

叶酸修饰的长春新碱纳米脂质体的制备及其对人肝、肺癌细胞的作用

寇卫政^{1*}, 杨晓煜², 杨留中¹, 杨丹¹, 姬颖华¹(1.新乡医学院第一附属医院肿瘤科, 河南卫辉 453100; 2.新乡医学院基础医学院病理科, 河南新乡 453003)

中图分类号 R943;R979.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)19-2690-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.19.31

摘要 目的:制备叶酸(FA)修饰的长春新碱(VCR)纳米脂质体(VCR-nLip-FA)并考察其对人肝、肺癌细胞的作用。方法:采用硫酸铵梯度法制备VCR-nLip-FA,考察其粒径分布、Zeta电位、包封率、释放率。以人肝癌HepG2细胞、人肺癌A549细胞为例,比较VCR-nLip-FA和VCR-nLip的细胞摄取率和体外抑制效果(5~80 μg/ml)。结果:VCR-nLip-FA的粒径分布为98.1~159.0 nm,平均粒径为132.2 nm,平均Zeta电位为-40.1 mV,平均包封率为(86.6±3.5)%($n=4$),24 h的累积释放率为(42.2±2.6)%。与VCR-nLip比较,A549细胞对VCR-nLip-FA的摄取率和VCR-nLip-FA对A549细胞活力的抑制作用差异无统计学意义($P>0.05$);HepG2细胞对VCR-nLip-FA的摄取率和VCR-nLip-FA对HepG2细胞活力的抑制作用明显增加($P<0.01$),且抑制作用呈浓度依赖性。结论:所制备的VCR-nLip-FA可高效地将抗癌药物靶向到HepG2细胞,并高效地抑制其生长;但对A549细胞的作用无明显提高。

关键词 叶酸修饰的长春新碱纳米脂质体;肝靶向性;肝癌HepG2细胞;肺癌A549细胞

Preparation of Folic Acid-loaded Vincristine Nano Liposome and Its Effects on Human Liver and Lung Cancer Cells

KOU Weizheng¹, YANG Xiaoyu², YANG Liuzhong¹, YANG Dan¹, JI Yinghua¹(1.Dept. of Oncology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Henan Weihui 453100, China; 2.Dept. of Pathology, School of Basic Medical Sciences, Xinxiang Medical College, Henan Xinxiang 453003, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare folic acid (FA)-loaded vincristine (VCR) nano liposome (VCR-nLip-FA) and to study its effects on human liver and lung cancer cells. METHODS: VCR-nLip-FA was prepared by ammonium sulfate gradient method, and particle size, Zeta-potential, encapsulation rate and release rate were investigated. Taking human liver cancer HepG2 cells and lung cancer A549 cells as example, uptake rate and inhibitory effect *in vitro* (5-80 μg/ml) were compared between VCR-nLip-FA and VCR-nLip. RESULTS: The particle size distribution, average particle size, average Zeta-potential, average encapsulation rate and 24 h accumulative release rate of VCR-nLip-FA were 98.1-159.0 nm, 132.2 nm, -40.1 mV, (86.6±3.5)% ($n=4$) and (42.2±2.6)%. Compared with VCR-nLip, there was no statistical significance in uptake rate of A549 cells to VCR-nLip-FA and inhibitory effect of VCR-nLip-FA on A549 cell viability ($P>0.05$); uptake rate of HepG2 cells to VCR-nLip-FA and inhibitory effect of VCR-nLip-FA on HepG2 cell viability increased significantly ($P<0.01$), in dose-dependent manner. CONCLUSIONS: Prepared VCR-nLip-FA can target anti-tumor drug to HepG2 cells efficiently, and highly inhibit the growth of HepG2 cells. But it has no higher effects on A549 cells.

