

乳糖化-去甲斑蝥素磷脂复合物 pH 敏感型脂质体肝靶向抗肿瘤活性研究

周 奕*, 叶建林

南京医科大学附属无锡市人民医院儿童医院, 江苏 无锡 214023

摘要: 目的 考察乳糖化-去甲斑蝥素磷脂复合物 pH 敏感型脂质体 (pH-LPC-lips) 的体内外抑瘤作用, 及其在小鼠体内的肝脏靶向性。方法 以空白脂质体 (blank-lips、blank-pH-lips) 为对照, MTT 法考察乳糖化-去甲斑蝥素 (Lac-NCTD) 和 2 种载药脂质体 (Lac-lips、pH-LPC-lips) 对人体肝癌细胞 HepG2 的细胞毒作用。采用 HPLC 法评价 HepG2 细胞对 Lac-NCTD 及其脂质体的摄取过程。建立 H22 肝癌细胞小鼠荷瘤模型考察脂质体在体内抗肿瘤活性。用 Cy-7 标记羧甲基壳聚糖 (CMCT) 制备 Cy-7 荧光标记的 pH-LPC-lips, 通过小动物活体成像仪, 采集荧光信号, 考察该脂质体在小鼠体内的靶向性。结果 与 Lac-NCTD、Lac-lips 相比, pH-LPC-lips 在体外对肿瘤细胞 HepG2 的亲性和性更好, 细胞毒作用更显著。体内抑瘤实验表明, pH-LPC-lips 可以更好地抑制 H22 肿瘤的生长。pH-LPC-lips 可以靶向聚积在小鼠肝脏和肿瘤部位, 有很好的靶向作用, 从而减小药物毒副作用, 提高抗肿瘤效果。结论 优化的 pH-LPC-lips 可以在呈弱酸性的肿瘤部位主动释药, 并对肝脏和肿瘤部位具有靶向性, 从而表现出更好的抗肿瘤作用。

关键词: 乳糖化-去甲斑蝥素; pH 敏感型脂质体; 磷脂复合物; 抗肿瘤活性; 肝靶向性

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2014)19 - 2803 - 06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.19.014

Liver targeting anti-tumor activity of pH-sensitive liposomes loaded with lactosyl-norcantharitin phospholipids complex

ZHOU Yi, YE Jian-lin

The Children's Hospital of Wuxi People's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi 214023, China

Abstract: Objective To investigate the antitumor activity of pH-sensitive liposomes (pH-LPC-lips) loaded with lactosyl-norcantharitin (Lac-NCTD) phospholipids complex *in vitro* and *in vivo*, and the liver targeting in mice. **Methods** Using blank liposomes (blank-lips and blank-pH-lips) as control, the MTT assay was used to study the cytotoxic effects of Lac-NCTD and its liposomes (Lac-lips and pH-LPC-lips) on human hepatoma carcinoma cells HepG2. HPLC assay was used to evaluate the uptake of Lac-NCTD and its liposomes in HepG2. *In vivo* antitumor activity of Lac-NCTD and its liposomes were evaluated in mice bearing H22 liver tumors. The hepatocyte specificity of near-infrared fluorescence dye (Cy7)-labeled pH-LPC-lips in H22 tumor-bearing mice was monitored through NIR fluorescence real-time tumor imaging instrument. **Results** The pH-LPC-lips demonstrated stronger cytotoxicity against tumor cells HepG2 and easily permeated the cell membrane, compared with Lac-NCTD and Lac-lips. The results of antitumor activity *in vivo* showed that pH-LPC-lips displayed best tumor inhibitory effect. The optical imaging results indicated that Cy7-labeled pH-LPC-lips showed excellent hepatocyte specificity in H22 tumor-bearing mice, which could reduced the side effect, and increased the antitumor activity. **Conclusion** The pH-LPC-lips could take the initiative to release at the tumor site and showed the liver-targeting. As a result, the preparation could be regarded as novel liver-targeting agent which has better antitumor effect.

