

人转铁蛋白修饰海藻酸钠载阿霉素纳米微球的制备与表征

苏科^{1,2}, 周汉新¹, 汤顺清², 齐晖¹, 李富荣¹

(1. 暨南大学第二临床医学院深圳市人民医院临床医学研究中心, 广东 深圳 518020;

2. 暨南大学生物医学工程系, 广东 广州 510632)

[摘要] 通过人转铁蛋白修饰海藻酸钠载阿霉素纳米微球制备一种药物载体, 拟解决抗肿瘤药物靶向治疗和肿瘤细胞多药耐药产生的问题. 用优化的微乳化-离子交联方法制备包覆阿霉素的海藻酸钠复合纳米微球, 以水溶性碳二亚胺为交联剂, 将载药微球与人转铁蛋白连接, 制备出了人转铁蛋白 Tf 修饰海藻酸钠载阿霉素纳米微球. 结果显示其平均粒径为 (170 ± 5.12) nm, 外观为圆球型, 阿霉素包裹量为 11.9%, 人转铁蛋白的连接量为 42.3% 的纳米微球, 为解决乳腺癌细胞的多药耐药性提供重要的体外实验基础和科学依据.

[关键词] 海藻酸钠; 阿霉素; 纳米微球; 多药耐药

[中图分类号] R943; R979.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2009)03-0331-04

Preparation and evaluation of alginate nanoparticle simultaneous delivery of doxorubicin and Tf antibody

SU Ke^{1,2}, ZHOU Han-xin¹, TANG Shun-qing², QI Hui¹, LI Fu-rong¹

(1. Clinical Medical Research Center, Shenzhen People's Hospital, 2nd Clinical Medicine College, Jinan University, Shenzhen 518020, China; 2. Department of Biomedical Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[Abstract] The purpose of this study is to look for a novel nanoparticle drug bearer formulations capable of delivering a cytotoxic drug, doxorubicin (Dox) and a chemosensitizer antibody, to finish off the problem of the multidrug resistant phenotype in cell. To optimize for the effectiveness of this combination-al approach, novel nanoparticle formulations capable of delivering a cytotoxic drug, doxorubicin (Dox), a chemosensitizer antibody, transferrin linker by EDC. The results showed that this novel nanoparticle had spherical morphology, the average size was approximately (170 ± 5.12) nm. The Tf content in the nanoparticle was 42.3%, and the drug loading was 11.9%. These findings set up an vitro experiment ground and science base work for solve the problem of breast multidrug resistant phenotype effect.

[Key words] alginate; doxorubicin; nanoparticle; multidrug-resistant(MDR)

[收稿日期] 2008-11-12

[基金项目] 广东省自然科学基金资助(04006966)

[作者简介] 苏科(1982-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 医用生物材料的研究

通讯作者: 李富荣, 研究员, 暨南大学第二临床医学院(深圳市人民医院)

目前的肿瘤治疗方法中,化疗是运用最广泛也最有效的办法之一,并在提高肿瘤病人近期和远期疗效中发挥着重要作用,但在其临床应用中暴露出两个问题.首先,化疗药物对肿瘤细胞或肿瘤组织缺乏靶向性,进入体内后会经全身循环,肿瘤部位因为药物浓度不够达不到杀灭肿瘤细胞的作用;而正常组织因化疗药物对正常细胞的杀伤作用毒副作用明显.其次,肿瘤细胞经抗肿瘤药物治疗后出现耐药性,既当化疗药物进入到肿瘤细胞达到一定浓度后,肿瘤细胞能特异性识别化疗药物的存在并将其“推出”到细胞外,使药物无法发挥作用.所以制备一种既有特异性靶向定位又能阻止药物外排的新型化疗药物就成为问题的关键^[1-3].

由于肿瘤细胞对铁的高需求,肿瘤细胞表面有比正常细胞更多的与铁代谢相关的受体表达和对铁的高摄取率.转铁蛋白可与细胞表面的转铁蛋白受体特异性结合,而将所载的铁通过内吞方式转入细胞^[4].因此,转铁蛋白可作为肿瘤细胞的靶分子来修饰纳米载体,使其获得肿瘤细胞靶向性.将抗肿瘤药物阿霉素特异性输送到肿瘤细胞^[5],可以利用人转铁蛋白 Tf 来躲避 p 糖蛋白的特异性,达到抑制 P-糖蛋白外排药物的目的.既解决抗肿瘤药物靶向治疗问题又解决肿瘤细胞多药耐药产生的问题.

