

脑靶向紫杉醇纳米胶束的体外实验研究

陆 恒 王雅杰

摘 要 **目的** 研发一种新型的治疗乳腺癌脑转移的靶向递药系统。**方法** 采用薄膜水化法制备载药胶束,将胶束与脑靶向分子 Angiopep-2 连接,使胶束具有脑靶向功能。**结果** 体外细胞实验证实该胶束具有良好的靶向性。**结论** 连接有靶向分子 Angiopep-2 的纳米胶束具有良好的脑靶向功能。

关键词 乳腺癌 脑转移 纳米 靶向 胶束

中图分类号 R730.53

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.05.015

Brain Targeting Drug Nano Micelle in Vitro Experimental Study. Lu Heng, Wang Yajie. Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Abstract Objective To develop a novel targeted delivery system for the treatment of brain metastases from breast cancer. **Methods** Micelles were prepared by membrane hydration method, and the micelles were connected to Angiopep-2. **Results** The micelles were confirmed to be well targeted in vitro. **Conclusion** Nano-particles with the targeting molecule Angiopep-2 has good brain-targeting function.

Key words Breast cancer; Brain Metastases; Nano; Targeting; Micelles

乳腺癌在全球范围内都普遍高发,据统计,乳腺癌占所有癌症的 25.1%,严重威胁着女性的健康^[1]。近几十年来,随着医疗手段的日臻成熟,乳腺癌的疗效有了明显的改善,但是伴随着生存期大幅度延长而带来的问题是,乳腺癌脑转移率的增高。据统计,15%~30%的乳腺癌患者在疾病进展过程中会出现脑转移病灶^[2]。由于血-脑脊液屏障的天然存在,绝大部分的药物不能进入脑部肿瘤组织,因此一旦发生脑转移,则意味着极差的预后。目前临床针对乳腺癌脑转移的治疗手段主要是放射治疗,尽管能够有效控制脑转移局部,然而,同样带来了认知功能下降的严重后果^[3]。这一矛盾的存在给临床治疗乳腺癌脑转移带来了棘手的选择。一般认为低分子酪氨酸激酶抑制剂,拉帕替尼能够少量穿透血-脑脊液屏障在脑部发挥抗肿瘤作用,但缺乏可靠的大样本研究。临床亟需一种能够具有确切的穿透血-脑脊液屏障能力,并达到脑部肿瘤部位发挥抗肿瘤功能的药物。

纳米载药运输系统是 20 世纪 60 年代发展起来的一种新型给药系统。纳米粒子的粒径一般在 1~

1000nm(1 μ m)之间,与体内大多数蛋白大小相近,且由于纳米材料具有生物相容性,能够满足载体在体内生物兼容性的要求^[4]。Angiopep-2 是一段具有亲大脑内皮细胞功能的短肽,它能够特异性结合位于血-脑脊液屏障(BBB)的低密度脂蛋白受体相关蛋白-1(LRP-1),通过 LRP-1 介导的胞吞作用,穿透血-脑脊液屏障,进入脑内。将它与胶束连接后,能够赋予胶束亲大脑内皮细胞的功能。

笔者将临床治疗乳腺癌的一线药物紫杉醇包载于纳米级的胶束中,并把胶束与靶向分子 Angiopep-2 与胶束通过羧基与羟基连接,使得载药胶束具有脑靶向功能,将紫杉醇带到脑转移瘤部位发挥抗肿瘤疗效。不仅如此,LRP-1 同样表达于乳腺癌细胞,载药胶束进入脑组织后,同样可以通过 LRP-1 的胞吞作用进入肿瘤细胞发挥疗效。

材料与方法

1. 材料与仪器:准微量电子分析天平(德国 Sartorius 公司),恒温水浴锅(中国上海亚荣生化仪器厂),恒温磁力搅拌器(中国上海司乐仪器厂),CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo 公司),倒置式显微镜(日本 Nikon 公司),超净工作台(中国上海博迅实业有限公司),细胞电阻仪(美国 Millipore 公司)透析袋(MWCO 3500 K,美国 Spectrum 公司),微孔滤膜(0.22 μ m,德国 Merck Millipore 公司),紫杉醇(中国

