

盐酸米托蒽醌聚乙二醇化脂质体的制备及对 A549 细胞体外抗肿瘤作用的研究

凌云¹,程婷²,宋礼华²

(1. 绩溪县食品药品监督管理局,安徽 绩溪 245300;

2. 安徽安科生物工程(集团)股份有限公司,安徽 合肥 230088)

摘要:目的 研究盐酸米托蒽醌聚乙二醇化脂质体(DHAD-PEG-L)的制备及其抗肿瘤细胞增殖作用,比较 DHAD-PEG-L 与常规盐酸米托蒽醌(DHAD)制剂的抗肿瘤活性差异。方法 以主动载药法制备获得 DHAD-PEG-L;以人非小细胞肺癌 A549 细胞为模型,采用 MTT 法考察 DHAD-PEG-L 和 DHAD 对肿瘤细胞的抑制效果,测定制剂作用肿瘤细胞 48 h 后的 IC₅₀ 值;以方差分析法比较 DHAD-PEG-L 与 DHAD 抗肿瘤活性的统计学差异。结果 DHAD-PEG-L 和 DHAD 对 A549 细胞的 IC₅₀ 分别是 $(1.561 \pm 0.09) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $(0.862 \pm 0.02) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;药物经聚乙二醇(PEG)脂质体包封后,与常规制剂相比,高浓度时肿瘤抑制作用略有下降,低浓度时抑制作用增强。结论 PEG 化技术可运用于脂质体,对 DHAD 进行减毒增效改造,预期可降低药物不良反应。

关键词:盐酸米托蒽醌;聚乙二醇化脂质体;MTT 法;体外细胞药效

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2018.02.008

Preparation of mitoxantrone hydrochloride PEGylated liposomes and its in vitro antitumor effects on tumor cell A549

LING Yun¹, CHENG Ting², SONG Lihua²

(1. Jixi Food and Drug Administration, Jixi, Anhui 245300;

2. Anhui Anke Biotechnology (Group) Co., Ltd., Hefei, Anhui 230088, China)

通信作者:宋礼华,男,研究员,博士生导师,研究方向:生物制药和精准医疗,E-mail:songlh@ankebio.com

透细胞膜的内化作用。

综上所述,本研究依赖于生物信息学蛋白结构和跨膜蛋白结构的原理设计合成具有高效穿膜活性的 PTD 结构和 Cu/ZnSOD 融合表达,经过实验显示良好的穿膜特性,进一步提高了 PTD 分子的内化作用,为建立一种高效的 PTD 分子打下了良好的基础。而 PTD 能够携带生物大分子高效进入成活细胞的特性也预示着其广阔的应用前景,可以把 PTD 作为一种载体工具,携带缺少穿越细胞膜能力的生物大分子高效穿越细胞生物膜来发挥其生物活性,进行靶向治疗。

参考文献

- [1] 贾进明,濮翔科. PEP-1-SODI 融合蛋白的制备、表达及纯化[J]. 徐州医学院学报,2015,35(2):105-108.
- [2] ALAN HO, STEVEN R, SCHWARZE J, et al. Synthetic protein transduction domains: enhanced transduction potential in vitro and in vivo[J]. Cancer Research, 2001, 61(2):474-477.
- [3] 刘莲,余榕捷,戴云,等. 重组蛋白 PTD-HSP27 的制备及其穿细胞膜和角膜组织的功能研究[J]. 中国病理生理杂志,2015, 31(1):135-140.

