DOI: 10.16016/j.1000-5404.201409160

论著

RGD修饰共载紫杉醇与microRNA-34a脂质体对肺癌裸鼠移植瘤的生长抑制作用

赵 欣[1],张 健[2] (453000 河南 新乡,新乡医学院第一附属医院:呼吸科[1],儿童重症监护室[2])

[摘要] **目的** 探讨精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp,RGD)修饰共载紫杉醇与microRNA-34a脂质体(RGD miLPs-34a/PTX)的体内药代动力学以及体内对肺癌裸鼠移植瘤的生长抑制作用。**方法** 采用荧光分光光度法检测RGD miLPs-34a/PTX的体外血清稳定性和体内药代动力学。构建肺癌裸鼠移植瘤模型,近红外活体成像研究RGD miLPs-34a/PTX在荷瘤裸鼠的体内分布。荷瘤裸鼠治疗实验检测RGD miLPs-34a/PTX对肿瘤的生长抑制作用。**结果** RGD miLPs-34a/PTX在50%血清中具有良好的稳定性。药代动力学实验表明,在荷瘤小鼠血液中的microRNA-34a的消除速率明显快于miLPs-34a/PTX和RGD miLPs-34a/PTX组,差异有统计学意义($P<0.05$);活体成像实验结果显示,RGD miLPs-34a/PTX在肿瘤组织的荧光分布显著强于miLPs-34a/PTX。肿瘤生长抑制实验结果显示,RGD miLPs-34a/PTX对肿瘤生长的抑制作用显著强于其他脂质体组,差异有统计学意义($P<0.01$)。各给药组对肿瘤生长抑制能力显著强于生理盐水组,差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 体内研究证实RGD修饰的共载紫杉醇和miRNA脂质体能够延长药物体内循环时间,达到长循环效果,具有良好的体内肿瘤靶向性和体内肿瘤治疗效果。

[关键词] 整合素受体;紫杉醇;microRNA-34a;肺癌
[中图法分类号] R734.2;R969;R979.1 [文献标志码] A

Effect of RGD-modified paclitaxel and microRNA-34a co-loaded liposome on inhibiting tumor growth in A549-bearing nude mice

Zhao Xin[1], Zhang Jian[2] ([1]Department of Respiratory Diseases, [2]Pediatric Intensive Care Unit, First Affiliated Hospital, Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan Province, 453000, China)

[**Abstract**] **Objective** To research the pharmacokinetics and antitumor effect of arginine-glycine-aspartic acid (RGD)-modified paclitaxel and microRNA-34a co-loaded liposome (RGD miLPs-34a/PTX) in A549-bearing nude mice. **Methods** Fluorescence spectrophotometry was used to evaluate *in vitro* stability of RGD miLPs-34a/PTX in 50% fetal bovine serum (FBS) and *in vivo* pharmacokinetics. Near infrared imaging was adopted to evaluate the targeting efficiency of the liposome. A549 cells were xenografted into athymic mice to establish lung cancer mouse models, which were used to evaluate the antitumor effect of the liposome. **Results** RGD miLPs-34a/PTX could be stable in 50% FBS for 24 h. The elimination of microRNA-34a was much quicker than that of miLPs-34a/PTX and RGD miLPs-34a/PTX ($P<0.05$). Near infrared imaging demonstrated that the accumulation of RGD miLPs-34a/PTX was much higher than that of miLPs-34a/PTX. The antitumor effect of RGD miLPs-34a/PTX was much better than that of other liposomes ($P<0.05$). **Conclusion** RGD miLPs-34a/PTX shows high targeting efficiency and antitumor effect, and is a promising

[通信作者] 赵 欣,E-mail:527236911@qq.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141204.1641.017.html(2014-12-04)

drug delivery system targeting lung cancer.

