• 论 著・

泊洛沙姆 188-PLGA 纳米给药系统对抗耐药肿瘤的研究

王慧欣^{1,2,3},王慧媛²,张梦²,谭娇²,王雅萍²,梁剑铭²,赵永星^{1*},黄永焯^{2*}(1.郑州大学药学院,郑州 450001; 2.中科院上海药物研究所,上海 201203; 3.新乡医学院第一附属医院,河南 新乡 453100)

摘要:目的 利用泊洛沙姆 188 对 PLGA 进行化学修饰,制备包载阿霉素的纳米粒,并评价纳米粒在人耐药乳腺癌细胞中的摄取能力及毒性。方法 通过 EDC/NHS 法合成泊洛沙姆 188-PLGA,通过核磁共振对其结构进行表征并测定临界胶束浓度;通过纳米沉淀法制备包载阿霉素的纳米粒,通过粒度仪对纳米粒的粒径及分布进行分析,通过细胞摄取实验及细胞毒性实验对纳米粒的摄取效果及毒性进行评价。结果 成功合成了泊洛沙姆 188-PLGA,并制备了粒径在 140 nm 左右的纳米粒,该纳米粒在人耐药乳腺癌细胞中有较好的摄取效果及较强的毒性。结论 泊洛沙姆 188 能够逆转耐药,增强耐药细胞对化疗药物的敏感程度。

关键词: 耐药; PLGA 纳米粒; 泊洛沙姆; 阿霉素; MCF-7/ADR 中图分类号: R962 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2014)10-1167-04 DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.10.001

Poloxamer188-PLGA Nanodrug Delivery System for Overcoming Drug Resistant Tumor

WANG Huixin^{1,2,3}, WANG Huiyuan², ZHANG Meng², TAN Jiao², WANG Yaping², LIANG Jianming², ZHAO Yongxing^{1*}, HUANG Yongzhuo^{2*}(1.School of Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 2.Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China; 3.The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453100, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To improve the treatment efficacy of doxorubicin to human breast cancer drug-resistant MCF-7/ADR cells, the synthesis of Poloxamer 188-PLGA conjugates and preparation of doxorubicin-loaded Poloxamer188 modified PLGA nanoparticles were investiagated. **METHODS** Poloxamer 188-PLGA was synthesized by using EDC/NHS, and the product was confirmed by nuclear magnetic resonance(NMR) and its critical micelle concentration was measured. Doxorubicin-loaded nanoparticles were prepared by the nanoprecipitation method, and the particle size was analyzed by laser scattering particle counter. Cellular uptake was observed using a fluorescence microscope and cell viability was determined by MTT assay. **RESULTS** Poloxamer 188-PLGA was synthesized successfully, and the average size of doxorubicin-loaded nanoparticles was about 140 nm. The nanoparticles could improve the intracellular delivery of doxorubicin and thus enhance the cytotoxicity in MCF-7/ADR cells. **CONCLUSION** Poloxamer 188 modified PLGA nanoparticles can reverse drug resistance and increase the cytotoxicity of doxorubicin in MCF-7/ADR cells.

KEY WORDS: drug resistance; PLGA nanoparticles; Poloxamer; doxorubicin; MCF-7/ADR

恶性肿瘤是影响人类健康的重大疾病,化疗 是临床上治疗肿瘤的重要方法,然而在化疗过程 中,90%的肿瘤患者会产生耐药性^[1],这成为影响 化疗疗效的关键障碍。肿瘤细胞产生耐药性的机 制有很多,包括 ATP 结合盒(ATP-binding cassette, ABC)转运蛋白的高表达^[2-3],凋亡通路的阻滞^[4-5] 以及 DNA 修复异常^[6]等。其中 ABC 转运蛋白的 高表达是产生耐药的关键因素,也是治疗耐药肿 瘤的主要切入点。 纳米技术是解决肿瘤多药耐药的主要方法。 纳米粒不仅可以通过 EPR 效应在肿瘤部位聚集, 而且能够躲避 ABC 转运蛋白的外排在肿瘤细胞内 富集^[7-8]。PLGA 是经 FDA 批准的可生物降解的药 用辅料,由于其良好的生物相容性及生物可降解 性而用作药物载体。目前,对 PLGA 的修饰也是 研究的热点,例如用 PEG 修饰 PLGA 纳米粒来增 加体内循环时间^[9];用转铁蛋白修饰 PLGA 纳米粒 来达到主动靶向的目的^[10]等。泊洛沙姆修饰纳米

