

· 实验研究 ·

靶向叶酸受体的熊果酸脂质体制备及其对人口腔肿瘤的抑制作用

杨光^{1,2} 张涛¹ 陈晓青¹

(1 江汉大学医学院 武汉 430056; 2 华中科技大学同济医学院药学院 武汉 430030)

[摘要] 目的: 构建新型靶向性熊果酸脂质体, 并考察其对人口腔肿瘤的靶向抑制作用。方法: 以新型叶酸靶向材料叶酸-聚乙二醇-胆固醇的半琥珀酸盐作为靶向分子, 再用 mPEG-DSPE 对脂质体表面进行结构修饰, 以熊果酸为抗癌药物, 利用薄膜分散法制备载熊果酸的 PEG 修饰靶向熊果酸脂质体 (F-PEG-L-UA); 并对该脂质体进行表征; 考察其对入源性口腔表皮癌 KB 细胞及其移植瘤的抑制作用。结果: 与普通熊果酸脂质体 (PEG-L-UA) 相比, 本研究所制备的熊果酸主动靶向脂质体粒径、分散系数、包封率及电位等理化性质无显著差异性, 粒径约 150 ~ 160 nm、颗粒分散均匀、呈负电性, 熊果酸包封率大于 85%。体外细胞实验结果表明, F-PEG-L-UA 表现出良好的肿瘤细胞靶向性、肿瘤细胞增殖抑制作用和促肿瘤细胞凋亡效应。体内药效学实验证实与被动靶向脂质体相比, F-PEG-L-UA 能够显著抑制口腔肿瘤的生长。结论: 本研究合成了一种新型靶向熊果酸脂质体, 通过体内外实验研究证实其具有明显的肿瘤抑制作用, 将有利于体内肿瘤的靶向治疗效果。

[关键词] 熊果酸; 脂质体; 叶酸受体靶向; 入源性口腔肿瘤

[中图分类号] R979.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2015)23-2708-07

Preparation of targeted ursolic acid liposomes modified with folate derivative and their inhibitory effect on human epidermoid carcinoma

YANG Guang^{1,2}, ZHANG Tao¹, CHEN Xiao-qing¹

(1 School of Medicine, Jianghan University, Wuhan 430056, China; 2 Pharmacy School, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a new kind of targeted ursolic acid liposomes and determine their inhibitory effect on human epidermoid carcinoma. **Methods:** Folate derivative was used as targeting molecule and conjugated with mPEG-DSPE for obtaining liposomes with long circulation features. This novel targeting agent was prepared by a thin-film dispersion method and ursolic acid was loaded into the liposomes as the anticancer drug. The encapsulation efficiency, particle size, dispersity index and zeta potentials of the constructed liposomes were characterized, and their cellular uptakes and inhibitory effects were investigated on the human epidermoid carcinoma KB cells and transplantation tumor. **Results:** Compared with ordinary ursolic acid liposomes, the modification of folate derivative didn't affect the physicochemical characters, such as particle size, dispersity index and encapsulation efficiency. The targeted ursolic acid liposomes were uniformly dispersed and negatively charged. Their average particle size was approximately 150 ~ 160 nm. The encapsulation efficiencies of ursolic acid were above 85%. Results from cytotoxic and apoptotic studies showed that the targeted ursolic acid liposomes (F-PEG-L-UA) had the highest cellular uptake, inhibitory effect and apoptosis effect compared with non-targeted drug liposomes (PEG-L-UA) in the KB cells. It was confirmed that F-PEG-L-UA could significantly inhibit the growth of KB tumor *in vivo* compared with PEG-L-UA. **Conclusion:** A novel targeted ursolic acid liposome system was successfully prepared with folate

[基金项目] 国家自然科学基金(81072596)

[作者简介] 杨光, 女, 博士研究生, 主要从事药物新剂型的研究。联系电话: (027) 84898020, E-mail: sunshine77@126.com。



derivative as the folate receptor targeting functional material. It has obvious inhibitory effect on human epidermoid carcinoma and demonstrates a strong potential in treatment of tumor.

[Key words] ursolic acid; liposomes; folate receptor targeting; human epidermoid carcinoma

口腔癌是全球肿瘤发生率中排名第6的常见肿瘤,生存率不到50%^[1]。口腔肿瘤的发生90%以上为恶性肿瘤。口腔癌中晚期患者的治疗一般需要进行手术切除,这通常会影响到患者面部的美观,造成口腔功能的损伤,严重影响患者的社会交往、进食及语言功能^[2]。因此,我们迫切需要设计与开发一种新型有效的肿瘤治疗药物来改善口腔癌临床治疗的局限性。

