

双配体修饰的阿霉素脂质体靶向于脑胶质瘤的体外研究

吕清^{1,2}, 韩旻², 李黎明², 郑艳榕², 李范珠^{1*}, 高建青^{2*} (1.浙江中医药大学药学院, 杭州 310053; 2.浙江大学药学院, 杭州 310058)

摘要: 目的 筛选和优化转铁蛋白、叶酸共同修饰的阿霉素脂质体的处方及制备工艺, 以期得到具有良好的脑胶质瘤靶向治疗作用的给药系统。方法 采用薄膜分散和硫酸铵梯度法制备阿霉素脂质体。将叶酸连接至二硬脂酸磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000(DSPE-PEG2000-NH₂)得到 DSPE-PEG2000-Folic, 考察不同磷脂种类、药脂比、水化介质和载药时间, 对脂质体粒径、包封率和稳定性的影响, 确定脂质体的处方工艺。以大鼠的脑毛细血管内皮细胞(bEnd3)和星形胶质细胞组成体外血脑屏障(blood-brain barrier, BBB), 并结合大鼠胶质瘤 C6 细胞, 构建体外模拟胶质瘤靶向治疗的复合 BBB 模型。考察阿霉素脂质体在 bEnd3 细胞中的摄取机制和透过 BBB 的转运速率及对 C6 细胞的毒性。结果 确定了 DSPC 作为主要磷脂组分, 并以 120 mmol·L⁻¹ 的硫酸铵作为水化介质, 药脂比为 1:15, 载药时间选择 60 min, 成功制备了高包封率和稳定性的双配体脂质体。其在 bEnd3 细胞中摄取远大于普通脂质体($P<0.05$), 摄取过程受网格蛋白和小窝内陷介导的细胞内吞作用, 并受转铁蛋白和叶酸的影响; 同时其在 BBB 模型中的药物透过速率、及其进一步透过 BBB 后对下层 C6 细胞的毒性, 均显著高于其他脂质体组。结论 转铁蛋白和叶酸共同修饰的阿霉素脂质体具有较好的体外脑胶质瘤靶向治疗作用。

关键词: 阿霉素; 转铁蛋白; 叶酸; 脂质体; 胶质瘤

中图分类号: R965.1; R943

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)11-0963-08

Study of Doxorubicin Liposome Modified with Transferrin and Folic Acid Targeting to Glioma *in Vitro*

LÜ Qing^{1,2}, HAN Min², LI Liming², ZHEN Yanrong², LI Fanzhu^{1*}, GAO Jianqing^{2*} (1.Department of Pharmaceutics, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2.Institute of Pharmaceutics, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To carry out the optimization of formulation and preparation process of the transferrin and folic acid co-modified doxorubicin liposomes [Tf (FA)-DOX-lipo], investigating the glioma targeting therapeutic effects. **METHODS** Tf (FA)-DOX-lipo was prepared by thin-film evaporation method and ammonium sulfate gradient method. First, folic acid was connected to 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[amino(polyethylene glycol)-2000] to get the DSPE-PEG2000-Folic. Further, the phospholipid species, ratio of drug to lipid, hydration medium concentration and drug loading time were examined, particle size, encapsulation efficiency and stability were utilized to determine the formulation and process of the liposomes. Rats brain blood capillary endothelial cells (bEnd3) and astrocytes were used to construct *in vitro* blood-brain barrier(BBB), combined with rats glioma C6 cells to construct the composite BBB model, investigating glioma targeted therapy *in vitro*. The uptake mechanism of doxorubicin liposomes in bEnd3 cells, transport ratios through the BBB and toxicity on C6 glioma cells were investigated. **RESULTS** The results of NMR showed that folic acid was successfully connected to the DSPE-PEG2000-NH₂, while identifying DSPC as the main components of phospholipids, 120 mmol·L⁻¹ ammonium sulfate as the hydration medium, the drug to lipid ratio was 1:15, drug time was 60 min, and stable dual-ligands modified liposomes with high encapsulation efficiency was successfully prepared. bEnd3 cell uptake was much larger than conventional liposomes ($P<0.05$), which demonstrated the brain targeting mechanism of Tf(FA)-dox-lipo were likely clathrin-dependent and caveolae dependent endocytosis pathway, subjected to the impact of transferrin and folic acid as well. In the BBB model, drugs transport ratio and toxicity on C6 cells after transport were significantly higher than other liposome groups. **CONCLUSION** Transferrin and folic acid modified doxorubicin liposomes have good glioma targeting and therapeutic effect *in vitro*.

KEY WORDS: doxorubicin; transferrin; folic acid; liposome; glioma

脑胶质瘤是最常见的颅内肿瘤, 约占脑肿瘤的半数左右^[1]。目前临床治疗以手术切除为主, 由于

胶质瘤呈浸润性生长, 没有明确边界, 手术不易全切, 因此需要结合术后的放、化疗进行全脑的

基金项目: 浙江省自然科学基金(Y2100645); 2012 国家级大学生创新创业训练计划(3291)

作者简介: 吕清, 女, 硕士生 Tel: (0571)88208440 E-mail: lqtongxiang@yahoo.com.cn *通信作者: 李范珠, 男, 博士, 教授, 博导 Tel: (0571)86633030 E-mail: lifanzhu@zjtcu.net 高建青, 男, 博士, 教授, 博导 Tel: (0571)88208437 E-mail: gaojianqing@zju.edu.cn

