中图分类号：R979.1；TQ460.6　　文献标志码：A　　文章编号：1006－4931（2024）13－0038－07
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2024.13.010

共载索拉非尼与双硫仑靶向胶束的制备与表征*

阿丽古丽·买买提依明[1]，李　萌[2]，凯丽比努尔·奥布力艾散[1]，范　宁[2]，李　倩[2]，尹东锋[2]

（1. 新疆医科大学药学院，新疆 乌鲁木齐　830000；2. 中国人民解放军新疆军区总医院，新疆 乌鲁木齐　830000）

摘要：目的　制备共载索拉非尼和双硫仑的普朗尼克P123－半乳糖（索拉非尼/双硫仑－半乳糖－P123）胶束。**方法**　采用CCK－8法筛选索拉非尼和双硫仑最优药物协同比例。采用薄膜水化法制备索拉非尼/双硫仑－半乳糖－P123胶束，采用星点设计－响应面法优选最优工艺；采用高效液相色谱法测定包封率和载药率；采用马尔文粒度测定仪测定粒径、Zeta电位、多分散指数（PDI）；通过透射电镜观察形态；采用透析法测定释放度。**结果**　索拉非尼－双硫仑（1∶2，*m*/*m*）为最优药物协同比例。星点设计－响应面法优选最优工艺为总投药量20.67 mg，总材料量140.54 mg，水化体积8.22 mL。按此工艺制备，索拉非尼的包封率为（94.2±0.03）%，载药率为（5.38±0.32）%；双硫仑的包封率为（92.07±0.01）%，载药率为（7.89±0.32）%。所制得纳米胶束形态为球形，分散均匀，粒径为（61.36±0.74）nm，Zeta电位为（－9.38±1.5）mV，PDI为0.292±0.070。在pH 7.4环境中，索拉非尼和双硫仑在72 h时的释放率分别为58.70%，14.90%；在pH 5.0环境中，索拉非尼和双硫仑在72 h时的释放率分别为97.20%，28.60%。**结论**　采用薄膜水化法制备的索拉非尼/双硫仑－半乳糖－P123胶束工艺优良、稳定性良好，具有较好的包封率、pH敏感性和缓释释放作用，可有效聚集在肿瘤部位。

关键词：索拉非尼；双硫仑；肝细胞癌；半乳糖；胶束；普朗尼克

Preparation and Characterization of Targeted Micelles Co－Loaded with Sorafenib and Disulfiram

Aliguli MAIMAITIYIMING[1], LI Meng[2], Kailibinu'er AOBULIAISAN[1], FAN Ning[2], LI Qian[2], YIN Dongfeng[2]

(1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, China　830000; 2. General Hospital of Xinjiang Military Region of the PLA, Urumqi, Xinjiang, China　830000)

Abstract: Objective　To prepare Pluronic P123－galactose (sorafenib/disulfiram－galactose－P123) micelles co－loaded with sorafenib and disulfiram. **Methods**　CCK－8 method was used to select the optimal drug synergistic ratio of sorafenib and disulfiram. Sorafenib/disulfiram－galactose－P123 micelles were prepared by the thin film hydration method, and the optimal process was optimized by the central composite design－response surface methodology (CCD－RSM). The high－performance liquid chromatography (HPLC) method was used to determine encapsulation efficiency and drug loading rate. Malvern particle size analyzer was used to measure particle size, Zeta potential, and polydispersity index (PDI). The morphology was observed through transmission electron microscopy. The dialysis method was used to determine the release rate. **Results**　Sorafenib－disulfiram (1∶2, *m*/*m*) was the optimal drug synergistic ratio. The optimal process of CCD－RSM was as follows: the total drug dosage was 20.67 mg, the total material dosage was 140.54 mg, and the hydration volume was 8.22 mL. According to this process, the encapsulation efficiency of sorafenib was (94.2±0.03)%, and the drug－loading rate of sorafenib was (5.38±0.32)%. The encapsulation efficiency of disulfiram was (92.07±0.01)%, and the drug－loading rate of disulfiram was (7.89±0.32)%. The prepared nano micelles were spherical, uniformly dispersed, with a particle size of (61.36±0.74) nm, a Zeta potential of (－9.38±1.5) mV, and a PDI of 0.292±0.070. Under the environment with pH of 7.4, the release rates of sorafenib and disulfiram at 72 h were 58.70% and 14.90%, respectively. Under the environment with the pH of 7.4, the release rates of sorafenib and disulfiram at 72 h were 58.70% and 14.90%, respectively. Under the environment with the pH of 5.0, the release rates of sorafenib and disulfiram at 72 h were 97.20% and 28.60%, respectively. **Conclusion**　Sorafenib/disulfiram－galactose－P123 micelles prepared by the thin film hydration method have excellent process, good stability, good encapsulation efficiency, pH sensitivity, and sustained release effect, which can effectively aggregate at the tumor site.

