

隐丹参酮靶向脂质体的构建及其体外抗脑胶质瘤考察

赵华聪^{1,2}, 王永明^{1,2}, 崔季维^{1,2}, 封宽瀚^{1,2}, 王若宁^{1,2*}, 狄留庆^{1,2*}

(1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210046; 2. 江苏省中药高效给药系统工程技术研究中心, 江苏 南京 210023)

摘要: 隐丹参酮 (cryptotanshinone, CPT) 具有抗脑胶质瘤活性, 但其存在溶解度低、肿瘤渗透性弱等问题, 因此设计具有深度穿透、精准靶向的纳米给药系统迫在眉睫。本文采用乳化蒸发法制备了 tLyp-1 修饰的隐丹参酮脂质体 (tLyp-1 modified liposomes loaded with CPT, tLipo/CPT), 用脂质体负载 CPT, 并在其表面修饰具有靶向肿瘤新生血管和肿瘤细胞膜神经毡蛋白受体 (neuropilin receptors, NRP) 的穿膜肽 tLyp-1, 使 CPT 能够精准靶向脑胶质瘤并准确释放。通过粒径、多分散系数 (polymer dispersity index, PDI)、胞内荧光参数、透射电镜扫描等确定 tLipo/CPT 的粒径大小为 (162.2 ± 14.6) nm, PDI 为 0.24 ± 0.03 ; tLyp-1 肽修饰的最佳摩尔比例为 0.5%; 靶向脂质体呈光滑圆整的球形。高效液相色谱法定量测定其包封率为 (70.06 ± 7.22) %; 靶向脂质体 (liposomes modified with tLyp-1 peptide, tLipo) 相较于脂质体 (liposomes not modified with tLyp-1, Lipo) 能够被 GL261 细胞更多地摄取, tLipo 组胞内荧光强度较 Lipo 组增加 40%, 进一步确认 GL261 细胞对 tLipo/CPT 的摄取为通过神经毡蛋白受体 1 (NRP-1) 介导的内吞途径; MTT 实验表明 tLipo/CPT 可显著抑制脑胶质瘤 GL261 细胞的增殖, 其半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC_{50}) 为 $5.70 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; tLipo/CPT 可跨越体外血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 模型; 此外, 体内荧光成像实验显示, 尾静脉注射 DiR 标记的 tLipo 后, 0.5 h 在小鼠脑部即可观察到荧光分布, 且 24 h 后脑部仍存在荧光, 进一步确定 tLipo/CPT 可穿透 BBB, 且其可通过抑制脑胶质瘤 GL261 细胞的增殖发挥抗脑胶质瘤作用。动物福利和实验过程均遵循南京中医药大学动物伦理委员会的规定。

关键词: 隐丹参酮; 多肽; 血脑屏障; 脂质体; 脑胶质瘤

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2021)12-3268-09

Construction of targeted cryptotanshinone liposomes and research on its *in vitro* anti-glioma effect

ZHAO Hua-cong^{1,2}, WANG Yong-ming^{1,2}, CUI Ji-wei^{1,2}, FENG Kuan-han^{1,2},
WANG Ruo-ning^{1,2*}, DI Liu-qing^{1,2*}

(1. School of Pharmacy of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China; 2. Jiangsu Provincial TCM Engineering Technology Research Center of High Efficient Drug Delivery System, Nanjing 210023, China)

Abstract: Cryptotanshinone (CPT), an active ingredient with the inhibitory effect on brain glioma cells, is trapped with poor solubility and low tumor permeability. Therefore, it is urgent to design nano drug delivery systems characterized with deep penetration and accurate targeting. In the present study, tLyp-1 modified liposomes loaded with CPT (tLipo/CPT) was prepared by emulsion solvent evaporation method. Peptide tLyp-1 which targeting tumor angiogenesis and neuropilin receptors (NRP) was modified on surface of CPT liposomes, with the aim of active targeting brain glioma cells and further release CPT precisely. The size and polymer dispersity index (PDI) of tLipo/CPT were (162.2 ± 14.6) nm and 0.24 ± 0.03 . The optimal molar ratio of tLyp-1 modified on CPT liposomes

收稿日期: 2021-07-16; 修回日期: 2021-08-22.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81903557, 82074024); 江苏省自然科学基金资助项目 (BK20190802); 大学生创新创业训练计划项目 (202010315XJ040).

*通讯作者 Tel: 15852937869, E-mail: ruoningw@njucm.edu.cn; diluqing@njucm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1050

was 0.5% determined by intracellular fluorescence parameters. The morphology displayed a smooth sphericity structure as determined by transmission electron microscope. Efficiency of CPT encapsulated in tLipo/CPT was detected by high performance liquid chromatography. The encapsulation efficiency of CPT was $(70.06 \pm 7.22) \%$. Liposomes modified with tLyp-1 peptide (tLipo) were internalized more than liposomes not modified with tLyp-1 (Lipo) by GL261 cells. Fluorescence intensity of tLipo in GL261 cells increased 40% than that of Lipo. Furthermore, we proved that the intake of tLipo/CPT in GL261 cells was mediated by NRP-1 receptor. MTT analysis indicated that tLipo/CPT significantly inhibit the proliferation of GL261 cells. The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) was $5.70 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. *In vitro* blood-brain barrier (BBB) model experiment indicated that tLipo/CPT could penetration across BBB. Moreover, *in vivo* fluorescence biodistribution study indicated tail vein injection of DiR labeled tLipo after 0.5 h, DiR fluorescence could be observed in the brain of mice. Even after 24 h, DiR fluorescence still was observed in the brain. Our research certified that tLipo/CPT can penetrate the BBB and show effect of anti-glioma by inhibiting the proliferation of GL261 cells. The animal experiment was carried out in accordance with protocol evaluated and approved by the Ethics Committee of Nanjing University of Chinese Medicine.

Key words: cryptotanshinone; peptide; blood-brain barrier; liposome; glioma

脑胶质瘤是成人最常见的原发性脑瘤, 占有原发性脑瘤的 51.4%^[1]。恶性脑胶质瘤具有快速浸润性生长、增殖迅速以及容易复发等特点, 临床治疗效果不佳, 复发率高, 病死率极高, 5 年存活期仅为 5%^[2]。脑胶质瘤作为临床高死亡率、预后差、难治愈的肿瘤之一, 引发广大研究者开始寻找有效治疗脑胶质瘤的药物和方法。

