

靶向性蒿甲醚脂质体的构建及体外靶向性研究

李秀英¹, 李学涛², 李钦青¹

1. 山西中医药大学, 山西 晋中 030024

2. 辽宁中医药大学, 辽宁 大连 116600

摘要: **目的** 构建靶向性蒿甲醚脂质体并评价其对 C6 脑胶质瘤细胞的体外靶向性。**方法** 以氨基蝶呤 (APGA) 为靶向性分子, 采用化学法合成靶向性功能材料氨基蝶呤-聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺共聚物 (APGA-PEG2000-DSPE), 以薄膜分散法制备靶向性蒿甲醚脂质体, 构建血脑屏障 (BBB)-C6 脑胶质瘤肿瘤球共培养模型, 以香豆素为荧光探针, 以共聚焦荧光显微镜观察靶向性脂质体跨越 BBB 及穿透肿瘤球的能力, 以流式细胞仪检测 C6 细胞对脂质体的摄取情况来评价制剂的靶向性能, 采用 SRB 法考察靶向性脂质体对 C6 脑胶质瘤细胞的生长抑制作用。**结果** 合成的 APGA-PEG2000-DSPE 的相对分子质量为 3 150, 与预测的相对分子质量相吻合; 共培养模型显示靶向性脂质体可以更好地跨越 BBB 并穿透肿瘤球, 对于 C6 脑胶质瘤细胞, 靶向性蒿甲醚脂质体、蒿甲醚脂质体、游离蒿甲醚对 C6 脑胶质瘤细胞的 IC₅₀ 值分别为 42、82、95 μmol/L。**结论** 构建的靶向性蒿甲醚脂质体可以有效跨越 BBB, 并靶向运输至脑胶质瘤肿瘤球内部, 且具有很强的杀伤脑胶质瘤细胞活性。

关键词: 氨基蝶呤-聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺共聚物; 靶向性脂质体; 蒿甲醚; 脑胶质瘤; 氨基蝶呤; 薄膜分散法; 香豆素

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)04-0814-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.04.010

Development of targeted artemether liposomes and targeting effect *in vitro*

LI Xiu-ying¹, LI Xue-tao², LI Qin-qing¹

1. Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030024, China

2. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

Abstract: **Objective** To evaluate the targeting and inhibitory effects of the targeted artemether liposomes modified with APGA-PEG2000-DSPE conjugate *in vitro*. **Methods** APGA was used as targeted molecular, and the new functional material APGA-PEG2000-DSPE conjugate was synthesized and confirmed by using MALDI-TOF-MS. A kind of targeted artemether liposomes was developed by modifying APGA-PEG2000-DSPE using film dispersed method. Co-culture model of BBB-glioma C6 tumor spheroids was developed, and it was used to study the transporting efficiency across the BBB and the penetration ability of the liposomes into glioma C6 tumor spheroids viewed by a confocal laser scanning microscope. Flow cytometry was used to evaluate the targeting properties of the preparations to C6 glioma cells. SRB method was used to study the inhibitory effect of targeted liposomes on the growth of C6 glioma cells. **Results** The APGA-PEG2000-DSPE conjugate was confirmed by using MALDI-TOF-MS, and its average mass was 3 150. The co-culture model showed that the targeted liposomes can better transport across the BBB and then penetrate into the glioma C6 tumor spheroids. To C6 glioma cells, the IC₅₀ of the targeted artemether liposomes, artemether liposomes and free artemether were 45, 82, and 95 μmol/L, separately. **Conclusion** The targeted artemether liposomes could effectively transport across the BBB and penetrate into the glioma C6 tumor spheroids. The targeted artemether liposomes had stronger inhibitory effect on brain glioma cells *in vitro*.

