文章编号:1000-5404(2014)20-2103-05

论著

双功能 RGD-R8 修饰阿霉素脂质体的制备及其体外评价

何笑冬,舒小镭,李少林 (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院放射医学教研室)

[摘要] **目的** 制备串联的 RGD-R8 肽修饰阿霉素(DOX)脂质体(RGD-R8-LP-DOX),对其理化性质进行表征,并研究脂质体与乳腺癌 MCF-7 细胞的亲和力和增殖抑制作用。**方法** 采用薄膜分散法制备 RGD-R8-LP-DOX,研究脂质体的形态、粒径、电位以及包封率;定量细胞摄取实验研究乳腺癌 MCF-7 细胞对 RGD-R8-LP 的摄取效率以及对脂质体摄取的影响因素。定性共聚焦实验观察肿瘤细胞对脂质体的摄取。MTT 实验研究 RGD-R8-LP-DOX 对乳腺癌 MCF-7 细胞的细胞毒性。**结果** RGD-R8-LP-DOX 的粒径为(115.8±11.5)nm,电位为(23.45±4.68)mV,阿霉素的包封率为 95.6%。细胞摄取实验结果显示,RGD-R8-LP 在 4 h 摄取效率是 2 h 的 1.75 倍,差异有统计学意义($P<0.05$);MCF-7 细胞在与脂质体共同孵育 4 h 后对 RGD-R8-LP 的摄取效率分别是 R8-LP、RGD -LP 和 LP 的 2.1 倍、2.9 倍和 3.8 倍,差异有统计学意义($P<0.01$);RGD-R8-LP-DOX 与乳腺癌 MCF-7 细胞孵育 24 h 后的存活率是 48 h 的 1.8 倍,差异有统计学意义($P<0.05$);在给药 48 h 后,R8-LP-DOX、RGD -LP-DOX 和 LP-DOX 的细胞存活率分别是 RGD-R8-LP-DOX 组的 1.6 倍、1.8 倍和 2.4 倍,差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 整合素受体特异性配体 RGD 和细胞穿膜肽 R8 串联的 RGD-R8 肽修饰阿霉素脂质体能够有效穿透肿瘤细胞膜进入肿瘤细胞,是一种潜在高效的乳腺癌给药系统。

[关键词] 整合素受体;细胞穿膜肽;脂质体;乳腺癌
[中图法分类号] R914.5;R966;R979.14 [文献标志码] A

Preparation of bifunctional RGD-R8 peptide modified doxorubicin liposome and *in vitro* evaluation

He Xiaodong, Shu Xiaolei, Li Shaolin (Department of Radiation Medicine, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To prepare RGD-R8 modified doxorubicin liposome (RGD-R8-LP-DOX) and to study its activity on breast cancer MCF-7 cells. **Methods** RGD-R8-LP-DOX was prepared by film-ultrasonic dispersion method. The appearance, particle size, Zeta potential, and entrapment efficiency were evaluated. The cellular uptake of RGD-R8-LP by MCF-7 cells *in vitro* was used to evaluate the targeting efficiency. The anti-proliferation efficiency of RGD-R8-LP-DOX was evaluated by MTT assay. **Results** The particle diameter of the liposome was 115.8±11.5 nm with the Zeta potential of 23.45±4.68 mV. The entrapment efficiency of DOX was 95.6%. The RGD-R8-LP uptaking rate by MCF-7 cells at 4 h was 1.75 times higher than that at 2 h ($P<0.05$). The RGD-R8-LP uptaking rate by MCF-7 cells was 2.1, 2.9 and 3.8 times higher than that of R8-LP, RGD-LP and LP, respectively ($P<0.01$). The cell viability of MCF-7 cells treated by RGD-R8-LP-DOX for 24 h was 1.8 times higher than that for 48 h ($P<0.05$). MTT assay demonstrated that after 48 h treatment, the cell viability of MCF-7 cells treated by R8-LP-DOX, RGD-LP-DOX and LP-DOX were 1.6, 1.8 and 2.4 times higher than that of RGD-R8-LP-DOX ($P<0.01$), respectively. **Conclusion** RGD-R8-LP-DOX might serve as a promising breast cancer delivery system of antitumor drugs.

