

双靶向共载紫杉醇及白藜芦醇纳米系统构建及其体外抗多药耐药肿瘤研究

陈聪慧*, 张佩语

临沂大学药学院, 山东 临沂 276000

摘要: 目的 构建一种具有肿瘤双靶向功能的仿脂蛋白结构纳米载体 (FA-BSA-LC/SPC), 共载紫杉醇 (paclitaxel, PTX) 及白藜芦醇 (resveratrol, Rev), 用于抗多药耐药肿瘤研究。方法 以牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 作为构建仿脂蛋白结构纳米载体的蛋白部分, 叶酸 (folic acid, FA) 通过偶联在 BSA 上形成偶联蛋白 FA-BSA, 与载药脂质核心部分 (LC/SPC-PTX+Rev) 通过静电作用相结合; 利用透析法考察载药纳米制剂的体外释药行为; 通过纳米制剂在血浆中的凝聚变化对其血浆稳定性进行考察; 采用 MTT 法对载药纳米制剂进行多药耐药细胞毒性研究; 利用激光扫描共聚焦显微镜考察仿脂蛋白结构纳米载体肿瘤双靶向效果。结果 制备的纳米制剂具有较高的紫杉醇及白藜芦醇封装率 (分别为 91.02%、91.30%), 适用于药物紫杉醇-白藜芦醇 (4:1) 的共载; 载药纳米制剂在体外具有明显的缓释药物行为; 在血浆孵育后的粒径分布没有明显变化, 表明其在血浆中具有较好的稳定性; 通过细胞毒性研究发现 FA-BSA-LC/SPC-PTX+Rev 对多药耐药肿瘤细胞具有明显的细胞生长抑制作用; 通过细胞摄取实验结果表明, FA-BSA-LC/SPC 具有明显的肿瘤双靶向功能。结论 FA-BSA-LC/SPC-PTX+Rev 作为具有生物相容性、肿瘤双靶向功能的一种仿脂蛋白结构纳米载体共载药物紫杉醇及逆转剂白藜芦醇, 达到理想的治疗多药耐药肿瘤效果。

关键词: 双靶向; 纳米载体; 紫杉醇; 白藜芦醇; 逆转多药耐药; 抗肿瘤; 仿脂蛋白结构; 叶酸; 缓释

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)02-0395-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.02.009

Construction and reversing multidrug resistance *in vitro* by dual tumor targeting nanocarrier with paclitaxel and resveratrol co-loaded

CHEN Cong-hui, ZHANG Pei-yu

School of Pharmaceutical Science, Linyi University, Linyi 276000, China

Abstract: Objective To construct dual-targeting lipoprotein-mimic nanocarrier (FA-BSA-LC/SPC) with paclitaxel (PTX) and resveratrol (Rev) co-loaded for reversing multidrug resistance (MDR) activity. **Methods** The bovine serum albumin (BSA) was used as the protein model for constructing the lipoprotein-mimic nanocarrier, the further conjugating folic acid to BSA generated modified BSA (FA-BSA) and then coated the surface of the lipid core (LC/SPC-PTX+Rev) through electrostatic attraction; The *in vitro* drug release study was conducted using dialysis method; The stability of FA-BSA-LC/SPC-PTX+Rev was studied by testing the aggregation in 50% human plasma. The cytotoxicity of drug loaded nanocarriers against MDA-MB-231/taxol cells were evaluated by the standard MTT assay. The *in vitro* dual-targeting ability was studied by laser scanning confocal microscopy (LSCM). **Results** FA-BSA-LC/SPC-PTX+Rev had high encapsulation efficiency of PTX and Rev (91.02% and 91.30%, respectively), which was suitable for PTX and Rev delivery; *In vitro* drug release study showed that drug released from nanocarrier was significantly prolonged. The stability study showed that there was no significant change, suggesting that the coupling protein could increase the stability in plasma. The cytotoxicity studies demonstrated that FA-BSA-LC/SPC-PTX+Rev had greater cellular inhibition in MDA-MB-231/taxol cells; The cellular uptake studies showed that FA-BSA-LC/SPC exhibited excellent dual-targeting activity. **Conclusion** FA-BSA-LC/SPC-PTX+Rev, as biocompatible and dual tumor-targeting nanocarrier, is a promising system with PTX and Rev loaded for optimal reversing MDR efficacy.

Key words: dual-targeting; nanocarrier; paclitaxel; resveratrol; reversing multidrug resistance; anti-tumor; lipoprotein-mimic structure; folic acid; sustained release

收稿日期: 2021-08-16

基金项目: 山东省自然科学基金青年项目 (ZR2020QH325); 大学生创新创业训练项目 (S202110452120)

作者简介: 陈聪慧 (1988—), 女, 博士, 讲师, 研究方向为中药新剂型及靶向抗肿瘤研究。Tel: 15653973593 E-mail: conghui6@126.com

癌症已经成为严重威胁人类健康的主要病症之一,我国肿瘤引起的死亡率较高,且发病率呈上升趋势。肿瘤多药耐药(multidrug resistance, MDR)是临床上肿瘤化学治疗的主要障碍,也是化疗失败的主要原因之一。因此,寻找安全有效的 MDR 逆转策略已成为目前亟待解决的问题^[1-4]。

