

## EGF 对人毛囊外毛根鞘无色素性黑素细胞增殖及迁移能力的影响

袁睿<sup>1</sup>, 杜宇<sup>2△</sup>

(1. 重庆市渝北区人民医院皮肤科 401100; 2. 西南医科大学附属医院皮肤科, 四川泸州 646600)

**[摘要]** **目的** 观察表皮生长因子(EGF)对毛囊外毛根鞘(ORS)无色素性黑素细胞(AMMCs)增殖及迁徙能力的影响。**方法** 差胰酶法传代纯化 AMMC 至第 3 代;免疫组织化学染色法鉴定 AMMC;CCK8 检测法及 Transwell 体外小室迁移实验分别检测不同浓度 EGF 干预后细胞增殖、迁移能力变化。**结果** 第 3 代 AMMC 免疫组织化学染色显示 NKI/beteb 染色阳性, HMB-45 染色阴性;CCK8 法 OD 值及 Transwell 体外小室迁移实验结果显示,随 EGF 浓度升高,其促进迁移及增殖的作用增加,但进一步增加浓度效果无明显增强。**结论** 体外一定浓度范围的 EGF 可促进 AMMC 增殖和迁移。

**[关键词]** 毛囊外毛根鞘;无色素性黑素细胞;细胞增殖;细胞运动;表皮生长因子

**[中图分类号]** R785.4+1

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2018)04-0446-03

**Effect of epidermal growth factor on proliferation and migration ability of amelanotic melanocytes in human hair follicle outer root sheath**

YUAN Rui<sup>1</sup>, DU Yu<sup>2△</sup>

(1. Department of Dermatology, Yubei District People's Hospital, Chongqing 401100, China;

2. Department of Dermatology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646600, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of epidermal growth factor (EGF) on proliferation and migration ability of amelanotic melanocytes (AMMC) in human hair follicle outer root sheath. **Methods** AMMC were purified to the third generation by the variant enzyme method. Then AMMC was identified by the immunohistochemical method; the changes of cellular proliferation and migration ability after intervention by different concentrations of EGF were detected by using CCK8 and Transwell in vitro chamber migration test. **Results** The third generation AMMC immuno histochemical staining showed NKI/beteb staining positive and HMB-45 staining negative. The OD values of CCK8 test and the Transwell in vitro chamber migration assay results showed that its promoting proliferation and migration effects were increased with the EGF concentration increase, but when further increasing concentration, the effects had no obvious enhancement. **Conclusion** A certain concentration range of EGF in vitro can promote AMMC proliferation and migration.

**[Key words]** out root sheath; amelanotic melanocytes; cell proliferation; cell movement; epidermal growth factor

白癜风为常见的皮肤,毛发色素脱失性疾病。国内外研究证实多种因素导致白癜风皮损区黑素细胞(melanocytes, MC)消失。但位于毛囊外毛根鞘(out root sheath, ORS)中上部的无色素性黑素细胞(amelanotic melanocytes, AMMCs)并未损伤<sup>[1-4]</sup>。在外界刺激及自身基因诱导下可作为储存库向表皮补充 MC<sup>[5]</sup>。有研究证实表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)除对体内外培养的人皮肤成纤维细胞、角膜上皮细胞有再生作用外,对视网膜干细胞(retinal stem cells, RSCs)<sup>[6]</sup>、哺乳动物神经干细胞<sup>[7]</sup>及表皮干细胞都具有促增殖、迁移作用。但其对 AMMCs 是否有影响尚少见报道。本研究旨在探讨 EGF 能否促进 AMMCs 的增殖及迁移能力,为白癜风的治疗作有益探索。

## 1 材料与方

**1.1 材料** 实验标本取自 3 例头皮血管瘤患者手术切口边缘正常头皮组织(与头皮提供者沟通获得同意后,记录基本信息)。成纤维生长因子(bFGF)、EGF、干细胞生长因子(SCF)购自美国 PEPROTECH 公司, MCDB153 培养基、Chelex 100 钠形式、胰蛋白酶、Geneticin、Cholera toxin 购自美国 Sigma 公司, Dispase II 购自瑞士 Roche 公司, CCK-8 试剂盒、DAPI 染色液购自上海碧云天生物技术有限公司, HRP-DAB 底物显色试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司, 兔抗 NKI/beteb 多克隆抗体购自美国 Santacruz 公司, 兔抗 HMB45 多克隆抗体购自北京博奥森公司, 超敏二步法免疫组化试剂盒购自中杉金

