论著

文章编号:1000-5404(2014)17-1828-05

转铁蛋白与RGD共修饰脂质体的制备及其肿瘤靶向性评价

张小文[1],吴 静[1,2] (454000 河南 焦作,焦作市妇幼保健院药剂科[1];130000 长春,吉林大学第三临床医学院药学系[2])

[摘要] **目的** 制备转铁蛋白与RGD共修饰脂质体(TF/RGD-LP),研究其体内外卵巢癌靶向性。**方法** 采用薄膜分散法制备RGD修饰脂质体(RGD-LP)。采用后插入法制备转铁蛋白修饰脂质体(TF-LP)和TF/RGD-LP。研究脂质体的粒径和电位;通过细胞摄取实验研究卵巢癌细胞对普通脂质体(LP)、RGD-LP、TF-LP和TF/RGD-LP的摄取效率。构建卵巢癌细胞肿瘤球模型,考察脂质体的肿瘤球穿透能力;构建卵巢癌裸鼠异位模型,考察不同脂质体在荷瘤裸鼠的体内分布。**结果** TF/RGD-LP的粒径为(95.5±8.7)nm,电位为(3.05±1.25)mV。细胞摄取实验结果显示,卵巢癌A2780细胞对TF/RGD-LP的摄取效率分别是LP、TF-LP和RGD-LP的5.7、2.7倍和2.9倍,差异具有统计学意义($P<0.01$)。细胞肿瘤球穿透实验和脂质体体内分布实验结果显示TF/RGD-LP具有良好的肿瘤靶向性和穿透能力。**结论** TF/RGD-LP是一种潜在、高效的卵巢癌靶向给药系统。

[关键词] 整合素受体;转铁蛋白;脂质体
[中图法分类号] R914.2; R979.1 [文献标志码] A

Preparation of transferrin and RGD co-modified liposome and evaluation of its tumor targeting effect

Zhang Xiaowen[1], Wu Jing[1,2] ([1]Department of Pharmacy, Jiaozuo Maternal and Child Care Service Center, Jiaozuo, Henan Province, 454000; [2]Faculty of Pharmacy, Third Clinical Medical School of Jilin University, Changchun, Jilin Province, 130000, China)

[**Abstract**] **Objective** To prepare transferrin and Arg-Gly-Asp (RGD) co-modified liposomes (TF/RGD-LP) and evaluate the targeting effect to ovarian cancer *in vitro* and *in vivo*. **Methods** The RGD modified liposome (RGD-LP) was prepared by film-ultrasonic method. Transferrin and RGD co-modified liposomes (TF/RGD-LP) and the transferrin modified liposomes (TF-LP) were prepared by post-insertion method. The appearance, particle size and Zeta potential of the liposome were evaluated. The cellular uptake of these liposomes to ovarian cancer A2780 cells *in vitro* was determined. Then the tumor spheroids were prepared and used to evaluate the penetration efficiency of the liposome. Transplanted tumor of A2780 cells was established in nude mice, and fluorescence *in vivo* imaging was used to evaluate the targeting efficiency of the liposome in 12 h after injected through tail vein. **Results** The particle diameter of the co-modified liposome TF/RGD-LP was 95.5±8.7 nm with the Zeta potential of 3.05±1.25 mV. The cell uptake of TF/RGD-LP were 2.9, 2.7 and 5.7 times higher than that of RGD-LP, TF-LP and LP respectively ($P<0.01$). The evaluation of tumor spheroid penetration and *in vivo* imaging showed TF/RGD-LP had sound tumor targeting effect and penetration. **Conclusion** TF/RGD-LP might serve as a promising ovarian carcinoma delivery system of antitumor drugs.

[**Key words**] integrins receptor; transferrin; liposome

Corresponding author: Zhang Xiaowen, E-mail:1096485971@qq.com

在过去几十年,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,其中肿瘤的靶向治疗成为了肿瘤治疗研究的热点[1]。转铁蛋白受体是一种在正常细胞和肿瘤细胞表面都普遍存在的受体,但在肿瘤细胞的表面转铁蛋白受体的表达是正常细胞的4~5倍[2]。整合素(integrins)是一类细胞黏附受体分子,在有核细胞表面均广泛表达,其中整合素$\alpha_v\beta_3$在

[通信作者] 张小文,E-mail:1096485971@qq.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140623.1643.009.html (2014-06-23)

