

联合装载紫杉醇和依他硝唑的靶向纳米粒对乏氧肿瘤细胞的放射增敏作用研究

金成
(西电集团医院普通外科,陕西 西安 710077)

【摘要】目的: 本研究为解决乏氧肿瘤细胞的放射抵抗问题设计了一种 VEGF 单抗修饰的联合装载紫杉醇和依他硝唑的靶向纳米递药系统。**方法:** 采用单乳溶媒挥发法制备聚乳酸-羟基乙酸共聚物联合装载紫杉醇和依他硝唑的纳米粒,碳化二亚胺/羟基琥珀酰亚胺交联法制备 VEGF 单抗修饰的纳米粒。高效液相色谱法分析载药纳米粒的包封率、载药率和模拟体外释药,扫描电镜研究纳米粒的形态,荧光显微镜观察人乳腺癌 MCF-7 细胞和宫颈癌 HeLa 细胞吞噬摄取纳米粒,细胞存活分析检测载药纳米粒对肿瘤细胞克隆形成能力的影响。**结果:** 靶向纳米粒呈球形,粒径平均约 120 nm,紫杉醇和依他硝唑的载药率分别为 4.66% 和 1.94%。体外释放实验展示双相释药特征,紫杉醇在 5 d 内缓释 30%,依他硝唑在 3 h 内突释 50%,24 h 达 90%。VEGF 单抗修饰显著增强 MCF-7 和 HeLa 细胞对纳米粒的摄取效率,联合 10 Gy 剂量照射靶向纳米粒使乏氧肿瘤细胞克隆形成率较非靶向组降低。**结论:** 本研究中的靶向纳米递药系统通过乏氧靶向和时空差异释药双重机制协同增强放疗作用,为克服肿瘤放射抵抗提供了新思路。

【关键词】 紫杉醇;依他硝唑;纳米粒;VEGF 单抗;放射增敏

【中图分类号】 R730.5 **【文献标志码】** A

The radiosensitizing effect of targeted nanoparticles loaded with paclitaxel and etanidazole on hypoxic tumor cells

JIN Cheng
(Department of General Surgery, XD Group Hospital, Xi'an 710077, Shaanxi, China)

【Abstract】Objective: To design a VEGF monoclonal antibody (mAb)-modified nanoparticles co-loaded with paclitaxel (PTX) and etanidazole (ETA) for radioresistance in hypoxic tumor cells. **Methods:** Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles co-loaded PTX and ETA were prepared using a single emulsion-solvent evaporation method. VEGF monoclonal antibodies were conjugated to the nanoparticles via carbodiimide/N-hydroxysuccinimide (EDC/NHS) coupling. High-performance liquid chromatography (HPLC) was employed to analyze drug encapsulation efficiency, loading capacity, and drug release simulated in vitro. The morphology of nanoparticles was observed by scanning electron microscopy (SEM). Cellular uptake of nanoparticles by human breast cancer MCF-7 cells and cervical cancer HeLa cells was evaluated using fluorescence microscopy. The effect of drug loaded nanoparticles on the clonal formation ability of tumor cells were analysed and detected by cell survival. **Results:** The targeted nanoparticles exhibited a spherical morphology with an average particle size of approximately 120 nm. The drug loading capacities for PTX and ETA were 4.66% and 1.94%, respectively. In vitro release profiles demonstrated biphasic characteristics; PTX showed sustained release (30% over 5 days), while ETA exhibited rapid release (50% within 3 h and 90% within 24 h). VEGF antibody modification significantly enhanced nanoparticle uptake by both MCF-7 and HeLa cells. Combined with 10 Gy radiation, the targeted nanoparticles significantly reduced the colony formation rate of hypoxic tumor cells compared to non-targeted counterparts. **Conclusion:** The developed nano-system synergistically enhanced radiotherapeutic efficacy through dual mechanisms of hypoxia targeting and spatiotemporally differential drug release to provide a novel strategy to overcome tumor radioresistance.

