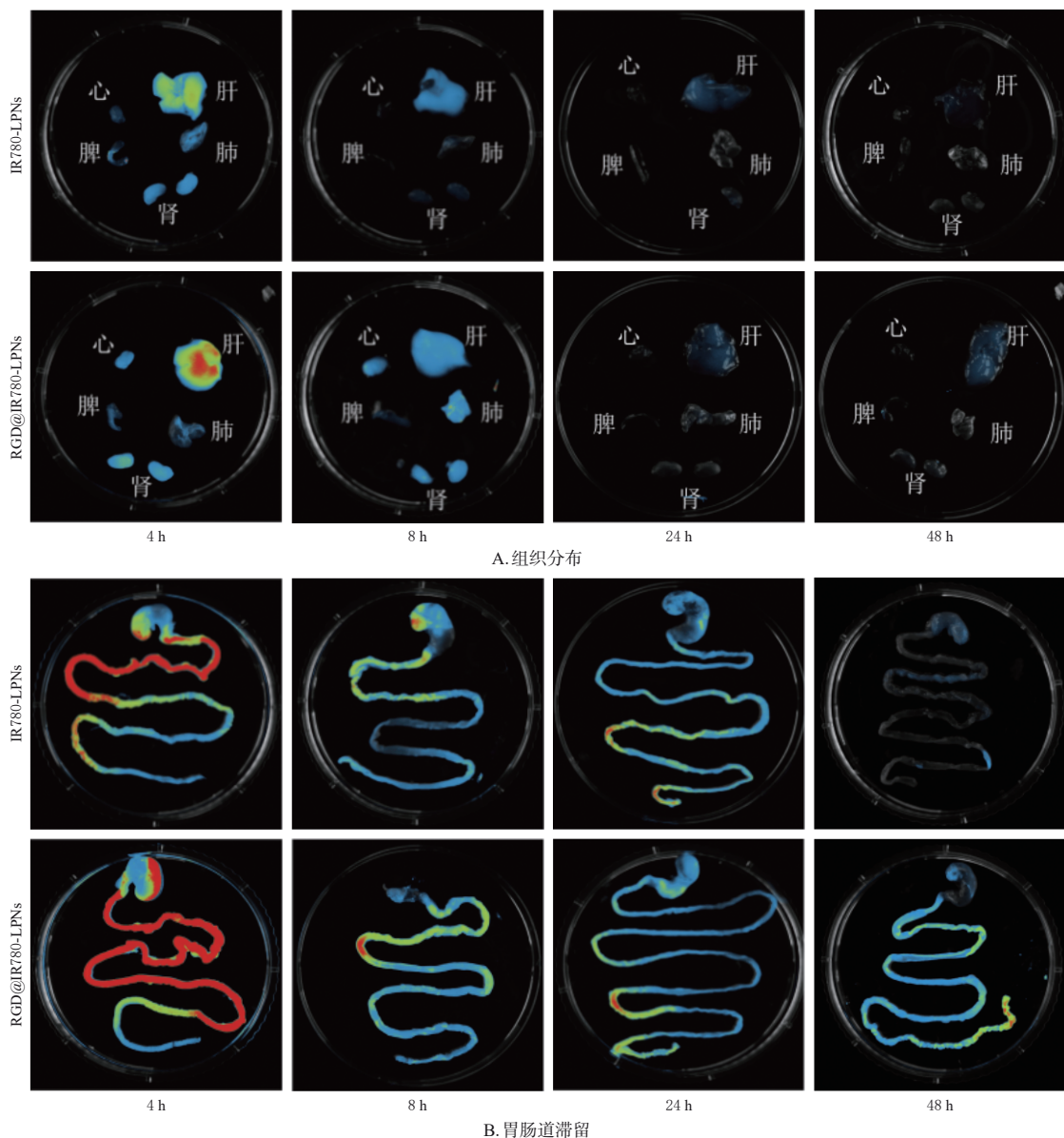


图6 制剂中药物的体内组织分布及胃肠道滞留情况(圆形视野直径:10 cm)

