

REFERENCES

- [1] WANG W Y, WANG H, LUO Y, et al. The effects of metabotropic glutamate receptor 7 allosteric agonist N, N'-dibenzhydrylethane-1, 2-diamine dihydrochloride on developmental sevoflurane neurotoxicity: role of extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 mitogen-activated protein kinase signaling pathway [J]. *Neuroscience*, 2012(205): 167-177.
- [2] WANG W Y, YANG R, HU S F, et al. N-stearoyl-L-tyrosine ameliorates sevoflurane induced neuroapoptosis via MEK/ERK1/2 MAPK signaling pathway in the developing brain [J]. *Neurosci Lett*, 2013(541): 167-172
- [3] WANG W Y, JIA L J, LUO Y, et al. Location- and subunit-specific NMDA receptors determine the developmental sevoflurane neurotoxicity through ERK1/2 signaling [J]. *Mol Neurobiol*, 2014. DOI: 10.1007/s12035-014-9005-1.
- [4] WANG W Y, LUO Y, JIA L J, et al. Inhibition of aberrant cyclin-dependent kinase 5 activity attenuates isoflurane neurotoxicity in the developing brain [J]. *Neuropharmacology*, 2014(77): 90-99.
- [5] YANG S Y, CHEN W H, JIN H Z, et al. Dexmedetomidine prevents sevoflurane neurotoxicity via ERK1/2 MAPK signaling in the developing brain [J]. *Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学)*, 2014, 31(5): 523-528.
- [6] DIMAGGIO C, SUN L S, KAKAVOULI A, et al. A retrospective cohort study of the association of anesthesia and hernia repair surgery with behavioral and developmental disorders in young children [J]. *J Neurosurg Anesthesiol*, 2009, 21(4): 286-291.
- [7] WILDER R T, FLICK R P, SPRUNG J, et al. Early exposure to anesthesia and learning disabilities in a population-based birth cohort [J]. *Anesthesiology*, 2009, 110(4): 796-804.
- [8] SERVICK K. Biomedical Research. Researchers struggle to gauge risks of childhood anesthesia [J]. *Science*, 2014, 346(6214): 1161-1162.
- [9] NOBLE W, PLANEL E, ZEHR C, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(19): 6990-6995.
- [10] WEI H, QIN Z H, SENATOROV V V, et al. Lithium suppresses excitotoxicity-induced striatal lesions in a rat model of Huntington's disease [J]. *Neuroscience*, 2001, 106(3): 603-612.
- [11] WU S, ZHENG S D, HUANG H L, et al. Lithium down-regulates histone deacetylase 1 (HDAC1) and induces degradation of mutant huntingtin [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(49): 35500-35510.
- [12] JI M H, DONG L, JIA M, et al. Epigenetic enhancement of brain-derived neurotrophic factor signaling pathway improves cognitive impairments induced by isoflurane exposure in aged rats [J]. *Mol Neurobiol*, 2014, 50(3): 937-944.
- [13] GU Z L, LIU W H, WEI J, et al. Regulation of N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptors by metabotropic glutamate receptor 7 [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(13): 10265-10275.
- [14] YAN X B, HOU H L, WU L M, et al. Lithium regulates hippocampal neurogenesis by ERK pathway and facilitates recovery of spatial learning and memory in rats after transient global cerebral ischemia [J]. *Neuropharmacology*, 2007, 53(4): 487-495.
- [15] GRIMES C A, JOPE R S. CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 β and facilitated by lithium [J]. *J Neurochem*, 2001, 78(6): 1219-1232.