Key words: lactosyl-norcantharidin; pH-sensitive liposomes; phospholipids complex; antitumor activity; liver targeting

乳糖化-去甲斑蝥素 (lactosyl-norcantharidin, Lac-NCTD) 是抗肿瘤药去甲斑蝥素 (norcantharidin, NCTD) 的衍生物, 研究表明, 其结构中的半乳糖残基能被体内肝细胞膜表面的去唾液酸糖蛋白受体

(asialoglycoprotein-receptor, ASGP-R) 特异性识别, 达到主动靶向作用^[1]。然而, Lac-NCTD 结构中有大量羟基存在, 极性很大, 大鼠尾 iv 给药后, 药物在体内分布速率快, 消除时间短, 不易蓄积, 不利

收稿日期: 2014-04-18

基金项目: 国家科技部“十一五”重大新药创制技术平台项目资助(2009ZX09310-001); 国家科技部科技型中小企业技术创新基金(07C26223201333); 江苏省“六大人才高峰”资助项目

*通信作者 周 奕 (1986—), 女, 硕士。Tel: 18762623161 E-mail: zhouyi860525@163.com

于药效的发挥^[2]。据多项研究报道, 药物磷脂复合物在改善药物脂溶性, 从而改变药物药动学性质方面有显著效果^[3-4]。将 Lac-NCTD 制备成药物磷脂复合物 (LPC), 大大提高了其在脂质给药系统中的封装率, 通过羧甲基壳聚糖 (CMCT) 与脂质体表面的静电吸附作用, 使 CMCT 吸附在脂质体表面, 从而使脂质体具有 pH 敏感性^[5]。

本实验以人源性肝肿瘤细胞株 HepG2 为体外肿瘤模型, 采用噻唑蓝 (MTT) 比色法研究 Lac-NCTD、空白脂质体 (blank-lips)、空白 pH 敏感型脂质体 (blank-pH-lips) 及 Lac-NCTD 脂质体 (Lac-lips) 和 Lac-NCTD 磷脂复合物 pH 敏感型脂质体 (pH-LPC-lips) 对该肿瘤细胞的毒性, 并采用 HPLC 法测定该细胞对这 5 种处方的摄取率, 考察脂质体的体外抗肿瘤活性及体外肿瘤靶向性。为进一步验证 Lac-NCTD 及其脂质体的药效学特征, 通过建立 H22 荷瘤小鼠为考察体内抗肿瘤活性的动物模型, 考察 Lac-NCTD 及其脂质体在小鼠体内的抗肿瘤活性。同时, 基于小动物活体成像技术具有快速检测、灵敏度高, 可整体直观地观察药物在动物体内靶向性的特点^[6-8], 本实验用水溶性荧光染料 Cy7 标记 CMCT, 制备 Cy7 标记的 pH-LPC-lips, 对 H22 荷瘤小鼠口服给药, 通过小动物活体成像仪, 观察脂质体在小鼠体内的靶向过程。

1 材料

1.1 药物与试剂

Lac-NCTD (质量分数为 98.43%^[9])、LPC、Lac-lips、pH-LPC-lips 均由苏州大学药学院药剂学教研室制备; RPMI 1640 培养基 (Gibco 公司); 小牛血清 (FBS, 长春西诺生物科技有限公司); 胰蛋白酶 (1:250, 上海沃凯凯生物技术有限公司); 噻唑蓝 (MTT) (Sigma 公司); 大豆磷脂 PC90 (批号 0903S01, 上海爱康精细化工有限公司); 胆固醇 (批号 F20091021, 国药集团化学试剂有限公司); CMCT (批号 S10050631, 浙江金壳生物化学有限公司); 荧光染料 Cy7 (上海宝曼生物科技有限公司); 氯仿、乙醚等均为分析纯。

1.2 细胞及动物

人源性肝肿瘤细胞株 HepG2 (苏州大学免疫教研室提供); 鼠源性肝肿瘤细胞株 H22 (苏州大学药理教研室提供)。均在含有 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液 (5% CO₂、37 °C 细胞培养箱) 中培养, 取对数生长期细胞进行实验。