[**Key words**] integrin receptor; cell-penetrating peptides; liposomes; breast cancer

Supported by the National Natural Science Foundation of China(81171365,30970843). Corresponding author: Li Shaolin, E-mail:lishaolin@cqmu.edu.cn

随着现代生物研究的发展,对肿瘤疾病的治疗手段也日益丰富。其中根据肿瘤组织特点进行靶向治疗成为了肿瘤研究和治疗的热点[1-3]。八聚精氨酸(R8)是由 8 个精氨酸组成的直链肽,能够穿过与之相接触的任何细胞的细胞膜[4],具有高效的穿膜作用[5]。整合素受体(integrin receptor)是一种在多种肿瘤细胞表面和新生血管表面大量表达的受体[6-8]。研究表明,精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp,RGD)能够特异性识别整合素受体,具有高度亲和

[基金项目] 国家自然科学基金(81171365,30970843)
[通信作者] 李少林,E-mail:lishaolin@cqmu.edu.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140821.1436.009.html(2014-08-21)

力[9]。本研究将整合素受体特异性的结合肽RGD与细胞穿膜肽R8串联后连接到脂质体的表面,可以通过RGD识别肿瘤细胞表面高度表达的整合素受体,再利用R8的高效穿膜作用进入肿瘤细胞,以提高脂质体与肿瘤细胞特异结合能力和脂质体的入胞能力,避免阿霉素脂质体对正常细胞的损伤,降低副作用。

1 资料与方法

1.1 材料与仪器

SizerNano ZS90型激光粒度仪及ZETA电位分析仪(英国Malvern instruments Ltd)。大豆磷脂(SPC,上海太伟药业有限公司);胆固醇(Chol,美国Sigma公司);RGD-R8肽(RGD-CRRRRRRRR,上海吉尔生化);阿霉素(浙江海正药业);DSPE-PEG3500(美国Avanti polar lipids);DMEM高糖培养基和胎牛血清(美国GIBCO公司);其余试剂为分析纯。人源乳腺癌MCF-7细胞(ATCC)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 将MCF-7细胞置于含有10%胎牛血清的DMEM培养基中,培养条件为5% CO_2,饱和湿度,温度为37 ℃。待细胞汇合度为0.8~0.9时,用2.5 mg/L胰酶消化传代,取对数生长期细胞进行实验。将MCF-7细胞分为PBS组、LP-DOX组、RGD-LP-DOX组、R8-LP-DOX组和RGD-R8-LP-DOX组。

1.2.2 RGD-R8-LP-DOX的制备及其表征 参照文献[10]的方法合成DSPE-PEG3500-RGD-R8、DSPE-PEG3500-RGD和DSPE-PEG3500-R8。将处方量的SPC、Cho、DSPE-PEG3500-RGD-R8和DSPE-PEG-OMe[保证总磷脂:胆固醇=70:30(物质的量浓度比)]分别溶于氯仿中,在茄形瓶中减压蒸馏成膜,置真空干燥器中过夜。加入2.5 mL PBS缓冲液(pH7.4),置空气浴摇床中,37 ℃,180 r/min,20 min水化,水浴超声5 min脱膜,探头超声制备得到RGD-R8修饰的脂质体。采用硫酸铵梯度法制备载阿霉素的RGD-R8修饰脂质体。用相同物质的量浓度的DSPE-PEG3500-RGD或DSPE-PEG3500-R8取代DSPE-PEG3500-RGD-R8制备得到RGD-LP-DOX和R8-LP-DOX,用相同物质的量浓度的DSPE-PEG3500取代DSPE-PEG3500-RGD-R8制备得到LP-DOX。

