

cRGD 靶向阿霉素脂质体制备及其对 HeLa 细胞的影响

陈 钰¹, 杨 蕊², 李向东³, 陈万瑛³, 王 涛³, 任预应³, 王亚鹏³, 陈道桢^{1,3*}

(¹南京医科大学附属无锡妇幼保健院中心实验室, 江苏 无锡 214002; ²东南大学医学院病理与生理学系, 江苏 南京 210009; ³新疆阿合奇县人民医院中心实验室, 新疆 克州 843500)

[摘要] 目的:制备含有二硫键的环形 RGD 肽(cyclic RGD peptide, cRGD)修饰长循环阿霉素主动靶向脂质体,对其理化性质、靶向性和对 HeLa 细胞的影响进行评价。方法:用 DSPE-PEG-NHS 耦联 cRGD,插入采用 pH 法制备的磁性长循环阿霉素脂质体中制备主动靶向脂质体;利用透射电镜、紫外分光光度计和质谱仪进行表征;流式细胞术和免疫荧光验证其靶向性;MTT 和流式细胞术验证其对 HeLa 细胞的影响。结果:制备的主动靶向脂质体粒径在 100~180 nm 之间,包封率达到 72%,免疫荧光及流式细胞术均显示其对 HeLa 细胞具有一定靶向性,且能显著诱导 HeLa 细胞凋亡。结论:本研究制备的 cRGD 靶向阿霉素脂质体具有一定靶向性,能显著提高其杀伤肿瘤细胞的作用。这种具有靶向及穿透功能的脂质体载体可能为肿瘤治疗提供一个新方法。

[关键词] 阿霉素脂质体;cRGD;HeLa 细胞

[中图分类号] R73-36*2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)11-1481-05

doi:10.7655/NYDXBNS20141105

Preparation of cRGD modified doxorubicin liposomals and the targeting effects on HeLa cells

Chen Yu¹, Yang Lei², Li Xiangdong³, Chen Wanying³, Wang Tao³, Ren Yuying³, Wang Yapeng³, Chen Daozhen^{1,3*}

(¹Central Laboratory, Wuxi Maternity and Child Health Care Hospital Affiliated to NJMU, Wuxi 214002; ²Department of Pathology and Pathophysiology, School of Medical Science, Southeast University, Nanjing 210009; ³Clinical Laboratory, the People's Hospital of Aheqi County, Kezhou 843500, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare doxorubicin liposomals modified with PEG and cRGD, and study physicochemical properties of liposomals along with targeting effects on HeLa cells. **Methods:** Using pH gradient method to prepare the liposomes modified with cRGD. The characteristics were observed with TEM and UV spectrophotometer. The targeting effect was determined by immunofluorescence and flow cytometry on HeLa cells, and cell apoptosis was measured by MTT assay and flow cytometry. **Results:** The particle size of liposomes was between 100-180 nm, and encapsulation ratio detected by UV spectrophotometer was 72%. The result of immunofluorescence and flow cytometry showed targeting effect of liposomes on HeLa cells, which was significantly better than that of control group. **Conclusion:** These doxorubicin liposomes with high encapsulation ratio and small particle size exhibited an effect of cell targeting and cell penetrating, which might be a novel approach for specific and efficient intracellular drug delivery.

[Key words] doxorubicin liposome; cRGD; HeLa cells

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(11): 1481-1485]

宫颈癌为最常见的女性恶性肿瘤之一,尤其是中晚期的宫颈癌具有较高病死率。目前临床治疗主

要以手术和放化疗为主,而对晚期宫颈癌来说,由于肿瘤扩散,没有明确边界,仅能以放化疗为主^[1-2]。传统化学药物主要以被动运输的形式扩散至肿瘤细胞,细胞毒性较大,随着脂质体技术的发展,研究发现通过将一些配体修饰在脂质体表面,与肿瘤细胞或肿瘤新生血管细胞表面过表达的受体相结合,靶向

[基金项目] 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助(201318101-13)