熊果酸为纯中药及植物提取物,具有广泛的生物学效应^[3-4]。同时,它对多种致癌促癌物有抵抗作用,且对多种恶性肿瘤细胞有明显细胞毒^[5]及促肿瘤细胞凋亡作用^[6-8]。虽然熊果酸具有良好的抗肿瘤效果,但它难溶于水,口服给药体内吸收差,体外释放度小,体内半衰期短,这些缺点限制了其在药学领域的广泛应用,影响抗肿瘤疗效的发挥^[9]。有研究人员利用脂质体这一良好药物载体制备了熊果酸脂质体,开展了临床前研究及I期临床试验。试验结果显示,熊果酸脂质体在增强其抗肿瘤疗效的同时,提高了晚期癌症患者的生存质量。研究结果同时也表明,熊果酸脂质体在体内缺乏特异性的肿瘤靶向选择性,后期对肿瘤表现出较弱的杀灭作用^[10]。因此,增加熊果酸脂质体的肿瘤组织主动靶向性将有助于提高其肿瘤抑制效率。

叶酸受体(FR)是一种跨膜单链糖蛋白,在许多常见恶性肿瘤细胞的表面均有过量的FR表达^[11],在正常组织中很少表达,因此具备很好的肿瘤组织特异性^[12]。基于这一理由,本研究拟采用叶酸受体靶向治疗技术,以具备良好化学稳定性的叶酸-聚乙二醇-胆固醇的半琥珀酸盐作为靶向材料,制备新型的叶酸受体靶向熊果酸脂质体。基于人源性口腔表皮癌KB细胞上多表达叶酸受体的特点^[13],希望通过这一技术,将包裹熊果酸的主动靶向型脂质体定向聚集于肿瘤部位,增加肿瘤靶区组织里的药物浓度,在改善熊果酸临床使用局限性的前提下,提高其抗肿瘤效应。

材 料

1 仪器

N-1100S-WD 旋转蒸发仪(EYELA,上海普渡生化科技有限公司);DZF-6090 真空干燥箱(上

海林频仪器有限公司);Lipex Extruder 高压挤出器(Northern Lipids Inc.);IX71 荧光倒置显微镜(日本Olympus公司);FACSCalibur 流式细胞分析仪(美国Becton Dickinson Biosciences公司);高效液相色谱仪(600泵、2487紫外检测器、717自动进样器,美国Waters公司);Sapphires RP C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm 5 μm,美国Sepax色谱公司);Zeta-PALS 激光粒度及电位分析仪(美国Brookhaven Instruments Corporation);酶标仪(芬兰Thermo Labsystems公司);Forma311 二氧化碳培养箱(美国Forma公司);超净工作台(苏州净化设备厂);SS-325 全自动高压灭菌锅(日本TOMY公司);H6-1 微型电泳槽(上海西巴斯生物科技有限公司);化学发光成像分析系统(美国Gene公司);Sepharose CL-4B 凝胶柱填料(美国Sigma-Aldrich Chemical Co.)等。

2 试剂

熊果酸(AR级,纯度95%,华中科技大学同济医学院药学院);叶酸-聚乙二醇-胆固醇的半琥珀酸盐(华中科技大学同济医学院药学院);氯化卵磷脂(美国Avanti Polar Lipids Inc.);胆固醇(美国Acros organics公司);聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(mPEG2000-DSPE,德国Lipoid公司);氯仿(CHCl₃)、二甲基亚砜(DMSO)(中国国药集团化学试剂有限公司);青霉素、链霉素、胰蛋白酶(碧云天生物科技有限公司);RPMI-1640 培养基(美国Sigma-Aldrich Chemical Co.);FBS 胎牛血清(杭州四季青生物科技有限公司);谷氨酰胺(美国SIGMA公司);3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT,飞弈科技有限公司);Annexin V/PI 凋亡试剂盒(联科生物科技有限公司);bcl-2 兔多克隆抗体(#2870)、bax 兔多克隆抗体(#2772)、caspase-3 兔多克隆抗体(#9665)、二抗 Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody(#7074)(Cell Signaling Technology)等。

3 细胞

人口腔表皮癌KB细胞株(武汉大学细胞培养保藏中心提供)。

4 动物

BALB/c 裸鼠,雌性,鼠龄4~6周,15~20g,华中科技大学同济医学院实验动物部提供,购自北京

华富康生物科技有限公司,许可证号: SCXK(京) 2009-0004。

方 法

1 色谱条件

Sapphire RP C₁₈ 色谱柱; 流动相: 甲醇-水-三乙胺(90:10:0.03); 流速: 1.2 mL·min⁻¹; 检测波长: 210 nm; 柱温: 20 °C; 进样量: 20 μL。

