

共载紫杉醇和纳米银的叶酸-白蛋白纳米粒的制备和体外评价

高彩芳^{1,2}, 梁剑铭^{1,2}, 秦晶¹, 陆伟根^{2*}, 王建新^{1*}

1. 复旦大学药学院, 智能化递药教育部重点实验室, 上海 201203

2. 上海医药工业研究院, 上海 201203

摘要:目的 以叶酸-白蛋白作为纳米载体, 并包载抗癌药物紫杉醇和纳米银, 以达到增加药物毒性和细胞摄取以及提高抗叶酸受体高表达肿瘤的目的。方法 通过紫外吸收法测定牛血清白蛋白(BSA)的平均叶酸结合数, 采用自组装法制备纳米粒, 并对其形状、粒径、Zeta 电位和包封率进行表征; 另外在口腔上皮癌 KB 细胞模型上考察纳米粒的细胞摄取能力, 以及载药纳米粒的体外抗肿瘤的效果。结果 紫外吸收结果表明叶酸-白蛋白的平均叶酸结合数为 11 个, 在电镜下纳米粒呈球形、大小分布均匀, Fa-BSA-AgNP/PTX 的粒径为 (98.20 ± 3.58) nm, Zeta 电位为 (-39.90 ± 1.98) mV。细胞摄取实验结果显示叶酸修饰白蛋白纳米粒更易被 KB 细胞摄取。细胞毒性和凋亡实验结果表明叶酸的修饰和共载纳米银能够增加药物对肿瘤细胞增殖的抑制能力和促进 KB 细胞凋亡。结论 制备的纳米粒粒径小, 包封率高, 可以增强纳米粒被摄取的能力和载药纳米粒的毒性。

关键词: 叶酸; 牛血清白蛋白; 紫杉醇; 纳米银; 口腔上皮癌; 体外评价

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)12-2786-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.12.009

Preparation and *in vitro* evaluation of folic acid-albumin nanoparticles co-loaded with paclitaxel and nanosilver

GAO Cai-fang^{1,2}, LIANG Jian-ming^{1,2}, QIN Jing¹, LU Wei-gen², WANG Jian-xin¹

1. School of Pharmacy, Fudan University, Key Laboratory of Smart Drug Delivery, Ministry of Education, Shanghai 201203, China

2. Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective Paclitaxel and nanosilver were co-encapsulated into folic acid-albumin nanoparticles to increase the toxicity and uptake of the drug and improve the targeting ability of tumor that highly expressed folic acid (Fa) receptor. **Methods** The mean Fa binding number of bovine serum albumin (BSA) was determined by ultraviolet absorption method. The nanoparticles were prepared through self-assemble method and then its shape, particle size, Zeta potential, and encapsulation efficiency were characterized with the dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscope (TEM). In addition, the cellular uptake of nanoparticles and the *in vitro* anti-tumor effect of drug-loaded nanoparticles were investigated on the KB cells model of oral epithelial carcinoma. **Results** Ultraviolet absorption results showed that the average Fa binding number of Fa-BSA was 11. The nanoparticles were discrete and uniform spheres with the average size of (98.20 ± 3.58) nm and Zeta potential of (-39.90 ± 1.98) mV. Cellular uptake experiments showed that folate-modified albumin nanoparticles were more easily taken up by KB cells. Cytotoxicity and apoptosis assay indicated that the modification of folic acid and co-loaded nanosilver could increase the inhibition of tumor cell proliferation and promote KB cells apoptosis. **Conclusion** The prepared nanoparticles have small particle size and high encapsulation efficiency, which can enhance the ability of the nanoparticles to be uptaken and the toxicity of the drug-loaded nanoparticles against tumor cells.

Key words: folic acid; bovine serum albumin; paclitaxel; nano silver; oral epithelial carcinoma; *in vitro* evaluation

世界卫生组织(WHO)发布的一份全世界癌症统计报告显示,2012 年全世界癌症病例 1 400 万例,估计 20 年后每年癌症病例总数将上升至 2 200 万,严重威胁着全球范围内人类的健康^[1]。化疗仍是临床上治疗肿瘤的一种重要手段,但由于多数化疗药物水溶性差和缺乏肿瘤选择性,因此存在治疗效果

收稿日期: 2018-05-30

基金项目: 国家重大科学研究计划(“973”)项目“用于脑部肿瘤治疗的新型纳米药物研究”(2013CB932500)

作者简介: 高彩芳(1992—),女,硕士研究生,从事新型给药系统研究。Tel: (021)51980086 E-mail: fdgaocaifang@126.com

