

# 胡桃醌-PLGA 纳米粒制备及对 A375 恶黑细胞的体外抗肿瘤作用

岳武恒<sup>1</sup>, 梅瑞<sup>1</sup>, 蔡娟<sup>2</sup>, 钱汉清<sup>2</sup>, 刘宝瑞<sup>2</sup>, 邹征云<sup>1,2\*</sup>

(1. 南京中医药大学 中西医结合鼓楼临床医学院, 南京 210008;

2. 南京大学 医学院 附属鼓楼医院, 南京 210008)

**[摘要]** 目的:制备胡桃醌(juglone, Jug)聚乳酸-羟基乙酸(poly lactic-co-glycolic acid, PLGA)纳米粒(Jug-PLGA-NPs),并考察其理化性质、体外释放特征及对 A375 细胞的体外影响。方法:采用乳化挥发法制备 Jug-PLGA-NPs,对其粒径、包封率、载药率以及体外释放特征进行考察;荧光显微镜观察 PLGA-NPs 在体外细胞的摄取情况,小动物活体成像仪观测 PLGA-NPs 在 BALB/c 荷瘤裸鼠尾静脉注射后体内的分布;用噻唑蓝(thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT)比色法检测其对 A375 细胞增殖抑制作用,流式细胞仪进行细胞凋亡率及细胞周期检测;蛋白免疫印迹法检测蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt),磷酸化-Akt(p-Akt),周期蛋白 D<sub>1</sub>(cyclinD<sub>1</sub>)的表达情况。结果:制备的 Jug-PLGA-NPs 平均粒径为(149.6 ± 21.5)nm,包封率为(68.39 ± 2.51)%,载药率(5.07 ± 0.98)%,具有良好的缓释特征。PLGA-NPs 在体外细胞摄取和体内活体成像中具有良好的穿透和靶向性能。不同浓度 Jug-PLGA-NPs 均能明显抑制 A375 细胞增殖、促进细胞凋亡,呈明显时间浓度依赖性( $P < 0.05$ ),且 48 h 作用略优于等浓度 Jug;其机制可能与调节 Akt 磷酸化水平,下调 cyclinD<sub>1</sub> 表达( $P < 0.05$ ),阻滞细胞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期有关( $P < 0.05$ )。结论:负载 Jug 的 PLGA 纳米微粒制备简便,具有良好的药物缓释、肿瘤靶向及抗肿瘤能力,为未来 Jug 的临床应用提供了一种新的药物剂型。

**[关键词]** 胡桃醌;聚乳酸-羟基乙酸;纳米微粒;黑色素瘤;A375 细胞

**[中图分类号]** R22;R242;R2-031;R285.5;R273 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)04-0087-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.20190114

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20181015.1719.005.html>

**[网络出版时间]** 2018-10-19 8:38

## Preparation of Juglone-loaded PLGA Nanoparticles and Its Anti-tumor Effect on Melanoma A375 Cells *in Vitro*

YUE Wu-heng<sup>1</sup>, MEI Rui<sup>1</sup>, CAI Juan<sup>2</sup>, QIAN Han-qing<sup>2</sup>, LIU Bao-rui<sup>2</sup>, ZOU Zheng-yun<sup>1,2\*</sup>

(1. Nanjing Drum Tower Hospital, Clinical College of Traditional Chinese and Western Medicine,

Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210008, China;

2. Nanjing Drum Tower Hospital, The Affiliated Hospital of Nanjing University

Medical School, Nanjing 210008, China)

**[Abstract]** **Objective:** To prepare Juglone-loaded poly lactic-co-glycolic acid nanoparticles (Jug-PLGA-NPs), and investigate their physicochemical properties, release characteristics *in vitro* and anti-tumor activities on A375 melanoma cells *in vitro*. **Method:** Jug-PLGA-NPs were prepared by emulsification-solvent evaporation