卵巢癌、黑素瘤癌、神经胶质瘤等多种肿瘤细胞表面高度表达,因此整合素 $\alpha_v\beta_3$ 常被用作肿瘤靶向的特异性靶点[3]。已有研究表明,精氨酸-甘氨酸-门冬氨酸(Arg-Gly-Asp,RGD)的三肽序列能特异性识别含 α_v 亚基的整合素家族,具有高度亲和力[4]。本研究以脂质体为载体,将转铁蛋白(transferrin,TF)和 RGD 连接到脂质体表面,以卵巢癌细胞为模型,对共修饰脂质体的肿瘤细胞靶向性进行评价。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大豆磷脂(SPC,上海太伟药业有限公司);DSPE-PEG2000、罗丹明标记磷脂、DSPE-PEG2000-MAL(美国 Avanti polar lipids),DMEM 高糖培养基(美国 GIBCO 公司);转铁蛋白(美国 Sigma 公司),胎牛血清(美国 GIBCO 公司),人源卵巢癌细胞(A2780,上海细胞研究所)。SizerNano ZS90 型激光粒度仪及 Zeta 电位分析仪(英国 Malvern instruments Ltd);IVIS® Spectrum system (Caliper, Hopkington, MA)。

1.2 方法

1.2.1 RGD-PEG2000-DSPE 的合成 将一定量商品化的 DSPE-PEG2000-MAL 用适量氯仿溶于茄形瓶中,旋转蒸发除去溶剂成膜,真空干燥过夜。加入适量 PBS 缓冲液(pH = 7.4)水化 1 h(37 ℃,200 r/min),水浴超声 5 min 使形成均匀的 DSPE-PEG2000-MAL 胶束溶液。物质的量之比 1.5 倍的 cRGDfK 多肽溶于适量 PBS 缓冲液中,加入上述胶束溶液,N_2 保护下 4 ℃ 搅拌反应直至 TLC 薄层色谱(展开剂 MeOH: DCM = 1: 10)鉴定 DSPE-PEG-MAL 点基本消失。Sephadex-G50 凝胶色谱柱分离 DSPE-PEG2000-MAL 和游离 RGD(洗脱液为 pH = 7.4 的 PBS 缓冲液),收集 DSPE-PEG-RGD 胶束峰(UV 254 nm)溶液后冻干,除水氯仿溶解后过滤除去无机盐,重复操作 2 次得 DSPE-PEG2000-RGD[5-6]。

1.2.2 转铁蛋白和 RGD 共修饰脂质体(TF/RGD-LP)的制备 精密称取 SPC 15.12 mg,胆固醇 1.35 mg,DSPE-PEG2000-OMe 1.25 mg,RGD-PEG2000-DSPE 0.35 mg,将以上材料和药物溶于氯仿中,在茄形瓶中减压蒸馏成膜,除去有机溶剂,置于真空干燥器中过夜,使其充分干燥,加入 2 mL PBS 水化,探头超声(80 W,10 s,10 s,5 次)得到 RGD 修饰脂质体(RGD-LP)。参照文献[7-8]采用后插入法制备 TF/RGD-LP 和转铁蛋白修饰脂质体(TF-LP)。即首先将转铁蛋白巯基化,再与商品化的 DSPE-PEG2000-MAL 孵育得到转铁蛋白胶束,将胶束后插入已经制备的 RGD-LP 或者普通脂质体得到 TF/RGD-LP 或者 TF-LP。

1.2.3 TF/RGD-LP 的细胞毒性 培养 A2780 细胞,并接种于 96 孔板中,培养 24 h 后加入无菌过滤后的脂质体溶液,将孔板移入 37 ℃ 5% CO_2 孵箱中培养 24 h 和 48 h 后取出,每孔加入 20 μL 5 mg/mL MTT 溶液,再放回孵箱中继续孵育 4 h,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。

