

转铁蛋白修饰的阿霉素隐形脂质体的制备及体外细胞试验

李学明^{1,2*}, 丁丽燕², 顾立², 周维娜², 平其能¹

(¹中国药科大学药剂学教研室, 南京 210009; ²南京工业大学制药与生命科学学院, 南京 210009)

摘要 目的: 用转铁蛋白(Tf)修饰盐酸阿霉素隐形脂质体(SL), 以增加药物在肿瘤部位的积蓄, 从而增加药物向肿瘤细胞内的转运。方法: 采用薄膜超声法制备空白脂质体, 硫酸铵梯度法装载盐酸阿霉素(DOX); 通过膜材 DSPE-PEG2000-COOH 上的活性羧基末端与 Tf 上的氨基连接制备 Tf 修饰的隐形脂质体(Tf-SL); 采用凝胶柱-UV 法测定脂质体中 DOX 的封装率, 双辛丁酸试剂盒测定蛋白结合效率; 通过流式细胞试验和激光共聚焦显微试验考察肝癌细胞 HepG2 对 SL 封装的 DOX(DOX-SL)及 Tf-SL 封装的 DOX(Tf-DOX-SL)的结合或摄取情况, 并观察两种脂质体对 HepG2 细胞的体外杀伤作用。结果: Tf-DOX-SL 的平均粒径为 (62 ± 17) nm, 药物平均封装率为 96.4%, 蛋白结合效率为 100.28 $\mu\text{g Tf}/\mu\text{mol}$ 磷脂。与 DOX-SL 相比, Tf-DOX-SL 与肝癌细胞 HepG2 的结合及摄取均增加。48 h 细胞毒试验表明 Tf-DOX-SL 对 HepG2 细胞的杀伤作用 ($\text{IC}_{50} = 20.4 \mu\text{mol/L}$) 明显优于 DOX-SL ($\text{IC}_{50} = 166.2 \mu\text{mol/L}$) ($P < 0.01$)。结论: Tf 修饰的隐形脂质体可作为肿瘤靶向的载体通过受体介导的方式促进 DOX 向肿瘤细胞内的传递。

关键词 阿霉素; 隐形脂质体; 转铁蛋白; 受体介导; 体外细胞实验

中图分类号 R944 文献标识码 A 文章编号 1000-5048(2008)02-0111-05

Preparation of doxorubicin-loaded stealth liposomes modified with transferrin and *in vitro* cell research

LI Xue-ming^{1,2*}, DING Li-yan², GU Li², ZHOU Wei-na², PING Qi-neng¹

¹Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009;

²College of Life Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China

Abstract **Aim:** To investigate the possibility of using stealth liposomes(SL) modified with transferrin (Tf) as a targeting carrier to increase the accumulation of doxorubicin (DOX) in tumor and hence enhance intracellular delivery of the encapsulated DOX. **Methods:** Liposomes containing DOX were prepared by film dispersion followed by ammonium sulfate gradient method. Tf-DOX-SL were prepared by binding free amino groups of Tf to carboxylic groups of DSPE-PEG2000-COOH. The entrapment efficiency of Tf-DOX-SL was determined by Sephadex G-50-UV. The average concentration of Tf conjugated to the liposomes was determined with a bicinchonic acid(BCA) protein assay. Flow cytometry and confocal microscopy were performed to evaluate the cellular association or uptake of Tf-DOX-SL or DOX-SL *in vitro*. Cytotoxicity on HepG2 cells *in vitro* was evaluated with MTT methods. **Results:** The results revealed that the mean size of the liposomes was (62 ± 17) nm and the entrapment efficiency was about 96.4%. The coupling efficiency was 100.28 $\mu\text{g Tf}/\mu\text{mol}$ phospholipids. The liposomes showed good shape, sustained-release rate and good stability. The cells treated with Tf-DOX-SL showed remarkable increase in cellular association or DOX uptake if compared to DOX-SL. 48 h Cytotoxicity assay showed that cytotoxicity of Tf-DOX-SL on HepG2 cells ($\text{IC}_{50} = 20.4 \mu\text{mol/L}$) was markedly less than that of DOX-SL ($\text{IC}_{50} = 166.2 \mu\text{mol/L}$) ($P < 0.01$). **Conclusion:** The Tf-modified SL could be a targeting carrier to facilitate the delivery of the encapsulated DOX into the tumor cells via receptor-mediated mechanism.