取适量制备得到的脂质体样品,用激光粒度仪测定其粒径和电位。取适量脂质体滴至覆有支持膜的铜筛网上,用2%磷钨酸染色10 s后用滤纸吸去多余的染液,自然干燥后,用透射电镜观察其轮廓和形态,并拍摄照片。取脂质体过G50凝胶柱,用HPLC法在254 nm检测阿霉素含量。按照 $EE\% = W_{包}/W_{投} \times 100\%$ 计算包封率。$W_{包}$:脂质体中包载的药物量。$W_{投}$:制备脂质体的投药量。

1.2.3 乳腺癌MCF-7细胞对阿霉素脂质体的摄取及摄取机制

将对数生长期的细胞按 5×10^5/孔接种于6孔板中,37 ℃培养24 h后,每孔加入适量载阿霉素的LP、R8-LP、RGD-LP和RGD-R8-LP,使孔中阿霉素浓度为6 μmol/mL,37 ℃分别孵育2、4 h后除去含脂质体培养基,冷PBS清洗2次,0.25%胰酶消化后离心,PBS清洗3次,流式细胞仪测定细胞荧光值。

将对数生长期的细胞按 5×10^5/孔接种于6孔板中,37 ℃培养24 h后,每孔加入适量载阿霉素的LP、R8-LP、RGD-LP和RGD-R8-LP,使孔中阿霉素浓度为6 μmol/mL,分别控制其孵育温度,加入多聚赖氨酸以及不同胞吞抑制剂孵育4 h后流式细胞仪测定荧光值。

为了定性观察细胞对脂质体的摄取情况,将脂质体与细胞共同孵育4 h后,冷PBS冲洗2次,每孔加入4%多聚甲醛固定15 min,弃去多聚甲醛,加入2 μg/mL DAPI溶液,遮光染色5 min,冷PBS冲洗2次,甘油封片保存。共聚焦显微镜观察。

1.2.4 MTT实验 培养MCF-7细胞接种于96孔板中,24 h后加入适量载阿霉素的LP、R8-LP、RGD-LP和RGD-R8-LP,分别培养24、48 h后取出,每孔加入20 μL 5 mg/mL MTT溶液孵育4 h后,将孔板中液体倒出,每孔加入200 μL DMSO,37 ℃避光振摇15 min,用酶标仪在490 nm处测定各孔的光密度值[$D(490)$]。

1.3 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 21.0统计软件进行数据分析,两组间比较用 t 检验,多组间比较用方差分析。

2 结果

2.1 脂质体的表征

透射电镜下观察RGD-R8-LP-DOX呈球形,形态规整(图1)。粒径为(115.8±11.5)nm,电位为(23.45±4.68)mV,阿霉素的包封率为95.6%(表1)。

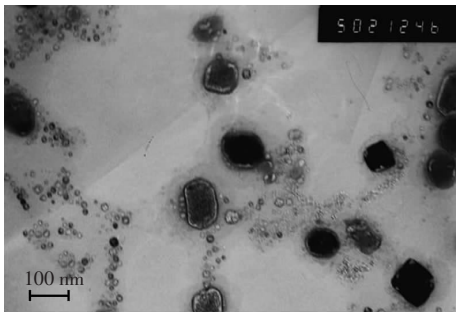
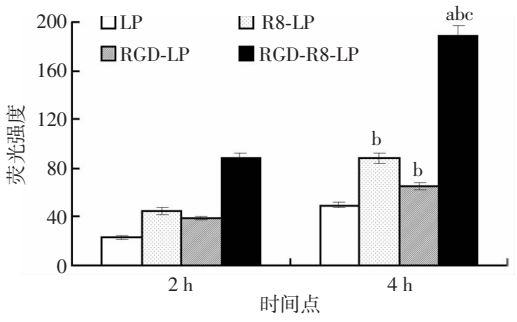


