

RGD 修饰的载蟾毒灵多级靶向纳米粒在裸鼠人肝癌移植瘤中的靶向研究

梁 波 王 炎 邱艳艳 胡送娇 刘培峰 段友容 彭 文 殷佩浩 仇 明 李 琦

摘 要 **目的** 观察 RGD 修饰的载蟾毒灵多级靶向纳米粒对荷 LM3 肝癌裸鼠的靶向性,为蟾毒灵纳米粒的肝癌临床治疗提供依据和方法。**方法** 两组荷 LM3 肝癌裸鼠分别注射 Dir - bufalin - mPEG - PLGA - PLL 和 Dir - bufalin - mPEG - PLGA - PLL - cRGD 纳米粒,于药物注射后 3、19h 后采用活体成像系统测定裸鼠活体的荧光强度。**结果** 注射纳米粒 3、19h 后,与 Dir - bufalin - mPEG - PLGA - PLL 纳米粒相比,注射 Dir - bufalin - mPEG - PLGA - PLL - cRGD 纳米粒的荷瘤裸鼠肝脏肿瘤部位显示出较高的荧光强度。**结论** RGD 修饰的载蟾毒灵多级靶向纳米粒具有更有效的瘤体靶向性,可能为临床抗肝癌治疗提供实验基础和理论依据。

关键词 蟾毒灵 纳米粒 cRGD 肝癌 靶向性

Tumor - targeting Efficiency of Bufalin - loaded mPEG - PLGA - PLL - cRGD Nanoparticles in Hepatocellular Carcinoma - bearing Nude Mice. Liang Bo, Wang Yan, Qiu Yanyan, et al. Central Hospital of Shanghai Putuo District, Shanghai 200062, China

Abstract Objective To observe the targeting efficacy of bufalin - loaded mPEG - PLGA - PLL - cRGD nanoparticles (bufalin - mPEG - PLGA - PLL - cRGD NPs) in LM3 hepatocellular carcinoma - bearing nude mice and to provide the basis and method for the hepatocellular clinical treatment of the bufalin nanoparticles. **Methods** The mice were classified into 2 groups, At 3 and 19 hours after injection, the tumor fluorescence intensity of the mice were observed via in vivo targeting fluorescence imaging. **Results** After 3 and 19 hours after injection, compared with the Dir - bufalin - mPEG - PLGA - PLL nanoparticles, the tumor fluorescence intensity of the LM3 hepatocellular carcinoma - bearing nude mice injected Dir - bufalin - mPEG - of PLGA - PLL - cRGD nanoparticles showed the higher. **Conclusion** The cRGD moiety resulted in better tumor targeting in vivo. This may provide theoretical basis for clinical treatment.

Key words Bufalin; Nanoparticles; Cyclic arginine - glycine - aspartic acid (cRGD); Hepatocellular carcinoma; Tumor targeting

原发性肝癌是全世界第 5 大常见恶性肿瘤,化疗、生物免疫治疗是转移性肝癌主要的治疗手段之一^[1,2]。但化疗药物存在的对肿瘤缺乏特异亲和性和专一性、全身毒性及多药耐药等问题。随着纳米给药系统的兴起,纳米技术被引入药物制剂研究中,利用纳米技术研制和开发具有肿瘤靶向性的药物载体,使药物在肿瘤局部释放并发挥作用。蟾毒灵是蟾酥中提取的一种毒性配基之一,具有诱导肿瘤分化和凋亡作用。本实验组前期在 mPEG - PLGA - PLL(聚乙二醇单甲醚 - 聚乳酸羟基乙酸 - 聚赖氨酸)纳米粒上,用 cRGD(缬氨酸 - 精氨酸 - 甘氨酸 - 天冬氨酸 - 谷氨酸环肽)修饰,包裹蟾毒灵制备纳米粒,通过

纳米粒本身具备的主动、被动靶向作用,再加之 RGD 与整合素之间的受体 - 配体特异性结合作用,从而达到多级靶向目的,进而将药物运送到靶部位^[3]。笔者通过建立裸鼠原位移植性肝癌模型,观察纳米粒对荷 LM3 肝癌裸鼠的靶向情况,以探讨 RGD 修饰的载蟾毒灵多级靶向纳米粒体内的抗肿瘤效应,为该纳米粒的肝癌临床治疗提供依据和方法。

材料与方法

1. 主要药物与试剂:蟾毒灵(bufalin)(南昌贝塔生物科技有限公司)。蟾毒灵多级靶向纳米粒(bufalin nanoparticle, BNP)采用乳化溶剂蒸发法制备,纳米粒平均粒径为 $164 \pm 84\text{nm}$,BNP 中蟾毒灵含量为 $3.92\% \pm 0.16\%$ 。Dir - mPEG -