KEYWORDS Folic acid-loaded vincristine nano liposome; Liver-targeting; Liver cancer HepG2 cells; Lung cancer A549 cells

脂质体(Liposome, Lip)是一种单层或双层磷脂双分子膜形成的球型纳米载体,由于其低毒性和可修饰性,常被用于药物的载体。研究发现,纳米脂质体(Nano liposome, nLip)可以聚集在体内的肿瘤部位,但其靶向性较低^[1-2]。因此在nLip上偶联一些靶向分子,可以有效地改善其靶向性。

叶酸(Folic acid, FA)受体是一种锚定于细胞膜表面的糖蛋白,对FA有着极高的亲和力,其在卵巢癌、晚期乳腺癌、宫颈癌、子宫内膜癌等肿瘤细胞表面过量表达,多分布于上皮细胞表面的胞膜上。FA分子偶联的药物能在FA靶向探头引导的作用下特异性地结合到该类细胞的表面,从而达到肿瘤药物靶向治疗的目的^[3-5]。

长春新碱(Vincristine, VCR)是从夹竹桃科植物长春花中提取出来的生物碱,具有良好的抗肿瘤作用^[6-7],但临床使用中其具有体内滞留时间短、易引发肝脾肾的毒副作用。研

究者常通过改变剂型来达到增效减毒的目的^[8]。本研究利用带有FA靶头的空白nLip包裹VCR制备成FA修饰的VCR-nLip(VCR-nLip-FA),以人肝癌HepG2细胞、人肺癌A549细胞为研究对象,考察其对人肝、肺癌细胞的作用。

1 材料

1.1 仪器

CX41-12C02普通光学显微镜(日本Olympus公司);LSM 510 system激光共聚焦显微镜(德国Zeiss公司);CytoFLEX流式细胞仪(美国Beckman公司);ELx800酶标仪(美国Bio-Tek公司);Zetasizer APS激光纳米粒度仪(英国马尔文仪器有限公司);紫外分光光度计(瑞士Mettler Toledo公司)。

1.2 药品与试剂

VCR(南京凯基生物科技发展有限公司,批号:KGA8252,纯度:≥95%);胎牛血清(FBS)、DMEM细胞培养基(美国Gibco公司);聚乙二醇修饰的FA分子(DSPE-PEG-FA,北京盛科博源生物科技发展有限公司,批号:PG2-DSFA-2k);鞘磷脂和胆

* 主治医师,硕士。研究方向:消化道肿瘤综合治疗。电话:0373-4402108。E-mail:kouweizheng@163.com

固醇(美国 Sigma 公司);硫酸铵(上海阿拉丁生化试剂公司);透析袋(美国 Spectrum 公司,截留分子量:1 000)。

1.3 细胞

人肝癌 HepG2 细胞、人肺癌 A549 细胞均购于上海细胞库。

2 方法

2.1 nLip-FA 的制备

2.1.1 空白 nLip-FA 的制备 采用硫酸铵梯度法制备 nLip。第一步制备有机相:取鞘磷脂 39 mg(54.9 nmol)、胆固醇 15 mg(38.8 nmol)、DSPE-PEG-FA 12 mg(4.2 nmol),置于 1.5 ml EP 管中,加热溶解于 0.40~0.5 ml 的乙醇溶液(65 ℃)中,涡旋均匀,吸至 1 ml 注射器中,65 ℃水浴 5 min。第二步制备水相:取 5 ml 的 250 mmol/L 的硫酸铵溶液(不调 pH)于小烧杯中,65 ℃加热条件下磁力搅拌。最后用注射器,缓慢将有机相注入水相中(液面下均匀注射 20 s),形成 nLip。在 65 ℃条件下,15 min 蒸发除去残余乙醇,再透析除去残余的硫酸铵,得到空白 nLip-FA。

2.1.2 VCR-nLip-FA 的制备 将预先配好的 5 mg/ml VCR 水溶液加入到空白 nLip-FA 溶液中,使终质量浓度为 2 mg/ml,于 60 ℃水浴中 20 min,透析去除游离 VCR,得到 VCR-nLip-FA。