基金项目:上海市自然科学基金资助项目(13NM1401504)

作者单位:200433 上海,第二军医大学附属长海医院

通讯作者:王雅杰,教授,博士生导师,电子信箱:yajiewa0459@

163.com

福建南方药物公司), MPEG2000 - PDLLA2000, COOH - MPEG2000 - PDLLA2000 (中国济南岱刚生物技术有限公司), Angiopep - 2 (上海吉尔生物科技有限公司), 乙腈, NHS, EDC (分析纯, 中国国药集团化学试剂有限公司), Dir, DAPI (美国 Biotium 公司), DMEM, FBS, 胰蛋白酶 (美国 Gibco BRL 公司), 细胞培养皿、Transwell 板、离心管等 (美国 Corning 公司)。人乳腺癌细胞 Skbr - 3 (HER - 2 高表达)、BCEC 细胞。

2. 靶向胶束的制备及表征: (1) 靶向胶束的制备: 采用薄膜水化法, 分别称取处方量的紫杉醇及共聚物材料 PEG - PLA 和 COOH - PEG - PLA, 加入 4ml 乙腈, 超声使其充分溶解, 将溶液移至 250ml 茄形烧瓶中, 40℃ 旋转蒸发 1h 除尽有机溶液。再加入 4ml 双蒸水 (40℃ 条件下), 充分振摇烧瓶使薄膜能被全部溶解, 将所得溶液经 0.22μm 微孔滤膜过滤以除去游离的紫杉醇, 即得无色透明的 MIC - PTX 溶液。在所得胶束水溶液中加入过量 EDC200mmol/L, 过量 NHS100mmol/L, 室温下磁力搅拌 0.5h 活化羧基。按比例加入 Angiopep - 2 肽与胶束水溶液共孵育, 室温下磁力搅拌 6h。超滤除去 EDC/NHS。即可得到 ANG - MIC - PTX。(2) 靶向胶束的表征: ①紫杉醇 PEG - PLA 胶束 (MIC - PTX) 的载药量及包封率的测定: 精密吸取过滤后的溶液, 加入定量乙腈稀释并释放出紫杉醇, 超声 5min 使聚合物溶解完全, 0.22μm 微孔滤膜过滤, 取溶液进样测定。按照下式分别计算包封率 (entrapping efficiency, EE) 与载药量 (drug loading capacity, DLC):

$$DLC(\%) = \frac{\text{胶束中药物含量}}{\text{投入的药物及聚合物总量}} \times 100\% ;$$

$$EE(\%) = \frac{\text{胶束中药物含量}}{\text{投入药物总量}} \times 100\% ;$$

②粒径: Zeta 电位测定: 将 MIC - PTX 加双蒸水稀释至适当浓度, 采用粒度/Zeta 电位测定仪测定粒径和 Zeta 电位值; ③透射电子显微镜鉴定: MIC - PTX 稀释后滴加于覆盖碳膜的铜网上, 用磷钨酸 (pH 7.0, 2%) 负染, 室温干燥后置于透射电子显微镜下观察胶束外部形态。

3. 体外释放: MIC - PTX 的体外释放行为采用透析法考察, 为了保证药物的释放能够满足漏槽条件, 释放介质选用含 1% 吐温 80 的 PBS 溶液 (pH 7.4)。精密吸取 1ml 待测定溶液 (理论上含 1.25mg PTX,), 加入到预处理好的透析袋 (MWCO = 13000K) 内, 两

端密封, 完全浸入装有 150ml 释放介质的广口瓶中, 平行 3 份。精密称取 5mg 紫杉醇, 完全溶解于 4ml 乙腈中。精密吸取 1ml 该溶液, 按照上述条件平行 3 份。37℃, 100r/min 恒温振荡 96h, 分别第于 0.5、1、2、4、8、12、24、48、72、96h 取样 0.5ml 溶液, 同时补加等量 37℃ 空白释放介质。释放样品中 PTX 的浓度采用 HPLC 测定, 并按照以下公式计算校正浓度。

