

线粒体靶向的载紫杉醇 TPP-PEG-PE 纳米胶束的体外评价及促肿瘤细胞凋亡研究

康 宁¹, 周东升¹, 李燕杰¹, 刘尚明^{2*}

1. 山东省千佛山医院 肿瘤科, 山东 济南 250014

2. 山东大学基础医学院, 山东 济南 250100

摘要: 目的 制备载紫杉醇 TPP-PEG-PE 纳米胶束, 研究其体外释放行为, 考察其线粒体靶向性及促 A549 肺癌细胞凋亡效果。方法 采用薄膜水化法制备载紫杉醇 TPP-PEG-PE 纳米胶束, 以载药量、包封率、粒径为考察因素, 优选载紫杉醇 TPP-PEG-PE 纳米胶束的制备工艺参数, 再对优选工艺的纳米载药系统进行表征, 采用体外释药、线粒体靶向、肺癌细胞毒性和细胞凋亡实验对该载药系统进行评价。结果 载紫杉醇 TPP-PEG-PE 纳米胶束粒径为 (18.7 ± 0.8) nm, Zeta 电位为 (13.4 ± 0.5) mV, 透射电子显微镜结果表明, 载紫杉醇 TPP-PEG-PE 纳米胶束为大小较为均一的规则圆球型。线粒体靶向实验表明 TPP-PEG-PE 纳米胶束可以促进药物聚集在线粒体部位, 肺癌细胞毒性实验显示载紫杉醇 TPP-PEG-PE 纳米胶束抗细胞凋亡效果良好, Hoechst 染色提示凋亡肺癌细胞出现了大量形态学改变, 载紫杉醇 TPP-PEG-PE 纳米胶束可以明显提高促凋亡 Caspase-3 活性以及减少抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 c-IAP1 表达量, 均显著优于载紫杉醇 PEG-PE 纳米胶束和紫杉醇组的实验结果 ($P < 0.01$)。结论 载紫杉醇 TPP-PEG-PE 纳米胶束具有良好的肺癌细胞线粒体靶向性和促肺癌细胞凋亡作用, 是一种潜在高效的肺癌细胞线粒体靶向给药系统。

关键词: TPP-PEG-PE 纳米胶束; 紫杉醇; 线粒体靶向性; 细胞凋亡; Hoechst 染色

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)23-5554-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.23.011

In vitro evaluation of mitochondrial-targeted taxol TPP-PEG-PE nanomicelles and promotion of tumor cell apoptosis

KANG Ning¹, ZHOU Dong-sheng¹, LI Yan-jie¹, LIU Shang-ming²

1. Department of Oncology, Qianfoshan Hospital of Shandong Province, Jinan 250014, China

2. Basic Medical College, Shandong University, Jinan 250100, China

Abstract: Objective To prepare taxol TPP-PEG-PE nanomicelles and study its *in vitro* release behavior, mitochondrial targeting and pro-apoptosis of A549 lung cancer cells. **Methods** The taxol TPP-PEG-PE nanomicelles were prepared by membrane hydration method. Based on the drug loading, encapsulation efficiency and particle size, the preparation parameters of taxol TPP-PEG-PE nanomicelles were optimized. The preferred nano-drug delivery system was then characterized. The drug delivery system was evaluated by *in vitro* drug release, mitochondrial targeting, lung cancer cell toxicity, and apoptosis assay. **Results** The diameter of taxol TPP-PEG-PE nanomicelles was (18.7 ± 0.8) nm, Zeta potential was (13.4 ± 0.5) mV, and the results of TEM electron microscopy showed that the taxol TPP-PEG-PE nanomicelles were regular spheres of uniform size. Mitochondrial targeting experiments showed that TPP-PEG-PE nanomicelles can promote drug accumulation in mitochondrial sites. Lung cancer cytotoxicity assay showed that taxol TPP-PEG-PE nanomicelles had good anti-apoptotic effect, and Hoechst staining suggested that a large number of morphological changes were observed in apoptotic lung cancer cells. Taxol TPP-PEG-PE nanomicelles could significantly increase the pro-apoptotic Caspase-3 activity and reduce the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 and c-IAP1. They were all significantly superior to that of taxol-PEG-PE nanomicelles and taxol group ($P < 0.01$). **Conclusion** The taxol TPP-PEG-PE nanomicelles had good mitochondrial targeting of lung cancer cells and promoted the apoptosis of lung cancer cells. It was a potential and efficient drug

收稿日期: 2018-07-06

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目 (ZR2014HL075)

作者简介: 康 宁, 副教授, 研究方向为肿瘤学及靶向制剂。E-mail: kangning@126.com

*通信作者 刘尚明, 男, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为药物的靶向治疗。E-mail: stin_ger@163.com

delivery system for lung cancer cell mitochondria.

