

# Legumain 酶和线粒体双级靶向去氢骆驼蓬碱脂质体的制备及其体外特性评价<sup>△</sup>

伊帕尔古丽·阿皮孜\*, 贺宏吉, 王昭志, 李喆喆, 卡迪热娅·艾克拉木, 白静雅, 王梅<sup>#</sup>(新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830017)

中图分类号 R944 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)13-1565-08  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.13.06



**摘要** 目的 制备 Legumain 酶和线粒体双级靶向去氢骆驼蓬碱(HM)脂质体(KA@HM-LPS), 并对其制剂学特性、体外抗肿瘤作用及生物相容性进行初步评价。方法 首先, 筛选 KA@HM-LPS 的制备方法和均质化方法, 并对制备的脂质体进行表征。其次, 分别测定 KA@HM-LPS 的血清稳定性、体外释放率、溶血百分数, 以及空白脂质体作用下的细胞存活率。最后, 分别测定 KA@HM-LPS 作用下的细胞存活率、线粒体靶向性和对肝癌细胞迁移和侵袭的抑制作用。结果 选择薄膜分散法制备 KA@HM-LPS, 其包封率为  $(90.50 \pm 0.62)\%$ ; 选择挤出法作为 KA@HM-LPS 的均质化方法。所制备的 KA@HM-LPS 粒径、多分散系数、Zeta 电位分别为  $(211.40 \pm 11.67)$  nm、 $0.316 \pm 0.014$  和  $(-14.20 \pm 0.49)$  mV。在  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、10% 胎牛血清中, 12 h 后 KA@HM-LPS 的粒径基本稳定; KA@HM-LPS 在 20% 血浆中的体外释放曲线符合 Weibull 分布, 具有缓释效果; 当 HM 质量浓度为  $160\text{ }\mu\text{g/mL}$  时, KA@HM-LPS 的溶血百分数为  $(4.23 \pm 0.19)\%$ , 远小于游离 HM, 具有安全性。当空白脂质体的质量浓度达  $400\text{ }\mu\text{g/mL}$  时, LO2 细胞的存活率为  $(94.40 \pm 6.12)\%$ , 载体生物相容性较好。体外细胞实验结果显示, KA@HM-LPS 对 Legumain 酶过表达的肝癌细胞 LGMN<sup>+</sup>-SK-Hep-1 的抑制作用显著高于对正常肝癌细胞 SK-Hep-1 的抑制作用; 且与 SK-Hep-1 细胞相比, LGMN<sup>+</sup>-SK-Hep-1 细胞对载体的摄取效率更高; KA@HM-LPS 可以更明显地抑制 LGMN<sup>+</sup>-SK-Hep-1 细胞的迁移和侵袭。结论 成功制备 KA@HM-LPS; 该脂质体可以有效抑制 Legumain 酶过表达的肝癌细胞的迁移和侵袭, 并提高 HM 的血液相容性。

**关键词** 去氢骆驼蓬碱; 线粒体; Legumain 酶; 脂质体

## Preparation of Legumain enzyme and mitochondrial double-stage targeted harmine liposome and evaluation of its *in vitro* characterization

Ipargul · Hafiz, HE Hongji, WANG Zhaozhi, LI Zhezhe, Kadirya · Akram, BAI Jingya, WANG Mei (College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830017, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To prepare Legumain enzyme and mitochondrial double-stage targeted harmine (HM) liposome (KA@HM-LPS) and preliminary evaluate its pharmaceutical properties, *in vitro* antitumor effect and biocompatibility. **METHODS** Firstly, the preparation and homogenization methods of KA@HM-LPS was screened, and prepared liposomes were characterized. Secondly, the serum stability, *in vitro* release rate, hemolysis percentage of KA@HM-LPS and cell survival rate under KA@BLPS were determines respectively. Finally, the cell survival rate, mitochondrial targeting and inhibitory effects on cell migration and invasion of KA@HM-LPS were determined. **RESULTS** KA@HM-LPS was prepared by the thin-film dispersion method, with encapsulation efficiency of  $(90.50 \pm 0.62)\%$ . The extrusion moulding method was selected as homogenization method of KA@HM-LPS. The particle size, polydispersity index, and Zeta potential of KA@HM-LPS were  $(211.40 \pm 11.67)$  nm,  $0.316 \pm 0.014$  and  $(-14.20 \pm 0.49)$  mV, respectively. In  $37\text{ }^\circ\text{C}$ , 10% FBS, the particle size of KA@HM-LPS kept stable after 12 h. *In vitro* release curve of KA@HM-LPS in 20% plasma conformed to Weibull distribution and had the property of sustained release. When HM concentration was  $160\text{ }\mu\text{g/mL}$ , the hemolysis percentage of KA@HM-LPS was  $(4.23 \pm 0.19)\%$ , which was much lower than that of free HM, with safety. When the mass concentration of KA@BLPS reaches  $400\text{ }\mu\text{g/mL}$ , the survival rate of LO2 cells was  $(94.40 \pm 6.12)\%$ , and the biocompatibility was good. Cell test results *in vitro* showed that, inhibitory effect of KA@HM-LPS on liver cancer cells with overexpression of Legumain enzyme (LGMN<sup>+</sup>-SK-Hep-1) was significantly higher than that of normal liver cancer cells SK-Hep-1; compared with SK-Hep-1, LGMN<sup>+</sup>-SK-Hep-1 cells had a higher uptake efficiency of the liposome; KA@HM-LPS could significantly inhibit the migration and invasion of LGMN<sup>+</sup>-

<sup>△</sup> 基金项目 国家自然科学基金资助项目(No.81760637);新疆维吾尔自治区天山英才计划第三期资助项目;新疆天然活性组分和释药技术重点实验室项目(No.XJDX1713);新疆医科大学大学生创新训练计划项目(No.CX2021048)

\* 第一作者 硕士研究生。研究方向:药物新剂型及药物传输系统。E-mail: ipargull@qq.com

<sup>#</sup> 通信作者 教授,博士生导师,博士。研究方向:药物新剂型及药物传输系统。E-mail: wm630@163.com

SK-Hep-1 cells. **CONCLUSIONS** KA@HM-LPS is prepared successfully, which can effectively inhibit the migration and invasion of liver cancer cells with Legumain enzyme overexpression, and improve the blood compatibility of HM.

