

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.23.005

IR780 白蛋白纳米粒的制备、表征 及体外抗肿瘤活性研究*

李艳丽¹, 孙增先¹, 王添艳^{1,2}, 杨广胜^{1△}

(1. 徐州医科大学附属连云港医院·连云港市第一人民医院药学部, 江苏 连云港 222000; 2. 徐州医科大学药物分析教研室, 江苏 徐州 221004)

摘要:目的 制备出包载近红外荧光染料 IR780 的白蛋白纳米粒, 并进行体外表征及其抑制癌细胞增殖作用的研究。方法 通过去溶剂法制备包载 IR780 白蛋白纳米粒, 检测白蛋白纳米粒的形态大小、粒径分布、载药量和包封率及光热效应作用; 采用 MTT 法对人结肠和直肠癌上皮细胞 Caco-2 细胞的增殖抑制作用进行研究, 并计算半数抑制率(IC_{50})。结果 所制得白蛋白纳米粒形态规则圆整, 分散性良好, 平均粒径为 $(236 \pm 8.4) \text{ nm}$ ($n=6$), IR780 包封率为 $(72.43 \pm 6.45)\%$, IR780 载药量为 $(4.38 \pm 0.35)\%$; 近红外光照射后, 白蛋白纳米粒具有优越的光热效应, 并增强对 Caco-2 细胞的抑制作用, IC_{50} 为 $0.215 \mu\text{g/mL}$ 。结论 成功制备的白蛋白纳米粒具有较强的光热效应和体外抗肿瘤活性。

关键词: IR780; 白蛋白; 纳米粒; 光热效应; 体外细胞毒性

中图分类号: R943; R965

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2018)23-0015-04

Preparation and Characterization of IR780 Albumin Nanoparticles and Its Antitumor Activity *in Vitro*

Li Yanli¹, Sun Zengxian¹, Wang Tianyan^{1,2}, Yang Guangsheng¹

(1. Department of Pharmacy, The First People's Hospital of Lianyungang, Lianyungang Hospital Affiliated to Xuzhou Medical University, Lianyungang, Jiangsu, China 222000; 2. College of Pharmaceutical Science, Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu, China 221004)

Abstract: Objective To prepare albumin nanoparticles encapsulated with near infrared fluorescent dye IR780, and to study its *in vitro* characterization and inhibitory effect on proliferation of cancer cells. **Methods** IR780 albumin nanoparticles was synthesized by the method of rotary evaporation, and the morphology, size distribution, drug loading, encapsulation efficiency and photothermal effect of albumin nanoparticles were measured. The proliferation inhibition of human colon and rectal cancer cell line Caco-2 was studied by MTT method, and the half inhibitory concentration(IC_{50}) was calculated. **Results** The morphology of the albumin nanoparticles were rounded with good dispersion. The average particle size was $(236 \pm 8.4) \text{ nm}$ ($n=6$), encapsulation efficiency of IR780 was $(72.43 \pm 6.45)\%$, drug loading of IR780 was $(4.38 \pm 0.35)\%$. After near-infrared irradiation, albumin nanoparticles had excellent photothermal effect and the inhibition of Caco-2 cells was increased. IC_{50} was $0.215 \mu\text{g/mL}$. **Conclusion** The albumin nanoparticles prepared successfully have strong photothermal effect and antitumor activity *in vitro*.

Key words: IR780; albumin; nanoparticles; photothermal effect; *in vitro* cytotoxicity

IR780 是一种亲脂性阳离子型小分子近红外荧光吸收剂^[1], 属于吖啶三碳菁类染料, 在吸收波长为 780 nm 处有最大吸收峰, 一般以碘化物的形式存在^[2]。相比于其他碳菁类染料, IR780 分子结构中引入的氯原子, 提高了整个分子的量子产率, 且降低了 IR780 在溶液中的荧光淬灭率和分子聚合反应率, 具备深入穿透肿瘤组织内部, 靶向聚集于肿瘤细胞内, 提高病灶组织的信号对比度等特点^[3]。在近红外光照射下, IR780 可通过产生的活性氧自由基和大量的热杀死肿瘤细胞, 但由于其脂溶性高、体内毒性大, 光学性质不稳定, 已发生光漂白及生物相容性差等缺点, 极大地限制了临床应用。纳米载

