DOI:10.16016/j.1000-5404.202005276

CREKA 肽修饰的载多西他赛脂质体抗前列腺癌靶向研究

杨文波[1],郝 兰[2],王志刚[2],张荣贵[1] 400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院:泌尿外科[1],超声分子影像重庆市重点实验室[2]

[摘要] **目的** 构建以 CREKA 肽修饰的包载多西他赛脂质体(CREKA-lipo-DTX),评价该药物传递系统体外靶向性和体外抗肿瘤效应。**方法** 首先采用迈克尔加成反应合成靶向部分 DSPE-PEG2000-CREKA,随后使用薄膜水化-超声法制备 CREKA-lipo-DTX 并对其基本表征进行评价;将 PC-3 细胞和 RWPE-1 细胞分别分为 3 组($n=3$):空白对照组、PEG-lipo-DiI 组和 CREKA-PEG-DiI 组,脂质体与细胞共孵育后,用激光共聚焦显微镜和流式细胞术分别对脂质体的细胞摄入进行定性和定量的分析,从而评价 CREKA 修饰脂质体对 PC-3 细胞的靶向性;将 PC-3 细胞分为 4 组($n=3$):空白对照组、游离 DTX 组、PEG-lipo-DiI 组和 CREKA-PEG-DiI 组,通过 CCK-8 法和 Annexin V/PI 双染色法评价该药物载体对 PC-3 细胞的增殖抑制效应。**结果** 成功制备出 CREKA 肽修饰的载药脂质体(CREKA-lipo-DTX),其粒径为(130.37±1.44)nm,包封率为(91.93±4.64)%。该药物载体稳定性良好,体外释放结果显示其具有较好的缓释性。激光共聚焦显微镜和流式细胞术分析结果显示,与 PEG-lipo-DiI 组相比,PC-3 细胞对 CREKA 修饰脂质体的摄取显著增加($P<0.05$),而 RWPE-1 细胞对 CREKA 修饰脂质体的摄取差异无统计学意义($P>0.05$);体外抗肿瘤实验结果显示,与游离 DTX 组和 PEG-lipo-DTX 组相比,CREKA-lipo-DTX 组增强了多西他赛对 PC-3 细胞的杀伤作用($P<0.05$),而且使 PC-3 细胞早期凋亡和晚期凋亡的数量均显著增加($P<0.05$)。**结论** 成功制备出一种具有长循环和肿瘤特异靶向特性的高效低毒的脂质体载药系统,体外可以特异靶向于 PC-3 细胞,提高了该载体的体外抗肿瘤效应。

[关键词] CREKA 肽;前列腺癌;脂质体;靶向治疗
[中图法分类号] R737.25; R965; R979.1 [文献标志码] A

CREKA peptide-modified docetaxel loaded liposomes for targeted treatment of prostate cancer *in vitro*

YANG Wenbo[1], HAO Lan[2], WANG Zhigang[2], ZHANG Ronggui[1] [1]Department of Urology, [2]Chongqing Key Laboratory of Ultrasound Molecular Imaging, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China

[**Abstract**] **Objective** To prepare CREKA peptide-modified docetaxel (DTX) loaded liposomes (CREKA-lipo-DTX) and to evaluate their targeted binding ability and anti-proliferative activity *in vitro*. **Methods** Firstly, Michael addition reaction was used to synthesize the targeted part DSPE-PEG2000-CREKA, and then CREKA-lipo-DTX was prepared by thin film hydration-ultrasound method, and its basic characterization was evaluated. Both PC-3 cells and RWPE-1 cells were divided into 3 groups respectively ($n=3$): blank control group, PEG-lipo-DiI group and CREKA-lipo-DiI group. After co-incubation with the cells, the cellular uptake of liposomes was analyzed qualitatively and quantitatively by laser confocal microscopy and flow cytometry respectively, so as to evaluate the targeting effect of CREKA modified vector on PC-3 cells. The cellular uptake of liposomes was analyzed qualitatively and quantitatively by laser confocal microscopy and flow cytometry respectively. The anti-proliferative activity of CREKA-lipo-DTX was evaluated by CCK-8 assay and Annexin V-PI apoptosis detection kit on blank control group, free DTX group, PEG-lipo-

[通信作者] 张荣贵,E-mail:1005983970@qq.com

DiI group and CREKA-PEG-DiI group of PC-3 cells. **Results** CREKA-lipo-DTX was successfully prepared, with an average particle size of 130.37±1.44 nm, and encapsulation rate of (91.93±4.64)%. The obtained drug carrier had good stability and showed good slow-release behavior *in vitro*. The results of laser confocal microscopy and flow cytometry analysis indicated that the uptake of CREKA-modified liposomes by PC-3 cells was significantly increased ($P<0.05$) when compared with the unmodified liposome group (PEG-lipo-DiI), while no such difference was seen in RWPE-1 cells ($P>0.05$). *In vitro* anti-tumor experimental results suggested that enhanced killing effect of DTX on PC-3 cells and significantly increased numbers of early and late apoptotic PC-3 cells were observed in the CREKA-lipo-DTX group when compared with the free DTX and PEG-lipo -DTX groups ($P<0.05$). **Conclusion** A high-efficiency and low-toxicity lipoid drug delivery system with long cycle and tumor specific targeting characteristics has been successfully prepared, which can specifically target PC-3 cells *in vitro*, and thus can improve the anti-tumor effect of the carrier *in vitro*.

[**Key words**] CREKA peptide; prostate cancer; liposome; targeted therapy

Corresponding author: ZHANG Ronggui, E-mail:1005983970@qq.com

前列腺癌是男性常见的癌症之一,也是癌症相关死亡的常见原因之一[1]。虽然局限性前列腺癌可以通过手术和放疗得到有效的治疗,但是大多数患者会逐渐发展为更具侵袭性的去势抵抗性前列腺癌(castration resistant prostate cancer,CRPC)[2]。化疗药物如多西他赛已被广泛用于 CRPC 的治疗[3],但由于这些药物存在一些难以克服的缺点,如水溶性差、血液半衰期过短、对正常细胞毒副作用大等,仅显示出中等的生存获益,成为限制其化疗效果的一个持续的临床问题[4-5]。因此,更有效的治疗 CRPC 的替代策略非常有必要探讨。

