

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2025.02.05 文章编号: 2095-1264(2025)02-0178-09

抗实体瘤小分子靶向药物 基础研究与临床实践专栏

一种新型克唑替尼纳米药物制剂的制备 及其体外抗非小细胞肺癌研究*

刘泓池¹,罗 迁²,刘 熠¹,阳 仪¹,陶晓军^{1*},袁立明^{1*} (¹湖南师范大学医学部小分子靶向药物研究与创制湖南省重点实验室,湖南长沙,410081; ²湖南师范大学附属第一医院/湖南省人民医院 肿瘤科,湖南长沙,410005)

摘要:目的 开发一种透明质酸(HA)修饰的克唑替尼(Cri)纳米递药系统(HDC NPs),以改善Cri的水溶性 差、生物利用度低等问题,同时赋予其pH响应性控释、主动靶向及长循环特性,为非小细胞肺癌(NSCLC)的精准治 疗提供新策略。方法 采用 3'3-二硫代二丙酸(DTPA)作为连接臂,通过酰胺化反应共价偶联 HA与 Cri,合成两 亲性聚合物HA-DTPA-Cri (HDC),并利用自组装法制备HDC NPs。通过傅里叶变换红外光谱(FTIR)和核磁共 振氢谱(1H-NMR)验证化学结构;动态光散射(DLS)和透射电镜(TEM)表征纳米粒的粒径、Zeta电位及形态;紫外 分光光度法测定载药量(DL)和包封率(EE);透析法评价体外释放行为(pH 7.4 vs. 5.0);流式细胞术和共聚焦显微 镜分析 A549 细胞对纳米粒的摄取效率; 细胞毒性实验(MTT法)评估体外抗肿瘤活性。结果 成功合成了 HDC, 通过调整亲水材料与疏水材料的比例,制备出多种不同尺寸的HDC NPs。当HA-DTPA(HD)与Cri的投料比为 1:1时, HDC NPs的粒径为(215.97±10.12) nm, 电位为(-17.23±0.98) mV, 多分散指数(PDI)为(0.197±0.048), 透 射电镜观察显示纳米粒子呈均匀球形。以上述比例制备的纳米药物制剂,载药量为(3.55±0.48)%,包封率为 (42.61±3.96)%。体外释放实验表明, HDC NPs具有缓释性能, 并可在 pH 5.0的酸性环境下实现控制释放, 72 h的 累积释放率为(73.28±1.88)%。以A549细胞为NSCLC细胞模型的体外细胞实验结果表明,HDC NPs的细胞摄取 率为(28.12±0.66)%,显著高于 Free Cri,并且在抑制肿瘤细胞增殖和活力方面表现出更显著的效果。结论 本研 究制备的新型纳米药物制剂 HDC NPs具有均匀的粒径、规整的形态及良好的分散度和稳定性,能够实现缓释和控 释功能。在体外实验中,HDC NPs表现出优异的抗肿瘤效果,为克唑替尼的剂型改良及NSCLC靶向治疗提供了 新的思路。

关键词:非小细胞肺癌;克唑替尼;纳米制剂;靶向递送系统;透明质酸 中图分类号: R734.2;R979.1 文献标识码: A

Design and development of a novel crizotinib nanoformulation: in vitro investigation of its antitumor efficacy against non-small cell lung cancer^{*}

LIU Hongchi¹, LUO Qian², LIU Yi¹, YANG Yi¹, TAO Xiaojun^{1*}, YUAN Liming^{1*}

(¹ Key Laboratory of Small Molecule Targeted Drug Research and Development in Hunan Province, Health Science Center,

Hunan Normal University, Changsha, 410081, Hunan, China; ²Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Hunan Normal University/Hunan Provincial People's Hospital, Changsha, 410005, Hunan, China)

Abstract: Objective To develop a hyaluronic acid (HA)-modified crizotinib (Cri) nanoparticle drug delivery system

^{*}基金项目:湖南省研究生创新科研项目(CX20230532);湖南省大学生创新训练计划项目(S202410542134S);湖南师范大学大学生创新创业训练计划项目(S202410542233)。

作者简介:刘泓池,男,硕士研究生,研究方向为纳米制剂的缓控释性及靶向治疗。

^{*}通信作者:陶晓军,男,医学博士,副教授,研究方向为肿瘤靶向治疗、纳米制剂的定位释放、纳米中药制剂等;袁立明,男, 医学硕士,副教授,研究方向为临床应用解剖学。