2.2 粒径和 Zeta 电位的检测

用去离子水稀释 VCR-nLip-FA 溶液,加至样品杯中,用激光纳米粒度仪重复检测粒径 3 次。同种样品放到 Zeta 电位检测皿中,重复检测溶液的 Zeta 电位 3 次。同种样品 VCR-nLip-FA 溶液放置在 4、25、37 ℃的环境中 7 d,每天检测其粒径,观察粒径变化,每天重复检测 4 次。

2.3 包封率的检测

利用紫外分光光度计检测 VCR 吸光度,绘制标准曲线。准确称取 10 mg 的 VCR 溶于 1 ml 的去离子水中,稀释至 1 mg/ml,然后等比稀释至 0.5、0.25、0.125、0.062 5 mg/ml。采用紫外分光光度计在 270 nm 波长处测定吸光度(A),以 A 为纵坐标、质量浓度(c)为横坐标绘制标准曲线。利用标准曲线的公式计算 nLip 中 VCR 的浓度,按公式计算 VCR 的包封率[包封率(%)=脂质体中包封的药物量/投入的药物总量×100%]。

2.4 体外释放率的检测

取 5 ml 的 VCR-nLip-FA 溶液放入透析袋中,透析袋放入 1 L 的磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)中,在 37 ℃透析。分别于 1、2、4、8、12、24、48 h 取样 0.1 ml,并补加同温同体积的 PBS。用紫外分光光度法测定透析液中 VCR 的含量,计算释放率(%)=($m_{总}-m_{剩}$)/ $m_{总}$ ×100%($m_{总}$:投入 VCR 的总质量; $m_{剩}$:剩余 VCR 的总质量)。

2.5 体外细胞靶向性的考察

取处于对数生长期的 HepG2、A549 细胞于共聚焦培养皿中,密度为 10^5 个/ml,培养 24 h 后,分别加入 20 μg/ml 用异硫氰酸酯荧光染料(FITC)标记的 VCR-Lip-FA 和 VCR-Lip(FITC-VCR-nLip-FA 和 FITC-VCR-nLip),再孵育 3 h,加入 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)标记细胞核,用 PBS 清洗掉细胞外纳米颗粒,然后加入适量 PBS。在激光共聚焦显微镜下观察细胞中 FITC 的荧光,并采用流式细胞仪检测细胞中 FITC 的荧光信

号,并进行统计学分析。整个试验在避光环境下进行,每个试验重复 3 次。

2.6 体外细胞活力的考察

分别取处于对数生长期的 HepG2、A549 细胞于 96 孔板中,每孔加入 100 μl 含血清培养基细胞悬液,细胞密度为 40 000 个/ml,于 37 ℃、5% CO₂ 细胞培养箱中过夜培养。取 0、5、10、20、40、80 μg/ml(以 VCR 为计)的 VCR-nLip-FA、VCR-nLip、空白 nLip(0、50、100、150、200 μg/ml)和单独的 VCR 溶液加入到 96 孔板中,每个药物 4 个平行孔,37 ℃下孵育 24 h 后,将含药培养基吸出,然后加入含 10 μl CCK-8 试剂的新鲜培养基,避光,37 ℃下孵育 30 min。用酶标仪测定 450 nm 波长处 CCK-8 的吸光度(A),计算细胞活力,细胞活力(%)=($A_{加药}-A_{空白}$)/($A_{未加药}-A_{空白}$)×100%。

2.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 粒径和 Zeta 电位

结果显示,VCR-nLip-FA 的平均粒径为 132.2 nm,分布在 98.1~159 nm 之间,最大 Zeta 电位为 -40.1 mV,说明其具有很好的水溶性。VCR-nLip-FA 在 4、25、37 ℃下放置 7 d,粒径几乎没有较大波动,保持在 130 nm 左右。VCR-nLip-FA 的粒径分布见图 1,Zeta 电位分布见图 2,不同温度下 7 d 内粒径变化见表 1。

