

白介素-2 靶向 5-氟尿苷棕榈酸酯脂质体的制备及细胞毒性研究

陈莹, 吴镁春, 潘黎军, 王驰* (重庆医科大学药学院, 重庆 400016)

摘要: 目的 制备了白介素-2(IL-2)靶向 5-氟尿苷棕榈酸酯(5-FURP)脂质体, 并进行了体外细胞毒性, 初步考察其对 IL-2 受体高表达的肿瘤细胞的靶向作用。方法 采用逆相蒸发法制备 5-FURP 脂质体, 通过交联剂将 IL-2 连接到脂质体的表面, 得 IL-2 靶向 5-FURP 脂质体(IL-2-5FURP-L); UV 法测定包封率; 用考马斯亮蓝结合法测定 IL-2 与脂质体的结合率; 用 MTT 法测定脂质体对 IL-2 受体高表达的皮肤 T 细胞淋巴瘤 Hut-102 细胞的生长抑制作用。结果 IL-2-5-FURP-L 的粒径为 180 nm; 药物平均包封率为 91.3%; IL-2 的结合率为 56.0%; 在 pH7.4 的释放介质中, 脂质体具有缓释作用; MTT 实验结果显示, IL-2-5-FURP-L 呈剂量依赖性抑制肿瘤细胞的生长, 72 h 细胞毒性试验表明 IL-2-5-FURP-L 对 Hut-102 的杀伤作用($IC_{50}=1.04 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)明显优于 5-FURP-L($IC_{50}=6.11 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)及 5-FURP($IC_{50}=7.35 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。结论 IL-2 修饰的载药脂质体具有明显的抑瘤作用和主动靶向作用。

关键词: 白介素-2; 5-氟尿苷棕榈酸酯; 脂质体; 主动靶向; 细胞毒性实验

中图分类号: R943.42; R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2011)09-0842-04

Preparation of 5'-Palmitoyl-5-Fluorouridine Liposomes Modified with Interleukin-2 and Its Cell Toxicity

CHEN Ying, WU Meichun, PAN Lijun, WANG Chi* (College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the specificity of interleukin-2 (IL-2) targeting liposomes (L) containing 5'-palmitoyl-5-fluorouridine (5-FURP). **METHODS** Liposomes containing 5-FURP were prepared by reverse phase evaporation method. IL-2 targeting 5-FURP-L were prepared through the effect of cross linker. The entrapment efficiency was measured by UV method. The amount of IL-2 conjugated to liposomes was determined with coomassie brilliant blue binding assay. Cytotoxicity on Hut-102 cells expressing IL-2 receptors *in vitro* was evaluated with MTT methods. **RESULTS** The mean size of the liposomes was 180 nm and the entrapment efficiency was 91.3%. The coupling efficiency of IL-2 was 56.0%. In pH 7.4 PBS, 5-FURP was released in a sustained manner from the liposomes. The MTT assay suggested that the IL-2 targeting 5-FURP-L had a distinct killing effect on Hut-102 tumor cells. **CONCLUSION** The IL-2 modified 5-FURP-L has an active targeting function and a significant anticancer effect.

KEY WORDS: interleukin-2; 5'-palmitoyl-5-fluorouridine; liposomes; active targeting; cell toxicity

白介素-2(interleukin-2, IL-2)是分子量为 1.5 万的糖蛋白, 对 T 细胞激活及生长有作用。IL-2 主要由 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞产生, 以自分泌或旁分泌方式发挥效应, 是参与免疫应答的重要细胞因子, 并参与抗肿瘤效应和移植排斥反应。IL-2 受体在许多恶性肿瘤细胞中高表达, 如成人 T 细胞白血病(ATL)、皮肤 T 细胞淋巴瘤(CTCL)、B 慢性淋巴细胞白血病、人头颈部鳞状细胞癌等^[1-3]。皮肤 T 细胞淋巴瘤细胞 Hut-102 是 ALT 细胞系, IL-2 受体在其细胞表面高表达^[4]。

本实验将 IL-2 作为配体连接在载药脂质体上, 制备出 IL-2 靶向 5-尿苷棕榈酸酯(5-FURP)脂质体^[5], 并测定该脂质体粒径、包封率、稳定性等重要性质, 以及考察了该脂质体在 IL-2 作用下抑制肿瘤

细胞生长的作用效果, 为进一步阐明 IL-2 靶向脂质体的抑瘤机制和开发出靶向递送系统药物奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