*通信作者 王建新,教授,从事新型给药系统研究。Tel: (021)51980088 E-mail: jxwang@shmu.edu.cn

陆伟根,研究员,从事药物新制剂与新剂型研究与开发。Tel: (021)20572000 E-mail: sipiluwg@163.com

差和毒副作用大等问题^[2-4]。纳米技术的出现为药物向肿瘤组织的靶向输送、提高治疗效果提供了机遇。

肿瘤的快速生长亟需大量的营养物质,因此生成大量的肿瘤新生血管,但这些新生血管由于发育不完善,会有大量的缝隙,纳米粒由于其粒径小,能够特异性地通过狭缝在肿瘤部位蓄积,这就是增强渗透与滞留效应,即纳米粒的被动靶向^[5]。血清白蛋白来源广泛,体内半衰期长,含有多个配体结合位点,是疏水性物质体内输送的天然载体,能可逆性结合将各类物质输送到相应组织。白蛋白性质较稳定,对 pH 值、温度、有机溶剂都具有一定的耐受性,因而适用于多种纳米粒的制备^[6]。其次,与正常细胞相比,肿瘤细胞表面还高表达很多受体,叶酸受体是最为常见和研究较多的受体之一。在一些上皮细胞系肿瘤,如乳腺癌、卵巢癌和口腔上皮癌等^[7-8],其细胞膜表面上的叶酸受体数量和活性显著高于正常细胞。叶酸(Fa)作为Fa受体的主要配体,由蝶啶、谷氨酸和对氨基苯甲酸3部分组成。Fa的谷氨酸基团的 α -和 γ -羧基具有较高的反应活性,能够与具有氨基、巯基或羟基的物质反应进行偶联。在药物载体上偶联Fa,通过Fa与Fa受体的配体-受体结合作用,使纳米粒特异性地识别肿瘤细胞,能够提高纳米粒的肿瘤靶向性,从而增强其抗肿瘤药效和降低毒副作用^[9-11]。

紫杉醇(PTX)是一种从红豆杉树皮中分离提取的天然次生代谢产物二萜生物碱类化合物,在临床上已经广泛用于乳腺癌、卵巢癌、头颈癌和肺癌的治疗^[12-15]。纳米银(AgNP)是利用纳米技术制备而成的纳米级银单质,其粒径范围在10~100 nm。AgNP已广泛应用于光学、电子、催化和生物医药等领域。据报道,AgNP不仅对细菌、真菌和病毒等致病微生物具有强烈的抑制和杀伤作用^[16],还具有抗肿瘤的生物学活性,其抗肿瘤作用已在体内外实验中得到了证实^[17-18]。因此,本实验以高表达Fa受体的人口腔上皮癌KB细胞作为模型细胞,采用主动靶向策略,将Fa修饰在牛血清白蛋白(BSA)上,并以其作为载体载入PTX和AgNP,从而将药物靶向递送肿瘤部位,抑制肿瘤的生长。

1 材料

1.1 试剂

BSA(质量分数96%,批号A116563)、三(2-羧基乙基)磷盐酸盐(TCEP)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、*N*-羟基琥珀酰

亚胺(NHS)和香豆素-6(质量分数>98%,批号C100929),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;Fa(质量分数≥97%,批号67000834)、硝酸银和4-二甲氨基吡啶(DMAP),国药集团化学试剂有限公司;PTX(批号N1005A,质量分数>99%),大连美仑生物技术有限公司;Hoechst 33342,批号14533,北京泛博生物化学有限公司;胎牛血清(FBS),批号A37F00H,美国Invitrogen公司;青链双抗(PS)、胰蛋白酶-EDTA溶液、非必需氨基酸(NEAA)和磷酸盐缓冲液(PBS),美国Corning公司;四甲基偶氮唑盐(MTT),美国Sigma-Aldrich公司;碘化丙啶(PI),上海优宁维生物科技股份有限公司;其他常用试剂均为分析纯,国药集团化学试剂公司。

1.2 仪器

Malvern Nano-ZS激光粒度和Zeta电位测定仪,英国Malvern公司;IKA基本型磁力搅拌器,德国IKA公司;湘仪H1850R台式高速冷冻离心机,湖南湘仪实验仪器开发有限公司;BS224S电子天平,北京赛多利斯仪器系统有限公司;JEM-2100F 200 kV场发射透射电子显微镜,日本电子株式会社;高效液相色谱,美国安捷伦科技有限公司;循环水式真空泵,上海予华仪器有限公司;Heraeus BB15二氧化碳培养箱,美国Thermo Fisher Scientific公司;倒置显微镜,上海光学仪器六厂;Infinitie 200酶标仪,瑞士Tecan公司;倒置荧光显微镜,德国Leica公司。

1.3 细胞

人口腔上皮癌细胞株KB细胞,购自中国科学院上海细胞库。

2 方法

2.1 Fa-BSA的合成和表征

Fa修饰的载体能够提高纳米粒对Fa受体阳性肿瘤细胞的靶向递送能力,根据已报道方法进行制备^[19-20]。称取50 mg Fa、300 mg EDC、300 mg NHS和5 mg DMAP,加入5 mL的无水二甲基亚砜(DMSO)中,并在55℃中避光搅拌2 h进行活化。然后将40 mg BSA溶解到10 mL Tris缓冲液中,再将上述反应液滴加到BSA溶液中,室温避光反应过夜。经过上述步骤,反应溶液加入透析袋(截留相对分子质量14 000)进行透析,先用10 mmol/L的碳酸氢钠溶液透析48 h,之后超纯水透析12 h,最后4℃保存。