**[收稿日期]** 20180719(007)

**[基金项目]** 国家重点研发计划专项(2017YFC1308900);南京市医学科技发展项目(ZKX15012);中央高校基本科研项目(021414380427)

**[第一作者]** 岳武恒,在读硕士,从事恶性肿瘤的中西医结合及生物免疫治疗研究,E-mail: 737281405@qq.com

**[通信作者]** \* 邹征云,博士,主任医师,硕士生导师,从事恶性肿瘤生物免疫治疗的研究,Tel:025-83106666, E-mail: zouzhenyun001@163.com

method. Then the particle size, encapsulation efficiency, drug loading rate and *in vitro* release characteristics were investigated. Fluorescence microscopy was used to observe the uptake of PLGA-NPs *in vitro*. The distribution of PLGA-NPs in BALB/c nude mice after tail vein injection was observed by the small living animal imaging system. Their inhibition effect on proliferation of A375 cells was detected by thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) assay. Apoptosis rate and cell cycle detection were performed by flow cytometry. Western blot was used to determine the protein kinase B (Akt), phosphorylated Akt (p-Akt) and cyclinD<sub>1</sub>. **Result:** The average particle size of the prepared Jug-PLGA-NPs was (149.6 ± 21.5) nm, entrapment rate of (68.39 ± 2.51)%, and drug-loading rate of (5.07 ± 0.98)%, showing good sustained-release characteristics. PLGA-NPs showed good penetration and targeting properties in cellular uptake *in vitro* and *in vivo* imaging. Different concentrations of Jug-PLGA-NPs could significantly inhibit the proliferation and promote apoptosis of A375 cells in a time and concentration dependent manner ( $P < 0.05$ ), and its 48 h effect was superior to that of the same concentration of Jug. The mechanism may be related to the regulation of Akt phosphorylation level, down-regulation of cyclinD<sub>1</sub> expression ( $P < 0.05$ ) and the cell-cycle arrest in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The Jug-PLGA-NPs are easy to prepare and have good sustained-release characteristics, tumor targeting and anti-tumor ability, providing a new pharmaceutical dosage form for the future clinical application of Jug.

[**Key words**] juglone; poly lactic-co-glycolic acid (PLGA); nanoparticles; melanoma; A375 cells

恶性黑色素瘤是临床上较为常见皮肤、黏膜及色素膜肿瘤,其恶性程度较高、预后较差,对于存在广泛远处转移的Ⅳ期恶黑患者,其5年生存率 < 10%,同时大多数恶性黑色素瘤被认为对传统化疗及放射线相对不敏感,因而亟待寻求新的治疗手段<sup>[1]</sup>。肽基脯氨酰顺反异构酶 1 (Pin1) 是目前已知调节磷酸化丝氨酸/苏氨酸基序顺反构象变化唯一的酶,其在恶性黑色素瘤、乳腺癌等多种恶性肿瘤中过表达<sup>[2]</sup>,可加强和活化多种致癌信号,被称为肿瘤发生的催化分子,因而是一潜在的抗肿瘤靶点<sup>[3]</sup>。胡桃醌 (Jug) 作为中药青龙衣的抗肿瘤作用的主要成分<sup>[4]</sup>,是通过高通量筛选方法发现的第 1 个 Pin1 抑制剂<sup>[5]</sup>,目前已证实其能抑制多种恶性肿瘤细胞生长并诱导其凋亡,如卵巢癌<sup>[6]</sup>、乳腺癌<sup>[7]</sup>、黑色素瘤<sup>[8]</sup>等,但体内研究中也发现了与抗肿瘤作用伴生的巨大副作用<sup>[9]</sup>,同时由于其水溶性较差、性质不稳定,温度和光照均会引起其降解,影响了其基础研究及临床应用。纳米微粒药物作为近年热点研究的新型药物剂型,可显著改善药物的溶解度及控制药物释放速度,且由于实体肿瘤血管的高通透性和滞留效应 (EPR) 的存在<sup>[10]</sup>,可明显增加药物的被动肿瘤靶向性,目前已有多种材料制备的 Jug 纳米微粒问世<sup>[11-12]</sup>,但相关研究多集中于药剂工艺探索,较少涉及其抗肿瘤效应比较及相关机制探讨。本实验以美国食品药品监督管理局 (FDA) 认证具有生物可降解和良好的生物相容性的高分子聚合物聚乳酸-羟基乙酸 (PLGA) 为载体,成功制备了 Jug

聚乳酸-羟基乙酸钠纳米粒 (Jug-PLGA-NPs), 对其理化性质、体内外靶向性进行了考察,比较其与 Jug 对 Pin1 高表达 A375 恶黑细胞的抗肿瘤作用<sup>[13]</sup>,同时对其作用机制做了一定的探讨。

## 1 材料

**1.1 细胞与动物** 人恶性黑色素瘤 A375 细胞株 (北京市肿瘤防治研究所赠),细胞复苏后以含 10% 胎牛血清的 DMEN 培养基培养,传至 3 代后取对数生长期细胞进行细胞实验;BALB/c 裸鼠,雄性,4 ~ 5 周龄,购自扬州大学实验动物中心,合格证号 SCXK (苏) 2017-0007,动物实验方案符合南京鼓楼医院动物实验伦理委员会标准 (编号 201802014)。

**1.2 药物与试剂** 胎牛血清 (杭州四季青公司,批号 20161207); DMEN 培养基 (Corning 公司,批号 28417002); Jug (上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号 B1509031); PLGA<sub>40000</sub>50/50 (济南岱罡生物科技有限公司,批号 C0021); 香豆素 6 (Coumarin 6, C6), 噻唑蓝 (MTT) (Sigma 公司,批号分别为 M-2128, MKBJ5465V); 近红外荧光 (DiR) 染料 (中国北京全品速生物科技有限公司,批号 D22070); 膜连蛋白 V (Annexin V)/碘化丙啶 (PI) 凋亡检测试剂盒,细胞周期检测试剂盒 (杭州联科生物技术股份有限公司,批号分别为 72238383, 82009041); 周期蛋白 D<sub>1</sub> (cyclinD<sub>1</sub>) 一抗,β-肌动蛋白 (β-actin) 一抗 (CST 公司,批号分别为 2922, 4970); 蛋白激酶 B (Akt), 磷酸化-Akt (p-Akt) (S473) 一抗 (Santa Cruz 公司,批号分别为 sc-1618-R, sc-33437); 4', 6-双