RE-52 旋转蒸发仪(上海青浦沪西仪器厂); 752 型紫外分光光度计(上海光谱仪器有限公司); Zetasizer 激光粒度分析仪(英国 Malvern 公司); KA1000 型台式离心机(上海世义精密仪器有限公司); 318MC 酶标仪(上海精密仪器仪表有限公司)。

1.2 试剂

5-FURP(自制); 蛋黄卵磷脂、胆固醇、SepharoseCL-4B(美国 Sigma 公司); IL-2(美国 Peprotech 公司); 25%戊二醛(上海生工试剂公司),

作者简介: 陈莹, 女, 硕士生 Tel: (023)68485578 E-mail: chenyinglcs@126.com
Tel: (023)68485578 E-mail: wchi639@sohu.com

*通信作者: 王驰, 男, 博士, 副教授

批号: 1664B76); 考马斯亮蓝 G-250(国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20061127); 其余试剂均为分析纯。

Hut-102 细胞株(上海天呈科技有限公司); 乳腺癌 MDA-MB-231 细胞(重庆医科大学附属一院实验研究中心); 胎牛血清及 RPM1640 培养基(美国 Gibco 公司); 小牛血清(杭州四季青公司)。

2 方法与结果

2.1 IL-2 靶向 5-FURP 脂质体的制备

采用逆相蒸发法^[6]制备 5-FURP 脂质体。将卵磷脂与胆固醇按 3:1 的比例溶于适量的氯仿中, 转移至圆底烧瓶中 45 °C 减压旋转蒸发至瓶壁上形成一层脂质薄膜。将 5-FURP 溶于一定量的氯仿中, 加入圆底烧瓶中, 再滴加入磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)形成两相体系。水浴超声 5 min 得 W/O 型乳剂, 45 °C 旋转减压蒸发除去氯仿, 达到胶态后, 加入 5 mL PBS 缓冲液继续旋转 30 min, 放置 2 h 使其充分水化, 过 0.22 μm 的聚碳酸酯微孔滤膜, 制得包裹了 5-FURP 的脂质体溶液。

将制备好的 5-FURP 脂质体^[7]1.0 mL 加入 25% 的戊二醛 20 μL 后室温静置 2 h, 过量的戊二醛经透析去除, 透析时间 2 h, 中途换液两次, 然后加入 1 mL 0.1 mg·mL⁻¹ 的 IL-2 溶液, 4 °C 放置 24 h。过琼脂糖凝胶 Sepharose CL-4B 柱, 分离游离药物和未结合上的 IL-2, 收集脂质体部分, 得 IL-2 靶向 5-FURP 脂质体, 置于 4 °C 冰箱保存。

2.2 IL-2 靶向 5-FURP 脂质体的表征

2.2.1 IL-2 靶向 5-FURP 脂质体的粒径分布 取少量 IL-2 靶向 5-FURP 脂质体的混悬液, 用 PBS 缓冲液适当稀释, 在激光粒度分析仪上测定该脂质体的粒径分布, 粒度分析结果见图 1。结果表明, 脂质体粒径主要分布在 160~220 nm, 平均粒径在 180 nm。

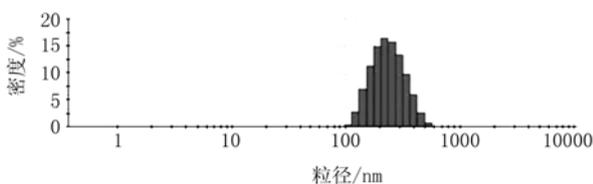


图 1 IL-2 靶向 5-FURP 脂质体的粒径分布

Fig 1 The size distribution histogram of IL-2 targeting 5-FURP-L

2.2.2 IL-2 靶向 5-FURP 脂质体的包封率的测定

采用 Sepharose CL-4B 凝胶柱分离 IL-2 靶向 5-FURP 脂质体混悬液中的脂质体和游离药物及未连接上的 IL-2, 用 PBS 洗脱, 脂质体先流出, 药物后流出, 再用紫外分光光度法(UV)测定游离药物浓度, 由以下公式计算包封率, 所得平均包封率为 91.3%。包封率(%)=(药物总含量-游离药物含量)/药物总含量×100%

