

功能化阿霉素脂质体制备与肿瘤靶向性评价

宋振国, 吴小瑜, 程沁园, 陈 慧, 龙苗苗[△]

(无锡卫生高等职业技术学校药理学系, 江苏 无锡 214028)

摘要:目的 考察功能化阿霉素脂质体(DOX/LP/HS)的物理性质及体外肿瘤靶向性。方法 合成透明质酸-硬脂胺聚合物(HS), 通过后插入法修饰制备 DOX/LP/HS; 考察脂质体粒径电位、包封率、体外释放和稳定性等物理性质; 选择 MCF-7 细胞考察脂质体的体外靶向性。结果 成功合成 HS; DOX/LP/HS 的平均粒径为 $(51.97 \pm 0.95) \text{ nm}$, 电位值为 $(-9.48 \pm 0.55) \text{ mV}$, 包封率为 $(98.34 \pm 1.02) \%$, 体外缓释现象明显; 经 HS 修饰后, 脂质体泄漏率降低, 稳定性提高, 在 MCF-7 细胞内的摄取率升高。结论 成功制备了功能化阿霉素脂质体, 且具有明显的肿瘤靶向性。

关键词:透明质酸; 硬脂胺; 两性亲水聚合物; 阿霉素; 脂质体; 功能化; 肿瘤靶向

中图分类号: R965; R979.1

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)04-0012-04

Preparation and Tumor Targeting Evaluation of Functionalized Doxorubicin-Loaded Liposomes

SONG Zhenguo, WU Xiaoyu, CHENG Qinyuan, CHEN Hui, LONG Miaomiao

(Department of Pharmacy, Wuxi Higher Health Vocational Technology School, Wuxi, Jiangsu, China 214028)

Abstract: Objective To investigate the physical properties and *in vitro* tumor targeting of functional doxorubicin-loaded liposomes (DOX/LP/HS). **Methods** Hyaluronic acid-stearyl amine(HS) copolymers were synthesized and DOX/LP/HS was prepared with the post-insertion method. The physical properties of liposomes size such as potential value, entrapment efficiency, *in vitro* release and stability were investigated. MCF-7 cells were selected to investigate the *in vitro* targeting of liposomes. **Results** HS copolymers were prepared successfully. The average particle size of DOX/LP/HS was $(51.97 \pm 0.95) \text{ nm}$, the potential value was $(-9.48 \pm 0.55) \text{ mV}$, the encapsulation efficiency was $(98.34 \pm 1.02) \%$, and the sustained release *in vitro* was obvious. After HS modification, the leakage rate of liposomes was decreased, the stability was increased, and the uptake rate was increased in MCF-7 cells. **Conclusion** Functional doxorubicin-loaded liposomes have been successfully prepared, which have liposomes and obvious targeting ability to tumor.

Key words: hyaluronic acid; stearylamine; amphiphilic copolymers; adriamycin; liposome; functionalization; tumor targeting

阿霉素(DOX)为广谱抗肿瘤药物, 可通过嵌入 DNA 阻断核酸分子的合成, 但会对机体正常细胞产生广泛的生物化学效应, 从而对人体正常组织产生强烈的毒副作用^[1]。脂质体(LP)为具有类细胞膜的双分子层脂质膜结构的微小囊泡, 具有自行密合的特性, 可包载疏水性或/和亲水性药物。脂质体具有的纳米尺寸可通过高渗透滞留效应(EPR)被动靶向到肿瘤部位, 将脂质体作为阿霉素药物递送载体, 可提高肿瘤部位药物浓度, 降低药物的毒副作用^[2-5]。目前已有多种阿霉素脂质体上市, 但仅依靠 EPR, 普通阿霉素脂质体无法主动靶向肿瘤细胞, 故研发功能化脂质体尤为重要。透明质酸(HA)为线性多糖, 具有生物相容性好和生物可降解性等优点。HA 可与肿瘤细胞表面过量表达的 CD44 受体结合, 具有靶向肿瘤细胞的功能。故可作为药物载体用于靶向传递药物, 增加药物在肿瘤部位的蓄积, 有效抑制肿瘤细胞生长^[6-7]。此外, 与磷脂相比, 多糖聚合物在体内降解较缓慢, 将其修饰于脂质体表面, 可提高脂质