脒基-2-苯基吡啶(DAPI),羊抗兔二抗(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为 C1005,A0208)。

**1.3 仪器** VCX130 型探头超声仪(美国 Sonics&Materials 公司);5810R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);NanoZSE 型动态光散射测定仪(英国 Malvern 公司);UV4802 型紫外分光光度计(美国 Unico 公司);JEM-2100 型透射电镜(TEM)(日本 Jeol 公司);EVOS FL Auto 型荧光显微镜(美国 Thermo Fisher 公司);IVIS Lumina XRMS III 型小动物活体成像系统(美国 PerkinElmer 公司);ELx800 型全自动酶标仪(美国 Biotek 公司);AccuriC6 型流式细胞仪(美国 BD 公司);1658001 型电泳槽,1703930 型湿转槽(美国 Bio-Rad 公司);Tanon6600 型发光成像工作站(上海天能科技公司)。

## 2 方法

**2.1 纳米粒的制备**<sup>[14]</sup> 采用超声乳化挥发法制备 PLGA 纳米粒,精密称取 PLGA 10 mg,Jug 0.8 mg,二氯甲烷 0.5 mL 溶解为有机相,在冰浴条件下逐滴加入含 1% 聚乙烯醇水相 3.5 mL 中,探头超声(52 W)间断超声数分钟,于磁力搅拌器上搅拌 4 h 挥去有机溶剂,得到 Jug-PLGA-NPs。将 Jug-PLGA-NPs 常温 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min 除去游离药物,保留上清;4 ℃,14 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 40 min 收集沉淀,以适量双蒸水洗 2 次获得 Jug-PLGA-NPs 沉淀。同法制备 C6-PLGA-NPs 及 DiR-PLGA-NPs。

**2.2 纳米粒子的粒径分布及形态** 动态光散射测定仪测定纳米粒的粒径分布。将 Jug-PLGA-NPs 溶液滴至铜网上,样品晾干后以 1% 双氧铀负染,通过透射电镜观察其形态。

**2.3 标准曲线绘制** 分别用 50% 乙醇配制 0.2, 0.1, 0.05, 0.025, 0.012 5, 0.006 25 g·L<sup>-1</sup> Jug 溶液,于紫外分光光度计测量其在 426 nm 处吸光度 A。以 A 及药物浓度 C 进行线性回归,得回归方程  $A_1 = 21.577C + 0.018 (R^2 = 0.999 5)$ 。结果表明,药物质量浓度在 0.006 25 ~ 0.2 g·L<sup>-1</sup> 内呈良好的线性关系。同法绘制释放外液标准曲线  $A_2 = 19.369C + 0.213 (R^2 = 0.999)$ 。

**2.4 Jug-PLGA-NPs 包封率及载药量测定** 将一定量 Jug-PLGA-NPs 以适量丙酮溶解,超声破球后挥发丙酮,以 50% 乙醇再次溶解定容,紫外分光光度计测定其 A,按上述标准曲线计算 Jug 含量。计算包封率 = Jug 实际质量/Jug 投药量 × 100%;载药量 = Jug 质量/(Jug 质量 + PLGA 质量) × 100%。

**2.5 Jug-PLGA-NPs 体外释放实验** 将 Jug-PLGA-NPs 沉淀分散于磷酸缓冲盐溶液(PBS)(pH 7.4) 1 mL 中,移于透析袋(Mw 3 000)内,将透析袋完全浸入 PBS(含 0.1% 聚山梨酯-80)5 mL 释放外液并置于 37 ℃ 避光水浴缸中,分别于 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 192, 240 h 将释放外液移出并加入 5 mL 新鲜释放外液,紫外分光光度计测定透析液中 Jug 含量,计算纳米粒释放度并绘制累积释放曲线,同时称取相同质量 Jug 原药作对比。

**2.6 Jug-PLGA-NPs 的体外细胞摄取** 将 A375 恶黑细胞以  $4 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板中,待贴壁后加入 10 mg·L<sup>-1</sup> C6-PLGA-NPs 共孵育 1 h,用 PBS 洗涤后用 4% 多聚甲醛固定 10 min,后以 DAPI 染细胞核,洗涤 2 次后在荧光显微镜下观察纳米粒子摄取情况。

**2.7 荷瘤裸鼠活体成像**<sup>[15]</sup> 细胞以每只  $5 \times 10^6$  个接种于裸鼠左侧腹股沟处,当肿瘤长至约 300 mm<sup>3</sup> 左右开始实验。取荷瘤裸鼠 4 只,分为 2 组,分别尾静脉注射载有 DiR 乙醇溶液 0.15 mL 和等量 DiR-PLGA-NPs,分别于 2, 24, 48 h 在异氟烷麻醉下,小动物活体成像仪记录裸鼠荧光成像照片,实验结束后统一处理图像。