基金项目:国家自然科学基金(81172996, 81373357);中国博士后自然科学基金(2012M510121, 2013T60478) 作者简介:王慧欣,女,硕士生 Tel: (021)20231000-1403 E-mail: wanghuixin1989@163.com ^{*}通信作者:赵永星,男,博士,教授 Tel: (0371)67781908 E-mail: zhaoyx@zzu.edu.cn 黄永焯,男,博士,研究员 Tel: (021)20231000-1401 E-mail: yzhuang@simm.ac.cn

粒能进一步对抗肿瘤的多药耐药。泊洛沙姆是一类由聚氧乙烯与聚氧丙烯醚共聚而成的三嵌段共聚物^[11],可以逆转耐药,能够使药物毒性增加 2~3 倍^[12-13]。泊洛沙姆逆转耐药的重要机制是其能够影响 ABC 转运蛋白的表达,从而增加药物在细胞内的积累^[14-15]。因此,本实验通过化学键将泊洛沙姆 188(P188)偶联在 PLGA 上,通过纳米沉淀法制备包裹化疗药物阿霉素的 PLGA-P188 纳米粒,以提高阿霉素在耐药肿瘤中的治疗效果。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

1.1.1 试剂 聚乙烯醇(PVA)、丙酮、DMSO、1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)-碳化二亚胺盐酸盐 (EDC·HCl)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),均购于国 药集团化学试剂有限公司,分析纯;PLGA(平均分 子量11000,乳酸:羟基乙酸为50:50)购于济南 岱罡生物科技有限公司;P188(BASF,批号: WPEE587E);阿霉素(大连美仑生物技术有限公 司,纯度>98%)。

1.1.2 仪器 400-Plus 核磁共振谱仪(美国 Varian); ZEN3690 激光粒度分析仪(英国 Malver); F4600 荧 光分光光度计(日本 Hitachi); 荧光显微镜(日本 Olympus); 酶标仪(美国 Thermo)。

1.1.3 细胞株及细胞培养 人乳腺癌耐药细胞株 (MCF-7/ADR)购自于中科院上海细胞库。用含10% 胎牛血清 RPIM 1640 完全培养基,并以1μg·mL⁻¹ 的阿霉素维持其耐药性,在37℃、5%CO₂的细胞 培养箱中连续培养。采用 2~3 代处于对数生长期 的细胞进行实验。

1.2 方法

1.2.1 PLGA-P188 的合成与表征 称取 500 mg PLGA, 置于 50 mL 圆底烧瓶中,加入 5 倍量(摩 尔比)的 EDC,在氮气保护下反应 30 min。称取 5 倍量(摩尔比)的 NHS,加入到上述反应器中,反应过夜。反应完全后,产物在冰乙醚中沉淀,沉淀 用 冰乙 醚-甲醇(7:3)洗 3 次。真空干燥得 PLGA-NHS。

氦气保护下,PLGA-NHS 与 3 倍量 P188 反应 2 d。产物在冰无水乙醇中沉淀,并用冰无水乙醇 洗 3 次除尽未反应的 P188。合成示意图见图 1。 将产物溶于氘代氯仿中,通过核磁共振(¹H-NMR) 进行结构表征。



图 1 PLGA-P188 的合成

Fig. 1 Synthesis of PLGA-P188

通过芘荧光探针法测定 PLGA、P188 和 PLGA-P188 的临界胶束浓度。将 3 种材料分别配 制成系列浓度的溶液,与芘溶液(2.4×10⁻⁶ mol·L⁻¹) 按 1:1 混合,测定混合溶液在发射波长 390 nm 的激发光谱,记录激发波长为 338 nm 与 333 nm 时的荧光强度,计算临界胶束浓度。

1.2.2 PLGA-P188 纳米粒的制备 采用纳米沉淀 法制备空白及包载阿霉素的 PLGA-P188 纳米粒。

10 mg PLGA-P188 的丙酮(1.5 mL)溶液逐滴滴加 到 5 mL 的 0.25%的 PVA 水溶液中,旋蒸除去丙酮, 即得到 PLGA-P188 空白纳米粒。将阿霉素与 PLGA-P188 混合溶液滴加到 PVA 水溶液中,相同 方法得到包裹阿霉素的 PLGA-P188 纳米粒。同法 制备包裹阿霉素的 PLGA 纳米粒。

