

• 药剂与工艺 •

转铁蛋白/叶酸双重修饰的薏苡仁油-雷公藤红素微乳制备及其体外靶向抗肿瘤研究

郭梦斐^{1,2}, 瞿 鼎^{1,2}, 王理想^{1,2}, 黄萌萌^{1,2}, 刘聪燕^{1,2}, 刘玉萍^{1,2}, 陈 彦^{1,2*}

1. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 江苏 南京 210028

2. 江苏省中医药研究院 中药组与微生态研究中心, 江苏 南京 210028

摘要:目的 构建转铁蛋白(Tf)和叶酸(FA)双重修饰的薏苡仁油-雷公藤红素微乳(transferrin and folic acid modified coix seed oil-tripterine microemulsion, Tf/FA-CT-MEs), 提高其体外靶向抗肿瘤能力。方法 采用经典缩合法制备叶酸-聚乙二醇400(FA-PEG 400), 通过FT-IR与¹H-NMR进行结构表征, 并连同Tf共同作为靶配体; 以薏苡仁油为油相, 包埋难溶性抗肿瘤药物雷公藤红素, 水滴定法制备Tf/FA-CT-MEs等制剂并表征其理化性质; 以异硫氰酸荧光素(FITC)为荧光探针, 通过流式细胞仪定量比较MCF-7(Tf/FA受体双过表达)和A549(仅Tf受体过表达)细胞对微乳的摄取量。同时考察微乳抑制细胞增殖作用和诱导细胞凋亡的能力。结果 合成并表征了FA-PEG 400, 作为制剂靶配体制备了Tf/FA-CT-MEs等制剂; Tf/FA-CT-MEs外观圆整, 平均粒径为(52.52±0.11) nm, 多分散指数(PDI)为0.124±0.019, Zeta电位为(-21.50±1.70) mV, 且具有较好的体外稳定性。细胞实验表明, Tf/FA-CT-MEs对MCF-7细胞和A549细胞的半数抑制浓度(IC₅₀)分别为0.77、0.85 μmol/L; 4 h细胞摄取荧光强度分别为2 782.33±131.77、2 762.91±23.18; 诱导MCF-7细胞凋亡率为(70.60±6.92)%。结论 Tf/FA-CT-MEs在体外干预Tf/FA受体双过表达细胞系时, 体外靶向抗肿瘤作用明显增强, 此类双靶修饰策略为提高中药纳米制剂针对特定肿瘤细胞的靶向性研究提供依据。

关键词: 双靶修饰; 薏苡仁油; 微乳; 雷公藤红素; 转铁蛋白; 叶酸; 水滴定法; 抗肿瘤; MCF-7细胞; A549细胞; 经典缩合法; 异硫氰酸荧光素; 增殖; 细胞凋亡; 靶向

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)09-1748-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.09.009

Preparation and *in vitro* targeted antitumor effect of *Coicis Semen* oil-tripterine microemulsion co-modified with transferrin and folic acidGUO Meng-fei^{1,2}, QU Ding^{1,2}, WANG Li-xiang^{1,2}, HUANG Meng-meng^{1,2}, LIU Cong-yan^{1,2}, LIU Yu-ping^{1,2}, CHEN Yan^{1,2}

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Affiliated Hospital on Integration of Chinese and Western Medicine, Nanjing 210028, China

2. Multi-component of Traditional Chinese Medicine and Microecology Research Center, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

Abstract: Objective A transferrin and folic acid co-modified *Coicis Semen* oil-tripterine microemulsion (Tf/FA-CT-MEs) was developed to improve the tumor targeting and thereby enhance the *in vitro* antitumor efficacy. **Methods** FA-PEG 400 was synthesized by classic condensation and together with transferrin as targeting ligands. The structures were characterized by FT-IR and H-NMR. Tf/FA-CT-MEs were prepared by aqueous titration method using *Coicis Semen* oil as oil phase, followed by anchoring Tf on the surface of prepared particles mentioned-above in aqueous environment. The physiochemical properties and morphology were detected by

收稿日期: 2016-12-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81673606, 81373979, 81503264)

作者简介: 郭梦斐(1993—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药新型给药系统。Tel: (025)52362155 E-mail: gmfzjy@163.com

*通信作者 陈彦(1968—), 博士生导师, 研究方向为中药多组分纳米药物递送系统抗肿瘤研究。

Tel/Fax: (025)52362155 E-mail: ychen202@hotmail.com

dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM), respectively. The A549 and MCF-7 cellular uptake of various microemulsions was detected through employing fluorescein isothiocyanate (FITC) as a fluorescence probe. The *in vitro* antitumor efficacy of the microemulsions against A549 and MCF-7 cells were determined by MTT assay and cell apoptosis kit. **Results** FA-PEG 400 was synthesized and characterized as a target ligand. The Tf/FA-CT-MEs with spherical shape had a small droplet size (52.52 ± 0.11) nm, narrow polydispersion index (PDI, 0.124 ± 0.019), and negative Zeta potential (-21.50 ± 1.70) mV, respectively, with good *in vitro* stability. In *in vitro* antitumor efficacy, the half proliferation inhibitory concentration (IC_{50}) of Tf/FA-CT-MEs was $0.77 \mu\text{mol/L}$ on MCF-7 cell model and $0.85 \mu\text{mol/L}$ on A549 cell model. The cellular uptake results suggested that the fluorescence intensity of MCF-7 and A549 cells was $2\ 782.33 \pm 131.77$ and $2\ 762.91 \pm 23.18$ for 4 h, respectively. Besides, $(70.60 \pm 6.92)\%$ of MCF-7 cells were induced to apoptosis by Tf/FA-CT-MEs. **Conclusion** Tf/FA-CT-MEs could improve *in vitro* targeting and cytotoxicity toward MCF-7 cells. This study suggests that the modification with dual-targeted ligands could be a promising strategy for developing tumor-specific nanomedicines.