桥公司, Transwell 迁移小室购自美国 Corning 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 整合血清及 ORS 中 AMMCs 专用培养基的配制** 整合血清的配制:在 100 mL 的 10% 胎牛血清中加入 3 g Chelex 100 钠形式, 4 °C 下搅动 90 min, 除菌后 4 °C 保存。ORS 中 AMMCs 专用培养基的配制<sup>[8]</sup>:将 2% 的胎牛血清、2 mmol/L 谷氨酰胺、2.50 ng/mL bFGF、10 ng/mL 的 SCF、1.66 μg/L 的霍乱毒素(CT)、10% 的整合血清、青霉素-链霉素溶液(100 U/mL)加入 MCDB153 培养基中。调定 pH 为 7.10~7.30, 滤器除菌后 4 °C 保存。

**1.2.2 取材和 AMMC 原代培养** 采用聚维酮碘消毒已经取得的头皮 5 min, PBS 液反复冲洗 3 次。放入含青霉素、链霉素双抗溶液的培养基中,用显微剪去掉真皮上 1 mm 和脂肪组织,将头皮被处理成 1.00 cm×0.50 cm 的皮片。在 4 °C 条件下用 1% 分散酶 II 消化皮片 24 h,然后在 37 °C 条件下继续消化 1 h,再用显微镊轻柔挤压毛囊并使其自动游离。MCDB153 培养液反复冲洗 3 次, 1 700 r/min 离心 7 min, 收集毛囊。37 °C 下用 0.50% 胰蛋白酶消化 25~35 min, 直至 ORS 中的细胞绝大多数游离。使用胎牛血清中和并将其制成细胞悬液,经 200 目铜网过滤,再次 1 700 r/min 离心 7 min。去掉上清液,用 AMMC 专用培养液将其制成 2×10<sup>7</sup> 个/mL 浓度的细胞悬液,培养于 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C 的孵箱。

**1.2.3 AMMC 的纯化** 继续将 1.2.2 中的原代 AMMC 培养

2 d, 更换培养液可以除掉未贴壁细胞。然后再培养 7 d, 在培养瓶中观察到有小片状的角质形成细胞后, 采用 0.25% 的胰酶, 消化 5 min。然后按 3:1 的比例传代。此后每 5~7 天用 1:2 的比例继续传代。至第 3 代时可得到比较纯化的 AMMC。

**1.2.4 AMMC 的鉴定** 取 1.2.3 中纯化的 AMMC, 接种于内置有盖玻片的 24 孔版中。饱和湿度, 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C 条件下继续培养 48 h; 4% 的多聚甲醛室温下固定 15 min; 0.5% Triton 室温下打孔 10 min; 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 去离子水孵育 10 min; 不同的培养孔内分别加入 1:250 的兔抗 NKI/beteb 多克隆抗体、1:300 的兔抗 HMB45 多克隆抗体、阴性对照 (PBS 液), 继续 4 °C 下过夜; 添加 HRP-DAB 底物显色试剂盒内的试剂 1, 室温下孵育 15~25 min; 加入试剂 2, 室温下孵育 15~25 min; 加入 DAB 溶液, 室温下孵育 10 min; 加入苏木素溶液, 室温下复染 5 min, 添加 1% 盐酸乙醇, 反应 4 s 后冲洗, 添加饱和 Li-CO<sub>3</sub>, 反应 2 min 后冲洗。70%、80%、90%、95%、100% 梯度乙醇脱水, 显微镜下观察中性树胶封片后的图片并记录。

**1.2.5 实验分组** 取经纯化及鉴定的 AMMC, 根据 EGF 的浓度, 把实验分为 5 组: 即 EGF 0、1、10、20、50 ng/mL 干预组 (分别为对照组、EGF1 组、EGF2 组、EGF3 组、EGF4 组)。

**1.2.6 CCK8 检测法测定不同浓度 EGF 对 AMMC 增殖的影响** 取经鉴定及纯化的 AMMC, 用只添加了 10% 胎牛血清的 MCDB153 培养液制成 1×10<sup>4</sup> 个/mL 浓度细胞悬液, 根据 1.2.5 中的分组接种到 96 孔板中, 每孔的体积为 200 μL。每组接种 10 个复孔。采用等体积的相同培养基作阴性对照。继续培养 24 h, 将相应浓度的 EGF 分别加入各实验组, 每孔加入 EGF 的体积为 20 μL, 继续在饱和湿度、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 48 h。取出 96 孔板, 每孔中加入 20 μL 体积的 CCK8 溶液, 继续饱和湿度、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 1 h。然后在全光谱分光光度计上检测, 选择的波长为 450 nm。记录检测结果, 重复 3 次实验。

