

CD133 抗体修饰的紫草素微乳的制备及抗三阴性乳腺癌研究

王洁¹, 李倩², 吴静华¹, 吴华², 朱娟英^{1*}

1. 嘉兴市妇幼保健院, 浙江 嘉兴 314000

2. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210029

摘要: 目的 评价 CD133 抗体修饰的紫草素微乳 (anti CD133 antibody-modified shikonin-loaded microemulsion, Anti CD133Ab-SKN-MEs) 治疗三阴性乳腺癌的可行性及优势。方法 利用经典的成乳工艺制备紫草素微乳 (SKN-MEs), 再通过 EDC/NHS 缩合技术制备 Anti CD133Ab-SKN-MEs, 以粒径、Zeta 电位、包封率为指标优化投料比、抗体修饰密度等工艺参数; 采用 MTT 法考察三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖行为, 利用异硫氰酸荧光素 (FITC) 作为探针定性定量考察细胞摄取行为, 借助膜联蛋白 V-PE/7-氨基放线菌素 D (Annexin V-PE/7-AAD) 试剂盒考察给药组诱导细胞凋亡行为; 借助悬浮培养技术富集 MDA-MB-231 干细胞, 通过各给药组孵育观察细胞成球性以及 CD133⁺细胞率; 建立裸鼠 MDA-MB-231 异位移植瘤模型, 设生理盐水、紫草素 (SKN)、SKN-MEs、Anti CD133Ab-SKN-MEs, 4 mg/kg 隔天 iv 5 次, 观察肿瘤体积、裸鼠生存时间、抑瘤率和 CD133⁺细胞比率。结果 Anti CD133Ab-SKN-MEs 的最佳质量比为 1.0%, 抗体密度为 0.025%, 粒子形态圆整, 粒径为 (31.4±2.1) nm, 电位为 (-18.7±2.5) mV, 包封率为 (93.6±2.8) %; Anti CD133Ab-SKN-MEs 对 MDA-MB-231 细胞的 IC₅₀ 为 (1.53±0.43) μg/mL, 细胞摄取显著高于 SKN 和 SKN-MEs, 孵育 8 h 可诱导 (67.9±4.2) % 细胞凋亡; Anti CD133Ab-SKN-MEs 可以显著抑制 MDA-MB-231 干细胞的成球性, 明显降低 CD133⁺细胞率; Anti CD133Ab-SKN-MEs 体内抑瘤率为 78.5%, 69 d 后仍有 12.5%裸鼠存活, 瘤组织 CD133⁺细胞率显著降低。结论 与 SKN 相比, Anti CD133Ab-SKN-MEs 在治疗三阴性乳腺癌方面优势明显, 机制可能与降低肿瘤细胞干性作用有关。

关键词: 紫草素; 微乳; 靶向抗肿瘤; 三阴性乳腺癌; CD133

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)07-1587-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.07.014

Treatment of triple-negative breast cancer with anti CD133 antibody-modified shikonin-loaded microemulsion

WANG Jie¹, LI Qian², WU Jing-hua¹, WU Hua², ZHU Juan-ying¹

1. Jiaxing Maternity and Child Health Care Hospital, Jiaxing 314000, China

2. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

Abstract: Objective To evaluate the feasibility and advantages of therapy of triple-negative breast cancer with Anti CD133 antibody-modified shikonin-loaded microemulsion (Anti CD133Ab-SKN-MEs). **Methods** Anti CD133Ab-SKN-MEs were prepared by a classic EDC/NHS conjugation technique. The drug loading efficiency and density of modified antibody were optimized using average particle size, Zeta potential and entrapment efficiency as indicators. The cell proliferation of MDA-MB-231 cells was investigated by MTT method. The cellular uptake of various formulations was qualitatively and quantitatively investigated using FITC as a probe. MDA-MB-231 cellular apoptosis induced by various treatments was evaluated by the Annexin V-PE/7-amino actinomycin D (Annexin V-PE/7-AAD) assay kit. MDA-MB-231 breast cancer stem cells (MDA-MB-231 CSC) was enriched by a suspension culture technique, and the cell morphology and proportion of CD133-positive cells were studied after treatment with various SKN formulations. The model of MDA-MB-231 tumor-bearing nude mice was established, and then injected five times every other day with saline, shikonin (SKN), SKN-MEs, and Anti CD133Ab-SKN-MEs at a dose of 4 mg/kg, to observe the tumor volume, survival time, tumor inhibition and CD133⁺ cells ratio during/after the treatment. **Results** The optimal mass ratio of SKN to total carrier was 1.0% in the preparation of Anti CD133Ab-SKN-MEs, and the optimal density of modified antibody was 0.025%.

收稿日期: 2018-12-24

作者简介: 王洁 (1983—), 女, 本科, 研究方向为中西医结合乳腺肿瘤学研究。Tel: 13736846291 E-mail: xinren0381@sina.com

*通信作者 朱娟英 (1968—), 女, 本科, 主任医师, 研究方向为乳腺肿瘤学研究。Tel: 13736881201 E-mail: tiaopidaodi@163.com

The particle was spherical with a particle size of (31.4 ± 2.1) nm, a potential of (-18.7 ± 2.5) mV and an encapsulation efficiency of (93.6 ± 2.8) %. The IC_{50} of Anti CD133Ab-SKN-MEs against MDA-MB-231 cells was (1.53 ± 0.43) μ g/mL, the cell uptake of Anti CD133Ab-SKN-MEs was significantly higher than that of SKN-MEs and SKN, and 8 h incubation induced (67.9 ± 4.2) % cell apoptosis. Anti CD133Ab-SKN-MEs can significantly inhibit the globularity of MDA-MB-231 CSC, with a decrease in the number of CD133-positive cells. The *in vivo* tumor inhibition rate of Anti CD133Ab-SKN-MEs-treated mice was 78.5%, and 12.5% of tumor-bearing nude mice still survived at day 69. Moreover, the ratio of CD133-positive tumor cells within the tumor tissues was significantly reduced. **Conclusion** Anti CD133Ab-SKN-MEs has obvious advantages in treatment of triple-negative breast cancer, which might be related to the inhibition of tumor cells differentiation.