2 脂质体的制备

称取氢化卵磷脂、胆固醇、mPEG2000-DSPE 和叶酸-聚乙二醇-胆固醇的半琥珀酸盐(摩尔比 6.5:3:0.45:0.05) 以及一定质量的熊果酸(药物: 脂质=1:20) 于梨形瓶中, 加入少量的氯仿使之完全溶解, 37 °C 减压旋转蒸发除去有机溶剂直至梨形瓶内壁上形成一层脂质薄膜。在室温下, 置于真空干燥箱中过夜除去残余的有机溶剂。用 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液(PBS) 于 60 °C 水化脂质膜。再将水化后的脂质体于 60 °C 水浴中, 在通氮气的条件下, 用高压挤出器过 0.22 μm 滤膜整粒 5 次。即得乳白色半透明的靶向熊果酸脂质体(F-PEG-L-UA)。熊果酸脂质体(PEG-L-UA) 的制备方法同上, 处方中不添加叶酸-聚乙二醇-胆固醇的半琥珀酸盐。

3 脂质体的表征

3.1 包封率 取新制备的脂质体原液 500 μL, 过 Sepharose CL-4B 凝胶柱, 以 PBS 作为流动相分离未包封入脂质体内的游离熊果酸, 收集脂质体部分加流动相破乳(可于 60 °C 适当加热), 直至脂质体溶液完全澄清, 用于测定所包封的药物含量。另取未过凝胶柱的脂质体混悬液 500 μL, 破乳, 用于测定总的药物含量。包封率(EE: entrapment efficiency) = 包封的药物含量/总的药物含量 × 100%。

3.2 粒径和电位 分别取新制得的脂质体各 1 mL 加 PBS 稀释至合适浓度(1:30, v/v), 混合均匀后, 使用动态光散射激光粒度分析仪 DelsaNanoseries 测定脂质体粒径和粒度分布, 测试温度设定为 25 °C, 重复 5 次, 每次测试时间 1 min, 取平均值。同样处理的脂质体样品放置电位分析仪 Zeta PALS 中测定各种脂质体的 Zeta 电位, 重复 5 次, 取平均值。

4 肿瘤细胞的靶向摄取性

利用钙黄绿素(calcein) 具有绿色荧光的特性, 将其作为荧光标记物, 考查叶酸受体靶向脂质体的

肿瘤细胞靶向摄取性。将 KB 细胞以 4 × 10⁵ cell·mL⁻¹ 接种于 6 孔细胞培养板中, 在 CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 收集细胞至 EP 管中; 每管分别加入一定量的 PBS 作为空白对照组(Control group)、非靶向脂质体组(Non-targeted group)、叶酸受体靶向组(FR-targeted group)、叶酸受体靶向阻断组(FR blocking group), 含 20 μmol·L⁻¹ FR-targeted group 和 1 mmol·L⁻¹ 游离叶酸以封闭 FR, 每管中钙黄绿素的终浓度为 15 μmol·L⁻¹, 再于 37 °C 下继续培养 1 h 后, 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清, 加 1 mL 预冷的 PBS 洗 3 次, 置于冰 PBS 中; 在 1 h 内用激发波长为 488 nm 的激发光进行流式细胞术定量分析。重复 3 次, 取平均值。

5 肿瘤细胞的增殖抑制作用

将浓度为 4.5 × 10⁵ cell·mL⁻¹ 的 KB 细胞, 接种于 96 孔细胞培养板中, 置细胞培养箱中孵育 24 h。待细胞贴壁生长后, 分别加入游离熊果酸(Free UA)、熊果酸脂质体(PEG-L-UA)、靶向熊果酸脂质体(F-PEG-L-UA) 和叶酸受体靶向阻断组(FR blocking group), 每组设 6 个复孔。并另设空白对照组(空白脂质体) 和阴性对照组(含 PBS), 继续培养 48 和 72 h。培养结束后, 每孔加入 20 μL MTT(5 mg·mL⁻¹), 于 37 °C 继续孵育 4 h。孵育结束, 每孔加入 150 μL DMSO, 轻轻震荡直至蓝紫色结晶完全溶解, 混匀后用酶标仪在 490 nm 下分析检测吸光度(A)。脂质体组细胞生存率的计算公式如下:

$$\text{脂质体组细胞生存率}/\% = (A_{\text{脂质体组细胞}} / A_{\text{空白对照组细胞}}) \times 100;$$

$$\text{游离熊果酸细胞生存率}/\% = (A_{\text{游离熊果酸组细胞}} / A_{\text{阴性对照组细胞}}) \times 100。$$

6 促肿瘤细胞的凋亡分析

将浓度为 4.5 × 10⁵ cell·mL⁻¹ 的 KB 细胞, 接种于 6 孔细胞培养板中, 置细胞培养箱中于适当条件下孵育 24 h。待细胞贴壁生长后, 每组分别加入 PEG-L-UA, F-PEG-L-UA 和 FR blocking group, 另设空白对照组(PBS) 至每孔熊果酸终浓度为 20 μmol·L⁻¹, 于 37 °C 继续孵育 24 h。孵育结束后, 收集细胞于 EP 管中, 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清。加预冷的 PBS 洗涤后, 每管加入 300 μL Annexin V binding buffer(100 mmol·L⁻¹ HEPES, 140 mmol·L⁻¹ NaCl, 25 mmol·L⁻¹ CaCl₂, pH 7.4) 重悬细胞, 最后加 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI 室温避光孵育 5 min, 用流式细胞仪进行分析检测。重复 3 次。