【Key words】 Paclitaxel; Etanidazole; Nanoparticle; VEGF mAb; Radiosensitization

肿瘤乏氧是制约放疗疗效的关键问题之一。许多研究^[1-2]表明,在实体瘤中有高达 50%~60% 的氧分压低于 5 mmHg 的乏氧区域,其中的乏氧细胞对电离辐射的抗性较常氧细胞增高 2~3 倍,这是肿

瘤复发和转移的重要原因之一。放射增敏剂可以通过模拟氧效应或调控细胞周期来增强肿瘤细胞的放疗敏感性,但传统放射增敏药物具有一定局限,比如紫杉醇(Paclitaxel,PTX)作为微管稳定剂可诱导肿瘤细胞出现G2/M期阻滞而发挥放射增敏效果,然而紫杉醇的强疏水性导致临床剂型使用要依靠辅料聚氧乙烯蓖麻油,其容易引起过敏反应^[3-4];硝基咪唑类代表药物依他硝唑(Etanidazole,ETA)通过耗竭肿瘤细胞的谷胱甘肽发挥治疗作用,能够选择性的针对乏氧细胞增敏,但是其半衰期较短,不能长时间维持有效治疗浓度^[5-6]。目前而言,放射增敏剂的联合用药是其提高疗效,降低毒性的可行且有效的途径^[7-10]。

纳米生物技术近年已成为国际生物技术领域前沿和热点,在医药卫生领域,特别是肿瘤治疗方面有着广泛的应用前景,其中的纳米药物是药物研发领域中一个很有活力的新方向^[11-14]。聚乳酸-羟基乙酸共聚物[Poly(D,L-lactide-co-glycolide),PLGA]为载体材料的纳米粒因其可生物降解、可控制释药,表面易配基修饰等特性被广泛应用于药物递送系统^[15-17]。另有研究^[18]表明,纳米载体可依靠增强药物溶解性、延长药物血液循环时间、靶向传输等机制来增效减毒。目前,针对肿瘤微环境的主动靶向策略备受重视,其中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)作为乏氧诱导因子HIF-1的关键下游靶点,在肿瘤血管异常生成中发挥核心作用^[19]。利用VEGF单抗修饰载药纳米粒,既可实现靶向病灶,又能阻断VEGF信号通路,有望抑制“乏氧-血管增生-放射抵抗”的恶性循环^[20-22]。

现有研究多聚焦于单一药物递送或被动靶向策略,对多机制协同的放射增敏治疗探索明显不足。本研究构建VEGF单抗修饰的共载PTX与ETA的PLGA纳米粒,通过时空差异性释药,ETA快速释放耗竭GSH,PTX缓释维持细胞周期阻滞,更联合主动靶向的双重协同机制来增强放射增敏效果。

1 材料和方法

1.1 细胞系

人乳腺癌MCF-7细胞系和宫颈癌HeLa细胞系被培养于美国Gibco公司DMEM培养液,其内含链霉素50 μg/mL,青霉素100 U/mL和10%热灭活胎牛血清,在参数为37℃、5%CO₂及饱和湿度培养箱培养。细胞每3~5 d被传代一次,对数生长期细胞被收集用于研究。

1.2 主要试剂

紫杉醇(纯度为99.7%)购自北京华联博科技术有限公司,VEGF单抗、PLGA(L/G=50/50,分子量=25 000)、聚乙烯醇(Polyvinyl Alcohol,PVA,分子量=30 000~70 000)、乙腈、碳化二亚胺(Carbodiimide hydrochloride,EDC)、羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide,NHS)、碘化丙啶(Propidium iodide,PI)、联二苯-己三烯(1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene,DPH)购自美国Sigma公司,二氯甲烷被购于国药试剂公司。

1.3 联合装载紫杉醇和依他硝唑纳米粒制备

6 mg依他硝唑被溶于0.2 mL水中,将此溶液倒入含有5 mg紫杉醇和0.1 g PLGA二氯甲烷4 mL中并给予磁力搅拌得到初次乳化液,再将其加入到20 mL的1% PVA水溶液中,给予剧烈搅拌并超声乳化3 min形成的悬浊液,此后给予悬浊液持续磁力搅拌6 h,彻底挥发除去二氯甲烷,给予悬浊液3 000 r/min离心弃上清,再用蒸馏水洗涤沉淀3遍,冷冻干燥沉淀获得纳米粒干粉,干粉被4℃保存。

