

• 药理与临床 •

靶向熊果酸脂质纳米粒抗宫颈癌的作用研究

杨 光, 陈晓青, 陈中强

江汉大学医学院, 湖北 武汉 430056

摘要: **目的** 探讨靶向熊果酸脂质纳米制剂抗宫颈癌的作用效果。**方法** 利用新型靶向性功能材料叶酸-CONH-聚乙二醇-NH-胆固醇合成靶向熊果酸脂质纳米粒, 采用 MTT 法对比靶向熊果酸脂质纳米粒的人宫颈癌 HeLa 细胞和宫颈正常鳞状上皮细胞的增殖抑制作用的差异性; 用流式细胞术考察其促细胞凋亡作用; 应用蛋白免疫印迹 (Western blotting) 检测 Bcl-2、Bax、Livin 及 Caspase-3 的蛋白表达, 用实时荧光定量-聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 检测基因表达, 探索靶向熊果酸脂质纳米粒抗宫颈肿瘤的作用机制。初步考察靶向熊果酸脂质纳米粒在荷瘤鼠体内的抗肿瘤作用。**结果** 靶向熊果酸脂质纳米粒对 HeLa 细胞具有显著的细胞增殖抑制及促细胞凋亡作用; 使细胞中 Livin、Bcl-2 基因或蛋白表达增加, Caspase-3、Bax 基因或蛋白表达减少; 体内抑瘤效率高于普通熊果酸脂质纳米粒。**结论** 靶向熊果酸脂质纳米粒可有效传输药物至肿瘤组织, 抑制细胞的增殖, 促使其凋亡, 具有一定的体内抗肿瘤效果。

关键词: 熊果酸; 靶向脂质纳米粒; 宫颈癌 HeLa 细胞; 抗肿瘤; 叶酸; 细胞增殖; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)08-2185-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.08.027

Anti-cervical cancer effect of targeting ursolic acid lipid nanoparticles

YANG Guang, CHEN Xiao-qing, CHEN Zhong-qiang

College of Medicine, Jianghan University, Wuhan 430056, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of targeting ursolic acid lipid nanoparticles on cervical cancer. **Methods** In this study, a novel targeted functional material, folate-CONH-polyethylene glycol-NH-cholesterol, was firstly used to synthesize targeted lipid nanoparticles. MTT assay was used to detect and compare the difference of its inhibition on the proliferation of human cervical cancer HeLa cells and normal cervical squamous epithelial cells. The flow cytometry was then used to investigate the pro-apoptotic effect of ursolic acid lipid nanoparticles on HeLa cells. The effects of ursolic acid lipid nanoparticles on the protein expressions of Bcl-2, Bax, Livin, and Caspase-3 were detected by Western blotting and gene expressions were detected by qRT-PCR, and the mechanism of its targeted anti-cervical tumor was explored. Finally, the anti-tumor effect in tumor-bearing mice was investigated. **Results** The targeted ursolic lipid nanoparticles showed significant inhibition of cell proliferation and apoptosis in HeLa cells, which may be associated with down-regulating the expression of Livin and Bcl-2 protein, and up-regulating the expression of Caspase-3 and Bax protein. *In vivo* tumor inhibition efficiency was higher than other groups. **Conclusion** Targeted lipid nanosystem can effectively deliver drugs to tumor tissues, inhibit the proliferation of cells, and promote their apoptosis, which has certain anti-tumor efficiency *in vivo*.

Key words: ursolic acid; targeted lipid nanoparticles; cervical cancer HeLa cells; antitumor; folic acid; cell proliferation; apoptosis

宫颈癌是临床较常见的妇科恶性肿瘤之一, 其发病率在女性恶性肿瘤中居第 2 位, 仅次于乳腺癌。据统计, 全世界每年约有 50 万宫颈癌新发病例, 其中中国约 13 万多, 占世界新发病例的四分之一^[1]。据世界卫生组织 (WHO) 推测, 至 2050 年全球每年将有 100 万左右患者死于宫颈癌。我国每年有 2~

3 万人死于宫颈癌, 并呈不断上升趋势, 年龄也更趋于年轻化^[2]。有研究证实叶酸受体 (FR) 在宫颈癌细胞中高度表达, 与宫颈癌的发生演变密切相关^[3]。前期本课题组已构建以钙黄绿素为荧光探针的标记物, 利用人宫颈癌 HeLa 肿瘤细胞表面高表达 FR 的特性, 通过 FR 所介导的高效靶向作用, 将连接有

收稿日期: 2019-12-19

基金项目: 江汉大学博士资助科研启动经费项目 (032 号)

作者简介: 杨 光, 女, 博士研究生, 研究方向为靶向药物新剂型。E-mail: sunshine77@126.com

新型靶向材料叶酸-CONH-聚乙二醇-NH-胆固醇的脂质纳米制剂成功输送至肿瘤细胞^[4]，为抗肿瘤药物的体内靶向转运提供理想的载体。熊果酸是五环三萜类化合物，存在于夏枯草、白花蛇舌草、女贞子等药材中，具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤及免疫调节等功能^[5-6]。它对多种恶性肿瘤细胞具有明显的细胞毒作用，能诱导乳腺癌、胃癌及大肠癌等多种肿瘤细胞的凋亡，通过抑制 DNA 聚合酶及 DNA 拓扑酶活性，激活 Caspase 蛋白家族 Caspase-3 诱导的酶解级联反应抑制细胞增殖^[7-8]。脂质纳米制剂能避免药物的降解，有效延长药物在机体内的作用时间，增强肿瘤靶向性，尤其适合将熊果酸这类水不溶性药物制备成脂质纳米制剂^[9]。