- [4] VONK WI, WIJMEGA C, BERGER R, et al. Cu, Zn superoxide dismutase maturation and activity are regulated by COMMD1[J]. J Biol Chem, 2010, 285(37):28991-29000.
- [5] 王冠杰,赵娅娟,董济民. 脂质体和厚朴酚联合热疗对腺样囊性癌增殖的协同抑制作用[J]. 安徽医药, 2016, 20(7):1237-1240.
- [6] GREEN M, LOEWENSTEIN PM. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat transactivator protein[J]. Cell, 1988, 55(6):1179-1188.
- [7] FRANKEL AD, PABO CO. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus[J]. Cell, 1988, 55(6):1189-1193.
- [8] YU C, WANG P, LI S, et al. The protective effect of Cu/Zn-SOD against oxidative stress after PTEN deletion[J]. Cancer Invest, 2011, 29(4):253-256.
- [9] HUANG C, DU R, ZHANG P, et al. Expression, purification, and functional characterization of recombinant PTD-SARA[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2011, 43(2):110-117.
- [10] LIU J, HOU J, XIA ZY, et al. Recombinant PTD-Cu/Zn SOD attenuates hypoxia-reoxygenation injury in cardiomyocytes[J]. Free Radic Res, 2013, 47(5):386-393.
- [11] YOON JS, JUNG YT, HONG SK, et al. Characteristics of HIV-Tat protein transduction domain[J]. J Microbiol, 2004, 42(4):328-335.

(收稿日期:2016-12-20,修回日期:2017-01-17)

Abstract: Objective To study the preparation of mitoxantrone hydrochloride PEGylated Liposomes (DHAD-PEG-L) and its *in vitro* antitumor effects. Compared the differences of *in vitro* antitumor effects of DHAD-PEG-L and conventional preparations (DHAD). **Methods** DHAD-PEG-L was prepared by ammonium sulfate ion gradient technique. Observed the antitumor effects of DHAD-PEG-L and DHAD with the model of non-small cell lung cancer cell A549 by MTT method. IC_{50} value was determined after interaction with cancer cell for 48 h. Compared the antitumor difference of those two preparations by ANOVA statistical method. **Results** The IC_{50} value in A549 were $(1.561 \pm 0.09) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $(0.862 \pm 0.02) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. After encapsulated in liposomes, the drug antitumor effects decreased when used in high concentration, but increased while used in low concentration. **Conclusion** Preliminary results suggest that PEGylated liposomes could be chosen for the preparation modification of mitoxantrone hydrochloride to reduce ADR.

Keywords: mitoxantrone hydrochloride; PEGylated liposomes; MTT method; *in vitro* effect

盐酸米托蒽醌 (Mitoxantrone, DHAD) 是一种具有蒽环结构的广谱抗肿瘤抗生素, 通过其自身化学结构的“嵌插”机制, 可阻断肿瘤细胞 DNA 的合成、转录, 对多种临床常见的肿瘤细胞有明确疗效^[1-3]。但该药具有较明显的骨髓抑制、心脏毒性及白细胞减少等不良反应^[4-5]。将抗肿瘤药物制备成脂质体, 可改变药物的分布性质, 从而实现药物动力学的优化, 减少不良反应^[6]。在制备脂质体时, 通过添加聚乙二醇 (PEG) 磷脂, 将高分子材料嵌插入脂质体结构从而改变脂质体表面性质, 可显著提高脂质体的稳定性, 延长血循环时间提高药物作用效果。随着研究的不断深入, PEG 修饰技术与包封药物的释放性能之间的关系、是否会对释药造成负面影响, 目前研究观点仍未达成一致意见^[7-8]。为探索 PEG 化修饰对脂质体制剂细胞毒作用的影响, 本课题制备了 DHAD PEG 化脂质体 (DHAD-PEG-L), 以 DHAD 水溶液模拟常规 DHAD 制剂为参比、以人非小细胞肺癌 A549 细胞为模型开展细胞药效学试验, 从而明确 DHAD 减毒增效的改造方向, 以期提高药物化疗效果, 减少不良反应, 提高患者生存质量。

1 材料与方法

1.1 仪器 细胞培养箱 (2123-TC, SHEL-LAB); 倒置显微镜 (OLYMPUS); 光吸收读板机 (Molecular Devices); 超净工作台 (苏净); 冷冻离心机 (BECKMAN); 细胞培养瓶、96 孔培养板 (Costar); Sephadex G-25 葡聚糖凝胶柱 (Pharmacia); 高效液相色谱 (Waters); 紫外检测仪 (上海琪特); Nano ZS 粒度分析仪 (Malvern)。