Key words: TPP-PEG-PE nanomicelles; taxol; mitochondrial targeting; apoptosis; Hoechst staining

恶性肿瘤成为严重威胁人类健康的疾病,据统计每年因病致死的人中有 21.75%死于癌症^[1-2]。目前大量研究证实,肿瘤的发生发展与细胞凋亡密切相关,而线粒体对细胞凋亡具有调控作用^[3]。紫杉醇为线粒体介导的抗肿瘤药物,在临床上用于乳腺癌、肺癌、鼻咽癌和卵巢癌等多种癌症的治疗^[4-11]。文献表明紫杉醇可以提高线粒体膜通透性,使胞浆内钙离子浓度升高,线粒体膜电位下降,影响肿瘤细胞周期,增加细胞凋亡率^[12]。但紫杉醇属于亲脂性小分子,存在水难溶性、对肿瘤细胞无选择性^[13],故到达细胞线粒体的量过少,导致临床上疗效不理想,而加大给药剂量又会引起严重的耐药性。因此,提高紫杉醇水溶性及线粒体靶向性对于增强药物的疗效至关重要。

聚乙二醇-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)是两亲性聚合物,在水溶液中可自发形成一种自组装胶束,亲水性 PEG 片段形成外壳,疏水性 PE 片段形成内核,可以装载亲脂性药物^[14]。大量研究发现 PEG-PE 在肿瘤部位具有良好的渗透与滞留时间(enhanced permeability and retention time, EPR)效应,可以将药物透过肿瘤部位血管之间的间隙,蓄积在肿瘤细胞部位^[15-16]。另外也有大量文献证实,(3-丙羧基)三苯基溴化磷(TPP)阳离子可介导肿瘤药物、高分子聚合药物靶向进入线粒体^[17-18]。基于前期大量的文献报道,本实验采用 TPP 阳离子嫁接在 PEG-PE 上,形成 TPP-PEG-PE 聚合物,将紫杉醇传递到肿瘤细胞线粒体,从而增强该药物抗肿瘤的疗效。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Zetasizer Nano ZS 纳米粒度电位仪,英国马尔文仪器有限公司;JEM-2100 Plus 透射电子显微镜(TEM),日本电子株式会社;GL-21M 高速冷冻离心机,上海卢湘仪离心机仪器有限公司。

1.2 药品与试剂

紫杉醇,上海禧琅生物科技有限公司,质量分数 $\geq 98\%$,批号 BL170522;1,1'-双十八烷基-3,3',3'-四甲基吲哚二碳菁高氯酸盐(DID),荧光剂,质量分数 $\geq 98\%$,批号 ES170928,天津希恩思生化有限公司;PEG-PE(相对分子质量约 2 000)和 TPP-PEG-

PE(相对分子质量约 2 500),西安瑞禧生物科技有限公司,质量分数 $\geq 95\%$;TPP,Adamas 试剂有限公司,质量分数 $\geq 98\%$;A549 肺癌细胞,上海美轩生物科技有限公司;Gibco RPMI 1640 培养基,上海浩然生物科技有限公司;10099-141 胎牛血清,上海恒远生物科技有限公司;Mitotracker Green 荧光探针,厦门生光生物科技有限公司;Hoechst 33342 染色液,碧云天生物技术研究所以。

2 方法与结果

2.1 载紫杉醇 TPP-PEG-PE 纳米胶束的制备

精密称取紫杉醇原料 5 mg,TPP-PEG-PE 100 mg,加入色谱纯甲醇 20 mL 促使两者完全溶解,转移至旋蒸瓶中,通入适量氩气排除空气进行保护,启动旋转蒸发仪,于 40 °C 温度下形成一层均匀的干燥薄膜,再在低温真空条件下冷冻干燥 12 h 除尽残留的有机溶剂,加入适量 PBS 轻微搅拌促进薄膜水合,40 °C 水浴下水化 1 h 后,再超声 0.5 h 促进粒子分散,0.2 μm 微孔滤膜滤过,最后采用低温冷冻干燥 24 h,即得载紫杉醇 TPP-PEG-PE 纳米胶束;采用同样的办法可制备载紫杉醇 PEG-PE 纳米胶束。

将亲脂性红色荧光剂 DID 包裹在 TPP-PEG-PE 或者 PEG-PE 纳米胶束内核,制备载 DID TPP-PEG-PE 或者载 DID PEG-PE 纳米胶束。