收稿日期: 2015-01-09

NGR 多肽修饰的 9-硝基喜树碱隐形脂质体药剂学性质与抗肿瘤作用研究

顾薇¹, 陈军¹, 彭佩², 胡梦雅¹, 陆姗姗¹, 杨希雄^{2*} (1.南京中医药大学药学院, 南京 210023; 2.荆楚理工学院化工与药学院, 湖北 荆门 448000)

摘要: 目的 考察 NGR 修饰前后 9-硝基喜树碱(9-nitrocamptothecin, 9-NC)隐形脂质体的药剂学性质与抗肿瘤作用。方法 采用薄膜-超声化法制备 NGR 修饰 9-NC 隐形脂质体, 以未经 NGR 修饰的隐形脂质体作对照, 考察包封率、体外释放度、内酯稳定性等药剂学性质; 以 HT1080 为细胞模型, MTT 法考察 NGR 修饰与未修饰 9-NC 隐形脂质体对细胞生长的影响, 流式细胞实验比较 NGR 修饰与未修饰组的入胞效率。结果 NGR 修饰对 9-NC 隐形脂质体的药剂学性质没有显著影响。修饰后的 9-NC 隐形脂质体对 HT1080 细胞的抑制率明显高于未修饰组($P < 0.05$), 流式细胞实验显示修饰后的脂质体入胞效率显著提高。结论 NGR 修饰能够显著提高 9-NC 隐形脂质体的抗肿瘤效果和入胞效率。

关键词: NGR; 9-硝基喜树碱; 隐形脂质体; 抗肿瘤

中图分类号: R943 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2015)05-0529-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.05.003

基金项目: 湖北省自然科学基金重点项目(2012FFA083); 南京中医药大学国家基金预研基金项目(14XYY03)

作者简介: 顾薇, 女, 硕士, 讲师 Tel: (025)85811506 E-mail: yxixiong163@163.com *通信作者: 杨希雄, 男, 博士, 教授, 博导 Tel: (0724)2353001 E-mail: yxixiong163@163.com

Pharmaceutical Properties and Anti-tumor Study of 9-Nitrocamptothecin Stealth Liposome Modified by NGR Polypeptides

GU Wei¹, CHEN Jun¹, PENG Pei², HU Mengya¹, LU Shanshan¹, YANG Xixiong^{2*} (1.School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2.College of Chemical Engineering and Pharmacy, Jingchu University of Technology, Jingmen 448000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the pharmaceutical properties and anti-tumor activity of 9-nitrocamptothecin(9-NC) stealth liposome between NGR polypeptides modification and unmodified group. **METHODS** Liposome was prepared using film-ultrasonic method, and its pharmaceutical properties, such as entrapment efficiency, release *in vitro*, lactone stability, were compared between modified and unmodified group. Based on HT1080 cells model, MTT method was used to investigate the effect on the growth of cells between NGR modified and unmodified group. Flow cytometry experiments were conducted to compare entry effect between two groups. **RESULTS** No significant differences were observed between liposome modified by NGR polypeptide and unmodified group in terms of pharmaceutical properties, release degree *in vitro*, and lactone stability. However, the experimental results showed that inhibition rate of HT1080 cells in the modified 9-NC stealth liposome increased significantly than that in unmodified group($P<0.05$). Further, HT1080 uptake rate of NGR-modified liposome was significantly higher than unmodified liposomes. **CONCLUSION** While from the point of pharmaceutical properties, NGR polypeptides modified liposome show no significant difference, their antitumor effect and uptake efficiency are higher than unmodified group. **KEY WORDS:** NGR; 9-nitrocamptothecin; stealth liposome; anti-tumor

9-硝基喜树碱(9-nitrocamptothecin, 9-NC)是美国 Supergen 公司研制的新型喜树碱衍生物,其临床前药理学研究显示该药具有理想的抗肿瘤作用^[1-3]。研究表明,经过大豆磷脂(SPC),氢化大豆磷脂(HSPC)复合磷脂脂质体修饰能克服 9-NC 水溶性差的缺陷,且同时使其具有更好的被动靶向性^[4];而用二硬脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000(DSPE-PEG2000)来对脂质体表面进行修饰制备隐形脂质体,可提高其亲水性,使其避免网状内皮系统巨噬细胞的摄取^[5-6],实现在肿瘤部位富集有效浓度从而达到在体内长循环的目的。