7 Western blot 法半定量检测 bcl-2, bax 和 caspase-3 蛋白表达

将 KB 细胞分别与 PBS, Free UA, PEG-L-UA, F-PEG-L-UA 和 FR blocking group 药物共孵育 24 h 后, 滴加细胞裂解液 1 mL, 收集细胞至 EP 管中, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 获得总蛋白。以牛血清白蛋白(BSA) 做标准品, 测蛋白浓度。取 30 μg 总蛋白经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 4 °C 下转印至 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶(含 0.1% 聚山梨酯 20) 封闭 1 h, 加一抗 bcl-2, bax 和 caspase-3, 一抗 4 °C 孵育过夜(β-actin 做为上样量对照), 洗膜, 加辣根过氧化物酶(HRP) 标记二抗室温孵育 2 h, 洗膜, ECL 化学发光显色后用化学发光成像系统分析。

8 体内药效学实验

接种浓度为 3.6×10^6 cell·mL⁻¹ 的 KB 细胞至 BALB/c 裸鼠右前肢右侧腋部皮下, 于肿瘤种植后一周左右选择肿瘤生长良好、瘤体体积约 80 ~ 150 mm³ 左右的荷瘤鼠, 作为本实验动物模型。按瘤体大中小平均分配的原则随机分为 4 组(Control group, Free UA, PEG-L-UA, F-PEG-L-UA), 每组 6 只荷瘤鼠。每只荷瘤鼠分别单次注射 4.5 mg·kg⁻¹ 不同组别的

药物, 剂量为 0.3 mL, 每隔 1 d 注射 1 次, 连续给药 5 次。于首次给药时, 每隔 1 d 用数显游标卡尺测量并记录荷瘤裸鼠肿瘤最长径(a) 和与长径互相垂直的短径(b) 的长度。按以下公式计算肿瘤体积并于 24 d 后绘制肿瘤体积生长曲线: $V = \pi ab^2/6$ [14-15]。

结 果

1 脂质体的表征

我们制备了靶向熊果酸脂质体和熊果酸脂质体, 两者的包封率、粒径、多分散系数和电位的分析结果见表 1。结果表明, 熊果酸的包封率大于 85%, 满足《中华人民共和国药典》对于药物包封率的要求。脂质体的粒径在 150 ~ 160 nm 之间。两者的多分散系数均小于 0.2, 说明在所选择的制备工艺条件下, 所制备的脂质体粒度分布窄, 大小分布均匀, 分散度良好。脂质体的电负性是由带负电荷的 mPEG-DSPE 所产生的 [16], 叶酸-聚乙二醇-胆固醇的半琥珀酸盐是中性分子, 脂质体表面的负电荷可增加微粒间的相互碰撞, 减少基团之间的相互聚积, 使脂质体更加稳定 [17]。实验证明, 脂质体在 4 °C 条件下保存 3 个月, 药物的泄露率小于 10%。

表 1 靶向熊果酸脂质体及其对照制剂的表征结果

制剂	包封率/%	粒径/nm	多分散系数	Zeta 电位/mV
熊果酸脂质体	87.7 ± 9.1	150.2 ± 13.4	0.157 ± 0.057	-21.75 ± 8.7
靶向熊果酸脂质体	85.9 ± 6.7	160.1 ± 11.9	0.176 ± 0.032	-19.24 ± 5.3

2 肿瘤细胞的靶向摄取性

在激发波长为 488 nm 的激发光的作用下, 本实验通过流式细胞术分析确定了 KB 细胞摄取不同组别样品的荧光强度值(见图 1)。结果显示, FR-targeted group 组的荧光强度比 Non-targeted group 提高了 30 倍以上, 含叶酸-聚乙二醇-胆固醇的半琥珀酸盐靶向材料的叶酸受体靶向脂质体能更多的被叶酸受体高表达的 KB 细胞所摄取; 而 Non-targeted group 的荧光强度与叶酸受体阻断组相当, 说明未链接叶酸靶向材料的脂质体几乎不能被 KB 细胞摄取, 摄取的效率能够被 1 mmol·L⁻¹ 游离叶酸所阻断。从而, 我们可以初步推断出叶酸受体靶向脂质体和 KB 肿瘤细胞的结合是通过叶酸受体介导的通路来实现的, 该通路能有效将药物靶向聚积于肿瘤细胞。