(HDC NPs) to address the poor water solubility and low bioavailability of Cri, while endowing it with properties of pH-responsive controlled release, active targeting and long circulating, so as to provide a novel strategy for precise treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC). Methods Using 3,3'-dithiodipropionic acid (DTPA) as a linker, HA and Cri were covalently conjugated via amidation reaction to synthesize the amphiphilic polymer HA-DTPA-Cri (HDC), followed by self-assembly to prepare HDC NPs. The structure of the polymer was verified using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and proton nuclear magnetic resonance (¹H-NMR). Dynamic light scattering (DLS) was employed to determine the particle size and zeta potential, while transmission electron microscopy (TEM) was used to observe nanoparticle morphology. Ultraviolet spectrophotometry was used to determine drug loading (DL) and encapsulation efficiency (EE). In vitro release behavior (pH 7.4 vs. 5.0) was evaluated via dialysis. Flow cytometry and confocal microscopy were used to analyze the cellular uptake efficiency in A549 cells, while cytotoxicity assay (MTT method) to assess the antitumor activity. Results The HDC polymer was successfully synthesized. By optimizing the ratio of hydrophilic to hydrophobic materials, various HDC NPs with different sizes were prepared. When the mass ratio of HA-DTPA (HD) to Cri is 1: 1, the nanoparticles exhibited a size of (215.97±10.12) nm, a zeta potential of (-17.23±0.98) mV, and a polydispersity index (PDI) of (0.197±0.048). Observation of nanoparticles as uniform spherical shapes through TEM. The nanodrug formulation prepared at this ratio has a drug loading capacity of (3.55±0.48)% and an encapsulation efficiency of (42.61±3.96)%. In vitro release studies showed that HDC NPs exhibited sustained release properties and pH-responsive controlled release under acidic conditions (pH 5.0), with a 72-hour release rate of (73.28±1.88)%. Cellular experiments using A549 cells as an NSCLC model showed that HDC NPs achieved a cellular uptake rate of (28.12±0.66)%, significantly higher than free Cri, and exhibited enhanced inhibition of tumor cell proliferation and viability. Conclusion The newly developed HDC NPs exhibit uniform size, well-defined morphology, excellent dispersibility, and stability. They enable sustained and controlled release and demonstrate superior antitumor efficacy in vitro. This study provides a promising strategy for the improvement of crizotinib formulations and targeted therapy for NSCLC.

Keywords: NSCLC; Crizotinib; Nanoformulation; Targeted delivery system; Hyaluronic acid

0 前言

肺癌是全球范围内发病率和死亡率最高的恶性 肿瘤。最新流行病学数据显示,肺癌新发病例占全 球癌症总发病率的23.6%,死亡病例占癌症总死亡 率的16.8%^[1]。在组织学分类中,非小细胞肺癌(nonsmall cell lung cancer, NSCLC)是最主要的病理类 型,约占肺癌的85%^[2],其高发病率和高死亡率对全 球公共卫生构成了严峻挑战。

克唑替尼(crizotinib, Cri)作为首个获得临床批 准的多靶点酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI),可通过特异性抑制间变性淋巴瘤激酶 (anaplastic lymphoma kinase, ALK)与细胞间质上皮 转化因子(cellular-mesenchymal epithelial transition factor, c-Met)激酶的磷酸化,有效阻断肿瘤细胞的 增殖信号通路并诱导细胞凋亡^[3-4]。临床研究证实, 该药物可显著改善ALK 阳性局部晚期或转移性 NSCLC患者的无进展生存期(progression-free survival, PFS)和总生存期(overall survival, OS)^[5]。然而,克 唑替尼作为口服制剂存在明显的局限性(如水溶性 差、受食物影响显著、首过效应明显等),导致其生 物利用度较低^[6-7]。因此,如何提升克唑替尼的溶解 性和生物利用度,优化其药代动力学性能,并减少 药物相关不良反应,已成为当前研究的关键问题和 重要挑战。

近年来,纳米药物递送系统作为一种新型肿瘤 靶向治疗策略,因其独特的优势而备受关注。该系 统具有良好的生物相容性、靶向定位能力、隐形特 性、长效循环性、缓释与控释特性及表面易修饰性 等显著特征,可将药物分子特异性地传递至病灶部 位,因而在抗肿瘤药物的靶向运输和肿瘤联合治疗 中得到了广泛应用^[8-10]。CD44作为一种跨膜糖蛋 白,在多种恶性肿瘤细胞中过表达,可通过调控细 胞增殖、迁移和上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)等过程促进肿瘤进展^[11],是 实现精准治疗、提高靶向治疗疗效的重要靶点。透 明质酸(hyaluronic acid, HA)是一种天然糖胺聚糖, 由葡萄糖醛酸和N-乙酰氨基葡萄糖的双糖单元反 复交替连接而成,具有良好的生物相容性和优异的 可降解性。HA功能基元丰富,易于进行化学改性, 通过接枝功能单元制备的纳米药物递送载体能很 好地保持多肽、蛋白、基因等物质的活性及其与