Key words: shikonin; microemulsion; targeted antitumor; triple-negative breast cancer; CD133

据国家癌症中心 2018 年发布的最新流行病学调查结果,我国女性乳腺癌发病率位居世界 160 位,而死亡率位居 177 位,总体发病率和死亡率均处于较低水平^[1]。但是,我国乳腺癌病例数和死亡率分别占全国女性恶性肿瘤发病和死亡率的第 1 位和第 5 位,总体形势依然不容乐观^[1]。随着临床肿瘤治疗学的发展,目前不同分子亚型的乳腺癌已出现相应的推荐治疗方案,生存率近年来有大幅提高^[2-3]。但是其中的三阴性乳腺癌既没有合适的内分泌治疗药物,也没有靶向治疗药物可以推荐使用,大多数治疗方案还是依托于传统的手术切除和放化疗^[4-5],患者的顺应性以及临床疗效均受到很大的限制。

紫草素(shikonin, SKN)是从紫草科草本植物中提取的一种活性天然成分,具有抗肿瘤、抗炎、抗菌、抗病毒、抗血栓等广泛的生物活性^[6-8]。SKN 抗肿瘤机制包括诱导细胞凋亡、抑制蛋白酪氨酸激酶活性、影响肿瘤血管异常增生等,是一种高效的天然抗肿瘤中药成分^[9-10]。值得关注的是,有课题组报道 SKN 能够降低脑胶质瘤、乳腺癌等干细胞干性标志物的表达,这对提高药物敏感度,降低瘤组织顽性有重要意义^[11-12]。但是,SKN 的水溶性很差,体内吸收存在很大的障碍;此外,常规的制剂手段使得 SKN 在肿瘤组织细胞/干细胞的聚集含量不高,因此通过制剂学手段提高靶细胞/部位的摄取以及聚集显得非常重要。有文献报道,许多肿瘤(如乳腺癌、脑胶质瘤等)干细胞表面过表达 CD133^[11-12],这是一种潜在的药物定向运输靶点,通过对递药系统表面修饰抗 CD133 抗体(Anti CD133Ab),能够将某些活性组分高效递送到目标区域,实现相应的设计初衷。

本研究以三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞和相应的异位移植瘤裸鼠为模型,设计一种微乳给药系统,将 SKN 作为难溶性药物包埋于微乳的脂溶性内核中,并通过经典的缩合法将 Anti CD133Ab

作为乳腺癌干细胞的靶向配体修饰在微乳的表面,验证制得的 SKN 给药系统(Anti CD133 antibody-modified shikonin-loaded microemulsion, Anti CD133Ab-SKN-MEs)在体内外抗肿瘤以及降低瘤细胞干性方面的优势。本实验将围绕微乳的工艺优化、体内外抗肿瘤效应以及初步的机制开展研究。

1 仪器与材料

1.1 仪器

RT5 多点加热磁力搅拌器,苏州赛恩斯仪器有限公司;MS250 DU 型十万分之一天平,瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司;Waters 2965 高效液相色谱(HPLC)仪,美国沃特世科技有限公司;贝克曼 LS13-320 粒径仪,美国贝克曼库尔特有限公司;奥林巴斯 IX83 荧光倒置显微镜,日本奥林巴斯株式会社;JEM-2100 型透射电镜,日本 JEOL 仪器有限公司;Spectra Max[®] ABS Plus 酶标仪,美国 MD 科技有限公司;C6 型流式细胞分析仪,美国 BD 科技有限公司;Milli-Q flex5 超纯水系统,美国密理博仪器有限公司。

1.2 试剂

SKN 购自南京阿仙奴生物科技有限公司,质量分数>98%,批号 AXN64262-202;Kolliphor[®] HS15 购自美国 Sigma-Aldrich 公司;亚油酸、聚乙二醇 400 (PEG400)均购自上海三齐医药科技有限公司;氨基化二硬脂酸磷脂酰乙醇胺聚乙二醇_{5k} (DSPE-PEG_{5k}-NH₂)购于上海艾维特医药科技有限公司;1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)、羟基琥珀酰亚胺(NHS)、异硫氰酸荧光素(FITC)购自阿拉丁化学试剂有限公司;DMEM、胎牛血清(FBS)、胰酶、磷酸缓冲盐(PBS)、细胞用二甲基亚砷(DMSO)、MTT(噻唑盐)等试剂/耗材购自美国 Thermo-Fisher 公司;Anti CD133 抗体、APC-Anti CD133 抗体由美国 Abcam 公司提供;Annexin V-PE/7-AAD 细胞凋亡试剂盒购自合肥

博美生物科技有限公司。

1.3 实验动物

雌性裸鼠，体质量（20±2）g，由上海斯莱克实验动物公司提供，实验动物使用许可证号 SCXK（沪）200720005，饲养于恒温恒湿的 SPF 级层流架中，饲养期间自由给水喂食，实验前 24 h 禁食不禁水。

2 方法与结果

2.1 微乳制备方案优化

2.1.1 投料比工艺优化 称取 900 mg Kolliphor® HS15（以下简称 HS15）、300 mg PEG400 与 10~40 mg SKN，磁力搅拌至完全匀质后，加入 800 mg 亚油酸和 58 mg DSPE-PEG_{5k}-NH₂ 继续搅拌 30 min，5 mL 去离子水逐滴加入，即得 SKN-MEs。2.2 mg

EDC·HCl 和 1.4 mg NHS 加入 SKN-MEs 溶液中室温搅拌 4 h，再加入 15 μg CD133 抗体，室温搅拌过夜^[13]。所得体系用截留相对分子质量为 13 000 透析袋流动水透析 12 h，即得 Anti CD133Ab-SKN-MEs。

借助动态光散射（DLS）激光粒度仪和 HPLC 测算粒径、Zeta 电位和包封率指标。结果见表 1，SKN 质量比（占总处方量质量比）在 0.5%~1.5%，2 种微乳的粒径均未出现明显改变，但当质量比上升到 2.0%后，SKN-MEs 和 Anti CD133Ab-SKN-MEs 的粒径均有显著性增大；不同质量比下所制得的 Anti CD133Ab-SKN-MEs Zeta 电位均比 SKN-MEs 低，提示抗体修饰可以明显降低微乳的表面电荷，更利于维持微乳的结构稳定性；不同投料比也显著

表 1 不同药载比下的粒径、Zeta 电位和包封率考察（ $\bar{x} \pm s, n = 3$ ）

Table 1 Characterizations of particle size, Zeta potential, and encapsulation efficiency of various microemulsions with different feeding of SKN ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

