

包载紫杉醇的透明质酸聚合物胶束细胞毒性及细胞摄取研究

刘艳华¹, 孙进², 王文苹¹, 何仲贵^{2*}

(1. 宁夏医科大学药学院药剂学系, 银川 750004;
2. 沈阳药科大学药学院药剂教研室, 沈阳 110016)

[摘要] 目的: 研究 CD44 受体单靶向的透明质酸-十八烷基(HA-C₁₈)、叶酸和 CD44 受体双靶向的叶酸-透明质酸-十八烷基(FA-HA-C₁₈)载紫杉醇(PTX)胶束的肿瘤细胞靶向功能。方法: 选择叶酸和 CD44 受体表达丰富的 MCF-7 细胞, 评价 PTX-HA-C₁₈ 和 PTX-FA-HA-C₁₈ 胶束的细胞毒性和细胞摄取。结果: 相比于市售制剂泰素(taxol), HA 载药胶束在低浓度下表现出较强的细胞毒性, 且 PTX-FA-HA-C₁₈ 胶束的细胞毒性显著强于 PTX-HA-C₁₈ 胶束。HA 胶束能显著提高 PTX 在细胞中的摄取量, 且细胞摄取呈现浓度-时间依赖性。相比于 HA-C₁₈ 胶束, FA-HA-C₁₈ 胶束表现出更强的摄取能力。结论: HA 胶束具有良好的肿瘤细胞靶向功能, FA-HA-C₁₈ 双靶向胶束表现出最佳的靶向能力。

[关键词] 透明质酸-十八烷基胶束; 叶酸-透明质酸-十八烷基胶束; 紫杉醇; 细胞毒性; 细胞摄取

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)21-0271-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120827.1046.012.html>

[网络出版时间] 2012-08-27 10:46

Study on Cytotoxicity and Cellular Uptake of Paclitaxel-loaded Hyaluronic Acid Polymeric Micelles

LIU Yan-hua¹, SUN Jin², WANG Wen-ping¹, HE Zhong-gui^{2*}

(1. Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2. Department of Biopharmaceutics, School of Pharmacy,

[收稿日期] 20120330(002)

[第一作者] 刘艳华, 博士, 讲师, 从事新型纳米给药系统研究, Tel:0951-6880581, E-mail:lyanhua1214@126.com

[通讯作者] * 何仲贵, 博士, 教授, 从事药物新剂型与新技术研究, Tel:024-23986320, E-mail:hezongui@gmail.com

NE 及 DA 能系统。本研究结果对于进一步推广葛根异黄酮的临床应用具有一定的参考价值。

[参考文献]

- [1] 郭密, 张仲君, 徐寿水, 等. 葛根素抗缺氧及抗氧化作用的实验研究 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2007, 9 (4): 279.
- [2] 刘薇, 王亚利, 张式暖, 等. 葛根素对慢性缺氧心肌保护作用的实验研究 [J]. 山东医药, 2006, 46 (5): 15.
- [3] 梁俊清, 丁春华, 凌亦凌, 等. 葛根素对糖尿病致肺损伤的保护作用及其机制的研究 [J]. 中国应用生理学杂志, 2007, 23(3): 355.
- [4] 陈晓莉, 王骊骊, 薛克昌. 葛根提取物对肝癌细胞增殖及细胞周期的作用 [J]. 广东药学院学报, 2001, 17 (3): 183.

- [5] 陈亚奇, 王爱梅, 田敏. 葛根异黄酮对衰老模型大鼠学习记忆能力及海马神经元形态的影响 [J]. 医学理论与实践, 2011, 24(20): 2405.
- [6] 董妙先, 牛英才, 潘志, 等. 葛根异黄酮对 MPP⁺ 诱导的 PC12 氧化应激的保护作用 [J]. 中药药理与临床, 2009, 25 (2): 48.
- [7] 牛英才, 潘志, 李晓明, 等. 葛根异黄酮对 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞凋亡的保护作用 [J]. 中国药理学通报, 2009, 25 (1): 112.
- [8] 陈爱春, 顾宗欣. 葛根异黄酮治疗更年期抑郁症的临床疗效观察 [J]. 数理医药学杂志, 2011, 24 (5): 604.
- [9] 高霄飞, 王雪琦, 何成, 等. 抑郁症单胺类递质受体研究进展 [J]. 生理科学进展, 2002, 33(1): 17.