肿瘤在中医病证中通常归属于“症瘕积聚”范畴, 血瘀证贯穿肿瘤发生、发展的始终^[3]。因此, 活血化瘀是肿瘤的一种重要治法。丹参 (*Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*) 是临床常用的活血化瘀代表药, 在临床治疗肿瘤中, 常与其他中药配伍应用。已有研究表明, 丹参中的水溶性活性成分丹参多酚酸盐^[4]、丹酚酸 B^[5]等, 以及脂溶性活性成分隐丹参酮^[6]、丹参酮 I^[7]、丹参酮 II A^[8]、二氢丹参酮 I^[9]均对脑胶质瘤细胞有直接杀伤作用, 显示出一定的抗脑胶质瘤活性, 有望成为脑胶质瘤的治疗药物。其中, 隐丹参酮 (cryptotanshinone, CPT) 作为丹参的主要代表成分之一, 溶解度极低、口服生物利用度低等性质限制了其临床使用^[10]。CPT 能够透过血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB), 且显示出抑制脑胶质瘤 C6、U251、T98G、U87 细胞的增殖、侵袭和迁移作用^[6,11]。CPT 对脑胶质瘤的抑制作用可能与抑制 STAT3 信号通路的激活有关, STAT3 信号通路在脑胶质瘤细胞中呈持续激活状态^[12]。实验研究表明, 灌胃给予 $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ CPT 对原位 U87 脑胶质瘤裸鼠模型脑胶质瘤的发生发展具有抑制作用, 其作用机制可能与 CPT 上调蛋白酪氨酸磷酸酶 SHP-2 的活性、抑制 STAT3 信号通路的激活有关^[13]。此外, 亦有研究表明, 抑制 STAT3 信号通路可以延长荷 GL261 胶质瘤小鼠中位生存期^[14]。但由于脑部转运蛋白等作用, 限制了

CPT 的脑部渗透^[15], 限制了其抗脑胶质瘤的活性。

因此, 本文设计靶向脂质体, 通过高效包载中药有效成分, 并在其表面修饰具有主动靶向脑胶质瘤的多肽, 有望解决 CPT 溶解性差、生物利用度低的问题^[16], 且能够有效增加 CPT 瘤内蓄积^[17]。tLyp-1 肽氨基酸序列为 Cys-Gly-Asn-Lys-Arg-Thr-Arg (CGNKRTR), 可与肿瘤新生血管和肿瘤细胞膜上高度表达的神经毡蛋白受体 (neuropilin receptors, NRP) 高效结合, 产生跨膜血管渗透和肿瘤穿膜作用, 具有高 BBB 穿透性及肿瘤靶向性^[18]; 同时脂质体的类脂质双分子层结构和纳米级别粒径使得活性成分能够顺利到达病灶部位发挥作用, 提高药物的生物利用度。构建修饰靶向肽 tLyp-1 的 CPT 脂质体—tLipo/CPT (tLyp-1 modified liposomes loaded with CPT), 对其制剂学进行表征; 利用靶向脂质体负载 CPT 透过 BBB, 主动靶向脑胶质瘤, 最大程度地使得 CPT 在病灶部位积聚, 并对其体外抗脑胶质瘤作用进行考察。

材料与方法

药品与试剂 CPT [纯度 HPLC (high performance liquid chromatography) > 97%, 南京金益柏公司]; tLyp-1 肽 (序列 CGNKRTR, 国平药业合成); 二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱 (DMPC)、DSPE-PEG₂₀₀₀-MAL (西安瑞禧公司); 香豆素 6 (coumarin 6, C6)、三 (2-羧乙基) 膦盐酸盐 (TCEP-HCl) (翼飞雪公司); 荧光染料 DiI、DiR (苏州宇恒生物科技有限公司)。

细胞株 小鼠脑胶质瘤 GL261 细胞、小鼠脑微血管内皮 bEnd.3 细胞 (中国科学院细胞库)。

动物 BALB/c 小鼠, SPF 级, 18~20 g, 雄性 (合格证号: 410983211100112883)。动物实验符合伦理学

标准,并得到南京中医药大学伦理委员会的批准。

DSPE-PEG₂₀₀₀-tLyp-1的制备 称取2 μmol DSPE-PEG₂₀₀₀-MAL、4 μmol tLyp-1和40 μmol TCEP·HCl至50 mL平底烧瓶中,加入3 mL磷酸盐缓冲液(PBS, pH 6.5)溶解后,氮气保护,室温搅拌48 h。48 h后,将反应液吸出,转至3 000 Da分子质量的透析袋中,于足量超纯水中进行透析,透析24 h后将溶液进行真空冷冻干燥,即得DSPE-PEG₂₀₀₀-tLyp-1粉末。

tLipo/CPT的制备 称取适量DMPC、DSPE-PEG₂₀₀₀-tLyp-1、CPT溶解于氯仿中,作为有机相,将有机相逐滴加入水相(PBS)中,边滴加边搅拌,滴加完毕,搅拌30 min,旋转蒸发抽去有机溶剂,转至西林瓶中,195 W,冰水浴上进行超声破碎,超声破碎1 s,间歇2 s,超声破碎一定时间,过0.8 μm孔径滤膜,除去游离的CPT,即得tLipo/CPT。进一步以粒径、多分散系数(polymer dispersity index, PDI)和包封率(encapsulation efficiency, EE, %)为考察指标,对DMPC与CPT的比例($m_{DMPC} : m_{CPT}$)、有机相与水相的体积比($V_{organic\ phase} : V_{water\ phase}$)、超声破碎的总时间(time/min)以及DSPE-PEG₂₀₀₀-tLyp-1与磷脂DMPC的摩尔比进行优化考察,得到最佳工艺制备的tLipo/CPT。

粒径检测 制备所得tLipo/CPT用PBS作适当稀释后,混匀加入比色皿中,利用马尔文纳米颗粒技术仪(Zetasizer Nano ZS90, Malvern)测定粒径、PDI和zeta电位。

形态观察 采用负染色法,置于透射电镜(transmission electron microscope, TEM)下观察tLipo/CPT的形态。

EE的测定 采用高效液相色谱法(HPLC)测定CPT的EE,其计算方法如公式(1)。色谱方法:色谱柱为Thermo BDS HYPERSIL C18 (4.6 mm × 250 mm);流动相为乙腈(A)-0.02%磷酸溶液(B);柱温为35 °C;检测波长270 nm;进行梯度洗脱:0~6 min, 61% A~61% A; 6~20 min, 61% A~90% A; 20~20.5 min, 90% A~61% A; 20.5~25 min, 61% A~61% A; 流速:1 mL·min⁻¹;运行时间25 min。

$$EE/\% = \frac{\text{CPT的包载质量}}{\text{CPT的投入量}} \times 100\% \quad (1)$$

稳定性考察 将最终制备所得的tLipo/CPT避光保存于4 °C冰箱中,每隔1天测定其粒径和PDI,连续测定7天。

泄漏率考察 取新鲜制备的tLipo/CPT,按照“EE的测定”项下色谱方法测定CPT含量,计算贮存前tLipo/CPT包封的CPT的量,将tLipo/CPT避光保存于4 °C下,7天后取出测定其CPT含量,计算贮存7天后泄漏

