

壳-核结构多柔比星脂质磷酸钙纳米粒的制备及体外性能评价

薛建秀^{1#}, 毕洪书^{2#}, 李雨爱¹, 陈瑶¹, 刘晓庆¹, 徐正奇¹, 潘虎威¹, 石凯^{1*}

(1. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 辽宁药联制药有限公司, 辽宁 本溪 117004)

摘要: 脂质体作为一种重要的药物载体, 具有生物相容性高、免疫原性低等优点, 已被广泛应用于药物传递领域, 尤其是肿瘤的靶向治疗。然而传统脂质体由流动的动态磷脂膜构成, 极易发生相互融合从而导致聚集和药物泄露。此外, 较低的聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 修饰程度也限制了该载体在体内的靶向递药性能。鉴于传统脂质体存在的问题, 本文设计了一种将无机载体磷酸钙与脂质体相结合的纳米粒靶向药物递送系统, 即脂质磷酸钙 (lipid coated calcium phosphate, LCP)。以多柔比星 (doxorubicin, DOX) 为模型药物, 采用反相微乳液法制备载药脂质磷酸钙纳米粒 (DOX/LCP), 并对制备条件进行考察。采用红外光谱、能量色散光谱和透射电镜对磷酸钙内核进行结构表征和形态观察, 并对 DOX/LCP 的粒径、包封率、载药量、稳定性及体外释放行为进行了考察。在此基础上, 采用共聚焦显微镜和流式细胞仪分别对 LCP 介导 DOX 在耐药肿瘤细胞株 MCF-7/DOX 中的摄取进行了定性和定量评价, 并采用噻唑蓝比色法考察了其细胞毒性作用。结果表明: 制得的 LCP 具有典型的核-壳结构, 且尺寸均一、分散性良好, 粒径为 (48.6 ± 3.9) nm, zeta 电位为 (-12.1 ± 1.2) mV, 包封率 $> 80\%$, 在模拟血浆中具有较好的粒径稳定性。体外释放具有明显的 pH 依赖性, 当环境 pH 为 7.4 时, 24 h 累计释放度低于 20%; 随着释放介质 pH 值的降低, DOX/LCP 释放速度逐渐加快, 在 pH 为 4.5 介质中, 24 h 累计释放量超过 90%。LCP 可以显著促进耐药细胞对 DOX 的摄取和蓄积, 且体外对耐药肿瘤的抑制率显著提高, DOX/LCP 组和游离 DOX 组的半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC_{50}) 分别为 4.6 和 11.8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 两者相比具有显著性差异 ($P < 0.05$)。综上, 本研究制备的 LCP 粒径小、包封率高、稳定性好, 具有环境响应性及潜在的逆转肿瘤耐药性能, 有应用于临床研究的潜力。

关键词: 磷酸钙; 纳米粒; 多柔比星; 抗肿瘤

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 08-1364-07

Preparation and *in vitro* performance evaluation of doxorubicin loaded lipid calcium phosphate nanoparticles with shell-core structure

XUE Jian-xiu^{1#}, BI Hong-shu^{2#}, LI Yu-ai¹, CHEN Yao¹, LIU Xiao-qing¹, XU Zheng-qi¹,
PAN Hu-wei¹, SHI Kai^{1*}

(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

2. Liaoning Yaolian Pharmaceutical Co., Ltd., Benxi 117004, China)

Abstract: As an important drug carrier, liposome has the advantages of high biocompatibility and low immunogenicity. It has been widely used in the field of drug delivery, especially the targeted treatment of tumors. However, traditional liposomes are composed of flowing dynamic phospholipid membranes, which are easy to fuse together, resulting in aggregation and drug leakage. In addition, the lower degree of polyethylene

收稿日期: 2018-03-27; 修回日期: 2018-04-14.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31671020); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (201710163000037).

#共同第一作者.

*通讯作者 Tel / Fax: 86-24-43520557, E-mail: ashikai@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0259