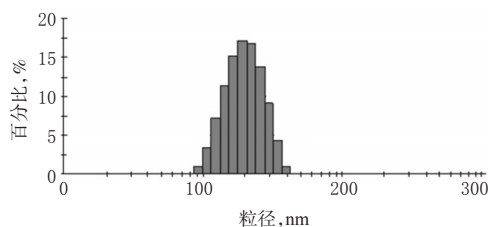


图 1 VCR-nLip-FA 的粒径分布

Fig 1 Particle size distribution of VCR-nLip-FA

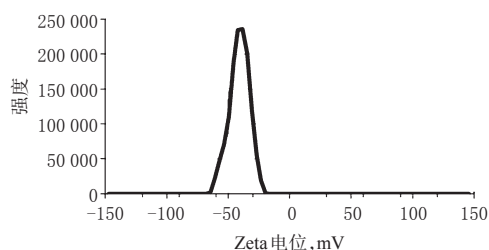


图 2 VCR-nLip-FA 的 Zeta 电位分布

Fig 2 Zeta-potential distribution of VCR-nLip-FA

3.2 包封率

结果显示,VCR 的标准曲线为 $A = 1.661c - 0.0358$ ($r = 0.9994$),VCR-nLip-FA 中 VCR 的包封率为 $(86.6 \pm 3.5)\%$ ($n = 4$)。

表 1 VCR-nLip-FA 在不同温度下 7 d 内粒径变化($n = 4, nm$)

Tab 1 Changes of particle size of VCR-nLip-FA under different temperatures for 7 days($n = 4, nm$)

| 温度, ℃ | 0 d | 1 d | 2 d | 3 d | 4 d | 5 d | 6 d | 7 d |
|-------|--------------|--------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 4 | 130.2 ± 13.2 | 130.9 ± 11.1 | 136.5 ± 4.9 | 134.2 ± 7.1 | 131.2 ± 14.5 | 134.4 ± 12.2 | 132.9 ± 7.6 | 132.9 ± 9.8 |
| 25 | 129.4 ± 7.9 | 133.6 ± 8.8 | 135.2 ± 5.6 | 132.9 ± 7.2 | 134.5 ± 13.8 | 128.9 ± 11.2 | 133.1 ± 10.2 | 135.4 ± 8.9 |
| 37 | 133.9 ± 10.2 | 136.1 ± 6.9 | 132.6 ± 8.2 | 133.1 ± 8.5 | 136.9 ± 9.9 | 137.8 ± 5.6 | 138.9 ± 12.5 | 139.7 ± 12.1 |

3.3 体外释放率

结果显示,37℃下,VCR可以缓慢地从VCR-nLip-FA中释放出来,1~7h时释放速率最大,在第7h的累积释放率达(37.6±1.2)%($n=4$)。随着时间的增长,累积释放率缓慢增加,第24h的累积释放率为(42.2±2.6)%($n=4$)。VCR-nLip-FA的累积释放曲线见图3。

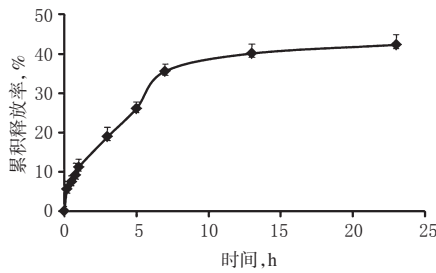


图3 VCR-nLip-FA的累积释放曲线

Fig 3 Cumulative release curve of VCR-nLip-FA

3.4 体外细胞靶向性

激光共聚焦显微镜结果显示,与VCR-nLip比较,VCR-nLip-FA可以被HepG2细胞高效地摄取($P<0.01$),摄取率分别为(8.7±4.2)%、(56.9±3.4)%($n=4$)。而A549细胞对VCR-nLip和VCR-nLip-FA的摄取率差异不大,分别为(9.7±4.9)%、(14.6±2.9)%($n=4$),原因可能是A549细胞为表面FA受体阴性细胞,FA分子可以高效地与FA受体结合而被细胞摄取,因此对A549细胞的摄取效果不明显。HepG2、A549细胞对VCR-nLip-FA和VCR-nLip的细胞摄取激光共聚焦显微镜图见图4。