Key words: APGA-PEG2000-DSPE; targeted liposomes; artemether; brain glioma; aminopterin; film dispersed method; coumarin

脑胶质瘤是致死率较高的肿瘤之一, 其较强的浸润性使得手术无法将肿瘤彻底切除, 因此手术治

疗后常应用化疗来控制肿瘤的生长, 然而由于血脑屏障 (BBB) 的存在使得大部分药物难以有效地进

收稿日期: 2017-09-28

基金项目: 山西省中医药管理局科研项目 (2016ZYCY23)

作者简介: 李秀英 (1984—), 女, 博士, 讲师, 研究方向为肿瘤靶向药物递药系统的研究。Tel: (0351)3179903 E-mail: lixiuying85@163.com

入脑内,限制了药物在脑部疾病中的应用,同时肿瘤的耐药性是化疗失败的另一个重要原因^[1-3]。蒿甲醚是一种青蒿素衍生物,具有强效和速效抗疟作用,可以用于严重的多药耐药疟疾的治疗^[4]。除了显著地抗疟疾活性外,蒿甲醚具有一定的抗肿瘤活性($IC_{50} > 100 \mu\text{mol/L}$, 针对脑胶质瘤,相对紫杉醇等作用较弱,但是其作用机制多样)^[5-7],但其与经典的化疗药物(如紫杉醇、硫酸长春新碱等)相比其抗肿瘤活性较弱。氨基蝶呤(APGA)是一种叶酸类似物,可以与脑胶质瘤细胞表面过度表达叶酸受体发生特异性结合,在本研究中将 APGA 共价结合于聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(PEG2000-DSPE^[8])上形成了一种新的 APGA-PEG2000-DSPE 共聚物,应用于靶向蒿甲醚脂质体中,以香豆素为荧光探针评价其体外靶向性,并考察其对 C6 脑胶质瘤细胞的抑制活性,以期蒿甲醚的抗脑胶质瘤应用提供实验基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

蛋黄卵磷脂,上海如吉生物科技发展有限公司;胆固醇,北京索莱宝科技有限公司;二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000 (PEG2000-DSPE),上海甄准生物科技有限公司;氨基聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺($\text{NH}_2\text{-PEG2000-DSPE}$),美国 Avanti 公司;聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸脂(TPGS 1000),上海谱振生物科技有限公司;蒿甲醚(ART),上海阿拉丁试剂有限公司;葡聚糖凝胶 G-50,北京索莱宝科技有限公司;氨基蝶呤(APGA),北京百灵威科技有限公司;香豆素、1-羟基苯并三唑(HOBt)、三氯乙酸(TCA)、磺基罗丹明 B(SRB)、二甲基亚砜(DMSO),美国 Sigma-Aldrich 公司;二环己基碳二亚胺(DCC)、4-二甲氨基吡啶(DMAP),国药集团化学试剂公司;鼠源脑胶质瘤 C6 细胞系,中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所;鼠脑毛细血管内皮细胞及其专用培养液,中日友好医院临床研究所;低熔点琼脂糖、胰蛋白酶(Trypsin),Amresco 公司;一次性细胞培养实验用品,包括细胞培养板、培养皿、无菌离心管等,美国 BD 公司。

1.2 仪器

十万分之一精密电子天平,北京赛多利斯有限公司;JY92-IIIN 超声波细胞粉碎机、SB-5200 超声机,宁波新芝生物科技有限公司;透析袋,截留相

对分子质量 3 000,北京宝赛公司;圣叶 St-2000 旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂;基体辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS),日本 Shimadzu 公司;Zetasizer Nano-90 激光粒度仪,英国马尔文仪器有限公司;LEICA TCS SP2 激光共聚焦显微镜,德国 LEICA 公司;Becton Dickinson FACS Calibur 流式细胞仪,美国 Becton Dickinson 公司;Infinite F50 酶标仪,瑞士 TECAN 公司。