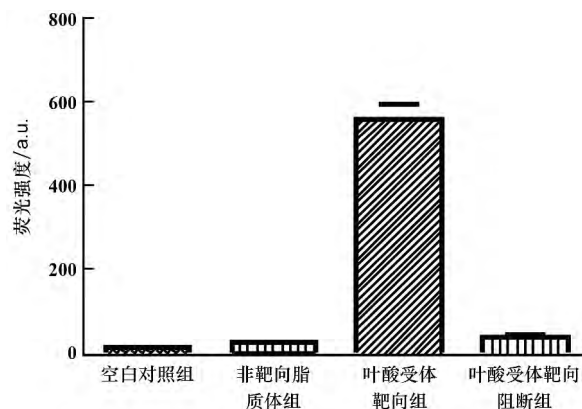


图 1 人源性 KB 肿瘤细胞给药处理后细胞摄取的荧光强度结果

3 对肿瘤细胞的增殖抑制效应

我们通过 MTT 法分析比较了靶向脂质体与非靶向制剂以及游离熊果酸对 KB 肿瘤细胞的增殖抑

制作用。结果显示,细胞增殖抑制率呈明显的浓度-时间依赖性。游离熊果酸有明显的细胞增殖抑制效应,其细胞生存率最低,作用 72 h 的 IC_{50} 值为 $16.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。非靶向脂质体作用 72 h 的 IC_{50} 值为 $146.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,而靶向脂质体的 IC_{50} 值为 22.05

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,几乎与游离熊果酸相当,是因为药物需要一定的时间才能从脂质体内释放,发挥相应的药效^[18]。可见 F-PEG-L-UA 的细胞增殖抑制效应约为 PEG-L-UA 的 7 倍,具有明显的受体靶向作用和细胞杀伤性。见图 2 和表 2。

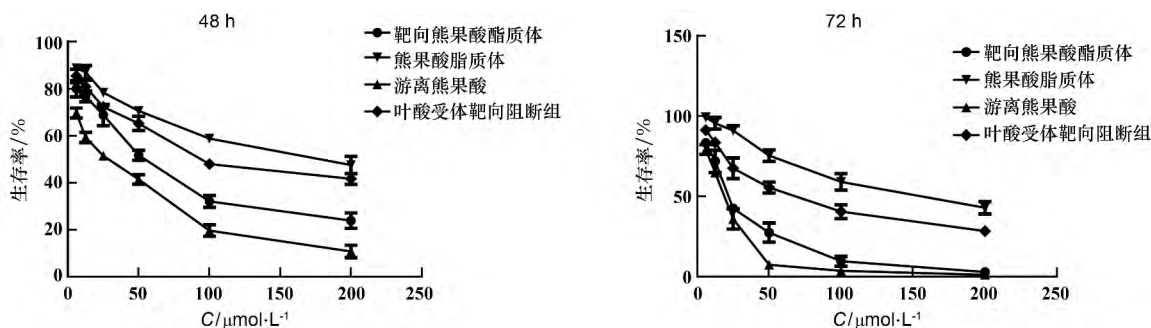


图 2 给予含 0 ~ 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 熊果酸的各组药物后肿瘤细胞的生存率% ($P < 0.05, n = 3$)

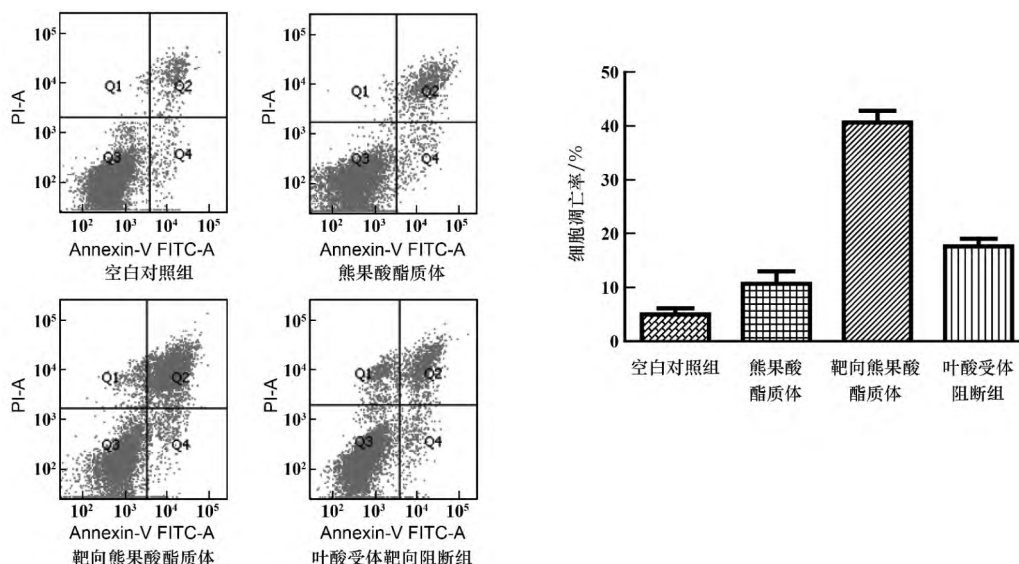
表 2 肿瘤细胞经药物作用 48 和 72 h 后的各组 IC_{50} 值 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

