

具有线粒体靶向功能的载去甲斑蝥素 TPP-PEG-PCL 纳米胶束促肝肿瘤细胞凋亡研究

韩黎丽¹, 吕慧芳¹, 王 丹¹, 王居峰¹, 唐 觅^{2*}

1. 郑州大学附属肿瘤医院 肿瘤研究中心, 河南 郑州 450008

2. 四川大学华西公共卫生学院, 四川 成都 610039

摘要: 目的 制备去甲斑蝥素 (3-丙羧基)三苯基溴化磷 (TPP)-聚乙二醇-b-聚己内脂 (PEG-PCL) 纳米胶束, 研究其体外释放、细胞内转运及促肝肿瘤细胞凋亡作用。方法 采用薄膜水化法制备去甲斑蝥素 TPP-PEG-PCL 纳米胶束, 测定粒径、Zeta 电位及显微电镜形态分析, 同时对胶束进行稳定性、体外释放、药代动力学和临界胶束浓度测定; 以香豆素-6 作为荧光探针, 评价 TPP-PEG-PCL 纳米胶束在肝肿瘤细胞内的摄取、溶酶体逃逸及线粒体靶向功能; 采用给药剂量等同条件下, 评价去甲斑蝥素 TPP-PEG-PCL 纳米胶束促肝肿瘤细胞凋亡效果。结果 去甲斑蝥素 TPP-PEG-PCL 纳米胶束粒径为 (16.8 ± 0.2) nm, Zeta 电位为 (14.3 ± 0.2) mV, 透射电镜图片该纳米胶束呈规则圆球形; 荧光试验结果显示, TPP-PEG-PCL 纳米胶束可以促进药物的细胞摄取、逃逸溶酶体的捕获, 最终靶向聚集在线粒体部位; 细胞存活率和 Hoechst 染色结果显示去甲斑蝥素 TPP-PEG-PCL 纳米胶束具有很好的促肝肿瘤细胞凋亡作用, 去甲斑蝥素 TPP-PEG-PCL 纳米胶束可以明显降低线粒体膜电位、提高细胞内活性氧 (ROS) 水平、增加促凋亡蛋白 Bcl-2、减少抗凋亡 Bax 蛋白的表达, 这些促凋亡相关的实验结果均明显优于去甲斑蝥素 PEG-PCL 纳米胶束和去甲斑蝥素, 具有统计学意义。结论 去甲斑蝥素 TPP-PEG-PCL 纳米胶束具有良好的肝肿瘤细胞线粒体靶向性和促肿瘤细胞凋亡作用, 为一种潜在高效靶向肿瘤细胞线粒体的载药系统。

关键词: 去甲斑蝥素; TPP-PEG-PCL; 纳米胶束; 细胞摄取; 溶酶体逃逸; 线粒体靶向; 细胞凋亡; 线粒体膜电位

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)19-4943-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.19.013

Mitochondrial targeting function of norcantharidin TPP-PEG-PCL nanomicelles promotes apoptosis of liver tumor cells

HAN Li-li¹, LV Hui-fang¹, WANG Dan¹, WANG Ju-feng¹, TANG Mi²

1. Cancer Research Center, Cancer Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450008, China

2. West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610039, China

Abstract: Objective To prepare norcantharidin TPP-PEG-PCL nanomicelles and study its release *in vitro*, intracellular transport and promoting effect on hepatoma cell apoptosis. **Methods** Thin film hydration method was used to prepare norcantharidin TPP-PEG-PCL nanomicelles, and the particle size, electric potential and microscopic electron microscopy morphological analysis were measured. At the same time, the nanomicelles were evaluated for stability, *in vitro* release, pharmacokinetics and critical micelle concentration. Coumarin-6 was used as a fluorescent probe to evaluate the uptake of TPP-PEG-PCL nanomicelles in liver tumor cells, lysosomal escape and mitochondrial targeting function; Under the same dosage conditions, the effect of norcantharidin TPP-PEG-PCL nanomicelles on promoting apoptosis of liver tumor cells was evaluated. **Results** The cantharidin TPP-PEG-PCL nanomicelles had a particle size of (16.8 ± 0.2) nm, a Zeta potential of (14.3 ± 0.2) mV, and transmission electron microscopy images showed that nanomicelles had a regular spherical shape. The fluorescence test results showed that TPP-PEG-PCL nanomicelles can promote the cellular uptake of drugs, escape lysosomal capture, and finally target aggregation at the mitochondrial site; Cell survival rate and Hoechst staining results showed that cantharidin TPP-PEG-PCL nanomicelles had a good effect on promoting apoptosis of liver tumor cells. Norcantharidin TPP-PEG-PCL nanomicelles can significantly reduce mitochondrial membrane potential, increase

收稿日期: 2020-04-30

基金项目: 成都市卫生健康发展基金资助项目 (2018ZC002)

作者简介: 韩黎丽, 主治医师, 研究方向为消化肿瘤药物的靶向治疗。E-mail: 3799288208@qq.com

*通信作者 唐 觅, 博士, 研究方向为纳米药物。E-mail: songjp7344@163.com

intracellular ROS levels, increase pro-apoptotic protein Bcl-2, and reduce resistance. The expression of apoptotic proteins Bax and these pro-apoptotic related experimental results are significantly better than those of norcantharidin PEG-PCL nanomicelles and norcantharidin, which have statistical significance. **Conclusion** Norcantharidin TPP-PEG-PCL nanomicelles have good liver tumor cell mitochondrial targeting and promote tumor cell apoptosis, and it is a potentially effective drug delivery system for targeting tumor cell mitochondria.

Key words: norcantharidin; TPP-PEG-PCL; nanomicelles; cell uptake; lysosomal escape; mitochondrial targeting; apoptosis; mitochondrial membrane potential

去甲斑蝥素 (norcantharidin, NCTD) 是斑蝥素的合成衍生物, 化学结构为一种半萜烯毒素, 我国首先将其开发成治疗肝癌和肝炎的新药^[1-2]。目前发现去甲斑蝥素在治疗肝癌、膀胱癌、骨髓瘤、前列腺癌、食管癌、胃癌等方面具有很好的抗肿瘤效果^[3], 研究表明, 去甲斑蝥素抗肿瘤作用的重要机制是诱导肿瘤细胞凋亡^[4]。如李先茜等^[5]研究发现, 去甲斑蝥素作用于人肝癌 SMMC-7721 细胞后, 肿瘤细胞出现明显的凋亡特征, 包括 caspase-3 酶活力明显升高, 促凋亡蛋白 Bax 的表达量上升, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达量下降。这些结果提示, 去甲斑蝥素可以通过内源性线粒体信号转导途径诱导肿瘤细胞凋亡。既然如此, 构建一种载药系统将去甲斑蝥素靶向递送到肿瘤细胞部位的线粒体, 从机制入手直接诱导肿瘤细胞线粒体凋亡, 有可能很大程度上提高该药的临床疗效。

聚乙二醇-b-聚己内酯 [poly(ethylene glycol)-b-poly(ϵ -caprolactone), PEG-PCL] 药用高分子材料属于两亲性聚合物, 溶于水后可组装形成一种纳米胶束, 其中外周为亲水性 PEG 材料, 内核为疏水性 PCL 片段聚合成团状^[6]。目前, 许多研究证实 PEG-PCL 在肿瘤组织部位具有良好的渗透与滞留时间 (enhanced permeability and retention time, EPR) 效应, 由于肿瘤组织部位的血管存在较大的间隙, PEG-PCL 高分子可以存留在这些间隙中, 被动蓄积在肿瘤细胞部位^[7]。