BSA上连接的Fa数量通过紫外法进行测定。

精密配制 0.2 mg/mL 的 Fa 溶液（溶剂为 0.1 mol/L 的碳酸钠缓冲液）作为对照品溶液。配制一系列质量浓度的对照品溶液，建立标准曲线。再用 0.1 mol/L 碳酸钠溶液将样品稀释到合适质量浓度，于 366 nm 测定其吸光度（ A ）值，根据标准曲线计算溶液中 Fa 的质量浓度。蛋白质量浓度（ ρ_{BSA} ）使用 BCA 法测定。最后 BSA 的平均 Fa 偶联数（ m ）按公式进行计算。

$$m = M_{\text{BSA}} \times C_{\text{Fa}} / \rho_{\text{BSA}}$$

m 为 BSA 上的 Fa 偶联数， M_{BSA} 为 BSA 的摩尔质量， C_{Fa} 为溶液内 Fa 的浓度， ρ_{BSA} 为溶液内 BSA 的质量浓度

2.2 纳米粒的制备和表征

采用晶种法制备共载纳米粒中的 AgNP^[21]。将 1.5 mg 的柠檬酸三钠和 1 mg 的硝酸银溶于 40 mL 超纯水中，在冰浴中搅拌并混合均匀，之后将 1.2 mL 0.1 mol/mL 硼氢化钠逐渐滴加到上述溶液中。反应完成后，银种溶液会变成棕黄色，将成功制备的银种溶液置室温避光保存备用。然后将 400 μL 的银种溶液加入 8 mL 的葡萄糖溶液中（2.5 mg/mL），并在 75 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中搅拌 5 min，最后将 800 μL 硝酸银溶液（10 mg/mL）缓慢滴加到上述反应液中反应 10 min，经 0.22 μm 滤膜滤过，备用。

本研究采用自组装法制备纳米粒。先配制 8 mL 的蛋白溶液（BSA 或者 Fa-BSA，质量浓度为 5 mg/mL），加入 120 μL Tris 缓冲液和 200 μL 的 TCEP 溶液（32 mg/mL），混合均匀。精密配制 10 mg/mL 的 PTX 溶液（DMSO 溶解），取预先配制好的 PTX 溶液 400 μL （若共载 AgNP，则在加入 PTX 后立即再加入 5 mL 已制备好的 AgNP，否则不需要）加入上述的蛋白溶液中，并以 1 200 r/min 的转速搅拌 2 h。然后将反应液进行冰浴超声，超纯水透析 1 h，经 0.22 μm 滤膜滤过后，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下，以 8 000 r/min 的转速离心 20 min，收集沉淀和加入等体积超纯水重悬。制备的纳米粒粒径、Zeta 电位和聚合物分散性指数（polydispersity index, PDI）使用动态光散射技术进行分析，形态在透射电镜下进行观察。HPLC 法测定 PTX 的包封率^[22]，蛋白浓度使用 BCA 法测定^[23]，分别按公式进行计算，得到纳米粒的载药量（DL）和包封率（EE）。

$$\text{DL} = VC_{\text{PTX}} / m_{\text{NP}}$$

$$\text{EE} = VC_{\text{PTX}} / m_{\text{total}}$$

C_{PTX} 为溶液中 PTX 的质量浓度， V 为溶液体积， m_{NP} 为纳米粒的总质量， m_{total} 为 PTX 的投药量

2.3 细胞摄取

取融合程度为 70%~80% 的 KB 细胞，消化并配成单细胞混悬液，以 3×10^4 /孔的密度接种于 12 孔板内，每孔 1 mL 培养基，置于培养箱中过夜，使细胞贴壁。将各组载香豆素-6（制备方法如载药纳米粒的制备方法，只是将 PTX 溶液换成香豆素-6 溶液，其余不变，加入香豆素-6 溶液的质量为载体蛋白的 1/100）的纳米粒用培养基稀释，使香豆素-6 的终质量浓度为 50 ng/mL，然后分别加 1 mL 上述稀释的纳米粒溶液放入相应各孔中。置于培养箱孵育 4 h 后，加入提前配制好的 Hoechst 33342（1：1 000），继续孵育 30 min。弃掉培养液，用预冷的 PBS 洗涤 3 次，最后每孔加 300 μL PBS 缓冲液，于倒置荧光显微镜下进行定性观察并拍照。

2.4 细胞毒性

采用 MTT 法测定各制剂对 KB 细胞的细胞毒性。以每孔 1×10^4 个 KB 细胞接种到 96 孔板上，在培养箱中培养 24 h 后，吸去培养基，分别加入预先用培养基配制好的不同质量浓度梯度的 PTX 和载 PTX 的纳米粒溶液 100 μL ，轻轻晃动均匀，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中，孵育 48 h；然后将上述药液弃掉，每孔加入 20 μL 预先配好的 5 mg/mL MTT 溶液，继续培养 4 h，吸弃 MTT 溶液；然后每孔加入 100 μL DMSO 溶解生成的紫色结晶甲臞（MTT 法的检测原理为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性 MTT 还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲臞并沉积在细胞中，而死细胞无此功能，故用 DMSO 溶解生成的甲臞，并在酶标仪下进行测定），置于微孔板恒温振荡仪上，150 r/min 低速振荡 10 min；然后用酶标仪在 490/570 nm 波长下测定 A 值，进而计算各组对 KB 细胞的抑制率。空白组是无细胞的 96 孔板加 100 μL DMSO 溶剂，对照组是加培养基的正常细胞组。

$$\text{抑制率} = 1 - (A_{\text{处理}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