近年来,越来越多的研究表明纳米载体在肿瘤的诊断成像、治疗等方面有效[6]。在各种被研究的纳米载体中,脂质体在药物传递领域具有很大的应用前景。脂质体是一种球状结构,由一个或多个围绕离散水空间的同心双脂层形成,脂质体与其他药物输送系统相比存在一些独特的特征,如生物相容性、无免疫原性、自组装能力、能够负荷亲水性和疏水性药物从而改善其溶解性等[7]。为了提高脂质体抗癌药物的疗效,纳米载体常与分子如抗体及其可变片段、肽、核酸适体、维生素和碳水化合物结合从而靶向性将药物递送至癌细胞,达到最大化治疗效果[8]。在癌症进展过程中,细胞外基质(extracellular matrix,ECM)发生了巨大变化,促进癌细胞迁移和侵袭。在重建的肿瘤 ECM 中,纤连蛋白(fibronectin,FN)水平上调,以帮助肿瘤生长、进展和侵袭。FN 是 ECM 分子的中心组织者,调节肿瘤微环境与癌细胞之间的相互作用。它的上调与血管生成、癌症进展、转移和耐药性相关[9]。迄今为止,FN 靶向制剂已被广泛应用于肿瘤的诊断与治疗[10]。凝块结合肽半胱氨酸-精氨酸-谷氨酸-赖氨酸-丙氨酸(CREKA)是在 MMTV-PyMT 转基因乳腺癌小鼠体内噬菌体展示中获得的一种 FN 靶向配体,研究表明 CREKA 肽可以通过与肿瘤血管内的 FN 和 FN 相关的凝血血浆蛋白结合靶向于肿瘤部位[11]。

因此,本研究将 CREKA 肽作为一种靶向配体,构建以 CREKA 肽修饰的包载多西他赛的脂质药物传递系统,并初步探讨该药物传递系统体外靶向性和抗肿瘤效应,为进一步开发前列腺癌的靶向治疗制剂提供新的可能性。

1 材料与方法

1.1 实验试剂和仪器

CREKA 肽(Cys-Arg-Glu-Lys-Ala,纯度>95%)由上海生工合成;大豆卵磷脂(SPC)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000(DSPE-mPEG2000)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-马来酰亚胺(DSPS-mPEG2000-MAL)、胆固醇(Cholesterol)购自瑞士 Corden 公司;多西他赛(docetaxel, DTX)购自大连美仑生物有限公司;细胞膜红色荧光探针(DiI)、DAPI 细胞核染色液购自上海碧云天生物技术有限公司;CCK-8 试剂购自 MCE 公司;PC-3 细胞、RWPE-1 细胞购自 Procell 公司;F-12K 培养基、胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司;DMEM 培养基购自 HyClone 公司。

RE-52A 旋转蒸发仪购自上海亚荣生化仪器厂,声震仪购自美国 Sonic 公司,马尔文 Nano-ZS90 型粒径分析仪购自英国 Malvern 公司,LC-10A 型高效液相色谱仪购自日本岛津公司,JEM-2100F 型透射电子显微镜购自日本 Hitachi 公司,激光共聚焦扫描显微镜购自日本 Nikon 公司,流式细胞仪购自美国 BD Influx 公司,多功能酶标仪购自美国 Thermo Fisher 公司,AVANCE Ⅲ 600MHz 核磁共振波谱仪购自瑞士 Bruker 公司。

1.2 合成 DSPE-PEG2000-CREKA

参照文献[12]报道的实验方法,CREKA 肽段末端半胱氨酸结构中巯基与 DSPE-PEG2000-MAL 中 PEG 链末端的马来酰亚胺基团通过迈克尔加成反应生成 DSPE-PEG2000-CREKA。将 CREKA 肽与 DSPE-PEG2000-MAL(摩尔比 1.1∶1)分别溶于甲醇和氯仿(体积比 1∶1),少量的三乙胺作为反应的催化剂,该反应在室温下反应 12 h。为了进一步纯化合成物 DSPE-PEG2000-MAL,将反应后的混合物装进截流分子量 3 500 的透析袋中,然后在去离子水中透析 48 h,最后将纯化好的反应物进行冻干,存储在-20 ℃备用,获得的纯化物通过核磁共振氢谱(^{1}H NMR)进行验证。

1.3 CREKA-lipo-DTX 的制备

采用薄膜水化-超声法制备脂质体制剂,按照一定比例精密称取 SPC、胆固醇、DSPE-mPEG2000-CREKA 和 DTX,加入适量氯仿溶解,使用旋转蒸发仪在真空条件下去除有机溶剂,圆底烧瓶内壁形成一层脂质薄膜,然后室温下加入 PBS 缓冲溶液(pH 7.4)对脂质薄膜进行水化,直至薄膜水化完全。涡旋振荡使脂质薄膜分布均匀,再将获得的脂质体悬液在冰水浴中使用探头声震仪超声振荡 8 min(150 W,5 s-on/5 s-off),即得 CREKA 修饰的包载 DTX 的脂质体悬液(CREKA-lipo-DTX)。在制备过程中,将 DSPE-PEG2000-CREKA 换成 DSPE-PEG2000,即可得到无 CREKA 肽修饰的包载 DTX 脂质体(PEG-lipo-DTX)。

1.4 CREKA-lipo-DTX 基本表征

1.4.1 粒径、粒径分布、Zeta 电位的测定 使用马尔文 Nano-ZS90 型动态光散射粒径分析仪在 25 ℃下测定各脂质体的粒径和粒径分布。取适量各种脂质体悬液,稀释成适宜浓度,置于 Zeta 样品池中,使用粒径分析仪测定 Zeta 电位。

1.4.2 脂质体包封率的测定 采用超滤法测定脂质体的包封率,精密量取制备好的脂质体悬液 0.5 mL 两份:一份加入到超滤管中,进行超滤离心 10 min,转速 14 000 r/min,分离出游离药物和脂质体,取离心流出滤液用 HPLC 法分析,测定 DTX 含量,即为未载入脂质体中的 DTX 质量,记为 $W_{游}$;另一份直接用甲醇溶液破乳,超声 10 min,使脂质体完全破裂,测定 DTX 含量,即为制剂中 DTX 总量,记为 $W_{总}$。按以下公式计算包封率(EE)。

$$EE=(W_{总}-W_{游})/W_{总}\times 100\%$$

1.4.3 纳米脂质体稳定性研究 通过监测脂质体在 50%FBS 中的浑浊度变化情况来评价脂质体在血清中的稳定性,将脂质体制剂和 FBS 按 1∶1的比例混合并放在 37 ℃下孵育 72 h,在不同时间点(0、1、2、4、8、12、24、48 和 72 h)使用多功能酶标仪在 750 nm 波长检测混合物的光密度,并计算出相应的透射比,实验重复 3 次。