2.2 粒径、Zeta 电位及形态分析

称取适量制备的载紫杉醇 TPP-PEG-PE 纳米胶束,采用蒸馏水溶解,以纳米粒度电位仪测定胶束的粒径和 Zeta 电位分布;再吸取少量载紫杉醇 TPP-PEG-PE 纳米胶束溶液,先超声约 30 min 促进粒子分散,然后采用移液枪吸取约 100 μL 滴加在 200 目铜网上,再用滤纸尽量吸走周围多余的溶液,烘干约 20 min,置 TEM 下观察纳米胶束的形态。

2.3 包封率及载药量的测定

精密吸取以上制备的载紫杉醇 TPP-PEG-PE 纳米胶束溶液约 600 μL ,置于超滤离心管中(截留相对分子质量为 3 000),经高速冷冻离心机 10 000 r/min 低温离心 5 min,下层为游离紫杉醇,经 HPLC 测定得游离紫杉醇质量($M_{\text{游离}}$)。上层即为载药纳米胶束,加入大约 10 倍体积乙醇溶解破坏纳米胶束结构,促使胶束释放紫杉醇,经 HPLC 测定胶束中

包封的药物量 ($M_{\text{包}}$), 即可计算包封率。同时将离心后的上清纳米胶束溶液冷冻干燥, 然后称定质量 ($M_{\text{总}}$), 计算载药量。

$$\text{包封率} = M_{\text{包}} / (M_{\text{包}} + M_{\text{游离}})$$

$$\text{载药量} = M_{\text{包}} / M_{\text{总}}$$

$M_{\text{游离}}$ 为离心后游离紫杉醇质量, $M_{\text{包}}$ 为胶束中包载的紫杉醇质量, $M_{\text{总}}$ 为载紫杉醇 TPP-PEG-PE 纳米胶束质量

2.4 纳米胶束制备工艺的优化

对载紫杉醇 TPP-PEG-PE 纳米胶束制备过程中药物紫杉醇与载体 TPP-PEG-PE 的投料比、水化温度、水化时间等因素进行考察。

2.4.1 药物与载体的投料比 根据预试验的结果, 固定水化温度为 40 °C 和水化时间为 1 h, 选取 5 个不同的紫杉醇与载体投料比, 以载药量、包封率、粒径为考察因素, 结果见表 1, 随着药物与载体投料比的增大, 粒径呈增大趋势, 载药量和包封率大体呈先增加后减小趋势, 其中以药物与载体投料比为 5 : 100 时的载药量和包封率最高, 且纳米粒径也相对较小, 故优选的二者投料比为 5 : 100。

表 1 药物与载体的投料比对纳米胶束的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 1 Effect of drug-carrier ratio on nanomicelles ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

投料比	粒径/nm	载药量/%	包封率/%
1 : 100	16.7 ± 0.6	0.8 ± 0.2	80.4 ± 0.7
3 : 100	17.4 ± 0.5	2.2 ± 0.8	73.3 ± 0.5
5 : 100	18.4 ± 0.3	4.2 ± 0.6	83.9 ± 0.2
7 : 100	24.6 ± 0.7	4.0 ± 0.8	57.6 ± 0.5
9 : 100	28.4 ± 0.5	4.1 ± 0.3	45.7 ± 0.4

2.4.2 水化温度 根据预试验的结果, 固定紫杉醇与载体投料比 5 : 100 和水化时间为 1 h, 选择 3 个不同的水化温度, 以载药量、包封率、粒径为考察因素, 结果见表 2, 随着水化温度的增加, 纳米粒径呈增大趋势, 包封率和载药量表现为先增加后减小, 故选择水化温度为 40 °C, 载药量和包封率均比较高, 且粒径也相对较小。

2.4.3 水化时间 根据预试验的结果, 固定紫杉醇与载体投料比 5 : 100 和水化温度为 40 °C, 选择 4 个不同的水化时间, 以载药量、包封率、粒径为考察因素, 结果见表 3, 随着水化时间的增加, 纳米粒径呈增大趋势, 包封率和载药量表现为先增加后减小, 其中水化时间为 1 h 时的载药量和包封率最高, 且粒径也相对较小, 故作为最优选择。

表 2 水化温度对纳米胶束的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of hydration temperature on nanomicelles ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

水化温度/°C	粒径/nm	载药量/%	包封率/%
30	16.3 ± 0.4	3.9 ± 0.6	82.1 ± 0.3
40	18.6 ± 0.5	4.6 ± 0.8	83.7 ± 0.6
50	24.7 ± 0.1	3.7 ± 0.3	74.8 ± 0.6