本研究以叶酸-CONH-聚乙二醇-NH-胆固醇作为靶向材料，采用薄膜分散法合成靶向熊果酸脂质纳米粒，考察该制剂对 HeLa 细胞增殖、凋亡的影响及其作用机制，初步考察其体内抑瘤效果，旨在探讨靶向熊果酸脂质纳米粒抗宫颈癌的效果，为肿瘤的治疗提供理论依据。

1 仪器与材料

N-1100S-WD 型旋转蒸发仪，上海普渡生化科技有限公司；DF-101S 型恒温加热磁力搅拌器，郑州长城科工贸有限公司；DZF-6090 型真空干燥箱，上海林频仪器有限公司；AL204 型电子天平，梅特勒-托利多仪器有限公司；Forma 311 型二氧化碳培养箱，美国 Forma 公司；酶标仪，芬兰 Thermo Labsystems；IX71 型倒置荧光显微镜，日本 Olympus 公司；FACSCalibur 型流式细胞仪，美国 BD Biosciences 公司；H6-1 微型电泳槽，上海西巴斯生物科技有限公司；PowerPac 高电流电泳仪，美国 Bio-Rad 公司；HoferTM miniVE 垂直电泳槽，美国 Amersham Pharmacia 公司；化学发光成像分析系统，美国 Gene 公司；Neofuge 15R 台式高速冷冻离心机，Heal Force 公司；7300 荧光定量 PCR 仪，ABI 公司。

氢化大豆磷脂(HSPC)，美国 Avanti Polar Lipids Inc. 公司；叶酸-CONH-聚乙二醇-NH-胆固醇靶向材料，自制；熊果酸（质量分数 98%），华中科技大学同济医学院药学院提供；聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (mPEG₂₀₀₀-DSPE)，德国 Lipoid 公司；胆固醇，比利时 Acros organics 公司；MTT、DMEM 培养基，Promega 公司；AnnexinV-FITC/PI 双染细胞凋亡试剂盒，美国 Molecular Probes 公司；Bcl-2 兔抗人多克隆抗体、Bax 兔抗人多克隆抗体、

Caspase-3 兔抗人多克隆抗体、Livin 兔抗人多克隆抗体、二抗 Anti-rabbit IgG，HRP-linked Antibody，Cell Signaling Technology 公司；细胞裂解液，碧云天生物科技有限公司；蛋白酶抑制剂 PMSF、cocktail、磷酸化蛋白酶抑制剂、BCA 蛋白定量试剂盒、蛋白上样缓冲液、SDS-PAGE 琼脂糖凝胶试剂盒，谷歌生物科技有限公司；Thermo Pierce ECL 化学发光试剂盒，上海慧颖生物科技有限公司；Trizol Reagent，Invitrogen Life Technologies 公司；RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit，Thermo 公司；引物，Invitrogen Biotechnology Co., Ltd. 公司；其他试剂均为国产分析纯。

人宫颈癌 HeLa 细胞和宫颈正常鳞状上皮细胞由华中科技大学同济医学院附属同济医院提供；balb/c 裸鼠，雌性，鼠龄 6~8 周，体质量 16~20 g，由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供，生产许可证号 SCXK（沪）2012-0002。

2 方法与结果

2.1 靶向熊果酸脂质纳米粒的制备

按物质的量比 63 : 32 : 0.5 : 4.5 分别称取 HSPC、胆固醇、叶酸-CONH-聚乙二醇-NH-胆固醇、mPEG₂₀₀₀-DSPE，再按药脂比 1 : 20 加入熊果酸，共溶于 5 mL 氯仿中，置旋转蒸发仪上减压旋转蒸发（37 °C），直至梨形瓶内壁形成一层薄薄的白色脂质薄膜。然后，于 60 °C 水浴中用 2 mL pH 6.8 PBS 缓冲溶液水化脂质膜。水化后的脂质溶液过 0.22 μm 滤膜，用高压挤出器进行整粒，即得乳白色半透明脂质纳米混悬液。普通熊果酸脂质纳米粒的制备同上（不加叶酸-CONH-聚乙二醇-NH-胆固醇靶向材料）。通过透射电镜观察所制备的靶向熊果酸脂质纳米粒的形态，呈类圆形或椭圆形纳米颗粒，平均粒径在 100 nm 左右（图 1）。同时，对纳米粒的分散系数、电位及载药量、包封率、稳定性等进行了检测分析^[4]。

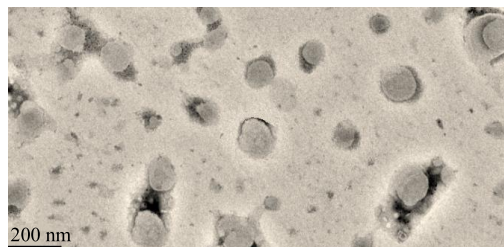


图 1 靶向熊果酸脂质纳米粒的透视电镜形态

Fig. 1 Targeting ursolic acid lipid nanoparticles in perspective electron microscope

2.2 统计学分析

运用 GraphPad Prism 5.01 软件对数据进行统计分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间数据比较采用单因素方差分析 Bartlett's 检验。

2.3 肿瘤细胞增殖抑制实验

2.3.1 细胞培养 在 5% CO₂、37 °C 条件下用含有 10% 灭活胎牛血清的无叶酸 RPMI 1640 培养基培养人宫颈癌 HeLa 细胞和宫颈正常鳞状上皮细胞, 传代 2~3 次, 然后取对数生长期的细胞用于实验。