昆明种小鼠 100 只, 体质量 18~22 g, 雄性, 清洁级, 由苏州大学实验动物中心提供; C57BL/6 裸鼠, 体质量 18~22 g, 雄性, SPF 级, 由苏州大学实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号 XCYK (苏) 2002-2008, 实验动物使用许可证号 SYXK (苏) 2002-037。

1.3 仪器

ME2155 分析天平 (德国 Staroriorious 公司); ELx 808 酶联免疫检测仪 (英国 BioTek 公司); HF151 UV CO₂ 细胞培养箱 (香港 Heal Force 公司); LC-10A 高效液相色谱系统 (SPD-M10A 紫外检测器, SCL-10A 系统控制器, CTO-10AS 恒温箱, CR-10A 数据处理机) (日本岛津公司); Hypersil ODS-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm, Thermo 公司); 85-2A 型恒温磁力搅拌器 (江苏富华仪器公司); PB203-N 电子天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司); TG1502 游标卡尺 (150 mm, 精度 0.02 mm, 国产); ML11 生物显微镜 (Olympus 公司); *In vivo*-FX Pro (美国 Kodak 公司)。

2 方法

2.1 pH-LPC-lips 的制备

依据文献方法^[5]制备, 即精密称取磷脂 40 mg, 胆固醇 10 mg, Lac-NCTD 磷脂复合物 4 mg 溶于 40 mL 三氯甲烷中, 加入 pH 为 6.6 的 PBS 10 mL, 50 °C 水浴, 搅拌 2 h, 旋转蒸发至胶状, 减压 15 min, 除去有机溶剂, 用缓冲液洗脱胶状物, 移至水浴乳化池中, 水化 2 h, 探头式超声整粒 30 次, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 得 Lac-NCTD 磷脂复合物脂质体悬液, 向其中加入 0.02% 的 CMCT 溶液 2 mL, 水合 0.5 h, 即得。

2.2 细胞毒性检测

Lac-NCTD 及 4 种脂质体 (blank-lips、blank-pH-lips、Lac-lips、pH-LPC-lips) 对 HepG2 细胞株的细胞毒性采用 MTT 比色法测定。取处于对数生长期的 HepG2 细胞于 96 孔板中, 每孔 1×10⁴ 个细胞, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h, 更换培养基为含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基, 并分别加入 Lac-NCTD、blank-lips、blank-pH-lips、Lac-lips、pH-LPC-lips 不同梯度浓度 (磷脂/Lac-NCTD 浓度分别为 0.011 0/0.004 8、0.055 0/0.024 0、0.275 0/0.120 0、1.375 0/0.600 0、6.875 0/3.000 0 μmol/mL) 的试药溶液, 不含试药孔作阴性对照, 培养液作调零孔, 继续培养 24 h。实验终止前, 加入 5 mg/mL MTT 溶液 20 μL, 继续孵育 4 h。终止培养, 移取上层液体,

PBS 溶液冲洗 3 次。每孔加入 DMSO 100 μL ，置摇床低速振荡 15 min，使蓝紫色结晶充分溶解，用酶联免疫检测仪测各孔的吸光度 (A) 值，选定波长为 570 nm。计算药物对 HepG2 细胞的生长抑制率 (IR)。

$$\text{IR}=1-A_{\text{药物}}/A_{\text{对照}}$$

2.3 细胞摄取实验

将 HepG2 细胞培养于 6 孔板中，每孔 1×10^6 个细胞，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。更换培养基为含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基，并加入 Lac-NCTD 溶液、Lac-lips 及 pH-LPC-lips (使 Lac-NCTD 终质量浓度为 247.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，继续于培养箱中培养，分别于 20、60、180 min 移去培养基，适量 PBS 溶液冲洗 2 次，刮取细胞并使其分散于适量 PBS 溶液中。按下述方法处理细胞液，进样，得细胞摄取药物浓度。细胞中蛋白定量通过考马斯亮蓝法测定。