Key words: sorafenib; bisulfiram; hepatocellular carcinoma; galactose; micelles; Pluronic

索拉非尼是一种酪氨酸激酶抑制剂，于2007年被美国食品和药物管理局（FDA）批准为晚期肝细胞癌（HCC）的首选靶向药物[1]，通过阻断Raf蛋白激酶/丝裂原活化蛋白激酶/细胞外调节蛋白激酶（Raf/MEK/ERK）通路和血管内皮生长因子受体/血小板源性生长因子受体（VEGFR/PDGFR）的酪氨酸激酶来抑制细胞增殖和肿瘤血管生成，是治疗晚期HCC最有效、最主要的一线治疗药物[2－3]。但治疗2～6周会发生不同程度的药品不良反应（ADR），表现为腹泻、手足综合征、皮疹、高血压、纳差、乏力等[4]，且易发生原发性和获得性

*基金项目：新疆维吾尔自治区自然科学基金重点项目[2022D01D78]。

第一作者：阿丽古丽·买买提依明，女，维吾尔族，硕士研究生在读，药师，研究方向为肿瘤靶向递药系统，（电子信箱）2402394286@qq.com。

耐药，严重影响其临床疗效[5]。双硫仑可抑制乙醛脱氢酶的活性，达到戒酒目的[6]。研究表明，双硫仑还具有广谱抗肿瘤活性，通过多种机制发挥抗肿瘤作用，包括抑制 P－糖蛋白功能，诱导氧化应激，减少血管生成，抑制肿瘤相关巨噬细胞等[7－8]。此外，双硫仑与其他抗肿瘤药物联用具有协同作用，可有效逆转肿瘤细胞的耐药性，增强药物的细胞毒作用，且能减少用药量，降低毒副作用，有望成为抗肿瘤佐剂[9－10]。目前，能将治疗药物有效运送到肿瘤细胞的纳米递药系统受到越来越多的关注。普朗尼克是由聚氧乙烯（PEO）、聚氧丙烯（PPO）聚合而成的两亲性三嵌段共聚物[11]，可自组装形成胶束，具有良好的生物相容性、低毒性、无免疫原性及一定的抑制 P－糖蛋白介导的药物外排作用。因其骨架上含有活性羟基，易于功能化修饰，被广泛用作制备纳米胶束的载体材料[12－13]。HCC 细胞中含有丰富的去唾液酸糖蛋白受体（ASGPR），但在正常细胞中表达较少[14]。半乳糖是 ASGPR 的特异性配体，可靶向识别 HCC，增加在 HCC 部位的富集量，提高治疗效果，实现对 HCC 的靶向治疗[15－16]。根据这一特性，可目标导向性地设计靶向药物递送系统，选用具有双重抗肿瘤作用的索拉非尼和作为辅助抗肿瘤作用的双硫仑[17]，设计并制备共载两药的半乳糖连接普朗尼克的胶束，以达到协同增效及减毒作用，并为索拉非尼应用于 HCC 的临床治疗提供思路。现报道如下。

1 仪器、试药与细胞

1.1 仪器

515 型高效液相色谱（HPLC）仪（美国 Waters 公司）；BK2008R 型酶标仪（北京普朗新技术有限公司）；RB3M 型台式低速大容量离心机（青岛卓光电科技有限公司）；RE－2000B 型旋转蒸发仪（美国 IKA 公司）；SCIENTZ－10N 型冷冻干燥机（宁波新芝生物科技股份有限公司）；CJV1500－Y 型超净台（青岛海尔股份有限公司）；Mastersizer 3000 型马尔文粒度测定仪（英国 Malvern Panalytical 公司）；TH7700 型透射电子显微镜（日本 Hitachi Limited 有限公司）；BC－J80S 型细胞培养箱（山东博科医用材料有限公司）；AE240 型电子天平（瑞士 Mettler Toledo 公司，精度为 0.01 mg）；TH2－82 型恒温水浴摇床（常州国华企业集团有限公司）；JNM－ECA－400 型核磁共振仪（日本电子株式会社）。

1.2 试药

索拉非尼（上海阿拉丁试剂有限公司，批号为 B2224281，纯度为 99%）；双硫仑（北京百灵威科技有限公司，批号为 LUB0R22，纯度为 97%）；普朗尼克 P123（Pluronic P123，美国 Sigma－Aldrich 公司，批号为 MKCM2074，纯度为 99%）；四乙酰基－α－*D*－溴代半乳糖（上海源叶生物科技有限公司，批号为 J20HS189221，纯度为 93%）；碳酸银（上海阿达玛斯贝塔化学试剂有限公司，批号为 P2049826，纯度为 99%）；CCK－8（批号为 BB12229069），磷酸盐缓冲液（PBS，批号为 BC07034437），均购自北京博奥森生物技术有限公司；DMEM 培养基（500 mL，批号为 8123282），乙醇（色谱纯，批号为 P2605993，纯度为 99.9%），甲醇（色谱纯，纯度为 99.8%，批号为 P2267489），均购自北京索莱宝科技有限公司；去离子水（自制）。

1.3 细胞

HepG－2 细胞和 Huh－7 细胞由新疆医科大学馈赠。

2 方法与结果

2.1 最佳协同药物比筛选

HepG－2 细胞和 Huh－7 细胞以 1×10^4 个/孔的密度接种至 96 孔板中，置培养箱中培养 24 h 后，根据前期实验[18]，加入索拉非尼－双硫仑（1∶4、1∶2、1∶1、2∶1、4∶1，*m*/*m*）48 h，加入 10 μL CCK－8 试剂，37 ℃孵育 1 h，于 450 nm 波长处检测各组细胞吸光度（*A*）值，计算细胞抑制率。利用 Compusyn 1.0 软件计算药物联合指数（*CI*）值，以 *CI* 值为纵坐标、细胞杀伤效率（Fa）为横坐标，利用 Graphpad prism 8.0 软件绘制曲线图。以 *CI* < 1 为协同作用，*CI* = 1 为相加作用，*CI* > 1 为拮抗作用，筛选最佳协同比例。结果索拉非尼－双硫仑（1∶4，*m*/*m*）对 HepG－2 细胞和 Huh－7 细胞呈拮抗作用，索拉非尼－双硫仑（4∶1、2∶1、1∶1，*m*/*m*）对其部分细胞呈拮抗作用。因此，选择索拉非尼－双硫仑（1∶2，*m*/*m*）进行后期实验。结果见图 1。

