

脂质-磷酸钙核/壳纳米粒作为抗肿瘤药物载体的初步研究

缪云秋^{1,2}, 何淑芳², 梁金英², 柯 琴², 张馨欣^{2*}, 王 瑞^{1*}, 甘 勇²

(1. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203; 2. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203)

摘要: 本文拟构建一种新型的脂质-磷酸钙核/壳纳米粒 (lipid bilayer-coated calcium phosphate nanoparticles, LCAPNs) 可在胞内溶解实现迅速释药, 以提高抗肿瘤药物对肿瘤细胞的杀伤活性。采用薄膜分散法合成了包载紫杉醇 (paclitaxel, PTX) 的脂质-磷酸钙核/壳纳米粒 (lipid bilayer-coated calcium phosphate nanoparticles loaded with PTX, PTX-LCAPNs), 并对其进行了形态、粒度和体外释放行为的表征。同时, 以人肝癌细胞 Huh-7 为细胞模型, 考察载体的细胞摄取、胞内溶解特性、药物胞内蓄积量和抗肿瘤活性。研究结果表明: LCAPNs 在透射电镜下呈球形, 平均粒径为 124.73 ± 6.41 nm。载体在体外模拟正常生理 pH 条件下 PTX 泄漏量低, 而在胞内酸性 pH 环境中快速释药。另外, LCAPNs 可有效提高 Huh-7 细胞对药物的摄取量, 并且在胞内溶解以快速释药。PTX-LCAPNs 显著增加 PTX 对肿瘤细胞的杀伤力, 将包载紫杉醇的磷酸钙纳米粒 (calcium phosphate nanoparticles loaded with PTX, PTX-CAPNs) 的胞内药物浓度提高了 1.7 倍, 半数抑制浓度 (IC_{50}) 降低了约 5 倍, 抗肿瘤效果显著增强。

关键词: 磷酸钙; 纳米粒; 紫杉醇; 释药; 抗肿瘤药物

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 06-0977-08

Preliminary study of lipid bilayer-coated calcium phosphate nanoparticles as a drug carrier for antitumor drug

MIAO Yun-qiu^{1,2}, HE Shu-fang², LIANG Jin-ying², KE Qin², ZHANG Xin-xin^{2*},
WANG Rui^{1*}, GAN Yong²

(1. School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

2. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

Abstract: This study aims to prepare lipid bilayer-coated calcium phosphate core-shell nanoparticles (LCAPNs), which can dissolve in an acidic environment to improve the tumor cell toxicity of antitumor drug. Paclitaxel (PTX) loaded lipid coated calcium phosphate nanoparticles (PTX-LCAPNs) were prepared by thin-film dispersion method. The morphology, particle size and *in vitro* release behavior were characterized. Meanwhile, the intracellular uptake, intracellular dissolution, cell toxicity of PTX-LCAPNs and intracellular accumulation of PTX were evaluated in human HCC cell line (Huh-7). The results suggested that the mean diameter of the spherical LCAPNs was 124.73 ± 6.41 nm. The PTX-LCAPNs demonstrated little drug leakage in simulated normal physiological conditions, while a rapid release was observed in simulated intracellular condition *in vitro*. Moreover, the PTX-LCAPNs achieved 1.7 fold improvement in the intracellular PTX concentration leading to 5-fold reduction in half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values of PTX compared with calcium phosphate nanoparticles loaded with PTX (PTX-CAPNs), demonstrating a stronger

收稿日期: 2017-01-12; 修回日期: 2017-03-01.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81571796).

*通讯作者 Tel: 86-21-51322181, Fax: 86-21-51322519, E-mail: ellewang@163.com;

Tel / Fax: 86-21-20231000-1424, E-mail: xinxinzhang@simm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0052

cancer cell lethality.

Key words: calcium phosphate; nanoparticle; paclitaxel; drug release; antitumor drug

肿瘤是严重威胁人类健康的一大类疾病,居各类疾病死亡率的第二位,针对肿瘤药物递药系统方面的研发已经成为目前医药领域的热点。常见的纳米载体递药系统包括脂质体、聚合物纳米粒及囊泡等,具有增加难溶性药物的溶解度、减少药物对正常组织的损伤并提高药物抗肿瘤作用等功效^[1]。然而传统的纳米制剂,如普通的脂质体,由于其在体液中的理化性质不稳定,注射后在到达肿瘤部位前,聚集、沉积、破裂等原因产生一定的药物泄露^[2-5],而进入肿瘤组织后药物释放也较慢,导致肿瘤组织内药物浓度较低,生物利用度不高,对正常组织及器官造成严重损伤的同时,也限制了临床治疗效果^[6]。因此,需要新型的药物传递系统以提高药物抗肿瘤疗效。

磷酸钙 (calcium phosphate, CAP) 是一种天然的生物材料,具有良好的生物安全性和可降解性。CAP 类物质可与多种药物和生物活性物质结合,且不会使结合的药物失去活性,因此可用作药物载体。已有文献^[7]报道将 CAP 类物质作为抗生素、蛋白质、生长因子及抗癌药物的载体。磷酸钙纳米粒 (calcium phosphate nanoparticles, CAPNs) 作为载体材料,具有生物相容性好、比表面积大、无不良反应、不像脂质体易被巨噬细胞摄取及具有较好载药性能等一系列优点。最重要的是 CAP 对酸敏感^[8],在肿瘤酸性环境下可以快速释药,使肿瘤部位的药物浓度有所提高,进而增强抗肿瘤作用,但 CAP 在一定程度上也存在到达肿瘤组织前的药物泄露问题。此外,尽管磷酸钙具有较好的生物相容性,但是作为无机材料,其细胞摄取水平不高,降低了药物疗效。因此,在 CAP 上包裹一层脂质膜,可减少制剂到达肿瘤前的药物泄露,提高细胞摄取,延长体内循环时间。