制剂	48 h	72 h
游离熊果酸	22.18 ± 1.35	16.49 ± 1.22
熊果酸脂质体	174.01 ± 2.24	146.30 ± 2.17
靶向熊果酸脂质体	50.11 ± 1.70	22.05 ± 1.34
叶酸受体靶向阻断组	109.80 ± 2.04	65.66 ± 1.82

靶向熊果酸脂质体。如图 3 所示,与阴性对照组相比靶向熊果酸脂质体作用的 KB 细胞活细胞比率明显下降;比较促早期凋亡和晚期凋亡的细胞数,显示熊果酸促晚期凋亡效果比早期凋亡更强。PEG-L-UA, F-PEG-L-UA 和 FR blocking group 早期凋亡细胞数分别为 3.8% 5.1% 和 3.4%;同时,靶向脂质体组的晚期凋亡比例为非靶向脂质体组的 4 倍。说明靶向脂质体促进细胞凋亡的效果优于非靶向脂质体,而受体阻断组效果没有靶向组好,说明靶向脂质体组的促肿瘤细胞凋亡效应也是通过叶酸受体介导的通路来实现。

4 促肿瘤细胞凋亡作用

Annexin V-FITC/PI 双染法用于确定靶向熊果酸脂质体诱导 KB 肿瘤细胞凋亡的效应是否优于非

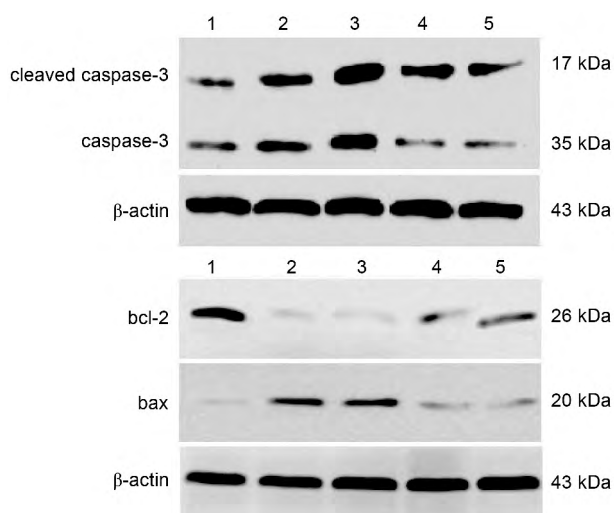


Q1: 死细胞; Q2: 凋亡后期细胞; Q3: 活细胞; Q4: 凋亡早期细胞

图 3 流式细胞术双染检测肿瘤细胞凋亡情况 ($n = 3$)

5 Western blot 法检测 bcl-2 ,bax 和 caspase-3 蛋白表达

bcl-2 ,bax 和 caspase-3 蛋白测定结果显示,PEG-L-UA 组、FR blocking group 和 F-PEG-L-UA 组中 bcl-2 蛋白的表达依次呈逐步下降趋势,即随着促凋亡作用的增强 bcl-2 蛋白的表达量逐渐降低。而 bax 和 caspase-3 蛋白的表达量呈逐步上升趋势(见图 4),即随着促凋亡作用的增强 bax 和 caspase-3 蛋白的表达量也逐渐增加。本实验设置了阴性对照基因蛋白看家基因 β -actin,电泳结果在化学发光成像分析系统分析。这一结果与 Shan 等^[19]的研究中熊果酸能够通过调节 bcl-2 及 bax 蛋白表达的比值来诱导肿瘤细胞凋亡的结果相一致。



1: 空白对照组; 2: 游离熊果酸; 3: 靶向熊果酸脂质体;
4: 叶酸受体靶向阻断组; 5: 熊果酸脂质体

图 4 Western blot 法检测 bcl-2 ,bax 和 caspase-3 蛋白表达情况

6 体内药效学实验结果

我们在成功建立人 KB 肿瘤荷瘤鼠模型的基础上开展了体内药效学初步研究。从首次给药至 24 d 为止,每隔 1 d 测量 1 次荷瘤鼠的瘤体体积。随着给药时间的延长,control group 的瘤体体积不断增大,并呈不断加快的趋势,且因为瘤体过大,荷瘤鼠的活动受到一定程度的影响,表现出运动迟缓;而脂质体组的瘤体体积虽亦随时间延长而有所增长,但增长速度明显降低,并且荷瘤鼠呈现较好的精神状态,活动自如,食欲、排泄各方面生理功能正常。如图 5 所示,F-PEG-L-UA 组与其他各组相比,其肿瘤生长曲线显著低于其他各组,肿瘤生长受到抑制。ANOVA

方差分析 F-PEG-L-UA 组较空白组瘤体体积减少近 50% ($P < 0.05$);而 Free UA 组和 PEG-L-UA 组的瘤体体积增长较为迅速。