Key words: dual targeting modification; *Coicis Semen* oil; microemulsion; tripterine; transferrin; folic acid; water titration; antitumor; MCF-7 cells; A549 cells; classic condensation; fluorescein isothiocyanate; proliferation; cell apoptosis; targeting

雷公藤红素 (tripterine) 是雷公藤的主要药效成分之一, 具有较强的抗肿瘤活性^[1]。大量研究发现, 雷公藤红素对人乳腺癌 (MCF-7)、肺腺癌 (A549)、结肠癌 (HCT-8)、前列腺癌 (PC-3) 等肿瘤细胞均有显著的抑制作用^[2-6], 但是由于毒性大、体内分布选择性差, 极大地限制了其成药性, 不少学者尝试采用多种制剂学方法改变其成药性及毒性^[7-13]。薏苡仁油 (*Coicis Semen* oil) 是中药薏苡仁的主要抗肿瘤组分, 其市售制剂康莱特注射液在肝癌和肺癌的辅助治疗中已取得较好的疗效^[14]。然而, 雷公藤红素和薏苡仁油均为难溶性组分, 其口服生物利用度低、口服毒性等问题影响了其作为口服制剂的疗效的发挥。

本课题组长期致力于“多功能组分”中药微乳口服给药系统的研究, 即筛选一系列既具药理活性, 也拥有类辅料作用的中药组分直接构建递药系统^[15]。其中较为成功的设计是用薏苡仁油代替常规油相辅料制备出一系列的薏苡仁油微乳口服系统^[16], 研究表明这种策略极大地提高了系统的载药量, 显著地增强了细胞摄取活性组分能力, 明显地抑制了体内肿瘤的生长^[17-18]。因此, 本实验采用了此前的策略, 以薏苡仁油为油相和辅助抗肿瘤组分, 包埋难溶性抗肿瘤组分雷公藤红素, 在增溶后者的同时, 实现其增效减毒以及协同抗肿瘤效应^[16]。

肿瘤主动靶向配体修饰技术是提高纳米粒子识别和定位肿瘤细胞能力的常见手段^[19]。已有文献表明, 转铁蛋白 (transferrin, Tf) 或叶酸 (folic acid, FA) 修饰技术是目前进入或接近实际应用的纳米制剂中较为可靠、使用广泛的肿瘤靶向技术^[20-25], 但是, 单一靶配体的修饰易被体内某些酶或者外源性物质干扰, 影响寻靶效率, 而双靶配体修饰可以很

大程度提高微乳的肿瘤主动靶向能力, 且双靶修饰特别适用于二者受体双过表达系的肿瘤细胞 (譬如 MCF-7 细胞)^[26-27]。因此, 为提高微乳的靶向性, 进一步增强其抗肿瘤活性, 本实验制备了由 Tf 和 FA 双重修饰的薏苡仁油-雷公藤红素微乳 (Tf/FA-CT-MEs), 并对其进行体外抗肿瘤活性研究。

1 仪器与材料

8S-1 型磁力搅拌器, 江苏金坛市金城国胜实验仪器厂; MT-5 型百万分之一天平, 美国梅特勒-托利多公司; LGJ-12 真空冷冻干燥机, 北京松源华兴科技发展有限公司; THZ-82AHS 气浴恒温恒速振荡箱, 江苏金坛市金城国胜实验仪器厂; Nicolet IS-10 型傅里叶变换红外光谱 (FT-IR) 仪、HERA Cell 150 i CO₂ 培养箱, 美国赛默飞世尔科技公司; Bruker 500 MHz 核磁共振仪, 瑞士布鲁克公司; Agilent 1260 高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; Spectra Max190 全波长酶标仪, 美国热电集团; Nano-ZS 型马尔文激光散射粒径测定仪, 英国马尔文公司; JEM-2100 型透射电子显微镜, 日本 JEOL 公司; Milli-Q 超纯水系统, 美国 Millipore 公司。

雷公藤红素, 质量分数 $\geq 99\%$, 南京泽朗医药科技有限公司, 批号 ZL1508501Z; 薏苡仁油, 自制, 超临界萃取制得, 以总三酰甘油计质量分数为 86.67% ; 聚氧乙烯氢化蓖麻油 (Cremophor® RH 40), 德国 BASF 公司; 聚乙二醇 400 (PEG 400)、FA (批号 20140724)、*N,N'*-二环己基碳酰亚胺 (DCC), 国药集团化学试剂有限公司; 二甲基亚砜 (DMSO), Sigma-Aldrich 公司; Tf, 批号 15120715, 上海士锋生物科技有限公司; *N*-羟基丁二酰亚胺 (NHS)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺 (EDC)、异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate,

FITC), 梯希爱(上海)化成工业发展有限公司; 胎牛血清(FBS), 杭州四季青生物工程材料有限公司; RPMI 1640 培养基、胰蛋白酶溶液, Gibco 公司; 四甲基偶氮唑(MTT), 南京凯基生物科技发展有限公司; Annexin V-PE 细胞凋亡检测试剂盒, 美国 Millipore 公司。

人乳腺癌 MCF-7 细胞株、肺腺癌 A549 细胞株均购自中国科学院上海生命科学院生物化学与细胞生物学研究所。

2 方法与结果

2.1 叶酸-聚乙二醇 400 (FA-PEG 400) 的合成与表征^[28]

称取 FA 1.655 g (3.75 mmol) 置于反应瓶中, 加入 15 mL DMSO, 搅拌 2 h 后, 加入 1.525 g DCC (7.40 mmol) 和 932 mg NHS (8.10 mmol), 避光室温搅拌 24 h。加入 1.500 g PEG 400 (3.75 mmol), 避光室温搅拌。反应结束后将反应液与水按体积比 1:5 混合, 于布氏漏斗减压抽滤。滤液在流动水为透析介质的条件下, 置于透析袋 (M_w 1 000) 中避光透析 48 h, 收集透析液, 避光真空冷冻干燥得絮状粉末。

