

• 药剂与工艺 •

雷公藤红素/丹参酮 II_A 磺酸钠共传递脂质体的制备、表征及协同抗乳腺癌研究秦 越^{1,2,3}, 王理想^{2,3}, 郭梦斐^{2,3}, 瞿 鼎^{2,3*}, 陈 彦^{2,3*}

1. 安徽中医药大学, 安徽 合肥 230012

2. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 江苏 南京 210028

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

摘要: 目的 探索组分配比可控的雷公藤红素(Cel)/丹参酮 II_A 磺酸钠(STS)共传递脂质体(celastrol/sodium tanshinone II_A sulfonate-co-loaded liposome, Cel/STS-CL)制备工艺, 并验证其体外抗乳腺癌协同效应。方法 通过体外 MTT 实验确定 Cel 和 STS 协同抗肿瘤的最佳配比, 以薄膜分散法构建最佳比例的双组分共传递脂质体系统, 借助动态光散射(DLS)、透射电镜(TEM)及 HPLC 等手段表征脂质体的制剂学和形态学行为。同时, 以人乳腺癌 MCF-7 细胞为模型, 通过考察脂质体胞内滞留、抗细胞增殖以及诱导细胞凋亡等实验验证递药系统体外协同抗乳腺癌效应。结果 通过常规的薄膜分散法将亲水性和亲脂性组分同时高效地包埋至脂质体中, 该粒子形态圆整, 双分子层清晰可见, 平均粒径为(104.7±2.1) nm, 多分散指数(PDI)为0.217±0.002, Zeta 电位为(-48.8±2.3) mV, Cel 和 STS 的包封率分别为(82.2±2.7)%和(66.2±2.3)%。细胞实验表明, Cel/STS-CL 的细胞摄取能力相比对照组提高 30 倍, 对 MCF-7 细胞的半数抑制浓度(IC₅₀)为(1.42±0.12) μmol/L, 相较单组分治疗组的协同指数为 0.81; Cel/STS-CL 诱导 MCF-7 细胞凋亡率达到 80%, 相比雷公藤红素单组分脂质体(celastrol-loaded liposome, Cel-Lip)提高 0.1 倍。结论 所构建的 Cel/STS-CL 制备工艺可靠, 体外协同抗乳腺癌效应明显, 具有较高的后续研究价值。

关键词: 雷公藤红素; 丹参酮 II_A 磺酸钠; 共传递脂质体; 乳腺癌协同治疗; 协同效应; 协同抗肿瘤; 薄膜分散法

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)22-5271-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.22.009

Celastrol/sodium tanshinone II_A sulfonate-co-loaded liposome: Preparation, characterization, and synergistic anti-breast cancer treatmentQIN Yue^{1,2,3}, WANG Li-xiang^{2,3}, GUO Meng-fei^{2,3}, QU Ding^{2,3}, CHEN Yan^{2,3}

1. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China

2. Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

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

Abstract: Objective To explore the preparation technology of celastrol/sodium tanshinone II_A sulfonate-co-loaded liposome (Cel/STS-CL) and verify the synergistic anti-breast cancer effects *in vitro*. **Methods** The optimal ratio of celastrol to sodium tanshinone II_A sulfonate for synergistic anti-breast cancer effect was explored by MTT assay. The liposome was prepared by conventional film dispersion method. The physiochemical properties and morphology were measured by dynamic light scattering

收稿日期: 2018-06-26

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(81503264); 国家自然科学基金资助项目(81673606); 江苏省科教强卫医学人才项目(ZDRCA 2016036); 江苏省医学青年重点人才项目(QNRC2016631)

作者简介: 秦 越(1994—), 女, 硕士在读, 研究方向为药剂学。Tel: 13505515741 E-mail: 270964569@qq.com

***通信作者** 陈 彦, 女, 研究员, 博士生导师, 主要从事生物药剂学及中药新型给药系统研究。Tel: (025)52362155 E-mail: ychen202@hotmail.com
瞿 鼎, 男, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事中药新型给药系统研究。Tel: (025)52362155 E-mail: quding1985@hotmail.com

(DLS), HPLC, and transmission electron microscopy (TEM), respectively. Meanwhile, the *in vitro* synergistic anti-breast cancer effect of liposome was investigated by cellular uptake, antiproliferative assay, and cell apoptosis induction using MCF-7 cells as model. **Results** Hydrophilic sodium tanshinone II_A sulfonate and hydrophobic celastrol were simultaneously encapsulated into liposomes by film dispersion method. The liposome had a nearly spherical shape with a clear bilayer, as well exhibited the particle sizes of (104.7 ± 2.1) nm, narrow polydispersion index (PDI) of (0.217 ± 0.002) , and zeta potential of (-48.8 ± 2.3) mV. The encapsulation efficiency of celastrol and tanshinone II_A sulfonate were $(82.2 \pm 2.7)\%$ and $(66.2 \pm 2.3)\%$, respectively. In cellular studies, the cellular uptake of liposome was 30 times higher than that of control group; The half proliferation inhibitory concentration (IC_{50}) was (1.42 ± 0.12) μ mol/L against MCF-7 cells with a combined index as 0.81. Besides, 80% of MCF-7 cells were induced to apoptosis by Cel/STS-CL, which was 0.1 time higher than Cel-Lip. **Conclusion** The preparation of Cel/STS-CL was feasible and efficiently, and promising for the *in vitro* synergistic anti-breast cancer effect, as well in the further studies.

