肿瘤靶向性药物载体叶酸-淀粉纳米颗粒的研制与应用

肖苏尧 童春义 刘选明* 俞丹密 刘巧玲 薛昌刚 唐冬英 赵李剑

(湖南大学生命科学与技术研究院, 化学生物传感与计量学国家重点实验室, 长沙 410082. * 联系人, E-mail: sw_xml@hnu.cn)

摘要 用反相微乳液法和交联法制备了带负电的交联淀粉纳米颗粒(StNP), 经过叶酸活性物质(FA-PEG-NH_2)修饰, 成功制备了叶酸-淀粉纳米颗粒(FA-PEG/StNP). 原子力显微镜和 Zeta-Sizer 粒度仪检测表明所得颗粒的平均直径约为 130 nm. FA-PEG/StNP 与抗癌药物多柔比星(DOX)经渗透结合, 获得了载药叶酸-淀粉纳米颗粒, 用紫外分光光度法检测发现纳米颗粒结合 DOX 的饱和量为 28 μg/mg, 并对药物 DOX 具有明显的缓释效果. 经过与肝癌细胞 BEL7404 共培养实验发现: 载药 FA-PEG/StNP 和载药 StNP 的半致死浓度 LC_{50} 比 DOX 的半致死浓度明显提高, 表明 FA-PEG/StNP 和 StNP 都能显著降低 DOX 的细胞毒性. 而含相同量药物 DOX 的载药 FA-PEG/StNP 和载药 StNP 与肝癌细胞 BEL7404 共培养发现: 前者的细胞致死率是后者的 3 倍, 结果证实了修饰在颗粒上的 FA 能显著提高颗粒对肝癌细胞的靶向作用, 使更多药物作用于肿瘤细胞, 提高了作用效果. 所制备的叶酸-淀粉纳米颗粒具有药物缓释、靶向识别、降低毒副作用的特点, 可以作为肿瘤靶向性药物载体.

关键词 叶酸受体 肿瘤细胞 靶向药物载体 淀粉纳米颗粒

药物的低毒和高效对疾病的临床治疗十分重要. 为此, 近年来, 药物靶向传递的研究越来越受到研究者的重视. 自从发现叶酸受体在绝大多数恶性肿瘤细胞膜内有大量表达而正常细胞很少有表达以来, 叶酸/叶酸受体介导靶向传递的研究成为该领域的热点问题[1]. 叶酸是小分子量维生素, 相对于单分子抗体等蛋白质, 具有结构稳定、价格低廉、无免疫原性等特点, 而且叶酸与叶酸受体结合力强, 能被高效介导进入肿瘤细胞, 是一种很有应用价值的靶向物质. 结合到药物缓释的要求, 人们又将叶酸通过化学键合连接到药物载体上, 如脂质体[2,3]、多聚物[4,5]、蛋白质[6], 以及它们制成的纳米颗粒[7~9], 这样就能有效地同时实现抗肿瘤药物对肿瘤细胞的靶向识别和药物缓释, 避免药物对正常细胞的伤害, 提高肿瘤的治疗效果.

淀粉作为一种天然生物材料, 与其他很多药物材料相比, 具有很好的生物相容性、无免疫原性, 在空气中很稳定, 与大多数药物之间不发生作用, 在体内的降解速度较快, 其水解产物为还原糖, 易在体内消化, 而且廉价易得, 长期以来就是医药领域中最常用的药物填充剂. 近年来发现淀粉经过物理或化学变性还可以获得更多的特性, 可以作为药物载体材料广泛应用于医药领域[10,11]. 作者已成功研制出阴离子交联淀粉纳米颗粒[12]. 本文在原有工作基础上进一步进行淀粉纳米颗粒的叶酸生物学修饰, 研制具有肿瘤靶向的叶酸-淀粉纳米颗粒, 并对制备的叶酸-淀粉纳米颗粒在药物缓释、靶向性识别、降低药物毒副作用等方面进行探讨.

1 材料与方法

1.1 材料

试剂: 叶酸(folate, FA)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、二环己基碳二亚胺(DCC)、异硫氰酸荧光素(FITC)、聚乙二醇二氨(PEG-$(NH_2)_2$, MW3350)和盐酸多柔比星(Doxorubicin · HCl, DOX)均购自 Sigma 公司, 可溶性淀粉等其他试剂均为国产分析纯.