glycol (PEG) modification also limits the targeted delivery performance of the vector *in vivo*. In view of the problems, a nanoparticle-targeted drug delivery system combining the inorganic carrier calcium phosphate with liposomes was designed, namely lipid calcium phosphate (LCP). Using doxorubicin (DOX) as a model drug, doxorubicin-loaded lipid calcium phosphate nanoparticles (DOX/LCP) were prepared by reverse microemulsion method, and the preparation conditions were investigated. The structure and morphology of calcium phosphate cores were observed by infrared spectroscopy, EDS spectroscopy, and transmission electron microscopy. The particle size, encapsulation efficiency, drug loading, stability and release behavior *in vitro* of DOX/LCP were investigated. Confocal microscopy and flow cytometry were used to qualitatively and quantitatively evaluate the uptake of DOX in drug-resistant tumor cell line MCF-7/DOX by LCP, respectively, and the thiazolium MTT colorimetric method was used to examine its cytotoxicity. LCP exhibited a typical core-shell structure with good size uniformity and dispersibility. The particle size was in (48.6 ± 3.9) nm, the potential was in (-12.1 ± 1.2) mV, and the encapsulation efficiency was above 80%. Moreover, it has a good stability in simulated plasma. *In vitro* release of LCP had a significant pH dependence. When the pH of the environment was 7.4, the cumulative release within 24 hours was less than 20%; as the pH of the release medium decreases, the release rate of DOX/LCP was accelerated gradually. Accumulated release over 24 hours exceeded 90% in the pH 4.5 medium. LCP significantly promoted the uptake and accumulation of DOX by drug-resistant cells, and the inhibition rate of drug-resistant tumors was significantly increased *in vitro*. The half maximal inhibitory concentrations (IC_{50}) of LCP/DOX and free DOX were 4.6 and 11.8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively, and there was a significant difference between the two groups ($P < 0.05$). In summary, the LCP prepared in this study had a small particle size, high encapsulation efficiency and good stability. It had environmental responsiveness and potential inhibition of tumor drug resistance, which suggests a potential in the clinical application.

Key words: calcium phosphate; nanoparticles; doxorubicin; antitumor

磷酸钙是一种天然的生物材料,具有良好的生物相容性和可降解性^[1],在组织修复、药物递送、基因转染及诊断成像等生物学领域具有广阔的应用前景^[2-4],因此近年来备受人们的关注。由于其在化学组成和生物性能上与脊椎动物骨骼无机相具有相似性而广泛地用作骨组织替代材料,安全性已为大量的实验及临床应用所证明^[5,6]。此外,磷酸钙在生理 pH 下保持较高的稳定性,但在内涵体 (pH 5.0~6.0) 或溶酶体 (pH 4.0~5.0) 的酸性环境中可迅速解离,通过改变内涵体/溶酶体的渗透压而使其破坏,从而将所载药物释放至胞质^[7]。由于磷酸钙纳米粒具有较高的比表面积和强烈的聚集倾向,且化学稳定性不高而难以直接应用^[8];作为无机材料,磷酸钙的细胞摄取率较低,用于抗肿瘤治疗缺乏相应的靶向基团,从而降低了药物疗效^[9]。为了解决这些问题,必须对纳米粒进行表面修饰。

脂质体是由磷脂和胆固醇形成的、具有脂质双分子层的封闭囊泡,已被广泛应用于药物传递领域,尤其是肿瘤的靶向治疗^[10]。传统脂质体由流动的动态磷脂膜构成,粒子间极易发生相互融合从而导致聚集和药物泄露^[11]。另外,脂质体作为药物载体用于肿瘤靶向治疗时,通常需要进行聚乙二醇 (PEG) 化修饰以延长体内的循环时间,改善药物动力学和体内

分布^[12]。但具有表面活性剂性质的 PEG 修饰材料过多 (>10%) 往往会裂解磷脂膜从而影响脂质体的表面修饰程度^[13]。鉴于传统脂质体存在的问题, Huang 课题组^[14]设计了一种将磷酸钙与脂质体相结合的纳米粒靶向药物递送系统,即脂质磷酸钙 (lipid coated calcium phosphate, LCP) 纳米粒。一方面,脂质膜可以改善磷酸钙纳米粒的表面性质,增加细胞的亲和性和摄取率,从而提高药物在细胞内的蓄积,进一步提高药效^[15];另一方面,以磷酸钙为固体内核的脂质纳米粒克服了传统脂质体不能修饰大量 PEG 的缺点,改善了脂质体的稳定性^[16]。

本文以多柔比星 (DOX) 为模型药物,采用反相微乳液法在 Triton X-100/己醇/己烷/反相微乳体系中制备了尺寸均一、分散性良好且具有核-壳结构的载药脂质磷酸钙纳米粒 (DOX/LCP),并对制备条件进行了考察,同时对所得脂质磷酸钙纳米粒的理化性质、细胞摄取及体外抗肿瘤活性进行了初步评价。

材料与方法

主要仪器 JEM-1200EX 型透射电子显微镜 (日本电子公司); Nano-ZS90 激光散射粒度仪 (英国马尔文公司); Bio-RAD 680 酶标仪 (美国 Bio-RAD 公司); FV1000-IX81 激光共聚焦显微镜 (日本 Olympus 公司);

FACSAria 流式细胞仪 (美国 BD 公司); CS120GXL 低温超速离心机 (日本 Hitachi 公司)。

药品和试剂 二油酰磷脂酸 (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidic acid, DOPA)、二油酰基卵磷脂 (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, DOPC)、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000 [1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-methoxy(polyethylene glycol)-2000, DSPE-PEG 2K] (美国 Avanti Polar Lipids 公司); 偶联叶酸 (folic acid, FA) 的聚乙二醇化磷脂 (DSPE-PEG2K-FA) (本实验室自制); 四甲基偶氮唑蓝 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、胆固醇 (美国 Sigma 公司); RPMI 1640 培养基和胎牛血清 (美国 Gibco 公司); 实验用水为去离子水, 甲醇、乙腈为色谱纯; 其余试剂或药品均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司。