**KEYWORDS** harmine; mitochondria; Legumain enzyme; liposome

肝癌严重影响着人类的生活,其中,我国肝癌的发病例数占全球的55%<sup>[1-3]</sup>。在肝癌的药物治疗方面,由于化疗药物的全身毒性或严重不良反应,导致患者生存质量下降<sup>[4]</sup>。研究与开发安全高效的药物递送系统,有望降低化疗药物毒性反应的严重程度,同时维持或提高治疗效果。

去氢骆驼蓬碱(harmine, HM)是从骆驼蓬种子中分离出来的生物碱。研究显示, HM通过抑制蛋白激酶B (protein kinase B, Akt)磷酸化诱导胶质母细胞瘤细胞凋亡,并通过G2细胞周期阻滞和线粒体途径诱导肝母细胞瘤HepG2细胞凋亡<sup>[5-6]</sup>。然而,由于HM溶解度低且在大剂量下易引起神经毒性,导致其临床应用受限。线粒体是一种高度活跃的细胞器,通过不断分裂和融合来维持细胞的正常生理功能<sup>[7]</sup>。线粒体动力学失调通常会影响肿瘤细胞的能量供应、氧化还原信号和代谢功能。由于线粒体的功能障碍在肿瘤发展中起着至关重要的作用,已被确定为治疗肿瘤的关键靶点<sup>[8]</sup>。Legumain酶,又称天冬酰胺内肽酶,属于半胱氨酸蛋白酶家族,最初发现于豆类植物<sup>[9]</sup>。研究表明, Legumain酶在不同类型的实体肿瘤中表达上调,其水平与肿瘤的恶性潜能呈正相关<sup>[10]</sup>。KA肽由Legumain酶响应氨基酸序列和线粒体靶向肽KLA序列组成,其双级靶向特点有待进一步考察<sup>[11-12]</sup>。

为提高HM进入肿瘤细胞及其线粒体的效率,降低HM的毒副作用,本研究以大豆磷脂(soybean phospholipid, SPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(dipalmitoyl phosphatidylcholine, DPPC)、胆固醇(cholesterol, Chol),以及KA肽偶联的二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000(DSPE-PEG<sub>2000</sub>-KA)为材料负载HM,得到Legumain酶和线粒体双级靶向HM脂质体(KA@HM-LPS),并对其制剂学特性、体外抗肿瘤作用及生物相容性进行初步评价,以期为后续研究提供实验基础。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究的主要仪器有UV-2700型紫外可见分光光度计[岛津(上海)实验器材有限公司], R-2003型旋转蒸发仪、SHZ-95B型循环水式多用真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司), HWS-24型电子恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司), KQ5200DE型超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司), BSA124S型电子分析天平(德国Sartorius公司), 3-18KS型台式高速冷冻离心机(美国Sigma化学公司), VCX500型超声波破碎仪(美国Sonics公司), 610000型微型脂质体挤出器(美国Avanti公司), 孔径为100 nm的聚碳酸酯膜, PHSJ-3F型pH计(上海

雷磁创益仪器仪表有限公司), Nano ZS型纳米粒径仪(英国Malvern公司), Modulyo型真空冷冻干燥机、371型CO<sub>2</sub>培养箱、Herasafe™ KS型Ⅱ级生物安全柜(美国Thermo Fisher Scientific公司), 85-2型恒温磁力搅拌器(常州金坛精达仪器制造有限公司), ZWYR-D2402型恒温振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司), Victor Nivo型多功能酶标仪(美国PerkinElmer公司), JEM-1230型透射电镜[JEOL捷欧路(北京)科贸有限公司], ECLIPSE Ti型激光共聚焦显微镜[Nikon仪器(上海)有限公司], SX-500型全自动高压灭菌锅(日本Tomy Digital Biology公司)。

### 1.2 主要药品与试剂

本研究的主要药品与试剂有HM标准品(成都瑞芬思生物科技有限公司,批号Q041-180308,高效液相色谱法测得含量>98%), SPC[艾伟拓(上海)医药科技有限公司,批号SY-SO-200401], 二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000(DSPE-mPEG<sub>2000</sub>)、DPPC、Chol(西安瑞禧生物科技有限公司,批号分别为LP-R4-039、CC0657、RA0200624), 胎牛血清、青霉素、链霉素溶液、胰酶MEM培养基(美国Gibco公司,批号分别为2173969RP、2129299、2186962、8121247), 磷酸盐缓冲液(PBS,美国Hyclone公司,批号AG29574691), Dil细胞膜红色荧光探针(上海碧云天生物技术有限公司,批号010421210629), MitoLite Blue FX490线粒体蓝色荧光染料(美国AAT Bioquest公司,批号1771462), CCK-8试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司,批号BA03175388), 基质胶[康宁(上海)有限公司,批号1060001], 甲醇(天津市化学试剂有限公司,批号20211101410), DSPE-PEG<sub>2000</sub>-KA(本实验室自制,批号20210828), 其余试剂均为分析纯。

### 1.3 细胞与动物

人正常肝癌细胞SK-Hep-1购自武汉普诺赛生命科技有限公司; Legumain酶过表达的人肝癌细胞SK-Hep-1(LGMN<sup>+</sup>-SK-Hep-1)在本实验室通过慢病毒介导转染的方法获得<sup>[13]</sup>; 人正常肝细胞LO2由新疆医科大学药学院艾尼娃尔·艾克木教授课题组赠送; 雄性BALB/c裸鼠(8周龄, 22~24 g, 生产许可证SCXK-2016-0006)购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 HM含量测定方法的建立

2.1.1 HM标准曲线的建立 精密称取HM标准品10 mg, 用甲醇溶解, 并定容至10 mL, 制成质量浓度为1 mg/mL的HM标准品贮备液。将其用甲醇稀释, 制得质量浓度为10 μg/mL的HM标准品溶液, 置于紫外可见分

光光度计上进行全波长扫描。结果显示, HM 在 240、300 nm 波长处均有较高的吸收, 但是 240 nm 波长接近于紫外末端, 因此, 选择 300 nm 作为检测 HM 含量的最佳吸收波长。将 HM 标准品溶液用甲醇稀释得到质量浓度为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的系列溶液, 分别于 300 nm 波长处测定吸光度 ( $A$ ) 值, 以  $A$  值对质量浓度 ( $C$ ) 进行线性回归, 得 HM 的回归方程为  $A=0.0828C+0.0052$  ( $R^2=0.9995$ ), 表明 HM 检测质量浓度的线性范围为 1~10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