CD44受体的高亲和结合能力^[12-13],因而引起了人们的广泛关注。

本研究计划将HA与Cri进行偶联,制备一种新型透明质酸-3'3-二硫代二丙酸-克唑替尼纳米前药递送系统(HDC NPs),旨在克服现有制剂的药学局限性。通过利用纳米材料的小尺寸效应及HA赋予的长循环特性,该制剂能够借助肿瘤组织的高通透性和滞留(enhanced permeability and retention, EPR)效应,大量聚集在肿瘤部位^[14-16]。在肿瘤组织的酸性环境下,该制剂可实现药物的控制释放^[17-18]。此外,HA与肿瘤细胞高表达的CD44受体结合,能够实现被动靶向与受体介导的主动靶向相结合,从而介导细胞内吞,提高肿瘤细胞对药物的摄取率。本研究有望为Cri的药物剂型改良及NSCLC的靶向治疗提供新的思路。

1 材料

1.1 细胞系

A549细胞(人NSCLC肺泡基底上皮细胞系)由 湖南师范大学医学部任凯群教授课题组提供。

1.2 药物与试剂

Cri(货号:C137735)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDCI·HCL)(货号:25952-53-8)、 4-二甲氨基吡啶(dimethylaminopyridine,DMAP) (货号:1122-58-3)购自阿拉丁试剂(上海)有限公 司;纳诺寡聚水解透明质酸钠(货号:9067-32-7)购 自华熙生物;3'3二硫代二丙酸(dithiodipropionic acid,DTPA)(货号:D807054)、N-羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide,NHS)(货号:6066-82-6)购自麦 克林化学试剂有限公司;二甲亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO)(货号:67-68-5)购自国药试剂;DMEM 培养基(货号:C11995500BT)、磷酸盐缓冲溶液(货 号:C20012500BT)、胰蛋白酶(货号:25200-056)、 青-链霉素混合液(货号:15140-122)购自Gibco;胎 牛血清(货号:FSP100)购自依科赛生物。

1.3 主要仪器

磁力搅拌器(DF-1Z,长城科学仪器有限公司); 傅立叶变换红外光谱仪(Nicolet 360, Thermo Fisher Scientific);紫外-可见分光光度计(UV-Probe-2450, Shimadzu);核磁共振波谱仪(Quantum-I Plus 500 MHz, 北京欧贝尔仪器有限公司);动态光散射仪 (Ma11118509, Malvern Panalytical);透射电子显微 镜(Tecnai F20, FEI Company);二氧化碳培养箱 (THF 151,力康生物医疗科技控股有限公司);倒置 荧光显微镜(DMi8,Leica Microsystems);多功能酶 标仪(Synergy HTX, BioTek Instruments)。

2 方法

2.1 HA的合成

称取透明质酸钠 3.0 g, 加入适量纯水充分溶 解,采用浓盐酸调节溶液的 pH 值至 2~3。将混合液 转移至截留分子量 3 000 Da 的透析袋中,于纯水中 透析过夜。透析完成后,将所得溶液进行冷冻干 燥,最终得到产物 HA。

2.2 HD的合成

分别准确称取 DTPA 0.21 g、EDCI 0.19 g、DMAP 0.12 g溶于适量 DMSO 中,常温条件下磁力搅拌活化 1 h。另取 HA 0.38 g,用适量纯水溶解,制备 HA 溶 液。将活化后的混合溶液与HA 溶液混合,45 ℃反 应 48 h。反应完成后,将反应液转移至截留分子量 3 000 Da 的透析袋中,用去离子水透析 48 h,透析完 成后静置 6 h,过滤除去残留小分子(DTPA、EDCI、 DMAP)。将纯化后的溶液进行冷冻干燥,获得白色 海绵状透明质酸-3,3'-二硫代二丙酸(HA-DTPA, 简称 HD)产物。

2.3 HDC的合成

分别准确称取 NHS 8.06 mg 和 EDCI 13.4 mg,溶 于适量 DMSO 中。另称取 40 mg HD,溶于适量纯水 中。将上述溶液混合,常温下磁力搅拌活化1h。称 取 40 mg Cri,溶于适量 DMSO 中。活化完成后,将 Cri溶液缓慢滴加至上述混合溶液中,45℃恒温反 应 24 h。反应完成后,将反应液转移至截留分子量 3 000 Da 的透析袋中,用去离子水透析 48 h。透析 完成后静置 6 h,过滤除去残留的 NHS、EDCI及 Cri。 将纯化后的溶液进行冷冻干燥,得到 HA-DTPA-Cri (HDC)产物。按照 HD:Cri投料比(1:1、1:2、2:1)分别进 行合成,筛选出最佳尺寸比例的 HDC复合物(图1)。

2.4 HDC NPs 的制备

准确称取HDC聚合物40mg,溶于适量纯水中, 常温下磁力搅拌2h,使聚合物充分溶解。将溶液转 移至截留分子量3000Da的透析袋中,用去离子水 透析48h。透析完成后,收集透析袋内液体,过滤, 冷冻干燥,得到HDCNPs。

2.5 NPs的表征

采用傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)和核磁共振氢谱(pro-



Fig. 1 Roadmap for the synthesis of HDC nanomaterials

ton nuclear magnetic resonance, ¹H-NMR)对HA、HD及 HDC的化学结构进行表征。使用动态光散射(dynamic light scattering, DLS)测定HDC NPs的水合粒 径、Zeta电位及聚合物分散指数(polymer dispersity index, PDI);采用透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)观察HDC NPs的形态及 粒径分布。