药系统是将包载的药物靶向运送到特定的肿瘤部位等, 降低药物在其他正常组织器官中的分布, 具有增强药物溶解性和肿瘤靶向性, 提高药效和降低药物毒副作用等特点^[4-5]。制备纳米粒的载体材料有很多, 其中牛血清白蛋白载药量高、无抗原性、生物相容性好^[6-7]。此外, 白蛋白纳米粒可通过控制其粒径大小特定靶向于肝脏和肺组织, 从而实现肝脏等组织肿瘤的靶向治疗, 揭示白蛋白纳米粒作为生物大分子药物载体有着各种潜在的优越功能^[8-11]。为增强 IR780 的水溶性和光热的稳定性, 降低其在体内的毒性, 本研究中将 IR780 包载在白蛋白纳米粒中, 研究负载 IR780 白蛋白纳米粒的制

*基金项目: 江苏省连云港市科学技术项目[SH1531]。

第一作者: 李艳丽, 硕士研究生, 药师, 研究方向为药物传递新技术, (电话)0518-85767493。

△通信作者: 杨广胜, 主任药师, 研究方向为临床药学, (电话)0518-85767493。

备、表征、光热效应及对人的结肠和直肠癌上皮细胞 Caco-2 体外生长抑制效果,探讨白蛋白作为近红外荧光染料 IR780 载体的潜在优势,为进一步研究其体内靶向分布和光热治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与细胞

仪器:JEM-100SX 型高分辨透射电子显微镜(日本 JEOL 公司);LS55 紫外-荧光分光光度计(美国 Perkinelmer);380ZLS 粒径电位分析仪(Nicomp,美国);离心机(日立仪器有限公司);酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);81-2 恒温磁力加热搅拌器(上海梅颖浦电子仪器有限公司);MS304T 型电子分析天平(德国梅特勒公司);冷冻离心机(Centrifuge 5415R,德国 Eppendorf 公司),5804R 高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);倒置显微镜(40CFL Axiovert 40,德国 Carl Zeiss 公司);785 nm 激光器(MW-GX-785/2000mW,长春飞秒科技有限公司)。

试剂与细胞:IR780 碘化物(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号为 20170420,纯度为 99.9%);牛血清白蛋白(分析纯,美国 Gibco 公司,批号为 20150703);95% 戊二醛、二甲亚砜、甲醇、无水乙醇(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。优级胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号为 20170503);噻唑蓝(MTT,上海碧云天生物技术有限公司,批号为 20170504);台盼蓝(批号为 T108744),1640 培养基(批号为 20170705),均由徐州博利达生物科技有限公司提供;人结肠和直肠癌上皮细胞 Caco-2 由中科院上海细胞库提供。

1.2 方法

载 IR780 白蛋白纳米粒的制备:精密称取一定量 IR780 和牛血清白蛋白 BSA,将 IR780 先溶于 0.2 mL 甲醇中,与 BSA 混溶于 3 mL 蒸馏水中,超声溶解,向溶液中缓慢滴加 pH=9.0 的磷酸盐缓冲液,再以 2 mL/min 的速率滴加无水乙醇,边加边搅拌,加入 0.3 mL 8% 戊二醛溶液固化 6 h,减压蒸馏除去乙醇和甲醇,沉淀用蒸馏水洗涤 3 次,20 000 r/min 高速离心 10 min,沉淀真空干燥,得白蛋白纳米粒粉末,低温保存,待用。

白蛋白纳米粒形态和粒径分布观察:取上述条件下制备的白蛋白纳米粒冻干粉,加纯水稀释至 1 mL,采用激光纳米粒度仪测定其粒径。另取适量上述白蛋白纳米粒溶液,滴在覆有支持膜的铜网上,2% 磷钨酸负染干燥后置透射电镜下拍照,观察其外表形态。

