

文章编号:1673-0062(2018)02-0013-06

果胶阿霉素大分子前药纳米传递体系的 体外抗肿瘤作用评价

李志平¹, 陈波¹, 蒋明超¹, 龚娟¹, 杨飒¹, 谭翔文¹, 喻翠云^{1,2*}

(1. 南华大学 湖南省分子靶标新药研究协同创新中心, 湖南 衡阳 421001;
2. 南华大学 药物药理研究所, 湖南 衡阳 421001)

摘要: 研究果胶阿霉素大分子前药纳米传递体系(PDC-M)的体外抗肿瘤效果与体内药代动力学. 用马尔文纳米粒度仪检测了 PDC-M 在血清中的稳定性, 采用溴化四唑蓝比色法(MTT 法)评价 PDC-M 对 SMMC7721 人肝癌细胞株的体外抗肿瘤作用, 采用倒置荧光显微镜观察细胞对药物的摄取过程, 采用细胞划痕法和 Transwell 法分别检测 PDC-M 对 SMMC7721 肝癌细胞迁移能力和侵袭能力的影响. 结果表明 24 h 内 PDC-M 在血清中有较好的稳定性; PDC-M 对 SMMC7721 肝癌细胞的增殖具有明显抑制作用, 呈剂量依赖性和时间依赖性, 并有一定缓释效果; 果胶上的半乳糖可以通过与去唾液酸糖蛋白受体的特异性相互作用来实现主动靶向的作用; PDC-M 能够抑制 SMMC7721 肝癌细胞的迁移和侵袭.

关键词: 药物传递; 果胶阿霉素大分子前药; 体外抗肿瘤效果; 肝癌

中图分类号: R94 **文献标志码:** A

In Vitro Performance Evaluation of PDC Macromolecular Pro-drug Based Nanoparticles Delivery System

LI Zhi-ping¹, CHEN Bo¹, JIANG Ming-chao¹, GONG Juan¹,
YANG Sa¹, TAN Xiang-wen¹, YU Cui-yun^{1,2*}

(1. Hunan Province Cooperative Innovation Center for Molecular Target New Drug Study, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. Institute of Pharmacy and Pharmacology, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: This study reported the evaluation of *in vitro* anti proliferative effect of PDC mac-

收稿日期: 2018-02-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81471177); 湖南省杰出青年基金项目(2017JJ1024); 南华大学抗肿瘤药物创新团队项目(NHCXTD05)

作者简介: 李志平(1992-), 男, 硕士研究生, 主要从事抗肿瘤药物传递系统的研究. E-mail: 653692478@qq.com.

* 通讯作者: 喻翠云, E-mail: yucuiyunusc@hotmail.com

romolecular pro-drug (PDC-M). The physical stability of PDC-M in the serum was monitored by a Zetasizer nanoparticle analyser for 24 h in terms of the mean size. The results have demonstrated that the PDC-M has good stability in serum. Anti proliferative effect of PDC-M in SMMC7721 cells was determined by MTT assay. The results demonstrated that PDC-M have greater properties of delayed and slow release as compared to free doxorubicin (DOX). The cellular uptake of PDC-M into SMMC7721 cells was investigated qualitatively by fluorescence microscopy. It suggested that the cellular uptake of galactosylated nanomedicine was mediated by the asialoglycoprotein receptor (ASGP-R). Cell wound healing test and transwell method were carried out to detect migration and invasion in SMMC7721 cells. The results showed that PDC-M remarkably inhibited migration and invasion of SMMC7721 cells. The obtained data suggested that PDC-M is a very promising drug delivery system for hepatocellular carcinoma treatment.

