载雷公藤甲素靶向制剂的制备及质量、靶向性、细胞毒性评价Δ

尹茉莉[1*]，罗文彬[1]，徐婧哲[1]，唐泽波[2]，郭　妮[3]，劳友幸[1]，王会岩[1#]（1.吉林医药学院吉林省抗体工程科技协同创新中心，吉林 吉林　132013；2.吉林医药学院基础医学院，吉林 吉林　132013；3.西安交通大学第二附属医院生物诊疗中心，西安　710299）

中图分类号　R944；R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2025）12-1457-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2025.12.07

摘　要　目的　制备雷公藤甲素（TP）纳米粒子靶向制剂，并评价其质量、靶向性和细胞毒性作用。**方法**　使用乳化挥发法，以聚乳酸-羟基乙酸共聚物/聚乙二醇/叶酸（PLGA-PEG-FA）为载体，制备载TP靶向FA受体的聚合物纳米粒子（TP@PLGA-PEG-FA），观察其形态及分布，测定其粒径、Zeta电位、多分散性指数（PDI）、载药量、包封率，评价其稳定性、血液相容性、体外释药情况、RAW264.7细胞摄取情况（以荧光染料Cy3.5定位）和体外细胞毒性。**结果**　TP@PLGA-PEG-FA呈球形，分布均匀，粒径为（122.60±0.02）nm，Zeta电位为（－17.6±0.6）mV，PDI为0.26±0.02；TP的载药量和包封率分别为（7.78±0.05）%和（68.62±0.03）%；其在4 ℃水中放置14 d和在37 ℃、含有10%胎牛血清的DMEM培养基中放置12 h的粒径、PDI、Zeta电位均无明显变化。100、200、300、400 μg/mL TP@PLGA-PEG-FA的溶血率分别为0.77%、0.92%、1.34%、1.63%。TP@PLGA-PEG-FA在pH5.5的磷酸盐缓冲液中72 h时的累积释放量为（84.83±0.29）%，较pH7.4、6.5磷酸盐缓冲液中72 h时的累积释放量[分别为（42.37±0.35）%、（63.83±0.29）%]显著升高（$P<0.05$）。激活的RAW264.7细胞对Cy3.5@PLGA-PEG-FA的摄取明显多于其对Cy3.5@PLGA-PEG-FA+游离FA和Cy3.5@PLGA-PEG的摄取；当TP质量浓度≥15.63 ng/mL时，TP@PLGA-PEG-FA组激活细胞的存活率显著低于同质量浓度游离TP组（$P<0.05$）。**结论**　所制备的TP@PLGA-PEG-FA稳定性高、血液相容性好，对炎症细胞具有主动靶向性和细胞毒性。

关键词　雷公藤甲素；类风湿关节炎；细胞毒性；靶向制剂；纳米粒子

Preparation and evaluation of quality, targeting and cytotoxicity of triptolide-loaded targeting nanoparticles

YIN Moli[1], LUO Wenbin[1], XU Jingzhe[1], TANG Zebo[2], GUO Ni[3], LAO Youxing[1], WANG Huiyan[1]（1. Jilin Collaborative Innovation Center for Antibody Engineering, Jilin Medical University, Jilin Jilin 132013, China; 2. College of Basic Medicine, Jilin Medical University, Jilin Jilin 132013, China; 3. National-Local Joint Engineering Research Center of Biodiagnostics and Biotherapy, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710299, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To prepare nanoparticle-based targeting preparation loaded with triptolide (TP), and evaluate its quality, targeting ability and cytotoxic effects. **METHODS** Polymer nanoparticles carrying TP-targeted folic acid (FA) receptor (TP@PLGA-PEG-FA) were fabricated using poly (lactic-co-glycolic acid)/polyethylene glycol/FA (PLGA-PEG-FA) as the carrier by emulsion and volatilization technique. The morphology and distribution were observed, and their particle size, Zeta potential, polydispersity index (PDI), drug loading capacity and encapsulation efficiency were measured. Their stability, blood compatibility, *in vitro* drug release, uptake by RAW264.7 cells (localization with fluorescent dye Cy3.5), and *in vitro* cytotoxicity were evaluated. **RESULTS** TP@PLGA-PEG-FA exhibited spherical shape and uniform distribution, with particle size of (122.60±0.02) nm, Zeta potential of (−17.6±0.6) mV, and PDI of 0.26±0.02; drug loading capacity and encapsulation efficiency of TP were measured to be (7.78±0.05)% and (68.62±0.03)%, respectively. The hemolysis rates of 100, 200, 300, 400 μg/mL TP@PLGA-PEG-FA were 0.77%, 0.92%, 1.34% and 1.63%, respectively. There were no significant changes in particle size, PDI and Zeta potential when TP@PLGA-PEG-FA were placed in 4 ℃ water for 14 days and in DMEM culture medium containing 10% fetal bovine serum at 37 ℃ for 12 h. The cumulative release rate of TP@PLGA-PEG-FA was (84.83±0.29)% in phosphate buffer at pH5.5 for 72 h, which was significantly higher than the cumulative release rates in phosphate buffer solutions at pH7.4 and 6.5 for 72 h [(42.37±0.35)% and (63.83±0.29)%, respectively] ($P<0.05$). Activated RAW264.7 cells took up significantly more Cy3.5@PLGA-PEG-FA than they took up