(3-丙羧基)三苯基溴化磷 [(3-carboxypropyl) triphenylphosphonium bromide, TPP] 阳离子呈正电荷性质, 细胞膜和线粒体膜呈负电荷, 鉴于正负电荷的吸引, TPP 常用来介导肿瘤药物、高分子聚合物克服细胞膜和线粒体膜的屏障阻碍^[8], 最终靶向进入线粒体^[9-10]。线粒体靶向给药系统不仅能很大程度上提高药物的治疗效果, 同时还可以尽量减少药物的不良反应^[11-12], 该方面的研究在提高肿瘤药物的精准性方面应用前景广泛^[13-14]。基于这些文献报道, 本实验采用 TPP 修饰 PEG-PCL, 形成

TPP-PEG-PCL 聚合物, 再将其装载去甲斑蝥素, 制备载去甲斑蝥素 TPP-PEG-PCL (norcantharidin TPP-PEG-PCL, NCTD@TPP-PEG-PCL) 纳米胶束, 预期递送该药物到达肿瘤细胞线粒体, 显著增强促肿瘤细胞凋亡作用。

1 仪器与材料

1.1 仪器

JEM-2100 Plus 透射电子显微镜 (TEM) 购自日本电子株式会社; Zetasizer Nano ZSE 纳米粒度电位仪购自英国马尔文仪器有限公司; Cell Insight CX7 LZR 激光共聚焦高内涵筛选 (HCS) 平台购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; CytoFLEX 流式细胞仪购自美国贝克曼公司; TGL-16M 台式高速冷冻离心机购自济南存昌生物技术有限公司。

1.2 药品与试剂

去甲斑蝥素购自泰安市嘉叶生物科技有限公司, 质量分数 $\geq 98\%$, 批号 20190922; PEG-PCL (相对分子质量 2 000, 批号 20190517, 质量分数 $\geq 95\%$, PDI < 0.5) 和 TPP-PEG-PCL (相对分子质量 2 500, 质量分数 $\geq 95\%$, PDI < 0.5 , 批号 20190426) 购自西安瑞禧生物科技有限公司; 聚山梨酯 80 (质量分数 $\geq 98\%$, 批号 20190516)、蓖 (质量分数 $\geq 98\%$, 批号 20190422)、TPP (质量分数 $\geq 98\%$, 批号 20190523) 和香豆素 6 (coumarin 6, C6, 质量分数 $\geq 98\%$, 批号 20190628) 均购自梯希爱 (上海) 化成工业发展有限公司。

1.3 细胞株、动物及染料

人肝肿瘤 SMMC-7721 细胞株和人正常肝细胞 L02 均购买于中科院上海细胞生物学研究所, SD 大鼠购自于郑州大学附属肿瘤医院, RPMI 1640 培养基购自美国 Gibco 公司, Gibco 16000-044 胎牛血清 (特级 FBS) 购自上海江林生物科技有限公司, Hoechst33342 染色液购自上海信帆生物科技有限公司; Mito-Tracker Red (线粒体红色荧光探针, 批号 20190322)、Lyso-Tracker Red (溶酶体红色荧光探针, 批号 20190617)、DCF-DA (活性氧 ROS 荧光

探针,批号 20190728)购自碧云天生物技术研究。

2 方法与结果

2.1 TPP-PEG-PCL 高分子聚合物的核磁验证

精密称取 4.29 mg TPP 和 25 mg NH_2 -PEG-PCL 溶于 50 mL 色谱甲醇中,再加 6.2 mg EDC 和 3.2 mg NHS 促进 TPP 的羧基与 NH_2 -PEG-PCL 的氨基成酯化反应。在避光的环境下,通入适量的氩气进行保护,室温反应 24 h,再采用透析袋(相对分子质量 2 000)除去未反应的多余的小分子 TPP,最终产物采用冷冻干燥,即得 TPP-PEG-PCL,经核磁验证,如图 1 所示, δ 7.5 左右的为 TPP 的三苯环峰, δ 3.5 和 δ 1.4 左右的分别为高分子 PEG 和 PCL 的特征峰,该结果表明,TPP-PEG-PCL 高分子聚合物已经合成成功。

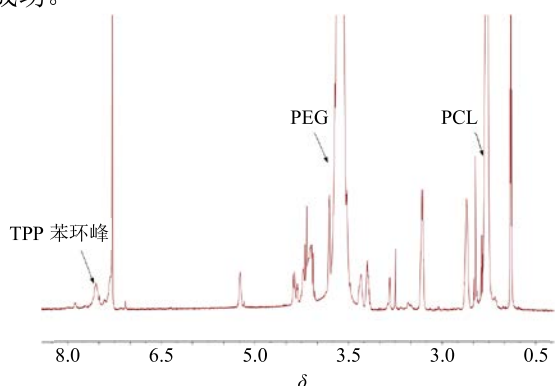


图 1 TPP-PEG-PCL 聚合物的氢核磁图谱

Fig. 1 ^1H -NMR spectrum of TPP-PEG-PCL polymer

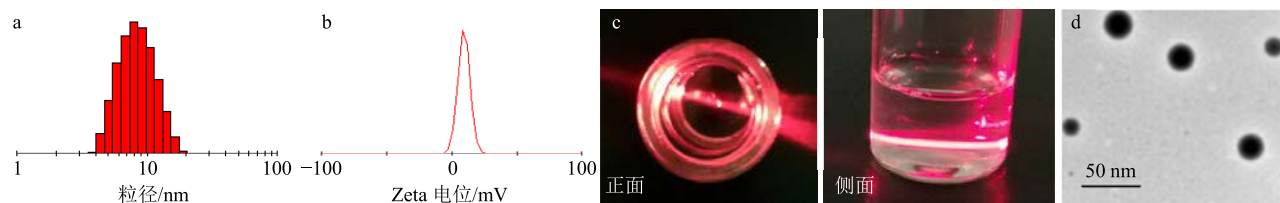


图 2 NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束的表征: 粒径 (a)、Zeta 电位 (b)、丁达尔现象 (c)、电镜 (d)

Fig. 2 Characterization of norcantharidin TPP-PEG-PCL nanomicelles: particle size (a), electric potential (b), Tyndall phenomenon (c), electron microscope (d)

结果表明 NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束的平均粒径为 (16.8 ± 0.2) nm, Zeta 电位为 (14.3 ± 0.2) mV, 电镜图片显示 NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束呈现为颗粒规则的圆球形。

2.4 包封率及载药量

吸取大约 2 mL NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束溶液置于超滤离心管(截留相对分子质量为 2 000)中,以 15 000 r/min 低温高速离心 5 min,包裹在纳米胶束内的去甲斑蝥素截留在超滤离心管(截留相对分子质量为 2 000)内,加入 10 倍体积的

2.2 NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束的制备

采用分析天平精密称取去甲斑蝥素原料 10 mg、TPP-PEG-PCL 100 mg 置于梨形瓶中,采用量筒量取 50 mL 色谱甲醇加入梨形瓶中,轻微振摇后促进充分溶解,然后将梨形瓶安装在旋蒸蒸发仪上,开启旋转蒸发仪,设置水温大约 40 $^{\circ}\text{C}$,先慢后稍快,梨形瓶底部形成一层分布均匀的干燥薄膜,然后再采用冷冻干燥过夜,充分除尽残留甲醇,滴加适量 PBS 于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下轻微振摇促进水化,超声处理 15 min,过 0.2 μm 微孔滤膜,再低温冷冻干燥 24 h,即得 NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束。