SKN/%	粒径/nm		Zeta 电位/mV		包封率/%	
	SKN-MEs	Anti CD133Ab-SKN-MEs	SKN-MEs	Anti CD133Ab-SKN-MEs	SKN-MEs	Anti CD133Ab-SKN-MEs
0.5	26.5±1.3	32.3±1.9	-13.3±1.8	-17.2±2.1*	85.8±2.1	90.9±3.0
1.0	28.4±1.8	31.4±2.1	-10.6±1.5	-18.7±2.5**	87.4±2.2	93.6±2.8
1.5	38.7±2.4	43.1±3.8**	-12.3±1.5	-19.1±2.8**	69.4±1.9	55.6±1.8*
2.0	57.2±4.2	64.7±4.9**	-14.1±2.0	-21.2±1.9**	51.2±1.5	37.7±1.4**

与相应 SKN 质量比的 SKN-MEs 比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs SKN-MEs with the corresponding SKN quality ratio

影响微乳的 SKN 包封率，当 SKN 的质量比高于 1.0%时，2 种微乳的药物包封率显著降低，且 Anti CD133Ab-SKN-MEs 更低于 SKN-MEs。

2.1.2 抗体密度工艺优化 称取 900 mg HS15、300 mg PEG400 与 20 mg SKN，磁力搅拌 1~2 h 后，加入 800 mg 亚油酸和 58 mg DSPE-PEG_{5k}-NH₂ 继续搅拌 30 min，5 mL 去离子水逐滴加入，即得 SKN-MEs。将 2.2 mg EDC·HCl 和 1.4 mg NHS 加入 SKN-MEs 溶液中室温搅拌 4 h，再加入 6~60 μg CD133 抗体，室温搅拌过夜^[13]。所得体系用截留相对分子质量为 13 000 透析袋流动水透析 12 h，即得 Anti CD133Ab-SKN-MEs。借助 DLS 和 HPLC 测算粒径、Zeta 电位和包封率指标。抗体修饰密度对微乳理化性质的影响，如表 2 所示，在所考察的抗体密度范围内，未见 Anti CD133Ab-SKN-MEs 粒径和电位出现明显变化。以小粒径、高负电性以及高包封率为考量因素，最终将 Anti CD133Ab-SKN-MEs 的制备工艺确定为 SKN 的质量比为 1.0%，抗体修饰密度为 0.025%。

表 2 不同抗体密度下的粒径和电位测定（ $\bar{x} \pm s, n = 3$ ）

Table 2 Particle size and Zeta potential of various microemulsions with different densities of antibody ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

CD133 抗体/%	粒径/nm	Zeta 电位/mV
0.010	29.2±1.6	-19.9±1.8
0.025	31.4±2.1	-18.7±2.5
0.050	34.5±1.7	-19.4±2.1
0.100	27.1±1.4	-21.7±2.3

2.2 药物含量测定方法

SKN 色谱条件参照文献方法^[14]：Agilent SB-C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；色谱柱温度为 30 ℃；流动相为乙腈-水（85：15）；体积流量为 0.8 mL/min；检测波长为 516 nm；进样量为 20 μL。配制不同质量浓度对照品溶液，进 HPLC 检测并绘制成标准曲线，以此作为各测试样品的定量工具。

2.3 微乳制备及表征

2.3.1 空白微乳（blank MEs） 称取 800 mg 亚油酸、900 mg HS15、300 mg PEG400、58 mg DSPE-

PEG_{5k}-NH₂, 45 °C 恒温水浴下剧烈搅拌至完全匀质, 5 min 内将 5 mL 去离子水缓慢滴入体系中, 所形成的澄明略带乳光的溶液即为 blank MEs。

2.3.2 SKN 微乳 (SKN-MEs) 称取 900 mg HS15、300 mg PEG400 与 20 mg SKN, 磁力搅拌 1~2 h 后, 加入 800 mg 亚油酸和 58 mg DSPE-PEG_{5k}-NH₂ 继续搅拌 30 min, 5 mL 去离子水逐滴加入, 即得 SKN-MEs。上述处方解析如下: 亚油酸作为油相, HS15 作为乳化剂, PEG400 作为助乳化剂, DSPE-PEG_{5k}-NH₂ 作为功能化修饰位点。类似的方法, 用 0.04% FITC 代替 SKN, 即得 FITC-MEs。

2.3.3 Anti CD133Ab-SKN-MEs 按上述方法新鲜制得 SKN-MEs。2.2 mg EDC·HCl 和 1.4 mg NHS 加入 SKN-MEs 溶液中室温搅拌 4 h, 再加入 15 μg CD133 抗体, 室温搅拌过夜^[13]。所得体系用截留相对分子质量为 13 000 透析袋流动水透析 12 h, 即得 Anti CD133Ab-SKN-MEs。类似的方法, 用 0.04% FITC 代替 SKN, 即得 Anti CD133Ab-FITC-MEs。

2.3.4 微乳的表征 将上述新鲜制备的微乳定容至 20 mL 后, 8 000×g 离心 5 min 去除未包封的 SKN, 所得上清液取 20 μL 进行 HPLC 药物定量。

包封率 = $C_{SKN} \times \text{稀释倍数} / \text{初始投药量}$

其余上清液稀释成合适浓度后采用 DLS 激光粒度仪测试粒径、多分散指数 (PDI) 和 Zeta 电位等指标。取 1 滴新鲜制备的微乳溶液, 滴于透射电子显微镜 (TEM) 专用镀膜铜网上, 自然晾干后用 1% 磷钨酸染色, 再次晾干后用 TEM 表征粒子形态和尺寸。

结果如表 3 所示, 所制备的 SKN-MEs 粒径仅为 (28.4±1.8) nm, PDI 为 0.101±0.001, Zeta 电位为 (-10.6±1.5) mV。当表面修饰了 CD133 抗体后, Anti CD133Ab-SKN-MEs 在粒径和 PDI 上较 SKN-MEs 均有小幅增加, 但无显著性差异, 但是 Zeta 电位大幅下降至 (-18.7±2.5) mV, 提示 CD133 抗体修饰可增强微乳表面的负电性, 也有助于稳定粒子在水相中的结构。Anti CD133Ab-SKN-MEs 和 SKN-MEs 对 SKN 的包封率均在 90% 左右, 两者无显著性差异, 提示所设计的微乳体系可用于高效包封 SKN。

如图 1 所示, 2 种微乳的粒径分布均在 30 nm 左右, 结果与表 3 的 DLS 结果相一致。图 2 是 2 种微乳的形态学考察, 由图可知 SKN-MEs 外观圆