紫杉醇(paclitaxel, PTX)是从红豆杉属植物紫杉的树皮中提取开发得到的天然抗癌药物,分子式为 $C_{47}H_{51}NO_{14}$, 相对分子质量 853.92, 能够促进微管蛋白聚合, 进而抑制微管蛋白解聚, 致使快速分裂的肿瘤细胞终止于有丝分裂阶段而死亡, 具有良好的抗肿瘤活性^[5]。紫杉醇作为广谱抗肿瘤药物, 目前临床上主要被应用于乳腺癌、卵巢癌、非小细胞肺癌及前列腺癌等的治疗。但在临床应用中极易导致肿瘤产生耐药性, 进而导致紫杉醇的临床应用价值大大降低^[6]。白藜芦醇(resveratrol, Rev)化学名称为 3,4',5-三羟基苯二烯, 是一种广泛存在于葡萄和多种传统中药, 如决明、虎杖等中的一种多酚类活性单体。研究表明来自于天然植物的白藜芦醇具有显著的逆转多药耐药的作用^[7-9]: (1) 抑制膜转运蛋白介导的药物外排作用; (2) 诱导多种肿瘤细胞凋亡; (3) 抑制转录因子调控蛋白核转录因子- κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 的活性。白藜芦醇作为一种天然植物药物成分, 其对肿瘤多药耐药细胞的抑制作用已得到肯定, 在癌症发生的起始、增进、扩展 3 个主要阶段, 都能够起到抑制作用^[10], 因此通过联合应用紫杉醇及白藜芦醇提高化疗药物的疗效同时达到逆转肿瘤 MDR 效果。

为了提高紫杉醇水溶性、降低不良反应^[11-12], 共同有效传递中药成分紫杉醇和白藜芦醇至肿瘤部位, 达到理想的治疗多药耐药肿瘤效果, 本研究合成一种具有双靶向仿脂蛋白结构纳米载体, 用于紫杉醇和白藜芦醇的 MDR 肿瘤靶向及肿瘤细胞的有效递送, 有效发挥药效杀死 MDR 肿瘤细胞, 达到理想的治疗 MDR 肿瘤效果。以牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)作为构建仿脂蛋白结构纳米载体的蛋白模型, BSA 不仅具有生物相容性, 安全无毒, 作为内源性物质, 可延长纳米载体的体内循环时间, 并且通过 GP60 受体及 SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine, 肿瘤分泌的一种富含半胱氨酸的酸性蛋白, 功能似白蛋白受体)介导的内吞, 可靶向作用于肿瘤细胞^[13]。叶酸(folic acid, FA)作为介导肿瘤靶向的物质, 通

过偶联在仿脂蛋白结构纳米载体的蛋白模型 BSA 上, 可增强纳米载体的靶向能力, 与 BSA 的靶向作用协同产生双靶向肿瘤效果^[14]。构建的双靶向功能仿脂蛋白结构纳米载体将包封的药物紫杉醇与白藜芦醇有效递送至耐药肿瘤细胞, 充分发挥药效, 实现理想的治疗多药耐药肿瘤效果。

1 仪器与材料

1.1 仪器

DRC-1000REC 冷冻干燥机, 日本 Rikakikai 公司; Spectrum-754PC 型紫外扫描仪, 上海光谱仪器有限公司; Varioskan Flash 多功能酶标仪, 美国 Thermo Scientific 公司; 高效液相色谱仪(L2300 泵, L2400 紫外检测器)、CS120GXL 型低温超速离心机, 日本 Hitachi 公司; RE52CS 型旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; JY9222D 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝科器研究所; TGL-16G 型台式高速离心机, 上海安亭科学仪器厂; Zetasizer-Nano ZS90 粒度和 Zeta 电位分析仪, 英国 Malvern 公司; FV1000-IX81 激光扫描共聚焦显微镜(laser scan confocal microscope, LSCM), 日本 Olympus 公司; JEM-1200 EX 型透射电子显微镜(TEM), 日本 JEOL 公司。

1.2 材料

叶酸(质量分数 $\geq 97\%$)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、三硝基苯磺酸(TNBS)、考马斯亮蓝 G-250, 美国 Sigma 公司; BSA, 美国 Amresco 公司; 紫杉醇, 质量分数 99.5%, 上海金和生物技术有限公司; 白藜芦醇, 质量分数 $\geq 98\%$, 上海源叶生物科技有限公司; 注射级大豆磷脂(SPC), 上海太伟药业有限公司; 十八胺, Alfa Aescar 公司; 甲基噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、胰酶, Sigma-Aldrich 公司; DMEM 培养基, 美国 Gibco 公司; 胎牛血清(FBS), 海克隆生物化学制品有限公司; 双抗, 美国 Invitrogen 公司; 香豆素-6(coumarin-6, C6), 上海谱振生物科技有限公司; Hoechst 33258, 碧云天生物技术有限公司; 氯仿, 分析纯, 山东禹王有限公司; 胆固醇、磷酸二氢钠、磷酸二氢钾, 天津博迪化工股份有限公司; 甲醇、乙腈, 色谱纯, 天津市康科德科技有限公司; 十二烷基硫酸钠(SLS)、聚山梨酯 80, 上海麦克林生化科技有限公司。

1.3 细胞

人乳腺癌细胞紫杉醇耐药株 MDA-MB-231/

taxol 细胞为临沂大学药学院实验室冻存保种,复苏后于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

2 方法与结果

2.1 叶酸偶联牛血清白蛋白 (FA-BSA) 的制备及其偶联度测定

2.1.1 FA-BSA 的制备方法 取叶酸 10 mg, 溶于 DMSO 5 mL 中, 溶解后, 加入 EDC (6 mg) 和 NHS (4 mg), 避光反应 4 h 后, 加入到含有 100 mg BSA 的 Na₂CO₃/NaHCO₃ 缓冲液 (pH 9.0) 中, 避光室温反应 10 h 后即得^[15]。将反应液用蒸馏水透析 2 d, 除去没反应的叶酸, 最后将透析后的反应液在 12 000 r/min 下高速离心 10 min。将分离纯化后的 FA-BSA, 冷冻干燥。