细胞材料: 肝癌细胞 BEL7404, 本实验室提供.

仪器: SPI-400 型原子力显微镜(日本精工), Zeta-Sizer 粒度仪(英国 Malvern 公司), UV-1600 型紫外可见分光光度计(北京瑞利公司), Axiovert 200 Zeiss 荧光显微镜(德国 Carl Zeiss 公司), Hitachi F-2500 型荧光分光光度计, MK3 酶标仪(美国, Thermo Electron), 19HW-1 型恒温磁力搅拌器(中国江苏), SCIENTZ-ⅡD 超声波细胞粉碎机(中国宁波新芝).

1.2 方法

(ⅰ) 淀粉纳米颗粒的制备. 参照文献[12], 略做修改, 制备方法如下: 称取 1 g 可溶性淀粉配成 8%的水溶液, 沸水浴中加热水解, 直到溶液澄清, 室温放置冷却. 量取甲苯和氯仿以 3∶1 的体积比混合, 加入占总体积 2%的表面活性剂 SPan80, 以 600

r/min 的速度搅拌混匀, 形成油相. 取淀粉水解液加入油相中($V_{油}/V_{水}$=15/1), 继续搅拌一定时间至形成微小的乳液. 加入占淀粉质量 0.05%的交联剂 $POCl_3$, 继续搅拌反应 50 min, 用丙酮和乙醇洗涤乳液 3 次, 冷冻干燥, 即可得到带负电的交联淀粉纳米颗粒.

(ⅱ) FA-PEG-NH_2 的制备. FA-PEG-NH_2 的合成原理如图 1 所示, 叶酸的羧基被 DCC 和 NHS 活化后与 PEG-$(NH_2)_2$ 的一个氨基结合, 得到 FA-PEG-NH_2. 具体方法如下: 叶酸 13.2 mg 叶酸溶于 1 mL DMSO, 搅拌下加入一定量的 DCC 和 NHS, 加入 100 mg PEG-$(NH_2)_2$, 室温反应 4 h. 加入 5 mL 水, 过滤除去不溶物, 上清液冷冻干燥, 乙醚洗涤干燥物, 得到浅黄色固体 FA-PEG-NH_2. 红外分光光度法检测所得固体产物.

(ⅲ) FA-PEG/StNP 的制备. 称取 1 mg 淀粉纳米颗粒溶于 1 mL 去离子水中, 超声分散, 加入 0.1 mg FA-PEG-NH_2, 通过氨基与淀粉颗粒结合, 常温共育 3 h, 离心洗涤, 沉淀重悬于 PBS (pH 7.4), 得到 FA-PEG/StNP. 1 mg FA-PEG/StNP 悬浮于双蒸水中, 用α-淀粉酶消化除去淀粉, 反应条件为 37℃下振摇 2 h, 再用紫外可见分光光度计检测消化液中叶酸的含量, 检测波长为 363 nm, 其他物质在该波长处无吸收. 以 FA-PEG-NH_2 的水溶液做标准曲线.

(ⅳ) FA-PEG/StNP 的原子力显微镜检测. FA-PEG/StNP 配制成 1 mg/mL 的水溶液, 用原子力显微镜和 Zeta-Sizer 电位仪检测颗粒的形态、大小和分布.

(ⅴ) FA-PEG/StNP 装载抗癌药物多柔比星(DOX). 称取 10 mg FA-PEG/StNP 溶于 5 mL 去离子水中, 在溶液中再加入一定量除去盐酸的 DOX, 使得溶液中 DOX 的浓度分别为 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 1.5, 2.0 mg/mL, 室温下振荡共孵育一定时间, 离心洗涤, 沉淀真空干燥, 得到粉末状载药纳米颗粒. 称取 1 mg 载药纳米颗粒悬浮于双蒸水中, 用淀粉酶消化掉淀粉, 反应条件为 37℃下振摇 2 h, 用紫外可见分光光度计检测消化液中 DOX 的量, 检测波长为 480 nm, 淀粉和淀粉酶在该波长处无吸收. 以纯 DOX 的水溶液做标准曲线.

