

RGD 肽修饰的异长春花碱-粉防己碱脂质体的制备及体外抑瘤作用研究^Δ

居瑞军^{1*}, 王晓敏², 晁建平¹, 程 岚², 李学涛^{2#} (1.北京石油化工学院制药工程系, 北京 102617; 2.辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

中图分类号 R943;R979.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)25-3549-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.25.25

摘 要 目的:制备RGD肽修饰的异长春花碱(VRB)-粉防己碱(TET)脂质体,研究其对脑胶质瘤C6细胞的抑制作用。方法:采用薄膜分散法和硫酸铵梯度法制备RGD肽修饰的VRB-TET脂质体,观察其形态和粒径分布,测定其中VRB的含量;以磺酰罗丹明B法分别测定空白靶向脂质体、VRB普通脂质体和RGD肽修饰的VRB-TET脂质体对C6细胞的抑制作用。结果:所制RGD肽修饰的VRB-TET脂质体呈圆球状或类圆球状,表面光滑,粒径为120 nm左右,其中VRB的平均含量为28.27 μg/mL (RSD=0.38%, n=3)。空白靶向脂质体对C6细胞生长无显著影响;RGD肽修饰的VRB-TET脂质体能明显抑制C6细胞生长,其作用后细胞存活率明显低于VRB普通脂质体(P<0.05)。结论:成功制得RGD肽修饰的VRB-TET脂质体,其具有明显的抑制C6细胞生长的作用。

关键词 RGD肽;异长春花碱;粉防己碱;脂质体;体外抑瘤作用

Preparation of Vinorelbine-tetrandrine Liposomes Modified with RGD and Study on the *in vitro* Antitumor Effect

JU Ruijun¹, WANG Xiaomin², CHAO Jianping¹, CHENG Lan², LI Xuetao² (1.Dept. of Pharmaceutical Engineering, Beijing Institute of Petrochemical Technology, Beijing 102617, China; 2.School of Pharmacy, Liaoning University of TCM, Liaoning Dalian 116600, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To prepare the vinorelbine-tetrandrine liposomes modified with RGD, and study the inhibitory effect on glioma C6 cells. **METHODS:** Film dispersion method and ammonium sulfate gradient method were used to prepare the vinorelbine-tetrandrine liposomes modified with RGD, and the morphology and particle size distribution were observed. The vinorelbine content was determined, and sulforhodamine B method was used to respectively determine the inhibitory effects of blank targeting liposomes, normal vinorelbine liposomes and vinorelbine-tetrandrine liposomes modified with RGD on C6 cells. **RESULTS:** The prepared vinorelbine-tetrandrine liposomes modified with RGD were spherical or almost spherical with smooth surface, and particle size was about 120 nm. The average content of vinorelbine was 28.27 μg/mL (RSD=0.38%, n=3). Blank targeting liposomes had no significant effect on the growth of C6 cells; vinorelbine-tetrandrine liposomes modified with RGD can obviously inhibit the growth of C6 cells, and cell viability after its effect was significantly lower than normal vinorelbine liposomes (P<0.05). **CONCLUSIONS:** Vinorelbine-tetrandrine liposomes modified with RGD are successfully prepared, and they show obvious inhibitory effects on the growth of C6 cells.

KEYWORDS RGD; Vinorelbine; Tetrandrine; Liposomes; *in vitro* antitumor effect

异长春花碱(Vinorelbine, VRB)是从长春花[Catharathus roseus (L) G.Don]中提取的一种半合成生物碱。作为细胞周期特异性抗肿瘤药物,VRB主要作用于细胞增殖周期的G₁、S及M期^[1],并可通过与微管蛋白结合抑制微管聚合,使分裂的细胞不能形成纺锤体而终止细胞