图1 透射电镜下观察RGD-R8-LP-DOX

2.2 MCF-7细胞对脂质体的摄取和摄取机制

不同脂质体的摄取实验结果见图2。肿瘤细胞对脂质体的摄取随着时间的延长而增加,RGD-R8-LP在4 h摄取效率是2 h的1.75倍,差异有统计学意义($P<0.05$);MCF-7细胞对RGD-R8-LP的摄取效率显著高于R8-LP、RGD-LP和LP($P<0.01$),分别是三者的2.1倍、2.9倍和3.8倍;激光共聚焦荧光倒置显微镜观察结果见图3,RGD/R8-LP组荧光强度显著强于其他组。



a:$P<0.01$,与R8-LP和RGD-LP比较;b:$P<0.01$,与LP比较;c:$P<0.01$,与RGD-R8-LP在2 h的摄取比较

图2 MCF-7细胞不同时间对不同脂质体的摄取效率 ($n=3$)

表 1　不同脂质体的粒径、电位与包封率比较（$n=3, \bar{x} \pm s$）

脂质体	粒径(nm)	多分散系数	电位(mV)	包封率(%)
LP-DOX	98.8 ±6.9	0.150 ±0.050	−4.22 ±2.38	96.4
RGD-LP-DOX	105.9 ±8.4	0.160 ±0.030	2.72 ±2.51	93.2
R8-LP-DOX	110.1 ±7.8	0.180 ±0.070	21.45 ±4.13	91.4
RGD-R8-LP-DOX	115.8 ±11.5	0.160 ±0.080	23.45 ±5.68	95.6

摄取机制实验结果(图 4)显示,MCF-7 细胞对 RGD-R8-LP 的摄取是一个温度、能量和电荷依赖的过程。4 ℃条件下,RGD-R8-LP 的摄取下降了 86%。NaN_3使脂质体的摄取下降了 18%。多聚赖氨酸使脂质体的摄取下降了 68%。秋水仙素和氯丙嗪分别使脂质体的摄取下降了 17% 和 43%,说明脂质体的入胞依赖巨胞饮和网格蛋白介导入胞。加入 100 μmol 的游离 RGD 使 RGD-R8-LP 的摄取下降了 56%,100 μmol 的 R8 肿瘤细胞对脂质体的摄取量则没有显著变化。