2 方法与结果

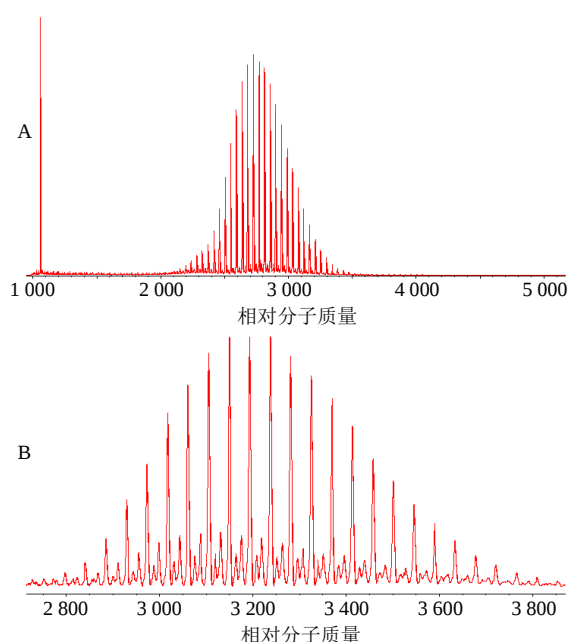
2.1 功能性材料 APGA-PEG2000-DSPE 的合成

APGA-PEG2000-DSPE 是由 $\text{NH}_2\text{-PEG2000-DSPE}$ 上的氨基和 APGA 上的羧基通过酰化缩合,用 DCC、DMAP 和 HOBt 作为反应缩合剂^[9]。将 $10 \mu\text{mol}$ APGA、 $49.2 \mu\text{mol}$ DMAP、 $20 \mu\text{mol}$ DCC 和 $20 \mu\text{mol}$ HOBt 溶解在 2 mL DMSO 溶液中,将反应液混合物在室温下用磁力搅拌器轻轻搅拌 30 min ,随后加入 $2 \mu\text{mol}$ COOH-PEG2000-DSPE ,继续搅拌 12 h 得到粗产物,继而将粗产物转移到再生纤维素透析袋,在去离子水中透析 48 h ,除去未反应的 APGA、DMAP、DCC、HOBt 和 DMSO。接下来将透析后的液体冷冻干燥,得到干燥的产物为混合物白色粉末。反应产物使用 MALDI-TOF-MS 进行检测,以 2,5-二羟基苯甲酸(DHB)为基体。

原料 $\text{NH}_2\text{-PEG2000-DSPE}$ (图 1-A)和终产物 APGA-PEG2000-DSPE(图 1-B)的 MALDI-TOF-MS 图谱如图 1 所示,反应产物中 APGA-PEG2000-DSPE 的平均相对分子质量为 $3\ 150.06$, $\text{NH}_2\text{-PEG2000-DSPE}$ 的平均相对分子质量为 $2\ 727.58$,APGA-PEG2000-DSPE 与 $\text{NH}_2\text{-PEG2000-DSPE}$ 之间的相对分子质量差约为 422.48 ,与 APGA 脱去 1 分子水(APGA 相对分子质量为 440.41 ,水的相对分子质量为 18.01 ,APGA 的相对分子质量减去水的分子量为 422.40 ,其与上述的 422.48 相符)的相对分子质量相吻合。

2.2 靶向性蒿甲醚脂质体的构建

精密称取卵磷脂、胆固醇、TPGS1000、APGA-PEG2000-DSPE(物质的量比为 $88:3.5:3:3$)和蒿甲醚(脂材-蒿甲醚 $20:1$)适量,溶解于氯仿-甲醇($3:1$)中,然后在 40°C 水浴通过旋转蒸发减压干燥除去有机试剂,在茄形瓶底部及内壁形成一层薄薄的均匀脂质薄膜。加入适量 PBS 溶液水化:先在水浴中超声 1 min ,至形成乳白色均匀的粗脂质体后转移到超声波细胞粉碎机中进一步超



A-NH₂-PEG2000-DSPE 的质谱图 B-APGA-PEG2000-DSPE 的质谱图
A-MS spectra of NH₂-PEG2000-DSPE B-MS spectra of APGA-PEG2000-DSPE conjugate