研究表明,肿瘤的生长与内皮细胞上的氨肽酶 NPN/CD13 高度表达密切相关^[7-8],因此抑制氨肽酶的活性,就可以有效地抑制肿瘤的侵袭和转移以及肿瘤新生血管的生成。NGR 是含精氨酸-甘氨酸-天冬酰胺(Asn-Gly-Arg)基序的多肽,是氨肽酶 N(APN/CD13)的配体,能够通过受体 CD13 结合来影响新生血管的生长,达到抗肿瘤的效果。彭佩等^[9]选用香豆素-6 作为荧光探针考察 NGR 修饰脂质体的体外靶向性与入胞特点,发现 NGR 修饰的隐形脂质体具有明显主动靶向特性和抗肿瘤活性。

本实验采用合成 NGR 导向化合物,对 9-NC 隐形脂质体进行修饰,对修饰前后的 9-NC 隐形脂质体进行药剂学性质、体外释放度与内酯稳定性的比较;同时选用 CD13 高表达的 HT1080 纤维瘤

作为模型,对 NGR 修饰与未修饰的 9-NC 隐形脂质体进行体外抗肿瘤研究;以香豆素-6 作为荧光探针,流式细胞仪考察 NGR 修饰与未修饰组的入胞效果。

1 仪器与材料

1.1 仪器

FC500 MPL 型流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司);PCS3000 型 Nano ZS90 纳米粒径测定仪(Malvern);TK-12D 型透皮扩散仪(上海科技贸易有限公司);LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津);INCO108 型 CO₂ 细胞培养箱(美国 thermo scientificforma);XD-202 倒置显微镜(江南永新);SpectraMax M5 酶标仪(Molecular Devices);FD-1A-50 冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

9-硝基喜树碱(特鲁比康公司,批号:20101105,纯度>99%);香豆素-6[3-(2'-苯并噻唑基)-7-二乙基氨基香豆素](美国 Sigma-Aldrich,含量≥99%,批号:1001312327);赖氨酸-天冬酰胺-甘氨酸-精氨酸-甘氨酸序列的多肽(KNGRG),强耀生物科技有限公司,批号:2012CK03229020,纯度>98%);N,N'-二异丙基乙胺(DIPEA)、N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)、1-羟基苯并三唑(HOBt)均为美国 Sigma 公司,分析纯;N-甲基吡咯烷酮(NMP,德国 Merck 公司,分析纯);DSPE-PEG2000-CH₂-COOH(批号:

225673, 纯度 >98%)、DSPE-PEG2000(批号 2120042-01, 纯度>98%)均为上海艾韦特医药科技有限公司提供;胆固醇(国药集团化学试剂有限公司, 分析纯, 批号: F20111010)、HSPC(批号: 2110392-01)、SPC(批号: 790610-4)均为德国 Lipoid 公司提供; RPMI1640 完全培养基(南京凯基生物科技发展有限公司); PBS、胰酶、胎牛血清、青霉素和链霉素(Gibco); PBS、RPMI1640 不完全培养基(HyClone); DMSO(细胞实验用, Biolink); 乙腈(色谱纯); 甲醇(色谱纯); 其他试剂均为分析纯。

1.3 细胞及培养条件

HT1080 人成纤维肉瘤细胞(南京凯基生物科技发展有限公司)。培养条件: 含 10%胎牛血清、青霉素和链霉素的完全 RPMI-1640 培养基, CO₂ 培养箱 37 °C、95%湿度、5% CO₂。

2 方法

2.1 NGR 导向化合物 DSPE-PEG2000-NGR 的制备^[9]

称取 DSPE-PEG2000-CH₂-COOH 50.0 mg、DCC 4.4 mg、HOBT 2.8 mg 共同溶解于 NMP 中, 加入 10 μL DIPEA, 放置在西林瓶中, 室温搅拌 30 min, 再加入 1.2 倍摩尔量的多肽 KNGRG, 室温搅拌过夜。西林瓶中反应液转移至再生纤维素型透析袋中, 每隔 30 min 换 1 次透析液, 透析液为去离子水, 透析 8~10 h。将透析液转移到瓶中, 冷冻过夜。然后冷冻干燥得到白色针尖状冻干粉末, 得到 NGR 导向化合物 DSPE-PEG2000-NGR。

2.2 脂质体的制备^[9]