key words: drug delivery; PDC-M; in vitro performance evaluation; liver cancer

0 引言

癌症是一个主要的公共卫生问题,也是全球死亡的主要原因之一^[1]. 到目前为止,化疗仍然是治疗的主要治疗方式. 阿霉素(doxorubicin, DOX)曾被FDA认为是最强大的抗癌药物之一. 因其抗癌谱广^[2],治疗效果好,而被广泛使用在肿瘤学^[3-4]. 但是阿霉素在达到抗肿瘤效果的同时也产生了严重的心脏毒性^[5-6]. 近年来,为减少阿霉素的毒副作用,研究人员致力于天然的聚合物纳米粒子的研究,因其具有良好的生物相容性,无毒,生物可降解性和可调节的控制释放特性^[7-10]. 目前肝靶向系统的研究分为被动靶向法和主动靶向法^[11]. DOX的被动靶向可借助纳米给药体系包封DOX,通过肿瘤高通透性和滞留效应(enhanced permeability and retention, EPR)实现,而主动靶向则可通过在纳米给药体系的表面接枝配体,和肿瘤细胞中高表达的受体特异性结合而实现^[12]. 肝细胞表面的去唾液酸糖蛋白受体(asialoglycoprotein receptor, ASGP-R),可特异识别半乳糖残基而将其内吞清除^[13-14]. 近年来,它作为肝主动靶向的有效靶点受到了广泛研究. 果胶是应用最广泛的天然多糖之一,其带有大量的半乳糖残基,而半乳糖可以与ASGP-R结合,从而实现主动靶向肝实质细胞的作用^[15-17]. 果胶结构中富含诸多活性基团如-OH、-COOH等^[18],具有高度亲水性,容易与疏水性DOX形成两亲性胶束.

在我们前期研究中,已经通过酰胺缩合反应将果胶耦合到阿霉素上,成功制备果胶-阿霉素大分子分子前药纳米传递体系(pectin-doxorubicin

conjugates macromolecular pro-drug, PDC-M),证实了果胶基纳米载体本身生物相容性好,能够有效地降低药物的毒副作用,具有一定的缓释性能和良好的细胞相容性和低毒性,具有较好的抗癌效果^[19]. 在本实验中,我们将研究PDC-M纳米传递体系在血清中的稳定性,对SMMC7721人肝癌细胞株的抗肿瘤活性,细胞摄取过程,以及迁移能力和侵袭能力的影响.

1 试剂与仪器

盐酸阿霉素(湖北银河化工有限公司),果胶(美国Sigma公司),MTT(美国Amresco公司),DMEM培养基和RPIM1640培养基(美国Gibco公司),Matrigel(美国BD公司),胎牛血清(FBS,美国Gibco公司),SMMC7721肝癌细胞购于中科院上海生命科学研究院,其余试剂均为分析纯.

纳米粒度及Zeta电位分析仪(ZS90,英国Malvern公司),酶联免疫检测仪(Elx-800型, Bio-Tek公司),倒置荧光显微镜(日本Olympus公司),Transwell侵袭小室(8.0 μm孔径PC膜,美国Corning公司).

2 实验方法

2.1 PDC-M在血清中的稳定性

PDC-M在血清中的稳定性试验在含有血清的溶液中进行. 取新鲜制备分离的PDC-M纳米传递体系,重悬于体积比为10%胎牛血清的磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer solution, PBS)溶液中; 37℃孵育12h,分别在第1、2、4、24h取样,用马尔文粒度仪测定纳米粒粒径大小. 分别测得每组纳米传递体系在不同时间段粒径大小,汇总并分

析实验结果。

2.2 PDC-M 对肿瘤细胞抑制率的影响

将 SMMC7721 肝癌细胞制成细胞悬液接种于 96 孔细胞培养板中, 细胞密度约为 5×10^3 个/孔, 置于体积比为 5% CO_2 、37 °C 细胞培养箱。培养 24 h 后吸除旧培养液, 分别加入最终浓度为 1.9、3.8、7.6、15.2、30.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 DOX 与 PDC-M 纳米传递体系子的培养液, 未加药物的为空白对照组, 每组设 3 个复孔。分别培养至 24 h, 48 h 和 72 h 后, 每孔加入 MTT 溶液 (5 g/L) 20 μL , 继续培养 4 h 后, 吸除孔内液体, 每孔加入 150 μL 二甲基亚砷 (DMSO), 取出 96 孔细胞培养板震荡 10 min, 使结晶物充分溶解后用酶标仪检测每孔于波长 570 nm 的光吸收值 (OD 值), 按公式计算每组浓度抑制率: 抑制率% = (对照组 OD 值 - 给药组 OD 值) / 对照组 OD 值 \times 100%, 并用 Graph Pad 软件分析数据计算 IC_{50} 值。