1 仪器与试剂

透射电子显微镜(TEM, TECHAI210, 荷兰 PHILIPS); 激光散射仪(美国布鲁克海文 BI9100), 电动搅拌机(D6022F, 杭州仪表电机有限公司); u800 分光光度计(上海棱光技术有限公司), 海藻酸钠(Alg, 化学纯, 温州市东升化工试剂厂); 阿霉素(DOX, 原料药, 质量分数 98.5%, 湿品, 深圳万乐药业有限公司提供); 水溶性碳二亚胺(EDC, Sigma 公司); 考马斯亮蓝(Fluka 公司), 兔抗小鼠(华美生物公司); 人转铁蛋白(第四军医大学细胞工程研究所).

2 实验部分

2.1 海藻酸钠药物纳米微球的制备

Ho Lun Wong 等人^[6]运用硬脂酸等油水混合体系来制备分散的海藻酸钠纳米微球, 本实验对其方法进行了参照和改进, 采用反相微乳法, 制备了这种海藻酸钠药物纳米微球, 主要步骤如下: 取 20 mg Alg; 10 mg Dox 分别溶于 50 mL 蒸馏水中, 再边搅拌边互混, 半小时后形成混合液. 在超声和高速搅拌的条件

下, 将混合液逐滴加入到 $V_{\text{正庚烷}}: V_{\text{Span80}} = 10:1$ 的油相中, 形成微乳体系, 继续搅拌 50 min 后, 再加入 3 mol/L CaCl_2 溶液逐滴加入到整个体系中, 继续搅拌 1.5 h 后, 进行静置, 离心分离. 最后过 220 nm 滤膜, 收集保存即得最后的纳米微球.

取 2 mg 上述纳米药物微球于实验管中, 用磷酸盐缓冲液洗涤 2 次, 向管中加 2 mL 0.01 mol/L $\text{pH} = 7.4$ 的 PBS 和 30 mg 水溶性碳二亚胺, 然后加入 300 μg 的单抗人转蛋白 Tf, 室温旋转 18 h 后取下来, 用 PBS 洗涤直至上清液中检测不出抗体, 经分离后冷冻干燥即得人转铁蛋白修饰海藻酸钠载阿霉素药物纳米微球(以下简称 TDA).

2.2 TDA 的理化性能表征

用透射电子显微镜观察 TDA 的形貌, 用激光散射仪测定其大小和粒径分布, 计算平均数($n = 5$).

2.3 TDA 中阿霉素质量分数的测定方法

取 2 mg TDA 粉剂和 2 mg 的空白微球, 加入 10 mL 含少量盐酸的 PBS 溶液, 在超声并加热($90 \sim 100^\circ\text{C}$) 1 h 后, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 以空白为参比, 用紫外可见分光光度计在 480 nm 处测量阿霉素质量分数, 标准曲线回归方程为 $C = 14.459A - 0.0299$, 相关系数 $R = 0.9996$ ($n = 3$), 计算 TDA 的载药量^[7-8]. 载药量 = 已包裹药物总量/微球总量 $\times 100\%$.

2.4 TDA 中阿霉素的释放率的测定

取 30 mg TDA 于锥形瓶中, 加入 90 mL 0.01 mol/L PBS($\text{pH} = 7.4$), 置于 37°C 水浴摇床 100 r/min 振荡, 定时取出 25 mL 于试管中, 3 000 r/min 离心 10 min 后, 倒出上清液再加入 25 mL PBS 于试管中, 振荡后转入锥形瓶. 上清液用紫外分光光度计测量阿霉素质量分数, 并计算累积释放百分率. 释放率 $\% = w_1/w_2 \times 100\%$, 式中 w_1, w_2 分别为 TDA 在 PBS 中溶出的阿霉素量和 TDA 中阿霉素的总量^[9].

2.5 考马斯亮蓝法测定 TDA 中单抗的含量

参照文献^[10], 可得单抗 Tf 的标准曲线为 $A = 0.0008C + 0.0374$ ($R = 0.9996$). 测量 TDA 制备过程所收集上清液中单抗的质量分数, 运用反推法, 用实验投入量 - 回收量 = 连接量, 计算出单位质量 TDA 结合抗体的量和抗体结合率.