本研究设计了一种将磷酸钙与脂质体相结合的核/壳纳米粒 (LCAPNs) 药物递送系统,以抗肿瘤药物紫杉醇 (paclitaxel, PTX) 为模型药物,制备了包载 PTX 的脂质-磷酸钙核/壳纳米粒 (PTX-LCAPNs)。一方面,脂质膜可以有效保护包载的药物,减少制剂到达肿瘤前的泄露;另一方面,磷酸钙纳米粒的酸溶解性使得药物实现在胞内的迅速释放,发挥药效。此外,该载体有利于增加细胞摄取,提高药物在细胞内的蓄积,进一步提高药效。在构建载体的基础上,本研究对 LCAPNs 进行了表征,并评价了其细胞摄取、胞

内溶解特性及体外抗肿瘤活性。

材料与方法

材料与试剂 PTX 原料药 (含量 > 99%, 大连美仑生物技术有限公司); 泊洛沙姆 188 (Poloxamer 188, Pluronic F68)、聚氧乙烯蓖麻油 (Cremophor EL)、泊洛沙姆 407 (Poloxamer 407, Pluronic F127) (德国 BASF 公司); 卵磷脂 E80 (德国 Lipoid 公司); 海藻酸钠 (青岛晶岩生物科技开发有限公司); 胎牛血清 (美国 Hyclone 公司); DMEM 培养基 (美国 Gibico 公司); 异硫氰酸罗丹明 B (Rhodamine B isothiocyanate, RITC, 阿拉丁化学试剂有限公司); 胆固醇、(3-氨基丙基) 三乙氧基硅烷 (3-aminopropyltriethoxysilane, APTES) (国药集团化学试剂有限公司); 超纯水 (MiliQ); Fluo-3-乙酰氧基甲基酯 (Fluo-3-acetoxymethyl ester, Fluo-3 AM), Hoechst 33342 (上海翊圣生物科技有限公司); MTT、DAPI (碧云天生物技术公司); 其他试剂均为色谱纯。

主要仪器 Agilent 1200 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); Zetasizer Nano ZS 粒度仪 (英国 Malvern 公司); JEM-2100F 型透射电镜 (日本 JEOL 公司); CO₂ 培养箱 Binder 150L (德国 Binder 公司); FV1000 型激光共聚焦显微镜 (日本 Olympus 公司); BD FACS Calibur 型流式细胞仪 (美国 Becton Dickinson 公司); Synergy H1 多功能酶标仪 (美国 BioTek 公司); 旋转蒸发仪、加热磁力搅拌器、恒温摇床 IKA KS 3000i (德国 IKA 公司); Allegra 64R 高速冷冻离心机 (美国 Beckman Coulter 公司); 红外光谱仪 (IS5-FT-IR, 美国 Thermo 公司)。

细胞模型 人肝癌 Huh-7 细胞株 (中国科学院上海药物研究所) 培养于含 10% 胎牛血清 DMEM 培养液中,在 37 °C、5% CO₂ 孵箱中孵育,每 1~2 天更换一次培养液。

HPLC 色谱条件 色谱柱 Agilent Zorbax SB-C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为水-乙腈 (45 : 55), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 227 nm, 进样量 50 μL。

CAPNs 的制备 精密称取泊洛沙姆 188 (F68) 1.4 g 于 70 mL 去离子水中,40 °C 加热搅拌,待溶液澄清后,加入海藻酸钠溶液 (2 mg·mL⁻¹) 10 mL, 搅

拌 1 h 后, 依次加入 $25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 15 mL 和 $25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$ 10 mL, 并用氨水调 pH 为 10, 继续搅拌 24 h, 离心收集沉淀, 以水和乙醇交替清洗, 再离心收集沉淀, 4°C 保存^[9]。

载 PTX 载体的制备

PTX-CAPNs 的制备 取 CAPNs 10 mg 分散于 1 mL 水中, 将 PTX 4 mg 和十八胺 4 mg 加热溶于 10% 无水乙醇和 90% 聚氧乙烯蓖麻油中配制成 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的油溶液, 并将 PTX 油溶液加入到 CAPNs 水溶液中, 避光搅拌 24 h, 离心收集沉淀, 以 pH 7.4 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) 清洗, 即得 PTX-CAPNs, 4°C 保存。

PTX-LCAPNs 的制备 称取 E80 15 mg、胆固醇 1.5 mg 于圆底烧瓶中, 氯仿适量溶解, 40°C 旋转蒸发除去有机溶剂, 形成均匀脂质膜。以 PTX-CAPNs 的 PBS 溶液 (其中 CAPNs 质量浓度为 $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 1 mL 于 45°C 水化 30 min, 以 1% 功率探头超声 2 min。离心除去空白脂质体和游离 PTX, 即得 PTX-LCAPNs, 4°C 保存。

PTX-LPs 的制备 在相同实验条件下, 称取 E80 15 mg、胆固醇 1.5 mg 和 PTX 0.3 mg 于圆底烧瓶中形成均匀脂质膜。以 1 mL PBS 溶液水化, 即得包载紫杉醇的脂质体 (liposomes loaded with PTX, PTX-LPs), 4°C 保存。