[责任编辑 聂淑琴]

Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[Abstract] Objective: To study the cytotoxicity and cellular uptake of CD44 receptor targeting paclitaxel-hyaluronic acid-octadecyl (PTX-HA-C₁₈) and folate and CD44 receptors dual targeting PTX-folate-HA-C₁₈ (PTX-FA-HA-C₁₈) micelles. **Method:** Cytotoxicity and cellular uptake *in vitro* of Taxol and PTX-loaded micelles were performed using folate and CD44 receptors over expressing MCF-7 cell. **Result:** PTX-loaded HA micelles exhibited higher cytotoxicity compared with Taxol at lower PTX concentration. The cellular inhibition of FA-HA-C₁₈ micelle was more obvious than that by HA-C₁₈ micelle. HA micelles possessed high cellular uptake capacity, and the cellular uptake was concentration and time-dependent. FA-HA-C₁₈ micelles exhibited higher cellular uptake compared with HA-C₁₈ micelles. **Conclusion:** HA micelles has good tumor targeting ability, and FA-HA-C₁₈ micelle exhibits excellent tumor targeting efficiency.

[Key words] HA-C₁₈ micelle; FA-HA-C₁₈ micelle; paclitaxel; cytotoxicity; cellular uptake

抗肿瘤药物的抗肿瘤活性研究对预测其临床疗效具有重要意义。药物及其制剂的抗肿瘤活性可以通过体内荷瘤鼠模型和体外细胞毒性试验两种方法进行评价。其中体外细胞毒性试验以传统的断点检测方法为主,如细胞计数法、噻唑蓝(MTT)比色法及SRB显色法等。其中,MTT比色法操作简便、灵敏且重复性好,广泛用于细胞活性的测定^[1]。

双受体介导的药物靶向,作为新型的靶向策略,能有效地将纳米粒靶向传递至肿瘤细胞。本实验前期制备了包载紫杉醇(paclitaxel,PTX)的CD44受体单靶向的透明质酸-十八烷基(HA-C₁₈)、叶酸和CD44受体双靶向的叶酸-透明质酸-十八烷基(FA-HA-C₁₈)胶束。该载药胶束表现出良好的注射安全性,体内外稳定性,载药能力强和缓释特性^[2]。

本文研究的抗肿瘤药物PTX具有广泛的抗肿瘤作用,临床上可用于治疗乳腺癌、卵巢癌和非小细胞肺癌等。本文构建了叶酸和CD44受体双靶向的胶束系统,以CD44和叶酸受体表达丰富的人乳腺癌细胞MCF-7为细胞模型^[3],研究PTX-HA-C₁₈和PTX-FA-HA-C₁₈胶束的细胞毒性和摄取,评价FA-HA-C₁₈胶束相对于HA-C₁₈胶束的肿瘤细胞靶向优势。

1 材料

1.1 药物与试剂 PTX(99.5%,重庆美联制药有限公司,批号090405),DMEM培养液(Gibco,批号101019),胎牛血清(郑州佰安生物工程有限公司,批号100804),胰酶,四甲基偶氮唑蓝(MTT,Sigma公司,批号100622),其他试剂均为分析纯。

1.2 细胞 人乳腺癌细胞MCF-7(南京凯基生物技术有限公司)。

1.3 仪器 倒置生物显微镜XD-101型(南京江南光电公司),DL-CJ-2F型洁净工作台(哈尔滨东联电

子技术公司),Model 500型酶标仪(美国Biomed公司),JY92-2D超声波细胞破碎仪(宁波新芝科器研究厂),超高效液相色谱串联质谱联用仪(美国Waters公司)。