(ⅵ) 药物释放检测. 10 mg 载药 FA-PEG/StNP 复合物溶于 PBS (pH 7.4)中, 装于透析袋中, 50 mL PBS (pH 7.4)为透析液, 于 37℃下透析释放, 100 r/min 振荡, 每隔一定时间取出 5 mL 透析液, 再加入 5 mL PBS 以维持透析液的体积. 用紫外可见分光光度计检测透析液中 DOX 的量, 检测波长为 480 nm, 以纯 DOX 的 PBS 溶液做标准曲线.

(ⅶ) FA-PEG/StNP 与细胞共培养. 选对数生长期的肝癌细胞和正常肝细胞, 用 0.25%胰蛋白酶消化, 以 30000 个细胞/孔的密度接种于放置了干净灭菌盖玻片的细胞培养皿(Costar, Ø35 mm)内, 加入 1.5 mL 完全培养基, 在 5% CO_2 培养箱中 37℃培养 24 h. 在培养皿中加入 0.2 mg 修饰了荧光物质 FITC 的 FA-PEG/StNP, 共培养 4 h, 用 D-hanks 洗涤细胞 2 次, 取出皿中的盖玻片, 用 95%的乙醇溶液固定盖玻片上的细胞. 用荧光显微镜检测细胞对荧光纳米颗粒的吞噬情况. 在另一些培养细胞的培养皿中先加入 10 μg 纯化的叶酸, 共培养 4 h, 去除培养液, 用 D-hanks 洗涤细胞 2 次, 再加入修饰了荧光物质 FITC 的 FA-PEG/StNP 共培养, 处理方式同上. 以培养皿中加入修饰了 FITC 的 StNP 作为对照.

(ⅷ) 载药颗粒对肝癌细胞的抑制作用. 选对数生长期的肝癌细胞, 用 0.25%胰蛋白酶消化, 以 2000 个细胞/孔的浓度接种于 96 孔细胞培养板(Costar)内, 在 5% CO_2 培养箱中 37℃培养 24 h. DOX、载 DOX 的 StNP 和载 DOX 的 FA-PEG/StNP 都溶于 PBS (pH 7.4)中, 以一定的细胞浓度梯度加入到接有细胞的 96 孔培养板中, 在 5% CO_2 37℃培养箱中培养 24 h, 用 MTT 法检测细胞的存活率, 得出 3 种药剂对肝癌细胞作用 24 h 的半致死量浓度.

取载有相同量药物 DOX 的载药 StNP 和载药 FA-PEG/StNP, 加入到接有细胞的 96 孔培养板中, 在 5% CO_2 37℃培养箱中培养 24 h, 用 MTT 法检测药物对细胞的致死率.

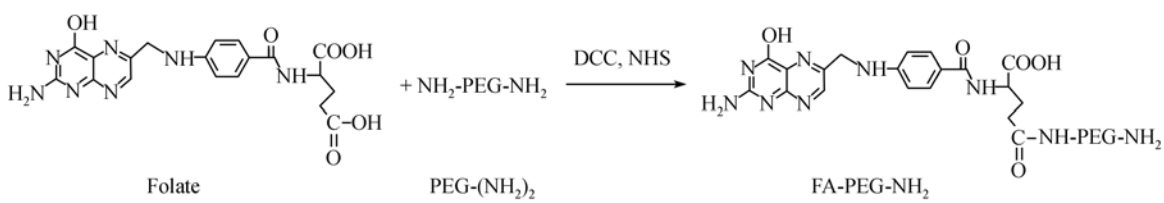

图 1 FA-PEG-NH_2 的合成原理图

2　结果与讨论

2.1　FA-PEG-NH_2 的红外光谱检测

从图 1 可知，若叶酸与 PEG-$(NH_2)_2$ 连接成功，就会在 PEG-$(NH_2)_2$ 上引入苯环. 由图 2 可见，相比 PEG-$(NH_2)_2$ 的红外光谱图，FA-PEG-NH_2 的红外图上出现苯环的特征峰(1606 cm^{-1})，说明成功制备了 FA-PEG-NH_2.