体的稳定性, 增加其在体内的循环时间^[8-9]。硬脂胺为亲脂性阳离子化合物, 通过加入少量硬脂胺调节脂质体表面电荷, 可提高其稳定性, 而且用于制备的阳离子脂质体具有肺部癌症靶向治疗作用^[10]。本研究中通过引入 HA-硬脂胺聚合物(HS), 制备功能化阿霉素脂质体, 并对其体外性质和抗肿瘤活性进行研究。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

DF-101S 型恒温加热磁力搅拌器(郑州科泰实验设备有限公司); RV10BS96 型旋转蒸发仪(德国 IKA 仪器设备有限公司); UV-1800 型紫外分光光度计(日本岛津仪器有限公司); JEM-2100 型透射电子显微镜(日本 Jeol 公司); Zetasizer Nano ZS 型纳米粒度分析仪(英国 Malvern 公司); JY92-II 型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司); DMIL LED 型倒置荧光显微镜(德国 Leica 公司); FACSCalibur 型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)。

第一作者: 宋振国, 男, 大学本科, 副教授, 研究方向为药物制剂, (电子信箱)shixun219@sina.com。

[△]通信作者: 龙苗苗, 女, 硕士研究生, 研究方向为药物传递系统, (电子信箱)longmiaomiao@sina.com。

1.2 试药

盐酸阿霉素(大连美仑生物技术有限公司,批号为J0614A,纯度>98%);HA(华熙福瑞达生物医药有限公司,批号为1409191,相对分子质量为5300);大豆磷脂(上海太伟有限公司,纯度98%);硬脂胺(阿拉丁试剂有限公司);胆固醇(上海生工生物工程股份有限公司);N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)均购自上海晶纯生化科技股份有限公司;其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 HS的合成

将HA(含0.25 mmol羧基)100 mg溶于10 mL无水甲酰胺中,加入等浓度比的EDC和NHS(60 mg)活化。称取硬脂胺72 mg,溶于N,N-二甲基甲酰胺,然后缓慢滴加入上述溶液中,氮气保护下反应48 h。反应结束后用蒸馏水透析(截留相对分子质量为 3.5×10^3)3 d,冷冻干燥得HS。通过 $^1\text{H-NMR}$ 确证聚合物化学结构。结果见图1。表明硬脂胺已成功链接到HA主链上。