2.4 细胞中 Lac-NCTD 的定量分析

2.4.1 专属性考察 将培养于 6 孔板中处于对数生长期的 HepG2 细胞刮取下来，并用 PBS 溶液冲洗，将细胞匀浆，得空白细胞液。在空白细胞液中加入 Lac-NCTD 溶液，高速涡旋 2 min，15 000 r/min 超速离心 15 min，取上清液，过 0.45 μm 微孔滤膜，取 20 μL ，按文献报道色谱条件进样^[5]，Lac-NCTD 的保留时间约 5.2 min，样品峰未受杂质峰的干扰，方法专属性良好。

2.4.2 线性范围 精密称取 10 mg Lac-NCTD 对照品于 10 mL 量瓶，PBS 溶液定容，并稀释不同倍数，得系列质量浓度的 Lac-NCTD 对照品溶液。按上述方法制备空白细胞液，分别在空白细胞液中加入不同质量浓度的对照品溶液，按“2.4.1”项下方法处理生物样品，以峰面积对药物质量浓度作图，得线性方程为 $Y=4\ 987+3\ 672.8 X$ ，线性范围为 0.05~50.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($R^2=0.999\ 3$)，线性关系良好。

2.4.3 回收率和精密度 在空白细胞液中分别加入已知质量浓度的对照品溶液，配制高、中、低 3 个质量浓度的供试液，按“2.4.1”项下方法处理样品，HPLC 法测定，得平均回收率为 (98.26 \pm 3.13)%；1 日内各质量浓度供试液重复测定 3 次，连续测定 3 d，得日内精密度 RSD 为 2.65%，日间精密度 RSD 为 3.08%。

2.5 体内抗肿瘤活性实验

将 H22 细胞于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中

培养 3 d，以生理盐水调整细胞浓度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$ ，用无菌注射器注射入小鼠腹腔，连续传代培养。7 d 后将小鼠颈椎脱臼处死，于 75% 乙醇中浸泡 15 min，取出，切开腹部皮肤，用无菌注射器刺入腹腔，抽出乳白色腹水，用生理盐水调整细胞浓度至 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 。于每只小鼠右腋下 sc 10 mL/kg。将接种后的小鼠随机分为 9 组，即生理盐水组，NCTD (2.0 mg/kg) 组，Lac-NCTD (6.6 mg/kg) 组，Lac-lips 高、中、低剂量 (13.2、6.6、3.3 mg/kg) 组及 pH-LPC-lips 高、中、低剂量 (13.2、6.6、3.3 mg/kg) 组，每组 10 只。于接种后第 2 天，ip 给药，每日 1 次，连续 10 d。同时，每日给小鼠称体质量，并用游标卡尺测量肿瘤体积 ($V=\text{长径} \times \text{宽径}^2/2$)。10 d 后处死各组小鼠，小心剥离腋下肿瘤并称质量。计算各组抑瘤率 (IR_t)。以各组小鼠每日肿瘤平均体积为纵坐标，受试时间为横坐标，绘制肿瘤生长曲线。

$$\text{IR}_t=1-\text{给药组小鼠肿瘤质量}/\text{生理盐水组小鼠肿瘤质量}$$

2.6 Cy-7 荧光标记脂质体在小鼠体内的近红外荧光成像

2.6.1 Cy-7 荧光标记脂质体的制备 取 1 mg CMCT 溶于 pH 9.16 碳酸盐缓冲液中，逐滴加入 50 μL 1 mg/mL Cy7 溶液，避光，于室温条件下磁力搅拌 12 h。反应终止后，将溶液转移至透析袋 (截留相对分子质量为 3 000) 中，蒸馏水透析 3 d，直至透析袋外液体中无荧光 ($\lambda_{\text{ex}}=747\ \text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=774\ \text{nm}$) 检出。将透析液避光冷冻干燥，即得 Cy-7 标记的 CMCT。按文献中 pH-LPC-lips 制备方法^[5]，加入 Cy-7 标记的 CMCT，即得 Cy-7 荧光标记的 pH-LPC-lips (Cy7-pH-LPC-lips)。