2.3.2 MTT 法 取 1×10^4 个/mL 对数生长期的 HeLa 细胞接种于 96 孔酶标板中, 共分 4 组, 每组设 6 个复孔, 每孔加入 100 μ L 的细胞培养液, 在 37 °C、含 5% CO₂ 的培养箱中孵育 24 h; 随后分别加入除菌的 4 组药物 (普通熊果酸脂质纳米粒、靶向熊果酸脂质纳米粒加入相应的细胞培养液中, 使其熊果酸终浓度为 200 μ mol/L; 叶酸受体靶向阻断组为同样浓度的靶向熊果酸脂质纳米粒, 并含 1 mmol/L 游离叶酸; 空白靶向脂质纳米粒组加入空白靶向脂质纳米粒), 同时另设空白对照组 (空白脂质体) 和阴性对照组 (含 PBS) 继续分别培养 48 h 和 72 h; 培养结束后每孔加入质量浓度约为 5 mg/mL 的 MTT 20 μ L, 于 37 °C 继续孵育 4 h 后弃原液。每孔再加入 150 μ L DMSO, 使蓝紫色结晶完全溶解, 并静置 20 min; 在 490 nm 条件下用酶标仪检测吸光度 (A), 计算细胞存活率 (存活率 = $A_{\text{脂质纳米粒}}/A_{\text{空白对照}}$)。

另外, 为考察靶向熊果酸脂质纳米粒对正常细胞是否具有毒性, 取对数生长期的 HeLa 细胞及宫颈正常鳞状上皮细胞, 以每孔 1×10^4 个/mL 接种于 96 孔培养板, 贴壁后分别加入 0 (对照)、15、30、60、120、240 μ mol/L (熊果酸浓度) 的靶向熊果酸脂质纳米粒孵育 72 h。按 MTT 法测定, 计算细胞存活率 (存活率 = $A_{\text{药物}}/A_{\text{对照}}$)。

实验结果如图 2 所示, 与其他各组相比较, 靶向熊果酸脂质纳米粒呈现明显的细胞增殖抑制作用, 72 h 的抑制率大于 70%, 抑制率约为普通熊果酸脂质纳米粒的 3~4 倍; 而空白靶向脂质纳米粒及普通熊果酸脂质纳米粒对 HeLa 细胞的增殖几乎无抑制作用; 叶酸受体靶向阻断组则有一定的增殖抑制作用, 是因为加入的 1 mmol/L 叶酸对 HeLa 细胞表面 FR 的封闭作用, 其细胞增殖抑制强度远比靶向熊果酸脂质纳米粒低。空白对照组 (空白脂质体) 与空白靶向脂质纳米粒组 (未加药物仅加靶向脂质材料) 的细胞存活率基本一致。因本实验的药

物分组未设置游离熊果酸, 全部是脂质纳米制剂, 因此, 选择对细胞存活几乎无影响的空白脂质体为空白对照组作为后续实验的基线对照, 更具代表性。

从宫颈正常鳞状上皮细胞和 HeLa 细胞的差异性研究中发现, 不同浓度靶向熊果酸脂质纳米粒组药物处理 HeLa 细胞和正常细胞 72 h 后, 2 种细胞的存活率均有所下降, 但 HeLa 细胞的存活率明显低于正常细胞, 正常细胞的存活率随药物浓度的增加呈现缓慢下降的趋势, 结果见图 3。因采用含 10% 灭活胎牛血清的无叶酸的 RPMI 1640 培养基培养, 正常细胞的少量死亡可能受无叶酸培养条件及处理工艺的影响^[10]。靶向熊果酸脂质纳米粒对 HeLa 细胞及正常细胞的半数抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 77.26 μ mol/L 及 470.5 μ mol/L。

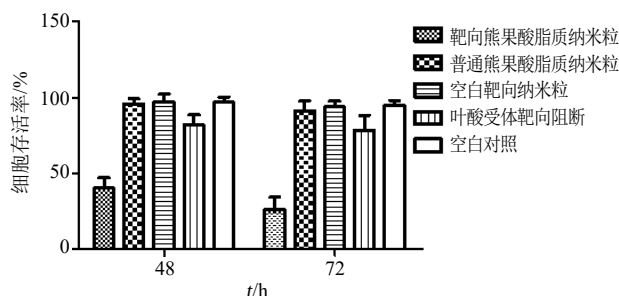


图 2 脂质纳米粒对 HeLa 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 2 Effects of lipid nanoparticles on HeLa cells proliferation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

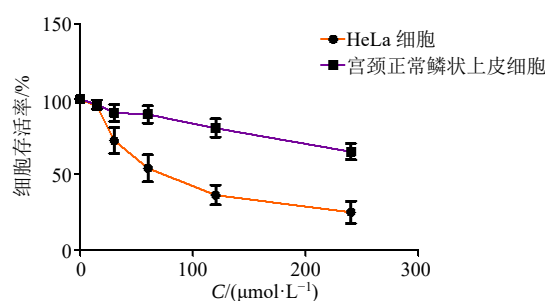


图 3 靶向熊果酸脂质纳米粒对 HeLa 和宫颈正常鳞状上皮细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 3 Effects of targeted group drugs on HeLa and normal cell survival ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡实验