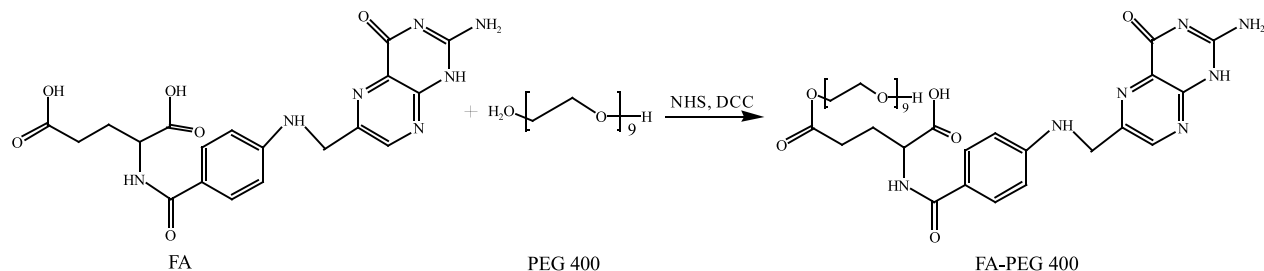


图 1 FA-PEG 400 的合成路线

Fig. 1 Synthetic route of FA-PEG 400

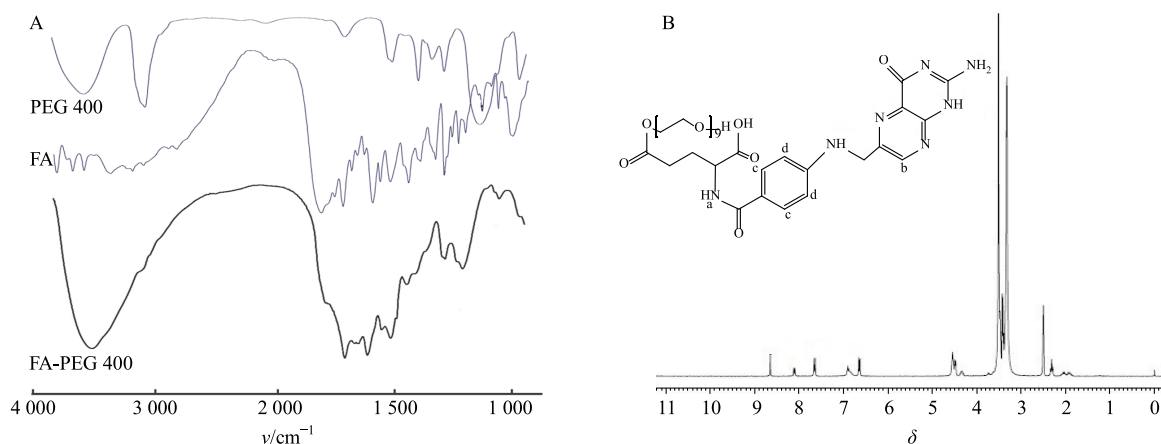


图 2 PEG 400、FA 和 FA-PEG 400 的 FT-IR (A) 及 FA-PEG 400 的 $^1\text{H-NMR}$ (B) 谱图

Fig. 2 FT-IR (A) of PEG 400, FA, and FA-PEG 400 and $^1\text{H-NMR}$ (B) of FA-PEG 400

FA-PEG 400 合成路线见图 1, 借助 FT-IR、 $^1\text{H-NMR}$ 等手段对 FA-PEG 400 化学结构进行表征。FT-IR 结果如图 2-A 所示, 在 3496.7 cm^{-1} 处存在羟基的伸缩振动峰, 提示 PEG 400 的片段存在; 在 1736.6 cm^{-1} 也出现明显的强吸收峰, 该波段的吸收属于酯键中羰基的特征峰, 提示 2 个化学片段通过酯键共价连接在一起; 此外还观察到苯环骨架振动峰 (1640.5 cm^{-1}), 提示所制备化合物与设计一致。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) 谱如图 2-B 所示, δ 8.6 (1H, s) 归属于叶酸片段的酰胺中 H-a 质子峰, δ 8.1 (1H, d, $J=7.7\text{ Hz}$) 归属于叶酸片段的 N 杂环上 H-b 质子峰, δ 7.6 (2H, d, $J=8.3\text{ Hz}$) 归属为叶酸片段的苯环结构中 H-c 质子峰, δ 6.6 (2H, d, $J=8.3\text{ Hz}$) 归属为叶酸片段的苯环结构中 H-d 质子信号峰, 而 δ 3.4 应归属为 PEG 400 中的 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ 重复单元的质子信号峰。

通过上述 2 种表征方式, 初步确证 FA-PEG 400 的化学结构。

2.2 微乳的制备与表征^[29-31]

2.2.1 薏苡仁油-雷公藤红素微乳 (CT-MEs) 的制备 称取 150 mg RH 40、50 mg PEG 400 置于西林

瓶中, 磁力搅拌 2 h, 加入 200 mg 薏苡仁油、5 mg 雷公藤红素, 磁力搅拌 2 h 混匀, 采用水滴定法定容至 5 mL。

2.2.2 Tf 修饰的 CT-MEs (Tf-CT-MEs) 制备 取上述制备的 CT-MEs 200 μ L 分散于 3 mL 水相, 加入 0.74 mg EDC、0.47 mg NHS、2 mg Tf 于西林瓶中, 孵育 12 h, 水浴透析 6 h 后, 纯水定容至 5 mL, 并用 BCA 试剂盒进行蛋白定量。

2.2.3 FA 修饰的 CT-MEs (FA-CT-MEs) 制备 称取 15 mg FA-PEG 400、50 mg PEG 400 置于西林瓶中, 磁力搅拌 2 h, 加入 150 mg RH 40、200 mg 薏苡仁油、5 mg 雷公藤红素, 磁力搅拌 2 h 混匀, 纯水定容至 5 mL。

2.2.4 Tf 和 FA 双重修饰的 CT-MEs (Tf/FA-CT-MEs) 制备 取上述制备的 FA-CT-MEs 200 μ L 分散于 3 mL 水相, 加入 0.74 mg EDC、0.47 mg NHS、2 mg Tf 于西林瓶中, 孵育 12 h, 纯水定容至 5 mL, 即得。

2.2.5 包埋 FITC 微乳的制备 将雷公藤红素替换成荧光探针 FITC, 以同样的方法, 还可以制备成包

埋 FITC 的薏苡仁油微乳 (FITC-CMEs) 和 Tf 修饰薏苡仁油微乳 (Tf-FITC-CMEs)、包埋 FITC 的 FA 修饰薏苡仁油微乳 (FA-FITC-CMEs) 及 Tf/FA 修饰薏苡仁油微乳 (Tf/FA-FITC-CMEs), 避光保存。

2.2.6 微乳的表征 采用马尔文激光散射粒度测定仪, 在室温下测定 CT-MEs、Tf-CT-MEs、FA-CT-MEs 及 Tf/FA-CT-MEs 的平均粒径、多分散指数 (PDI) 和 Zeta 电位, 结果见表 1。同时将载有 Formvar (该膜化学成分为聚乙烯醇缩甲醛) 支持膜的铜网置于蜡板上, 在膜上滴加 1 滴微乳液, 红外灯下照射 5 min, 再滴加 1 滴 1% 的磷钨酸, 室温下风干 10 min, 置于透射电镜下观察微乳的外观形态, 结果显示所制备的各微乳呈类球形, 外观较为圆整, 分散较均匀 (图 3)。靶配体的表面密度对纳米粒子的寻靶能力至关重要, 因此本实验还通过 BCA 试剂盒测定所制备的 Tf-CT-MEs (Tf/CT-MEs, Tf 与 CT-MEs 质量比为 1:8) 中的 Tf 表面密度为 36.39 mg/g。根据处方设计中的组分比例, 计算所得叶酸的表面密度为 35.71 mg/g。

表 1 微乳的平均粒径、PDI 及 Zeta 电位 ($n = 3$)

Table 1 Average particle size, PDI, and Zeta potential of different types of microemulsions ($n = 3$)