按磷脂(SPC:HSPC=9:1):胆固醇:DSPE-PEG2000:DSPE-PEG2000-NGR=55:40:4.68:0.32(摩尔比)和适量 9-NC(药脂比 1:60, 质量比)溶于乙醇中, 于 60 °C 下减压旋转蒸发 100 min 成膜, 40 °C 真空干燥过夜。取适量 pH 5.9 PBS 水合 1 h, 得到的混悬液探头超声(60 °C, 400 W, 100 次), 即得 NGR 多肽修饰的 9-NC 隐形脂质体。同法制得磷脂(SPC:HSPC=9:1):胆固醇:DSPE-PEG 2000=55:40:5(摩尔比)的 9-NC 隐形脂质体, 即不加 NGR 导向化合物的 9-NC 隐形脂质体和空白脂质体(不加 9-NC 和 NGR 导向化合物)。NGR 多肽修饰的香豆素-6 隐形脂质体与不加 NGR 导向化合物的香豆素-6 隐形脂质体的制备方法同文献[9]。

2.3 包封率和产率的测定

取“2.2”项下制备的 NGR 修饰的 9-NC 隐形

脂质体、未修饰的 9-NC 隐形脂质体和空白脂质体, 按文献[10]方法分别测定脂质体中药物含量和游离药物含量, 由此测定包封率和产率。

2.4 粒径、多分散系数(polydispersity index, PDI)、Zeta 电位的测定

取“2.2”项下制备的 NGR 修饰的 9-NC 隐形脂质体、未修饰的 9-NC 隐形脂质体和空白脂质体, 采用纳米粒径测定仪, 以超纯水为分散介质, 测定脂质体的平均粒径、PDI 和 Zeta 电位。在实际测定前, 需要将待测样品用超纯水稀释, 使得计数率不超过 500 Kcps。

2.5 释放度试验

2.5.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5μm), 流动相: 乙腈-0.1%三乙胺(冰醋酸调 pH 6.5)=35:65, 流速: 1 mL·min⁻¹, 柱温: 40 °C, 检测波长: 373 nm, 进样量: 50 μL。

2.5.2 标准曲线 精密称取 9-NC 对照品 10 mg, 加入 2 mL DMSO 溶解, 并用甲醇定容到 10 mL, 取该贮备液 0.25 mL, 用甲醇稀释至 25.00 μg·mL⁻¹ 作为 9-NC 母液, 再分别配制成 0.125, 0.250, 0.500, 1.25, 2.50, 5.00 μg·mL⁻¹ 对照品溶液, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 进行线性回归。

测定精密度: 取高、中、低(5.00, 1.25, 0.125 μg·mL⁻¹)3 个浓度的 9-NC 对照品溶液, 连续进样 5 次, 连续测定 5 d。

测定回收率: 取 9-NC 内酯型对照品溶液, 用释放介质稀释到高、中、低(5.00, 1.25, 0.125 μg·mL⁻¹)3 个浓度, 按醋酸:样品=1:9 进行酸化, 涡旋, 离心, 进样测定 9-NC 浓度并计算平均回收率。

2.5.3 释放度试验 采用透析法, 释放介质为含 0.01%吐温 80 的 pH 7.4 等渗缓冲液。吸取 2 mL 去除游离药物的脂质体装入透析袋中, 迅速置于 50 mL 释放介质中, 37 °C 500 r·min⁻¹ 恒温磁力搅拌, 于不同时间点(10, 20, 40, 60, 120, 180, 240, 360, 480 和 600 min)吸取释放介质 0.9 mL 并且补充空白释放介质 0.9 mL, 取出的样品于常温保存。将所有样品按醋酸:样品=1:9 进行酸化, 涡旋 30 s, 样品高速离心(12 000 r·min⁻¹, 5 min)后, HPLC 测定释放介质中 9-NC 浓度。“0”点用甲醇将母液稀释相同倍数, 涡旋, 其他操作步骤同上。