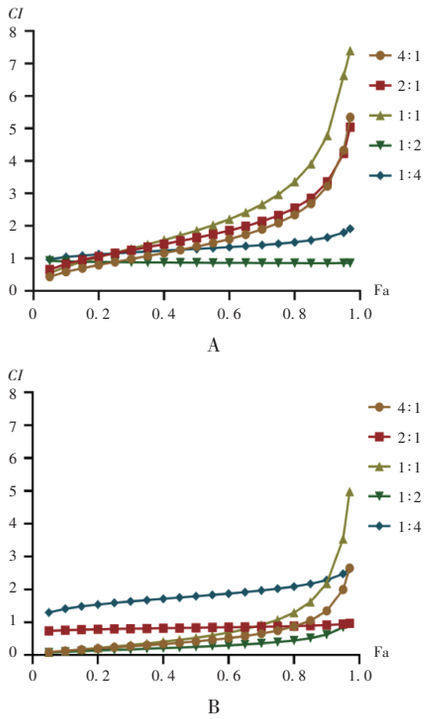
2.2 Pluronic P123 与半乳糖合成[19]

分别取四乙酰基－α－*D*－溴代半乳糖 3.10 g 和 Pluronic P123 7.25 g，精密称定，溶于 30 mL 无水氯仿中，加入碳酸银 1.44 g，37 ℃条件下搅拌 48 h，滤过，减压蒸馏，加入 1.20 mol/L 甲醇钠/甲醇溶液 10 mL 复溶，室温下搅拌 2 h，减压蒸馏，甲醇透析 4 d，除去有机溶剂，得白色黏固产物，4 ℃保存。合成路线见图 2。

由图 3 可知，半乳糖－Pluronic P123 ^{1}H－NMR 图谱中同时显示出半乳糖的特殊化学位移峰 4.11×10^{-6}（C4—H）、4.23×10^{-6}（C5—H）、6.07×10^{-6}（C1—H）和 Pluronic P123 的特殊化学位移峰 0.99×10^{-6}（PPO—CH3）、3.40×10^{-6}～3.60×10^{-6}（PPO—CH2CHO，PEO—CH2CHO），表明半乳糖已连接在 Pluronic P123 上，半乳糖－P123 成功合成。

2.3 共载索拉非尼和双硫仑的半乳糖－P123 胶束构建

称取适量的 Pluronic P123、索拉非尼和双硫仑，用甲醇溶解，旋转蒸发 30 min，除去有机溶剂，使其形成一层均匀薄膜，在相同温度水浴中加热，并加入 10 mL 60 ℃灭菌注射用水，磁力搅拌水化 30 min，冷却至室温，0.22 μm 微孔滤膜滤过，得胶束溶液，冷冻干燥，过夜。



A. HepG－2细胞 B. Huh－7细胞

图1 索拉非尼与双硫仑不同药物比对HepG－2细胞和Huh－7细胞的*CI*与Fa曲线

A. HepG－2 cells B. Huh－7 cells

Fig. 1 *CI* and Fa curves of different ratios of sorafenib to disulfiram for HepG－2 cells and Huh－7 cells

2.4 索拉非尼和双硫仑含量测定[20－21]

2.4.1 色谱条件

色谱柱：Hypersil ODS C_{18}柱（150 mm × 4.6 mm，5 μm）；流动相：去离子水（1 mL三乙胺稀释至50 mL，用磷酸调pH至5.4）－乙腈（30∶70，*V*/*V*）；流速：1.0 mL/min；柱温：室温；检测波长：300 nm；进样量：20 μL。

2.4.2 溶液制备

分别取索拉非尼和双硫仑各适量，精密称定，分别置25 mL容量瓶中，用甲醇定容，制成质量浓度均为400 μg/mL的溶液。分别取索拉非尼和双硫仑各适量，精密称定，置同一25 mL容量瓶中，用甲醇定容，制成每1 mL分别含索拉非尼和双硫仑各400 μg的混合溶液，4 ℃保存。

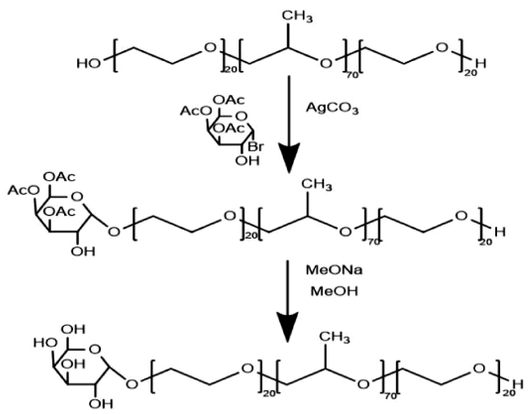


图2 Pluronic P123与半乳糖的合成路线

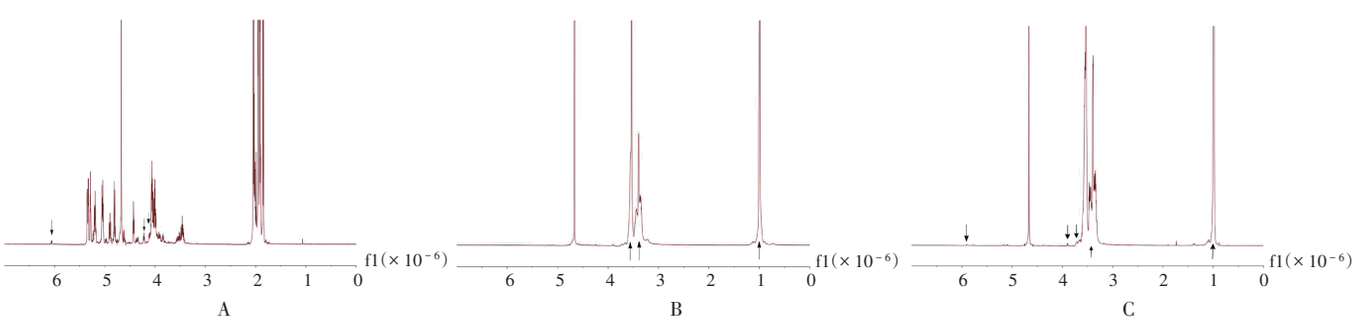
Fig. 2 The synthetic routes of Pluronic P123 and galactose