组别	平均粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
CT-MEs	40.14 $\pm$ 0.04	0.155 $\pm$ 0.004	-14.70 $\pm$ 0.40
Tf-CT-MEs	49.09 $\pm$ 0.49**	0.239 $\pm$ 0.015**	-12.20 $\pm$ 0.90
FA-CT-MEs	50.82 $\pm$ 0.31**	0.139 $\pm$ 0.002	-15.10 $\pm$ 0.90
Tf/FA-CT-MEs	52.52 $\pm$ 0.11**	0.124 $\pm$ 0.019	-21.50 $\pm$ 1.70**

与 CT-MEs 组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs CT-MEs group

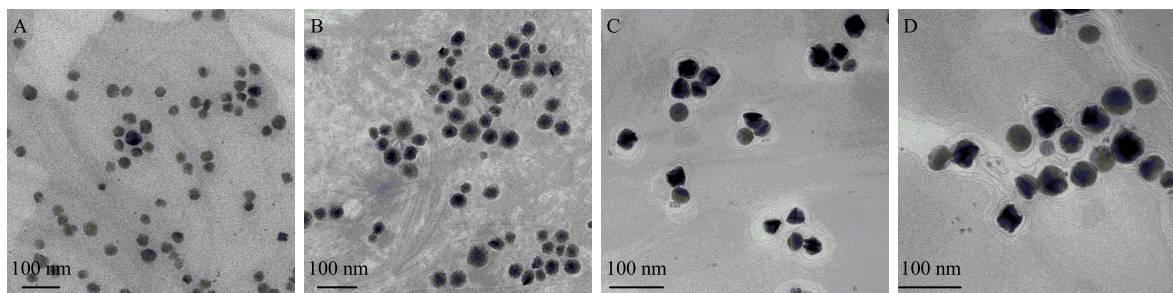


图 3 CT-MEs (A)、FA-CT-MEs (B)、Tf-CT-MEs (C) 及 Tf/FA-CT-MEs (D) 的透射电镜图

Fig. 3 TEM Morphology of CT-MEs (A), FA-CT-MEs (B), Tf-CT-MEs (C), and Tf/FA-CT-MEs (D)

2.3 体外稳定性研究^[32]

分别取新鲜制备的 Tf-CT-MEs、FA-CT-MEs 及 Tf/FA-CT-MEs 各 1 mL (含 1 mg/mL 雷公藤红素), 置于 49 mL 的 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中, 以 60 r/min 速率 37 $^{\circ}$ C 恒温振荡, 并于 0、0.5、1.0、2.0、4.0、

8.0、12.0、24.0、48.0 h 取样 0.5 mL, 同时补充同等体积介质。样品经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过后, 加 3 倍体积甲醇超声破乳, 离心后取上清液测定雷公藤红素的量, 计算累积药物泄漏百分率。结果显示, 在 48 h 内, Tf-CT-MEs、FA-CT-MEs、Tf/FA-CT-MEs

在 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中药物泄漏均较为缓慢, 泄漏趋势大致相同 (表 2)。在 0~8 h, 靶配体修饰的各微乳组雷公藤红素的泄漏速率稍快, 在 8 h 时 Tf-CT-MEs、FA-CT-MEs、Tf/FA-CT-MEs 的药物泄漏率分别为 12.22%、12.73%、13.18%; 在 8~48 h, 各微乳组雷公藤红素的泄漏速率放缓, 在 48 h 时 Tf-CT-MEs、FA-CT-MEs、Tf/FA-CT-MEs 的药物泄漏率分别为 20.32%、22.36%、23.86%。实验结果表明靶配体修饰的 Tf-CT-MEs、FA-CT-MEs 和 Tf/FA-CT-MEs 具有较好的体外稳定性和缓释特性。

2.4 体外抗肿瘤活性研究^[33-34]

2.4.1 试药配制 游离雷公藤红素溶液: 称取 5 mg 雷公藤红素, 用 DMSO 溶解定容至 10 mL 得浓度为 1 nmol/L 游离雷公藤红素溶液。

CT-MEs、Tf-CT-MEs、FA-CT-MEs、Tf/FA-CT-MEs 的制备方法如“2.2”项下所述。

表 2 在 pH 7.4 时 Tf-CT-MEs、FA-CT-MEs 及 Tf/FA-CT-MEs 中雷公藤红素的泄漏率 ($n=3$)

Table 2 Tripterine leakage of Tf-CT-MEs, FA-CT-MEs, and Tf/FA-CT-MEs at pH 7.4 ($n=3$)

t/h	泄漏率/%			
	CT-MEs	Tf-CT-MEs	FA-CT-MEs	Tf/FA-CT-MEs
0.5	4.12±1.01	4.05±1.13	4.73±1.16	5.58±1.32
1.0	4.32±1.13	4.56±1.21	5.23±1.05	6.60±1.10
2.0	6.45±1.24	6.60±1.42	7.62±1.50	7.95±1.22
4.0	8.02±1.30	8.14±1.81	9.19±1.41	8.64±1.61
8.0	11.81±2.04	12.22±2.26	12.73±1.24	13.18±2.15
12.0	14.03±1.31	14.26±1.62	16.28±1.63	16.96±1.40
24.0	17.92±2.16	18.85±1.45	19.23±2.32	20.38±2.37
48.0	20.14±2.43	20.36±2.51	22.36±1.81	23.86±2.77

表 3 各雷公藤红素制剂对 MCF-7 细胞的体外细胞毒性 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 *In vitro* cytotoxicity of various tripterine formulations against MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

$C/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	存活率/%				
	雷公藤红素	CT-MEs	Tf-CT-MEs	FA-CT-MEs	Tf/FA-CT-MEs
0.06	102.08±4.52	101.02±3.28	97.85±1.44	100.62±2.83	94.28±2.12
0.12	97.21±3.82	91.28±4.15	92.99±2.54	90.73±2.64	92.27±3.89
0.25	86.27±6.74	80.47±1.40	77.91±1.27	79.34±1.10	78.37±1.53
0.50	72.19±2.11	64.89±2.25	58.48±1.48	66.34±1.73	59.43±2.09
1.00	54.74±2.98	49.15±5.80	45.78±4.71	47.04±1.81	43.26±1.78
2.00	34.12±4.72	35.33±4.01	29.28±3.16	36.99±0.32	30.25±0.56
4.00	16.07±0.66	14.87±0.34	18.87±1.31	16.78±0.77	19.52±0.97
8.00	14.24±0.85	14.10±0.49	14.65±1.56	14.58±1.23	15.87±1.34