荧光标记载体的制备 精密称取 RITC 1 mg, 加入无水乙醇 1 mL 溶解, 再加入 APTES 10 μL , 室温搅拌过夜^[10], 即得 RITC-APTES。取 CAPNs 10 mg 分散于 2 mL 水中, 加入 RITC-APTES 100 μL , 于 40°C 下搅拌 24 h, 离心收集沉淀, 并用水清洗, 即得 RITC 标记的磷酸钙纳米粒 (RITC labeled CAPNs, RITC-CAPNs)。参考“PTX-LCAPNs 的制备”, 在相同实验条件下, 以 RITC-CAPNs 的 pH 7.4 PBS 溶液水化磷脂膜, 即得到荧光染料 RITC 标记的脂质-磷酸钙核/壳纳米粒 (RITC labeled LCAPNs, RITC-LCAPNs)。参考“PTX-LPs 的制备”, 称取 E80 15 mg 和胆固醇 1.5 mg 于圆底烧瓶中, 氯仿适量溶解, 并加入 RITC-APTES 25 μL , 40°C 旋转蒸发除去有机溶剂, 形成均匀脂质膜。以 pH 7.4 PBS 溶液 1 mL 于 45°C 水化 30 min, 1% 功率探头超声 2 min, 并将纳米粒溶液过 G50 凝胶柱, 即得荧光染料 RITC 标记的纳米脂质体 (RITC labeled LPs, RITC-LPs)。

粒径和 zeta 电位 取 CAPNs 及 LCAPNs 适量, 用水稀释, 采用 Zetasizer Nano ZS 粒度电位测定仪测定载体的粒径、粒径分布和 zeta 电位。

透射电镜 (TEM) 用水分别稀释 CAPNs、LCAPNs 至 $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 各取适量滴加在铜网上, 用 2% 磷钨酸负染^[11], 置于透射电镜下观察纳米粒的形态。

红外光谱 (IR) 以 KBr 为介质, 用 Thermofisher-Nicolet-IS5 红外光谱仪 (IS5-FT-IR) 对 CAPNs 进行红外光谱的表征。

载体稳定性 通过纳米粒粒径变化考察载体稳定性。取 LPs、CAPNs 及 LCAPNs 适量, 用水稀释, 分别于 1、2、7 和 15 天测定载体的粒径。

载药量的测定 精密量取 PTX-CAPNs 或 PTX-LCAPNs 1.0 mL, 加入甲醇 2 mL, 超声 30 min, 离心并收集上清液, 沉淀物中加入甲醇 2 mL, 重复操作 3 次, 合并上清液, 以流动相定容至 10 mL, HPLC 测定 PTX 含量, 采用以下公式计算纳米载体的载药量 (drug loading capacity, DLC):

$$\text{DLC} = W_c / W_t \times 100\%$$

其中, W_c : 纳米载体中包载的 PTX 含量 (mg); W_t : 包载 PTX 的纳米载体的总重量 (mg)。

体外释放度研究 精密吸取 PTX-CAPNs、PTX-LCAPNs 及 PTX-LPs 各 0.2 mL, 分别加入 pH 7.4 或 5.0 的 PBS (含 0.2% Tween 80) 等渗溶液 7.8 mL 为释放介质, 于 37°C , $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡, 1、2、4、8、12、24 和 48 h 取样, 并用超滤管 (截留分子量 5000 Da) 离心, 取上清用甲醇稀释 5 倍, 采取 HPLC 法测定 PTX 浓度, 计算累积释药量^[12]。

细胞摄取实验 将 Huh-7 细胞接种于 12 孔板的玻璃盖玻片上, 培养 24 h, 分别以 RITC-LPs、RITC-CAPNs 和 RITC-LCAPNs 于 37°C 、5% CO_2 孵育体系下孵育细胞 4 h, 弃去孵育液, 以 PBS 7.4 洗涤; 加入 4% 多聚甲醛室温固定细胞 15 min, 除去固定液, 以 PBS 7.4 洗涤; 加入 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ DAPI 室温孵育 10 min, 除去染色液, 以 PBS 7.4 洗涤, 取出盖玻片, 以 90% 甘油封片, 置于共聚焦显微镜下观察^[13]。

流式细胞仪检测 将 Huh-7 细胞以 1×10^5 个/孔接种于 12 孔板中, 培养 24 h 后, 分别以 RITC-LPs、RITC-CAPNs 和 RITC-LCAPNs 于 37°C 、5% CO_2 孵育体系下孵育细胞 4 h, 弃去孵育液, 以 PBS 7.4 洗涤, 胰酶消化, 最终将细胞悬于 0.5 mL PBS 7.4 中, 以流式细胞仪检测荧光强度^[13]。

磷酸钙胞内钙离子释放 将 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Fluo-3-乙酰氧基甲基酯溶液与 20% F127 溶液等体积混匀, 用 Hank's 平衡盐溶液稀释 1000 倍, 得到新鲜配制的 Fluo-3 AM 工作液。将 Huh-7 细胞以 1×10^5 个/孔接种于激光共聚焦培养皿中, 培养 24 h 后, 加入

Hoechst 33342 染液 200 μL , 室温孵育 20 min 后, 移去染液, 用 PBS 清洗 2~3 次, 加入新鲜配制的 Fluo-3 AM 工作液 200 μL , 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下孵育 1 h, 弃去孵育液, 用 PBS 清洗 2~3 次后, 加入空白 DMEM 培养基, 置于共聚焦显微镜下观察; 再加入 CAPNs 或 LCAPNs 200 μL , 于 488 nm 激发波长处观察^[8]。

细胞内 PTX 浓度测定 将 Huh-7 细胞接种于 12 孔板上, 培养 24 h, 分别以游离 PTX、PTX-LPs、PTX-CAPNs 和 PTX-LCAPNs (其中 PTX 质量浓度为 0.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 孵育液代替培养液, 孵育 0.5、1 和 2 h, 弃去孵育液, 以 PBS (pH 7.4) 洗涤, 除去残留药物。胰酶消化细胞, 以细胞裂解液 200 μL 孵育后, 加入甲醇 300 μL ^[14], 超声并离心后, 取上清液采用 HPLC 法测定 PTX 浓度, 计算胞内药物蓄积浓度。