**2.8 MTT 比色法检测细胞增殖** 调整细胞以  $7 \times 10^3$  个/孔接种于 96 孔板中,于 37 ℃ 培养箱中过夜,待细胞贴壁后分别加入 0, 2, 3, 4 mg·L<sup>-1</sup> Jug 180 μL 和相同浓度 Jug-PLGA-NPs 培养基,分别避光培养 24, 48 h 后,加入 5 g·L<sup>-1</sup> MTT 溶液 20 μL,37 ℃ 继续孵育 4 h,弃上清,每孔加入二甲亚砜 150 μL 振荡 5 min,在酶标仪上波长 490 nm 测定 A,计算各组细胞生长抑制率。

**2.9 Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡** 细胞以  $5 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板中,分为空白组及药物组(2, 3, 4 mg·L<sup>-1</sup> Jug-PLGA-NPs 及 4 mg·L<sup>-1</sup> Jug, 75 mg·L<sup>-1</sup> PLGA-NPs),继续培养 48 h 后,收集各组细胞分别加入 Annexin V 及 PI 染液,流式细胞仪检测凋亡,FloJo 软件分析结果。

**2.10 PI 单染色法检测细胞周期** 取对数期生长细胞,以  $4 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板中,贴壁后分别予 0, 2, 3, 4 mg·L<sup>-1</sup> Jug-PLGA-NPs 处理 24 h,收集各组细胞,以 70% 冰乙醇 4 ℃ 固定过夜,1 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, PBS 漂洗 2 遍,每组加入 PI 染液 400 μL,避光孵育 30 min 后过滤,流式细胞仪检测,Modfit 软件分析结果。

**2.11 蛋白免疫印迹法检测蛋白表达** 细胞以  $6 \times$

$10^5$  个/孔接种于 6 孔板中,待细胞达到 80% 融合时,更换含 0, 2, 3, 4  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Jug-PLGA-NPs 培养液刺激细胞 24 h 后收集细胞总蛋白,定量后加入  $5 \times$  上样缓冲液,煮沸 5 min。经 15% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后,转膜,含 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,加入 Akt, p-Akt, cyclinD<sub>1</sub>,  $\beta$ -actin 一抗 (1:1 000) 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,洗膜后加辣根过氧化物酶标记二抗 (按 1:1 000) 室温反应 1 h,采用化学发光液曝光显影,利用 Image J 软件进行灰度值检测,以  $\beta$ -actin 为内参分析蛋白相对表达量。

**2.12 统计学方法** 采用 SPSS 22.0 统计软件分析,计量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,多组比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 Jug-PLGA-NPs 的表征** 制备好的 Jug-PLGA-NPs 溶液呈橙黄色透明状液体,动态光散射测定仪测定平均粒径为  $(149.6 \pm 21.5)$  nm (图 1),分散系数为  $0.093 \pm 0.35$ ,包封率为  $(68.39 \pm 2.51)\%$ ,载药率  $(5.07 \pm 0.98)\%$ 。TEM 下示纳米粒子呈类圆形,大小均匀且分散良好 (图 2)。体外释放实验显示,Jug 原药释放迅速,在 24 h 内即释放了 94.21%;而 Jug-PLGA-NPs 在最初 24 h 存在突释现象,前 24 h 释放了 40.65% 负载的 Jug,随后稳步释放,在 240 h 累积释放 78.21% (图 3),该 Jug-PLGA-NPs 呈现良好的缓释性能。

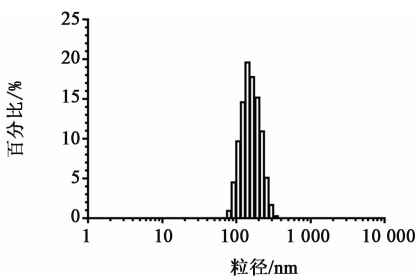


图 1 Jug-PLGA-NPs 粒径分布

Fig.1 Particle size distribution of Jug-PLGA-NPs

### 3.2 PLGA-NPs 在体内外肿瘤细胞的摄取情况

C6-PLGA-NPs 与 A375 恶黑细胞共培养 1 h 后荧光显微镜拍摄图片 (图 4),蓝色荧光为 DAPI 染色的肿瘤细胞核,同时在细胞胞浆和核周围区可以观察大量绿色荧光。此现象表明 PLGA-NPs 可以在短时间内被恶黑细胞摄取,并在细胞浆及细胞核周围区累积。在荷瘤裸鼠尾静脉注射的游离近红外染料 DiR 溶液后,照片中荧光信号主要集中在肝脾,在 24 h 及 48 h 后荧光强度逐步减弱,肿瘤周围均未见明显