游离组操作步骤同上, 所测药物为同浓度 9-NC 游离药物。

2.6 内酯稳定性试验

取“2.2”项下制备的 NGR 修饰的 9-NC 隐形脂质体、未修饰的 9-NC 隐形脂质体,以及同浓度 9-NC 游离药物,按文献[10]的方法分别于不同时间点测定脂质体中 9-NC 内酯型的含量和 9-NC 总含量(内酯型+羧酸盐型),由此计算不同时间点 9-NC 内酯型的比例。

2.7 体外抗肿瘤实验

2.7.1 细胞的形态学观察 取培养的 HT1080 细胞于倒置显微镜观察细胞的贴壁以及生长状况。

2.7.2 MTT 试验 取对数生长期的细胞以 8×10^3 个·孔⁻¹ 种于 96 孔板中,培养过夜备用。

脂质体离心过膜去除游离的 9-NC,用 DMSO 配制 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 9-NC 游离溶液作比较,用生理盐水配制 $50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 顺铂溶液作为阳性药。在无菌操作台上过 $0.22 \text{ } \mu\text{m}$ 的滤膜除菌。用 RPMI-1640 不完全培养基稀释药物至 25, 15, 10, 5, 2.5, $0.05 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 系列浓度。复孔加入 $100 \text{ } \mu\text{L}$ 上述配置完备的药物,每个样品平行 5 份,分为 NGR 修饰隐形脂质体组、未修饰隐形脂质体组、空白脂质体组、游离组和顺铂组。在培养箱中培养 24 h 后加入 $20 \text{ } \mu\text{L}$ $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ MTT 溶液,然后放入培养箱中孵育。4 h 后吸取上清液,弃去,每孔加入 $150 \text{ } \mu\text{L}$ 的 DMSO 溶解甲瓚,振荡 10 min 完全溶解以后在酶标仪测定 OD 值,测定波长 490 nm,平行 3 次,所得的 OD 值即为实验组 OD 值。

2.7.3 调零孔和对照孔修正 ①调零孔组:修正培养基对显色的干扰,复孔中只加入培养基,其他操作步骤与实验组相同,平行 2 份。②对照孔组:复孔中不加入药物,其他操作步骤与实验组相同,平行 3 份。

修正后的实验组 OD 值=实验组 OD 值-调零孔组 OD 值;修正后的对照孔组 OD 值=对照孔组 OD 值-调零孔组 OD 值;抑制率=(1-修正后的实验组 OD 值/修正后的对照孔组 OD 值)×100%。

2.8 流式细胞试验

取 HT1080 细胞种于 6 孔板中(1×10^6 个·孔⁻¹),待细胞贴壁后,分别加“2.2”项下制备的 NGR 修饰与未修饰的香豆素-6 隐形脂质体 1 mL,分别放置 10, 30, 60, 180, 360 min,于各点取细胞用 PBS 洗 3 遍,用胰酶消化后离心去上清,用 PBS 调整细胞悬浮液洗 3 次,用流式细胞仪测定平均荧光强度,实验重复 3 次。

3 结果

3.1 标准曲线考察

以 9-NC 的浓度(C)为横坐标,峰面积(W)为纵坐标,进行线性回归,得到标准曲线: $W=142\ 973C-6\ 196.4$, $r=0.999\ 9$,线性范围 $0.125 \sim 5.00 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3.2 精密度考察

高、中、低浓度($5.00, 1.25, 0.125 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)的 9-NC 对照品溶液的日内精密分别为 0.29%, 0.83%和 2.36%;连续 5 d 进样测定,日间精密分别为 0.72%, 2.15%和 2.68%。

3.3 回收率试验

高、中、低浓度($5.00, 1.25, 0.125 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)的 9-NC 对照品溶液的平均回收率分别为(103.2 ± 1.63)%, (99.6 ± 1.84)%和(96.1 ± 3.44)% ($n=3$)。

3.4 包封率和产率

9-NC 隐形脂质体经 NGR 多肽修饰前后其包封率与产率无显著影响,包封率均>80%,符合中国药典 2010 年版关于脂质体包封率不得<80%的规定,且重复性良好。结果见表 1。

表 1 包封率和产率的比较($n=3$)