Key words: celastrol; sodium tanshinone II_A sulfonate; codelivery liposome; synergistic effect; synergistic anti-tumor treatment; film dispersion method

雷公藤红素 (celastrol, Cel) 是来源于雷公藤根皮的三萜类化合物^[1], 是雷公藤的主要有效成分, 具有抗炎^[2]、抑制肿瘤细胞增殖和诱导肿瘤细胞凋亡^[3-5]等作用, 被评选为 21 世纪最可能成药的 5 大天然药物之一^[6]。但由于其水溶性差、体内生物利用度不高以及安全性等问题, 临床应用受到了较大的限制^[7-8]。脂质体 (liposome) 结构类似于细胞膜, 具有增溶难溶性药物、靶向递药、促抗肿瘤药物减毒增效等优势, 是抗肿瘤纳米剂型中商业化程度最高的一种剂型^[8-9], 将 Cel 进行脂质体包封有望克服其理化性质带来的药用局限性。但是, 临床研究表明, 目前尚未有直接证据显示脂质体产品在抗肿瘤药效学上比普通制剂有显著优势, 其原因可能与肿瘤血管异常化所致的药物瘤内递送障碍有关^[10]。

丹参酮 II_A 磺酸钠 (sodium tanshinone II_A sulfonate, STS) 是丹参中含有的脂溶性活性成分丹参酮 II_A 经磺化后得到的一种水溶性物质^[11], 具有良好的活血化瘀功效以及改善体内血管微循环的功能^[12]。本课题组前期研究表明, STS 还能够对肿瘤畸形血管进行正常化, 是一个潜在的肿瘤血管正常化调节剂, 其机制与丹参酮 II_A 类似^[13]。因此, 将 STS 和 Cel 共同装配至脂质体中, 期望凭借 STS 的血管正常化作用, 协同提高 Cel 脂质体的体内抗肿瘤疗效。本实验通过薄膜分散法^[14]将肿瘤血管调节剂 STS 和中药抗肿瘤成分 Cel 共同包埋于脂质体中, 通过对脂质体制备工艺探索和体外协同抗肿瘤评价等, 确定工艺的可靠性和体外抗肿瘤的有效性, 为后续体内研究建立扎实的实验基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Nano-ZS 马尔文粒径测定仪, 英国马尔文公司,

含动态光散射 (DLS) 系统; Agilent 1260 高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; 电子分析天平, 百万分之一, 瑞士 Mettler-Toledo 公司; Milli-Q 纯水系统、RE-52A 旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; Guava easycyte 4 L 流式细胞仪, 美国 Millipore 公司; IX73 生物显微镜, 日本 Olympus 公司; 超声波细胞粉碎机, 南京先欧仪器制造有限公司; TG16W 台式高速离心机, 长沙湘智离心机仪器有限公司; HERA Cell 150i CO₂ 培养箱、酶标仪, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 24 孔培养板、96 孔培养板, Corning 公司。

1.2 材料

大豆卵磷脂, 上海艾韦特医药科技有限公司, 磷脂质量分数 > 50%; 胆固醇, 上海惠兴生化试剂有限公司, 质量分数 ≥ 99%; Cel, 郎泽医药科技有限公司, 质量分数 ≥ 99%; STS, 西安鸿生生物技术有限公司, 质量分数 ≥ 98%; 异硫氰酸荧光素 (FITC), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 质量分数 ≥ 99%; 胎牛血清 (FBS), 以色列 Biological Industries 公司; DMEM 培养基、胰蛋白酶溶液、磷酸盐缓冲液, 上海源培生物科技股份有限公司; Guava Nexin Reagent 细胞凋亡检测试剂盒、四甲基偶氮唑盐 (MTT), 南京凯基生物科技发展有限公司; 甲醇为色谱纯; 其他试剂均为分析纯; 水为超纯水。人源乳腺癌 MCF-7 细胞株购于上海细胞库。

2 方法与结果

2.1 Cel 和 STS 体外抗肿瘤配比筛选

通过前期预试验对不同质量比的 Cel+STS 联合给药组进行比较, 发现 Cel 和 STS 质量配比为 1 : 1、2 : 5、1 : 5 时, 对 MCF-7 细胞抑制效果较好, 因此选取这 3 个比例进行最优化配比探索。

2.1.1 试药配制

(1) Cel 溶液: 称取 1.8 mg Cel 溶于 1 mL 的 DMSO 中, 得浓度为 4.0 mmol/L 游离 Cel 溶液。

(2) STS 溶液: 称取 1.6 mg STS 用 1 mL 不完全培养基配制成浓度为 4.0 mmol/L 游离 STS 溶液。

(3) Cel+STS 混悬液: 称取 1.8 mg Cel 和 1.8 mg STS 溶于 1 mL 的 DMSO 中, 得 Cel 与 STS 质量比为 1 : 1, Cel 浓度为 4.0 mmol/L 的混悬液; 称取 1.8 mg Cel 和 4.5 mg STS 溶于 1 mL 的 DMSO 中, 得 Cel 与 STS 质量比为 2 : 5, Cel 浓度为 4.0 mmol/L 的混悬液; 称取 1.8 mg Cel 和 9.0 mg STS 溶于 1 mL 的 DMSO 中, 得 Cel 与 STS 质量比为 1 : 5, Cel 浓度为 4.0 mmol/L 的混悬液。