1.2.3 阿霉素纳米粒的粒径及分布 取适量的纳 米粒胶体溶液,用激光散射粒度测定仪测定其平 均粒径及粒度分布。

1.2.4 阿霉素纳米粒的包封率与载药量的测定 将阿霉素纳米粒超速离心(4℃,100 000 r·min⁻¹) 30 min,沉淀加蒸馏水洗涤 3 次。用 DMSO 溶解 沉淀后,用荧光分光光度计对阿霉素进行定量分 析(激发波长 485 nm,发射波长 590 nm)。按以下公 式计算包封率与载药量:包封率= $W_1/W_0 \times 100\%$; 载药量= $W_1/W_2 \times 100\%$ 。其中, W_0 是加入的阿霉素 的总质量; W_1 是沉淀中测得阿霉素的质量; W_2 是 载药纳米粒总质量。

1.2.5 纳米粒的细胞摄取实验 取对数生长期的 MCF-7/ADR 细胞,以每孔 1×10⁴ 个细胞接种于 24 孔板中。培养 24 h 后,分 3 组给药,分别是游 离阿霉素组,包载阿霉素的 PLGA 纳米粒组和包 载阿霉素的 PLGA-P188 纳米粒组。各组阿霉素浓 度均为 10 μg·mL⁻¹, 孵育 4 h 后用 PBS 洗 3 遍, 在 荧光显微镜下观察各组细胞的摄取情况。

1.2.6 纳米粒的细胞毒性实验 细胞毒性实验通 过 MTT 法进行评价。取对数生长期的 MCF-7/ADR 细胞,以每孔 6 000 个细胞的密度接种于 96 孔板 中,正常培养 24 h 后给药。按"1.2.5"项下设置 3 组,每组在 0.1~10 μg·mL⁻¹之间设置 6 个浓度, 每个浓度设 6 个复孔。给药 48 h 后,每孔加入一 定量的 MTT(20 μL, 5 mg·mL⁻¹),孵育 4 h 后吸去 培养基,每孔加入 200 μL DMSO。用酶标仪测定 每孔在 490 nm 的吸光值,计算细胞存活率。

2 结果与讨论

2.1 PLGA-P188 的表征

PLGA-P188 的核磁氢谱图见图 2。由图 2 可 知,δ5.2、4.8 分别为 PLGA 中聚乳酸上次甲基质 子与聚乙醇酸上亚甲基质子的特征峰;δ 1.6 是 PLGA 上甲基质子特征峰;δ 1.17 为 P188 上甲基 质子特征峰;δ3.7 处为 P188 中亚甲基质子特征峰。 从这一系列特征峰可以表明材料 PLGA-P188 的合 成成功。

通过芘荧光探针法测定了 3 种材料的临界胶 束浓度,结果见图 3。PLGA 的临界胶束浓度非常 小,为 0.086 g·L⁻¹,共价接上两亲性聚合物 P188 后,临界胶束浓度增大到 0.199 g·L⁻¹,小于 P188 的临界胶束浓度(0.995 g·L⁻¹)。这是因为 P188 的亲 水端在纳米粒外层,提高了 PLGA 的亲水性,同 时起到保护作用,使其临界胶束浓度增大。





图 3 3 种材料的临界胶束浓度 Fig. 3 CMC of PLGA, P188 and PLGA-P188

2.2 PLGA-P188 纳米粒的表征 激光粒度仪对纳 米粒的粒径分析结果见图 4。修饰了 P188 对 PLGA 纳米粒粒径几乎没有影响,负载阿霉素的纳米粒 平均粒径在 140 nm 左右,且重复性良好。阿霉素 载药量为(3±0.5)%,包封率为(91±2.8)%。



图 4 载药纳米粒的粒径分布



2.3 PLGA-P188 纳米粒的细胞摄取实验 细胞摄 取实验结果见图 5。可以看出,游离阿霉素组几乎 看不到红色荧光,而将阿霉素包裹于 PLGA 纳米 粒中可以增加细胞中阿霉素浓度,对于 P188 修饰 的 PLGA 纳米粒,细胞内可见红色荧光强度高于 PLGA 纳米粒组,这说明 P188 在一定程度上可以 逆转 MCF-7/ADR 细胞的耐药性,从而使药物在胞 内的累积量增加。



图5 细胞摄取实验

Fig. 5 Cellular uptake test

2.4 PLGA-P188 纳米粒的细胞毒性实验

MTT 法测定 MCF-7/ADR 细胞存活率结果见 图 6。从图中可以看出,游离阿霉素即使在高浓度 (10 μg·mL⁻¹)下也无法杀死耐药细胞。由于纳米粒 能逃脱外排蛋白的外排,将阿霉素包裹于 PLGA 纳米粒中能够增强其对耐药细胞的杀伤作用。 P188 能逆转肿瘤细胞的多药耐药性,所以 PLGA-P188 纳米粒能够使阿霉素发挥更好的效 果。结果表明,在阿霉素浓度为 10 μg·mL⁻¹时, PLGA 纳米粒组细胞存活率为 76.1%, PLGA-P188 纳米粒组为 53.8%, P188 修饰使 MCF-7/ADR 细 胞存活率降低了 22.3%。