2.3 荧光显微镜下观察肝癌细胞对 PDC-M 的摄取过程

将 SMMC7721 肝癌细胞制成细胞悬液接种于 6 孔细胞培养板中, 细胞密度约为 4×10^4 个/孔, 培养基 2 mL/孔, 置于体积比为 5% CO_2 、37 °C 细胞培养箱。贴壁 24 h 后, 弃掉培养基, PBS 清洗 1 次, 滴加培养基 (1 mL/孔), 按照 DOX 浓度 0.01 g/L 避光条件下加入 DOX 于 PDC-M, 于培养箱内避光培养 2 h。细胞分为 4 组: 1) DOX 组 (加入游离 DOX); 2) DOX+galactose 组 (加入游离 DOX 与半乳糖); 3) PDC-M 组 (加入 PDC-M); 4) PDC-M+galactose 组 (加入 PDC-M 与半乳糖)。达到预定作用时间后, 小心除去上清液, 再次 PBS 冲洗 3 次。随后, 在室温下用 4% 多聚甲醛固定细胞 10 min, 用 PBS 洗涤两次。然后用 DAPI 来染细胞核 10 min 后, 用 PBS 洗涤两次。然后于倒置荧光显微镜下观察并记录药物进入细胞内的情况, 用 Image J 软件分析数据。

2.4 细胞划痕实验

用记号笔在 6 孔细胞培养板板底均匀的划横线, 每孔划 1 条横线。将细胞密度为 5×10^5 个/孔的细胞铺于 6 孔板上, 每孔加入 1 mL 含 10% 胎牛血清的培养液中培养细胞使形成单层细胞。第二天用 20 μL Tip 头在单层细胞上快速横线划痕, 枪头要垂直, 不能倾斜。划痕后用 PBS 清洗细胞 3 次, 去除划下的细胞。分为三组: 1) PBS 组、2)

DOX 组、3) PDC-M 组。加入 3 组药物培养。按 0 h、24 h 拍照并测量记录。

2.5 细胞侵袭实验

将 Matrigel (冻存于 -20 °C 冰箱) 放到 4 °C 过夜, 使其变成液态; 用预冷的 Tip 头、移液管, 将按体积比液态的 Matrigel 用 4 °C 的无血清培养基按体积比 1 : 8 稀释, 混匀。在 Transwell 上室均匀铺 40 μL 稀释的 Matrigel, 放入细胞培养箱中, 孵育 2 h 后用培养基 (无血清) 轻洗薄层凝胶。在 Transwell 下室中加入 500 μL 含有 10% 小牛血清的 RPMI-1640 液, 上室每孔加入 100 μL 用无血清培养基 (含 0.1% BSA) 配成的 SMMC7721 细胞悬液 (1×10^6 个/mL), 分为三组: 1) PBS 组、2) DOX 组、3) PDC-M 组。加入 3 组药物培养, 放置于配套的 24 孔板上将 Transwell 放置于培养箱中, 培养 24 h 后取出 Transwell, 用棉签轻轻擦尽上室面的 Matrigel 和非侵袭细胞, 下室面用 4% 多聚甲醛固定 15 min。风干后与 1% 结晶紫溶液染色 15 min, PBS 洗 2 遍。晾干, 将小室正置于载玻片上, 在倒置显微镜下观察。随机取 5 个高倍镜视野, 照相、计数。计数小室下室面的细胞数即反映肿瘤细胞迁移能力的高低, 取平均数作为实验结果。

2.6 数据分析

实验中测得数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 并用 T 检测; $P < 0.05$ 提示差异有统计学意义, $P < 0.01$ 提示有显著性差异。

3 实验结果和讨论

3.1 PDC-M 在血清中的稳定性

PDC-M 纳米传递体系在血清中随时间的稳定性情况如表 1 所示, 可得出, 在 24 h 内, 纳米传递体系在血清中粒径大小没有明显改变, 均在 100 nm 左右。显示 PDC-M 纳米传递体系在血清中是稳定的, 提示 PDC-M 经静脉注射进入体内后也是稳定的, 不会引起颗粒聚集或解聚而影响活性。