[**Key words**] integrin receptor; paclitaxel; microRNA-34a; lung cancer

Corresponding author: Zhao Xin, E-mail: 527236911@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。根据肿瘤组织的特点进行靶向治疗成为了热点[1-2]。整合素受体(integrins receptors)在黑素瘤癌、神经胶质瘤和肺癌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[3-5]。精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp,RGD)能有效识别整合素受体[6]。我们前期的研究已经证实了 RGD 修饰共载紫杉醇与 microRNA-34a 脂质体不仅能够增强与肺癌 A549 细胞具有良好的亲和力和对肿瘤球的穿透能力,还能增强肿瘤细胞增殖抑制能力和肿瘤球生长抑制能力[7]。本研究进一步探讨 RGD 修饰共载紫杉醇与 microRNA-34a 脂质体的体内药代动力学特点、体内肿瘤靶向性和体内抗肿瘤能力,通过对 RGD 修饰共载紫杉醇与 microRNA-34a 脂质体的体内外性质和肿瘤靶向性全面的研究为其临床应用提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

microRNA-34a(上海吉玛生物技术有限公司);紫杉醇(重庆美联制药有限公司,批号:S05055,纯度99.7%);精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp,RGD,上海强耀生物科技公司);DMEM 高糖培养基(美国 Gibco 公司);其余试剂为分析纯。人源肺癌细胞(A549,ATCC);雄性裸鼠(购自新乡医学院实验动物中心)。

1.2 方法

1.2.1 肺癌移植瘤模型的构建及分组 A549 细胞,用含 100 mg/L 双抗,10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养。培养条件为:5% CO_2,37 ℃饱和湿度。取体质量 20 ~ 25 g 的雄性裸鼠,将 A549 细胞悬浊液皮下接种于裸鼠背部,7 d 后出现米粒大肿瘤证实接种成功。取 3 只接种成功后的荷瘤裸鼠分为生理盐水组、RGDLP 组和 LP 组用于近红外活体成像实验。取 12 只接种成功后的荷瘤裸鼠随机分为 miLPs-34a/PTX 组、RGD miLPs-34a 组、RGDLP-PTX 组和 RGD miLPs-34a/PTX 组,每组 3 只,用于体内药代动力学实验。取 30 只接种成功后的荷瘤裸鼠分为生理盐水组、miLPs-34a/PTX 组、RGD miLPs-34a 组、RGDLP-PTX 组和 RGDmiLPs-34a/PTX 组,每组 6 只,用于体内抗肿瘤实验。

1.2.2 RGD miLPs-34a/PTX 的血清稳定性和体内药代动力学研究 通过测定脂质体在 50% 血清环境下的浊度变化考察脂质体在 50% 血清中的稳定性[8-10]。取 miLPs-34a/PTX、RGDmiLPs-34a、RGDLP-PTX 和 RGDmiLPs-34a/PTX,取一定量脂质体与等体积胎牛血清(过膜除去蛋白沉淀,链霉素和青霉素浓度 2 000 U/mL)混合后,于 37 ℃环境下孵育,分别计算各时间点各组脂质体溶液在含 50% 血清环境中透光率与含 50% FBS 的磷酸盐缓冲液透光率的比值。

参照文献[7,11]方法制备 microRNA-34a 被 Cy3 标记的 RGD miLPs-34a/PTX。从尾静脉以 10 μmol/kg 的 microRNA-34a 浓度注射脂质体样品和 Cy3 标记的 microRNA-34a,分别于 0.16、2、4、8、18、30、48 h 时通过断尾取血法采集约 25 μL 血液于肝素管中,混匀后,取 20 μL 血液于另一 EP 管中,加入 220 μL 生理盐水(pH = 7.4),涡旋(1 000 r/min,4 s)混匀,于 2 500 r/min 离心 5 min 沉淀血细胞,小心吸取 200 μL 上清,加入 50 μL 10% 的 Triton X-100 水溶液,于空气浴摇床中避光孵育裂解脂质体(37 ℃,180 r/min,30 min),取 200 μL 裂解液于 96 孔荧光酶标板中,用 ScanIt 生物发光仪测定其荧光强度(Ex = 555 nm,Em = 570 nm,测定时间 200 ms)。以 0.16 h 的 Cy3 浓度作为注射载药脂质体时,起始点 0 h 为 100% 血药浓度,各时间点的相对于起始点 0 h 的血药浓度百分比按公式计算。ID = (各时间点的 Cy3 浓度)/(0.16 h 的 Cy3 浓度) × 100%。