表 3 水化时间对纳米胶束的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of hydration time on nanomicelles ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

水化时间/h	粒径/nm	载药量/%	包封率/%
0.5	16.3 ± 0.7	3.7 ± 0.5	78.9 ± 0.3
1.0	17.5 ± 0.4	4.5 ± 0.3	82.7 ± 0.6
2.0	19.7 ± 0.2	3.9 ± 0.4	76.8 ± 0.5
3.0	24.3 ± 0.6	3.7 ± 0.5	75.4 ± 0.3

2.5 优选载紫杉醇 TPP-PEG-PE 纳米胶束的表征

综合考虑上述工艺考察的 3 个因素, 选择紫杉醇-TPP-PEG-PE 纳米胶束的制备工艺优选条件为药物紫杉醇与载体 TPP-PEG-PE 投料比为 5 : 100, 水化温度为 40 °C, 水化时间为 1.0 h, 所制备载紫杉醇 TPP-PEG-PE 纳米胶束粒径为 (18.7 ± 0.8) nm, Zeta 电位为 (13.4 ± 0.5) mV; TEM 电镜结果显示载紫杉醇 TPP-PEG-PE 纳米胶束为规格圆球型结构, 大小比较均一; 载紫杉醇 TPP-PEG-PE 纳米胶束的载药量为 (4.3 ± 0.4) %, 包封率为 (81.5 ± 3.7) %, 结果见图 1。

2.6 体外释放

将 1 mg 紫杉醇、载紫杉醇 PEG-PE 纳米胶束 (含 1 mg 紫杉醇) 和载紫杉醇 TPP-PEG-PE 纳米胶束 (含 1 mg 紫杉醇) 装入 Sigma 透析袋 (M_w 为 3 000) 中, 采用夹子密封两端, 分别置于 500 mL pH 7.4 PBS 释放介质中, 在 37 °C 水浴环境中进行体外释放研究。按预定的时间点 1、3、6、9、12、16、20、24、36、48、60、72 h 取样, 每次取样 1 mL 进行含量测定, 同时补充相同体积的 PBS, 计算纳米胶束体外释放率。结果见图 2, 紫杉醇呈快速释放趋势, 24 h 内已累积释放 93.7%, 而载紫杉醇 TPP-PEG-PE 和载紫杉醇 PEG-PE 纳米胶束溶液均呈缓慢释放, 尤以载紫杉醇 TPP-PEG-PE 纳米胶束缓释现象最明显, 72 h 才累积释放约 73.1%, 由此推测, 载紫杉醇 TPP-PEG-PE 纳米胶束可以将药物包埋在 PE 内核, 外周有 PEG 的层层包裹, 故释药

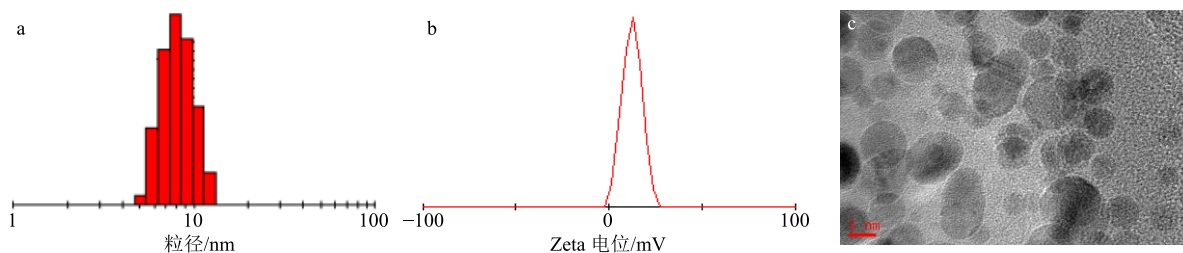


图 1 载紫杉醇 TPP-PEG-PE 纳米胶束的粒径 (a)、Zeta 电位 (b) 和 TEM 图 (c)

Fig. 1 Distribution of particle size (a), Zeta potential (b), and TEM image (c) of taxol TPP-PEG-PE nanomicelles