基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(81001594);上海市自然科学基金资助项目(11ZR1433200);上海市科委纳米专项基金资助项目(11nm0504500);上海市科委引导项目(114119B3100);上海市卫生局中医处资助项目(2010QL050B);上海市普陀区科委创新重大项目(2011PTKW001)

作者单位:200062 上海中医药大学附属普陀医院、上海中医药大学中西医结合肿瘤介入研究所(梁波、王炎、邱艳艳、胡送娇、彭文、殷佩浩、李琦);200032 上海市肿瘤研究所(刘培峰、段友容);200003 第二军医大学附属长征医院腹腔镜外科(仇明)

通讯作者:殷佩浩,博士,副主任医师,电子信箱:yinpeihao1975@hotmail.com

PLGA - PLL - cRGD 聚合物(上海交通大学医学院附属仁济医院上海市肿瘤研究所段友容课题组提供, PLGA Mn: 8000, PLL Mn: 3000, mPEG - PLGA - PLL Mn: 12000, mPEG - PLGA - PLL 与 RGD 按摩尔比 1:1 接枝)。

2. 细胞株和实验动物: 细胞株为 LM3 肝癌细胞, 由复旦大学附属中山医院肝病研究所提供; BALB/C nu/nu 裸鼠 12 只, 6 周龄, 体重 20 ± 2 g, 雄鼠, 购自上海市公共卫生中心[实验动物许可证号为 SCXK(沪): 2005 - 0001], 饲养于上海中医药大学附属普陀医院 SPF 级动物实验室[动物实验室许可证号为 SYXK(沪), 2005 - 0008]。

3. 荷 LM3 肝癌裸鼠原位瘤模型的建立: 培养 LM3 肝癌细胞, 待细胞生长至对数生长期, 常规胰蛋白酶消化, 制备单细胞悬液, 调整细胞浓度为 1×10^7 /ml。在 6 只裸鼠右腋部皮下注入 0.2ml 细胞悬液, 待皮下肿瘤长至 1.0 ~ 1.2cm 时, 脱颈椎处死后剥离皮下肿瘤组织。将剥离的移植瘤剪成约 $1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 3\text{mm}$ 大小的组织块, 然后固定剩下 6 只裸鼠, 用手术镊夹起胸骨下 1cm 处皮肤, 剪至胸骨缘后拎起肌肉层剪开。剪开后用棉签辅助挤出肝脏。用手术剪在肝脏较厚处戳一小洞后用镊子通过小洞探一小隧道, 将瘤块塞入小隧道后逐层关腹。

4. 活体靶向荧光成像实验方法: 在模型制作后第 10 天将

裸鼠分为 Dir - mPEG - PLGA - PLL 纳米粒 LM3 肝癌原位瘤组, Dir - mPEG - PLGA - PLL - RGD 纳米粒 LM3 肝癌原位瘤组, 各 3 只裸鼠。通过尾静脉各注射 0.2ml, 各组动物的饲养条件完全相同, 各组动物体重无差异。荧光成像之前均先腹腔注射 0.06ml 2.5% 戊巴比妥钠, 使之处于麻醉状态, 用 LB983 型动物活体成像仪分别在 3 和 19h 进行活体靶向荧光成像。

结 果

1. 荧光活体成像观察: 纳米粒通过尾静脉注入荷瘤裸鼠后, 分别于 3 和 19h 成像。如下图所示, 注射纳米粒 3h 后, 与 Dir - bufalin - mPEG - PLGA - PLL (图 1A) 纳米粒相比, 注射 Dir - bufalin - mPEG - PLGA - PLL - cRGD (图 1B) 纳米粒的荷肝脏原位瘤裸鼠肿瘤部位的荧光强度要强。注射纳米粒 19h 后, 注射 Dir - bufalin - mPEG - PLGA - PLL 纳米粒的荷肝脏原位瘤裸鼠肿瘤部位未显示出荧光, 而注射 Dir - bufalin - mPEG - PLGA - PLL - cRGD 纳米粒的荷肝脏原位瘤裸鼠肿瘤部位能显示出部分荧光, 这表明 Dir - bufalin - mPEG - PLGA - PLL - cRGD 纳米粒能在肿瘤部位存留时间更久, 从而更有效地靶向肿瘤。