2.6 载药量和包封率

准确称取5 mg Cri溶于25 mL DMSO中, 配制成 200 μg·mL⁻¹的标准储备液。采用梯度稀释法制备 一系列不同浓度的标准溶液,使用紫外分光光度计 测定 Cri的吸光度值, 绘制标准曲线, 拟合线性回归 方程。通过紫外分光光度计测量 Cri和 HDC NPs 的 吸光度值,并利用线性回归方程计算纳米粒子中 Cri 的浓度, 从而得到载药量和包封率。计算公式 如下:

载药量(%)=
$$\frac{纳米粒子中Cri质量}{HDC NPs质量}$$
×100%,
包封率(%)= $\frac{纳米粒子中Cri总质量}{投料Cri总质量}$ ×100%。

2.7 HDC NPs 的稳定性

将制备的HDC NPs水分散液于室温条件下避 光保存。在0、1、2、3、5、7 d的固定时间点取样,采 用DLS测定其水合粒径、Zeta电位及PDI值,评估纳 米颗粒的物理稳定性。

2.8 体外药物释放曲线

精确量取5 mL HDC NPs 溶液(1 mg·mL⁻¹,含 Cri)装入截留分子量3000 Da的透析袋中。取5 mL

Cri 溶液(1 mg·mL⁻¹)同法处理。将上述透析袋分别 浸入 pH 7.4(模拟生理环境)和 pH 5.0(模拟肿瘤微 环境)的 PBS缓冲液中,37 °C、100 r·min⁻¹避光振荡, 模拟体内循环环境。分别在 T=0.25、0.5、1、2、4、12、 24、48、72 h时间点取出所有释放样品,并立即补充 等体积同 pH 的新鲜 PBS。采用紫外分光光度法测 定各时间点介质中 Cri 的浓度,并按以下公式计算 释放率: R(%)= $\sum_{i=1}^{n} C_i \times V/M \times 100\%$ 。其中,M 为纳 米粒子中药物的质量, C_i 为T时置换取样时释放药 物的浓度,V为 PBS 的置换体积,R 为药物释放百 分率。

2.9 细胞培养

选用人NSCLC A549 细胞作为模型细胞系,在 含10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和1% 青 霉素-链霉素(penicillin-streptomycin, PS)的DMEM 高糖培养基中培养,培养条件为37 ℃、5% CO₂。

2.10 细胞摄取实验

取对数生长期A549细胞,以5×10⁴个/孔的密度 接种于6孔细胞培养板中,每孔加入2mL含10% FBS的DMEM完全培养基。将培养板置于37℃、5% CO2恒温培养箱中孵育24h,待细胞贴壁且融合率达 80%后进行后续实验。吸弃孔内旧培养基,分别加 入含FITC标记和FreeFITC溶液的HDCNPs的新鲜 完全培养基。将处理后的细胞放回培养箱,分别于 2、6、12h时间点终止孵育。小心吸弃孔内培养液。 用预冷的PBS(pH7.4)轻柔洗涤细胞3次,以去除未 内化的荧光物质。用4%多聚甲醛室温固定15min, 并用DAPI染色液染色,经PBS洗涤后,使用倒置荧 光显微镜观察并采集图像。

2.11 细胞活力检测

取对数生长期 A549 细胞,调整细胞密度至 2×10⁴个/mL,接种于96孔板,每孔加入 100 μL细胞 悬液。将培养板置于 37 ℃、5% CO₂恒温培养箱中孵 育 24 h,待细胞完全贴壁后进行后续处理。分别加 入系列浓度的 Cri和 HDC NPs处理细胞,其中 C_{cri}=1、 2、4、8、16 μmol·L⁻¹,将处理后的细胞继续培养48 h。 对照组加入等体积完全培养基继续培养。每孔加 入 10 μL MTT 溶液(5 mg·mL⁻¹),轻轻混勾后放回培 养箱孵育4 h。小心吸弃孔内培养液,每孔加入 150 μL DMSO,室温避光振荡 15 min。使用多功能酶标 仪在 490 nm 波长下检测各孔的 OD 值,计算细胞存 活率。细胞存活率计算公式:

细胞存活率(%)=
$$\frac{OD_{gsb} - OD_{gch}}{OD_{pds} - OD_{gch}} \times 100\%$$

3 结果

3.1 FTIR分析

HA具有多个-OH,HA、HD及HDC在3419 cm⁻¹ 附近均观察到O-H伸缩振动峰,表明分子中仍存在 未反应的羟基。HA在1733 cm⁻¹处显示典型的C=O 伸缩振动峰,而HD中该峰消失,证实HA的羟基与 DTPA通过酯化反应成功偶联。HDC在1376 cm⁻¹ 处出现新的吸收峰,归属为酰胺键(C-N)的伸缩振 动,且因共轭效应向低波数方向移动。以上结果表明,Cri通过酰胺化反应成功接枝至HD分子上, HDC成功合成(图2)。