3.2 PDC-M 对肿瘤细胞抑制率的影响

MTT 试验的结果如图 1 所示, 在所考察的各质量浓度与培养时间下, DOX 与 PDC-M 对 SMMC7721 肝癌细胞产生的抑制, 随着药物质量浓度增加, 培养时间延长, 药物对癌细胞的抑制率逐渐提高, 细胞存活率呈下降趋势。

表1 PDC-M在血清中的稳定性

Table 1 Mean size changes of PDC-M in serum

时间/h	0.5	1	2	4	24
粒径/nm	150.51±5.02	151.72±5.24	149.80±3.35	150.44±0.25	153.93±2.30

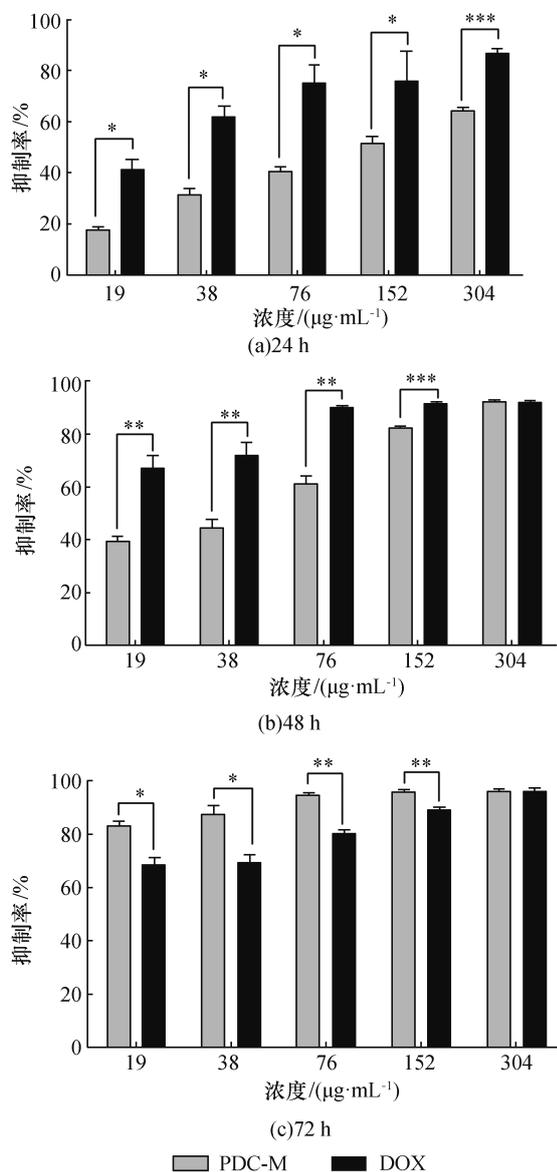


图1 DOX与PDC-M对SMMC7721肝癌细胞的抑制率

Fig.1 *In vitro* cell inhibition of free DOX and PDC-M in SMMC7721 cells

在24 h与48 h, PDC-M在各个质量浓度,对SMMC7721肝癌细胞株的生长抑制作用基本都低于DOX,且绝大多数具有统计学显著性或极显著性差异($P < 0.05$ 或 0.01).而在72 h, PDC-M在各个质量浓度,对SMMC7721肝癌细胞株的生长抑制作用都高于DOX.这意味着PDC-M的副作用

DOX小,也从侧面说明了PDC-M具有缓释效果.从表2可以看出,在24 h与48 h, PDC-M对SMMC7721肝癌细胞作用后的 IC_{50} 值都大于DOX,而在72 h时与DOX没有差异.这可能说是因为PDC-M具有缓释效果. PDC-M对SMMC7721肝癌细胞抑制率的逐渐提高可归因于果胶的半乳糖酸可与ASGP-R特异性结合.