LCP 纳米粒的制备^[17] 采用油包水型反相微乳法制得: ① 取一定量的环己烷、正己醇和 Triton X-100 按一定比例混合均匀制成油相; 将 DOX 溶解在 600 μL CaCl_2 ($2.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 水溶液中, 滴入 20 mL 油相中形成 A 溶液; ② 将 Na_2HPO_4 ($12.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 9.0) 600 μL 和 DOPA ($20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 200 μL 加入另一份 20 mL 油相中形成 B 溶液; ③ 将 A、B 两溶液分别搅拌 15 min 形成均一溶液后, 混合并在室温下继续搅拌 30 min。待磷酸钙沉淀反应完全后, 加入乙醇 40 mL 破乳, $10000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min 分离沉淀; ④ 无水乙醇洗涤两次除去溶剂和表面活性剂后, 将磷酸钙内核沉淀溶解在氯仿中, 置于 -20°C 冰箱中备用。

为制备稳定的水溶性 LCP, 将溶解在氯仿中的内核与 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DOPC/胆固醇 ($20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 1:1) 100 μL 、 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DSPE-PEG2K 10 μL 和 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DSPE-PEG2K-FA 10 μL 共溶于氯仿中混匀。减压旋转蒸发除去氯仿后, 加入 5% 葡萄糖溶液 1 mL 水化, 即得载有 DOX 的 LCP 纳米粒 (DOX/LCP)。

包封率和载药量的测定 采用高效液相色谱法 (HPLC) 测定 DOX/LCP 的载药量及包封率。色谱条件: 流动相为甲醇-水-冰醋酸 (体积比 55:45:0.5), 流速为 $0.8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 检测波长 258 nm, 进样量 20 μL 。建立标准曲线 $A=36061X-28202$, $R^2=0.9991$ 。将 DOX/LCP 用裂解液 ($2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA 和 0.05% Triton X-100) 破坏, 过 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 精密吸取 0.1 mL 加入乙腈稀释至 10 mL。采用 HPLC 法测定纳米粒中的药物质量 (m_1), 根据下列公式计算包封率 (EE) 和载药量 (DL): $\text{EE}\% = (m_1 / m_{\text{DOX}}) \times$

100% , $\text{DL}\% = (m_1 / m_{\text{total}}) \times 100\%$, 其中 m_{DOX} 为投药量, m_{total} 为载体材料总质量。

形态观察及粒径、zeta 电位测定 取 LCP 纳米粒及磷酸钙内核 5 μL 滴加于铜网上, 1 min 后吸去多余液体, 自然晾干, 透射电镜下观察其形态并拍照。采用马尔文激光粒度测定仪测定其粒径, 多分散指数 (polydispersity index, PDI) 及 zeta 电位。

体外释放度测定 采用动态膜透析法考察 DOX/LCP 纳米粒的体外释放性质。精密量取一定量的 DOX/LCP 纳米粒, 装入预处理过的透析袋中 (截留分子质量为 8000~12000 Da), 两端扎紧后置于 30 mL 不同 pH 的释放介质中, 在 37°C 、 $100 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的条件下恒温振荡。分别于 0.5、2、4、8、12 和 24 h 取样 0.2 mL, 并补充相同体积的新鲜释放介质。HPLC 法测定释放介质中药物的浓度, 计算累积释放度。以释放时间为横坐标、累积释放百分率为纵坐标绘制释放曲线。

DOX 的体外细胞摄取 为定性观察细胞对载药 LCP 的摄取情况, 乳腺癌耐药株 (MCF-7/DOX) 细胞以细胞数 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于 12 孔板中, 置于二氧化碳培养箱中贴壁过夜。给予相同浓度 ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的游离 DOX 及 DOX/LCP 分别培养 4 h。吸去培养基, 经漂洗、固定后, 加入含 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 的封片剂, 共聚焦显微镜定性观察细胞摄取情况。

为定量比较细胞对载药 LCP 的摄取情况, MCF-7/DOX 细胞以细胞数 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 接种在 6 孔板中, 置于二氧化碳培养箱中贴壁过夜。给予相同浓度 ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的游离 DOX 及 DOX/LCP 分别培养 4 h。吸去培养基, 经漂洗、消化后, 加入 500 μL 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 调成单细胞悬液, 流式细胞仪分析细胞荧光强度。DOX 的激发/发射波长为 485/595 nm。

