

葡萄糖 - 黄连素纳米颗粒抑制脑胶质瘤的价值

郝志强 王树斌 朱 巍

摘 要 黄连素/盐酸小檗碱 (berberine hydrochloride, BBR) 是一种异喹啉类生物碱, 具有广泛的药理作用。研究发现, BBR 在 5% 葡萄糖 (Glu) 溶液中可自组装形成 200 ~ 300 nm 粒径的球状, 提高了水溶性、分散性和药物摄入量。近年来研究表明, BBR 在体外具有广泛的抗肿瘤活性, 而对脑胶质瘤的研究报道甚少。BBR - Glu 纳米颗粒通过诱导线粒体凋亡影响脑胶质瘤细胞的能量代谢; 导致细胞 G₂/M 期阻滞, 可能通过有丝分裂危象提高脑胶质瘤的放射治疗敏感度; 作用于细胞骨架, 可以降低肿瘤细胞的浸润能力和恶性表型。BBR 采用葡萄糖包被后可以通过 GLUT1/3 的转运穿过血 - 脑脊液屏障。BBR - Glu 纳米颗粒对脑胶质瘤通过多种作用机制影响脑胶质瘤的增殖, 由于 BBR 与传统的细胞毒类化疗药作用机制显著不同, 通过研究其在体内体外的抑瘤作用的机制, 可以联合传统治疗方式, 进一步提高脑胶质瘤的疗效。本研究通过纳米化组装构建葡萄糖包被的 BBR 纳米颗粒, 拟观察其有效的突破血 - 肿瘤屏障和血 - 脑脊液屏障, 并通过多种不同途径抑制脑胶质瘤的生长, 且对传统的放化疗具有潜在增敏的作用。

关键词 黄连素 葡萄糖 纳米颗粒 线粒体损伤 恶性脑胶质瘤

中图分类号 R73

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2023.01.007

黄连素又叫盐酸小檗碱 (berberine hydrochloride, BBR), 它是从清热解毒中药黄连及小檗碱属植物中提取分离得到的一种异喹啉类生物碱, 在传统中医药中广泛应用于大肠湿热, 赤白下痢, 里急后重或暴注下泻, 肛门灼热等。随着现代药理学研究发现, BBR 具有调节免疫、消炎、杀菌、降压、降糖、抗血小板聚集以及抗肿瘤等作用, 故临床上可用于肠炎、心血管疾病、糖尿病以及恶性肿瘤等疾患^[1]。特别是在乳腺癌、前列腺癌、肝癌、肠癌、黑色素瘤和神经胶质瘤的研究中发现, BBR 通过抑制细胞增殖、促进细胞凋亡、阻止肿瘤细胞迁移和浸润、增加肿瘤细胞对放疗射线的敏感度以及为化疗药物增敏等方面达到抗肿瘤的作用^[2,3]。

一、黄连素的抗肿瘤机制以及给药途径

黄连素的具体抗肿瘤机制可能体现在以下方面, BBR 通过复杂的信号通路抑制多种肿瘤细胞的恶性增殖, 但对不同的肿瘤细胞的作用特点也不完全相同, 例如在细胞周期方面, BBR 能使分裂的细胞停滞于 G₀/G₁ 期, 抑制 DNA 合成^[4]。另有研究表明, BBR 通过影响 p21 蛋白表达, 阻滞肿瘤细胞于 G₂/M 期, 提高放化疗的敏感度, 同时通过有丝分裂危象途径杀灭肿瘤细胞; 也有文献报道, BBR 可以直接杀死肿瘤

干细胞^[5]。此外, 既往研究显示, BBR 可通过抑制缺氧诱导因子 - 1 α (hypoxia - inducible factor - 1 α , HIF - 1 α) 的表达来抑制肿瘤血管形成, 阻断肿瘤细胞、血管内皮细胞及胞外基质之间的黏附等多种途径抑制肿瘤的生长, 但其是否可以通过表观调控来影响肿瘤侵袭或血管新生等方面尚无系统报道。