表2 DOX与PDC-M对SMMC7721细胞作用后的 IC_{50} 值Table 2 IC_{50} of free DOX and PDC-M on SMMC7721 cells

Drug	$IC_{50}/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$		
	24 h	48 h	72 h
DOX	24.5±0.39	8.1±0.11	6.7±0.13
PDC-M	129.7±0.50	33.2±0.30	7.7±0.07

3.3 荧光显微镜下观察SMMC7721肝癌细胞对PDC-M的摄取过程

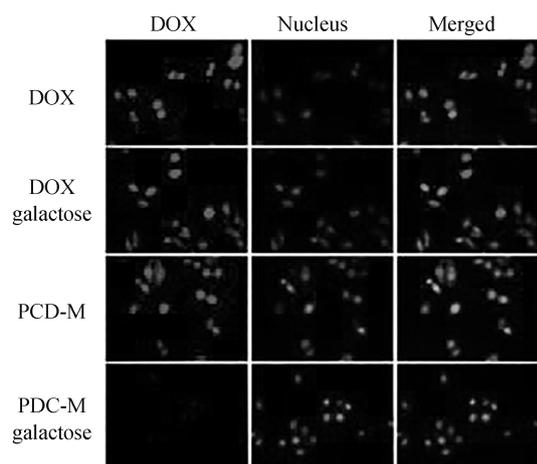
通过荧光显微镜拍照研究SMMC7721肝癌细胞对DOX, PDC-M的摄取程度.为了研究半乳糖在PDC-M的细胞摄取中的重要作用,我们选择半乳糖作为竞争试剂进行受体竞争结合测定.如图2所示,当同时加入PDC-M和半乳糖时, SMMC7721肝癌细胞的荧光强度显著降低, PDC-M组的荧光强度是PDC-M+galactose组的3倍.而半乳糖的存在几乎不影响SMMC7721肝癌细胞对DOX的摄取.与我们的假设一致,半乳糖可以通过与ASGP-R的特异性相互作用来增强纳米药物的内吞作用.

3.4 PDC-M对肿瘤细胞的迁移能力和侵袭能力的影响

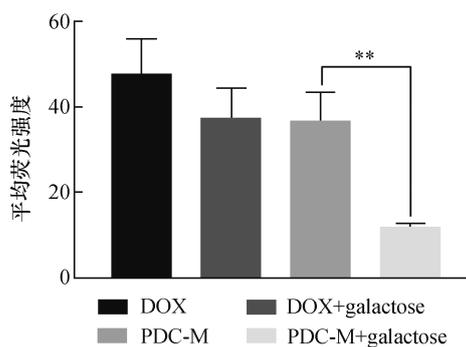
如图3所示,与control组相比,DOX、PDC-M都能在一定程度上抑制肿瘤细胞的迁移. PDC-M对SMMC7721肝癌细胞的迁移抑制显著高于DOX.实验充分验证了PDC-M纳米体系能显著抑制肿瘤细胞的迁移.

