

负载紫杉醇双配体纳米药物输送系统的体外生物性能评价

周 兵¹, 廖海红², 陈 艳², 张 霞^{2*}

(1. 南华大学附属第二医院妇产科, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学附属第二医院超声科)

摘要: **目的** 体外评价带有叶酸和穿膜肽双配体的、负载紫杉醇纳米药物输送系统的生物性能。 **方法** 分别用 H-F-P NPs、H-Tat-P NPs 及 H-F-Tat-P NPs 孵育细胞, 利用流式细胞仪定量评价细胞对带有不同配体纳米药物输送系统的摄取量。再用 H-F-Tat-P NPs 孵育细胞, 利用激光共聚焦显微镜定性评价不同细胞对 H-F-Tat-P NPs 的摄取量。 **结果** 叶酸受体阳性表达的 MDA-MB-231 细胞摄取 H-F-Tat-P NPs 的量明显多于 H-F-P NPs 及 H-Tat-P NPs。叶酸受体阴性表达的 A549 细胞摄取 H-F-Tat-P NPs 与 H-Tat-P NPs 的量多于 H-F-P NPs。 **结论** 叶酸的靶向作用与穿膜肽的穿膜作用能够协同提高药物在靶细胞的聚集, 进一步增强药物输送系统的治疗作用, 为开发新型、高效药物输送系统提供基础。

关键词: 紫杉醇; 穿膜肽; 叶酸; 纳米药物输送系统

中图分类号: R737.3 文献标识码: A

In vitro Biological Activities of Paclitaxel Nanoparticles with Dual Ligands

ZHOU Bing, LIAO Haihong, CHEN Yan, et al

(Department of Obstetrics and Gynecology, the Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To evaluate in vitro biological activities of paclitaxel nanoparticles with dual ligands. **Methods** The cells were incubated with H-F-P NPs, H-Tat-P NPs, or H-F-Tat-P NPs, and then evaluated by using flow cytometry. Then the cells were incubated with H-F-Tat-P NPs, and evaluated by using confocal laser scanning microscopy. **Results** Quantitative analysis of cellular uptake of NPs by flow cytometry showed the extend of cellular uptake for A549 cell lines was: H-F-Tat-P NPs > H-Tat-P NPs > H-F-P NPs. For MDA-MB-231 cells: H-F-Tat-P NPs > H-F-P NPs > H-Tat-P NPs. Qualitative analysis of cellular uptake of H-F-Tat-P NPs by confocal laser scanning microscopy showed the fluorescent signal of NPs in MDA-MB-231 cells was higher than that of A549 cells under the same conditions. **Conclusion** The strategy on nanomedicine with dual ligands can enhance the cellular uptake of drug thereby improve its chemotherapeutic efficiency. The nanoparticle system could be used as a promising cancer cell specific delivery system for further investigation.

Key words: folate; tat; paclitaxel; nanoparticle system

细胞穿膜肽 (cell-penetrating peptides, CPPs) 是一大类由 10 ~ 30 个氨基酸组成、可以携带多种分子主动穿越各种生物膜屏障包括血脑屏障, 导入几乎所有细胞的短肽^[1]。自穿膜肽发现以来人们利用穿膜肽的转运功能已将蛋白质、抗体、核酸、脂质体、显像剂、细胞毒性药物等多类物质导入细胞, 为许多

疾病分子水平的诊断、治疗提供了有效手段, 但普通穿膜肽缺乏靶向性制约了其进一步在体应用^[2-3]。目前已经发现叶酸受体 (folate receptor, FR) 在包括乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌等在内的大部分恶性肿瘤组织中高度表达, 而在正常组织中几乎不表达^[4-5]。因此, 叶酸可作为肿瘤特异分子应用于靶向药物输送系统的研究^[6-8]。

