

RPV 修饰的紫杉醇与五味子乙素脂质体处方工艺优化及体外抗肿瘤活性初步评价[△]

张璐*,何思雨,刘昕泽,孔亮,李学涛[#](辽宁中医药大学药学院,辽宁大连 116600)

中图分类号 R943;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)10-1173-08

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.10.04

摘要 目的:制备细胞穿膜肽RPV修饰的紫杉醇与五味子乙素脂质体,并初步评价其体外抗肿瘤活性。方法:采用薄膜分散法制备RPV修饰的紫杉醇与五味子乙素脂质体。以胆固醇加入量、紫杉醇加入量和探头超声时间间隔为考察因素,紫杉醇和五味子乙素两药的平均包封率为考察指标,通过Box-Benhken设计-响应面实验优化RPV修饰的紫杉醇与五味子乙素脂质体的处方工艺,并对最优处方工艺所制脂质体进行表征。采用磺酰罗丹明B染色法考察RPV修饰的空白脂质体、紫杉醇与五味子乙素脂质体、RPV修饰的紫杉醇与五味子乙素脂质体对人卵巢癌细胞SK-OV-3的体外毒性作用,并采用细胞划痕实验和Transwell小室侵袭实验分别考察上述3种脂质体对SK-OV-3细胞迁移、侵袭能力的影响。结果:最优处方工艺为磷脂44 mg、胆固醇8 mg、紫杉醇0.64 mg、五味子乙素1.5 mg,探头超声时间间隔5 s,总处方量为5 mL。根据最优处方工艺制得的脂质体为类球形,粒径为(126.49±1.19)nm,Zeta电位为(-4.83±0.61) mV,脂质体中两药的平均包封率为(93.88±1.67)%。与RPV修饰的空白脂质体比较,经紫杉醇与五味子乙素脂质体、RPV修饰的紫杉醇与五味子乙素脂质体处理后,SK-OV-3细胞的存活率、迁移抑制率和侵袭率均显著降低($P<0.05$),且RPV修饰的紫杉醇与五味子乙素脂质体的作用优于紫杉醇与五味子乙素脂质体($P<0.05$)。结论:成功制备了RPV修饰的紫杉醇与五味子乙素脂质体,且其具有一定的体外抗肿瘤活性。

关键词 紫杉醇;五味子乙素;细胞穿膜肽;脂质体;Box-Benhken设计-效应面实验;处方工艺优化;抗肿瘤活性;人卵巢癌细胞SK-OV-3

Prescription Technology Optimization of RPV Modified Paclitaxel and Schisandrin B Liposomes and Preliminary Evaluation of Antitumor Activity *in vitro*

ZHANG Lu, HE Siyu, LIU Xinze, KONG Liang, LI Xuetao (School of Pharmacy, Liaoning University of TCM, Liaoning Dalian 116600, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare paclitaxel and schisandrin B liposomes modified by cell penetrating peptide RPV, and to preliminarily evaluate its anti-tumor activity *in vitro*. METHODS: RPV modified paclitaxel and schisandrin B liposomes were prepared by film dispersion method. Box-Benhken design-response surface methodology was used to optimize the prescription technology of RPV modified paclitaxel and schisandrin B liposomes using the amount of cholesterol and paclitaxel, the time interval of ultrasound probe as factors, average entrapment efficiency of paclitaxel and schisandrin B was used as the index. The liposomes prepared by the optimal technology were characterized. Sulfonilyrhodamine B staining method was used to investigate *in vitro* toxicity of RPV modified blank liposomes, paclitaxel and schisandrin B liposomes, RPV modified paclitaxel and schisandrin B liposomes to human ovarian cancer cell SK-OV-3. The effects of 3 kinds of liposomes on the migration and invasion ability of SK-OV-3 cells were investigated by cell scratch test and Transwell chamber invasion test. RESULTS: The optimal prescription technology was phospholipid 44 mg, cholesterol 8 mg, paclitaxel 0.64 mg, schisandrin B 1.5 mg, ultrasonic probe time interval 5 s, prescription dosage 5 mL. According to the optimal prescription technology, the liposomes were spherical in shape, and the particle size was (126.49 ± 1.19) nm, Zeta-potential was (-4.83 ± 0.61) mV, average entrapment efficiency of liposomes was (93.88 ± 1.67)%. Compared with RPV modified blank liposomes, after treated with paclitaxel and schisandrin B liposomes and RPV modified paclitaxel and schisandrin B liposomes, the survival rate, migration inhibition rate and invasion rate of SK-OV-3 cells were significantly decreased ($P<0.05$). The effects of RPV modified paclitaxel and schisandrin B liposomes was better than those of paclitaxel and schisandrin B liposomes ($P<0.05$). CONCLUSIONS: RPV modified paclitaxel and schisandra B liposome are successfully prepared, and they have certain antitumor activity *in vitro*.

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81874347)

* 硕士研究生。研究方向:新型给药系统。电话:0411-85890145。

E-mail:zhanglu0710@163.com

[#] 通信作者:教授,博士生导师。研究方向:新型给药系统。电话:0411-85890145。E-mail:Lixuetao1979@163.com

KEYWORDS Paclitaxel; Schisandrin B; Cell penetrating peptide; Liposome; Box-Benhken design-response surface methodology; Prescription technology optimization; Anti-tumor activity; SK-OV-3 cells

卵巢癌作为妇科生殖系统的三大恶性肿瘤之一,致死率较高,目前临床上常采用紫杉醇相关制剂进行治疗^[1]。紫杉醇是从红豆杉树皮中分离得到的一种二萜类生物碱,为一种广谱抗癌药,常用于治疗卵巢癌、乳腺癌、肺癌、胃癌、食管癌以及头颈部癌等^[2-5]。但紫杉醇对肿瘤细胞缺乏选择性,在肿瘤部位的浓度较低、副作用较大,其临床应用受到了一定的限制^[6-7]。五味子乙素作为中药五味子的主要成分之一,具有抗氧化、抗肿瘤、保肝等多种药理活性,可通过抑制多种肿瘤细胞的增殖、诱导其凋亡,进而抑制肿瘤细胞的侵袭和转移^[8-10]。据相关研究报道,将五味子乙素与紫杉醇联用后,五味子乙素可起到辅助作用,增强抗肿瘤药物紫杉醇的活性并降低其副作用^[11]。