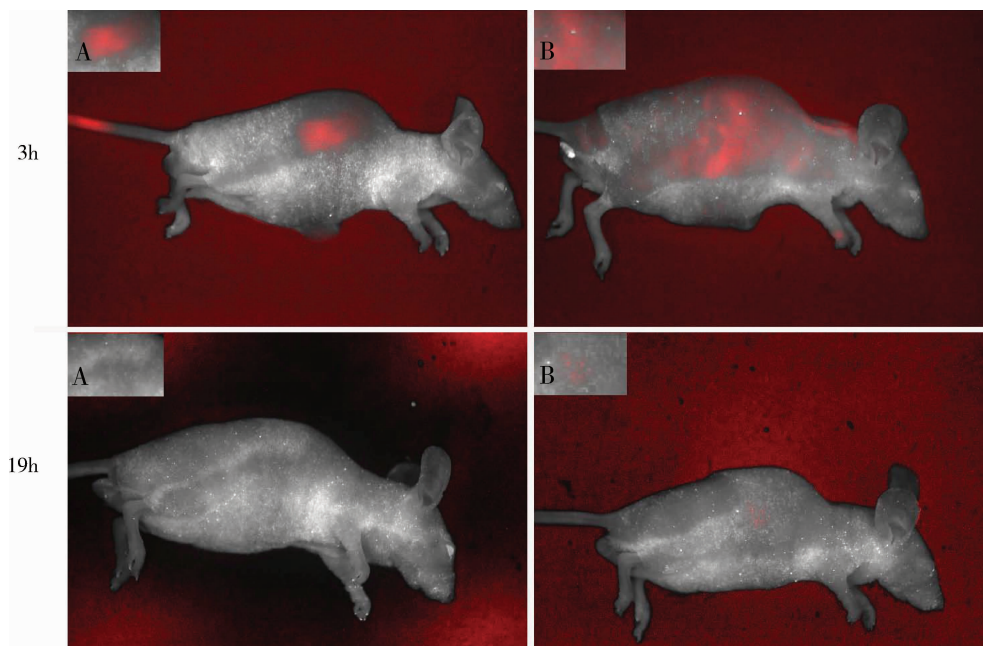


图 1 尾静脉注射 Dir - bufalin - mPEG - PLGA - PLL 和 Dir - bufalin - mPEG - PLGA - PLL - cRGD 纳米粒后荷瘤裸鼠的肝脏原位瘤的活体荧光成像图

A. Dir - bufalin - mPEG - PLGA - PLL; B. Dir - bufalin - mPEG - PLGA - PLL - cRGD

讨 论

蟾毒灵是中药蟾酥中的有效成分之一, 现代研究发现其对包括肝癌在内的多种肿瘤具有抑制作用, 作用机制涉及促进凋亡、诱导分化、抑制肿瘤血管新生

等^[4-8]。韩克起等^[9]研究发现大、中剂量的蟾毒灵对小鼠原位移植性肝癌有明显的抗肿瘤效应。但因其毒性较大、难溶于水、代谢快、半衰期短等缺点, 限制了其在肿瘤治疗中的应用^[10]。

纳米制剂是目前靶向给药系统中较具开发前景的剂型之一。研究表明,由于肿瘤细胞有较强的吞噬能力以及肿瘤等病变部位的血管内皮细胞缝隙远大于正常内皮细胞间隙,因此纳米粒更容易进入肿瘤内部;同时纳米粒缓释抗肿瘤药物延长了药物在肿瘤内的存留时间,因此延长了作用时间,提高了疗效^[11]。

新型的纳米载体使用主动和被动的靶向治疗策略,极大地增加了肿瘤细胞内的药物浓度并避免其对正常细胞的毒性,克服在临床上应用蟾毒灵存在的问题^[12,13]。同时可在纳米粒表面偶联特异性的靶向分子进行表面修饰,如特异性配体、单克隆抗体等,通过靶向分子与细胞表面特异性受体结合,实现药物的多级靶向输送。本课题组前期研究制备的以缬氨酸-精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-谷氨酸环肽(VRGDG, cRGD)修饰的聚乙二醇单甲醚-聚乳酸羟基乙酸-聚赖氨酸(mPEG-PLGA-PLL-cRGD)聚合物为载体,以蟾蜍灵(bufofin)为模型药制备的 bufofin-mPEG-PLGA-PLL 的纳米给药系统具有良好的靶向递送能力和治疗效果,主要由于以下几个方面:①可降解聚合物 PLGA 使包裹在内的 bufofin 随材料的降解被缓慢释放出来,从而延长治疗并降低其毒性;②阳离子多聚物聚左旋赖氨酸 PLL,生物相容性好,降解产物为人体所必需的氨基酸;③由于聚乙二醇单甲醚(mPEG)附着在 mPEG-PLGA-PLL-cRGD 聚合物载体的表面,mPEG 的长链能使纳米载体有效的逃避网状内皮系统的吞噬,从而达到长循环的目的,有助于取得较好的治疗效果;④cRGD 是一个有效的靶向分子,众多实验已经证实其对肿瘤血管具有很好的靶向效果。因此以载蟾蜍灵的缬氨酸-精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-谷氨酸环肽(VRGDG, cRGD)修饰的聚乙二醇单甲醚-聚乳酸羟基乙酸-聚赖氨酸(bufofin-mPEG-PLGA-PLL-cRGD)纳米给药系统将能够有效的降低 bufofin 的毒性,增强其靶向性。