2.1.2 MTT 实验^[15] 取对数生长期的 MCF-7 细胞, 常规操作培养至细胞密度 80% 后, 胰酶消化后离心, 沉底细胞用含 10% FBS 的 DMEM 培养基稀释并吹散, 细胞以 1×10^5 个/mL 的密度接种于 96 孔板中, 每孔加入 100 μ L 细胞悬液, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中孵育至细胞密度 70% 备用。对照组加 DMEM 不完全培养基; 给药组分别加 Cel 混悬液、STS 溶液和 Cel+STS 混悬液 (1 : 1、2 : 5、1 : 5), Cel 混悬液和 Cel+STS 混悬液组用不完全培养基稀释, 以 Cel 浓度计为 16.00、8.00、4.00、2.00、1.00、0.50、0.25、0.13 μ mol/L, STS 溶液组用不完全培养基稀释, 以 STS 浓度计为 16.00、8.00、4.00、2.00、1.00、0.50、0.25、0.13 μ mol/L, 每个浓度设 6 个复孔。药物与细胞共孵育 48 h 后, 每孔加入 10 μ L MTT PBS 溶液 (5 mg/mL), 染色 4 h 后, 移除上层培养基, 每孔加入 150 μ L 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。计算细胞存活率、细胞增殖抑制率, 再根据增殖抑制率计算细胞增殖的半数抑制浓度 (IC_{50}) 和 2 种药物的协同指数 (CI)。 IC_{50} 的计算采用 Graphpad Prism 6.0 软件, 其他计算公式如下。结果见图 1 和表 1。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

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

$$\text{CI} = \text{IC}_{50}^a / \text{IC}_{50}^A + \text{IC}_{50}^b / \text{IC}_{50}^B$$

IC_{50}^a 、 IC_{50}^b 分别表示给药组中各组分的 IC_{50} , IC_{50}^A 、 IC_{50}^B 分别表示相应对照组的 IC_{50}

由图 1 可知, STS ($<16 \mu\text{mol/L}$) 对 MCF-7 细胞无明显抗增殖活性; 但 Cel ($>0.5 \mu\text{mol/L}$) 对 MCF-7 细胞增殖有明显抑制作用, 并且在 0.5~2.0

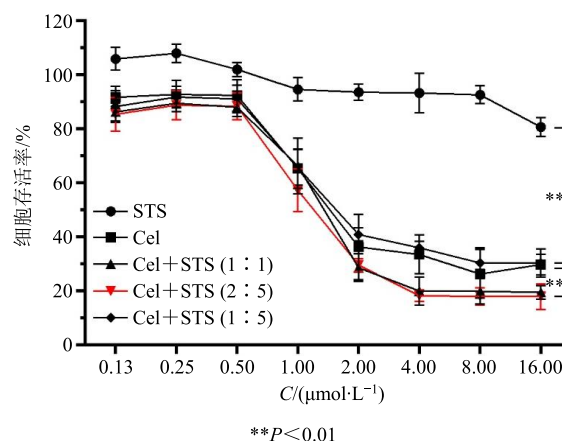


图 1 Cel、STS 以及联合给药对 MCF-7 细胞的抗增殖效应 ($n=6$)

Fig. 1 Antiproliferative effects of Cel, STS and combinational treatment against MCF-7 cells ($n=6$)

表 1 不同给药组对 MCF-7 细胞的 IC_{50} 和 CI ($n=6$)

Table 1 IC_{50} and CI of various formulations against MCF-7 cells ($n=6$)

组别	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	CI
Cel	1.82 ± 0.04	—
STS	142.80 ± 11.61	—
Cel+STS (1 : 1)	$1.61 \pm 0.09^*$	0.89
Cel+STS (2 : 5)	$1.63 \pm 0.13^*$	0.90
Cel+STS (1 : 5)	1.92 ± 0.11	1.06

与 Cel 组比较: $*P < 0.05$

$*P < 0.05$ vs Cel group

$\mu\text{mol/L}$ 呈浓度依赖性; 不同质量配比的 Cel 和 STS 联合给药表现出与 Cel 相当以及增强的抗 MCF-7 细胞增殖能力。从表 1 可知, 质量比为 2 : 5 和 1 : 1 时对 MCF-7 细胞的 IC_{50} 分别为 $(1.63 \pm 0.13) \mu\text{mol/L}$ 和 $(1.61 \pm 0.09) \mu\text{mol/L}$, CI 分别为 0.90 和 0.89, 相较于单药治疗组, 表现出明显的协同效应。考虑到后续工作中需要保证 STS 具有较高的治疗浓度, 因此将两药配比设定为 2 : 5。

2.2 Cel/STS 共传递脂质体 (Cel/STS-CL) 制备及表征

脂质体包封 2 种极性差异较大的药物, 包封率也有明显差异。为了调控 Cel/STS-CL 中所包埋的 2 组分有效质量比为 1 : 1、2 : 5、1 : 5, 前期对单组分脂质体进行多批次的工艺摸索, 在稳定各组分的包封率后, 通过理论计算和大量实验优化, 最终将 2 组分的投药比确定为 3 : 4、1 : 3、1 : 9 时, 实际被包封的 2 组分分配比符合实验要求。

2.2.1 薄膜分散法制备脂质体

(1) Cel/STS-CL 制备: 称取大豆卵磷脂 60.0 mg、胆固醇 15.0 mg 与一定量的 Cel 混溶于 10 mL 氯仿中, 于 37 °C 下 100 r/min 恒温水浴减压蒸除有机溶剂, 直至瓶壁形成均匀薄膜, 真空干燥过夜除去残留有机试剂。加入一定浓度的 STS 溶液 10 mL, 于 37 °C 下 100 r/min 恒温水浴常压水合 1 h 后, 冰浴超声 10 min (功率 250 W), 流动水透析 4 h 后过 0.45、0.22 μm 微孔滤膜滤过, 得到澄清透亮的脂质体溶液(图 2-A)。两药物理混合后有明显的不溶物, 脂质体溶液则体系均一、澄清透明、略带乳光。

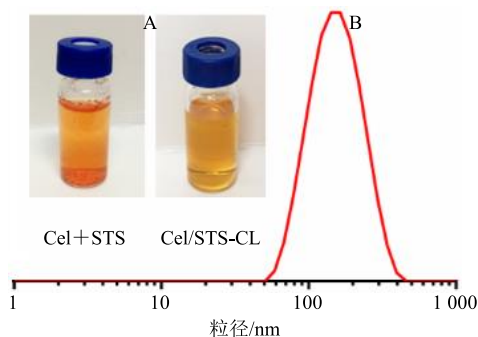


图 2 Cel+STS 物理混合和 Cel/STS-CL 溶液的外观图 (A) 及由 DLS 所测的 Cel/STS-CL 粒径分布 (B)