Δ **基金项目**　吉林省科技发展计划项目（No. YDZJ20240203-0CXJD, No. YDZJ202101ZYTS095）；吉林省中医药科技项目（No. 2024161）；吉林省大学生创新创业训练计划项目（No.S202313706005, No.S202413706028）

＊ **第一作者**　实验师，博士。研究方向：药物新剂型。E-mail：80630963@qq.com

\# **通信作者**　教授，博士。研究方向：药物新剂型。E-mail：zswhy518@163.com

Cy3.5@PLGA-PEG-FA+free FA and Cy3.5@PLGA-PEG. When the mass concentration of TP was≥15.63 ng/mL, the survival rates of activated cells in the TP@PLGA-PEG-FA groups were significantly lower than those of the same mass concentration of free TP groups ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** The prepared TP@PLGA-PEG-FA has high stability, good blood compatibility, active targeting and cytotoxicity to inflammatory cells.

KEYWORDS triptolide; rheumatoid arthritis; cytotoxicity; targeting preparation; nanoparticles

类风湿关节炎（rheumatoid arthritis，RA）是一种全身性免疫病，可导致患者多处关节肿胀、受损，甚至造成关节畸形，致残率较高。据统计，我国RA的年发病率为0.34%～0.45%，患者人数超过500万[1]。RA的发病机制尚不明确，但与多种细胞有关，其中巨噬细胞在病程进展过程中具有关键作用[2]。在炎症关节中，浸润的单核细胞处于缺氧环境，进而激活巨噬细胞，而这些被激活的巨噬细胞会高表达叶酸受体（folate receptor，FR）、清道夫受体等多种受体[3]。FR与叶酸（folic acid，FA）具有很强的亲和力，能介导巨噬细胞大量摄取FA，从而诱发RA[4]。因此，FR可作为靶向治疗RA的潜在靶点。

雷公藤甲素（triptolide，TP）是从药用植物雷公藤中提取的环氧化二萜内酯化合物，具有抗炎症、抗类风湿、调节免疫、抑制血管增生及诱导细胞凋亡等作用，对RA具有一定的改善作用[5]。但TP存在水溶性差，肝、肾、生殖毒性较大，生物利用度低等不足，使得其临床应用严重受限[6]。可见，改进现有剂型有望成为实现TP减毒增效的重要策略。靶向聚合物纳米粒子能有效改善药物的溶解度、稳定性、生物利用度，并可延长药物在体内的循环时间，同时还能通过靶向治疗来减少药物的毒副作用[7]。聚乳酸-羟基乙酸共聚物[poly（lactic-co-glycolic acid），PLGA]是一种生物相容性良好的可降解高分子聚合物，因其没有毒性，常被作为药物载体以制备纳米制剂，进而用于癌症、免疫系统疾病及心脑血管疾病等治疗领域[8]。聚乙二醇（polyethylene glycol，PEG）是一种具有良好生物相容性的聚合物，可显著延长纳米粒子的血液循环时间，增加药物在病灶部位的富集，被广泛用于生物制药领域[9]。FA具有分子生物相容性好、稳定性高、易于合成、无免疫原性等优点，现已成为一种极具应用前景的靶向配体[8]。考虑到FA与FR特异性结合这一特点，用FA修饰载药纳米粒子可有助于提高药物的靶向性、减少药物的毒副作用[10]。基于此，本研究拟采用乳化挥发法制备载TP靶向FR的聚合物纳米粒子（简称“TP@PLGA-PEG-FA”），对其形态、粒径、电位进行表征，对其载药量及包封率进行测定，对其血液相容性和稳定性进行评价，并通过体外实验对该制剂的靶向性及对RA的改善效果进行探讨，以期为TP的深入开发和RA的临床治疗提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括Galaxy-170s型CO_2培养箱和5424R型离心机（德国Eppendorf公司）、Cary-3500型紫外分光光度计（美国Agilent公司）、Zetasizer Nano型激光粒度分析仪（英国Malvern公司）、TS2型倒置光学显微镜和FV3000型激光共聚焦显微镜（日本Olympus公司）、TM3000型扫描电子显微镜（日本Hitachi公司）、168-1130型酶标仪（美国Bio-Rad公司）、CP214型电子天平（美国Ohaus公司）等。