白蛋白纳米粒的载药量和包封率测定:通过紫外分光光度计测定溶液中 IR780 的含量。配制质量浓度为 1.0,2.0,4.0,8.0,10.0,16.0,20.0 $\mu\text{g/mL}$ 的 IR780 溶

液,用紫外分光光度计(780 nm)测量其吸光度,并绘制标准曲线。精密称取一定量的白蛋白纳米粒,加入 9% 醋酸溶液沸水浴 2 h,破坏白蛋白纳米粒,得澄清透明溶液,测定 IR780 的吸光度,并用标准曲线计算 IR780 的浓度、载药量及包封率。计算公式:载药量 = 纳米粒中药物的含量/纳米粒的质量 $\times 100\%$,包封率 = 纳米粒中药物的含量/药物的投药量 $\times 100\%$ 。通过以下公式计算载药量和包封率。载药量($\%$) = 纳米粒中 IR780 的质量/纳米粒的质量 $\times 100\%$,包封率($\%$) = 纳米粒中 IR780 的质量/IR780 的投入量 $\times 100\%$ 。

白蛋白纳米粒的光热效应考察:分别称取一定量的白蛋白纳米粒,按照包载的 IR780 质量浓度配置成 10, 20, 40, 60 $\mu\text{g/mL}$,785 nm 激光器照射 5 min(1.5 W/ cm^2),观察温度上升情况。

体外细胞毒性试验:取对数生长期的 Caco-2 细胞,将该细胞悬液按每孔 100 μL ($4 \times 10^4/\text{mL}$)接种至 96 孔板中,将 96 孔板置细胞培养箱中培养过夜,设置白蛋白纳米粒 $\pm$ 激光照射组,然后分别加入不同浓度白蛋白纳米粒和游离 IR780 溶液,质量浓度为 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 10 $\mu\text{g/mL}$ IR780,每个质量浓度设置 6 个复孔,不加药物为空白对照组,培养 24 h 后终止药物孵育,换用新的培养基,激光照射组用 785 nm 激光器照射 3 min(1.5 W/ cm^2),继续培养 6 h,然后弃去培养基,每孔加入 MTT 溶液 20 μL (5 mg/mL),4 h 后终止培养,加入 100 μL 二甲亚砜,振荡 10 min,用酶标仪在 490 nm 波长处测定每孔的吸光度值(OD),细胞的存活率($\%$) = (OD_{实验组})/(OD_{对照组}) $\times 100\%$ 。

Caco-2 细胞台盼蓝染色:取对数生长期的 Caco-2 细胞,将该细胞悬液按每孔 1 mL($5 \times 10^3/\text{mL}$)接种至 24 孔板中培养过夜,对照组为正常的细胞,未加任何干预措施,实验组为加入 IR780 5 $\mu\text{g/mL}$ 的白蛋白纳米粒,培养 6 h 后,弃去培养基,PBS 清洗 3 次,加入无血清培养基,785 nm 激光器照射 3 min,继续培养 6 h 后,加入胰酶消化贴壁细胞,制备单细胞悬液,并适当稀释。然后将细胞悬液与 0.4% 台盼蓝溶液以 9:1 混合均匀(终浓度 0.04%),在倒置显微镜下观察细胞染色情况。

2 结果

2.1 白蛋白纳米粒形态和粒径分布

所制备的包载 IR780 白蛋白纳米粒的透射电镜图见图 1,粒径分布见图 2。可见,白蛋白纳米粒形态比较圆整,分散性良好、无黏连,可使白蛋白纳米粒在体内有效躲避网状内皮系统的吞噬,并可通过高渗透长滞留效应(EPR)蓄积到肿瘤组织中^[12]。粒度分析仪检测结果表明白蛋白纳米粒的平均粒径为(236 $\pm$ 8.4) nm($n = 6$)。

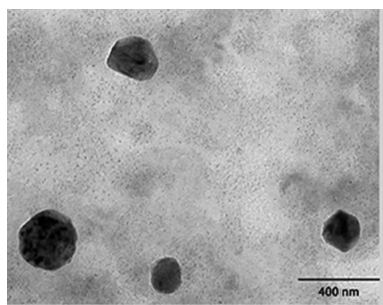


图1 透射电镜下白蛋白纳米粒粒径分布($\times 30\,000$)