Key words doxorubicin; stealth liposomes; transferrin; receptor mediation; *in vitro* cell research

This study was supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province(No. BK2006177)

在疾病的治疗过程中,为了提高药效和减轻不良反应,药物定向输送和靶细胞特异治疗的研究越来越受到人们的关注。研究者正在探索药物定点和定向转运系统可能的应用方案,其中配体-受体介导的转运系统备受关注^[1]。隐形脂质体(stealth liposomes, SL)作为一种抗癌药物载体,能够在肿瘤组织中蓄积并显著提高药物的治疗指数。在隐形脂质体的表面用特异性配体(如叶酸、转铁蛋白或单克隆抗体等)进行修饰可进一步提高靶向性。

转铁蛋白(transferrin, Tf)和转铁蛋白受体(transferrin receptor, TfR)介导的内吞作用是生物体细胞最具特点的转运过程之一。由于恶性肿瘤细胞过度表达TfR,利用Tf-TfR转运途径,可明显增强抗癌药物的选择性、毒性和减少耐药性,从而增强疗效。利用Tf-TfR的转运途径,将药物特异性地转运至肿瘤部位及脑内发挥药效已取得进展^[2-4]。本课题以DSPE-PEG2000-COOH作为连接脂质,将TfR的配体Tf连接至盐酸阿霉素隐形脂质体,测定脂质体形态、粒径、稳定性、包封率,体外细胞结合、摄取与细胞毒等重要性质,为设计转铁蛋白修饰的主动靶向给药系统提供有效的调控方法。

1 材料

1.1 药品与试剂

盐酸阿霉素(DOX,浙江海正药业股份有限公司);二硬脂酸磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000-羧基交连物(DSPE-PEG2000-COOH)、胆固醇(Chol)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)(美国Avanti Polar Lipids公司);1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)、转铁蛋白(美国Sigma公司);*N*-羧基琥珀酰亚胺(S-NHS,上海延长生化科技有限公司);Sephacryl CL-4B(美国Pharmacia公司)。其他试剂均为分析纯,实验用水为三蒸水。

1.2 仪器

RE52-99型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);高速冷冻离心机(美国Eppendorf公司);AKTA prime plus蛋白快速层析系统(美国GE公司);超声波细胞粉碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司);JEM-2010 UHR高分辨透射电镜(日本

电子光学公司);Zetasizer 3000HSA型粒径分析仪(英国Malvern公司);FACS Calibur流式细胞仪(美国Becton Dickinson公司)。

2 方法

2.1 转铁蛋白修饰脂质体的制备^[5,6]

分别精密称取DSPC、Chol、DSPE-PEG2000-COOH(物质的量比为6:3:0.6)作为制备脂质体的膜材。膜材溶于有机溶剂(氯仿-甲醇,2:1)后置圆底烧瓶中于53℃水浴减压蒸发形成薄膜。加入250 mmol/L硫酸铵溶液适量,涡旋振荡,水浴超声。所得脂质体装于透析袋中,置盛有PBS(pH 7.4)100 mL的烧杯中,室温下透析5次,每次1 h。DOX用硫酸铵梯度法装载^[7]:将DOX固体粉末加到空白脂质体中,60℃水浴孵育1 h,并不时振荡,即得阿霉素隐形脂质体(DOX-SL)。

DOX-SL混悬于柠檬酸-磷酸盐溶液(pH 4.0)中,每10微摩尔膜材中分别加入0.5 mol/L EDC和0.5 mol/L S-NHS的水溶液各360 μL,室温下反应10 min。然后用1 mol/L NaOH调pH至7.5,每微摩尔磷脂(DSPC和DSPE-PEG2000-COOH)中加入Tf 125 μg,4℃搅拌8 h,即得转铁蛋白修饰的阿霉素隐形脂质体(Tf-DOX-SL)。Sephacryl CL-4B去除游离Tf,所得脂质体于4℃冷藏备用。