2.4.3 方法学考察

专属性试验：取甲醇及2.4.2项下索拉非尼溶液、双硫仑溶液和混合溶液各适量，0.22 μm微孔滤膜滤过，按2.4.1项下色谱条件进样测定，记录色谱图。结果索拉非尼和双硫仑溶液的色谱图基线平稳，峰形较好，且分离度大于1.5，表明方法专属性良好。色谱图见图4。

线性关系考察：取2.4.2项下索拉非尼和双硫仑溶液各适量，用甲醇稀释为质量浓度分别为1.56，3.13，6.25，12.50，25.00，50.00，100.00 μg/mL的系列溶液，按2.4.1项下色谱条件进样测定，以溶液质量浓度（*X*，μg/mL）为横坐标、峰面积（*Y*）为纵坐标进行线性回归，得回归方程 $Y_{双}$ = 32 706 $X_{双}$ － 6 617（R^2 = 0.999 9，*n* = 7）和 $Y_{索}$ = 9 940 $X_{索}$ + 12 864（R^2 = 0.999 4，*n* = 7）。结果表明，索拉非尼和双硫仑的质量浓度均在1.56～100.00 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验：取线性关系考察项下低、中、高质量浓度（1.56，12.50，100.00 μg/mL）的索拉非尼和双硫仑溶液，同1 d内分别于0，3，6，12，24 h时按2.4.1项下色谱条件进样测定，考察日内精密度；第1，2，3，4，5天

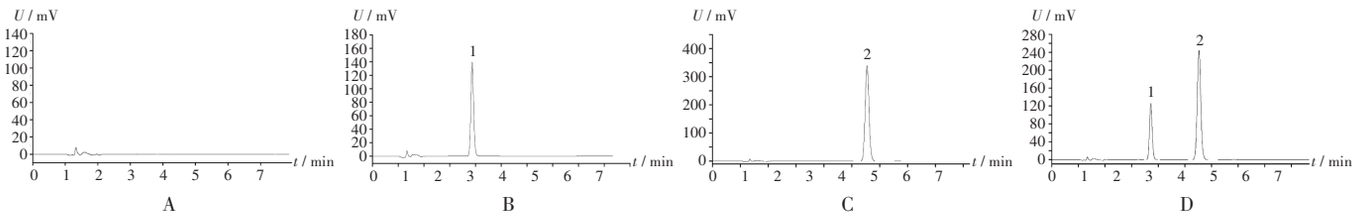


A. 半乳糖 B. Pluronic P123 C. 半乳糖－P123

图3 核磁共振氢谱图

A. Galactose B. Pluronic P123 C. Gal－P123

Fig. 3 NMR hydrogen spectrums



1. 索拉非尼　2. 双硫仑

A. 甲醇　B. 索拉非尼溶液　C. 双硫仑溶液　D. 索拉非尼 - 双硫仑混合溶液

图 4　高效液相色谱图

1. Sorafenib　2. Disulfiram

A. Methanol　B. Sorafenib solution　C. Disulfiram solution　D. Sorafenib - disulfiram mixed solution

Fig. 4　HPLC chromatograms

按 2.4.1 项下色谱条件进样测定，考察日间精密度。结果低、中、高质量浓度索拉非尼和双硫仑溶液的 *RSD* 均不超过 2%（$n = 5$），表明仪器精密度良好。详见表 1。

表 1　精密度试验结果的 *RSD*（%，$n = 5$）

Tab. 1　The *RSD*s of the precision test results（%，$n = 5$）

质量浓度	日内精密度		日间精密度	
	索拉非尼	双硫仑	索拉非尼	双硫仑
1.56 μg / mL	1.20	0.85	1.02	0.43
12.50 μg / mL	0.35	0.91	1.47	1.19
100.00 μg / mL	0.34	0.84	0.54	0.87

回收试验：取线性关系考察项下低、中、高质量浓度（1.56，12.50，10.00 μg / mL）的索拉非尼和双硫仑溶液，按 2.4.1 项下色谱条件进样测定，记录峰面积，代入线性回归方程计算质量浓度，计算回收率。结果见表 2。

表 2　加样回收试验结果（$n = 9$）

Tab. 2　Results of the recovery test（$n = 9$）

加入量	测得量（μg / mL）		回收率（%）		$\bar{X}$（%）		*RSD*（%）	
（μg / mL）	索拉非尼	双硫仑	索拉非尼	双硫仑	索拉非尼	双硫仑	索拉非尼	双硫仑
1.56	1.522	1.54	97.56	98.72				
1.56	1.546	1.53	99.10	98.08				
1.56	1.548	1.53	99.23	98.08				
12.50	11.996	12.11	95.97	96.88				
12.50	12.051	11.96	96.41	95.68	98.20	97.91	1.90	1.69
12.50	11.991	11.90	95.93	95.20				
100.00	101.181	99.49	101.18	99.49				
100.00	100.017	99.39	100.02	99.39				
100.00	98.390	99.67	98.39	99.67				