2.6.2 荧光成像实验 按“2.5”项下方法，将 $2 \times 10^6/\text{mL}$ 的 H22 细胞 sc 于裸鼠右腋下，待肿瘤体积增至 (100 \pm 20) mm^3 时，裸鼠 ig 给药 20 mL/kg Cy7-pH-LPC-lips。给药后，将裸鼠 ip 4% 水合氯醛 10 mL/kg 麻醉，置于荧光活体成像系统内对其扫描成像。采集参数如下：激发波长 747 nm，发射波长 774 nm，温度 36.5 $^{\circ}\text{C}$ ，曝光时间 30 s。记录给药后不同时间点的成像图。

2.7 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 16 统计程序进行单因素方差分析，组间比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 脂质体性质

所制得 pH-LPC-lips 的平均粒径为 (47.18 \pm

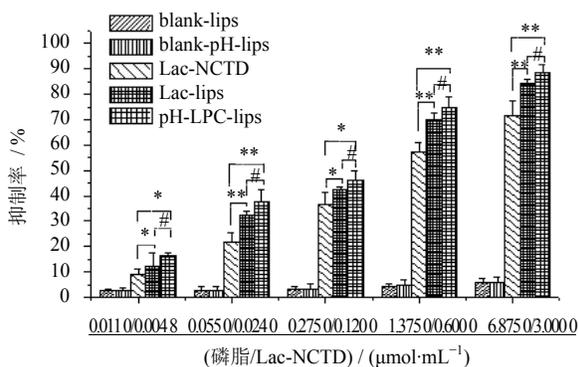
4.16) nm, 包封率为 (70.00±1.30) %。

3.2 脂质体对肝肿瘤细胞的毒性

采用直线回归法推算 Lac-NCTD、Lac-lips 及 pH-LPC-lips 对 HepG2 细胞的 IC₅₀ 分别为 0.351、0.140、0.094 μmol/mL。从图 1 中可以看出, Lac-NCTD 及其脂质体对 HepG2 细胞有显著的抑制作用, 并且该抑制作用随着处方中 Lac-NCTD 浓度的增加而增强, 呈现剂量相关性。而 Lac-NCTD 与其脂质体对细胞的抑制作用差异有显著性, 其中, pH-LPC-lips 表现出最强的抑制效果, 其次是 Lac-lips。Lac-NCTD 制备成脂质体后, 脂质体通过与细胞膜良好的亲和力, 通过膜间转运、胞吞等作用进入细胞, 释放出药物, 因此表现出比游离于细胞外的 Lac-NCTD 更好的细胞毒性。与 Lac-lips 相比, 由 pH 敏感性引起的脂质体主动释药显著提高了细胞中 Lac-NCTD 的初始浓度, 从而提高了其细胞毒性。实验中发现, 2 种空白脂质体对 HepG2 细胞也有微弱的抑制作用, 但该抑制作用不随脂质体中磷脂量的变化而变化。2 种载药脂质体的细胞毒性都分别大于 Lac-NCTD 与相应的空白脂质体的细胞毒性的和, 表明药物与剂型的结合对细胞毒性有协同增效作用而非简单的加和作用。

3.3 肝肿瘤细胞对脂质体的摄入

从图 2 中可以看出, HepG2 细胞摄取药物的量随着时间延长而增加; 相同时间下, pH-LPC-lips 中被 HepG2 细胞摄取的药物量明显高于 Lac-NCTD 溶液与 Lac-lips。可能由于脂质体



与 Lac-NCTD 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 Lac-lips 组比较: # $P < 0.05$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs Lac-NCTD group; # $P < 0.05$ vs Lac-lips group