1.2 试剂 DHAD 原料药 (湖北健源化工, 纯度 > 99%); PEG 化空白脂质体由安徽安科生物工程股份有限公司协助制备 (成分规格: 氢化磷脂 $8.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、PEG 磷脂 $2.95 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、胆固醇 $2.95 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$); RPMI 1640 培养基、小牛血清及胰蛋白酶 (Gibco); MTT (Solarbio); L-谷氨酰胺、Triton100、丙酮酸钠、二甲亚砜 (DMSO) 均购自国药集团有限公司 (分析

纯)。

1.3 细胞 A549 人非小细胞肺癌细胞株 (由安徽安科生物工程股份有限公司提供)。

1.4 方法

1.4.1 主动载药法制备脂质体药物 移取适量空白 PEG 化脂质体至透析袋, 置 1 000 倍体积的生理盐水中透析 10 h, 置换 PEG 脂质体外相液, 并以 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液调节外相 pH 值至 7.4 附近。精密移取 4.5 mL 空白 PEG 脂质体和 0.5 mL DHAD 溶液 ($10.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 至试管中混匀, 60 °C 恒温水浴孵育 30 min, 即得载药 PEG 化脂质体 DHAD-PEG-L。

1.4.2 载药脂质体的理化表征 粒径和 Zeta 电位: 以适量生理盐水对 DHAD-PEG-L 进行稀释后, 使用粒度电位分析仪进行测定, 计算平均粒径、电位和粒径分布。包封率: 使用 Sephadex G-25 葡聚糖凝胶柱洗脱脂质体溶液, 流动相为生理盐水, 洗脱速度 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 收集脂质体峰, 以 Triton-100 溶解破坏脂质体膜后使用 HPLC 以标准曲线法测定包封药物的含量, 参照以下公式计算包封率^[9]。

包封率 = $\frac{\text{柱层析后脂质体系统中包封的药量}}{\text{柱层析前系统中包封和未包封的药物总量}} \times 100\%$

1.4.3 细胞复苏及培养 A549 细胞以 37 °C 温水融化复苏, 以 $1\,000 \sim 2\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速离心 3 ~ 5 min。小心吸去上清液, 加入 1.0 mL 预热的细胞培养液, 将细胞吹散后转移至培养瓶。补充 RPMI 1640 培养基 4.0 mL, 并添加 10 % 的小牛血清。置于培养箱中 37 °C 常规培养 (CO_2 浓度 5%)。A549 细胞消化传代频率为 1 次/周, 换液间隔为 3 d。

1.4.4 细胞增殖抑制试验 取对数生长期的 A549 细胞, 用 RPMI 1640 培养基配制单细胞悬液 (每毫升细胞个数 1.0×10^5 个), 以每孔 100.0 μL 接种于 96 孔板, 37 °C 常规培养 (CO_2 浓度 5%) 4 h。实验设 3 组: 分别将 DHAD-PEG-L、DHAD 溶液和空白脂质体稀释成 250、25、2.5、0.25、0.025、0.002 5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 共 6 个梯度浓度作为制剂测试组。其中, 空白脂质体的稀释方法以 4.5 mL 空白 PEG 脂质体加入

0.5 mL 生理盐水溶液的混合物为原液,参照含药组进行同倍数稀释。DHAD-PEG-L 每孔加药量为 100.0 μ L,另设置空白对照组(加入生理盐水与肿瘤细胞)和校零组(单纯培养基)。继续培养 48 h 后,每孔加入 5.0 g $\cdot$ L⁻¹的 MTT 溶液 20.0 μ L,震荡混匀后继续培养 4 h 后以 2 000 r $\cdot$ min⁻¹转速离心 10 min,弃上清液,每孔加入 DMSO 150.0 μ L,震荡溶解结晶后以读板机进行光吸收扫描,设定波长 490 nm,记录数据并分析。