1.2 主要药品与试剂

TP原料药（批号A10261，纯度96.8%）和对照品（批号B20709，纯度98%）均购自上海源叶生物科技有限公司；PLGA-PEG（批号R-PL1025-10K，聚乳酸与羟基乙酸的摩尔比为85∶15）和PLGA-PEG-FA（批号R-PL1045-10K，聚乳酸与羟基乙酸的摩尔比为85∶15）、荧光染料Cy3.5（批号RM0212406）均购自西安瑞禧生物科技有限公司；聚乙烯醇[poly（vinyl alcohol），PVA；批号P434371]、脂多糖（批号L381866）均购自上海阿拉丁生化试剂股份有限公司；RPMI-1640培养基（批号G4534）和DMEM培养基（批号G4511）均购自武汉赛维尔生物科技有限公司；4′，6-二脒基-2-苯基吲哚（DAPI）染液（批号28718-90-3）购自美国Sigma公司；CCK-8细胞增殖及毒性检测试剂盒（批号CA1210）购自北京索莱宝科技有限公司；其余试剂均为分析纯或实验室常用规格，水为蒸馏水。

1.3 实验动物与细胞

健康SD大鼠，雌性，体重180～220 g，8周龄，购自北京维通利华实验动物技术有限公司，生产许可证号为SCXK（京）2021-0011。所有大鼠均饲养在温度18～26 ℃、相对湿度40%～70%、定期通风换气的环境中。本动物实验方案经吉林医药学院伦理委员会批准（编号2023-ZYY-005）。

小鼠单核巨噬细胞RAW264.7由吉林医药学院吉林省抗体工程科技协同创新中心提供。

2 方法

2.1 TP@PLGA-PEG-FA等纳米粒子的制备

采用乳化挥发法制备。取TP原料药1 mg，溶于甲醇1 mL中；称取PLGA-PEG-FA 10 mg，溶于二氯甲烷

10 mL中；将上述2种溶液混匀，乳化1 min，形成油相。将油相加入到3%PVA溶液5 mL中，得油包水乳液；乳化1 min后，加入2%异丙醇溶液20 mL，于室温下振荡3～5 h，使有机溶剂充分挥发，得TP@PLGA-PEG-FA乳液。上述乳液经15 000 r/min离心10 min，弃去上清液，沉淀用水重悬并重复洗涤3次，以去除未包封的TP；再用水重悬后，于4 ℃下保存，备用。

使用同样方法制备PLGA-PEG空白纳米粒子（不加TP，将PLGA-PEG-FA替换为PLGA-PEG）、PLGA-PEG-FA空白靶向纳米粒子（不加TP）、TP@PLGA-PEG（将PLGA-PEG-FA替换为PLGA-PEG）、Cy3.5@PLGA-PEG（将TP替换为Cy3.5，PLGA-PEG-FA替换为PLGA-PEG）、Cy3.5@PLGA-PEG-FA（将TP替换为Cy3.5）。

2.2 TP@PLGA-PEG-FA的表征

取“2.1”项下TP@PLGA-PEG-FA、PLGA-PEG-FA空白靶向纳米粒子适量，使用扫描电子显微镜观察其形态及分布。取“2.1”项下TP@PLGA-PEG-FA、TP@PLGA-PEG适量，使用激光粒度分析仪检测其粒径、Zeta电位及多分散性指数（polydispersity index，PDI），检测重复3次。

2.3 TP@PLGA-PEG-FA载药量和包封率的测定

精密称取TP对照品，用甲醇稀释，制成质量浓度分别为30、20、10、5、2.5 μg/mL的标准溶液。以甲醇为对照，使用紫外分光光度计于217 nm波长处检测上述TP标准溶液的吸光度值并记录其紫外光谱图。以吸光度值为纵坐标、对应TP标准溶液的质量浓度为横坐标绘制标准曲线，并进行方法学考察。

