

Scientific)。

1.1.2 药品与试剂 CA(BR,99.99%)、二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE,≥99.00%)、大豆卵磷脂(≥99.00%)、胆固醇(≥99.00%)、Hochest 33258(≥98.00%)、噻唑蓝(MTT,98.00%,美国 Sigma 公司);HA 钠(Mw=8 000 Da,山东福瑞达生物化工有限公司);胎牛血清(FBS,美国 GIBCO 公司);胰酶、DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司);6-香豆素(日本 TCI 公司 8LUEF-CC);其余试剂为分析纯。

1.1.3 细胞 人肺癌 A549 细胞(川北医学院药物研究所);人肝癌 HepG2 细胞(川北医学院药物研究所)。

1.2 方法

1.2.1 HA-DOPE 的制备^[10] 称取 HA 30 mg,置 10 mL 蒸馏水中溶胀后超声溶解。加入 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)60 mg 和 N-羧基琥珀酰亚胺(NH-SS)90 mg,加氢氧化钠溶液调至 pH 7.5,于 37 ℃ 水浴活化 24 h。持续搅拌下滴加含 DOPE 72 mg 的混悬液,反应过夜。透析除去反应液中多余反应物和副产物,经薄层色谱(展开剂:氯仿:甲醇:水为 65:25:4,碘蒸气显色)验证反应液中已无游离 DOPE 存在,冷冻干燥即得。

1.2.2 HA-CA 脂质体的制备 精密称取卵磷脂 120 mg,胆固醇 30 mg(磷脂比为 4:1),CA 5 mg 于茄型瓶中,加入氯仿丙酮混合溶剂 10 mL(氯仿:丙酮体积比为 4:1),超声使其充分溶解,置于旋转蒸发仪中将溶剂蒸出,直至在瓶壁上形成均匀的脂质膜。加入 3 mL(pH 7.4)PBS 磷酸盐缓冲溶液和 2 mL HA-DOPE 的 PBS 溶液(HA-DOPE 为 1 g/L)后在 60 ℃ 水浴条件下水化 1 h,即得。

1.2.3 CA 体外水平测定方法的建立 (1)色谱条件^[11]: Thermo C18 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相为甲醇:0.1%冰醋酸(30:70);检测波长为 330 nm;流速为 1.0 mL/min;进样量为 5 μL;柱温为 30 ℃。(2)标准曲线的绘制:精密称取 CA 原料药适量,用甲醇溶解,制备成质量浓度分别为 0.10、0.20、0.40、0.60、0.80 g/L 的梯度标准溶液,0.22 μm 微孔滤膜过滤,备用。在以上色谱条件下测定 CA 的峰面积。

1.2.4 精密度实验 精密吸取浓度为 0.20 g/L 的 CA 样品溶液进样,按照 1.2.3 色谱条件测定,共测 6 次,计算相对标准偏差(RSD)。

1.2.5 稳定性实验 精密吸取浓度为 0.20 g/L 的 CA 样品溶液进样测其稳定性,3 h 测 1 次,共测 6 次,计算 RSD。

1.2.6 回收率实验 精密量取浓度为 0.40 g/L 的 CA 样品溶液适量,按比例加入 HA 空白脂质体 1 mL,用流动相配成高、中、低 3 种质量浓度的 CA 脂质体溶液,每种 5 份,加甲醇破坏脂质体,稀释定容至刻度,摇匀,离心吸取上清液,按照 1.2.3 色谱条件测定。