到介质中CPT的量,计算泄漏率,如公式(2)。

$$\text{泄漏率}/\% = \frac{\text{贮存后泄漏到介质中的药量}}{\text{贮存前包封的药量}} \times 100\% \quad (2)$$

tLipo/CPT中CPT的体外释放考察 取制备所得的tLipo/CPT,置于8 000 Da分子质量的透析袋中,放入足量的pH 7.2~7.4和pH 5.4的PBS溶液中,室温不断振摇,分别于0、15 min、30 min、45 min、1 h、2 h、4 h、8 h、12 h和24 h时间点吸取释放介质,每次取样完毕,立即补入等体积的新鲜释放介质。各时间点的样品加入甲醇破乳,按照“EE的测定”项下色谱方法测定CPT的含量,计算CPT的累积释放百分率 Q_a ,如公式(3)。

$$Q_a/\% = \frac{M_n}{M} \times 100\% \quad (3)$$

M_n :不同时间点测得的释放介质中CPT的量; M :tLipo/CPT中含有CPT的总量。

tLipo/CPT对肿瘤细胞的体外增殖抑制作用 采用MTT实验研究tLipo/CPT对GL261细胞的体外增殖抑制作用,并计算其半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)。

tLipo/CPT与GL261细胞共定位及摄取定量考察 以C6替代CPT,按照tLipo/CPT的制备方法制备得到C6标记的靶向脂质体(C6 labeled tLyp-1 modified liposomes, tLipo/C6)和不加肽C6标记的脂质体(C6 labeled liposomes not modified with tLyp-1, Lipo/C6),将tLipo/C6和Lipo/C6与GL261细胞共孵育4 h后,共聚焦显微镜下观察tLipo/C6和Lipo/C6与GL261细胞的共定位情况,并利用多功能酶标仪(TECAN Infinite 200 PRO)对细胞内摄取的tLipo/C6和Lipo/C6荧光强度进行定量。

GL261细胞摄取tLipo/CPT的机制研究 以不同的细胞内吞抑制剂:5 mmol·L⁻¹盐酸氯丙嗪、10 mmol·L⁻¹甲基-β-环糊精、5 mmol·L⁻¹阿米洛利预先处理GL261细胞30 min后,给予DiI荧光染料标记的靶向脂质体(DiI labeled tLyp-1 modified liposomes, tLipo/DiI)处理细胞4 h,测定细胞摄取tLipo/DiI的荧光强度;以不同浓度的游离tLyp-1肽预先处理GL261细胞30 min后,给予tLipo/DiI处理细胞4 h,测定细胞摄取tLipo/DiI的荧光强度。

tLipo/CPT的体外BBB穿透能力及机制考察 bEnd.3细胞(1×10⁵个)接种于24孔Transwell小室(Millipore公司,孔径0.4 μm,直径6.5 mm)中,隔天更换细胞培养液,测定跨膜电阻值(transendothelial electrical resistance, TEER),待TEER超过200 Ω·cm²,于下室接种GL261细胞(1×10⁵个),培养至细胞贴壁。吸去上室细胞培养液,给予tLipo/C6和Lipo/C6,于

12 h后测定下室GL261细胞中摄取的荧光强度。以不同的细胞内吞抑制剂: $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸氯丙嗪、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲基- β -环糊精、 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 阿米洛利预先处理bEnd.3细胞30 min后, 给予tLipo/DiI处理细胞4 h, 测定细胞摄取tLipo/DiI的荧光强度。

tLipo/CPT的体内BBB穿透能力考察 以近红外染料DiR替代CPT, 按照tLipo/CPT的制备方法制备得到DiR标记的靶向脂质体(DiR labeled tLyp-1 modified liposomes, tLipo/DiR) 和不加肽DiR标记的脂质体(DiR labeled liposomes not modified with tLyp-1, Lipo/DiR)。小鼠背部及脑部脱毛后, 每只小鼠尾静脉注射荧光制剂 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 分别于注射后0.5、1、2、4、6、8、12和24 h进行活体成像, 拍摄小鼠体内荧光分布情况(IVIS spectrum; $\lambda_{\text{Ex}}/\lambda_{\text{Em}}$: 745 nm/800 nm)。注射后8 h后脱颈椎处死小鼠, 取出脑组织, 进行离体脑组织荧光成像拍摄。将脑组织进行冷冻切片后, 于倒置荧光显微镜下观察tLipo/DiR和Lipo/DiR在脑内的DiR荧光分布情况。

数据分析 所得数据用平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示; 用Excel、GraphPad Prism 6.0和IBM SPSS Statistics 21统计软件进行数据统计和分析, 组间均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义; 两组独立样本比较采用*t*检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义; 计算 IC_{50} 及其95%置信区间, 并作probit分析。采用Living image 4.5.5软件对小动物活体成像图片进行分析; 采用Leica Application Suite X软件对共聚焦图像进行分析。

结果

1 tLipo/CPT的制备及工艺参数优化

采用乳化蒸发法制备得到负载CPT的靶向脂质体tLipo/CPT。以EE、粒径及PDI为指标, 对制备时处方中CPT的投入量($m_{\text{DMPC}}:m_{\text{CPT}} = 15:1, 20:1, 25:1$)、有机相与水相的体积比($V_{\text{Organic phase}}:V_{\text{Water phase}} = 1:1, 1:2, 1:4$)、超声破碎总时间($\text{time}/\text{min} = 5, 10, 15$)进行考察。综合不同指标, 当 $m_{\text{DMPC}}:m_{\text{CPT}}$ 为20:1、 $V_{\text{Organic phase}}:V_{\text{Water phase}} = 1:2$ 、超声破碎总时间为10 min时, 制备所得

tLipo/CPT的EE较高的同时, 粒径及PDI较小(图1)。

以巯基-马来酰亚胺迈克尔加成反应^[19]为原理, 合成制备得到DSPE-PEG₂₀₀₀-tLyp-1(图2A)。向处方有机相中加入不同摩尔比的DSPE-PEG₂₀₀₀-tLyp-1和DMPC(0、0.5%、1%、3%), 用C6代替CPT加入处方有机相中, 按照CPT脂质体的制备方法得到修饰有不同摩尔比DSPE-PEG₂₀₀₀-tLyp-1的荧光脂质体Lipo/C6、0.5% tLipo/C6、1% tLipo/C6、3% tLipo/C6, 将上述不同多肽摩尔比的荧光脂质体与GL261细胞共孵育4 h后, 利用流式细胞仪检测不同组别细胞内摄取的荧光强度, 0.5% tLipo/C6组显示出最高的荧光强度(图2B、C)。同时制备含有不同多肽摩尔比的tLipo/CPT, 并对其粒径、PDI进行了测定, 发现0.5% tLipo/CPT的粒径为(156.4 ± 7.1) nm, PDI为 0.14 ± 0.05 , 与载CPT脂质体组(liposomes not modified with tLyp-1 loaded with CPT, Lipo/CPT)的粒径(156.1 ± 14.5) nm相近, 而1% tLipo/CPT和3% tLipo/CPT的粒径分别增大至(188.6 ± 16.5) nm、(192.2 ± 1.2) nm(表1)。因此, 向处方有机相中加入0.5%的DSPE-PEG₂₀₀₀-tLyp-1作为最优的磷脂多肽修饰比例。最终确定tLipo/CPT的最优处方工艺为: 取DMPC、DSPE-PEG₂₀₀₀-tLyp-1、CPT(200:23:1, mol/mol/mol), 加1 mL氯仿溶解, 作为有机相, 将有机相逐滴加入2 mL水相(PBS)中, 边滴加边搅拌, 滴加完毕, 搅拌30 min, 旋转蒸发抽去有机溶剂, 转至西林瓶中, 195 W, 冰水浴上进行超声破碎, 超声破碎1 s, 间歇2 s, 超声破碎10 min, 过0.8 μm 孔径的滤膜除去游离CPT, 即得tLipo/CPT。所得最终制剂tLipo/CPT中CPT的EE为(70.06 ± 7.22) %。