取“2.1”项下TP@PLGA-PEG-FA、PLGA-PEG-FA空白靶向纳米粒子各1 mL，分别用水10 mL稀释，以30 μg/mL的TP标准溶液为对照，使用紫外分光光度计于217 nm波长处检测样品溶液的吸光度值并记录其紫外光谱图，再根据前述所得回归方程计算纳米粒子中TP含量，根据下式计算TP@PLGA-PEG-FA的载药量和包封率：载药量（%）＝纳米粒子中TP含量/纳米粒子的总质量×100%；包封率（%）＝纳米粒子中TP含量/TP总投入量×100%。实验重复3次。

2.4 TP@PLGA-PEG-FA的体外释药实验

取“2.1”项下TP@PLGA-PEG-FA溶液3份，各1 mL（其中TP质量浓度相同），置于透析袋（截留分子量300 kDa）中，再分别浸入装有pH7.4、6.5、5.5磷酸盐缓冲液（pH参考文献[11]设置）50 mL的离心管中，将离心管置于37 ℃摇床中均匀振荡。分别于0、4、8、10、12、16、24、30、36、42、48、50、60、72 h时从离心管中取样5 mL，同时补加等pH等温等体积的磷酸盐缓冲液。使用紫外分光光度计于217 nm波长处检测各时间点取样溶液的吸光度值，代入“2.3”项下回归方程计算TP含量，计算TP的累积释放量并绘制释放曲线。计算公式为：累积释放量$=\frac{c_nV_0+\sum_{i=1}^{n-1}c_iV_i}{m}\times100\%$（式中，$c_n$为第$n$个时间点样品的质量浓度；$V_0$为溶出介质总体积；$c_i$为第$i$个时间点样品的质量浓度；$V_i$为取样体积；$m$为纳米粒子中TP含量）。实验重复3次。

2.5 TP@PLGA-PEG-FA的血液相容性考察

取经抗凝处理的健康大鼠外周血适量，加入生理盐水，以3 000 r/min离心10 min至上清液无色，收集红细胞并用生理盐水重悬；将TP不同质量浓度（400、300、200、100 μg/mL）的TP@PLGA-PEG-FA与等体积的红细胞悬液混匀，即得供试样品。另设阳性对照样品（以水混合红细胞悬液）和阴性对照样品（以生理盐水混合红细胞悬液）。所有样品于37 ℃下放置2 h后，以3 000 r/min离心10 min，取上清液，使用紫外分光光度计于541 nm波长处检测其吸光度值，再计算各样品的溶血率：溶血率（%）＝（待测样品的吸光度值－阴性对照样品的吸光度值）/（阳性对照样品的吸光度值－阴性对照样品的吸光度值）×100%。

2.6 TP@PLGA-PEG-FA的稳定性考察

取“2.1”项下TP@PLGA-PEG-FA适量，于4 ℃水中放置14 d，每隔2 d取样1次；另将TP@PLGA-PEG-FA置于含10%胎牛血清的DMEM培养基中，于37 ℃下放置12 h，每隔2 h取样1次。使用激光粒度分析仪检测其粒径、PDI、Zeta电位，以评价纳米粒子的稳定性。

2.7 RAW264.7细胞对纳米粒子的摄取情况考察

TP@PLGA-PEG-FA和TP@PLGA-PEG中没有发光成分，为考察纳米粒子表面耦联FA是否会提高纳米粒子的靶向性，本研究将纳米粒子中装载的TP替换为荧光染料Cy3.5，用以考察RAW264.7细胞对纳米粒子的摄取情况。取RAW264.7细胞，以1×10^5个/孔接种到24孔共聚焦培养板中，待完全贴壁后，将其分为激活细胞（以1 μg/mL的脂多糖刺激24 h）和未激活细胞，分别用含Cy3.5@PLGA-PEG、Cy3.5@PLGA-PEG-FA+游离FA、Cy3.5@PLGA-PEG-FA（Cy3.5质量浓度均为500 ng/mL）的RPMI-1640培养基孵育2 h（每组设置3个复孔）；收集细胞，用磷酸盐缓冲液洗涤3次；加入4%多聚甲醛溶液固定30～40 min，再用磷酸盐缓冲液洗涤3次；加入DAPI染液染色5 min，使用激光共聚焦显微镜观察细胞对纳米粒子的摄取情况（细胞核经DAPI染色后呈蓝色荧光，而Cy3.5@PLGA-PEG和Cy3.5@PLGA-PEG-FA呈红色荧光），并拍照记录。

2.8 TP@PLGA-PEG-FA的体外细胞毒性考察

取对数生长期的RAW264.7细胞，以2×10^4个/孔接种到96孔板中，待完全贴壁后，将其分为激活细胞（以1 μg/mL的脂多糖刺激24 h）和未激活细胞，用含8%胎牛