图 1 不同浓度 Lac-NCTD 及 4 种脂质体对 HepG2 细胞的毒性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 *In vitro* cytotoxicity of Lac-NCTD at different concentration and four liposomes on HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

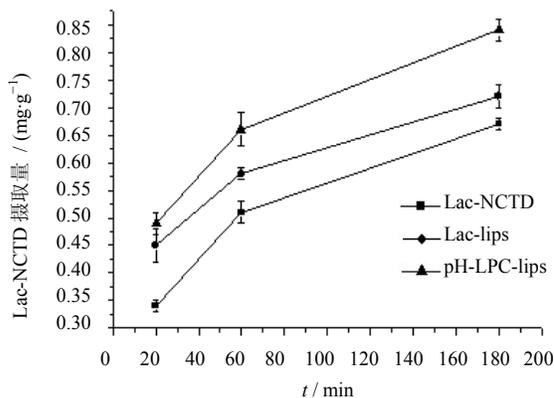


图 2 HepG2 细胞于不同时间对 Lac-NCTD 的摄取量
Fig. 2 Cellular uptake of Lac-NCTD in HepG2 cells at different incubation time

的亲脂性及其适当的粒径大小 (<100 nm), 更易透过细胞膜, 或通过细胞内吞作用、细胞裂隙进入细胞。同时, 由于 pH-LPC-lips 中 Lac-NCTD 以磷脂复合物形式存在, 比高水溶性的 Lac-NCTD 更易渗透入细胞, 因此更多的 Lac-NCTD 可以被细胞摄取。

3.4 脂质体在荷瘤小鼠体内的抗肿瘤活性

从图 3 中可知, 随着接种时间的延长, 生理盐水组、NCTD 组、Lac-NCTD 组、Lac-lips 中剂量组、pH-LPC-lips 中剂量组小鼠肿瘤体积都在增大, 前 3 d, 各组小鼠肿瘤体积差异未见显著性, 从第 4 天开始, 各组肿瘤体积逐渐表现出差异性。NCTD 组、Lac-NCTD 组、Lac-lips 中剂量组、pH-LPC-lips 中剂量组均表现出了抑制肿瘤生长作用, 相同浓度下, NCTD 组与 Lac-NCTD 组抑瘤效果相似, 而

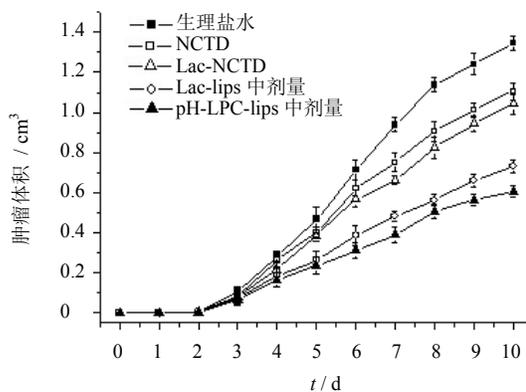


图 3 脂质体对 H22 荷瘤小鼠肿瘤生长抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Fig. 3 Inhibition of liposomes on tumor growth in H22 bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Lac-lips 中剂量组与 pH-LPC-lips 中剂量组抑瘤效果明显强于其他组, 并且 pH-LPC-lips 中剂量组在 5 组中表现出最强的抑瘤效果。

各组药物对小鼠 IR_t 结果见表 1, 由表中可以看

出, 与生理盐水组比较, 各给药组均表现出抑瘤效果, 其中, Lac-lips 与 pH-LPC-lips 抑瘤效果显著, 且 pH-LPC-lips 效果最强。2 种脂质体各浓度组的 IR_t 表现出统计学差异。