采用流式细胞术定量分析检测细胞凋亡的情况。收集经空白脂质体、普通熊果酸脂质纳米粒、靶向熊果酸脂质纳米粒及靶向熊果酸脂质纳米粒和

叶酸（阻断组）分别作用 24 h 的 HeLa 细胞，用冷 PBS 缓冲液洗涤 3 次，调整细胞浓度为 4.5×10^5 个/mL，用 (AnnexinV-FITC)/PI 双染细胞凋亡试剂盒染色，室温避光孵育 5 min，用流式细胞仪检测荧光强度。

流式细胞术检测结果（图 4）显示，经 4 组药

物制剂分别作用 24 h 后，HeLa 细胞的凋亡率分别为 $(6.3 \pm 0.4)\%$ 、 $(13.7 \pm 0.3)\%$ 、 $(17.9 \pm 0.2)\%$ 、 $(27.1 \pm 0.5)\%$ 。与空白脂质体组相比，普通熊果酸脂质纳米粒组、阻断组有少许凋亡细胞产生，但靶向熊果酸脂质纳米粒促肿瘤细胞凋亡效应显著高于其他各组，各组间比较差异显著 ($P < 0.05$)。

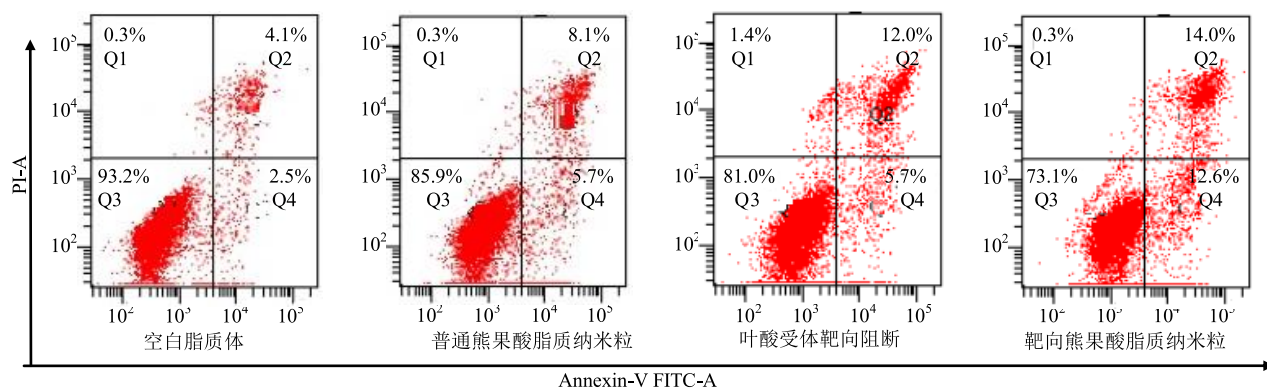


图 4 不同脂质纳米粒对 HeLa 细胞凋亡的影响

Fig. 4 Effects of different lipid nanoparticles on HeLa cell apoptosis for 24 h

2.5 蛋白表达检测实验

采用 Western blotting 蛋白免疫印迹法检测经不同脂质纳米粒处理后 HeLa 细胞的 Bcl-2、Bax、Livin 及 Caspase-3 蛋白表达情况。将 HeLa 细胞接种于 10 cm 培养皿中，待细胞长满培养皿的 90% 后按“2.4”项处理方法加药处理，37 °C 温育 24 h，再用冷 PBS 缓冲液漂洗 2 次，加 300 mL 细胞裂解液，12 000 r/min 离心 10 min 后取上清液收获总蛋白。取 30 μg 总蛋白经 10% 聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳分离后，于 4 °C 下转移至聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜，室温下用 5% 的脱脂牛奶封闭 1 h 后分别加 1:1 000 稀释的 Bcl-2 兔抗人多克隆抗体、Bax 兔抗人多克隆抗体、Caspase-3 兔抗人多克隆抗体、Livin 兔抗人多克隆抗体 (β-actin 作为上样量对照)，4 °C 放置过夜。最后 TBS 洗膜，加入 1:1 000 稀释的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗，室温反应 2 h，洗膜后显色扫描。

以空白脂质体作阴性对照，与普通熊果酸脂质纳米粒及阻断组相比较，靶向熊果酸脂质纳米粒组 HeLa 细胞 Livin、Bcl-2 的蛋白表达量明显减少；而 Bax、Caspase-3 的蛋白表达量增加（图 5）。表明靶向熊果酸脂质纳米粒可下调 HeLa 细胞 Livin、Bcl-2 蛋白的表达，同时上调 Bax、Caspase-3 蛋白的表达。

2.6 qRT-PCR 基因表达量测定

取对数生长期的肿瘤细胞，给药方法同“2.4”

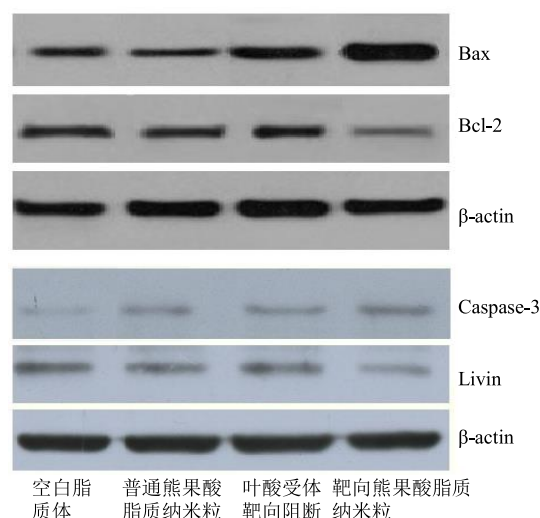


图 5 脂质纳米粒对 HeLa 细胞中 Bax、Bcl-2、Caspase-3、Livin 蛋白表达的影响

Fig. 5 Effect of lipid nanoparticles on Bax, Bcl-2, Caspase-3, and Livin protein expression in HeLa cells

