

RGD 序列修饰的 PEG 化脂质体对肿瘤细胞靶向作用的初步研究

丁杰 王峰 沈晓菲 冯敏 汪灏 管文贤

【摘要】 目的 本研究中,我们构建了一个 RGD 修饰的封装香豆素-6 的聚乙二醇化脂质体 (RGD-PLS-C6) 通过细胞实验探讨其对过表达整合素 $\alpha 5 \beta 1$ 胃癌细胞的靶向效果。方法 通过酰胺化反应将 RGD 偶联到聚乙二醇链的末端 检测制备好脂质体的特征和稳定性。利用流式细胞术和激光共聚焦显微镜分析 RGD-PLS-C6 的肿瘤靶向作用。结果 在胃癌细胞中, RGD-PLS-C6 结合到胃癌细胞的荧光强度明显高于 PLS-C6; 而在正常对照细胞中两者的荧光强度均比较弱 荧光强度与 PLS-C6 处理的胃癌细胞无明显差异。结论 实验表明 RGD-PLS 可作为运输荧光染料的靶向载体 具有一定的应用前景。

【关键词】 胃肿瘤; 脂质体; 整合素 $\alpha 5 \beta 1$; 靶向

The preliminary study on RGD modified PEGylated liposomes in targeting tumor cells Ding Jie, Wang Feng, Shen Xiaofei, Feng Min, Wang Hao, Guan Wenxian. Department of General Surgery, Drum Tower Hospital, the Affiliated Hospital of Nanjing University Medical School, Jiangsu Nanjing 210008, China
Funding: This study was supported by grants from the National Nature Science Foundation of China (81372364), Digestive System Disease Clinical Medical Center of Jiangsu Province (BL2012001), and Nanjing Medical Science and Technique Development Foundation (ZKX14022)

Corresponding author: Guan Wenxian Email: Guan-wx@163.com

【Abstract】 Objective In this study we developed a RGD modified PEGylated liposomes-encapsulated coumarin-6 (RGD-PLS-C6) system and investigated the targeting effect on gastric cancer cells with overexpression of integrin $\alpha 5 \beta 1$. **Methods** RGD was covalently conjugated to the distal end of DSPE-PEG2000-NH₂ lipid by amide bond. The characteristics and stability of prepared liposomes were measured. The targeting effects of RGD were detected by using flow cytometry and confocal microscopy.

Results The fluorescence intensity in gastric cancer cells treated with RGD-PLS-C6 was obviously higher than that of those cells treated with PLS-C6; however, the fluorescence intensity of normal cells treated with RGD-PLS-C6 and PLS-C6 was weak, as well as that of the gastric cancer cells treated with PLS-C6.

Conclusions The experimental data suggested that RGD-PLS might be a fluorescent dye delivery system for targeting of gastric carcinoma and worth wide application.

【Keywords】 Stomach neoplasms; Liposomes; Integrin $\alpha 5 \beta 1$; Targeting

胃癌是世界上第四常见的癌症和恶性疾病的第二致死原因,而对患者实施肿瘤和淋巴结的精确切除是广大外科医师所追求的,这就需要肿瘤甚至淋巴结进行有效示踪,由于胃癌及其淋巴结转移相对复杂,本文旨在通过细胞实验初步探索荧光染料对胃癌细胞的靶向示踪效果。整合素 $\alpha 5 \beta 1$ 是整合素家族中最重要的成员之一,是纤维连接蛋白(FN)

的主要受体。有研究证实细胞表面的整合素 $\alpha 5 \beta 1$ 可以与 FN 的 III₁₀ 中的 RGD 序列有效识别和结合^[1-2],在肿瘤的生长、侵犯和转移中发挥着重要作用^[3-4],其表达与胃癌的分化和转移有关^[5],甚至可能是胃癌患者的独立预后因子^[6]。因此有学者用人工合成的 RGD 或含有 RGD 的序列作为靶向配体用于胃癌的研究^[7]。脂质体是由英国血液病学家 BANGHAM 等^[8]首次描述的,近些年来,PEG 修饰的脂质体结合靶向配体(RGD,西妥昔单抗等)已用于动物模型的肿瘤治疗。本研究中,我们采用脂质体薄膜水化/挤出法制备 PLS-C6,然后将 RGD 结合到 PEG 链的末端,从而探讨其对胃癌细胞的靶向结合作用。

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-3946.2015.05.117.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81372364);江苏省消化系统疾病临床医学中心(BL2012001);南京市医学科科技发展基金资助项目(ZKX14022)