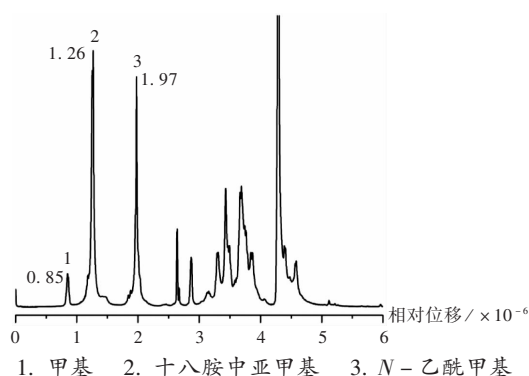


图1 HS的核磁共振氢谱

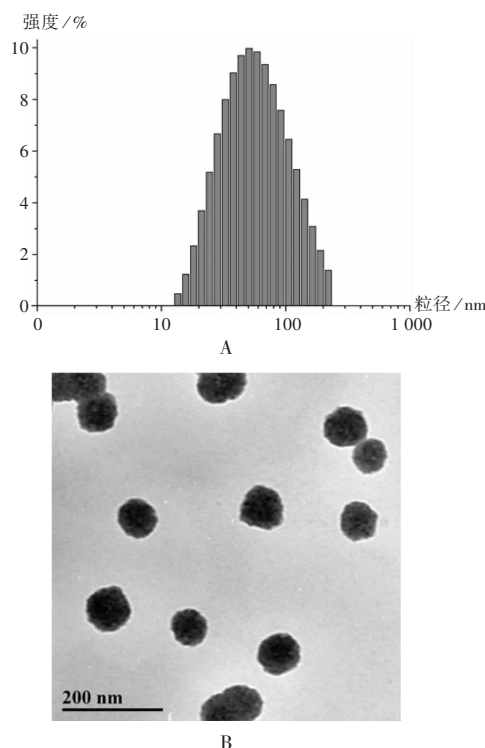
2.2 功能化阿霉素脂质体的制备与表征

制备:称取磷脂500 mg和胆固醇50 mg,溶于无水乙醚,逐滴加入盐酸阿霉素溶液2 mg,旋转蒸发除尽有机溶剂,加入磷酸盐缓冲液(PBS)10 mL,水化30 min后冰浴超声10 min,然后加入HS溶液,50℃恒温孵育1 h,得功能化阿霉素脂质体(DOX/LP/HS)。同法制备阿霉素普通脂质体(DOX/LP)。

粒径及Zeta电位测定:取适量脂质体溶液置测量杯内,采用动态光散射技术(DLS)测定脂质体的粒径、多分散系数(PDI)和Zeta电位。DOX/LP的粒径为 $(47.17 \pm 0.85)\text{nm}$,PDI为 0.297 ± 0.08 ;经HS聚合物修饰后,DOX/LP/HS粒径变化不大,为 $(51.97 \pm 0.95)\text{nm}$,PDI为 0.286 ± 0.07 ,分布较好(图2A)。DOX/LP的Zeta电位为 $(-4.64 \pm 0.81)\text{mV}$,经HS修饰后,DOX/LP/HS的电位降低到 $(-9.48 \pm 0.55)\text{mV}$,这是由于HA结构中存在大量羧基所致。表面的负电有利于防止脂质体聚沉,避免血浆蛋白吸附,提高在血液中的

稳定性。

透射电镜观察:通过透射电镜(TEM)观察脂质体形貌特征及粒径分布。取脂质体分散液滴于铜网上,晾干后滴加磷钨酸对其负染,室温干燥后用TEM进行观察。透射电镜图可以看出DOX/LP/HS形貌呈球形或类球形,分布较窄(图2B)。说明脂质体具有较好的粒径及分布,适宜作为抗肿瘤药物载体。



A. 粒径分布图 B. 透射电镜图($\times 20\,000$)

图2 DOX/LP/HS粒径分布图及透射电镜图

包封率测定:准确量取定量DOX/LP/HS,加入甲醇10 mL超声破坏后,在480 nm波长处测定吸光度,计算药物总含量。取2.2的“制备”项下脂质体2.0 mL,置截留相对分子质量为3000的超滤杯中,10000 r/min离心50 min,测得游离药物含量,并计算包封率(EE)。结果,DOX/LP包封率为 $(94.8 \pm 1.95)\%$,DOX/LP/HS包封率为 $(98.34 \pm 1.02)\%$,表明两种脂质体对药物均有较好的包载能力。HS插入脂质体双分子结构中,可使载药空间增大,一定程度上提高了脂质体对药物的包封率。

2.3 体外药物释放

采用动态透析法测定体外释放行为。向透析袋中加入脂质体2 mL,将透析袋置PBS(pH=7.4,0.01 mmol/L)溶液10 mL,在100 r/min, $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 的摇床震荡,分别于不同时间取样1 mL,并加入新鲜PBS 1 mL。于480 nm波长处测定吸光度,并计算含量及累积释放度。DOX/LP和DOX/LP/HS的体外释放行为见图3。2种脂质体在10 h内的药物释放低于20%,表明DOX几乎全部包

载于脂质体中,无明显突释现象。随着时间的延长,脂质体内药物缓慢释放,具有明显缓释作用。48 h时,DOX/LP/HS的累积释放度低于DOX/LP,这可能是由于HS的疏水段硬脂烷链插入脂质体双分子层膜,导致疏水作用力增强,结构更紧密,不利于药物向外自由扩散。