结合前期已经成功制备了负载紫杉醇的双配体纳米药物输送系统 (heparin-folate-tat-paclitaxel nano-

particles, H-F-Tat-P NPs)^[9], 本研究体外评价该系统的生物性能, 为进一步研究其体内生物活性, 特别是开发具有高效治疗作用的药物输送系统提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 肝素钠 ($M_w = 15000$ Da, 效价 150 U/mg), 叶酸, 丁二酸酐 (上海国药集团), 732 (H^+) 阳离子交换树脂 (上海山浦化工有限公司), 4, 4'-二甲氨基吡啶 (DMAP), 二环己基碳化二亚胺 (DCC), 1-乙基-3(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 (EDC), N-羧基琥珀酰亚胺 (NHS) (上海共价化学公司), 紫杉醇 (沈阳天峰生物化学有限公司), Tat 肽 Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg (MW 1560 Da), FITC-Tat 肽 (上海强耀生物科技有限公司), Sephadex G-25 葡聚糖凝胶, 透析袋 (MW-CO 3500) (Pharmacia, 瑞典), 所有试剂反应前均进行重蒸处理。人乳腺癌细胞 MDA-MB-231、人肺癌细胞 A549, RPMI 1640 细胞培养基、新生牛血清、0.25% 胰蛋白酶、胎牛血清、L-15 细胞培养基 (广州速研生物科技有限公司), 氯化钠 (NaCl)、十二水合磷酸二钠 ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)、氯化钾 (KCl)、磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) (广州铭旺生物科技有限公司), Bruker AVANCEAV 400 核磁共振仪 (美国布鲁克公司), Zetasizer Nano-Zs 动态光散射仪 (DLS, 英国 Malvern 公司), UV-2410 紫外分光光度计 (日本岛津仪器有限公司), TOPCON DS150 扫描电子显微镜, TF-FD-1 冷冻干燥机 (上海田枫仪器有限公司), 高效液相 (HPLC, Shimadzu), 反向 C_{18} 硅胶柱 (SepaxHP- C_{18} , 4.6250 mm, 5 m, Sepax, USA), 紫外检测器 (SPD-20 A, Shimadzu)。细胞计数板、细胞培养皿、载玻片、盖玻片、移液器枪头、离心管、EP 管、6 孔板 (广州杰特伟公司), 1 000 μ L 微量加样枪 $\times 1$ 支, 20 ~ 100 μ L 微量加样枪 $\times 1$ 支, 1 ~ 20 μ L 微量加样枪 $\times 1$ 支 (法国吉而森公司), CP225D 电子分析天平 (Sartorius, Germany), CO_2 孵箱 (GALAXY S), 电热恒温水浴锅 (北京市永光明医疗仪器厂), FACSort 流式细胞分析仪 (Becton Dickinson, USA); 激光共聚焦显微镜 (Olympus fluoview fv1000, Tokyo, Japan), 低速离心机 (LD5-2A) (Sigma, America), LRH-150-S 型恒温恒湿培养箱 (广东省医疗器械厂)。

1.2 P NPs 的制备 参照前期制备方法制备 H-F-P NPs、H-Tat-P NPs 及 H-F-Tat-P NPs^[9]。

1.3 细胞培养 人乳腺癌细胞 MDA-MB-231、人肺癌细胞 A549 置于 37 $^{\circ}C$ 5% CO_2 饱和湿度恒温的细胞培养箱中培养, 培养液分别为 L-15、RPMI 1640, 均含 10% FBS、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素。每天更换培养液 1 次。

1.4 流式细胞仪定量分析 于 6 孔板内每孔加入约 2.8×10^5 个 MDA-MB-231 细胞或 A549 细胞, 加入适量培养液放入孵箱培养 24 h 后吸去细胞培养液, 加入 2 ~ 3 mL PBS 缓冲液重复漂洗 2 ~ 3 遍, 以去掉细胞代谢产物和死细胞; 再分别加入 H-F-P NPs、H-Tat-P NPs 及 H-F-Tat-P NPs 放入孵箱孵育 4 h。制备成细胞悬液后利用流式细胞分析仪定量分析细胞摄取情况, 上机检测前将装有待测样品的流式管避光保存在冰里。

1.5 激光共聚焦显微镜 将 2 个盖玻片分别置于 6 孔板内, 加入约 3×10^4 个 MDA-MB-231 细胞或 A549 细胞于每个盖玻片上, 放入孵箱培养 24 h 后吸去盖玻片上的培养液, 加入 2 ~ 3 mL PBS 缓冲液重复漂洗 2 ~ 3 遍, 以去掉细胞代谢产物和死细胞; 再加入 H-F-Tat-P NPs 放入孵箱孵育 4 h。细胞固定及染色后将盖玻片覆于载玻片上, 激光共聚焦显微镜下观察细胞摄取情况。

2 结 果

2.1 流式细胞分析仪定量分析细胞对载药纳米粒的摄取情况 分别用 H-F-P NPs、H-Tat-P NPs 及 H-F-Tat-P NPs 作用于 MDA-MB-231 细胞和 A549 细胞, 孵育 4 h 后, 利用流式细胞分析仪定量分析细胞对载药纳米粒的摄取情况, 结果发现叶酸受体表达阳性的 MDA-MB-231 细胞摄取 H-F-P NPs 及 H-F-Tat-P NPs 的量明显多于叶酸受体表达阴性的 A549 细胞, 而 MDA-MB-231 细胞与 A549 细胞对 H-Tat-P NPs 的摄取量基本一致 (图 1), 叶酸受体表达阴性的 A549 细胞摄取 H-F-Tat-P NPs 及 H-Tat-P NPs 的量多于 H-F-P NPs (图 1b), 因此推测叶酸受体介导的胞吞作用及 Tat 介导的穿膜作用能够促进细胞对纳米粒的摄取, 而 Tat 介导的穿膜作用可能与细胞种类无关。