3.2 ¹H-NMR分析

HDC 在 δ H 4.44 ppm 和 δ H 4.35 ppm 出现了 HA 的 1 号位氢和 1′号位氢,在 δ H 3~4 ppm 之间出现了 HA 单体糖环上的 2~6 号位质子以及 2′~5′位质子信 号,在 δ H 1.91 ppm 处出现了 HA 单体上的 7 号位甲 基氢,这表明 HDC 完整保留了 HA 的主体结构。而 HDC 在 δ H 6.5~8 ppm 出现了接枝物上的 6个芳环氢 信号,即 i-H、g-H、h-H、j-H、m-H 和 n-H;在 δ H 6.09 ppm 处出现了一处 q峰,符合接枝物上的 k-H 特征;在 δ H 3.13 ppm 处出现了接枝物上的 a-H 和 b-H信号;在 δ H 1.74 ppm 出现了接枝物上的 o-H信 号。新特征峰的出现证实接枝物已通过共价键成 功引入HA 骨架,HDC制备成功(图 3)。









3.3 纳米粒子的表征

采用 DLS 系统测定以不同质量比(HD:Cri)制备的 HDC NPs 的理化参数。当投料比为1:1时,纳米粒子的平均水合粒径较优,离子表面带负电荷,可有效防止纳米粒子聚集,使纳米粒子在血液中具有良好的稳定性;当 PDI<0.3,可认为纳米粒子具有

优良分散指数(图4、表1)。通过TEM对最优比例 (HD:Cri=1:1)的纳米粒子进行形貌表征(图5),纳 米粒子呈现规整的近球形形貌,粒径分布均匀,实 测尺寸略小于DLS测得的数据。经分析,这可能归 因于DLS测定的是水合状态下的流体动力学直径, 而TEM测定的是干燥状态下的实际颗粒尺寸。



注:(A)投料比(HD:Cri)=1:1 HDC 粒径分布图;(B)投料比(HD:Cri)=1:2 HDC 粒径分布图;(C)投料比(HD:Cri)=2:1 HDC 粒径分布图; (D)投料比(HD:Cri)=1:1 HDC 电位分布图;(E)投料比(HD:Cri)=1:2 HDC 电位分布图;(F)投料比(HD:Cri)=2:1 HDC 电位分布图。

Note: 1:1 HDC particle size distribution (A) and potential distribution (D); 1:2 HDC particle size distribution (B) and potential distribution (E); 2:1 HDC particle size distribution (C) and potential distribution (F).

图4 不同投料比HDC的粒径和电位分布图



表1	不同投料比(HD:Cri)制备的HDC粒径、Zeta电位和
	PDI的具体数值

 Tab. 1
 Specific values of HDC particle size, zeta potential and

 PDI prepared in different ratios

投料比(HD:Cri)	粒径/nm	Zeta 电位/mV	PDI
1:1	215.97±10.12	-17.23±0.98	0.197 ± 0.048
1:2	331.20±6.88	-16.97±3.24	0.271±0.032
2:1	342.83±20.46	-17.44±1.76	0.240 ± 0.075

3.4 Cri标准曲线的绘制及HDC的载药量和包封率计算

采用紫外分光光度法对 Cri标准溶液进行全波 长扫描(200~400 nm),结果显示其在 279 nm 处具有 最大吸收峰。对比分析 HD NPs 和 HDC NPs 的紫外 吸收光谱,证实二者最大吸收峰与 Cri特征吸收峰无 重叠,表明在 279 nm 处测定具有特异性。在 279 nm 检测波长下,测定系列浓度 Cri标准溶液(10、20、 30、40、50 µg·mL⁻¹)的吸光度值。经线性回归分析



- 图5 不同比例尺下投料比(HD:Cri)为1:1的HDC NPs透射 电镜图
- Fig. 5 Transmission electron microscopy of HDC NPs with 1: 1 mass ratio at different scales

得标准曲线方程:y=0.034 3x+0.009 7(R²=0.999 1), 显示浓度与吸光度在测定范围内呈现良好的线性 关系(图 6)。基于标准曲线计算得出:Cri载药量为 (3.55±0.48)%,包封率为(42.61±3.96)%。

3.5 HDC NPs 稳定性测试

为评估HDC NPs的稳定性,将其置于室温下储存7d,并每日监测其粒径、Zeta电位及PDI。结果表明,在观察期内,HDC NPs的粒径、Zeta电位及PDI

均未发生显著变化(P>0.05),表明该纳米颗粒在短期内具有良好的物理稳定性(图7)。



3.6 体外药物释放试验

采用不同pH值的PBS缓冲溶液(pH 7.4和5.0) 模拟生理及肿瘤微环境,考察HDC NPs的体外药物 释放特性。Free Cri在两种pH条件下均于24h内接 近完全释放,而HDC NPs组表现出显著的缓释特 性。在pH 7.4的中性环境中,HDC NPs负载的Cri释 放速率较慢,72h累计释放率为(45.88±2.73)%;而 在 pH 5.0的酸性条件下,释放速率显著提高(P< 0.05),72h累计释放率达(73.28±1.88)%(图8)。这 一结果表明,HDC NPs不仅能够实现药物的缓释, 还能响应肿瘤微环境的酸性条件,促进药物的靶向 释放。