表 3 微乳的制剂学评价 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Characterizations of various microemulsions ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	粒径/nm	PDI	电位/mV	包封率/%
空白微乳	26.2±1.2	0.093±0.001	-12.3±0.8	—
SKN-MEs	28.4±1.8	0.101±0.001	-10.6±1.5	87.4±2.2
Anti CD133Ab-SKN-MEs	31.4±2.1	0.119±0.002	-18.7±2.5**	93.6±2.8

与空白微乳比较: ** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs blank MEs

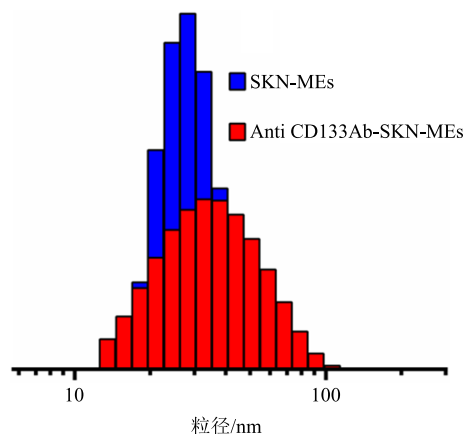


图 1 SKN-MEs 和 Anti CD133Ab-SKN-MEs 的 DLS 粒径分布

Fig. 1 Size distribution of SKN-MEs and Anti CD133Ab-SKN-MEs studied by DLS

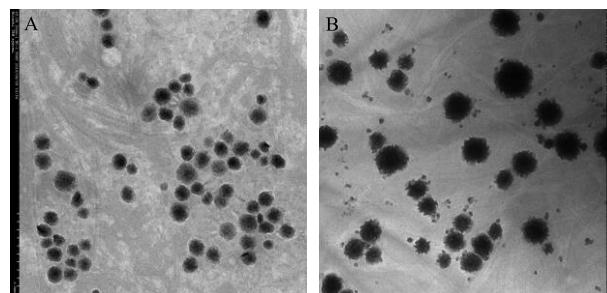


图 2 SKN-MEs (A) 和 Anti CD133Ab-SKN-MEs (B) 的 TEM 图

Fig. 2 Morphology of SKN-MEs (A) and Anti CD133Ab-SKN-MEs (B) observed by TEM

整, 表面相对光滑, 粒径约为 30 nm; Anti CD133Ab-SKN-MEs 形态近乎圆形, 但表面光滑度降低, 推测与修饰上 CD133 抗体有关。

2.4 药物释放研究

将 2.5 mL 新鲜制备的 Anti CD133Ab-SKN-MEs 溶液 (含 5 mg SKN) 移至透析袋中, 再置于装有 100 mL pH 5.0~7.4 的 PBS 介质的溶出杯中 (必要时加入 0.5% 体积比的聚山梨酯-80 助溶), 每个 pH 设 5 个平行实验组。介质温度设为 37 °C, 旋转速率为 90 r/min, 期间在 1~48 h 时间点从溶出介质中取样, 并补足同体积、同 pH 值、同温度的空白溶出介质。所取样品加 9 倍量乙腈稀释, 涡旋 3~5 min, 8 000 g×10 min 离心, 上清液 20 μL 进行 HPLC 定量, 计算药物释放率。

药物释放率 = $C_{\text{测定量}} \times 5 \times 200 / \text{起始药物含量}$

结果如图 3 所示, 在不同 pH 值条件下, Anti CD133Ab-SKN-MEs 48 h 累积释放 SKN 的量均处于 30% 左右, 组间差异无显著性, 提示这种微乳系统具有明显的缓释功能。pH 环境对 SKN 释放的影响较小, 这对药物在生理循环时减少泄露, 减轻毒副作用有积极作用。此外, 从释放动力学特性上看, 0~8 h 释放速率较快, 此后释放明显放缓, 12 h 基本到达平台期。

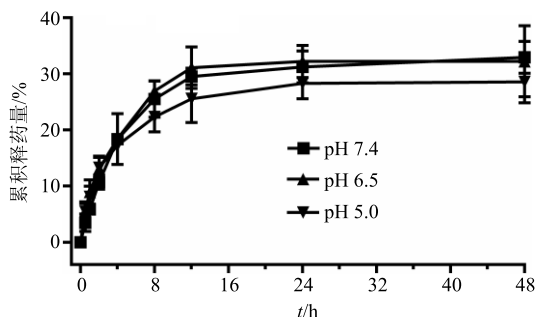


图 3 Anti CD133Ab-SKN-MEs 在不同 pH 条件下的累积释药量 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 3 SKN release profile of Anti CD133Ab-SKN-MEs under different pH values within 48 h ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

2.5 体外抗肿瘤活性评价

2.5.1 细胞培养 MDA-MB-231 (中国科学院细胞库) 细胞培养液为含 10% 胎牛血清的 DMEM。于 37 °C 下, 外接 5% CO₂ 和 90% 湿度的孵育箱中无菌培养。每隔 24~48 h 换 1 次培养基, 显微镜下观察细胞密度超过 80% 时, 用不含 EDTA 的胰酶消化 30 s, 改良型 Eagle 培养基 (DEME) 完全培养基终止消化, 1/10 (密度比) 传代, 备用。

2.5.2 微乳抗肿瘤细胞增殖评价 MDA-MB-231 细胞悬液以 5×10^3 个/mL 接种于 96 孔板中, 静置培养至 60% 细胞密度后, 移除培养液, 加入 0.1 mL

含不同 SKN 质量浓度的 SKN、SKN-MEs 和 Anti CD133Ab-SKN-MEs 溶液, 共孵育 48 h 后加入 20 μL 0.5 mg/mL MTT 溶液, 避光染色 4 h 后, 弃去培养基, 加入 150 μL DMSO, 酶标仪上震荡 3 min 后, 检测 570 nm 处吸光度 (A) 值。半数抑制浓度 (IC₅₀) 通过 SPSS 14.0 软件计算得出。

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

2.5.3 微乳体外诱导细胞凋亡评价 MDA-MB-231 细胞悬液以 1×10^5 个/mL 接种于 24 孔板中, 静置培养至 80% 细胞密度后, 移除培养液, 加入 0.4 mL 含 1.0 μg/mL SKN 的 SKN、SKN-MEs 和 Anti CD133Ab-SKN-MEs 溶液。共孵育 1~8 h 后, PBS 充分清洗, 用不含酚红的胰酶消化后, 再次用 PBS 充分清洗, 离心后用 PBS 分散, 取 100 μL 细胞悬液和等体积的 Annexin V-PE 凋亡试剂盒避光孵育 30 min, 立即进行流式检测, 每个样品计数 30 000 个细胞。