综合治疗,然而胶质瘤对治疗的敏感性较低,故其复发仍难以避免,这也导致了目前临床疗效较差,生存期短,死亡率高。其中高级别胶质瘤患者的平均生存期尚不足1年,而恶性胶质瘤5年生存率不足5%,其病死率仅次于胰腺癌和肺癌,位居第3位。化疗是胶质瘤患者手术治疗后一种必不可少的辅助治疗手段^[2]。

为提高药物静脉输送入脑后对肿瘤细胞的靶向性,本课题将利用脑毛细血管内皮细胞高表达的转铁蛋白受体以及脑内胶质瘤细胞表达的叶酸受体,构建转铁蛋白(transferrin, Tf)和叶酸(folate, F)共同修饰的脂质体脑胶质瘤二级靶向给药系统,以提高化疗药物盐酸阿霉素克服血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)入脑后在肿瘤组织的分布,减少对正常脑组织的损伤,增加肿瘤细胞对化疗药物阿霉素的敏感性,同时减少阿霉素严重的不良反应,进一步提高药物的治疗作用。

1 材料和仪器

1.1 材料和试剂

盐酸阿霉素(doxorubicin hydrochloride, DOX)(浙江海正药业,批号:M110104);胆固醇、转铁蛋白均购自Sigma公司;氢化磷脂(HSPC,德国Lipoid公司);二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二硬脂酸磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000(DSPE-PEG2000)、二硬脂酸磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000-羧基交连物(DSPE-PEG2000-COOH)、二硬脂酸磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000-氨基交连物(DSPE-PEG2000-NH₂)均购自美国Avanti Polar Lipids公司;三氯甲烷(国药集团化学试剂有限公司);DMEM高糖培养基、胎牛血清、胰酶和青霉素-链霉素双抗试剂(100×)均购于Gibico公司;3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)、1, 3-二环己基碳二亚胺(DCC)均购自

Sigma公司;1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)和N-羟基琥珀酰亚胺(S-NHS)(Sigma);SephadexG-100(瑞典Pharmacia Biotech公司);BCA蛋白浓度测定试剂盒(南京碧云天生物技术公司)。其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器

Zetasizer Nano-S90激光粒度测定仪(马尔文);数显恒温水浴锅(江苏省金坛市江南仪器厂);RE-52C旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);JY92-II超声波细胞粉碎仪(宁波新芝科器研究所);KQ-100B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);AL204电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);Eppendorf离心机(德国Eppendorf公司);Agilent 1100高效液相色谱仪(德国Santa Clara, CA);核磁共振仪(瑞士BRUKER AVIII, 500M)。

1.3 动物

新生SD乳鼠, Wistar大鼠, ♂, 体质量(220±20)g, 由浙江中医药大学动物实验中心提供, 实验动物许可证号: zju2010-1-02-015。

2 试验方法

2.1 将叶酸接至DSPE-PEG2000-NH₂

参考文献[3-4], 将6.25 mg叶酸溶解于0.5 mL无水DMSO中, 同时加入125 μL吡啶, 8.15 mg DCC(吡啶与DMSO均用4A分子筛脱水), N₂保护, 室温避光反应4 h活化羧基, 然后将25 mg DSPE-PEG2000-NH₂加入上述反应体系, 避光搅拌反应24 h。旋转蒸发器减压蒸发去除混合物中吡啶。加入3.5 mL水后, 过220 nm油膜去除不溶副产物二环己基, 上清液用MWCO 8 000~14 000的透析袋透析, 用50 mmol·L⁻¹生理盐水2 L透析2次, 水透析3次(每次均为12 h)后, 产物冷冻干燥后待¹H-NMR检测。化学反应式见图1。

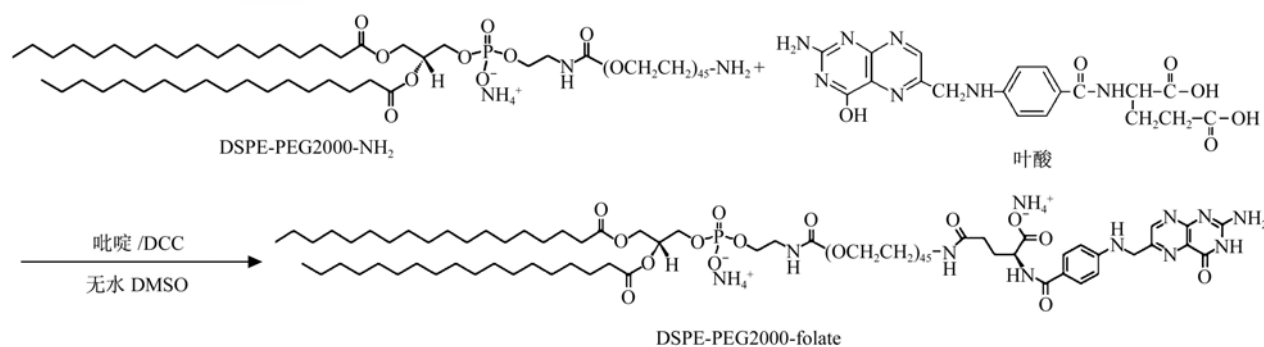


图1 叶酸和DSPE-PEG2000-NH₂的化学反应过程

Fig 1 The chemical reaction of folic acid attached to DSPE-PEG2000-NH₂

2.2 处方和工艺的筛选及优化

通过查阅文献[5]和预实验,发现磷脂种类、药脂比、水化介质和载药时间对脂质体的制备影响较大,所以本实验选取了磷脂种类(DSPC、HSPC),药脂比(1:8, 1:10, 1:15),水化介质硫酸铵的浓度(120, 250 mmol·L⁻¹),载药时间(30, 60 min)作为筛选的条件,以粒径、包封率和稳定性作为考察指标进行处方和工艺筛选优化的考察指标。