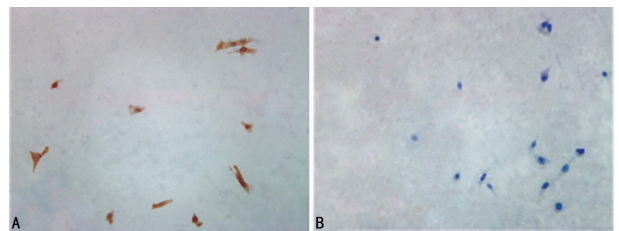
**1.2.7 Transwell 体外小室迁移实验测定不同浓度的 EGF 对 ORS 中 AMMC 迁移的影响** 取经鉴定及纯化的 AMMC, 培养于无血清的 MCDB153 中饥饿 24 h, 然后用 2% 胎牛血清 + MCDB153 培养液配成浓度为 2×10<sup>4</sup> 个/mL 的悬浮细胞液。Transwell 迁移小室 (带 8 μm 直径的微孔聚碳酸酯膜) 的上室

中加入 200 μL 上述细胞悬液, 下室添加 500 μL 的 10% 胎牛血清 + MCDB153 培养液。各实验组每孔的上室添加 100 μL 相应浓度条件的 EGF, 饱和湿度、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下继续培养 48 h。去除小室滤膜上的细胞, 在室温下用 40 g/L 的多聚甲醛固定滤膜下的细胞 15 min; 0.50% Triton 室温下打孔 10 min; DAPI 室温下染色 3 min (下面的操作均需要避光)。滴 18 μL 的抗荧光猝灭剂于载玻片上, 盖上盖玻片, 随机在荧光显微镜下取 8 个 400 倍视野并记录细胞数。重复实验 3 次。

**1.3 统计学处理** 使用 SPSS11.5 统计软件分析所得数据, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两两之间比较采用 SNK 法, 多组间比较采用单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

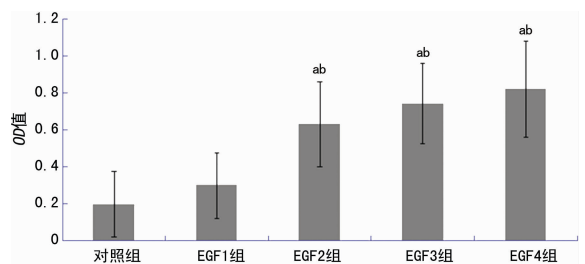
**2 结 果**

**2.1 ORS 中 AMMC 的免疫组织化学染色结果** 第 3 代经传代纯化的细胞, HMB45 免疫组织化学染色显示, 细胞质中没有棕黄色的颗粒。NKI/beteb 免疫组织化学染色, 少数细胞为三级, 大多数细胞为两极, 细胞质中有棕褐色的颗粒, 见图 1。