2.1.2 FA-BSA 结构鉴定 将叶酸、BSA 和 FA-BSA 用 PBS 溶解, 分别进行紫外吸收光谱扫描, 并将 3 者的紫外扫描图进行对比, 确证 FA-BSA 的结构。如图 1 所示, 在 FA-BSA 的紫外吸收曲线上, 分别在 280、360 nm 具有明显的吸收峰。相比 BSA, FA-BSA 有叶酸 360 nm 的特征吸收峰, 可说明叶酸已成功偶联到 BSA 分子上。

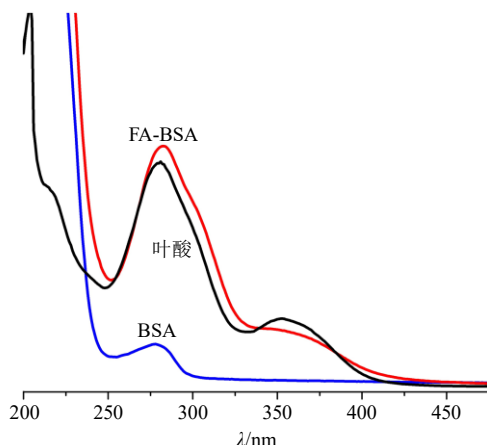


图 1 紫外吸收光谱

Fig. 1 Absorption spectra of synthesized FA-BSA

2.1.3 FA-BSA 偶联度的测定 TNBS 法常用于蛋白质表面活性赖氨酸的测定, 可以用来定量计算修饰蛋白的表面活性氨基取代度^[16]。因此, 可以利用 TNBS 法来计算 FA-BSA 中叶酸的偶联度。

BSA 及纯化冷冻干燥得到的 FA-BSA 分别用磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4) 制备成不同质量浓度的样品。将 NaHCO₃ (0.2 mL, 40 mg/mL; pH 8.5), TNBS (0.2 mL, 1 mg/mL) 加入到上述各种不同质量浓度的蛋白样品中, 在 40 ℃避光反应 2 h 后, 加入 0.10 g/mL SLS 0.2 mL 及 1 mol/L HCl 0.1 mL, 混

合均匀。取上述各反应液, 利用多功能酶标仪, 测定 420 nm 处吸光度 (*A*) 值。得到 BSA 及 FA-BSA 的质量浓度-*A* 值标准曲线, BSA 的标准曲线为 $Y=0.323\ 7\ X+0.199\ 7$, $R^2=0.999\ 6$; FA-BSA 的标准曲线为 $Y=0.253\ 7\ X+0.194\ 0$, $R^2=0.999\ 5$, 线性范围均为 0.2~1.0 mg/mL。

FA-BSA 的表面活性氨基取代度值计算公式为取代度 = $1 - K_{FA-BSA}/K_{BSA}$, 其中, K_{BSA} 及 K_{FA-BSA} 分别为 BSA 及 FA-BSA 的质量浓度-*A* 值曲线的斜率。计算出 FA-BSA 的取代度为 21.43%。由于每个 BSA 表面活性赖氨酸残基数目为 60, 可以相应计算出每个 BSA 上叶酸的偶联个数为 12.9。当叶酸对 BSA 的偶联比大于或等于 3 时, 就能对叶酸受体高表达的肿瘤细胞产生很好的靶向作用^[17]。本实验通过上述反应制备的 FA-BSA, 每个 BSA 分子偶联 12~13 个叶酸分子, 因此, 可以使结合的纳米载体产生比较好的靶向效果。

2.2 双靶向载紫杉醇及白藜芦醇纳米载体 (FA-BSA-LC/SPC-PTX+Rev) 的制备

2.2.1 载药脂质核心 (LC/SPC-PTX+Rev) 的制备 取 SPC 100 mg, 分别以 SPC-胆固醇 5:1, 药脂比 1:10, 紫杉醇-白藜芦醇 4:1, 十八胺 2 mg, 使用 10 mL 乙醇溶解, 置于 100 mL 茄形瓶中, 40 ℃减压旋转蒸干成膜; 加入 10 mL PBS, 37 ℃水化 30 min; 200 W 探头冰浴超声 (20 kHz, 超声时间设定为超声 1 s, 间歇 1 s, 超声时间 5 min), 即得 LC/SPC-PTX+Rev。

作为荧光对照用的脂质核心 (LC/SPC-C6), 制备方法同 LC/SPC-PTX+Rev, 区别为用荧光染料香豆素-6 取代药物。

2.2.2 双靶向仿脂蛋白结构载药纳米载体 (FA-BSA-LC/SPC-PTX+Rev) 的制备 取一定量按照“2.1.1”项方法制备纯化冷冻干燥的 FA-BSA, 用 PBS (pH 7.4) 溶解成质量浓度为 5 mg/mL 的蛋白溶液, 按照蛋白-磷脂比 (质量比) 为 1:10, 缓慢搅拌加入到上述载药脂质核心溶液中, 37 ℃缓慢搅拌孵育 12 h, 即得 FA-BSA-LC/SPC-PTX+Rev。作为对照用 BSA-LC/SPC-PTX+Rev, 制备方法相同, 区别为用 BSA 取代 FA-BSA。