图 1 靶向性材料 APGA-PEG2000-DSPE 合成的验证

Fig. 1 Verification of the synthetic target materials APGA-PEG2000-DSPE

声, 设置超声工作时间为 10 s, 间歇时间为 10 s, 全程时间为 10 min, 保护温度为 20 °C, 功率为 200 W, 超声结束后逐渐形成带有微弱蓝色荧光的半透明液体。然后将超声波粉碎后的脂质体囊泡挤压通过孔径为 400、200 nm 的聚碳酸酯膜各 3 次, 制得靶向性蒿甲醚脂质体。

空白靶向脂质体的制备方法同上, 但不含蒿甲醚; 蒿甲醚脂质体的制备方法同上, 但以 PEG2000-DSPE 替代 APGA-PEG2000-DSPE; 探针标记的靶向性脂质体的制备与靶向性蒿甲醚脂质体的过程相

似, 但以香豆素替代蒿甲醚, 并调节脂药比 (脂材-香豆素 1 000 : 1); 探针标记的普通脂质体的制备过程同蒿甲醚脂质体, 但以香豆素替代蒿甲醚, 并调节脂药比 (脂材-香豆素 1 000 : 1)。

2.3 体外跨越 BBB 穿透肿瘤球实验

2.3.1 BBB 模型的建立^[10] 细胞插入器上池以 2% 明胶 D-Hank's 溶液包被后, 每个插入器 (0.4 μm 孔径、12 mm 直径、1.12 cm² 表面积) 中接种 1×10⁴ 个脑微血管内皮细胞, 培养 6 d, 每 2 天更换 1 次培养液。使用电阻仪检测插入器内外两侧的电阻值, 电阻高于 200 Ω·cm² 的可用于实验。

2.3.2 体外脑胶质瘤肿瘤球模型的建立^[11] 将质量浓度为 20 g/L 的琼脂糖凝胶溶液以 100 μL/孔加入到 48 孔细胞培养板中, 冷却至室温; 将 C6 细胞以 5×10³ 个/孔 (200 μL) 接种到上述培养板, 缓慢摇动细胞培养板 2 min 后, 在 5% CO₂、37 °C 的条件下培养 48 h, 每个孔内可形成 1 个肿瘤球。通过显微镜观察, 肿瘤球圆整、无孔洞的可用于实验。

2.3.3 共培养模型的建立 按照 BBB 模型建立的方法将脑微血管内皮细胞种入细胞插入器上池中, 然后于第 4 天将培养好的肿瘤球转入下池共培养, 其培养液是 2 种细胞培养液各一半, 共培养 24 h。

在细胞插入器上池中分别加入探针标记的普通脂质体、靶向性脂质体, 探针终浓度为 5 μmol/L。加药后的细胞插入器, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中, 继续培养 12 h; 将肿瘤球转移到玻底皿中, 每组 3 个肿瘤球, 用新鲜培养液洗涤 3 次, 每皿再加入 100 μL 新鲜培养液; 对于每个肿瘤球, 从肿瘤球顶部到中央以 10 μm 的间隔进行光切, 研究不同层面的探针 (激发波长 353 nm、发射波长 442 nm) 荧光强度。图 2 所示为利用激光共聚焦显微镜观察