2.2 激光共聚焦显微镜定性分析细胞对载药纳米粒的摄取情况 用 H-F-Tat-P NPs 分别作用于 MDA-MB-231 细胞和 A549 细胞, 孵育 4 h 后, 利用激光共聚焦显微镜定性分析细胞对载药纳米粒的摄

取情况,结果发现 MDA-MB-231 细胞内绿色荧光强度强于 A549 细胞(图 2),推测叶酸受体介导的胞吞

作用能够促进细胞对纳米粒的摄取。

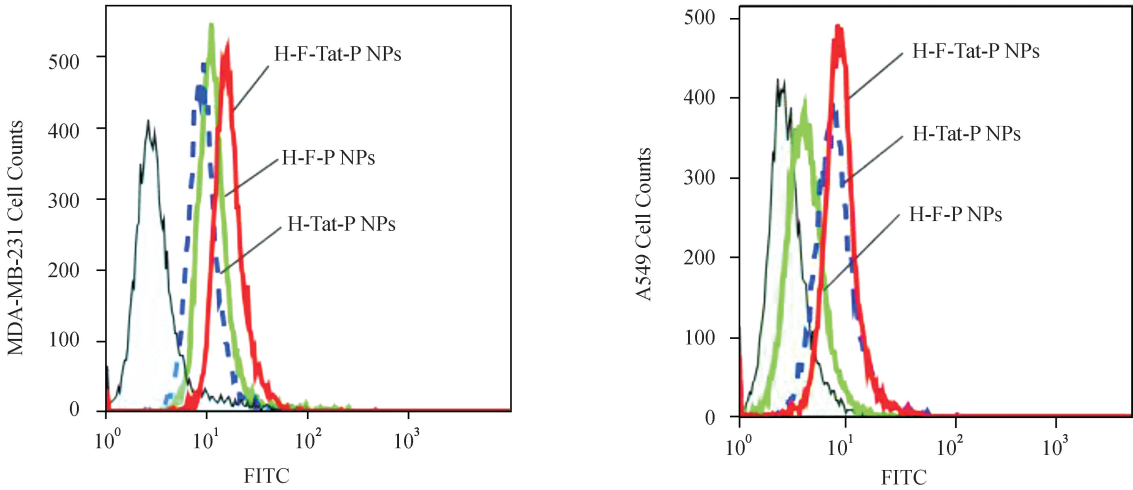


图 1 用 H-F-P NPs 、H-Tat-P NPs 及 H-F-Tat-P NPs 作用于 MDA-MB-231 细胞和 A549 细胞 4 h 后的流式细胞图