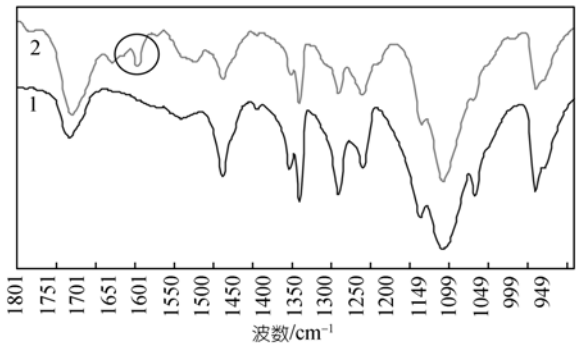

图 2　FA-PEG-NH_2 的红外光谱检测图
1, PEG-$(NH_2)_2$; 2, FA-PEG-NH_2

2.2　StNP 和 FA-PEG/StNP 的表征

用原子力显微镜和 Zeta-Sizer 分析仪检测 StNP 和 FA-PEG/StNP. StNP 的颗粒分散性好，形状规则，颗粒的平均直径约为 50 nm，Zeta 电位为–12 mV(未给出图). FA-PEG/StNP 的颗粒直径主要分布于 70~200 nm 之间，平均颗粒直径约为 130 nm(图 3 所示).

2.3　FA-PEG/StNP 中叶酸的量

紫外可见分光光度计检测 FA-PEG/StNP 中的叶酸，检测波长为 363 nm，得到叶酸的修饰量为 0.8 μg/mg. 由实验结果可知，本研究方法能成功地在淀粉纳米颗粒表面修饰上叶酸.

2.4　FA-PEG/StNP 装载抗癌药物 DOX

FA-PEG/StNP 的水溶液浓度为 2 mg/mL, DOX 在反应液中的浓度分别为 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 1.5, 2.0 mg/mL，纳米颗粒与 DOX 共孵育 6 h，离心洗涤，真空干燥. 载药颗粒溶于双蒸水中，用α-淀粉酶消化掉淀粉，紫外可见分光光度计检测消化液中 DOX 的量，结果如图 4 所示. 从图 4 发现当 DOX 的浓度高于 1.0 mg/mL 时，纳米颗粒装载 DOX 的量达到饱和，装载量约为 28 μg/mg.

2.5　载药 FA-PEG/StNP 中 DOX 的释放

载药 FA-PEG/StNP 溶于 PBS(pH 7.4)中，并以 PBS(pH 7.4)为透析液, 37℃下 100 r/min 振荡，紫外可见分光光度计检测，所得结果见图 5. 由图 5 可见，复合物在前 1 h 的药物释放量为 29%，原因是在透析早期由于吸附在颗粒表面的 DOX 较易释放，所以在曲线上表现出一个突释过程. 透析 10 h 后, DOX 释放量达到 50%. 48 h 后 DOX 释放 75%，此时复合物中还载有 25%的药物. 以 DOX 溶液为对照, DOX 在透析 6 h 很快就释放完了. 结果表明 FA-PEG/StNP 对 DOX 具有很好的缓释作用.

2.6　FA-PEG/StNP 对肝癌细胞的靶向作用

修饰了荧光物质 FITC 的 FA-PEG/StNP 与肝癌细胞共培养 4 h 后，用荧光显微镜观察并摄像，结果见图 6. 从图 6 可见，肝癌细胞摄取的荧光颗粒数量