1.4.4 体外释放研究 配制含 0.5%Tween-80 的 PBS 缓冲液(pH 7.4)作为释放介质,以释放介质为溶剂,配制成质量浓度分别为 1、10、25、50、100、200 μg/mL 的 DTX 溶液,按照色谱条件:色谱柱为 Hanbon C18 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm)、柱温 30 ℃、流动相为乙腈-水(体积比 50∶50)、检测波长 230 nm、流速 1.0 mL/min、进样量 20 μL,分别进样 HPLC 分析,记录峰面积,以峰面积(y)对多西他赛质量浓度(x)作线性回归方程,即可得 DTX 的标准曲线。

采用动态膜扩散法研究脂质体制剂的体外释放药物性能,用移液器精密吸取 CREKA-lipo-DTX、PEG-lipo-DTX、游离 DTX 溶液各 0.5 mL,分别置于分子量 8 000~14 000 透析袋中,透析袋两端扎紧后置于盛有 50 mL 释放介质的容器中,置于恒温摇床(37 ℃,120 r/min)振荡,分别于预设时间点 0、1、2、4、8、12、24、48 h 定量吸取释放介质,并同时补充同温等量相同释放介质,HPLC 法测定 DTX 浓度,计算累计释放率,并绘制药物的体外释放曲线,实验重复 3 次。

1.5 细胞培养

实验选取人前列腺癌 PC-3 细胞,其为雄激素非依赖性前列腺癌细胞,被广泛用于雄激素抵抗性型前列腺癌的研究[13],可以满足实验要求,选取人前列腺正常细胞 RWPE-1 作为正常对照组。PC-3 细胞采用 F-12K 完全培养基(10% FBS 和 1% 的青霉素/链霉素),RWPE-1 细胞采用 DMEM 完全培养基(10% FBS 和 1%的青霉素/链霉素),在 37 ℃,5%CO_2 的培养箱中培养,实验均采用处于对数生长期的细胞。

1.6 体外细胞摄取实验

为了验证细胞对脂质体的摄入情况,采用细胞膜红色荧光探针 DiI 作为一种荧光染料代替 DTX 载入脂质体中进行细胞摄取实验,在激光共聚焦显微镜下观察细胞对不同制剂的摄取情况。将 PC-3 细胞和 RWPE-1 细胞按 1×10^5/孔接种于共聚焦专用皿中,在 37 ℃、5%CO_2 环境下孵育 24 h,使其完全贴壁,分别加入含 PEG-lipo-DiI 和 CREKA-lipo-DiI 的培养基,以只加培养基的细胞作为空白对照组,在 37 ℃下继续分别共同孵育 2 h。孵育结束后吸出皿中的培养基,用冷 PBS 缓冲液洗涤细胞 3 遍,然后在室温下用 4%多聚甲醛固定细胞 10 min,固定结束后再用冷 PBS 缓冲液冲洗细胞,接下来加入 DAPI 核染色液对细胞核染色 10 min,实验中全程避光,最后使用共聚焦显微镜对细胞观察并拍照。

通过流式细胞仪检测细胞的平均荧光强度以对细

胞摄取脂质体进行定量分析。将 PC-3 细胞和 RWPE-1 细胞按 2×10^5/孔接种于 6 孔板中,在 5%CO_2、37 ℃条件下孵育 24 h 后,分别加入含 PEG-lipo-DiI 和 CREKA-lipo-DiI 的培养基,随后在 37 ℃继续孵育 2 h。孵育结束后吸出孔板中的培养基,用冷 PBS 缓冲液洗涤细胞 3 遍,然后加入胰酶消化细胞,待细胞分离后,含血清的完全培养基终止消化,1 000 r/min 离心 5 min,用 0.5 mL PBS 缓冲液重悬细胞,该实验中全程避光,最后用流式细胞仪检测并分析,并对细胞的平均荧光强度进行分析,以定量评价细胞摄入脂质体情况。随后又评价了时间对 PC-3 细胞摄入脂质体的影响,将细胞与脂质体在 37 ℃共孵育 1、2、4 h,随后用流式细胞仪检测并分析。

1.7 竞争性抑制实验

将对数生长期 PC-3 细胞经胰酶消化后离心重悬、细胞计数板计数,按 1×10^5/孔接种于 12 孔板中,5%CO_2、37 ℃条件下孵育 24 h 后,在加入脂质体制剂前加入过量游离 CREKA 肽与 PC-3 细胞共孵育 0.5 h,用培养基清洗细胞,再分别加入含 PEG-lipo-DiI 和 CREKA-lipo-DiI 的培养基,以只加培养基的细胞作为空白对照组,随后在 37 ℃继续孵育 2 h,孵育结束后吸出孔板中的培养基,用冷 PBS 缓冲液洗涤细胞 3 遍,然后加入胰酶消化细胞,待细胞分离后,含血清的完全培养基终止消化,1 000 r/min 离心 5 min,用 0.5 mL PBS 缓冲液重悬细胞,该实验中全程避光,最后用流式细胞仪检测并分析。

1.8 细胞毒性实验

采用 CCK-8 法检测各制剂对前列腺癌细胞 PC-3 的细胞毒性作用。选取处于对数生长期的 PC-3 细胞,以 3×10^3/孔接种于 96 孔板中,在 37 ℃、5%CO_2 环境中培养 24 h。以完全培养基分别稀释 DTX、PEG-lipo-DTX、CREKA-lipo-DTX 悬液至浓度为 0.1、1、5、10、20 μg/mL,用配制的溶液替换上述 96 孔的培养基,每个浓度 3 个复孔,在 37 ℃继续培养 48 h。每孔加入 CCK-8 孵育 1 h 后,使用多功能酶标仪在波长 450 nm 处测定光密度值[$D(450)$],计算细胞存活率。

1.9 细胞凋亡实验

细胞凋亡通过 Annexin V-PI 双染色进行定量分析,PC-3 细胞中分别加入相同药物浓度的 DTX、PEG-lipo-DTX 和 CREKA-lipo-DTX 制剂,共孵育 24 h,孵育结束后吸出孔板中的培养基,用冷 PBS 缓冲液洗涤细胞 3 遍,然后加入胰酶消化细胞,待细胞分离后,含血清的完全培养基终止消化,1 000 r/min 离心 5 min,用 0.5 mL PBS 缓冲液重悬细胞,分别加入 5 μL Annexin V-FITC 与 5 μL PI 染液,避光孵育 15 min,然后通过流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

1.10 统计学分析

采用 Excel 与 Graphpad prism 软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,检验水准:$\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 合成 DSPE-PEG2000-CREKA