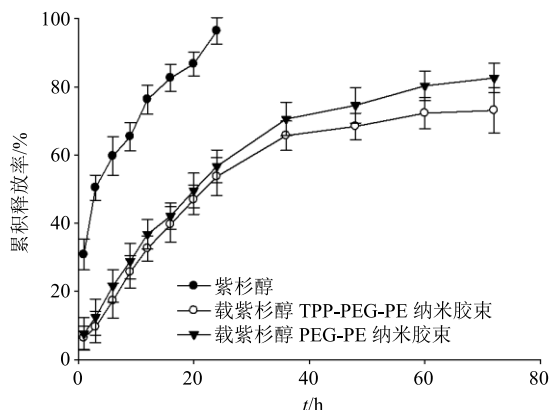


图 2 紫杉醇、载紫杉醇 PEG-PE 与载紫杉醇 TPP-PEG-PE 纳米胶束体外释放曲线

Fig. 2 *In vitro* release profile of taxol, taxol PEG-PE and taxol TPP-PEG-PE nanomicelles

相对缓慢。

2.7 线粒体靶向性考察

将 A549 肺癌细胞以 1×10^5 个的密度接种于 24 孔培养板内, 用血清培养基培养 48 h, 将荧光剂质量浓度为 100 ng/mL 的载 DID TPP-PEG-PE 纳米胶束和载 DID PEG-PE 纳米胶束加入其中, 再与细胞共同孵育 2 h, 孵育结束后换用无血清培养基, 采用 100 nmol/L 的 Mitotracker Green (MTG, 线粒体绿色荧光探针) 使线粒体染色 30 min (显绿色), 5 μ g/mL 的 Hoechst 33342 使细胞核染色 5 min (显蓝色), 采用激光共聚焦显微镜观察这 2 种荧光标记纳米胶束进入线粒体情况。结果见图 3, 激光共聚焦显示, 蓝色标记的细胞核部位均有 DID 的红色荧光出现, 但载 DID TPP-PEG-PE 纳米胶束大部分聚集

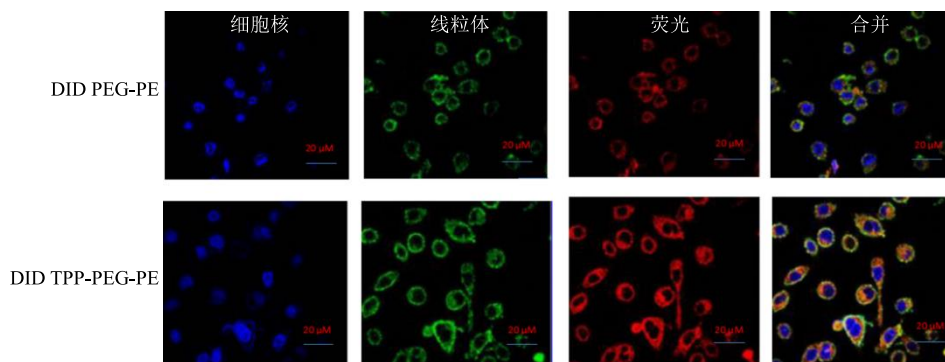


图 3 载 DID PEG-PE 纳米胶束与载 DID TPP-PEG-PE 纳米胶束的线粒体靶向性

Fig. 3 Mitochondria-targeting profile of taxol PEG-PE and taxol TPP-PEG-PE nanomicelles

在绿色荧光标记的线粒体周围, 而载 DID PEG-PE 相对较少。由此分析, PEG-PE 纳米胶束有助于 DID 的跨膜转运进入细胞, TPP 阳离子由于呈正电荷, 可以加快载药系统跨越负电荷的线粒体膜, 增强药物的线粒体靶向性。

2.8 细胞毒性实验

取对数生长期 A549 肺癌细胞, 以细胞密度 1×10^4 个接种于 96 孔培养板中培养 24 h, 待细胞完全贴壁后, 观察细胞融合度大约 80% 左右且细胞形

态饱满后, 弃去培养基, 添加载紫杉醇 TPP-PEG-PE 纳米胶束、载紫杉醇 PEG-PE 纳米胶束以及游离的紫杉醇样品经微孔滤膜滤过除菌, 各取适量加入孔中, 使紫杉醇质量浓度为 0.5、1.0、5.0、10.0、30.0 μ g/mL, 平行制备 3 份样品, 以正常细胞作为对照组, 只加培养基的为空白组, 共同孵育 24 h 后弃去供试药液, 每孔加入 40 μ L 5.0 mg/mL MTT 的 PBS 溶液, 37 $^{\circ}$ C 避光振荡 4 h, 于 490 nm 用酶标仪检测吸光度 (A) 值。每孔细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_s - A_0) / (A_c - A_0)$$