作者单位:210008 南京大学医学院附属鼓楼医院普通外科

通讯作者:管文贤,Email: Guan-wx@163.com

资料与方法

1. 材料和仪器: 卵磷脂(纯度 > 98%, 美国 Aladdin 公司); DSPE-mPEG₂₀₀₀ 和 DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ (美国 Avanti Polar lipids 公司); 胆固醇、香豆素-6 (C6) 和 DMTMM (美国 sigma 公司); Sephadex LH-20 柱(瑞典通用电气医疗集团); 脂质体挤出仪、聚碳酸酯膜(美国默格机械有限公司); H-7650 透射式电子显微镜(日本日立集团); 流式细胞仪(美国 BD 生物科学公司); 激光共聚焦显微镜(德国 ZEISS 公司)。

2. 实验方法: (1) PC : CHO : mPEG-DSPE : NH₂-PEG-DSPE : 香豆素-6 = 200 : 100 : 8 : 2 : 1 (摩尔比) 溶于 9 ml 的 2:1 氯仿: 甲醇混合溶剂中; (2) 氮气下在 37°C 旋转蒸发除去有机溶剂获得淡黄色的透明脂质膜 真空干燥箱过夜; (3) 干燥的脂质膜用 PBS 水化 30 ~ 60 min 反复冻融 6 次; (4) 悬浮液用脂质体挤出器通过聚碳酸酯膜(100 nm) 挤出, 循环 12 次; (5) 过 Sephadex LH-20 柱将获取的脂质体置于 4°C 暗室备用; (6) RGD 上游羧基与 DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ 的氨基进行酰胺化反应^[9]; (7) 检测脂质体的粒径; 用电子显微镜 (TEM) 观察脂质体的形貌; (8) 检测脂质体的紫外吸收光谱, 波长从 300 ~ 900 nm; (9) 建立 C6 的浓度标准曲线, 然后计算脂质体封装 C6 的浓度; (10) RGD-PLS-C6 与细胞结合和内化进行流式细胞分析和激光共聚焦荧光显微镜分析的^[10]。

3. 统计学分析: 采用 SPSS19.0 软件进行统计分析, 各组脂质体数据用均数 ± 标准差表示, *t* 检验; *P* < 0.05 具有统计学意义。

实验结果

1. 脂质体的合成和特征: 动态光散射法 (DLS) 测定封装 C6 的 PLS 的粒径与 RGD 共轭到脂质体表面后粒径、粒径分散指数差异无统计学意义, 表 1。透射电镜观察靶向与非靶向脂质体的形貌, 粒径较为均匀, 大小相似(图 1), 结果与 DLS 法测得的粒径结果基本一致。

2. C6 浓度的计算: C6 对应的最大吸收峰在 460 nm 左右(图 2A); UV Professional 绘制的 C6 的标准曲线如图 2B 示 标准曲线方程(其中 A 为吸光度值): C6 浓度测量值(μg/ml) = 5.5723 × A - 0.0014 相关系数 *r* = 0.999; 经测定 PLS-C6 的浓度为 13.98 μg/ml; RGD-PLS-C6 的浓度为 13.51 μg/ml。

表 1 封装 C6 的脂质体的特征 [($\bar{x} \pm s$) (n ≥ 3)]

脂质体	荧光材料	粒径 (nm)	多分散指数
PLS	coumarin-6	109.7 ± 1.2	0.066 ± 0.024
RGD-PLS	coumarin-6	121.4 ± 4.4	0.057 ± 0.012

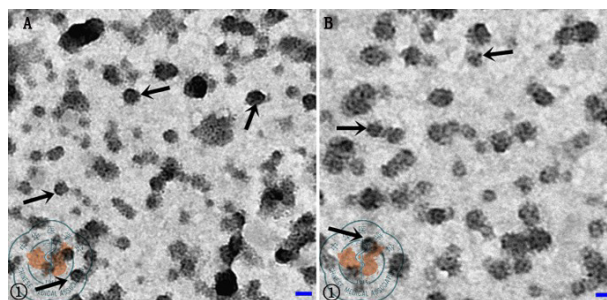


图 1 TEM 观察 2% 磷钨酸染色下的脂质体形貌 蓝色实线代表 100 nm 粒径或直径, 黑色箭头代表脂质体; 放大倍数: 30 000。[A: RGD-PLS-C6 B: PLS-C6]

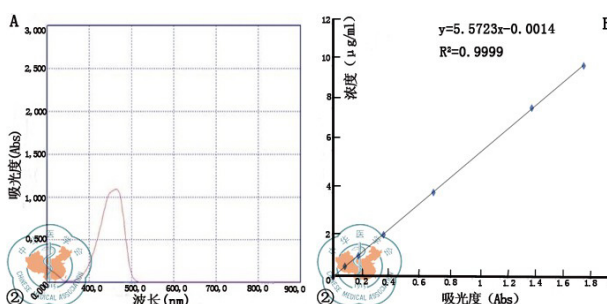


图 2 C6 的波长扫描 (A: 300 ~ 900 nm) 和浓度的标准曲线 (B: 0 ~ 10 μg)