2.2.3 IL-2 靶向 5-FURP 脂质体的稳定性考察

将 IL-2 靶向 5-FURP 脂质体分别于 4 °C 和 25 °C 条件下充氮气密闭保存, 以脂质体上 IL-2 的含量变化为指标考察 IL-2 的稳定性, 以药物包封率变化为指标考察脂质体的稳定性, 结果见表 1 和表 2。结果表明将 IL-2 靶向 5-FURP 脂质体保存在 4 °C, 30 d 内包封率无明显变化, 脂质体上 IL-2 含量变化也较小。25 °C 时, 药物包封率明显下降, 脂质体上 IL-2 含量显著降低, 说明温度对脂质体上的 IL-2 及脂质体的稳定性影响较大, 应低温保存。

表 1 脂质体上 IL-2 含量的变化

Tab 1 Content changes of IL-2 at different temperatures

温度/°C	含量/μg·mL ⁻¹							
	0 d	1 d	2 d	4 d	8 d	12 d	20 d	30 d
4	36.0	35.9	35.9	35.8	35.7	35.4	35.3	35.2
25	36.0	35.8	35.4	35.2	34.8	34.4	33.9	33.1

表 2 IL-2 靶向 5-FURP 脂质体包封率的变化

Tab 2 Entrapment efficiency changes of IL-2 targeting 5-FURP liposome at different temperatures

温度/°C	包封率/%							
	0 d	1 d	2 d	4 d	8 d	12 d	20 d	30 d
4	91.3	91.2	91.1	91.0	90.8	90.7	90.5	90.4
25	91.3	91.0	90.0	89.6	88.2	87.1	85.5	83.0

2.3 IL-2 靶向 5-FURP 脂质体的体外释放行为

精密吸取一定量的 5-FURP, 5-FURP 脂质体(含主药 1.0 mg)和 IL-2 靶向 5-FURP 脂质体(含主药 1.0 mg), 分别装入透析袋中, 放入盛有 100 mL PBS(pH 7.4)缓冲液的杯中, 37 °C 水浴中恒速(100 r·min⁻¹)磁力搅拌, 定时取外液 0.5 mL, 同时补充等量的 PBS 缓冲液。用 UV 法测定 PBS 缓冲液中的药物含量, 计算累计释放度, 绘制释放曲线见图 2。结果表明, 游离药物在 8 h 释放完全, 而两种脂质体释药较慢, 都在 48 h 后药物释放完全, 具有明显的缓释效应。同时可知在 PBS(pH 7.4)缓冲液中有无配体的载药脂质体都比较稳定, 而

且 5-FURP 脂质体与 IL-2 靶向 5-FURP 脂质体之间释放量没有明显差别。

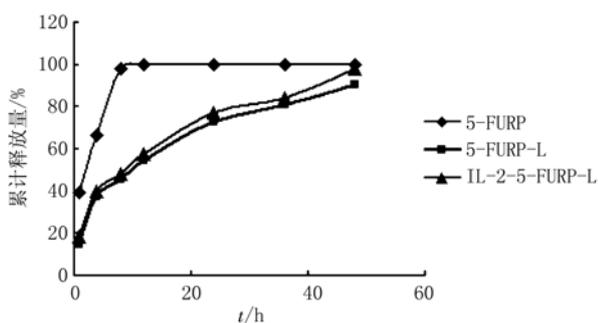


图 2 5-FURP, 5-FURP-L, IL-2 targeting 5-FURP-L 的平均累积释药量曲线

Fig 2 The release curve of 5-FURP, 5-FURP-L and IL-2 targeting 5-FURP-L

2.4 IL-2 与脂质体结合率的测定

将脂质体与 IL-2 分别按比例 1:1、1:0.5 和 1:0.25 进行反应, 经 Sepharose CL-4B 过柱分离游离 IL-2, 以 1:1 的比例加入破乳剂甲醇, 再通过考马斯亮蓝结合法检测脂质体上 IL-2 的含量, 结果见表 3。结果表明, 在三种比例的脂质体和 IL-2 中, IL-2 与脂质体以 1:1 比例反应, IL-2 的结合率最高, 故本实验中按比例 1:1 进行反应。

表 3 IL-2 含量测定结果(n=4)

Tab 3 Contents of IL-2 in IL-2 targeting 5-FURP liposome (n=4)

脂质体: IL-2	IL-2 含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	RSD/%
1:1	36.00	3.05
1:0.5	18.00	2.50
1:0.25	10.00	2.91

2.5 细胞毒性实验

2.5.1 细胞培养 皮肤 T 细胞淋巴瘤 Hut-102 细胞接种于含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液中, 37℃, 5%CO₂ 条件下传代培养。