Fig. 2 Appearance of Cel + STS and Cel/STS-CL (A) and hydrodynamic size of Cel/STS-CL measured by DLS (B)

表 2 各脂质体的制剂学表征 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Characterization of various types of liposomes ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	STS 包封率/%	Cel 包封率/%
STS-Lip	89.1 $\pm$ 0.3	0.212 $\pm$ 0.004	-49.1 $\pm$ 0.3	68.2 $\pm$ 1.6	—
Cel-Lip	98.3 $\pm$ 0.9	0.239 $\pm$ 0.011	-51.6 $\pm$ 1.0	—	82.6 $\pm$ 1.0
Cel/STS-CL (1 : 1)	107.3 $\pm$ 2.4	0.223 $\pm$ 0.005	-47.2 $\pm$ 5.3	58.1 $\pm$ 5.2	69.2 $\pm$ 3.1
Cel/STS-CL (2 : 5)	104.7 $\pm$ 2.1	0.217 $\pm$ 0.002	-48.8 $\pm$ 2.3	66.2 $\pm$ 2.3	82.2 $\pm$ 2.7
Cel/STS-CL (1 : 5)	110.2 $\pm$ 4.1	0.224 $\pm$ 0.004	-53.1 $\pm$ 3.9	37.6 $\pm$ 1.1	70.2 $\pm$ 2.8

(98.3 $\pm$ 0.9) nm, 表明水难溶性药物被包封至较薄的双分子层后粒径会有小幅增加; 当同时包埋双组分后, Cel/STS-CL 粒径根据实际包封药物组分配比不同 (1 : 1、2 : 5、1 : 5) 分别为 (107.3 $\pm$ 2.4)、(104.7 $\pm$ 2.1)、(110.2 $\pm$ 4.1) nm, 组间无显著性差异, 但与单药脂质体相比粒径显著升高。由图 2-B 所示, 所制得的 Cel/STS-CL 粒径分布较小, 结合 DLS 数据可知, 各制剂的多分散指数 (PDI) 均处于 0.21 左右。此外, 各脂质体的表面电位均处于 -50 mV 左右, 这种高负电性可能与大豆卵磷脂的物化性质有关。

为考察双组分共传递脂质体在协同抗肿瘤方面的优势, 本研究还通过类似的制备方法构建相应的单组分脂质体, 作为对照。

STS 脂质体 (STS-Lip) 制备: 称取大豆卵磷脂 60.0 mg、胆固醇 15.0 mg 溶于 10 mL 氯仿中, 于 37 °C 下 100 r/min 恒温水浴减压蒸除有机溶剂, 直至瓶壁形成均匀薄膜, 真空干燥过夜除去残留有机试剂。加入 1.0 mg/mL 的 STS 溶液 10 mL, 于 37 °C 下 100 r/min 恒温水浴常压水合 1 h 后, 冰浴超声 10 min (功率 250 W), 流动水透析 4 h 后除去未包封的 STS, 最后过 0.45 μm 微孔滤膜得到澄清透亮的脂质体溶液。

Cel 脂质体 (Cel-Lip): 称取大豆卵磷脂 60.0 mg、胆固醇 15.0 mg 和 Cel 3.0 mg 混溶于 10 mL 氯仿中, 于 37 °C 下 100 r/min 恒温水浴减压蒸除有机溶剂, 直至瓶壁形成均匀薄膜, 真空干燥过夜除去残留有机试剂。加入纯水 10 mL, 于 37 °C 下 100 r/min 恒温水浴常压水合 1 h 后, 冰浴超声 10 min (功率 250 W), 分别过 0.45、0.22 μm 微孔滤膜滤过以去除未包封的 Cel, 得到澄清透亮的脂质体溶液。

2.2.2 脂质体表征 通过动态光散射 (DLS) 粒径仪测得基本的制剂学参数。由表 2 可知, STS-Lip 和 Cel-Lip 的平均粒径分别为 (89.1 $\pm$ 0.3) nm 和

通过透射电镜 (TEM) 观察粒子的形态学特征。于 Formvar 支持膜的铜网上滴加 1 滴 Cel/STS-CL 溶液, 滤纸小心吸除多余液体后, 立即滴加 20 μL 1% 的磷钨酸溶液, 室温下风干 30 min, 立即置于 TEM 下观察脂质体的外观形态。如图 3 所示, Cel/STS-CL 脂质体形态成近圆形, 外观圆整, 双分子层清晰可见, 粒径约为 100 nm, 结果与 DLS 数据基本一致。

2.3 脂质体包封率考察

2.3.1 色谱条件^[16]

(1) Cel 的 HPLC 测定条件: 采用 Agilent SB-

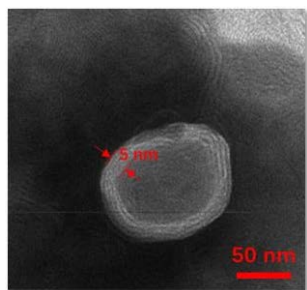


图 3 透射电镜下的 Cel/STS-CL 形态

Fig. 3 Morphology of Cel/STS-CL observed by TEM

C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温 30 ℃; 流动相为甲醇-2%醋酸水溶液 (90:10); 体积流量 1 mL/min; 检测波长 426 nm; 进样量 10 μL。

(2) STS 的 HPLC 测定条件: 采用 Agilent SB-C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温 30 ℃; 流动相为甲醇-2%醋酸水溶液 (70:30); 体积流量 1 mL/min; 检测波长 271 nm; 进样量 10 μL。