3 结果与讨论

3.1 TDA 的形态和粒径

图 1 为 TDA 的激光散射粒径分布图, 图 2 是

TDA 的 TEM 图。由图 1 和图 2 可见,在 DOX 纳米粒子的表面包覆 Alg 以后,纳米粒子仍呈球形,粒径较小,分散性较好。选择合适的制备条件,可得到平均粒径约 170 nm、主要分布在 100 ~ 300 nm 的 TDA。

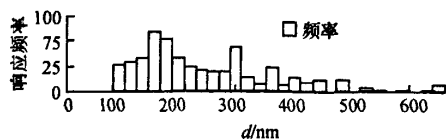


图1 TDA 的激光散射粒径分布图

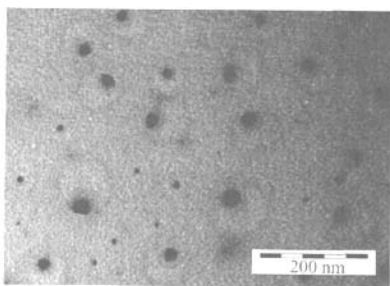
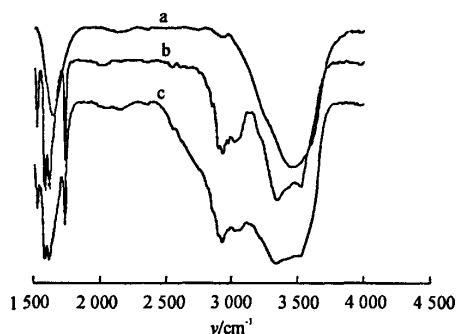


图2 TDA 的 TEM 图

3.2 TDA 的表层结构

图 3 a、b、c 分别为海藻酸钠、阿霉素、TDA 的红外光谱图。从图 3 可看到在 3 429、3 022、1 727、1 617、1 582、1 412、1 285、1 211 等波数附近的药物吸收峰。图 3c 与 b 比较发现,包复后药物的吸收峰并没有发生明显位移,与 3a 比较也发现,基材的特征峰峰形及峰位也没有发生明显变化,即可断定,药物在被包覆后,其化学基团没有发生明显变化,不影响药物药效的发挥。



a:海藻酸钠;b:阿霉素;c:TDA

图3 红外光谱图

图 4 是 TDA 的荧光显微镜图,由于阿霉素自发荧光,再由改变粒径不改变其他反映条件的情况下观察其成球时阿霉素和海藻酸钠各自的成球形态,

从图中可以看出在 TDA 表层有键合的情况下,阿霉素被海藻酸钠囊括在微球内。

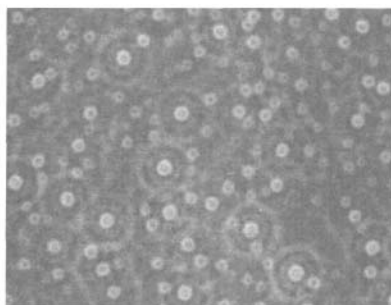


图4 TDA 的荧光显微镜图

3.3 TDA 中阿霉素质量分数的测定结果

靶向药物微球的载药量是一个重要指标,只有足够的药物在肿瘤部位释放出来才能有效杀灭肿瘤细胞,起到化疗作用。采用上述方法提取阿霉素,经测量每毫 TDA 含阿霉素为 101.7 μg 。

3.4 TDA 中药物的释放率的测定结果

由图 5 可知,以海藻酸钠为载体的 TDA 具有长时间缓释作用。微球缓释的机理可能是 Alg 与氯化钙发生离子反应生成球形海藻酸钙骨架,将药物包裹其中;同时 Alg 的羧酸根与阿霉素的胺基之间的离子作用,使药物释放受到阻碍。药物的释放初期是由药物的溶解而扩散到溶液中,后阶段由于海藻酸钠的逐渐溶蚀和降解而使药物缓释出来的。

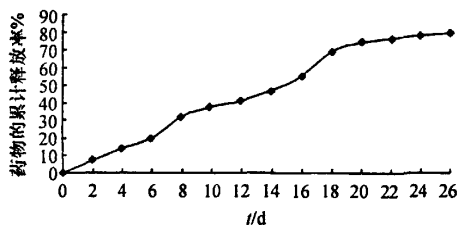


图5 TDA 的药物缓释曲线

3.5 TDA 中抗体的质量分数

研究表明抗体质量对吸附行为有重要影响。由表 1 可见,随着抗体质量的增加,Tf 抗体的结合率明显减小。抗体结合率的影响可以从两个方面来考虑,离子强度的增加使 Tf 抗体处于更多的离子氛围中,与配基结合的空间阻碍和静电排斥作用增大;另一方面,盐离子也会与配基分子的某些基团相互作用,阻碍配基与 Tf 抗体的结合,因此导致吸附量下降。

表 1 十字正交实验的结果表明,每毫克 TDA 结

合率为 42.3% 时为最佳结合情况.