体外细胞毒性实验 取对数生长期的 MCF-7/DOX 细胞, 以细胞数 $5 \times 10^4/\text{mL}$ 接种在 96 孔板中, 置于二氧化碳培养箱中贴壁过夜。实验分 3 组, 即游离 DOX 组、DOX/LCP 组和空白 LCP 组。加入 100 μL 含不同浓度 DOX 的培养基, 同时设置阴性对照孔和空白调零孔, 每个浓度重复 6 孔。细胞在常规培养条件下培养 24 h 后, 每孔加入 $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ MTT 液 20 μL , 37°C 继续培养 4 h 后, 吸弃上清液, 每孔加入 DMSO 150 μL , 避光震荡 20 min, 使结晶物充分溶解。以酶标仪检测 490 nm 处的吸光度 (A), 按照如下公式计算细胞存活率 (SR): $\text{SR}\% = (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}) \times 100\%$, 式中 A_{sample} 、 A_{control} 和 A_{blank} 分别为加药

孔、阴性对照孔及空白调零孔的吸光度值。

统计学方法 采用 SPSS 22.0 程序进行统计学分析, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多样本均数间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为显著性差异, $P < 0.01$ 为极显著性差异。

结果

1 微乳液体系组成的确定

按照乳化剂 (Triton X-100) 和助乳化剂 (正己醇) 的体积比 (K_m , 1 : 1、2 : 1、3 : 1) 配制成混合表面活性剂。将环己烷与混合表面活性剂按不同比例混合均匀, 分别向这些体系中滴定水溶液并观察微乳液透明度的变化; 在混合溶液出现浑浊时记录加入水的体积。以 Triton X-100+正己醇、环己烷、水为三相绘制三元相图, 确定微乳区域。通过滴定法确定此体系的拟三元相图如图 1 所示, 图中线左侧区域即为 W/O 微乳区域, 在此区域内配制溶液均为微乳液, 外观澄清透明, 超速离心后没有分层的现象。由各比例下的表面活性剂所绘制成的曲线围成的左侧成乳区域大小, 可以看出表面活性剂的乳化剂与助乳化剂比例为 $K_m = 2 : 1$ 时的相图面积较大, 即 Triton X-100 与正己醇体积比为 2 : 1 时, 微乳最易获得。

2 脂质磷酸钙纳米粒的制备

在确定微乳液体系最佳组成的基础上, 采用反相微乳模板法制备油溶性的载药磷酸钙内核, 进而采用薄膜法在磷酸钙内核表面重建非对称的磷脂双分子层, 其制备过程如图 2 所示。

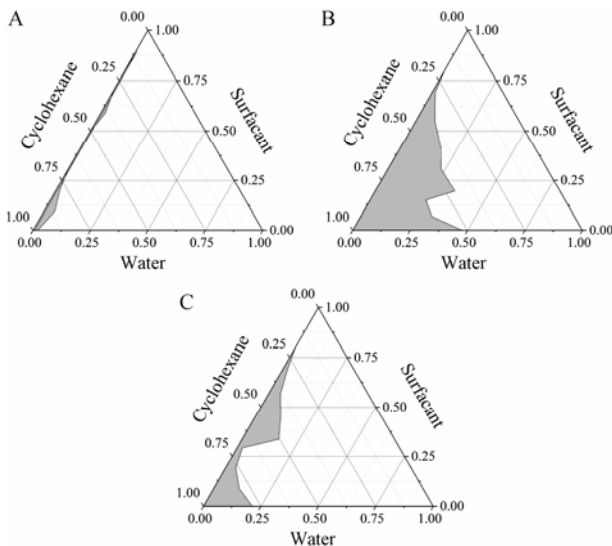


Figure 1 Pseudo-ternary phase diagram of Triton X-100-hexanol/cyclohexane/water microemulsion system with K_m value of 1 : 1 (A), 2 : 1 (B) and 3 : 1 (C)

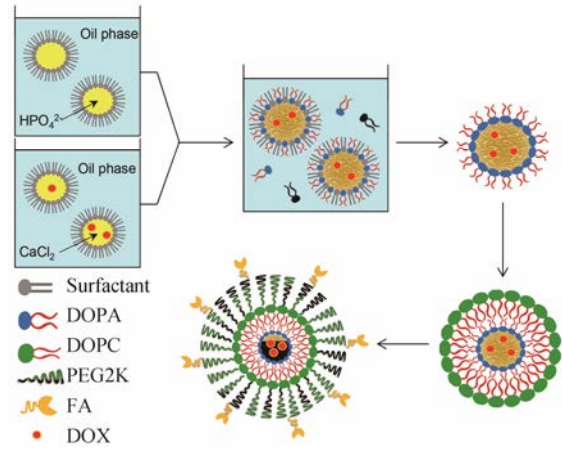


Figure 2 Schematic illustration of the synthesis of doxorubicin-loaded lipid calcium phosphate nanoparticles (DOX/LCP). DOPA: 1, 2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidic acid; DOPC: 1, 2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; PEG2K: Polyethylene glycol-2000; FA: Folic acid