*通信作者(Corresponding author), Email: chendaozhen@163.com

运输药物到肿瘤细胞附近,能有效提高细胞对药物的摄取^[3]。研究发现,精-甘-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp, RGD)序列,能够与细胞表面的整合素相结合,抑制血管增生^[4]。而 Pasqualin 等^[5]则发现含有二硫键的环形 RGD 肽(cyclic RGD peptide, cRGD)对肿瘤新生血管内皮细胞的抑制作用较强,是线形 RGD 肽的 10~200 倍。本课题将 RGD 环肽耦联至载阿霉素(doxorubicin, DOX)的脂质体上,体外实验评价其靶向性及细胞毒性,为今后肿瘤治疗提供了一定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

cRGD 多肽购自上海吉尔生化公司;阿霉素购自浙江海正制药厂;聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(polyethyleneglycoldistearoylphosphatidylethanolamine, PEG-DSPE)和二棕榈酰磷脂酰胆碱(dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPC)购自德国 Lucas-Meyer 公司;胆固醇(cholesterol, Chol)购自北京奥博星生物技术责任有限公司;DAPI、细胞凋亡试剂盒购自上海碧云天公司。

UV2500 紫外检测器购自日本岛津公司;透射电子显微镜购自日本日立公司;荧光显微镜购自日本奥林巴斯公司;FACS Calibur 流式细胞仪购自美国 Becton Dickinson 公司。

1.2 方法

1.2.1 cRGD 修饰阿霉素脂质体(doxorubicin liposomes modified with cRGD, cRGD-DOX)的制备

准确称量 DSPE-PEG-NHS 和 cRGD(摩尔比 2:1)分别溶于新鲜蒸馏的无水无氨的 DMF 中。将 DSPE-PEG-NHS 溶液逐滴加入 cRGD 溶液中,室温避光搅拌,2 d 后终止反应。反应液置透析袋(截留分子量 2 000)中,于去离子水中透析 48 h 后冷冻干燥。终产物进行 MOLDI-TOF MS 分析^[6]。准确称量 DPPC 16 mg、胆固醇 2 mg、DSPE-PEG-NHS-cRGD 2 mg(质量比为 8:1:1)混合置于茄形瓶中,加入 6 ml 氯仿和 3 ml 甲醇的混合液(体积比为 2:1),超声混匀后,旋转蒸发形成白色、均匀的脂质薄膜。使用 pH 梯度法装载阿霉素脂质体(doxorubicin liposomes, DOX-lip)^[5]。使用 0.3 mol/L 柠檬酸溶液(pH4.0)对磷脂膜进行水化,制备脂质体。将所得脂质体加入盐酸阿霉素,并用 1 mol/L Na₂HPO₄ 将 pH 值调至 7.0,55℃水浴 30 min 即得 cRGD-DOX。

1.2.2 cRGD-DOX 脂质体的表征

取制备好的 cRGD-DOX,稀释 10 倍后点样于

铜网,2%磷钨酸负染,干燥后在透射电镜下观察脂质体的表面形貌及粒径大小,并用粒径分析仪测定粒径值。

取 1 ml cRGD-DOX,12 000 r/min 30 min,收取上清液,在 480 nm 处测定阿霉素含量^[7]。按中国药典记录的计算公式计算包封率及载药量^[8]。

1.2.3 cRGD 修饰脂质体靶向性评价

1.2.3.1 流式细胞术测定 cRGD-DOX 的靶向性

取 HeLa 细胞接种于 6 孔板中,待细胞长满后弃原培养基,每组 3 个复孔。DOX-lip 组加入无血清培养基稀释的 DOX-lip, cRGD-DOX 组加入 cRGD-DOX, DOX 终浓度均为 25 μg/ml,对照组(Control)加入无血清培养基,37℃孵育 1.5 h,弃培养基,用 PBS 洗涤 3 次,胰酶消化离心,再用 PBS 洗涤 3 次并离心,流式细胞仪测定细胞摄取的 DOX 荧光强度(激发波长 488 nm,测定波长 560 nm)。

1.2.3.2 免疫荧光测定 cRGD-DOX 的靶向性

取 HeLa 细胞接种于放置玻片的 6 孔板中,待细胞长满后弃原培养基,每组 2 个复孔。DOX-lip 组加入无血清培养基稀释的 DOX-lip, cRGD-DOX 组加入 cRGD-DOX, DOX 终浓度均为 25 μg/ml,对照组加入无血清培养基,37℃孵育 1.5 h,弃培养基,用 PBS 洗涤 3 次,4%多聚甲醛固定 15 min,再用 PBS 洗涤 3 次,DAPI 染色 10 min 并封片,于荧光显微镜下观察 DOX 荧光强度。