脂质体是由胆固醇和磷脂构成的球型微囊结构的药物载体,在其表面修饰靶向配体后即能够选择性地将包埋的药物浓集定位于靶组织、靶器官或靶细胞,且靶向脂质体相比与普通脂质体具有毒性低、靶向性强等优点^[12-13]。细胞穿膜肽是一类由10~30个氨基酸残基组成的能穿透细胞膜的短链多肽,其中富含碱性氨基酸,能够与多种药物分子结合并将药物递送至肿瘤细胞内,以达到增强疗效的目的,是一种有效的载体工具^[14]。而RPV肽(氨基酸组成为精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-脯氨酸-苯丙氨酸-缬氨酸-酪氨酸-亮氨酸-异亮氨酸)是一种新型的小分子细胞穿膜肽,与普通细胞穿膜肽相比,其能更好地促进肿瘤细胞对药物的摄取^[15],为卵巢癌的治疗带来了新的希望。鉴于此,本研究拟制备一种RPV修饰的紫杉醇与五味子乙素脂质体,并初步考察其对人卵巢癌细胞SK-OV-3侵袭和转移的抑制作用,为其后续抗卵巢癌研究提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究使用的主要仪器有HBS-1096A型酶标仪(南京德铁实验设备有限公司)、FA1004型电子天平(上海越平科学仪器有限公司)、T1-S型倒置荧光显微镜(日本Nikon公司)、DZKW-S-4型电热恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器有限公司)、RE52CS型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)、SG3300H型超声波清洗器(上海冠特超声仪器公司)、JY92-2D型超声波细胞捣碎机(宁波新芝生物股份有限公司)、20AT型高效液相色谱(HPLC)仪(日本Shimadzu公司)、JEM-1200EX型透射电子显微镜(日本JEOL公司)、ZS90型激光散射粒径测定仪(英国Malvern公司)、WJ-80B-II型CO₂细胞培养箱(上海新苗医疗器械制造有限公司)。

1.2 主要药品与试剂

紫杉醇对照品(批号J1101A,纯度>99%)、胆固醇、磺酰罗丹明B均购自大连美仑生物技术有限公司;五味子乙素对照品(批号201805793,纯度>99%)购自湖州

展舒生物科技有限公司;RPV(纯度>95%)购自上海吉尔生化有限公司;卵磷脂购自日本NOF公司;胎牛血清(FBS)购自浙江天杭生物科技有限公司;MCCOY'S 5A培养基、pH 7.4的磷酸盐缓冲液(PBS,批号1022Q021)、葡聚糖凝胶Sephadex G-50(粒径120 μm)均购自北京索莱宝科技有限公司;胰蛋白酶购自美国Gibco公司;其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为纯净水。

1.3 细胞

人卵巢癌细胞SK-OV-3购自中国医学科学院基础医学研究所。

2 方法与结果

2.1 脂质体的制备

采用薄膜分散法进行制备。精密称取处方量的RPV、卵磷脂、胆固醇和紫杉醇、五味子乙素对照品,加三氯甲烷5 mL,超声(功率200 W,频率40 kHz,下同)处理3 min,然后在40 ℃水浴中减压蒸发除去三氯甲烷,使圆底烧瓶内壁形成一层薄膜。将得到的薄膜用PBS 5 mL超声处理5 min使溶解,然后将此混悬液置于EP管中,以探头超声10 min后,用微孔滤膜(0.22 μm)滤过2次,取滤液,即可得到RPV修饰的紫杉醇与五味子乙素脂质体。除不加入紫杉醇和五味子乙素外,其余步骤同前,制备RPV修饰的空白脂质体。除不加入RPV外,其余步骤同前,制备紫杉醇与五味子乙素脂质体。

2.2 紫杉醇含量测定方法的建立

采用HPLC法进行测定。

2.2.1 色谱条件 色谱柱为Agilent ZORBAX SB-Aq C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-甲醇-水(42:28:30, V/V/V);检测器为紫外吸收检测器,检测波长为227 nm;柱温为30 ℃;流速为1 mL/min;进样量为10 μL。

2.2.2 溶液的制备 (1)对照品溶液:称取紫杉醇对照品10 mg,置于10 mL量瓶中,加甲醇定容,混匀,即得到质量浓度为1 mg/mL的对照品母液。以甲醇为溶剂,将上述对照品母液稀释后制成质量浓度分别为60、80、100、120、140、160、180、200 μg/mL的系列对照品溶液。(2)供试品溶液:精密吸取RPV修饰的紫杉醇与五味子乙素脂质体1 mL,加甲醇9 mL,混匀,超声处理2 min破乳后,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液,即得。(3)空白溶液:精密吸取RPV修饰的空白脂质体1 mL,同供试品溶液制备方法进行操作,即得。

2.2.3 专属性试验 分别取供试品溶液、对照品溶液(200 μg/mL)、空白溶液适量,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果显示,紫杉醇在6.5~6.6 min出峰,而空白溶液在对应时间段无色谱峰出现;待测成分峰与相邻色谱峰间的分离度均大于1.5,且主峰与杂质峰均能达到基线分离,提示本方法专属性良好,详见图1。