A_s 、 A_c 和 A_0 分别表示样品组、对照组和空白组的 A 值

MTT 实验结果如表 4 所示, 载紫杉醇 TPP-PEG-PE 纳米胶束对 A549 肺癌细胞的增殖抑制率随着紫

杉醇质量浓度的增加而增强。在相同紫杉醇质量浓度下, 载紫杉醇 TPP-PEG-PE 纳米胶束对 A549 肺癌细胞的增殖抑制率显著强于载紫杉醇 PEG-PE 纳米胶束和游离紫杉醇, 差异显著 ($P < 0.05$)。

表 4 不同紫杉醇剂型对 A549 肺癌细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effects of different taxol formulations on viability of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	存活率/%				
	0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	1.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	5.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	10.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	30.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
紫杉醇溶液	78.5 $\pm$ 0.9	70.9 $\pm$ 0.6	62.3 $\pm$ 0.8	58.7 $\pm$ 0.4	57.4 $\pm$ 0.6
紫杉醇 PEG-PE	60.3 $\pm$ 0.4	51.6 $\pm$ 0.7	50.4 $\pm$ 0.3	45.7 $\pm$ 0.5	36.8 $\pm$ 0.6
紫杉醇 TPP-PEG-PE	36.8 $\pm$ 0.4	35.4 $\pm$ 0.3	32.8 $\pm$ 0.6	31.4 $\pm$ 0.3	28.7 $\pm$ 0.4

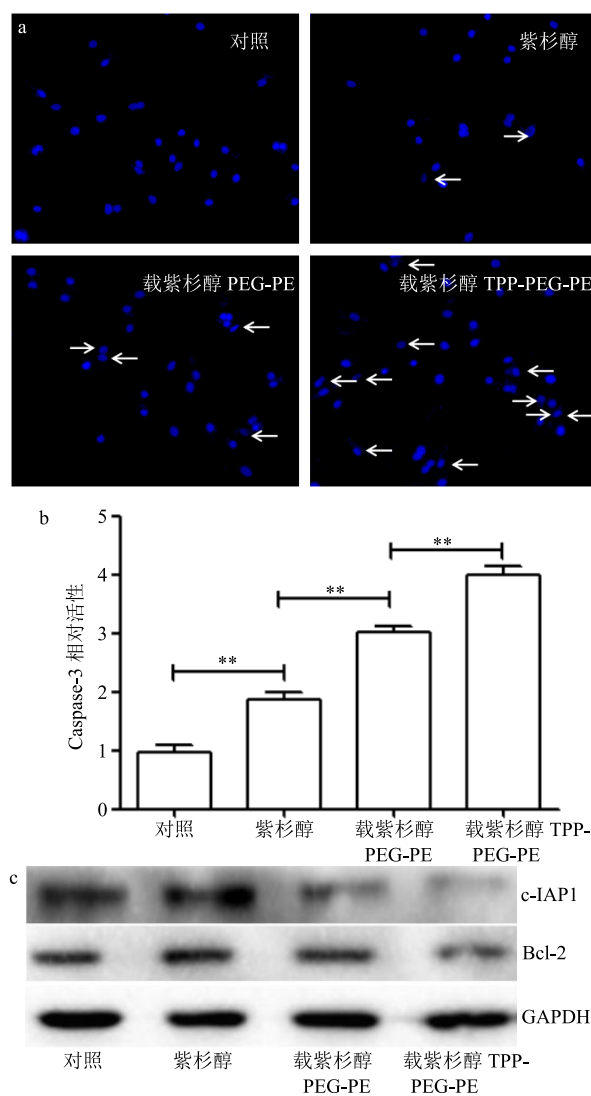
2.9 细胞凋亡

2.9.1 Hoechst 染色 A549 肺癌细胞前期处理同“2.8”项, 以上 3 种类型的紫杉醇药物 (等量紫杉醇药物质量浓度 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 与 A549 肺癌细胞共同孵育 24 h 后, 采用 4% 细胞组织液进行固定, 再以 PBS 洗涤 3 次, 采用 Hoechst 33258 参照说明书进行染色, 再置荧光显微镜下观察, 凋亡细胞呈现颜色暗淡、形态皱缩。

2.9.2 Caspase-3 活性检测 A549 肺癌细胞前期处理同“2.8”项, 以上 3 种类型的紫杉醇药物与 A549 肺癌细胞共同孵育 24 h 后, 加入 100 μL Caspase-3 试剂, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1 h, 空白组加入 PBS, 每组设 3 个重复, 采用酶标仪测定 405 nm 处 A 值, 样品组 A 值减去空白组的 A 值, 即为各组样品细胞 Caspase-3 催化产生的 A 值。