采用同样的方法制备载去甲斑蝥素 PEG-PCL (NCTD@PEG-PCL) 纳米胶束、载绿色荧光香豆素 6 TPP-PEG-PCL (C6@TPP-PEG-PCL) 纳米胶束和载绿色荧光香豆素 6 PEG-PCL (C6@PEG-PCL) 纳米胶束。

2.3 粒径分布、Zeta 电位、丁达尔现象及电镜分析

吸取少量 NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束溶液,添加蒸馏水进行稀释,采用 Zetasizer Nano ZSE 纳米粒度电位仪测定该胶束的粒径、 ζ 电位;采用激光笔从胶束溶液中照射一侧,可见明亮的光束,表现为良好的丁达尔现象。采用移液枪吸取少量 NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束溶液,滴加在 200 目铜网上,用吸耳球轻微吹干,置透射电子显微镜(TEM)下观察纳米胶束的形态。结果如图 2 所示,

甲醇破坏纳米胶束结构,采用 HPLC 法检测纳米胶束中承载的去甲斑蝥素质量 ($M_{\text{内}}$),离心管外为游离的去甲斑蝥素,同法即可测定胶束外围游离的去甲斑蝥素质量 ($M_{\text{外}}$),计算 NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束的包封率,结果发现包封率为 $(86.7 \pm 1.7)\%$;将离心管内截留的 NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束溶液进行冷冻干燥,称定质量即为 M ,即可计算 NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束载药量,结果发现载药量为 $(7.8 \pm 1.6)\%$ 。

$$\text{包封率} = M_{\text{内}} / (M_{\text{外}} + M_{\text{内}})$$

$$\text{载药量} = M_{\text{内}}/M$$

$M_{\text{内}}$ 为离心后游离 NCTD 质量, $M_{\text{外}}$ 为胶束中 NCTD 质量, M 为 NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束质量

2.5 体外释放

取 1 mg 去甲斑蝥素、NCTD@PEG-PCL 纳米胶束(含 1 mg 去甲斑蝥素)和 NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束(含 1 mg 去甲斑蝥素)置于 Spectrum Labs 透析袋(截留相对分子质量为 2 000)中,采用塑料夹密封透析袋两端,将其置于 100 mL pH 7.4 PBS 缓冲溶液中,添加 1.0 g 聚山梨酯 80 作为表面活性剂,确保去甲斑蝥素在释放过程中达到漏槽条件。设定水温为 37 ℃,于预定的时间点 1、2、5、8、10、12、16、18、24、48、72、96 h 采用移动枪取样,每次吸取 0.5 mL,并补充等体积的 PBS,计算去甲斑蝥素在胶束中的累积释放率。结果见图 3,去甲斑蝥素释放较快,NCTD@PEG-PCL 纳米胶束(含 1 mg 去甲斑蝥素)和 NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束均呈缓慢释放趋势,三者比较,NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束释药速率最慢,表现为良好的缓释性能。

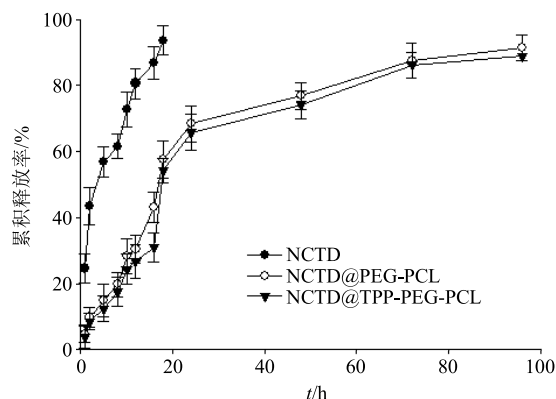


图 3 NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束的体外释放曲线
Fig. 3 *In vitro* release profile of NCTD@TPP-PEG-PCL nanomicelles

2.6 药动学

取 SD 大鼠 18 只,体质量 200~250 g,随机分成 3 组,雌雄各半,实验前天晚上开始禁食,大约 12 h,自由饮水,然后各组大鼠分别尾 iv 给予去甲斑蝥素、NCTD@PEG-PCL 纳米胶束和 NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束,各组给药剂量均为 5 mg/kg,在给药前和给药后 0.083、0.25、0.5、1、2、3、4、6、8、10、12 h 从眼眶取血,每次约 0.5 mL,离心制成血浆样品,采用移液枪吸取血浆 150 μ L,精密加入斑蝥素内标液(20 μ g/mL) 20 μ L,加入

300 μ L 甲醇沉淀蛋白,涡旋 5 min,然后以 15 000 r/min 高速离心 10 min,吸取上清液 350 μ L,采用液氮吹干,检测前采用移液枪吸取甲醇 60 μ L,涡旋 5 min,继续高速离心 10 min,吸取上清液 40 μ L 进样分析,采用 HPLC-DAD 检测血浆样品中去甲斑蝥素的含量,绘制各组血药浓度曲线(图 4),再采用 DAS 3.0 软件进行模型拟合,计算各组的药动学参数(表 1)。结果显示,去甲斑蝥素释药较快, $t_{1/2}$ 为 (2.8 ± 1.1) h,而 NCTD@PEG-PCL 纳米胶束和 NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束释药比较缓慢, $t_{1/2}$ 分别为 (7.5 ± 0.7) h 和 (8.2 ± 0.6) h,该药动学结果表明,纳米胶束组具有明显的缓慢释放药物特征,与体外释放结果该载药系统的缓释性能具有一定的相关性。生物利用度结果显示,NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束组可以明显提高去甲斑蝥素的生物利用度,可能与该载药系统的缓慢释放药物相关,导致药物体内存留时间延长。

2.7 临界胶束浓度(critical micelle concentration, CMC)测定

将 TPP-PEG-PCL 纳米胶束制备制备成 1~

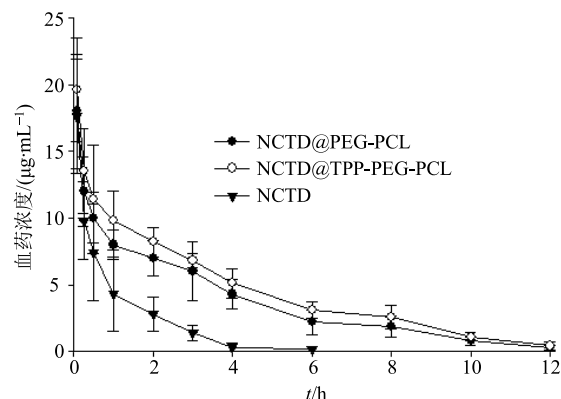


图 4 NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束的药动学曲线
Fig. 4 Pharmacokinetic curve of NCTD@TPP-PEG-PCL nanomicelles