在 Graphped prism 7 软件中，以细胞抑制率为纵坐标，以 PTX 的质量浓度的对数值为横坐标，绘制细胞抑制率曲线，应用 logistic 模型拟合量效关系，计算半数抑制浓度（ IC_{50} ）。

2.5 细胞凋亡

将处于对数生长期的 KB 细胞胰酶消化，然后以 1×10^5 /孔的密度接种于 12 孔细胞培养板，置于培养箱，继续孵育 12 h。然后分别加入 PTX、载 PTX 的纳米粒（其中 PTX 的质量浓度 5 $\mu\text{g/mL}$ ，培

培养基稀释) 1 mL, 置于培养箱中孵育 48 h, 弃去培养基, 每孔加入 1 mL 已配好的凋亡检测试剂 (Hoechst 和 PI), 并在 37 °C 条件下孵育 30 min, 然后弃掉检查试剂, 用 PBS 轻轻润洗 3 次, 最后再加 200 μ L PBS。采用倒置荧光显微镜观察 KB 细胞凋亡的相关特征。

3 结果

3.1 Fa-BSA 的表征

作为天然的药物载体, BSA 具有良好的生物相容性和稳定的生化性质^[24]。在 BSA 的氨基酸构成中, 含有多个赖氨酸和精氨酸, 这使 BSA 拥有大量的氨基残基, 而这些氨基残基可作为反应位点, 通过化学偶联的方式连接不同的化学基团, 本实验通过 Fa 的羧基与 BSA 的氨基反应, 成功制备出 Fa-BSA。紫外吸收法测定得到 Fa 在 BSA 上的偶联数为 11 个。许多研究证明, 当大分子上的 Fa 偶联数目超过 3 时, Fa 就能提高大分子在 Fa 受体阳性细胞的摄取量。而当 Fa 偶联数超过 10 时, Fa 修饰载体的纳米粒的细胞摄取量并没有显著增加^[25], 因此本实验所制备的 FA-BSA 能够很好地提高药物的摄取量, 适用于后续的实验。

3.2 纳米粒的表征

按照“2.2”项下方法制备纳米粒, 以纳米粒的粒径和包封率作为评价指标, 从冰浴超声的时间、功率、载体浓度和药物浓度 4 个方面进行单因素考察, 最终确定纳米粒的最优工艺为超声功率 300 W, 超声时间 5 min (超声 3 s, 停 2 s), 蛋白质量浓度 5 mg/mL, 药物质量浓度 0.5 mg/mL。纳米粒形态、粒径和 Zeta 电位分布如图 1 所示, 纳米粒呈较规则的球状, 并且粒径大小与动态光散射法测出来的相符。图 1 中所示 4 种纳米粒的 PDI 均小于 0.3, 提示纳米粒的粒径分布比较均一。本实验所制备的纳米粒均带负电荷, 而 Fa-BSA/PTX $[-38.00 \pm 2.67)$ mV] 和 Fa-BSA-AgNP/PTX $[-39.90 \pm 1.98)$ mV] 的 Zeta 电位与 BSA/PTX $[-30.20 \pm 1.34)$ mV] 和 BSA-AgNP/PTX $[-31.40 \pm 0.84)$ mV] 相比有所

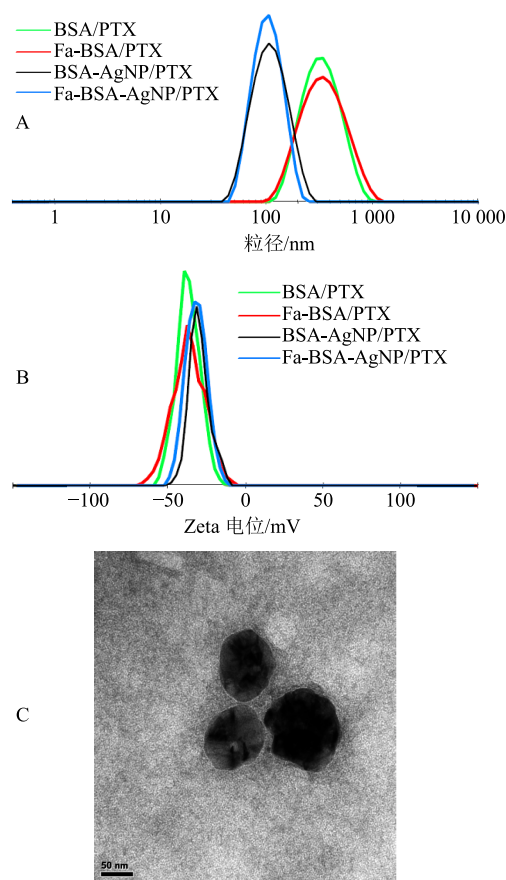


图 1 Fa-BSA 纳米粒的粒径分布 (A)、Zeta 电位 (B) 和电镜图 (C)