1.2.4 A2780 细胞对 TF/RGD-LP 的摄取 将对数生长期的细胞以 5×10^5/孔的密度接种于 24 孔板中,37 ℃ 培养 24 h 后,每孔加入适量 LP、RGD-LP、TF-LP 和 TF/RGD-LP 使孔中罗丹明浓度为 0.15 nmol/mL,37 ℃ 分别孵育 2 h 和 4 h 后除去含脂质体培养基,冷 PBS 清洗 2 次,每孔加入 1% Triton,裂解细胞,暗处放置 30 min,用荧光分光光度计测定荧光值。为了定性观察细胞对脂质体的摄取,将脂质体与细胞共同孵育 4 h 后,将细胞用 PBS 漂洗 3 次,加入 2 μg/mL DAPI 溶液,室温孵育 30 min,加冰 PBS 漂洗 3 次,加 4% 多聚甲醛固定 15 min,弃去多聚甲醛,用冰 PBS 保存。置激光共聚焦显微镜观察细胞摄取。

为了定量研究游离 TF 和 RGD 对 TF/RGD-LP 被 A2780 细胞摄取的影响,将对数生长期的细胞以 5×10^5/孔的密度接种于 24 孔板中,37 ℃ 培养 24 h 后,分别加入 60 μmol 的转铁蛋白和(或)RGD,孵育 1 h 后,加入适量 LP 和 TF/RGD-LP 使孔中罗丹明浓度为 0.15 nmol/mL,37 ℃ 分别孵育 4 h 后除去含脂质体培养基,冷 PBS 清洗 2 次,每孔加入 1% Triton,裂解细胞,暗处放置 30 min,用荧光分光光度计测定荧光值。

1.2.5 TF/RGD-LP 的肿瘤球穿透能力 取对数生长期的 A2780 卵巢癌细胞,用 0.125% 胰酶消化后,用含血清的培养基中和胰酶,并将细胞吹打下来后离心,弃去上清液,沉淀(细胞)用培养基重悬至 5×10^7/mL 后接种于用低熔点琼脂糖预处理的 96 孔板中,于 37 ℃、5% CO_2 孵箱中培养。肿瘤球生长 7 d 后,分别加入罗丹明标记的 LP、RGD-LP、TF-LP 和 TF/RGD-LP,加培养基调整罗丹明标记的磷脂的终浓度为 20 nmol/mL。37 ℃ 孵育 4 h 后,将细胞用 PBS(pH = 7.4)漂洗 3 次,加 4% 多聚甲醛固定 15 min,弃去多聚甲醛,用 PBS 4 ℃ 保存。置激光共聚焦显微镜观察脂质体的肿瘤球穿透能力。

1.2.6 TF/RGD-LP 的体内分布 A2780 卵巢癌细胞经胰酶消化,离心后将其悬浮于 DMEM 培养液中,计数调节浓度至 5×10^7/mL。取 4 只雌性裸鼠用 0.4 g/kg 水合氯醛麻醉,将准备好的 A2780 细胞悬浊液皮下接种于裸鼠左右背部各 1 处,每个点接种 0.1 mL 细胞悬浊液。接种后 1 ~ 2 周可见左右背部长出 100 ~ 200 mm^3 肿瘤块,证明接种成功。

按 1.2.1 方法制备载近红外荧光染料 DIR 的不同脂质体,使脂质体中 DIR 的终浓度为 20 μg/mL。荷瘤裸鼠尾静脉注射脂质体 0.1 mL,12 h 后,将小鼠用 10% 水合氯醛麻醉,于荧光活体成像系统下观察并拍照(Ex = 630 nm,Em = 700 nm)。

1.3 统计学分析

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析,2 组间比较用独立样本 t 检验,多组间比较用方差分析。

2 结果

2.1 脂质体的表征

取制备得到的 TF/RGD-LP 用马尔文激光粒度仪测定粒度和 Zeta 电位,平行测定 3 次。结果(表 1)显示 TF/RGD-LP 的粒径为(95.5 ± 8.7)nm,多分散性系数为 0.170 ± 0.080,Zeta 电位为(3.05 ± 1.25)mV。

表 1 不同脂质体的粒径与电位($n=3,\bar{x}\pm s$)

组别	粒径(nm)	多分散系数	电位(mV)
LP	98.8 ± 6.4	0.120 ± 0.050	4.52 ± 2.56
RGD-LP	112.9 ± 9.4	0.150 ± 0.030	−2.52 ± 3.16
TF-LP	105.5 ± 8.2	0.160 ± 0.070	1.82 ± 2.13
TF/RGD-LP	95.5 ± 8.7	0.170 ± 0.080	3.05 ± 1.25