图 6 细胞毒性实验 Fig. 6 Cell viability test

3 讨论

本实验用 P188 修饰 PLGA,并以此为材料包 裹阿霉素成功制备了粒径在 140 nm 左右的新型载 药纳米粒。细胞摄取实验显示 P188 修饰的 PLGA 纳米粒能够更多的富集于 MCF-7/ADR 细胞中,这 可能是由于纳米粒外层的 P188 能够影响细胞膜上 ABC 转运蛋白的作用,降低细胞对胞内药物的外 排。MTT 实验也证实了 P188 修饰的 PLGA 载药 纳米粒对耐药细胞有更强的毒性。本实验将 P188 修饰的纳米给药系统成功的应用于肿瘤多药耐药 的治疗,为对抗耐药肿瘤提供了一种新的药物传 输系统。

REFERENCES

- WILSON T R, JOHNSTON P G, LONGLEY D B. Anti-apoptotic mechanisms of drug resistance in cancer [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2009, 9(3): 307-319.
- [2] SCHNEIDER E, HUNKE S. ATP-binding cassette(ABC) transport system: Functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains [J]. FEMS Microbiol Rev, 1998, 22(1): 1-20.
- [3] LITMAN T, BRANGI M, HUDSON E, et al. The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR(ABCG2) [J]. J Cell Sci, 2000, 113(11): 2011-2021.
- [4] VIKTORSSON K, LEWENSOHN R, ZHIVOTOVSKY B. Apoptotic pathways and therapy resistance in human malignancies [J]. Adv Cancer Res, 2005, 94: 143-196.
- [5] MASHIMA T, TSURUO T. Defects of the apoptotic pathway as therapeutic target against cancer [J]. Drug Resist Updat, 2005, 8(6): 339-343.
- [6] CAHILL D P, CODD P J, TRACY M D, et al. Loss of the mismatch repair protein MSH6 in human glioblastomas is associated with tumor progression during temozolomide treatment [J]. Neurosurgery, 2007, 61(1): 216-217.
- [7] CUVIER C, ROBLOT T L, MILLOT J M, et al. Doxorubicin-loaded nanospheres bypass tumor cell multidrug resistance [J]. Biochem Pharmacol, 1992, 44(3): 509-517.
- [8] SUSA M, IYER A K, RYU K. Doxorubicin loaded polymeric nanoparticulate delivery system to overcome drug resistance in osteosarcoma [J]. BMC Cancer, 2009, 9(1): 399.
- [9] YOOH S, PARK T G. Biodegradable polymeric micelles composed of doxorubicin conjugated PLGA-PEG block copolymer [J]. J Control Release, 2001, 70(1/2): 63-70.
- [10] SHAH N, CHAUDHARI K, DANTULURI P, et al. Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles surface modified with transferring and Pluronic P85, an *in vitro* cell line and *in vivo* biodistribution studies on rat model [J]. J Drug Target, 2009, 17(7): 533-542.
- [11] ALEXANDER V K, ELENA V B, VALERY Y A. Pluronic block copolymers for overcoming drug resistance in cancer [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2002, 54(5): 759-779.
- [12] ALAKHOV V Y, MOSKALEVA E Y, BATRAKOVA E V, et al. Hypersensitization of multidrug resistant human ovarian carcinoma cells by pluronic P85 block copolymer [J]. Bioconjug Chem, 1996, 7 (2): 209-216.
- [13] VENNEA, LI S, MANDEVILLE R, et al. Hypersensitizing effect of pluronic L61 on cytotoxic activity, transport, and subcellular distribution of doxorubicin in multiple drugresistant cells [J]. Cancer Res, 1996, 56 (16): 3626-3629.
- [14] WOODCOCK D M, JEFFERSON S, LINSENMEYER M E, et al. Reversal of the multidrug resistance phenotype with cremophor EL, a common vehicle for water-insoluble vitamins and drugs [J]. Cancer Res, 1990, 50(14): 4199-4203.
- [15] BATRAKOV E V, MILLER D W, LI S, et al. Pluronic P85 enhances the delivery of digoxin to the brain: *in vitro* and *in vivo* studies [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2001, 296(2): 551-557. 收稿日期: 2014-02-26