CREKA 肽结合到 DSPE-PEG2000-MAL 上,通过 CREKA 肽上的半胱氨酸结构中巯基与 DSPE-PEG2000-MAL 上的马来酰亚胺(Maleimide)反应,从核磁氢谱图可以看到,在 4.5~5.0 ppm 之间典型的共振峰是溶剂残留峰,DSPE-PEG2000-CREKA 与 DSPE-PEG2000-MAL 核磁氢谱图在 3.5~4.0 ppm 之间都存在 PEG 共振峰,表明它们都存在 PEG 长链;从 DSPE-PEG2000-MAL 核磁氢谱图可以看到 6.5~7.0 ppm 存在 MAL 基团的特征峰,而 DSPE-PEG2000-CREKA 核磁氢谱图中 MAL 基团的特征峰完全消失,表明 DSPE-PEG2000-MAL 中的 MAL 基团被完全消耗完,而且 DSPE-PEG2000-MAL 与 CREKA 核磁氢谱图在 2.0~5.0 ppm 出现完全重叠的共振峰,进一步说明 DSPE-PEG2000-CREKA 合成成功(图 1)。

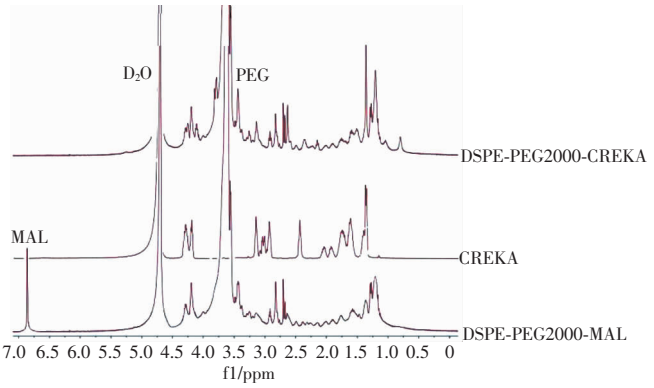


图 1 DSPE-PEG2000-MAL、CREKA 与 DSPE-PEG2000-CREKA 的核磁氢谱图

2.2 脂质体的制备及基本表征

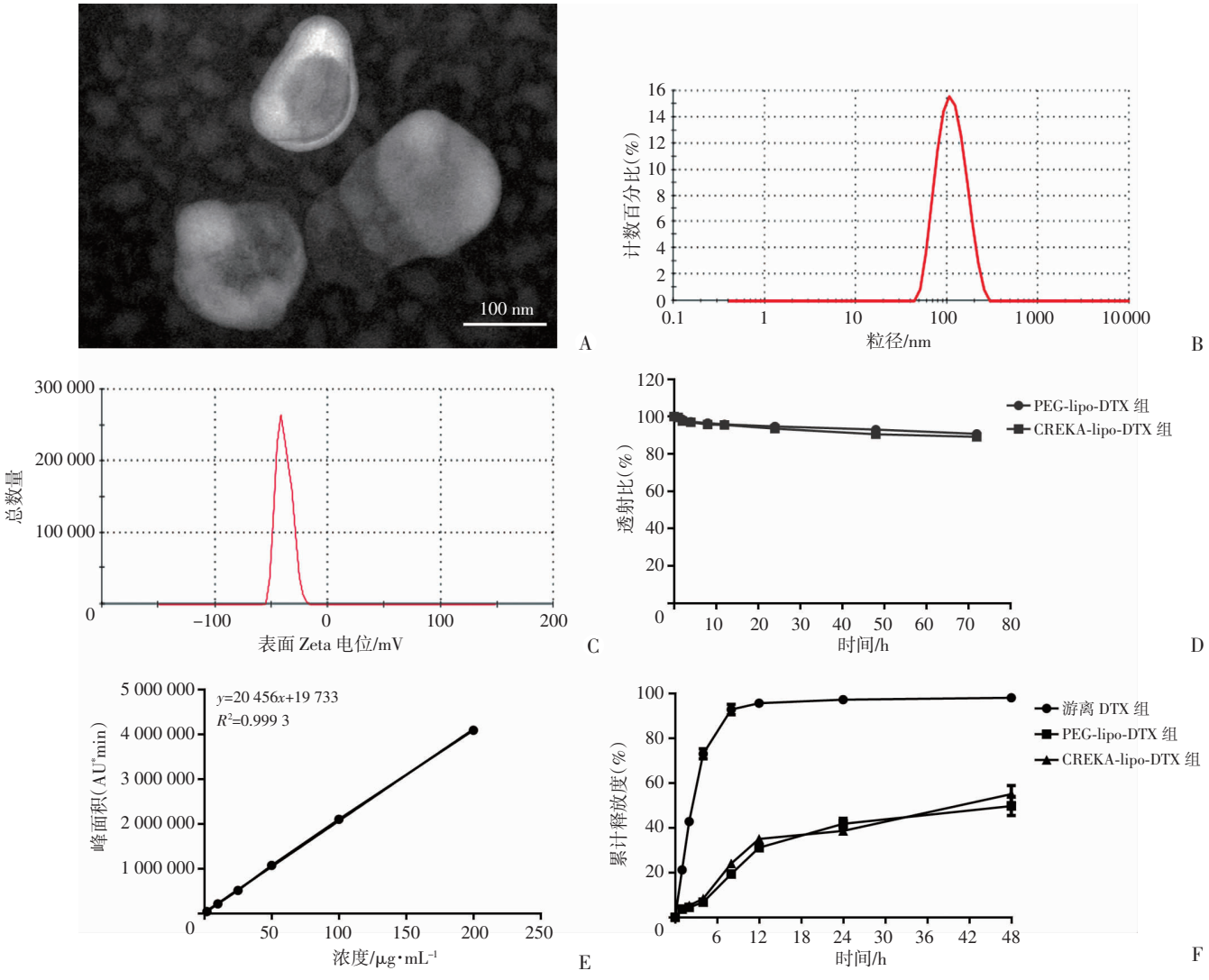
采用薄膜水化法成功制备出脂质体制剂,透射电镜可见 CREKA-lipo-DTX 类似圆球状结构,分布均匀,粒径约为 130 nm(图 2A)。粒径仪测得 CREKA-lipo-DTX 粒径为(130.37±1.44)nm,分布均匀,呈正态单峰分布,Zeta 电位为(-30.66±0.28)mV(图 2B、C)。各脂质体的粒径在 100~130 nm 之间,多分散系数(polydispersity index,PDI)在 0.2 左右,而且各种脂质体的 Zeta 电位均为负电位。纳米脂质体对 DTX 有较高的

包封率,CREKA-lipo-DTX 的包封率为(91.93±4.64)%,PEG-lipo-DTX 的包封率为(96.45±0.89)%(表 1)。脂质体稳定性检测发现,两种载药脂质体在 37 ℃孵育 72 h 后,透射比一直在 90%以上,没有明显变化(图 2D)。