BBR 给药途径的差异能导致吸收率的显著差异, 在大鼠的多途径 BBR 给药模式研究 (如口服、腹腔注射、尾静脉注射等) 中发现, 口服途径最为安全, 无半数致死量 (LD₅₀), 腹腔注射次之 (LD₅₀ 为 57.6103 mg/kg), 静脉给药有着较低的 LD₅₀ (9.0386 mg/kg), 伴随大鼠心率的降低^[6]。在 200 mg/kg BBR 口服给药后, 结合液相色谱串联质谱 (liquid chromatography - mass spectroscopy/mass spectroscopy, LC - MS/MS) 技术, 发现 BBR 快速分布到肝脏、肾脏、肌肉、肺、脑、心脏、胰腺等组织, 在随后的 4 h, BBR 能稳定滞留于肝脏、肾脏、脑和胰腺组织, 并伴随 4 种代谢物的产生^[7]。在 BBR 处理的小鼠、大鼠和家兔中都均没有出现急性毒性, 药代动力学及对血 - 脑脊液屏障 (blood brain barrier, BBB) 的通透性的研究中发现, BBR 对血 - 脑脊液屏障的通透有两个方向, 即从血液循环入脑以及从脑到外周循环。然而, 这两个方向存在着显著差异, 药物血液循环入脑 (静脉给药) 比从脑扩散到外周循环 (脑室内注射) 困难得多, 从而表现为 BBR 在脑组织内的累

基金项目: 内蒙古自治区卫生健康科技计划项目 (202202299)

作者单位: 014040 包头市中心医院、包头医学院肿瘤防治研究所

通信作者: 朱巍, 电子信箱: 18686111667@163.com

积。而关于 BBR 是否能直接穿透血 - 脑脊液屏障,少数研究认为,BBR 可以透过 BBB,但缺乏对相应的机制的进一步研究^[8]。

二、恶性脑胶质瘤的治疗现状和瓶颈问题

脑胶质瘤发生率约为 12/10 万,约占颅内所有肿瘤的 49%,大部分为恶性表现,容易发生肿瘤播散及复发,且有难治性的特点,恶性脑胶质瘤的 5 年生存率为 6%^[9]。脑胶质瘤在脑实质内呈弥漫浸润性生长,肉眼很难分辨肿瘤的组织学边界,且由于脑功能区的限制,仅依靠经验和肉眼判断,切除程度难以完全切除肿瘤^[10],临床上一般手术切除不会超过影像学上所见的肿瘤边界。因此,尽管显微手术技术在不断进步,但切除术后早期复查脑 MRI 结果提示仍有约 40% 的脑胶质瘤存在残留表现。目前临床上仍然无法通过影像学技术来有效地确定脑胶质瘤的具体边界,脑胶质瘤播散、侵袭的规律也无规律可循;在局部放射治疗方面,脑胶质瘤的放射致死量显著高于正常脑组织的耐受量,所以肿瘤区域局部加量也无法达到肿瘤的放射致死量,不能有效杀灭肿瘤。

血 - 脑脊液屏障是动物神经系统中由毛细血管壁与神经胶质细胞紧致相连而形成的血浆与脑细胞组织间的屏障,以及由脉络丛形成的血浆与脑脊液间的屏障,血 - 脑脊液屏障作为脑和脊髓内的一个动态的调节界面,为大脑和脊髓维持一个相对稳定的内环境。在临床治疗中,很多药物不能透过 BBB,这也是造成中枢神经系统疾患用药在给药途径上的一个瓶颈。替莫唑胺 (temozolomide, TMZ) 是目前脑胶质瘤治疗的一线标准口服烷化剂,TMZ 的耐药是造成脑胶质瘤化疗失败的主要原因之一,脑胶质瘤化疗耐药的原因是多方面因素共同作用造成的结果,是一个十分复杂的互相作用的生物学过程,近年来,在脑胶质瘤药物治疗方面选择 TMZ 和生物靶向药物联用是比较活跃的一个研究领域,联合用药可能提高抗肿瘤疗效并且降低患者的毒性反应。另外,由于解剖结构、神经功能和放射抵抗等因素的限制,脑胶质瘤局部治疗的手段难以完全控制肿瘤,治疗效果差,复发率高。临床上,脑胶质瘤的治疗仍然难以取得令人满意的效果,寻找新的药物和靶向治疗手段是目前的热点。