2.2 脂质体包封率的测定

精密量取载药脂质体混悬液0.5 mL加至预先用PBS(pH 7.4)平衡好的Sephadex G-50分子筛凝胶柱上,用PBS洗脱,收集480 nm处有吸收的第一峰(DOX-SL)的红色洗脱液直至吸收度接近空白,得到除去游离DOX的含药脂质体溶液共8 mL。取1 mL置10 mL量瓶中,加入乙醇-异丙醇(1:4)使脂质体完全破裂,用三蒸水定容,摇匀,于480 nm处测定吸收度,计算包封率。并每隔7 d取样品,两周内测定脂质体的包封率,计算贮存过程中的渗漏率。

2.3 脂质体中磷脂含量的测定^[8]

取Tf-DOX-SL 200 μL,先用乙醇-异丙醇破膜1 h,氮气流下吹干,再溶于氯仿2 mL中,加显色剂2 mL,涡旋离心,硫氰铁铵显色法测定磷脂含量。

2.4 BCA试剂盒测定蛋白结合效率

精密量取Tf-DOX-SL 0.1 mL,加入甲醇0.4 mL,涡旋,9 000 r/min离心10 s;再加入氯仿0.2

mL, 涡旋, 9 000 r/min 离心 10 s; 加入水 0.3 mL, 涡旋, 9 000 r/min 离心 1 min, 小心除去上层。在氯仿相和析出的蛋白层中加入甲醇 0.3 mL。混合样品, 9 000 r/min 离心 2 min。除去上清液, 氮气流下干燥蛋白。所得的蛋白溶于 PBS (pH 7.4) 0.1 mL 中, 双辛丁酸 (bicinchoninic acid, BCA) 试剂盒测定蛋白含量。蛋白结合效率以 $\mu\text{g Tf}/\mu\text{mol PL}$ 表示。

2.5 流式细胞实验考察细胞与 DOX 的结合

HepG2 细胞生长层单层, 经胰酶消化后用新鲜的培养液洗 1 次, 吸取一定量的细胞混悬液分别与 Tf-DOX-SL、DOX-SL 及 DOX 溶液 (DOX 质量浓度均为 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$) 在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中孵育 2 h, 孵育完毕用冷的 PBS 洗 3 次, 流式细胞仪测定与细胞结合的 DOX 荧光强度 (激发波长为 488 nm, 测定波长为 560 nm)。

2.6 激光共聚实验考察细胞对 DOX 的摄取

HepG2 细胞种植于盖玻片上, 贴壁生长至 50% 汇集, 加入 Tf-DOX-SL、DOX-SL、DOX 溶液 (DOX 质量浓度均为 $6.0 \mu\text{g}/\text{mL}$), 置 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱内培养 1 h, 依次用 PBS 缓冲液漂洗 3 次, 95% 乙醇固定, 30% PBS 甘油封片。用激光扫描共聚焦显微镜以 480 nm 波长的激光束激发 DOX (激发波长 480 nm, 检测波长 540 nm) 进行图象分析。

2.7 体外细胞毒试验

HepG2 细胞在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱内培养。取对数生长期的细胞, 稀释成每毫升 0.4×10^4 个细胞, 加在 96 孔培养板上, 每孔 $100 \mu\text{L}$; 分别加入 Tf-DOX-SL、DOX-SL、DOX 溶液及 RPMI 1640 (对照组), DOX 每组设 6 个浓度, 分别为 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 分别培养 8 h; 用冷的 PBS 洗 3 次, 继续孵育 40 h, 每孔加入 MTT 溶液 ($5 \text{ mg}/\text{mL}$) $20 \mu\text{L}$, 孵箱内孵育 4 h, 置酶标仪上检测, 检测波长 570 nm。