2.9 抗肿瘤作用考察

2.9.1 4T1 细胞培养及荷瘤小鼠模型建立

取4T1细胞,接种于培养瓶中,以含10%胎牛血清、1%青链霉素双抗的RPMI-1640培养基于37℃、5%CO₂下培养,隔天更换培养基1次,待细胞融合至80%~90%时传代。

参考相关文献^[9]方法制备荷瘤小鼠模型:取对数生长期的4T1细胞,以PBS调整至1×10⁷个/mL;取上述细胞悬液,按每只2 mL皮下注射于小鼠前肢腋下;继续饲养7~10 d,待瘤体长至250~300 mm³后,进行后续实验。

2.9.2 分组与给药

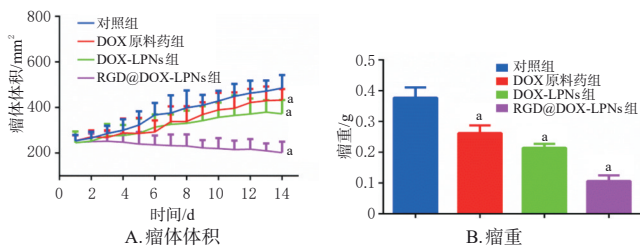
取“2.9.1”项下瘤体大小较为均一的小鼠,随机分为对照组、DOX原料药组、DOX-LPNs组、RGD@DOX-LPNs组,每组5只。除对照组小鼠灌胃生理盐水外,其余各组小鼠均按10 mg/kg(以DOX质量计,以生理盐水

为溶剂)^[10]的剂量灌胃相应药液,灌胃体积均为0.2 mL,每2 d给药1次,连续给药7次。

2.9.3 瘤体测定和抑瘤率

给药期间,每天观察各组小鼠的瘤体生长情况,用游标卡尺测量并按下式计算瘤体体积:瘤体体积=1/2×L×W²(式中,L为瘤体长度,W为瘤体宽度)。末次给药后,同法计算瘤体体积并于次日处死各组小鼠,剖取其瘤体,观察后并称重,按下式计算抑瘤率(inhibition rate of tumor, IRT):IRT(%)=(对照组小鼠平均瘤重-实验组小鼠平均瘤重)/对照组小鼠平均瘤重×100%。

结果(图7,瘤体观察图略)显示,对照组小鼠瘤体生长迅速;DOX原料药组、DOX-LPNs组、RGD@DOX-LPNs组小鼠瘤体生长减缓,其瘤体体积(末次给药后)、瘤重均显著缩小或降低(P<0.01),IRT分别为30.53%、43.19%、65.74%。



a: 与对照组比较, $P < 0.01$ 。

图7 瘤体体积及瘤重检测结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

2.9.4 细胞凋亡检测

采用TUNEL染色法检测。取各组小鼠的肿瘤组织,置于10%中性福尔马林中固定后进行常规石蜡包埋、切片,参照TUNEL细胞凋亡试剂盒方法处理后封片,使用显微镜观察各组肿瘤细胞的凋亡情况(凋亡细胞呈棕色)并计算凋亡率(凋亡细胞数与细胞总数的百分比)。结果(图8)显示,对照组小鼠的肿瘤细胞凋亡率为 $(2.65 \pm 0.12)\%$; DOX原料药组、DOX-LPNs组、RGD@DOX-LPNs组小鼠的肿瘤细胞凋亡率分别为 $(21.36 \pm 3.67)\%$ 、 $(36.19 \pm 2.34)\%$ 、 $(49.54 \pm 3.58)\%$,且RGD@DOX-LPNs组 > DOX-LPNs组 > DOX原料药组 > 对照组($P < 0.01$)。这表明DOX原料药及相关制剂均能诱导乳腺癌细胞凋亡;经RGD修饰后,DOX的抗肿瘤效果明显增强。