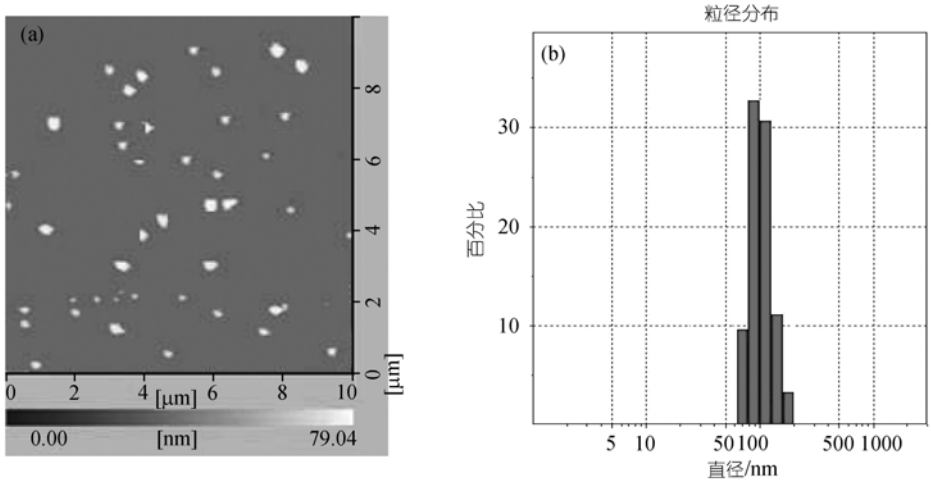

图 3　FA-PEG/StNP 的颗粒分布图

(a) AFM 检测图, (b) Zeta-Sizer 检测图. 用于检测的复合物浓度为 1 mg/mL

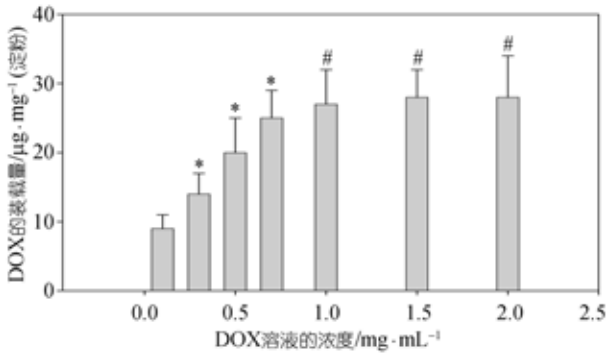

图 4 不同药物浓度下淀粉纳米颗粒装载 DOX 的量

误差棒由标准误差 S 得到, 其中 $n = 4$. *, $P < 0.01$, 有显著性差异; #, $P > 0.05$, 表明后三组之间无显著性差异

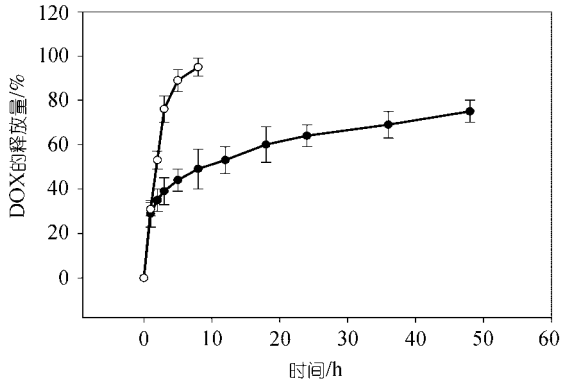

图 5 载药颗粒中 DOX 的释放曲线和 DOX 的释放曲线

实心点线为载药 FA-PEG/StNP 复合物的释放曲线, 空心点线为 DOX 溶液的释放曲线. 误差棒由标准误差 S 得到, 其中 $n = 3$

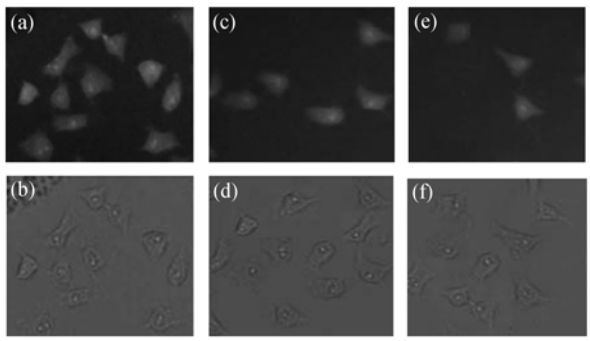

图 6 肝癌细胞对荧光颗粒的摄取

(a) FITC 修饰的 FA-PEG/StNP 作用于肝癌细胞; (c) FITC 修饰的 FA-PEG/StNP 作用于正常细胞; (e) FITC 修饰的 FA-PEG/StNP+游离叶酸作用于肝癌细胞. (b), (d), (f)为(a), (c), (e)对应的明视图

多(图 6(a)和(b)), 而正常肝细胞对荧光颗粒的摄取较少(图 6(c)和(d)), 在培养基中加了游离叶酸后, 肝癌细胞对荧光颗粒的摄取量又明显降低(图 6(e)和(f)). 结果表明: 通过叶酸受体介导可以显著提高肝癌细胞对 FA-PEG/StNP 的吞噬能力, 培养基中加入游离叶酸后, 由于游离叶酸优先结合了肿瘤细胞表面的部分叶酸受体, 从而降低了肿瘤细胞对荧光颗粒的吞噬能力.