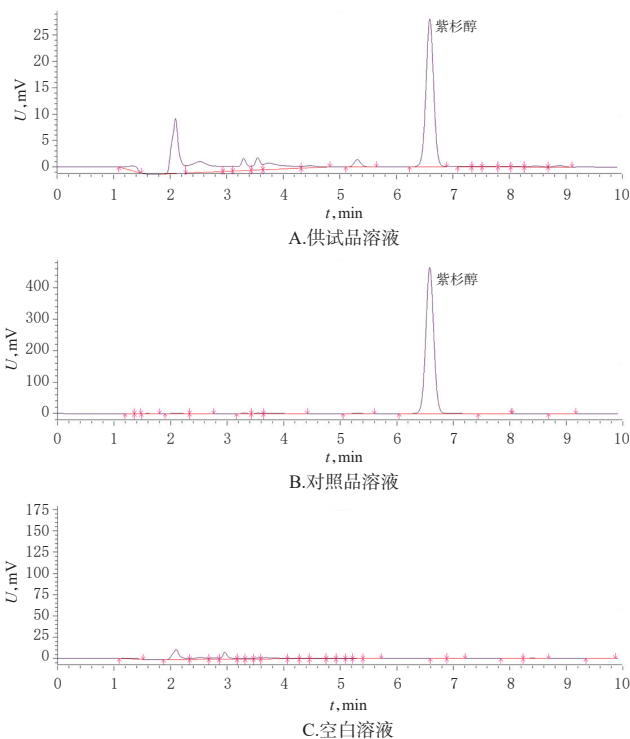


图1 紫杉醇含量测定的HPLC图

Fig 1 HPLC chromatograms of content determination of paclitaxel

2.2.4 标准曲线的绘制 取“2.2.2(1)”项下不同质量浓度的系列对照品溶液各适量,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以待测成分质量浓度为横坐标($x, \mu\text{g/mL}$)、对应峰面积为纵坐标(y)进行线性回归,得紫杉醇的回归方程为 $y=22\ 946x-21\ 914$ ($r=0.999\ 6$)。结果表明,紫杉醇在 $60\sim 200\ \mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围内与其峰面积的线性关系良好。

2.2.5 重复性试验 取“2.5”项下2号方案样品6份,分别按“2.2.2(2)”项下方法制备供试品溶液,然后再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并代入“2.2.4”项下回归方程计算紫杉醇的含量。结果,紫杉醇的平均含量为 $202.10\ \mu\text{g/mL}$ ($\text{RSD}=0.18\%, n=6$),表明本方法重复性良好。

2.2.6 精密度试验 取对照品溶液($120\ \mu\text{g/mL}$)适量,按“2.2.1”项下色谱条件重复进样测定6次,记录峰面积。结果,紫杉醇峰面积的RSD为 0.23% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 取“2.5”项下2号方案样品,按“2.2.2(2)”项下方法制备供试品溶液,分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,紫杉醇峰面积的RSD为 0.23% ($n=6$),表明该脂质体供试品溶液在室温下放置24 h内的稳定性良好。

2.2.8 加样回收率试验 取“2.5”项下已知含量的样品(2号方案样品)6份,分别按“2.2.2(2)”项下方法制备供

试品溶液,然后按质量比1:1加入相应质量浓度的对照品溶液适量,混匀,然后按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,代入“2.2.4”项下回归方程中计算紫杉醇含量,并计算其加样回收率。结果,测得紫杉醇的平均加样回收率为 102.16% ($\text{RSD}=0.49\%, n=6$),详见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=6$)
Tab 1 Results of recovery tests($n=6$)

待测成分	已知含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
紫杉醇	0.301 4	0.300 0	0.605 2	101.26	102.16	0.49
	0.299 9	0.300 0	0.607 3	102.47		
	0.299 9	0.300 0	0.607 1	102.40		
	0.300 0	0.300 0	0.607 5	102.50		
	0.300 1	0.300 0	0.605 9	101.93		
	0.299 9	0.300 0	0.607 0	102.37		
五味子乙素	0.700 0	0.700 0	1.410 3	101.47	101.34	0.15
	0.699 9	0.700 0	1.410 8	101.56		
	0.700 3	0.700 0	1.409 2	101.27		
	0.699 9	0.700 0	1.409 1	101.31		
	0.700 1	0.700 0	1.408 3	101.17		
	0.699 9	0.700 0	1.408 7	101.26		

2.3 五味子乙素含量测定方法的建立

采用HPLC法进行测定。

2.3.1 色谱条件 色谱柱为Agilent ZORBAX SB-Aq C_{18} 柱($250\ \text{mm}\times 4.6\ \text{mm}, 5\ \mu\text{m}$);流动相为甲醇-水($85:15, V/V$);检测器为紫外吸收检测器,检测波长为 $250\ \text{nm}$;柱温为 $30\ ^\circ\text{C}$;流速为 $1\ \text{mL/min}$;进样量为 $10\ \mu\text{L}$ 。

2.3.2 溶液的制备 (1)对照品溶液:称取五味子乙素对照品 $10\ \text{mg}$,置于 $10\ \text{mL}$ 量瓶中,加甲醇定容,混匀,即得到质量浓度为 $1\ \text{mg/mL}$ 的对照品母液。以甲醇为溶剂,将上述对照品母液进行稀释后制成质量浓度分别为 $40、60、80、100、110、130、150\ \mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液。(2)供试品溶液、空白溶液:分别按照“2.2.2(2)”“2.2.2(3)”项下方法进行制备,即得。

2.3.3 专属性试验 分别取供试品溶液、对照品溶液($150\ \mu\text{g/mL}$)、空白溶液适量,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果显示,五味子乙素在 $8.9\sim 9.2\ \text{min}$ 处出峰,而空白溶液在此时间段无色谱峰出现;待测成分峰与相邻峰间的分离度均大于1.5,且主峰与杂质峰均能达到基线分离,提示本方法的专属性良好,详见图2。

2.3.4 标准曲线的绘制 取“2.3.2(1)”项下不同质量浓度系列对照品溶液各适量,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度为横坐标($x, \mu\text{g/mL}$)、对应峰面积为纵坐标(y)进行线性回归,得到五味子乙素的回归方程为 $y=17\ 754x-73\ 726$ ($r=0.999\ 6$)。结果表明,五味子乙素在 $40\sim 150\ \mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围内与其峰面积的线性关系良好。

2.3.5 重复性试验 取“2.5”项下2号方案样品6份,按“2.3.2(2)”项下方法制备供试品溶液,然后再按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并将其代入“2.3.4”项

下回归方程中计算五味子乙素含量。结果,五味子乙素的平均含量为130.43 $\mu\text{g/mL}$ ($\text{RSD}=1.91\%$, $n=6$),表明本方法重复性良好。