表 1 NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束的药动学参数

Table 1 Pharmacokinetic parameters of NCTD@TPP-PEG-PCL nanomicelles

参数	单位	去甲斑蝥素	NCTD@PEG-PCL	NCTD@TPP-PEG-PCL
$t_{1/2}$	h	2.8 ± 1.1	7.5 ± 0.7	8.2 ± 0.6
$C_{\max}$	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	18.4 ± 0.6	17.6 ± 0.8	18.1 ± 1.3
MRT	h	4.3 ± 0.9	7.8 ± 0.4	8.1 ± 0.8
$\text{AUC}_{0 \sim t}$	$\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	13.4 ± 1.6	31.6 ± 2.2	36.5 ± 3.1
$\text{AUC}_{0 \sim \infty}$	$\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	14.9 ± 2.1	32.8 ± 1.9	38.4 ± 2.9

10 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度的胶束溶液, 再与芘进行混合, 室温搅拌 6 h 以上, 采用荧光光度仪检测芘的发射光谱 I_{394} 和 I_{373} , 记录 1~10 $\mu\text{g/mL}$ 系列质量浓度下纳米胶束发出的荧光强度值, 以 I_{394}/I_{373} 荧光强度比值为纵坐标, 纳米胶束质量浓度为横坐标, 绘制曲线。结果见图 5 所示, 胶束内核芘荧光强度 I_{394}/I_{373} 比值随着 TPP-PEG-PCL 纳米胶束质量浓度增大而变化, 表现为大致 S 型曲线, 曲线拐点处恰好 TPP-PEG-PCL 纳米胶束的 CMC, 大约为 5.8 $\mu\text{g/mL}$, 该质量浓度很小, 由此表明 TPP-PEG-PCL 可自发组装成胶束。

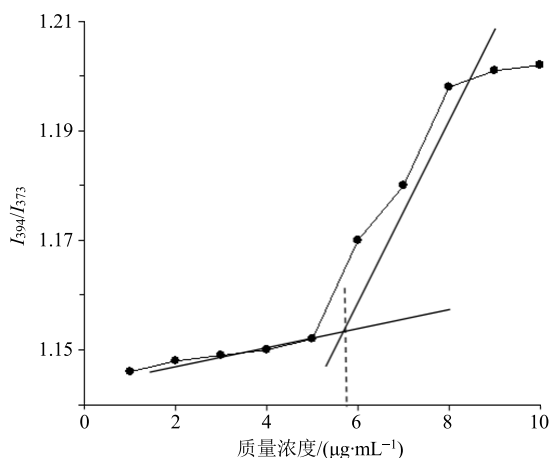


图 5 TPP-PEG-PCL 纳米胶束的 CMC

Fig. 5 CMC of TPP-PEG-PCL nanomicelles

2.8 稳定性

将 NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冷藏 60 d, 分别于 0、10、20、30、40、50、60 d 取出, 采用上述方法检测纳米胶束的粒径和 Zeta 电势。由图 6 结果分析可知, 与最初 0 d 的结果比较, NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冷藏 60 d 的粒径和电势变化不显著, 该结果表明, NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束在低温条件存放比较稳定。

2.9 肝肿瘤细胞对纳米胶束的摄取

由于去甲斑蝥素无荧光, 因此本实验采用带绿色荧光的香豆素-6 作为模型药物替代去甲斑蝥素, 研究肿瘤细胞对去甲斑蝥素的摄取行为。将肝肿瘤细胞株 SMMC-7721 接种到 12 孔培养板中, 培养 24 h, 再将 C6@TPP-PEG-PCL 和 C6@PEG-PCL 纳米胶束 (最终细胞溶液中 C6 质量浓度为 50 ng/mL) 共同孵育, 于孵育 1、3 h 后, 收集细胞, 用 PBS 洗涤 3 次, 进流式细胞仪, 收集 10 000 个细胞检测

荧光强度, 计算摄取率。结果见图 7 所示, C6@TPP-PEG-PCL 纳米胶束的摄取率在 1、3 h 后均明显高于 C6@PEG-PCL 纳米胶束, 由此表明, TPP 阳离子能促进胶束的细胞摄取。

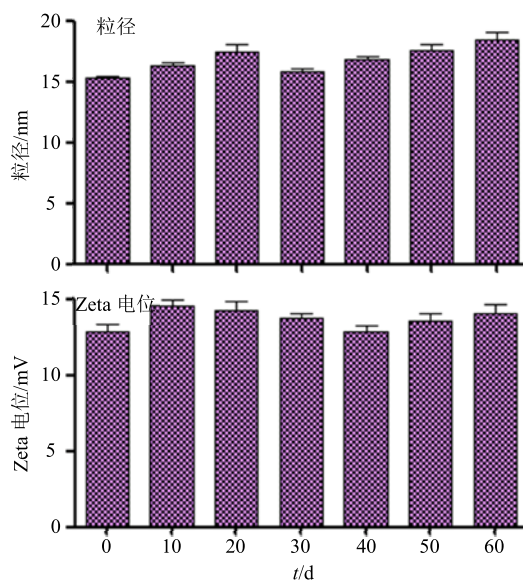
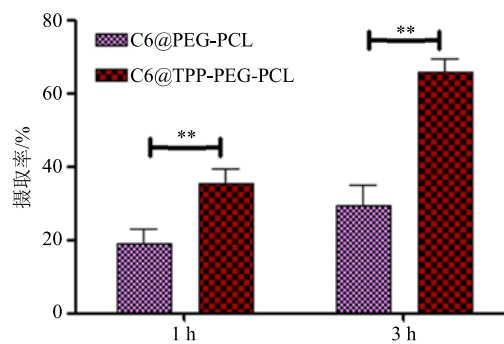


图 6 NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束的稳定性研究

Fig. 6 Study on stability of NCTD@TPP-PEG-PCL nanomicelles



与同等条件下的 C6@PEG-PCL 比较: ** $P < 0.01$, 下同

** $P < 0.01$ vs C6@PEG-PCL under the same conditions, the same below

图 7 肝肿瘤细胞对 C6@TPP-PEG-PCL 和 C6@PEG-PCL 纳米胶束的摄取率

Fig. 7 Uptake of C6@TPP-PEG-PCL and C6@PEG-PCL nanomicelles by liver tumor cells

2.10 线粒体靶向

细胞前期处理过程同细胞摄取试验, 药物与肿瘤细胞共同孵育 1、3 h 后, 于 35 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 以 50 nmol/L MitoTrackerTM Red 染线粒体 (红色) 5 min, 5 mg/mL Hoechst 33342 染细胞核 (蓝色) 5 min, 然后采用激光共聚焦显微镜观察 C6 进入肿瘤细胞后, 在细胞内的分布情况。

结果见图 8, 带绿色荧光的纳米胶束进入细胞

后, 聚集在显红色荧光线粒体周围, 两者重合后变为黄色, 具有很好的时间相关性, 随着孵育时间的延长, 黄色逐渐变深。纳米胶束与线粒体的共定位采用重合系数来体现, 采用 Image J 计算泊桑分布

参数, 计算结果见图 9, 结果显示 C6@TPP-PEG-PCL 的泊桑分布值明显高于 C6@PEG-PCL, 存在显著性差异, 由此可知, TPP 阳离子能促进胶束聚集在肿瘤细胞线粒体部位。