1.4 VEGF单抗修饰的联合装载紫杉醇和依他硝唑纳米粒制备

联合装载药物的纳米粒被分散于pH 6.3的磷酸二氢钠溶液中,获得浓度为5 mg/mL的悬浊液。取1 mL紫杉醇纳米粒悬浊液,其中加入10 μL的50 mg/mL EDC和10 μL的50 mg/mL NHS,在室温条件持续搅拌20 min来活化PLGA的羧基。VEGF单抗被溶于pH 7.0的HEPES溶液,其浓度为1 μg/μL,与等体积上述悬浊液混合发生酯化反应,即VEGF单抗的氨基通过酰胺键与纳米粒PLGA的羧基端共价结合,生成靶向纳米粒。将最终获得的悬浊液以30 000 r/min、低温离心5 min,收集沉淀,去除未结合的抗体。沉淀被蒸馏水洗涤3次并冷冻干燥,从而获得靶向纳米粒的干粉,干粉被4℃保存。纳米粒制备过程中加入10 mg DPH(溶质质量/溶液体积为0.25%)制备荧光纳米粒,其余方法同前。

1.5 包封率和载药率测定

靶向纳米粒被溶于1 mL二氯甲烷,将其加到3 mL乙腈:水=50:50混合溶液中萃取,导入氮气挥发二氯甲烷至溶液完全清亮,给予2 000 r/min离心,上清被保存。美国Agilent公司高效液相色谱仪分析上清中紫杉醇含量,流动相采用乙腈:水=50:50,流速1 mL/min,紫外探测波长为227 nm,紫杉醇标准曲线为线性,该检测在50~100 000 ng/mL范围内相关系数 $R^2=0.99$ 。

靶向纳米粒被溶于 1 mL 二氯甲烷, 将其加到 3 mL 磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffered solution, PBS, pH 7.4) 萃取, 导入氮气挥发二氯甲烷至溶液完全清亮, 给予 2 000 r/min 离心, 上清被保存。高效液相色谱分析上清中依他硝唑的含量, 流动相采用乙腈: 水 = 5: 95, 流速 1 mL/min, 紫外探测波长为 324 nm, 依他硝唑标准曲线为线性, 该检测在 50 ~ 100 000 ng/mL 范围内相关系数 $R^2 = 0.97$ 。包封率和载药率公式计算如下:

包封率 = (载药纳米粒中药物的含量 / 所用药物总量) $\times 100\%$

载药率 = (载药纳米粒中药物的含量 / 纳米粒的总量) $\times 100\%$

1.6 模拟体外释药

靶向纳米粒被分散在 10 mL PBS 中, 形成混悬液, 将其放于 37 °C 的摇床上给予 120 r/min 震荡, 在预定不同时间点取出混悬液, 给予 2 000 r/min 离心, 上清被保存, 采用高效液相色谱分析上清中紫杉醇和依他硝唑的含量, 方法同前。所得沉淀被重悬于新鲜 PBS 10 mL 中, 给予继续震荡。

1.7 纳米粒的形态和粒径分析

1 mg 纳米粒被分散于 2 mL 水中, 将其滴于盖玻片上并烤干, 给予溅射喷金, 采用日本 JEOL 公司扫描电镜观察纳米粒的形态特征。

1.8 荧光显微镜观察细胞吞噬摄取纳米粒

MCF-7 和 HeLa 细胞以 1×10^6 /孔被接种于六孔细胞培养板, 此前在培养板内预先放置盖玻片, 细胞被培养 48 h 后贴壁生长于盖玻片, 此后将制备的荧光纳米粒被加入培养板来共孵育 24 h。此细胞爬片被 95% 酒精固定, 用 PI 衬染细胞核。采用紫外光激发, 荧光显微镜观察, 细胞核呈现为橙黄色, 荧光纳米粒呈现为蓝色。

1.9 细胞存活分析

MCF-7 和 HeLa 细胞以 500 个/孔被接种于六孔细胞培养板, 在乏氧培养箱被孵育 24 h, 此后分别加入单独及联合装载紫杉醇和依他硝唑的纳米粒, 终浓度为 1 mg/mL, 在乏氧培养箱中被孵育 24 h, 乏氧培养箱通入 95% 氮气和 5% 二氧化碳。孵育后细胞给予单次 ^{60}Co 照射共 53 s, 分别为 0、225.77、452.30、668.78、893.97、1126.86 cGy/min 剂量率, 0、2、4、6、8 和 10 Gy 吸收剂量。细胞在照射后常规培养条件下生长 10 ~ 14 d, 此后给予细胞姬姆萨染色, 细胞克隆数被记录, 在细胞数超过 50 的克隆标记为阳性, 通过未给药的照射组计算接种率 (Plating efficiency, PE), 细胞存活率 = 处理组细胞形成的克隆数 / (接种细胞数 $\times$ PE) $\times 100\%$, 最后