**2.1.2 方法学考察** (1) 精密性试验: 将“2.1.1”项下制备的 HM 标准品溶液用甲醇稀释到质量浓度分别为 4、6、8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (低、中、高浓度), 在 300 nm 波长处分别于 0、12、24 h 检测以考察日内精密性, 于 0、24、48、72 h 检测以考察日间精密性, 结果显示, 低、中、高浓度 HM 的日内精密性 RSD 分别为 0.26%、0.25%、0.41%, 日间精密性 RSD 分别为 0.48%、0.17%、0.87%, 均小于 2.00% ( $n=6$ ), 说明方法的精密性良好。(2) 稳定性试验: 取“2.2.1”项下采用薄膜分散法结合挤出法制备的 KA@HM-LPS 1 mL, 分别在室温条件下放置 0、2、4、8、16、24 h 后, 用甲醇溶解并定容至 50 mL, 在 300 nm 波长处测定  $A$  值。结果显示,  $A$  值的 RSD 为 1.97%, 小于 2.00% ( $n=6$ ), 说明方法的稳定性较好。(3) 重复性试验: 取“2.2.1”项下采用薄膜分散法结合挤出法制备的 KA@HM-LPS 100  $\mu\text{L}$ , 用甲醇溶解并定容至 5 mL, 在 300 nm 波长处测定  $A$  值。结果显示,  $A$  值的 RSD 为 1.74%, 小于 2.00% ( $n=6$ ), 说明方法的稳定性较好。(4) 加样回收率试验: 从“2.1.1”项下制备的 HM 标准品贮备液中分别精密量取 0.2、0.3、0.4 mL 置于 50 mL 容量瓶中, 各加 0.5 mL 空白脂质体 (KA@BLPS), 用甲醇定容至刻度, 得到 HM 质量浓度分别为 4、6、8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (低、中、高浓度) 的供试品溶液。检测 300 nm 波长处的  $A$  值, 以评价加样回收率。结果显示, 低、中、高浓度 HM 对应的加样回收率 ( $n=3$ ) 分别为  $(99.30 \pm 0.47)\%$ 、 $(101.00 \pm 1.40)\%$  和  $(104.10 \pm 0.33)\%$ , 表明方法的准确度较好<sup>[14]</sup>。

## 2.2 KA@HM-LPS 制备方法的选择

**2.2.1 KA@HM-LPS 的制备** 分别采用逆相蒸发法、pH 梯度法和薄膜分散法制备 KA@HM-LPS。(1) 逆相蒸发法: 按照质量比 10:10:5:1:1, 精密称取 SPC、DPPC、Chol、DSPE-PEG<sub>2000</sub>-KA 和 HM 标准品, 用适量有机相 (氯仿-甲醇混合液, 体积比 2:1, 下同) 溶解, 加入有机相 1/3 体积的去离子水, 冰浴超声 2 h (100 W), 减压旋蒸 (压力 0.05 MPa, 转速 100 r/min, 下同) 至有机溶剂除尽<sup>[15]</sup>, 用微型脂质体挤出器挤出 3 次, 得 KA@HM-LPS。(2) pH 梯度法: 按照质量比 10:10:5:1:1, 精密称取 SPC、DPPC、Chol、DSPE-PEG<sub>2000</sub>-KA 和 HM 标准品, 用适量有机相溶解, 减压旋蒸形成干燥的脂膜, 加入有机相 1/3 体积的柠檬酸缓冲液 (浓度为 50 mmol/L), 此时的

pH 值为 2.0; 超声水合 30 min (100 W), 形成的混悬液用碳酸钠缓冲液 (浓度为 150 mmol/L) 调节 pH 值至 7.0, 磁力搅拌 (室温, 转速 200 r/min) 2 h, 微型脂质体挤出器挤出 3 次, 得 KA@HM-LPS<sup>[16]</sup>。(3) 薄膜分散法: 按照质量比 10:10:5:1:1, 精密称取 SPC、DPPC、Chol、DSPE-PEG<sub>2000</sub>-KA 和 HM 标准品, 用适量有机相溶解, 减压旋蒸形成干燥的脂膜, 加入有机相 1/3 体积的去离子水, 超声水合 30 min (100 W), 用微型脂质体挤出器挤出 3 次, 得 KA@HM-LPS<sup>[17]</sup>。

**2.2.2 脂质体的表征** 分别对逆相蒸发法、pH 梯度法和薄膜分散法制备的 KA@HM-LPS 进行表征。(1) 分离效率的测定: 精密称取 HM 标准品 5 mg, 加入 KA@BLPS 5 mL, 超声 5 min, 使之混匀, 得到质量浓度为 1 mg/mL 的 HM 物理混合液。取 HM 物理混合液 1 mL, 置于超滤离心管 (截留分子量为 10 kDa) 中, 离心 2 次 (转速 6 000 r/min, 每次 20 min), 每次离心前加入去离子水 1 mL, 混匀 3 次。离心结束后, 将外管中的游离药物用甲醇定容至 5 mL, 测定 HM 的浓度, 采用分离效率评价方法的可行性。根据公式①计算得到分离效率为  $(97.00 \pm 1.67)\%$ , 说明超滤法适用于游离 HM 与脂质体的分离<sup>[18]</sup>。因此, 采用超滤法测定包封率。(2) 包封率的测定: 精密量取 KA@HM-LPS 1 mL, 与上述同法测定其游离药物的量 ( $W_{\text{游离}}$ ); 另取 1 mL KA@HM-LPS, 用甲醇破乳并定容至 50 mL, 测定总药物的量 ( $W_{\text{总}}$ ), 根据公式②计算包封率。(3) 载药量的测定: 精密量取 KA@HM-LPS 1 mL, 冷冻干燥 24 h, 通过减重法测定 KA@HM-LPS 的量 ( $W_{\text{KA@HM-LPS}}$ ), 根据公式③计算载药量。(4) 取 0.5 mL KA@HM-LPS, 加 0.5 mL 去离子水混匀, 分别测定粒径、多分散系数 (polydispersity index, PDI) 和 Zeta 电位。

$$\text{分离效率} = 100\% \times (\text{初始量} - \text{测得量}) / \text{初始量} \dots\dots\dots \text{公式①}$$

$$\text{包封率} = 100\% \times (W_{\text{总}} - W_{\text{游离}}) / W_{\text{总}} \dots\dots\dots \text{公式②}$$

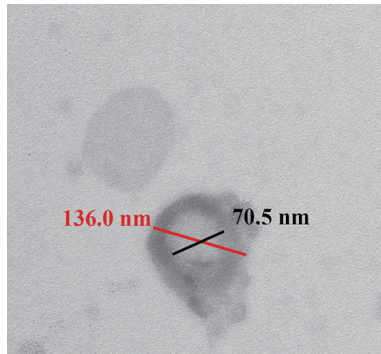
$$\text{载药量} = 100\% \times (W_{\text{总}} - W_{\text{游离}}) / W_{\text{KA@HM-LPS}} \dots\dots\dots \text{公式③}$$

数据分析应用 SPSS 26.0 软件, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示; 组间对比时, 数据首先采用单因素方差分析, 而后采用 Tukey HSD 事后检验, 并采用 Bonferroni 法校正显著性水平的 Tukey HSD 事后检验结果, 检验水准  $\alpha=0.05$ 。结果显示, 逆相蒸发法、pH 梯度法和薄膜分散法制备的 KA@HM-LPS 包封率及载药量差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ ), 而粒径差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。其中, 薄膜分散法制备的 KA@HM-LPS 包封率和载药量最高 (表 1), 因此, 选择薄膜分散法制备 KA@HM-LPS 用于后续实验。根据薄膜分散法制备的 KA@HM-LPS 呈负电荷, 说明其在体内的毒性可能较低。KA@HM-LPS 原液 (未经过稀释的脂质体) 借助透射电镜观察其形态, 如图 1 所示。由图 1 可见, KA@HM-LPS 呈类圆形, 粒径大小跟粒径仪测定的平均粒径相差不大<sup>[19]</sup>。另外, 将 KA@HM-LPS