用荧光分光光度计检测细胞破碎液的荧光强度实验进一步证实了 FA-PEG/StNP 对肝癌细胞的靶向作用. 取上述相同量共培养的细胞用 TritonX100-PBS 缓冲溶液破碎, 检测结果如图 7 所示. 结果发现与 FA-PEG/StNP 共培养的细胞液荧光强度约为对照液荧光强度的 20 倍. MTT 实验表明 1, 2, 3 实验组的细胞量和细胞活性大体相当.

载体纳米颗粒对肝癌细胞药物 DOX 的半致死浓度影响. 以 5000 个/10 μL 的浓度接种于 96 孔细胞培养板内, 在 5% CO_2 培养箱中 37℃培养 24 h. 加入不同量的 DOX, StNP/DOX 和载药 FA-PEG/StNP 的 PBS(pH 7.4)溶液, 在 5% CO_2 培养箱中 37℃培养 24 h, 用 MTT 法检测细胞的存活率, 结果见表 1. 从表 1 可知, DOX, 载药 StNP 和载药 FA-PEG/StNP 的半致死浓度分别为 5×10^{-5}, 8.4×10^{-4} 和 2.6×10^{-4} mol/L(以纯 DOX 在培养基中的终浓度计), 其中载药 StNP 的半致死浓度约为 DOX 的 17 倍, 表明结合淀粉纳米颗粒载体降低了抗癌药物 DOX 的细胞毒性, 载药

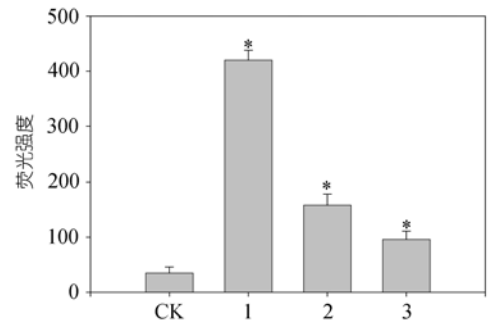

图 7 肝癌细胞摄取荧光颗粒的定量检测

CK, 对照; 1, FITC 修饰的 FA-PEG/StNP 作用于肝癌细胞; 2, FITC 修饰的 FA-PEG/StNP 作用于正常细胞; 3, FITC 修饰的 FA-PEG/StNP+游离叶酸作用于肝癌细胞. 误差棒由标准误差 S 得到, 其中 $n = 3$. *, $P < 0.01$, 表明三个实验组与对照之间具有显著性差异

表 1 DOX 和不同载药颗粒对肝癌细胞 BEL7404 的 DOX 半致死浓度的影响

DOX 或载药颗粒	半致死浓度 LC_{50}(以 DOX 终浓度计)
DOX	5×10^{-5} mol/L

载药 StNP	8.4×10^{-4} mol/L
载药 FA-PEG/StNP	2.6×10^{-4} mol/L

FA-PEG/StNP 的半致死浓度较载药 StNP 的低，可能是因为载药 FA-PEG/StNP 复合物表面修饰的叶酸与肿瘤细胞表面叶酸受体结合，介导颗粒进入细胞，从而更有效地抑制肿瘤细胞生长.

此外，我们进行了不同载药颗粒对肝癌细胞 BEL7404 的致死率的影响实验：在接了肝癌细胞的 96 孔细胞培养板中加入一定量的 StNP, FA-PEG/StNP, 载药 StNP, 载药 FA-PEG/StNP 和载药 FA-PEG/StNP+游离 FA，培养 24 h 后，用 MTT 法检测得到细胞的致死率，结果见图 8. 由图 8 可知, StNP 与 FA-PEG/StNP 两种颗粒的细胞致死率都很低，载药 FA-PEG-StNP 的致死率最高，约为载药 StNP 的 1 倍，而载药 FA-PEG/StNP+FA 的致死率则与载药 StNP 的相当. 结果进一步证实说明这两种纳米颗粒的细胞毒性低，而载药 FA-PEG/StNP 中的 FA 能够作为靶向物质有效地介导颗粒进入肝癌细胞.