2.2 TF/RGD-LP 的细胞毒性

细胞毒性实验结果如图1所示，与PBS比较，各组脂质体在24 h和48 h对A2780细胞毒性较小，差异无统计学意义（$P>0.05$）。

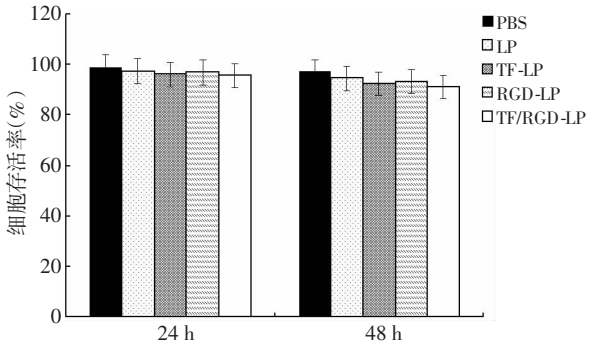
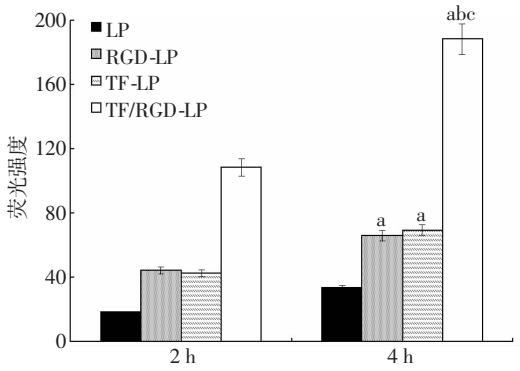


图1 A2780细胞不同脂质体在24、48 h的存活率

2.3 A2780细胞对TF/RGD-LP的摄取

在A2780细胞表面有转铁蛋白受体和整合素受体高度表达。细胞摄取的定量实验结果（图2）显示：卵巢癌A2780细胞对TF/RGD-LP的摄取效率分别是LP、TF-LP和RGD-LP的5.7、2.7倍和2.9倍，差异具有统计学意义（$P<0.01$）；定性的激光共聚焦荧光显微镜观察结果如图3所示，TF/RGD-LP组荧光强度显著强于其他组，这与定量的实验结果相一致。

细胞摄取竞争抑制实验结果如图4所示，游离的RGD和TF都能对TF/RGD-LP的摄取产生竞争抑制，说明RGD和TF都是通过特异性受体介导入胞。游离的RGD和TF分别使TF/RGD-LP的摄取下降48.0%和55.4%，与TF/RGD-LP的摄取效率比较，差异具有统计学意义（$P<0.01$）。