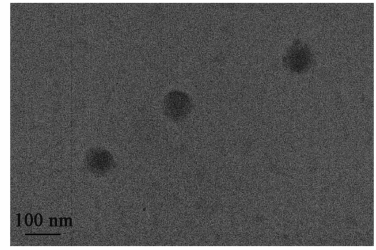


图 2 Jug-PLGA-NPs 的透射电镜观察

Fig.2 TEM image of Jug-PLGA-NPs

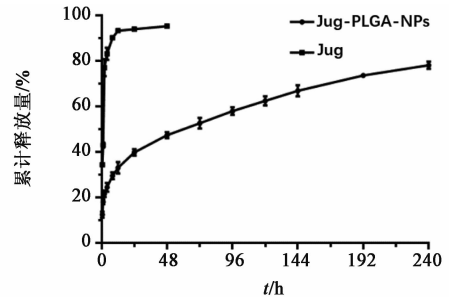
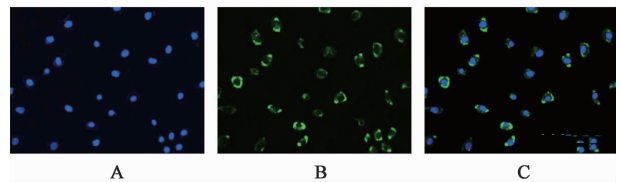


图 3 Jug-PLGA-NPs 与 Jug 原药体外释放曲线 ( $n=3$ )

Fig.3 Release curves of Jug-PLGA-NPs and Jug *in vitro* ( $n=3$ )

荧光聚集;而给予 DiR-PLGA-NPs 组,除了肝脾可见强烈荧光外,在 24 h 时肿瘤区可见到明显荧光信号,48 h 后仍有继续增强趋势 (图 5)。表明 PLGA-NPs 相较于裸药存在明显肿瘤趋向性,且由于纳米粒子缓释特点,药物可从微球中缓慢释放于肿瘤组织,因而可能发挥更强的抗肿瘤作用。



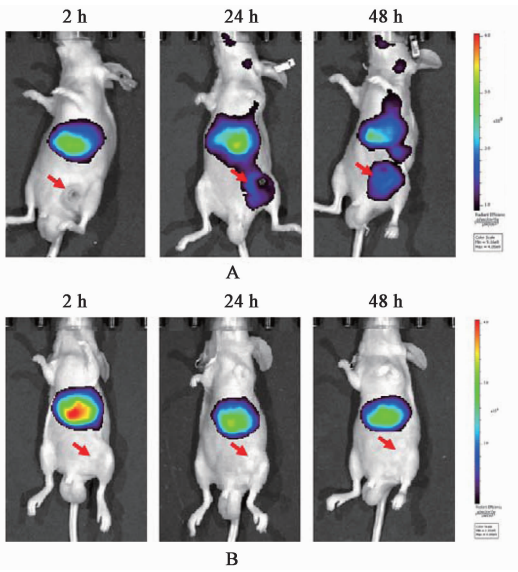
A. 蓝色荧光,DAPI 染肿瘤细胞核;B. 绿色荧光,C6-PLGA-NPs 被肿瘤细胞大量吞噬;C. 荧光叠加图像

图 4 PLGA-NPs 的细胞摄取 (免疫荧光,  $\times 200$ )

Fig.4 Cellular uptake of PLGA-NPs (immunofluorescence,  $\times 200$ )

**3.3 对 A375 细胞增殖影响** Jug-PLGA-NPs, Jug 裸药都表现了明显抑制增殖作用,并呈浓度时间依赖。与等质量浓度 Jug 比较,各质量浓度 Jug-PLGA-NPs 组 24 h 细胞增殖抑制率均降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );48 h 后细胞增殖抑制率均稍高,但除了 Jug-PLGA-NPs 3  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组别外 ( $P < 0.05$ ),其余各组间差异均无统计学意义。见表 1。

**3.4 对恶黑细胞凋亡影响** 与空白组比较,高浓度 PLGA-NPs 组凋亡率差别无统计学意义;各质量浓度 Jug-PLGA-NPs 及 Jug 组早期凋亡率、晚期凋亡率、总凋



红色箭头所指为皮下瘤; A. DiR-PLGA-NPs 组, 荧光聚集于肝脾及肿瘤区; B. DiR 组, 荧光主要集中在肝脾

图 5 PLGA-NPs 的体内靶向性

Fig. 5 Targeting properties of PLGA-NPs *in vivo*

表 1 Jug, Jug-PLGA-NPs 对 A375 细胞增殖抑制率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h	48 h
Jug	2.0	18.52 ± 0.80	32.74 ± 2.89
	3.0	37.82 ± 1.48	46.22 ± 3.09
	4.0	68.36 ± 1.79	94.29 ± 1.96
Jug-PLGA-NPs	2.0	12.28 ± 2.26 <sup>1)</sup>	33.96 ± 2.08
	3.0	21.41 ± 2.33 <sup>2)</sup>	54.59 ± 1.96 <sup>1)</sup>
	4.0	47.68 ± 3.33 <sup>2)</sup>	96.48 ± 3.02

注:与等质量浓度 Jug 比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

亡率均显著升高,除  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Jug-PLGA-NPs 晚期凋亡率无统计学差异外,余均存在统计学差异 ( $P < 0.01$ );  $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Jug 裸药组与等浓度 Jug-PLGA-NPs 组比较,凋亡率差异无统计学意义,见表 2。