分裂,从而起到抑制细胞增殖的作用^[2]。VRB在临床上主要用于非小细胞肺癌、急性淋巴细胞白血病、转移性乳腺癌、软组织肉瘤及神经母细胞瘤等多种肿瘤的治疗^[3-5]。脂质体具有类似生物细胞的结构,可增强药物的肿瘤靶向性,降低药物的治疗剂量,减少药物的毒副作用。肿瘤的多药耐药性(Multidrug resistance, MDR)是指肿瘤细胞对一种抗肿瘤药物产生耐药性的同时,对结构和作用机制不同的抗肿瘤药物产生交叉耐药性的现象^[6]。MDR的出现是导致肿瘤难以被彻底治愈的主要原因。粉防己碱(Tetrandrine, TET)又名汉防己甲素,是

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81673603, 81541081);辽宁省教育厅重点实验室基础研究项目(No.LZ2015053)
* 讲师。研究方向:药物新制剂与新剂型。E-mail:juruijun@bipt.edu.cn
通信作者:教授。研究方向:新型给药系统。E-mail:lixuetao1979@163.com

从中药粉防己中提取而来一种双苄基异喹啉类生物碱,具有镇痛、抗炎、降血压等作用^[7]。有研究显示,TET有很好的抑制肿瘤MDR的作用^[8]。RGD肽是含有精氨酸-甘氨酸-门冬氨酸(Arg-Gly-Asp)序列的一类短肽,能与肿瘤细胞表面的整合素受体 $\alpha v \beta_3$ 特异性结合,对肿瘤细胞具有靶向性^[9]。基于此,笔者采用薄膜分散法和硫酸铵梯度法将VRB脂质体通过RGD肽和TET进行修饰制备成RGD肽修饰的VRB-TET脂质体,并研究其对脑胶质瘤C6细胞的抑制作用,以期增加脂质体的主动靶向性能,并降低肿瘤细胞对VRB的MDR。

1 材料

1.1 仪器

20AT液相色谱仪和AY220电子分析天平(日本岛津公司);Anke TDL-500B离心机(上海安亭科学仪器厂);RE-52AA旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);脂质体挤出仪(上海阳溢生物科技有限公司);Mastersizer 2000粒径分析仪(英国Malvern公司);JEM-2000EX透射电子显微镜(日本电子公司)。

1.2 药品与试剂

VRB原料药(批号:MB20886,纯度: $>98\%$)、VRB对照品(批号:MB1263,纯度: 99.50%)、TET原料药(批号:MB6635,纯度: $>98\%$)均购自大连美仑生物技术有限公司;卵磷脂(日本NOF公司,批号:120015);二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000(DSPE-PEG 2000,日本精化株式会社,批号:B10206,相对分子量:2 800.5);胆固醇(上海普迈生物科技有限公司,批号:8280100);RGD肽(上海吉尔生化有限公司,批号:052305);DSPE-PEG 2000-RGD(辽宁中医药大学实验室合成);乙醇、甲醇、氯仿、乙腈、磷酸等均为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

1.3 细胞

C6细胞(中国医学科学院肿瘤研究所)。

2 方法与结果

2.1 RGD肽修饰的VRB-TET脂质体和VRB普通脂质体的制备

分别精密称取卵磷脂、胆固醇、DSPE-PEG 2000、TET和DSPE-PEG 2000-RGD适量(20:8:4:3:2.5, $m/m/m/m/m$)于圆底烧瓶中,加入适量氯仿超声使溶解,40℃水浴中旋转蒸发除去氯仿,形成一层均匀的脂膜;加入适量250 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 水溶液,冰浴中超声使之水化,形成均匀的乳白色粗脂质体;然后超声10 min(工作时间10 s,间歇时间10 s,保护温度35℃,功率200 W),即得脂质体溶液;将超声后的脂质体溶液依次挤压通过孔径为400、200 nm的聚碳酸酯膜各2次,即得空白靶向脂质体。将空白靶向脂质体密封于透析袋(截留分子量:10 000~12 000)中,磷酸盐缓冲液(PBS)中透析24 h,每8 h更换1次透析液。另精密称取0.15 mg的VRB于圆底烧瓶中,加入甲醇适量超声使其溶解,旋转蒸发除去