1.2.4 流式细胞测定细胞凋亡率

将 HeLa 细胞接种至 6 孔板中,每孔 4×10⁵ 个细胞,每组 3 个复孔。过夜培养,待细胞贴壁后,分别加入游离 DOX、DOX-lip、cRGD-DOX (DOX 终浓度均为 25 μg/ml),并设置相应空白对照。72 h 后,消化细胞并加入 FITC-Annexin V 和 PI 进行细胞凋亡染色,设置阴性脂质体组以及 FITC 单染组。进行流式细胞分析。

1.2.5 MTT 实验测细胞抑制率

将 96 孔板中的 HeLa 细胞分为游离 DOX 组、cRGD-DOX 组、DOX-lip 组,其 DOX 浓度分别为 5、10、20、30、40 μg/ml,并设置相应空白对照,每孔设置 3 个复孔。48 h 后每孔加 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐[3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT]溶液 20 μl,继续培养 4 h 后吸尽上清液,加二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)每孔 150 μl,振荡溶解 10 min。用酶标仪在 492 nm 下测吸光度值。根据公式“细胞的抑制率(%)=(对照组吸光度值-各实验组吸光度

值)/对照组吸光度值 $\times 100\%$ ”计算细胞抑制率。

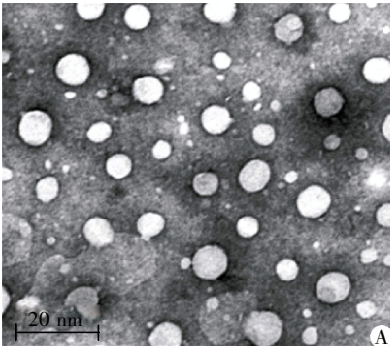
1.3 统计学方法

实验数据使用 SPSS 软件包进行处理, 计量资料指标使用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 各组间差异显著性检验采用单因素方差分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

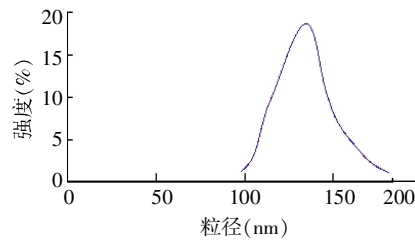
2 结果

2.1 cRGD-DOX 脂质体的表征

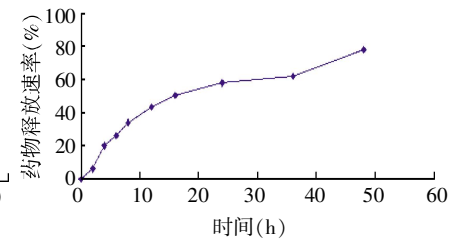
A



B



C



A:cRGD-DOX 脂质体透射电镜图;B:cRGD-DOX 脂质体粒径分布图;C:cRGD-DOX 脂质体释药图

图 1 cRGD-DOX 脂质体表征

Figure 1 The characters of the DOX liposomes

DOX 荧光强度, 结果如图 2 所示, cRGD-DOX 组的平均荧光强度较 DOX-lip 组强约 1.5 倍, 这一结果表明 cRGD-DOX 能更迅速进入 HeLa 细胞中, 表明 cRGD 修饰脂质体可能具有一定的靶向性。

2.2.2 免疫荧光测定脂质体的靶向性

分别以红光和蓝光激发 DOX 和 DAPI, 结果如图 3 所示, DOX-lip、cRGD-DOX 分别与细胞共孵育 1.5 h 后, HeLa 细胞逐渐摄取 DOX, 其中 DOX-Lip 组摄取的 DOX 较少, 而 cRGD-DOX 组摄取明显较多。这一结果也表明 cRGD 修饰的脂质体可以较为迅速地被 HeLa 细胞摄取, 进一步验证了 cRGD-DOX 脂质体相对 DOX-lip 可能具有一定靶向性。

2.3 流式测定 HeLa 细胞凋亡率

用流式细胞法测定游离 DOX、cRGD-DOX 与 DOX-lip 对 HeLa 细胞凋亡率的影响。流式细胞仪分析 Annexin-V, 结果如图 4 所示。作用 72 h 后, cRGD-DOX 组凋亡率为 $(78.6 \pm 8.3)\%$, 显著高于 DOX-Lip 组 $(61.3 \pm 6.2)\%$ ($P < 0.05$), 较游离 DOX 组 $(85.3 \pm 5.9)\%$ 弱。表明 cRGD 修饰的 DOX 脂质体对 HeLa 细胞杀伤作用较普通 DOX 脂质体强, 但较游离 DOX 弱。