Tab. 1 Comparison of encapsulation efficiency and yield($n=3$)

样品	总药浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	脂质体药物 浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	包封率/%	产率/%
未修饰的 9-NC 隐形脂质体	284.02 ± 3.58	257.76 ± 2.03	90.75 ± 0.43	94.69 ± 3.23
NGR 修饰的 9-NC 隐形脂质体	281.01 ± 2.91	243.80 ± 4.81	86.75 ± 0.96	88.31 ± 4.02

3.5 粒径、PDI 和表面电位

NGR 修饰的与未修饰的 9-NC 隐形脂质体粒径分布均一(PDI<0.2),且其粒径和 Zeta 电位相近,可见,NGR 修饰不改变脂质体药剂学性质。结果见表 2。

表 2 粒径、多分散系数与表面电位的比较($n=3$)

Tab. 2 Comparison of Zeta potential, particle size and PDI ($n=3$)

样品	粒径/nm	PDI	Zeta 电位
空白脂质体	100.4 ± 0.58	0.174 ± 0.006	-12.5 ± 0.60
未修饰的 9-NC 隐形脂质体	106.5 ± 1.44	0.191 ± 0.012	-19.6 ± 1.62
NGR 修饰的 9-NC 隐形脂质体	102.2 ± 1.21	0.169 ± 0.010	-23.9 ± 1.19

3.6 释放度

NGR 多肽修饰的与未修饰的 9-NC 隐形脂质体的体外释药曲线可知,是否经过 NGR 修饰的 9-NC 隐形脂质体其体外释放度相当。结果见图 1。

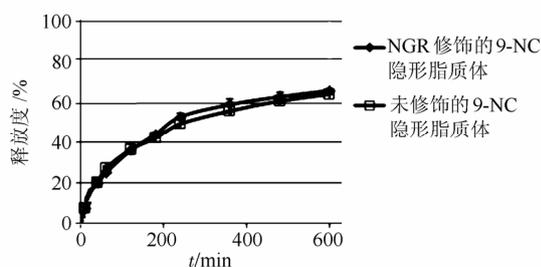


图1 释放度的比较($n=3$)

Fig. 1 Comparison of release *in vitro* ($n=3$)

3.7 内酯稳定性

2种9-NC隐形脂质体的内酯型比例的经时变化过程可知, NGR修饰前后的9-NC隐形脂质体相较游离药物均显示出显著的内酯稳定效果, 而NGR修饰过的隐形脂质体中显示出更优的内酯稳定性, 内酯型开环转变为羧酸盐型的速度明显减慢, 也就是说NGR修饰具有稳定脂质体中9-NC内酯型的作用, 从而使得2种形式之间的平衡向内酯型比例提高的方向移动。结果见图2。

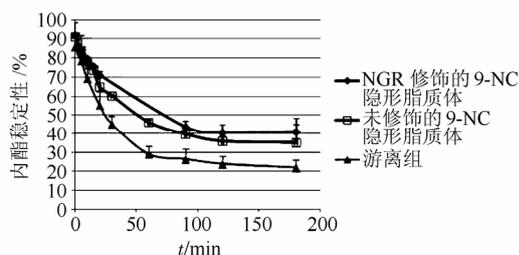


图2 内酯稳定性的比较($n=3$)

Fig. 2 Comparison of lactone stability ($n=3$)

3.8 HT1080细胞形态学观察^[11]

HT1080细胞正常培养时细胞饱满, 梭形, 核大明显, 结果见图3A。给NGR多肽修饰的9-NC隐形脂质体后培养24h, 可见大部分细胞形态不规则, 胞体皱缩, 核凝集, 细胞内出现许多空泡, 细胞密度下降, 见图3B。

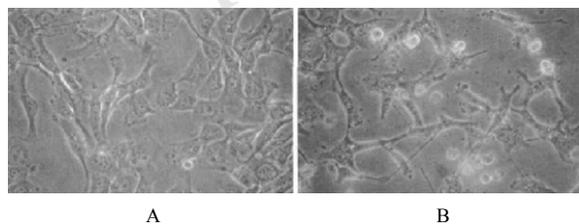


图3 HT1080细胞形态观察(40 \times)

A-HT1080正常培养; B-HT1080细胞给药处理24h后。

Fig. 3 Observation of cell morphology(40 \times)

A-normal morphology of HT1080; B-HT1080's morphology 24 h after administration.