2.2.3 蛋白包覆率的测定 采用微柱离心法分离未包覆的游离蛋白及除去包覆过程可能析出的药物。合并游离蛋白部分的滤过液, 以蒸馏水定容; 采用考马斯亮蓝法于 595 nm 处测定 *A* 值, 计算游离蛋

白含量。根据蛋白包覆率计算公式 $\text{包覆率} = (1 - W_f/W_i)$ (其中, W_f 为游离蛋白的量, W_i 为制剂中蛋白的加入量), 计算出 FA-BSA-LC/SPC-PTX+Rev、BSA-LC/SPC-PTX+Rev 最终蛋白包覆率分别为 86.8%、87.4%。可见, 制备的双靶向仿脂蛋白结构纳米载体具有较高的包覆率, 因此, 可以为实现双靶向研究奠定基础, 且对照组纳米载体的蛋白包覆率相似, 适用于对比研究。

2.3 FA-BSA-LC/SPC-PTX+Rev 的表征

2.3.1 形态观察 取适量新鲜制备的纳米载体, 加蒸馏水将制剂稀释至适当质量浓度, 滴加于覆盖碳膜的铜网上, 使液体尽量铺满整个铜网, 室温下自然晾干, 于 TEM 下观察形态并拍照。FA-BSA-LC/SPC-PTX+Rev 的电镜照片见图 2。可见, 纳米载体呈圆形或类圆形, 分布比较均匀。

2.3.2 粒径及 Zeta 电位的测定 取适量新鲜制备的纳米载体, 稀释后采用 Zetasizer-Nano ZS90 粒度和 Zeta 电位分析仪对其粒径及其分布进行考察, 并

对其 Zeta 电位进行测定。各载药纳米载体的粒径及 Zeta 电位见表 1。制备的 FA-BSA-LC/SPC-PTX+Rev 的粒径为 $(121.40 \pm 1.53) \text{ nm}$, 比脂质核心 LC/DOPE-PTX+Rev 的粒径 $(102.30 \pm 1.98) \text{ nm}$ 明显增加; 由于带负电荷的蛋白部分屏蔽脂质核心表面的部分正电荷, 导致 FA-BSA-LC/SPC-PTX+Rev 的 Zeta 电位 $(4.65 \pm 0.57) \text{ mV}$, 比 LC/SPC-PTX+Rev 的 Zeta 电位 $(17.67 \pm 0.68) \text{ mV}$ 明显下降。

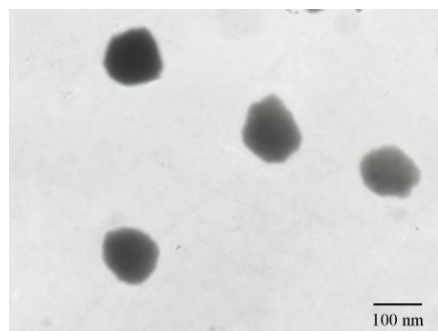


图 2 FA-BSA-LC/SPC-PTX+Rev 透射电镜照片

Fig. 2 TEM of FA-BSA-LC/SPC-PTX+Rev

表 1 各载药纳米制剂的平均粒径、PDI 及 Zeta 电位 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Average particle size, PDI and Zeta potential of each drug-loaded nano-preparation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	平均粒径/nm	多分散指数 (PDI)	Zeta 电位/mV
LC/SPC-PTX+Rev	102.30 ± 1.98	0.186 ± 0.010	17.67 ± 0.68
BSA-LC/SPC-PTX+Rev	119.30 ± 1.67	0.177 ± 0.020	4.82 ± 0.53
FA-BSA-LC/SPC-PTX+Rev	121.40 ± 1.53	0.175 ± 0.020	4.65 ± 0.57

FA-BSA-LC/SPC-PTX+Rev 粒径的增加及电荷的降低均证明蛋白层的有效包覆, 同时其纳米级的尺寸及良好的粒径分布 ($\text{PDI } 0.175 \pm 0.020$)、缓和的电位值, 以及外层包覆的具有生物相容性的蛋白层, 能够避免 RES 识别与清除, 提高载体在体内血液循环的稳定性。

2.3.3 包封率及载药量的测定 采用低速和超速离心法相结合的方法分离游离药物, 测定纳米载体中药物的包封率及载药量。将分离纯化的纳米载体, 加甲醇定容, 超声破坏, 过 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜, 用 HPLC 法进行检测, 分别确定制剂中紫杉醇及白藜芦醇的量。

紫杉醇的含量测定色谱条件^[18]: 色谱柱为 Hypersil ODS C₁₈ 柱 ($150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$); 流动相为乙腈-水 (60:40); 体积流量 1 mL/min ; 检测波长 227 nm ; 柱温为室温; 进样量 $20 \mu\text{L}$ 。

白藜芦醇的含量测定色谱条件^[19]: 色谱柱为 Hypersil ODS C₁₈ 柱 ($150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$); 流

动相为甲醇-水 (48:52); 体积流量 1 mL/min ; 检测波长 303 nm ; 柱温为室温; 进样量 $20 \mu\text{L}$ 。

按下式计算包封率与载药量。

$$\text{包封率} = W_{\text{药}}/W_{\text{投}}$$

$$\text{载药量} = W_{\text{药}}/W_{\text{总}}$$

$W_{\text{药}}$ 为制剂中所包载的药物量, $W_{\text{投}}$ 为投药量, $W_{\text{总}}$ 为制剂的总质量

药物载体对药物的包封率及载药量, 是评价药物载体的 2 个重要因素, 制备的 FA-BSA-LC/SPC-PTX+Rev 具有较高的紫杉醇及白藜芦醇包封率 (表 2), 分别为 $(91.02 \pm 0.68) \%$ 及 $(91.30 \pm 0.68) \%$, 因此, 适用于药物紫杉醇及白藜芦醇的包载及后续的肿瘤多药耐药治疗研究, 且各对照组纳米载体的包封率及载药量相似, 可适用于对比研究。