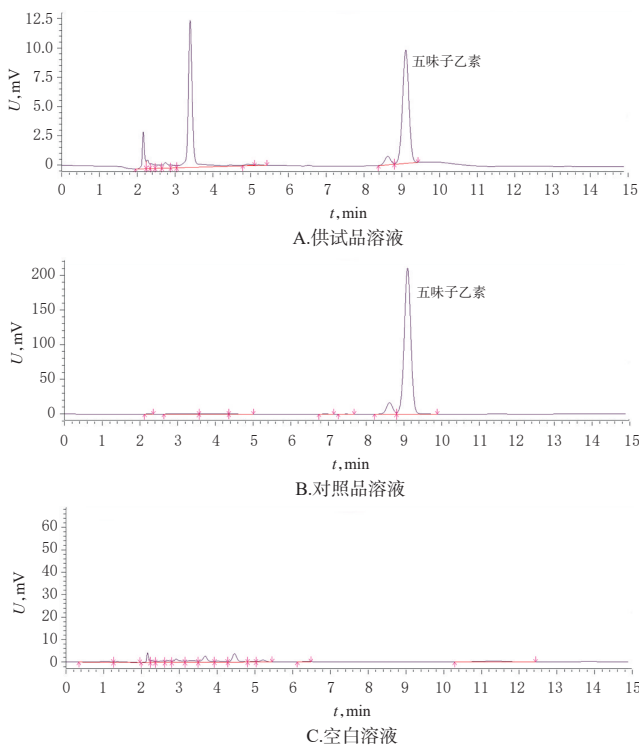


图2 五味子乙素含量测定的HPLC图

Fig 2 HPLC chromatogram of content determination of schisandrin B

2.3.6 精密度试验 取对照品溶液(80 $\mu\text{g/mL}$)适量,按“2.3.1”项下色谱条件重复进样测定6次,记录峰面积。结果,五味子乙素峰面积的RSD为0.12% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.3.7 稳定性试验 取“2.5”项下2号方案样品适量,按“2.3.2(2)”项下方法制备供试品溶液,分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时按照“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,五味子乙素峰面积的RSD为0.10% ($n=6$),表明该脂质体供试品溶液在室温下放置24 h内的稳定性良好。

2.3.8 加样回收率试验 取“2.5”项下已知含量的样品(2号方案样品)6份,按“2.2.2(2)”项下方法制备供试品溶液,然后按质量比1:1加入相应质量浓度的对照品溶液,混匀,然后按照“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,代入“2.3.4”项回归方程中计算出五味子乙素的含量,并计算其加样回收率。结果,五味子乙素的平均加样回收率为101.34% ($\text{RSD}=0.15\%$, $n=6$),提示本方法的准确度较好,详见表1。

2.4 包封率的测定

取脂质体样品2 mL,逐滴加至Sephadex G-50凝胶柱中,用PBS洗脱,流速为1 mL/min,收集洗脱液乳光部分,并以PBS定容至2 mL。分别精密吸取未经洗脱的脂

质体与洗脱后的脂质体1 mL,加入甲醇9 mL破乳,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液。将脂质体溶液与续滤液分别注入HPLC仪中,分别按照“2.2.1”“2.3.1”项下色谱条件测定2种成分的峰面积后,代入“2.3.4”项下回归方程中计算药物含量,并计算其包封率:包封率($\%$)= $N_a/N_b \times 100\%$ (式中, N_a 表示续滤液中药物含量, N_b 表示脂质体溶液中药物含量)。

2.5 脂质体处方工艺的优选

根据实验室经验及文献[16],固定处方量为5 mL、磷脂为44 mg、紫杉醇和五味子乙素摩尔比为1:5,初步选定对脂质体制备过程影响相对较大的胆固醇含量(A)、紫杉醇含量(B)与探头超声时间间隔(简称“时间间隔”,C)作为考察因素,两药平均包封率(Y,%)作为考察指标,采用Box-Behnken设计-效应面实验优选脂质体的处方工艺。各因素水平编码见表2,实验设计方案与结果见表3,方差分析结果见表4。

表2 各因素水平编码

Tab 2 Factors and levels code

因素	-1	0	1
A(胆固醇),mg	6	8	10
B(紫杉醇),mg	0.4	0.6	0.8
C(时间间隔),s	3	4	5

表3 Box-Behnken实验设计方案与结果

Tab 3 Plan and results of Box-Behnken trials

序号	A	B	C	Y, %
1	1	0	1	80.25
2	-1	-1	0	57.73
3	-1	0	-1	65.37
4	0	-1	1	85.41
5	0	0	0	95.67
6	0	0	0	92.74
7	1	1	0	79.30
8	1	0	-1	72.67
9	0	0	0	93.24
10	0	0	0	94.32
11	0	1	1	90.96
12	0	1	-1	92.56
13	0	-1	-1	79.68
14	-1	0	1	68.85
15	1	-1	0	70.06
16	-1	1	0	63.37
17	0	0	0	94.45

将表3中平均包封率数据输入Design-Expert 8.0.6.1软件中,拟合得到方程为 $Y=94.08+5.87A+4.16B+1.90C+0.90AB+1.03AC-1.83BC-20.92A^2-5.55B^2-1.38C^2$ ($R=0.9918$, $P<0.05$)。拟合结果表明,该模型可以较好地反映Y值的变化,可用以优选RPV修饰的紫杉醇与五味子乙素脂质体的最优处方工艺。对拟合模型进行显著性检验发现,A、B、C、 A^2 、 B^2 对Y值有显著影响($P<0.01$),因素AB、AC、BC、 C^2 对Y值没有显著影响($P>0.05$);3个因素对平均包封率影响的大小顺序为 $A>B>C$,即胆固醇质量>紫杉醇质量>时间间隔。使

用 Design-Expert 8.0.6.1 软件绘制因变量和自变量的三维效应面图和二维等高图,结果见图3、图4。

表4 方差分析结果

Tab 4 Analysis results of variance

方差来源	SS	df	MS	F	P
模型	2 527.72	9	280.86	81.15	< 0.000 1
A	275.66	1	275.66	79.65	< 0.000 1
B	138.69	1	138.69	40.07	0.000 4
C	28.84	1	28.84	8.33	0.023 4
AB	3.24	1	3.24	0.94	0.365 5
AC	4.20	1	4.20	1.21	0.306 9
BC	13.43	1	13.43	3.88	0.089 5
A ²	1 842.41	1	1 842.41	532.35	< 0.000 1
B ²	129.73	1	129.73	37.48	0.000 5
C ²	8.03	1	8.03	2.32	0.171 6
残差	24.23	7	3.46		
失拟项	19.00	3	6.33	4.85	0.080 6
纯误差	5.22	4	1.31		
总离差	2 551.95	16			