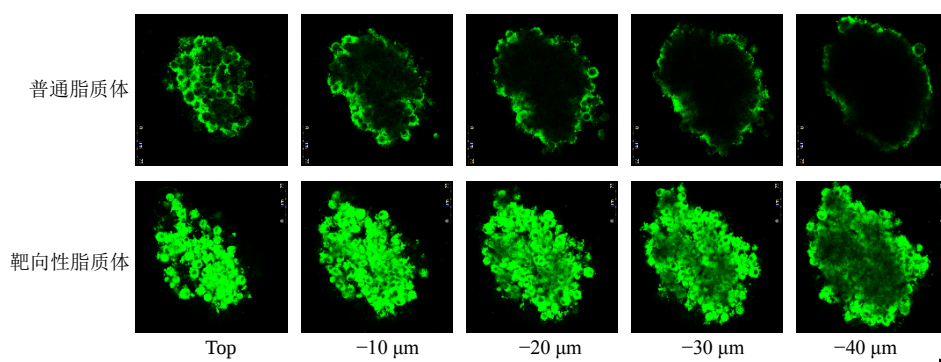


图 2 共培养模型给予不同制剂后 C6 脑胶质瘤肿瘤球的共聚焦显微镜图

Fig. 2 Confocal images of C6 tumor spheroids after applying targeted coumarin liposomes at different layers from top to middle of spheroids

的靶向性脂质体跨越 BBB 后对 C6 肿瘤球的穿透实验照片。在给予普通脂质体、靶向性脂质体后，用共聚焦显微镜对肿瘤球进行自上而下的层切拍照。其结果显示相比于普通脂质体组，靶向性脂质体组荧光强度显著提高，而且可以穿透到肿瘤球的核心。

2.4 脑胶质瘤细胞摄取实验

采用流式细胞仪探究脑胶质瘤细胞对靶向性脂质体的摄取情况。将 C6 细胞以 4×10^5 个/孔的浓度接种到 6 孔细胞培养板中，并在 5% CO_2 、37 °C 的条件下培养 24 h。随后用探针标记的普通脂质体、靶向性脂质体孵育细胞 4 h，荧光探针终浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ ，用空白培养基培养作为对照组。给药孵育后，将细胞用 0.25% 胰蛋白酶收集，并用冷的 PBS 洗 2 次，300 μL PBS 复悬。细胞摄取量用流式细胞仪测定，收集数为每个样品 1×10^4 个细胞，荧光强度表示细胞摄取量的大小。结果如图 3 所示，相对于普通脂质体，靶向性脂质体在 C6 细胞内的摄取量显著增加，为普通脂质体的 (1.86 ± 0.01) 倍。

2.5 体外抗脑胶质瘤活性

将对数生长期的 C6 细胞以 5×10^3 个/孔的量 (180 μL 细胞悬液) 接种到 96 孔板上，设 6 个复孔，

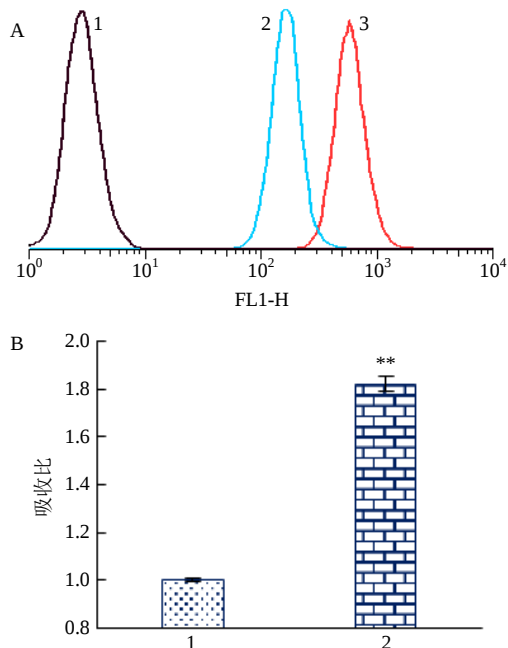
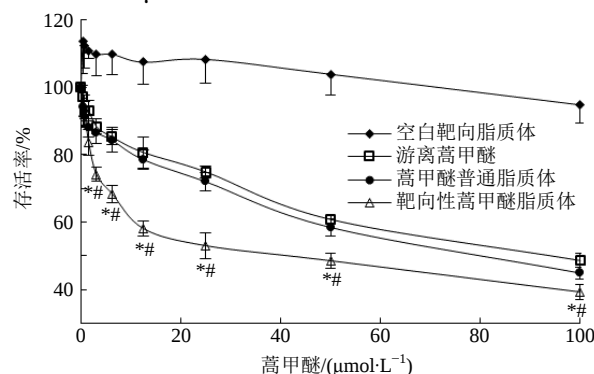