2.4.4　包封率与载药率测定

取冻干胶束适量，溶于甲醇，透析 2 h 后，0.22 μm 滤膜滤过，按 2.4.1 项下色谱条件进样测定，计算包封率和载药率。包封率（%）= 胶束包封药物的质量 / 总投药量 × 100%，载药率（%）= 胶束包封药物的质量 / 载药胶束总质量 × 100%。

2.5　星点设计 - 响应面法优化处方

单因素考察：以胶束的包封率和载药率为考察指标，考察总材料量、水化体积、总投药量、水化时间、水化温度对包封率和载药率的影响。结果包封率随总材料量和水化体积的增加呈先上升后下降再上升趋势，随总投药量的增加呈先下降后上升再下降趋势，对包封率的影响较大；包封率随水化时间和水化温度的增加呈先上升后下降趋势。水化温度在 60 ℃、水化 30 min 时的包封率最大。详见图 5。载药率随总材料量、水化体积、总投药量的增加呈波动趋势，水化 30 min 时的载药率最大，水化温度在 60 ℃时索拉非尼的载药率最大。详见图 6。因此，将总材料量、总投药量和水化体积作为考察因素，采用星点设计 - 响应面法进行处方优化。

工艺优化[22]：以单因素试验结果为基础，选取 3 个影响较大的因素，使用 Design Expert 13.0 软件设计并制备 20 组不同处方的索拉非尼 / 双硫仑 - 半乳糖 - P123 胶束，以索拉非尼和双硫仑的包封率、载药率为评价指标（因变量），采用三因素五水平的星点设计 - 响应面法优化处方，以归一化值（*OD*）进行综合考虑。结果见表 3。采用 Design Expert 13.0 软件进行多元线性回归及模型拟合，发现以三次多项式拟合效果最好（$R^2 = 0.982\ 2$，$P = 0.001\ 2$）。拟合得三次多项式回归方程 $OD = 0.622 - 0.0416A - 0.0981B - 0.1011C + 0.0175AB + 0.1050AC + 0.0125BC - 0.1263A^2 + 0.0169B^2 - 0.0874C^2 - 0.0100ABC + 0.0031A^2B + 0.2036A^2C + 0.1341AB^2$，方差分析结果见表 4。*OD* 值随因素变化的三维响应面图见图 7，最终确定索拉非尼 / 双硫仑 - 半乳糖 - P123 胶束的最佳工艺为总投药量 20.67 mg，总材料量 140.54 mg，水化体积 8.22 mL。

验证试验：根据最佳制备工艺制备 3 批索拉非尼 / 双硫仑 - 半乳糖 - P123 胶束，测定包封率及载药率。结果索拉非尼和双硫仑的包封率及载药率的实际值与预测值的差异较小，且均符合《中国药典》中胶束包封率大于 80% 的规定。详见表 5。

2.6　形态、粒径和 Zeta 电位测定

将索拉非尼 / 双硫仑 - 半乳糖 - P123 胶束以去离子水稀释 15 倍，采用马尔文激光粒度仪测定粒径、多分散指数（PDI）及 Zeta 电位。另取少量胶束冻干粉末，用