绘制剂量存活曲线。

1.10 统计学分析

采用 SPSS 21.0 统计软件对数据进行统计分析。计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 组间比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

制备 VEGF 单抗修饰的联合装载紫杉醇和依他硝唑纳米粒获得成功, 纳米粒呈现为光滑球形, 粒径分布在 100 ~ 300 nm (图 1), 在纳米粒中紫杉醇的包封率和载药率分别为 89.72% 和 4.66%, 依他硝唑的包封率和载药率分别为 22.58% 和 1.94%。两种药物的模拟体外释药曲线都呈现为包括爆发释放和缓慢释放的双相, 即紫杉醇在 5 d 内药物释放量约 30%, 1 d 内释放量约 15%; 依他硝唑在 3 h 内释放量约 50%, 1 d 内药物释放量超过 90%。荧光显微镜观察发现 MCF-7 和 HeLa 细胞能够吞噬摄取 VEGF 单抗修饰的纳米粒 (图 2)。照射后, VEGF 单抗修饰的联合装载紫杉醇和依他硝唑纳米粒给药的乏氧 MCF-7 和 HeLa 细胞的克隆形成能力较单纯联合装载纳米粒组降低 ($P < 0.05$, 图 3)。

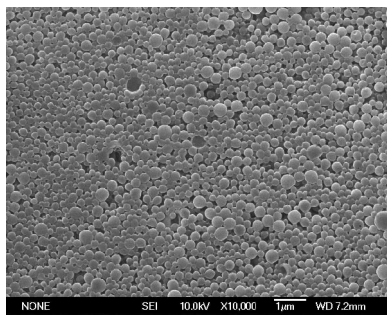


图 1 VEGF 单抗修饰的联合装载紫杉醇和依他硝唑纳米粒扫描电镜照片

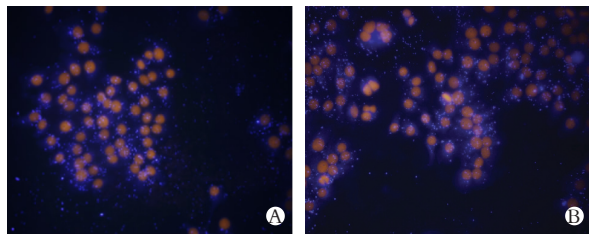
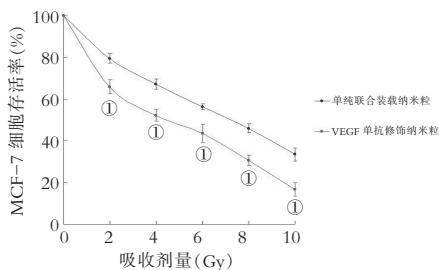


图 2 不同细胞对 VEGF 单抗修饰的联合装载紫杉醇和依他硝唑纳米粒吞噬摄取的荧光照片 ($\times 200$)

A. MCF-7 细胞; B. HeLa 细胞。



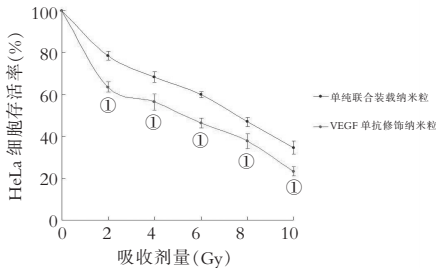


图3 在不同剂量照射下纳米粒对乏氧 MCF-7 和 HeLa 细胞存活能力的影响
① $P<0.05$,与单纯联合装载纳米粒比较。

3 讨论

本研究通过纳米生物材料技术成功构建了 VEGF 单抗修饰的联合装载 PTX 与 ETA 的双药靶向递送系统,并验证了其增强乏氧肿瘤细胞放射敏感性的效果。

首先,纳米载体的应用有效克服了两种药物的固有缺陷。PLGA 纳米粒的双相释药特性使依他硝唑在最初 3 h 快速释放约 50%,有利于迅速降低乏氧肿瘤细胞谷胱甘肽水平,而紫杉醇的 5 d 释放 30%的缓释特征,可维持 G2/M 期阻滞的持续效应。相较于传统剂型,纳米载体不仅提高了紫杉醇的溶解性,而且避免使用辅料聚氧乙烯蓖麻油引起的过敏反应,更通过延长依他硝唑的有效作用时间(传统剂型半衰期仅 5~8 h),实现时空差异化的药物释放模式。