图 3 靶向性脂质体脑胶质瘤摄取 ($n = 3$)
Fig. 3 Uptake of drugs by C6 cells ($n = 3$)

在 37 °C、5% CO_2 培养箱中孵育 24 h，随后每孔给予 20 μL 无血清培养液配制系列浓度的游离蒿甲醚 (蒿甲醚溶解于 DMSO 中，给予细胞时，用无血清培养液稀释 10 倍，DMSO 终浓度不大于 1%)、蒿甲醚脂质体、靶向性蒿甲醚脂质体，蒿甲醚的终浓度为 0~100 $\mu\text{mol/L}$ 。加药后的 96 孔培养板，置于 37 °C、5% CO_2 培养箱中，继续孵育 48 h。孵育结束后，采用碘基罗丹明 B (SRB) 法^[12]来评价各种蒿甲醚脂质体对脑胶质瘤细胞的毒性作用。

结果如图 4 所示，空白靶向脂质体对 C6 细胞增殖无明显抑制作用。与各对照组相比，靶向性蒿甲醚脂质体显著提高了蒿甲醚对 C6 细胞的抑制增殖作用，且对细胞生长抑制作用的顺序为靶向性蒿甲醚脂质体 > 蒿甲醚脂质体 > 游离蒿甲醚，各制剂对 C6 脑胶质瘤细胞的 IC_{50} 值分别为靶向性蒿甲醚脂质体 42 $\mu\text{mol/L}$ 、蒿甲醚脂质体 82 $\mu\text{mol/L}$ 、游离蒿甲醚 95 $\mu\text{mol/L}$ 。



与游离蒿甲醚比较: * $P < 0.05$; 与蒿甲醚普通脂质体比较: # $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs free artemether; # $P < 0.05$ vs artemether liposomes

图 4 靶向性蒿甲醚脂质体对 C6 脑胶质瘤细胞的生长抑制作用 ($n = 6$)

Fig. 4 Survival of brain glioma C6 cells after treatment with various formulations ($n = 6$)

3 讨论

本研究采用 APGA 为靶向性分子，将其与 PEG2000-DSPE 相连，合成了一种新的功能性材料 APGA-PEG2000-DSPE，并以质谱验证了功能材料的成功合成。利用脂质材料与上述功能性材料，制备了靶向性蒿甲醚脂质体和靶向性探针脂质体。与对照脂质体相比，靶向性脂质体可以显著提高药物在脑胶质瘤细胞中的摄取量，其原因可能为靶向性脂质体可以借助于功能性材料 APGA-PEG2000-DSPE 与脑胶质瘤细胞表面过度表达的叶酸受体特异性结合从而介导脂质体的跨膜转运进入肿瘤细胞

内部。共培养实验显示多功能靶向性脂质体可以显著增强药物跨越 BBB 后在脑胶质瘤肿瘤球内部的穿透, 分析其有以下 2 个原因: ①TPGS1000 作为一种已载入《美国药典》的载体材料, 其本身可以对 ABC 转运蛋白具有显著抑制作用, 从而抑制 BBB 上过表达的药物的外排泵对药物的外排, 并逆转 ABC 转运蛋白介导的肿瘤细胞多药耐药性^[13], 使药物得以更多地进入脑内, 同时使得肿瘤细胞对药物更敏感, 药物的抗肿瘤活性更强。TPGS1000 具有长循环作用, 可以提高脂质体的体内外稳定性并延长药物体内时间^[14-15]。②由于脂质体粒径较小且表面修饰有 APGA-PEG2000-DSPE, 其可通过受体配体特异性识别, 介导脂质体跨膜进入肿瘤细胞内部, 并穿透至肿瘤球内部的。TPGS 作为一个分子材料, 其本身具有一定的抗肿瘤作用, 且对肿瘤细胞的细胞毒具有选择性^[16]。TPGS1000 可以通过对细胞器结构的影响、促进肿瘤细胞的凋亡, 导致恶性细胞的死亡, 从而发挥抑制肿瘤的生长作用^[17]。因此, 蒿甲醚脂质体的抗肿瘤活性较游离蒿甲醚的活性强。SRB 结果显示, 靶向性蒿甲醚脂质体显著提高了蒿甲醚的抗肿瘤活性, 进一步说明本研究构建的靶向性脂质体能够提高蒿甲醚抗脑胶质瘤活性。