$$C_{\text{校}} = C_{\text{测}} + \frac{0.3}{30} \sum_{i=1}^{n-1} C_{\text{测}}。$$

4. 靶向胶束透体外血 - 脑脊液屏障的功能: (1) 体外血 - 脑脊液屏障的建立: 参考文献实验方法^[5,6], 将处于对数生长期的 BCEC 细胞消化好, 制成单细胞悬液并计数, 分别以 2×10^5 /孔接种至细胞培养池微孔膜 (Transwell 小室) 内, 以 100μl 培养基培养, CO₂ 培养箱内孵育, 每天更换新鲜培养液。下室中加入空白培养基。于第 3 天开始测量上下两室电阻差, 当电阻值乘以小室底面积 0.33cm² 接近 300 时, 即体外模型的跨内皮细胞电阻值为 $321 \pm 13\Omega \cdot \text{cm}^2$ 将处于对数生长期的 Skbr - 3 细胞消化好, 制成单细胞悬液并计数, 分别以 1×10^5 /孔接种于下室, 400μl 培养基培养, 继续培养 12h, 待细胞依附培养皿底。(2) 载香豆素 6 的胶束的制备: 称取适量的香豆素 6, PEG - PLA, COOH - PEG - PLA, 采用之前所述薄膜水化法制备载香豆素 6 的胶束, 并按照同样的方法活化羧基并连接 Angiopep - 2, 制备成两种胶束, MIC - COU - 6 和 ANG - MIC - COU - 6。(3) 靶向胶束靶向性的验证: 吸去 Transwell 小室中培养基, 加入 50μl 培养基及 50μl 载有香豆素 - 6 (最终香豆素 - 6 浓度为 500ng/ml) 的不载药的胶束 MIC - COU - 6 及 ANG - MIC - COU - 6, 随后在 CO₂ 培养箱中孵育 4h, 于共聚焦荧光显微镜下观察下室中可见弥漫绿色荧光, 说明已有部分胶束穿透 BBB。吸去下室中培养溶液, PBS 清洗 3 次后加入 4% 多聚甲醛溶液固定细胞 15min。吸去多聚甲醛溶液, 再次用 PBS 清洗 3 次后, 加入 1μg/ml 4,6 - 二脒基 - 2 - 苯基吲哚 (DAPI) 染色 10min, 染色过程注意避光。除去 DAPI 溶液并用 PBS 清洗后将细胞置于共聚焦荧光显微镜下观察。

结 果

1. 粒径及稳定性: 一定范围内, 胶束的粒径越小, 其在肿瘤组织中的 EPR 效应则越明显。薄膜水化法所制备的 MIC - PTX 粒径如图 1 所示。MIC - PTX 平均粒径为 $24.35 \pm 0.15\text{nm}$, ANG - MIC - PTX 平均粒径为 $27.16 \pm 0.2\text{nm}$ ($P < 0.01$), 提示胶束粒径在

20nm 左右,而 20nm 左右的粒径有利于胶束充分发挥其肿瘤的被动靶向作用。胶束的多分散指数 (polydispersity index, PDI) 分别为 0.128 ± 0.019 、 0.162 ± 0.023 ($P < 0.01$),胶束的粒径大小比较均