3 结果

3.1 脂质体的形态、粒径和 Zeta 电位

以纯水适当稀释 Tf-DOX-SL, 将其吸附于敷有支撑膜的铜网上, 自然晾干后置透射电镜下。结果显示: 脂质体粒度分布较窄, 圆整度和分散度均较好。以纯水为分散介质, 利用粒径仪测得 Tf-DOX-SL 的粒径大部分集中于 $43 \sim 78 \text{ nm}$ 处, 平均粒径为 $(62 \pm 17) \text{ nm}$, Zeta 电位为 $-(30.33 \pm 2.08) \text{ mV}$ 。

3.2 包封率的测定

按照 UV-Sephadex 法测定 DOX-SL 的包封率。过 Sephadex G-50 柱时, 可明显看到 DOX-SL 色带的快速下移, 肉眼未见游离 DOX 的红色色带。从洗脱曲线 (图 1) 中可以看出, 游离 DOX 从 63 min 左右开始被洗脱下来, DOX-SL 从 21 min 开始被洗脱下来, 两者可以完全分离。3 批样品的包封率分别为 96.4%、95.5% 和 96.8%, 样品含药浓度分别为 0.540、0.508 和 0.527 mg/mL 。两周内 DOX 的渗漏率为 0.9%, 符合脂质体贮藏期间渗漏率检查的要求。

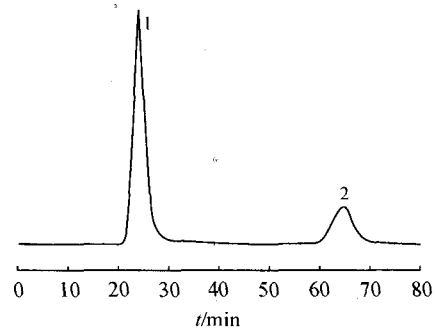


Figure 1 Elution profiles of doxorubicin-stealth liposomes (DOX-SL) (1) and DOX (2)

3.3 蛋白结合效率的测定

蛋白结合效率按 BCA 试剂盒操作说明进行, 其标准曲线为 $A = -6\text{E-}08c^2 + 0.0007c + 0.0099$ ($r = 0.9996$, $n = 9$), 检测范围为 $20 \sim 2000 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。Tf-DOX-SL 的磷脂含量为 $(7.26 \pm 0.20) \mu\text{mol}/\text{mL}$, 蛋白含量为 $(760 \pm 32.43) \mu\text{g}/\text{mL}$, 转铁蛋白的结合效率为 $100.28 \mu\text{g Tf}/\mu\text{mol 磷脂}$ 。

3.4 流式细胞试验

图 2 可见, HepG2 细胞与 Tf-DOX-SL、DOX-SL 及 DOX 溶液分别共同孵育 2 h 后, 与细胞结合的 DOX 的荧光强度从大到小依次为: DOX 溶液、Tf-DOX-SL、DOX-SL。与 DOX-SL 相比, HepG2 细胞与 Tf-DOX-SL 孵育后, 与细胞结合的 DOX 的浓度增加。

3.5 激光共聚焦试验

利用激光共聚焦显微镜法考察 HepG2 细胞对 DOX 的摄取, 结果见图 3。HepG2 细胞与不同 DOX 制剂共同孵育后, Tf-DOX-SL 组 HepG2 细胞内的 DOX 荧光强度明显高于 DOX-SL 组, DOX 溶液组细胞内荧光强度最大。这一结果与流式细胞试验结果相似, 表明 Tf 修饰脂质体后能够促进药物向细胞内传递。

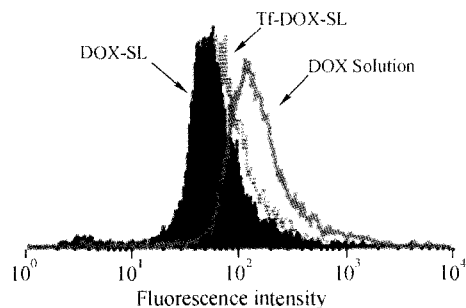


Figure 2 Flow cytometric measurement of doxorubicin (DOX) uptake by HepG2 cells after incubated with three preparations