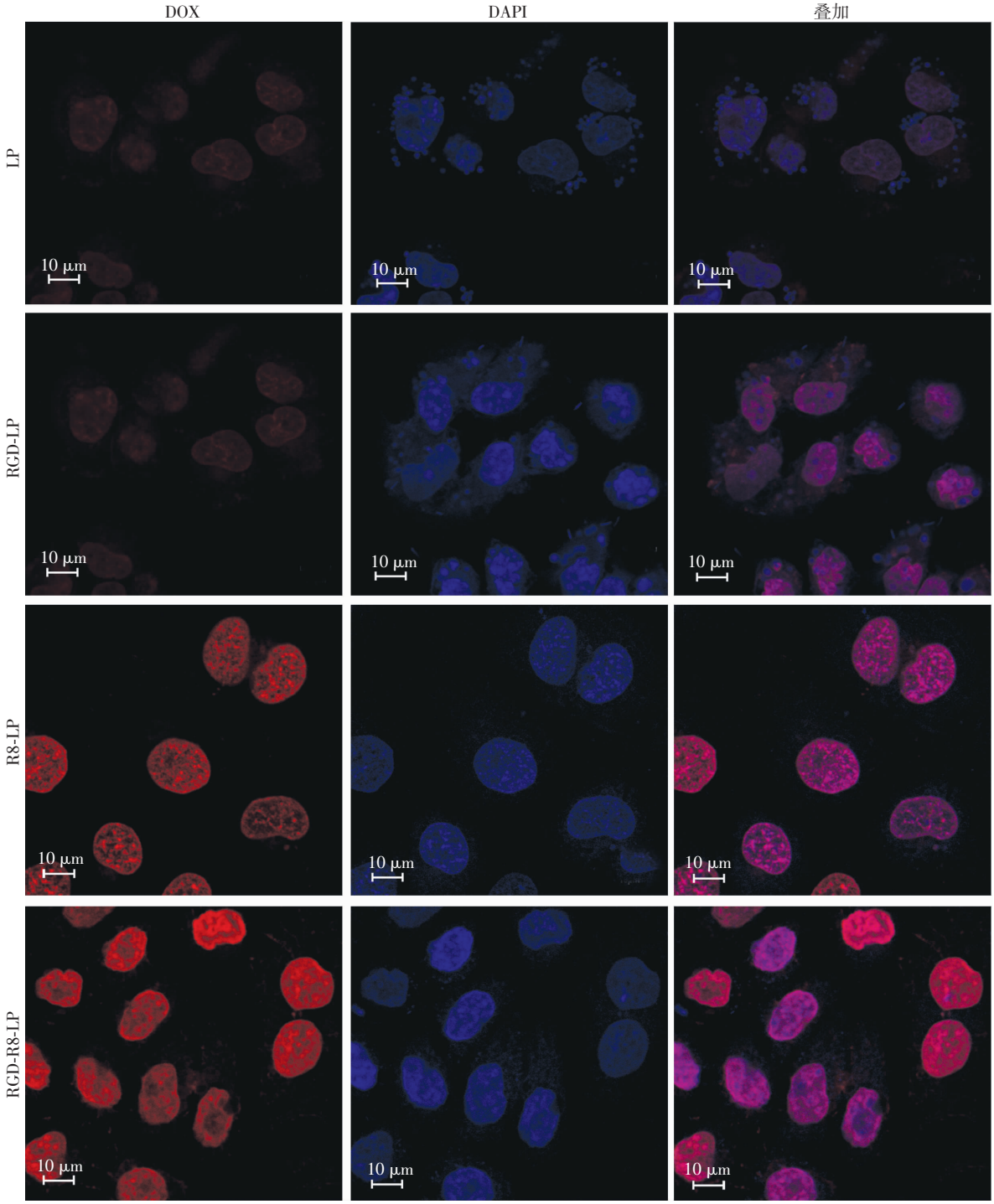
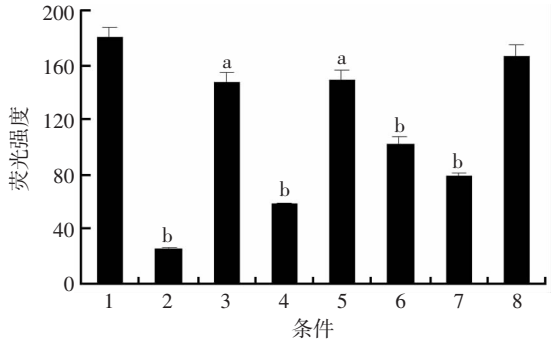


图 3　激光共聚焦观察 MCF-7 细胞对载阿霉素脂质体的摄取情况

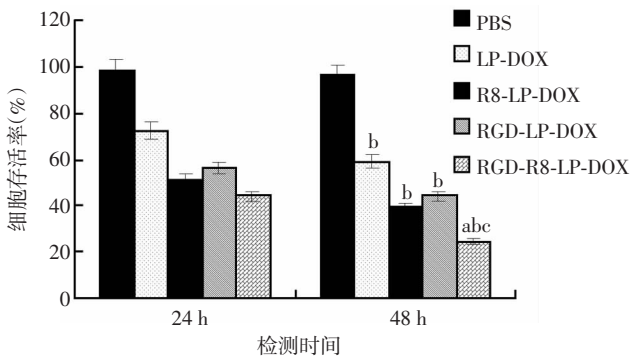


1:PBS; 2:4 ℃; 3:NaN_3; 4: 多聚赖氨酸; 5:秋水仙素; 6:氯丙嗪; 7: 100 μmol RGD; 8: 100 μmol R8;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 PBS 比较