表 1 脂质体对 H22 荷瘤小鼠的抑瘤作用 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Inhibition of liposomes on tumor growth in H22-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	小鼠体质量 / g		瘤质量 / g	$IR_t / \%$
		实验前	实验后		
生理盐水	—	19.6±0.9	29.7±0.8	1.41±0.12	—
NCTD	2.0	19.8±1.1	30.2±1.3	0.97±0.09*	31.2
Lac-NCTD	6.6	19.5±0.7	29.6±0.6	0.87±0.13*	38.3 [#]
Lac-lips	3.3	20.9±0.9	29.0±0.7	0.98±0.08*	31.5
	6.6	19.9±0.9	29.1±1.3	0.62±0.05*	56.6 ^{##}
	13.2	20.5±1.5	29.0±1.0	0.33±0.05*	76.9 ^{###}
pH-LPC-lips	3.3	20.8±0.8	29.2±0.9	0.82±0.04*	42.7 ^{##}
	6.6	20.8±1.7	29.1±0.9	0.52±0.04*	63.6 ^{##}
	13.2	20.9±0.9	29.1±1.1	0.21±0.06*	85.3 ^{###}

与生理盐水组比较: * $P < 0.05$; 与 NCTD 组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$
* $P < 0.05$ vs normal saline group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs NCTD group

3.5 脂质体在荷瘤小鼠体内分布

荷瘤裸鼠 ig 给药 0.5 h 后, 于小鼠胃部检测到强烈、集中的荧光信号, 说明此时脂质体大量集中于胃部; 2 h 后脂质体在体内有小范围弥散, 胃部荧光强度减弱, 说明脂质体已通过胃肠道吸收入血, 进入体内分布过程; 24 h 后脂质体达到全身弥散, 胃部荧光强度进一步减弱; 在此 24 h 内, 小鼠体内荧光总强度逐渐减弱。在随后的 48 h 中, 脂质体逐渐由全身向小鼠肝脏与肿瘤部位集中, 因此肝脏与肿瘤部位的荧光强度逐渐增强并持续至 72 h。这一现象, 直观有力地证明了 pH-LPC-lips 在小鼠体内的靶向作用过程, 与小鼠体内抑瘤结果相吻合。

4 讨论

脂质体的双分子层结构与生物膜相似, 因此具有良好的组织相容性和细胞亲和力, 可以同细胞发生吸附、脂质交换、内吞/吞噬、膜融合、渗漏、扩散、磷酸酯酶消化等作用。通过考察 Lac-NCTD 及其脂质体对该细胞株的细胞毒性与亲和力, 发现制备的 pH-LPC-lips 表现出最强的抑制细胞生长作用, 也最易于为细胞摄取。

pH-Lac-Lips 体外药效实验所选取的模型细胞株是人体肝肿瘤细胞株 HepG2, 其与正常肝细胞都能在细胞表面表达去唾液酸糖蛋白受体 (asialoglycoprotein receptor, ASGP-R)^[10], 可以主

动识别 Lac-NCTD 中的半乳糖残基, 发挥 Lac-NCTD 的肝脏主动靶向作用^[11]。

pH-LPC-lips 体内显著的抗肿瘤活性, 是由靶向作用与主动释药作用结合产生的。由于制备的 pH-LPC-lips 粒径小于 100 nm, 其可以大量积累于肝脏部位与肿瘤部位, 肿瘤部位 pH 值低于正常组织, 使得 pH-LPC-lips 主动释药, 而其较高的包封率使得其可以从脂质体中释放出更多的 Lac-NCTD, 并被肿瘤表面的 ASGP-R 识别, 所以与 Lac-NCTD 溶液和低包封率的 Lac-lips 相比, pH-LPC-lips 中有更多的药物直接靶向于肿瘤部位, 使其更好地发挥抗肿瘤效果。