2 tLipo/CPT的制剂表征

以最优处方工艺制备得到的tLipo/CPT, 粒径大小为(162.2 ± 14.6) nm(图2D), PDI为 0.24 ± 0.03 , zeta电位为(-2.3 ± 2.1) mV, TEM图显示tLipo/CPT为圆整球形(图2D)。将新鲜制备所得tLipo/CPT贮存于4 $^{\circ}\text{C}$, 每天测定其粒径分布和电位, 连续测定7天, 观察其7天内4 $^{\circ}\text{C}$ 放置稳定性。结果显示, tLipo/CPT放置7天, 粒径、PDI及电位无明显变化(图2E、F), 较为稳定。

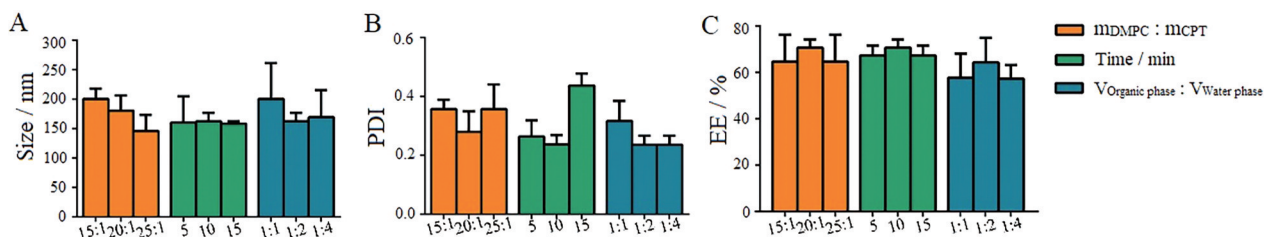


Figure 1 Size distribution (A), polymer dispersity index (PDI, B), and encapsulation efficiency (EE, C) of tLyp-1 modified liposomes loaded with cryptotanshinone (tLipo/CPT) in different prescriptions ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

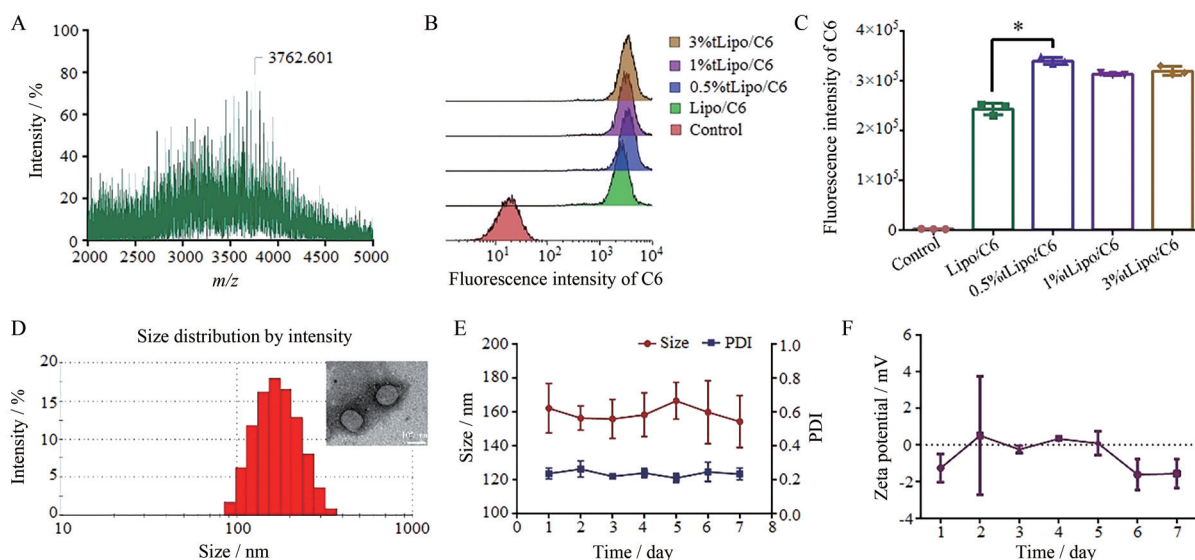


Figure 2 Preparation and characteristic analysis of tLipo/CPT. A: DSPE-PEG₂₀₀₀-tLyp-1 synthesized was analyzed by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometer (MALDI-TOF MS); B: Fluorescence intensity of tLipo/C6 contain different molar ratio of DSPE-PEG₂₀₀₀-tLyp-1 after incubated with GL261 cells for 4 h was determined by flow cytometry; C: Quantification of intracellular fluorescence intensity of C6 after incubated with tLipo/C6 contain different molar ratio of DSPE-PEG₂₀₀₀-tLyp-1 ($n = 3, \bar{x} \pm s, *P < 0.05$); D: The size distribution and morphology of tLipo/CPT were detected by Malvern particle size analyzer (dynamic light scattering, DLS) and transmission electron microscope (TEM) respectively; E, F: PDI (E) and zeta potential (F) of tLipo/CPT kept at 4 °C on the 1st day to 7th day were monitored by DLS ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Size, PDI, and zeta potential of different molar ratio tLyp-1 modified Lipo/CPT detected by DLS ($n = 3, \bar{x} \pm s$). Lipo/CPT: Liposomes not modified with tLyp-1 loaded with CPT

Name	Size/nm	PDI	Zeta potential/mV
Lipo/CPT	156.1 ± 14.5	0.14 ± 0.03	-0.2 ± 3.7
0.5% tLipo/CPT	156.4 ± 7.1	0.14 ± 0.05	-1.6 ± 0.8
1% tLipo/CPT	188.6 ± 16.5	0.21 ± 0.05	-1.7 ± 2.4
3% tLipo/CPT	192.2 ± 1.2	0.21 ± 0.08	-2.9 ± 0.5

为考察CPT在不同pH环境中从tLipo/CPT中的释放情况, 将tLipo/CPT置于分子质量8 000 Da透析袋中, 分别置于足量的pH 7.2~7.4和pH 5.4的PBS中, 测定0、15 min、30 min、45 min、1 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h不同时间点CPT的 Q_a 。结果表明(图3), pH为7.2~7.4时, 在前2 h内, tLipo/CPT释放CPT的量为(40.0 ± 8.8)%, 12 h后释放CPT变缓, 24 h后有(89.2 ± 15.1)%的CPT从tLipo/CPT中释放出来(图3)。而在pH 5.4下, tLipo/CPT具有快速和大量释药行为, 在2 h时, 释放出(76.0 ± 18.8)%的CPT, 在4 h后CPT的释放变缓, 且24 h后CPT的释放率达(95.9 ± 2.4)%, 这提示CPT可在进入肿瘤细胞核内体和溶酶体的酸性环境后从tLipo/CPT中快速并大量释放。将新鲜制备的tLipo/CPT贮存于4 °C, 7天后取出, 利用HPLC测定贮存7天后泄漏到制剂介质中CPT的量, 7天后CPT的泄漏率为(24.7 ± 8.2)%, 表明tLipo/CPT在4 °C放置下较为稳定。