2.4.2 MTT 实验 收集对数生长期的细胞, 用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基调整细胞悬液浓度至 1×10^4 个/mL, 接种于 96 孔板中, 每孔加入 200 μL 细胞悬液, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 24 h, 使其贴壁, 对照组给予 RPMI 1640 不完全培养基, 给药组分别给予雷公藤红素、CT-MEs、Tf-CT-MEs、FA-CT-MEs、Tf/FA-CT-MEs, 每组用不完全培养基稀释以雷公藤红素浓度计为 8、4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.062 5 $\mu\text{mol/L}$, 每个浓度设 6 个复孔, 药物与细胞共孵育 20 h 后, 每孔加入 20 μL MTT 溶液 (5 mg/mL, 即 0.5% MTT), 继续培养 4 h 后终止培养, 吸弃上层液体, 每个复孔加入 150 μL DMSO 溶液, 摇床低速振摇 10 min 后, 采用酶标仪检测 490 nm 处各孔吸光度 (A) 值。并利用公式计算药物对细胞的增殖抑制率。根据增殖抑制率计算细胞增殖的半数抑制浓度 (IC_{50})。 IC_{50} 的计算采用 Graphpad Prism 6.0 软件 (美国 GraphPad Software 公司), 公式如下。

$$\text{细胞增殖抑制率} = 1 - A_{\text{给药}}/A_{\text{对照}}$$

结果如表 3、4 所示, 各给药组对 MCF-7 和 A549 的细胞毒性均呈浓度依赖性^[35], 且随着雷公藤红素浓度的提高, 各给药组的细胞增殖抑制率提高, 细胞存活率下降, 各组趋势基本相同。

CT-MEs、Tf-CT-MEs、FA-CT-MEs、Tf/FA-CT-MEs 各微乳在体外抗 MCF-7 细胞增殖的 IC_{50} 值分别为 1.05、0.85、0.93、0.77 $\mu\text{mol/L}$ 。通过量化分析表明, Tf-CT-MEs 的 IC_{50} 值比 CT-MEs 的 IC_{50} 值降低 19.05%, 表明 Tf 修饰的微乳提高了制剂的靶向性同时降低了给药浓度。FA-CT-MEs 的 IC_{50} 值比 CT-MEs 的 IC_{50} 值降低 11.43%, 提示 FA 修饰的微

表 4 各雷公藤红素制剂对 A549 细胞的体外细胞毒性 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 *In vitro* cytotoxicity of various tripterine formulations against A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

$C/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	存活率/%				
	雷公藤红素	CT-MEs	Tf-CT-MEs	FA-CT-MEs	Tf/FA-CT-MEs
0.06	99.46 $\pm$ 1.40	100.72 $\pm$ 1.81	98.78 $\pm$ 0.63	98.24 $\pm$ 3.74	97.66 $\pm$ 1.76
0.12	92.17 $\pm$ 1.25	90.47 $\pm$ 2.64	89.12 $\pm$ 1.23	91.43 $\pm$ 2.11	86.28 $\pm$ 2.25
0.25	87.28 $\pm$ 5.80	79.14 $\pm$ 3.22	80.53 $\pm$ 6.72	78.12 $\pm$ 2.98	76.24 $\pm$ 2.11
0.50	79.12 $\pm$ 4.01	66.34 $\pm$ 1.52	61.28 $\pm$ 4.47	66.31 $\pm$ 4.72	60.12 $\pm$ 3.12
1.00	59.73 $\pm$ 1.34	53.04 $\pm$ 1.67	42.14 $\pm$ 1.08	48.35 $\pm$ 0.66	42.86 $\pm$ 3.24
2.00	43.56 $\pm$ 0.49	35.99 $\pm$ 1.72	31.67 $\pm$ 1.06	29.12 $\pm$ 0.85	28.13 $\pm$ 1.52
4.00	26.31 $\pm$ 2.15	16.74 $\pm$ 0.83	17.35 $\pm$ 1.11	18.14 $\pm$ 0.41	14.25 $\pm$ 0.89
8.00	11.56 $\pm$ 1.56	12.58 $\pm$ 1.21	10.12 $\pm$ 0.95	10.23 $\pm$ 1.15	8.13 $\pm$ 0.83

乳对于 MCF-7 细胞靶向作用较明显。Tf/FA-CT-MEs 的 IC_{50} 值比 CT-MEs 的 IC_{50} 值降低 26.67%，表明 Tf 和 FA 双重修饰的微乳可以增强对 MCF-7 细胞的增殖抑制作用。此外，游离雷公藤红素对 MCF-7 的 IC_{50} 值 (1.52 $\mu\text{mol/L}$) 高于各微乳组，提示微乳可能通过摄取增强来提高细胞毒性。

而对于仅 Tf 受体过表达的 A549 细胞系，CT-MEs、Tf-CT-MEs、FA-CT-MEs、Tf/FA-CT-MEs 在体外抗细胞增殖的 IC_{50} 值分别为 0.99、0.86、1.01、0.85 $\mu\text{mol/L}$ 。Tf 及 Tf/FA 修饰分别将 CT-MEs 的 IC_{50} 值降低 13.13%、14.14%。双靶修饰的优势较 MCF-7 组明显减弱，推测可能与 A549 细胞为 FA 受体表达阴性细胞有关^[36]。上述结果分析可知，Tf 和 FA 双重修饰的 CT-MEs 可以明显增强诸如 MCF-7 等 Tf/FA 受体双过表达细胞系的体外抗肿瘤活性。

2.5 细胞摄取研究^[37-38]

2.5.1 试药配制 游离 FITC 溶液 (free FITC): 称取 0.975 mg FITC, 用纯水定容至 10 mL 得 250 $\mu\text{mol/L}$ 游离 FITC 溶液, 避光保存。

FITC-CMEs、Tf-FITC-CMEs、FA-FITC-CMEs、Tf/FA-FITC-CMEs 的制备方法如“2.2”项下所述。

2.5.2 细胞摄取实验 取对数生长期的细胞, 胰酶

消化使其脱壁, 用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液重悬成单细胞悬液, 细胞计数后稀释至细胞浓度为 1×10^4 个/mL, 吹打均匀, 接种于 24 孔细胞培养板, 每孔加入 400 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 24 h。移去孔内原培养液, 将 free FITC、FITC-CMEs、Tf-FITC-CMEs、FA-FITC-CMEs、Tf/FA-FITC-CMEs 分别用不完全培养基稀释至 5 $\mu\text{mol/L}$ (以 FITC 浓度计), 给药于细胞, 每孔 400 μL 。抑制 Tf 受体给药组 (Tf-FITC-CMEs+Tf)、抑制 FA 受体给药组 (FA-FITC-CMEs+FA) 及同时抑制二者受体给药组 (Tf/FA-FITC-CMEs+Tf/FA) 在孵育结束前 2 h 时, 移去孔内原培养液后分别加入游离 Tf 溶液 (质量浓度为 1 mg/mL)、游离 FA 溶液 (质量浓度为 441 $\mu\text{g/mL}$) 及二者的混合液, 孵育结束后分别加入 Tf-FITC-CMEs、FA-FITC-CMEs、Tf/FA-FITC-CMEs。给药结束后移入 CO_2 培养箱中继续培养 4 h, 快速移去培养基, 每孔加 500 μL PBS 冲洗 3 次, 再加 100 μL 不含 EDTA 的胰酶消化约 2 min, 立即弃去胰酶。加入 500 μL 含 10% FBS 的 PBS 溶液终止消化, 1 000 r/min 离心 3 min, 弃除上清液后加入 1 mL PBS 轻轻打匀后进行流式细胞仪检测, 结果见图 4。