2.9.3 抗凋亡蛋白表达测定 采用 Western blotting 法检测凋亡相关蛋白的表达, A549 肺癌细胞前期处理同“2.8”项, 以上 3 种类型的紫杉醇药物与 A549 肺癌细胞共同孵育 48 h 后, 按照总蛋白一致的原则上样, 10% 的分离胶进行 SDS-PAGE 电泳; 100 V 湿转 50 min, 5% 的脱脂奶粉 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h; TBST 洗 10 min, 3 次, 然后采用一抗 (1:1 000) 室温孵育 1 h; TBST 洗 10 min, 3 次, 然后兔抗鼠 (1:4 000) 室温孵育 1 h; 加入的抗体有 Bcl-2 (ab692, 1:1 000, Abcam), c-IAP1 (ab32503, 1:1 000, Abcam) 和 GAPDH (ab9484, 1:1 000, Abcam)。次日 TBST 洗膜后, 加二抗 (1:2 000) 反应 1 h, TBST 洗 3 次, ECL Bio-Rad 成像系统显影。

图 4 显示, 载紫杉醇 TPP-PEG-PE 纳米胶束诱导的 A549 肺癌细胞凋亡最多, Hoechst 染色细胞核后出现了细胞形态明显的暗淡、皱缩; 细胞中的



a-Hoechst 染色 b-Caspase-3 活性 c-抗凋亡蛋白的表达 (** $P < 0.01$)
a-Hoechst staining b-Caspase-3 activity c-Expression of anti-apoptotic proteins (** $P < 0.01$)

图 4 不同紫杉醇剂型诱导 A549 肺癌细胞凋亡作用比较
Fig. 4 Comparison of apoptosis in A549 lung cancer cells induced by different taxol formulations

Caspase-3 活性最高,抑制细胞凋亡的相关蛋白 Bcl-2 和 c-IAP1 表达量最少,由此表明,载紫杉醇 TPP-PEG-PE 纳米胶束诱导的 A549 肺癌细胞凋亡效果最明显,存在显著性差异 ($P<0.01$)。

3 讨论

PEG-PE 纳米胶束是体内可降解并经 FDA 批准的可用于人体的药物载体材料,作为纳米药物递送系统具有很多优势。由于两亲性共聚物能在水介质中形成具有疏水性内核与亲水性外壳的超分子聚集体,疏水性内核包载药物,提高难溶性药物的溶解度,并可保护药物不降解,同时控制药物缓慢释放;而 PEG 亲水性外壳有助于纳米胶束在血液中的长时间循环,故这种 PEG-PE 纳米胶束常用于难溶性药物的增溶载体。另外也有研究表明,PEG-PE 纳米胶束可通过网格蛋白和小窝蛋白的介导,增强药物的跨膜转运和细胞内蓄积能力,还可以内吞的形式进入细胞^[19-20]。进入细胞后,如何进入线粒体又是纳米胶束面临的技术难题。目前大量研究证实 TPP 阳离子具有线粒体靶向性,鉴于线粒体内膜带 150~180 mV 负电荷,细胞膜带 30~60 mV 负电荷,而 TPP 为三苯基膦阳离子带正电荷,正负电荷相互吸引,促使 TPP 阳离子聚集于线粒体的能力提高 100~500 倍,能够克服高黏度细胞液的阻碍,介导肿瘤药物和 G(5)-PAMAM 树枝状嵌段共聚物靶向进入线粒体^[21]。本研究成功制备了 TPP-PEG-PE 纳米胶束作为紫杉醇的药物载体,粒径大小为 (22.7 ± 0.8) nm, Zeta 电位为 (13.4 ± 0.5) mV,文献报道 PEG-PE 纳米胶束一般为负电势,由此表明 TPP 阳离子已连接在 PEG-PE 高分子材料上。TPP-PEG-PE 纳米胶束载药量为 $(3.5\pm 0.4)\%$,包封率为 $(81.5\pm 3.7)\%$,且体外释药非常缓慢,据此初步推测,紫杉醇作为亲脂性小分子药物,包裹在疏水性 PE 内核中,形成了较为稳定的纳米胶束体系,故紫杉醇在 TPP-PEG-PE 纳米胶束中表现为释药非常缓慢,有助于延长药物的体内循环时间,提高药物的生物利用度。线粒体靶向实验结果发现,载紫杉醇 TPP-PEG-PE 纳米胶束进入细胞后,大部分聚集在线粒体部位,进入后通过调节线粒体功能,启动细胞凋亡通路,故 A549 肺癌细胞出现了大范围的凋亡,从细胞毒性实验,细胞凋亡的 Hoechst 染色、Caspase-3 活性提高以及抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 c-IAP1 表达量减少,证实了载紫杉醇 TPP-PEG-PE 纳米胶束抗凋亡效果明显强于普通载紫杉醇 PEG-PE 纳米