3.7 细胞摄取实验

采用倒置荧光显微镜对 A549 细胞摄取 Free FITC 和 FITC 标记 HDC NPs 的效率进行系统观察与 分析。FITC荧光信号(绿色)定位于胞质区域,DAPI 染色(蓝色)清晰标记细胞核。荧光定量分析表明, 平均荧光强度与孵育时间呈显著正相关,两种形式 的 FITC 摄取均呈现时间依赖性增加趋势;经12h孵 育后,HDC NPs负载组细胞摄取率(28.12±0.66)%, 较 Free FITC 组的(17.70±0.25)%提升约 1.6 倍(图9)。



图 8 不同条件下 Free Cri 和 HDC NPs 中 Cri 的释放情况 Fig. 8 Cri release from Free Cri and HDC NPs under different

conditions



注:(A)用 Free FITC 处理的 A549 细胞;(B)用含 FITC HDC NPs 处理的 A549 细胞;(C)两组细胞摄取率统计分析图(***P<0.001, ****P<0.000 1)。

Note: (A) A549 cells treated with Free FITC; (B) A549 cells treated with FITC HDC NPs; (C) Statistical analysis of cell uptake rates in the two groups. (***P<0.001, ****P<0.000 1).

图 9 分别用 Free FITC 和含 FITC HDC NPs 培养 2、6、12 h后 A549 细胞的细胞摄取研究

Fig. 9 Cell uptake study of A549 cells after incubation with Free FITC and HDC NPs containing Fic for 2, 6, and 12 hours

3.8 细胞活力检测

通过 MTT 法系统评估 Free Cri 和 HDC NPs 对 A549 细胞的体外细胞毒性作用。在低浓度范围(<4 μ mol·L⁻¹)内, Free Cri 与 HDC NPs 均未表现出显 著细胞毒性(*P*>0.05),提示药物需达到临界浓度才能发挥细胞杀伤作用。当浓度升至4 μ mol·L⁻¹时,

两组均开始显现细胞生长抑制作用,其中HDC NPs 组抑制效果显著优于 Free Cri组(P<0.05)。在16 μmol·L⁻¹高浓度条件下,HDC NPs组细胞存活率接 近0%,而 Free Cri组仍保持约20%的细胞存活率 (P<0.01),表明HDC NPs可显著增强Cri的体外抗 肿瘤活性(图10)。



图 10 不同浓度 HDC NPs 与 Free Cri 处理 A549 细胞 48 h 的 细胞活力研究(****P<0.0001)

Fig. 10 Cell viability study of A549 cells treated with different concentrations of HDC NPs and Free Cri for 48 h (****P<0.0001)

4 讨论

NSCLC 是肺癌最主要的病理学亚型,与SCLC 相比,肿瘤细胞增殖和转移速率相对缓慢,但由于早 期症状隐匿,约75%的患者在确诊时已进展至中晚 期,导致临床预后极差,病死率居高不下^[20]。Cri作 为首个获批的ALK和c-MET口服抑制剂,是具有里 程碑意义的小分子靶向药物^[21]。然而,该药物在临 床应用过程中常引起血细胞减少、转氨酶升高及呼 吸困难等不良反应,这在一定程度上降低了其临床 使用效果和患者的获益程度^[21]。此外,Cri水溶性差、 血浆清除率高及首过效应显著,导致其生物利用度 仅为32%~66%^[24]。因此,本研究旨在通过剂型改良 优化Cri的药代动力学性能,并减轻其不良反应,从 而为NSCLC的靶向治疗提供更优的治疗选择。

近年来,纳米技术在药物递送领域的应用取得 了突破性进展。与传统制剂相比,纳米药物递送系 统凭借其独特的物理化学特性(粒径、可调控的表 面电荷及多样的形态结构),可显著改善药代动力 学和药效学性能,从而提高疗效,展现出广阔的应 用前景^[22]。许多纳米药物,如盐酸阿霉素脂质体和 白蛋白结合型紫杉醇,已成功从实验室进入临床应 用,最终为患者带来了生存获益^[23]。

为解决Cri水溶性差这一关键药学问题,本研

究创新性地采用HA与Cri进行分子偶联,成功构建 了具有自组装特性的纳米递送系统(HDC NPs)。该 系统可在水性介质中自发形成稳定纳米胶体,显著 提高了Cri的水溶性。此外,HDC NPs在溶液中呈 现出规整的球形结构,其表面带有负电荷。这种结 构特点不仅保证了纳米粒子在水相体系中的良好 分散性,还显著减少了血浆蛋白在其表面的吸附, 故HDC NPs在体内的血浆清除率得到有效降低。