1.2.3 活体成像 取荷瘤裸鼠尾静脉注射载 DIR 脂质体,24 h 后腹腔注射水合氯醛溶液麻醉后置于活体成像仪下观察脂质体的体内分布(Ex = 780 nm,Em = 810 nm)。心脏灌流将各器官中血液替换完全后分离荷 A549 瘤裸鼠肿瘤组织,以 4 μm 的厚度冰冻切片,4% 多聚甲醛室温固定 30 min,PBS 清洗 3 次,DAPI 孵育 5 min 使细胞核染色,冷 PBS 洗涤 3 次后甘油封片,激光共聚焦显微镜下观察各组脂质体在肿瘤组织细胞内的分布情况。

1.2.4　RGD miLPs-34a/PTX 抗肿瘤研究　荷瘤裸鼠在第 3、6、9 天和 12 天尾静脉注射 0.1 mL 生理盐水、miLPs-34a/PTX、RGDmiLPs-34a、RGDLP-PTX 和 RGDmiLPs-34a/PTX，每天观察其活动度和饮食习惯，第 21 天后剖肿瘤，称量，计算抑瘤率。抑瘤率计算公式：抑瘤率 =（1 − $M_{脂质体}/M_{生理盐水}$）× 100%。其中 $M_{脂质体}$ 表示各脂质体干预组在第 21 天处死裸鼠后肿瘤的质量；$M_{生理盐水}$ 表示生理盐水组在第 21 天处死裸鼠后肿瘤的质量。

1.3　统计学方法

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 t 检验，多组间比较用方差分析。

2　结果

2.1　RGD miLPs-34a/PTX 的体外血清稳定性和体内药代动力学

体外血清性实验结果见图 1，miLPs-34a/PTX、RGD miLPs-34a、RGD LP-PTX 和 RGD miLPs-34a/PTX 在 24 h 与 50% FBS 磷酸盐缓冲液的透光率比值均在 90% 上，表明 4 种脂质体在 50% 血清环境中均比较稳定。体内药代动力学分析结果见图 2，在荷瘤小鼠血液中的 microRNA-34a 的消除速率明显快于 miLPs-34a/PTX 和 RGD miLPs-34a/PTX 组，Cy3 荧光强度直到第 48 h 才完全消失。计算得到 microRNA-34a 的半衰期（$t_{1/2}$）为（0.29 ± 0.07）h，miLPs-34a/PTX 和 RGD miLPs-34a/PTX 的半衰期分别为（1.79 ± 0.10）h 和（1.82 ± 0.09）h。miLPs-34a/PTX 和 RGD miLPs-34a/PTX 的半衰期显著长于 microRNA-34a，差异有统计学意义（$P < 0.05$）；miLPs-34a/PTX 和 RGDmiLPs-34a/PTX 的半衰期无显著差异（$P > 0.05$）。

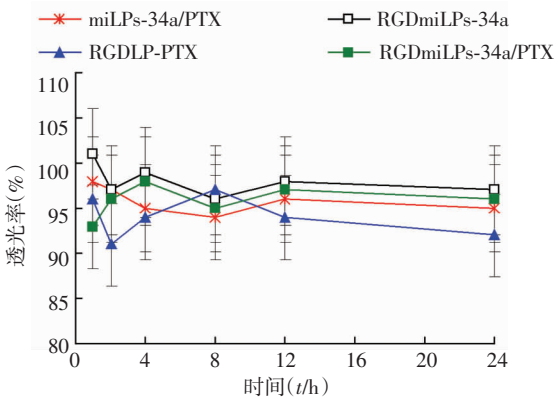


图 1　不同脂质体的体外血清稳定性

2.2　近红外活体成像

近红外活体成像实验结果见图 3，RGDLP 在肿瘤组织中蓄积很明显，在其他组织中分布较少甚至没有分布。RGDLP 在肿瘤组织的荧光强度显著强于 LP。说明经过 RGD 修饰后能够增强脂质体的肿瘤蓄积能力。肿瘤组织细胞内的分布情况见图 4，LP 组肿瘤组织荧光分布较均匀且较弱，相较于 LP 组，RGDLP 组荧光强度较强，这与近红外活体成像的结果一致。