2.4 体外释放行为的考察

精密吸取不同制剂组溶液 0.1 mL 于透析袋中, 置于 200 mL , 含有 0.1% 聚山梨酯 80 的 PBS 释放介质中 ($\text{pH } 7.4$), 于 37°C 、 100 r/min 的摇床中振

摇, 定时取出释放介质 200 μL , 同时补充相同体积和温度的新鲜释放介质。HPLC 法测定释放介质中的药物含量, 计算累积释放度并绘制累积释放曲线,

考察不同制剂体外释放行为。不同制剂在含有 0.1% 聚山梨酯 80 的 PBS 释放介质中 (pH 7.4), 37 $^{\circ}\text{C}$ 下的体外累积释放曲线见图 3。

表 2 各载药纳米制剂的封装率及载药量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Encapsulation efficiency and drug-loading efficiency of drug loaded nanocarriers ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	封装率/%		载药量/%	
	紫杉醇	白藜芦醇	紫杉醇	白藜芦醇
LC/SPC-PTX+Rev	91.18 $\pm$ 0.62	92.03 $\pm$ 0.62	5.56 $\pm$ 0.25	1.40 $\pm$ 0.29
BSA-LC/SPC-PTX+Rev	90.96 $\pm$ 0.72	91.27 $\pm$ 0.72	5.20 $\pm$ 0.22	1.31 $\pm$ 0.24
FA-BSA-LC/SPC-PTX+Rev	91.02 $\pm$ 0.68	91.30 $\pm$ 0.68	5.21 $\pm$ 0.19	1.32 $\pm$ 0.27

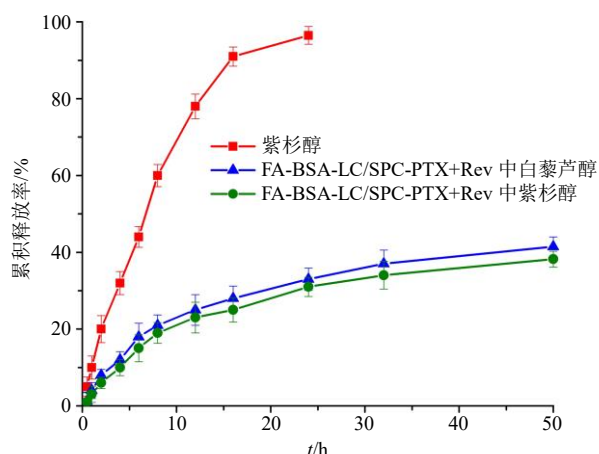


图 3 不同制剂体外累积释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Release profiles of different formulations ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

结果表明, 在体外释放实验中, pH 7.4 条件下, 以聚氧乙烯蓖麻油和无水乙醇 (50:50) 为溶剂的紫杉醇能够快速的释放, 在 24 h 内基本释放完全, 累积释放率达到 96.5%。而制备的纳米制剂在生理条件下释放缓慢, 表现出较好的药物缓释效果, 可以有效携带药物至靶组织和靶细胞, 减少由于药物的泄漏对机体正常组织和器官的毒害; 同时, 纳米制剂 FA-BSA-LC/SPC-PTX+Rev 中的紫杉醇与白藜芦醇在 48 h 累积释放率分别为 38.5%、40.8%, 释放行为相似, 可按照相应比例释药, 达到理想的治疗 MDR 肿瘤效果。

2.5 血浆稳定性研究

为考察具有蛋白层的双靶向仿脂蛋白结构纳米载体在血液循环中的稳定性, 将纳米载体分别在同体积的 PBS 及含 50% 血浆的 PBS 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育, 依次在 3、12、24、36 h 取样测定载体粒径。通过不同时间粒径变化情况考察纳米载体在血浆中的稳定性^[20]。FA-BSA-LC/SPC-PTX+Rev 在与同体积 PBS 及含 50% 血浆 PBS, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育后的的粒径

分布没有明显变化 (表 3), 表明 FA-BSA-LC/SPC-PTX+Rev 在血浆中具有稳定性。

表 3 不同介质中 FA-BSA-LC/SPC-PTX+Rev 不同时间下的粒径变化对其稳定性的考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Stability of FA-BSA-LC/SPC-PTX+Rev with change of particle sizes at different media ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t/h	平均粒径/nm	
	PBS	50% 血浆 PBS
3	121.70 $\pm$ 1.08	121.50 $\pm$ 1.17
12	122.30 $\pm$ 0.98	122.60 $\pm$ 1.23
24	122.60 $\pm$ 1.37	122.90 $\pm$ 1.42
36	123.00 $\pm$ 1.29	123.20 $\pm$ 1.38

由于吸附于 FA-BSA-LC/SPC-PTX+Rev 表面的蛋白层, 一方面可以降低表面电荷, 另外可以增加纳米载体表面的亲水性, 因此, 使纳米载体在血浆中具有良好的稳定性。