透射电镜下脂质体近似球形, 分散性好, 粒子团聚少(图 1A); 粒径分析仪测得脂质体粒径在 100~180 nm 间, 呈现正态分布(图 1B)。紫外分光光度计测得包封率高达到 72%(总 DOX 含量 1 mg, 经紫外分光光度测得游离 DOX 含量约为 0.28 mg), 且具有一定的缓释性(图 1C)。

2.2 cRGD 修饰脂质体靶向性评价

2.2.1 流式细胞术测定脂质体的靶向性

使用流式细胞术测定激发波长 488 nm 下的

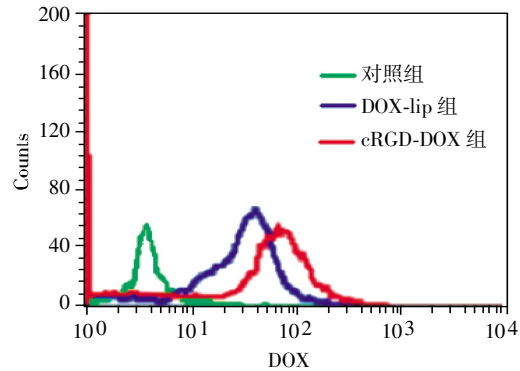


图 2 HeLa 细胞摄入 DOX 的流式细胞结果图

Figure 2 The fluorescence of DOX measured by flow cytometer after HeLa cells uptook the drugs

2.4 MTT 检测细胞抑制率

用 MTT 法检测 HeLa 细胞的存活率。根据各组在酶标仪 493 nm 处的吸光度值计算其相对抑制率(图 5)。其中游离 DOX 组的 IC_{50} 约为 $(20.0 \pm 1.2) \mu\text{g/ml}$, cRGD-DOX 组 IC_{50} 为 $(25.1 \pm 0.8) \mu\text{g/ml}$, DOX-lip 组 IC_{50} 约为 $(27.2 \pm 1.3) \mu\text{g/ml}$ 。结果显示不同浓度的 cRGD-DOX 脂质体细胞毒性与 DOX-Lip 较为接近, 但显著低于游离 DOX ($P < 0.05$), 且呈一定浓度相关性。