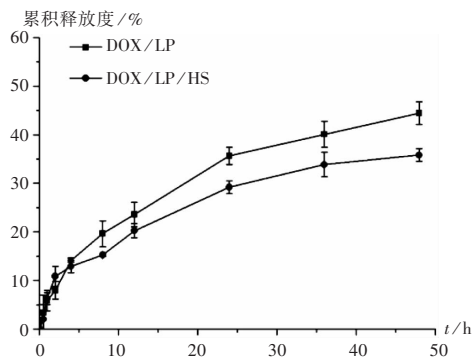


图3 DOX/LP和DOX/LP/HS体外释放行为

2.4 稳定性考察

将装有脂质体混悬液的10 mL棕色瓶置(4±0.5)℃冰箱中,不同时间用马尔文粒径仪测量脂质体粒径,考察其稳定性。此外,将制备的脂质体混悬液置(4±0.5)℃冰箱中,不同时间取样测定包封率,然后计算6 d后脂质体泄漏率[泄漏率=(第1天包封率-第6天包封率)/第1天包封率×100%]。DOX/LP和DOX/LP/HS放置的粒径变化见图4。可见,随着放置时间的延长,脂质体粒径均有所增加。其中第8天时,DOX/LP粒径急剧变大,并出现多峰,而DOX/LP/HS粒径变化不大,说明经HA修饰后,脂质体的稳定性有所提高。

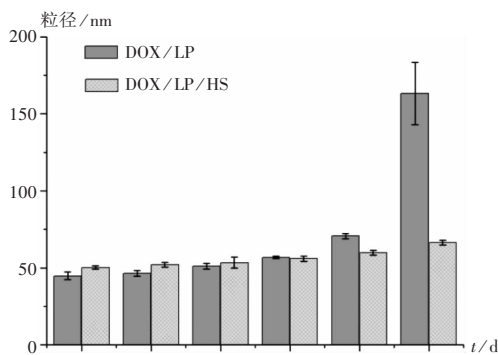


图4 DOX/LP和DOX/LP/HS的粒径变化

DOX/LP和DOX/LP/HS放置6 d后的泄漏率分别为(4.94±0.5)%和(1.93±0.05)%,DOX/LP/HS明显低于DOX/LP,说明脂质体经HS修饰后提高了脂质体结构的致密性,使药物不易泄露,提高了脂质体稳定性。

2.5 肿瘤靶向性评价

流式细胞仪测定:将MCF-7和COS7细胞按照3×10⁵个/孔的密度加到6孔板培养24 h,加入2 mL

游离DOX,DOX/LP,DOX/LP/HS(阿霉素终质量浓度为5 μg/mL)孵育1,2,4 h(以细胞培养液为空白对照),胰酶消化后,收集细胞,加入PBS 500 μL分散细胞后,用流式细胞仪测定相对荧光强度,代表摄取水平,结果见图5。可见,2种细胞对脂质体的摄取均有明显的时间依赖性。由于COS7细胞表面缺乏CD44受体的表达,DOX/LP/HS和DOX/LP在各个时间点的摄取无明显差异。而DOX/LP/HS在MCF-7细胞内的摄取率明显高于DOX/LP,这是因为HS修饰的阿霉素脂质体可通过细胞表面的CD44受体介导进入细胞,增加细胞内的药物蓄积量,具有更好的抗肿瘤作用。