2.3.2 标准曲线的绘制 精密称取 Cel 2.5 mg, 用甲醇稀释成质量浓度分别为 1.9、3.9、7.8、15.6、31.2、62.5 μg/mL 溶液; 精密称取 STS 2.0 mg, 用甲醇稀释成质量浓度分别为 3.1、6.3、12.5、25.0、50.0、100.0 μg/mL 溶液, 于上述色谱条件下分别测定峰面积。以峰面积 (Y) 与质量浓度做线性回归, 得 Cel 和 STS 的回归方程分别为 Cel $Y=16.332 C+1.772 4$, $r^2=0.999 9$; STS $Y=17.102 C-18.345$, $r^2=0.999 7$, 分别在 1.9~62.5 μg/mL 及 3.1~100.0 μg/mL 线性关系良好。

2.3.3 包封率测定 取透析过膜后的脂质体溶液 1.0 mL, 加 9 倍量甲醇破乳后, HPLC 测定 Cel 和 STS 的含量。计算二者包封率 (包封率 = $W_{包}/W_{总}$, 其中 $W_{包}$ 和 $W_{总}$ 分别表示脂质体包载量和总投料量), 结果见表 2。

由表 2 可知, 薄膜分散法制备的脂质体对亲水性的 STS 包封率约为 68%, 而对亲脂性的 Cel 包封率则为 82% 左右。不同质量配比的双组分共传递脂质体对两药的包封率与单组分对照组有显著差异, 其中以被包封药物的质量配比 2:5 组包封率最高。值得注意的是, 该投料比工艺下制备的脂质体各组分包封率最接近单组分脂质体组。这不仅从制剂学角度验证了 Cel 和 STS 质量比为 2:5 时适合脂质体给药系统的装配, 也为制备组分可控的双组分共传递脂质体提供了实验基础。

2.4 体外抗肿瘤活性研究

2.4.1 试药配制 游离药物的配制同“2.1.1”项方

法, Cel-Lip 制备同“2.2.1”项方法。Cel/STS-CL 的制备: 称取大豆卵磷脂 60.0 mg, 胆固醇 15.0 mg 与 Cel 1.0 mg 混溶于 10 mL 氯仿中, 于 37 ℃ 下 100 r/min 恒温水浴减压蒸除有机溶剂, 直至瓶壁形成均匀薄膜, 真空干燥过夜除去残留有机试剂。加入 0.3 mg/mL 的 STS 溶液 10 mL, 于 37 ℃ 下 100 r/min 恒温水浴常压水合 1 h 后, 冰浴超声 10 min (功率 250 W), 流动水透析 4 h 后过 0.45、0.22 μm 微孔滤膜滤过, 得到澄清透亮的脂质体溶液。

2.4.2 MTT 实验 给药组分别给予 Cel+STS (2:5)、Cel-Lip 和 Cel/STS-CL, 其余方法同“2.1.2”项, 结果见表 3、4。

表 3 Cel+STS、Cel-Lip 和 Cel/STS-CL 对 MCF-7 细胞的抗增殖效应 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 3 Antiproliferative effects of Cel + STS, Cel-Lip, and Cel/STS-CL against MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

C/(μmol·L ⁻¹)	存活率/%		
	Cel+STS	Cel-Lip	Cel/STS-CL
0.13	85.41±5.07	99.35±1.45	86.64±0.64
0.25	88.85±4.37	96.93±1.04	80.98±0.77
0.50	88.43±4.11	94.90±3.85	69.66±1.53
1.00	57.30±6.46	43.52±5.25	24.52±0.65
2.00	29.63±1.91	23.95±1.23	11.78±0.46
4.00	18.28±1.66	22.30±0.64	10.33±0.48
8.00	18.03±2.63	20.75±0.36	9.79±0.48
16.00	19.60±1.12	20.50±1.17	9.78±0.42

表 4 不同给药组对 MCF-7 细胞的 IC₅₀ 和 CI ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)
Table 4 IC₅₀ and CI of various formulations against MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	IC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹)	CI
Cel	1.82±0.04	—
STS	142.80±11.61	—
Cel+STS (2:5)	1.63±0.13*	0.90
Cel-Lip	1.65±0.07*	—
Cel/STS-CL	1.42±0.12**	0.81

与 Cel 组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs Cel group

由表 3 可知, Cel+STS、Cel-Lip、Cel/STS-CL 对 MCF-7 细胞增殖均有明显的抑制作用, 并且与 Cel 浓度呈正相关。Cel/STS-CL 组抗细胞增殖能力显著高于单组分脂质体, 表明两药联用具有更高的抑制细胞增殖能力。从表 4 可知, Cel-Lip 组和 Cel/

STS-CL 组 IC_{50} 值分别为 $(1.65 \pm 0.07) \mu\text{mol/L}$ 和 $(1.42 \pm 0.12) \mu\text{mol/L}$, 相较于游离单药组, 抑制细胞增殖能力明显增强。Cel/STS-CL 组 CI 值为 0.81, 相较于游离双药组, 表现出更显著的协同效应。

2.5 细胞摄取研究

2.5.1 试药配制 游离 FITC 溶液 (FITC): 精密称取 1.0 mg FITC, 用无水乙醇溶解定容至 5 mL, 得 500 $\mu\text{mol/L}$ 游离 FITC 溶液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

FITC 与 STS、Cel 混合液 (FITC+STS+Cel): 精密称取 FITC 1.0 mg, STS 5.0 mg, Cel 2.0 mg 避光条件下, 混合均匀, 溶于 5 mL DMSO 中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