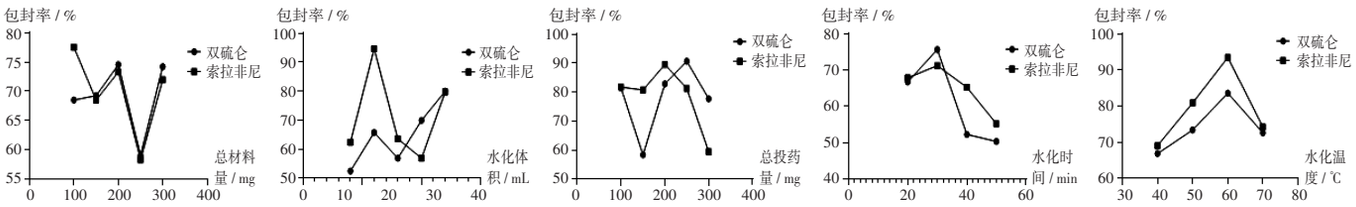


图5 包封率单因素考察结果

Fig. 5 Results of the single factor investigation of the encapsulation rate

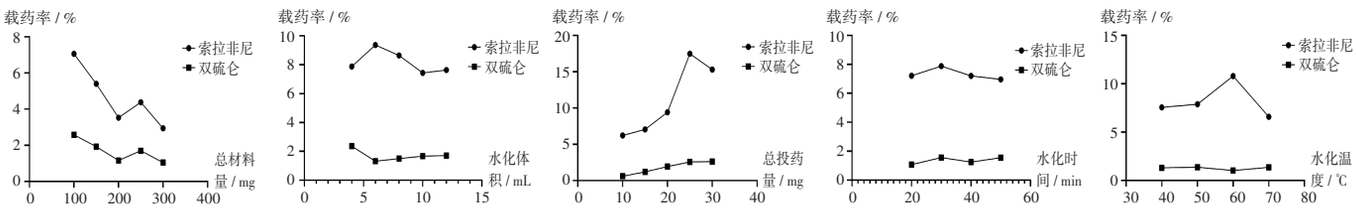


图6 载药率单因素考察结果

Fig. 6 Results of the single factor investigation of drug - loading rate

表3 星点设计与结果

Tab. 3 Design and results of the CCD

序号	索拉非尼(%)		双硫仑(%)		*OD*
	包封率	载药率	包封率	载药率	
1	84.21	3.683	85.16	4.748	0.47
2	59.39	6.156	50.53	7.316	0.39
3	72.36	2.065	71.45	2.976	0.20
4	68.68	2.853	69.27	3.518	0.23
5	78.04	3.547	76.25	5.745	0.42
6	83.85	7.409	82.07	9.568	0.80
7	71.76	2.618	69.55	3.693	0.24
8	90.59	4.928	89.88	6.691	0.65
9	86.97	2.408	91.25	3.496	0.40
10	56.03	5.130	44.10	6.288	0.26
11	94.96	6.982	92.91	10.045	0.90
12	102.27	3.028	100.33	3.874	0.57
13	94.78	3.929	97.26	5.502	0.61
14	70.56	3.541	69.65	3.396	0.27
15	97.70	4.203	97.22	5.587	0.64
16	99.50	4.067	99.66	4.886	0.63
17	84.28	4.559	89.42	6.544	0.59
18	67.00	3.670	102.69	5.112	0.46
19	86.67	4.128	95.63	5.621	0.58
20	84.85	4.141	89.17	5.978	0.55

灭菌注射用水稀释至质量浓度为1 mg / mL，取1滴至铺有碳膜的铜网上，用2.0%磷钨酸染色，30 s后取出，自然干燥后用透射电镜观察并拍照。结果显示，所制纳米胶束形态为球形，分散均匀，粒径为(61.36 ± 0.74)nm，Zeta电位为(-9.38 ± 1.50)mV，PDI为0.292 ± 0.070。详见图8。

2.7 体外释放试验

将胶束冻干粉末用灭菌注射用水稀释至质量浓度为2 mg / mL，在分子截留量为3 000的透析袋中精密加

表4 方差分析结果

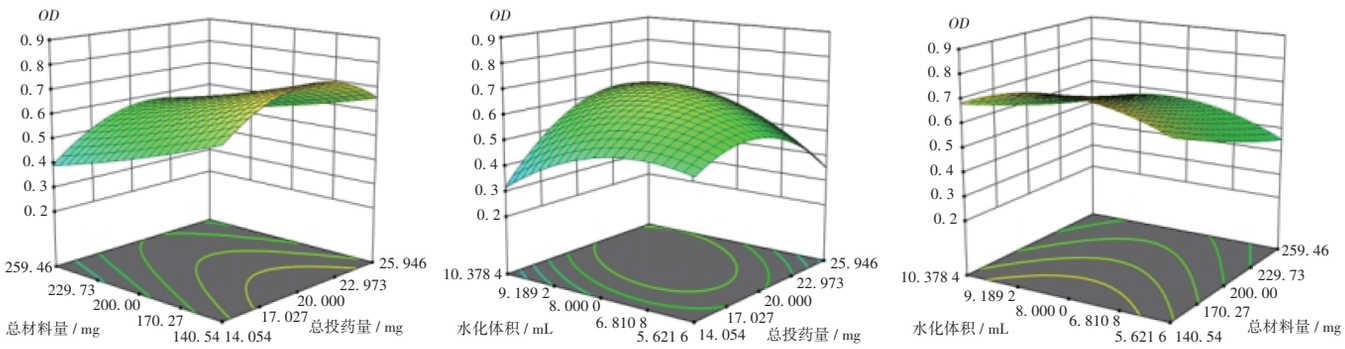
Tab. 4 Results of the analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方差	*F*值	*P*值
模型	0.781 0	13	0.060 1	23.92	0.000 4
A	0.009 8	1	0.009 8	3.90	0.095 6
B	0.054 4	1	0.054 4	21.68	0.003 5
C	0.057 8	1	0.057 8	23.01	0.003 0
AB	0.002 4	1	0.002 4	0.98	0.361 5
AC	0.088 2	1	0.088 2	35.12	0.001 0
BC	0.001 2	1	0.001 2	0.50	0.507 0
A^2	0.238 2	1	0.238 2	94.82	< 0.000 1
B^2	0.003 1	1	0.003 1	1.23	0.310 0
C^2	0.115 9	1	0.115 9	46.13	0.000 5
ABC	0.000 8	1	0.000 8		
A^2B	0	1	0		
A^2C	0.137 3	1	0.137 3		
AB^2	0.059 6	1	0.059 6		
AC^2	0	0			
B^2C	0	0			
BC^2	0	0			
A^3	0	0			
B^3	0	0			
C^3	0	0			
残差	0.015 1	6			
失拟项	0.014 5	1	0.002 5		
净误差	0.000 5	5	0.014 5		
总离差	0.796 1	19	0.000 1		

表5 验证试验结果(%)

Tab. 5 Results of the validation test (%)

药品名称	预测值		实际值($\overline{X} \pm s$)	
	包封率	载药率	包封率	载药率
索拉非尼	94.26	5.81	94.20 ± 0.03	5.38 ± 0.32
双硫仑	92.97	7.20	92.07 ± 0.01	7.89 ± 0.32

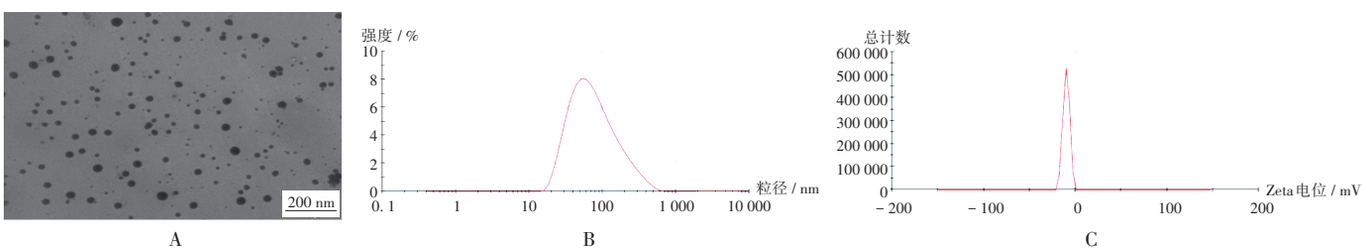


A. 总投药量与总材料量　B. 总投药量和水化体积　C. 总材料量与水化体积

图 7　各因素交互作用对 *OD* 影响的三维响应面图

A. Total drug dosage and total material dosage　B. Total drug dosage and hydration volume　C. Total material dosage and hydration volume