3.9 MTT 试验

不同药物对HT1080细胞的抑制率结果可知, 随着9-NC浓度的提高, 其对HT1080细胞的抑制率提高。结果见图4。

利用SPSS软件计算半数抑制浓度(IC_{50}), 脂质体处理24h后, IC_{50} 与其95%可信限见表3, 其中顺铂为阳性对照, 空白脂质体为阴性对照。由表3中 IC_{50} 对比结果可以看出, NGR多肽修饰的9-NC隐形脂质体对HT1080细胞的抑制作用明显高于未修饰的9-NC隐形脂质体与游离药物。在浓度 $>10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, NGR多肽修饰的9-NC隐形脂质体与未修饰的9-NC隐形脂质体对HT1080细胞的抑制率经 t 检验, $P<0.05$, 有显著性差异。

体外细胞实验显示, NGR多肽修饰的9-NC隐形脂质体对HT1080细胞的抑制作用明显优于未修饰的9-NC隐形脂质体与游离药物。这是因为NGR可与HT1080上的CD13受体相结合, 起到靶向定位作用。未修饰的9-NC隐形脂质体与游离药物的抑制作用差别不大, 可能是因为游离药物是用DMSO溶解的, DMSO对细胞的穿透能力强, 溶解的9-NC随之进入细胞。

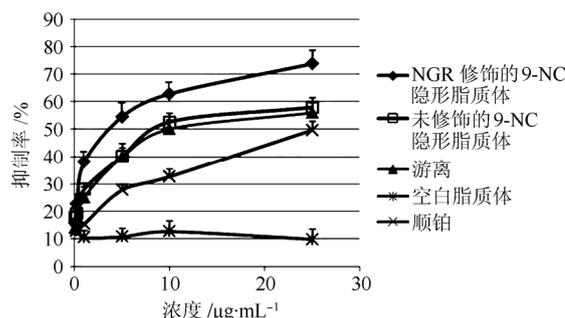


图4 对HT1080细胞抑制率的比较($n=3$)

Fig. 4 Inhibition rate to HT1080($n=3$)

表3 半数抑制浓度($n=3$)

Tab. 3 The half inhibition concentration($n=3$)

样品	$IC_{50}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	95%可信限/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
游离9-NC	18.365	7.969~26.727
未修饰的9-NC隐形脂质体	19.417	7.748~27.870
NGR修饰的9-NC隐形脂质体	4.510	3.087~6.588

3.10 流式细胞试验

流式细胞仪实验结果表明, CD13高表达的HT1080对NGR修饰香豆素-6隐形脂质体的摄取明显高于未修饰组。细胞摄取脂质体量在1h前随时间逐渐增加, 在1h后没有明显的变化, NGR修饰

组与未修饰组 2 种细胞摄取都呈时间依赖性。结果见图 5。

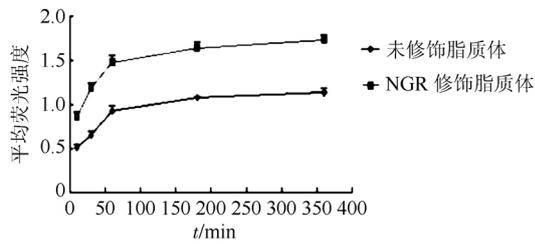


图 5 时间对 HT1080 摄取香豆素-6 隐形脂质体的影响 ($n=3$)

Fig. 5 Time of duration's influence on HT1080 uptake coumarin-6 stealth liposome ($n=3$)