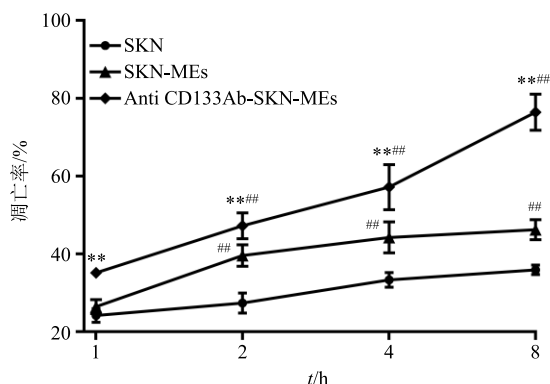
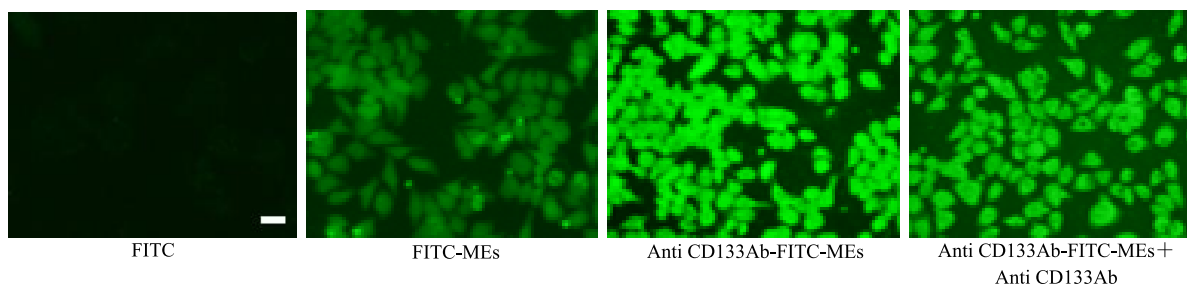
2.5.4 细胞摄取微乳评价 MDA-MB-231 细胞悬液以 1×10^5 个/mL 接种于 24 孔板中, 静置培养至 80% 细胞密度后, 移除培养液, 加入 0.4 mL 含 5 μmol/L FITC 浓度的 FITC、FITC-MEs 和 Anti CD133Ab-FITC-MEs 溶液。共孵育 4 h 后, PBS 充分清洗, 荧光倒置显微镜观察细胞内的荧光强度, 并进行拍照。细胞用不含酚红的胰酶消化后, 再次用 PBS 充分清洗, 离心后用不含酚红和 FBS 的培养基稀释成细胞悬液, 流式细胞仪检测胞内荧光强度, 计数 10 000 个细胞。

结果如表 4 所示, 当 SKN 质量浓度高于 2 μg/mL 时, 各制剂组对 MDA-MB-231 细胞均表现出明显的抑制作用; 组间差异显著, 微乳组处理后的细胞存活率明显低于游离 SKN 组, 提示可能与微乳被细胞摄取增多有关; 此外, Anti CD133Ab-SKN-MEs [IC₅₀ (1.53 ± 0.43) μg/mL] 对细胞的增殖抑制作用在多个质量浓度点都明显强于 SKN-MEs, 可能与抗体修饰后细胞摄取进一步增加有关。

各制剂组在不同时间点的细胞凋亡诱导结果见图 4, 在 1~8 h, SKN 的细胞凋亡诱导率保持在 20%~30% 的小范围内; SKN-MEs 在 2 h 后的凋亡诱导率明显高于游离组, 但 2~8 h 间的凋亡率数值并未出现显著性波动, 提示 2 h 可能是 SKN-MEs 的摄取平台期; 经过 CD133 抗体修饰后, Anti CD133Ab-SKN-MEs 的凋亡率与其他 2 组相比, 不仅在各时间点都有显著性提高, 并且不同时间点的

表 4 微乳对 MDA-MB-231 细胞增殖抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 4 Cytotoxicity of formulations against MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	细胞存活率/%					
	0.05 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
SKN	99.19 $\pm$ 4.24	96.81 $\pm$ 5.26	82.18 $\pm$ 4.11	66.19 $\pm$ 6.73	33.92 $\pm$ 4.35	25.19 $\pm$ 3.12
SKN-MEs	101.27 $\pm$ 4.02	99.81 $\pm$ 5.19	76.15 $\pm$ 4.42	52.21 $\pm$ 5.29*	16.18 $\pm$ 4.27**	14.11 $\pm$ 3.21**
Anti CD133Ab-SKN-MEs	104.35 $\pm$ 7.24	97.63 $\pm$ 4.12	62.92 $\pm$ 5.29*	37.02 $\pm$ 2.21***	11.90 $\pm$ 3.20***	10.81 $\pm$ 1.21**

与 SKN 比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 SKN-MEs 比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs SKN; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs SKN-MEs与 SKN-MEs 比较: ** $P < 0.01$; 与 SKN 比较: ## $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ vs SKN-MEs; ## $P < 0.01$ vs SKN图 4 不同时间点各制剂对 MDA-MB-231 细胞诱导凋亡率 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)Fig. 4 Apoptosis induction by formulations at different time intervals ($\bar{x} \pm s, n = 4$)图 5 不同微乳的细胞摄取荧光图片 (比例尺均为 50 μm)Fig. 5 Cellular uptake of various microemulsions (bar is 50 μm)表 5 微乳的 MDA-MB-231 细胞摄取流式定量评价 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 5 Intracellular intensity of cellular uptake after treating MDA-MB-231 cells with various formulations ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	胞内荧光强度
FITC	17.47 $\pm$ 1.13
FITC-MEs	66.53 $\pm$ 4.27**
Anti CD133Ab-FITC-MEs	74.11 $\pm$ 5.25**