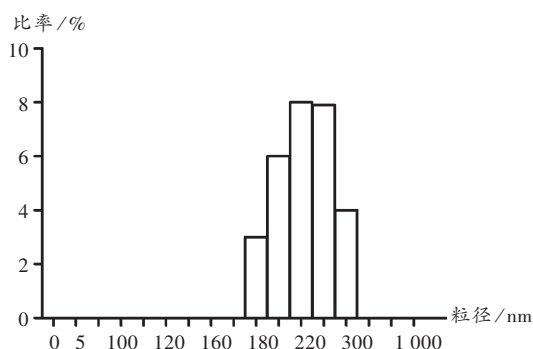


图2 白蛋白纳米粒粒径分布

2.2 白蛋白纳米粒载药量和包封率测定

利用紫外分光光度计测量并绘制 IR780 的标准曲线,以 UV 吸光度 (Y) 为纵坐标、质量浓度 ($X, \mu\text{g/mL}$) 为横坐标,得 $Y = 0.0772X + 0.0415$, $R^2 = 0.9997$ ($n = 3$),表明白蛋白纳米粒质量浓度在 $1.0 \sim 20.0 \mu\text{g/mL}$ 范围内与 IR780 线性关系良好。测定白蛋白纳米粒中 IR780 的吸光度值,计算得到 IR780 的包封率为 $(72.43 \pm 6.45)\%$,载药量为 $(4.38 \pm 0.35)\%$ 。

2.3 白蛋白纳米粒光热效应考察

IR780 具有近红外光吸收的升温特性,考察了不同浓度的白蛋白纳米粒的光热升温效果。由图 3 可见,蒸馏水对照组经过近红外光照射后,溶液温度变化不大,300 s 内温度仅升高了 3°C ;白蛋白纳米粒具有较强的光热效应,随着光照时间的延长,溶液的温度逐渐升高,时间越长温度越高,且随着 IR780 浓度的增加,温度也逐渐增高,显示白蛋白纳米粒具有较强的浓度依赖性升温效果。此外, $60 \mu\text{g/mL}$ IR780 的白蛋白纳米粒经过激光照射后,温度可升高至 42°C ,据报道, 42°C 的温度即为杀死肿瘤细胞的致死温度^[13]。

2.4 体外细胞毒性试验

利用 MTT 法分别检测游离 IR780 和白蛋白纳米粒对 Caco-2 细胞的毒性作用。由图 4 A 可见,相比于游离 IR780 组,近红外光照射 IR780 组对 Caco-2 的细胞毒性作用增强,表明光热效应可增强 IR780 对 Caco-2

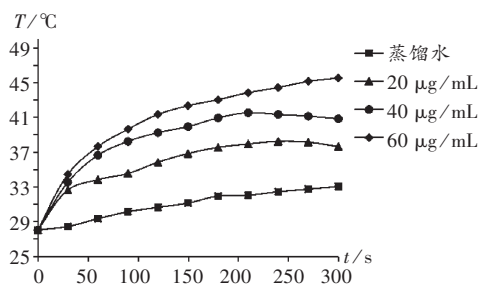
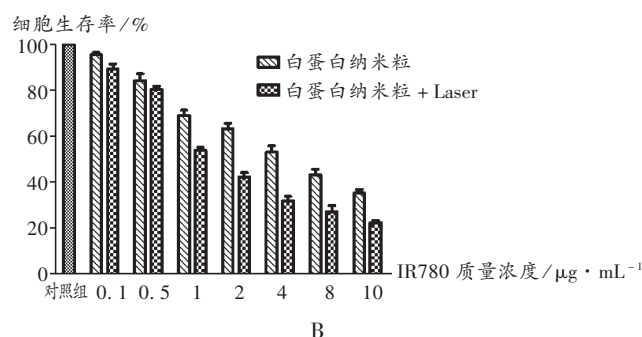
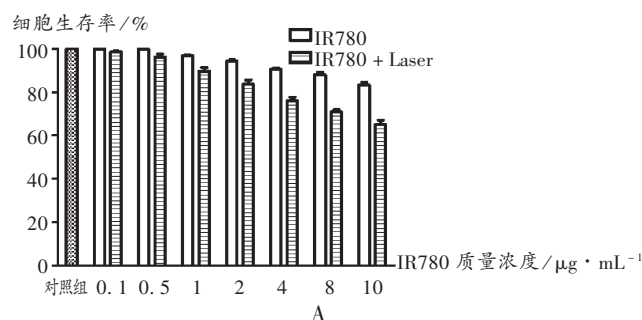