图4 不同条件对 MCF-7 细胞摄取的影响

2.3 细胞毒性

MTT 实验结果见图 5,RGD-R8-LP-DOX 与乳腺癌 MCF-7 细胞孵育 24 h 后的存活率是 48 h 的 1.8 倍,差异有统计学意义($P<0.05$);在给药 48 h 后,R8-LP-DOX、RGD-LP-DOX 和 LP-DOX 的细胞存活率分别是 RGD-R8-LP-DOX 组的 1.6 倍、1.8 倍和 2.4 倍,差异具有统计学意义($P<0.01$)。



a:$P<0.01$,与 R8-LP-DOX 和 RGD-LP-DOX 比较;b:$P<0.01$,与 PBS 比较;c:$P<0.01$,与 24 h 比较

图5 MCF-7 细胞在不同脂质体 MTT 实验中的存活率 ($n=5$)

3 讨论

本研究以脂质体为载体,利用整合素 αvβ3 在人多数肿瘤细胞和肿瘤新生血管高表达的特点[11],选择特异亲和该整合素的 RGD 短肽,与细胞穿膜肽八聚精氨酸连接,合成具有靶向于整合素受体和高效穿膜作用的含 RGD 和 R8 双功能肽 RGD-R8,然后将 RGD-R8 连接到脂质体构建材料 DSPE-PEG2000 末端,制备了脂质体,脂质体系统首先通过被动靶向作用到达肿瘤组织,再通过脂质体表面 PEG 末端的 RGD 识别高度表达整合素受体的肿瘤细胞并与肿瘤细胞结合,最后利用 R8 的高效穿膜作用,进入肿瘤细胞以实现肿瘤细胞的三级靶向。

本研究制备得到的共修饰脂质体的粒径为130 nm 左右,有研究显示纳米载体的粒径范围在 10 ~ 150 nm 能够有效避开网状内皮系统的吞噬,通过 EPR 效应到达肿瘤组织[12-13]。体外细胞摄取实验结果表明,RGD-R8 肽修饰后能够显著增强脂质体的入胞效率,这说明 RGD 肽和 R8 肽串联能够发挥二者的协同作用,达到了实验期望结果。纳米递药系统的细胞毒性以及释药能力等与其细胞摄取途径密不可分,不同的影响因素会对不同配体修饰载体产生影响。因此本研究考察了温度、能力抑制剂 NaN_3、多聚赖氨酸、各种胞吞抑制剂以及游离的 RGD 和 R8 对 RGD-R8-LP 在 MCF-7 细胞中摄取中的影响。结果显示,RGD-R8-LP 的入胞依赖巨胞饮和网格蛋白介导的温度、电荷以及能量依赖的过程,游离的 RGD 能够对 RGD-R8-LP 的摄取产生竞争性抑制,说明 RGD 与肿瘤细胞的结合具有特异性;游离 R8 对 RGD-R8-LP 的摄取无明显的影响,说明细胞穿膜肽 R8 无选择性,与文献[5,7]报道的 RGD 单独修饰脂质体和 R8 单独修饰的脂质体的摄取机制和入胞途径相一致,说明本研究构建的 RGD-R8 肽同时具有 RGD 对高度表达整合素受体细胞的选择特异性和 R8 高效穿透细胞膜的特性,增强脂质体的入胞作用。MTT 实验结果显示双功能肽修饰后脂质体对肿瘤细胞的增殖抑制能力与体外细胞摄取能力具有一致性,说明提高肿瘤细胞对脂质体摄取效率能够增强脂质体的肿瘤细胞增殖抑制能力。

综上所述,本研究构建了一种双功能肽修饰的脂质体给药系统,它能够高效识别并进入肿瘤细胞, RGD-R8-LP 是一种潜在高效的三级靶向肿瘤给药系统。

参考文献:

[1] Schiffelers R M, Molema G, ten-Hagen T L, *et al*. Ligand-targeted liposomes directed against pathological vasculature[J]. J Liposome Res, 2002, 12(1/2): 129 - 135.