1.2.7 HA-CA 脂质体的包封率测定 采取离心法测定脂质体的包封率。取 HA-CA 脂质体溶液 2 mL,置于离心管中,以 14 000 r/min 离心 30 min,下层沉淀部分即制备的姜黄素脂质体。小心倒去含有游离姜黄素的上层溶液,用甲醇溶液超声 20 min 溶解底部的姜黄素脂质体后置 5 mL 容量瓶中定容后,按照 1.2.3 的色谱条件测定 CA 的峰面积,代入标准曲线,按外标法计算 CA 的水平,并计算 HA-CA 脂质体的包封率,连续测定 5 批脂质体,包封率公式如下:

$$\text{包封率(CA)} = \text{MCA} / \text{M} \times 100\%$$

其中,MCA 为消解后测得 CA 的浓度,M 为制备时加入的 CA 的量。

1.2.8 HA-CA 脂质体的细胞毒性实验 分别培养 A549 细胞(HA 受体高表达)和 HepG2 细胞(HA 受体低表达)并接种于 96 孔板中,当孔板中细胞完全贴壁且处于对数生长期时,以含 10%FBS 的培养基为空白对照组,以未经药物处理过的细胞悬液为阴性对照组,加入 3 个浓度(5、15、30 μL/mL)的游离 CA、CA 脂质体及 HA-CA 脂质体。继续培养 48 h 后取出,每孔加入 MTT 溶液 20 μL(20 g/L),再放回孵箱中继续孵育 4 h。离心,弃上清液,每孔加入 200 μL 二甲基亚砷(DMSO),振荡 10 min,用酶标仪在 490 nm 处测定各孔的光密度(OD)值。计算空白脂质体、游离 CA、CA 脂质体抑制率,以及 HA-CA 脂质体对 A549、HepG2 细胞的增殖抑制率,计算公式如下:

$$\text{细胞抑制率} = [1 - (\text{OD}_{\text{实验组}} - \text{OD}_{\text{空白对照组}}) / (\text{OD}_{\text{阴性对照组}} - \text{OD}_{\text{空白对照组}})] \times 100\%$$

1.2.9 细胞摄取实验

1.2.9.1 载 6-香豆素的脂质体(C-LP)制备 精密称取 6-香豆素 0.5 mg 于 10 mL 容量瓶中,加二氯甲烷溶解,配制成 0.05 g/L 的 6-香豆素储备液。另精密称取卵磷脂 120 mg,胆固醇 30 mg(磷脂比为 4:1),加入氯仿丙酮混合溶剂 10 mL(氯仿:丙酮体积比为 4:1),超声使其充分溶解,加入 1 mL 香豆素溶液,置于旋转蒸发仪中将溶剂蒸出,直至在瓶壁上形成均匀的脂质膜。加入 5 mL(pH 7.4)PBS 后在 60 ℃ 水浴条件下水化 1 h,即得。

1.2.9.2 载 6-香豆素的 HA 脂质体(HA-C-LP)制备 另精密称取卵磷脂 120 mg,胆固醇 30 mg(磷脂比为 4:1),加入氯仿丙酮混合溶剂 10 mL(氯仿:丙酮体积比为 4:1),超声使其充分溶解,加入 1 mL 香豆素储备液,置于旋转蒸发仪中将溶剂蒸出,直至在瓶壁上形成均匀的脂质膜。加入 3 mL(pH 7.4)PBS 和 2 mL HA-DOPE 的 PBS 溶液(HA-DOPE 为 1 g/L)后在 60 ℃ 水浴条件下水化 1 h,即得。

1.2.9.3 细胞摄取实验 分别培养 24 h 的 A549、HepG2 细胞悬液(密度为 10×10^4 个/mL)弃去培养基,将 4 组药液:6-香豆素 DMSO 溶液(6-coumarin)、C-LP、HA-C-LP+HA 溶液(HA 为 0.4 g/L)、HA-C-LP,每孔加入 1 mL,继续于 37 ℃ 孵育 2 h^[10];弃去培养基,并以冷的 PBS 洗 2 次;再以 4%多聚甲醛固定 10 min;再用冷的 PBS 洗 2 次;以 Hochest 33258 (2.5 μg/mL)染细胞核 15 min 后,再以 PBS 洗 1 次,最后置于高内涵仪中分析结果。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行分析,计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HA-CA 脂质体的粒径测定结果 取脂质体适量,用超纯水稀释后用动态光散射粒径分析仪测定粒径,测得平均粒径、多分散系数(PDI),结果见图 1。平均粒径为 219.20 nm, PDI 为 0.16,粒径分布较窄,脂质体粒径较均匀。