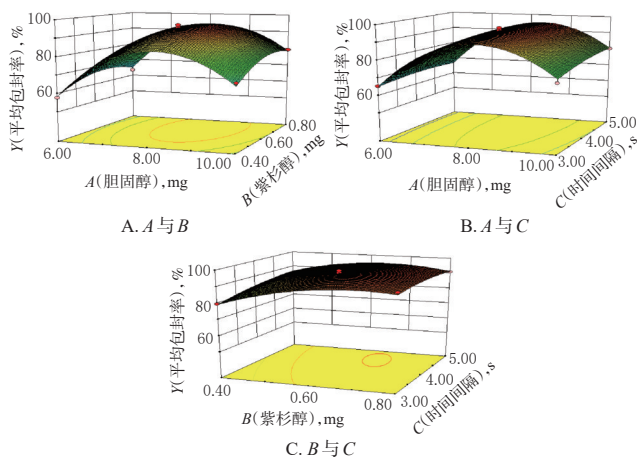


图3 各因素对RPV修饰的紫杉醇与五味子乙素脂质体平均包封率影响的效应面图

Fig 3 Response surface diagrams of the effects of various factors on the average entrapment efficiency of RPV modified paclitaxel and schisandrin B liposomes

由图3、图4可知,C对Y值的影响不大,A和B对Y值则影响显著。上述交互因素中A与B、A与C的效应面形状均较陡,等高线均呈明显的椭圆形,而B与C的效应面较平缓,等高线椭圆形不明显,说明A与B、A与C的交互作用更为明显。该模型模拟所得最优处方工艺为胆固醇8.32 mg、紫杉醇0.66 mg、超声时间间隔4.55 s;根据该结果再结合本实验室脂质体处方考察经验,确定最终的处方工艺为磷脂44 mg、胆固醇8 mg、紫杉醇0.64 mg、五味子乙素1.5 mg、处方量5 mL、超声时间间隔5 s。

根据上述最优处方工艺制备3批RPV修饰的紫杉醇与五味子乙素脂质体,按前文所建HPLC法测定脂质体中紫杉醇和五味子乙素的含量,并计算两药的平均包封率。结果,3批样品中两药的平均包封率为

(93.88 ± 1.57)%,与模型预测值(95.70%)的相对误差为1.89%。以上结果表明,本研究优选的处方工艺稳定、可行。

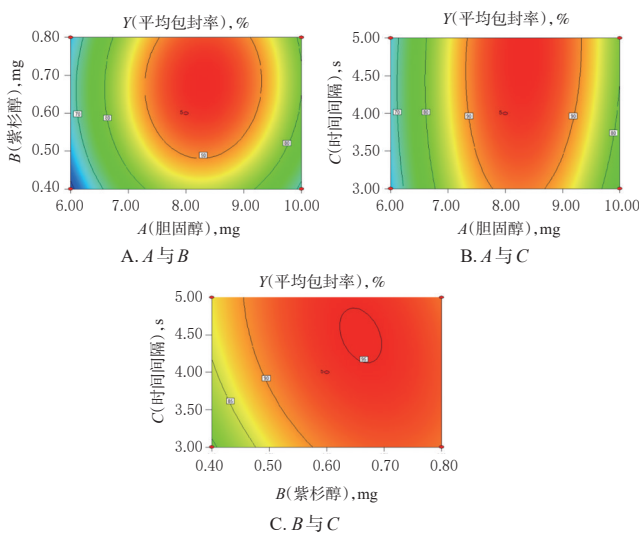


图4 各因素对RPV修饰的紫杉醇与五味子乙素脂质体平均包封率影响的等高线图

Fig 4 Contour maps of the effects of various factors on the average entrapment efficiency of RPV modified paclitaxel and schisandrin B liposomes

2.6 脂质体的表征

吸取按最优工艺制备的脂质体溶液适量,以PBS稀释50倍。取稀释后的脂质体溶液适量,滴加至专用铜网上,以2%磷酸钨酸溶液染色,室温晾干,然后置于透射电子显微镜上(透射电镜加速电压为120 kV)观察其形态,平行操作3次。另取脂质体溶液200 μL,使用激光散射粒径测定仪测定脂质体的粒径及Zeta电位(每次设定循环测10次),平行操作3次。结果显示,RPV修饰的紫杉醇与五味子乙素脂质体呈球形,粒径为(126.49 ± 1.19) nm (n=3), Zeta电位为(-4.83 ± 0.61) mV (n=3)。RPV修饰的紫杉醇与五味子乙素脂质体的透射电镜图见图5。

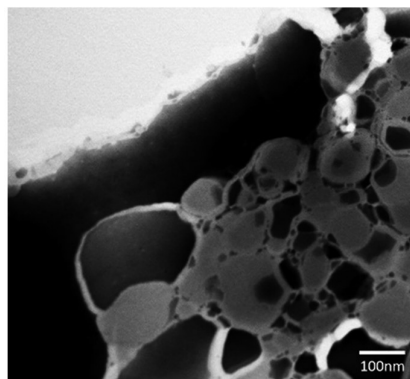


图5 RPV修饰的紫杉醇与五味子乙素脂质体的透射电镜图

Fig 5 TEM micrograph of RPV modified paclitaxel and schisandrin B liposomes

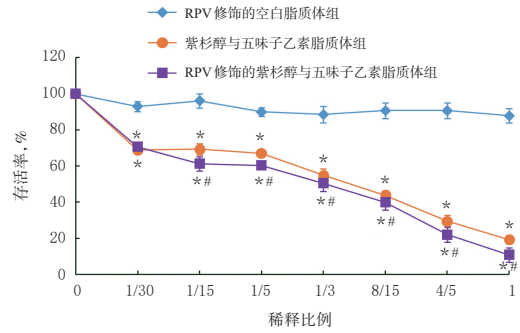
2.7 RPV 修饰的紫杉醇与五味子乙素脂质体外抗肿瘤作用的初步评价

2.7.1 细胞的培养 将 SK-OV-3 细胞接种于含 10% FBS 和 1% 青-链霉素的 MCCOY'S 5A 完全培养基(简称“完全培养基”)中,然后将其置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中孵育。待细胞生长至融合度为 90% 后,弃去培养液,加入适量 PBS 清洗细胞,再加入 0.25% 胰蛋白酶 1 500 μL 消化细胞,然后用移液枪轻轻吹打使细胞完全脱落,将细胞悬液置于 15 mL 离心管中,以 1 500 r/min 离心 3 min,吸弃上清液,重新加入新鲜的完全培养基重悬并转移至 2 个新的培养瓶中进行传代培养。本研究所用为传代 5~8 代的细胞。