**3.5 Jug-PLGA-NPs 对 A375 细胞周期影响** 与空白组比较,不同质量浓度 Jug-PLGA-NPs 组细胞 S 期比例显著下降,  $G_0/G_1$  期比例显著升高 ( $P < 0.01$ ); 但  $G_2/M$  期无明显变化,见表 3。

**3.6 对 Akt, p-Akt, cyclinD<sub>1</sub> 蛋白的影响** 与空白组比较,不同质量浓度 Jug-PLGA-NPs 组 Akt 蛋白的表达无明显差异; p-Akt, cyclinD<sub>1</sub> 蛋白明显下降 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),见图 6,表 4。

#### 4 讨论

恶性黑色素瘤是一种恶性程度较高的肿瘤,在

表 2 Jug, Jug-PLGA-NPs 作用 A375 细胞 48 h 对凋亡率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of Jug-PLGA-NPs or Jug on apoptosis of A375 cells after treatment for 48 h ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ ) %

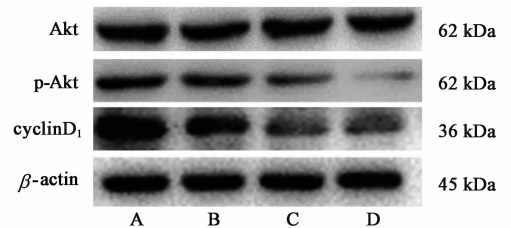
组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	早期凋亡	晚期凋亡	总凋亡率
空白	-	2.06 ± 0.75	3.68 ± 1.18	5.74 ± 1.61
PLGA-NPs	75	2.23 ± 1.01	2.29 ± 0.43	4.52 ± 1.22
	Jug-PLGA-NPs	2.0	14.24 ± 4.10 <sup>2)</sup>	7.91 ± 2.63
NPs	3.0	25.82 ± 1.89 <sup>2)</sup>	20.17 ± 4.99 <sup>2)</sup>	46.00 ± 3.56 <sup>2)</sup>
	4.0	74.32 ± 1.85 <sup>2)</sup>	14.90 ± 2.14 <sup>2)</sup>	89.22 ± 2.22 <sup>2)</sup>
Jug	4.0	74.66 ± 5.99 <sup>2)</sup>	15.77 ± 0.76 <sup>2)</sup>	90.43 ± 5.74 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  (表 3, 4 同)。

表 3 Jug-PLGA-NPs 作用 24 h 对 A375 细胞周期的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effect of Jug-PLGA-NPs on cell-cycle of A375 cells after treatment for 24 h ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ ) %

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$G_0/G_1$ 期	S 期	$G_2/M$ 期
空白	-	24.26 ± 3.58	68.32 ± 1.87	6.06 ± 0.85
Jug-PLGA-NPs	2.0	45.64 ± 2.46 <sup>2)</sup>	49.61 ± 0.67 <sup>2)</sup>	4.75 ± 2.03
	3.0	62.03 ± 3.90 <sup>2)</sup>	30.64 ± 1.37 <sup>2)</sup>	7.33 ± 4.83
NPs	4.0	72.33 ± 3.19 <sup>2)</sup>	20.21 ± 1.42 <sup>2)</sup>	7.46 ± 4.25



A. 空白组; B ~ D. 2.0, 3.0, 4.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Jug-PLGA-NPs 组

图 6 Jug-PLGA-NPs 作用 A375 细胞 24 h Akt, p-Akt, cyclinD<sub>1</sub> 蛋白表达电泳

Fig. 6 Electrophoresis on expression of Akt, p-Akt and cyclinD<sub>1</sub> protein in A375 cells treated with Jug-PLGA-NPs for 24 h

我国虽然总体发病率不高,但由于中国人口的庞大基数,使得我国黑色素瘤发病人数的绝对值居高不下。近年来随着 FDA 陆续批准了丝裂原活化的蛋白激酶激酶的激酶 B (B-Raf) 制剂、有丝分裂原活化蛋白激酶 (MEK) 抑制剂用于晚期 B-Raf 突变恶黑患者的靶向治疗,细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原 4 (CTLA-4),程序性死亡受体-1 (PD-1) 抗体的陆续上市开启了恶性黑色素瘤免疫治疗的时代,提高了晚期恶性黑色素瘤患者的治疗效果,但与此同时逐渐显露出来分子靶向药物的继发性耐药问题, B-Raf

表 4 Jug-PLGA-NPs 对 A375 细胞 Akt, p-Akt, cyclinD<sub>1</sub> 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of Jug-PLGA-NPs on expression of Akt, p-Akt and cyclinD<sub>1</sub> protein in A375 cells( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	Akt /β-actin	p-Akt /β-actin	cyclinD <sub>1</sub> /β-actin
空白	-	1.02 ± 0.07	0.78 ± 0.10	2.21 ± 0.12
Jug-PLGA-NPs	2.0	1.01 ± 0.10	0.71 ± 0.07 <sup>1)</sup>	1.23 ± 0.08 <sup>2)</sup>
	3.0	0.99 ± 0.06	0.45 ± 0.04 <sup>2)</sup>	0.74 ± 0.09 <sup>2)</sup>
	4.0	0.98 ± 0.11	0.13 ± 0.13 <sup>2)</sup>	0.66 ± 0.06 <sup>2)</sup>