项，37 °C 孵育 24 h 后离心收集细胞。按 Trizol 试剂盒说明提取细胞总 RNA：加入 1 mL 的 Trizol Reagent，破碎细胞，将液体转移至灭菌的 1.5 mL 离心管内；加入 250 μL 三氯甲烷，充分混匀后静置 3 min；于 4 °C 下 13 000×g 离心 8 min，取上清，加入 0.8 倍体积的异丙醇，混匀，-20 °C 放置 15 min，

4 ℃下 13 000×g 离心 10 min, 管底的白色沉淀即为 RNA。弃上清, 加入 75%乙醇 1.5 mL 洗涤沉淀。弃上清, 将离心管置于超净台上吹 3 min; 加 20 μL 无 RNA 酶的水溶解 RNA, 于 55 ℃孵育 5 min。再逆转录合成 cDNA: 取 PCR 管, 加入含 2 μg RNA 的溶液; 加入 1 μL oligo(dT)₁₈, 用无核糖核酸酶的去离子水补足至 12 μL, 70 ℃加热 5 min, 再迅速

置冰上冷却, 依次加入 4 μL 5×buffer, 2 μL 10 mmol/L dNTPs, 1 μL RNA inhibitor 和 1 μL 反转录酶, 用枪抽吸混匀; 42 ℃孵育 60 min, 80 ℃保温 5 min 灭活反转录酶。荧光定量 PCR: 应用 ABI[®]7300 荧光定量 PCR 仪测定 Bcl-2、Bax、Livin 及 Caspase-3 的基因表达情况, 反应以 β-actin 作为内参, 基因表达水平以 2^{-ΔΔCt} 法进行分析。引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列及反应参数

Table 1 qRT-PCR primer sequences and reaction parameters

基因	引物序列 (5'→3')	PCR 反应参数
β-actin	正向: 5'-CACCCAGCACAATGAAGATCAAGAT-3'	95 ℃、5 min; 95 ℃、15 s; 60 ℃、60 s, 40 个循环; 75 ℃、75 s; 熔解
	反向: 5'-CCAGTTTTTAAATCCTGAGTCAAGC-3'	
Bcl-2	正向: 5'-TCCCAGCCTCCGTTATCC-3'	95 ℃、5 min; 95 ℃、15 s; 54 ℃、45 s, 32 个循环; 75 ℃、75 s; 熔解
	反向: 5'-CTTCGCGCAGATGTCCAG-3'	
Bax	正向: 5'-TGCTTCAGGGTTTCATCCAGG-3'	95 ℃、5 min; 95 ℃、15 s; 55 ℃、30 s, 30 个循环; 75 ℃、75 s; 熔解
	反向: 5'-TGGCAAAGTAGAAAAGGGCGA-3'	
Livin	正向: 5'-TCTATGACTGGCCGCTGACT-3'	95 ℃、5 min; 95 ℃、15 s; 60 ℃、30 s, 30 个循环; 75 ℃、75 s; 熔解
	反向: 5'-CTTTTGACCGGAGCAGGAAC-3'	
Caspase-3	正向: 5'-ATGGAAGCGAATCAATGGAC-3'	95 ℃、5 min; 95 ℃、15 s; 65 ℃、15 s, 40 个循环; 75 ℃、75 s; 熔解
	反向: 5'-GAGCGACGGAGAGAGACTGT-3'	

与空白对照组比较, 各药物组 HeLa 细胞的 Livin、Bcl-2 的 mRNA 扩增产物表达量呈逐渐减少的趋势; 而 Bax、Caspase-3 的 mRNA 表达量呈增加趋势。与普通组及阻断组相比, 靶向熊果酸脂质纳米粒可下调 Livin、Bcl-2 的 mRNA 表达, 同时上调 Bax、Caspase-3 的 mRNA 表达, 说明靶向熊果酸脂质纳米粒可能通过影响人宫颈癌 HeLa 细胞 Livin/Caspase-3 信号传导过程诱导细胞凋亡。结果见图 6。

2.7 体内荷瘤鼠肿瘤抑制效应的研究

将 HeLa 单个细胞悬液调整至浓度为 5.5×10⁶ 个/mL, 取 150 μL 直接接种至 6~8 周龄裸鼠右前

肢腋部皮下。期间不断观察裸鼠的生存状态及肿瘤生长大小, 于接种后 2 周左右, 选择肿瘤生长体积较大 (瘤体积 60~80 mm³) 及生存状况较好的荷瘤鼠, 作为荷瘤鼠动物模型。

取荷瘤鼠共 24 只随机分成 4 组, 每组 6 只, 分别为模型组、普通熊果酸脂质纳米粒组、阻断组 (含靶向熊果酸脂质纳米粒和 1 mmol/L 游离叶酸) 及靶向熊果酸脂质纳米粒组。每只裸鼠尾单次 iv 给药 5.5 mg/kg (以熊果酸计), 给药频率为隔天 1 次, 连续给药 5 次。隔日测量肿瘤最长径 (D_{max}) 和最短径 (D_{min}), 按照公式 $V=\pi D_{\max} D_{\min} \times 2/6$ ^[11] 计算各组裸鼠不同时间的肿瘤体积 (V), 并记录其生存