用电子天平精确称取 DSPE-PEG2000-COOH 1.5 mg、胆固醇(Chol)10 mg、(二硬脂酸磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-叶酸)F-PEG2000-DSPE 1 mg、DSPE-PEG2000 9 mg、DSPC 或者 HSPC 60 mg; DSPC/HSPC:Chol:DSPE-PEG2000:DSPE-PEG2000-COOH:F-PEG2000-DSPE(摩尔比分别为 2:1:0.11:0.021:0.017)溶于 15 mL 氯仿中。采用薄膜分散法,然后加入 10 mL 的硫酸铵溶液(250 或 120 mmol·L⁻¹)水化约 1 h,形成均匀的乳状液体。水浴超声 20 min,探头超声 100 W,30 次,过 220 nm 的水膜控制粒径。将制剂用 pH 7.4 的 PBS 作为透析介质透析 3 h,以增加内外相的 pH 差。用硫酸铵梯度法制备阿霉素脂质体,将上述脂质体于 60 °C 的恒温水浴载药,取药脂比为 1:8 或 1:10 或 1:15 的盐酸阿霉素溶于 1 mL 的水中,逐滴加于脂质体中,60 °C 搅拌孵育 30 min 或 1 h。

2.3 制剂的制备

根据处方筛选得到最佳的处方组成和制备工艺,用主动载药法制备阿霉素脂质体(DOX-lipo)、阿霉素转铁蛋白脂质体(Tf-DOX-lipo)、阿霉素叶酸脂质体(F-DOX-lipo)、空白转铁蛋白叶酸脂质体[Tf(FA)-lipo]、转铁蛋白和叶酸共同修饰的阿霉素脂质体[Tf(FA)-DOX-lipo]。

2.3.1 DOX-lipo 的制备 根据处方筛选结果确定的最佳的处方组成为 DSPC, Chol, DSPE-PEG2000, 用薄膜分散法制备,并用硫酸铵缓冲液水化获得脂质体,控制粒径后,利用主动载药法制备获得 DOX-lipo。

2.3.2 Tf-DOX-lipo 的制备 处方组成为 DSPC, Chol, DSPE-PEG2000, DSPE-PEG2000-COOH, 用薄膜分散法制备,并用硫酸铵缓冲液水化获得脂质体,控制粒径后,利用主动载药法制备获得 DOX-lipo。将转铁蛋白接至脂质体。转铁蛋白脂质体的制备是将磷脂上的羧基与转铁蛋白上的

氨基反应^[6]。即取 EDC·HCl 和(S-NHS)(DSPE-PEG2000-COOH:TF:EDC·HCl:S-NHS=0.67:0.67:2.5:6.3)加入上述脂质体的磷酸缓冲液中(pH=5.5),室温搅拌 15 min 后,调 pH=7,加入转铁蛋白,继续搅拌 2~3 h,得到转铁蛋白修饰的脂质体 Tf-DOX-lipo。未包封的阿霉素,未反应的转铁蛋白和 EDC·HCl、S-NHS 通过 Sephadex G-100 柱(1.5 cm×25 cm)以 PBS 缓冲液洗脱除去。

2.3.3 F-DOX-lipo 的制备 处方组成为 DSPC, Chol, DSPE-PEG2000, F-PEG2000-DSPE, 用薄膜分散法制备,并用硫酸铵缓冲液水化获得脂质体,控制粒径后,利用主动载药法制备获得 F-DOX-lipo。

2.3.4 Tf(FA)-lipo 的制备 处方组成为 DSPC, Chol, DSPE-PEG2000, DSPE-PEG2000-COOH 和 F-PEG2000-DSPE, 用薄膜分散法制备,用生理盐水水化后控制粒径,获得 Tf(FA)-lipo。转铁蛋白的接载按“2.3.2”项下方法操作。

2.3.5 Tf(FA)-DOX-lipo 的制备 处方组成为 DSPC, Chol, DSPE-PEG2000, DSPE-PEG2000-COOH 和 F-PEG2000-DSPE, 用薄膜分散法制备,并用硫酸铵缓冲液水化后获得叶酸修饰的脂质体,控制粒径后,利用主动载药法制备获得叶酸修饰的 DOX-lipo。转铁蛋白的接载按“2.3.2”项下方法操作,得到 Tf(FA)-DOX-lipo。

2.4 脂质体的理化性质考察

脂质体含量测定:取 20 μL DOX-lipo 悬液,加入 180 μL 乙醇破坏。涡旋后,13 000 r·min⁻¹ 高速离心 10 min,取上清采用紫外分光光度计测定。**粒径的测定:**取空白脂质体, DOX-lipo, Tf-DOX-lipo, Tf(FA)-DOX-lipo 各适量,用 PBS 稀释至合适浓度,激光粒度测定仪测定粒径分布。**形态学观察:**取上述脂质体溶液各适量,纯水稀释后滴加于铜网上,用 2%磷钨酸负染,于透射电镜下观察其形态,见图 2。转铁蛋白结合率的测定:由 BCA 试剂盒测定转铁蛋白结合效率^[7]。

2.5 bEnd3 细胞的摄取

取对数生长期的每孔 1×10⁶ 个的永生化血管内皮细胞 bEnd3 细胞以每孔 2 mL 接种于 6 孔板中,在 37 °C, 5%CO₂ 条件下培养 24 h 后,弃去培养液, pH 7.4 的 PBS 漂洗 1 次,分别加入含药物浓度为 10 μg·mL⁻¹ 的阿霉素溶液及制剂的 Hank's 缓冲液 2 mL, 37 °C 孵箱培养 4 h,除去 Hank's 液,