体外抗肿瘤活性检测 以 MTT 法^[15]检测制剂的体外抗肿瘤活性。将 Huh-7 细胞以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板中, 培养 24 h。以完全培养基稀释游离 PTX、PTX-LPs、PTX-CAPNs 和 PTX-LCAPNs, 使 PTX 的梯度质量浓度为 0.25、1.25 和 2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 在对应孔中分别加入含不同药物浓度的制剂 100 μL , 每组设 4 个复孔, 处理细胞 24 h。结束后, 每孔加入新鲜配制的 MTT 溶液 (5.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 10 μL , 孵育 4 h; 弃去上清液, 每孔加入 DMSO 150 μL 并置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中振荡 15 min 以溶解紫色结晶产物, 于 490 nm 处检测吸收度值。

空白载体的安全性评价 以 MTT 法考察空白载体的安全性。LPs、CAPNs 和 LCAPNs 空白纳米粒浓度与“体外抗肿瘤活性检测”项下的高浓度制剂的浓度一致, 以此孵育 Huh-7 细胞, 同时参考“体外抗肿瘤活性检测”, 在相同条件下实验, 以研究空白载体对抑制肿瘤细胞增殖的影响。

数据处理 实验所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 如果数据符合正态分布, 统计方法采用双侧 t 检验; 3 组及以上数据采用方差分析, $P<0.05$ 为显著性差异, $P<0.01$ 为极显著性差异。

结果

1 纳米载体的制备与表征

PTX-LCAPNs 的制备过程见图 1。在 CAPNs 的

制备过程中, 改变 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 和 Na_2HPO_4 的投料量, 选择合适的量进行实验。Zetasizer Nano ZS 粒度电位测定仪于 25 $^{\circ}\text{C}$ 测定, 结果见表 1。可见 CAPNs 和 LCAPNs 的粒径均小于 150 nm, 粒度分布窄。

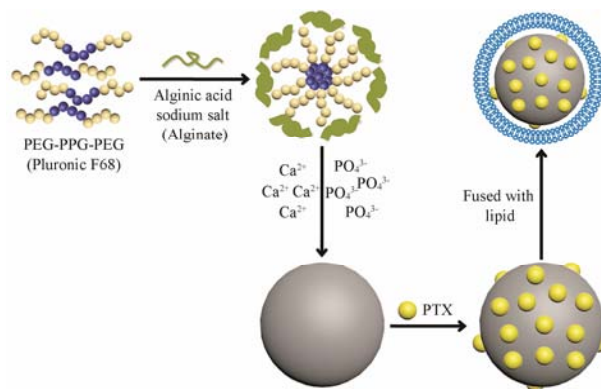


Figure 1 Schematic illustration of the synthesis of PTX-loaded lipid bilayer-coated calcium phosphate core-shell nanoparticles (PTX-LCAPNs). The calcium phosphate nanoparticles (CAPNs) as the core of the drug delivery system was synthesized by stirring pluronic F68 and alginate followed by adding Ca^{2+} and PO_4^{3-} in hot water. After CAPNs loading PTX, lipid bilayer composed of E80 was then fused to PTX-loaded cores through film-hydration method. PTX: Paclitaxel

Zeta 电位是微粒表面荷电性质与大小的标志, 往往决定着微粒的物理稳定性、体内分布及药物动力学。测定结果显示, CAPNs 的 zeta 电位值为负值, 与 Seong 等^[9]的研究结果一致。本研究采用注射级蛋黄卵磷脂 E80 包被 CAPNs, E80 显电中性。结果显示, LCAPNs 的表面电位为 -6 mV 左右, 证实脂质膜对磷酸钙纳米粒的包覆, 表明本研究成功制备了 LCAPNs。

透射电镜结果 (图 2A) 显示, CAPNs 近球形, 粒径 100 nm 左右。图 2B 显示, LCAPNs 具有明显的核/壳结构, 其颗粒大小与粒度测定结果一致。

经 IS5-FT-IR 红外光谱检测, 结果如图 3 所示, 并参照文献^[9]分析可知 1093.44、1031.73、962.30、603.61 和 565.04 cm^{-1} 处的峰是 PO_4^{3-} 的特征峰。结果表明, 制备的纳米粒中含有 PO_4^{3-} 离子。

通过粒径变化考察纳米粒的稳定性, 结果见表 2。CAPNs 在 15 天内粒径增长了 20 nm 左右, 而 LCAPNs 的粒径没有变化, 表明包裹脂质膜可以提高 CAPNs

Table 1 The characterization of CAPNs and LCAPNs in deionized water. PI: Polydispersity index. $n=3$, $\bar{x}\pm s$

Group	Size/nm	PI	Potential/mV	Drug loading capacity/%
CAPNs	103.21 \pm 3.54	0.09 \pm 0.02	-24.32 \pm 0.09	11.58 \pm 0.57
LCAPNs	124.73 \pm 6.41	0.24 \pm 0.06	-6.51 \pm 0.02	1.69 \pm 0.09

Table 2 The diameter of LPs, CAPNs and LCAPNs in 1, 2, 7, 15 days. LPs: Liposomes. $n=3, \bar{x} \pm s$

Nanoparticles group	Size/nm			
	1 d	2 d	7 d	15 d
LPs	125.26 ± 5.98	123.58 ± 5.01	127.74 ± 6.30	131.92 ± 7.48
CAPNs	103.21 ± 3.54	105.26 ± 1.45	115.84 ± 3.47	125.42 ± 4.63
LCAPNs	124.73 ± 6.41	126.01 ± 3.60	125.53 ± 4.84	124.31 ± 4.02

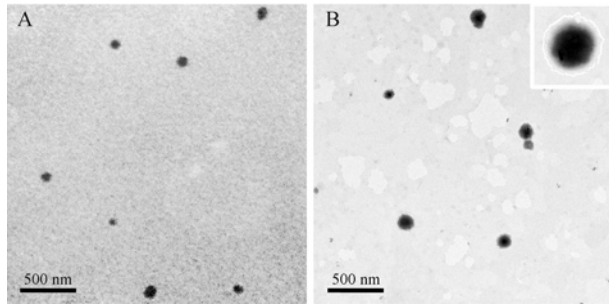


Figure 2 Transmission electron micrographs (TEM) of CAPNs (A) and LCAPNs (B)