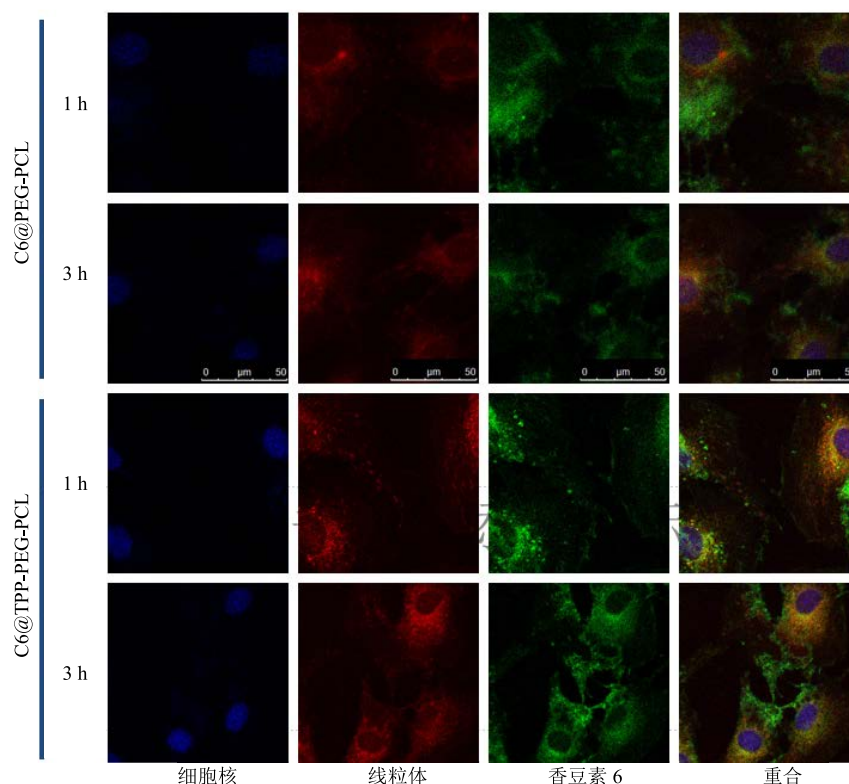


图 8 C6@TPP-PEG-PCL 与 C6@PEG-PCL 纳米胶束的线粒体靶向性

Fig. 8 Mitochondrial targeting of C6@TPP-PEG-PCL and C6@PEG-PCL nanomicelles

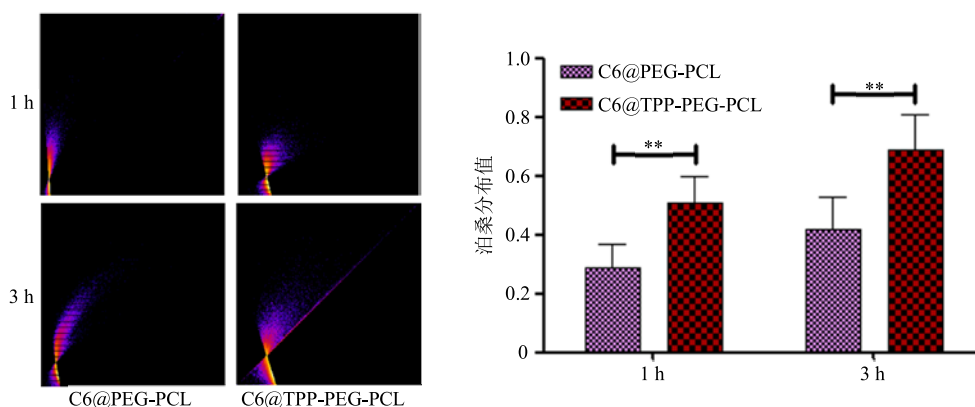


图 9 C6@TPP-PEG-PCL 和 C6@PEG-PCL 纳米胶束与线粒体重合后的泊桑分布值

Fig. 9 Poisson distribution of C6@TPP-PEG-PCL and C6@PEG-PCL nanomicelles combined with mitochondria

2.11 溶酶体逃逸

细胞前期处理过程同线粒体靶向试验, 药物与肿瘤细胞共同孵育 3 h 后, 于 35 °C 条件下, 以 100 nmol/L 的 Lyso-Tracker Red™ 染线粒体 (红色) 5 min, 5 mg/mL Hoechst 33342 染细胞核 (蓝色) 5 min, 然后采用激光共聚焦显微镜观察 C6 进入肿瘤细胞

后, 在细胞内的分布情况。

结果见图 10 所示, 带绿色荧光的纳米胶束进入细胞后, 被显红色荧光溶酶体捕获后, 两者重合变为黄色, 黄色越深, 表明溶酶体捕获越严重, 重合系数采用 Image J 计算泊桑分布参数, 计算结果见图 11, 结果显示 C6@TPP-PEG-PCL 的泊桑分布值

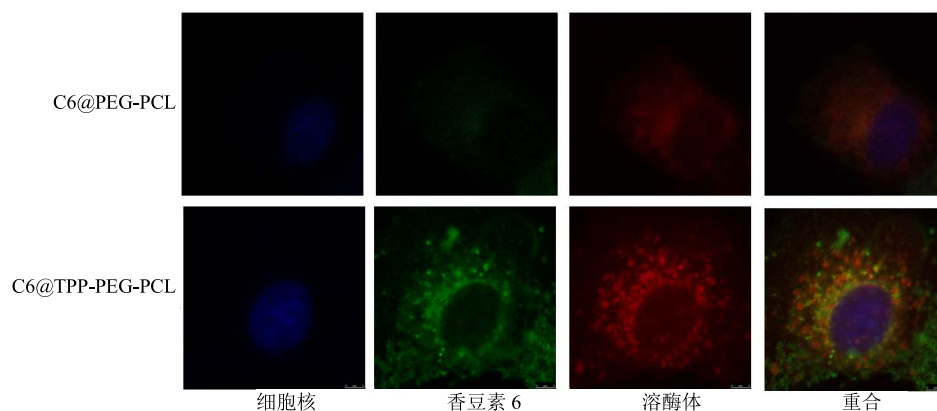


图 10 C6@TPP-PEG-PCL 的纳米胶束的溶酶体逃逸现象

Fig. 10 lysosome escape phenomenon of C6@TPP-PEG-PCL nanomicelles

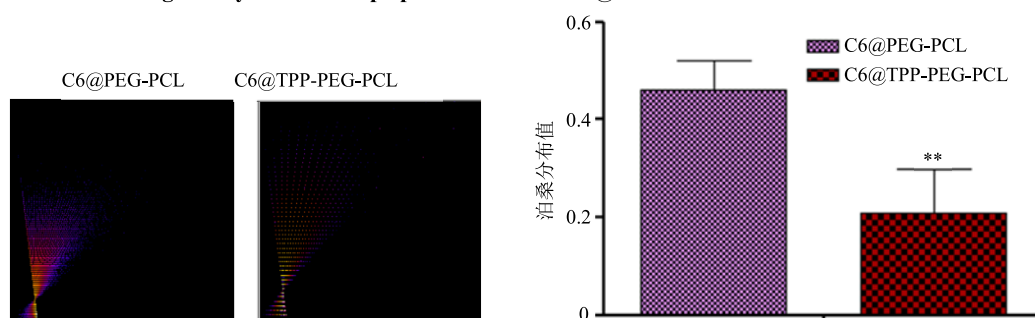


图 11 C6@TPP-PEG-PCL 和 C6@PEG-PCL 纳米胶束与溶酶体重合后的泊桑分布值

Fig. 11 Poisson distribution value of C6@TPP-PEG-PCL and C6@PEG-PCL nanomicelles combined with lysozyme