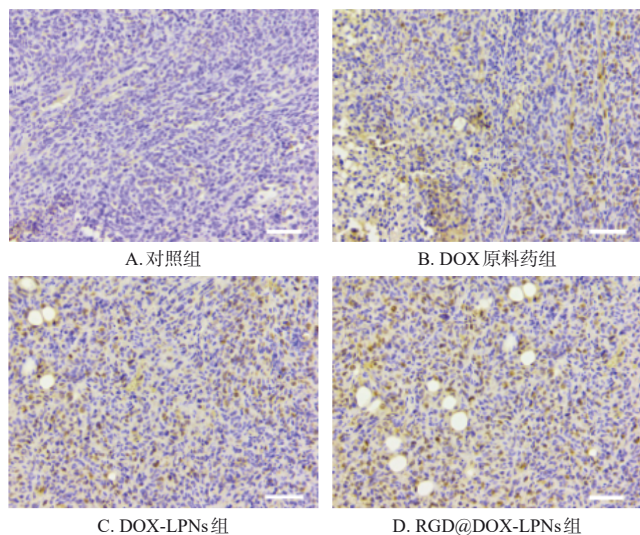


图8 各组小鼠肿瘤细胞凋亡的显微图(标尺:250 μm)

3 讨论

乳腺癌是女性高发恶性肿瘤,其治疗面临化疗药物生物利用度低、心脏毒性大及靶向性差等关键挑战^[1]。本研究采用纳米沉淀法制备RGD@DOX-LPNs,其粒径为 (159.67 ± 8.02) nm,符合口服纳米制剂的粒径要求 $(100 \sim 200)$ nm^[12];该制剂的PDI为 $0.15 \pm 0.06 (< 0.3)$,粒径分布均匀,与TEM观察到的微观特征相符;此外,该制剂的Zeta电位为 (-19.70 ± 0.79) mV,荷负电,与文献报道的肠道屏障表面电荷特征一致^[13],可避免药物滞留于肠道屏障表面。上述物理化学特性为后续纳米粒

顺利穿过黏液层的网状结构到达小肠上皮细胞并被该细胞摄取奠定了基础。

DSC、XRD结果显示,经纳米粒包裹后,DOX从晶体形态转变为无定型或分子状态,这种相变可显著改善药物的溶解特性^[14]。体外释放结果显示,与DOX原料药0.5 h释放超过95%相比,RGD@DOX-LPNs实现了48 h内的缓释,这种释放行为可能源于PLGA壳层的扩散屏障作用和药物分子与磷脂层的疏水相互作用^[14]。此外,稳定性考察结果显示,RGD@DOX-LPNs在4、25 $^{\circ}\text{C}$ 下放置7 d的外观、粒径、包封率均无明显变化,提示该制剂具有良好的稳定性。笔者分析认为,纳米粒的稳定性与其自身组成、结构密切相关,其中PEG2000-PLGA嵌段可能发挥了重要作用:PEG2000具有良好的亲水性,可在纳米粒表面形成水化层,并可通过空间位阻效应有效阻止纳米粒之间的聚集,从而维持了粒径的稳定^[15];PLGA作为纳米粒的核心结构,可增强其整体结构的稳固性,减少因外力或环境变化所导致的纳米粒结构受损^[16],为药物耐受胃肠道环境提供了良好保障。