与 FITC 比较: ** $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ vs FITC

数值也有明显上升 [8 h 时的凋亡率为 (67.9 $\pm$ 4.2)%]。

为验证 Anti CD133Ab-SKN-MEs 在细胞增殖抑制及凋亡诱导的优势与细胞摄取有关, 本实验对各制剂组的细胞摄取做了定性和定量的分析。如图 5 所示, Anti CD133Ab-FITC-MEs 处理后的 MDA-MB-231 细胞图亮度明显高于 FITC-MEs 组; 而 2 个微乳组的荧光强度也明显强于游离 FITC 组; 此外, 用 CD133 抗体预孵育细胞后, 再用 Anti CD133Ab-FITC-MEs 处理后的 MDA-MB-231 细胞, 荧光强度则明显降低, 通过正反验证实验展示了 CD133 抗体修饰对微乳促进细胞摄取的作用。表 5 展示的是制剂的摄取定量结果, 通过流式胞内定量, Anti CD133Ab-FITC-MEs 依然表现出最强的荧光强度, 与前述结果一致。

2.6 微乳抑制肿瘤干性评价

2.6.1 微乳对肿瘤细胞成球性影响^[15] 取 1×10^5 个 MDA-MB-231 细胞, 培养在含 FBS (10%)、青霉素 (100 U/mL) 和链霉素 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 DMEM 培养基中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、加湿 5% CO_2 条件下培养。采用细胞悬浮培养技术获得富含肿瘤干细胞 (CSC) 的细胞群。取 2×10^5 个 MDA-MB-23/CSC 接种于超低贴壁培养皿中, 培养基为不含 FBS 的 DMEM/F-12, 并添加 B27、表皮生长因子 (EGF, 20 ng/mL)、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF, 20 ng/mL)、胰

岛素 (5 $\mu\text{g/mL}$)、牛血清白蛋白 (0.4%)、青霉素 (100 U/mL) 和链霉素 (100 $\mu\text{g/mL}$)。静置培养 8~12 d 后, 制得 MDA-MB-23/CSC 瘤球。分为对照 (完全培养基)、SKN、SKN-MEs 和 Anti CD133Ab-SKN-MEs 4 组, 质量浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$, 给药时间为

10 d, 观察终点在显微镜下拍照, 并计算瘤球面积。

结果如图 6 和表 6 所示, 对照组瘤球面积在 4 组中最大, 为 76.52 μm^2 , SKN、SKN-MEs 和 Anti CD133Ab-SKN-MEs 组的面积依次明显减小, 其中 Anti CD133Ab-SKN-MEs 组处理后的瘤球几乎难以

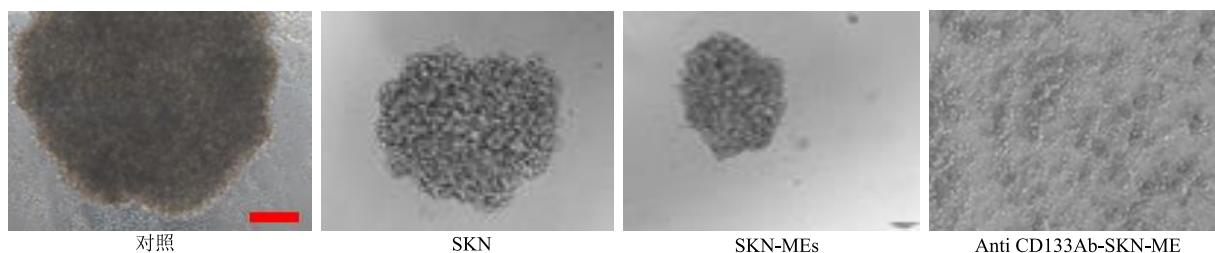


图 6 不同给药组对 MDA-MB-23/CSC 瘤球的形态学影响 (比例尺均为 200 μm)

Fig. 6 Influence of various formulations on morphology of MDA-MB-23/CSC sphere (bar is 200 μm)

表 6 不同给药组对 MDA-MB-23/CSC 瘤球面积的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 6 Influence of various formulations on area of MDA-MB-23/CSC sphere ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	瘤球面积/($\times 10^7 \mu\text{m}^2$)
对照	76.52 $\pm$ 6.24
SKN	43.25 $\pm$ 5.36**
SKN-MEs	19.34 $\pm$ 2.12**##
Anti CD133Ab-SKN-MEs	5.22 $\pm$ 2.01**##&&

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 SKN 组比较: ## $P < 0.01$; 与 SKN-MEs 组比较: && $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs SKN group; && $P < 0.01$ vs SKN-MEs group

观测, 显示出所设计的微乳能够明显降低 MDA-MB-23/CSC 瘤球聚集成球的能力, 可能与降低其瘤干细胞干性作用有关。

2.6.2 微乳对肿瘤细胞干性标志物表达影响 按上述方法制备得 MDA-MB-23/CSC 瘤球。胰酶消化后轻轻吹散成单细胞悬液后。分为对照 (完全培养基)、SKN、SKN-MEs 和 Anti CD133Ab-SKN-MEs 4 组, 质量浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$, 给药时间为 48 h。按照 APC-CD133 抗体试剂盒操作规程避光染色 30 min, 立即采用流式细胞仪检测细胞表面标志物表达水平。

结果如图 7 所示, 对照组的 CD133⁺ 细胞率为 8.23%, 但 SKN、SKN-MEs 和 Anti CD133Ab-SKN-MEs 组的 CD133⁺ 细胞率依次减小, 其中 Anti CD133Ab-SKN-MEs 组处理后的 CD133⁺ 率仅为 1.12%, 显示出所设计的微乳能够明显降低 MDA-MB-23/CSC 的干性标志物表达, 结果与上述实验趋势一致。

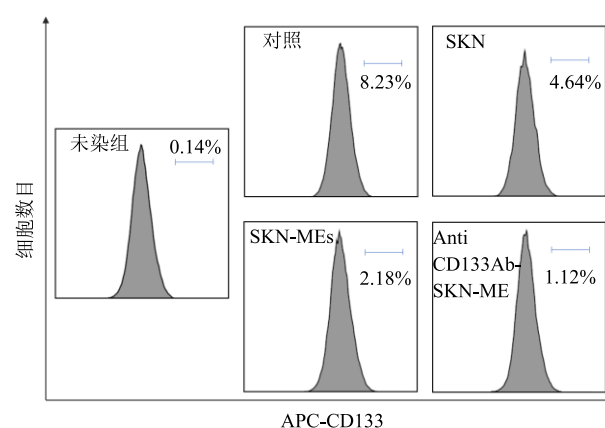


图 7 流式考察不同制剂处理 48 h 后 MDA-MB-23/CSC 的 CD133 阳性率

Fig. 7 Flow cytometric analysis of CD133⁺ cell population in MDA-MB-23/CSC treated with different formulations for 48 h