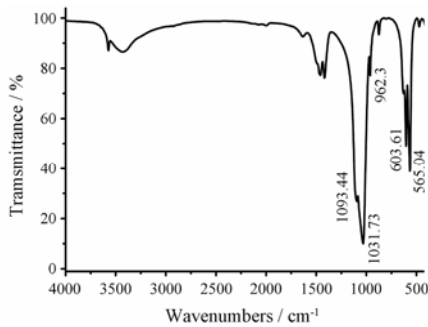


Figure 3 FT-IR spectra of CAPNs

的稳定性。普通制剂 LPs 粒径稍有变化, 15 天内增长了 5 nm 左右, 但是没有显著性差异。

以 HPLC 法测定, PTX-CAPNs 的载药量为 (11.58 ± 0.57) % ($n=3$); PTX-LCAPNs 的载药量为 (1.69 ± 0.09) % ($n=3$)。

2 体外释放的研究

以超滤离心法研究 CAPNs 和 LCAPNs 的体外释放行为, 结果表明载体具有 pH 敏感释药特性。在

生理环境 (pH 7.4) 下, PTX-CAPNs 释放较慢, 48 h 仅释放了 50% 左右; 而 PTX-LCAPNs 的累积释放量明显低于 PTX-CAPNs, 48 h 时仅释放了 20% 左右, 将 PTX-CAPNs 的释放量降低了 30% 左右, 表明脂质包载后进一步减少了载体中药物的释放, 一定程度上减少了 PTX-CAPNs 到达肿瘤组织前的药物泄露 (图 4A); 在 pH 5.0 条件下, PTX-CAPNs 和 PTX-LCAPNs 的释放速率均较快, 12 h 时释放量超过 90%, 而 PTX-LPs 组的释放速率远低于 PTX-CAPNs 和 PTX-LCAPNs。结果表明, 与普通的脂质体相比, PTX-CAPNs 和 PTX-LCAPNs 具有快速释药的效果 (图 4B)。

有研究表明^[13, 14], 在酸性条件 (pH 5.0) 下, 脂质膜不稳定。与正常生理环境相比, PTX-LPs 在酸性条件下释放较快。结果表明, 在正常生理条件 (pH 7.4) 下, LCAPNs 结构较稳定, 载体可以有效地将药物递送至肿瘤组织及细胞中, 包裹的磷脂膜可以减少 CAPNs 的药物泄露对正常组织和细胞造成的损伤, 降低不良反应, 增加药效; 载体在模拟肿瘤胞内环境中 (pH 5.0) 表现出一定的突释性, 快速释药, 提高肿瘤细胞内的药物浓度。

3 荧光载体的细胞摄取研究

RITC-CAPNs、RITC-LPs 和 RITC-LCAPNs 处理组的孵育时间为 4 h, 细胞摄取结果如图 5 所示。激光共聚焦实验结果显示, 3 组荧光载体在胞内的荧光强度有明显差异, LCAPNs 组荧光最强, 强度顺序为 RITC-LCAPNs 组 > RITC-LPs 组 > RITC-CAPNs 组 (图

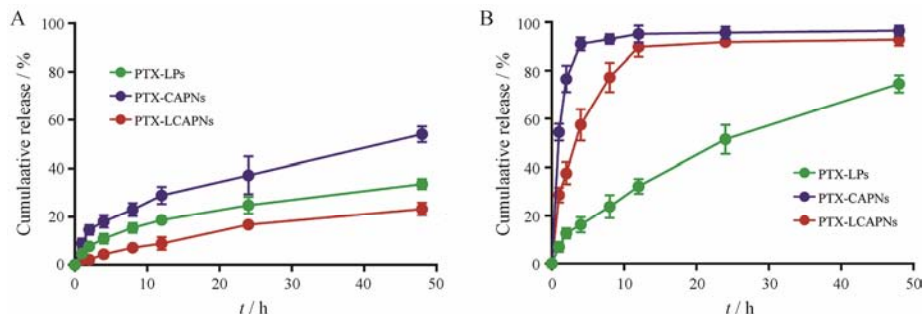


Figure 4 The release profiles of PTX-LPs, PTX-CAPNs and PTX-LCAPNs *in vitro*. The release of PTX in simulated body fluid pH 7.4 (A) and pH 5.0 (B) acid fluid at 37 °C for 48 h. $n=3, \bar{x} \pm s$

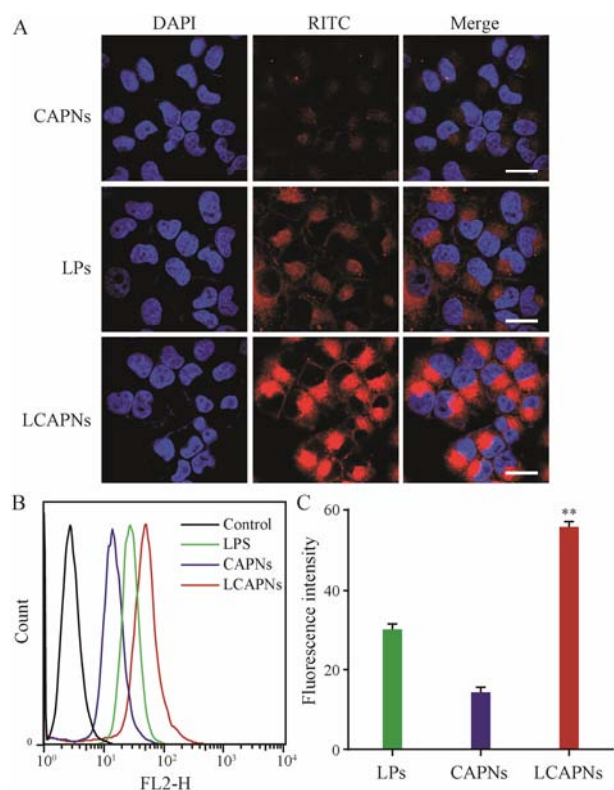


Figure 5 Confocal micrographs (A, scale bar: 20 μ m), flow cytometry charts (B) and intracellular fluorescence intensity assay (C) of Huh-7 cells incubated with RITC-CAPNs, RITC-LPs, RITC-LCAPNs for 4 h. The nuclei were stained with DAPI (blue). $n=3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs CAPNs, LPs