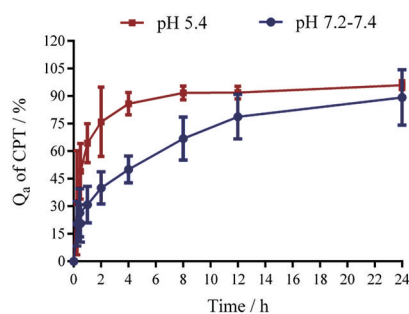


Figure 3 Cumulative release of CPT from tLipo/CPT in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2 - 7.4 and pH 5.4) was detected by high performance liquid chromatography (HPLC) at different points of time ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

3 tLipo/CPT对GL261细胞的体外增殖抑制作用

为了探讨tLipo/CPT对胶质瘤GL261细胞的体外增殖抑制作用, 用tLipo/CPT处理GL261细胞后, 加入MTT检测GL261细胞的存活率。如图4所示, tLipo/CPT组显示出较好的抗GL261细胞增殖作用, 当药物CPT浓度为7.5 μmol·L⁻¹时, 游离CPT组(free CPT)GL261细胞存活率为(69.03 ± 4.31)%, Lipo/CPT组为(33.05 ± 3.88)%, 而tLipo/CPT组具有最低的细胞存活率, 为(26.90 ± 1.65)%。且结果显示, 不包载CPT的空白载体tLipo, 按照tLipo/CPT组同等浓度梯度配制后给予GL261细胞, 对其生长没有抑制作用, 细胞存活率为

(106.53 ± 6.86)%, 表明该载体对 GL261 细胞生长没有毒性。此外, 与游离 CPT 组相比, tLipo/CPT 对 GL261 细胞的杀伤作用较强, IC_{50} 值为 $5.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 低于游离的 CPT 组和不加 tLyp-1 修饰的 CPT 脂质体组 (表 2), 可能由于 tLyp-1 肽的修饰增加了 GL261 细胞对 tLipo/CPT 的摄取, 增加 CPT 在细胞内的蓄积, 从而产生更强的毒性。

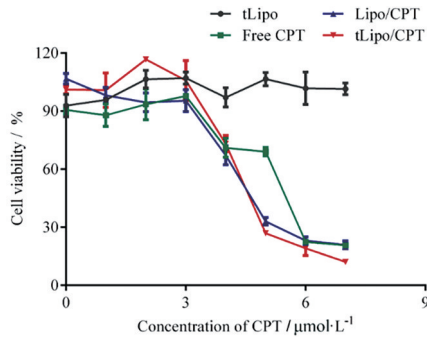


Figure 4 Cytotoxicity of different preparations on GL261 cells. GL261 cells were treated with free CPT, tLipo, Lipo/CPT, and tLipo/CPT for 24 h and the viability was detected by MTT ($n = 4, \bar{x} \pm s$)

Table 2 IC_{50} of free CPT, Lipo/CPT, and tLipo/CPT

Sample	CPT/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	95% Confidence limit for CPT/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
Free CPT	9.31	(7.67, 11.51)
Lipo/CPT	6.20	(5.28, 7.39)
tLipo/CPT	5.70	(4.83, 6.85)

4 tLipo/CPT 靶向 GL261 细胞能力考察

作者进一步验证了 tLyp-1 的修饰是否赋予 tLipo/CPT 更强的被细胞摄取的能力。按照 tLipo/CPT 制备方法, 用 C6 代替 CPT, 得到加 tLyp-1 肽修饰的荧光脂质体 tLipo/C6 和不加肽修饰的荧光脂质体 Lipo/C6。将 tLipo/C6 和 Lipo/C6 与 GL261 细胞共孵育 4 h 后, 共聚焦下观察 GL261 细胞对 tLipo/C6 和 Lipo/C6 的摄取

情况。结果显示, tLipo/C6 和 Lipo/C6 均分布在细胞质内, 绿色荧光信号 tLipo/C6 组强于 Lipo/C6 组 (图 5A)。tLipo/C6 和 Lipo/C6 与 GL261 细胞共孵育 4 h 后, 对胞质内摄取的制剂荧光强度进行定量, 结果表明, GL261 细胞对 tLipo/C6 的摄取量相较于 Lipo/C6 增加了 67% (图 5B), 这表明 tLyp-1 肽修饰后增加了胶质瘤 GL261 细胞对制剂的摄取, 修饰后的脂质体具有更高效的靶向 GL261 细胞的能力。

5 GL261 细胞摄取 tLipo/CPT 的机制验证

已证明 tLipo/CPT 对 GL261 细胞显示出良好的体外杀伤作用, 加 tLyp-1 肽修饰的效果 ($IC_{50} = 5.70 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 优于不加肽修饰组 ($IC_{50} = 6.20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 且加肽修饰后 GL261 细胞对其摄取更多 (图 5)。为了阐明 tLipo/CPT 的细胞内化机制, 作者在 GL261 细胞中定量评估了不同内吞抑制剂对细胞摄取的影响。预先用 $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸氯丙嗪 (chlorpromazine) 抑制网格蛋白介导的内吞、 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲基- β -环糊精 (M- β -CD) 抑制脂筏、 $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 阿米洛利 (amiloride) 抑制巨胞饮途径^[20], 上述不同内吞抑制剂处理 GL261 细胞 30 min 后, 再给予 tLipo/DiI 与细胞共孵育 4 h, 测定各组胞内的荧光强度。定量结果显示, 给予盐酸氯丙嗪处理后, GL261 细胞对 tLipo/DiI 的摄取量降低 10%, 给予甲基- β -环糊精和阿米洛利处理后, GL261 对 tLipo/DiI 的摄取量与对照组相比没有变化 (图 6A), 表明 GL261 细胞对 tLipo/CPT 的内化过程是网格蛋白介导的。

为了进一步验证 GL261 细胞内吞 tLipo/CPT 后, 对细胞产生的优良杀伤效果和增强的靶向效率是否由于 tLyp-1 肽的修饰产生, 作者预先加入 tLyp-1 处理 GL261 细胞后, 再给予 tLipo/DiI 与 GL261 细胞共孵育, 利用荧光酶标仪检测细胞内 DiI 摄取量的变化。结果显示, 预先用 tLyp-1 处理细胞后, 再给予 tLipo/DiI, 与