a：$P<0.01$，与LP比较；b：$P<0.01$，与RGD-LP和TF-LP比较；c：$P<0.01$，与2 h的TF/RGD-LP比较

图2 A2780细胞对不同脂质体的摄取

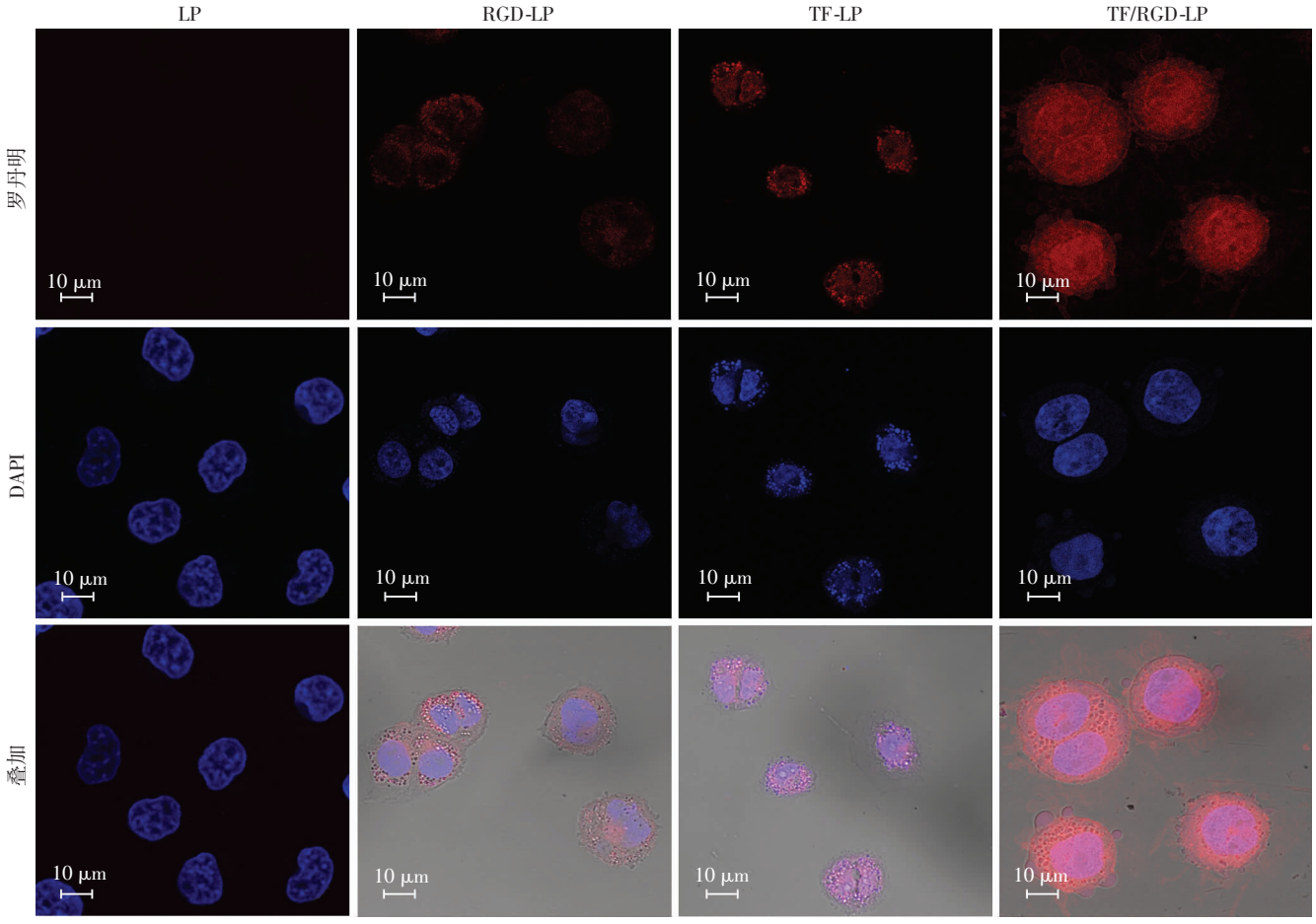
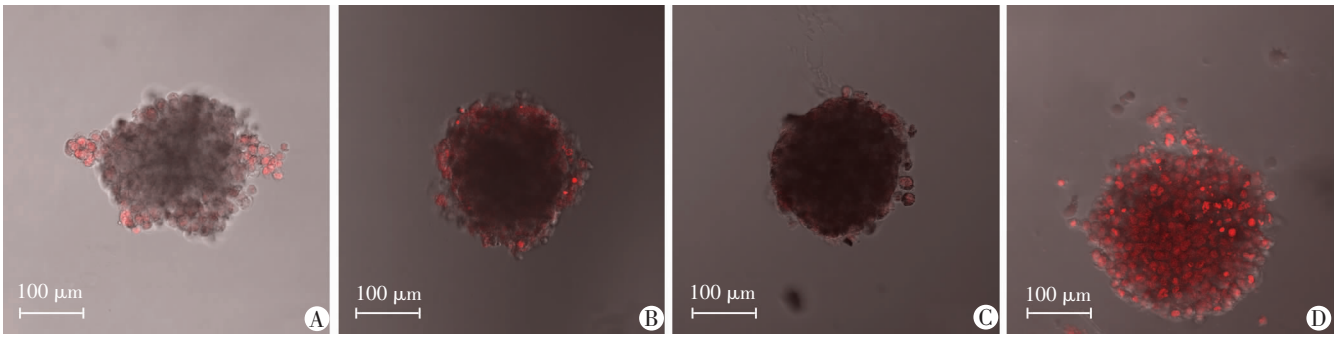
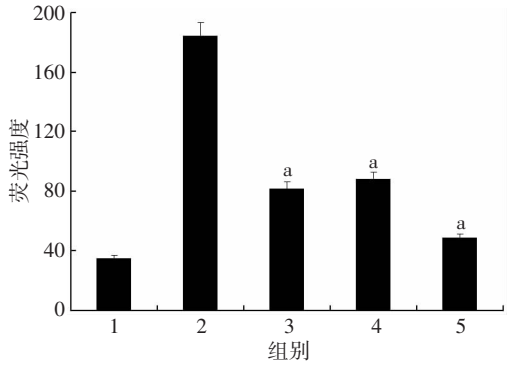