2.7.2 RPV 修饰的紫杉醇与五味子乙素脂质体对 SK-OV-3 细胞存活率的影响 采用碘酞罗丹明 B 染色法进行考察。取对数期生长的 SK-OV-3 细胞,用完全培养基稀释制成密度为 $1.0 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的细胞悬液,按每孔 1.5×10^4 个接种于 96 孔板中,并置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h。然后将细胞分为稀释不同倍数(分别稀释为最优处方工艺最大量的 4/5、8/15、1/3、1/5、1/15、1/30,浓度根据前期预实验设置)的 RPV 修饰的空白脂质体组、紫杉醇与五味子乙素脂质体组和 RPV 修饰的紫杉醇与五味子乙素脂质体组,每组设置 4 个复孔。加药后继续孵育 48 h,吸弃培养液,细胞用 10% 三氯乙酸溶液在 4 ℃ 条件下固定 1 h,用水冲洗 3 次。待孔板内完全干燥后,每孔加 0.4% 碘酞罗丹明 B 溶液 150 μL 染色 30 min,用 1% 乙酸溶液冲洗 4 次;室温干燥后,每孔加入 10 mmol/L 的 Tris 碱溶液(pH 10.5)200 μL,振荡 1 h 加速染料的溶解,然后使用酶标仪于 540 nm 波长下测定各孔的光密度(OD)值,并计算细胞存活率:细胞存活率(%) = $\text{OD}_n / \text{OD}_0 \times 100\%$ (式中,OD_n 为实验组细胞的 OD 值,OD₀ 为 RPV 修饰的空白脂质体组细胞的 OD 值)。使用 Graphpad-prism-5 软件计算药物的半数抑制浓度(IC₅₀)。实验重复 3 次。采用 SPSS 18.0 软件进行单因素方差分析和 LSD 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。各组细胞存活率的测定结果见图 6。

结果显示,RPV 修饰的紫杉醇与五味子乙素脂质体对 SK-OV-3 细胞的毒性最强[细胞存活率最低,IC₅₀ 为 $(2.93 \pm 0.56) \mu\text{mol/L}$],其次为紫杉醇与五味子乙素脂质体[IC₅₀ 为 $(4.21 \pm 0.43) \mu\text{mol/L}$],RPV 修饰的空白脂质体几乎没有毒性。与紫杉醇与五味子乙素脂质体组比较,RPV 修饰的紫杉醇与五味子乙素脂质体组的 IC₅₀ 显著降低($P < 0.05$)。以上结果提示,RPV 的修饰使脂质体对肿瘤细胞的抑制作用较普通脂质体有所增强。

2.7.3 RPV 修饰的紫杉醇与五味子乙素脂质体对 SK-OV-3 细胞迁移能力的影响 采用划痕实验进行考察。取对数期生长的 SK-OV-3 细胞,以完全培养基稀释制成密度为 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的细胞悬液,按每孔 2×10^5 个接



注:与 RPV 修饰的空白脂质体组比较,* $P < 0.05$;与紫杉醇与五味子乙素脂质体组比较,# $P < 0.05$

Note: vs. RPV modified blank liposome group, * $P < 0.05$; vs. paclitaxel and schisandrin B liposomes group, # $P < 0.05$

图 6 各组细胞存活率的测定结果($\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig 6 Survival rate of cells in each group($\bar{x} \pm s, n=4$)

种于 6 孔板中,然后将其分为 RPV 修饰的空白脂质体组、紫杉醇与五味子乙素脂质体组和 RPV 修饰的紫杉醇与五味子乙素脂质体组,每组设置 4 个复孔。将细胞置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 12 h,待细胞长至融合度达到 80% 后,用 10 μL 枪头在每孔中间画 3 条平行线。以 PBS 冲洗掉划痕中间死亡的细胞,加入新鲜的完全培养基,并分别加入相应脂质体各 200 μL(将处方稀释 5 倍,即脂质体中紫杉醇浓度为 3 μmol/L,紫杉醇与五味子乙素摩尔比为 1:5,浓度根据前期预实验确定)。分别于给药培养 0、24 h 时拍照,用 Image J 1.48 软件测定划痕区域面积,并计算细胞迁移抑制率:迁移抑制率(%) = $(1 - S_{24h} / S_{0h}) \times 100\%$ (式中, S_{24h} 为给药 24 h 时的划痕面积, S_{0h} 为给药 0 h 时的划痕面积)。按“2.7.2”项下方法进行统计分析。各组细胞的划痕面积测定结果见图 7。

结果显示,3 种脂质体对 SK-OV-3 细胞迁移能力的抑制作用大小为 RPV 修饰的紫杉醇与五味子乙素脂质体 > 紫杉醇与五味子乙素脂质体 > RPV 修饰的空白脂质体。与 RPV 修饰的空白脂质体组[细胞迁移抑制率为 $(1.12 \pm 0.14)\%$]比较,紫杉醇与五味子乙素脂质体组、RPV 修饰的紫杉醇与五味子乙素脂质体组的细胞迁移抑制率[分别为 $(15.79 \pm 1.28)\%$ 、 $(86.41 \pm 2.05)\%$]均显著升高($P < 0.05$);且 RPV 修饰的紫杉醇与五味子乙素脂质体组细胞的迁移抑制率显著高于紫杉醇与五味子乙素脂质体组($P < 0.05$)。

2.7.4 RPV 修饰的紫杉醇与五味子乙素脂质体对 SK-OV-3 细胞侵袭能力的影响 采用 Transwell 小室侵袭实验进行考察。取对数期生长的 SK-OV-3 细胞,以无血清的 MCCOY'S 5A 培养液稀释制成密度为 $3 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 的细胞悬液,按每孔 1.5×10^4 个接种于 Transwell 小室的上室中。于上室中分别加入 RPV 修饰的空白脂质体、紫杉醇与五味子乙素脂质体及 RPV 修饰的紫杉醇与五味子乙素脂质体各 20 μL(脂质体中紫杉醇浓度为 15