2.7 体内抗肿瘤活性评价

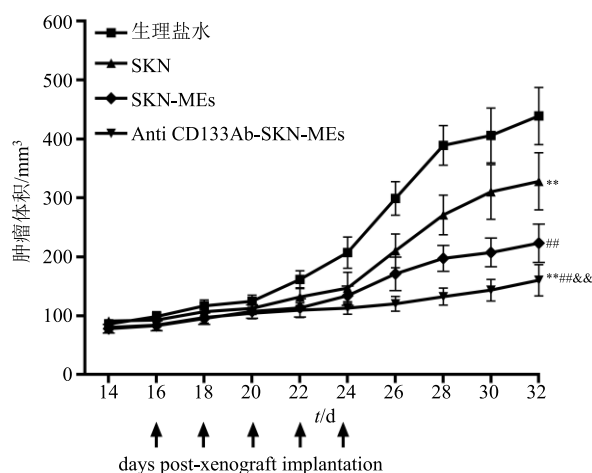
随机选取雌性裸鼠 48 只, 右腿后侧 sc 0.1 mL 1×10^7 个/mL 的 MDA-MB-231 单细胞悬液, 自由给水喂食, 7~10 d 后 (平均瘤体积 70~90 mm^3) 照肿瘤体积随机分为生理盐水、SKN、SKN-MEs 和 Anti CD133Ab-SKN-MEs 4 组, 分别在第 16~24 天进行隔天 iv 给药, 剂量设为 4 mg/kg。治疗期间观察生存状态, 记录肿瘤体积, 第 32 天处死后剥离肿瘤称定质量。肿瘤组织经单细胞悬液制备仪分散, 用 APC-CD133 抗体试剂盒测试瘤组织中 CD133 阳性细胞率^[15]。

$$\text{抑瘤率} = 1 - \frac{\text{肿瘤指数}_{\text{治疗}}}{\text{肿瘤指数}_{\text{生理盐水}}}$$

$$\text{肿瘤指数} = \frac{\text{肿瘤质量}}{\text{动物体质量}}$$

结果如图 8 所示, 治疗组与生理盐水组相比,

均表现出明显的抗肿瘤效应；经过 5 次给药后，观察期终点 SKN-MEs 组的肿瘤体积明显小于 SKN 组，体现了微乳的内在抗肿瘤优势，可能与通透性与滞留增强（EPR）效应所致的被动靶向有关；修饰 CD133 抗体的微乳抑制肿瘤体积进一步增强，显著低于 SKN-MEs 组，结果与体外抗肿瘤效应一致，抑瘤率结果见表 7。SKN-MEs 治疗组的抑瘤率为 60.1%，而 Anti CD133Ab-SKN-MEs 组则达到 78.5%。此外，本实验还统计了不同治疗组的裸鼠生存期，如图 9 所示，SKN-MEs 组裸鼠的最大生存时间为 66 d，相比 SKN 组的 45 d，有明显提高；而 Anti CD133Ab-SKN-MEs 组的裸鼠在观察期终点



与生理盐水组比较：** $P < 0.01$ ；与 SKN 组比较：# $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ；与 SKN-MEs 组比较：&& $P < 0.01$
 ** $P < 0.01$ vs saline group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs SKN group; && $P < 0.01$ vs SKN-MEs group

图 8 MDA-MB-231 荷瘤小鼠经不同给药组治疗期间/之后的肿瘤体积变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Fig. 8 Changes of tumor volume of MDA-MB-231 tumor-bearing mice after treatments at dose of 4 mg/kg ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

表 7 MDA-MB-231 荷瘤小鼠经不同给药组治疗后的抑瘤率和 CD133 阳性率变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Table 7 Tumor inhibition rate and proportion of CD133⁺ cells of mice after treatments ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

组别	抑瘤率/%	CD133 ⁺ /%
生理盐水		5.2 ± 0.4
SKN	31.3 ± 2.3	4.0 ± 0.2**
SKN-MEs	60.1 ± 2.2###	3.1 ± 0.2**#
Anti CD133Ab-SKN-MEs	78.5 ± 3.2###&&	1.9 ± 0.1***&&&

与生理盐水组比较：** $P < 0.01$ ；与 SKN 组比较：# $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ；与 SKN-MEs 组比较：&& $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs saline group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs SKN group; && $P < 0.01$ vs SKN-MEs group

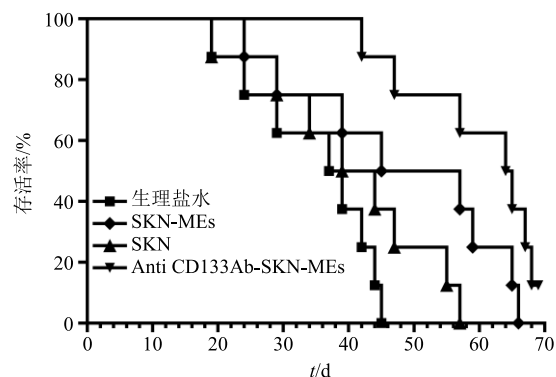


图 9 不同给药组治疗后的动物生存曲线对比

Fig. 9 Survival curves of tumor-bearing mice after different treatments

69 d 时，生存率为 12.5%，提示经过靶向修饰后的微乳可以进一步延长模型动物的生存时间。由表 7 可知，SKN 可以显著降低乳腺癌组织中 CD133 阳性细胞的水平，而通过 SKN-MEs 改善递药后，这种效应进一步提升；再利用 CD133 抗体进行靶向修饰后，SKN 降低乳腺癌细胞干性的水平仍能进一步提升。上述结果验证了 SKN 经过微乳剂型构建和靶向修饰后，体内抗肿瘤能力明显增强，动物生存时间显著延长，这些效应可能与降低了肿瘤细胞表面干性标志物，使细胞对治疗药物更加敏感有关。