1.5 统计学方法 半数抑制浓度 IC₅₀值的计算:每组吸光度 A_{490 nm} 均值依以下公式求算细胞抑制率,并使用 SPSS 17.0 统计软件计算 IC₅₀值。

$$\text{细胞抑制率} = 1 - \left(\frac{\text{加药组 } A_{490 \text{ nm}} \text{ 值}}{\text{空白对照组 } A_{490 \text{ nm}} \text{ 值}} \right) \times 100\%$$

DHAD-PEG-L、DHAD 溶液和空白 PEG 脂质体在不同浓度下对 A549 细胞抑制作用的结果,使用 SPSS 17.0 软件进行数据处理。以单因素方差分析法对肿瘤细胞抑制作用进行组间比较,以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脂质体的理化性质 经粒度电位分析仪检测,本实验制备获得的 DHAD-PEG-L 平均粒径为 (103.6 $\pm$ 2.8) nm,平均 Zeta 电位为 (-12.2 $\pm$ 1.0) mV,粒径分布 D₁₀ 平均值为 (38.2 $\pm$ 1.1) nm, D₅₀ 平均值为 (79.6 $\pm$ 2.5) nm, D₉₀ 平均值为 (160.7 $\pm$ 3.1) nm。各批次 DHAD-PEG-L 的粒径、粒径分布和 Zeta 电位检测结果如表 1 所示。

上述 DHAD-PEG-L 经柱层析、表面活性剂破膜处理后通过 HPLC 进行定量分析,计算获得 3 批次 DHAD-PEG-L 的包封率分别为 (95.2 $\pm$ 2.4)%、(94.3 $\pm$ 1.6)% 和 (95.8 $\pm$ 1.8)%,平均包封率为 (95.1 $\pm$ 1.9)%。

表 1 DHAD-PEG-L 的粒径参数及 Zeta 电位/ $\bar{x} \pm s$

表征项目	测定值		
	批次一	批次二	批次三
粒径/nm	102.5 $\pm$ 2.7	97.5 $\pm$ 3.5	110.7 $\pm$ 2.1
Zeta 电位/mV	-12.9 $\pm$ 0.8	-12.0 $\pm$ 1.1	-11.7 $\pm$ 1.0
D ₁₀ /nm	38.6 $\pm$ 1.3	39.6 $\pm$ 1.0	36.5 $\pm$ 0.9
D ₅₀ /nm	77.5 $\pm$ 2.3	81.3 $\pm$ 2.1	79.8 $\pm$ 2.9
D ₉₀ /nm	160.8 $\pm$ 3.5	158.2 $\pm$ 2.6	163.0 $\pm$ 3.0

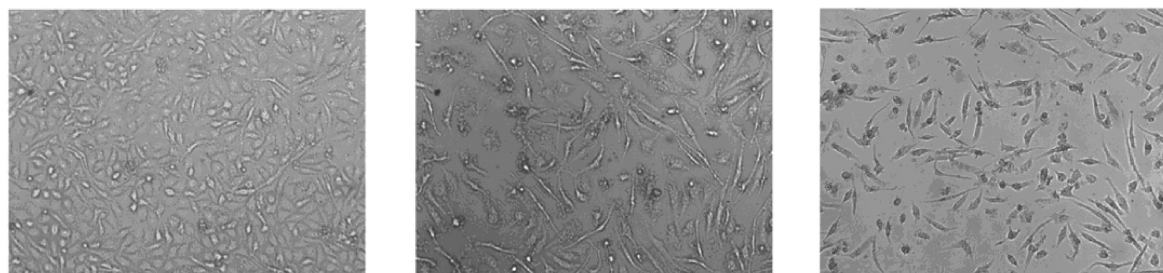
2.2 IC₅₀ 值 DHAD-PEG-L、DHAD 溶液对 A549 细胞作用 48 h 后的 IC₅₀ 值分别为 (1.561 $\pm$ 0.09)、(0.862 $\pm$ 0.02)。