其次,在本研究中双药协同机制得到较深入的探讨^[23]。依他硝唑通过耗竭谷胱甘肽直接增强 DNA 辐射损伤效率,而紫杉醇诱导的 G2/M 期阻滞使细胞处于辐射敏感时相延长。在乏氧条件下, HIF-1 α 介导的 VEGF 高表达能够促进肿瘤血管异常增生来加剧缺氧微环境发展,本研究将 VEGF 单抗导向纳米粒的抗血管生成与放射增敏双重策略进行整合,为打破“乏氧-血管增生-放射抵抗”的恶性循环提供现实的可能性。细胞实验结果证实靶向组的放射增敏效应显著优于单纯联合载药的非靶向组,提示抗体介导的主动靶向能提高病灶局部药物浓度。

本研究存在的问题是体外释药数据显示依他硝唑 24 h 释放量达 90%,这明显影响长期疗效,未来可通过调整 PLGA 分子量,例如改用 75:25 的乳酸-羟基乙酸比例,或添加壳聚糖外层构建核壳结构来延缓药物的释放^[24]。在本研究中,紫杉醇的封装率与此前文献报道的 PLGA 载药系统相当,但依他硝唑的封装率仍有较大的提升空间,可以通过优化乳化工艺来改善,例如应用微流控技术。

细胞摄取实验说明纳米粒可以通过内吞途径进入细胞。VEGF 单抗修饰纳米粒通过受体介导的胞吞明显增强内化效率,但具体内化通路需通过进一步的抑制剂实验来明确。值得注意的是,乏氧可能通过调节网格蛋白表达影响内吞的效率,这为后续研究提供了新方向。

在临床应用前景方面,该靶向递药系统可望实现三重治疗优势:(1)VEGF 单抗抑制肿瘤血管生成和介导纳米药物靶向输送;(2)依他硝唑增强放射敏感性;(3)紫杉醇发挥细胞毒性与放射增敏的协同作用。未来研究应开展荷瘤动物实验,并评估纳米粒的增强渗透和滞留效应与主动靶向的协同作用^[25-26]。

综上,本研究为克服乏氧肿瘤的放射抵抗提供了新型纳米药物解决方案,其临床转化需重点关注以下问题:(1)PLGA 降解产物的长期生物安全性;(2)双药释放动力学的精准调控;(3)纳米粒在复杂肿瘤微环境中的渗透能力和生物学行为^[27-31]。通过多学科交叉创新,此类多功能纳米策略有望为精准、高效放疗开拓新的方向。

参考文献

[1] Brown JM, Wilson WR. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment[J]. Nature Reviews Cancer, 2004, 4(6): 437-447.
[2] Li Y, Zhao L, Li XF. Hypoxia and the tumor microenvironment [J]. Technology in Cancer Research & Treatment, 2021, 20: 15330338211036304.
[3] Bernabeu E, Cagel M, Lagomarsino E, et al. Paclitaxel: what has been done and the challenges remain ahead[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2017, 526(1-2): 474-495.
[4] Linam J, Yang LX. Recent developments in radiosensitization [J]. Anticancer Research, 2015, 35(5): 2479-2485.
[5] Wardman P. Chemical radiosensitizers for use in radiotherapy [J]. Clinical Oncology, 2007, 19(6): 397-417.
[6] Yang Y, Jin C, Li H, et al. Improved radiosensitizing effect of the combination of etanidazole and paclitaxel for hepatocellular carcinoma in vivo[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2012, 3(2): 299-303.
[7] Meng X, Li X, Gao Y, et al. Nuclear receptors as novel regulators that modulate cancer radiosensitivity and normal tissue radiotoxicity[J]. Molecular Cancer, 2025, 24(1): 155.
[8] Wang H, Mu X, He H, et al. Cancer radiosensitizers[J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2018, 39(1): 24-48.
[9] Sharabi AB, Lim M, DeWeese TL, et al. Radiation and checkpoint blockade immunotherapy: radiosensitisation and potential mechanisms of synergy[J]. The Lancet Oncology, 2015, 16(13): e498-e509.
[10] Spalding AC, Lawrence TS. New and emerging radiosensitizers and radioprotectors [J]. Cancer Investigation, 2006, 24(4): 444-456.
[11] Kim BYS, Rutka JT, Chan WCW. Nanomedicine[J]. New Eng-