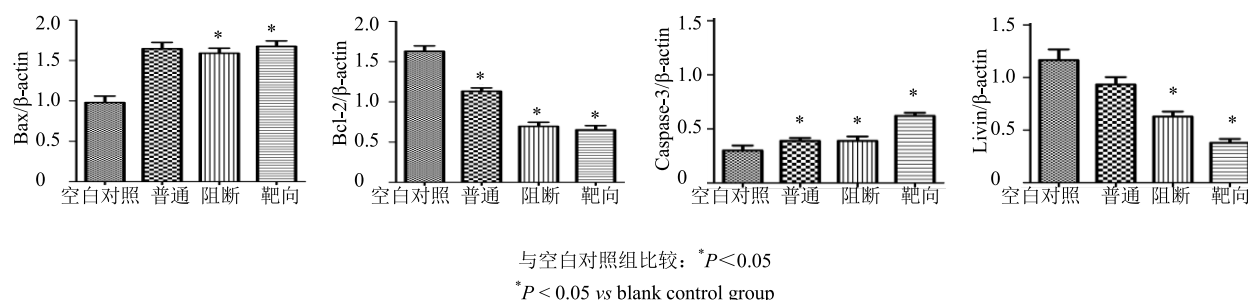


图 6 qRT-PCR 检测经不同脂质纳米制剂作用的 HeLa 细胞中 Bax、Bcl-2、Caspase-3、Livin 的 mRNA 表达情况 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 6 mRNA expressions of Bax, Bcl-2, Caspase-3, and Livin in HeLa cells treated with different lipid nanometers by qRT-PCR ($\bar{x} \pm s, n=3$)

状态。待肿瘤 $D_{\max}$ 接近 2 cm, 颈椎脱臼处死, 绘制荷瘤裸鼠生存曲线。

如图 7 所示, 模型组裸鼠的瘤体积随着时间的推移而不断增大, 荷瘤鼠的运动能力明显受限, 其生存状况及食欲均较其他组差; 靶向熊果酸脂质纳米粒组的瘤体积随时间的延长也有所增长, 但增长幅度没有其他组明显。ANOVA 方差分析, 与模型组相比, 靶向熊果酸脂质纳米粒组瘤体积减少 30%~40%; 而普通熊果酸脂质纳米粒组及阻断组的瘤体积仍是处于持续生长状态。给药第 24 天, 模型组、普通熊果酸脂质纳米粒、阻断组及靶向熊果酸脂质纳米粒组裸鼠的平均瘤体积为 ($1\ 352.53 \pm 403.05$)、($1\ 149.86 \pm 178.82$)、($1\ 137.01 \pm 306.42$)、(788.32 ± 194.76) mm^3 。说明靶向熊果酸脂质纳米粒载药系统能成功将药物输送至肿瘤组织产生药效。

荷瘤裸鼠的生存曲线均采用 Graphpad Prism 软件采用 Kaplan-Meier 方法进行估算。以自然死亡或瘤体 $D_{\max}$ 达 2 cm 为处死标准, 如图 8 所示, 模型组最长生存期为 39 d; 而普通熊果酸脂质纳米粒和阻断组的生存期分别为 44 d 和 48 d; 靶向熊果酸脂质纳米粒组的生存周期最长为 56 d, 说明靶向熊果

酸脂质纳米粒相对其他组别能有效抑制肿瘤的生长, 延长荷瘤鼠生存周期, 改善其生存状况。

3 讨论

近年来, 在癌症治疗领域中草药以其独特的减毒增效优势作为补充替代疗法而备受关注。熊果酸具有多种药理作用, 其中最重要的是抗肿瘤作用。有研究人员发现, 熊果酸的结构式与糖皮质激素地塞米松类似, 熊果酸可通过阻断糖皮质激素受体而发挥 HeLa 细胞增殖抑制效应^[12]。在本研究中, 为了进一步改善熊果酸的水不溶性问题, 提高其肿瘤细胞亲和力, 利用叶酸-CONH-聚乙二醇-NH-胆固醇靶向材料将其制备成直径 100 nm 左右的肿瘤靶向脂质纳米粒, 考察其对宫颈癌 HeLa 细胞的增殖抑制效率。同时, 宫颈癌的发生与细胞凋亡过程息息相关^[13], 有研究表明熊果酸抑制肿瘤生长的主要机制是诱导肿瘤细胞凋亡的发生, 因此, 通过分析细胞凋亡过程中起关键作用的 Bcl-2、Bax、Livin 及 Caspase-3 基因, 初步探索靶向熊果酸脂质纳米粒治疗宫颈癌的作用机制。

肿瘤的发生与发展是一个多阶段、多基因参与的复杂过程, 不仅涉及癌基因的异常表达, 而且还与生长因子、供氧及营养缺乏等因素所致的细胞凋亡异常有关。因此, 凋亡过程对肿瘤的形成至关重要。凋亡抑制蛋白家族 (inhibitor of apoptosis proteins, IAPs) 在调节肿瘤细胞凋亡方面发挥关键作用^[14]。Livin 是新近发现的 IAPs 家族成员, Kasof 等^[15-16]在人类基因组库中通过搜索 IAPs 家族的同源序列时发现 Livin 是一种能够抑制细胞凋亡的基因。Livin 蛋白在一些实体瘤中高度表达, 如乳腺癌、肺癌、胃癌、黑色素瘤以及白血病等^[17-21], 而在正常成人的大多数组织中 (除胎盘外) 均不表达, 表皮、淋巴、脾脏和黑色素细胞表达很低。