采用高效液相色谱法建立 DTX 标准曲线,回归方程为 $y=20\,456x+19\,733$,$R^2=0.999\,3$,DTX 在 1~200 μg/mL 之间线性良好(图 2E)。考察 DTX 溶液在 37 ℃释放介质中稳定性良好,没有降解现象。对比各组释药性能可以发现,在释药 0~12 h,PEG-lipo-DTX 及 CREKA-lipo-DTX 组的累计释放均在 40%以下,而游离 DTX 组累计释放已经超过了 90%;在释药 12~48 h,PEG-lipo-DTX 及 CREKA-lipo-DTX 组的药物释放呈现缓慢释放阶段,且 CREKA 的修饰对载药脂质体的药物释放性能无明显影响($P>0.05$,图 2F)。

表 1　不同脂质体的粒径、PDI、Zeta 电位及包封率($\bar{x}\pm s$,$n=3$)

组别	粒径/nm	多分散系数	Zeta 电位/mV	包封率(%)
PEG-lipo 组	103.27±2.23	0.16±0.03	−31.81±0.33	−
CREKA-lipo 组	108.34±1.97	0.18±0.02	−27.49±0.48	−
PEG-lipo-DTX 组	120.70±2.43	0.22±0.01	−28.33±0.09	96.45±0.89
CREKA-lipo-DTX 组	130.37±1.44	0.24±0.03	−30.74±0.28	91.93±4.64



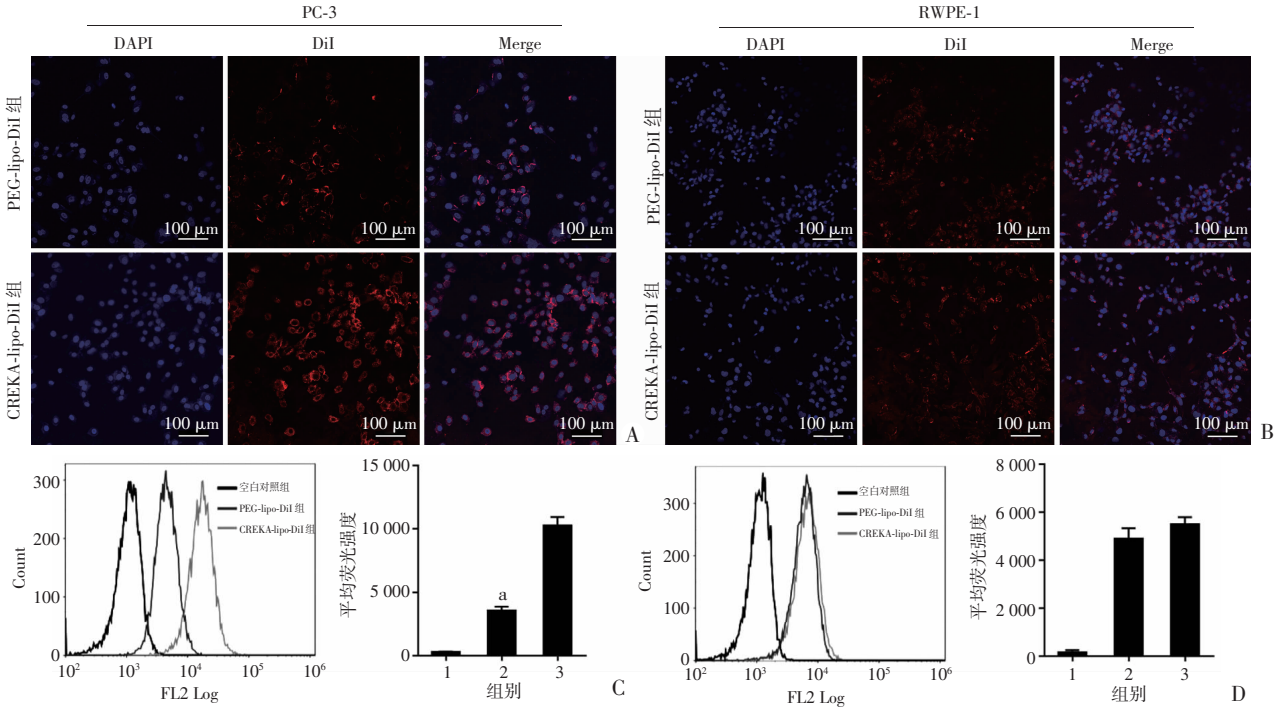
A:CREKA-lipo-DTX 透射电镜图;B:CREKA-lipo-DTX 粒径分布图;C:CREKA-lipo-DTX 的 Zeta 电位分布图;D:各载药脂质体在 50%FBS 中透射比变化($n=3$);E:DTX 的标准曲线($n=3$);F:各制剂体外释放药物的结果($n=3$)

图 2　脂质体的基本表征

2.3　体外细胞摄入实验

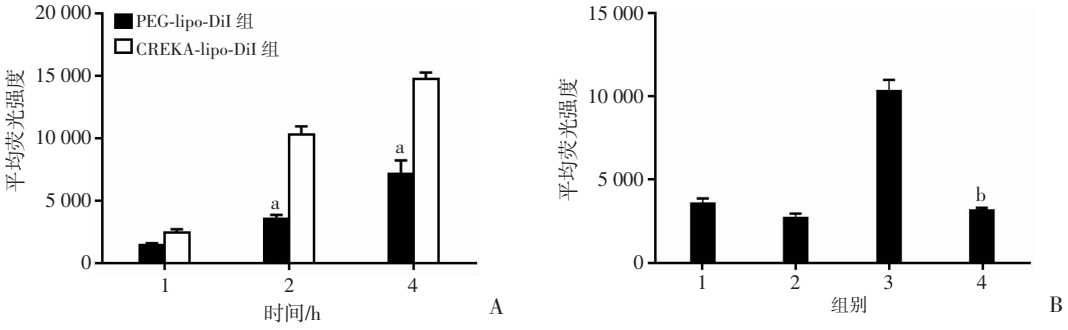
激光共聚焦显微镜观察可见,在相同孵育时间,PC-3 细胞中 CREKA 修饰的脂质体组(CREKA-lipo-DiI)细胞核周围与细胞膜之间的红色荧光信号明显多于非 CREKA 修饰的脂质体组(PEG-lipo-DiI),见图 3A;而在 RWPE-1 细胞中,CREKA-lipo-DiI 组与 PEG-lipo-DiI 组的红色荧光信号无明显差别(图 3B)。说明 CREKA 肽的修饰提高了 PC-3 细胞对脂质体的摄取,而对 RWPE-1 的摄取无明显影响。