图3 激光共聚焦显微镜下观察A2780细胞对不同脂质体的摄取



A:LP;B:TF-LP;C:RGD-LP;D:TF/RGD-LP

图 5　不同脂质体对 A2780 肿瘤球的穿透作用　（罗丹明）



1:LP;2:TF/RGD-LP;3:TF/RGD-LP + 60 μmol TF;4:TF/RGD-LP + 60 μmol RGD;5:TF/RGD-LP + 60 μmol RGD + 60 μmol TF;a:$P < 0.01$,与 TF/RGD-LP 比较

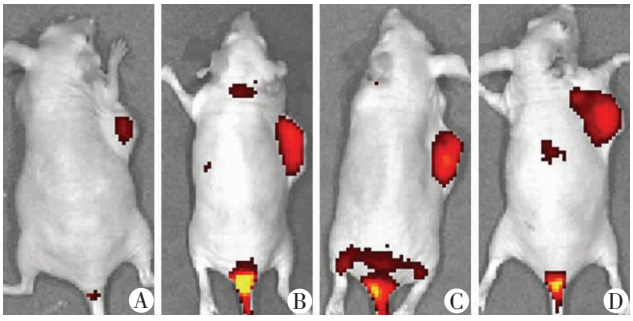
图 4　游离 TF 和 RGD 对 TF/RGD-LP 的竞争性抑制

2.4　TF/RGD-LP 的肿瘤球穿透能力

肿瘤球穿透实验结果如图 5 所示,LP 组红色荧光只在肿瘤球表面少量分布,RGD-LP 组和 TF-LP 组肿瘤球中罗丹明红色荧光分布均匀,强于 LP 组,TF/RGD-LP 组荧光显著强于 RGD-LP 组和 TF-LP 组。说明 RGD 和转铁蛋白共修饰脂质体后能够发挥协同作用促进脂质体进入肿瘤球内部。

2.5　TF/RGD-LP 的体内分布

荷瘤裸鼠活体成像实验结果如图 6 所示,TF/RGD-LP 组的荷瘤裸鼠肿瘤组织红色荧光最强,其次是 RGD-LP 组和 TF-LP 组。说明经过 TF 和 RGD 共修饰后,增强了脂质体的肿瘤靶向能力。



A:LP;B:RGD-LP;C:TF-LP;D:TF/RGD-LP

图 6　载 DIR 的不同类型的脂质体在小鼠体内的分布

3　讨论

理想的肿瘤靶向药物传递系统不仅需要在全身给药后将药物浓集在肿瘤组织,而且还需要将药物高效地传递到肿瘤细胞内,从而将治疗作用最大化并减少抗肿瘤药物的副作用。肿瘤组织内部由于血管壁间隙较宽、结构完整性差、淋巴回流缺失,造成纳米颗粒在此具有选择性高通透性和滞留性,这种现象被称作肿瘤组织的高通透性和滞留效应(enhanced permeability and retention effect),简称 EPR 效应[9-10]。研究已经证实,转铁蛋白受体和整合素受体在多种肿瘤细胞表面都有大量的表达[2-3],因此,转铁蛋白受体和整合素受体成为了肿瘤靶向给药系统主动靶向给药的重要靶点。本研究将转铁蛋白和整合素受体特异多肽 RGD 连接到脂质体的表面,构建了高效肿瘤靶向的脂质体。

本研究结果显示,制备得到的脂质体的粒径为 95 nm 左右。有研究证实,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[11]。在细胞摄取实验中,与普通脂质体相比,经过 RGD 或者 TF 修饰都能够显著增强卵巢癌细胞对脂质体的摄取,其中对共修饰脂质体的摄取效率显著高于 RGD 或者 TF 单独修饰的脂质体,这说明二者发挥了协同作用,共同促进入胞。在某些实体肿瘤组织中,由于肿瘤组织致密生长,肿瘤内部压力高且血管少,因此给药系统很难进入肿瘤组织深部[12]。本研究构建了体外肿瘤球模型用于模拟评价转铁蛋白与 RGD 共修饰脂质体的肿瘤球穿透能力,结果显示经过转铁蛋白和 RGD 共修饰的脂质体能够有效穿透肿瘤球,到达肿瘤组织深处。本研究还构建了裸鼠卵巢癌异位肿瘤模型,通过近红外成像实验考察共修饰脂质体的体内分布,结果与体外研究结果一致,转铁蛋白与 RGD 共修饰脂质体在荷瘤裸鼠肿瘤部位