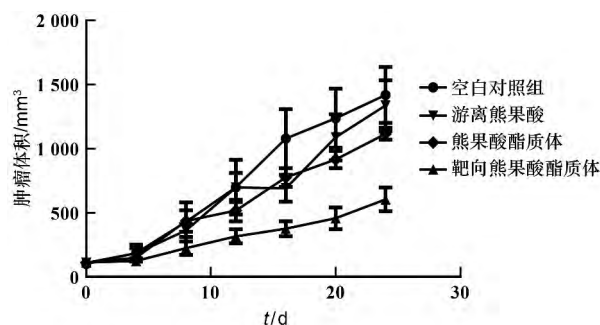


图 5 给药后荷瘤鼠的肿瘤生长曲线 ($n = 6$)

讨 论

为了解决口腔癌临床治疗的局限性,本研究制备了一种新型的主动靶向熊果酸脂质体,以提高肿瘤对抗肿瘤药物的摄取,进而提高药物对肿瘤细胞的抑制效应。

叶酸受体是存在于肿瘤细胞表面过度表达的受体,是抗肿瘤靶向治疗的潜在靶点。叶酸-聚乙二醇-胆固醇的琥珀酸盐作为一种叶酸类似物能够高效地与叶酸受体结合,将药物有效靶向于肿瘤细胞。

熊果酸具备良好的抗肿瘤作用,因而受到广泛的关注,但它的溶解性问题限制其广泛应用,为此我们利用脂质体这一良好的药物载体,提高熊果酸的水溶性及其药用价值。然而,脂质体的表面经 PEG 修饰的熊果酸脂质体属于被动靶向,经过临床一期试验研究证明,其在延长体内循环时间的同时,对肿瘤组织的蓄积作用有所增加,但对周围正常组织也会产生一定不良反应,对肿瘤组织的作用缺乏专一性。因此,我们制备了主动靶向作用的叶酸受体靶向的熊果酸脂质体,所制备的新型给药系统具备以下功能:① 提高熊果酸的水溶性。② 脂质材料中所用的 mPEG₂₀₀₀-DSPE 可延长脂质体在体内的作用时间。③ 用于修饰脂质体表面的靶向分子能够使脂质体与肿瘤表面的叶酸受体有效结合,使药物更加有效的聚积于肿瘤组织,发挥肿瘤抑制效果。本研究所采用的叶酸-聚乙二醇-胆固醇的琥珀酸盐具备较高的水解稳定性,原料合成成本低廉^[20]。

本实验考察了靶向脂质体在口腔表皮癌 KB 肿瘤细胞中的摄取情况,经叶酸靶向材料修饰的靶向

载药脂质体与 KB 肿瘤细胞的亲和力提高,进而肿瘤细胞内药物含量增加。前期研究工作中,我们采用低表达叶酸受体的肿瘤细胞进行 MTT 试验,靶向组和非靶向组细胞毒作用均无明显的浓度与时间依赖性,但靶向组对高表达叶酸受体的 KB 细胞则表现出较强的细胞增殖抑制作用。体外促细胞凋亡实验结果表明,靶向性熊果酸脂质体表现出较强的促细胞凋亡作用,与摄取实验结果相吻合。经过靶向脂质体处理后的 KB 肿瘤细胞,诱导细胞凋亡的机制可以通过使 bcl-2 基因蛋白量表达减少和 bax 基因表达的增加,从而使 bcl-2/bax 比值下降来实现。bcl-2 家族成员在细胞凋亡的基因调控过程中起着至关重要的作用^[21],bcl-2/bax 的比值即动态平衡,决定了细胞生命过程的走向。同时,选择 caspase-3 这一基因蛋白是因为它处于诱导凋亡机制的下游,是细胞凋亡过程中最主要的剪切酶,也是细胞杀伤机制的重要组成部分。其激活可直接诱导凋亡的发生,caspase3 是在肿瘤细胞凋亡中起着核心作用的基因。本实验合成的靶向熊果酸脂质体可通过 caspase 促细胞凋亡的途径来活化 caspase 蛋白家族,尤其是在其中起着核心作用的基因 caspase-3,最终激活 caspase 所诱导细胞凋亡的一系列级联反应而促使 KB 肿瘤细胞凋亡的发生。体内药效学实验结果进一步证实靶向熊果酸脂质体有明显的抑制肿瘤生长的作用,作为熊果酸的新型有效载体,通过静脉注射迅速有效的聚集到叶酸受体高度表达的肿瘤组织,有效抑制肿瘤生长,这为进一步探索叶酸受体靶向治疗应用于临床奠定了坚实的基础。由此可见,本研究所构建的靶向性熊果酸脂质体对于人口腔表皮肿瘤具有良好的抑制效果和潜在的抗肿瘤应用价值。

[参 考 文 献]