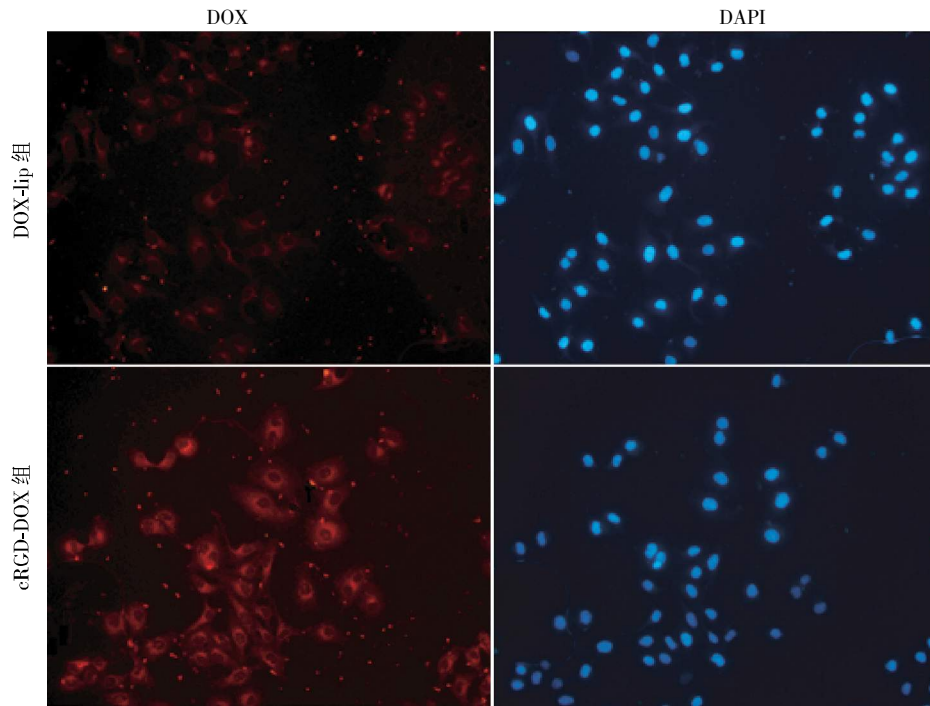
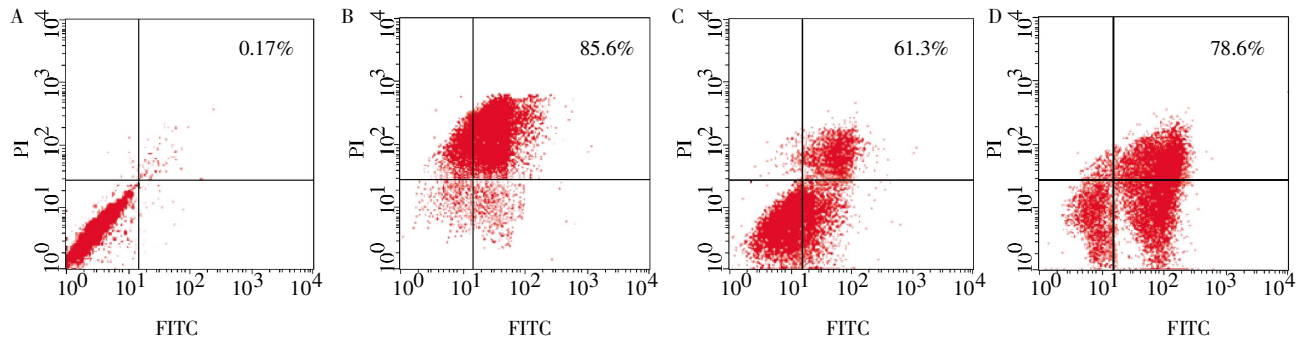


图 3 HeLa 细胞摄入 DOX 的免疫荧光结果图(×100)

Figure 3 The HeLa cell uptaking of DOX measured by fluorescence microscope(×100)



A: 阴性对照组; B: 游离 DOX 组; C: DOX-lip 组; D: cRGD-DOX 组。

图 4 流式细胞术检测不同组别 DOX 对 HeLa 细胞凋亡的影响

Figure 4 Fluorescence intensity of cell apoptosis of HeLa cells in each group measured by flow cytometer

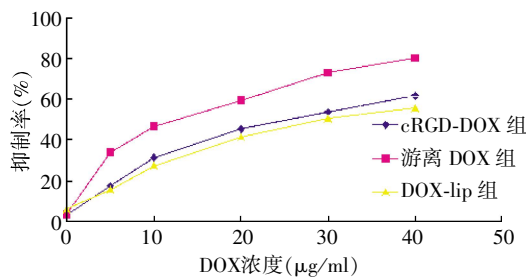


图 5 MTT 检测不同浓度 DOX 对 HeLa 细胞的作用

Figure 5 The MTT results of HeLa cells after applying different concentrations of DOX

3 讨论

恶性肿瘤难以根治的主要问题在于肿瘤的侵袭性生长,而后者依赖新生血管的营养支持^[9]。血管新生过程的调控往往依赖多种黏附分子^[10],整合素跨膜糖蛋白就是其中之一^[11]。多项研究表明cRGD 能够通过结合整合素,从而抑制肿瘤血管新生^[12]。目前发现多种肿瘤细胞表面过表达整合素分子,如 HeLa 细胞等^[13],故以整合素为靶点,通过耦联 cRGD 的阿霉素脂质体,可以靶向性识别 HeLa 细胞,提高药物的靶

向运输,并且可能通过抑制血管新生来抑制 HeLa 细胞生长。

本研究选择阿霉素作为模型药物,首先利用 pH 梯度法制备阿霉素脂质体,结果表明制备的载药脂质体包封率高,接着将 cRGD 偶联至载药脂质体表面,制备耦联 cRGD 的阿霉素脂质体。由于阿霉素本身具有自发荧光的特性,在靶向性分析中,选择了流式细胞术^[14]和免疫荧光^[15]两种方法。HeLa 细胞分别与 cRGD 修饰的阿霉素脂质体以及未经修饰的阿霉素脂质体共孵育 1.5 h 后,通过流式细胞术和免疫荧光检测 DOX 荧光强度,均显示 cRGD-DOX 组较 DOX-Lip 组更快被 HeLa 细胞内吞,与 Dubey 等^[16]研究结果类似。在体外杀伤实验中,与 DOX-Lip 组比较,cRGD-DOX 组对 HeLa 细胞的杀伤作用更为显著,但这种脂质体对宫颈癌是否有治疗效果还需相关动物实验进行证明。而 MTT 结果显示 cRGD-DOX 的细胞毒性与 DOX-Lip 接近,展示出其在将来临床应用的前景。