为了进一步说明细胞对脂质体的摄取能力,采用流式细胞仪检测并分析细胞摄入脂质体后的平均荧光强度来定量分析细胞摄取能力。结果显示,在 PC-3 细胞中,CREKA-lipo-DiI 组的脂质体摄入量大约是 PEG-lipo-DiI 组的 3 倍(图 3C);而在 RWPE-1 细胞中,CREKA-lipo-DiI 组的脂质体摄入量只略高于 PEG-lipo-DiI 组,差别无统计学意义($P>0.05$,图 3D),与激光共聚焦显微镜观察结果是一致的。PC-3 细胞对脂质体的摄入随着时间的增加而增加,共孵育 1 h 时,CREKA-lipo-DiI 组的平均荧光强度与 PEG-lipo-DiI 组差异无统计学意义($P>0.05$);共孵育 2 h 时,CREKA-lipo-DiI 组的平均荧光强度显著高于 PEG-lipo-DiI 组($P<0.05$);共孵育 4 h 时,CREKA-lipo-DiI 组的平均荧光强度与 PEG-lipo-DiI 组的差异有统计学意义($P<0.05$,图 4A)。



A、B:分别为激光共聚焦显微镜观察 PC-3 细胞与 RWPE-1 细胞摄取脂质体结果;C、D:分别为流式细胞仪检测 PC-3 细胞和 RWPE-1 细胞摄取脂质体及平均荧光强度分析($n=3$)　1:空白对照组;2:PEG-lipo-DiI 组;3:CREKA-lipo-DiI 组;a:$P<0.05$,与 CREKA-lipo-DiI 组比较

图 3　激光共聚焦显微镜及流式细胞仪检测细胞摄取脂质体情况



A:流式细胞仪检测不同时间点细胞摄取情况　a:$P<0.05$,与同时间点 CREKA-lipo-DiI 组比较;B:加入游离 CREKA 肽后 PEG-lipo-DiI 组与 CREKA-lipo-DiI 组的摄取情况　1:PEG-lipo-DiI 组;2:PEG-lipo-DiI+CREKA 组;3:CREKA-lipo-DiI 组;4:CREKA-lipo-DiI+CREKA 组;b:$P<0.05$,与 CREKA-lipo-DiI 组比较

图 4　时间和游离 CREKA 肽对 PC-3 细胞脂质体摄入的影响($n=3$)

2.4 竞争性抑制实验

在进行脂质体摄取实验前加入过量游离 CREKA 肽与 PC-3 细胞共孵育,对比 CREKA-lipo-DiI 组与 PEG-lipo-DiI 组的抑制作用。结果显示,在加入游离 CREKA 肽后,CREKA-lipo-DiI 组的摄取减少具有统计学差异($P<0.05$),其摄取相当于加入游离 CREKA 肽前的 PEG-lipo-DiI 组,而 PEG-lipo-DiI 组的摄取减少无统计学差异($P>0.05$,图 4B)。表明 CREKA 肽修饰的脂质载体的细胞内吞是配体-受体介导的结果。

2.5 细胞毒性实验

CCK-8 实验结果显示,DTX 对 PC-3 细胞毒性作用具有浓度依赖性。CREKA-lipo-DTX 组、PEG-lipo-DTX 组、游离 DTX 组的 IC_{50} 值分别为(9.34±1.78)、(16.78±0.67)、(25.80±1.15) μg/mL。CREKA-lipo-DTX 的 IC_{50} 值显著低于 PEG-lipo-DTX 组($P<0.05$),表明 CREKA 的修饰提高了抗肿瘤效果。游离 DTX 组的 IC_{50} 值显著高于 CREKA-lipo-DTX 组和 PEG-lipo-DTX 组($P<0.05$,图 5A),表明载药脂质体具有较好的肿瘤杀伤效果。此外,还对空白脂质体的细胞毒性进行了评估,其细胞存活率一直接近 100%(图 5B),表明其对细胞的毒性作用可以忽略不计。

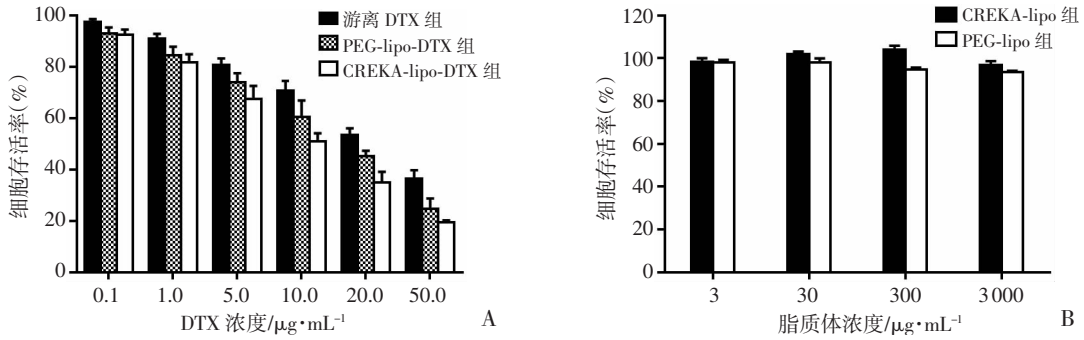
2.6 细胞凋亡实验

CREKA-lipo-DTX 组的诱导凋亡率(55.90±1.94)%显著高于其他组($P<0.05$),PEG-lipo-DTX 组的凋亡率[(29.70±1.30)%]也高于游离 DTX 组[(19.41±1.70)%,$P<0.05$,图 6A、B]。另外,空白脂质体组 PEG-lipo 和 CREKA-lipo 的凋亡率分别为(4.40±1.20)%、(4.26±0.51)%,与空白对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$),表明空白脂质体对细胞凋亡诱导基本无影响,与前面的细胞毒性检测结果一致。