材料中的 DSPE-PEG<sub>2000</sub>-KA 替换成 DSPE-mPEG<sub>2000</sub>, 按 KA@HM-LPS 相同的制备方法制备未修饰脂质体 (HM-LPS)。

表 1 不同方法制备所得 KA@HM-LPS 的表征结果 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

方法	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	包封率/%	载药量/%
逆相蒸发法	225.80 ± 5.69	0.337 ± 0.095	-15.20 ± 1.08	83.60 ± 1.61	4.10 ± 0.25
pH 梯度法	236.20 ± 12.03	0.301 ± 0.040	-17.40 ± 0.61	72.90 ± 0.30	3.20 ± 0.19
薄膜分散法	211.40 ± 11.67	0.316 ± 0.014	-14.20 ± 0.49	90.50 ± 0.62	4.60 ± 0.14

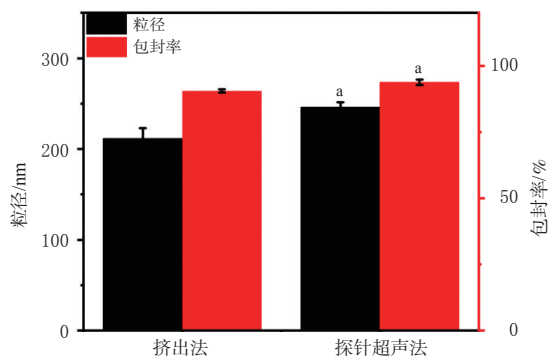


注: 黑色线条代表短径, 红色线条代表长径

图 1 KA@HM-LPS 的透射电镜图

### 2.3 KA@HM-LPS 均质化方法的选择

分别采用探针超声法和挤出法进行 KA@HM-LPS 均质化。(1) 探针超声法: 将 KA@HM-LPS 置于冰浴中, 探针超声 10 min (150 W, 工作 3 s、停止 2 s), 共 3 次。(2) 挤出法: 将 KA@HM-LPS 在 37 °C 保温条件下用微型脂质体挤出 3 次。分别比较 2 种方法所得 KA@HM-LPS 的粒径和包封率。数据分析和统计方法同“2.2.2”项下。结果显示, 与探针超声法相比, 挤出法处理的 KA@HM-LPS 包封率较低、粒径较小 ( $P < 0.01$ ), 因此, 本研究选择挤出法作为均质化方法用于后续实验。结果见图 2。



a: 与挤出法比较,  $P < 0.01$

图 2 KA@HM-LPS 不同均质化方法结果比较 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

### 2.4 KA@HM-LPS 的血清稳定性评价

首先, 取 KA@HM-LPS 5 mL, 依次在 -20 °C 和 -80 °C 冰箱中各预冻 12 h; 放入冷冻干燥机中, 于 -55 °C 减压条件下干燥 24 h, 得 KA@HM-LPS 冻干粉。精密称取 1 mg KA@HM-LPS 冻干粉, 混悬在 3 mL

含 10% 胎牛血清的培养基中, 于 37 °C 恒温孵育 24 h, 模拟生理环境。分别在第 0、1、2、4、6、8、10、12、24 h 时测定 KA@HM-LPS 的粒径, 观察血清对 KA@HM-LPS 稳定性的影响<sup>[20]</sup>。结果显示, KA@HM-LPS 的粒径在 12 h 后几乎未再变大, 说明稳定性良好。结果见图 3。

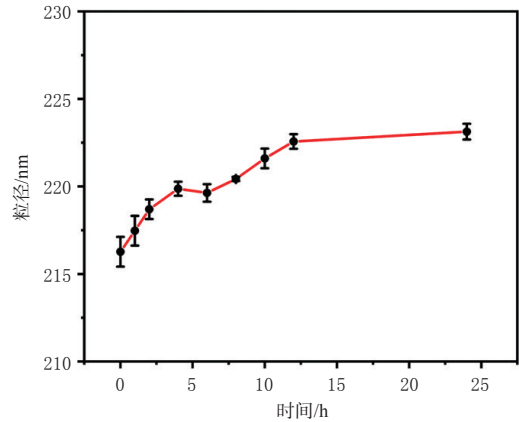


图 3 KA@HM-LPS 在模拟生理环境下粒径随时间的变化图

### 2.5 KA@HM-LPS 的血浆稳定性评价

为评价 KA@HM-LPS 的血浆稳定性, 测定其在 20% 血浆中的体外释放率。通过眼眶取血法从 BALB/c 裸鼠采集全血, 将 1 mL 裸鼠全血 (加抗凝剂) 以 2 500 r/min 离心 10 min, 吸取最上层的血浆部分, 并用生理盐水按照 1:5 稀释, 得到 20% 的血浆样本。将“2.4”项下 KA@HM-LPS 冻干粉和游离 HM 分别混悬在 20% 的 BALB/c 裸鼠血浆中, 调节 HM 的质量浓度为 100 μg/mL, 体积为 2 mL, 放入透析袋内 (截留分子量为 14 kDa), 两端系好, 置于含 40 mL 等渗 PBS (pH=7.4) 的 50 mL EP 管中, 在 37 °C 恒温条件下以 150 r/min 振摇。分别在第 1、2、4、6、8、10、12、24、48、72 h 取样 1 mL (每次取样后补充同温、等体积、等渗 PBS), 加甲醇 1 mL 混匀, 采用紫外分光光度法测定 HM 的含量, 计算体外释放率<sup>[4]</sup>。结果显示, KA@HM-LPS 的体外释放率在 72 h 时为 (90.80 ± 1.28)%, 而 HM 在 24 h 时已达到 (91.00 ± 1.18)%, 详见图 4。此外, 将 KA@HM-LPS 的体外释放曲线分别与零级、一级、Higuchi 和 Weibull 函数方程拟合, 其拟合优度分别为 0.767 1、0.988 9、0.921 3 和 0.996 3, 体外释放曲线更符合 Weibull 分布, 说明 KA@HM-LPS 具有缓释效果。

### 2.6 KA@HM-LPS 的毒性评价

2.6.1 血液相容性 为预测 KA@HM-LPS 在体内的血液相容性, 测定其在 2% 红细胞悬液中的溶血百分数。通过眼眶取血法从 BALB/c 裸鼠采集抗凝全血 1 mL, 离心数次 (转速 2 500 r/min, 时间 10 min), 每次离心前均去掉上清液, 加生理盐水混匀。当上清液变得无色透明时, 加入生理盐水定容至 50 mL, 得到 2% 红细胞悬液。将“2.4”项下 KA@HM-LPS 冻干粉用生理盐水制成质量浓度为 40、80、120、160、200 μg/mL 的混悬液, 加入等体