RGD是一类由多种氨基酸组成的小分子多肽,常作为整合素 $\alpha\text{v}\beta3$ 的特异性配体,能够介导细胞对多种载体的内吞作用,比传统黏附型载体具有更明显的优势^[5]。基于此,本研究选择其作为渗透性纳米粒的辅助载体。硅胶管旋转实验结果显示,RGD@COU-LPNs中COU在黏液中的滞留量较COU-LPNs多,这种效应可能是因为RGD中的精氨酸基团可通过静电吸附与黏蛋白2的硫酸化糖基结合,从而增强制剂与黏液间的相互作用^[17]。离体组织器官荧光成像进一步证实,经RGD修饰后,制剂在小肠中的滞留时间可超过24 h,在胃中的滞留也较未经RGD修饰的制剂明显,这种“黏液锚定”效应显著延长了载药纳米粒在胃肠道中的滞留时间,结合制剂的缓释效果,可进一步延长药物的吸收窗口期。值得注意的是,黏液滞留的实现并不完全依赖于药物的荷电特性或特定受体,而是通过分子间作用力来提升RGD修饰制剂与靶细胞接触的概率,间接促进整合素介导的内吞过程;上述黏液滞留机制与整合素介导的内吞作用相互协同,最终增强了小肠上皮细胞对载药纳米粒中药物的摄取^[18]。本研究的细胞摄取实验也得到了相似的结果,即细胞对经RGD修饰制剂中药物的摄取明显多于未经RGD修饰的制剂。

在4T1荷瘤小鼠模型中,RGD@DOX-LPNs表现出了明显的抗肿瘤活性,即该制剂可使荷瘤小鼠瘤体缩小、瘤重下降,并可诱导乳腺癌细胞凋亡;此外,该制剂的IRT达65.74%,高于DOX原料药(30.53%)和DOX-LPNs(43.19%)。笔者认为这种增强效应可能归因于:(1)纳米粒可保护药物免受胃酸降解^[19];(2)PEG2000修饰可延长黏液滞留时间^[20];(3)RGD的主动靶向性效应可提高药物在肿瘤部位的浓度^[21];(4)RGD能特异性识

别肿瘤细胞表面高表达的整合素 $\alpha v\beta 3$, 后者与肿瘤血管生成和肿瘤细胞迁移、侵袭密切相关^[21]。此外, 本研究虽未系统评价该制剂的毒性, 但已有研究表明, 纳米包裹可减少 DOX 蓄积、降低其毒副作用^[22]。

综上所述, 本研究成功构建了具有“核-壳”结构的 RGD@DOX-LPNs, 实验证实其具有以下优势: (1) 具有良好的理化特性和稳定性; (2) 具有一定的缓释效果; (3) 可显著增强黏液滞留和细胞摄取; (4) 可通过主动靶向和缓释特性来发挥抑瘤作用; (5) 抗肿瘤活性较原料药和普通纳米粒明显提升。本研究为口服型抗乳腺癌纳米制剂的研发提供了重要的实验依据, 但 RGD@DOX-LPNs 能否抑制肿瘤细胞转移、减轻 DOX 器官毒性等仍需进一步探索。

参考文献

[1] SIEGEL R L, KRATZER T B, GIAQUINTO A N, et al. Cancer statistics, 2025[J]. *CA A Cancer J Clin*, 2025, 75 (1):10-45.

[2] LU Q, HAN Z Y, WANG X, et al. Long-acting bioengineered platelets with internal doxorubicin loaded and external quercetin liposomes anchored for post-surgical tumor therapy[J]. *J Control Release*, 2025, 381:113546.

[3] CHEN Y, QIN H, LI N, et al. Neoadjuvant chemotherapy by liposomal doxorubicin boosts immune protection of tumor membrane antigens-based nanovaccine[J]. *Cell Rep Med*, 2025, 6(1):101877.

[4] MAHMOUDI R, ASHRAF MIRAHMADI-BABAHEIDRI S, DELAVIZ H, et al. RGD peptide-mediated liposomal curcumin targeted delivery to breast cancer cells[J]. *J Biomater Appl*, 2021, 35(7):743-753.

[5] REN L L, NIE J F, WEI J, et al. RGD-targeted redox responsive nano micelle: co-loading docetaxel and indocyanine green to treat the tumor[J]. *Drug Deliv*, 2021, 28 (1):2024-2032.