血清的RPMI-1640培养基培养24 h。吸弃培养基，分别加入含不同质量浓度TP@PLGA-PEG-FA、TP@PLGA-PEG、游离TP（TP质量浓度均分别为250、125、62.5、31.25、15.63、7.82 ng/mL，质量浓度根据其半数抑制浓度31.25 ng/mL设置）的RPMI-1640培养基，作为实验组；另设只加细胞、不加药物的对照组和不加细胞、不加药物的空白组。每组设置3个复孔。培养24 h，每孔加入CCK-8溶液10 μL，于37 ℃下避光孵育30 min后，使用酶标仪于450 nm波长处检测各孔的吸光度值，并按下式计算细胞存活率：细胞存活率（%）=（A_s-A_b）/（A_c-A_b）×100%（式中，A_s、A_c、A_b分别为实验组、对照组、空白组细胞的吸光度值）。

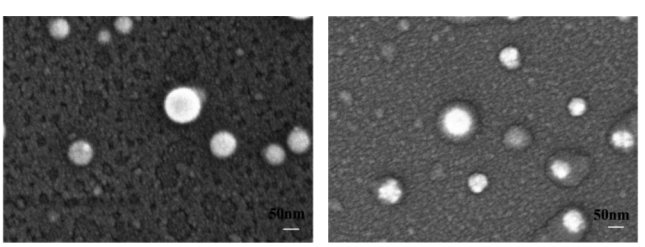
2.9 统计学方法

采用GraphPad Prism 5.0软件对数据进行统计分析。所有实验数据均以$\bar{x}\pm s$表示，组间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$\alpha=0.05$。

3 结果与讨论

3.1 TP@PLGA-PEG-FA的表征

扫描电子显微镜结果（图1）显示，PLGA-PEG-FA空白靶向纳米粒子和TP@PLGA-PEG-FA均呈球形，且分布均匀；两者的平均粒径分别为（106.20±0.03）、（122.60±0.02）nm，Zeta电位分别为（−18.3±0.5）、（−17.6±0.6）mV，PDI分别为0.28±0.04、0.26±0.02（$n=3$）。研究指出，<200 nm的纳米粒子更容易逃避网状内皮系统的捕获，并可借助由肿瘤血管渗漏引起的渗透增强及保留效应而在肿瘤部位累积，而RA的病理特性使其病变组织存在与肿瘤部位相似的“渗漏”血管系统[12]，故TP@PLGA-PEG-FA可能借助渗透增强及保留效应在RA关节炎症组织中累积。此外，由Zeta电位检测结果可知，TP@PLGA-PEG-FA荷负电，且此荷电特性不仅可避免纳米粒子聚集，而且可以减少与带负电荷细胞膜间的非特异性相互作用[13]，有利于TP@PLGA-PEG-FA与细胞膜表面的FR结合，从而发挥主动靶向性。

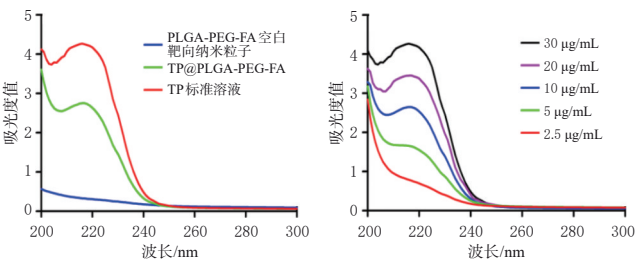


A. PLGA-PEG-FA空白靶向纳米粒子　　B. TP@PLGA-PEG-FA

图1 纳米粒子的扫描电子显微镜图

3.2 TP@PLGA-PEG-FA的载药量和包封率

紫外光谱图（图2A）显示，TP@PLGA-PEG-FA具有TP特征吸收峰，说明TP被成功包载入PLGA-PEG-FA空白靶向纳米粒子中。不同质量浓度TP标准溶液的紫外光谱图（图2B）显示，217 nm波长处的吸光度值与TP质量浓度呈正相关。以TP质量浓度为横坐标（x）、吸光度值为纵坐标（y），经最小二乘法拟合得到的回归方程为$y=0.120\ 6x+1.006\ 1$（$R^2=0.993\ 7$），TP检测质量浓度的线性范围为2.5～30 μg/mL；该方法的精密度、稳定性、重复性、回收率试验结果均符合2020年版《中国药典》（四部）的相关要求[14]。根据“2.3”项下公式计算得TP@PLGA-PEG-FA中TP的载药量和包封率分别为（7.78±0.05）%和（68.62±0.03）%（$n=3$）。