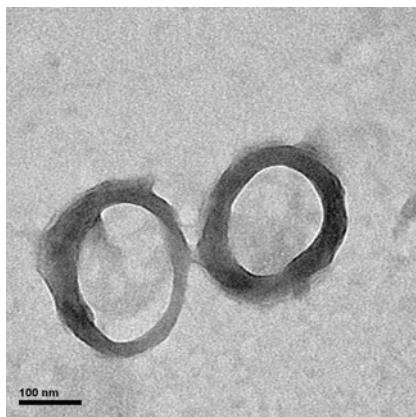


图2 Tf(F)-dox-liposome 的透射电镜图

Fig 2 Transmission electron micrograph of Tf(F)-DOX-liposome

用冰 PBS 迅速漂洗 3 次, -80°C 与 40°C 反复冻融各 3 次, 每次 30 min, 每孔加入 PBS 1 mL, 用细胞刮刀刮下细胞, 转移至 2 mL 离心管, 探头超声破碎(功率: 100 W; 工作时间: 2 s; 间歇时间: 3 s; 超声次数: 30 次), $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清液用荧光高效液相仪检测 DOX 浓度。

荧光液相色谱条件: Diamonsil C_{18} 柱($250\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$); 流动相为乙腈- $15\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (28:72), 其中 $15\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 溶液为 NaH_2PO_4 -三乙胺-磷酸(72:0.1:0.125); 阿霉素激发波长为 488 nm, 发射波长为 570 nm。

2.6 竞争性实验

2.6.1 考察游离转铁蛋白和叶酸的存在对制剂在细胞中 DOX 的摄取量的影响 实验组: 加入 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 游离转铁蛋白和/或叶酸, 37°C 预孵育 30 min, 再加入一定量双配体制剂, 使 DOX 终浓度为 $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 孵育 3 h, 每组平行设置 3 个复孔。对照组: 不加游离配体预孵育, 其余操作同实验组。

2.6.2 考察不同入胞抑制剂对制剂及 DOX 溶液的摄取量的影响 实验组: 分别加入 P-gp 抑制剂环孢菌素(终浓度 $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、维拉帕米(终浓度 $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、网格蛋白抑制剂氯丙嗪(终浓度 $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)、 Na^+/H^+ 交换体(NHE)抑制剂阿米洛利(终浓度为 $16.88\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)、小窝内陷内吞抑制剂甲基 β -环糊精(终浓度 $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)、能量抑制剂叠氮钠(终浓度为 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)于 37°C 预孵育 30 min, 再加入双配体 DOX-lipo, 使 DOX 终浓度为 $30\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 孵育 3 h, 考察细胞中 DOX 的摄取量变化。每组平行设置 3 个复孔。对照组: 不加各种抑制剂,

其余操作同实验组。

2.7 原代星型胶质细胞的获取和培养

原代星型胶质细胞以新生的 SD 大鼠的大脑皮层作为来源。2 mL 解剖液加入小平皿, 消毒剪刀后, 将用酒精擦拭过的新生小鼠(24 h 内)断头, 完整取脑, 剥去脑表面脑膜、血管、丘脑、小脑等, 仅留下脑皮层。拨干净的大脑皮层置另一盛解剖液的小平皿中, 用剪刀剪碎, 呈 1 mm^3 块。放入装有胰酶的离心管, 孵箱放置 15 min。加入适量培养液, 溶液至粉红(终止消化), 小心吸去上清。加入适量培养液, 再次吸去上清以清洗 1 次。加入适量培养液, 吹打均匀再加培养液至适当细胞。孵箱培养过夜, 第 2 天全量换液。以后每 2~3 d 半量换液 1 次。8 d 后每天换 1 次。12~14 d($\leq 18\text{ d}$)传代。

2.8 BBB 体外模型的建立

将星型胶质细胞于每孔 5×10^5 个的密度种于预先铺有多聚赖氨酸的插件反面(Corning, NY, USA, 孔径 $0.4\text{ }\mu\text{m}$, 直径 12 mm, 表面积 1.12 cm^2)培养^[8], 约 4 h, 待细胞贴壁后翻过来培养, 培养约 5 d。bEnd3 细胞种在预先涂有 2%明胶的插件上, 细胞密度每孔 1.25×10^6 个, 2 种细胞共同培养 7 d。上层加培养液 500 μL , 下层加培养液 1 500 μL , 每 2 d 换 1 次培养液。实验前, 单层细胞的强度用跨膜电阻仪来测定它的转移上皮电阻。TEER 值达到一定值方可用于实验。同时用辣根过氧化物酶(HRP)(RZ=3.0~3.5, 酶活性 $>265\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$, Mw=44 kDa)作为一个 BBB 模型渗透性的指标^[9]。

2.9 制剂过 BBB 的转运实验和对下层肿瘤细胞的毒性作用

待 BBB 模型建立以后, 分为阿霉素水溶液(DOX-solution), DOX-lipo, Tf-DOX-lipo、F-DOX-lipo 和双配体修饰的 DOX-lipo[Tf(FA)-dox-lipo], 以 $30\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 阿霉素浓度加入模型上层, 以 Hank's 作为转运媒介。在 6 h 点从下层接收液中取样 200 μL 。竞争性实验: 预先加入 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的游离转铁蛋白或者叶酸预孵育 30 min, 然后加入转铁蛋白脂质体。其余操作同转运实验。样品中药物含量用荧光 HPLC 测定。