[2] Xiong X B, Huang Y, Lu W L, *et al*. Enhanced intracellular uptake of sterically stabilized liposomal Doxorubicin *in vitro* resulting in improved antitumor activity *in vivo* [J]. Pharm Res, 2005, 22(6): 933 - 939.

[3] Qin Y, Chen H, Yuan W, *et al*. Liposome formulated with TAT-modified cholesterol for enhancing the brain delivery[J]. Int J Pharm, 2011, 419(1/2): 85 - 95.

[4] Khalil I A, Kogure K, Futaki S, *et al*. Octaarginine-modified liposomes: enhanced cellular uptake and controlled intracellular trafficking [J]. Int J Pharm, 2008, 354(1/2): 39 - 48.

[5] Al-Soraj M, He L, Peynshaert K, *et al*. siRNA and pharmacological inhibition of endocytic pathways to characterize the differential role of macropinocytosis and the actin cytoskeleton on cellular uptake of dextran and cationic cell penetrating peptides octaarginine (R8) and HIV-Tat[J]. J Control Release, 2012, 161(1): 132 - 141.

[6] Oba M, Fukushima S, Kanayama N, *et al*. Cyclic RGD peptide-conjugated polyplex micelles as a targetable gene delivery system directed to cells possessing alphavbeta3 and alphavbeta5 integrins[J]. Bioconjug Chem, 2007,18(5): 1415 - 1423.

[7] Zhan C, Gu B, Xie C, *et al*. Cyclic RGD conjugated poly(ethylene

glycol)-co-poly(lactic acid) micelle enhances paclitaxel anti-glioblastoma effect[J]. J Control Release, 2010, 143(1): 136 – 142.
[8] Ying X, Wen H, Lu W L, *et al*. Dual-targeting daunorubicin liposomes improve the therapeutic efficacy of brain glioma in animals[J]. J Control Release, 2010, 141(2): 183 – 192.
[9] Jiang X, Xin H, Gu J, *et al*. Solid tumor penetration by integrin-mediated pegylatedoly(trimethylene carbonate) nanoparticles loaded with paclitaxel[J]. Biomaterials, 2013,34(6): 1739 – 1746.
[10] Zhang Q, Tang J, Fu L, *et al* A pH-responsive a-helical cell penetrating peptide-mediated liposomal delivery system[J]. Biomaterials, 2013, 34(32): 7980 – 7993.
[11] Zhang L, Zhang L. Lipid-polymer hybrid nanoparticles: synthesis, characterization and applications[J]. Nano LIFE, 2010, 1(1/2): 163 – 173.
[12] Maeda H, Wu J, Sawa T, *et al*. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review[J]. J Control Release, 2000, 65(1/2): 271 – 284.
[13] Li J, Feng L, Fan L, *et al*. Targeting the brain with PEG-PLGA nanoparticles modified with phage-displayed peptides[J]. Biomaterials, 2011, 32(21): 4943 – 4950.

(收稿:2014-04-14;修回:2014-06-03)
(编辑 汪勤俭)

文章编号:1000-5404(2014)20-2107-01

个案与短篇

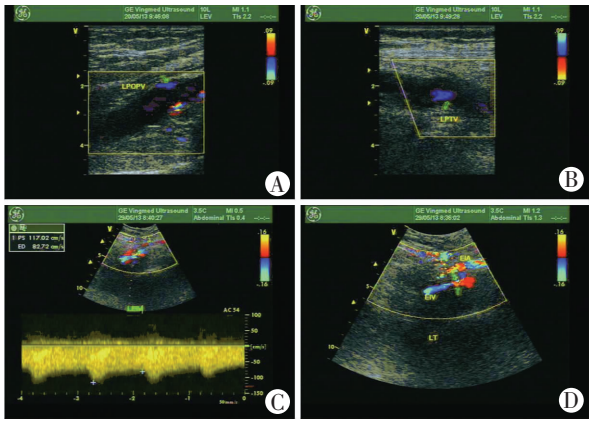
脊髓损伤后同时并发异位骨化和深静脉血栓 1 例

彭一念,邓艳业,游海光,曹永攀,殷 樱 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院康复医学科)