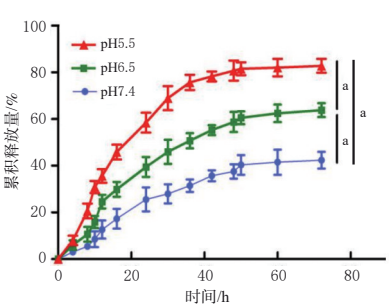


A. TP@PLGA-PEG-FA　　B. TP标准溶液

图2 纳米粒子和TP标准溶液的紫外可见光谱图

3.3 TP@PLGA-PEG-FA的累积释放量

体外释药实验结果（图3）显示，TP@PLGA-PEG-FA的释药行为具有明显的pH依赖性，且随着pH值的下降，药物释放速率明显加快。其中，TP@PLGA-PEG-FA在pH5.5的磷酸盐缓冲液中72 h时的累积释放量为（84.83±0.29）%，较pH7.4、6.5磷酸盐缓冲液中72 h时的累积释放量[分别为（42.37±0.35）%、（63.83±0.29）%]显著升高（$P<0.05$）。分析原因可能是，PLGA的降解可影响聚合物纳米粒子的释药性能，在水环境中，聚合链的缠绕程度将随着纳米粒子的膨胀而发生变化，使水溶性降解产物浓度增加，而TP@PLGA-PEG-FA中含有亲水基团PEG，导致其亲水性更强、释药更快；此外，酸性条件可影响聚合物纳米粒子中酸性低聚物的均匀度，从而加速PLGA的降解[15]。



a：72 h时组间比较，$P<0.05$。

图3 TP@PLGA-PEG-FA的释放曲线（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

3.4 TP@PLGA-PEG-FA的溶血率

血液相容性考察结果（图4）显示，与阴性对照样品相比，即便是400 μg/mL的TP@PLGA-PEG-FA也未引

起溶血现象，而且上清液澄清透明。100、200、300、400 μg/mL 的 TP@PLGA-PEG-FA 的溶血率分别为 0.77%、0.92%、1.34%、1.63%，均低于 3%，表明 TP@PLGA-PEG-FA 具有良好的血液相容性[16]，可用于体内注射。

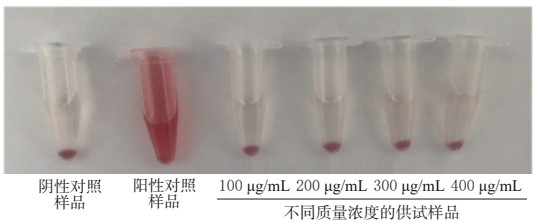


图4　不同质量浓度 TP@PLGA-PEG-FA 血液相容性考察实验的实拍图

3.5　TP@PLGA-PEG-FA 的稳定性

稳定性考察结果（图5）显示，TP@PLGA-PEG-FA 在 4 ℃水中放置 14 d 和在 37 ℃、含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中放置 12 h 的粒径、PDI、Zeta 电位均无明显变化，表明 TP@PLGA-PEG-FA 具有良好的稳定性。这可能归因于该纳米粒子表面的负电荷和 PEG 对纳米粒子表面的空间保护作用[17]。

3.6　细胞对 TP@PLGA-PEG-FA 的摄取情况

结果（图6）显示，在激活的 RAW264.7 细胞中，经 Cy3.5@PLGA-PEG-FA 处理的细胞核周围出现明显的红色荧光，而经游离 FA 预处理后再经 Cy3.5@PLGA-PEG-FA 处理的细胞核周围红色荧光明显减弱，且后者与 Cy3.5@PLGA-PEG 处理细胞比较未见明显差异。在未激活的 RAW264.7 细胞中，经 Cy3.5@PLGA-PEG、Cy3.5@PLGA-PEG-FA+ 游离 FA、Cy3.5@PLGA-PEG-FA 处理的细胞核周围均有较弱的红色荧光，但三者无明显差异。上述结果显示，激活的巨噬细胞能更有效地摄取 Cy3.5@PLGA-PEG-FA；若提前使用 FA 预处理，FA 则可先与激活的 RAW264.7 细胞表面的 FR 结合，从而导致 Cy3.5@PLGA-PEG-FA 的靶向作用减弱，表明 FA 修饰可明显提高纳米粒子的主动靶向性。