星形胶质细胞和血管内皮细胞共同培养 4 d 后, 转入另一个下层已种植 C6 胶质瘤细胞的 transwell, 细胞密度为每孔 5×10^5 个, 继续共同培养 1 d。分别加入阿霉素溶液, DOX-lipo, Tf-DOX-

lipo、F-DOX-lipo 和双配体修饰的 DOX-lipo [Tf(FA)-DOX-lipo], 分别以 $30\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 阿霉素浓度加入模型上层, 以 Hank's 作为转运媒介。48 h 后, 用 MTT 法检测下层 C6 胶质瘤细胞的生存活性。竞争性实验: 分别预先加入 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的转铁蛋白, $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 转铁蛋白和叶酸预孵育 30 min, 其余操作同上述实验。

3 结果

3.1 处方工艺筛选与优化结果

核磁结果说明已成功地制备了理论上所需的产物 DSPE-PEG2000-F, 然后进行制剂处方的筛选和制备工艺的优化。以 DSPC 为磷脂成分的脂质

体、在包封率和稳定性方面均优于 HSPC 脂质, 结果见表 1 和表 2。不同药脂比制备的脂质体, 粒径相似, 但药脂比为 1:15 时的脂质体药物包封率相对较高, 且其稳定性优于脂比为 1:8 时的脂质体。由于较高的水化介质浓度($250\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)可能会对制剂稳定性产生一定的影响, 故文中相对较低的硫酸铵浓度($120\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)条件下的脂质体, 具有更好的稳定性和包封率。另外, 载药时间 60 min 时, 脂质体的粒径较小且均一, 稳定性良好。故最终优化的制剂处方工艺为磷脂采用 DSPC, 药脂比为 1:15, 水化介质选择 $120\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硫酸铵, 载药时间为 60 min。

表 1 处方和工艺的筛选和优化结果

Tab 1 The screening and optimization results of formulation and process

考察的指标		粒径/nm	多分散系数 PDI	包封率/%
磷脂种类	HSPC	212±21.1	0.194±0.02	91.92±3.2
	DSPC	193±13.5	0.214±0.04	95.62±4.1
药脂比	1:8	212±15.3	0.179±0.04	84.49±3.3
	1:10	202±18.9	0.194±0.01	91.92±3.1
	1:15	209±21.4	0.235±0.07	99.63±1.2
水化介质(硫酸铵)浓度	120 mmol·L ⁻¹	218±8.5	0.191±0.05	98.02±4.2
	250 mmol·L ⁻¹	200±6.5	0.178±0.04	95.82±3.8
载药时间	30 min	193±9.6	0.214±0.05	91.02±1.1
	60 min	175±11.2	0.159±0.02	99.63±2.9

表 2 脂质体在 4℃ 的稳定性

Tab 2 Stability of liposome at 4℃

考察的指标		0 周粒径/nm	1 周粒径/nm	2 周粒径/nm	3 周粒径/nm
磷脂种类	HSPC	212±21.1	223±24.8	352±33.4	363±49.6
	DSPC	193±13.5	238±12.9	241±24.5	255±32.2
药脂比	1:8	212±15.3	227±17.5	309±33.2	361±4.4
	1:10	202±18.9	233±9.8	268±23.6	298±24.2
	1:15	209±21.4	331±7.2	274±14.7	297±26.8
水化介质浓度 (硫酸铵)	120 mmol·L ⁻¹	218±8.5	216±5.9	228±15.9	241±15.6
	250 mmol·L ⁻¹	200±6.5	234±24.3	255±28.6	277±33.8
载药时间	30 min	193±9.6	196±4.7	268±22.2	298±13.5
	60 min	175±11.2	215±6.3	224±32.2	253±13.4

3.2 脂质体的理化性质考察

各种类型的脂质体粒径均为 200 nm 左右, 且较为均一, 脂质体表面修饰了转铁蛋白和叶酸后粒径并无明显变化, 且粒径分布均一, 电位值均在 -10 mV 左右, 说明靶向功能基修饰未显著改变脂质体的表面电位, 提示也未影响制剂的稳定性。用 BCA 方法测得转铁蛋白的结合率为(56.06±

4.51)%。利用主动载药法制备的制剂包封率都较高。结果见表 3。

3.3 DOX 的摄取实验和竞争性实验

双配体修饰的脂质体的摄取量显著高于 DOX-lipo 和转铁蛋白脂质体以及叶酸转铁蛋白脂质体($P<0.05$), 结果见图 3。游离配体预孵育后, 阿霉素的摄取量远远降低, 进一步验证了双配体

表 3 各种类型脂质体的表征

Tab 3 Characterization of various types of liposomes

脂质体类型	粒径/nm	多分散系数/PDI	封装率/%	ζ 电位/mV
DOX-lipo	165±1.6	0.226±0.12	99.2±0.1	-9.9±0.8
Tf-DOX-lipo	180±7.5	0.276±0.05	98.3±0.3	-10.3±0.8
F-DOX-lipo	188±5.6	0.256±0.07	98.0±0.2	-11.0±0.8
(Tf)FA-DOX-lipo	195±6.3	0.248±0.02	97.5±0.5	-13.1±0.8
(Tf)F-lipo	192±3.5	0.283±0.03	—	-9.3±0.8