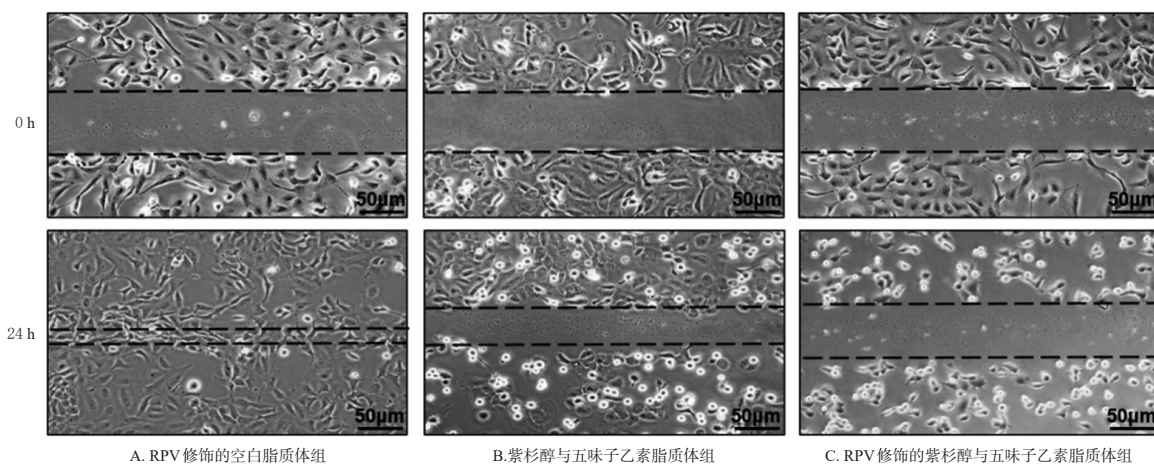


图7 各组细胞迁移能力测定的显微图

Fig 7 Micrographs of migration ability of SK-OV-3 cells in each group

μmol/L, 紫杉醇与五味子乙素摩尔比 1:5, 浓度根据前期预实验设定), 下室中加入完全培养基 0.6 mL, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 12 h。然后用 PBS 轻洗小室中未穿过下室的细胞, 小室外侧用 4% 多聚甲醛溶液固定 30 min 后, 再置于 0.1% 结晶紫溶液中染色 20 min。用 PBS 洗去多余染料后晾干, 于倒置显微镜下进行细胞计数并拍照, 计算细胞侵袭率: 细胞侵袭率 (%) = $n/n_0 \times 100\%$ (式中, n 为给药组侵袭细胞总数、 n_0 为 RPV 修饰的空白脂质体组侵袭细胞数)。实验重复 3 次。按“2.7.2”项下方法进行统计分析。各组细胞侵袭能力测定的显微图见图 8。

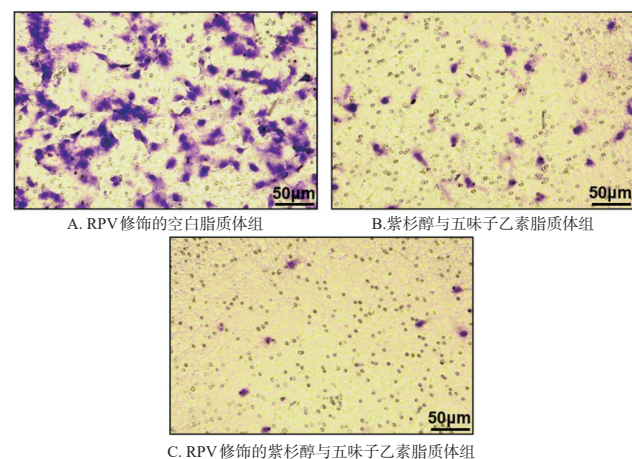


图8 各组细胞侵袭能力测定的显微图

Fig 8 Micrographs of invasion ability of SK-OV-3 cells in each group

结果显示, 3 种脂质体对 SK-OV-3 细胞侵袭能力的抑制作用大小为 RPV 修饰的紫杉醇与五味子乙素脂质体 > 紫杉醇与五味子乙素脂质体 > RPV 修饰的空白脂质体。与 RPV 修饰的空白脂质体组 [细胞侵袭率为 $(106.00 \pm 5.57)\%$] 比较, 紫杉醇与五味子乙素脂质体组和 RPV 修饰的紫杉醇与五味子乙素脂质体组细胞的侵袭率 [分别为 $(26.44 \pm 3.93)\%$ 、 $(9.21 \pm 1.77)\%$] 均显著降

低 ($P < 0.05$), 且 RPV 修饰的紫杉醇与五味子乙素脂质体组细胞的侵袭率显著低于五味子乙素脂质体组 ($P < 0.05$)。

3 讨论

卵巢癌是妇科最常见的恶性肿瘤之一, 其发病机制复杂、诊断迟, 因此其病死率位居妇科癌症首位^[17]。目前, 临床上主要采取手术和放、化疗等手段进行治疗, 虽然可以改善患者的症状, 但化疗药物本身的毒副作用对患者影响较大, 故临床应用受限^[18]。靶向治疗是继手术和放、化疗后的一种新方法, 能选择性地作用于特定因子、酶类以及信号通路等, 从而抑制癌细胞的增殖甚至直接杀死癌细胞^[19]。靶向治疗的机制主要是抑制肿瘤血管生成、抑制信号酶传导、诱导细胞凋亡等^[20]。紫杉醇作为临床上常用的广谱抗癌药, 在水溶液中的溶解度极低, 口服给药生物利用度较差, 也不具备靶向性, 临床效果有限^[21]。本研究成功制备了 RPV 修饰的紫杉醇与五味子乙素脂质体, 将紫杉醇和五味子乙素成功包载于脂质体中, 其中五味子乙素可发挥辅助作用, 进而增强紫杉醇的抗肿瘤作用; 穿膜肽 RPV 的修饰可进一步增强脂质体的靶向性, 提高 2 种药物在肿瘤部位的浓度, 以达到更好的疗效。因紫杉醇与五味子乙素在该脂质体中具有协同抗肿瘤转移的作用, 二者相辅相成^[22], 故本研究对两药的平均包封率进行考察。