3.7　TP@PLGA-PEG-FA 的体外细胞毒性

针对未激活 RAW264.7 细胞的体外毒性实验结果（图 7A）显示，当 TP 质量浓度 ≥62.5 ng/mL 时，TP@PLGA-PEG-FA 组、TP@PLGA-PEG 组未激活细胞的平均存活率均小于 50%；而当 TP 质量浓度 ≥15.63 ng/mL，游离 TP 组未激活细胞的平均存活率均小于 50%；当 TP 质量浓度 ≥15.63 ng/mL 时，游离 TP 组的细胞存活率均显著低于同质量浓度 TP@PLGA-PEG-FA 组和 TP@PLGA-PEG 组（$P<0.05$）。这主要归因于游离 TP 可通过扩散作用直接作用于细胞；而 TP@PLGA-PEG-FA、TP@PLGA-PEG 则是通过细胞内吞作用将药物送入未激活的巨噬细胞中，从而导致细胞对纳米粒子的摄入量不足、药物毒性减弱。

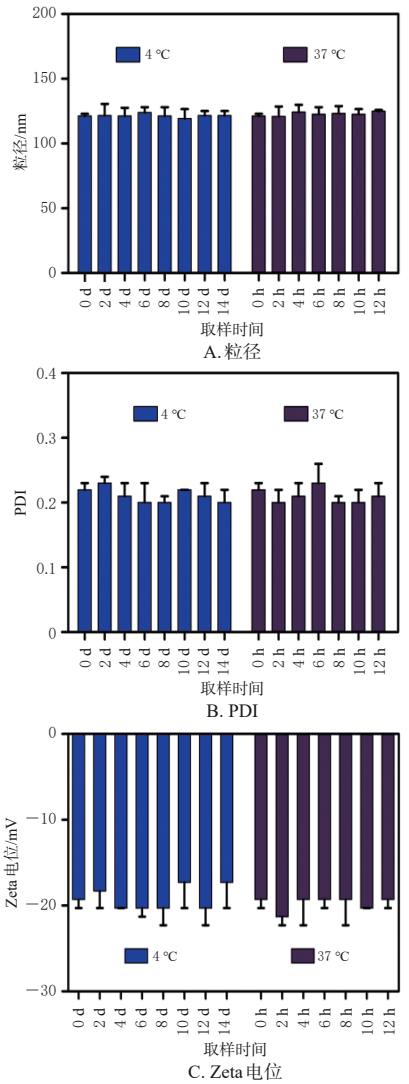


图5　TP@PLGA-PEG-FA 的稳定性考察结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

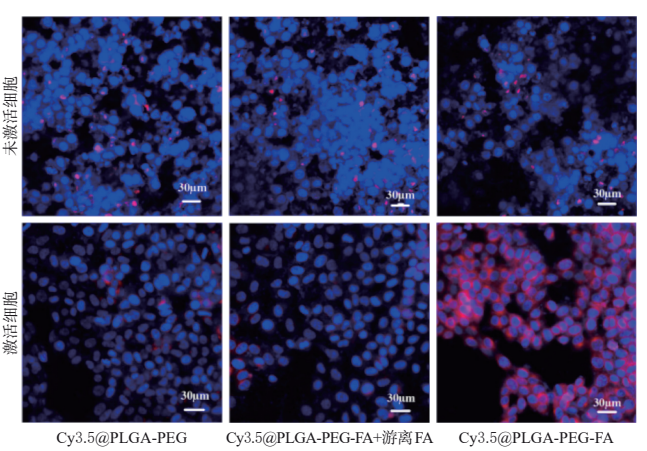
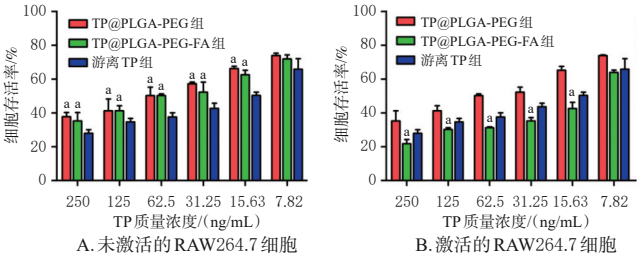


图6　激活与未激活 RAW264.7 细胞对纳米粒子摄取的激光共聚焦显微图

针对激活 RAW264.7 细胞的体外毒性实验结果（图 7B）显示，当 TP 质量浓度 ≥15.63 ng/mL 时，TP@PLGA-PEG-FA 组激活细胞的存活率均显著低于同质量浓度游离 TP 组（$P<0.05$）。这主要是因为 TP@PLGA-PEG-FA

表面存在FA，增加了激活巨噬细胞对纳米粒子的摄入量，从而使TP得以积累、药物毒性得以提高。



a：与游离TP组比较，$P<0.05$。

图7 不同质量浓度游离TP、TP@PLGA-PEG-FA和TP@PLGA-PEG的体外细胞毒性比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