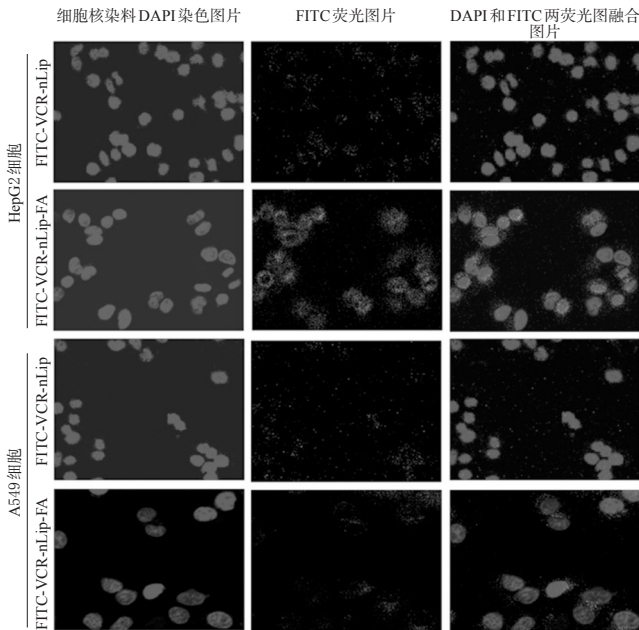


图4 HepG2、A549细胞对VCR-nLip-FA和VCR-nLip的细胞摄取激光共聚焦显微镜图

Fig 4 The uptake of HepG2 and A549 cells to VCR-nLip-FA and VCR-nLip by confocal microscopy

3.5 细胞抑制作用

结果显示,0~200 μg/ml的空白nLip对HepG2、A549细胞均没有明显毒性;随着VCR质量浓度的增加,VCR、VCR-nLip和VCR-nLip-FA作用后HepG2、A549细胞活力逐渐降低,其中VCR-nLip-FA效果较VCR-nLip更明显($P<0.01$),但是对A549

细胞的作用差异无统计学意义($P>0.05$)。不同nLip对HepG2、A549细胞活力的作用见图5。

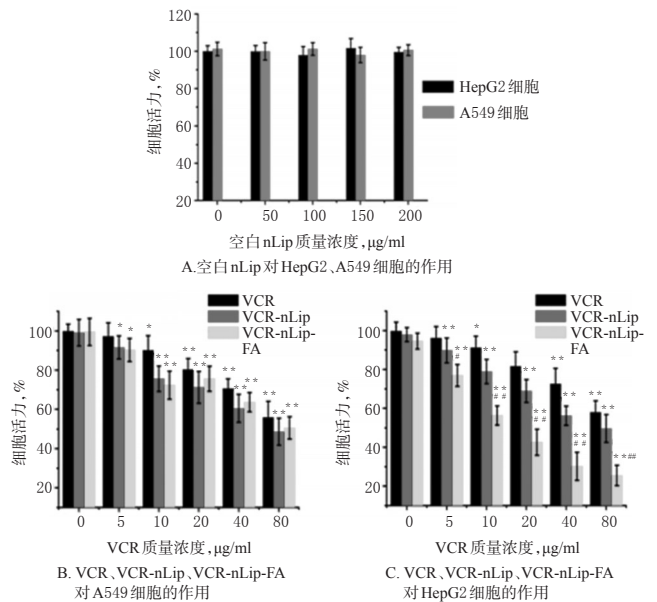


图5 不同nLip对HepG2、A549细胞活力的影响

注:与0 μg/ml比较,* $P<0.05$,** $P<0.05$;与VCR-nLip比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$