积的2%红细胞悬液,于37℃保温孵育2h。阳性对照为去离子水,阴性对照为生理盐水。以200 r/min离心5 min,取上清液,采用紫外可见分光光度计在416 nm波长处测定A值,根据公式④计算溶血百分数<sup>[21-22]</sup>。各质量浓度(以HM计算)KA@HM-LPS的溶血百分数分别与游离HM(质量浓度为40 μg/mL)对比。

$$\text{溶血百分数} = 100\% \times (A_{\text{样品}} - A_{\text{阴性对照}}) / (A_{\text{阳性对照}} - A_{\text{阴性对照}}) \quad \text{公式④}$$

数据分析和统计方法同“2.2.2”项下。结果显示,游离HM的质量浓度为40 μg/mL时,KA@HM-LPS的溶血百分数为(5.16 ± 0.19)%;脂质体中HM的质量浓度为40、80、120、160、200 μg/mL时,KA@HM-LPS的溶血百分数分别为(2.54 ± 0.13)%、(3.00 ± 0.19)%、(3.26 ± 0.19)%、(4.23 ± 0.19)%、(5.16 ± 0.14)%。将KA@HM-LPS中HM的质量浓度为160 μg/mL时的溶血百分数与游离HM(40 μg/mL)的溶血百分数比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),表明KA@HM-LPS的血液相容性较好<sup>[23]</sup>。

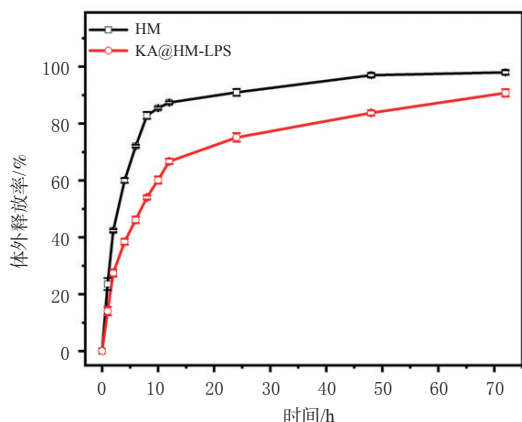
2.6.2 KA@BLPS对正常肝细胞存活率的影响 为考察KA@BLPS对正常肝细胞的毒性,将人正常肝细胞

LO2按照5 000个/孔接种至96孔板中,并在5% CO<sub>2</sub>、37℃培养箱中培养12 h。按照不同质量浓度[0(空白)、25、50、100、200、400 μg/mL]加入KA@BLPS,继续培养48 h。另设空白调零组,不加细胞和药物,只加培养基。每个孔中加入10 μL CCK-8孵育2 h,采用酶标仪在450 nm波长处测定A值,并根据公式⑤计算细胞存活率。结果显示,当KA@BLPS的质量浓度达到400 μg/mL时,LO2细胞的存活率为(94.40 ± 6.12)%,说明载体的毒性很小,生物相容性较好。结果见图5A。

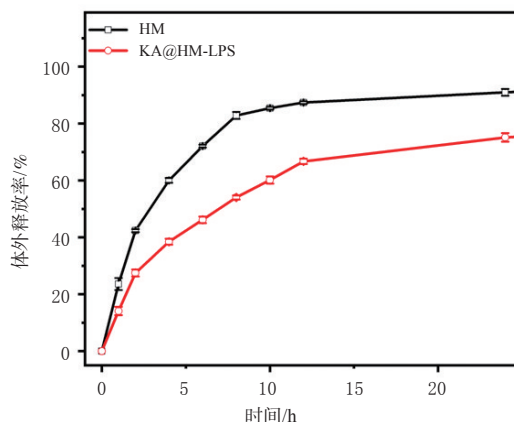
$$\text{细胞存活率} = 100\% \times (A_{\text{加药组}} - A_{\text{空白调零组}}) / (A_{\text{空白组}} - A_{\text{空白调零组}}) \quad \text{公式⑤}$$

## 2.7 Legumain酶过表达对KA@HM-LPS作用下细胞存活率的影响

本课题组前期研究显示,Legumain酶在肝癌细胞中的表达量低于在肝癌组织中的表达量<sup>[13]</sup>。为进行KA@HM-LPS的体外特性评价,本研究采用Legumain酶过表达人肝癌细胞系。取人正常肝癌细胞SK-Hep-1和LGMN<sup>+</sup>-SK-Hep-1,分别按照5 000个/孔接种至96孔板中,5% CO<sub>2</sub>、37℃培养箱中培养12 h。按照不同质量浓度[0(空白)、20、40、60、80、100 μg/mL]加入

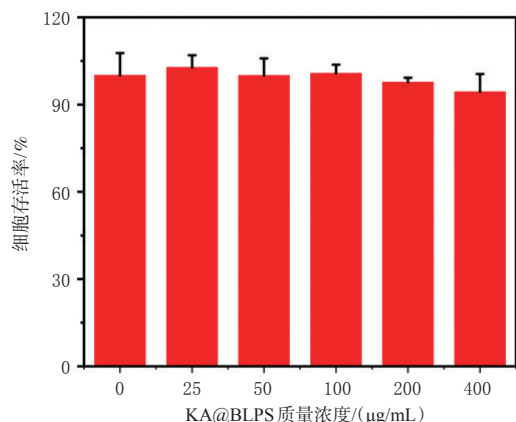


A. 0~72 h的体外释放率

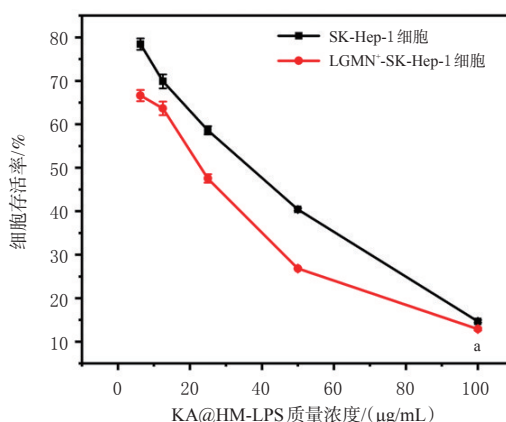


B. 图A中0~24 h段体外释放率放大图

图4 KA@HM-LPS在20%血浆中的体外释放率随时间的变化图



A. 不同质量浓度KA@BLPS对人正常肝细胞LO2细胞存活率的影响



B. Legumain酶过表达对KA@HM-LPS作用下细胞存活率的影响

a: 与LGMN<sup>+</sup>-SK-Hep-1细胞组比较, $P < 0.001$

图5 细胞存活率CCK-8实验结果

KA@HM-LPS, 孵育 48 h。每个孔中加入 10  $\mu$ L CCK-8 孵育 2 h, 采用酶标仪在 450 nm 波长处测定 *A* 值, 并根据公式⑤计算细胞存活率<sup>[24]</sup>。