明显小于 C6@PEG-PCL, 存在显著性差异, 由此可知, TPP 阳离子能逃逸溶酶体的捕获。

2.12 促肿瘤细胞凋亡

2.12.1 细胞培养 将 SMMC-7721 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中进行培养, 根据试验需要接种于 96 孔板上。

2.12.2 细胞存活率测定 将 SMMC-7721 细胞复苏传代, 待生长状态良好时, 用胰酶消化, 接种细胞密度为 1×10^4 个/孔, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中进行培养 24 h, 然后再开始加药。分别为去甲斑蝥素、NCTD@PEG-PCL 纳米胶束组、NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束组, 设定给药浓度均为 5、10、20、40、80、120、200、320 μg/mL, 每个质量浓度设 3 个复孔, 加药后继续孵育 24、48 h, 然后添加 20 μL 5 mg/mL 的 MTT, 培养 4 h 后取出, 加入二甲基亚砜 200 μL, 轻微振荡 15 min, 然后再于 570 nm 波长处检测下吸光度 (*A*) 值, 计算细胞存活率。阴性对照组只加 PBS, 不加药物, 细胞存活率 = 加药组 *A* 值 / 阴性对照组 *A* 值。结果见图 12 所示, 给药组在浓度增大情况下, 均显示良好的抑制

肿瘤细胞生长活性, 还具有一定的时间相关性, 其中 NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束组抗肿瘤细胞生长效果最优。

2.12.3 L02 细胞的细胞毒性 L02 细胞的处理过程同 SMMC-7721 细胞, 然后给予以下药物: NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束、去甲斑蝥素和 TPP, 其中给药剂量设定为 200 μg/mL、TPP 为 50 μg/mL, 空白对照组为 L02 细胞直接培养组, 与 L02 细胞共同孵育 48 h 后, 添加 MTT 和二甲基亚砜, 参照以上的方法计算各组的细胞存活率, 与空白对照组进行比较, 结果 NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束的细胞存活率为 $(93.6 \pm 1.7) \%$, 去甲斑蝥素为 $(95.4 \pm 2.2) \%$, TPP 为 $(97.4 \pm 0.9) \%$, 由此表明, NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束对 L02 细胞的细胞毒性比较小, 具有较好的生物相容性。

2.12.4 Hoechst 染色 肝肿瘤细胞株 SMMC-7721 的孵育同前处理, 采用将去甲斑蝥素、NCTD@PEG-PCL 纳米胶束组、NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束组进行药物处理, 给药剂量为 200 μg/mL, 与 SMMC-7721 细胞共同孵育 48 h 后, 以 4% 细胞组织液进行细胞固定, PBS 洗涤 3 次, 最后参照 Hoechst

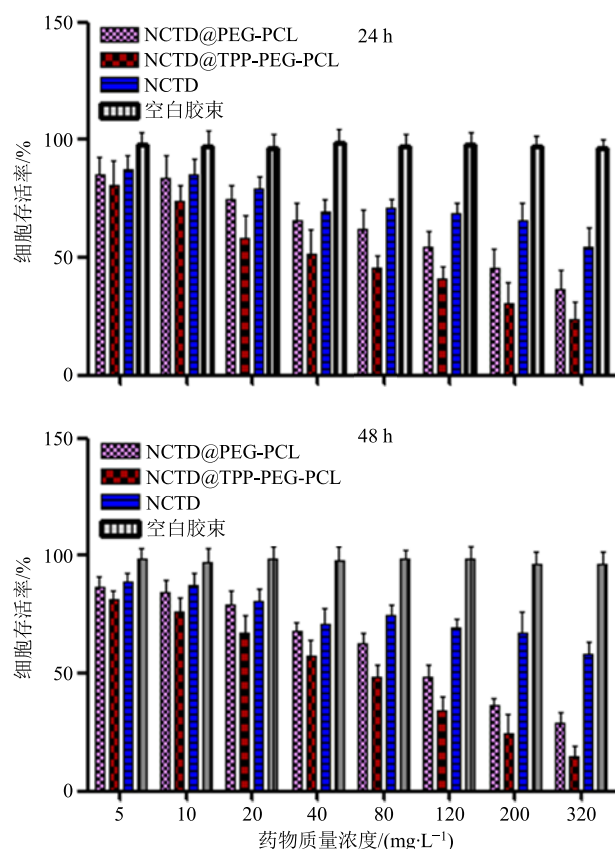


图 12 NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束和 NCTD@PEG-PCL 纳米胶束与肝癌细胞孵育 24、48 h 后的细胞存活率
Fig. 12 Cell survival rate after incubation of NCTD@TPP-PEG-PCL nanomicelles and NCTD@PEG-PCL nanomicelles with liver tumor cells for 24, 48 h

33258 说明书对细胞进行染色, 采用荧光电子显微镜下观察细胞的凋亡情况, 结果发现给药组均出现了细胞颜色暗淡、形态皱缩情况, 通过计算机统计软件进行处理, 计算 Hoechst 染色阳性细胞的百分率, 结果显示 NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束组的 Hoechst 染色阳性百分率最高 (图 13), 由此说明, NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束组抑制肿瘤细胞生长作用最优。

2.12.5 线粒体膜电位试剂盒检测线粒体膜电位 SMMC-7721 细胞的孵育及药物处理同上, 各给药组药物处理后收集肿瘤细胞, 采用 PBS 冲洗细胞 3 次, 然后再与线粒体膜电位检测试剂盒 JC-1 (10 $\mu\text{g/mL}$) 荧光探针于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min, 按照试剂盒说明书进行后续处理, 最后用流式细胞仪检测各组荧光强度。根据线粒体膜电位较高时, JC-1 产生红色荧光; 膜电位较低时, JC-1 可以产生绿色荧光, 根据各组的荧光强度, 检测线粒体膜电位值, 以未