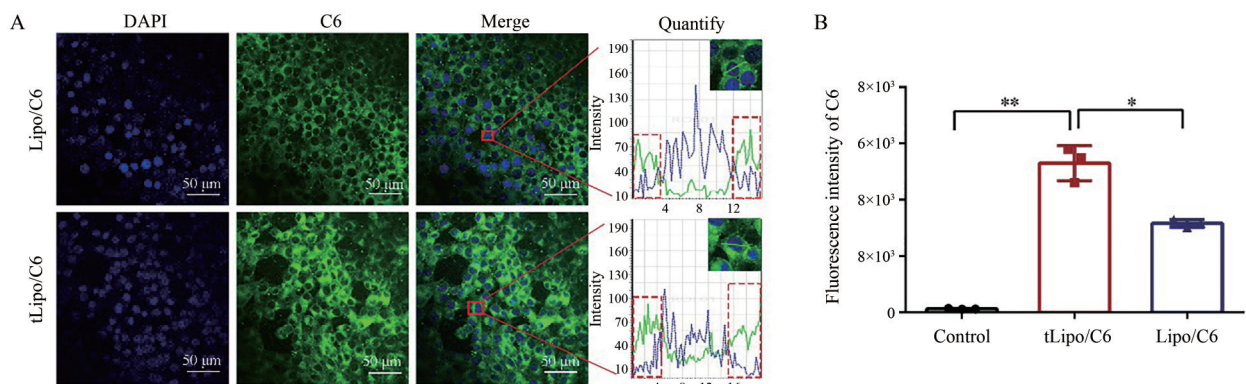


Figure 5 GL261 show more intake after modified with tLyp-1 on the surface of Lipo. A: Co-localization of tLipo/C6 and Lipo/C6 in GL261 cells after incubated for 4 h was observed and analyzed by Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM); B: The intracellular fluorescence intensity of tLipo/C6 and Lipo/C6 after incubated with GL261 for 4 h was determined ($n = 3, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). Scale bar: 50 μm . C6: Coumarin 6; DAPI: 4',6-Diamidino-2-phenylindole

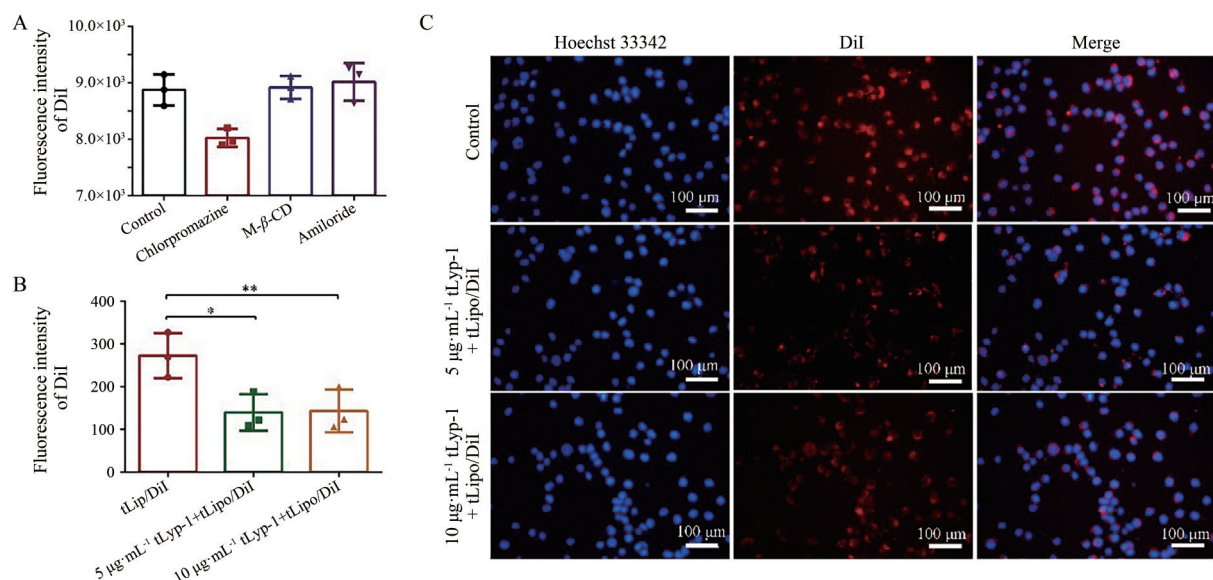


Figure 6 Endocytosis of tLipo/CPT is mediated by clathrin-mediated endocytosis and neuropilin receptor 1 (NRP-1). A: GL261 cells were pre-incubated with chlorpromazine, methyl-β-cyclodextrin (M-β-CD), and amiloride and the fluorescence intensity of DiI in GL261 cells was detected after incubated with tLipo/DiI for 4 h; B: GL261 cells were pre-treated with different concentration of free tLyp-1 peptide and intracellular DiI fluorescence intensity was quantified after 4 h ($n = 3$, $\bar{x} \pm s$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$); C: Co-localization of tLipo/DiI and GL261 cells was observed after pre-treated with different concentration of free tLyp-1 peptide for 4 h. Scale bar: 100 μm

未加肽处理组相比, 细胞的摄取量降低 1/2 (图 6B), GL261 细胞内 tLipo/DiI 的红色荧光信号减弱 (图 6C)。由于 GL261 细胞上的 NRP-1 受体被预先加入的 tLyp-1 ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 所饱和, 再给予 tLipo/DiI 处理后并不能增加对 tLipo/DiI 的摄取, 以上结果进一步证明了 GL261 细胞摄取 tLipo/DiI 是通过 NRP-1 受体介导的内吞, tLyp-1 肽的修饰赋予了 tLipo/CPT 增强的胶质瘤细胞靶向性和摄取效率。

6 tLipo/CPT 体外 BBB 穿透能力考察

由于 BBB 的存在, 使得药物难以透过并高效到达胶质瘤病变部位, 因此, 作者进一步探究了 tLipo/CPT 是否具备跨越 BBB 的能力。如图 7A 所示, 建立体外 BBB 模型, 鼠脑内皮 bEnd.3 细胞接种于上室内, 形成紧密连接, GL261 细胞接种于下室。tLipo/C6 和 Lipo/C6 在 12 h 后从上室到下室 GL261 细胞中的运输情况用荧光酶标仪进行定量监测。结果表明, 给予 tLipo/C6 后, 其能够穿过 BBB, 并且被 GL261 细胞所摄取, 相比于未加肽修饰的 Lipo/C6 组, GL261 对 tLipo/C6 摄取量是 Lipo/C6 的 1.2 倍 (图 7B), 说明 tLipo/CPT 能够穿透 BBB, 并且具有更强的靶向 GL261 的能力。

进一步对 tLipo/CPT 透过 BBB 的机制进行初步探讨, 用不同的细胞内吞抑制剂盐酸氯丙嗪、甲基-β-环糊精、阿米洛利预先处理 bEnd.3 细胞^[21]30 min 后再给予 tLipo/DiI, 与细胞共孵育 4 h, 测定 bEnd.3 细胞内摄取的 tLipo/DiI 荧光强度, 结果发现, 预先给予甲基-

β-环糊精和阿米洛利处理后, bEnd.3 胞内 tLipo/DiI 的荧光强度分别降低至 64.95% 和 73.31% (图 7C), 提示 tLipo/CPT 透过 BBB 是通过非网格蛋白介导的内吞途径和巨胞饮途径。