近年来,随着医学科技的大踏步前进,学科之间甚至不同领域的相互交叉融合,尤其是多学科协同理念的不断强化以及实践,脑胶质瘤的临床治疗方法呈

现多样化且相关技术均有显著的进步,目前已形成了以手术切除为主,联合放化疗、靶向治疗、免疫治疗等其他方法的综合治疗体系,也不乏有尚在实验研究阶段的中枢神经系统靶向给药的方法,包括颈内动脉注射高渗性药物,靶向单克隆抗体偶联药物后系统途径给药,脑内直接注射给药,脂质体技术包载药物以增加脑脊液中的药物浓度,病毒载体介导基因后直接脑内注射,利用缓激肽拮抗剂或者穿膜肽促使毛细血管内皮细胞膜性改变 BBB 的通透性。但是这些方法均有其不足,表现在制备工艺太复杂;中枢神经系统对脂质体的摄入特异性较差,导致其他正常组织器官分布较多及其相应的不良反应;病毒载体介导基因和脑内注射方式也存在安全隐患。

针对恶性胶质瘤的靶向药物在体内的输送是一个级联过程,纳米载体需要连续突破多重的生物屏障才能达到输送的高效性,才能进一步提高纳米药物的治疗效果;药物在血浆中长时间保留可以实现在颅内肿瘤组织中的富集以进一步提高浓度取得更好的疗效;克服肿瘤周围的肿瘤组织代谢环境(血 - 肿瘤屏障)的阻碍(由组织缺氧、酸中毒、间质高压,以及产生的大量生长因子和蛋白水解酶,免疫炎性反应等形成),渗透到肿瘤组织中的每个部分以作用于所有的肿瘤细胞,快速地进入到各个肿瘤细胞,并且在细胞内将药物快速释放以期充分达到抗肿瘤作用。若需实现上述多级连续的过程,目前已有的功能单一的载体材料是难以实现的,这就需要进一步根据药物输送过程中关键屏障的性能和特点,来设计相对应的性能的材料,多项功能协同克服上述药物输送过程中的各种生物屏障。

三、纳米技术在黄连素中的应用

随着科技的发展,纳米材料由于其独特的理化和生物性质在药物制备中产生越来越广泛的应用^[11]。近期初步研究显示,纳米药物分子与传统的肿瘤化学治疗药物比较,具备其独有的生物特性,比如:纳米颗粒可以更好地通过生物体内的各种生理屏障,从而充分进入循环系统,纳米药物分子的靶受体可能与传统的肿瘤化学治疗药物的受体不同;特定大小的纳米材料可通过逃避机体免疫系统的攻击,增加了它在体内的半衰期;同时,纳米材料所产生的被动靶向效应可实现对肿瘤部位的靶向效果。这表明纳米药物的杀伤以及抑制肿瘤的具体机制可能不同于传统化学治疗药物的具体机制。脑胶质瘤由于血 - 脑脊液屏障的存在,导致水溶性药物透过率低,难以在胶质瘤内

形成有效的血药浓度。

纳米材料是利用纳米颗粒的小尺寸以及表面效应来改善机体对药物的吸收效果且同时可以达到人工控制药物的释放的效果^[12]。通过药物的纳米化组装,提高药物穿过血-脑脊液屏障的能力,更改其布局,提升其生物利用度等,所以纳米化药物可以在颅内更好地发挥疗效。与传统的化疗药物比较,纳米化药物可以提高稳定性以及靶向性。对拟设的组织、器官具有靶向作用,而且可以更好地进入靶细胞或细胞器中,纳米化药物浓聚于靶细胞更加提高了治疗效果,也可以显著减轻因药物分布广泛而引起的相关不良反应^[13]。这正是临床中应用毒性不良反应较大的抗肿瘤药物所期待的途径,所以对于脑胶质瘤的治疗纳米化药物具有显著优势。直径为 30~100nm 的纳米颗粒的相关理化、生物性能优越,易于机体内形成长循环系统,可以更加有效地通过血-脑脊液屏障,进入中枢神经系统,达到更好的靶向给药效果。