在 LCP 制备过程中, 固定其他条件不变, 考察关键因素前体钙磷比 (Ca/P) 对粒径及包封率的影响 (表 1)。结果表明, 当 $Ca/P < 100$ 时粒径在 100 nm 以上; 随着 Ca/P 逐渐增加, 粒径显著降低, $Ca/P > 200$ 时粒径达到 50 nm 以下。包封率随着 Ca/P 的增加而有所降低, 当 $Ca/P > 300$ 时包封率 $< 80\%$ 。综合分析实验结果, Ca/P 选择 200 : 1 作为最佳比例。

Table 1 The effect of Ca/P ratios on preparation of DOX/LCP. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. PDI: Polydispersity index; DL: Drug loading; EE: Entrapment efficiency

Ca/P ratio	Size/nm	PDI	DL/%	EE/%
20	210.5 \pm 14.8	0.67 \pm 0.12	2.5	92.1
50	115.7 \pm 10.3	0.48 \pm 0.09	3.1	89.4
100	62.5 \pm 5.4	0.23 \pm 0.04	3.4	87.5
200	48.6 \pm 3.9	0.16 \pm 0.03	3.5	82.6
300	45.2 \pm 1.4	0.18 \pm 0.02	3.5	75.2

3 脂质磷酸钙纳米粒的理化表征

采用透射电镜观察磷酸钙内核及 LCP 的形态, 结果如图 3 所示。由图可见, 内核外观圆整, 呈球形, 分散性好, 透射电镜测得的粒径约 30 nm 左右。表面包裹磷脂双层后, 粒径略有增加, 平均粒径为 (48.6 \pm 3.9) nm, zeta 电位为 (-12.1 \pm 1.2) mV。LCP 的 zeta 电位绝对值比较低, 是由于 DSPE-PEG2K 的亲水链为聚乙二醇, 遮蔽了磷脂层的部分负电荷。

图 4A 中曲线为油溶性磷酸钙内核的 FTIR 图谱, 在 560 和 1030 cm^{-1} 处的吸收峰是由 PO_4^{3-} 引起的, 这些特征峰表明所得样品确为磷酸钙。3400 和 1540 cm^{-1} 处的吸收峰分别是由产物中 H_2O 的伸缩振动和

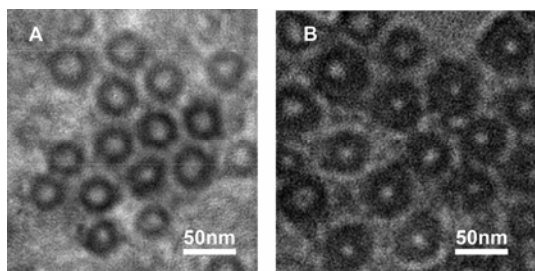


Figure 3 Typical TEM morphology of calcium phosphate cores (A) and LCP (B)

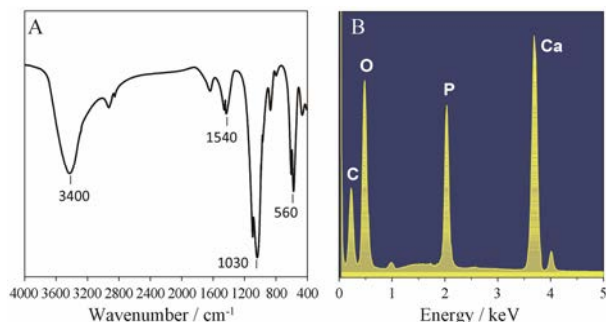


Figure 4 Physicochemical characterization of calcium phosphate cores. A: FT-IR spectra of CaP cores; B: EDS spectrum of synthesized CaP cores

弯曲振动引起的。图 4B 为磷酸钙内核的 EDS 能谱分析, 从图中可见, 粒子的主要成分为 Ca、P 和 O, 即磷酸钙的组成成分。其中 Ca 和 P 的含量比值大约为 1.4 : 1, 与文献^[18]报道中合成的磷酸钙的比例是一致的。

4 脂质磷酸钙纳米粒的血浆稳定性

LCP 在 37 °C 条件下分别置于模拟血浆 (含 10% 胎牛血清的 Tris 缓冲液) 及 Tris 缓冲液中 24 h 内的粒径和 PDI 变化见图 5。由图可见, LCP 显示了较好的物理稳定性, 粒径和 PDI 无显著性变化。

5 脂质磷酸钙纳米粒的体外释放特性

DOX/LCP 在不同 pH 条件下的释放曲线如图 6 所示。在 pH 为 7.4 介质中, DOX/LCP 释放呈现较低

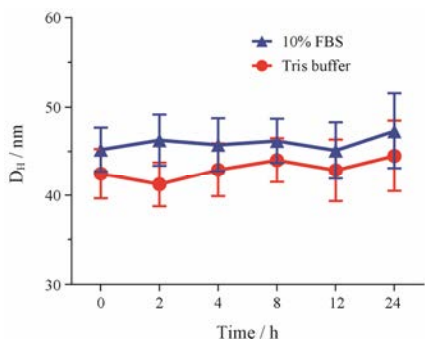


Figure 5 Particle size-stability of LCP in 10% fetal bovine serum (FBS) and Tris buffer