处方工艺优选的方法有单纯形网格法、星点设计-效应面法及正交设计法等, 其中 Box-Behnken 设计-响应面法具有实验次数少、预测值精准的优点, 能简单快速地优化出最优处方工艺^[23-24]。本研究前期进行了单因素实验, 以包封率为指标, 对胆固醇含量、紫杉醇含量、探头超声时间间隔和温度进行了考察, 确定了各因素的重要程度及优化区间, 为本研究的 Box-Behnken 设计-响应面法奠定了基础。在本研究中, 根据 Box-Behnken 设计-响应面法优选出的处方工艺为磷脂 44 mg、胆固醇 8 mg、紫杉醇 0.64 mg、五味子乙素 1.5 mg、处方量 5 mL、

超声时间间隔 5 s。在按上述处方工艺制备的脂质体中,两药的平均包封率为(93.88±1.67)%,符合 2020 年版《中国药典》(四部)对微粒制剂包封率不低于 80%的要求^[25]。接着,笔者对最优处方工艺制备的脂质体进行表征,发现该脂质体呈球形,电位值略负,这可能与穿膜肽 RPV 的修饰有关^[15]。通过体外细胞实验发现,RPV 修饰的紫杉醇与五味子乙素脂质体对 SK-OV-3 细胞的毒性较强,能有效地抑制 SK-OV-3 细胞的侵袭和转移,且作用由优于普通脂质体。

综上所述,本研究成功制备了包封率较高的 RPV 修饰的紫杉醇与五味子乙素脂质体,并初步确定了其体外抗卵巢癌作用,为卵巢癌的治疗带来新的希望,但后续需要进一步开展更为深入的细胞水平研究以及动物体内分析以对本结论进行验证。

参考文献

[1] 秦佳睿,尹香花.复发性卵巢癌治疗方法的研究进展[J].当代医学,2021,7(2):191-194.

[2] 刘先芳,梁敬钰,孙建博.紫杉醇:具有里程碑意义的天然抗癌药物[J].世界科学技术:中医药现代化,2017,19(6):941-949.

[3] 冯巧惠,李琼,贺延苓,等.紫杉醇对卵巢癌、乳腺癌、宫颈癌的抗癌功效及生物分子机制研究进展[J].药物生物技术,2020,27(3):278-280.

[4] 郭年凤.紫杉醇新剂型研究进展[J].中国乡村医药,2019,26(24):87-88.

[5] 屈怡帆,白莉.紫杉醇联合顺铂一线治疗晚期食管癌疗效及预后分析[J].现代肿瘤医学,2017,25(15):2405-2409.

[6] 于莹,任耘.紫杉醇临床应用及安全性研究进展[J].天津药学,2017,29(2):54-57.

[7] BERNABEU E, CAGEL M, LAGOMARSINO E, et al. Paclitaxel: what has been done and the challenges remain ahead[J]. Int J Pharm, 2017, 526(1/2):474-495.

[8] 潘瑶,林剑霞,李妍.五味子乙素的药理作用研究概况[J].吉林医药学院学报,2015,36(1):60-62.

[9] 白文字,王厚恩,王冰瑶,等.五味子化学成分及其药理作用研究进展[J].中成药,2019,41(9):2177-2183.

[10] 赵炜,赵志正.五味子乙素对人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖和 Notch-1 信号通路的影响[J].中国中医药信息杂志,2019,26(10):55-59.

[11] 陈冠男,耿丽晶,王筱瑜,等.五味子乙素对紫杉醇治疗乳

腺癌的减毒增效机制研究[J].中药材,2019,42(5):1156-1159.

[12] 杨贵兰,李文军,王春华.靶向脂质体的研究进展[J].药学研究,2020,39(5):289-293,307.

[13] 杨治中,王梓亭,魏鹏.刺激响应型脂质体在靶向药物递送系统中应用[J].中国生物化学与分子生物学报,2020,36(12):1395-1403.

[14] 梅隽彦.基于细胞穿膜肽的药物递送研究进展[J].广州化学,2020,45(2):64-75.

[15] KONG L, CAI F Y, YAO X M, et al. RPV-modified epirubicin and dioscin co-delivery liposomes suppress non-small cell lung cancer growth by limiting nutrition supply[J]. Cancer Sci, 2020, 111(2):621-636.

[16] 姚雪敏,荆鸣,蔡馥伊,等.穿膜肽 GGPFV 修饰的柔红霉素/薯蓣皂苷脂质体的处方优化及细胞毒性研究[J].中国药房,2020,31(21):2579-2584.

[17] 郭坤蕾,张国楠.卵巢癌靶向治疗的研究现状[J].肿瘤预防与治疗,2018,31(6):449-454.

[18] 牛星燕,张冬萍,彭芸花.卵巢癌铂耐药机制及相关靶向治疗研究进展[J].中国妇产科临床杂志,2020,21(6):661-663.

[19] 李溪,俞超芹.靶向肿瘤相关巨噬细胞治疗卵巢癌的研究进展[J].中国肿瘤,2019,28(2):137-142.

[20] 晁宏图,张孟丽. LncRNA LINC01138 靶向 miR-193a-3p 对卵巢癌 A2780 细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响[J].郑州大学学报(医学版),2020,55(5):668-672.

[21] 杨越.长效靶向紫杉醇脂质体的制备及其抗肿瘤作用研究[D].长春:吉林大学,2016.

[22] 张传琪.五味子脂 A 通过抑制 ROS 增强紫杉醇抑制卵巢癌 Skov3 细胞增殖的作用及机制[D].长春:吉林大学,2015.

[23] 袁思文,刘育辰,刘刚,等.单因素试验结合 Box-Behnken 设计-响应面法优化甘草中黄酮类成分的提取工艺[J].中国药房,2019,30(3):355-359.

[24] 曾海蓉,李婷娜,冉倩,等.基于嫡权法结合 Box-Behnken 响应面法优化桂枝芍药知母颗粒复方提取工艺[J].中草药,2020,51(1):84-90.

[25] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S]. 2020 年版.北京:中国医药科技出版社,2020:474-476.

(收稿日期:2020-12-15 修回日期:2021-03-03)

(编辑:林 静)

《中国药房》杂志——中文核心期刊,欢迎投稿、订阅