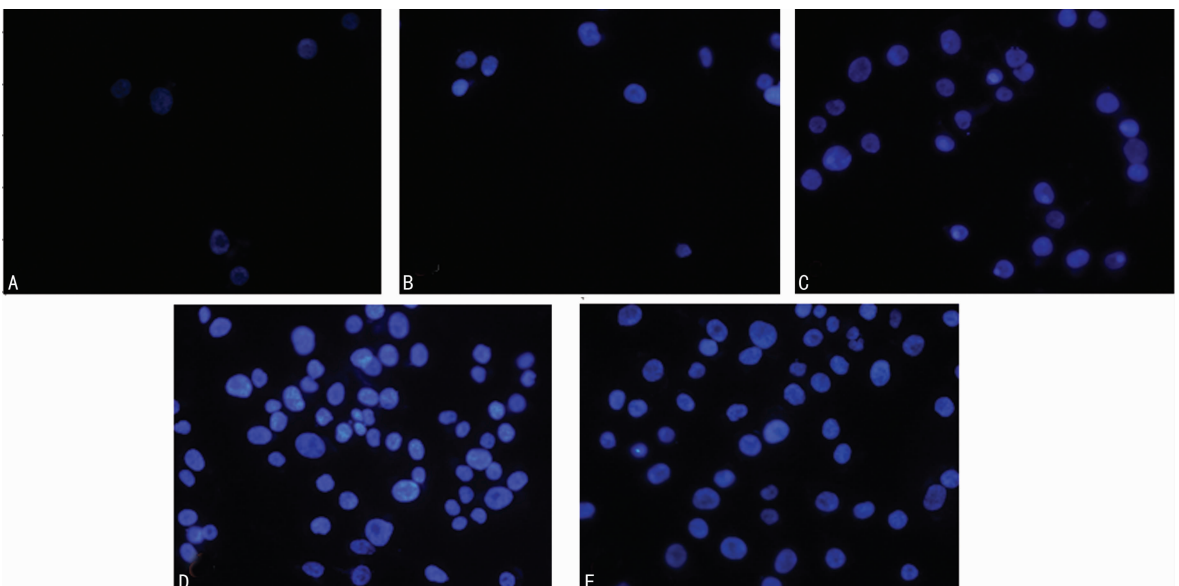
A: NKI/beteb 染色; B: HMB-45 染色

图 1 ORS 中 AMMC 的免疫组织化学染色 (×200)



<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与 EGF1 组比较

图 2 各组 ORS 中 AMMC 增殖能力比较

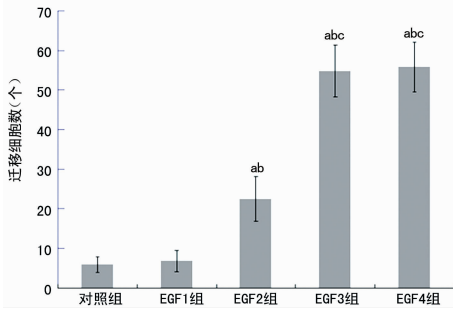


A: 对照组; B: EGF1 组; C: EGF2 组; D: EGF3 组; E: EGF4 组

图 3 人 ORS 中 AMMC 迁移实验 (荧光显微镜, DAPI×400)

**2.2 各组 ORS 中 AMMC 增殖能力比较** EGF 干预 48 h 后所检测到的各组 AMMC 的 CCK8 的 OD 值,经单因素方差分析得出 EGF2、EGF3、EGF4 组 AMMC 的 OD 值均高于 EGF1 组和对照组( $P < 0.05$ );EGF2、EGF3、EGF4 组组间 AMMC 的 OD 值比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );EGF1 组和对照组的 OD 值比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见图 2。

**2.3 各组 ORS 中 AMMC 迁移能力比较** EGF 干预 48 h 后测得各组穿过聚碳酸酯膜微孔的 AMMC 的细胞数,结果检测到 EGF2、EGF3、EGF4 组迁移穿过聚碳酸酯膜微孔的 AMMC 的细胞数明显多于对照组和 EGF1 组( $P < 0.05$ );EGF3、EGF4 组多于 EGF2 组( $P < 0.05$ );EGF3、EGF4 组组间的迁移细胞数比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );对照组与 EGF1 组 AMMC 的迁移细胞数比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见图 3、4。