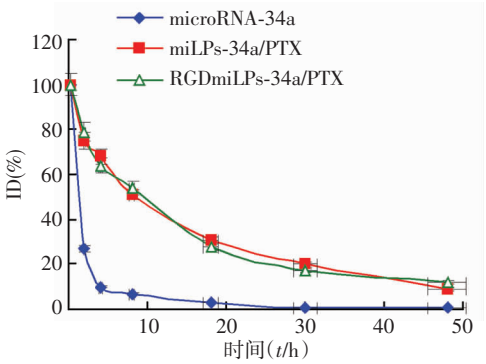
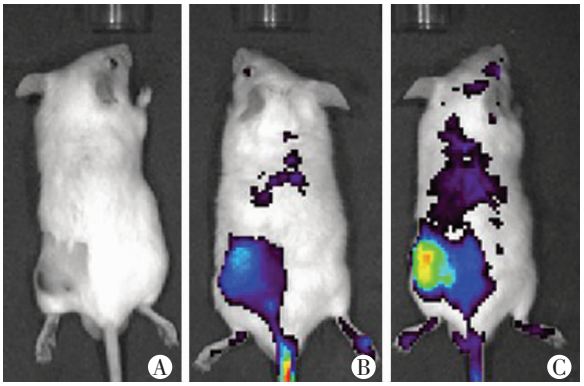


图 2　microRNA-34a、miLPs-34a/PTX 和 RGDmiLPs-34a/PTX 在荷瘤裸鼠体内的药时曲线



A：生理盐水组；B：LP 组；C：RGDLP 组

图 3　各组荷瘤裸鼠的近红外成像观察

2.3　RGD miLPs-34a/PTX 抑制肿瘤生长

对荷瘤裸鼠的治疗结果见表 1，与生理盐水组比较，miLPs-34a/PTX、RGDmiLPs-34a、RGDLP-PTX 和 RGDmiLPs-34a/PTX 都能有效抑制肺癌移植瘤的生长。RGDmiLPs-34a/PTX 对肿瘤生长的抑制作用显著强于其他脂质体，差异有统计学意义（$P < 0.01$）。

表 1　不同脂质体对各组荷瘤鼠肿瘤生长的抑制率比较（$n = 6$，$\bar{x} \pm s$）

组别	肿瘤质量(g)	抑瘤率(%)
生理盐水组	5.16 ± 0.24	0
miLPs-34a/PTX 组	3.84 ± 0.22[a]	25.6 ± 4.9[a]
RGDmiLPs-34a 组	4.28 ± 0.21[a]	19.0 ± 3.3[a]

RGDLP-PTX 组	3.18 ± 0.18[a]	38.4 ± 7.2[a]
RGDmiLPs-34a/PTX 组	1.81 ± 0.09[ab]	64.9 ± 7.5[ab]