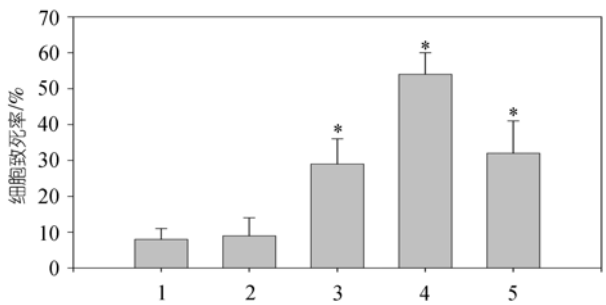

图 8　不同体系对肝癌细胞 BEL7404 的致死率的影响

1, StNP; 2, FA-PEG-StNP; 3, 载药 StNP; 4, 载药 FA-PEG/StNP; 5, 载药 FA-PEG/StNP+FA. 误差棒由标准误差 S 得到，其中 $n = 3$. *, $P < 0.01$，表明 3, 4, 5 实验组与对照之间具有显著性差异

3　结论

在我们已建立的淀粉纳米颗粒的制备基础上，通过靶向物质的生物学修饰进一步制备了可应用于医药的 FA-PEG/StNP 纳米药物载体. 该载体通过电性结合与物理包覆，可高效装载抗癌药物多柔比星(DOX)，并对 DOX 具有缓释性. 制备的 FA-PEG/StNP 药物载体作用于肝癌细胞 BEL7404，具有明显的靶向识别性，同时降低了药物的毒副作用. 结果表明修饰了叶酸的淀粉纳米颗粒可以作为一种潜在的可生物降解、具有肿瘤细胞靶向性、可控释的药物传递系统.

有研究表明，颗粒越大，其载药量越大，药物的释放则相应减慢. 我们还需要对所制备的颗粒的大小与载药量和药物释放之间的关系进行进一步的研究. 另外，淀粉纳米颗粒究竟结合多少叶酸，才能达到最佳靶向效果；靶向载体在体外与在体内的靶向效果是否一致，这些都需要深入探讨.

致谢　本工作为湖南省重点科技项目(批准号: 03NKY1001).

参　考　文　献

1 Christopher P L, Philip S L. Delivery of macromolecules into living cells: a method that exploits folate receptor endocytosis. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 5572－5576

2 Justin M S, Ananth A, Ravi V B. Controlled targeting of liposomal doxorubicin via the folate receptor in vitro. J Control Release, 2003, 92: 49－67[DOI]

3 Liu M, Pan J, Li H, et al. Preparation of folate-liposome and its delivery into cultured HeLa cells. J Shanghai Med Univ, 2001, 27(1): 4－8

4 Hyuk S Y, Tae G P. Folate receptor targeted biodegradable polymeric doxorubicin micelles. J Control Release, 2004, 96: 273－283[DOI]

5 Teruaki H, Tomohisa F, Shuichi H, et al. Schizophyllan–folate conjugate as a new non-cytotoxic and cancer-targeted antisense carrier. Bioorg Med Chem Lett, 2005, 15: 327－330[DOI]

6 Campbell I G, Jones T A, Foulkes W D, et al. Folate-binding protein is a marker for ovarian cancer. Cancer Res, 1991, 51: 5329－5338

7 Yoshiyuki H, Yoshie M. Enhanced in vitro DNA transfection efficiency by novel folate-linked nanoparticles in human prostate cancer and oral cancer. J Control Release, 2004, 97: 173－183[DOI]

8 Kevin A J, Marie P F, Ana M, et al. Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin. J Control Release, 2001, 73: 255－267[DOI]

9 Zhang L K, Hou S X, Mao S J, et al. Study on the tumor cell targetability of folate-conjugated albumin nanoparticles. J Sichuan Univ (Med Sci Edi), 2004, 35(2): 165－168

10 Laura T, Eija R, Tarja K, et al. Starch acetate microparticles for drug delivery into retinal pigment epithelium——in vitro study. J Control Release, 2004, 98: 407－413[DOI]

11 Linda S, Lena S, Ingvar S. Starch microparticles as an adjuvant in immunization: effect of route of administration on the immune response in mice. Vaccine, 2004, 22: 2863－2872[DOI]

12 肖苏尧，刘选明，童春义，等. 多聚赖氨酸淀粉纳米颗粒基因载体的研制及应用. 中国科学, B 辑, 2004, 34(6): 473－477

(2005-12-17 收稿, 2006-03-09 接受)