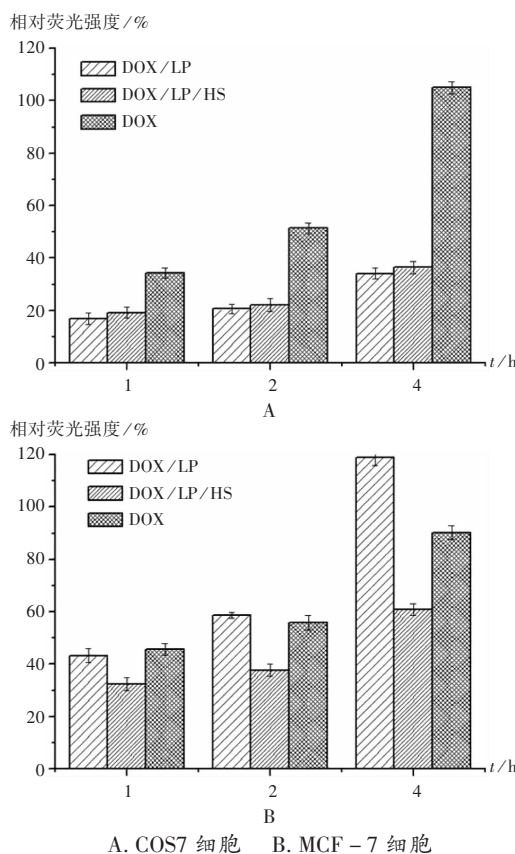


图5 不同制剂在细胞中的摄取率

荧光显微镜观察:为了验证CD44受体介导的靶向作用,采用倒置荧光显微镜进一步观察DOX/LP和DOX/LP/HS在MCF-7细胞内的摄取及分布情况。细胞以1.0×10⁴个/孔的密度进行接种,孵育24 h。弃去原培养基,用PBS清洗3次,加入500 μL含游离DOX,DOX/LP,DOX/LP/HS(DOX的终质量浓度为5 μg/mL)孵育1,2,4 h。然后PBS润洗3次,加入4%多聚甲醛固定20 min,Hoechst溶液(10 μg/mL)染色20 min,PBS清洗后在荧光显微镜下观察、拍照。

由图6可见,随着时间的延长,药物进入细胞的量逐渐增多,部分药物进入细胞核中,表现出时间依赖性。孵育时间为4 h时,游离DOX通过快速扩散入胞最多,

且均进入细胞核内。与 DOX/LP 相比, DOX/LP/HS 的荧光强度明显增强, 且主要集中于细胞核内, 表明 DOX/LP/HS 具有更好的肿瘤细胞靶向性。以上结果表明, DOX/LP/HS 能与肿瘤细胞表面的 CD44 受体结合, 提高药物的摄取量, 更有效地发挥抗肿瘤作用。

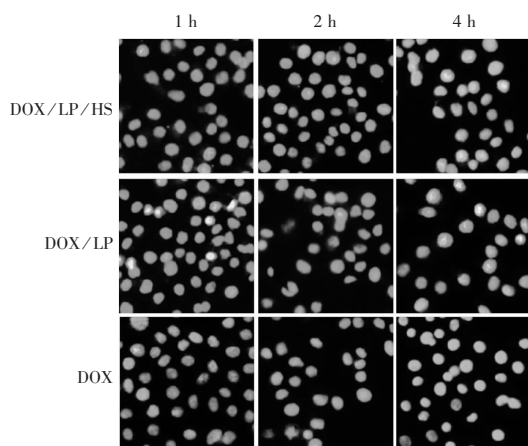


图6 不同制剂在 MCF-7 细胞中的摄取荧光图(×40)

3 讨论

脂质体主要由磷脂和胆固醇形成类似细胞膜的双分子层结构, 具有与细胞膜融合性好和生物相容性佳等特点, 且可包载亲水性和亲脂性药物, 故被广泛用于抗肿瘤药物的传递载体。DOX 是临床常用的蒽环类抗肿瘤药物, 但其具有严重的心脏毒性等毒副作用, 临床应用受限。目前上市的 DOX/LP/HS 能降低药物的心脏毒性, 但稳定性差, 药物易渗漏, 易受 RES 影响, 虽然经聚乙二醇修饰可提高脂质体表面的亲水性, 阻止血浆蛋白吸附, 减少吞噬吸收, 但其仅依靠 EPR 被动靶向到肿瘤部位, 无法进一步提高肿瘤部位的药物蓄积。通过配体对脂质体表面进行修饰是提高其靶向性的有效手段。多糖聚合物可提高疏水性药物的水溶性, 易于对结构进行修饰, 连接各类配体, 因而在抗肿瘤靶向给药系统备受关注^[11-13]。HA 可与大部分肿瘤细胞过表达的 CD44 受体结合, 通过靶向介导更多药物进入肿瘤细胞, 抑制肿瘤生长^[7,14]。