3. 流式细胞术评估细胞结合和摄取: 细胞对脂质体摄取的量化通过流式细胞进行分析。首先, RGD-PLS 与 SGC7901 和 GES1 细胞的结合与阴性对照组 PLS 进行了比较。如图 3 所示 RGD-PLS 与过表达整合素 α5β1 的 SGC7901 细胞结合的荧光强度在 37°C 下明显高于 PLS, 然而, RGD-PLS 和 PLS 处理的 GES1 细胞荧光强度无明显差异。

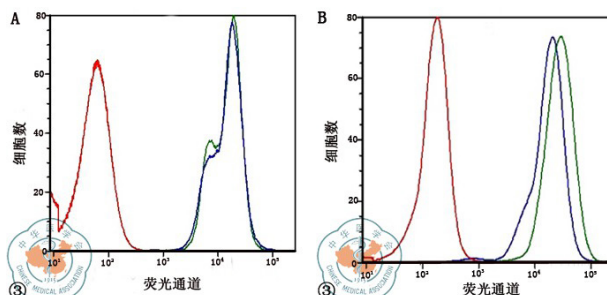


图 3 流式细胞分析 C6 在 GES1 (A) SGC7901 (B) 中的荧光强度 细胞分别用 PLS-C6 (蓝线) 和 RGD-PLS-C6 (C6 的浓度为 2 μg/ml) 在 37°C 下处理约 2 h 而 GES1 作为空白对照 (红线); 横轴表示荧光通道 (FITC-A); 纵轴表示细胞数 (Count)。

4. 共聚焦显微镜评估细胞结合和摄取: 为了进一步研究 RGD-PLS 和靶向细胞的关联, 用激光共聚焦显微镜观察了封装 C6 的脂质体与 SGC7901 人胃癌细胞株和 GES1 结合, 非靶向的脂质体 PLS 作为阴性对照组。在 SGC7901 中, PLS 处理的细胞可以观察到有非特异性的细胞结合。RGD-PLS 结合到

SGC7901 的荧光强度明显高于 PLS ,然而 ,在 GES1 中也观察到了荧光 ,但是荧光强度均比较弱 ,荧光强度与 PLS 处理的 SGC7901 无明显差异(图 4)。表明细胞可以非特异性的摄取脂质体和 RGD ,明显提高 SGC7901 与脂质体的结合并摄取。

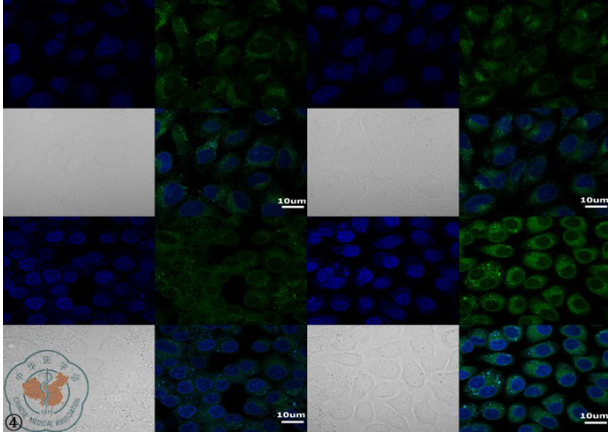


图 4 脂质体处理过表达整合素 $\alpha 5 \beta 1$ 的 SGC7901 与正常对照的 GES1 后的共聚焦显微镜成像
用封装 C6(浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的 PLS 和 RGD-PLS 与 GES1 和 SGC7901 用无血清培养基在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下共育 1 h ,其中细胞核用 hochechst 33342 染色(蓝色) ,而 C6 为绿色荧光;白色实线表示 10 μm 。

讨论

我们成功制备出了 RGD-PLS-C6 ,通过与肿瘤细胞 SGC7901 结合实验表明 RGD-PLS-C6 具有一定的肿瘤靶向作用 ,RGD-PLS 可作为一种有效的荧光染料运输载体 ,从而可通过封装其他染料(如 ICG、NIR797 等) ,借助荧光成像系统用于胃癌动物模型的肿瘤示踪 ,可能具有一定的应用价值。