2.3 肿瘤细胞抑制作用的差异性 经方差分析,各组的制剂类型因素和浓度因素有交互效应 ($F = 13\,770.736$ 、 $P < 0.001$),说明不同制剂对 A549 细胞的抑制作用随浓度变化而变化。三组制剂在不同浓度时细胞抑制率的组间比较采用单因素方差分析法,结果显示 DHAD-PEG-L 组、DHAD 溶液组各浓度的细胞抑制率差异有统计学意义,表明两种含药制剂均能抑制 A549 细胞增殖 ($F_{\text{PEG}} = 26\,754.289$ 、 $P_{\text{PEG}} < 0.001$; $F_{\text{DHAD}} = 16\,753.559$ 、 $P_{\text{DHAD}} < 0.001$);空白脂质体组各浓度间差异无统计学意义 ($F_{\text{空白脂质体}} = 0.929$ 、 $P_{\text{空白脂质体}} = 0.496$),推断空白脂质体对 A549 细胞增殖没有抑制作用。在相同浓度条件下,不同制剂组细胞抑制率的组间比较采用单因素方法分析后进行两两比较,结果均差异有统计学意义。其中,当药物浓度范围在 0.002 5 ~ 0.25 mg $\cdot$ L⁻¹时,DHAD-PEG-L 的细胞抑制作用显著强于 DHAD 溶液;当浓度在 2.5 ~ 250 mg $\cdot$ L⁻¹时,DHAD-PEG-L 的细胞抑制作用显著弱于 DHAD 溶液。见表 2。

表 2 不同浓度的 DHAD-PEG-L、DHAD 溶液和空白脂质体对 A549 细胞的抑制作用/ $\bar{x} \pm s$

组别	细胞抑制率/%						F_1 值	P_1 值
	0.002 5 mg $\cdot$ L ⁻¹	0.025 mg $\cdot$ L ⁻¹	0.25 mg $\cdot$ L ⁻¹	2.5 mg $\cdot$ L ⁻¹	25 mg $\cdot$ L ⁻¹	250 mg $\cdot$ L ⁻¹		
DHAD-PEG-L	5.53 $\pm$ 0.37	13.86 $\pm$ 0.24	30.06 $\pm$ 0.28	67.92 $\pm$ 0.29	74.29 $\pm$ 0.46	82.32 $\pm$ 0.41	26 754.289	<0.001
DHAD 溶液	1.57 $\pm$ 0.44	11.17 $\pm$ 0.19	28.15 $\pm$ 0.89	76.65 $\pm$ 0.76	85.47 $\pm$ 0.31	93.37 $\pm$ 0.28	16 753.559	<0.001
空白脂质体	1.50 $\pm$ 0.24	1.77 $\pm$ 0.19	1.58 $\pm$ 0.26	1.71 $\pm$ 0.22	1.72 $\pm$ 0.17	1.79 $\pm$ 0.10	0.929	0.496
F_2 值	190.875	1 274.234	2 530.260	16 406.715	56 321.538	62 181.218		
P_2 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001		

注: F_1 、 P_1 值为同一制剂类型因素下不同浓度组间方差分析的检验统计量和概率值; F_2 、 P_2 值为同一浓度因素下不同制剂组间方差分析的检验统计量和概率值。



空白脂质体

DHAD 溶液

DHAD-PEG-L

图1 两种制剂对 A549 细胞增殖抑制作用的显微成像图(浓度 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

通过显微成像图可以直观看出,当药物浓度为 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,经 DHAD-PEG-L 作用的 A549 细胞凋亡明显,PEG 修饰脂质体的优势开始展现。见图 1。

3 讨论

鉴于临床上以 DHAD 治疗人非小细胞肺癌应用较为常见,本研究选择 A549 细胞和 MTT 法开展细胞抑制实验研究,方法简捷、可靠性高。值得注意的是,MTT 法的常用扫描波段 $540 \sim 595 \text{ nm}$ 会与 DHAD 吸收波长范围($500 \sim 700 \text{ nm}$)发生干扰,因此本研究选择 490 nm 波长作为折中^[10-11],实验取得良好效果。