薄膜分散法制备 FITC 脂质体 (FITC-Lip) 和 FITC-丹参酮 II_A 磺酸钠-雷公藤红素脂质体 (FITC/

Cel/STS-CL), 方法同“2.4.1”项。

2.5.2 细胞摄取实验 收集对数生长期 MCF-7 细胞, 用胰蛋白酶消化, 用 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养基重悬成单细胞悬液, 用含 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养基稀释至细胞 5×10^4 个/mL, 接种于 24 孔细胞培养板, 每孔培养液 400 μL , 培养 24 h 后, 吸弃孔内原培养液, 分别将 FITC、FITC+STS+Cel、FITC-Lip、FITC/STS/Cel-Lip 用不完全培养基稀释为 FITC 终浓度 5 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液, 给药于 MCF-7 细胞, 每孔 400 μL , 并设置空白对照组。继续孵育 2 h, 吸除 24 孔中含有药物的培养基, 用冰冷 PBS 反复清洗 3 次后, 于荧光倒置显微镜下观察并比较各孔的荧光信号, 结果见图 4; 并借助流式细胞仪定量考察细胞内荧光摄取情况, 结果见表 5。

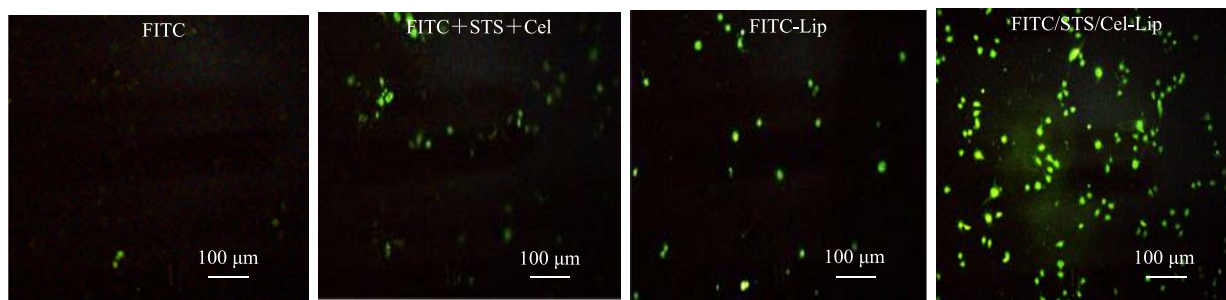


图 4 荧光倒置显微镜观察各给药组 2 h 在 MCF-7 细胞中的摄取情况

Fig. 4 Fluorescence images of cellular uptake after incubation with MCF-7 cell for 2 h

表 5 各给药组 2 h 在 MCF-7 细胞内的平均荧光强度值 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Intracellular fluorescence of MCF-7 cells after incubation for 2 h ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	荧光强度
FITC	39.79 ± 9.49
FITC+STS+Cel	131.39 ± 22.37
FITC-Lip	939.59 ± 38.04
FITC/STS/Cel-Lip	$1\,180.25 \pm 72.40$

如图 4 所示, FITC+STS+Cel 组细胞内荧光强度强于游离 FITC 组, 提示双组分中可能有促进细胞摄取的成分, 这可能与 STS 能够抑制耐药外排泵有关^[17]; FITC-Lip 组细胞内荧光强度强于游离 FITC 组, 展现出纳米制剂强大的促细胞摄取能力; 最重要地是, FITC/Cel/STS-CL 组荧光强度最强, 从细胞摄取角度进一步验证了双组分共传递脂质体的优势。表 5 中给药后各制剂组细胞内荧光强度值趋势与荧光图像一致。

2.6 细胞凋亡研究

2.6.1 试药配制 Cel 溶液: 称取 1 mg Cel 溶于 1 mL 的 DMSO 中, 得质量浓度为 1 mg/mL 游离 Cel 溶液。Cel+STS 混悬液: 称取 1 mg Cel 和 2.5 mg STS 溶于 1 mL 的 DMSO 中, 得 Cel 与 STS 质量比为 2:5, Cel 质量浓度为 1 mg/mL 的混悬液。Cel-Lip 和 Cel/STS-CL 的制备同“2.4.1”项方法。

2.6.2 细胞凋亡实验 收集对数生长期 MCF-7 细胞, 用胰蛋白酶消化, 用 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养基重悬成单细胞悬液, 用含 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养基稀释至细胞 5×10^4 个/mL, 接种于 24 孔细胞培养板, 每孔培养液 400 μL , 培养 24 h 后, 吸弃孔内原培养液, 将 Cel、Cel+STS、Cel-Lip、Cel/STS-CL 分别用不完全培养基稀释至不同质量浓度 (以 Cel 质量浓度计, 分别为 0.5、1.0、2.0、5.0 $\mu\text{g/mL}$), 每孔 500 μL 。然后移入细胞培养箱中继续培养 4 h。培养孵育结束后, 吸去培养基, 用冰冷的 PBS 反复清洗 3 次终止反应, 每孔加入 100 μL 不含有 EDTA 的胰酶消化液, 放入细胞培养

箱中继续孵育 2 min, 待细胞边缘变亮, 迅速弃除消化液, 加入含有 10% 胎牛血清的 PBS 缓冲液终止消化, 将孔内的细胞吹打下来, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃除上清液后取 100 μ L 细胞加入 96 孔板, 1 : 1 加入 100 μ L 细胞凋亡检测试剂 Guava Nexin Reagent, 避光孵育 20 min, 采用流式细胞仪测定 MCF-7 细胞的凋亡情况, 结果见图 5。

如图 5 所示, 各给药组诱导 MCF-7 细胞凋亡的

能力随着 Cel 质量浓度的增加而提高。但值得注意的是, 各质量浓度下脂质体组诱导细胞凋亡比率都低于相应的 Cel 裸药组, 可能是因为孵育时间较短, 脂质体具有缓释作用使得药物无法从中较快释放, 因此裸药组细胞凋亡更多。在 Cel < 5.0 μ g/mL 时, 脂质体组的细胞凋亡率不足 50%, 当 Cel 为 5.0 μ g/mL 时, Cel-Lip 组和 Cel/STS-CL 组的细胞凋亡率分别达到 70% 和 80%, 此时脂质体组才显示出明