综上所述,本研究制备的 cRGD-DOX 能够更迅速地被 HeLa 细胞摄取,并且对 HeLa 细胞的杀伤作用较 DOX-Lip 强,杀伤机制尚需要进一步研究证明,这一研究结果为宫颈癌的靶向治疗研究奠定了一定实验基础。

[参考文献]

- [1] 杨 莉,吴江平. 不同亚型人乳头瘤病毒在宫颈疾病中的分布特点[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2013,33(9):1297-1298
- [2] 袁春燕,安艳丽,张东生. $As_4S_4/MnO_5Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 复合纳米粒的制备及其杀伤宫颈癌 HeLa 细胞的实验研究[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2013,33(12):1678-1682
- [3] Liu Z, Jia B, Shi J, et al. Tumor uptake of the RGD dimeric probe ^{99m}Tc -G3-2P4-RGD2 is correlated with integrin $\alpha v \beta 3$ expressed on both tumor cells and neovasculature [J]. *Bioconjugate Chem*, 2010, 21(3): 548-555
- [4] Barrera DA, Zylstra E, Lansbury Jr P T, et al. Synthesis and RGD peptide modification of a new biodegradable copolymer: poly (lactic acid-co-lysine) [J]. *J Amer Chem Soc*, 1993, 115(23): 11010-11011
- [5] Pasqualini R, Koivunen E, Ruoslahti E. A peptide isolated from phage display libraries is a structural and functional mimic of an RGD-binding site on integrins [J]. *J Cell Biol*, 2011, 130(5): 1189-1196
- [6] 吴 卫,程 怡,吴 琼. 半乳糖配体介导多烯紫杉醇脂质体靶向性研究[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2012,32(2):168-171
- [7] 胡鹏翼,郑 琴,刘彦君,等. pH 梯度结合逆向蒸发法制备槐定碱纳米脂质体及体外释放度研究[J]. 中国新药杂志,2011,20(14):1275-1279
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:503-504
- [9] Gimbrone MA Jr, Leapman SB, Cotran RS, et al. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization [J]. *J Exp Med*, 1972, 136(2): 261-276
- [10] Liu C, Liu DB, Long GX, et al. Specific targeting of angiogenesis in lung cancer with RGD-conjugated ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles using a 4.7 T magnetic resonance scanner [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2013, 126(12): 2242-2247
- [11] Brooks PC, Strömblad S, Klemke R, et al. Antiintegrin $\alpha v \beta 3$ blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin [J]. *J. Clin. Invest*, 1995, 96(4): 1815
- [12] Reynolds AR, Hart IR, Watson AR, et al. Stimulation of tumor growth and angiogenesis by low concentrations of RGD-mimetic integrin inhibitors [J]. *Nat Med*, 2009, 15(4): 392-400
- [13] Mickler F M, Vachutinsky Y, Oba M, et al. Effect of integrin targeting and PEG shielding on polyplex micelle internalization studied by live-cell imaging [J]. *J Controlled Release*, 2011, 156(3): 364-373
- [14] Basuki JS, Duong HT, Macmillan A, et al. Using fluorescence lifetime imaging microscopy to monitor theranostic nanoparticle uptake and intracellular doxorubicin release [J]. *ACS Nano*, 2013, 7(11): 10175-10189
- [15] Zhao YZ, Sun CZ, Lu CT, et al. Characterization and anti-tumor activity of chemical conjugation of doxorubicin in polymeric micelles (DOX-P) *in vitro* [J]. *Cancer Lett*, 2011, 311(2): 187-194
- [16] Dubey PK, Mishra V, Jain S, et al. Liposomes modified with cyclic RGD peptide for tumor targeting [J]. *J Drug Target*, 2004, 12(5): 257-264

[收稿日期] 2014-01-19