数据分析和统计方法同“2.2.2”项下。结果显示, LGMN<sup>+</sup>-SK-Hep-1 的细胞存活率要显著低于 SK-Hep-1 ( $P < 0.001$ ), 表明 KA@HM-LPS 对 LGMN<sup>+</sup>-SK-Hep-1 细胞的抑制作用显著大于 SK-Hep-1 细胞, 初步说明 KA@HM-LPS 具有显著的 Legumain 酶响应性。结果见图 5B。

## 2.8 Legumain 酶过表达对 KA@HM-LPS 线粒体靶向性的影响

由于 HM 无自发荧光特性, 为观察 KA@HM-LPS 被 KA 肽介导细胞的摄取和定位情况, 将 HM 替换成 Dil 细胞膜红色荧光探针, 采用与 KA@HM-LPS 相同的制备方法得到 Dil 负载的 KA 肽修饰脂质体 (KA@Dil-LPS)。取 SK-Hep-1 和 LGMN<sup>+</sup>-SK-Hep-1 细胞, 分别接种到 Confocal 皿中, 每皿  $1 \times 10^4$  个细胞, 在 5% CO<sub>2</sub>、37  $^{\circ}$ C 条件下培养 12 h。加入 KA@Dil-LPS 孵育 6 h, 其中 Dil 的终浓度为 2  $\mu$ mol/L<sup>[25]</sup>。将细胞用预热的无血清胰酶 MEM 培养基清洗 3 次, 根据 MitoLite Blue FX490 线粒体蓝色荧光染料试剂盒检测结果标记各组细胞的线粒体, 置于共聚焦显微镜下观察 KA@HM-LPS 在 2 种细胞中的摄取情况与线粒体靶向性<sup>[26]</sup>。结果显示, 在 Legumain 酶过表达的 LGMN<sup>+</sup>-SK-Hep-1 细胞中, KA@Dil-LPS 更多地被细胞摄取, 且特异性地聚集在线粒体膜上和线粒体内, 这说明 KA@HM-LPS 具有 Legumain 酶响应性线粒体靶向特点, 其可以被 Legumain 酶过表达的癌细胞特异

性摄取, 并靶向至癌细胞的线粒体。结果见图 6。

## 2.9 KA@HM-LPS 对肝癌细胞迁移和侵袭的影响

肿瘤细胞的迁移和侵袭是肿瘤发生、发展、转移和复发的重要原因<sup>[27]</sup>。本研究通过 Transwell 实验分别测定 KA@HM-LPS 对 LGMN<sup>+</sup>-SK-Hep-1 细胞迁移和侵袭的影响。

**2.9.1 细胞迁移实验** 将 LGMN<sup>+</sup>-SK-Hep-1 细胞重悬于无血清胰酶 MEM 培养基中, 按照  $1 \times 10^4$  个/孔接种至 Transwell 小室。将细胞分为空白对照组 (加入无血清胰酶 MEM 培养基)、HM 组、未修饰脂质体 (HM-LPS) 组和 KA@HM-LPS 组, 其中涉及 HM 的终浓度均为 20  $\mu$ mol/L (剂量依据来源于前期预实验)。下室加入 20% 胎牛血清 600  $\mu$ L, 在 5% CO<sub>2</sub>、37  $^{\circ}$ C 条件下培养 48 h。上室用 PBS 洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定 20 min, 结晶紫染色 20 min, PBS 洗 3 次, 晾干, 拍照<sup>[28]</sup>。Transwell 实验图片分析应用 Image J 1.53 软件, 实验数据分析和统计同“2.2.2”项下。结果显示, KA@HM-LPS 对 LGMN<sup>+</sup>-SK-Hep-1 细胞迁移的抑制作用显著高于 HM-LPS ( $P < 0.001$ )。结果见图 7、图 8A。这说明 KA@HM-LPS 可以更好地抑制 Legumain 酶过表达癌细胞的迁移。

**2.9.2 细胞侵袭实验** Transwell 上室先用 50  $\mu$ L 基质胶 ( $V_{\text{基质胶}}:V_{\text{PBS}}=1:8$ ) 铺胶, 4  $^{\circ}$ C 过夜, 再水化。后续实验步骤同“细胞迁移实验”。结果显示, KA@HM-LPS 对 LGMN<sup>+</sup>-SK-Hep-1 细胞侵袭的抑制作用显著高于 HM-LPS ( $P < 0.001$ ), 结果见图 8B、图 9。这说明 KA@HM-LPS 可以更好地抑制 Legumain 酶过表达癌细胞的侵袭。