2.6 细胞毒性研究

取对数生长期的 MDA-MB-231/taxol 细胞, 以 5×10^3 /孔接种于 96 孔板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养。同时设置空白组 (只加不含细胞的培养液)。培养 12 h 后, 取出培养板, 吸走孔内培养液, 每孔加入不同质量浓度的各种载药制剂 200 μL , 每组设 5 个复孔。对照组为不加载药制剂的 200 μL 无血清培养液。置培养箱中培养 48 h 后, 吸去培养液, 每孔加入 20 μL MTT 溶液 (5.0 mg/mL) 继续培养 4 h, 弃去孔内液体, 每孔加入 150 μL DMSO, 震荡 10 min, 使沉淀充分溶解。最后用酶标仪 490 nm 测定 A 值。按公式计算细胞存活率, 考察载药双靶向向纳米载体在不同药物质量浓度对 MDA-MB-231/taxol 细胞的细胞毒性影响。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

$A_{\text{样品}}$ 为样品 A 值, $A_{\text{对照}}$ 为对照组 A 值, $A_{\text{空白}}$ 为空白组 A 值

各载药纳米载体 LC/SPC-PTX+Rev、BSA-LC/SPC-PTX+Rev、FA-BSA-LC/SPC-PTX+Rev 及以聚氧乙烯蓖麻油和无水乙醇 (50:50) 为溶剂游离紫杉醇制剂组的细胞毒性见图 4。游离紫杉醇制剂组在中、高质量浓度 (1、10 $\mu\text{g/mL}$) 有较高的细胞毒性, 是由于其中聚氧乙烯蓖麻油对细胞的毒性较大, 因此产生较高的细胞毒性, 然而, 纳米制剂组 FA-BSA-LC/SPC-PTX、LC/SPC-PTX+Rev、BSA-LC/SPC-PTX+Rev、FA-BSA-LC/SPC-PTX+Rev 在较低紫杉醇质量浓度 (低于 0.1 $\mu\text{g/mL}$) 时, 具有比游离紫杉醇制剂组更高的细胞抑制作用。

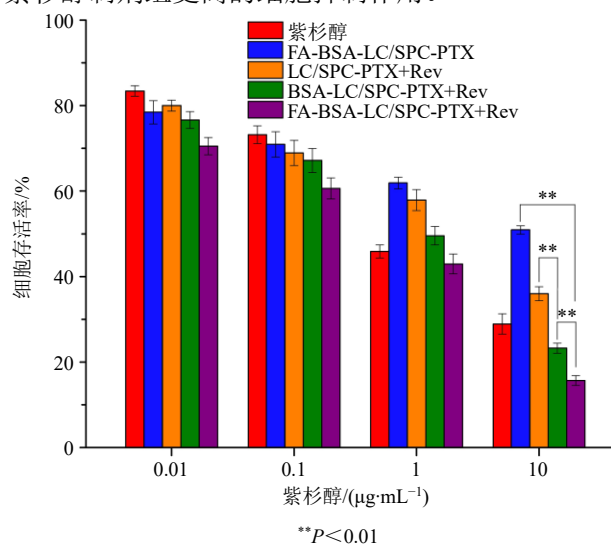


图 4 不同制剂的细胞毒性 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Cell cytotoxicity of preparations with different concentrations ($\bar{x} \pm s, n=3$)

同时, FA-BSA-LC/SPC-PTX+Rev 及 BSA-LC/SPC-PTX+Rev 对肿瘤细胞的生长抑制作用明显高于 LC/SPC-PTX+Rev。由于 FA-BSA-LC/SPC-PTX+Rev 及 BSA-LC/SPC-PTX+Rev, 相比 LC/SPC-PTX+Rev 具有蛋白包覆层 BSA, 可以通过与肿瘤细胞表面的 SPARC 高度亲和, 内化入肿瘤细胞, 将药物更多的释放到肿瘤细胞内, 从而产生较强的细胞毒性。同时, FA-BSA-LC/SPC-PTX+Rev 对肿瘤细胞的生长抑制作用显著高于 BSA-LC/SPC-PTX+Rev。FA-BSA-LC/SPC-PTX+Rev 由于具有叶酸靶向分子, 与肿瘤细胞表面的叶酸受体相结合, 靶向内化进入肿瘤细胞, 相比无叶酸靶向分子的 BSA-LC/SPC-PTX+Rev 产生更强的细胞毒性。因此, FA-BSA-LC/SPC-PTX+Rev 中的叶酸及白蛋白, 通过 SPARC 及 FR 介导的细胞内化作用, 对肿瘤细胞发

挥明显生长抑制作用, 达到双靶向抗肿瘤效果。

FA-BSA-LC/SPC-PTX+Rev 对耐药肿瘤细胞的生长抑制作用明显高于 FA-BSA-LC/SPC-PTX, 如在质量浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 时, 两者对肿瘤细胞的生长抑制率具有显著差异 ($P<0.01$)。FA-BSA-LC/SPC-PTX+Rev 由于白藜芦醇的逆转多药耐药的作用与紫杉醇联用, 提高化疗药物的疗效同时达到逆转肿瘤耐药目的, 结合纳米载体的双靶向效果, 从而具有显著的耐药肿瘤细胞抑制效果。