2 方法

2.1 制剂的制备

2.1.1 Taxol制剂的制备 精密称定PTX 24 mg,加入2 mL无水乙醇和2 mL Cremophor EL溶解,涡旋3 min混合均匀,水浴超声15 min,制得质量浓度为6 g·L⁻¹的Taxol。取1 mL Taxol溶液注入0.9%的NaCl注射液中,使最终药物质量浓度为1.0 g·L⁻¹,将制得的药液过0.22 μm微孔滤膜,即得。

2.1.2 PTX载药胶束的制备 HA-C₁₈(FA-HA-C₁₈)聚合物溶解于蒸馏水,将加药量为30%载体量的PTX溶解于0.5 mL无水乙醇中,缓慢滴加至聚合物水溶液中,磁力搅拌24 h后,冰浴超声10 min(超声功率200 W,工作2 s,间歇3 s),溶液于3 500 r·min⁻¹离心30 min,上清液过0.45 μm滤膜,得到澄清透明溶液,HPLC法测定胶束中PTX的含量。

Taxol,HA-C₁₈和FA-HA-C₁₈空白辅料除不加PTX外,制备方法同上。上述制剂均用培养液稀释至PTX终浓度依次为1 μg·L⁻¹~100 mg·L⁻¹的系列溶剂浓度,即为样品溶液。

2.2 体外细胞毒性 培养状态良好的细胞经消化后,用培养液稀释至细胞密度为3×10⁴个/mL,吹匀后加100 μL细胞悬液于96孔板,置培养箱孵育24 h使其贴壁。将泰素(Taxol),HA-C₁₈和FA-HA-C₁₈空白辅料或载药制剂各稀释成系列浓度,每孔加100 μL,每个浓度3个平行孔,置培养箱孵育72 h后,于96孔板每孔加入50 μL MTT溶液(2 g·L⁻¹),置培养箱中孵育3.5 h。甩板,吸干残留液体,每孔

表1 空白辅料和载药制剂在 MCF-7 细胞培养 72 h 的细胞毒性 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

质量浓度 /mg·L ⁻¹	空白辅料细胞存活率/%			载药制剂细胞存活率/%		
	泰素	HA-C ₁₈ 胶束	FA-HA-C ₁₈ 胶束	泰素	HA-C ₁₈ 胶束	FA-HA-C ₁₈ 胶束
0.001	96.4 ± 4.3	99.7 ± 3.6	98.7 ± 3.4	94.5 ± 4.7	85.9 ± 1.9	84.6 ± 2.0
0.01	93.7 ± 0.6	98.5 ± 4.6	99.0 ± 4.4	88.6 ± 1.2	73.7 ± 2.0	67.1 ± 4.1
0.1	86.4 ± 2.7	95.1 ± 2.8	98.3 ± 0.8	77.1 ± 1.9	59.1 ± 3.2	54.9 ± 3.0
1	68.2 ± 2.7	96.5 ± 7.5	97.9 ± 2.9	50.3 ± 3.0	50.4 ± 3.6	45.7 ± 1.5
10	50.8 ± 1.7	95.5 ± 5.4	93.3 ± 3.2	30.2 ± 2.9	32.1 ± 1.4	28.8 ± 1.0
100	33.3 ± 2.1	91.1 ± 2.5	95.0 ± 4.3	15.3 ± 2.7	19.9 ± 2.8	16.6 ± 1.2

加 200 μL DMSO,于振荡器上振荡 10 min 以溶解蓝色结晶物。在 560 nm 波长下,用酶标仪测定吸光度(A),计算细胞存活率^[4]。以 IC₅₀ 计算软件计算抑制 50% 细胞生长时的药物浓度,即 IC₅₀ 值。

$$\text{细胞存活率} = \frac{A_{\text{样品}}}{A_{\text{对照}}} \times 100\%$$

$A_{\text{样品}}$:Taxol,HA-C₁₈和 FA-HA-C₁₈空白辅料或载药制剂培养细胞测得吸光度; $A_{\text{对照}}$:培养液培养细胞测得吸光度。

2.3 细胞摄取 为了考察 CD44 受体、叶酸受体介导的内吞对胶束细胞摄取的影响,以市售制剂 Taxol 作为对照,考察不同 HA 胶束系统中的 PTX 在 MCF-7 细胞里的摄取。