2.5.2 体外细胞毒性实验 采用 MTT 法测定。取对数生长期单层培养细胞, 消化后计数, 按每孔 3×10^4 个接种于 96 孔培养板, 用不同浓度的药物处理细胞 72 h。然后每孔加入 $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ MTT $20 \mu\text{L}$, 在 37℃、5% CO₂、饱和湿度的条件下继续培养 4 h。终止培养, 小心吸除孔内上清液, 加入 DMSO 溶液 $100 \mu\text{L}$, 混匀后用酶标仪测定 570 nm 处吸收度(A), 所有样品进行复孔检测, 均

值为检测终水平。以未经药物处理过的细胞液作为阴性对照组, 细胞抑制率(%)=(1-实验组 A 值/对照组 A 值), 并且计算 IC₅₀ 值。24, 48 和 72 h 的细胞毒性实验结果分别见图 3、图 4 和图 5。结果表明, 在不同时间内, IL-2 靶向 5-FURP 脂质体对细胞 Hut-102 的生长抑制作用都显著优于 5-FURP 及 5-FURP 脂质体。同种药物浓度在同一作用时间, 对 Hut-102 细胞的抑制作用明显优于不表达 IL-2 受体的 MDA-MB-231 乳腺癌细胞。

对两种肿瘤细胞而言, 72 h 时细胞生长抑制作用都低于 24 h 及 48 h 的效果, 说明该体系对细胞的生长抑制作用不呈现时间依赖。而几种药物对细胞 Hut-102 的抑制作用随浓度增大呈增高的趋势, 说明该体系对细胞的生长抑制作用呈浓度依赖型。

72 h 药物浓度为 $15.00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, IL-2 靶向 5-FURP 脂质体对 Hut-102 细胞的杀伤作用(IC₅₀= $1.04 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)明显优于 5-FURP 脂质体(IC₅₀= $6.11 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)及 5-FURP(IC₅₀= $7.35 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 而 IL-2 靶向 5-FURP 脂质体对 MDA-MB-231 细胞的生长抑制作用(IC₅₀= $4.64 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)与 5-FURP 脂质体(IC₅₀= $4.73 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)无显著区别。

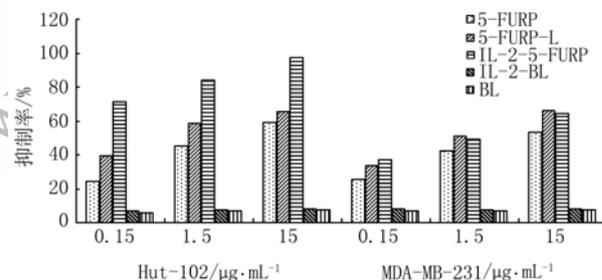


图 3 几种药物浓度对不同细胞株的抑制率(24 h)

Fig 3 Inhibition rate of different drug concentrations on cells (24 h)

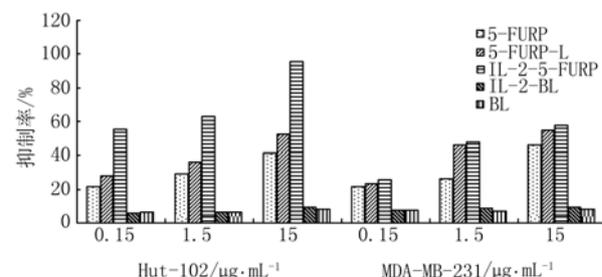


图 4 几种药物浓度对不同细胞株的抑制率(48 h)

Fig 4 Inhibition rate of different drug concentrations on cells (48 h)

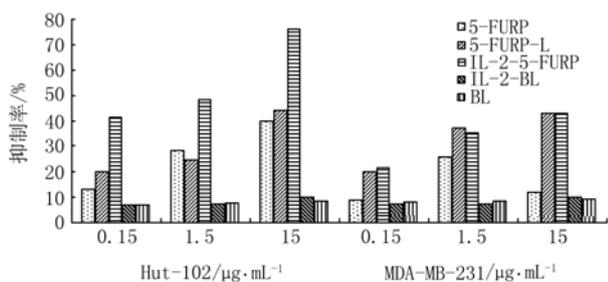


图5 几种药物浓度对不同细胞株的抑制率(72 h)

Fig 5 Inhibition rate of different drug concentrations on cells (72 h)