$a: P < 0.05$ , 与对照组比较;  $b: P < 0.05$ , 与 EGF1 组比较;  $c: P < 0.05$ , 与 EGF2 组比较

图 4 各组 ORS 中 AMMC 迁移能力比较

### 3 讨 论

白癜风皮损的复色首先在毛囊口形成色素岛,然后向四周扩散,最后形成色素片。但在无毛囊的部位如手掌等没有发现这种复色现象。有研究者将患者正常皮肤的毛发拔取后接种到皮损区并观察到了以接种毛发为核心的复色<sup>[9]</sup>。表明在白癜风复色中毛囊起关键作用。CUI 等<sup>[10]</sup>于 90 年代发现 AMMC 主要位于 ORS 中上部,光镜下细胞体大多数小于 MC,呈多角形,折光度好,少数为三级结构,多为双极。一般情况下处于休眠状态,无黑色素合成能力。在如 UVB 照射、炎症等刺激下激活,被激活的 AMMC 分化成熟,迁移至脱色区,形成以毛囊为中心的色素岛,从而起到 MC 储存库的作用<sup>[11-12]</sup>。既然 ORS 存在无活性的 MC,而 AMMC 又被证实为 MC 前体,具有干细胞特性,在特定条件下可增殖分化成 MC,且有研究表明患者皮损内 AMMC 并未受到损伤<sup>[1-4]</sup>。因此,采用刺激 AMMC 增殖、迁移并分化为成熟的 MC 从而复色皮损的方法具有较好的应用前景。但是在 ORS 中 AMMC 数量极少,怎样使处于静息态的 AMMC 激活、增殖并迁移成为研究白癜风治疗中迫切需要解决的难题。细胞增殖的主要方式是细胞分裂,目前已知的有丝分裂原包括 bFGF、EGF 等,它们能促进细胞的分裂和增殖。bFGF 被证实对 AMMC 的增殖有促进作用。那么同为有丝分裂原的 EGF 对 AMMC 的增殖是否也有促进作用?

本研究通过体外实验采用不同浓度 EGF 干预经鉴定的 AMMC。结果证实 EGF 10、20、50 ng/mL 干预后的增殖能力高于 EGF 0、1 ng/mL( $P < 0.05$ );EGF 0、1 ng/mL 干预组间增殖能力比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。证明 EGF 需达到一定浓度后才能起到促进增殖作用。但是随着 EGF 的浓度

升高,促进增殖作用并未进一步增加。

同时,本研究通过体外 Transwell 小室迁移实验发现,与 EGF 0、1 ng/mL 干预比较,EGF 10、20、50 ng/mL 均可促进 AMMC 的迁移( $P < 0.05$ )。说明当达到一定浓度后,随着 EGF 浓度的升高,其促迁移的作用并未进一步增加。

综上所述,一定浓度范围内的 EGF 对 AMMC 具有促进增殖、迁移作用,浓度过高或过低,其促进作用明显减弱。这对以后的研究提供了可靠依据,但机制尚不清楚。近来有文献报道 EGF 受体(EGF receptor, EGFR)在 AMMC 大量分布的人 ORS 的隆突区有较强表达<sup>[13-14]</sup>。这提示 EGF 可能通过 EGFR 对 AMMC 发挥促进增殖和迁移作用,作者将在进一步研究中探讨其作用机制,以期为白癜风的治疗提供新的思路和治疗靶点。

### 参考文献

- [1] LE POOLE I C, VAN D R, WESTERHOF W, et al. Presence or absence of melanocytes in vitiligo lesions: an immunohistochemical investigation[J]. *J Invest Dermatol*, 1993, 100(6):816-822.
- [2] CUI J, SHEN L Y, WANG G C. Role of hair follicles in the repigmentation of vitiligo[J]. *J Invest Dermatol*, 1991, 97(3):410-416.
- [3] NORRIS D A, HORIKAWA T, MORELLI J G. Melanocyte destruction and repopulation in vitiligo[J]. *Pigment Cell Res*, 1994, 7(4):193-203.
- [4] TOBIN D J, BYSTRYN J C. Different populations of melanocytes are present in hair follicles and epidermis[J]. *Pigment Cell Res*, 1996, 9(6):304-310.
- [5] ORTONNE J P, SCHMITT D, THIVOLET J. PUVA-induced repigmentation of vitiligo: scanning electron microscopy of hair follicles[J]. *J Invest Dermatol*, 1980, 74(1):40-42.
- [6] ANGÉNGÉNIEUX B, SCHORDERET D F, ARSENIJEVIC Y. Epidermal growth factor is a neuronal differentiation factor for retinal stem cells in vitro[J]. *Stem Cells*, 2006, 24(3):696-706.
- [7] REYNOLDS B A, WEISS S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system[J]. *Science*, 1992, 255(552):1707-1710.
- [8] 王大光,朱文元,马慧军,等.人毛囊无色素黑素细胞培养方法的改良及色素生成相关酶表达的研究[J]. *中国中西医结合皮肤性病学杂志*, 2008, 7(4):201-206.
- [9] NA G Y, SEO S K, CHOI S K. Single hair grafting for the treatment of vitiligo[J]. *J Am Acad Dermatol*, 1998, 38(4):580-584.
- [10] CUI J, SHEN L Y, WANG G C. Role of hair follicles in the repigmentation of vitiligo[J]. *J Invest Dermatol*, 1991, 97(3):410-416.
- [11] TOBIN D J, BYSTRYN J C. Different populations of melanocytes are present in hair follicles and epidermis[J]. *Pigment Cell Res*, 1996, 9(6):304-310.
- [12] ARRUNÁTEGUI A, ARROYO C, GARCIA L, et al. Melanocyte reservoir in vitiligo[J]. *Int J Dermatol*, 1994, 33(7):484-487.