3 讨论

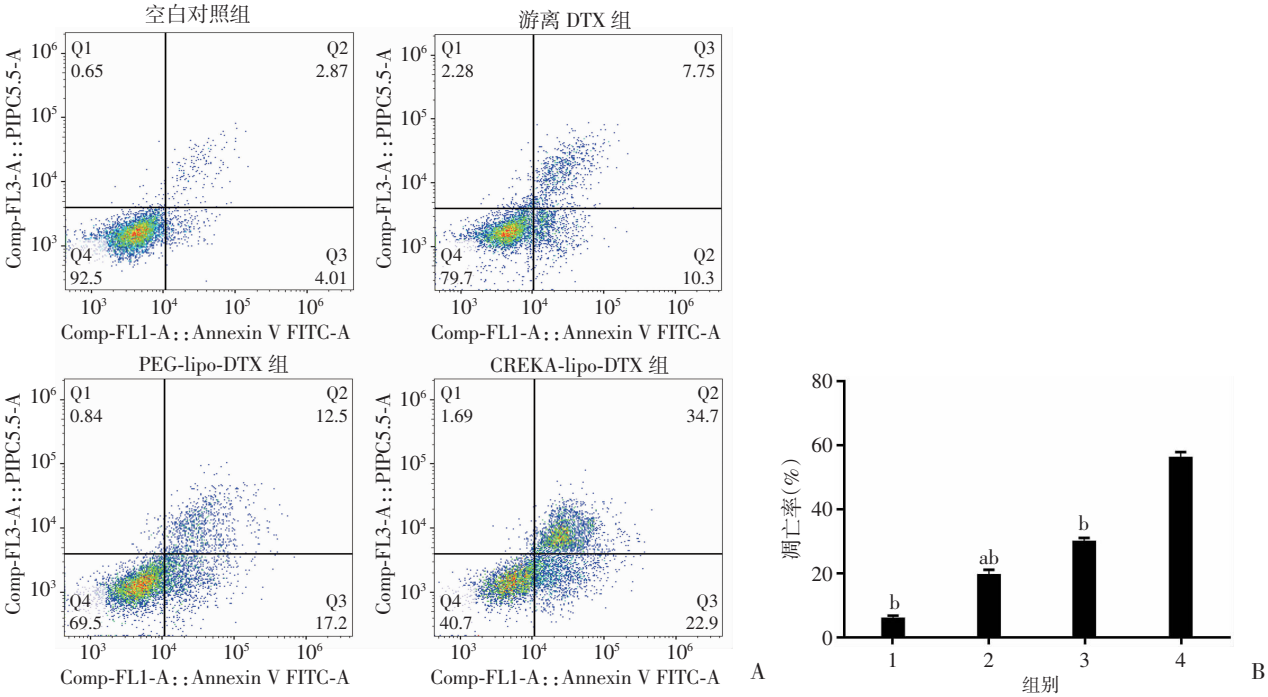
对于常规化疗来说,由于非特异性和系统性的药物释放常导致药物快速被清除,需要给予最高耐受剂量的药物。这是不经济的,并且通常表现出高毒性。而肿瘤靶向治疗可以区分正常细胞和肿瘤细胞之间的细微差异,通常比其他常规治疗更有效,并且表现出较少的副作用[14]。脂质体是一种新颖的药物运载工具,通过它可以将药物输送到肿瘤细胞中,同时最大限度地减少药物泄漏到正常细胞中,其与特异性肿瘤生物标记配体的结合可以达到更高效的靶向治疗效果[15-16]。CREKA 肽是一种肿瘤靶向肽,可以与 FN 及 FN 的复合物结合从而特异性定位于肿瘤部位,已被广泛应用于前列腺癌的靶向诊断与治疗[17-18]。

本研究采用脂质体作为纳米载体,CREKA 肽作为靶向配体,并装载 DTX 作为治疗药物,制备一种靶向于前列腺癌细胞的药物传递系统。制备出的脂质体粒径分布均匀,且小于 200 nm。这种粒径的脂质体更易于利用肿瘤部位的高通透性和滞留效应在肿瘤部位进行积累从而杀伤肿瘤细胞[19]。对于药物载体系统而言,控制药物释放一直是一个需要特别研究的问题。本实验制备的靶向载药系统具有良好的稳定性,有助于脂质体达到肿瘤部位释放药物,而且制备的脂质体包封率高,可以很好地满足临床需要。通过激光共聚焦显微镜观察发现,在 PC-3 细胞中,CREKA-lipo-DiI 组脂质体的摄入明显多于 PEG-lipo-DiI 组,而在 RWPE-1 细胞中,两组无明显差别;同时流式细胞术分析也得出相同的结果。表明 CREKA 的修饰提高了 PC-3 细胞对脂质体的摄取量,而对 RWPE-1 没影响,证实了 CREKA-lipo-DiI 对 PC-3 细胞的靶向性。随后竞争抑制



A:修饰前后空白脂质体对 PC-3 细胞存活率的影响;B:载药脂质体对 PC-3 细胞存活率的影响

图 5 各脂质体制剂对 PC-3 细胞的毒性作用($n=3$)



A:各处理组诱导 PC-3 细胞凋亡的流式分析;B:各处理组凋亡率的比较($\bar{x}\pm s$,$n=3$) 1:空白对照组;2:游离 DTX 组;3:PEG-lipo-DTX 组;4:CREKA-lipo-DTX 组;a:$P<0.05$,与 PEG-lipo-DTX 组比较;b:$P<0.05$,与 CREKA-lipo-DTX 组比较

图 6 流式细胞仪检测 PC-3 细胞凋亡结果

实验、流式细胞术分析显示,过量的 CREKA 肽提前与 PC-3 细胞的受体相结合,阻断了 CREKA-lipo-DiI 通过 CREKA 肽与受体结合介导的内吞作用,从而导致 CREKA-lipo-DiI 的摄取量显著降低。这表明 CREKA 肽修饰的脂质载体的细胞内吞是 CREKA 配体与其受体介导的结果。采用细胞毒性实验和凋亡实验观察该靶向载体体外抗肿瘤效应,结果显示,相较于其他组,CREKA-lipo-DTX 组的细胞毒性作用最大。这是由于 CREKA-lipo-DTX 的靶向作用促进了 DTX 的递送,提示细胞内药物水平与肿瘤抑制效果存在相关性。此外,还对空白脂质体的细胞毒性进行了评估,其细胞存活率一直在 95%以上,表明其对细胞的毒性作用可以忽略不计。接下来又评估了 PC-3 细胞的诱导凋亡结果,CREKA-lipo-DTX 组诱导凋亡作用最强,作为阳性对照,游离 DTX 的凋亡率也远小于两载药脂质体组,与细胞毒性结果基本一致。因此,基于 CREKA 肽修饰脂质体的给药系统对前列腺癌细胞具有特异靶向性及高效的杀伤效应。

综上所述,本研究成功制备了一种靶向于前列腺癌的脂质载药系统。该系统通过特异性靶向于前列腺癌,可以最大程度将化疗药物递送到肿瘤部位。这不仅能够提高化疗药物的治疗效率,而且可以降低化疗药物所带来的严重副作用,对改善肿瘤治疗具有重要的意义。这将为进一步开发前列腺癌的靶向治疗制剂提供新的可能性。

参考文献:

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2020[J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(1): 7-30. DOI:10.3322/caac.21590.

[2] KAHN B, COLLAZO J, KYPRIANOU N. Androgen receptor as a driver of therapeutic resistance in advanced prostate cancer [J]. Int J Biol Sci, 2014, 10(6): 588-595. DOI: 10.7150/ijbs.8671.