2.2 CA 的标准曲线 以 CA 的峰面积为纵坐标,浓度为横坐标绘制标准曲线得 CA 的标准曲线方程 $Y = 14\,064X - 103.54$, $R^2 = 0.999\,1$,CA 在 0.10~0.8 g/L 时线性关系良好,见图 2。

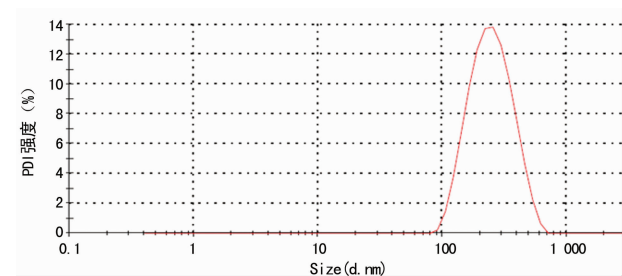


图 1 粒径分布图

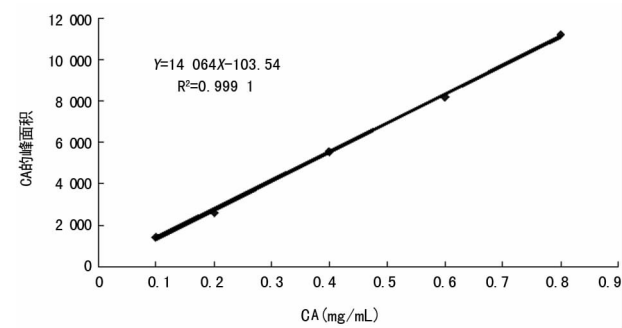


图 2 CA 的标准曲线

2.3 精密度及稳定性实验结果 精密度的 RSD 为 1.63% ($n=6$),表明仪器精密度良好;稳定性的 RSD 为 1.71% ($n=6$),表明 CA 样品在 15 h 内稳定性良好,见表 1。

表 1 精密度和稳定性实验结果

次数	精密度(面积)	稳定性(面积)
第 1 次	2 456	2 479
第 2 次	2 565	2 551
第 3 次	2 478	2 589
第 4 次	2 543	2 496
第 5 次	2 492	2 511
第 6 次	2 500	2 567

2.4 回收率及 HA-CA 脂质体包封率的测定结果 3 次测得的回收率分别为 98.20%、98.50%、98.10%。得到 HA-CA 脂质体的包封率为(85.36±1.01)%。

2.5 HA-CA 脂质体的细胞毒性实验结果 随着药物浓度的

增加对 A549、HepG2 细胞的增殖抑制率增强。在相同给药浓度下,HA-CA 脂质体对 A549 细胞的增殖抑制作用明显强于 CA 脂质体($P<0.05$);而对于 HepG2 细胞 HA-CA 脂质体的增殖抑制作用与 CA 脂质体相当,见图 3。

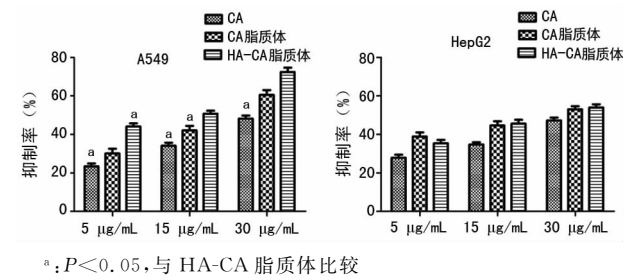
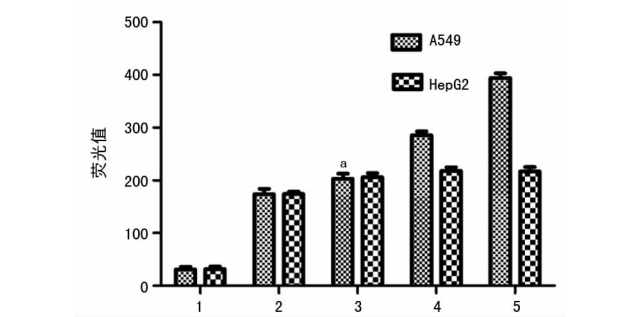