[6] LIU Y, LIU J G, LIANG J, et al. Mucosal transfer of wheat germ agglutinin modified lipid-polymer hybrid nanoparticles for oral delivery of oridonin[J]. *Nanomedicine*, 2017, 13(7):2219-2229.

[7] TEHRANI S F, BHARADWAJ P, LEBLOND CHAIN J, et al. Purification processes of polymeric nanoparticles: how to improve their clinical translation?[J]. *J Control Release*, 2023, 360:591-612.

[8] DÜNNHAUPT S, BARTHELMES J, HOMBACH J, et al. Distribution of thiolated mucoadhesive nanoparticles on intestinal mucosa[J]. *Int J Pharm*, 2011, 408 (1/2):191-199.

[9] PENG T T, HUANG Y, FENG X Q, et al. TPGS/hyaluronic acid dual-functionalized PLGA nanoparticles delivered through dissolving microneedles for markedly improved

chemo-photothermal combined therapy of superficial tumor [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(10):3297-3309.

[10] 杜华康, 陆苑, 金阳, 等. 载阿霉素纳米粒温敏凝胶复合体系的体内缓释性能和抗肿瘤作用及瘤内滞留性能评价[J]. *贵州医科大学学报*, 2024, 49(3):361-367, 374.

[11] SIEGEL R L, MILLER K D, WAGLE N S, et al. Cancer statistics, 2023[J]. *CA A Cancer J Clin*, 2023, 73 (1):17-48.

[12] WANG X, DENG F Y, JI T Y, et al. Impact of physiological characteristics on chylomicron pathway-mediated absorption of nanocrystals in the pediatric population[J]. *ACS Nano*, 2024, 18(34):23136-23153.

[13] ENSIGN L M, CONE R, HANES J. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: the gastrointestinal mucus barriers[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, 64(6):557-570.

[14] 李珏, 姜飞, 李慧丽, 等. 白藜芦醇-牛磺脱氧胆酸钠共无定形体系改善溶解度和物理稳定性[J]. *中草药*, 2024, 55 (21):7248-7256.

[15] 李明, 辛娟, 王远侠, 等. 聚乙二醇修饰杨梅苷固体脂质纳米粒制备及其体内药动学研究[J]. *中成药*, 2024, 46 (4):1102-1109.

[16] 王晓静, 郭子硕, 张海桐, 等. 紫杉醇 PLGA 纳米粒的表征及体外抗肿瘤作用研究[J]. *中国药房*, 2024, 35(22):2721-2725.

[17] HAN H J, VALDEPÉREZ D, JIN Q, et al. Dual enzymatic reaction-assisted gemcitabine delivery systems for programmed pancreatic cancer therapy[J]. *ACS Nano*, 2017, 11(2):1281-1291.

[18] 赵波, 范侯辰, 王学清, 等. iRGD 修饰的阿霉素主动靶向脂质体的细胞毒与抗肿瘤效果评价[J]. *药科学报*, 2013, 48(3):417-422.

[19] CHEN Y, WANG S B, MA Q, et al. Utilizing endosomal capture for tumor therapy via membrane-lytic mechanism-based pickering emulsion[J]. *J Control Release*, 2023, 354:523-537.

[20] BADIVI S, KAZEMI S, ESKANDARISANI M, et al. Targeted delivery of bee venom to A549 lung cancer cells by PEGylate liposomal formulation: an apoptotic investigation[J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1):17302.

[21] CHAKRAVARTY R, CHAKRABORTY S, DASH A. Molecular imaging of breast cancer: role of RGD peptides[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2015, 15(13):1073-1094.

[22] HUANG H Y, CHEN L Q, SUN W, et al. Collagenase IV and clusterin-modified polycaprolactone-polyethylene glycol nanoparticles for penetrating dense tumor tissues[J]. *Theranostics*, 2021, 11(2):906-924.

(收稿日期:2025-02-12 修回日期:2025-07-07)

(编辑:张元媛)