4 结语

本研究制备了一种FA表面修饰的靶向纳米粒子TP@PLGA-PEG-FA，该制剂血液相容性好，可有效改善TP的水溶性和稳定性，在炎症组织的微酸性环境中能快速释放TP，提高药物利用率。体外细胞实验表明，TP@PLGA-PEG-FA对炎症细胞具有主动靶向性，能通过FA-FR结合而被激活的RAW264.7细胞高效摄取，从而发挥细胞毒性作用。

参考文献

[1] 王明霞，蔡雪峰，林静，等. 雷公藤甲素抑制类风湿性关节炎成纤维细胞样滑膜细胞的自噬与存活[J]. 中国热带医学，2021，21(10)：976-980.

[2] 杨丽，刘荣华，黄四碧，等. 类风湿性关节炎的发病机制及治疗药物研究进展[J]. 中国药房，2021，32(10)：2154-2159.

[3] STEINZ M M，EZDOGLIAN A，KHODADUST F，et al. Folate receptor beta for macrophage imaging in rheumatoid arthritis[J]. Front Immunol，2022，13：819163.

[4] 黄莉，夏新华，杨磊，等. 叶酸修饰的斑蝥素/黄芩苷共载脂质体处方工艺优化及其评价[J]. 中草药，2024，55(10)：3267-3279.

[5] ZHANG X N，ZHANG X，WANG X P，et al. Efficient delivery of triptolide plus a miR-30-5p inhibitor through the use of near infrared laser responsive or CADY modified MSNs for efficacy in rheumatoid arthritis therapeutics[J]. Front Bioeng Biotechnol，2020，8：170.

[6] CAI B L，HU Z Y，TANG H Y，et al. Triptolide impairs genome integrity by directly blocking the enzymatic activity of DNA-PKcs in human cells[J]. Biomed Pharmacother，2020，129：110427.

[7] 邓飞，刘勇，马如江，等. 具有可见光响应聚合物纳米粒子的制备及性能研究[J]. 高分子学报，2023，54(5)：665-674.

[8] 李新健，游云，张琼玲，等. 载紫杉醇的叶酸靶向PTX@FA-PLGA-NMs纳米胶束的制备及其体外抗宫颈癌HeLa细胞作用的研究[J]. 中国中药杂志，2021，46(10)：2481-2488.

[9] WANG X W，GU Y X，LI Q，et al. Synergistic chemo-photothermal cancer therapy of pH-responsive polymeric nanoparticles loaded IR825 and DTX with charge-reversal property[J]. Colloids Surf B Biointerfaces，2022，209(Pt. 2)：112164.

[10] FARRAN B，MONTENEGRO R C，KASA P，et al. Folate-conjugated nanovehicles：strategies for cancer therapy[J]. Mater Sci Eng C，2020，107：110341.

[11] ZHAO J L，ZHAO M H，YU C H，et al. Multifunctional folate receptor-targeting and pH-responsive nanocarriers loaded with methotrexate for treatment of rheumatoid arthritis[J]. Int J Nanomedicine，2017，12：6735-6746.

[12] REN H W，HE Y W，LIANG J M，et al. Role of liposome size，surface charge，and PEGylation on rheumatoid arthritis targeting therapy[J]. ACS Appl Mater Interfaces，2019，11(22)：20304-20315.

[13] FERNANDES E，FERREIRA D，PEIXOTO A，et al. Glycoengineered nanoparticles enhance the delivery of 5-fluoroucil and paclitaxel to gastric cancer cells of high metastatic potential[J]. Int J Pharm，2019，570：118646.

[14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：四部[M]. 2020年版. 北京：中国医药科技出版社，2020：480-483.

[15] BASSAND C，VERIN J，LAMATSCH M，et al. How agarose gels surrounding PLGA implants limit swelling and slow down drug release[J]. J Control Release，2022，343：255-266.

[16] 王峰，张超，郑栓. 具有线粒体靶向性的雷公藤甲素TPP-PEG-PCL脂质体的制备及其促肝肿瘤细胞凋亡研究[J]. 中草药，2021，52(24)：7473-7483.

[17] ZHANG H W，DANG Q，ZHANG Z W，et al. Development，characterization and evaluation of doxorubicin nanostructured lipid carriers for prostate cancer[J]. J Buon，2017，22(1)：102-111.

（收稿日期：2024-12-27 修回日期：2025-05-20）

（编辑：邹丽娟）