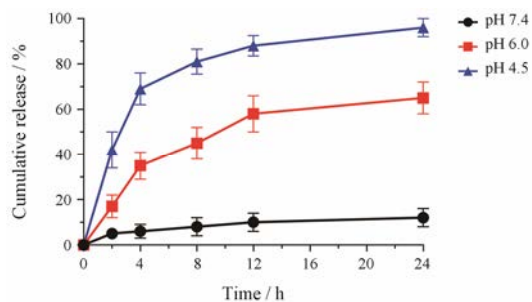


Figure 6 *In vitro* release profiles of DOX from LCP in medium with different pH values. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

的释放速率, 24 h 累计释放度低于 20%, 说明其在体循环中存在一定的稳定性; 随着释放介质 pH 值的降低, DOX/LCP 释放速度逐渐加快, pH 4.5 介质中在 24 h 累计释放量超过 90%, 说明 LCP 具有一定的 pH 敏感性, 可以在肿瘤微环境中及时释放药物。

6 脂质磷酸钙纳米粒的细胞摄取

共聚焦显微镜定性观察结果 (图 7) 表明, MCF-7/DOX 细胞与游离药物组孵育 3 h 后, 仅有微弱红色荧光分布在细胞核内, 流式细胞术分析结果显示细胞摄取率仅为 30.7%, 说明耐药细胞株对 DOX 有较强的外排性。而与 DOX/LCP 孵育相同时间后在细胞核观察到较强的荧光信号, 细胞摄取率提高至 72.6%, 说明 LCP 可以显著促进耐药细胞对 DOX 的摄取和蓄积。

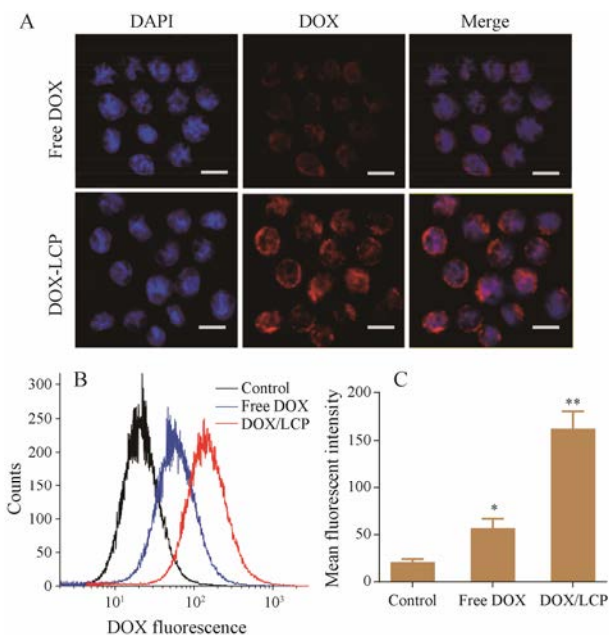


Figure 7 Cellular uptake of DOX/LCP. A: Intracellular localization of free DOX and DOX/LCP by confocal microscopy. Scale bar indicates 10 μ m. B: Quantifying intracellular uptake of DOX and DOX/LCP by flow cytometry analysis. Untreated cells were used as control. C: The quantified mean fluorescence intensity of DOX positive cells by flow cytometry analysis. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group

7 脂质磷酸钙纳米粒介导 DOX 的体外抗肿瘤活性

从图 8 可以看出, 空白 LCP 纳米粒不呈现细胞毒性, 与空白对照组相比无显著性差异 ($P>0.05$)。随着其浓度的增加, 细胞存活率几乎不受影响, 当其浓度达到 $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 细胞存活率在 80% 以上。DOX/LCP 的抗肿瘤活性比游离 DOX 组明显增强, IC_{50} 值分别为 4.6 ± 0.3 和 $11.8\pm 0.7 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 两者相比具有显著性差异 ($P<0.05$), 说明 DOX/LCP 是通过 DOX 而非药物载体起到肿瘤细胞抑制作用。