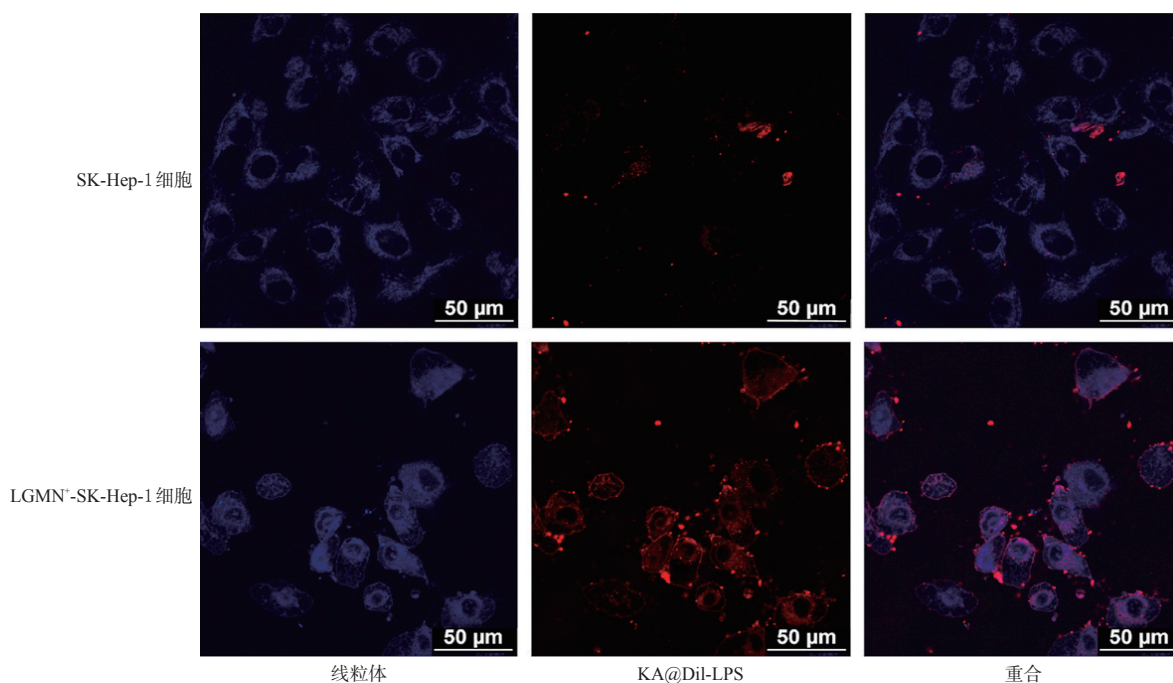


图 6 线粒体靶向性细胞摄取实验结果

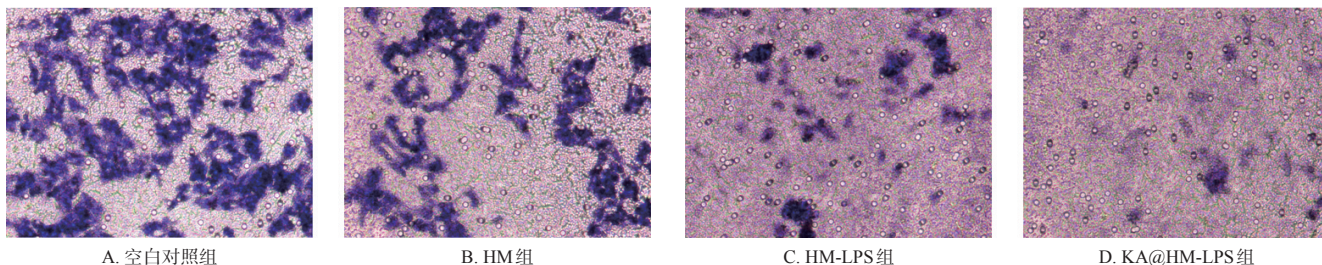
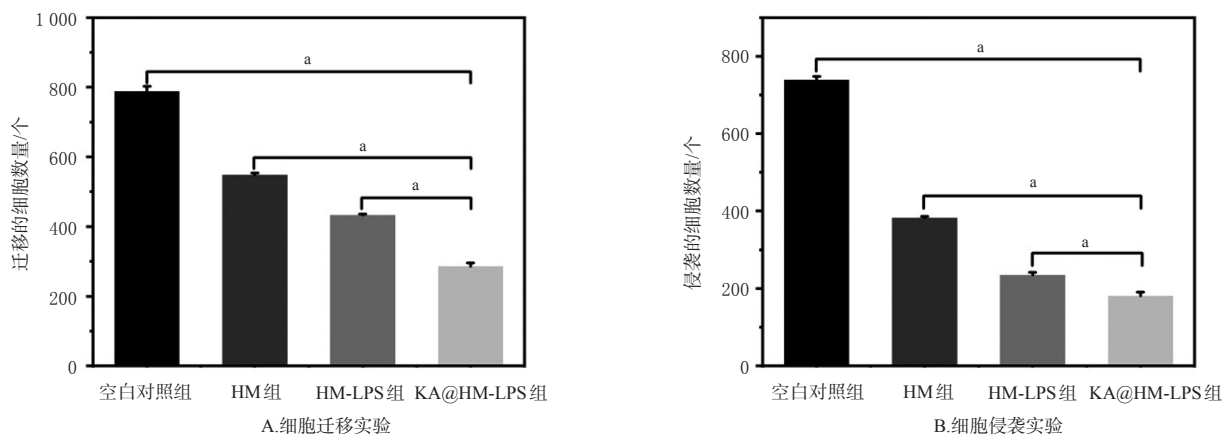


图7 细胞迁移实验结晶紫染色显微图( $\times 400$ )



a: 组间两两比较,  $P < 0.001$

图8 细胞迁移和侵袭实验结果柱状图

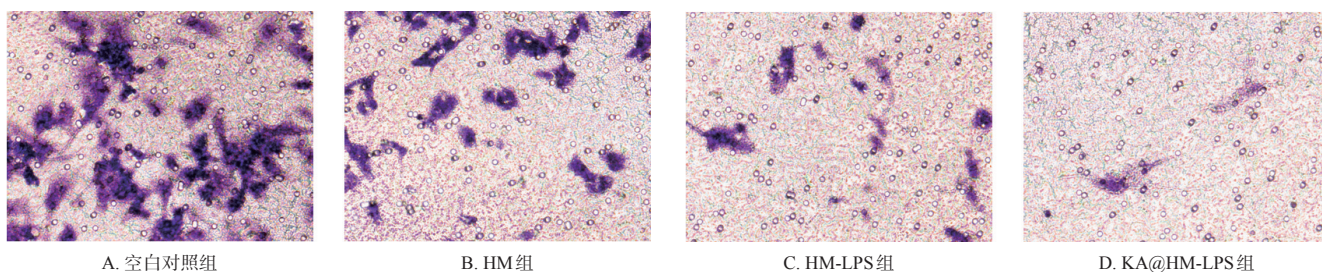


图9 细胞侵袭实验结晶紫染色显微图( $\times 400$ )

### 3 讨论

引起肝癌的主要危险因素有乙型肝炎、丙型肝炎、非酒精性脂肪肝、肝硬化等各种慢性肝损伤<sup>[29]</sup>。由于肝癌早期症状不明显,确诊时通常已扩散到肝实质外<sup>[26]</sup>。生物碱作为一类天然中药成分,具有抑制肿瘤细胞增殖、转移、血管生成,改变细胞形态,促进细胞凋亡和自噬,触发细胞周期阻滞,调节多种癌相关基因和通路等抗肿瘤作用<sup>[30]</sup>。HM虽然也具有很好的抗肿瘤作用,但存在毒性问题,故本研究制备了KA@HM-LPS。

本研究首先筛选KA@HM-LPS的制备方法和均质化方法。结果显示,薄膜分散法结合挤出法得到的KA@HM-LPS呈负电荷,粒径较小,其PDI在0.3左右,包封率为 $(90.50 \pm 0.62)\%$ 。体外释放率是评价缓控释剂的重要参数之一,本研究中20%血浆中的体外释放率结果显示,KA@HM-LPS与HM溶液相比具有明显的缓释效果,体外释放曲线更符合Weibull分布。KA@HM-LPS在37℃、10%胎牛血清中12h后的粒径几乎未再变大,表明KA@HM-LPS的血清稳定性良好。

KA@HM-LPS在HM质量浓度为160  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时的溶血百分数低于游离HM在质量浓度为40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时的溶血百分数,说明KA@HM-LPS在体内具有良好的血液相容性。而且,KA@BLPS对正常肝细胞LO2的毒性低,说明载体的生物相容性较好。但是,KA@BLPS具体对机体的安全性还需要在体内模型中分别从血液学和组织学方面进一步评价。另外,本研究还比较了KA@HM-LPS对LGMN<sup>+</sup>-SK-Hep-1和SK-Hep-1细胞的增殖抑制活性和线粒体靶向性。结果显示,在LGMN<sup>+</sup>-SK-Hep-1细胞中,KA@HM-LPS的抑制作用更大,且可以特异性聚集在其线粒体上。Transwell实验结果显示,KA@HM-LPS对LGMN<sup>+</sup>-SK-Hep-1细胞迁移和侵袭的抑制作用均高于HM-LPS。