Fig. 7　3D response surface diagram of the interaction of various factors on *OD*



A. 透射电镜图　B. 粒径　C. Zeta 电位

图 8　索拉非尼 / 双硫仑 − 半乳糖 − P123 胶束的粒径、Zeta 电位和透射电镜图

A. Transmission electron microscopy image　B. Particle size　C. Zeta potential

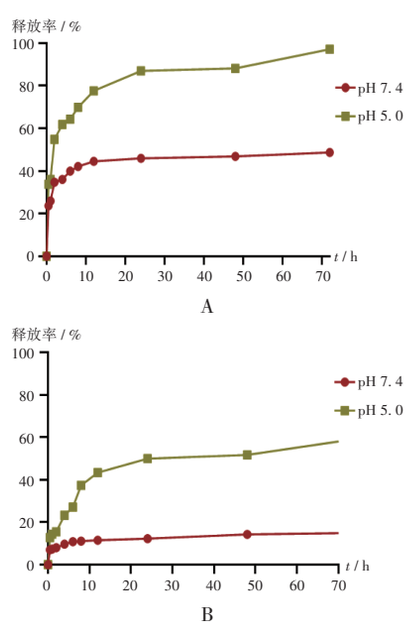
Fig. 8　Particle size, Zeta potential, and transmission electron microscopy image of sorafenib / disulfiram − galactose − P123 micelles

入 3 mL 胶束溶液，封口后置 80 mL pH 7. 4 和 pH 50 的含 0. 5% 吐温 − 80 的 PBS 中，模拟血液中和肿瘤内的环境，用恒温振荡器（温度为 37 ℃、转速为 100 r / min）进行释放度考察，分别于 0. 5，1，2，4，6，8，12，24，48，72 h 时取出释放介质 1 mL，同时补充 1 mL 释放介质。采用 HPLC 法测定释放液中索拉非尼和双硫仑的含量，并绘制体外释放曲线。结果索拉非尼和双硫仑在 pH 7. 4 和 pH 5. 0 环境中缓慢且稳定释放；在 pH 7. 4 环境中，索拉非尼和双硫仑在 72 h 时的释放率分别为 58. 70%，14. 90%；在 pH 5. 0 环境中，索拉非尼和双硫仑在 72 h 时的释放率分别为 97. 20%，28. 60%，详见图 9。可见，该胶束具有 pH 敏感性和缓释释放作用。

3　讨论

全球每年新增超过 60 万 HCC 患者，中国 HCC 的发病率仅次于肺癌。随着原发 HCC 患者病情的恶化，病变可能会向远处转移，甚至导致胸腹腔积液，治疗效果欠佳[23]。目前，临床常用化学治疗（简称化疗）药物治疗 HCC，包括紫杉醇、顺铂、吉西他滨、阿霉素、长春新碱等。随着 HCC 患者对传统化疗药物的多药耐药基因的过度表达[24]，伴随肝功能损害，小分子药物的利用效率低下，难以满足临床治疗需求。因此，寻找新的抗癌药物和联合用药方案成为当前的研究热点。

联合应用多种化疗药物治疗 HCC，可利用药物分



A. 索拉非尼　B. 双硫仑

图 9　索拉非尼 / 双硫仑 − 半乳糖 − P123 胶束在不同 pH 中的体外释放率

A. Sorafenib　B. Disulfiram

Fig. 9　*In vitro* release rates of sorafenib / disulfiram − galactose − P123 micelles at different pH values

子不同机制的相互作用，实现协同抗肿瘤效果，减弱肿瘤细胞对单一药物的耐药性，提高患者的生存

率[25-26]。有关索拉非尼与其他药物、双硫仑与其他药物的相关研究颇多，但索拉非尼与双硫仑联用的研究较少。本研究中通过薄膜水化法制备了一种以半乳糖为肝靶向头基修饰共载索拉非尼和双硫仑的混合纳米胶束递药系统。其中，普朗尼克可将疏水性药物包裹在胶束内核中；半乳糖可识别ASGPR，把胶束靶向递送到HCC细胞，增加稳定性和体内循环；并联用2种抗肿瘤药物，可提高对肿瘤细胞的毒性作用。测定了不同比例、不同浓度的混合药物对HepG-2细胞和Huh-7细胞的毒性，筛选出最佳协同药物比为索拉非尼-双硫仑(1∶2，*m*/*m*)。以包封率和载药率为指标，采用单因素试验和星点设计-响应面法确定了聚合物胶束的最优工艺为总投药量20.67 mg，总材料量140.54 mg，水化体积8.22 mL，此时胶束的药物包封率大于80%，具有粒径小、分散均匀、外观为球形等优点。通过体外释放试验发现，胶束具有缓释作用，且在肿瘤环境中的释放率远大于在血液中，表明胶束可有效聚集在肿瘤部位，还可防止药物通过血液循环导致全身毒性。可见，该胶束将联合用药和纳米药物递送系统有机结合，提高了对肿瘤细胞的毒性作用。本研究结果为下一步索拉非尼/双硫仑-半乳糖-P123胶束协同治疗HCC的体内外研究建立了基础，未来将进一步验证2种药物联用的优势。