匀。笔者所制备的 MIC-PTX 在 4℃ 的保存条件下具有非常好的稳定性,稳定上升至 25℃ 则稳定性降低 (图 2)。

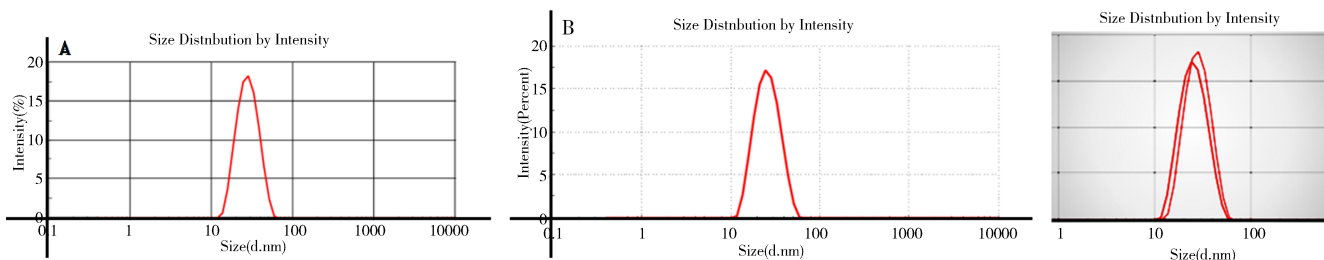


图 1 MIC-PTX 粒径

A. MIC-PTX 粒径;B. ANG-MIC-PTX 粒径;C. A 和 B 的重叠

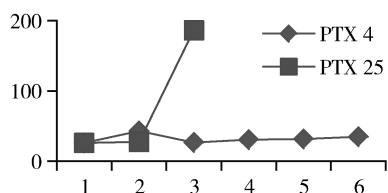


图 2 MIC-PTX 稳定性

蓝色为 4℃ 时,6 天内 MIC-PTX 的粒径变化,红色的线条为 25℃ 保存时,MIC-PTX 的粒径变化

2. Zeta 电位:如图 3 所示,MIC-PTX 的 Zeta 电位为 $-4.01 \pm 0.12\text{mV}$,ANG-MIC-PTX 电位为 $-1.01 \pm 0.51\text{mV}$ ($P < 0.01$),由于 Angiopep-2 表面携带正电荷,使得胶束电荷增大。

3. 载药量包封率:按照公式计算 MIC-PTX 对于紫杉醇的载药量与包封率平均自分别为 15.55%、85.54%,由此可以看出,PEG-PLA 胶束对紫杉醇具有不错的包裹能力。

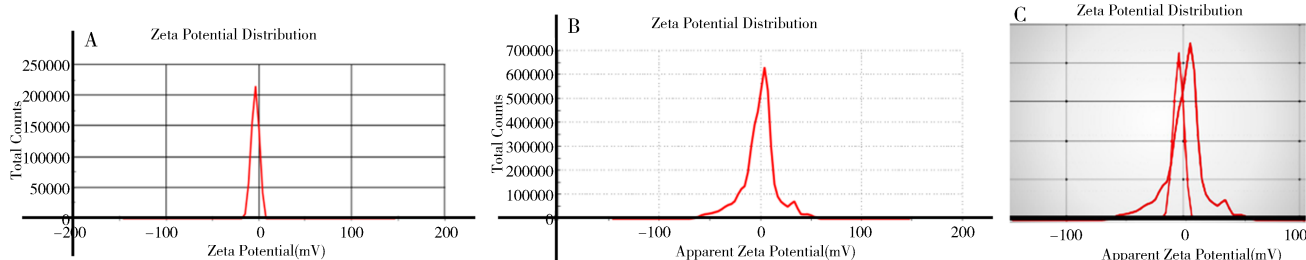


图 3 MIC-PTX 的 Zeta 电位

A. MIC-PTX 电位;B. ANG-MIC-PTX 电位;C. A 和 B 的重叠

4. 透射电镜:透射电子显微镜 (transmission electron microscopy, TEM) 能够观察纳米颗粒的大小及其表面形态。由图 4 透射电镜观察所见,MIC-PTX 和 ANG-MIC-PTX 胶束呈圆球状,且大小分布较均匀。

5. 累积释放量:计算 96h,游离 PTX 和胶束 MIC-PTX 释放紫杉醇的累积量,如图 5 所示。理论上投进 150ml 释放介质的是 1.25mg PTX,胶束化的紫杉醇具有一定的缓释功能。