Fig. 1 Size distribution (A), Zeta potential (B), and electron photomicrograph (C) of Fa-BSA nanoparticles

下降, 这是因为 Fa 具有 2 个羧基, 所带电荷为负电荷, 而 BSA 的反应位点为氨基, 带正电荷, 两者通过化学偶联后, BSA 每偶联 1 个 Fa 就会增加 2 个负电荷, 所以 Fa 修饰的 2 种纳米粒 Fa-BSA/PTX 和 Fa-BSA-AgNP/PTX 带有更多的负电荷。由表 1 可知, 纳米粒共载 AgNP 后粒径明显变小, 这可能与 BSA (Fa 修饰的 BSA) 围绕 AgNP 的核心进行组装, AgNP 起到压缩粒子大小的作用。其次合成的载药纳米粒的包封率和载药量都较高, 符合实验的要求, 且共载 AgNP 后纳米粒的载药能力提高。另外, 本实验只测定了纳米粒对 PTX 的包载能力, 后续还应

表 1 不同纳米粒的理化性质 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Physicochemical characteristics of various nanoparticles ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

纳米粒	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	EE/%	DL/%
BSA/PTX	279.2 $\pm$ 3.84	0.20 $\pm$ 0.01	-30.2 $\pm$ 1.34	6.34 $\pm$ 0.28	74.45 $\pm$ 3.27
Fa-BSA/PTX	282.9 $\pm$ 2.27	0.24 $\pm$ 0.03	-38.0 $\pm$ 2.67	6.70 $\pm$ 0.32	75.26 $\pm$ 2.94
BSA-AgNP/PTX	100.1 $\pm$ 5.28	0.24 $\pm$ 0.01	-31.4 $\pm$ 0.84	8.45 $\pm$ 0.18	86.53 $\pm$ 4.26
Fa-BSA-AgNP/PTX	98.2 $\pm$ 3.58	0.22 $\pm$ 0.04	-39.9 $\pm$ 1.98	8.69 $\pm$ 0.42	87.75 $\pm$ 2.38

该采用电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS) 考察纳米粒对 AgNP 的包载能力。

3.3 细胞摄取

纳米粒对肿瘤细胞的杀伤作用与肿瘤细胞对纳米粒的摄取量直接相关。在本研究中,使用 Fa 修饰

BSA, 包载香豆素-6 制备成为纳米粒, 提高细胞对纳米粒的摄取作用。KB 细胞的摄取结果见图 2, BSA 纳米粒在 KB 细胞内出现少量的荧光信号, 表明 BSA 纳米粒可以促进香豆素-6 穿透细胞膜进入细胞。而将 Fa 修饰的 BSA 纳米粒组, 与 BSA 纳米