- land Journal of Medicine, 2010, 363(25): 2434—2443.
- [12] Ai Z, Liu B, Chen J, *et al.* Advances in nano drug delivery systems for enhanced efficacy of emodin in cancer therapy[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2025, 9: 100314.
- [13] Lai C, Li L, Luo B, *et al.* Current advances and prospects in carbon nanomaterials-based Drug deliver systems for cancer therapy[J]. Current Medicinal Chemistry, 2023, 30 (24): 2710—2733.
- [14] Nasirmoghadas P, Mousakhani A, Behzad F, *et al.* Nanoparticles in cancer immunotherapies; an innovative strategy[J]. Biotechnology Progress, 2021, 37(2): e3070.
- [15] Danhier F, Ansorena E, Silva JM, *et al.* PLGA-based nanoparticles; an overview of biomedical applications[J]. Journal of Controlled Release, 2012, 161(2): 505—522.
- [16] Rezvantlab S, Drude NI, Moraveji MK, *et al.* PLGA-based nanoparticles in cancer treatment[J]. Frontiers in Pharmacology, 2018, 9: 1260.
- [17] Guo X, Zuo X, Zhou Z, *et al.* PLGA-based micro/nanoparticles; an overview of their applications in respiratory diseases [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(5): 4333.
- [18] Kamaly N, Yameen B, Wu J, *et al.* Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles; mechanisms of controlling drug release[J]. Chemical Reviews, 2016, 116(4): 2602—2663.
- [19] Balamurugan K. HIF-1 at the crossroads of hypoxia, inflammation, and cancer[J]. International Journal of Cancer, 2016, 138 (5): 1058—1066.
- [20] Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in signaling and disease; beyond discovery and development [J]. Cell, 2019, 176 (6): 1248—1264.
- [21] Peng K, Bai Y, Zhu Q, *et al.* Targeting VEGF-neuropilin interactions; a promising antitumor strategy [J]. Drug Discovery Today, 2019, 24(2): 656—664.
- [22] Plastino F, Pesce NA, André H. microRNAs and the HIF/VEGF axis in ocular neovascular diseases[J]. Acta Ophthalmologica, 2021, 99(8): e1255—e1262.
- [23] Gupta A, Ciftci K. Formulation and characterization of paclitaxel, 5-FU and paclitaxel + 5-FU microspheres[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2004, 276(1—2): 93—106.
- [24] Li Y, Tian H, Zeng H, *et al.* Chitosan based surface modulation of core-shell nanoparticles for oral delivery of exenatide via balancing mucus penetration and cellular uptake[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2025, 672: 125319.
- [25] Yang M, Li J, Gu P, *et al.* The application of nanoparticles in cancer immunotherapy: Targeting tumor microenvironment [J]. Bioactive Materials, 2021, 6(7): 1973—1987.
- [26] Ikeda-Imafuku M, Wang LL, Rodrigues D, *et al.* Strategies to improve the EPR effect; a mechanistic perspective and clinical translation [J]. Journal of Controlled Release, 2022, 345: 512—536.
- [27] Huang YT, Huang HY, Cheng JL, *et al.* A regio- and stereoselective ring-opening polymerization approach to isotactic alternating Poly (lactic-co-glycolic acid) with stereo complexation [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2025, 64(9): e202422147.
- [28] Li S, Zheng W, Deng W, *et al.* Logic-based strategy for spatiotemporal release of dual extracellular vesicles in osteoarthritis treatment[J]. Advanced Science, 2024, 11(26): 2403227.
- [29] Qiao Y, Liu M, Zhang Y, *et al.* Gambogic acid-iron nanozymes as effective carriers for enhanced chemotherapy by inducing excessive autophagy and oxidative stress[J]. Journal of Nanobiotechnology, 2025, 23(1): 435.
- [30] Wang Z, Tang Y, Li Q. A self-assembling nanoplatform for pyroptosis and ferroptosis enhanced cancer photoimmunotherapy [J]. Light: Science & Applications, 2025, 14: 16.
- [31] Wu Y, He L, Zhao S, *et al.* Tumor microenvironment pH-responsive size-transformable peptide self-assembling nanocarriers for tumor-specific treatment[J]. Biomaterials Advances, 2025, 173: 214293.

(收稿日期: 2025—01—12

修回日期: 2026—02—25)