参考文献

[1] TANG XF, ZHANG WC, YE YF, et al. LncRNA HOTAIR Contributes to Sorafenib Resistance through Suppressing miR-217 in Hepatic Carcinoma[J]. BioMed Research International, 2020, 2020: 1-10.
[2] 范芯铷，刘铭佳，王　庆，等. 原发性肝癌的发病机制及治疗进展[J]. 肝脏，2023，28(4)：391-392.
[3] 翁文采，代晓楠，高宏波，等. 榄香烯逆转索拉非尼治疗肝癌耐药的体外研究[J]. 当代医学，2019，25(8)：20-22.
[4] 贺　庆，刘　坤，王超红，等.《原发性肝癌诊疗指南(2022年版)》解读[J]. 西部医学，2023，35(4)：474-479.
[5] 赵彦玉，李凯欣，刘　芳，等. 微小RNA调控肝细胞癌索拉非尼耐药的分子机制[J]. 中国药理学通报，2023，39(7)：1205-1209.
[6] 冯冰玉. 青蒿素联合双硫仑治疗肠癌肝转移的活性研究[D]. 哈尔滨：东北林业大学，2020.
[7] DU RP, SUN FL, LI K, et al. Proteomics Analysis Revealed Smad3 as a Potential Target of the Synergistic Anti-tumor Activity of Disulfiram and Cisplatin in Ovarian Cancer[J]. Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry, 2023, 23(15): 1754-1764.
[8] LU Y, PAN QQ, GAO WX, et al. Leveraging disulfiram to treat cancer: Mechanisms of action, delivery strategies, and treatment regimens[J]. Biomaterials, 2022, 281: 121335.
[9] CHEN C, NIE DR, HUANG YX, et al. Anticancer effects of disulfiram in T-cell malignancies through NPL4-mediated ubiquitin-proteasome pathway[J]. Journal of Leukocyte Biology, 2022, 112(4): 919-929.
[10] 何　越，孙一鸣，涂明洁，等. 双硫仑联合用药抗肿瘤机制研究进展[J]. 包头医学院学报，2022，38(7)：85-91.
[11] LIU FS, MENG L, WANG H, et al. Research on preparation and *in vitro* antitumor activity of redox-responsive polymer micelles co-loaded with sorafenib and curcumin[J]. J Biomater Sci Polym Ed, 2023, 34(16): 2179-2197.
[12] 程　继，王志刚，付　国，等. 姜黄素@普朗尼克纳米胶束抑制前列腺癌PC-3细胞生长实验研究[J]. 陕西医学杂志，2021，50(11)：1340-1344.
[13] 熊晓丰，易小利，周　锐，等. 维生素E琥珀酸酯修饰的普朗尼克P123胶束的初步研究[J]. 华西药学杂志，2020，35(3)：244-248.
[14] 冯荟如，刘艳勤，董　营，等. 还原响应性肝靶向聚合物胶束的制备及其载药性能[J]. 功能高分子学报，2022，35(6)：566-574.
[15] ZHANG CY, LU XC, LIAN CT, et al. Study on galactosylated sodium alginate for enhancing HepG2 Cells adhesion and 3D printability[J]. J Biomater Sci Polym Ed, 2023, 34(12): 1683-1701.
[16] 夏　静. 半乳糖/苯硼酸双配体胶束的肝癌选择性靶向性能研究[D]. 岳阳：湖南理工学院，2022.
[17] 张　东. 双硫仑联合藤黄抑制肠癌肝转移的活性与机制研究[D]. 哈尔滨：东北林业大学，2022.
[18] 任童童，尹东锋. 共载多柔比星与双硫仑Pluronic P123/F127胶束的工艺优化及逆转乳腺癌耐药性的初步研究[J]. 军事医学，2022，46(4)：304-310.
[19] 陈　熙，张馨欣，李菲菲，等. 载盐酸伊立替康的半乳糖修饰脂质-介孔硅核壳纳米粒对肝癌细胞的抑制效果[J]. 药学学报，2014，49(5)：718-725.
[20] 高文慧. 肝肿瘤靶向索拉非尼纳米粒的制备与抗肝癌活性评价[D]. 广州：南方医科大学，2020.
[21] 神华尉. 乳糖酸功能化的Au/Ce/Pt多孔中空纳米酶负载双硫仑靶向缓解肝细胞胰岛素抵抗[D]. 重庆：重庆医科大学，2022.
[22] FAN N, LI Q, LIU Y, et al. Preparation of an HI-6-loaded brain-targeted liposomes based on the nasal delivery route and the evaluation of its reactivation of central toxic acetylcholinesterase[J]. Eur J Pharm Sci, 2023, 184: 106406.
[23] 王　辉，边晨峰. 顺铂联合吉西他滨循环热灌注化疗对肝癌腹腔积液患者恶性肿瘤特异性生长因子、癌胚抗原水平的影响[J]. 中国药业，2021，30(3)：63-65.
[24] 陈德志，陈巧辉，陈惠萍，等. 阿帕替尼在原发性肝癌治疗中的应用研究进展[J]. 中国药业，2019，28(12)：128-131.
[25] 方思远. 肝靶向奥沙利铂与索拉菲尼共载脂质体的制备及体外活性研究[D]. 南京：东南大学，2018.
[26] 付　瑶. 共载紫杉醇和伊曲康唑靶向脂质体的制备及体外抑瘤效果评价[D]. 长春：吉林大学，2021.

(收稿日期：2023-07-14；修回日期：2024-02-01)