a：$P<0.01$，与生理盐水组比较；b：$P<0.01$，与 miLPs-34a/PTX、RGDmiLPs-34a 组和 RGDLP-PTX 组比较

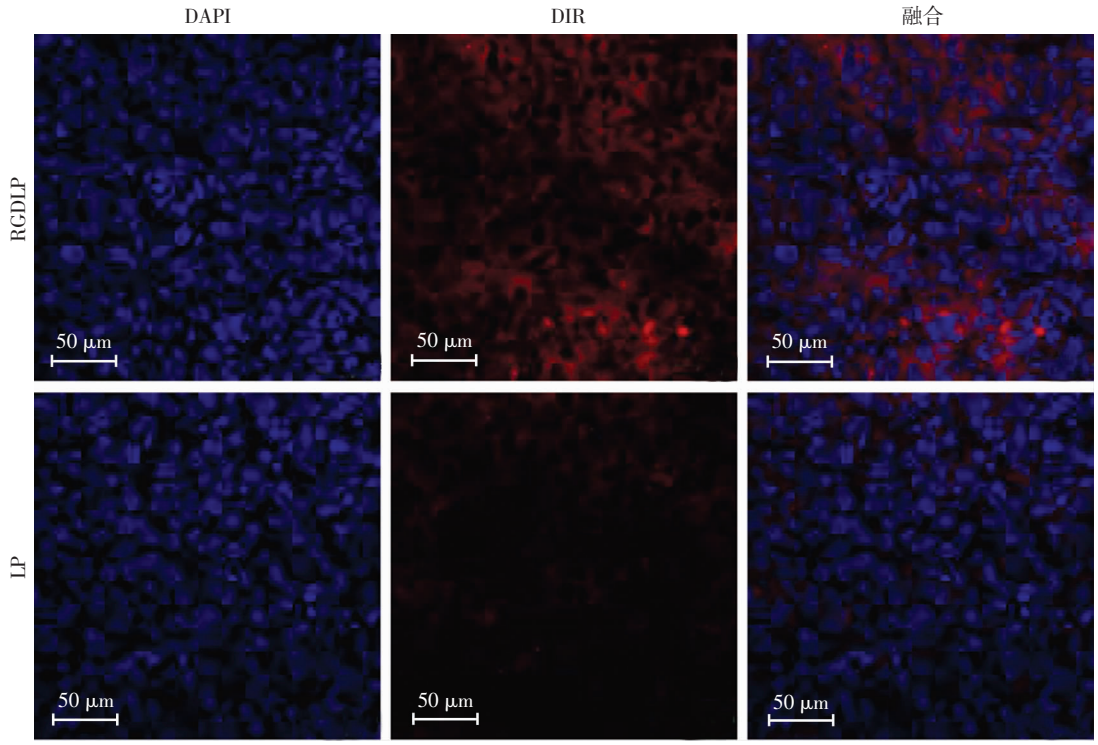


图4 激光共聚焦显微镜观察各组荷瘤裸鼠脂质体在肿瘤组织细胞内的分布情况

3 讨论

整合素受体是在肿瘤细胞表面大量表达的特异性受体[12]。将与整合素受体具有特异性亲和力的 RGD 肽连接到纳米给药系统的表面进行肿瘤靶向治疗已经被广泛研究，并取得了初步成效[13-14]。张小文等[15]将 RGD 连接到脂质体表面，实现了对卵巢癌细胞的靶向递药。MicroRNA-34a 是与人类癌症的发生和发展相关的最突出的内源性 miRNA 之一，它是一种肿瘤抑制基因，它能够有效地抑制肿瘤的发展[16]。在肺癌发生后，MicroRNA-34a 水平通常会下调。增加 MicroRNA-34a 在肺内的表达可以下调肿瘤中的 survivin 蛋白，因而可以抑制肿瘤的生长[17]，我们的研究同样表明 MicroRNA-34a 能够通过直接抑制肺癌干细胞的增殖[18]，因此本研究通过脂质体给药系统对荷瘤小鼠进行 MicroRNA-34a 递药以期望增强抗肺癌生长作用。紫杉醇是临床上常用的抗肿瘤药物。我们前期的研究也已经证实，经过 RGD 修饰后能够增强共载紫杉醇与 microRNA-34a 脂质体被肺癌 A549 细胞摄取和对 A549 细胞的增殖抑制作用。本研究进一步探讨了 RGD 修饰共载紫杉醇与 microRNA-34a 脂质体的体外血清稳定性和体内抗肿瘤活性。