随着小动物成像技术的发展,活体小动物无损伤性成像在临床前研究中发挥着越来越重要的作用。目前,体内可见光成像包括生物发光与荧光两种技术。荧光技术是采用荧光报告基因或荧光染料进行标记,本实验利用 DiR 这种近红外荧光染料形成清晰的体内生物光源,从而实现活体示踪。与传统技术相比不需要杀死动物,可以对同一个动物进行长时间反复跟踪成像,既可以提高数据的可比性,避免个体差异对试验结果的影响,又可以了解标志物在动物体内的分布和代谢情况,避免传统体外实验方法的诸多缺点。

此实验制备的载药纳米粒体内荧光活体成像实验数据显示相对于 Dir-bufofin-mPEG-PLGA-PLL 纳米粒,Dir-bufofin-mPEG-PLGA-PLL-cRGD 纳米粒能在肿瘤部位存留时间更久,从而更有效地靶向肿瘤,证明该纳米粒能有助于提高肝癌治疗的效果。但本研究目前主要是针对纳米粒的递送能力从活体成像方面进行了初步的研究。该纳米粒在肝癌治疗方面仍需进一步深入研究。

参考文献

- Jemal A, Bray F, Center MM, *et al.* Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90
- 汤钊猷. 关于肝癌治疗的策略[J]. 临床肝胆病杂志, 2011, 27(4): 337-339
- Yin PH, Wang Y, Qiu YY, *et al.* Bufofin-loaded mPEG-PLGA-PLL-cRGD nanoparticles: preparation, cellular uptake, tissue distribution and anticancer activity[J]. Int J Nanomedicine, 2012, 7: 3961-3969
- Amano Y, Cho Y, Matsunawa M, *et al.* Increased nuclear expression and transactivation of vitamin D receptor by the cardiotonic steroid bufofin in human myeloid leukemia cells[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2009, 114(3-5): 144-151
- Li D, Qu X, Hou K, *et al.* PI3K/Akt is involved in bufofin-induced apoptosis in gastric cancer cells[J]. Anticancer Drugs, 2009, 20(1): 59-64
- Yu CH, Kan SF, Pu HF, *et al.* Apoptotic signaling in bufofin- and cinobufagin-treated androgen-dependent and -independent human prostate cancer cells[J]. Cancer Sci, 2008, 99(12): 2467-2476
- Xu YZ, Fan Y, Zhang YL, *et al.* Effects of bufofin on apoptosis of human colon cancer SW620 cell[J]. J Jiangsu University: Medicine Edition, 2007, 17(6): 515-517
- Xie CM, Chan WY, Yu S, *et al.* Bufofin induces autophagy-mediated cell death in human colon cancer cells through reactive oxygen species generation and JNK activation[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2011, 51(7): 1365-1375
- 顾伟, 韩克起, 苏永华, 等. 蟾毒灵对裸鼠人肝癌移植瘤的抑制作用及对 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响[J]. 中西医结合学报, 2007, 2: 155-159
- Gong LL, Li JX, Zhang HM. Progress on pharmacological action and preparation of venenum bufonis[J]. Food Drug, 2007, 9(10): 51-53
- Li F, Wang YJ, Liu ZT, *et al.* Formulation and characterization of bufofinolides-loaded nanostructured lipid carriers[J]. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2010, 36(5): 508-517
- Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis[J]. Adv Drug Deliver Rev, 2002, 54(5): 631-651
- Cegnar M, Kristl J, Kos J. Nanoscale polymer carriers to deliver chemotherapeutic agents to tumor[J]. Expert Opin Biol Ther, 2005, 5(12): 1557-1569

(收稿日期: 2013-03-10)

(修回日期: 2013-03-18)