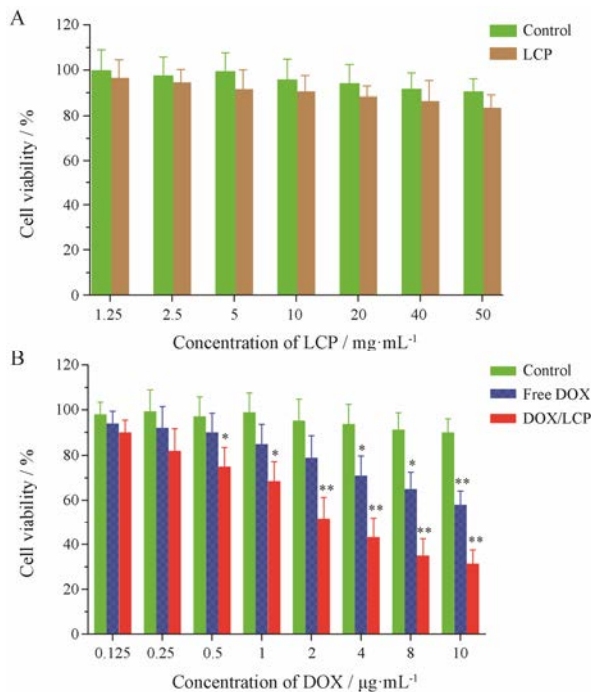


Figure 8 Cytotoxicity of LCP (A) and DOX/LCP (B) in MCF-7/DOX cells. $n=6$, $\bar{x}\pm s$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group

讨论

本文采用反相微乳法制备了粒径可控的磷酸钙纳米粒, 其中反相微乳是由水溶液分散到由 Triton X-100/正己醇/环己烷组成的三元油相溶液中制备得到^[19]。将氯化钙溶液/DOX 和磷酸钠溶液分别分散于油相中形成 W/O 型微乳, 两相混合过程中乳滴之间经过交换后发生共沉淀反应。DOPA 是一种亲水头部为磷酸基的负电荷磷脂, 与多价钙离子有很强的络合能力。在磷酸钙沉积过程中, DOPA 分子的疏水性尾基分布朝向油相, 而磷酸极性头部分布在乳滴水相中与生成的纳米粒在油水界面络合, 从而形成一层脂质膜稳定纳米粒的生长。经乙醇破乳、洗涤后, 表面覆盖磷脂单层的磷酸钙纳米核可重新分散于氯仿中。在 LCP 重建过程中, 外膜成分 (DOPC、胆固

醇、DSPE-PEG) 通过疏水相互作用以磷酸钙纳米核为模板进行自组装, 形成表面包覆不对称脂质双分子层的磷酸钙纳米粒。

在本研究中, LCP 的粒径受前体钙磷摩尔比例的影响较大, 只有当钙磷比大于 100 时才能得到粒径在 50 nm 以下的 LCP, 该结果与已有文献^[20]报道相一致。当钙磷比较高时 (200:1), 油水界面的 DOPA 可以和磷酸钙内核表面的过量钙离子络合, 从而保证磷酸钙的表面能够被 DOPA 充分覆盖改性。但过高的钙磷比会因较多的正电荷排斥而导致粒子产率下降, 从而影响药物的包封率。采用反相微乳法制得的 LCP 表面电势较低 (-12~-14 mV), 这是由于 DOPA 负电荷磷脂主要富集在内层膜与磷酸钙内核锚定, 而中性磷脂 (DOPC)、胆固醇及 PEG 高分子通过疏水相互作用排列在脂质膜的外层。

脂质体在体内循环过程中会被网状内皮系统的单核巨噬细胞吞噬而迅速从体内清除, 从而导致药物在肿瘤部位的富集不足。因此传统脂质体用于肿瘤靶向治疗时通常需要用 DSPE-PEG2K 进行表面修饰以延长体内循环时间^[21]。研究表明, 当脂质体表面的 PEG 修饰摩尔比达到 5%~8% 时, PEG 会由“蘑菇状”构象部分转变成具有更好保护性能的“毛刷状”构象^[22]。当 PEG 修饰摩尔比继续增加时, 脂质体会被具有表面活性的 DSPE-PEG 裂解成胶束而导致药物泄露^[23]。本研究制备的 LCP 以磷酸钙为固体内核, 磷脂膜通过 DOPA 与钙离子之间的强烈络合作用锚定在其表面, 相较于传统脂质体具有很高的物理稳定性, 其表面 PEG 修饰摩尔比可高达 20%。高密度的 PEG 可以保证 LCP 在体内外具有较高的物理稳定性。

游离 DOX 很难在耐药株细胞内蓄积, 其可被肿瘤细胞膜表面的 P-gp 糖蛋白泵出^[24]。药物通过包封于 LCP 中, 可避免耐药相关蛋白的识别、结合及外排, 使药物在细胞内的摄取及滞留能力均增加, 从而发挥独特的逆转耐药效应^[25]。LCP 以受体介导的内吞方式被细胞摄取内化形成胞内体后, 在酸性内涵体/溶酶体环境中发生解离, 一方面会形成高浓度的胞内离子从而改变内涵体渗透压使其发生破裂; 另一方面解离产生的大量磷酸氢根离子具有较强的 pH 缓冲作用, 通过捕获质子能防止早期内涵体内 pH 下降而过早与溶酶体融合, 从而可以避免溶酶体内发生的酶降解^[26]。在后续研究中将对 LCP 克服肿瘤耐药的机制进行深入的探讨。