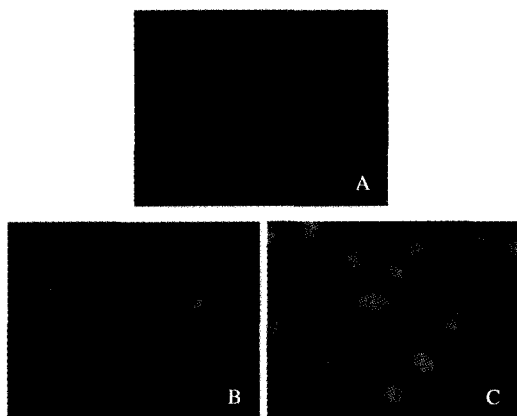
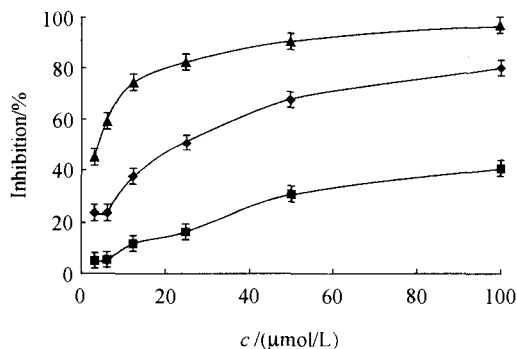


Figure 3 Confocal microscopy of HepG2 cells after incubation with DOX-SL (A), Tf-DOX-SL (B) and DOX solution (C) for 1 h at 37 °C. All three DOX formulations having DOX concentration of 6.0 μg/mL

3.6 体外细胞毒实验

48 h 细胞毒实验结果 (见图 4) 表明, Tf-DOX-SL 对肝癌细胞 HepG2 的杀伤作用显著优于 DOX-SL (两者的 IC_{50} 分别为 20.4 μmol/L 和 166.2 μmol/L, $P < 0.01$)。在 DOX 浓度达到 100 μmol/L 时, DOX 溶液对肝癌细胞的杀伤率达 96.8%, Tf-DOX-SL 则为 80.2%, 而 DOX-SL 仅为 40.3%。



—▲— DOX solution; —◆— Tf-DOX-SL; —■— DOX-SL

Figure 4 48 h Cytotoxicity assay of the three preparations of DOX to HepG2 cells

4 讨论

本实验用交联剂将 Tf 通过共价结合的方式连接到脂质体表面, 交联剂选择不合适或反应条件不当, 交联率则可能较低, 交联过程也可能影响脂质体或药物的稳定性。本文参照文献方法^[5,9], 利用 EDC 和 S-NHS 为交联剂, 将 Tf 连接到脂质体表面。EDC 与脂质体上的羧基反应, 形成氨基反应活性的 σ -酰基脲中间体。该中间体在水溶液中很不稳定, 易水解暴露出羧基以及 N-酰基脲。通过加入 S-NHS, 可以将该中间体转化为氨基反应活性的 S-NHS 酯, 大大提高了 EDC 介导的缩合反应的效率, 从而提高了蛋白结合效率。

流式细胞分析法测定的是与细胞结合的所有 DOX 的荧光强度, 包括吸附在细胞表面的 DOX、细胞内的 DOX 以及被吸附或被内吞的脂质体 DOX。DOX 溶液与细胞共同孵育后所测得的 DOX 荧光强度远高于与两种 DOX 脂质体孵育后的荧光强度, 需要指出的是, DOX 包载入脂质体后, 其荧光可能猝灭^[10], 结果使实际测得的荧光强度偏低。细胞毒实验表明在 DOX 浓度达到 100 μmol/L 时, Tf-DOX-SL 对肝癌细胞的杀伤率达 80.2%, 而 DOX-SL 仅为 40.31%, 两者相比差异有显著性 ($P < 0.01$), 说明 Tf-DOX-SL 对肝癌细胞有高效杀伤作用。虽然体外实验中游离的 DOX 更容易进入肿瘤细胞, 所产生的细胞毒也最大, 但在体内情况却不一样, 静脉注射游离的 DOX 或 DOX-SL 后, 游离的 DOX 在体内迅速被清除, 导致血药浓度迅速降低, 从而到达肿瘤组织的 DOX 浓度也远低于其脂质体。有研究表明, 游离的 DOX 在体内的清除速率是 PEG 修饰的 DOX 脂质体的 450 倍^[10]。