纳米药物递送系统的另一关键优势在于其优 异的靶向性能。通过表面修饰特异性配体,纳米颗 粒可实现基于配体-受体相互作用的主动靶向;同 时,借助EPR效应的被动靶向机制,可进一步提高 药物在肿瘤组织的选择性蓄积。这种双重靶向策 略不仅能优化药物在体内的分布,显著提升肿瘤部 位的药物浓度,还可减少非靶组织的药物暴露,从 而降低系统性毒性[22]。研究表明,粒径在200~300 nm范围内的纳米颗粒最有利于EPR效应介导的肿 瘤富集^[25]。基于此,本研究通过精确调控HA与Cri 的投料比,将所构建的HDC NPs 粒径控制在 (215.97±10.12) nm,以最大化其肿瘤靶向效率。体 外释放实验证实,HDC NPs在生理条件下(pH 7.4) 呈现缓释特性,而在肿瘤微环境条件下(pH 5.0)释 放速率显著提升约60%。此外,HA修饰赋予HDC NPs独特的主动靶向性和优异的生物相容性。作为 天然阴离子多糖,HA可与肿瘤细胞表面过表达的 CD44受体特异性结合,介导受体依赖性内吞^[26]。 本研究发现,HA修饰使HDC NPs在A549细胞中的 摄取效率较游离药物提升50%,这一现象与CD44 受体介导的主动靶向作用密切相关。HA作为高度 亲水的阴离子多糖,其表面修饰赋予纳米颗粒双重 功能特性:一方面能够赋予纳米粒子负电荷,另一 方面可增加其水化层厚度。这种修饰可使纳米粒 子在体内实现长循环,同时减少其与巨噬细胞的非 特异性相互作用,进而降低纳米粒子在肝脏和脾脏 的积累。此外,HA修饰还可影响肝脏单核吞噬细 胞系统(mononuclear phagocyte system, MPS)对纳米 粒子的识别与清除过程,从而在减轻Cri 肝脏毒性 等不良反应方面表现出显著的潜力^[26]。

5 结论

本研究成功制备了一种 HA 与 Cri 偶联的新型 纳米药物递送系统(HDC NPs)。通过优化配方投料 比,该系统表现出均匀的粒径分布、规则的球形形 态及出色的稳定性和分散性。在体外细胞实验中, HDC NPs在A549细胞模型中展现出良好的抗肿瘤 效果,为NSCLC靶向治疗提供了一种新的策略和潜 在的应用前景。

参考文献

- JENKINS R, WALKER J, ROY U B. 2022 cancer statistics: Focus on lung cancer [J]. Future Oncol, 2024: 1–11. DOI: 10.2217/fon-2022-1214.
- [2] LI Y T, YAN B S, HE S M. Advances and challenges in the treatment of lung cancer [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 169: 115891. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.115891.
- [3] MUSA S, AMARA N, SELAWI A, et al. Overcoming chemoresistance in cancer: the promise of crizotinib [J]. Cancers (Basel), 2024, 16(13): 2479. DOI: 10.3390/cancers16132479.
- [4] SOLOMON B J, LIU G, FELIP E, et al. Lorlatinib versus crizotinib in patients with advanced ALK-positive non-small cell lung cancer: 5-year outcomes from the phase III CROWN study [J]. J Clin Oncol, 2024, 42(29): 3400-3409. DOI: 10.1200/ JCO.24.00581.
- [5] HU L M, XIE Y J, ZHAO H Y. Regarding the prognostic factors in patients with ALK-positive non-small cell lung cancer treated with crizotinib [J]. Pulmonology, 2024, 30(4): 406–407. DOI: 10.1016/j.pulmoe.2024.02.007.
- [6] OU X J, LIU C L, SONG L X, et al. Salts of crizotinib with dicarboxylic acids: structural characteristic, stability analysis, and solubility performance [J]. Cryst Growth Des, 2024, 24(8): 3289–3298. DOI: 10.1021/acs.cgd.4c00020.
- [7] ZHONG T, LIU X R, LI H M, et al. Co-delivery of sorafenib and crizotinib encapsulated with polymeric nanoparticles for the treatment of *in vivo* lung cancer animal model [J]. Drug Deliv, 2021, 28(1): 2108–2118. DOI: 10.1080/10717544.2021.1979129.
- [8] WANG Y Q, LI S M, WANG X H, et al. Smart transformable nanomedicines for cancer therapy [J]. Biomaterials, 2021, 271: 120737. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2021.120737.
- [9] YU H Q, WU M, CHEN S Y, et al. Biomimetic nanoparticles for tumor immunotherapy [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2022, 10: 989881. DOI: 10.3389/fbioe.2022.989881.
- [10] ELMEHRATH S, NGUYEN H L, KARAM S M, et al. BioMOFbased anti-cancer drug delivery systems [J]. Nanomaterials (Basel), 2023, 13(5): 953. DOI: 10.3390/nano13050953.
- [11] XU H X, NIU M K, YUAN X, et al. CD44 as a tumor biomarker and therapeutic target [J]. Exp Hematol Oncol, 2020, 9(1): 36. DOI: 10.1186/s40164-020-00192-0.
- [12] AMORIM S, REIS C A, REIS R L, et al. Extracellular matrix mimics using hyaluronan-based biomaterials [J]. Trends Biotechnol, 2021, 39(1): 90–104. DOI: 10.1016/j. tibtech.2020.06.003.
- [13] DONG C H, WANG Y, ZHU W D, et al. Polycationic HA/CpG nanoparticles induce cross-protective influenza immunity in mice [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2022, 14(5): 6331-6342. DOI: 10.1021/acsami.1c19192.
- [14] ZHANG R S, ZHAO X H, JIA A, et al. Hyaluronic acid-based prodrug nanomedicines for enhanced tumor targeting and therapy: a review [J]. Int J Biol Macromol, 2023, 249: 125993.

DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.125993.

- [15] KAROUSOU E, PARNIGONI A, MORETTO P, et al. Hyaluronan in the cancer cells microenvironment [J]. Cancers (Basel), 2023, 15(3): 798. DOI: 10.3390/cancers15030798.
- [16] HAROON H B, HUNTER A C, FARHANGRAZI Z S, et al. A brief history of long circulating nanoparticles [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2022, 188: 114396. DOI: 10.1016/j. addr.2022.114396.
- [17] TAN B J, ZHAO C, WANG J, et al. Rational design of pHactivated upconversion luminescent nanoprobes for bioimaging of tumor acidic microenvironment and the enhancement of photothermal therapy [J]. Acta Biomater, 2023, 155: 554–563. DOI: 10.1016/j.actbio.2022.08.078.
- [18] WANG Y J, DENG T T, LIU X, et al. Smart nanoplatforms responding to the tumor microenvironment for precise drug delivery in cancer therapy [J]. Int J Nanomedicine, 2024, 19: 6253-6277. DOI: 10.2147/IJN.8459710.
- [19] CHAUDHRY G E S, AKIM A, NAVEED ZAFAR M, et al. Understanding hyaluronan receptor (CD44) interaction, HA–CD44 activated potential targets in cancer therapeutics [J]. Adv Pharm Bull, 2021, 11(3): 426–438. DOI: 10.34172/apb.2021.050.
- [20] YADLAPALLI R, VALMIKI E K A, OROSZI T. Non-small cell lung cancer: treatment, diagnosis, and life after treatment [J]. J Cancer Ther, 2022, 13(7): 450–463. DOI: 10.4236/jct.2022.137040.
- [21] NOGAMI N, NAKAMURA A, SHIRAIWA N, et al. Effectiveness of crizotinib in patients with *ROS1*-positive non-smallcell lung cancer: real-world evidence in Japan [J]. Future Oncol, 2023, 19(37): 2453–2463. DOI: 10.2217/fon-2023-0109.
- [22] BUBIĆ-PAJIĆ N, GATARIĆ B, ČIVČIJA J, et al. Nanopharmaceuticals: Characteristics of importance for pharmaceutical practice [J]. Arhiv Za Farmaciju, 2017, 67(6): 265–289. DOI: 10.5937/arhfarm1704265b.
- [23] QADIR M I. Review: Nanopreparations for better drug delivery[J]. Pak J Pharm Sci, 2017, 30(6): 2301–2309.
- [24] CAMIDGE D R, BANG Y J, KWAK E L, et al. Activity and safety of crizotinib in patients with ALK-positive non-smallcell lung cancer: updated results from a phase 1 study [J]. Lancet Oncol, 2012, 13(10): 1011-1019. DOI: 10.1016/ s1470-2045(12)70344-3.
- [25] KIM J, CHO H, LIM D K, et al. Perspectives for improving the tumor targeting of nanomedicine via the EPR effect in clinical tumors [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(12): 10082. DOI: 10.3390/ ijms241210082.
- [26] KESHARWANI P, CHADAR R, SHEIKH A, et al. CD44-targeted nanocarrier for cancer therapy [J]. Front Pharmacol, 2022, 12: 800481. DOI: 10.3389/fphar.2021.800481.

校稿:刘颖 李征

本文引用格式: 刘泓池, 罗迁, 刘熠, 等. 一种新型克唑替尼纳米药物制 剂的制备及其体外抗非小细胞肺癌研究[J]. 肿瘤药学, 2025, 15(2): 178-186. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2025.02.05.

Cite this article as: LIU Hongchi, LUO Qian, LIU Yi, et al. Design and development of a novel crizotinib nanoformulation: in vitro investigation of its antitumor efficacy against non-small cell lung cancer[J]. Anti-tumor Pharmacy, 2025, 15(2): 178–186. DOI: 10.3969/j. issn. 2095–1264.2025.02.05.