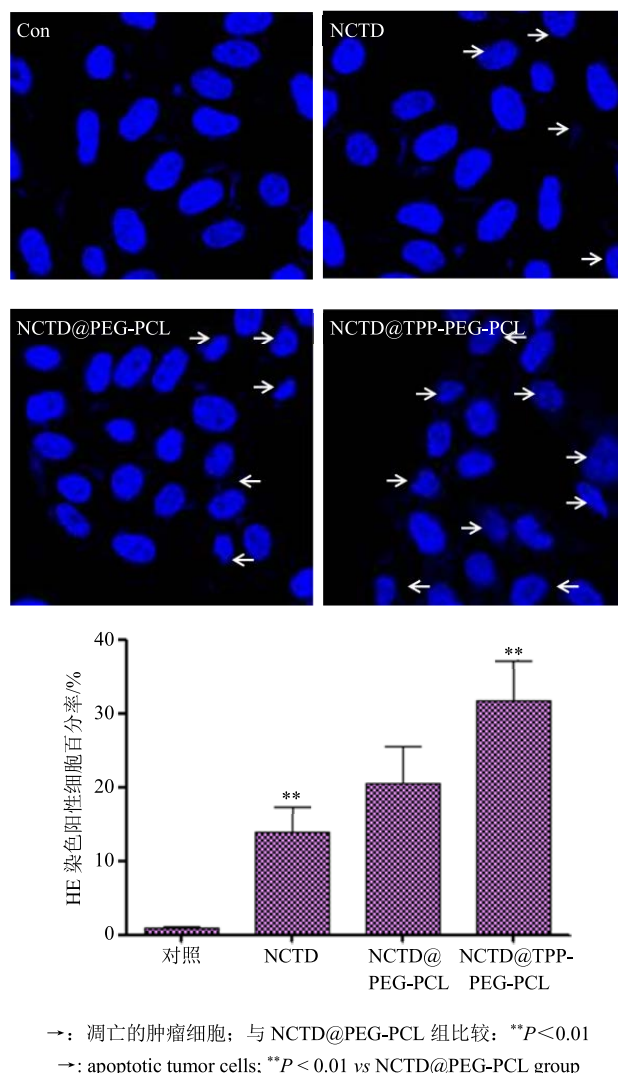
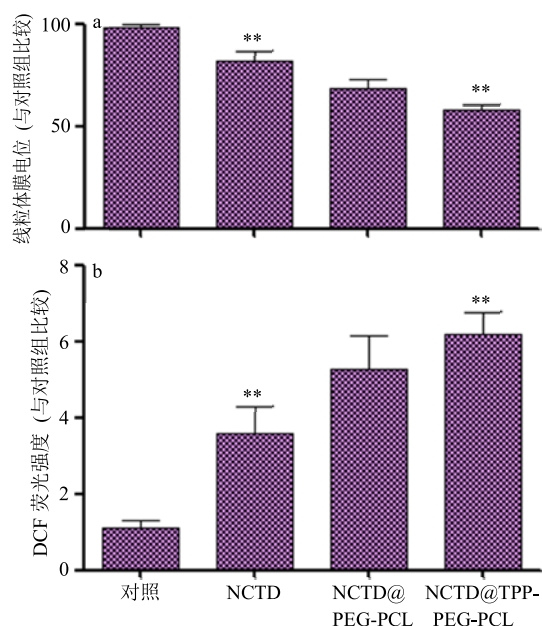


图 13 NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束和 NCTD@PEG-PCL 纳米胶束的 Hoechst 染色
Fig. 13 Hoechst staining of NCTD@TPP-PEG-PCL nanomicelles and NCTD@PEG-PCL nanomicelles

加药物的 PBS 组作为对照组, 然后所有给药组的电位值与对照组进行比较, 比较各组之间的差异。结果见图 14-a 所示, NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束组的线粒体膜电位比值最低, 由此表明, 该给药组抑制肿瘤细胞的效果最优。

2.12.6 ROS 水平 SMMC-7721 细胞的孵育及药物处理同上, 然后收集肿瘤细胞, 加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐 (DCFH-DA) 荧光探针作用 30 min, 再用冰冷 PBS 洗涤 3 次, 最后采用荧光光谱仪检测细胞内 DCF 荧光 (E_{X} 504 nm, E_{M} 529 nm) 强度, 考察细胞内活性氧的生成情况。结果见图 14-b 所示, 与对照组比较, 给药组的 DCF 荧光强度明显高于对照组, 其中, NCTD@TPP-PEG-PCL



线粒体膜电位降低, ROS 水平升高, 药物促肿瘤细胞凋亡效果越好; 与 NCTD@PEG-PCL 组比较: ** $P < 0.01$
mitochondrial membrane potential is reduced and ROS levels are increased, the better the effect of drugs on promoting tumor cell apoptosis; ** $P < 0.01$ vs NCTD@PEG-PCL group

图 14 NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束和 NCTD@PEG-PCL 纳米胶束促肿瘤细胞凋亡的线粒体膜电位 (a) 和 ROS 水平 (b) 比较

Fig. 14 Comparison of mitochondrial membrane potential (a) and ROS levels (b) of NCTD@TPP-PEG-PCL nanomicelles and NCTD@PEG-PCL nanomicelles to promote tumor cell apoptosis

纳米胶束组的 DCF 荧光强度最强, 促使细胞内氧自由基水平增加, 触发 ER 应激的诱导, 激活线粒体途径诱导 Caspase 家族依赖的细胞凋亡, 从而达到很好的抑制肿瘤细胞生长作用。

2.12.7 Bax、Bcl-2 蛋白表达 采用 Western blotting 检测凋亡相关蛋白的表达, 按照总蛋白一致的原则上样, 冲洗晒干玻璃板备用, 配制 12% 的分离胶进行 SDS-PAGE 电泳; 100 V 湿转 50 min, 再采用 5% BSA/TBST 封闭液室温下封闭 1 h; TBST 洗 10 min, 重复 3 次, 加入对应的一抗, 用 PBST 按照一定比例稀释至适当浓度 (Bcl-2、Bax 稀释比例均为 1:1 000) 孵育一抗, 放置摇床中振摇 2 h 后于 4 °C 冰箱中作用 24 h, 然后采用 TBST 洗膜, 再加二抗 (1:2 000 稀释), 室温条件下放置摇床 2 h, 敷完二抗后, 再用 TBST 每隔 5 min 清洗, 重复 3 次, 用 ECL 检测液中的 A 液 B 液等量混合均匀, 发光显影定影后, 采用凝胶成像系统进行检测, 并用 Image J 软件进

行灰度分析和统计学处理。结果见图 15, 给药组均可显著降低抗凋亡蛋白 Bcl-2, 提高促凋亡蛋白 Bax 的表达, 其中 NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束组调节凋亡相关蛋白的表达效果最显著, 与其他组比较具有显著性差异, 由此表明, TPP-PEG-PCL 纳米胶束能显著提高去甲斑蝥素促肿瘤细胞凋亡作用。

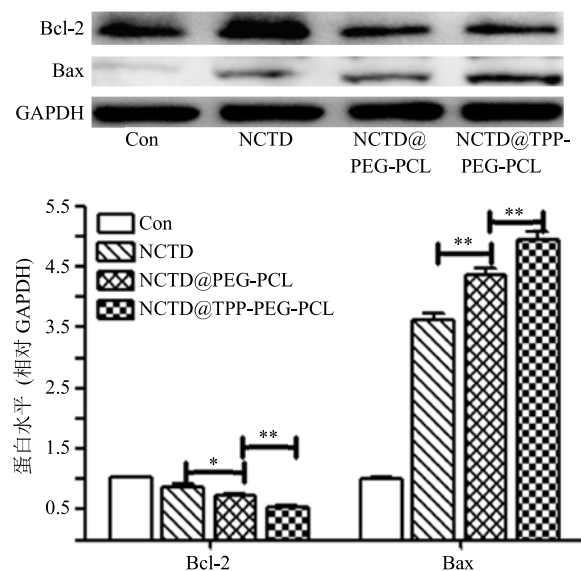


图 15 NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束和 NCTD@PEG-PCL 纳米胶束促肿瘤细胞凋亡的蛋白表达对比

Fig. 15 Comparison of protein expression of cantharidin TPP-PEG-PCL nanomicelles and norcantharidin PEG-PCL nanomicelles in promoting tumor cell apoptosis

3 讨论

PEG-PCL 属于体内可降解并经 FDA 批准的药用高分子载药材料, 外周 PEG 具有很好的水溶性, 内核 PCL 呈亲脂性, 常用来包裹小分子化合物^[15]。这些双亲性聚合物, 溶于水后可聚合成纳米胶束, 粒径相对较小, 很容易被细胞摄取; 另外, 这些纳米胶束在肿瘤组织部位, 具有很好的 EPR 效应, 可透过疏松的肿瘤细胞间隙, 聚集在肿瘤组织部位, 起到较好的被动靶向作用。因此, PEG-PCL 纳米胶束在药物制剂领域常用来装载肿瘤小分子药物, 提高药物对肿瘤的靶向性。