2.7 体外靶向能力研究

取对数生长期的 MDA-MB-231/taxol 细胞, 以 4×10^5 细胞/孔接种于底部放有无菌盖玻片的 6 孔培养板中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后, 弃去旧的培养液, 加入经无血清培养液稀释的各载香豆素-6 的纳米载体 (香豆素-6 终质量浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$), 置培养箱中分别孵育 2 h。孵育结束后, 取出盖玻片, 细胞以 PBS 洗 3 次, 加入 4% 多聚甲醛溶液固定 30 min; 固定结束后, PBS 洗 3 次, 以 Hoechst 33258 溶液 (10 mg/mL) 染核 10 min 后, 用 PBS 洗 3 次, 取出盖玻片, 将盖玻片细胞侧朝下, 盖于洁净的载玻片上, 用 50% 甘油封片。采用 LSCM 检测 2 个通道的细胞内荧光: 蓝色 (Hoechst 33258) 和绿色 (香豆素-6) 通道, 结果见图 5。由结果可知, 孵育 2 h 后, 与 LC/SPC-C6 相比, BSA-LC/SPC-C6 组及 FA-BSA-LC/SPC-C6 组的细胞内荧光强度明显增加, 并且在细胞核表面及细胞核区域具有较明显的荧光强度, 表明 BSA-LC/SPC、FA-BSA-LC/SPC 由于具有 BSA, 与肿瘤细胞上的 SPARC 特异性结合具有明显的靶向作用; 同时 FA-BSA-LC/SPC-C6 组的细胞内荧光强度明显高于 BSA-LC/SPC-C6 组, 结果证明, 由于 FA-BSA-LC/SPC 具有 FA, 通过叶酸受体介导, 增加对肿瘤细胞的靶向能力。结果证明, FA-BSA-LC/SPC 由于具有 BSA 及 FA 靶向分子, 可明显增加肿瘤细胞对所运载内含物的摄取, 达到双靶向抗肿瘤效果。

3 结论

本实验成功构建了具有双靶向功能的纳米载体 FA-BSA-LC/SPC-PTX+Rev, 用于药物紫杉醇及逆转剂白藜芦醇的共递送。载体蛋白包覆层提高了在血液循环中的稳定性及保留时间, 并且通过 SPARC 及叶酸受体介导的内化增加肿瘤细胞对所运载内含物的摄取, 达到靶向蓄积抗肿瘤功能; 具有逆转多药耐药作用的白藜芦醇与紫杉醇联用, 提高化疗药

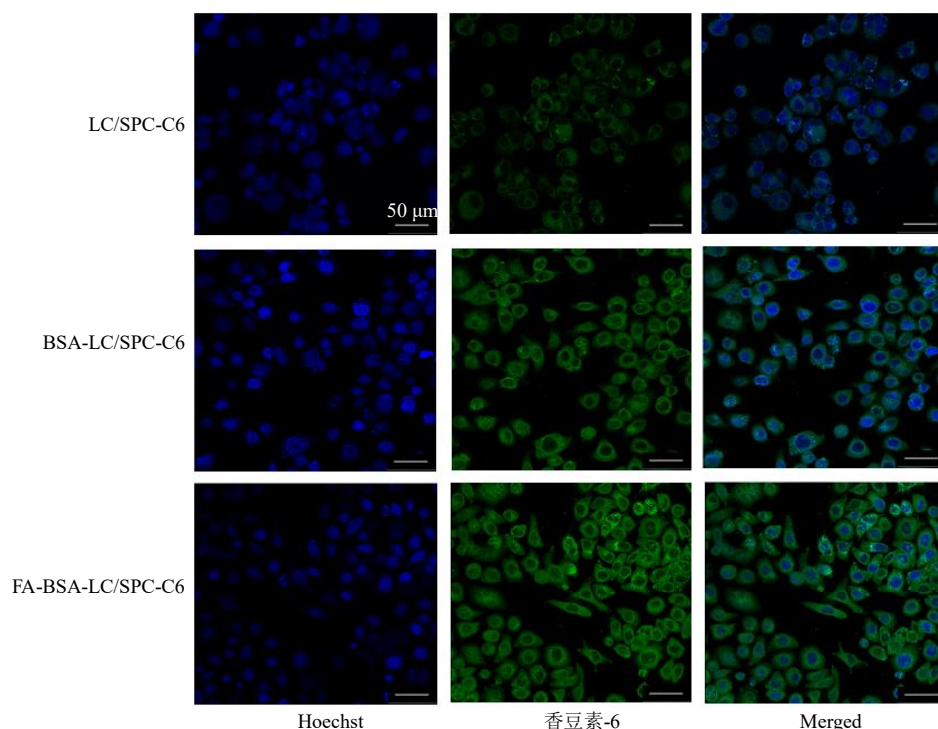


图 5 LC/SPC-C6、BSA-LC/SPC-C6 和 FA-BSA-LC/SPC-C6 与 MDA-MB-231/taxol 细胞孵育 2 h 后的 LSCM 图片
Fig. 5 LSCM of MDA-MB-231/taxol cells incubated with LC/SPC-C6, BSA-LC/SPC-C6 and FA-BSA-LC/SPC-C6 after 2 h

物的疗效同时达到逆转肿瘤耐药目的，从而具有显著的耐药肿瘤细胞抑制作用。因此，具有 BSA 及 FA 靶向分子的 FA-BSA-LC/SPC-PTX+Rev 作为具有生物相容性，肿瘤双靶向性的新型纳米载体有效递送抗癌药物紫杉醇及逆转剂白藜芦醇，达到理想的治疗 MDR 肿瘤效果。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Yin Q, Shen J N, Zhang Z W, *et al.* Reversal of multidrug resistance by stimuli-responsive drug delivery systems for therapy of tumor [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65(13/14): 1699-1715.
- [2] Szakacs G, Paterson J K, Ludwig J A, *et al.* Targeting multidrug resistance in cancer [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5: 219-234.
- [3] 刘海晔. 中药逆转肿瘤多药耐药性的研究进展 [J]. *中草药*, 2015, 46(7): 1096-1102.
- [4] 汤涛, 董伟, 张婧, 等. 中药单体成分逆转肿瘤多药耐药的研究进展 [J]. *中草药*, 2017, 48(4): 792-797.
- [5] 史清文. 天然药物化学史话: 紫杉醇 [J]. *中草药*, 2011, 42(10): 1878-1884.
- [6] Checchi P M, Nettles J H, Zhou J, *et al.* Microtubule-interacting drugs for cancer treatment [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2003, 24: 361-365.
- [7] 吴异兰, 王晗. 白藜芦醇对肺癌紫杉醇耐药细胞的增