6. 体外穿血-脑脊液屏障的功能:通过已建立的体外血-脑脊液屏障模型,定性比较两种胶束在相同

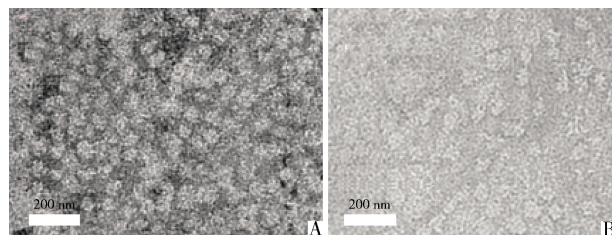


图 4 透射电镜图

A. MIC-PTX 电镜图;B. ANG-MIC-PTX 电镜图

时间内穿透 BBB 模型并进入 Skbr-3 细胞的能力,结果显示接有 Angiopep-2 的载香豆素的胶束在相

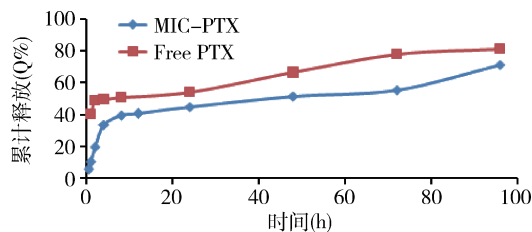


图5 游离 PTX 和胶束 MIC-PTX 释放紫杉醇的累积量

蓝色为 MIC-PTX 中紫杉醇在 96h 中的累积释放量,

红色的线条为游离 PTX 的累积释放量

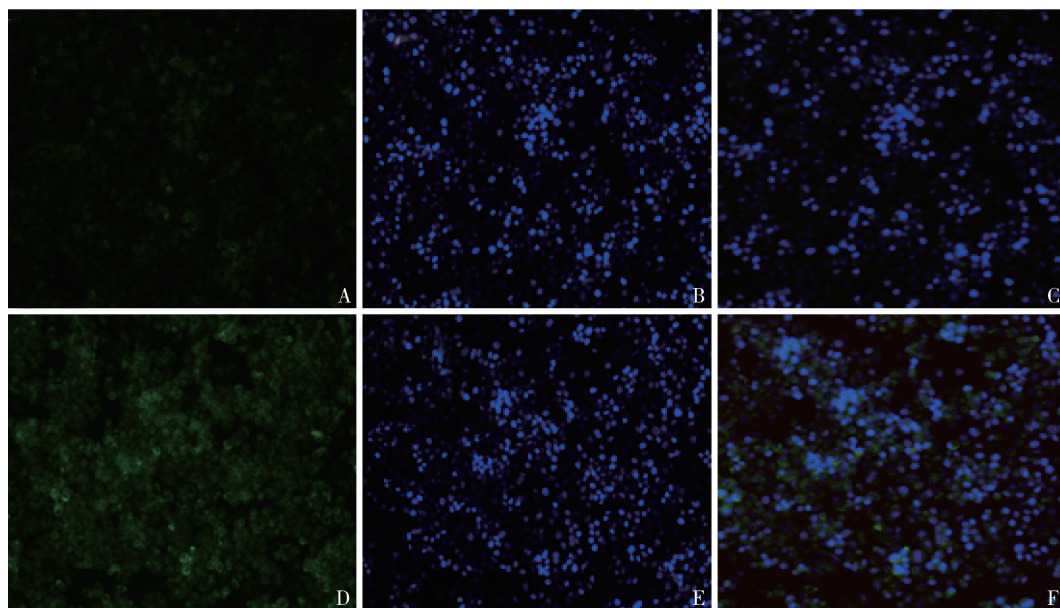


图6 体外穿血-脑脊液屏障的功能($\times 200$)

A. 载 cou-6 的 MIC 在细胞质内的分布;B. DAPI 在细胞核内的分布;C. 两张图片叠加;D. 载 cou-6 的 ANG-MIC 在细胞质内的分布;E. DAPI 在细胞核内的分布;F. 两张图片叠加。可以直观地观察到,即接有靶向分子的胶束在相同时间内对 BBB 的穿透能力明显强于未接靶向分子的胶束

癌的 OS 仅为 4.9 个月^[8]。由于血-脑脊液屏障的存在,几乎所有抗肿瘤药物都不能进入脑组织发挥疗效。目前紫杉醇是乳腺癌治疗的有效化疗药物,它是一种抗微管药物,通过促进微管蛋白聚合抑制解聚,保持微管蛋白稳定,抑制细胞有丝分裂。临床主要适用于卵巢癌和乳腺癌。

2015 年 FDA 批准 ANG1005 作为治疗乳腺癌的孤儿药上市。ANG1005 是将具有脑靶向功能的短肽分子 Angiopep-2 与 3 个紫杉醇分子连接,使紫杉醇具有脑靶向功能。在前期的研究中均证实了 ANG1005 对于乳腺癌脑转移的确切疗效。但是仍然不能解决紫杉醇难以溶解于水的问题,仍会带来可能致命的过敏反应。2005 年上市的紫杉醇白蛋白混悬液良好地解决了紫杉醇难溶于水的问题,但不具有穿透血-脑脊液屏障的功能。