胶束和紫杉醇。由此推断 TPP 阳离子可以介导纳米胶束递送到线粒体,从而很大程度上发挥细胞器靶向给药的优势,能否在动物实验上增强抗肿瘤效果有待于进一步研究证实。

参考文献

- [1] 吴学勇,李 进. 热疗联合放疗和化疗治疗恶性肿瘤研究进展 [J]. 中国肿瘤临床与康复, 2011, 18(4): 362-364.
- [2] 陈万青,袁郑寿,张思维,等. 2013 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析 [J]. 中国肿瘤, 2017, 26(1): 1-7.
- [3] 齐雪静,郑楠楠,高亚男,等. 线粒体靶向分子抗肿瘤应用的研究进展 [J]. 中国药理学杂志, 2015, 50(9): 741-744.
- [4] 王 宏,郭晓远,吴国建,等. 汉防己甲素联合紫杉醇逆转脑胶质瘤 C6/MDR 细胞耐药及其机制研究 [J]. 中草药, 2018, 49(11): 2584-2590.
- [5] 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.
- [6] 赵 磊,毕冬冬,齐晓宇,等. 聚多巴胺改性紫杉醇纳米粒靶向治疗乳腺癌骨转移 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(12): 1695-1700.
- [7] Cao S Q, Zhang K Y, Yan X, et al. Preparation and evaluation of paclitaxel and *Brucea javanica* oil core-matched nanoemulsions to treat cancer *in vitro* and *in vivo* [J]. *Chin Herb Med*, 2018, 10(3): 310-317.
- [8] 李 翔,张 婧,王东凯,等. 叶酸受体靶向多烯紫杉醇膜修饰脂质体的抗肿瘤活性 [J]. 药理学报, 2013, 48(7): 1142-1147.
- [9] 张宽云,马 燕. 紫杉醇-油酸和鸦胆子油分子配型组装纳米乳给药系统研究 [J]. 中草药, 2017, 48(8): 1544-1552.
- [10] 周永安,刘训碧. 曲妥珠单抗联合多西紫杉醇治疗 Her-2 阳性乳腺癌的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(6): 863-867.
- [11] 杨爱峰. 替吉奥、顺铂联合紫杉醇对进展期胃癌的疗效和安全性研究 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(4): 549-552.
- [12] 谭树芬,杨宏英,李 凡,等. 紫杉醇联合顺铂化疗对人卵巢浆液性囊腺癌组织 occludin 和 ZO-1 表达以及线粒体超微结构的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(8): 1437-1440.
- [13] 聂 华,梁 香,赵 莹,等. 酶促构建葡萄糖修饰脑靶向载紫杉醇脂质体制备处方及其工艺优化 [J]. 中草药, 2016, 47(11): 1867-1874.
- [14] Fang X, Yousaf M, Huang Q, et al. Dual effect of PEG-PE micelle over the oligomerization and fibrillation

- of human islet amyloid polypeptide [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 4463.
- [15] Kohay H, Sarisozen C, Sawant R, *et al.* PEG-PE/clay composite carriers for doxorubicin: Effect of composite structure on release, cell interaction and cytotoxicity [J]. *Acta Biomater*, 2017, 55(24): 443-454.
- [16] Sarisozen C, Vural I, Levchenko T, *et al.* PEG-PE-based micelles co-loaded with taxol and cyclosporine A or loaded with taxol and targeted by anticancer antibody overcome drug resistance in cancer cells [J]. *Drug Deliv*, 2012, 19(4): 169-176.
- [17] Biswas S, Dodwadkar N S, Piroyan A, *et al.* Surface conjugation of triphenylphosphonium to target poly(amidoamine) dendrimers to mitochondria [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(18): 4773-4782.
- [18] Smith R A, Hartley R C, Murphy M P. Mitochondria-targeted small molecule therapeutics and probes [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15(12): 3021-3038.
- [19] Huang J G, Leshuk T, Gu F X. Emerging nanomaterials for targeting subcellular organelles [J]. *Nano Today*, 2011, 6(10): 478-492.
- [20] Wang J, Wang Y, Liang W. Delivery of drugs to cell membranes by encapsulation in PEG-PE micelles [J]. *J Control Release*, 2012, 160(3): 637-651.
- [21] Murphy M P. Targeting lipophilic cations to mitochondria [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1777(7/8): 1028-1031.