Fig 5 Effect of different nLip on HepG2 and A549 cells viability

Note: vs. 0 μg/ml,* $P<0.05$,** $P<0.05$; vs. VCR-nLip,# $P<0.05$,## $P<0.01$

4 讨论

Lip是一种人工模拟的单层或双层脂质分子层,其球形结构的内外表面为亲水层,中间为疏水层,其中内部的亲水区域可以携带亲水性药物,而疏水层可以插入疏水性药物^[9-10]。Lip外表面可以修饰以多种功能团,如靶向基团、发光基团等^[1]。当其进入体内后,会随着体内循环系统游动,在循环过程中,靶向分子可以将Lip药物靶向聚集到靶点,这样可以对病灶部位实施定向杀伤,从而降低药物使用剂量和对人体正常体细胞的毒副作用。FA是细胞表面FA受体的特异性配体,当FA受体过量表达的细胞周围存在FA分子偶联的药物时,随着FA分子与胞膜上FA受体的结合,FA分子所偶联的药物同时被胞吞进入细胞内,并在胞内酸性环境下与FA受体解离而被释放入胞内,达到靶向传递药物的目的^[11]。

目前已上市的长循环Lip制剂如盐酸多柔比星隐形脂质体、顺铂长循环Lip、奥沙利铂长循环Lip^[12-13],这些Lip药物已表现出优于普通Lip的特征,达到增效减毒的目标,但此类制剂仍属于被动靶向,没有主动靶向的能力。

本研究采用硫酸铵梯度法制备了nLip颗粒,包被了抗癌药物VCR,并在nLip外表面修饰以FA分子。经过表征,本方法制备的VCR-nLip-FA具有很好的稳定性和生物相容性。这为脂质体药物的生物医学应用奠定了基础。靶向试验表明,VCR-nLip-FA可以被HepG2细胞高效摄取,而被A549细胞摄取的很少,HepG2细胞是FA受体过表达的细胞系,而A549细胞是FA受体低表达的细胞系。由此说明FA确实可以高效靶向结合细胞表面的FA受体。体外细胞活性抑制效果进一步表明了FA的高效靶向性。

综上所述,本研究成功制备了VCR-nLip-FA,其对肝癌

还原响应型高载药量普朗尼克F127聚合物胶束的制备

串星星^{1*}, 印亚双¹, 王学清^{2#} (1. 北京大学国际医院, 北京 102206; 2. 北京大学药学院药剂学系, 北京 100191)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)19-2693-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.19.32

摘要 目的: 制备还原响应型高载药量普朗尼克F127聚合物胶束。方法: 对普朗尼克F127的疏水段引入甲基丙烯酸叔丁酯和半胱胺, 合成强疏水性的巯基化衍生物F127-SH。利用薄膜水化法和巯基的氧化反应, 制备载紫杉醇(PTX)的还原响应型高载药量普朗尼克F127聚合物胶束(F127-SS/PTX), 检测其粒径、包封率、载药量, 考察其在还原和非还原环境下的粒径变化和释药行为。结果: 该胶束的平均粒径为(77.87±1.79) nm, 包封率为(92.73±2.35)%, 载药量为(16.25±0.99)%; 在10 mmol/L二巯苏糖醇作用下, 其粒径迅速增大, PTX释药速度显著增加。结论: 成功制得还原响应型高载药量普朗尼克F127聚合物胶束。

关键词 还原响应; 载药量; 聚合物胶束; 普朗尼克F127; 紫杉醇

Preparation of Redox-responsive Pluronic F127 Micelles with High Drug-loading Efficiency