近年来 ,大量证据表明 RGD 能够与胃癌细胞结合^[7,11] ,表明 RGD 可能成为一种有前景的用于胃癌的靶向配体。本文中 ,我们制备了 RGD-PLS-C6 来证实 RGD 可以增加与胃癌细胞的特异性结合 ,从而增加胃癌的靶向示踪作用。通常脂质体的粒径低于 200 nm 可以依靠 EPR 效应增加药物在肿瘤部位的聚集^[12]。同时 ,脂质体的粒径在与靶向细胞的作用方面也发挥着作用 ,而受体介导的细胞内吞可以内吞粒径在 100 ~ 200 nm 的粒子^[13]。我们制备的 PLS-C6 和 RGD-PLS-C6 的粒径主要在 100 ~ 130 nm ,这显然有助于细胞的被动和主动靶向摄取。流式分析和激光共聚焦成像结果表明 RGD-PLS 与 SGC7901 结合的荧光强度高于 PLS 组 ,而在 GES1 中两者的细胞荧光无明显差异。所有的实验现象表明由于 RGD 的介导作用 ,RGD-PLS 可以增

强特异的细胞结合和细胞摄取 ,我们推测这可能细胞表面整合素 $\alpha 5 \beta 1$ 的表达水平有关。

综上所述 ,我们制备的 RGD-PLS 可作为运输荧光染料的有效载体 ,并证实了 RGD-PLS-C6 对胃癌细胞 SGC7901 具有一定的靶向作用 ,但后续仍需要在动物肿瘤模型体内进行进一步验证其靶向作用 ,当然寻找更佳的荧光染料也是我们下一步的目标。

参考文献

- [1] Hynes RO. Integrins: versatility , modulation , and signaling in cell adhesion [J]. Cell ,1992 ,69(1) : 11-25.
- [2] Rajeswari J ,Pande G. The significance of alpha 5 beta 1 integrin dependent and independent actin cytoskeleton organization in cell trans-formation and survival [J]. Cell Biol Int 2002 26(12) : 1043-1055.
- [3] Toquet C , Colson A , Jarry A , et al. ADAM15 to $\alpha 5 \beta 1$ integrin switch in colon carcinoma cells: a late event in cancer progression associated with tumor dedifferentiation and poor prognosis [J]. Int J Cancer 2012 ,130(2) : 278-287.
- [4] Mitra AK , Sawada K , Tiwari P , et al. Ligand-independent activation of c-Met by fibronectin and $\alpha (5) \beta (1)$ -integrin regulates o-varian cancer invasion and metastasis [J]. Oncogene ,2011 ,30(13) : 1566-1576.
- [5] Chi F , Fu D , Zhang X , et al. Expression of the c-Met proto-onco-gene and Integrin $\alpha 5 \beta 1$ in human gastric cardia adenocarcinoma [J]. Biosci Biotechnol Biochem 2012 76(8) : 1471-1476.
- [6] Ren J , Xu S , Guo D , et al. Increased expression of $\alpha 5 \beta 1$ -integrin is a prognostic marker for patients with gastric cancer [J]. Clin Transl Oncol 2014 ,16(7) : 668-674.
- [7] Wang C , Bao C , Liang S , et al. RGD-conjugated silica-coated gold nanorods on the surface of carbon nanotubes for targeted photoacoustic imaging of gastric cancer [J]. Nanoscale Res Lett 2014 9(1) : 264.
- [8] BANGHAM AD , HORNE RW. NEGATIVE STAINING OF PHOS-PHOLIPIDS AND THEIR STRUCTURAL MODIFICATION BY SURFACE-ACTIVE AGENTS AS OBSERVED IN THE ELEC-TRON MICROSCOPE [J]. J Mol Biol ,1964 8: 660-668.
- [9] Kunishima M , Kawachi C , Hioki K , et al. Formation of carboxam-ides by direct condensation of carboxylic acids and amines in alco-hols using a new alcohol- and water-soluble condensing agent: DMT-MM [J]. Tetrahedron 2001 57(8) : 1551-1558.
- [10] Simard P , Leroux JC. pH-sensitive immunoliposomes specific to the CD33 cell surface antigen of leukemic cells [J]. Int J Pharm , 2009 381(2) : 86-96.
- [11] Chen CH , Liu DZ , Fang HW , et al. Evaluation of multi-target and single-target liposomal drugs for the treatment of gastric cancer [J]. Biosci Biotechnol Biochem 2008 72(6) : 1586-1594.
- [12] Gao J , Zhong W , He J , et al. Tumor-targeted PE38KDEL delivery via PEGylated anti-HER2 immunoliposomes [J]. Int J Pharm , 2009 374(1-2) : 145-152.
- [13] Couvreur P , Puisieux F. Nano- and microparticles for the delivery of polypeptides and proteins [J]. Adv Drug Deliv Rev ,1993 ,10(2-3) : 141-162.

(收稿日期: 2015-05-13)

丁杰 ,王峰 ,沈晓菲 等. RGD 序列修饰的 PEG 化脂质体对肿瘤细胞靶向作用的初步研究 [J/CD]. 中华普外科手术学杂志: 电子版 2015 9(5) : 54-56.