的荧光强度显著强于转铁蛋白修饰脂质体和RGD修饰脂质体。综上,TF/RGD-LP是一种潜在的高效肿瘤靶向给药系统。

参考文献:

[1] Qin Y, Chen H, Zhang Q, *et al*. Liposome formulated with TAT-modified cholesterol for improving brain delivery and therapeutic efficacy on brain glioma in animals[J]. Int J Pharm, 2011, 420(2): 304-312.

[2] Shah N, Chaudhari K, Dantuluri P, *et al*. Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles surface modified with transferrin and Pluronic ((R)) P85, an *in vitro* cell line and *in vivo* biodistribution studies on rat model [J]. J Drug Target, 2009, 17(7): 533-542.

[3] 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.

[4] 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.

[5] 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.

[6] Ying X, Wen H, Lu W L, *et al*. Dual-targeting daunorubicin liposomes improve the therapeutic efficacy of brain glioma in animals[J]. J Controlled Release, 2010, 141(2): 183-192.

[7] Gan C W, Feng S S. Transferrin-conjugated nanoparticles of poly(lactide)-D-alpha-tocopheryl polyethylene glycol succinate diblock copolymer for targeted drug delivery across the blood-brain barrier[J]. Biomaterials, 2010, 31(30): 7748-7757.

[8] Ulbrich K, Hekmatara T, Herbert E, *et al*. Transferrin- and transferring-receptor- antibody-modified nanoparticles enable drug delivery across the blood-brain barrier (BBB)[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2009, 71(2): 251-256.

[9] Kuai R, Yuan W, Li W, *et al*. Targeted delivery of cargoes into a murine solid tumor by a cell-penetrating peptide and cleavable poly(ethylene glycol) comodified liposomal delivery system *via* systemic administration[J]. Mol Pharm, 2011, 8(6): 2151-2161.

[10] Kuai R, Yuan W, Qin Y, *et al*. Efficient delivery of payload into tumor cells in a controlled manner by TAT and thiolytic cleavable PEG co-modified liposomes[J]. Mol Pharm, 2010, 7(5): 1816-1826.

[11] Zhang L, Zhang L F. Lipid-polymer hybrid nanoparticles: synthesis, characterization and applications[J]. Nano LIFE, 2010, 1(1/2): 163-173.

[12] Jiang X, Xin H, Gu J, *et al*. Solid tumor penetration by integrin-mediated pegylated poly(trimethylene-carbonate) nanoparticles loaded with paclitaxel[J]. Biomaterials, 2013, 34(6): 1739-1746.

(**收稿**:2014-02-07;**修回**:2014-03-19)

(编辑 张 维)

2014年度第三军医大学国家自然科学基金申报工作再创佳绩

2014年,我校基金申报工作再创佳绩。根据国家自然科学基金委员会网站公布的2014年度国家自然科学基金项目资助情况,截至目前,全校共中标各类项目242项(项目经费约1.44亿元),获批项目数和经费数均为历史最好成绩之一。其中包括重点项目6项、优秀青年科学基金项目2项、面上项目139项、青年科学基金项目92项。

获得国家自然科学基金资助情况是反映大学办学水平的重要指标之一。近年来,在校党委"实施一流发展战略,建设世界医学名校"总体办学思路的引领下,各级科研管理部门主动作为,始终聚焦生物医学前沿,努力提高科研绩效,着力推动内涵发展,基金工作不断取得新的进步,在支撑学科人才建设、提升综合办学水平等方面发挥了十分重要的作用。根据国家自然科学基金委员会的统计,今年我校获批项目数居全国医科院校第1位,在全国科研单位排名中列第22位。

下一步,学校将按照国家科技计划改革的要求,进一步加强包括科学基金在内的各级各类科研课题过程管理,重点抓好开题论证、中期检查等环节,不断提高课题完成质量,产出更多高水平研究成果,为加快推进一流名校建设做出更大贡献。

科研部组织计划处 供稿