CHUAN Xingxing¹, YIN Yashuang¹, WANG Xueqing² (1. Peking University International Hospital, Beijing 102206, China; 2. Dept. of Pharmaceutics, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare redox-responsive pluronic F127 micelles with high drug-loading efficiency. METHODS: The thiol derivative F127-SH with strong hydrophobicity was synthesized by introducing tert-butyl methacrylate and cysteamine to the hydrophobic segments of F127. Paclitaxel (PTX)-loaded redox-responsive pluronic F127 micelles with high drug-loading efficiency (F127-SS/PTX) were prepared by film-hydration method as well as oxidation reaction of thiol groups. The diameter, encapsulation efficiency and drug-loading amount were detected, and the change of diameter and drug release behavior of micelles were investigated under reducing environment or non-reducing environment. RESULTS: Mean diameter of F127-SS/PTX micelles was about (77.87±1.79) nm, and encapsulation efficiency and drug-loading amount were (92.73±2.35)% and (16.25±0.99)%, respectively. The diameter of the micelles increased rapidly and drug release rate of PTX increased significantly in the presence of 10 mmol/L dithiothreitol. CONCLUSIONS: The redox-responsive pluronic F127 micelles with high drug-loading efficiency are prepared successfully.

KEYWORDS Redox-responsive; Drug-loading amount; Polymeric micelles; Pluronic F127; Paclitaxel

HepG2细胞具有高效的靶向性, 并高效地抑制细胞生长, 但对A549细胞的作用无明显提高。

参考文献

- [1] 蒋雯, 田吉来, 丁晨静, 等. 双重修饰的主动靶向脂质体研究进展[J]. 药学研究, 2014, 33(8): 469.
- [2] 张佳斌, 任岳波, 任辉, 等. 转铁蛋白修饰脂质体的制备及其肝癌靶向性研究[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(35): 6 810.
- [3] Marchetti C, Palaia I, Giorgini M, et al. Targeted drug delivery via folate receptors in recurrent ovarian cancer: a review[J]. *Oncotargets & Therapy*, 2014, 7(6): 1 223.
- [4] 黄英男, 吴昊, 沈锡中. 叶酸受体在肿瘤靶向诊断和治疗中的应用[J]. 复旦大学学报: 医学版, 2012, 39(1): 74.
- [5] 沈丹华, 谢俊玲, 张银丽, 等. 叶酸受体 α 在卵巢上皮性肿瘤中的表达[J]. 中华病理学杂志, 2010, 39(11): 747.
- [6] Stefanadis C, Toutouzas K, Syntetos A, et al. Chemical denervation of the renal artery by vincristine in swine: a

* 药师, 硕士。研究方向: 新型药物输送系统。E-mail: chuanxx-star@126.com

通信作者: 副教授, 博士。研究方向: 新型药物输送系统。电话: 010-82801584。E-mail: wangxq@bjmu.edu.cn

new catheter based technique[J]. *International Journal of Cardiology*, 2013, 167(2): 421.

- [7] 李文静, 杨志强, 王杏林. 硫酸长春新碱脂质体研究进展[J]. 中国新药杂志, 2012, 21(13): 1 479.
- [8] 李慧, 张志岳, 孙萍. 固体脂质纳米粒用于细胞毒性药物传递系统综述的研究进展[J]. 中国药房, 2013, 24(9): 848.
- [9] 袁松, 孙会敏, 丁丽霞. 脂质体物理化学稳定性研究进展[J]. 中国药事, 2011, 25(4): 384.
- [10] 王生, 王化泉, 王汉杰, 等. 抗肿瘤药物长循环高分子脂质体的研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2013, 40(10): 1 063.
- [11] 王中领, 郭亮. 叶酸受体介导的肿瘤靶向成像及靶向给药系统的研究进展[J]. 临床放射学杂志, 2014, 33(1): 143.
- [12] 杨闯, 刘海忠, 傅仲学. 奥沙利铂长循环脂质体对人结肠癌SW480细胞凋亡影响[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(4): 368.
- [13] 汪小乐, 简晓顺, 庞廷媛, 等. 叶酸偶联壳聚糖载多西他赛纳米粒的制备[J]. 中国药房, 2014, 25(29): 2 740.

(收稿日期: 2015-11-26 修回日期: 2016-03-11)

(编辑: 邹丽娟)