研究表明,与高浓度药物组($\geq 2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)相比较时,PEG 脂质体药物并未体现药效学优势,癌细胞的抑制作用反比常规制剂低,这可能与 PEG 脂质体表面的毛线团状分子屏障有关,降低了肿瘤细胞与药物的直接接触和摄取。当药物浓度下降接近至常规用药血药浓度($\leq 0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)时,其细胞抑制作用开始优于常规制剂,其机制可能与脂质体包封高浓度药物,使药物局部浓度远高于普通溶液状态有关^[12],当载药 PEG 脂质体被细胞摄取或附着于表面进行局部释放时,可在肿瘤细胞局部形成高浓度作用区域,增强细胞抑制作用。这对于降低药物的全身血药浓度、实现靶向给药从而减少或减轻患者的不良反应有着重要意义。

脂质体制剂经 PEG 修饰后可获得更长的血循环时间达到病灶^[13]。本研究在理论上证实了注射相同剂量的 PEG 脂质体药物,相较于常规制剂,预期可使肿瘤部位获得更高的药物浓度,更好的抑制肿瘤生长,使患者耐受量增加,药物毒副作用下降,减少不良反应。然而,低浓度药物组的 PEG 脂质体对 A549 细胞总体抑制率不足 10%,这表明在今后的研究中,应当加大载药工艺和包封工艺的研究,并对细胞摄取机制进一步探索,优化脂质体膜材料

的成分组成和结构,增强药物在肿瘤细胞局部的毒性杀伤作用,从总体上优化肿瘤的治疗效果。

参考文献

- [1] 王志群,陈石,吕燕妮,等. 米托蒽醌与 B-DNA 相互作用的分子模拟[J]. 化学学报,2010,68(6):551-556.
- [2] 林庆志,邓伟国. 米托蒽醌联合阿糖胞苷或长春新碱疗法对急性白血病的临床疗效[J]. 福建医药杂志,2015,37(1):92-94.
- [3] 艾一玖,王伟,葛星瑶,等. 中低剂量米托蒽醌治疗急性白血病的临床观察[J]. 吉林医药学院学报,2016,37(3):206-207.
- [4] 张晓丽,刘延方,谢新生,等. 米托蒽醌、托泊替康联合阿糖胞苷治疗成人难治复发急性白血病的临床疗效观察[J]. 中国现代医学杂志,2015,25(22):101-104.
- [5] 马军. 蒽环类药物心脏毒性的防治[J]. 中国处方药,2013,11(5):34-35.
- [6] 王冠杰,赵娅娟,董济民. 脂质体和厚朴酚联合热疗对腺样囊性癌增殖的协同抑制作用[J]. 安徽医药,2016,20(7):1237-1240.
- [7] 张迪,徐缓,胡美娜,等. 脂质体面临的聚乙二醇“窘境”及其解决方法[J]. 药科学报,2015,50(3):252-260.
- [8] 吴琼. 聚乙二醇修饰的多西他赛长循环脂质体的研究[D]. 广州:广州中医药大学,2013.
- [9] 凌云,戎隆富,孙彦华,等. 盐酸米托蒽醌聚乙二醇化脂质体的制备及包封率考察[J]. 现代生物医学进展,2012,12(34):6637-6642.
- [10] ZHONG M, MA X, SUN C, et al. MicroRNAs reduce tumor growth and contribute to enhance cytotoxicity induced by gefitinib in non-small cell lung cancer[J]. Chem Biol Interact, 2010, 184(3): 431-438.
- [11] RHO JK, CHOI YJ, LEE JK, et al. Epithelial to mesenchymal transition derived from repeated exposure to gefitinib determines the sensitivity to EGFR inhibitors in A549, a non-small cell lung cancer cell line[J]. Lung Cancer, 2009, 63(2): 219-226.
- [12] 谢雨礼,苏红. 抗肿瘤药物多柔比星脂质体[J]. 药学与临床研究, 2010, 18(2): 107-111.
- [13] 王立英,刘雨萌,吴丽艳,等. 藤黄酸长循环脂质体制备及药动学研究[J]. 中草药,2016,47(8):1309-1314.

(收稿日期:2016-10-19,修回日期:2016-12-31)