将 MCF-7 细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种于 24 孔培养板,孵育 24 h 使其贴壁,弃去旧的培养液,给予经无血清培养液稀释的泰素,PTX-HA-C₁₈和 PTX-FA-HA-C₁₈胶束溶液(PTX 质量浓度为 0.2,0.5,1 mg·L⁻¹),分别孵育 0.5,1,2 h。孵育结束后,快速弃去培养液,加入冰冷的 PBS 终止细胞摄取,并冲洗细胞单分子层 3 遍。每孔加 200 μL 蒸馏水,刮取细胞,收集细胞悬液,冰浴下超声破碎细胞,UPLC-MS/MS法测定 PTX 的含量,考马斯亮蓝法测定蛋白的含量,以消除每孔细胞数不同引起的误差^[6]。

2.4 统计方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件进行方差分析,组间比较用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 空白辅料对 MCF-7 细胞的毒性 考察泰素空白辅料 Cremophor EL,HA-C₁₈和 FA-HA-C₁₈空白胶束对 MCF-7 细胞生长的影响,以评价胶束载体材料的安全性,并可作为载药胶束细胞毒性实验的对照,结果见表 1。HA-C₁₈和 FA-HA-C₁₈空白胶束在 MCF-7 细胞中孵育 72 h,高浓度下细胞的存活率在 90%

以上。然而空白泰素辅料,由于存在大量 Cremophor EL,在高浓度下表现出较强的细胞毒性。以上结果表明 HA-C₁₈和 FA-HA-C₁₈空白胶束的细胞毒性远低于泰素空白辅料,是生物相容性良好,安全无毒的载体材料。

3.2 载药制剂对 MCF-7 细胞的毒性 以泰素溶液为对照,MCF-7 细胞与 PTX-HA-C₁₈和 PTX-FA-HA-C₁₈胶束孵育 72 h 的细胞存活率见表 1。泰素,PTX-HA-C₁₈和 PTX-FA-HA-C₁₈载药胶束对 MCF-7 细胞孵育 72 h 后的半数生长抑制浓度 IC₅₀ 值,见表 2。由于泰素中辅料 Cremophor EL 在高辅料浓度下表现出较强的细胞毒性,泰素在 PTX 质量浓度为 10,100 mg·L⁻¹时表现出了较强的细胞毒性。但在低浓度下,载药胶束的细胞毒性高于泰素。

表2 泰素,PTX-HA-C₁₈和 PTX-FA-HA-C₁₈胶束在 MCF-7 细胞培养 72 h 的 IC₅₀ ($\bar{x} \pm s, n=3$)

制剂	IC ₅₀ /mg·L ⁻¹
泰素	1.37 ± 0.39
PTX-HA-C ₁₈ 胶束	0.669 ± 0.185
PTX-FA-HA-C ₁₈ 胶束	0.404 ± 0.124

PTX-FA-HA-C₁₈胶束对细胞的抑制作用明显高于 PTX-HA-C₁₈胶束,原因可能是因为 FA-HA-C₁₈表面修饰的叶酸配体还可以与细胞表面的叶酸受体结合,通过叶酸和 CD44 双受体介导胶束内吞进入细胞,从而更加有效地抑制细胞的生长。

3.3 细胞摄取 市售制剂泰素,PTX-HA-C₁₈和 PTX-FA-HA-C₁₈胶束在 MCF-7 细胞中的摄取,见表 3~4。相比于泰素,包载 PTX 的 HA 胶束更容易被细胞摄取。原因一方面是细胞对于胶束的非特异性内吞作用,另一方面是胶束表面的 HA 与 MCF-7 细胞表面的 CD44 受体的高度亲和性,胶束借助 CD44 受体介导的内吞被摄取进入细胞。对于 FA-HA-C₁₈胶束,在叶酸表达丰富的 MCF-7 细胞里,其摄取量显著高

表 3 泰素,PTX-HA-C₁₈和 PTX-FA-HA-

C₁₈胶束与 MCF-7 细胞培养 2 h 细胞的 PTX 摄取量($\bar{x} \pm s, n = 3$)