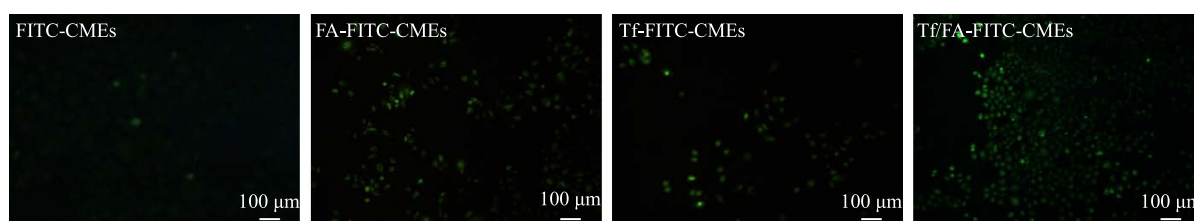


图 4 荧光倒置显微镜观察各组 MCF-7 细胞 4 h 的摄取作用

Fig. 4 Fluorescent staining of cellular uptake in each group after incubation with MCF-7 cells for 4 h

由图 4 可知, MCF-7 细胞与 Tf/FA-FITC-CMEs 共孵育 4 h 后的荧光强度明显强于单靶修饰的微乳组, 提示双靶修饰技术可以提高微乳进入 MCF-7 胞内的能力。对其定量分析结果(表 5)表明, Tf/FA-FITC-CMEs、Tf-FITC-CMEs、FA-FITC-CMEs 以及 FITC-CMEs 组的胞内荧光强度分别是 $2\ 782.33 \pm 131.77$ 、 622.80 ± 18.57 、 $1\ 182.45 \pm 113.12$ 、 475.94 ± 12.67 , Tf、FA 以及 Tf/FA 修饰分别是 FITC-CMEs 细胞摄取能力的 5.8、1.3、2.5 倍, 表明有 Tf 修饰和/或 FA 修饰的微乳能增强 MCF-7 细胞对药物的摄取作用。而通过相关的特异性抑制实验表明, Tf/FA-FITC-CMEs 的摄取增强作用是由 Tf 受体和 FA 受体双重介导的。

在 A549 细胞模型组中, 对药物摄取量的定量结果如表 5 所示, Tf/FA-FITC-CMEs、Tf-FITC-CMEs、FA-FITC-CMEs 以及 FITC-CMEs 组的胞内荧光强度分别是 $2\ 762.91 \pm 23.18$ 、 $2\ 795.16 \pm 130.43$ 、 $1\ 980.64 \pm 47.53$ 、 $1\ 950.18 \pm 46.52$, Tf 及 Tf/FA 修饰将 FITC-CMEs 细胞摄取能力都提高约 40%。推测可能原因是 A549 细胞是 FA 受体表达阴性的肿瘤细胞, FA 修饰的微乳对于 A549 细胞无明显的靶向作用。上述分析表明, Tf 和 FA 双重修饰的 CT-MEs 微乳可以明显增强靶配体相应受体双过表达的细胞系 MCF-7 细胞对药物的摄取作用。

2.6 细胞凋亡研究^[39]

2.6.1 试药配制 按“2.4”项下方法配制游离雷公藤红素溶液, 按“2.2”项下方法分别制备 CT-MEs、Tf-CT-MEs、FA-CT-MEs、Tf/FA-CT-MEs, 游离 FITC 溶液、游离 FA 溶液同“2.5.2”项方法配制。

2.6.2 细胞凋亡实验 将“2.5.2”项下 FITC 替换成雷公藤红素, 各给药组分别用不完全培养基稀释至 $2\ \mu\text{mol/L}$ (以雷公藤红素浓度计), 其他按上述操作, 最后加入 $500\ \mu\text{L}$ 含 10% FBS 的 PBS 溶液终止消化, $1\ 000\ \text{r/min}$ 离心 3 min, 弃除上清液后加入 $100\ \mu\text{L}$ PBS 轻轻打匀, 取此细胞悬液 $50\ \mu\text{L}$, 与 $50\ \mu\text{L}$ Annexin V-PE 混匀, 避光孵育 15 min 后采用流式细胞仪进样分析。

结果如表 6 所示, 细胞与 CT-MEs、Tf-CT-MEs、FA-CT-MEs、Tf/FA-CT-MEs 各微乳共孵育 4 h 后, 凋亡率均明显高于游离雷公藤红素给药组, 提示微乳剂型对于诱导肿瘤细胞凋亡也有积极作用。各微乳组之间比较可知, Tf、FA 以及 Tf/FA 修饰分别将 CT-MEs 诱导细胞凋亡能力提高 28.02%、13.79%、29.30%, 提示靶配体修饰可以促 MCF-7 细胞的凋亡。通过 Tf 和/或 FA 受体抑制实验, 表明 Tf/FA-CT-MEs 诱导 MCF-7 细胞凋亡作用是由 Tf 受体和 FA 受体双重介导的。总的来说, 靶配体修饰对于微乳促细胞凋亡能力有较明显的提升作用。

结果如表 6 所示, 细胞与 CT-MEs、Tf-CT-MEs、FA-CT-MEs、Tf/FA-CT-MEs 各微乳共孵育 4 h 后, 凋亡率均明显高于游离雷公藤红素给药组, 提示微乳剂型对于诱导肿瘤细胞凋亡也有积极作用。各微乳组之间比较可知, Tf、FA 以及 Tf/FA 修饰分别将 CT-MEs 诱导细胞凋亡能力提高 28.02%、13.79%、29.30%, 提示靶配体修饰可以促 MCF-7 细胞的凋亡。通过 Tf 和/或 FA 受体抑制实验, 表明 Tf/FA-CT-MEs 诱导 MCF-7 细胞凋亡作用是由 Tf 受体和 FA 受体双重介导的。总的来说, 靶配体修饰对于微乳促细胞凋亡能力有较明显的提升作用。