半胱氨酰天冬氨酸特异性蛋白酶 (cysteiny aspartate specific protease, Caspase) 是凋亡相关蛋白酶家族 (apoptosis-related protease family) 成员之一, 是介导细胞凋亡的重要蛋白质家族, 多数刺激因子是通过激发 Caspase 蛋白所诱导的级联反应而导致细胞凋亡的发生。其中 Caspase-3 参与了细胞凋亡过程中的染色体凝聚和 DNA 片段化等形态学的改变, 是引发细胞凋亡的重要执行者。正常情况下, 细胞质内的 Caspase-3 以无活性酶原的形式存在, 只有接受细胞凋亡信号刺激时才被激活为有活性的 Caspase-3。研究表明 IAPs 家族成员主要通过

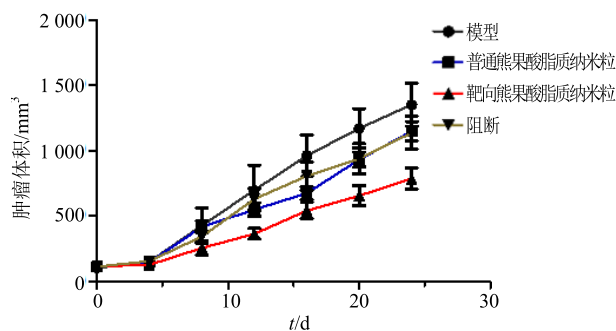


图 7 荷瘤鼠的肿瘤生长曲线 ($n = 6$)

Fig. 7 Growth curves of xenograft tumors ($n = 6$)

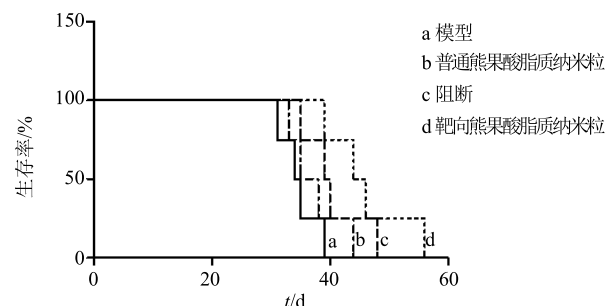


图 8 荷瘤鼠的生存曲线

Fig. 8 Survival curves of xenograft tumors

与特异性的 Caspase 蛋白结合并抑制其活性从而阻断凋亡发生^[22]。Livin 蛋白与 Caspase 家族成员的作用途径可能包括以下 3 个方面：(1) 细胞色素 C/Apof-1 线粒体途径：Livin 与 Caspase-9 前体蛋白 (procaspase-9) 和其激活形式结合抑制其活性，阻断 Caspase-3 裂解激活，抑制细胞凋亡；(2) Smac 途径：Livin 与 Smac 结合，中和其 Caspase 活化蛋白活性，使多种 Caspase 未能活化而发挥抗凋亡作用；(3) Fas/Caspase-8 死亡受体途径：Livin 未结合 Caspase-8，而是直接抑制 Caspase-3 活性，从而抑制 Fas/Caspase-8 诱导死亡受体途径发挥抗凋亡作用。已有研究证实，宫颈鳞状肿瘤细胞组织中的 Livin 和 Caspase-3 蛋白表达呈负相关性^[23]。在该肿瘤的发生、发展过程中 Livin 通过抑制 Caspase-3 活性从而抑制凋亡的发生，促使肿瘤细胞的增殖，加速其恶化^[24]。

在本研究中，探讨了经靶向熊果酸脂质纳米粒作用后的 Livin 基因的变化，发现 Livin 基因及蛋白的表达均减少，而 Caspase-3 基因及蛋白的表达增加，两者呈现明显的负相关性。说明 Livin 的表达量减少，无法与特异性的 Caspase-3 蛋白结合，同时 Caspase-3 接受凋亡刺激信号的刺激，使其活化，从而促使细胞凋亡的发生。

同时，探讨了在细胞凋亡过程中起关键作用的 Bcl-2 及 Bax 基因，Bax 与 Bcl-2 属于同一家族的成员。B 细胞淋巴瘤基因-2 (B cell lymphoma-2, Bcl-2) 是一类重要的调控细胞凋亡的蛋白，机体接受到细胞凋亡刺激信号时，诱发 Bcl-2 等抗凋亡蛋白的表达，从而抑制凋亡^[25]。若凋亡诱导因子与 Bax 等促凋亡蛋白结合，使其插入线粒体膜，诱导线粒体蛋白释放，产生促凋亡效应^[26]。Bcl-2 与 Bax 的比值即动态平衡决定了细胞生命过程的走向，其关系可形容为“凋亡开关”。其比值维持恒定，细胞凋亡处于平衡状态；Bcl-2/Bax 升高，细胞凋亡减少；Bcl-2/Bax 降低，细胞凋亡增加^[27]。在本研究中，经靶向熊果酸脂质纳米粒作用后的 Bcl-2 及 Bax 基因与其他各组相比较，Bcl-2 基因及蛋白表达显著下调，Bax 基因及蛋白表达上调，使 Bcl-2 与 Bax 比值下降，细胞凋亡增加，存活率减少。

综上所述，本研究所制备的靶向熊果酸脂质纳米粒能够抑制宫颈癌 HeLa 细胞的增殖，而对正常组织细胞几乎无作用，同时还能促使肿瘤细胞凋亡，分析其作用机制可能是通过上调细胞中 Bax、