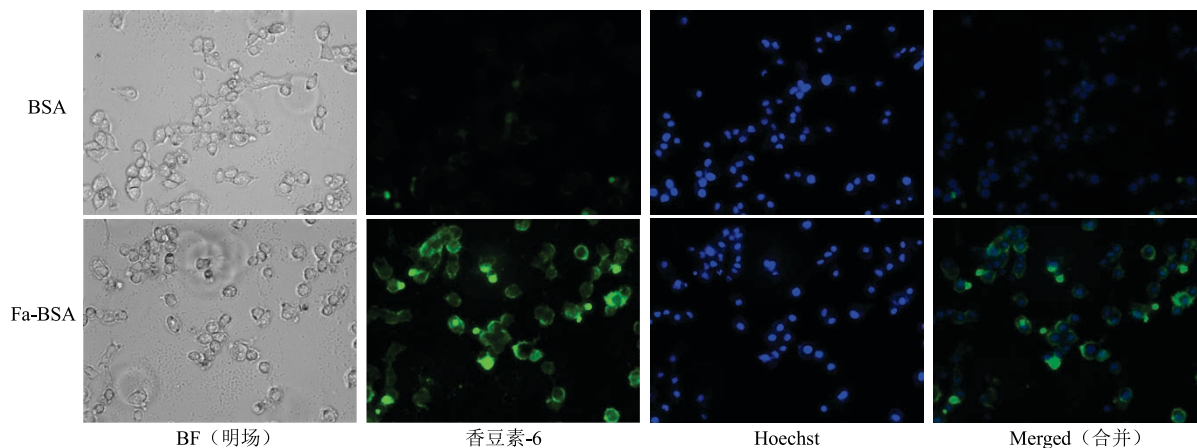


图 2 KB 细胞对不同载香豆素-6 纳米粒的摄取情况

Fig. 2 Cellular uptake of different coumarin-6 loaded nanoparticles on KB cells

粒相比, KB 细胞内的荧光信号明显增强, 说明 Fa 修饰后, 通过与 KB 细胞表面高表达的 Fa 受体结合, 显著促进了纳米粒被细胞摄取。

3.4 细胞毒性

MTT 结果如图 3, 游离 PTX 和各载 PTX 的纳米粒均能够抑制 C6 细胞的增殖, 载药纳米粒的抑制能力呈现浓度依赖性, 但 PTX 在给药浓度范围内的抑制能力几乎一致, 这说明游离 PTX 对 KB 细胞的杀伤能力较差, 这可能与 PTX 被细胞吸收摄取的效率较低有关, 其他纳米粒组可以明显提高 PTX 的抗 KB 细胞增殖的能力。利用统计软件 Graphpad prism 7 对数据进行统计分析, 得到各载药纳米粒组 IC_{50} 值。BSA/PTX、Fa-BSA/PTX、BSA-AgNP/PTX、Fa-BSA-AgNP/PTX 的 IC_{50} 值分别为 2.437 0、0.934 6、0.712 9、0.536 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。将 PTX 包载在 BSA 纳米粒后, 并与 AgNP 共载, 以及在 BSA 表面修饰 Fa 后, 纳米粒组的 IC_{50} 依次降低。这表明 BSA 纳米粒可以提高 PTX 的细胞毒性, 与 AgNP 共载后进一步加强了 PTX 的杀伤能力, Fa 修饰后, 通过受体-配体结合 Fa-BSA-AgNP/PTX 的 IC_{50} 值仅为 BSA/PTX 组的 22%。

3.5 细胞凋亡

细胞凋亡通常是药物抗肿瘤作用的最终体现, 其总是伴随着细胞形态变化和细胞膜通透性的改变, 如细胞核的固缩、细胞膜完整性的缺失等^[26-27]。

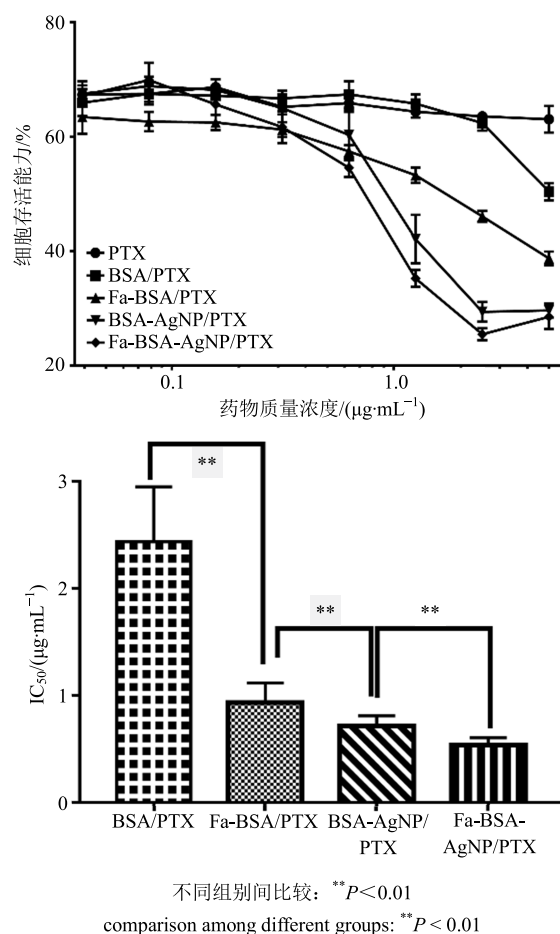


图 3 不同 PTX 制剂对 KB 细胞的毒性 ($n = 6$)

Fig. 3 Cytotoxicity of free PTX and different PTX nanoparticles against KB tumor cells ($n = 6$)

因此, 通过 Hoechst 33342 和 PI 染色双标记细胞, 可观察到凋亡细胞的形态变化。如图 4 所示, PBS 组中的细胞为正常细胞, 呈圆状, 外形规整, 形态饱满, 并且无红色荧光。当经过含有 PTX 的药物 (PTX、BSA/PTX、Fa-BSA/PTX、BSA-AgNP/PTX 和 Fa-BSA-AgNP/PTX) 处理后, 所有细胞均变圆皱缩, 细胞核出现多核和微核的特征结构, 提示药物引起了 DNA 损伤和有丝分裂阻滞。所有给药组均发现有红色荧光的 PI 阳性细胞核, 提示细胞经药物处理后能破坏细胞膜的完整性, 并且红色荧光的信号强度依次增强, 这与 MTT 的结果一致。

4 讨论

作为新型的功能材料, AgNP 具有独特的抗肿瘤活性, 其能够通过内吞进入细胞内并在线粒体周围聚集, 降低线粒体呼吸链复合酶活性, 并引起线粒体的功能丧失^[21,28-29]。其次 AgNP 作为潜在的促进剂, 能与细胞表面蛋白巯基相互作用促进纳米粒内化至细胞中。AgNP 在 BSA-AgNP/PTX 和 Fa-BSA-AgNP/PTX 这 2 个递药系统中, 不仅充当治疗药物, 而且还能作为促进剂通过与细胞表面蛋白的巯基作用增加细胞对纳米粒的摄取。