5A)。流式细胞仪检测结果如图 5B、C 所示, LCAPNs 组的胞内 RITC 荧光强度 55.77 ± 1.32 高于 CAPNs 组 14.33 ± 1.23 和 LPs 组 30.33 ± 1.37 , 且 3 个处理组的胞内荧光强度有显著性差异。由激光共聚焦及流式细胞仪结果可看出, LCAPNs 组的胞内荧光强度比 CAPNs 高, 表明脂质包载后纳米粒的摄取水平显著提高; 另外, LCAPNs 组的摄取比 LPs 组多, 可能是由于磷酸钙核的原因, LCAPNs 的硬度比 LPs 大, 使 LCAPNs 摄取较多^[16, 17]。以上实验结果表明, LCAPNs 和

CAPNs 均可以在短时间内被细胞摄取, 但 LCAPNs 显著增加了其在细胞中的摄取量。激光共聚焦实验及流式细胞仪检测结果均表明脂质膜可显著提高载体的细胞摄取量。

4 磷酸钙胞内钙离子释放

磷酸钙是一种酸溶性的沉淀物, 在酸性条件下可以快速溶解并释放钙离子。在酸性肿瘤环境中, 质子可以渗透到 LCAPNs 磷脂膜内进而溶解 CAPNs。本研究采用 Fluo-3 AM 检测细胞内钙离子的情况。Fluo-3 AM 是一种细胞膜可渗透钙离子荧光探针, 常用来检测细胞内钙离子浓度。Fluo-3 AM 穿透细胞膜进入细胞后被细胞内的酯酶剪切形成 Fluo-3, Fluo-3 游离配体几乎是非荧光性的, 当与细胞内钙离子结合后可以产生较强的荧光。先用 Fluo-3 AM 孵育细胞, 再加入 CAPNs 或 LCAPNs, 在激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm 条件下成像, 结果见图 6。在加入制剂孵育 10 min 左右即可观察到绿色荧光, 随着时间延长, 在孵育 1 h 后, 荧光明显增强。表明 CAPNs 进入细胞后会迅速溶解。而 LCAPNs 组无论是在 10 min 还是 1 h, 其绿色荧光均比 CAPNs 组强, 表明该组 Huh-7 细胞内钙离子含量较高, 主要是因为其细胞摄取比 CAPNs 组好。这些结果均表明, CAPNs 在肿瘤环境中可以迅速溶解, 达到快速释药的效果, 并与细胞摄取实验中 RITC-LCAPNs 摄取水平较高的结果一致。

5 Huh-7 细胞内 PTX 蓄积

游离 PTX、PTX-LPs、PTX-CAPNs 和 PTX-LCAPNs 溶液分别处理细胞 0.5、1 和 2 h 后, 细胞内 PTX 的浓度见图 7。处理 30 min 后, Huh-7 细胞对 4 种制剂均有一定的摄取, 但 PTX-LCAPNs 体现出显著的摄取优势; 2 h 时, 游离 PTX、PTX-LPs、PTX-CAPNs 和 PTX-LCAPNs 的胞内 PTX 的浓度分别为

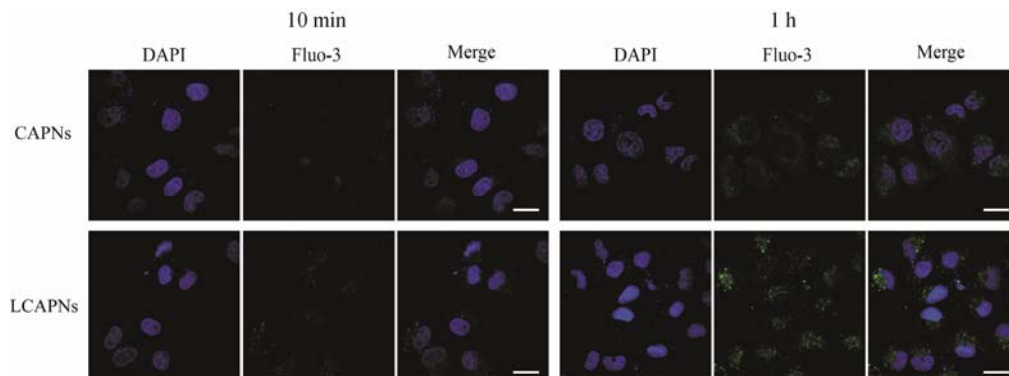


Figure 6 The intracellular calcium release profile of CAPNs and LCAPNs. The fluorescence images of Fluo-3 labeled Huh-7 cells after the addition of CAPNs or LCAPNs with 10 min or 1 h. The nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue). Scale bar: 20 μ m