小动物活体成像技术操作简便、检测快速、结果直观、灵敏度高, 在考察药物在动物体内靶向性方面可以弥补常规需要处死动物、缺乏直观性、操作复杂等的缺点, 因此近年来逐渐地应用于药物制剂靶向性研究方面。用于荧光标记的染料亦可以在动物体内发出荧光信号, 据文献报道^[12-13], 荧光染料在裸鼠体内能维持 24~48 h 荧光信号, 远远低于经其标记的药物制剂所能维持的信号时间, 因此本实验中没有将单独的荧光染料 Cy7 对裸鼠给药作为动物体内靶向性研究的对照组。

pH-LPC-lips 的小鼠体内组织靶向性主要基于粒径小于 100 nm 的脂质体的被动靶向作用, 肿瘤

部位毛细血管通透性增加而淋巴组织发育不完全, 肿瘤内皮存在一些直径约 50 nm 的孔隙, 使得直径小于 50 nm 的脂质体很容易通过进入肿瘤内部。而由于肝脏表面的有孔血窦, 使得直径小于 100 nm 的脂质体易被肝实质细胞俘获, 另外由于 H22 肿瘤与肝脏表面都表达 ASGP-R, 更增强了药物的肝实质细胞靶向作用, 因此在肝脏与肿瘤部位检测到了集中的荧光信号。

参考文献

- [1] Bettinger T, Remy J S, Erbacher P. Size reduction of galactosylated PEI/DNA complexes improves lectin-mediated gene transfer into hepatocytes [J]. *Bioconjug Chem*, 1999, 10(4): 558-561.
- [2] 周奕, 望开鹏, 管敏, 等. 静脉注射乳糖化-去甲斑蝥素纳米粒在大鼠体内的药动学 [J]. *抗感染药学*, 2010, 7(2): 90-93.
- [3] 陶云海, 刘俊华, 杨祥良. 豆腐果苷磷脂复合物的制备及理化性质研究 [J]. *中国药学杂志*, 2006, 41(22): 1720-1723.
- [4] 李颖, 潘卫三, 陈士林, 等. 葛根素及其磷脂复合物在 Beagle 犬体内的药动学比较 [J]. *中草药*, 2006, 37(5): 695-697.
- [5] 周奕, 许静玉, 管敏, 等. 乳糖化-去甲斑蝥素磷脂复合物及其 pH 敏感型脂质体的制备 [J]. *中国新药杂志*, 2011, 20(17): 1631-1638.
- [6] Kim J H, Kim Y S, Park K, *et al.* Self-assembled glycol chitosan nanoparticles for the sustained and prolonged delivery of antiangiogenic small peptide drugs in cancer therapy [J]. *Biomaterials*, 2008, 29(12): 1920-1930.
- [7] Saravanakumar G, Min K H, Min D S, *et al.* Hydrotropic oligomer-conjugated glycol chitosan as a carrier of paclitaxel: Synthesis, characterization, and *in vivo* biodistribution [J]. *J Control Release*, 2009, 140(3): 210-217.
- [8] 胡光霞, 钱志余, 孙涛, 等. 基于功能近红外光谱 (fNIRS) 的帕金森病大鼠模型脑组织特性研究 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2010, 30(9): 2360-2364.
- [9] 胡展红, 章良, 张学农. 肝靶向去甲斑蝥素修饰物的合成及其纳米粒的制备 [J]. *中国药学杂志*, 2009, 44(9): 679-684.
- [10] Maitani Y, Kawano K, Yamada K, *et al.* Efficiency of liposomes surface-modified with soybean-derived sterylglucoside as a liver targeting carrier in HepG2 cells [J]. *J Control Release*, 2001, 75(3): 381-389.
- [11] 吴红兵, 邓意辉, 王绍宁, 等. 齐多夫定棕榈酸酯半乳糖化脂质体在小鼠体内的分布 [J]. *药学学报*, 2007, 42(5): 538-544.
- [12] Oh K S, Song J Y, Cho S H, *et al.* Paclitaxel-loaded Pluronic nanoparticles formed by a temperature-induced phase transition for cancer therapy [J]. *J Control Release*, 2010, 148(3): 344-350.
- [13] Kim K, Kim J H, Park H, *et al.* Tumor-homing multifunctional nanoparticles for cancer theragnosis: Simultaneous diagnosis, drug delivery, and therapeutic monitoring [J]. *J Control Release*, 2010, 146(2): 219-227.