研究结果证实，RGD 修饰共载紫杉醇与 microRNA-34a 脂质体具有良好的体外血清稳定性，这为体内药代动力学实验提供了实验依据。利用 Cy3 标记 microRNA-34a，然后测定血液当中 Cy3 的荧光强度来表示脂质体的量，考察脂质体的药时曲线，用二室模型进行模拟[19]脂质体在体内的代谢过程。体内药代动力学实验结果显示，microRNA-34a 在很短的时间内从荷瘤裸鼠血液中消失，这可能是由于 microRNA-34a 被血液中的核酸酶所分解[20]，而脂质体组的 microRNA-34a 直到第 48 h 后才消失。脂质体组的半衰期也显著长于 microRNA-34a。这有助于脂质体通过 EPR 效应实现肿瘤蓄积。近红外活体成像仪常常被用于纳米载体的靶向性的定性研究，结果显示，经过 RGD 修饰的脂质体能够增强肿瘤蓄积能力，肿瘤组织切片结果显示，RGDLP 在肿瘤细胞细胞核周围大量分布，在实体肿瘤中也显示出良好的入胞能力，这与我们前期体外实验结果一致。裸鼠治疗实验结果显示出 RGDmiLPs-34a/PTX 对荷瘤裸鼠移植瘤的生长抑制作用最强。这也证实了体外研究中细胞增殖抑制实验的结果。

综上所述，RGD 修饰共载紫杉醇与 microRNA-34a 脂质体不仅能够在体外具有良好的肺癌细胞亲和力和

肺癌细胞增殖抑制能力,其在体内也具有优异的肺癌靶向性和肺癌治疗效果。RGD修饰共载紫杉醇与microRNA-34a脂质体是一种潜在有效的肺癌靶向给药系统。

参考文献:

[1] Calzolari A, Oliviero I, Deaglio S, *et al*. Transferrin receptor 2 is frequently expressed in human cancer cell lines[J]. Blood Cells Mol Dis, 2007, 39(1): 82-91.

[2] Shah N, Chaudhari K, Dantuluri P, *et al*. Paclitaxel-loaded PLGA nanparticles 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] Teesalu T, Sugahara K N, Kotamraju V R, *et al*. C-end rule peptides mediate neuropilin-1-dependent cell, vascular, and tissue penetration[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(38): 16157-16162.

[7] 赵欣. RGD修饰共载紫杉醇与microRNA-34a脂质体靶向抑制A549肺癌细胞的初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(11): 1183-1186.

[8] 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.

[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] 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.

[11] Chang S, Guo J, Sun J, *et al*. Targeted microbubbles for ultrasound mediated gene transfection and apoptosis induction in ovarian cancer cells[J]. Ultrason Sonochem, 2013, 20(1): 171-179.

[12] Garcia-Garcia E, Andrieux K, Gil S, *et al*. Colloidal carriers and blood-brain barrier (BBB) translocation: a way to deliver drugs to the brain? [J]. Int J Pharm, 2005, 298(2): 274-292.

[13] Huile G, Shuaiqi P, Zhi Y, *et al*. A cascade targeting strategy for brain neuroglial cells employing nanoparticles modified with angiopep-2 peptide and EGFP-EGF1 protein[J]. Biomaterials, 2011, 32(33): 8669-8675.

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

[15] 张小文, 吴静. 整合素受体介导共载紫杉醇和姜黄素脂质体的构建及其抗肿瘤研究[J]. 中国生化药物杂志, 2014, 34(1): 62-64.

[16] 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.

[17] Chen Y, Zhu X, Zhang X, *et al*. Nanoparticles modified with tumor-targeting scFv deliver siRNA and miRNA for cancer therapy[J]. Mol Ther, 2010, 18(9): 1650-1656.

[18] 赵欣. 载microRNA-34a脂质体靶向治疗肺癌干细胞靶的研究[J]. 中国生化药物杂志, 2014, 34(1): 68-71.

[19] Chang J, Jallouli Y, Kroubi M, *et al*. Characterization of endocytosis of transferrin-coated PLGA nanoparticles by the blood-brain barrier[J]. Int J Pharm, 2009, 379(2): 285-292.

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

(**收稿**:2014-09-23;**修回**:2014-10-29)

(编辑 汪勤俭)