3 讨论

本研究以经典缩合法合成了 FA-PEG 400, 并采用简单可控的工艺成功制备出双靶修饰的 Tf/FA-CT-MEs。通过对该微乳进行理化性质表征发现, 随着 Tf/FA 的修饰, 微乳粒径小幅增加, 但仍处于 50 nm 的水平, 同时, 通过透射电镜观察了微乳的外

Table 5 Cellular uptake of different types of microemulsions after incubation with MCF-7 cells and A549 cells for 4 h observed by flow cytometric analysis

组别	荧光强度	
	MCF-7	A549
FITC-CMEs	$475.94 \pm 12.67^{**}$	$1\ 950.18 \pm 46.52$
Tf-FITC-CMEs	$622.80 \pm 18.57^{**}$	$2\ 795.16 \pm 130.43^{##}$
FA-FITC-CMEs	$1\ 182.45 \pm 113.12^{**}$	$1\ 980.64 \pm 47.53$
Tf/FA-FITC-CMEs	$2\ 782.33 \pm 131.77$	$2\ 762.91 \pm 23.18^{##}$
Tf-FITC-CMEs+Tf	$498.58 \pm 30.60^{**}$	$1\ 982.25 \pm 84.76$
FA-FITC-CMEs+FA	$489.26 \pm 23.05^{**}$	$1\ 967.72 \pm 31.61$
Tf/FA-FITC-CMEs+Tf/FA	$475.97 \pm 12.34^{**}$	$2\ 030.53 \pm 70.39$

与 Tf/FA-FITC-CMEs 组比较 (MCF-7): $^{**}P < 0.01$; 与 FITC-CMEs 组比较 (A549): $^{##}P < 0.01$

$^{**}P < 0.01$ vs Tf/FA-FITC-CMEs group (MCF-7); $^{##}P < 0.01$ vs FITC-CMEs group (A549)

表 6 不同微乳给药组诱导 MCF-7 细胞的凋亡率

Table 6 Apoptosis rate of MCF-7 cells after treatment with different types of microemulsions

组别	凋亡率/%
对照	19.73 ± 0.63
雷公藤红素	40.37 ± 7.47
CT-MEs	54.60 ± 0.85
Tf-CT-MEs	$69.90 \pm 3.11^{*}$
FA-CT-MEs	$62.13 \pm 2.51^{*}$
Tf/FA-CT-MEs	$70.60 \pm 6.92^{*}$
Tf-CT-MEs+Tf	51.83 ± 0.88
FA-CT-MEs+FA	49.85 ± 3.96
Tf/FA-CT-MEs+Tf/FA	51.45 ± 4.80

与 CT-MEs 组比较: $^{*}P < 0.05$

$^{*}P < 0.05$ vs CT-MEs group

观形态,发现靶配体的修饰对微乳成型影响不大。该微乳保持了前期薏苡仁油微乳粒径小、分散窄、形态圆整、结构稳定等优势。

在体外靶向抗肿瘤研究中,Tf/FA-CT-MEs的双靶修饰的优势在MCF-7细胞模型中尤为突出,而在A549细胞模型中与Tf-CT-MEs差别不大。MTT实验分别考察了上述微乳对MCF-7、A549细胞的增殖抑制作用,结果表明CT-MEs经Tf和FA双重修饰后显著促进其对二者受体双过表达的细胞系MCF-7的增殖抑制作用。细胞摄取和细胞凋亡结果分别进一步证明双靶修饰的CT-MEs明显增强MCF-7细胞对药物的摄取及增加诱导MCF-7细胞的凋亡率。

雷公藤红素抗肿瘤活性强,但是本身毒性较大,如何提高其体内的分布选择性是促其成药的关键环节。本课题组已初步证实双靶修饰技术、微乳剂型、与薏苡仁油联合应用等方法能够较好地提高雷公藤红素的体外抗肿瘤活性,然而体内的生物学屏障更为复杂,如何有效地验证双靶策略在体内水平的肿瘤靶向性和增效减毒效应,有待建立荷载MCF-7裸鼠异位瘤模型进行深入研究。此外,Tf和FA双重修饰技术是否能够应用于其他纳米载药系统,即该策略的普适性还有待构建更多类型的新型递药系统作进一步探究。

参考文献

- [1] Sha M, Ye J, Zhang L X, *et al.* Celastrol induces apoptosis of gastric cancer cells by miR-21 inhibiting PI3K/Akt-NF- κ B signaling pathway [J]. *Pharmacology*, 2014, 93(1/2): 39-46.
- [2] 朱广倍. 雷公藤红素在乳腺癌中抑制 mTOR 信号通路作用机制的研究 [D]. 重庆: 重庆理工大学, 2016.
- [3] Mou H, Zheng Y, Zhao P, *et al.* Celastrol induces apoptosis in non-small-cell lung cancer A549 cells through activation of mitochondria-and Fas/FasL-mediated pathways [J]. *Toxicol In Vitro*, 2011, 25(5): 1027-1032.
- [4] 王淑静, 董立强, 刘欢, 等. 雷公藤红素对 SGC-7901 细胞和 ECV304 细胞增殖及能量代谢的影响 [J]. 中草药, 2016, 47(21): 3854-3860.
- [5] Wang W B, Feng L X, Yue Q X, *et al.* Paraptosis accompanied by autophagy and apoptosis was induced by celastrol, a natural compound with influence on proteasome, ER stress and Hsp90 [J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(5): 2196-2206.
- [6] 于小龙. 雷公藤红素对人骨肉瘤细胞增殖、凋亡的影响及作用机制研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2016.
- [7] 夏海建, 张振海, 蒋俊, 等. 雷公藤红素环糊精与油自组装小珠载药系统的制备及其体外评价 [J]. 中草药, 2013, 44(19): 2672-2676.
- [8] 张明珠, 李怡静, 苏文晶, 等. 雷公藤红素纳米混悬剂的制备及其抗肿瘤作用研究 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(10): 1528-1534.
- [9] 夏海建, 张振海, 贾晓斌. 雷公藤红素缓释滴丸的研究 [J]. 中草药, 2013, 44(7): 834-838.
- [10] 吴军, 刘荻, 马卓. 不同促渗剂对雷公藤红素醇质体体外透皮吸收的研究 [J]. 湖北工业大学学报, 2015, 30(5): 8-11.
- [11] 胡绍英, 张振海, 蒋艳荣, 等. 雷公藤红素胶体二氧化硅缓释固体分散体研究 [J]. 中草药, 2013, 44(6): 692-695.
- [12] 吴军, 吴明, 刘荻, 等. 雷公藤红素醇质体的制备及体外透皮性能研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2015, 32(5): 929-933.
- [13] 袁菱, 周蕾, 陈彦, 等. 雷公藤红素纳米结构脂质载体的制备及其体外透皮研究 [J]. 中草药, 2012, 43(8): 1514-1518.
- [14] Qu D, Ma Y H, Sun W J, *et al.* Microemulsion-based synergistic dual-drug codelivery system for enhanced apoptosis of tumor cells [J]. *Int J Nanomed*, 2015, 10(1): 1173-1187.
- [15] 刘丹, 田燕, 张振海, 等. 银杏内酯组分自微乳释药系统的制备及各成分溶出行为相似度分析 [J]. 中草药, 2016, 47(21): 3798-3804.
- [16] 李萍, 黄萌萌, 刘玉萍, 等. 雷公藤红素-薏苡仁油微乳的制备及其体外抗肿瘤活性评价 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(6): 1-6.
- [17] Qu D, He J J, Liu C Y, *et al.* Triterpene-loaded microemulsion using *Coix lacryma-jobi* seed extract as oil phase for enhanced antitumor efficacy: preparation and *in vivo* evaluation [J]. *Int J Nanomed*, 2014, 9(1): 109-119.
- [18] 袁成甜, 贺俊杰, 陈彦, 等. 灵薏方多组分微乳的制备及其抗肺癌活性研究 [J]. 中草药, 2014, 45(22): 3284-3288.
- [19] Ai X, Ho C J, Aw J, *et al.* *In vivo* covalent cross-linking of photon-converted rare-earth nanostructures for tumour localization and theranostics [J]. *Nat Commun*, 2016, doi:10.1038/ncomms10432.
- [20] 温宝芳, 李文涛, 庄宝祥, 等. 盐酸小檗碱/叶酸-壳聚糖纳米粒的制备及其对 CNE-1 细胞的抑制作用 [J]. 中草药, 2016, 47(20): 3594-3601.
- [21] Zhang P C, Hu L J, Yin Q, *et al.* Transferrin-modified c