甲醇形成一层药膜,将透析后的空白靶向脂质体加入到圆底烧瓶内(药脂比为1:15, m/m),40℃水浴中振摇30 min,即得RGD肽修饰的VRB-TET脂质体。按上述方法制备不加入TET和DSPE-PEG 2000-RGD的VRB普通脂质体。

2.2 VRB的含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Diamonsil C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.06 mol/L KH_2PO_4 水溶液(38:62, V/V ,含0.3%三乙胺,用磷酸调pH至4.0);流速:1.0 mL/min;柱温:30℃;检测波长:267 nm;进样量:20 μL 。理论板数按VRB计不低于3 000。

2.2.2 供试品溶液和空白溶液的制备 精密量取RGD肽修饰的VRB-TET脂质体或空白靶向脂质体1 mL,置于10 mL量瓶中,加入甲醇超声破乳,定容,用0.45 μm 的微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 VRB系列对照品溶液的制备 精密称取VRB对照品0.26 mg,加甲醇溶解并稀释成质量浓度为2.6、6.5、9.1、13.0、19.5、26.0 $\mu\text{g/mL}$ 的VRB系列对照品溶液,用0.45 μm 的微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 系统适用性试验 取VRB对照品溶液(13.0 $\mu\text{g/mL}$)、空白溶液和供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱。结果表明,空白靶向脂质体对VRB的测定无干扰,色谱图见图1。

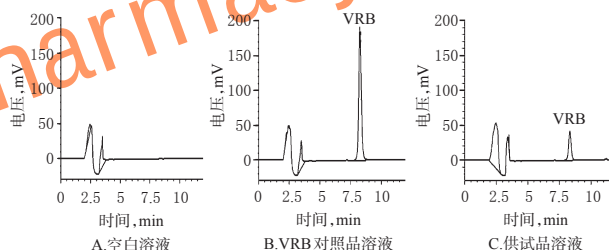


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.2.5 线性关系考察 取VRB系列对照品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以VRB质量浓度为横坐标(x)、对应的峰面积为纵坐标(y)进行线性回归,得回归方程 $y=53\ 006x-20\ 724$ ($r=0.999\ 8$)。结果表明,VRB质量浓度在2.6~26.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。

2.2.6 精密度试验 取13.0 $\mu\text{g/mL}$ 的VRB对照品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件平行进样5次,记录峰面积。结果VRB峰面积的RSD=0.48% ($n=5$),表明精密度良好。

2.2.7 重复性试验 取同一供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件平行进样5次,记录峰面积。结果VRB峰面积的RSD=0.73% ($n=5$),表明方法重复性良好。

2.2.8 稳定性试验 将供试品溶液分别放置0、2、4、8、12 h后,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果VRB峰面积的RSD=0.55% ($n=5$),表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

2.2.9 加样回收率试验 精密量取空白靶向脂质体 1 mL,置于 10 mL 量瓶中,加 26.0 μg/mL 的 VRB 对照品溶液 1 mL,加甲醇超声破乳,定容至刻度。按“2.2.1”项下色谱条件平行进样 6 次,记录峰面积,计算加样回收率。结果平均加样回收率为 97.69% (RSD=0.72%, n=6)。

2.2.10 含量测定 精密量取 3 个批次 RGD 肽修饰的 VRB-TET 脂质体各 3 份,每份 1.0 mL,按“2.2.2”项下方法制备成供试品溶液后,进样测定,计算 VRB 的含量。结果 3 个批次 RGD 肽修饰的 VRB-TET 脂质体中 VRB 的含量分别为 28.12、28.31、28.38 μg/mL,平均含量为 28.27 μg/mL (RSD=0.38%, n=3)。

2.3 RGD 肽修饰的 VRB-TET 脂质体的表征

2.3.1 透射电子显微镜观察 取少量的 RGD 肽修饰的 VRB-TET 脂质体,按文献[10]中的方法处理样品后,于 JEM-2000EX 透射电子显微镜下观察其形态。结果显示, RGD 肽修饰的 VRB-TET 脂质体呈圆球状或类圆球状,表面光滑。透射电子显微镜图见图 2。