图3 白蛋白纳米粒的光热效应考察(785 nm , 1.5 W/cm^2 , 5 min)

的细胞毒性作用。由图 4 B 可知,与相同浓度的游离 IR780 相比,白蛋白纳米粒对 Caco-2 细胞的毒性作用明显增强,随着 IR780 的浓度不断增大,细胞毒性也随之增加,白蛋白纳米粒对 Caco-2 细胞的半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 $(0.456 \pm 0.2) \mu\text{g/mL}$,这可能是由于白蛋白纳米粒增强细胞对 IR780 的摄取,导致细胞白蛋白纳米粒的细胞毒性作用增强。此外,白蛋白纳米粒经过激光照射后,对 Caco-2 的细胞毒性作用也进一步增加,细胞生存率明显降低, IC_{50} 为 $0.215 \mu\text{g/mL}$,表明近红外光照射可进一步增加白蛋白纳米粒对 Caco-2 细胞的毒性。



A. 游离 IR780 B. 白蛋白纳米粒

图4 体外细胞毒性研究

2.5 Caco-2 细胞台盼蓝染色

台盼蓝是组织和细胞培养中常用的死细胞鉴定染色方法。正常的活细胞,胞膜结构完整,能拒染台盼蓝,使之无法进入胞内,而丧失活性或细胞膜不完整的细胞,胞膜的通透性增加,台盼蓝可进入细胞内,显微镜下细胞可被台盼蓝染成蓝色。由图 5 A 可见,对照组中

Caco-2 细胞未加任何处理措施,细胞活性正常,拒染台盼蓝,显微镜下细胞外形轮廓清晰透明,而经过白蛋白纳米粒孵育并加激光照射组的 Caco-2 细胞(图 5 B),显微镜下细胞丧失了活性,且细胞膜发生了破裂,整个细胞被台盼蓝染成深蓝色,表明丧失了细胞膜的完整性,Caco-2 细胞已经死亡。

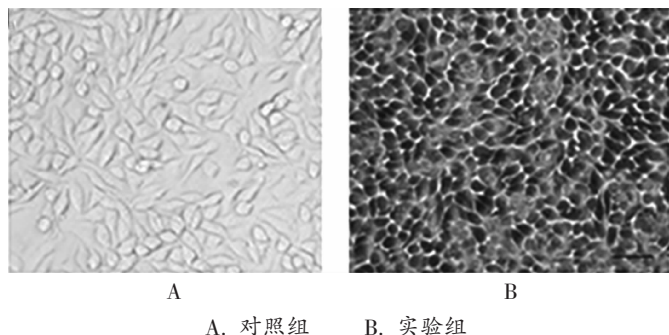


图5 Caco-2 细胞台盼蓝染色结果($\times 200$)

3 讨论

白蛋白具有生物可降解性、生物相容性等优良性质,可提高难溶性药物的溶解度,避免有机高分子材料在体内的毒性,是纳米载药领域的研究热点,被广泛应用于抗肿瘤药物的包载和纳米粒的制备。本研究中以牛血清白蛋白为载体材料,通过去溶剂化法成功制备出包载 IR780 的白蛋白纳米粒。此制备方法操作简便,IR780 被物理包裹于白蛋白中,与游离的 IR780 相比,载 IR780 的白蛋白纳米粒可以提高 IR780 在水中的溶解度;制备出的白蛋白纳米粒形态圆整,粒径较小,通过激光粒度仪检测,此白蛋白纳米粒的粒径在 236 nm 波长处。通过近红外光照射后,白蛋白纳米粒具有较强的光热效应,光敏剂 IR780 通过光热转换效应可产生较强的热量,使溶液温度升高,增强热疗效果。