参考文献

- [1] Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier A F, *et al.* Primary brain tumours in adults [J]. *Lancet*, 2003, 361(9354): 323-331.
- [2] Astner S T, Pihusch R, Nieder C, *et al.* Extensive local and systemic therapy in extraneural metastasized glioblastoma multiforme [J]. *Anticancer Res*, 2006, 26(6C): 4917-4920.
- [3] Nieder C, Grosu A L, Astner S, *et al.* Treatment of unresectable glioblastoma multiforme [J]. *Anticancer Res*, 2005, 25(6C): 4605-4610.
- [4] 严苏纯, 尹云泽, 艾乐, 等. 胃肠安丸合并蒿甲醚注射液治疗刚果(布)胃肠型疟疾临床观察 [J]. *中草药*, 2016, 47(8): 1366-1368.
- [5] Efferth T, Oesch F. Oxidative stress response of tumor cells: microarray-based comparison between artemisinins and anthracyclines [J]. *Biochem Pharmacol*, 2004, 68(1): 3-10.
- [6] Singh N P, Panwar V K. Case report of a pituitary macroadenoma treated with artemether [J]. *Integr Cancer Ther*, 2006, 5(4): 391-394.
- [7] Nakase I, Lai H, Singh N, *et al.* Anticancer properties of artemisinin derivatives and their targeted delivery by transferrin conjugation [J]. *Int J Pharm*, 2008, 345(1/2): 28-33.
- [8] 陈一桢, 张文娟, 唐兰如, 等. 和厚朴酚长循环脂质体的制备及药动学研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(18): 3720-3727.
- [9] Li X Y, Zhao Y, Sun M G, *et al.* Multifunctional liposomes loaded with paclitaxel and artemether for treatment of invasive brain glioma [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(21): 5591-5604.
- [10] Ying X, Wen H, Lu W L, *et al.* Dual-targeting daunorubicin liposomes improve the therapeutic efficacy of brain glioma in animals [J]. *J Control Release*, 2010, 141(2): 183-192.
- [11] Wang X X, Li Y B, Yao H J, *et al.* The use of mitochondrial targeting resveratrol liposomes modified with a dequalinium polyethylene glycol-distearoylphosphatidyl ethanolamine conjugate to induce apoptosis in resistant lung cancer cells [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(24): 5673-5687.
- [12] Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening [J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(3): 1112-1116.
- [13] Zhou J, Zhao W Y, Ma X, *et al.* The anticancer efficacy of paclitaxel liposomes modified with mitochondrial targeting conjugate in resistant lung cancer [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(14): 3626-3638.
- [14] Zhang Z, Yang X, Feng S S. Copolymer technology for advanced nanomedicine [J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2011, 6(4): 583-587.
- [15] Nevozhay D, Kanska U, Budzynska R, *et al.* Current status of research on conjugates and related drug delivery systems in the treatment of cancer and other diseases [J]. *Postepy Hig Med Dosw*, 2007, 61(61): 350-360.
- [16] Mi Y, Liu Y, Feng S S. Formulation of docetaxel by folic acid-conjugated d-alpha-tocopheryl polyethylene glycol succinate 2000 (Vitamin E TPGS2k) micelles for targeted and synergistic chemotherapy [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(16): 4058-4066.
- [17] Zhao Y, Neuzil J, Wu K. Review: Vitamin E analogues as mitochondria-targeting compounds: From the bench to the bedside [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2009, 53(1): 129-139.