如图4所示,与control组相比,DOX与PDC-M都能一定程度地抑制SMMC7721肝癌细胞的侵袭. PDC-M对SMMC7721肝癌细胞的侵袭

抑制与游离药物相差无几。

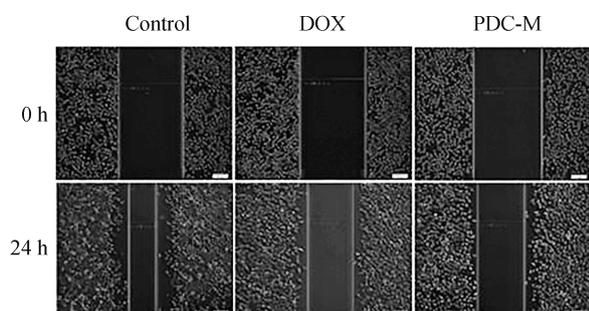


(a) 荧光显微镜拍照

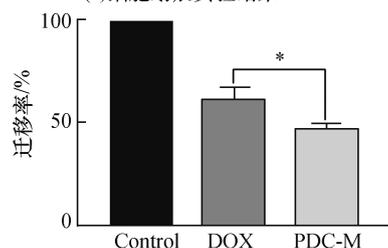


(b) Image J 软件分析荧光强度

图 2 SMMC7721 肝癌细胞对 PDC-M 的摄取过程
Fig.2 Cellular uptake of PDC-M by SMMC7721 cells

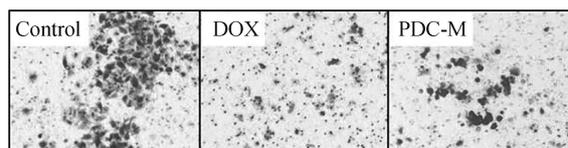


(a) 细胞划痕实验结果

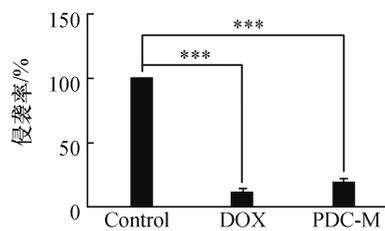


(b) 细胞迁移率

图 3 PDC-M 对肿瘤细胞迁移能力的影响
Fig.3 The wound healing images and quantitative analysis



(a) Transwell 试验结果



(b) 细胞侵袭率

图 4 PDC-M 对肿瘤细胞侵袭能力的影响

Fig.4 Microscopy images of invasion and quantitative analysis

4 结 论

近年来, ASGPR 介导靶向是肝靶向药物传递系统研究的热点. 本实验中 PDC-M 在血清中有较好的稳定性; 对 SMMC7721 肝癌细胞的增殖具有明显抑制作用; 能够抑制 SMMC7721 肝癌细胞的迁移和侵袭; 并且能通过半乳糖残基与 ASGP-R 的特异性相互作用来实现主动靶向的作用。

参考文献:

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2017 [J]. CA: a cancer journal for clinicians, 2017, 67 (1): 7-30.
- [2] EFFERTH T, KONKIMALLA V B, WANG Y F, et al. Prediction of broad spectrum resistance of tumors towards anticancer drugs [J]. Clinical cancer research, 2008, 14 (8): 2405-2412.
- [3] GOU P F, LIU W W, MAO W W, et al. Self-assembling doxorubicin prodrug forming nanoparticles for cancer chemotherapy: synthesis and anticancer study in vitro and in vivo [J]. Journal of materials chemistry B, 2012 (3): 284-292.
- [4] TIAN Y, JIANG X, CHEN X, et al. Doxorubicin-loaded magnetic silk fibroin nanoparticles for targeted therapy of multidrug-resistant cancer [J]. Advanced materials, 2014, 26(43): 7393-7398.
- [5] TAN M L, CHOONG P F, DASS C R. Review: doxorubicin delivery systems based on chitosan for cancer therapy [J]. Journal of pharmacy and pharmacology, 2009, 61 (2): 131-142.
- [6] HUANG L, TAO K, LIU J, et al. Design and fabrication of