3 讨论

三阴性乳腺癌是一种没有明确靶点、恶性程度较高的乳腺癌亚型，现阶段的治疗方案主要依靠传统放化疗^[2-5]。虽然这些治疗手段能够延长患者的生存时间，但是易复发、毒性大、生命质量降低、耐药等问题尚待解决^[16]。上述问题本质上与传统治疗手段靶向性不精准、瘤内递送效率不高以及肿瘤干细胞的干性作用未得到有效抑制有关。本研究在前期 SKN 降低乳腺癌干细胞干性维持作用的研究基础上，引入靶向纳米递药技术，将 SKN 精准靶向到肿瘤干细胞区域，从根部直击肿瘤巢穴，实现靶向治疗三阴性乳腺癌的增效减毒。本实验借鉴了 Qu 等^[17]课题组对中药成分微乳的设计思路，以 SKN 为难溶性抗肿瘤/抗肿瘤干细胞药物，通过经典乳化法将其组装成 SKN-MEs 系统，并通过缩合法将能够主动靶向到干细胞的 Anti CD133Ab 修饰到 SKN-MEs 表面，高效精准地向肿瘤/肿瘤干细胞区域递送 SKN，提高抗肿瘤疗效。

本研究首先制备出性质稳定、粒径均一、包封率高、释放缓慢的 Anti CD133Ab-SKN-MEs 给药系统，为体内外 SKN 精准递送提供了来源稳定的制

剂保障。此外,通过细胞摄取、细胞增殖抑制和细胞凋亡等实验分别验证了微乳给药系统和抗体修饰技术在抗三阴性乳腺癌的优势。为进一步考察优势的潜在机制,本研究制备了干细胞瘤球,并定量出 MDA-MB-231/CSC 中 CD133 阳性细胞率,提示所设计的给药系统可能是降低了肿瘤干细胞干性维持。最后,通过荷 MDA-MB-231 瘤裸鼠模型的体内抗肿瘤实验,证实 Anti CD133Ab-SKN-MEs 在抑制肿瘤生长、延长裸鼠生存时间方面比 SKN-MEs 以及 SKN 有明显的优势,并且治疗后裸鼠肿瘤组织中的 CD133⁺细胞率明显降低,进一步证实上述的科学假想。本研究通过靶向技术修饰的微乳给药系统增强了 SKN 自身抗乳腺癌的优势,为靶向治疗三阴性乳腺癌提供了一条有前景的解决方案。本实验仅从靶向技术所介导的抗肿瘤药效优势角度探讨了剂型设计的科学性和有效性,在后续工作中,还将借助激光共聚焦成像技术,对 Anti CD133Ab-SKN-MEs 在细胞水平和组织水平的靶向能力以及靶向机制进行深入探讨,为该制剂的增效机制提供更为合理、科学、严谨的解释。

参考文献

- [1] Chen W, Sun K, Zheng R, *et al.* Cancer incidence and mortality in China, 2014 [J]. *Chin J Cancer Res*, 2018, 30(1): 1-12.
- [2] Stefanou D, Kokkali S, Tripodaki E S, *et al.* Subcutaneous Trastuzumab combined with Pertuzumab and Docetaxel as first-line treatment of advanced HER2-positive breast cancer [J]. *Anticancer Res*, 2018, 38(11): 6565-6569.
- [3] Farrugia M K, Wen S, Jacobson G M, *et al.* Prognostic factors in breast cancer patients evaluated by positron-emission tomography/computed tomography before neoadjuvant chemotherapy [J]. *World J Nucl Med*, 2018, 17(4): 275-280.
- [4] Sang M M, Liu F L, Wang Y, *et al.* A novel redox/pH dual-responsive and hyaluronic acid-decorated multifunctional magnetic complex micelle for targeted gambogic acid delivery for the treatment of triple negative breast cancer [J]. *Drug Deliv*, 2018, 25(1): 1846-1857.
- [5] Xiao W, Zheng S, Yang A, *et al.* Incidence and survival outcomes of breast cancer with synchronous hepatic metastases: A population-based study [J]. *J Cancer*, 2018, 9(23): 4306-4313.
- [6] Kim H J, Hwang K E, Park D S, *et al.* Shikonin-induced necroptosis is enhanced by the inhibition of autophagy in non-small cell lung cancer cells [J]. *J Transl Med*, 2017, 15(1): 123.
- [7] Bi Y, Zhu Y, Zhang M, *et al.* Effect of shikonin on spinal cord injury in rats via regulation of HMGB1/TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(2): 481-491.
- [8] 柴冰阳, 陈泽慧, 张闪闪, 等. 4 种细胞毒活性方法评价紫草素体外肿瘤细胞抑制作用效果 [J]. *中草药*, 2019, 50(1): 172-177.
- [9] Lu B, Gong X, Wang Z Q, *et al.* Shikonin induces glioma cell necroptosis *in vitro* by ROS overproduction and promoting RIP1/RIP3 necrosome formation [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38(11): 1543-1553.
- [10] Zhao X Y, Zhu Y N, Hu J H, *et al.* Shikonin inhibits tumor growth in mice by suppressing pyruvate kinase M2-mediated aerobic glycolysis [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 14517.
- [11] Liu J, Qu C B, Xue Y X, *et al.* MiR-143 enhances the antitumor activity of shikonin by targeting BAG3 expression in human glioblastoma stem cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 468(1/2): 105-112.
- [12] Thakur R, Trivedi R, Rastogi N, *et al.* Inhibition of STAT3, FAK and Src mediated signaling reduces cancer stem cell load tumorigenic potential and metastasis in breast cancer [J]. *Sci Rep*, 2015, 14(5): 10194.
- [13] Min H S, Kim H J, Ahn J, *et al.* Tuned density of anti-tissue factor antibody fragment onto siRNA-loaded polyion complex micelles for optimizing targetability into pancreatic cancer cells [J]. *Biomacromolecules*, 2018, 19(6): 2320-2329.
- [14] Li M, Chen X, Hu S, *et al.* Determination of blood concentrations of main active compounds in Zi-Cao-Cheng-Qi decoction and their total plasma protein binding rates based on hollow fiber liquid phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography [J]. *Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2018, 1072: 355-361.
- [15] Liu M, Shen S, Wen D, *et al.* Hierarchical nanoassemblies-assisted combinational delivery of cytotoxic protein and antibiotic for cancer treatment [J]. *Nano Lett*, 2018, 18(4): 2294-2303.
- [16] Abramson V G, Lehmann B D, Ballinger T J, *et al.* Subtyping of triple-negative breast cancer: Implications for therapy [J]. *Cancer*, 2015, 121(1): 8-16.
- [17] Qu D, Guo M, Qin Y, *et al.* A multicomponent microemulsion using rational combination strategy improves lung cancer treatment through synergistic effects and deep tumor penetration [J]. *Drug Deliv*, 2017, 24(1): 1179-1190.