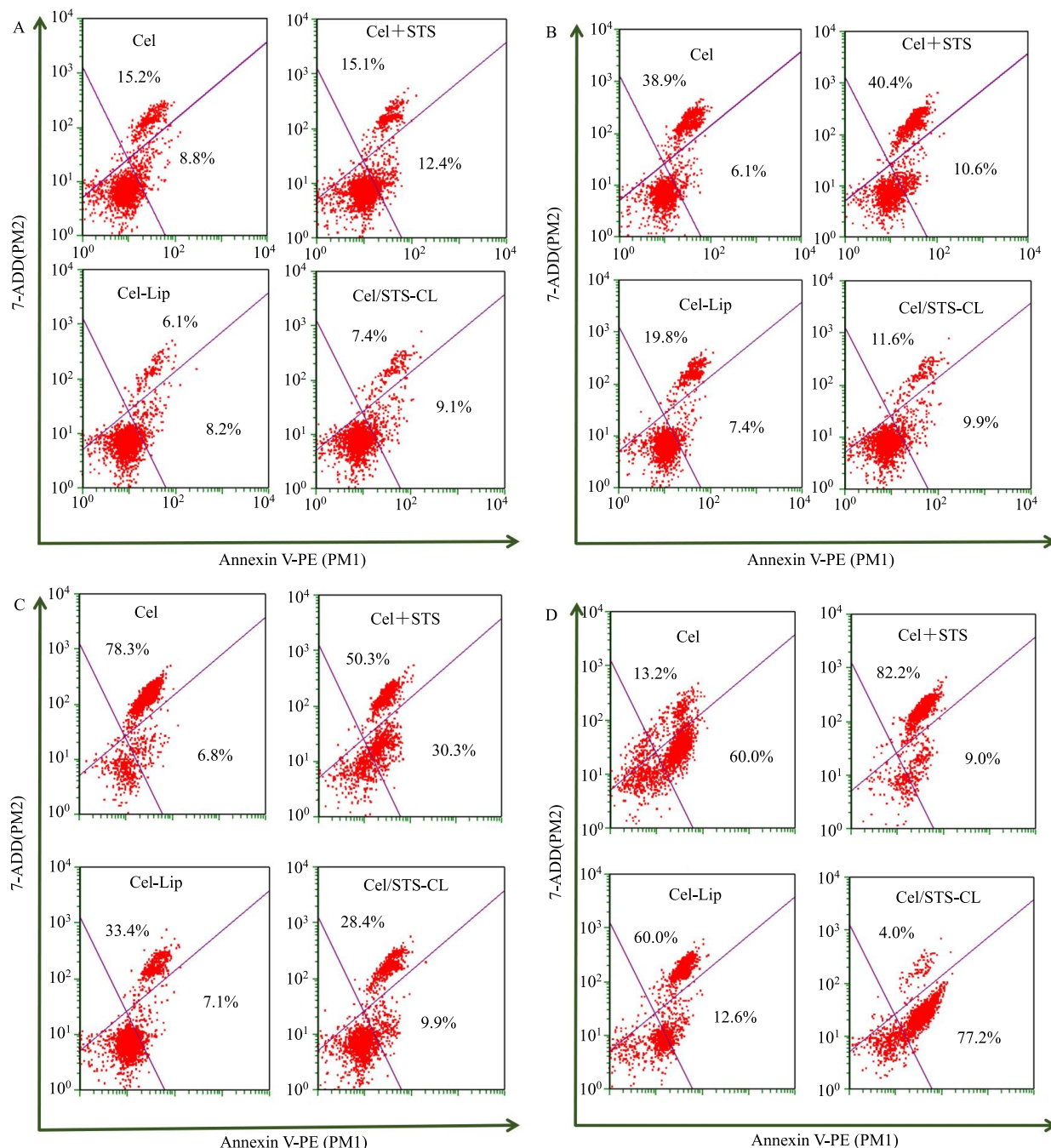


图 5 各给药组在 Cel 质量浓度为 0.5 (A)、1.0 (B)、2.0 (C)、5.0 (D) μ g·mL⁻¹ 下促 MCF-7 细胞凋亡的象限图

Fig. 5 Quadrant of apoptosis in each group treated with celastrol at different concentration of 0.5 (A), 1.0 (B), 2.0 (C), and 5.0 (D) μ g·mL⁻¹

显的促细胞凋亡作用,提示细胞凋亡可能与药物的孵育浓度以及释药速率等因素有关。

3 讨论

脂质体是一种可以同时包埋难溶性成分和水溶性成分的纳米剂型^[17],但是采用同一种制备方法包埋极性差异较大的双组分,通常会遇到包封率不高的问题。本研究在以往工作的基础上,选用 Cel 和 STS 作为联用药物,仅通过薄膜分散法即可制备出双组分包封率均较高的共传递脂质体,这可能与双组分的油水分配系数均在适合脂质体包埋的范围内有关^[18]。如何实现双组分共传递脂质体携带有效药物质量配比的调控也是研究工作的难点。本研究首先借助 MTT 细胞毒实验确定了两组分体外抗肿瘤的最佳质量配比,在此基础上进行制备工艺摸索,最后得到的制备工艺能够携带最佳质量比例的双组分,且制剂学(粒径、电位、多分散系数)和形态学行为均适合进行后续研究。