制剂进入细胞的一条途径是受体介导的内吞途径。bEnd3 细胞对阿霉素溶液的摄取量高于各组阿霉素制剂的量，与文献相符。一种可能的原因是由于制剂透过细胞是通过胞吞作用，而溶液是通过被动扩散作用，更容易通过细胞膜。还有一种可能的原因是，药物包载入制剂后，其荧光可能淬灭，结果使得荧光偏低^[10]。虽然体外实验中游离的 DOX 更容易进入细胞，但在体内情况却不一样，静脉给予游离的 DOX 后，游离的 DOX 在体内被巨噬细胞吞噬后迅速清除，导致血药浓度迅速降低，从而导致肿瘤组织中 DOX 的浓度也远低于 DOX-lipo。

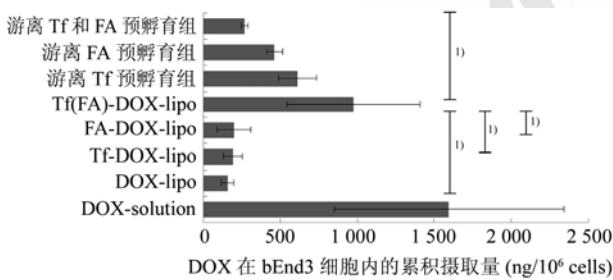


图 3 bEnd3 细胞内的阿霉素摄取量($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

阿霉素浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, ¹⁾ $P<0.05$

Fig 3 DOX uptake by bEnd3 cells

DOX concentration at $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, ¹⁾ $P<0.05$

网格蛋白抑制剂氯丙嗪、甲基 β -环糊精、叠氮钠预孵育后，双配体修饰的脂质体中的阿霉素摄取量都有显著性的差异($P<0.05$)，结果见图 4。Na⁺/H⁺交换体抑制剂阿米洛利预孵育后，双配体制剂的 DOX 摄取量无显著性变化，这说明双配体修饰的制剂内吞途径主要是通过网格蛋白和大胞饮途径，而小窝内陷介导的内吞途径没有明显的参与。而在 P-gp 抑制剂环孢菌素、维拉帕米预孵育后，DOX 的摄取量有显著性增加，尤其是加入环孢菌素 A 预孵育($P<0.01$)，这说明 bEnd3 细胞上存在 P-gp 并且对阿霉素制剂有外排作用。

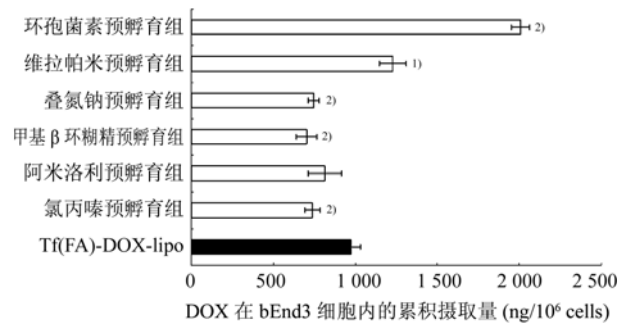


图 4 各种内吞抑制剂或者 P-gp 抑制剂预孵育后阿霉素被 bEnd3 摄取的结果($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

与(Tf)FA-DOX-lipo 比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$

Fig 4 Dox uptake by bEnd3 cells preconditioned with various endocytosis inhibitor or P-gp inhibitor($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Compared with (Tf)FA-DOX-lipo group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$

3.4 DOX-lipo 的 BBB 转运实验和对肿瘤细胞的毒性作用

建立的 BBB 模型，跨膜电阻可高达 $200 \Omega \cdot \text{cm}^{-2}$ ，同时用 HRP 透过率验证了模型的致密性，符合实验要求。溶液组的透过 BBB 的量明显高于制剂组，结果见图 5。一个主要的原因是脂溶性药物阿霉素极易被上层血管内皮细胞所摄取，这与摄取的结果一致。由图中还可以得出双配体修饰的脂质体药物转运量均高于普通脂质体($P<0.05$)以及单配体修饰的脂质体($P<0.05$)。并且在游离配体预孵育组中，药物的转运量均有较大的降低($P<0.05$)。说明双配体修饰的制剂中药物的转运也首先通过与血管内皮细胞上转铁蛋白和叶酸受体的结合，这与摄取的结果也相符。比较不足的是，制剂中药物的累计转运量整体偏低。对胶质瘤细胞的毒性实验中，阿霉素溶液组对下层肿瘤细胞的毒性高于其他组，这也与转运的结果相符合。但是双配体修饰的脂质体组毒性显著高于普通脂质体，说明制剂进入过 BBB 和肿瘤细胞都是通过了与转铁蛋白和叶酸受体相结合这一通道。在游离配体预孵育组，制剂的转运及其对肿瘤细胞的杀伤作用均有所上升。