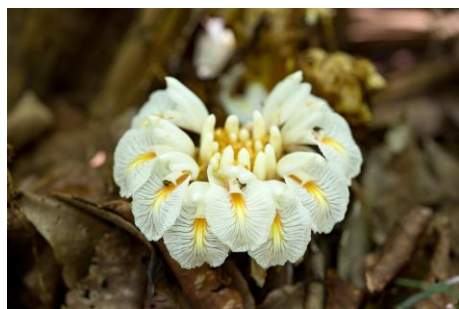
殖抑制作用及其机制 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2018, 30(3): 200-203.

- [8] 王子元, 孙筱婷, 吴丽莉, 等. 白藜芦醇对人大肠癌耐药细胞增殖及凋亡的影响 [J]. *上海中医药大学学报*, 2017, 31(3): 51-56.
- [9] 郭玉楷, 史敏, 秦永亮, 等. 白藜芦醇逆转肿瘤耐药的分子机制研究进展 [J]. *基础医学与临床*, 2016, 36(3): 401-405.
- [10] Golkar L, Ding X Z, Ujiki M B, *et al.* Resveratrol inhibits pancreatic cancer cell proliferation through transcriptional induction of macrophage inhibitory cytokine-1 [J]. *J Surg Res*, 2007, 138(2): 163-169.
- [11] Lee J, Lee S C, Acharya G, *et al.* Hydrotropic solubilization of paclitaxel: Analysis of chemical structures for hydrotropic property [J]. *Pharm Res*, 2003, 20(7): 1022-1030.
- [12] Lichtman S M, Hurria A, Cirrincione C T, *et al.* Paclitaxel efficacy and toxicity in older women with metastatic breast cancer: Combined analysis of CALGB 9342 and 9840 [J]. *Ann Oncol*, 2012, 23: 632-628.
- [13] Rahimizadeh P, Yang S, Lim S I. Albumin: An emerging opportunity in drug delivery [J]. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 2020, 25(6): 985-995.
- [14] Gao W, Xiang B, Meng T T, *et al.* Chemotherapeutic drug delivery to cancer cells using a combination of folate targeting and tumor microenvironment-sensitive

- polypeptides [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(16): 4137-4149.
- [15] Du C L, Deng D W, Shan L L, *et al.* A pH-sensitive doxorubicin prodrug based on folate-conjugated BSA for tumor-targeted drug delivery [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(12): 3087-3097.
- [16] Xu Y, Jin X, Ping Q, *et al.* A novel lipoprotein-mimic nanocarrier composed of the modified protein and lipid for tumor cell targeting delivery [J]. *J Control Release*, 2010, 146: 299-308.
- [17] Lu Y J, Low P S. Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, 54(5): 675-693
- [18] 康艳敏, 吴燕, 杨长青, 等. 紫杉醇脂质体的制备及质量考察 [J]. *中国药房*, 2008, 19(28): 2208-2210.
- [19] 李雨欣, 陈琳, 李娟, 等. 聚乙二醇修饰白藜芦醇脂质体的特性及其抗肿瘤实验研究 [J]. *陕西师范大学学报: 自然科学版*, 2020, 48(1): 92-98.
- [20] Chen D, Yu H, Mu H, *et al.* Novel chitosan derivative for temperature and ultrasound dual-sensitive liposomal microbubble gel [J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 94: 17-23.
- [责任编辑 郑礼胜]

• 封面图片介绍 •

九翅豆蔻



九翅豆蔻 *Amomum maximum* Roxb., 是姜科豆蔻属的多年生草本植物。

株高 2~3 m, 茎丛生。叶片长椭圆形或长圆形, 长 30~90 cm, 宽 10~20 cm, 顶端尾尖, 基部渐狭; 植株下部叶无柄或近于无柄, 中部和上部叶的叶柄长 1~8 厘米; 叶舌 2 裂, 长圆形, 长约 1.2~2.0 cm, 被稀疏的白色柔毛, 叶舌边缘干膜质, 淡黄绿色。穗状花序近圆球形, 直径约 5 cm, 鳞片卵形; 苞片淡褐色, 早落, 长 2.0~2.5 cm, 被短柔毛; 花萼管长约 2.3 cm, 膜质, 管内被淡紫红色斑纹; 花冠白色, 花冠管较萼管稍长, 裂片长圆形; 唇瓣卵圆形, 长约 3.5 cm; 花丝短, 花药线形, 长 1.0~1.2 cm。蒴果卵圆形, 长 2.5~3 cm,

宽 1.8~2.5 cm, 成熟时紫绿色, 三裂, 果皮具明显的九翅; 种子多数, 芳香, 干时变微。花期 5~6 月; 果期 6~8 月。

九翅豆蔻分布于广东、广西、云南和西藏等地, 果实及根入药, 性温味辛, 归脾、胃经, 温中止痛、开胃消食, 主脘腹冷痛、腹胀、不思饮食、噎腐吞酸。