具有协同抗肿瘤效应的双组分装配成一个递药系统后,协同效率会受到粒子稳定性、药物释放速率、细胞/器官摄取以及体内靶向等因素的影响^[19]。因此,验证共传递脂质体化的 Cel 和 STS 的协同抗肿瘤效应也是本研究的重点内容。在以 MCF-7 细胞为模型的细胞学实验中, Cel/STS-CL 对 MCF-7 细胞的抗增殖能力明显强于物理混合组和 Cel 裸药组,表明这种双组分共传递脂质体不仅重现了物理混合双组分的协同效应^[20],还在此基础上又进一步的优化,这与脂质体被 MCF-7 细胞内化的能力强于其对照组有关。此外,考虑到物理混合的双组分进入细胞的能力差异,胞内两种药物有效浓度可能会与投药量有所偏差, Cel/STS-CL 由于具备共传递的特性,亲水性和亲油性药物可以同时进入细胞,因此更有利于优化协同抗肿瘤效率。在细胞摄取和实验中,脂质体表现出纳米制剂独特的细胞内化能力^[21],这也是 Cel/STS-CL 体外抗肿瘤作用得到改善的重要原因。值得注意的是,细胞凋亡诱导结果似乎并没有显示出双组分共传递的优势,这可能与药物作用时间、药物从脂质体中释放速率等有关。

本研究通过简单的制备工艺,得到性质稳定、形态圆整、组分分配比可控的双组分共传递脂质体,并通过一系列体外细胞学实验,验证了双组分共传递脂质体协同抗肿瘤的优势。后续工作将聚焦于其体内吸收、分布、抗肿瘤药效评价等,进一步验证设计思路的科学性和有效性。

参考文献

- [1] 龚建军,胡永胜.雷公藤红素对神经胶质瘤 U87 细胞增殖、凋亡和迁移的影响 [J]. 中草药, 2017, 48(24): 5194-5199.
- [2] Astrý B, Venkatesha S H, Laurence A, *et al.* Celastrol, a Chinese herbal compound, controls autoimmune inflammation by altering the balance of pathogenic and regulatory T cells in the target organ [J]. *Clin Immunol*, 2015, 157(2): 228-238.
- [3] 辛文好,韦珍妮,张颖,等.雷公藤红素对巨噬细胞焦亡的影响 [J]. 中草药, 2018, 49(5): 1087-1091.
- [4] Anna C, Astrid H, Simone S, *et al.* The natural anti-tumor compound celastrol targets a Myb-C/EBP β -p300 transcriptional module implicated in myeloid gene expression [J]. *PLoS One*, 2018, 13(2): e0190934.
- [5] 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.
- [6] Bodle C R, Mackie D I, Hayes M P, *et al.* Natural products discovered in a high-throughput screen identified as inhibitors of RGS17 and as cytostatic and cytotoxic agents for lung and prostate cancer cell lines [J]. *J Nat Prod*, 2017, 80(7): 1992-2000.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Fang S, Hou Y, Ling L, *et al.* Dimeric camptothecin derived phospholipid assembled liposomes with high drug loading for cancer therapy [J]. *Colloid Surface B*, 2018, 166(1): 235-244.
- [10] Jiang K, Song X, Yang L, *et al.* Enhanced antitumor and anti-metastasis efficacy against aggressive breast cancer with a fibronectin-targeting liposomal doxorubicin [J]. *J Control Release*, 2018, 271(10): 21-30.
- [11] Chen F, Li H, Zhu G, *et al.* Sodium tanshinone II_A sulfonate improves inflammation, aortic endothelial cell apoptosis, disseminated intravascular coagulation and multiple organ damage in a rat heat stroke model [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(1): 87-94.
- [12] 任珍,张薇,王晓光.丹参酮 II_A 磺酸钠联合依达拉奉治疗急性脑梗死的疗效研究 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(4): 541-544.
- [13] Ateba S B, Ngeu S T, Mvondo M A, *et al.* Natural terpenoids against female breast cancer: A 5-year recent research [J]. *Curr Med Chem*, 2018, 25(27): 3162-3213.

- [14] 王小宁, 贾慧婷, 李伟泽, 等. 水飞蓟宾前体脂质体的制备及其质量评价 [J]. 中草药, 2017, 48(7): 1314-1420.
- [15] 汪 晶, 杨 蕾, 金 鑫, 等. 黄芪甲苷对人参皂苷 CK 肿瘤细胞摄取及抗肿瘤作用的影响 [J]. 中草药, 2016, 47(13): 2308-2312.
- [16] 王理想, 瞿 鼎, 刘聪燕, 等. 制备工艺和包封材料对 3 种成分脂质体包封率的影响 [J]. 中成药, 2017, 39(1): 60-64.
- [17] 郝文慧, 赵文文, 陈修平. 丹参酮类抗肿瘤作用与机制研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(8): 1041-1044.
- [18] Yu L, Cheng J, Huang W J, *et al.* Liposome intracellular delivery of *Salvia miltiorrhiza* Bge. deprivative DS-201 improves its BK Ca, channel-activating and vasorelaxing effects [J]. *Sci Bull*, 2016, 61(8): 622-631.
- [19] Schultze E, Collares T, Lucas C G, *et al.* Synergistic and additive effects of ATRA in combination with different anti-tumor compounds [J]. *Chem-Biol Interact*, 2018, 285(1): 69-75.
- [20] Boueroy P, Hahnvajanawong C, Boonmars T, *et al.* Synergistic effect of forbesione from *garcinia hanburyi* in combination with 5-fluorouracil on cholangiocarcinoma [J]. *Asian Pac J Cancer P*, 2017, 18(12): 3343-3351.
- [21] Palange A L, Di M D, Carallo C, *et al.* Lipid-polymer nanoparticles encapsulating curcumin for modulating the vascular deposition of breast cancer cells [J]. *Nanomedicine*, 2014, 10(5): 991-1002.