同时时间内更易穿透血-脑脊液屏障,脑靶向性良好(图 6)。

讨 论

乳腺癌是所有脑转移肿瘤中仅次于肺癌的原发病灶。统计分析表明,HER-2 阳性以及 TNBC 型的乳腺癌发生脑转移的概率达 30%~40%^[7]。在一项回顾性研究中,1256 例诊断为脑转移的乳腺癌患者,中位总生存期(OS)为 8.7 个月,按照肿瘤亚型分组时,HER2 阳性的 OS 为 16.5 个月,三阴性乳腺

紫杉醇由于水溶性差的缺点使其在临床的应用受到一定限制,而为解决这一难题,选用生物相容性好的聚合物材料,并将药物包载于聚合物胶束中是比较有效的方法之一。胶束是聚合物材料在水中自组装形成的纳米级球形物,两亲性嵌段共聚物组成的胶束具有亲水的外壳基团和疏水的内壳基团,有良好的水溶性以及对疏水药物的包载能力,稳定性高,体内滞留时间长等特点,可以提高药物的稳定性和生物利用度,减轻不良反应,更重要的是,可以在胶束表面连接具有大脑内皮细胞特异性识别功能的靶向因子,实现主动靶向给药的目的^[9]。

本实验选择以乙腈为溶剂,采用薄膜水化法制备载紫杉醇 PEG-PLA 胶束 MIC-PTX。胶束对于紫杉醇的载药量与包封率平均为 15.55%、85.54%,MIC-PTX 粒径 $24.35 \pm 0.15\text{nm}$,ANG-MIC-PTX

平均粒径为 $27.16 \pm 0.2 \text{ nm}$ 。接有靶向分子的胶束粒径仍在 20 nm 左右。纳米颗粒在肿瘤组织中的渗透能力很大程度上由其粒径决定,有文献报道,从血管渗透至肿瘤组织间质的能力,小粒径(20 nm 左右)的纳米颗粒明显优于大粒径(100 nm 左右)的颗粒^[10]。因此 ANG - MIC - PTX 对肿瘤组织仍有较好的被动靶向作用。MIC - PTX 的 Zeta 电位为 $-4.01 \pm 0.12 \text{ mV}$, ANG - MIC - PTX 电位为 $-1.01 \pm 0.51 \text{ mV}$ ($P < 0.01$), 由于人体血液内大多数蛋白带正电荷,胶束不易产生溶血反应。体外释放的数据表明,将紫杉醇包载于胶束中还产生了一定的缓释效果,理论上能够减低药物的毒性不良反应,提高治疗时的单次给药剂量,并且药物维持有效浓度的时间得以延长。

综上所述,采用薄膜水化法制备载紫杉醇并连接有 Angiopep - 2 的 PEG - PLA 胶束(ANG - MIC - PTX)能通过血 - 脑脊液屏障,有治疗乳腺癌脑转移的潜力。脑靶向实验证实,接有靶向分子 Angiopep - 2 的胶束在相同的时间内能够大量地穿越 BBB 进入脑组织,在接下来的动物实验中,笔者将在荷瘤鼠中展开实验,进一步验证载有靶向分子的胶束能够有效地穿透血 - 脑脊液屏障到达脑转移瘤部位发挥抗肿瘤的功能。

参考文献

- Ghoncheh M, Momenimovahed Z, Salehiniya H. Epidemiology, incidence and mortality of breast cancer in Asia [J]. Asian Pac J Cancer
- Golden - Mason L, Palmer B, Klarquist J, *et al.* Upregulation of PD - 1 Expression on Circulating and Intrahepatic Hepatitis C Virus - Specific CD8⁺ T Cells Associated with Reversible Immune Dysfunction [J]. Journal of Virology, 2007, 81 (17): 9249 - 9258
- Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, *et al.* PD - 1 expression on HIV - specific T cells is associated with T - cell exhaustion and disease progression [J]. Nature, 2006, 443 (7109): 350 - 354
- Raziorrouh B, Heeg M, Kurkschiev P, *et al.* Inhibitory phenotype of HBV - specific CD4⁺ T - cells is characterized by high PD - 1 expression but absent coregulation of multiple inhibitory molecules [J]. PLoS One, 2014, 9 (8): e105703
- Zhang XM, Shan NN. The role of T cell immunoglobulin and mucin domain - 3 in immune thrombocytopenia [J]. J Immunol, 2014, 79 (4): 231 - 236
- Ju Y, Hou N, Meng J, *et al.* T cell immunoglobulin - and mucin - containing molecule - 3 (Tim - 3) mediates natural killer cell