## 透明质酸修饰的绿原酸脂质体的制备及细胞学研究

赵玉玺,张帆,杨琴,魏莹,陈钊,刘福<sup>△</sup>

(川北医学院药学院药物研究所,四川南充 637000)

**[摘要]** **目的** 制备透明质酸(HA)靶向绿原酸(CA)脂质体,探讨其对 HA 受体(CD44)高表达 A549 细胞及低表达 HepG2 细胞的增殖抑制作用。**方法** 合成 HA-二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE);通过薄膜分散法制备 HA-CA 脂质体并用动态光散射粒径分析仪测定粒径;采用高效液相色谱法(HPLC)建立 CA 体外水平测定方法并测定 HA-CA 脂质体的包封率;采用噻唑蓝(MTT)法检测游离 CA、CA 脂质体及 HA-CA 脂质体对 A549 细胞和 HepG2 细胞的增殖抑制作用;采用荧光细胞摄取实验验证 HA 脂质体的靶向性。**结果** HA-CA 的平均粒径为 219.20 nm,多分散系数(PDI)=0.16;包封率为(85.36±1.01)%;HA-CA 脂质体对 A549 细胞的增殖抑制作用明显大于 CA 脂质体,且 CA 脂质体大于游离 CA;CA 脂质体和 HA-CA 脂质体对 HepG2 细胞的增殖抑制作用则基本相当,均大于游离 CA;A549 细胞对载 6-香豆素 HA 脂质体(HA-C 脂质体)的摄取高于 HepG2 细胞。**结论** HA-CA 脂质体能与高表达的 HA 受体细胞特异性结合,达到肿瘤细胞主动靶向效果。

**[关键词]** 透明质酸;绿原酸;细胞系;肿瘤;靶向;脂质体**[中图法分类号]** R94**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)04-0449-04

## Preparation of hyaluronic acid decorated chlorogenic acid liposome and cytology study

ZHAO Yuxi, ZHANG Fan, YANG Qin, WEI Ying, CHEN Chuan, LIU Fu<sup>△</sup>

(Institute of Medicine, School of Pharmacy, North Sichuan Medical University, Nanchong, Sichuan 637000, China)

**[Abstract]** **Objective** To prepare hyaluronic acid(HA) targeted chlorogenic acid(HA-CA) liposome and to investigate its inhibition effect on HA receptor(CD44) high expressing A549 cells and HA receptor(CD44) low expression HepG2 cells proliferation. **Methods** HA-DOPE was synthesized; HA-CA liposome was prepared by thin membrane disperse method and the particle size was measured by using the dynamic light scattering particle size analyzer; the HPLC method was adopted to establish the CA in vitro contents measurement method and detect the HA-CA liposome entrapment efficiency; MTT assay was applied to detect the proliferation inhibiting effect of free CA, CA liposome and HA-CA liposome on A549 cells and HepG2 cells; the fluorescence cell uptake assay was adopted to verify the targeting effect of HA liposome. **Results** The average particle size of HA-CA was 219.20 nm and PDI was 0.16; the entrapment efficiency of HA-CA liposome was(85.36±1.01)%; the proliferation inhibition effect of HA-CA liposome on A549 cells was significantly greater than that of CA liposome, moreover CA liposome was greater than free CA, the proliferation inhibition effect of CA liposome and HA-CA liposome on HepG2 cells was basically similar, which was greater than that of free CA; the uptake of A549 cells on HA liposome carrying 6-coumarin(HA-C liposome) was higher than that of HepG2. **Conclusion** HA-CA liposome can specifically combined with the high expression HA receptor cells to achieve the active targeting effect of tumor cells.