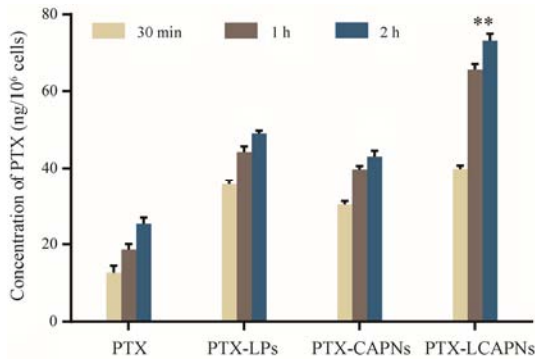


Figure 7 Intracellular accumulation of PTX in Huh-7 cells treating with free PTX, PTX-LPs, PTX-CAPNs and PTX-LCAPNs for differential time. Huh-7 cells were incubated with free PTX, PTX-LPs, PTX-CAPNs and PTX-LCAPNs with PTX 0.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for 0.5, 1 and 2 h. $n=3$, $\bar{x}\pm s$. ** $P<0.01$ vs PTX, PTX-LPs, PTX-CAPNS

25.38 \pm 1.61、49.14 \pm 0.76、43.12 \pm 1.52 及 73.14 \pm 1.80 ng/10⁶ cells; 与游离 PTX、PTX-LPs 和 PTX-CAPNs 相比, PTX-LCAPNs 胞内 PTX 的浓度显著提高 ($P<0.01$); 以上结果表明, 各处理组的细胞摄取均呈现出一定的时间依赖性; 同样条件下 PTX-LCAPNs 的细胞摄取显著高于 PTX-LPs 和 PTX-CAPNs, 胞内 PTX 浓度明显增大, 从而提高抗肿瘤效果。

6 MTT 法测定载体的体外抗肿瘤活性

通过 MTT 法测定含药载体对 Huh-7 细胞的杀伤能力, 如图 8A 所示。结果表明, 游离 PTX、PTX-CAPNs、PTX-LPs 和 PTX-LCAPNs 对 Huh-7 细胞均有抑制其增殖的作用, 且抑制作用均具有剂量依赖性。由图 8A 可见, PTX 质量浓度为 2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 孵育 24 h 后, 游离 PTX 组未对 Huh-7 细胞增殖产生显著的抑制作用, 细胞存活率仍达 80% 以上。与游离 PTX 组相比, PTX-LPs、PTX-CAPNs 和 PTX-LCAPNs 组的抑制细胞增殖作用有明显差异, 具有较强的抗

肿瘤效果。其中, PTX-LCAPNs 组与另外两组相比, 对细胞增殖的抑制作用更大, 且有显著性差异 ($P<0.01$)。在 3 组载体制剂中, PTX-LCAPNs 的抗肿瘤活性最强。

以 SPSS 对数据进行拟合, 计算 2 组载体 PTX-CAPNs、PTX-LCAPNs 作用细胞 24 h 的 IC₅₀ 值分别为 2.52 和 0.54 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 可知 PTX-LCAPNs 对细胞的杀伤力是 PTX-CAPNs 的 4.7 倍, 表明 PTX-LCAPNs 具有更高的抗肿瘤活性。

通过 MTT 法测定空白载体对 Huh-7 细胞的细胞毒性。结果如图 8B 所示, 3 种空白载体没有对 Huh-7 细胞增殖产生显著的抑制作用, 细胞存活率仍达 90% 以上, 且各载体组之间没有显著性差异。结果表明, 空白载体的细胞毒性较低, 安全性较高。PTX-LPs、PTX-CAPNs 和 PTX-LCAPNs 的体外抗肿瘤活性结果与载体本身的毒性无关。

讨论

脂质-磷酸钙核/壳纳米粒融合了磷酸钙快速释药的特性及脂质体良好的生物相容性的优势, 克服了二者的不足, 从而达到增加紫杉醇的载药量和细胞摄取量, 减少药物的泄露, 增加药物在肿瘤部位的浓度及蓄积的目的。

研究发现, CAPNs 纳米载体在酸性 (pH 5.0) 条件下可以快速溶解, 药物迅速释放。但 CAPNs 的细胞摄取量少, 入胞后即能使快速释药, 其胞内药物含量也较低。而 LCAPNs 中以脂质双分子层为 CAPNs 的药物泄露增加了一道屏障, 降低了 CAPNs 包载的紫杉醇在正常生理条件下 (pH 7.4 PBS) 的释放。同时脂质双分子层由于磷酸钙的支撑, 提高了其物理稳定性及细胞摄取水平。在酸性环境中, 脂质双层膜

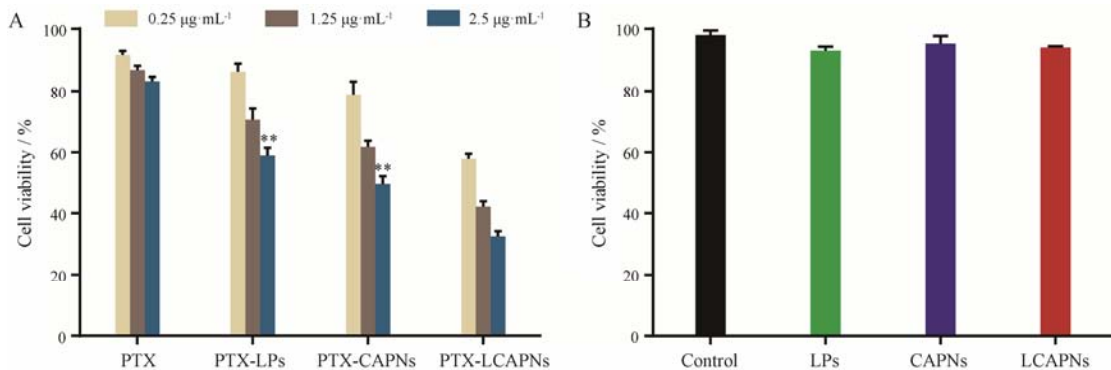


Figure 8 Cytotoxicity of free PTX, PTX-LPs, PTX-CAPNs, PTX-LCAPNs against Huh-7 cells during 24 h with the concentration of PTX at 0.25, 1.25, 2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (A). And cytotoxicity of LPs, CAPNs, LCAPNs against Huh-7 cells during 24 h with the highest concentration of blank nanoparticles used in the antitumor activity *in vitro* (B). $n=4$, $\bar{x}\pm s$. ** $P<0.01$ vs PTX-LCAPNs group