本研究中主要合成 HS, 修饰脂质体, 提高脂质体的靶向性和稳定性。通过考察 HS 的修饰方法发现, 后插入法 HS 可以自发嵌入脂质体结构中, 得到粒径更均一的脂质体。且 DOX/LP/HS 的稳定性优于 DOX/LP。硬脂胺等阳离子化合物可通过调节脂质体表面电荷提高其稳定性^[18]。此外, 通过体外释放等试验结构推测, HS 的疏水段插入脂质体双分子层膜, 导致疏水作用力增强, 结构更紧密, 降低了脂质体的泄漏率。DOX/LP/HS 可与 MCF-7 细胞表面的 CD44 受体结合, 具有更高的摄取量和细胞内蓄积率。

综上所述, 本研究为构建功能化脂质体作为抗肿瘤

药物载体提供了参考。但本研究中仅对 HS 修饰的功能化脂质体的制备及物理性质进行了研究, 后续试验应深入考察其体内外抗肿瘤活性。

参考文献:

- [1] HAN X, LI Z, SUN J, et al. Stealth CD44-targeted hyaluronic acid supramolecular nanoassemblies for doxorubicin delivery: probing the effect of uncovalent pegylation degree on cellular uptake and blood long circulation[J]. J Control Release, 2015, 197: 29-40.
- [2] PITCHAIMANIA, NGUYENTDT, ARYALS. Natural killer cell membrane infused biomimetic liposomes for targeted tumor therapy[J]. Biomaterials, 2018, 160: 124-137.
- [3] 孙玉琦, 沈丽萍, 颜冬雪, 等. 肝脏疾病治疗药物靶向脂质体研究进展[J]. 中国新药杂志, 2017, 26(2): 193-196.
- [4] 何文, 胡翠萍, 郭咸希. 水飞蓟宾脂质体制备方法研究[J]. 中国药业, 2016, 25(1): 49-52.
- [5] MOHAGHEGHI MA, MOHAMMADI J, SMYTH HDC, et al. Layer-by-layer assembly of graphene oxide on thermosensitive liposomes for photo-chemotherapy[J]. Acta Biomater, 2018, 65: 376-392.
- [6] 赵元培, 董秋玲, 周建平, 等. “三明治”式短发夹 RNA 自组装纳米复合物抗肿瘤靶向治疗的研究[J]. 中国医药工业杂志, 2017, 48(10): 1466-1473.
- [7] XIA J, DU Y, HUANG L, et al. Redox-responsive micelles from disulfide bond-bridged hyaluronic acid-tocopherol succinate for the treatment of melanoma[J]. Nanomedicine, 2018, 14(3): 713-723.
- [8] EL KECHAI N, MAMELLE E, NGUYEN Y, et al. Hyaluronic acid liposomal gel sustains delivery of a corticoid to the inner ear[J]. J Control Release, 2016, 226: 248-257.
- [9] 杨海, 马宝花, 周学锋. 壳聚糖修饰托氟啉纳米脂质体的体外释放试验研究[J]. 中国药业, 2016, 25(9): 12-14.
- [10] 宋金春, 黄岭, 陈佳丽. 肺靶向羟基基树碱脂质体的制备及体外释药性质研究[J]. 中国药理学杂志, 2008, 43(20): 1564-1568.
- [11] DING YF, LI S, LIANG L, et al. Highly biocompatible chlorin e6-loaded chitosan nanoparticles for improved photodynamic cancer therapy[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2018, 10(12): 9980-9987.
- [12] 张文华, 梁晔, 周泉, 等. 一种小粒径壳聚糖纳米粒作为基因载体的研究[J]. 功能材料, 2017, 48(12): 12084-12093.
- [13] XU Y, ASGHAR S, GAO S, et al. Polysaccharide-based nanoparticles for co-loading mitoxantrone and verapamil to overcome multidrug resistance in breast tumor[J]. Int J Nanomedicine, 2017, 12: 7337-7350.
- [14] 韩立杰, 郭炜, 刘伟, 等. 透明质酸修饰载紫杉醇靶向脂质体抑制脑肿瘤干细胞的初步评价[J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(9): 773-776.

(收稿日期: 2018-07-04)