**[Key words]** hyaluronic acid; chlorogenic acid; cell line, tumor; target; liposome

绿原酸(chlorogenic acid, CA)是金银花、杜仲等药材中的重要活性成分,也是具有重要应用开发前景的多酚类活性物质<sup>[1]</sup>。研究表明 CA 具有清除氧自由基、抗炎、抗病毒、降血压等作用<sup>[2]</sup>。近年来,研究发现 CA 还具有抗肿瘤的作用<sup>[3]</sup>。但是 CA 是脂溶性药物,难溶于水,在肠道中吸收差,所以使其应用受到很大的阻碍<sup>[4]</sup>。脂质体是具有良好的生物相容性的纳米载体<sup>[5]</sup>,脂质体包封脂溶性药物可以有效地提高其在体内的生物利用度,增强疗效,同时脂质体表面修饰配体是构建主动靶向脂质体的重要方式,能够使其靶向到特异性组织<sup>[6]</sup>。透明质酸(hyaluronic acid, HA)是一种天然多糖,是目前研究较多的一种主动靶向配体,已被证实可诱导引发受体介导的细胞内信号<sup>[7]</sup>。人体内有多种 HA 受体,如 CD44 受体、HA 介导能动性受体(RHAMM)、HA 内吞受体(HARE)等,其中 CD44 研究最为广泛深入。有研究表明,CD44 与多种肿瘤的生长、发展、转移和预后密切相关,包括腺癌、卵巢癌、乳腺癌等<sup>[8]</sup>,

CD44 受体可同 HA 特异性结合,通过受体-配体机制实现靶向药物递送的目的<sup>[9]</sup>。因此表面经 HA 及其衍生物修饰的脂质体可靶向递送抗肿瘤药至 HA 受体高表达的肿瘤细胞和组织。本研究选取 HA 为主动靶向的配体修饰载 CA 的脂质体(HA-CA 脂质体),用以增加 CA 的抗肿瘤效果。

**1 材料与方法****1.1 材料**

**1.1.1 仪器** Sartorius BP211D 电子天平(德国 Sartorius 公司);ALPHA 2-4 LSC 冻干机(德国 Christ 公司);CJ-2S 超净台(江苏天润仪器有限公司);DM-IL 倒置显微镜(德国徕卡公司);TGL-16G-A 离心机(上海安亭科学仪器厂);Forma Series 细胞培养箱(美国 Thermo Scientific 公司);恒温摇床(北京同正生物技术发展有限公司);Model 550 酶联分析仪(美国 BIO-RAD 公司);100、1 000  $\mu$ L 移液枪(美国 Thermo Scientific 公司);Thermo Array scan VTI 高内涵筛选仪(Thermo

### 3 讨 论

恶性肿瘤已经成为威胁人类生命安全的第二大疾病,而且呈现高发趋势<sup>[12]</sup>。目前治疗肿瘤的手段主要包括手术、放射治疗和化学药物治疗等。但放化疗的不良反应大,易产生耐药性<sup>[13]</sup>。由于中医药及中药成分在治疗肿瘤方面,可以发挥多途径、多靶点作用,同时具有不良反应少、机体耐受性好等优势,使其成为肿瘤治疗的热点<sup>[14]</sup>。CA 作为中药成分酚酸类的代表,研究表明可以通过诱导细胞凋亡调节细胞信号转导、诱导细胞分化和抑制多种与细胞凋亡相关的酶活性等途径发挥抗肿瘤作用<sup>[15]</sup>。

由于 HA 具有良好的可降解性、非免疫原性和生物相容性,使其介导的抗肿瘤靶向给药系统研究得到广泛关注。HA 有三种常用方式作为抗肿瘤靶向给药系统,一是 HA-药物偶联物,是将药物与 HA 通过共价键的方式结合;二是 HA 基因药物载体,既可保护 DNA 又可减少不良反应出现;三是 HA 的表面修饰,用 HA 及其衍生物修饰纳米给药系统既增强了纳米制剂的靶向性,又延长了药物体内作用时间<sup>[16]</sup>。

本文以 HA 为主动靶向配体,脂质体为药物载体,构建了 HA 修饰的 CA 脂质体,用以改善 CA 自身理化性质的局限,从而达到增强 CA 抑制肿瘤作用的目的。结果显示,与游离 CA 相比,将 CA 包载至脂质体后的 CA 脂质体可增强其对 A549 和 HepG2 细胞的细胞毒性。另外,HA-CA 脂质体对高表达 HA 受体的 A549 细胞的细胞毒性明显大于 CA 脂质体,而对于低表达 HA 受体的 HepG2 细胞而言,HA-CA 脂质体与 CA 脂质体的细胞毒性作用相当,说明 HA-CA 脂质体由于 HA 主动靶向配体的加入,使其能主动靶向至 HA 受体高表达细胞,增强药物对细胞的毒性作用。细胞摄取实验同样证明,HA 能够增强 HA 受体高表达细胞 A549 的细胞摄取率,从而提高药效。关于 HA-CA 脂质体的主动靶向通路及其体内抑制肿瘤能力等还有待进一步研究。以上研究结果表明 HA-CA 脂质体是一个很有发展潜力的抗肿瘤药物递送系统。