图 3 细胞抑制率(48 h)

2.6 细胞摄取实验结果 A549、HepG2 两种细胞在阴性对照组、6-coumarin 组和 C-LP 组的荧光摄取值比较,差异无统计学意义($P>0.05$);两种细胞在 6-coumarin 组和 C-LP 组的荧光值略有差异,原因是细胞对于 6-coumarin 和 C-LP 两种药物的摄取方式存在区别。A549 细胞在 HA-C-LP 组的荧光值远高于 C-LP 组($P<0.05$),而 HepG2 细胞在 HA-C-LP 组与 C-LP 组的荧光值比较差异无统计学意义($P>0.05$),A549 细胞在 HA-C-LP+HA 组随着游离 HA 的加入导致其荧光值比 HA-C-LP 组有所下降,见图 4、5。



1: 阴性对照组;2:6-coumarin 组;3:C-LP 组;4:HA-C-LP+HA 组;5:HA-C-LP 组;*: $P<0.05$,与 HA-C-LP 组比较

图 4 细胞摄取荧光值

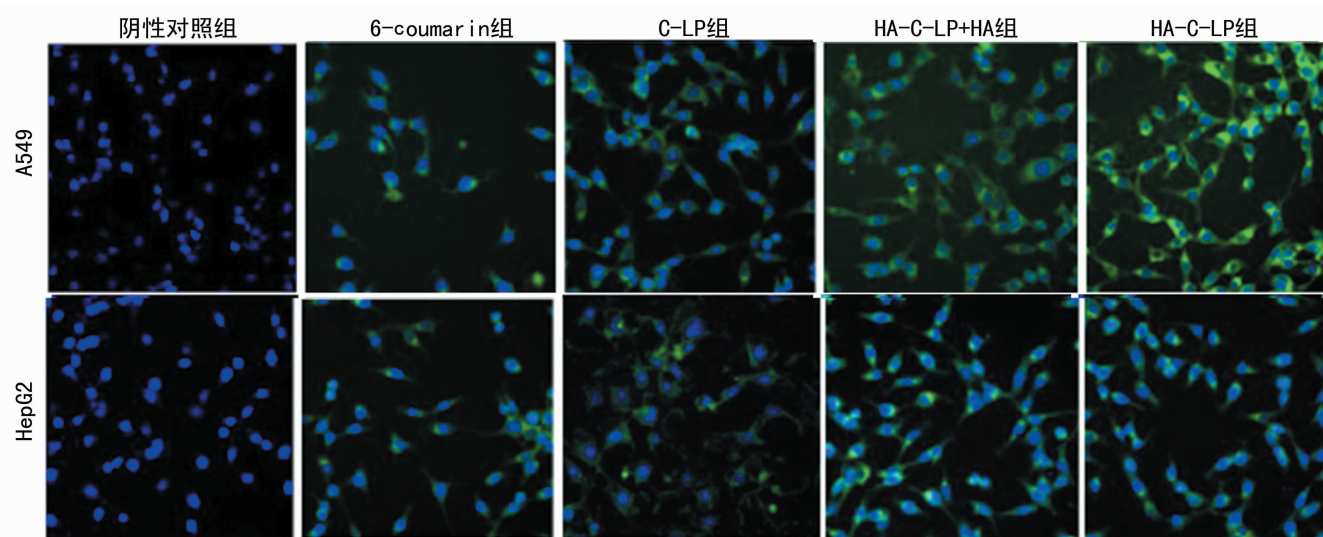


图 5 细胞摄取荧光图

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^[12]。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^[13]。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^[14]。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^[15]。

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^[16]。

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)