7 tLipo/CPT 体内 BBB 穿透能力考察

作者进一步探究了 tLipo/CPT 跨越体内 BBB 的能力。按照 tLipo/CPT 的制备方法, 用近红外染料 DiR 代替 CPT, 得到以 DiR 标记, 加 tLyp-1 修饰的脂质体 tLipo/DiR 和不加肽修饰的脂质体 Lipo/DiR。小鼠背部及脑部剃毛后, 分为 tLipo/DiR 和 Lipo/DiR 两组, 分别尾静脉注射荧光制剂 $0.2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 于 0.5、1、2、4、6、8、12 和 24 h 时间点进行活体成像, 拍摄小鼠体内荧光分布情况 (图 8A)。tLipo/DiR 和 Lipo/DiR 两组在小鼠脑部均有荧光分布, 且相比于 Lipo/DiR 组, tLipo/DiR 在各时间点脑部的荧光蓄积强于 Lipo/DiR 组, 肝脏部位的荧光分布弱于 Lipo/DiR 组, 说明用 tLyp-1 修饰后使得脂质体具有更强的脑部特异性。24 h 后, 离体脑组织及心、肝、脾、肺、肾各脏器组织的荧光分布与在体荧光分布基本一致 (图 8B)。对各离体脏器组织及脑组织的荧光强度进行定量, 结果显示, tLipo/DiR 离体脑组织的荧光强度是 Lipo/DiR 的 3.2 倍 (图 8D), 表明 tLipo/DiR 在小鼠脑部具有更强的蓄积能力。此外, 各组在 8 h 左右脑部的荧光分布较强, 于 8 h 后, 脱颈处死小鼠, 取出脑组织, 将全脑沿冠状切面冷冻切片后, 用倒置荧光显微镜观察各组脑切片中 DiR 的荧光分布情

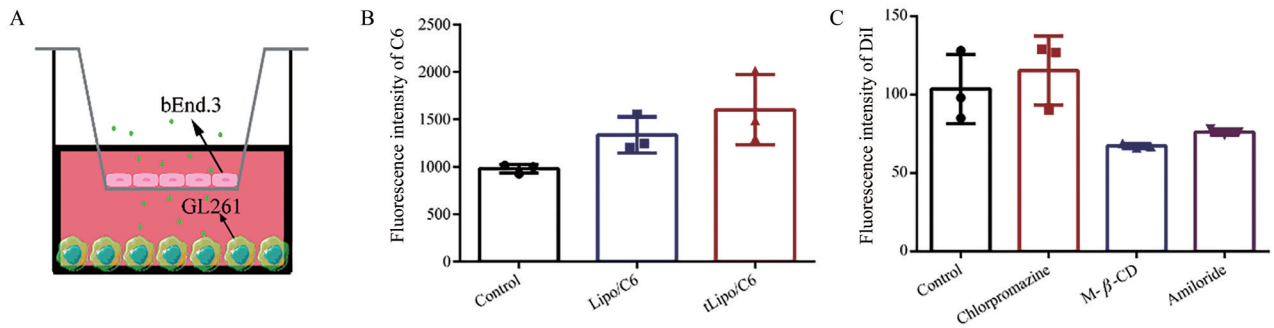


Figure 7 tLipo/CPT penetration across the blood-brain barrier (BBB) *in vitro*. A: Scheme of *in vitro* BBB model; B: Fluorescence intensity of C6 in GL261 cells cultivated in outside chamber after 12 h ($n = 3, \bar{x} \pm s$); C: bEnd.3 cells were pre-incubated with chlorpromazine, M-β-CD, and amiloride, and the fluorescence intensity of DiI in GL261 cells was detected after incubated with tLipo/DiI for 4 h ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

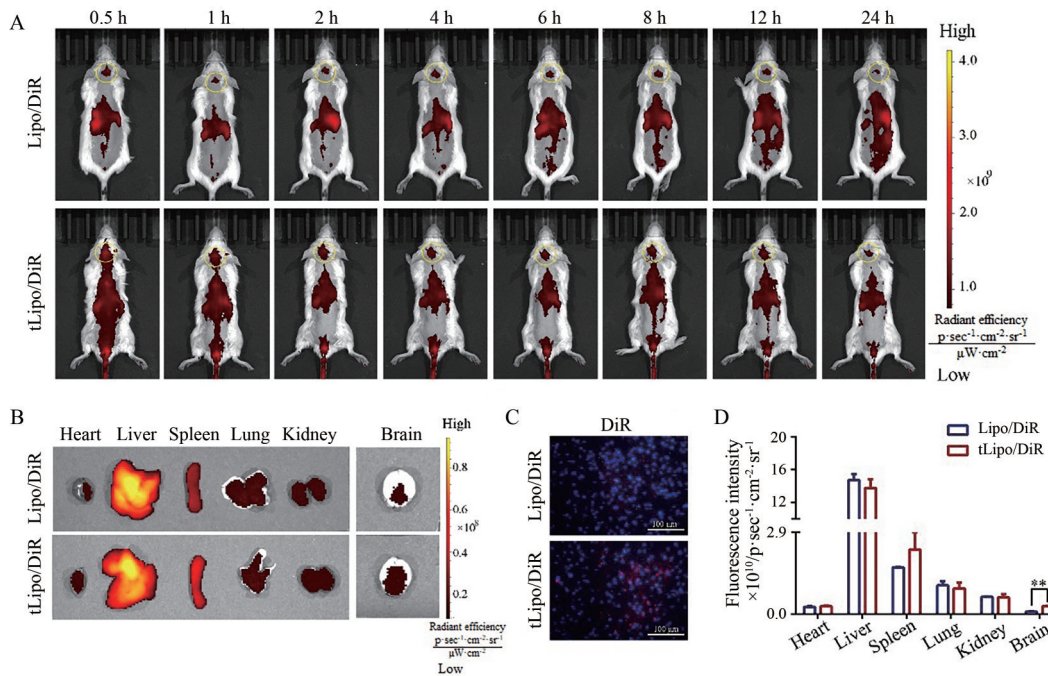


Figure 8 A: *In vivo* fluorescence imaging of BALB/c mice at timed intervals after intravenous injection of tLipo/DiR and Lipo/DiR; B: *Ex vivo* images of brain and other tissues at 24 h after injection; C: Brains were dissected 8 h after intravenous injection of tLipo/DiR and Lipo/DiR. Cell nucleus (blue fluorescence) was labeled with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) after preparing into 15 μm freezing microtome section and distribution of DiR (red fluorescence) was observed; D: Quantification of DiR in different mouse tissues after 24 h ($n = 3, \bar{x} \pm s$). ** $P < 0.01$). Scale bar: 100 μm

况, 可以观察到 tLipo/DiR 组的红色荧光信号要强于 Lipo/DiR 组 (图 8C)。以上结果表明 tLipo/DiR 能够穿透体内 BBB, 并在脑部有更多的蓄积, 也在一定程度上验证了 tLyp-1 修饰后制剂具有增强的脑靶向性。