表 1 Tf 抗体加入量和反应时间对 TDA 的影响

试管 编号	$m_{\text{微粒}}/\text{mg}$	t/h	$m_{\text{加入抗体量}}/\mu\text{g}$	抗体结 合率/%	$w_{\text{结合}}/(\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1})$
1	2	16	100	75.8	37.9
2	2	16	200	57.3	57.3
3	2	16	300	44.1	66.1
4	2	16	400	34.7	69.5
5	2	8	300	33.4	50.2
6	2	12	300	37.2	55.8
7	2	16	300	42.3	63.4
8	2	20	300	44.7	67.1

另外,选择不同的吸附时间(16~20 h)为吸附变量,考察了它们对 TDA 吸附性能的影响(图 6). 在 10h 内吸附量达到 50.0 $\mu\text{g}/\text{mg}$,随着反应时间增加,吸附量也有所增加,最终在 16 h 后达到 60.0 $\mu\text{g}/\text{mg}$,并基本维持稳定,不再随时间而发生变化.

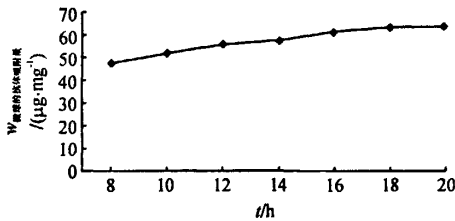


图 6 时间对 Tf 抗体连接的影响

本研究以阿霉素为包裹核心,选用海藻酸钠为包覆材料,以人转铁蛋白为的靶向剂,EDC 为连接单抗的交联剂,以微乳的方法制备的药物 TDA 具有粒径小、粒径分布均匀、且具有长时间药物缓释效果,同时 TDA 能保持原有抗体的活性. 根据文献[11-12]人转铁蛋白 Tf 对肿瘤特别是乳腺癌细胞的配体-受体靶向作用能有效的躲避 MCF-7/A 的 P-gp 对阿霉素的外排作用而达到抗多药耐药的效果,本纳米药物载体的研究为解决乳腺癌细胞的多药耐药性提供重要的体外实验基础和科学依据.

[参考文献]

[1] 谢云飞. 配体-受体系统介导的药物靶向性研究进展[J]. 药物生物技术,2004,11(2):130-134.

[2] 贾国存. 肿瘤细胞铁代谢的分子机制[J]. 国外医学输血及血液分册,2003,26(4):342-345.

[3] TAO Xia, CHEN Hua, SUN Xue-Jun, et al. Formulation and cytotoxicity of doxorubicin loaded in self-assembled bio-polyelectrolyte microshells[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2007, 336:376-381.

[4] 章莉,李杰,郭伟剑. 乳腺癌多药耐药机制研究进展[J]. 肿瘤防治杂志,2004,11(2):199-202.

[5] WONG HO LUN, ANDREW MIKE RAUTH, REINA BENDAYAN, et al. In vivo evaluation of a new polymer-lipid hybrid nanoparticle (PLN) formulation of doxorubicin in a murine solid tumor model[J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2007, 65:300-308.

[6] WONG HO LUN, REINA BENDAYAN, ANDREW MIKE RAUTH, et al. Simultaneous delivery of doxorubicin and GG918 (Elacridar) by new Polymer-Lipid Hybrid Nanoparticles (PLN) for enhanced treatment of multi-drug-resistant breast cancer[J]. Journal of Controlled Release, 2006, 116:275-284.

[7] 张玉,王凯平,陈东生,等. 复方阿霉素磁性白蛋白微球的制备及含量测定[J]. 中国医院药学杂志, 2000, 20(1):53-55.

[8] 赵瑞玲,谢茵,丁红,红紫外分光光度法测定阿霉素聚乳酸微球含量[J]. 山西医科大学报,2003,34(2):166-167.

[9] LUC BARRAUD, PHILIPPE MERLE, EMILIE SO-MA. Increase of doxorubicin sensitivity by doxorubicin-loading into nanoparticles for hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo[J]. Journal of Hepatology, 2005, 42: 736-743.

[10] 孔小丽,乔飞燕,齐晖,等. 抗体和寡核苷酸双标记纳米金生物探针的制备及性能分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2008,24(5):481-487.

[11] 张蓉,司徒红林,陈前军. 乳腺癌多药耐药机制及其逆转剂的研究[J]. 中华实用医药杂志,2006,6(17):1558-1561.

[12] 顾希平,裴元英. 转铁蛋白作为主动靶向载体的研究进展[J]. 中国药理学杂志,2005,40(8):586-571.

[责任编辑:黄建军]