制剂	细胞摄取 PTX/mg·g ⁻¹		
	PTX 浓度/mg·L ⁻¹		
	0.2	0.5	1
泰素	0.11 ± 0.03	0.27 ± 0.07	0.41 ± 0.09
HA-C ₁₈ 胶束	0.86 ± 0.17	1.71 ± 0.22	2.53 ± 0.18
FA-HA-C ₁₈ 胶束	1.01 ± 0.19	1.93 ± 0.29	3.46 ± 0.23

于 HA-C₁₈胶束。因此,除了非特异性内吞和 CD44 受体介导的内吞之外,叶酸受体介导的内吞进一步参与到 FA-HA-C₁₈胶束的入胞,而且叶酸受体介导细胞摄取的作用较为显著。因此,借助双靶向特性,FA-HA-C₁₈胶束表现出了优良的细胞摄取行为。

另外,从表 4 细胞摄取结果看出,泰素,PTX-HA-C₁₈和 PTX-FA-HA-C₁₈(PTX 质量浓度 0.2 ~ 1 mg·L⁻¹)胶束的细胞摄取在 0.5 ~ 2 h 内呈明显的浓度和时间依赖性。

表 4 泰素,PTX-HA-C₁₈和 PTX-FA-HA-C₁₈

胶束(PX 质量浓度为 1.0 mg·L⁻¹)与 MCF-7 细胞

培养不同时间细胞的 PTX 摄取量($\bar{x} \pm s, n = 3$)

制剂	细胞摄取 PTX/mg·g ⁻¹		
	0.5 h	1 h	2 h
泰素	0.12 ± 0.03	0.19 ± 0.06	0.38 ± 0.11
HA-C ₁₈ 胶束	0.88 ± 0.13	1.41 ± 0.12	2.56 ± 0.21
FA-HA-C ₁₈ 胶束	1.05 ± 0.12	1.71 ± 0.11	3.61 ± 0.27

4 讨论

相比于泰素,游离药物通过被动扩散进入细胞,疏水化修饰 HA 胶束可借助与 CD44 受体的高度亲和性,通过 CD44 受体介导的内吞作用提高胶束的细胞摄取,进而增强 PTX 的细胞生长抑制作用。

HA-C₁₈胶束仅结合于 MCF-7 细胞表面的 CD44 受体,FA-HA-C₁₈胶束通过与 MCF-7 细胞表面的叶酸受体和 CD44 受体相互作用,可通过双受体介导的内吞作用,增加胶束在细胞内的蓄积量,表现出更强的细胞毒性。因此,借助其双靶向特性,FA-HA-C₁₈胶束表现出了优良的抗肿瘤活性和细胞摄取行为。

相比于市售制剂泰素,HA-C₁₈和 FA-HA-C₁₈胶束表现出较强的抗肿瘤活性和良好的细胞摄取能力。FA-HA-C₁₈胶束借助双受体靶向特性,表现出更加优良的细胞摄取行为和体外抗肿瘤活性。HA 聚合物胶束是一种新型的提高抗肿瘤药物 PTX 的抗肿瘤活性的有效的纳米给药系统。

[参考文献]

- [1] 唐勇,何薇,王玉芝,等. 鸡血藤黄酮类组分抗肿瘤活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(2): 51.
- [2] 叶红翠,张小平,余虹. 多花黄精粗多糖抗肿瘤活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(6): 34.
- [3] Liu Y H, Sun J, Cao W, et al. Dual targeting folate-conjugated hyaluronic acid polymeric micelles for paclitaxel delivery [J]. Int J Pharm, 2011, 421(1): 160.
- [4] Taetz S, Bochot A, Surace C, et al. Hyaluronic acid-modified DOTAP/DOPE liposomes for the targeted delivery of anti-telomerase si RNA to CD44-expressing lung cancer cells [J]. Oligonucleotides, 2009, 19(2): 103.
- [5] 刘同祥,张艳平,徐羽,等. 紫杉醇联合三尖杉宁碱诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(9): 115.
- [6] 张美玲,王新春,黄志巧. 异甘草素在 Caco-2 细胞的摄取特性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 4(2): 134.

[责任编辑 聂淑琴]