野生型恶黑患者的治疗问题,要求学者进一步探索恶性黑色素瘤发生发展过程中各种基因组的突变及异常表达,以期获得新的药物靶点,如 GUO 等<sup>[16]</sup>对伊马替尼用于干细胞因子受体(C-kit)突变的黑色素瘤患者的治疗做出了巨大贡献。

大量临床样本数据研究表明,Pin1 在正常皮肤表皮、痣中仅呈中低度表达,而在黑色素瘤中却呈高表达<sup>[17]</sup>。Pin1 作为磷酸化丝氨酸/苏氨酸基序顺反构象变化唯一的酶,作用于众多调控细胞增殖与分化的核转录因子,如叉头盒蛋白 M1(FOXM1),视网膜母细胞瘤(RB),β-连环蛋白(β-catenin)等<sup>[18-19]</sup>,特别是 Pin1 可以通过多个通路如磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)/Akt 通路、生长因子信号通路等上调周期蛋白 cyclinD<sub>1</sub><sup>[20]</sup>,而 cyclinD<sub>1</sub> 的异常表达除了引起细胞周期调节的失控还可能促使脱氧核糖核酸修复功能异常<sup>[21]</sup>,因此 Pin1 常被称为致癌信号通路的催化剂。许多实验已证实抑制 Pin1 蛋白的活性能够抑制恶性黑色素瘤细胞的增殖、迁徙转移能力<sup>[13]</sup>以及促进细胞凋亡<sup>[8,13]</sup>;Pin1 敲除小鼠不仅可以正常发育<sup>[22]</sup>,同时对转基因引起的致癌性较正常小鼠拥有更高的抵抗力<sup>[23]</sup>,因而 Pin1 可作为恶性黑色素瘤一个新的比较理想的抗癌靶标。

近年来各种结构类型的 Pin1 小分子抑制剂不断涌现,这些小分子在酶水平都取得良好的活性,但在细胞水平却鲜见令人满意的数据<sup>[3]</sup>。Jug 作为第一个报道具有 Pin1 抑制活性的小分子药物,其主要母体药材青龙衣,在我国北方地区民间作为抗癌药物有着长期的临床实践<sup>[24-25]</sup>,诸多现代研究也证实其在体内外对多种恶性肿瘤存在抑制作用<sup>[26]</sup>。然而 Jug 对许多酶如丙酮酸脱氢酶、谷胱甘肽 S 转移酶、核糖核酸聚合酶 II<sup>[27]</sup>均有抑制作用,存在较大的毒副作用风险,同时 Jug 水溶性差且易氧化分解的性质也限制了其应用,因而提高 Jug 的生物利用

度和肿瘤靶向性是对其增效减毒的两个重要方向。PLGA 作为一种安全无毒、生物相容性佳的纳米载体,其制备的纳米微球一方面可以显著改善药物的溶解度和稳定性,从而提高药物的生物利用度,另一方面具有 EPR 效应介导的肿瘤被动靶向性、缓释等特点。

本实验以 PLGA 作为载体以乳化挥发法制备了 Jug-PLGA-NPs,结果显示制备的纳米微粒直径小、大小均匀、性质稳定且拥有良好的缓释性。Jug-PLGA-NPs 与 Jug 裸药比较,24 h 时对 A375 恶黑细胞抑制增殖稍弱,48 h 时具有相似的抑制增殖、诱导凋亡的作用。这可能与两者作用机制不同相关,Jug 裸药是被动扩散进入肿瘤细胞中,纳米粒的摄取方式主要是胞吞,发挥作用较慢,同时由于纳米粒子具有缓释性,Jug-PLGA-NPs 在 24 h 仅释放了 40.65%,所以与 Jug 裸药比较并未表现出明显抗肿瘤优势。纳米粒子的优势主要表现在靶向性及体内长循环方面,体内给药后的药物荧光分布提示 PLGA-NPs 相较裸药有着良好的肿瘤靶向性。总之 Jug-PLGA-NPs 能明显抑制 A375 恶黑细胞增殖诱导其凋亡,其机制可能是通过调节 Akt 磷酸化水平减少 cyclinD<sub>1</sub> 的表达,进而将细胞阻滞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期。后续本课题组将进一步在荷瘤鼠体内验证 Jug-PLGA-NPs 的抗肿瘤作用。

[参考文献]

[1] Siegel R L, Miller K D, Ahmedin-Jemal D P. Cancer statistics, 2018[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7-30.

[2] BAO L, Kimzey A, Sauter G, et al. Prevalent overexpression of prolyl isomerase Pin1 in human cancers[J]. Am J Pathol, 2004, 164(5): 1727-1737.