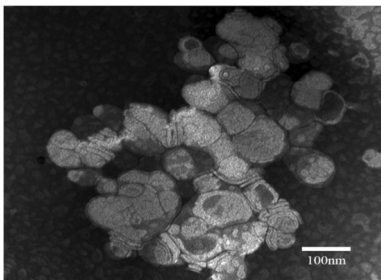


图 2 RGD 肽修饰的 VRB-TET 脂质体的透射电子显微镜图

Fig 2 Transmission electron microscopy of vinorelbine-tetrandrine liposomes modified with RGD

2.3.2 粒径分布的测定 精密量取 RGD 肽修饰的 VRB-TET 脂质体 0.5 mL,以 5% 葡萄糖注射液稀释至 20 mL,以乳滴的个数作为基准,用 Mastersizer 2000 粒径分析仪测定其粒径。结果显示, RGD 肽修饰的 VRB-TET 脂质体的粒径为 120 nm 左右,呈单峰正态分布。粒径分布图见图 3。

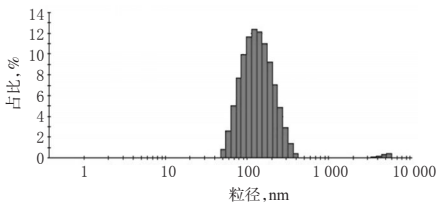


图 3 RGD 肽修饰的 VRB-TET 脂质体的粒径分布图
Fig 3 Particle size distribution of vinorelbine-tetrandrine liposomes modified with RGD

2.4 RGD 肽修饰的 VRB-TET 脂质体对 C6 细胞的抑制作用评价

2.4.1 细胞形态学观察 将新制备的空白靶向脂质体、VRB 普通脂质体及 RGD 肽修饰的 VRB-TET 脂质体,均

用培养液分别稀释成 0.04、0.1 μmol/L。取对数生长期的 C6 细胞,接种于 96 孔板,待细胞融合度达 80% 左右时,分别加入含上述脂质体的培养液,孵育 48 h 后,倒置显微镜下观察细胞的生长状态;以培养液为空白对照。C6 细胞的生长状态显微镜图见图 4。

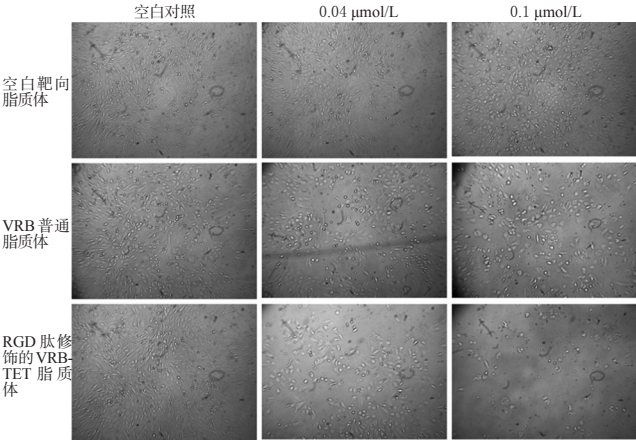
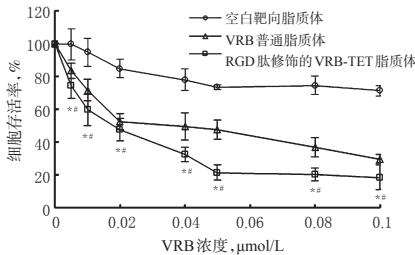


图 4 C6 细胞的生长状态显微镜图 (×20)
Fig 4 Microscope figure of growth state of C6 cells (×20)

由图 4 显示,未给药时, C6 细胞贴壁生长,呈菱形或长条形生长,细胞间隙均匀,排列整齐,轮廓清晰;加入空白脂质体后, C6 细胞生长状态无明显变化;加入 VRB 普通脂质体后, C6 细胞数量减少,且药物浓度越大,细胞减少越多;加入 RGD 肽修饰的 VRB-TET 脂质体后, C6 细胞的生长状态变差,细胞数量明显减少,且药物浓度越大,细胞减少越多。