[关键词] 脊髓损伤;异位骨化;深静脉血栓;碱性磷酸酶
[中图法分类号] R744 [文献标志码] B

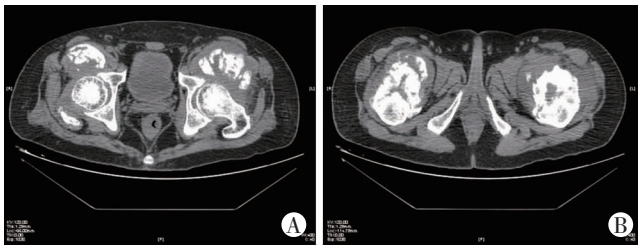
1 临床资料

患者,男性,50 岁,因“坠落致腰痛,双下肢感觉运动障碍 2 h”于 2012-12-30 入院。脊柱 CT 示 T_4爆裂性骨折,T_5压缩性骨折。2 d 后行切开复位和内固定术。术后 3 周开始康复治疗,患者 ASIA 脊髓功能损伤分级 A 级,神经平面 T_4,查体未见髋部、下肢红肿淤青以及骨折征象。患者常规康复训练和护理,伤后 12 周,患者双下肢出现麻胀感伴有疼痛(VAS 评分 6 分),服用洛芬待因、普瑞巴林后症状缓解。伤后 21 周,患者左侧小腿麻痛加重,2 周后出现左侧小腿明显肿胀,同时在康复治疗时触及双侧大腿根部软组织发硬,逐渐加重,并出现髋关节活动障碍。血清碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,AKP)值从损伤后 33 d(146 U/L)开始增高,损伤后 4 个月(531 U/L)达到高峰,并一直维持较高水平。2013-05-20 及 2013-05-29 下肢血管多普勒彩超示左侧腘静脉及胫后静脉血栓(deep vein thrombosis,DVT)形成(图 1A、B),左侧髂外静脉远心端狭窄(图 1C、D)。2013-06-05 CT 示双侧髂前下棘及双侧股骨上段骨化性肿块影(图 2)。患者 T_4水平以下完全性脊髓损伤(spinal cord injury,SCI)后同时并发双侧髋关节、髂骨翼区、股骨上段异位骨化(heterotopic ossification,HO)和左侧腘静脉、胫后静脉 DVT 诊断明确,且其骨化灶对左侧髂外静脉静脉造成压迫,临床上较为少见。但本例未在第一时间确诊 HO 合并 DVT,给治疗带来困难,该患者进行了止痛、抗凝、轻柔被动活动及常规康复训练,患者小腿肿胀减退,大腿持续僵硬,周径减少不明显,HO 症状虽无加重,但康复效果不甚理想。



A、B:左侧胭静脉及胫后静脉,管腔明显增宽,其内被低回声及等回声充填,CDFI 示未探及明显血流信号;C、D:左侧髂外静脉远心段管腔变细,管腔内探及花色血流信号,流速明显增高达 117 cm/s

图 1 患者下肢脊髓损伤后 5 个月余下肢血管多普勒彩超示深静脉血栓形成



A、B:双侧髂前下棘内缘及股骨上端大量骨膜增生,软组织内不规则花斑状骨化影,边界较清,骨质破坏不明显,周围软组织明显肿胀

图 2 患者脊髓损伤后 5 个月余骨盆和下肢近端 CT 示异位骨化形成

[通信作者] 殷 樱,电话:(023)63693075,E-mail: yinying@cqmu.edu.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140126.1056.026.html(2014-01-26)

(下转 2112 页)