- Prev, 2016, 17 (9): 47 - 52
- Tabouret E, Chinot O, Metellus P, *et al.* Recent trends in epidemiology of brain metastases: an overview [J]. Anticancer Res, 2012, 32 (11): 4655 - 4662
- Olson EM, Abdel - Rasoul M, Maly J, *et al.* Incidence and risk of central nervous system metastases as site of first recurrence in patients with HER2 - positive breast cancer treated with adjuvant trastuzumab [J]. Ann Oncol, 2013, 24 (6): 1526 - 1533
- Torchilin VP, Lukyanov AN, Gao Z, *et al.* Immunomicelles: targeted pharmaceutical carriers for poorly soluble drugs [J]. Proc Natl AcadSci USA, 2003, 100 (10): 6039 - 6044
- 陆伟, 谭玉珍, 蒋新国. 建立体外共培养脑屏障模型评价纳米粒的胞吞转运和毒性 [J]. 药学杂志, 2006, 41 (4): 296 - 304
- 李珺, 彭亮, 黄胜和, 等. 体外脑屏障模型的建立和发展 [J]. 广东医学, 2009, 30 (4): 647 - 648
- Kaplan MA, Isikdogan A, Koca D, *et al.* Biological subtypes and survival outcomes in breast cancer patients with brain metastases (study of the Anatolian Society of Medical Oncology) [J]. Oncology, 2012, 83 (3): 141 - 150
- Niikura N, Hayashi N, Masuda N, *et al.* Treatment outcomes and prognostic factors for patients with brain metastases from breast cancer of each subtype: a multicenter retrospective analysis [J]. Breast Cancer Res Treat, 2014, 147 (1): 103 - 112
- 李苏, 姜文奇, 王安训, 等. 5 - FU 核 - 壳型共聚物纳米胶束的制备及其体内释药的研究 [J]. 癌症, 2004, 23 (4): 381 - 385
- Yonemura Y, Ninomiya I, Yamaguchi A, *et al.* Evaluation of immunoreactivity for erbB - 2 protein as a marker of poor shortterm prognosis in gastric cancer [J]. Cancer Res, 1991, 51 (3): 1034 - 1038

(收稿日期: 2016 - 11 - 21)

(修回日期: 2016 - 11 - 29)

(上接第 54 页)

- suppression in chronic hepatitis B [J]. J Hepatol, 2010, 52 (3): 322 - 329
- Nebbia G, Peppia D, Schurich A, *et al.* Upregulation of the Tim - 3/galectin - 9 pathway of T cell exhaustion in chronic hepatitis B virus infection [J]. PLoS One, 2012, 7 (10): e47648
- Liu Q, Li XH, Lin BL, *et al.* 448 Coexpression of Tim - 3 and Pd - 1 in Hbv - specific Cd8 T cells in patients with hepatitis B virus related acute - on chronic liver failure [J]. J Hepatol, 2012, 56: S177 - S178
- Wang L, Zhao C, Peng Q, *et al.* Expression levels of CD28, CTLA - 4, PD - 1 and Tim - 3 as novel indicators of T - cell immune function in patients with chronic hepatitis B virus infection [J]. Biomed Rep, 2014, 2 (2): 270 - 274
- Peng G, Li S, Wu W, *et al.* PD - 1 upregulation is associated with HBV - specific T cell dysfunction in chronic hepatitis B patients [J]. Mol Immunol, 2008, 45 (4): 963 - 970

(收稿日期: 2016 - 09 - 01)

(修回日期: 2016 - 09 - 26)