2.4.2 细胞毒性试验 取对数生长期的 C6 细胞,接种于 96 孔板中,设 6 个复孔,孵育 24 h 后,分别给加入空白靶向脂质体、VRB 普通脂质体及 RGD 肽修饰的 VRB-TET 脂质体,使 VRB 的最终浓度为 0.005、0.01、0.02、0.04、0.05、0.08、0.1 μmol/L。给药后的细胞继续孵育 48 h,然后采用磺酰罗丹明 B (SRB) 法测定 C6 细胞存活率,细胞存活率=药物处理后的吸光度值 A_{540 nm}/空白对照孔的吸光度值 A_{540 nm}×100%。C6 细胞的生存曲线见图 5。



注:与空白靶向脂质体比较, *P<0.05;与 VRB 普通脂质体比较, #P<0.05
Note: vs. blank targeting liposomes, *P<0.05; vs. vinorelbine liposomes, #P<0.05

图 5 C6 细胞的生存曲线
Fig 5 Survival curves of C6 cells

由图5显示,各脂质体对C6细胞增殖的抑制能力强弱为:RGD肽修饰的VRB-TET脂质体>VRB普通脂质体>空白靶向脂质体。空白靶向脂质体对C6细胞表现出极微弱的抑制作用,表明制备脂质体的各种原料对C6细胞增殖无影响。与空白靶向脂质体与VRB普通脂质体比较,RGD肽修饰的VRB-TET脂质体能明显抑制C6细胞生长($P<0.05$),提示C6细胞对RGD肽修饰的VRB与TET脂质体的摄取量增加,从而使不同浓度下RGD肽修饰的VRB-TET脂质体对C6细胞都有明显的抑制作用。这是由于RGD肽修饰的VRB-TET脂质体表面的RGD肽与C6细胞表面的整合素受体特异性结合,从而增加了RGD肽修饰的VRB-TET脂质体对C6细胞的主动靶向性从而显著提高了其对C6细胞的抑制作用。

3 讨论

脂质体是由具有类脂质双分子层结构的物质形成的具有类生物膜结构的超微囊,可包裹水溶性和脂溶性药物。作为药物递送载体,脂质体粒径通常在50~450 nm之间,可以利用实体瘤的高通透性和滞留效应自动蓄积于肿瘤部位,表现出肿瘤靶向性,从而有效降低由于药物全身分布引起的系统毒性,减少药物的不良反应。脂质体脂材具有良好的细胞亲和性和组织相容性,且本身无毒性,因此脂质体制剂在肿瘤治疗方面受到越来越多的关注^[11-12]。然而,普通脂质体很容易被体内网状内皮系统吞噬,使到达靶部位的药物减少,治疗效果降低。为了能够使这些微粒逃脱网状内皮系统的识别和清除^[13],可以在脂质体的表面修饰一层“保护膜”,一般用PEG修饰。修饰后的脂质体不仅减少了网状内皮系统的吸收,还延长了其在体循环中的滞留时间,提高了药物的治疗效果,增强了药物的靶向性和稳定性。

脑胶质瘤是由神经外胚层分化而来的肿瘤,是中枢神经系统最常见的原发性恶性肿瘤,在颅内肿瘤中发病手术切除率位于第一。随着医学科学的进步,临床逐渐形成了以手术切除为基础,放疗、化疗等疗法相结合的抗肿瘤综合治疗方案^[14-15]。尽管治疗技术有了长足进步,但由于脑胶质瘤呈浸润性生长,表现出难治性、预后性差、易局部播散和复发等缺点^[16];长期使用化疗药又容易产生耐药性,一旦形成MDR,将严重影响多数化疗方案的治疗效果,贻误治疗时机。肿瘤细胞耐药类型大致可分为内源性耐药和获得性耐药,前者是肿瘤细胞化疗前就存在的对某种化疗药或多种化疗药物无反应性,后者则是化疗诱导的耐药性^[17-18]。