### 参考文献

[1] CAO X, XIE Y, ZHU D, et al. Determination of plasma protein binding rate of five components in eucommia ulmoides extract[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2015, 31(1): 131-135.

[2] 陈为烤, 居文政, 谈恒山. 绿原酸的体内过程及药物相互作用[J]. *中药药理与临床*, 2008, 24(3): 118-120.

[3] GRANADO-SERRANO A B, MARTIN M A, GOYA L, et al. Molecular mechanisms of(-)-epicatechin and chlorogenic acid on the regulation of the apoptotic and survival/

proliferation pathways in a human hepatoma cell line[J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(5): 2020-2027.

- [4] 徐贤柱, 魏允, 饶华, 等. 绿原酸纳米脂质体制备与抑菌性分析[J]. *食品科学*, 2014, 35(20): 62-66.
- [5] QIN Y, CHEN H, ZHANG Q, et al. Liposome formulated with TAT-modified cholesterol for improving brain delivery and therapeutic efficacy on brain glioma in animals [J]. *Int J Pharm*, 2011, 420(2): 304-312.
- [6] CHEN H, TANG L, QIN Y, et al. Lactoferrin-modified procationic liposomes as a novel drug carrier for brain delivery[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2010, 40(2): 94-102.
- [7] YANG C, CAO M, LIU H, et al. The high and low molecular weight forms of hyaluronan have distinct effects on CD44 clustering[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(51): 43094-43107.
- [8] ORIAN-ROUSSEAU V. CD44, a therapeutic target for metastasising tumours[J]. *Eur J Cancer*, 2010, 46(7): 1271-1277.
- [9] GHOSH S C, NESLIHAN ALPAY S, KLOSTERGAARD J. CD44: a validated target for improved delivery of cancer therapeutics[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2012, 16(7): 635-650.
- [10] 李建林, 孟路华, 赵玉玺, 等. 透明质酸磷脂酰衍生物修饰姜黄素脂质体的制备及细胞毒性[J]. *中国医药工业杂志*, 2013, 44(5): 471-474, 491.
- [11] 袁俊, 阮鸣, 陈静, 等. 咖啡中绿原酸高效液相色谱法测定及不同提取工艺的比较研究[J]. *南京师大学报(自然科学版)*, 2014, 37(4): 94-98.
- [12] AVEDISIAN C T, CAVICCHI R E, MCEUEN P L, et al. Nanoparticles for cancer treatment: role of heat transfer[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1161(1): 62-73.
- [13] 白云, 刘萍, 贾博宇, 等. 中药抗肿瘤作用的研究进展[J]. *中国药师*, 2014, 17(8): 1406-1409.
- [14] 刘雪丽, 周学锋, 王君瑜, 等. 中药抗肿瘤作用机制研究进展[J]. *中国药师*, 2016, 19(6): 1158-1162.
- [15] 田伟, 豆亚伟, 王宏涛, 等. 绿原酸诱导肺癌细胞凋亡及其机制研究[J]. *解放军预防医学杂志*, 2016, 34(6): 854-857.
- [16] 李亚秋. 透明质酸肿瘤靶向给药系统的研究进展[J]. *中国保健营养*, 2016, 26(30): 403-403.

(收稿日期: 2017-07-04 修回日期: 2017-09-11)

(上接第 448 页)

[13] AKIYAMA M, SMITH L T, HOLBROOK K A. Growth factor and growth factor receptor localization in the hair follicle Bulge and associated tissue in human fetus[J]. *J Invest Dermatol*, 1996, 106(3): 391-396.

[14] NARISAWA Y, KOHDA H, TANAKA T. Three-dimen-

sional demonstration of melanocyte distribution of human hair follicles: Special reference to the Bulge area[J]. *Acta Derm Venereol*, 1997, 77(2): 97-101.

(收稿日期: 2017-06-26 修回日期: 2017-10-04)