- multifunctional sericin nanoparticles for tumor targeting and pH-responsive subcellular delivery of cancer chemotherapy drugs [J]. *ACS applied materials & interfaces*, 2016, 8(10): 6577-6585.
- [7] OH J K, SIEGWART D J, LEE HI, et al. Biodegradable nanogels prepared by atom transfer radical polymerization as potential drug delivery carriers: synthesis, biodegradation, in vitro release, and bioconjugation [J]. *Journal of the American chemical society*, 2007, 129(18): 5939-5945.
- [8] KHALIQ N U, SANDRA F C, PARK D Y, et al. Doxorubicin/heparin composite nanoparticles for caspase-activated prodrug chemotherapy [J]. *Biomaterials*, 2016, 101: 131-142.
- [9] HUANG C, LI N M, GAO P, et al. In vitro and in vivo evaluation of macromolecular prodrug GC-FUA based nanoparticle for hepatocellular carcinoma chemotherapy [J]. *Drug delivery*, 2017, 24(1): 459-466.
- [10] YU C Y, LI N M, YANG S, et al. Fabrication of galactosylated chitosan-5-fluorouracil acetic acid based nanoparticles for controlled drug delivery [J]. *Journal of applied polymer science*, 2015, 132(40): 42625.
- [11] SINGH A, ARIATTI M, SINGH M, et al. Biotin-directed assembly of targeted modular lipoplexes and their transfection of human hepatoma cells in vitro [J]. *Drug delivery*, 2010, 7(6): 426-433.
- [12] CHENG W, NIE J P, XU L, et al. A pH-sensitive delivery vehicle based on folic acid-conjugated polydopamine-modified mesoporous silica nanoparticles for targeted cancer therapy [J]. *ACS applied materials & interfaces*, 2017, 9(22): 18462-18473.
- [13] KORIN E, BEJERANO T, COHEN S. GalNAc bio-functionalization of nanoparticles assembled by electrostatic interactions improves siRNA targeting to the liver [J]. *Journal of controlled release*, 2017, 266: 310-320.
- [14] ROHILLA R, GARG T, GOYAL A K, et al. Herbal and polymeric approaches for liver-targeting drug delivery: novel strategies and their significance [J]. *Drug delivery*, 2016, 23(5): 1645-1661.
- [15] YU C Y, CAO H, ZHANG X C, et al. Hybrid nanospheres and vesicles based on pectin as drug carriers [J]. *Langmuir*, 2009, 25(19): 11720-11726.
- [16] 王彦妹, 李娜梅, 刘格莎, 等. 载药果胶基纳米粒子体外 HepG2 肝癌细胞的靶向性研究 [J]. *南华大学学报(自然科学版)*, 2013, 27(1): 69-74.
- [17] YU C Y, WANG Y M, LI N M, et al. In vitro and in vivo evaluation of pectin-based nanoparticles for hepatocellular carcinoma drug chemotherapy [J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2014, 11(2): 638-644.
- [18] MOLLEA C, CHIAMPO F, CONTI R. Extraction and characterization of pectins from cocoa husks: a preliminary study [J]. *Food chemistry*, 2008, 107(3): 1353-1356.
- [19] YU C Y, YANG S, LI Z P, et al. The in-situ one-step synthesis of a PDC macromolecular pro-drug and the fabrication of a novel core-shell micell [J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2016, 22(4): 506-513.
- (责任编辑: 扶文静)
-
- (上接第6页)
- [39] 尹萍, 江晓红, 邹敏, 等. $\text{SiO}_2/\text{Co}_3\text{O}_4$ 核壳催化剂对 AP 热分解的催化性能研究 [J]. *无机化学学报*, 2014, 30(1): 185-191.
- [40] 王萌, 付卫东, 姚亚东. $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2 @ \text{Co}_3\text{O}_4$ 三元核壳结构催化剂的制备及表征 [J]. *四川有色金属*, 2014(4): 57-59.
- [41] GONG W, MENG X, TANG X, et al. Core-Shell MnO_2 - SiO_2 nanorods for catalyzing the removal of dyes from water [J]. *Catalysts*, 2017, 7(1): 19.
- [42] VASILYEVA S V, SHTIL A A, PETROVA A S, et al. Conjugates of phosphorylated zalcitabine and lamivudine with SiO_2 nanoparticles: synthesis by CuAAC click chemistry and preliminary assessment of anti-HIV and antiproliferative activity [J]. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2017, 25(5): 1696-1702.
- [43] ZHAO X, ZHAO H, CHEN Z, et al. Preparation and characterization of methylene blue-incorporated folate-functionalized Fe_3O_4 /Mesoporous silica core/shell magnetic nanoparticles [J]. *Journal of nanoscience & nanotechnology*, 2015, 15(7): 4976-4983.
- [44] CATAURO M, PAPAIE F, BOLLINO F. Coatings of titanium substrates with $x\text{CaO} \cdot (1-x)\text{SiO}_2$ sol-gel materials: characterization, bioactivity and biocompatibility evaluation [J]. *Materials science & engineering c materials for biological applications*, 2016, 58: 846-851.
- [45] BITAR A, VEGA-CHACON J, LGOURNA Z, et al. Sub-micron silica shell-magnetic core preparation and characterization [J]. *Colloids & surfaces a physicochemical & engineering aspects*, 2017, 537: 318-324.
- (责任编辑: 龙威)