通过细胞毒性试验发现,白蛋白纳米粒可增强 IR780 的癌细胞的毒性作用,这可能是一方面由于白蛋白纳米粒能增强细胞的药物摄取,使 IR780 在细胞内大量聚集释放,充分作用于癌细胞;另一方面,可能是因为白蛋白纳米粒经过近红外光照射后,包载的 IR780 通过光热转换效应,升高局部温度,通过光热效应,使肿瘤细胞温度达到 42 $^{\circ}\text{C}$,从而起到杀死肿瘤细胞的作用。

本研究中成功制备了包载 IR780 的白蛋白纳米粒并用于肿瘤细胞的治疗研究,为近红荧光

染料 IR780 的传递提供了一种新的药物传递载体。此外,白蛋白纳米粒通过光热治疗的作用方式为以后抗肿瘤治疗提供了一种新的治疗手段和方法。

参考文献:

- [1] Lin CY, Shieh MJ. Near Infrared Fluorescent Dye-decorated Nanocages to Form Grenade-Like Nanoparticles with Dual Control Release for Photothermal Theranostics and Chemotherapy[J]. Bioconjugate Chemistry, 2018, 29(4): 1384-1398.
- [2] 谭文超,左金梁,吴秀君. 纳米药物的药动力学研究概况分析[J]. 实用药物与临床, 2014, 17(7): 906-910.
- [3] Pietkiewicz J, Wilk KA, Bazylińska U. In vitro studies of serum albumin interaction with poly(D,L-lactide) nanospheres loaded by hydrophobic cargo[J]. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2016, 7(117): 426-435.
- [4] 胡春艳,陈卓,务圣洁,等. 载阿霉素聚合物纳米粒的制备、表征与体内外性能研究[J]. 国际生物医学工程杂志, 2016, 39(4): 202-206.
- [5] Jain AS, Makhija DT, Goel PN, et al. Docetaxel in cationic lipid nanocapsules for enhanced in vivo activity[J]. Pharmaceutical Development & Technology, 2016, 21(1): 76-85.
- [6] 苏华,胡晋红,李凤前. 白蛋白纳米粒的制备工艺及其靶向性研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(9): 641-644.
- [7] 李刚. 阿霉素白蛋白纳米粒介入治疗肝癌实验研究[D]. 长沙:中南大学, 2008.
- [8] 魏雪. 阿霉素白蛋白纳米粒的研制及性质的初步考察[D]. 石家庄:河北医科大学, 2008.
- [9] Zeybek A, Sanlı-Mohamed G, Ak G, et al. In vitro evaluation of doxorubicin-incorporated magnetic albumin nanospheres[J]. Chemical Biology & Drug Design, 2014, 84(1): 108-125.
- [10] Pitchaimani A, Baskar R, Raguraman V, et al. Near infra-red laser mediated photothermal and antitumor efficacy of doxorubicin conjugated gold nanorods with reduced cardiotoxicity in swiss albino mice[J]. Nanomedicine Nanotechnology Biology & Medicine, 2015, 11(6): 1435-1444.
- [11] Mundra V, Peng Y, Rana S, et al. Micellar formulation of indocyanine green for phototherapy of melanoma[J]. Journal of Controlled Release Official Journal of the Controlled Release Society, 2015, 220(Pt A): 130-140.
- [12] Li S, Johnson J, Peck A, et al. Near infrared fluorescent imaging of brain tumor with IR780 dye incorporated phospholipid nanoparticles[J]. Journal of Translational Medicine, 2017, 15(1): 18-29.
- [13] Zhou Z, Wang J, Liu W, et al. PEGylated nickel carbide nanocrystals as efficient near-infrared laser induced photothermal therapy for treatment of cancer cells in vivo[J]. Nanoscale, 2014, 6(21): 12591-12600.

(收稿日期:2018-07-01)

本栏目由

重庆英康医疗器械有限公司

协办