尽管 PEG-PCL 有如此良好的靶向功能, 肿瘤细胞的凋亡与线粒体调控功能密切相关, 线粒体膜通透性转运通道受到凋亡信号的刺激后开发, 引起线粒体肿胀, 并导致膜电位下降, 诱导细胞色素 C 释放入胞浆, 激活细胞凋亡信号通路, 最终导致细胞死亡^[16]。因此, 在 PEG-PCL 纳米胶束靶向肿瘤细胞的基础上, 再增加线粒体靶向功能的修饰, 最

终将药物靶向递送到肿瘤细胞线粒体,从细胞器部位精准给药,不仅可以很大程度上增强药物的疗效,还能很大程度上较少药物在其他非靶点部位的聚集引发的不良反应。目前有大量研究发现 TPP 阳离子具有线粒体靶向性,文献显示细胞膜带 30~60 mV 负电荷,线粒体内膜带 150~180 mV 负电荷,故两者都可吸附带正电荷的 TPP 阳离子,促使 TPP 阳离子聚集于线粒体的能力提高 100~500 倍,从而 TPP 阳离子修饰 PEG-PCL 可以克服高黏度细胞液的阻碍,介导肿瘤药物进入线粒体部位^[8]。

本研究制备的 NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束,粒径为 (16.8±0.2) nm, Zeta 电位为 (14.3±0.2) mV,较小的纳米粒子呈规则圆球形,具有良好的稳定性。细胞摄取结果实现发现,TPP-PEG-PCL 纳米胶束促进细胞摄取量明显优于 PEG-PCL 纳米胶束,可能的原因是除了纳米胶束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摄取量外^[17-18],还有 TPP 阳离子的电荷效应,吸引纳米胶束跨膜转运。进入细胞后,由于 TPP-PEG-PCL 纳米胶束带正电荷,可被带负电荷的溶酶体捕获,随着捕获的阳离子纳米胶束增多,最终溶酶体破裂,从而减少了溶酶体对纳米胶束的破坏,因此,TPP-PEG-PCL 纳米胶束具有良好的“溶酶体逃逸”功能^[19-20],与溶酶体共定位量明显少于 PEG-PCL 纳米胶束。带正电荷的 TPP-PEG-PCL 纳米胶束从溶酶体逃逸后,恰好又能被带负电荷的线粒体膜吸引,借助于电荷效应,TPP-PEG-PCL 纳米胶束可以很好的定位在线粒体周围,重合现象明显优于 PEG-PCL 纳米胶束。阳离子 TPP-PEG-PCL 纳米胶束将药物靶向到线粒体后,迅速启动线粒体凋亡信号通路,细胞存活率测定和 Hoechst 染色实验结果显示,NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束诱导肿瘤细胞凋亡效果明显优于 PEG-PCL 纳米胶束。再从凋亡信号通路分析,NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束能明显降低线粒体膜电位、增加肿瘤细胞内 ROS 水平,还能显著降低抗凋亡蛋白 Bcl-2,提高促凋亡蛋白 Bax 的表达,这些结果进一步验证了 TPP-PEG-PCL 纳米胶束提高了去甲斑蝥素在线粒体部位的靶向性,让更多的药物在线粒体部位发挥药理作用,故促肿瘤细胞凋亡作用很大程度上得到了提升。

综上所述,NCTD@TPP-PEG-PCL 纳米胶束粒径较小,稳定性良好,可显著提高药物在线粒体部位的靶向性,增强药物促肿瘤细胞凋亡作用。

参考文献

- [1] 李金龙,蔡于琛,胡志明,等. 去甲斑蝥素干扰 HL-60 肿瘤细胞周期及其机制研究 [J]. 中草药, 2010, 41(8): 1315-1318.
- [2] 李 柏,凌昌全. 去甲斑蝥素基础及临床研究进展 [J]. 中草药, 2002, 33(2): 184-185.
- [3] Zhang X P, Luo L L, Liu Y Q, *et al.* Norcantharidin combined with diamminedichloroplatinum inhibits tumor growth and cancer metastasis of hepatic carcinoma in murine [J]. *J Cancer Res Ther*, 2018, 14(Supplement): S1035-S1040.
- [4] Yang P Y, Hu D N, Kao Y H, *et al.* Norcantharidin induces apoptosis in human prostate cancer cells through both intrinsic and extrinsic pathways [J]. *Pharmacol Rep*, 2016, 68(5): 874-880.
- [5] 李先茜,邵世和,韩晓红,等. 去甲斑蝥素通过线粒体信号转导途径诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞 [J]. 中国免疫学杂志, 2010, 26(7): 611-615.
- [6] Grossen P, Witzigmann D, Sieber S, *et al.* PEG-PCL-based nanomedicines: A biodegradable drug delivery system and its application [J]. *J Control Release*, 2017 260(28): 46-60.
- [7] Ma B, Sheng J, Wang P, *et al.* Combinational phototherapy and hypoxia-activated chemotherapy favoring antitumor immune responses [J]. *Int J Nanomed*, 2019, 14: 4541-4558.
- [8] Murphy M P. Targeting lipophilic cations to mitochondria [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1777(7/8): 1028-1031.
- [9] 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.
- [10] Xiang H, Xue F, Yi T, *et al.* Cu₂S nanocrystals cross-linked with chlorin e6-functionalized polyethylenimine for synergistic photodynamic and photothermal therapy of cancer [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10(19): 16344-16351.
- [11] Weinberg S E, Chandel N S. Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy [J]. *Nat Chem Biol*, 2014, 11(1): 9-15.
- [12] Fulda S, Galluzzi L, Kroemer G. Targeting mitochondria for cancer therapy [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9(6): 447-464.
- [13] Mackenzie G G, Huang L, Alston N, *et al.* Targeting mitochondrial STAT3 with the novel phospho-valproic acid (MDC-1112) inhibits pancreatic cancer growth in

- mice [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e61532.
- [14] 徐鹏程, 于 鑫, 郭兆明, 等. 靶向线粒体的载体给药系统研究进展 [J]. 内蒙古大学学报: 自然科学版, 2017, 48(2): 219-224.
- [15] 李 瑞, 宋晓宁, 张 华, 等. FRET 技术研究 PEG-PCL 胶束跨 MDCK 细胞单层转运的完整性 [J]. 药学报, 2016, 51(8): 1316-1324.
- [16] 徐冰洁, 何昌龙, 赵 静, 等. 线粒体功能紊乱与肿瘤 [J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26(5): 772-776.
- [17] Huang J G, Leshuk T, Gu F X. Emerging nanomaterials for targeting subcellular organelles [J]. *Nano Today*, 2011, 6(10): 478-492.
- [18] Wang J, Wang Y, Liang W. Delivery of drugs to cell membranes by encapsulation in PEG-PE nanomicelles [J]. *J Control Release*, 2012, 160(3): 637-651.
- [19] Wang Z, Kuang X, Shi J, *et al.* Targeted delivery of geranylgeranylacetone to mitochondria by triphenylphosphonium modified nanoparticles: A promising strategy to prevent aminoglycoside-induced hearing loss [J]. *Biomater Sci*, 2017, 5(9): 1800-1809.
- [20] Mallick A, More P, Syed M M K, *et al.* Nanoparticle-mediated mitochondrial damage induces apoptosis in cancer [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8(21): 13218-13231.