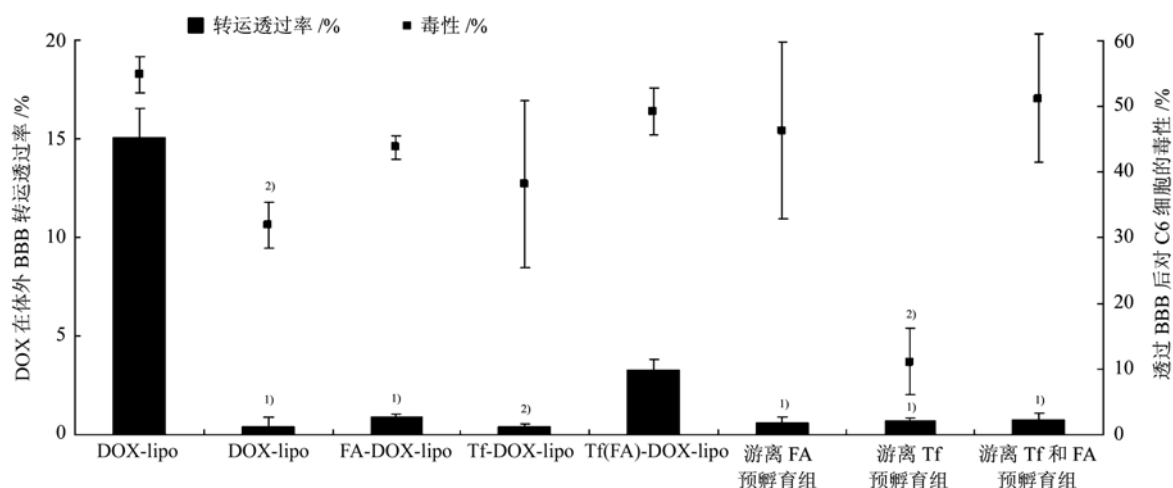


图5 阿霉素透过体外血脑屏障的透过率及透过后对肿瘤细胞的毒性作用($n=3$, $\bar{x} \pm s$)
与(Tf)FA-DOX-lipo 比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$

Fig 5 The ratio of DOX across BBB in vitro and antiproliferative activity against C6 glioma cells after through BBB model ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Compared with (Tf)FA-DOX-lipo group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$

4 讨论

脑胶质瘤患者术后的化疗由于抗肿瘤药物难以透过 BBB 和对肿瘤细胞的低选择性而一直未能得到较好的疗效。因此构建针对脑胶质瘤的靶向递药系统显得十分必要。

近年来有报道开展了多重修饰脂质体促进药物靶向脑内肿瘤细胞的研究工作, 构建了麦胚凝集素和他莫昔芬双重修饰的长循环(PEG 修饰)脂质体, 利用他莫昔芬对 BBB 外排能力和肿瘤细胞耐药性的抑制、以及麦胚凝集素对脑毛细血管内皮细胞和脑内肿瘤细胞的双重靶向, 更好的促进药物拓扑替康透过 BBB 并进入脑内肿瘤组织, 研究显示具有良好的体内疗效, 药物透过 BBB 后对肿瘤细胞有显著的靶向性^[11]。另外还建立了甘露糖衍生物和转铁蛋白共同修饰的脂质体, 同样显示出良好的脑内靶向性和体内外疗效^[8]。叶酸在细胞生长、分化、修复和宿主防御等方面扮演重要角色, 而肿瘤细胞的生长过程中较正常组织需要更多的叶酸, 所以肿瘤细胞, 包括脑肿瘤细胞^[12], 有比较丰富的叶酸受体。转铁蛋白是目前研究较为成熟的脑靶向配体, 由此, 本实验构建了转铁蛋白和叶酸共同修饰的脂质体, 使其通过转铁蛋白受体介导的转运进入脑内后, 进一步通过与胶质瘤细胞表面的叶酸受体结合, 而在胶质瘤部位释放药物, 从而达到更高的靶向性, 减少对正常脑组织的损伤。

处方筛选结果显示 DSPC 处方的脂质体优于

HSPC 处方脂质体。磷脂的性质对脂质体的稳定性有很大的影响作用。DSPC 处方的脂质体由于带负电荷, 可以减小脂质体间粒子的聚集, 较之 HSPC 处方的脂质体更加稳定。因为加入负电荷的磷脂, 脂质体膜表面形成了负电荷层, 既可减少正电荷离子或质子的跨膜渗漏, 长久保持离子梯度, 还可以防止脂质体之间的聚集。制剂中加入了 PEG 链, 降低血浆蛋白与脂质体之间的范德华引力, 使脂质体可逃避体内单核细胞吞噬系统的捕获, 延长脂质体及其携带药物的血液循环时间。有研究显示^[13], 用同种方法制备, 经超声处理得到粒径相同的 PEG 包衣脂质体较之普通脂质体, 由于 PEG 层存在, 脂质体的稳定性有很大的改变。

与正常组织相比, 肿瘤组织内的血管内皮细胞间隙增大, 血管壁薄, 血管通透性增加, 且肿瘤组织内缺少淋巴管。脑胶质瘤组织的血管内皮细胞间隙约为 50~300 nm, 这些特点导致粒径在 200 nm 以下的脂质体能够通过增强渗透和滞留作用(EPR 效应)向肿瘤组织内蓄积, 发挥更大的抗癌活性, 所以最好把粒径控制在 200 nm 以下。

本实验中利用永生化的血管内皮细胞 bEnd3 细胞和星型胶质细胞建立体外血脑屏障。bEnd3 细胞作为永生化的血管内皮细胞拥有内皮细胞的特性和血脑屏障的特征。因此它在体外常被作为简单血脑屏障来研究制剂的转运特性^[14-15]。

在药物的 bEnd3 细胞摄取和体外 BBB 模型转

运中, 经过转铁蛋白和叶酸修饰过的脂质体, 其摄取和转运速率均较阿霉素普通脂质体有明显提高, 并受到转铁蛋白受体介导的内吞作用; 但与溶液组相比, 尽管转运速率偏低, 但阿霉素双配体脂质体显示出了与溶液组在穿过 BBB 后于 C6 细胞中相似的毒性, 提示了双配体修饰的脂质体在透过 BBB 后, 可促进药物进一步进入 C6 细胞发挥治疗作用。

体外实验表明转铁蛋白和叶酸共同修饰的 DOX-lipo 具有一定的靶向作用和缓释作用。还须完善的部分包括: 进一步优化该脂质体的处方, 使其在体内有更好的长循环和靶向效果, 从而增加靶部位药物浓度和作用时间, 同时也减小给药剂量和减轻全身性不良反应, 以取得更好的脑胶质瘤治疗效果。