[3] BRAVE M, WEINSTOCK C, BREWER J R, *et al*. An FDA review of drug development in non-metastatic castration-resistant prostate cancer[J]. Clin Cancer Res, 2020, 26(18): 4717-4722. DOI:10.1158/1078-0432.ccr-19-3835.

[4] HWANG C. Overcoming docetaxel resistance in prostate cancer: a perspective review[J]. Ther Adv Med Oncol, 2012, 4(6): 329-340. DOI:10.1177/1758834012449685.

[5] ALPAJARO S I R, HARRIS J A K, EVANS C P. Non-metastatic castration resistant prostate cancer: a review of current and emerging medical therapies[J]. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2019, 22(1): 16-23. DOI:10.1038/s41391-018-0078-1.

[6] BAHRAMI B,HOJJAT-FARSANGI M,MOHAMMADI H,*et al*. Nanoparticles and targeted drug delivery in cancer therapy[J]. Immunol Lett, 2017, 190: 64-83. DOI:10.1016/j.imlet.2017.07.015.

[7] KUANG H H, KU S H, KOKKOLI E. The design of peptide-amphiphiles as functional ligands for liposomal anticancer drug and gene delivery[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2017, 110/111: 80-101. DOI:10.1016/j.addr.2016.08.005.

[8] BIFFI S, VOLTAN R, BORTOT B, *et al*. Actively targeted nanocarriers for drug delivery to cancer cells[J]. Expert Opin Drug Deliv, 2019, 16(5): 481-496. DOI: 10.1080/17425247.2019.1604679.

[9] WIERZBICKA-PATYNOWSKI I, SCHWARZBAUER J E. The ins and outs of fibronectin matrix assembly[J]. J Cell Sci, 2003, 116(Pt 16): 3269-3276. DOI:10.1242/jcs.00670.

[10] HAN Z, LU Z R. Targeting fibronectin for cancer imaging and therapy[J]. J Mater Chem B, 2017, 5(4): 639-654. DOI:10.1039/C6TB02008A.

[11] JIANG K J, SONG X, YANG L Q, *et al*. Enhanced antitumor and anti-metastasis efficacy against aggressive breast cancer with a fibronectin-targeting liposomal doxorubicin[J]. J Control Release, 2018, 271: 21-30. DOI:10.1016/j.jconrel.2017.12.026.

[12] ZHAO J J, ZHANG B, SHEN S, *et al*. CREKA peptide-conjugated dendrimer nanoparticles for glioblastoma multiforme delivery[J]. J Colloid Interface Sci, 2015, 450: 396-403. DOI:10.1016/j.jcis.2015.03.019.

[13] NIU Y, ALTUWAIJRI S, LAI K P, *et al*. Androgen receptor is a tumor suppressor and proliferator in prostate cancer[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(34): 12182-12187. DOI:10.1073/pnas.0804700105.

[14] DANHIER F, FERON O, PRÉAT V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery[J]. J Control Release, 2010, 148(2): 135-146. DOI:10.1016/j.jconrel.2010.08.027.

[15] WANG L Y, QU M K, HUANG S Q, *et al*. A novel α-enolase-targeted drug delivery system for high efficacy prostate cancer therapy[J]. Nanoscale, 2018, 10(28): 13673-13683. DOI:10.1039/c8nr03297a.

[16] XIANG B, DONG D W, SHI N Q, *et al*. PSA-responsive and PSMA-mediated multifunctional liposomes for targeted therapy of prostate cancer[J]. Biomaterials, 2013, 34(28): 6976-6991. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.05.055.

[17] AGEMY L, SUGAHARA K N, KOTAMRAJU V R, *et al*. Nanoparticle-induced vascular blockade in human prostate cancer[J]. Blood, 2010, 116(15): 2847-2856. DOI:10.1182/blood-2010-03-274258.

[18] WU X M, YU G P, LINDNER D, *et al*. Peptide targeted high-resolution molecular imaging of prostate cancer with MRI[J]. Am J Nucl Med Mol Imaging, 2014, 4(6): 525-536.

[19] RAJ S, KHURANA S, CHOUDHARI R, *et al*. Specific targeting cancer cells with nanoparticles and drug delivery in cancer therapy[J]. Semin Cancer Biol, 2019. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.11.002.

(收稿:2020-05-29;修回:2020-07-31)

(编辑 汪勤俭)

(上接2080页)

[14] 周玫余,袁帅,向颖,等.长链非编码RNA SFTA1P在非小细胞肺癌组织中的表达和细胞功能研究[J].中华疾病控制杂志,2020,24(3):341-347. DOI:10.16462/j.cnki.zhjbkz.2020.03.018.
ZHOU M Y, YUAN S, XIANG Y, *et al*. Expression and cellular function of long non-coding RNA SFTA1P in non-small cell lung cancer[J]. Chin J Dis Control Prev, 2020, 24(3):341-347. DOI:10.16462/j.cnki.zhjbkz.2020.03.018.

[15] ZHANG H, XIONG Y Q, XIA R, *et al*. The pseudogene-derived long noncoding RNA SFTA1P is down-regulated and suppresses cell migration and invasion in lung adenocarcinoma[J]. Tumour Biol, 2017, 39(2): 1010428317691418. DOI:10.1177/1010428317691418.

[16] ZHOU Z R, WANG W W, LI Y, *et al*. In-depth mining of clinical data: the construction of clinical prediction model with R[J]. Ann Transl Med, 2019, 7(23): 796. DOI:10.21037/atm.2019.08.63.

[17] PAN H, SHI X S, XIAO D K, *et al*. Nomogram prediction for the survival of the patients with small cell lung cancer[J]. J Thorac Dis, 2017, 9(3): 507-518. DOI: 10.21037/jtd.2017.03.121.

[18] IASONOS A, SCHRAG D, RAJ G V, *et al*. How to build and interpret a nomogram for cancer prognosis[J]. J Clin Oncol, 2008, 26(8): 1364-1370. DOI: 10.1200/JCO.2007.12.9791.

[19] LIANG W H, ZHANG L, JIANG G N, *et al*. Development and validation of a nomogram for predicting survival in patients with resected non-small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2015, 33(8): 861-869. DOI: 10.1200/JCO.2014.56.6661.

[20] WANG T, LU R, LAI S, *et al*. Development and validation of a nomogram prognostic model for patients with advanced non-small-cell lung cancer[J]. Cancer Inform, 2019, 18: 1176935119837547. DOI:10.1177/1176935119837547.

(收稿:2020-05-29;修回:2020-08-13)

(编辑 张 维)