综上所述,将HM制备成KA@HM-LPS可以有效抑制Legumain酶过表达的肝癌细胞的迁移和侵袭,并提高HM的血液相容性。本研究后续将通过动物实验进一步验证KA@HM-LPS在体内的安全性和靶向性,以探究该载体设计的有效性。

## 参考文献

- [1] HU J H, SHI J L, GAO Y Q, et al. 808 nm near-infrared light-excited UCNP@mSiO<sub>2</sub>-Ce6-GPC3 nanocomposites for photodynamic therapy in liver cancer[J]. *Int J Nanomed*, 2019, 14: 10009-10021.
- [2] XU C Z, ZHANG W, ZHANG X N, et al. Coupling function of cyclin-dependent kinase 2 and septin2 in the promotion of hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(2): 540-549.
- [3] YOON S M, RYOO B Y, LEE S J, et al. Efficacy and safety of transarterial chemoembolization plus external beam radiotherapy vs. sorafenib in hepatocellular carcinoma with macroscopic vascular invasion: a randomized clinical trial[J]. *JAMA Oncol*, 2018, 4(5): 661-669.
- [4] RIMASSA L, DANESI R, PRESSIANI T, et al. Management of adverse events associated with tyrosine kinase inhibitors: improving outcomes for patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Treat Rev*, 2019, 77: 20-28.
- [5] CAO M R, LI Q, LIU Z L, et al. Harmine induces apoptosis in HepG2 cells via mitochondrial signaling pathway[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2011, 10(6): 599-604.
- [6] ZHU Y G, LV Y X, GUO C Y, et al. Harmine inhibits the proliferation and migration of glioblastoma cells via the FAK/AKT pathway[J]. *Life Sci*, 2021, 270: 119112.
- [7] ZONG W X, RABINOWITZ J D, WHITE E. Mitochondria and cancer[J]. *Mol Cell*, 2016, 61(5): 667-676.
- [8] BURKE P J. Mitochondria, bioenergetics and apoptosis in cancer[J]. *Trends Cancer*, 2017, 3(12): 857-870.
- [9] JIN H Y, HE Y, ZHAO P F, et al. Targeting lipid metabolism to overcome EMT-associated drug resistance via integrin  $\beta$ 3/FAK pathway and tumor-associated macrophage repolarization using legumain-activatable delivery[J]. *Theranostics*, 2019, 9(1): 265-278.
- [10] YE Z, GUO C L, SHEN W Z, et al. Clinicopathologic significance of Legumain overexpression in cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 16599.
- [11] ZHAO T, ZHOU H, LEI L, et al. A new tandem peptide modified liposomal doxorubicin for tumor "ecological therapy"[J]. *Nanoscale*, 2020, 12(5): 3359-69.
- [12] YAMADA Y, SATRIALDI, HIBINO M, et al. Power of mitochondrial drug delivery systems to produce innovative nanomedicines[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, 154-155.
- [13] LI J, LI L, LV Y, et al. The construction of the novel magnetic prodrug Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@DOX and its antagonistic effects on hepatocarcinoma with low toxicity[J]. *RSC Adv*, 2020, 10(48): 28965-28974.
- [14] 唐小慧, 木尼热·库尔班, 焦敏, 等. 转铁蛋白修饰的去氢骆驼蓬碱磁纳米脂质体的制备及抑瘤效果评价[J]. *中国药理学杂志*, 2018, 53(11): 900-905.
- [15] LIU X L, DONG X, YANG S C, et al. Biomimetic liposomal nanoplatinum for targeted cancer chemophototherapy [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2021, 8(8): 2003679.
- [16] NAM J H, KIM S Y, SEONG H. Investigation on physico-chemical characteristics of a nanoliposome-based system for dual drug delivery[J]. *Nanoscale Res Lett*, 2018, 13(1): 101.
- [17] LIANG T S, GUAN R F, QUAN Z, et al. Cyanidin-3-O-glucoside liposome: preparation via a green method and antioxidant activity in GES-1 cells[J]. *Food Res Int*, 2019, 125: 108648.
- [18] DE M BARBOSA R, RIBEIRO L N M, CASADEI B R, et al. Solid lipid nanoparticles for dibucaine sustained release[J]. *Pharmaceutics*, 2018, 10(4): E231.
- [19] AHMED K S, HUSSEIN S A, ALI A H, et al. Liposome: composition, characterisation, preparation, and recent innovation in clinical applications[J]. *J Drug Target*, 2019, 27(7): 742-761.
- [20] 刘骏, 罗莹, 张婧, 等. 白头翁皂苷 B4 长循环脂质体的处方优化与评价[J]. *中国新药杂志*, 2021, 30(16): 1524-1529.
- [21] HAO F, YAN X P. Nano-sized zeolite-like metal-organic frameworks induced hematological effects on red blood cell[J]. *J Hazard Mater*, 2022, 424: 127353.
- [22] MIN Y, KIM M J, LEE S N, et al. Inhibition of TRAF6 ubiquitin-ligase activity by PRDX1 leads to inhibition of NF $\kappa$ B activation and autophagy activation[J]. *Autophagy*, 2018, 14(8): 1347-1358.
- [23] QIN J L, ZHONG Z Y, MA J. Biomimetic synthesis of hybrid hydroxyapatite nanoparticles using nanogel template for controlled release of bovine serum albumin[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2016, 62: 377-383.
- [24] YU H, JIN F Y, LIU D, et al. ROS-responsive nano-drug delivery system combining mitochondria-targeting ceria nanoparticles with atorvastatin for acute kidney injury[J]. *Theranostics*, 2020, 10(5): 2342-2357.
- [25] JIANG L, LI L, HE X D, et al. Overcoming drug-resistant lung cancer by paclitaxel loaded dual-functional liposomes with mitochondria targeting and pH-response[J]. *Biomaterials*, 2015, 52: 126-139.
- [26] GUO W F, GAO X N, ZHAN R H, et al. Tricolor imaging of MMPs to investigate the promoting roles of inflammation on invasion and migration of tumor cells[J]. *Talanta*, 2021, 222: 121525.
- [27] VILLANUEVA A. Hepatocellular carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(15): 1450-1462.
- [28] O' DWYER J, MURPHY R, GONZÁLEZ-VÁZQUEZ A, et al. Translational studies on the potential of a VEGF nanoparticle-loaded hyaluronic acid hydrogel[J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(6): 779.
- [29] ANWANWAN D, SINGH S K, SINGH S, et al. Challenges in liver cancer and possible treatment approaches[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2020, 1873(1): 188314.
- [30] LIU C Y, YANG S S, WANG K L, et al. Alkaloids from traditional Chinese medicine against hepatocellular carcinoma[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 120: 109543.

(收稿日期:2022-03-01 修回日期:2022-04-22)

(编辑:舒安琴)