4 讨论

本研究在前期研究的基础上，制备了磷脂比 HSPC : SPC=1 : 9 的 9-NC 复合磷脂隐形脂质体，并对其表面进行了 NGR 修饰，以实现脂质体的主动靶向作用。实验证实，NGR 修饰对 9-NC 隐形脂质体的包封率、粒径、表面电位，释放度和内酯稳定性均无显著影响，但是与未修饰组相比，NGR 修饰 9-NC 隐形脂质体对 HT1080 细胞的抑制率显著提高 ($P<0.05$)。

实验发现，NGR 修饰对 9-NC 隐形脂质体的药剂学性质和内酯稳定性均无显著影响，而 NGR 修饰 9-NC 隐形脂质体，对高表达 APN/CD13 的人成纤维肉瘤细胞 (HT1080) 的细胞毒性显著高于未修饰组，提示 NGR 修饰能够实现的 9-NC 脂质体的主动靶向药物传递。进一步流式细胞实验发现，NGR 修饰香豆素-6 脂质体在 APN/CD13 高表达的 HT1080 细胞中的转染效率显著高于未修饰组。由此证实 NGR 修饰脂质体可实现 CD13 高表达细胞的主动靶向功能，但其体内靶向传递性质与抗肿瘤效果仍有待进一步研究。

研究中发现，未修饰 9-NC 隐形脂质体的内酯稳定性和游离 9-NC 相比，明显提高，但是在 MTT 实验中，二者的 IC_{50} 却相差不大。可能是因

为 DMSO 溶解的游离药物，在与细胞接触过程中由于 DMSO 相对分子量较小、溶解度大使游离药物易穿透细胞，携带更多的药物进入细胞，而增加了游离药物 9-NC 的抗肿瘤作用。

REFERENCES

- [1] BERNACKI R J, PERA P, GAMBACORTA P, et al. *In vitro* antitumor activity of 9-nitrocamptothecin as a single agent and in combination with other antitumor drugs [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2000(922): 293-297.
- [2] AMORINO G P, HERCULES S K, MOHR P J, et al. Preclinical evaluation of the orally active camptothecin analog, RFS-2000(9-nitro-20(s)-camptothecin) as a radiation enhancer [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2000, 47(20): 503-509.
- [3] HUNG C L, DONIGER J, PALINI A, et al. 9-Nitrocamptothecin inhibits HIV-1 replication in human peripheral blood lymphocytes: a potential alternative for HIV-infection/AIDS therapy [J]. *J Med Virol*, 2001, 64(3): 238-244.
- [4] 陈军, 平其能, 蔡宝昌. 9-硝基喜树碱复合磷脂脂质体的研究[C]//2006 第六届中国药学会学术年会论文集. 广州: 中国药学会, 2006: 1411-1420.
- [5] CEH B, WINTERHALTER M, FREDERIK P M, et al. Stealth liposomes: from theory to product [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1997, 24(2/3): 75-87.
- [6] FATTEL L, CERUTI M, DOSIO F. From conventional to stealth liposomes: a new frontier in cancer chemotherapy [J]. *Tumori*, 2003, 89(3): 237-247.
- [7] HASHIDA H, TAKABAYASHI A, KANAI M, et al. Aminopetidase N is involved in cell motility and angiogenesis: its clinical significance in human clone cancer [J]. *Gastroenterology*, 2002, 122(2): 376-386.
- [8] IKEDMA N, NAKAJIMA Y, TOKUHARA T, et al. Clinical significance of aminopetidase N/CD13 expression in human pancreatic carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(4): 1503-1508.
- [9] PENG P, LIN A H, CHEN J, et al. Preparation of NGR-modified coumarin-6 containing stealth liposome and study on its *in vitro* cell uptake properties [J]. *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 2014, 34(6): 427-432.
- [10] GU W, CHEN J, ZHANG Y P, et al. Study on preparation of 9-nitrocamptothecin stealth liposomes composed of DPPC and SPC [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med* (南京中医药大学学报), 2014, 30(2): 168-172.
- [11] ZHOU H, HUANG X Y, YANG T, et al. Effect and mechanism of LY294002 on growth of fibrosarcoma cell line HT1080 [J]. *J Sichuan Univ* (Med Sci Ed) (四川大学学报: 医学版), 2010, 41(1): 20-23.

收稿日期: 2014-10-12