本研究以磷脂、胆固醇、DSPE-PEG 2000为基本膜材制备脂质体,加入的胆固醇与磷脂结合后能阻止磷脂凝结成晶体;将DSPE-PEG 2000作为脂质体的亲水基修饰材料,可阻止脂质体被血液中的调理素识别,降低网状内皮系统对脂质体的亲和力,从而延长药物在体内的滞留时间、提高靶向性;将TET包裹在脂质体双分子层

中,可抑制肿瘤的MDR,提高肿瘤对抗肿瘤药物的敏感度;将VRB作为抗肿瘤药物包封在脂质体水相中,可诱导肿瘤细胞的凋亡;RGD肽修饰在磷脂材料的一端,可发挥其主动靶向亲和作用。本研究成功制得的RGD肽修饰的VRB-TET脂质体可有效抑制C6细胞的生长,为恶性脑胶质瘤的治疗提供了一定的实验基础。

参考文献

- [1] 高正航,李卫东.长春花生物碱类药物研究概述[J].贵州农业科学,2005,33(6):94-96.
- [2] 崔萍,霍长虹,李力更,等.作用于微管的天然产物[J].中草药,2010,41(1):139-147.
- [3] Capasso A. Vinorelbine in cancer therapy[J]. *Curr Drug Targets*,2012,13(8):1065-1071.
- [4] Galano G, Caputo M, Tecce MF, et al. Efficacy and tolerability of vinorelbine in the cancer therapy[J]. *Curr Drug Saf*,2011,6(3):185-193.
- [5] 祖元刚,罗猛.长春花生物碱成分及其药理作用研究进展[J].天然产物研究与开发,2006,18(2):325.
- [6] 揭惠,酉明巧,刘辉,等.肿瘤多药耐药的发生机制及逆转策略[J].中华中医药学刊,2013,31(7):1686-1690.
- [7] 罗福玲,赵恒光,章卓,等.粉防己碱对LPS诱导的大鼠发热模型的解热作用[J].中成药,2010,32(8):1304-1308.
- [8] 刘凤玲,杨旭.粉防己碱逆转人卵巢癌耐药细胞SKOV3/DDP耐药的逆转作用及机制[J].山东医药,2011,51(45):37-38.
- [9] 陈中亚,赵雁,陶涛. RGD肽介导的脑胶质瘤靶向治疗和显像的研究进展[J].中国医药工业杂志,2013,44(3):290-295.
- [10] 李学涛,程岚,贾天柱.异长春花碱脂质体的制备及理化性质研究[J].中药材,2011,34(1):119-122.
- [11] 王燕.新型脂质体作为中药靶向载体在肿瘤治疗中的作用[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(16):212-215.
- [12] 沈珠,余江南,徐希明.新型脂质体的制备及其在药物/基因传递中的应用研究[J].药物生物技术,2007,14(6):451-454.
- [13] Owens DE, Peppas NA. Opsonization, biodistribution and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles[J]. *Int J Pharm*,2006,307(1):93-102.
- [14] 许志强,徐伦山,蒋晓江,等.脑胶质瘤的临床治疗进展[J].中国临床神经科学,2010,18(4):431-435.
- [15] 戴宜武,王振光,秦家振.脑胶质瘤治疗进展[J].中华临床医师杂志:电子版,2013,7(14):6225-6228.
- [16] 王凯,陈绪珠,戴建平.大鼠脑胶质瘤模型的研究进展[J].磁共振成像,2014,5(1):74-80.
- [17] 巫蒙,王梅.肿瘤多药耐药性产生机制及其逆转的研究现状[J].当代医学,2011,17(21):26-28.
- [18] 刘海晔.中药逆转肿瘤多药耐药性的研究进展[J].中草药,2015,46(7):1096-1102.

(收稿日期:2016-10-11 修回日期:2016-12-31)

(编辑:邹丽娟)