References

- [1] Ridi F, Meazzini I, Castroflorio B, et al. Functional calcium phosphate composites in nanomedicine [J]. *Adv Colloid Interface Sci*, 2017, 244: 281–295.
- [2] Yin H, Kanasty RL, Eltoukhy AA, et al. Non-viral vectors for gene-based therapy [J]. *Nat Rev Genet*, 2014, 15: 541–555.
- [3] Choi AH, Ben-Nissan B. Calcium phosphate nanocoatings and nanocomposites, part I: recent developments and advancements in tissue engineering and bioimaging [J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2015, 10: 2249–2261.
- [4] Tabaković A, Kester M, Adair JH. Calcium phosphate-based composite nanoparticles in bioimaging and therapeutic delivery applications [J]. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotecnol*, 2012, 4: 96–112.
- [5] Xu HH, Wang P, Wang L, et al. Calcium phosphate cements for bone engineering and their biological properties [J]. *Bone Res*, 2017, 5: 17056.
- [6] Parent M, Baradari H, Champion E, et al. Design of calcium phosphate ceramics for drug delivery applications in bone diseases: a review of the parameters affecting the loading and release of the therapeutic substance [J]. *J Control Release*, 2017, 252: 1–17.
- [7] Li J, Yang Y, Huang L. Calcium phosphate nanoparticles with an asymmetric lipid bilayer coating for siRNA delivery to the tumor [J]. *J Control Release*, 2012, 158: 108–114.
- [8] Ginebra MP, Canal C, Espanol M, et al. Calcium phosphate cements as drug delivery materials [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, 64: 1090–1110.
- [9] Elzoghby AO, Hemasa AL, Freag MS. Hybrid protein-inorganic nanoparticles: from tumor-targeted drug delivery to cancer imaging [J]. *J Control Release*, 2016, 243: 303–322.
- [10] Deshpande PP, Biswas S, Torchilin VP. Current trends in the use of liposomes for tumor targeting [J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2013, 8: 1509–1528.
- [11] Yang Y, Xie X, Yang Y, et al. A review on the influences of size and surface charge of liposome on its targeted drug delivery *in vivo* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2013, 48: 1644–1650.
- [12] Fang Y, Xue J, Gao S, et al. Cleavable PEGylation: a strategy for overcoming the “PEG dilemma” in efficient drug delivery [J]. *Drug Deliv*, 2017, 24: 22–32.
- [13] Zhang D, Xu H, Hu M, et al. “PEG dilemma” for liposomes and its solving approaches [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2015, 50: 252–260.
- [14] Haynes MT, Huang L. Lipid-coated calcium phosphate nanoparticles for nonviral gene therapy [J]. *Adv Genet*, 2014, 88: 205–229.
- [15] Satterlee AB, Huang L. Current and future theranostic applications of the lipid-calcium-phosphate nanoparticle platform [J]. *Theranostics*, 2016, 6: 918–929.
- [16] Haynes MT, Huang L. Maximizing the supported bilayer phenomenon: liposomes comprised exclusively of PEGylated phospholipids for enhanced systemic and lymphatic delivery [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8: 24361–24367.
- [17] 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.
- [18] Uskoković V, Desai TA. Phase composition control of calcium phosphate nanoparticles for tunable drug delivery kinetics and treatment of osteomyelitis. I. Preparation and drug release [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2013, 101: 1416–1426.
- [19] Guo S, Miao L, Huang L. Lipid coated calcium phosphate nanoparticles for drug delivery [J]. *Acta Biophys Sin (生物物理学报)*, 2013, 29: 823–830.
- [20] Tang J, Li L, Howard CB, et al. Preparation of optimized lipid-coated calcium phosphate nanoparticles for enhanced *in vitro* gene delivery to breast cancer cells [J]. *J Mater Chem B*, 2015, 3: 6805–6812.
- [21] Zhang L, Wang Y, Gao H, et al. The construction of cell-penetrating peptide R8 and pH sensitive cleavable polyethylene glycols co-modified liposomes [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2015, 50: 760–766.
- [22] Huang L, Liu Y. *In vivo* delivery of RNAi with lipid-based nanoparticles [J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2011, 13: 507–530.
- [23] Suk JS, Xu Q, Kim N, et al. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 99: 28–51.
- [24] Ma P, Mumper RJ. Anthracycline nano-delivery systems to overcome multiple drug resistance: a comprehensive review [J]. *Nano Today*, 2013, 8: 313–331.
- [25] Markman JL, Rekechenetskiy A, Holler E, et al. Nanomedicine therapeutic approaches to overcome cancer drug resistance [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65: 1866–1879.
- [26] Hu Y, Haynes MT, Wang Y, et al. A highly efficient synthetic vector: nonhydrodynamic delivery of DNA to hepatocyte nuclei *in vivo* [J]. *ACS Nano*, 2013, 7: 5376–5384.