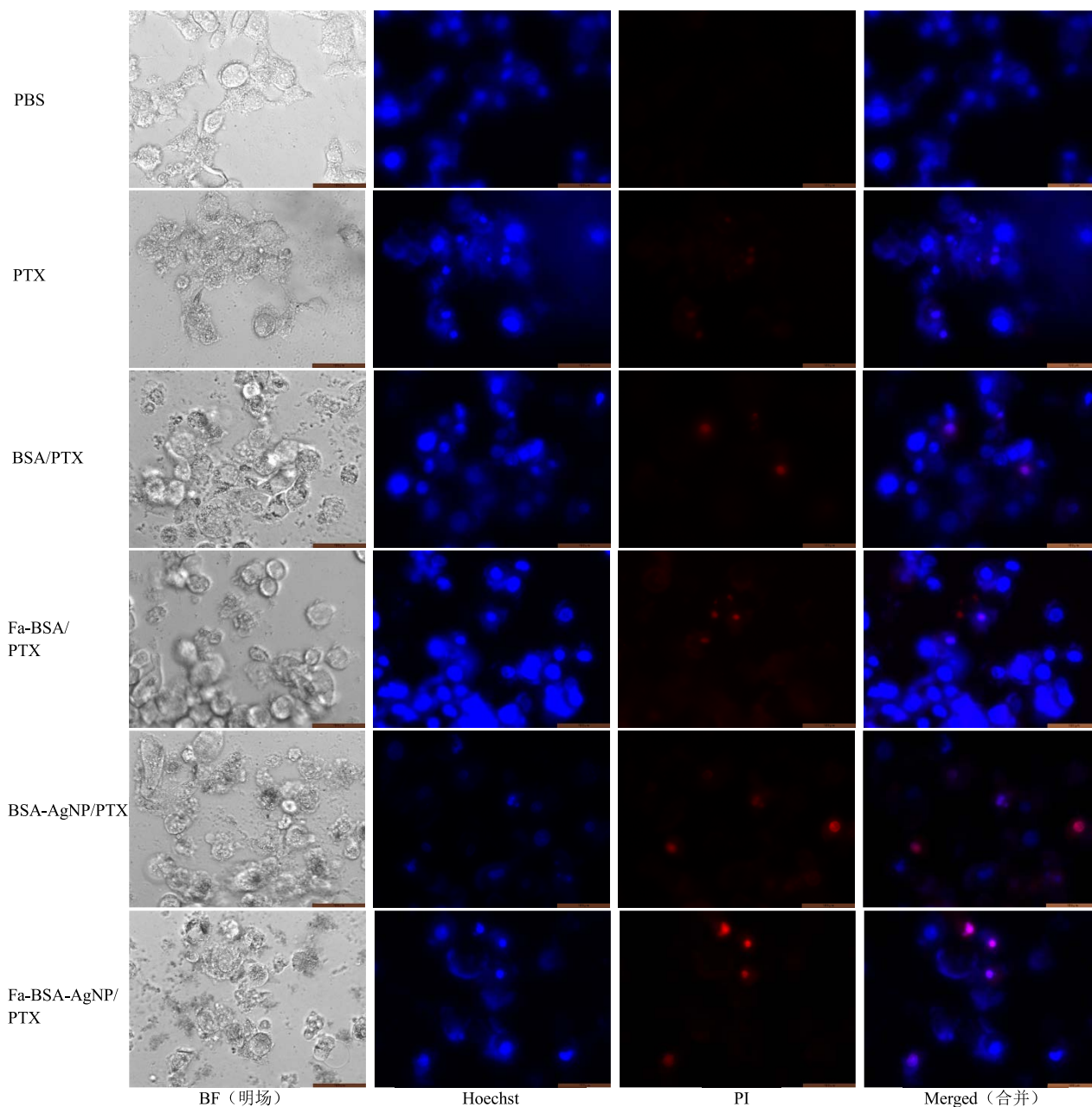


图 4 不同制剂对 KB 细胞凋亡的影响 (标尺: 100 μm)

Fig. 4 Apoptosis qualitative analysis of different PTX formulation against KB tumor cells (bar: 100 μm)

本实验定性地考察 KB 细胞对 BSA 和 Fa 修饰 BSA 纳米粒的摄取情况以及不同制剂组对 KB 细胞凋亡的影响, 尽管能大致反映不同制剂被摄取和促进凋亡的情况, 但无法显示具体的数值, 后续可以通过高效液相色谱和流式细胞仪准确定量, 提示共载 AgNP 和 Fa 修饰后与只载 AgNP 和未修饰组的具体差异情况。本实验制备了共载 PTX 和 AgNP 的 Fa-BSA 纳米粒, 并在体外 Fa 受体高表达的 KB 细胞上考察了其细胞摄取、细胞毒性和凋亡情况。与未修饰 Fa 纳米粒组和单载 PTX 纳米粒组相比, Fa 修饰纳米粒组和共载 AgNP 组可明显提高细胞摄取纳米粒的能力和对肿瘤细胞的毒性, 为载药 Fa-BSA 纳米粒在体内抗肿瘤研究提供了参考。