REFERENCES

- [1] COLMAN H, ALDAPE K. Molecular predictors in glioblastoma: toward personalized therapy [J]. Arch Neurol, 2008, 65(7): 877-883.
- [2] SILBERGELD D L, CHICOINE M R. Isolation and characterization of human malignant glioma cells from histologically normal brain [J]. J Neurosurg, 1997, 86(3): 525-531.
- [3] HO J A, HUNG C H, WU L C, et al. Folic acid-anchored PEGylated phospholipid bioconjugate and its application in a liposomal immunodiagnostic assay for folic acid [J]. Anal Chem, 2009, 81(14): 5671-5677.
- [4] GABIZON A, HOROWITZ A T, GOREN D, et al. Targeting folate receptor with folate linked to extremities of poly(ethylene glycol)-grafted liposomes: *in vitro* studies [J]. Bioconjug Chem, 1999, 10(2): 289-298.
- [5] XIANG Y, LIANG L, WANG X, et al. Chloride channel-mediated brain glioma targeting of chlorotoxin-modified doxorubicin-loaded liposomes [J]. J Control Release, 2011, 152(3): 402-410.
- [6] ISHIDA O, MARUYAMA K, TANAHASHI H, et al. Liposomes bearing polyethyleneglycol-coupled transferrin with intracellular targeting property to the solid tumors *in vivo* [J]. Pharm Res, 2001, 18(7): 1042-1048.
- [7] ANABOUSI S, BAKOWSKY U, SCHNEIDER M, et al. *In vitro* assessment of transferrin-conjugated liposomes as drug delivery systems for inhalation therapy of lung cancer [J]. Eur J Pharm Sci, 2006, 29(5): 367-374.
- [8] YING X, WEN H, LU W L, et al. Dual-targeting daunorubicin liposomes improve the therapeutic efficacy of brain glioma in animals [J]. J Control Release, 2010, 141(2): 183-192.
- [9] IMAMURA S, TABUCHI M, KUSHIDA H, et al. The blood-brain barrier permeability of geissoschizine methyl ether in Uncaria hook, a galenic constituent of the traditional Japanese medicine yokukansan [J]. Cell Mol Neurobiol, 2011, 31(5): 787-793.
- [10] LEE R J, LOW P S. Folate-mediated tumor cell targeting of liposome-entrapped doxorubicin *in vitro* [J]. Biochim Biophys Acta, 1995, 1233(2): 134-144.
- [11] DU J, LU W L, YING X, et al. Dual-targeting topotecan liposomes modified with tamoxifen and wheat germ agglutinin significantly improve drug transport across the blood-brain barrier and survival of brain tumor-bearing animals [J]. Mol Pharm, 2009, 6(3): 905-917.
- [12] WEITMAN S D, LARK R H, CONEY L R, et al. Distribution of the folate receptor GP38 in normal and malignant cell lines and tissues [J]. Cancer Res, 1992, 52(12): 3396-3401.
- [13] DENG Y H. Research on long cycle liposome [D]. Shenyang: Shenyang Pharmaceutical University, 1999.
- [14] BROWN R C, MORRIS A P, O'NEIL R G. Tight junction protein expression and barrier properties of immortalized mouse brain microvessel endothelial cells [J]. Brain Res, 2007, 1130(1): 17-30.
- [15] HU K, LI J, SHEN Y, et al. Lactoferrin-conjugated PEG-PLA nanoparticles with improved brain delivery: *in vitro* and *in vivo* evaluations [J]. J Control Release, 2009, 134(1): 55-61.

收稿日期: 2012-05-28

血脂康对自发性高血压大鼠心肌重构的作用及其可能机制

吴坚¹, 何红^{2*}, 赖东武², 胡宪清³ (1.绍兴第二医院心血管内科, 浙江 绍兴 312000; 2.浙江大学附属邵逸夫医院心血管内科, 杭州 310016; 3.金华市中心医院心血管内科, 浙江 金华 321000)

摘要: 目的 观察血脂康(Xuezhikang, XZK)对自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR)左室肥厚和心肌间质纤维化的影响, 探究其可能机制。方法 30只 SHR, ♂, 随机分为3组, 血脂康(300 mg·kg⁻¹·d⁻¹)治疗组(XZK组, n=10), 辛伐他汀(5 mg·kg⁻¹·d⁻¹)治疗组(SIM组, n=10), SHR对照组(SHR组, n=10), 同时入组同龄 Wistar-Kyoto 大鼠为正常对照组(WKY组, n=10), 均予等容量0.9%生理盐水灌胃。12周后, 分离心脏, 左室称重并计算左室重量指数(LVWI), 心肌组织固定包埋后 Masson 染色并计算心肌胶原容积分数(CVF)及心肌血管周围胶原面积(PVCA), 测定血清 I 型前胶原羧基末端前肽(P I CP)浓度、心肌组织超氧歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)浓度。结果 与 SHR 组相比, XZK 组和 SIM 组可以显著降低 LVWI(P<0.05)、CVF(P<0.01)、PVCA (P<0.01)及血清 P I CP 浓度(P<0.01), 但 SOD 活力及 MDA 浓度差

作者简介: 吴坚, 男, 硕士, 主治医师 Tel: (0575)85220811 E-mail: jeenboy@126.com *通信作者: 何红, 女, 硕士, 主任医师, 硕士 Tel: (0571) 86006494 E-mail: hehong179@163.com