讨论

脑胶质瘤作为成人中最常见的恶性原发性脑肿瘤, 其侵袭性生长特性、手术切除不全、放疗和化疗不敏感等原因, 导致死亡率和复发率仍然很高, 更有效的治疗策略亟待开发。本文引入脂质纳米递送系统, 将 CPT 包载在脂质体中, 并在其表面修饰具有肿瘤靶向

能力的穿膜肽 tLyp-1, 制备所得 CPT 递送系统 tLipo/CPT, 以期将 CPT 精准递送到达脑胶质瘤病变部位, 最大程度地发挥 CPT 的抗脑胶质瘤活性。作者发现, tLipo/CPT 能够通过 NRP-1 受体介导的内吞, 被胶质瘤 GL261 细胞更多地摄取。tLipo/CPT 具有更好的体外抗 GL261 增殖活性, 其 IC_{50} 为 $5.70 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 小于游离的 CPT ($IC_{50} = 9.31 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。通过体外和体内 BBB 穿透性实验考察, 该靶向脂质体能够穿透 BBB, 在小鼠脑部富集, 且 24 h 后仍表达荧光信号, 显示出良好的跨越体内 BBB 并有效蓄积的能力, 其穿透 BBB 的机制可能与非网格蛋白介导的内吞途径和巨胞饮途径有关。

目前, 针对 CPT 的新型递送系统报道较少, 多集中于传统剂型处方工艺的优化, 然而为解决其成药性、最大程度发挥其活性, 尤其是利用 CPT 抗肿瘤活性设计靶向递送系统的研究鲜有报道。开发新型靶向递送系统, 着力解决 CPT 成药性问题, 充分发挥其抗肿瘤药活性将成为药剂学的研究热点。CPT 纳米递药系统 tLipo/CPT 能够荷载 CPT 高效跨越 BBB, 并富集于脑胶质瘤细胞, 具有良好的体外抑制脑胶质瘤 GL261 细胞活性作用, 且显示出较好的体内 BBB 跨越能力, 为脑胶质瘤的治疗提供了新思路和研究策略。

作者贡献: 赵华聪进行具体实验(制剂的制备与评价等), 完成撰写任务; 王永明、崔季维、封宽瀚进行具体实验(体外细胞实验及体内 BBB 跨越考察等), 并负责数据整理; 王若宁、狄留庆指导和设计本课题实验, 指导论文的写作与修改。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Xue S, Hu M, Lyer V, et al. Blocking the PD-1/PD-L1 pathway in glioma: a potential new treatment strategy [J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10: 81.
- [2] Goodenberger ML, Jenkins RB. Genetics of adult glioma [J]. *Cancer Genet*, 2012, 205: 613-621.
- [3] Wang AY, Tao L, Lu Y, et al. Research progress on intervention by *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* on angiogenesis of tumor and ischemic disease [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2015, 46: 1399-1404.
- [4] Zhang XL, Zhang WJ, Jiang F, et al. The experimental research of depsides salts from *Salvia miltiorrhiza* on autophagy in glioma cell [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med (中华中国医药学刊)*, 2016, 34: 972-975.
- [5] Wang ZS, Luo P, Dai SH, et al. Salvianolic acid B induces apoptosis in human glioma U87 cells through p38-mediated ROS generation [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2013, 33: 921-928.
- [6] Lu L, Zhang SL, Li CX, et al. Cryptotanshinone inhibits human glioma cell proliferation *in vitro* and *in vivo* through SHP-2-dependent inhibition of STAT3 activation [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8: e2767.
- [7] Jian SG, Chen L, Lian MX, et al. Tanshinone I induces apoptosis and protective autophagy in human glioblastoma cells *via* a reactive oxygen species-dependent pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2020, 45: 983-992.
- [8] Dong WL, Zhang YK, Chen XM, et al. High-dose tanshinone II A suppresses migration and proliferation while promoting apoptosis of astrocytoma cells *via* Notch-1 pathway [J]. *Neurochem Res*, 2018, 43: 1855-1861.
- [9] Kumar V, Radin D, Leonardi D. Studies examining the synergy between dihydrotanshinone and temozolomide against MGMT⁺ glioblastoma cells *in vitro*: predicting interactions with the blood-brain barrier [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 386-390.
- [10] Wang DF, Yu WB, Cao L, et al. Comparative pharmacokinetics and tissue distribution of cryptotanshinone, tanshinone IIA, dihydrotanshinone I, and tanshinone I after oral administration of pure tanshinones and liposoluble extract of *Salvia miltiorrhiza* to rats [J]. *Biopharm Drug Dispos*, 2020, 41: 54-63.
- [11] Lu L, Li CX, Li D, et al. Cryptotanshinone inhibits human glioma cell proliferation by suppressing STAT3 signaling [J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 381: 273-282.
- [12] Piperi C, Papavassiliou KA, Papavassiliou AG. Pivotal role of STAT3 in shaping glioblastoma immune microenvironment [J]. *Cells*, 2019, 8: 1398.
- [13] Lu L, Zhang SL, Li CX, et al. Cryptotanshinone inhibits human glioma cell proliferation *in vitro* and *in vivo* through SHP-2-dependent inhibition of STAT3 activation [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8: e2767.
- [14] Ott M, Kassab C, Marisetty A, et al. Radiation with STAT3 blockade triggers dendritic cell-T cell interactions in the glioma microenvironment and therapeutic efficacy [J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 26: 4983-4994.
- [15] Yu XY, Lin SG, Chen X, et al. Transport of cryptotanshinone, a major active triterpenoid in *Salvia miltiorrhiza* Bunge widely used in the treatment of stroke and Alzheimer's disease, across the blood-brain barrier [J]. *Curr Drug Metab*, 2007, 8: 365-377.
- [16] Yang G, Chen XQ, Chen ZQ. Application of nano-system of active components of traditional Chinese medicine in anti-tumor [J]. *J Jiangnan Univ (Nat Sci Ed) (江汉大学学报(自然科学版))*, 2020, 48: 33-40.
- [17] Shi JF, Li J, Yang XQ, et al. Antitumor status analysis on the co-delivery systems regarding the active ingredients of Chinese herbs combined with chemotherapeutic drugs [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 258-268.
- [18] Wang YS, Yin S, Mei L, et al. A dual receptors-targeting and size-switchable "cluster bomb" co-loading chemotherapeutic and transient receptor potential Ankyrin 1 (TRPA-1) inhibitor for treatment of triple negative breast cancer [J]. *J Control Release*, 2020, 321: 71-83.
- [19] Yan Y, Li XQ, Duan JL, et al. Nanosized functional miRNA liposomes and application in the treatment of TNBC by silencing Slug gene [J]. *Int J Nanomed*, 2019, 14: 3645-3667.
- [20] Hu QY, Kang T, Feng JX, et al. Tumor microenvironment and angiogenic blood vessels dual-targeting for enhanced anti-glioma therapy [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8: 23568-23579.
- [21] Ruan SB, Qin L, Xiao W, et al. Acid-responsive transferrin dissociation and GLUT mediated exocytosis for increased blood-brain barrier transcytosis and programmed glioma targeting delivery [J]. *Adv Funct Mater*, 2018, 28: 1802227.