遭到破坏, 磷酸钙溶解, 继而药物快速释放, 从而达到减少药物胞外泄露, 胞内药物快速释放的目的。因此, LCAPNs 具有更好地抑制肿瘤细胞增殖的效果。

Huh-7 细胞对 LCAPNs 的摄取量大于 CAPNs, 推测原因是 LCAPNs 表面包被的脂质双分子层与细胞膜有极大的相似性, 使得载体对细胞膜的亲和性增加。此外, LCAPNs 的细胞摄取量高于 LPs, 可能是因为 LCAPNs 包载了 CAPNs, 提高了其硬度, 使得载体更易被细胞摄取。

PTX-LCAPNs 对 Huh-7 细胞增殖的抑制作用在一定范围内呈现浓度依赖性。同样条件下, PTX-LCAPNs 比 PTX、PTX-LPs 和 PTX-CAPNs 具有更高的细胞增殖抑制率, 可以推测 LCAPNs 通过增加细胞的摄取量以提高胞内药物的浓度, 从而增加细胞增殖抑制率。而 PTX-LPs 组的胞内 PTX 的浓度比 PTX-CAPNs 组高, 却显示较低的细胞增殖抑制率, 推测原因是在酸性条件下 PTX-CAPNs 的释药速率比 PTX-LPs 快, 从而产生较高的胞内游离药物浓度。通过 MTT 法对空白载体进行了安全性评价, 结果表明空白载体的细胞毒性较低, 排除了空白载体的细胞毒性对 PTX-LCAPNs 的抗肿瘤活性实验结果的影响。

本研究表明, 脂质-磷酸钙核/壳纳米粒作为抗肿瘤药物紫杉醇的智能药物传递系统具有一定的应用前景。然而, 目前对该载体的研究尚处于初步研究阶段, 有待进一步地考察载体的体内抗肿瘤活性, 此外肿瘤组织靶向性也值得研究与摸索。

References

- [1] Ashley CE, Carnes EC, Epler KE, et al. Delivery of small interfering RNA by peptide-targeted mesoporous silica nanoparticle-supported lipid bilayers [J]. *ACS Nano*, 2012, 6: 2174–2188.
- [2] Ye GF, Gupta A, DeLuca R, et al. Bilayer disruption and liposome restructuring by a homologous series of small Arg-rich synthetic peptides [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2010, 76: 76–81.
- [3] Marianecchi C, Di Marzio L, Rinaldi F, et al. Niosomes from 80s to present: the state of the art [J]. *Adv Colloid Interf Sci*, 2014, 205: 187–206.
- [4] Yarosh DB. Liposomes in investigative dermatology [J]. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2001, 17: 203–212.
- [5] Huang ZY, Sun YQ, Hu HY, et al. Techniques and methods evaluation on pharmaceutical stability of liposomes [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 356–361.
- [6] Estanqueiro M, Amaral MH, Lobo JMS, et al. Evolution of liposomal carriers intended to anticancer drug delivery: an overview [J]. *Int J Curr Pharm Res*, 2014, 6: 3–10.
- [7] Ginebra MP, Traykova T, Planell JA. Calcium phosphate cements: competitive drug carriers for the musculoskeletal system? [J]. *Biomaterials*, 2006, 27: 2171–2177.
- [8] Li J, Chen YC, Tseng YC, et al. Biodegradable calcium phosphate nanoparticle with lipid coating for systemic siRNA delivery [J]. *J Control Release*, 2010, 142: 416–421.
- [9] Seong DY, Kim YJ. Enhanced photodynamic therapy efficacy of methylene blue-loaded calcium phosphate nanoparticles [J]. *J Photoch Photobio B*, 2015, 146: 34–43.
- [10] Luo T, Huang P, Gao G, et al. Mesoporous silica-coated gold nanorods with embedded indocyanine green for dual mode X-ray CT and NIR fluorescence imaging [J]. *Opt Express*, 2011, 19: 17030–17039.
- [11] Liu JW, Jiang XM, Ashley C, et al. Electrostatically mediated liposome fusion and lipid exchange with a nanoparticle-supported bilayer for control of surface charge, drug containment, and delivery [J]. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 7567–7569.
- [12] Lomis N, Westfall S, Farahdel L, et al. Human serum albumin nanoparticles for use in cancer drug delivery: process optimization and *in vitro* characterization [J]. *Nanomaterials*, 2016, 6: 116–132.
- [13] Li FF, Zhang XX, Guo SY, et al. Preliminary study on pH-sensitive lipid bilayer-coated mesoporous silica nanoparticles as a novel drug carrier for antitumor drug [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2013, 48: 291–297.
- [14] Chen X, Zhang XX, Li FF, et al. Antitumor efficacy of irinotecan-loaded galactosyl modified lipid bilayer-coated mesoporous silica nanoparticles against hepatocellular carcinoma cells [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2014, 49: 718–725.
- [15] Zhou YM, Wu XP, Zeng Li, et al. *In vitro* anti-tumor effect of methotrexate modified by peptide [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2012, 47: 452–458.
- [16] Zhang L, Feng Q, Wang JL, et al. Microfluidic synthesis of hybrid nanoparticles with controlled lipid layers: understanding flexibility-regulated cell-nanoparticle interaction [J]. *ACS Nano*, 2015, 9: 9912–9921.
- [17] Sun JS, Zhang L, Wang JL, et al. Tunable rigidity of (polymeric core)-(lipid shell) nanoparticles for regulated cellular uptake [J]. *Adv Mater*, 2015, 27: 1402–1407.