参考文献

- [1] Bray F, Ren J S, Masuyer E, *et al.* Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008 [J]. *Int J Cancer*, 2013, 132(5): 1133-1145.
- [2] 桑秀丽, 刘国燕. 西黄丸联合紫杉醇和铂类新辅助化疗对晚期宫颈癌患者术后疗效的影响 [J]. *药物评价研究*, 2017, 40(8): 1112-1116.
- [3] Cho K, Xu W, Nie S, *et al.* Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(5): 1310-1316.
- [4] 任宁, 程维刚, 卫利民. 乌苯美司联合 XEC 化疗方案治疗三阴性乳腺癌的临床研究 [J]. *现代药物与临床*, 2018, 33(1): 128-133.
- [5] Torchilin V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011, 63(3): 131-135.
- [6] 季秀峰, 石莉, 邓意辉. 白蛋白纳米粒药物传递系统的研究进展 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2010, 27(12): 968-978.
- [7] Bagnoli M, Canevari S, Figini M, *et al.* A step further in understanding the biology of the folate receptor in ovarian carcinoma [J]. *Gynecol Oncol*, 2003, 88(2): 140-144.
- [8] 黄英男. 叶酸受体在肿瘤靶向诊断和治疗中的应用 [J]. *复旦学报: 医学版*, 2012, 39(1): 74-79.
- [9] 郭梦斐, 瞿鼎, 王理想, 等. 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 [J]. *中草药*, 2017, 48(9): 1748-1756.
- [10] Pearson R M, Sen S, Hsu H J, *et al.* Tuning the selectivity of dendron micelles through variations of the poly(ethylene glycol) corona [J]. *ACS Nano*, 2016, 10(7): 6905-6914.
- [11] 张琳华, 何颖娜, 马桂蕾, 等. 叶酸靶向紫杉醇聚合物纳米囊泡的制备及其抗肿瘤活性研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2010, 45(22): 1742-1748.
- [12] 赵艳芳, 王世辉, 邹余粮. 顺铂或奈达铂联合紫杉醇治疗宫颈癌的疗效比较 [J]. *药物评价研究*, 2017, 40(1): 87-91.
- [13] Li F, Lu J, Liu J, *et al.* A water-soluble nucleolin aptamer-paclitaxel conjugate for tumor-specific targeting in ovarian cancer [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1-14.
- [14] 史清文. 天然药物化学史话: 紫杉醇 [J]. *中草药*, 2011, 42(10): 1878-1884.
- [15] 高仑, 孙秀娥. 克唑替尼联合紫杉醇和顺铂治疗 ALK 阳性非小细胞肺癌的疗效观察 [J]. *现代药物与临床*, 2016, 31(12): 1994-1998.
- [16] Soni N, Dhiman R C. Phytochemical, anti-oxidant, larvicidal, and antimicrobial activities of castor (*Ricinus communis*) synthesized silver nanoparticles [J]. *Chin Herb Med*, 2017, 9(3): 289-294.
- [17] Morones J R, Elechiguerra J L, Camacho A, *et al.* The bactericidal effect of silver nanoparticles [J]. *Nanotechnology*, 2005, 16(10): 2346-2353.
- [18] 陈嵘, 荣凯峰, 吕中, 等. 纳米银的制备及其生物活性研究进展 [J]. *武汉工程大学学报*, 2010, 32(11): 1-7.
- [19] Liang J, Li R, He Y, *et al.* A novel tumor-targeting treatment strategy uses energy restriction via co-delivery of albendazole and nanosilver [J]. *Nano Res*, 2018, doi: 10.1007/s12274-018-2032-x.
- [20] Meng H, Chen J Y, Mi L, *et al.* Conjugates of folic acids with BSA-coated quantum dots for cancer cell targeting and imaging by single-photon and two-photon excitation [J]. *JBIC*, 2011, 16(1): 117-123.
- [21] 梁剑铭. 透明质酸修饰纳米银抗肿瘤应用初步研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2014.
- [22] 中国药典 [S]. 二部. 2015.
- [23] Krieg R C, Yan D K S, Knuechel R. Protein quantification and its tolerance for different interfering reagents using the BCA-method with regard to 2D SDS PAGE [J]. *J Biochem Biophys Meth*, 2005, 65(1): 13-19.
- [24] Zhu Y, Tong W, Gao C, *et al.* Fabrication of bovine serum albumin microcapsules by desolvation and destroyable cross-linking [J]. *J Mater Chem*, 2008, 18(10): 1153-1158.
- [25] Hong S, Leroueil P R, Majoros I J, *et al.* The binding avidity of a nanoparticle-based multivalent targeted drug delivery platform [J]. *Chem Biol*, 2007, 14(1): 107-115.
- [26] Joza N, Susin S A, Daugas E, *et al.* Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death [J]. *Nature*, 2011, 410(6828): 549-554.
- [27] Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death [J]. *Toxicol Pathol*, 2007, 35(4): 495-516.
- [28] Bressan E, Ferroni L, Gardin C, *et al.* Silver nanoparticles and mitochondrial interaction [J]. *Int J Dent*, 2013, doi: 10.1155/2013/312747.
- [29] Costa C S, Ronconi J V, Daufenbach J F, *et al.* In vitro effects of silver nanoparticles on the mitochondrial respiratory chain [J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 342(1/2): 51-56.