运用现代分子设计思想和先进合成技术在 DOX-SL 表面用 Tf 进行修饰, 使其具有靶器官、靶组织和靶细胞所要求的选择性, 是 Tf 靶向制剂研究的发展趋势。DOX-SL 表面的活性羧基是其化学修饰的最佳位点^[5]。本实验探讨了 Tf 修饰的 DOX-SL 形态、粒径、稳定性、包封率、蛋白结合效率、体外细胞结合及细胞毒等性质, 为进一步研究 Tf-DOX-SL 在体内的相关特征等提供了实验依据和参考。

致谢: 细胞实验得到了中国药科大学郭青龙教授的指导和帮助。

参考文献

- [1] Vyas SP, Sihorkar V. Endogenous carriers and ligands in non-immunogenic site-specific drug delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2000, **43**(2-3):101-164.
- [2] 顾希平(Gu XP), 裴元英(Pei YY). 转铁蛋白作为主动靶向载体的研究进展[J]. *中国药学杂志(Chin Pharm J)*, 2005, **40**(8):568-571.
- [3] 常彦忠(Chang YZ), 袁其朋(Yuan QP), 钱忠明(Qian ZM). 转铁蛋白-转铁蛋白受体系统在药物运输和定向给药中的应用[J]. *药学通报(Chin Pharm Bull)*, 2003, **48**(3):213-218.
- [4] Kobayashi T, Ishida T, Okada Y, et al. Effect of transferrin receptor-targeted liposomal doxorubicin in P-glycoprotein-mediated drug resistant tumor cells[J]. *Int J Pharm*, 2007, **329**(1-2):94-102.
- [5] Anabousi S, Laue M, Lehr CM, et al. Assessing transferrin modification of liposomes by atomic force microscopy and transmission electron microscopy[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2005, **60**(2):295-303.
- [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):1 042-1 048.
- [7] Fritze A, Hens F, Kimpfler A, et al. Remote loading of doxorubicin into liposomes driven by a transmembrane phosphate gradient [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, **1758**(10):1 633-1 640.
- [8] 吴道澄(Wu DC), 席晓莉(Xi XL), 胡佳慧(Hu JH). 分光光度法测定阿霉素脂质体中的磷脂含量[J]. *解放军药学报(Pharm J Chin PLA)*, 1999, **15**(3):48-49.
- [9] Grabarek Z, Gergely J. Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters[J]. *Anal Biochem*, 1990, **185**(1):131-135.
- [10] 熊小兵(Xiong XB), 黄悦(Huang Y), 吕万良(Lü WL), 等. RGD类似物修饰的阿霉素隐形脂质体的制备及体外细胞结合试验[J]. *药学报(Acta Pharm Sin)*, 2005, **40**(12):1 085-1 090.

· 会 讯 ·

2008年中国药学会学术年会

2008年中国药学会学术年会定于10月17~20日在河北省石家庄市举行。2008年中国药学会学术年会是贯彻落实党的十七大精神的一次会议,也是中国药学会进入新的一百年后第一次召开的我国药学界的综合性学术盛会。

大会通过对中药和天然药物等16个专业领域发展历程,面对我国药学领域科技发展问题,进行深入交流和研讨,对药学科发展现状和前景进行分析研究,提出药学各分支学科发展趋势,为创新型国家建设和构建和谐社会贡献力量。年会将邀请我国医药卫生及科技领域政府部门领导和院士及药学专家等作主会场大会报告,同时进行6个分会场专题报告及论文学术交流,并设有中国医药企业创新论坛、医药科技成果展览论文壁报以及全球医院药学未来发展大会汇报交流会、药物临床评价研讨会、合理用药报告会卫星会议等活动。

· 会议时间和地点

时间:2008年10月17-20日

地点:河北省石家庄市

· 联系方式

中国药学会:北京市朝阳区建外大街四号建外SOHO九号楼18层1802室

学术部联系人:孙文虹、鲁毅(010-58699275-819/820)

邮编:100022 传真:010-58699125

E-mail:sunwenhong2002@163.com