- [RGDfK]-paclitaxel loaded hybrid micelle for sequential blood-brain barrier penetration and glioma targeting therapy [J]. *Mol Pharm*, 2012, 9(6): 1590-1598.
- [22] 杨雪薇. 异喹啉类化合物及其转铁蛋白靶向脂质体的抗肿瘤活性研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2016.
- [23] 于 莲, 杜 妍, 田丽华, 等. 叶酸修饰水飞蓟宾固体脂质纳米粒的制备及其对 A549 细胞抑制作用研究 [J]. *中草药*, 2013, 44(2): 158-164.
- [24] Pramanik A, Laha D, Dash S K, *et al.* An *in-vivo* study for targeted delivery of copper-organic complex to breast cancer using chitosan polymer nanoparticles [J]. *Mater Sci Eng C*, 2016, 68(21): 327-337.
- [25] 刘 苒. 转铁蛋白修饰的新型多聚物载药纳米粒的研制及靶向逆转白血病多药耐药的体外研究 [D]. 南京: 东南大学, 2015.
- [26] Choi J S. Development of surface curcumin nanoparticles modified with biological macromolecules for anti-tumor effects [J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 92(11): 850-859.
- [27] Alibolandi M, Abnous K, Sadeghi F, *et al.* Folate receptor-targeted multimodal polymersomes for delivery of quantum dots and doxorubicin to breast adenocarcinoma: *In vitro*, and *in vivo*, evaluation [J]. *Int J Pharm*, 2016, 500(1/2): 162-178.
- [28] Qu D, Lin H, Zhang N, *et al.* *In vitro* evaluation on novel modified chitosan for targeted antitumor drug delivery[J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 92(1):545-554.
- [29] 刘明健, 瞿 鼎, 陈 彦, 等. 丁酰半乳糖酯修饰的薏苡仁组分微乳的制备及其体外抗肿瘤活性研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(18): 2696-2702.
- [30] Zhang H, Ji Y, Chen Q, *et al.* Enhancement of cytotoxicity of artemisinin toward cancer cells by transferrin-mediated carbon nanotubes nanoparticles [J]. *J Drug Target*, 2015, 23(6): 552-567.
- [31] He Z, Shi Z, Sun W, *et al.* Hemocompatibility of folic-acid-conjugated amphiphilic PEG-PLGA copolymer nanoparticles for co-delivery of cisplatin and paclitaxel: treatment effects for non-small-cell lung cancer [J]. *Tumor Biology*, 2016, 37(6):7809-7821.
- [32] Cetin M, Atila A, Kadioglu Y. Formulation and *in vitro* characterization of Eudragit L100 and Eudragit L100-PLGA nanoparticles containing diclofenac sodium [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2010, 11(3): 1250-1256.
- [33] 程汝滨, 杨 波, 钟晓明, 等. 小檗胺对肺腺癌 A549 细胞凋亡的影响及其机制研究 [J]. *中草药*, 2013, 44(14): 1967-1973.
- [34] Aloqail M, Al-Sheddi E, Siddiqui M A, *et al.* Anticancer activity of sub-fractions of chloroform extracts of *Nepeta deflersiana* on human breast and lung cancer cells: An *in vitro* cytotoxicity assessment [J]. *Planta Med*, 2015, 11(Suppl 4): S598-S605.
- [35] Shrivastava S, Jeengar M K, Reddy V S, *et al.* Anticancer effect of celastrol on human triple negative breast cancer: Possible involvement of oxidative stress, mitochondrial dysfunction, apoptosis and PI3K/Akt pathways [J]. *Exp Mol Pathol*, 2015, 98(3): 313-327.
- [36] Canal F, Vicent M J, Pasut G, *et al.* Relevance of folic acid/polymer ratio in targeted PEG-epirubicin conjugates [J]. *J Control Release*, 2010, 146(3): 388-399.
- [37] Tang J, Li L, Howard C B, *et al.* Preparation of optimized lipid-coated calcium phosphate nanoparticles for enhanced *in vitro* gene delivery to breast cancer cells [J]. *J Mater Chem B*, 2015, 3(33): 6805-6812.
- [38] Li W H, Yi X L, Liu X, *et al.* Hyaluronic acid ion pairing nanoparticles for targeted tumor therapy [J]. *J Control Release*, 2016, 225(3): 170-182.
- [39] Dong H, Yao L, Bi W, *et al.* Combination of survivin siRNA with neoadjuvant chemotherapy enhances apoptosis and reverses drug resistance in breast cancer MCF-7 cells [J]. *J Cancer Res Ther*, 2015, 11(4): 717-722.