Caspase-3 基因及蛋白的表达，下调 Bcl-2、Livin 基因及蛋白的表达，诱导细胞凋亡，抑制肿瘤细胞的侵袭及转移。同时，采用荷瘤鼠动物模型，证实靶向熊果酸脂质纳米载药系统对肿瘤组织具备一定效率的靶向性。

参考文献

- [1] 何 玥, 阴赅宏, 赵 群, 等. 人乳头瘤病毒 (HPV) 感染患者的管理现状 [J]. 中国妇产科临床杂志, 2017, 18(1): 87-89.
- [2] 孙晓东, 刘 敏, 鲍 慧, 等. 不同年龄段宫颈癌患者的病理特点及预后分析 [J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26(11): 1766-1769.
- [3] 白丽霞. 叶酸受体 α 介导 ERK 信号通路对宫颈癌变的作用及其机制研究 [D]. 太原: 山西医科大学, 2015.
- [4] 杨 光. 靶向熊果酸脂质体的制备及其体外靶向性研究 [J]. 中草药, 2018, 49(17): 4045-4050.
- [5] Liu J. Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives [J]. *J Ethnopharmacol*, 2005, 100(1/2): 92-94.
- [6] Saeidnia S, Gohari A R, Uchiyama N, *et al*. Two new monoterpene glycosides and trypanocidal terpenoids from *Dracocephalum kotschyi* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2004, 52(10): 1249-1250.
- [7] 熊 斌, 雷志勇, 陈 虹. 熊果酸药理学研究进展 [J]. 国外医学: 药学分册, 2004, 31(3): 133-136.
- [8] Mizushima Y, Iida A, Ohta K, *et al*. Novel triterpenoids inhibit both DNA polymerase and DNA topoisomerase [J]. *Biochem J*, 2000, 350(3): 757-763.
- [9] 杨 光. 叶酸受体靶向熊果酸长循环脂质体的制备及其抑瘤作用的研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2014.
- [10] 鲁 琳, 高微微, 徐伟江, 等. 胆碱与叶酸不足对人成淋巴细胞株细胞死亡的影响 [J]. 癌变·畸变·突变, 2010, 22(2): 123-129.
- [11] Tsai B Y, Lin Y L, Chiang B L. Autoimmune response induced by dendritic cell exerts anti-tumor effect in murine model of leukemia [J]. *J Autoimm*, 2010, 34(7): 364-370.
- [12] Yim E K, Lee M J, Lee K H, *et al*. Antiproliferative and antiviral mechanisms of ursolic acid and dexamethasone in cervical carcinoma cell lines [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2006, 16(6): 2023-2031.
- [13] 韩风贤, 张师前. 凋亡抑制基因 Survivin 在宫颈癌中的表达及其临床意义的研究 [J]. 中国妇幼保健, 2007, 22(35): 5034-5036.
- [14] Salvesen G S, Duckett C S. IAP proteins: Blocking the road to death's door [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(6): 401-410.
- [15] Lin J H, Deng G, Huang Q, *et al*. KIAP, a novel member

- of the inhibitor of apoptosis protein family [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 279(3): 820-831.
- [16] Kasof G M, Gomes B C. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(5): 3238-3246.
- [17] 周 晟, 万 捷, 刘 聪, 等. 凋亡抑制基因 livin 与 survivin 在乳腺癌中的表达差异 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2006, 15(5): 554-558.
- [18] Yagihashi A, Asanuma K, Kobayashi D, *et al.* Detection of auto antibodies to Livin and survivin in Sera from lung cancer patients [J]. *Lung Cancer*, 2005, 48(2): 217-221.
- [19] 刘霄强, 李 芳. Livin 在膀胱癌中的研究进展 [J]. 大连医科大学学报, 2014, 36(1): 84-87.
- [20] Gong J, Chen N, Zhou Q, *et al.* Melanoma inhibitor of apoptosis protein is expressed differentially in melanoma and melanocytic naevus, but similarly in primary and metastatic melanomas [J]. *J Clin Pathol*, 2005, 58(10): 1081-1085.
- [21] Choi J, Hwang YK, Sung K W, *et al.* Expression of Livin, an antiapoptotic protein, is an independent favorable prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. *Blood*, 2007, 109(2): 471-477.
- [22] Nachmias B, Ashhab Y, Bucholtz V, *et al.* Caspase-mediated cleavage converts Livin from an antiapoptotic to a proapoptotic factor: Implications for drug-resistant melanoma [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(19): 6340-6349.
- [23] 梁春艳, 马 萍. 凋亡抑制蛋白 Livin: 抗癌新靶点 [J]. 现代肿瘤医学, 2008, 16(6): 1055-1058.
- [24] 苏晓燕. Livin, Caspase-3 蛋白在宫颈癌中的表达及熊果酸体外抑制宫颈癌 SiHa 细胞的机制研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2010.
- [25] Youle R J, Strasser A. The BCL-2 protein family: Opposing activities that mediate cell death [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(1): 47-59.
- [26] Shmueli A, Oren M. Life, death, and ubiquitin: Taming the mule [J]. *Cell*, 2005, 121(7): 963-965.
- [27] Salakou S, Kardamakis D, Tsamandas A C, *et al.* Increased Bax/Bcl-2 ratio up-regulates caspase-3 and increases apoptosis in the thymus of patients with myasthenia gravis [J]. *In Vivo*, 2007, 21(1): 123-132.