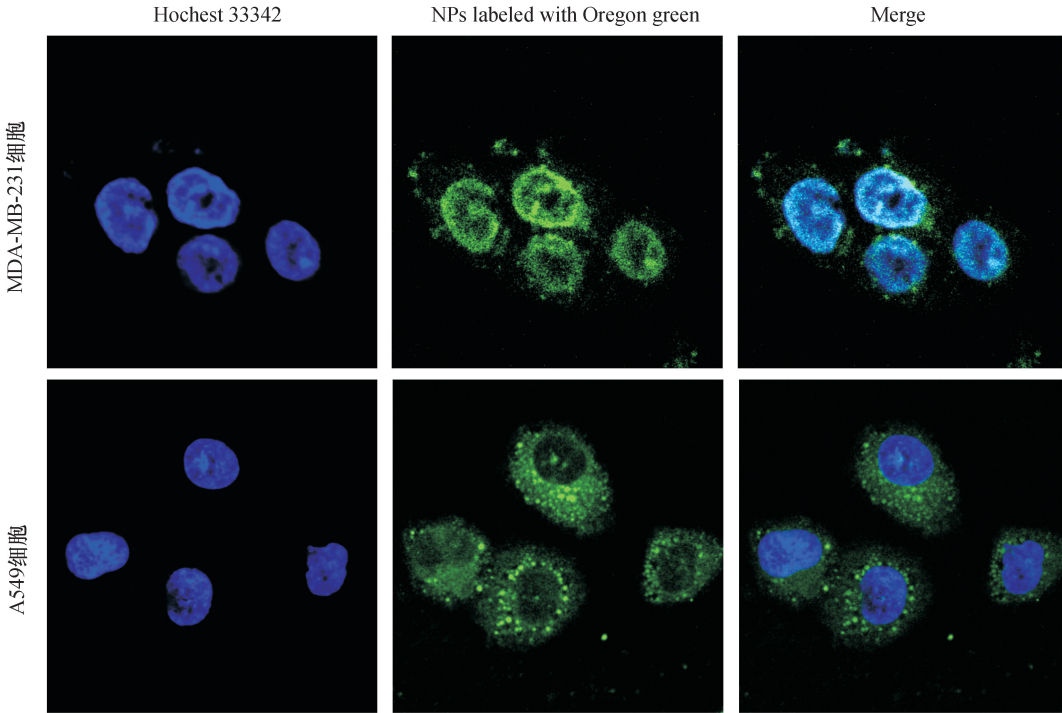


图 2 用 H-F-Tat-P NPs 分别作用于 MDA-MB-231 细胞和 A549 细胞,孵育 4 h 后的激光共聚焦图(60 ×) 左边为 Hoechst33342 蓝色荧光标记的细胞核;中间为 Oregon green488 绿色荧光标记的 H-F-Tat-P NPs;右边为两者的合并

3 讨 论

本研究选用叶酸受体表达阳性的乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和叶酸受体表达阴性的肺癌细胞 A549 来评估负载紫杉醇的双配体纳米药物输送系

统(FITC 标记纳米粒)的生物性能。结果显示叶酸紫杉醇纳米粒组及双配体紫杉醇纳米粒组 MDA-MB-231 细胞内荧光强度明显强于 A549 细胞,提示叶酸受体介导的胞吞作用可能促进细胞对纳米粒的摄取。两种细胞对 Tat 紫杉醇纳米粒的摄取量基本

一致,提示 Tat 的穿膜作用可能与细胞种类无关。双配体紫杉醇纳米粒组与叶酸紫杉醇纳米粒组、Tat 紫杉醇纳米粒组对比,MDA-MB-231 细胞内绿色荧光强度明显增强,说明叶酸与 Tat 可能起协同作用。A549 细胞在 Tat 紫杉醇纳米粒组及双配体紫杉醇纳米粒组细胞内荧光强度并无明显区别,且均强于叶酸紫杉醇纳米粒组,提示 Tat 可能促进细胞对纳米粒的摄取。

本研究用 Oregon green 绿色荧光标记纳米粒, Hoechst33342 蓝色荧光标记细胞核,进一步运用激光共聚焦显微镜来观察肿瘤细胞对纳米粒的摄取情况。用双配体紫杉醇纳米粒作用于叶酸受体阳性表达的 MDA-MB-231 细胞和叶酸受体阴性表达的 A549 细胞,结果显示 MDA-MB-231 细胞内绿色荧光强度强于 A549 细胞,推测叶酸可能促进纳米粒进入肿瘤细胞内。

叶酸和穿膜肽共同修饰的纳米药物输送体系,能够协同促进肿瘤细胞对载药纳米粒的摄取,提高肿瘤细胞内药物浓度,从而有效抑制肿瘤细胞生长,其抑瘤效果优于单配体修饰的纳米药物输送系统,这为进一步体内实验打下基础。

参考文献:

- [1] Dietz GP, Bahr M. Delivery of bioactive molecules into the cell :the Trojan horse approach [J]. Mol Cell Neurosci, 2004,27(2):85-131.
- [2] Cheng CJ, Saltzman WM. Enhanced siRNA delivery into

cells by exploiting the synergy between targeting ligands and cell-penetrating peptides[J]. Biomaterials, 2011,32: 6194-6203.

- [3] Zhao P, Wang H, Yu M, et al. Paclitaxel-loaded, folic - acid- targeted and TAT -peptide-conjugated polymeric liposomes;in vitro and in vivo evaluation [J]. PharmRes, 2010,27(9):1914-1926.
- [4] Steichen SD, Caldorera-Moore M, Peppas NA. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics [J]. Eur J Pharm Sci, 2012, 48 (3):416-427.
- [5] Ross JF, Chaudhuri PK, Ratnam M. Differential regulation of folate receptor isoforms in normal and malignant tissues in vivo and in established cell lines[J]. Physiologic and Clinical Implications, 1994,73(9):2432-2443.
- [6] Ak G, Sanlter SH. Synthesis of folate receptor-targeted and Doxorubicin-coupled chemotherapeutic nanoconjugate and research into its medical applications[J]. Prep Biochem Biotechnol, 2012,42(6):551-563.
- [7] Dhawan D, Ramos-Vara JA, Naughton JF, et al. Targeting folate receptors to treat invasive urinary bladder cancer [J]. Cancer Res, 2013,73(2):875-884.
- [8] Wang Y, Newell BB, Irudayaraj J. Folic acid protected silver nanocarriers for targeted drug delivery[J]. J Biomed Nanotechnol, 2012,8(5):751-759.
- [9] 张霞,王冬晓,李颖嘉,等. 负载紫杉醇的双配体纳米药物输送系统的制备[J]. 数理医药学杂志, 2013,4 (26):450-453.

(此文编辑:朱雯霞)