[3] MIN S H, ZHOU X Z, LU K P. The role of Pin1 in the development and treatment of cancer[J]. Arch Pharm Res, 2016, 39(12): 1609-1620.

[4] 沈广志, 邹桂华, 梁婷, 等. 核桃楸的化学成分研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(17): 219-224.

[5] Hennig L, Christner C, Kipping M, et al. Selective inactivation of parvulin-like peptidyl-prolyl cis/trans isomerases by juglone [J]. Biochemistry, 1998, 37(17): 5953-5960.

[6] FANG F, QIN Y X, QI L, et al. Juglone exerts antitumor effect in ovarian cancer cells[J]. Iran J Basic Med Sci, 2015, 18(6): 544-548.

[7] JI Y B, XIN G S, QU Z Y, et al. Mechanism of

- juglone-induced apoptosis of MCF-7 cells by the mitochondrial pathway [J]. *Genet Mol Res*, 2016, 15 (3):123-131.
- [ 8 ] Aithal B K, Kumar M R, RAO B N, et al. Juglone, a naphthoquinone from walnut, exerts cytotoxic and genotoxic effects against cultured melanoma tumor cells [J]. *Cell Biol Int*, 2009, 33(10):1039-1049.
- [ 9 ] 陈丽, 张建, 汪思应, 等. 胡桃醌对小鼠黑色素瘤细胞 B16F10 体内迁移的影响 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2012, 17(9):978-982.
- [10] Torchilin V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011, 63(3):131-135.
- [11] 杨倩, 罗国伟, 彭海龙, 等. 胡桃醌脂质体的制备及理化性质 [J]. *南昌大学学报:工科版*, 2015, 37(3):234-239.
- [12] 黄可心, 王晓扬, 沈韵桐, 等. 胡桃醌叶酸修饰自微乳的体内外靶向性研究 [J]. *中国医院药学杂志*, 2016, 36(4):285-289.
- [13] JIN J, ZHANG Y, LI Y, et al. RNA-interference-mediated downregulation of Pin1 suppresses tumorigenicity of malignant melanoma A375 cells [J]. *Neoplasia*, 2012, 60(1):92-100.
- [14] Arasoglu T, Derman S, Mansuroglu B, et al. Synthesis, characterization and antibacterial activity of juglone encapsulated PLGA nanoparticles [J]. *J Appl Microbiol*, 2017, 123(6):1407-1419.
- [15] ZHANG Z, QIAN H, YANG M, et al. Gambogic acid-loaded biomimetic nanoparticles in colorectal cancer treatment [J]. *Int J Nanomedicine*, 2017, 12:1593-1605.
- [16] GUO J, SI L, KONG Y, et al. Phase II, open-label, single-arm trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma harboring c-Kit mutation or amplification [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(21):2904-2909.
- [17] Kruiswijk F, Hasenfuss S C, Sivapatham R, et al. Targeted inhibition of metastatic melanoma through interference with Pin1-FOXM1 signaling [J]. *Oncogene*, 2016, 35(17):2166-2177.
- [18] Kim G, Kim J Y, Lim S C, et al. SUV39H1/DNMT3A-dependent methylation of the RB1 promoter stimulates PIN1 expression and melanoma development [J]. *Faseb J*, 2018, doi:fj201700645.
- [19] XU G G, Etkorn F A. Pin1 as an anticancer drug target [J]. *Drug News Perspect*, 2009, 22(7):399-407.
- [20] Hariharan N, Sussman M A. Pin1: a molecular orchestrator in the heart [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2014, 24(6):256-262.
- [21] Bartek J, Lukas J. DNA repair: Cyclin D<sub>1</sub> multitasks [J]. *Nature*, 2011, 474(7350):171-172.
- [22] Liou Y C, Ryo A, HUANG H K, et al. Loss of Pin1 function in the mouse causes phenotypes resembling cyclin D1-null phenotypes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(3):1335-1340.
- [23] TAO X, ZHANG H, Park S S, et al. Loss of Pin1, suppresses hedgehog-driven medulloblastoma tumorigenesis 1 [J]. *Neoplasia*, 2017, 19(3):216-225.
- [24] 陈静岚, 张国屏, 孙玉波. 复方青龙衣配合化疗治疗急性白血病 23 例 [J]. *黑龙江中医药*, 1996, 25(4):26-27.
- [25] 任生, 孟丽, 王桂花, 等. 中药青龙衣注射剂复合化疗药物介入治疗肺癌 13 例报告 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2000, 6(7):27-29.
- [26] 刘薇, 林文翰, 季宇彬. 青龙衣毒性作用及体外抗肿瘤作用的实验研究 [J]. *中国中药杂志*, 2004, 29(9):4-10.
- [27] CHAO S H, Greenleaf A L, Price D H. Juglone, an inhibitor of the peptidyl-prolyl isomerase Pin1, also directly blocks transcription [J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(3):767-773.

[责任编辑 张丰丰]