- [1] HAN S, CHEN Y, GE X, *et al.* Research article epidemiology and cost analysis for patients with oral cancer in a university hospital in China[J]. *BMC Public Health* 2010, 10(4): 196.
- [2] ADRIANE K, HUANG J, DING G, *et al.* Self assembled magnetic PVP/PVA hydrogel microspheres; magnetic drug targeting of VX2 auricular tumours using pingyangmycin[J]. *Drug Target*, 2006, 14(4): 243 - 253.
- [3] LIU J. Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives[J]. *J Ethnopharmacol* 2005, 100(1-2): 92 - 94.
- [4] SAEIDNIA S, GOHARI AR, UCHIYAMA N, *et al.* Trypanocidal terpenoids from *Dracocephalum kotschyi*[J]. *Chem Pharm Bull*, 2004, 52(10): 1249 - 1250.
- [5] 熊斌,雷志勇,陈虹. 熊果酸药理学研究进展[J]. 国外医学药学分册 2004, 31(3): 133 - 136.
- [6] LIU XS, JIANG J. Induction of apoptosis and regulation of the MAPK pathway by ursolic acid in human leukemia K562 cells[J]. *Planta Med* 2007, 73(11): 1192 - 1194.
- [7] MANU KA, KUTTAN G. Ursolic acid induces apoptosis by activating p53 and caspase-3 gene expressions and suppressing NFkappaB mediated activation of bcl-2 in B16F-10 melanoma cells[J]. *Int Immunopharmacol* 2008, 8(7): 974 - 981.
- [8] ACHIWA Y, HASEGAWA K, KOMIYA T, *et al.* Ursolic acid induces bax-dependent apoptosis through the caspase-3 pathway in endometrial cancer SNG-II cells[J]. *Oncol Rep*, 2005, 13(1): 51 - 57.
- [9] CERGA O, BORCAN F. Syntheses of new cyclodextrin complexes with oleanolic and ursolic acids[J]. *J Agroalimnet Processes Techno*, 2011, 17(4): 405 - 409.
- [10] 阎昭. 天然抗肿瘤药物熊果酸脂质体早期临床研究[D]. 天津: 天津大学, 2012.
- [11] BAGNOLI M, CANCVARI S, FIGINI M, *et al.* A step further in understanding the biology of the folate receptor in ovarian carcinoma[J]. *Gynecol Oncol* 2003, 88(1Pt2): S140 - S144.
- [12] LEAMON CP, REDDY JA. Folate-targeted chemotherapy[J]. *Adv Drug Deliv Rev* 2004, 56(8): 1127 - 1141.
- [13] RIVIERE K, HUANG Z, JERGER K. Antitumor effect of folate-targeted liposomal doxorubicin in KB tumor-bearing mice after intravenous administration[J]. *J Drug Target* 2011, 19(1): 14 - 24.
- [14] 吴向华, 李宗海, 王华茂, 等. Tie2 介导的基因导入系统转导 p53 基因对肺癌的抑制作用[J]. *肿瘤*, 2007, 27(4): 256 - 259.
- [15] TSAI BY, LIN YL, CHIANG BL. Autoimmune response induced by dendritic cell exerts anti-tumor effect in murine model of leukemia[J]. *J Autoimmun* 2010, 34(4): 364 - 370.
- [16] HINRICHS WL, MANCENIDO FA, SANDERS NN, *et al.* The choice of suitable oligosaccharide to prevent aggregation of PEGylated nanoparticles during freeze thawing and freeze drying[J]. *Int J Pharm* 2006, 311(1-2): 237 - 244.
- [17] MOHANTY C, SAHOC SK. The *in vitro* stability and *in vivo* pharmacokinetics of curcumin prepared as aqueous nanoparticulate formulation[J]. *Biomaterials* 2010, 31(25): 6597 - 6611.
- [18] PASUT G, CANALA F, SCHIAVON O, *et al.* Antitumoral activity of PEG-gemcitabine prodrugs targeted by folic acid[J]. *J Control Release* 2008, 127(3): 239 - 248.
- [19] SHAN JZ, XUAN YY, RUAN SQ, *et al.* Proliferation-inhibiting and apoptosis-inducing effects of ursolic acid and oleanolic acid on multi-drug resistance cancer cells *in vitro*[J]. *Chin J Integr Med* 2011, 17(8): 607 - 611.
- [20] XIANG G, WU J, LU Y, *et al.* Synthesis and evaluation of a novel ligand for folate-mediated targeting liposomes[J]. *Int J Pharm*, 2008, 356(1-2): 29 - 36.
- [21] TSUKAHARA S, YAMAMOTO S, SHWE TT, *et al.* Inhalation of low-level formaldehyde increases the bcl-2/bax expression ratio in the hippocampus of immunologically sensitized mice[J]. *Neuroimmunomodulation* 2006, 13(2): 63 - 68.

编辑: 赵文锐/接受日期: 2015-06-20