3 讨论

本实验采用逆相蒸发法制备了 5-FURP 脂质体,并用交联剂把 IL-2 连接到脂质体的表面。IL-2 靶向 5-FURP 脂质体的平均粒径约为 180 nm,药物的平均包封率为 91.3%,IL-2 与脂质体的结合率为 56.0%。体外释放结果表明,将药物包裹在脂质体中,具有明显的缓释效应。

5-FURP 脂质体对 Hut-102 细胞和 MDA-MB-231 细胞的生长抑制作用都优于游离 5-FURP,因为脂质体是一种定向药物载体,通过修饰可以实现缓释和靶向作用。脂质体与细胞膜的组成相似,能显著增强细胞摄取,从而可以减少药物剂量,提高药物疗效,降低不良反应。

受体介导的主动靶向脂质体大致分为两类:蛋白和多肽修饰的脂质体和核酸修饰的脂质体。近年来,多种多肽用于修饰脂质体形成主动靶向递药系统^[8]。IL-2 是一种糖蛋白,可用于抗肿瘤治疗,因为 IL-2 可使自然杀伤(NK)细胞增殖和肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)增生、诱导淋巴因子活化杀伤(LAK)细胞和细胞毒淋巴细胞增强其溶细胞活性,从而清除肿瘤^[9]。在体外细胞实验环境下,IL-2 无法激活上述细胞杀伤肿瘤,因此 IL-2 在本实验中作为配体起到靶向的作用。

本实验采用 IL-2 受体高表达的皮肤 T 细胞淋巴瘤 Hut-102 细胞作为实验组,采用乳腺癌 MDA-MB-231 细胞作为阴性组,分别用不同浓度的游离 5-FURP、5-FURP 脂质体和 IL-2 靶向 5-FURP 脂质体作用于细胞。结果显示,3 种药物

对 Hut-102 细胞都有不同程度的抑制作用,且有随浓度增大抑制率增高的趋势。同种浓度的不同药物对 Hut-102 细胞的抑制作用依次为:IL-2 靶向 5-FURP 脂质体>5-FURP 脂质体>5-FURP,IL-2 靶向 5-FURP 脂质体对细胞的抑制作用最强。由此分析造成这种结果的原因可能是:IL-2 作为载药脂质体的配体发挥导向物作用,通过与 IL-2 受体特异性结合,实现药物的主动靶向释放。阴性实验结果表明,有配体与无配体的载药脂质体对细胞的抑制作用无明显差异,由此间接证明了 IL-2 作为配体发挥导向作用,提高了药物的生物利用度。

REFERENCES

- [1] WEIDMANN E, SACCHI M, PLAISANCE S, et al. Receptors for interleukin 2 on human squamous cell carcinoma cell lines and tumor in Situ [J]. *Cancer Res*, 1992, 52(21): 5963-5970.
- [2] WALDMANN T A. The Structure, function, and expression of interleukin-2 receptors on normal and malignant lymphocytes [J]. *Science*, 1986, 232(4751): 727-732.
- [3] YAGURA H, TAMAKI T, FURISTU T, et al. Demonstration of high-affinity interleukin-2 on B-chronic lymphocytic leukemia cells: functional and structural characterization receptors [J]. *Blut*, 1990, 60(3): 181-186.
- [4] FRANKEL A E, FU T, BURBAGE C, et al. IL2 fused to lectin-deficient ricin is toxic to human leukemia cells expressing the IL-2 receptor [J]. *Leukemia*, 1997, 11(1): 22-30.
- [5] KONIGSBERG P J, GODTEL R, KISSEL T, et al. The development of IL-2 conjugated liposomes for therapeutic purposes [J]. *Biochim Bioph Acta*, 1998, 1370(2): 243-251.
- [6] MERTINS O, SEBBEN M, PHOLMANN A R, et al. Production of soybean phosphatidylcholine-chitosan nanovesicles by reverse phase evaporation:a step by step study [J]. *Chem Lipids*, 2005, 138(1-2): 29-37.
- [7] ZHU L, HU C M, ZHAO J Y, et al. Preparation of IL-2 conjugated immunoliposomes and study on its stability [J]. *J Chongqing Med Univ(重庆医科大学学报)*, 2008, 33(8): 1000-1002.
- [8] WU X P, WANG C. Advances in peptide-modified liposome targeted drug delivery system. [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2010, 27(8): 681-685.
- [9] PENICHERET M L, DELA CRUZ J S, SHIN S U, et al. A recombinant IgG3-(IL-2)fusion protein for the treatment of human HEP2/neu expressing tumors [J]. *Hum Antidodies*, 2001, 10(1): 43-49.

收稿日期: 2010-11-02