葡萄糖包被的黄连素/盐酸小檗碱纳米颗粒(glucose-coated berberine nanoparticle, BBR-Glu NP)粒径为 238nm,较 BBR-Water 的 475nm 有显著的生物学优势。肿瘤生长需要消耗大量的能量和氧气,肿瘤的失控性生长使肿瘤细胞的增殖能力远远超过了为其供应能量的滋养血管的增殖能力,能量供应相对不足,而且肿瘤细胞在有氧的条件下,也主要是以糖酵解途径获得能量,导致葡萄糖大量的消耗,而 ATP 的生成仍不能满足自身的需要。因此,肿瘤细胞需要通过葡萄糖转运蛋白(glucose transporter, GLUT)的高表达,促进细胞内葡萄糖转运且可以促进糖代谢,以维持肿瘤细胞基本的葡萄糖代谢顺利进行。

肿瘤细胞和血-脑脊液屏障的葡萄糖转运蛋白表达明显高于正常细胞,一些证据表明, GLUT1/3 能够介导葡萄糖包被的纳米颗粒穿过血-脑脊液屏障和血-肿瘤屏障^[14~17]。 GLUT1/3 主要是依靠细胞膜内外葡萄糖的浓度差将其由细胞外转运到细胞内。葡萄糖包被的纳米金、氧化镁、铁等纳米颗粒已经显示出对肿瘤独特的靶向性,尤其是葡萄糖包被的金纳米颗粒已经证实可以通过血-脑脊液屏障^[18~21]。一般而言,肿瘤细胞的生长较正常细胞均旺盛,其能量来源主要为葡萄糖的酵解,葡萄糖包被的纳米颗粒有望通过葡萄糖的转运途径进入细胞内,对代谢活跃的肿瘤具有更好的组织靶向性^[22]。前期工作发现, BBR-Glu NP 对脑胶质瘤细胞的线粒体有独特的亲

和性,线粒体既是细胞能量代谢的主要环境,又可以促进细胞的凋亡,会在能量代谢途径影响肿瘤的恶性行为。 BBR-Glu NP 可过线粒体途径影响脑胶质瘤细胞的能量代谢,ROS 聚集,线粒体嵴结构的破坏甚至消失,以及促进细胞 G₂/M 期阻滞与细胞凋亡。同时, BBR-Glu NP 对脑胶质瘤 U251 和 U87 G₂/M 期阻滞,将对放射治疗具有潜在的增敏作用,可能通过有丝分裂危象提高脑胶质瘤的放疗敏感度。鉴于 BBR-Glu NP 对中枢神经系统肿瘤作用机制的研究还未见报道,因此,探索 BBR-Glu NP 在脑胶质瘤的靶向治疗方面具有一定的临床意义。

四、展 望

葡萄糖包被的黄连素混合纳米颗粒较水溶性黄连素具有更好的药物摄入量和细胞杀伤性,而且体外实验已显示出葡萄糖包被的黄连素/盐酸小檗碱混合纳米颗粒可以通过线粒体代谢途径引起脑胶质瘤细胞生长抑制、周期阻滞、凋亡增加,但是仍有很多问题有待于进一步研究了解,比如该纳米药物是否能够有效透过血-脑脊液屏障,通过血-脑脊液屏障后该药物是否能够准确靶向至原位脑胶质瘤模型,同时该药物是否确实能够协助增强放化疗敏感度等方面仍缺乏相应的研究。该药物的相关药物实验若能证实上述机制,将为脑胶质瘤的治疗带来革命性的成果,甚至可以延伸至其他恶性肿瘤的治疗领域,同时也将进一步为中药抗肿瘤基础研究添砖加瓦,因此,探索新型纳米药物的制备在脑胶质瘤治疗中具有潜在的临床意义。

参考文献

- 1 Singh IP, Mahajan S. Berberine and its derivatives: a patent review (2009-2012) [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2013, 23(2): 215-231
- 2 Mahata S, Bharti AC, Shukla S, *et al.* Berberine modulates AP-1 activity to suppress HPV transcription and downstream signaling to induce growth arrest and apoptosis in cervical cancer cells [J]. *Mol Cancer*, 2011, 10: 39
- 3 Tong N, Zhang J, Chen Y, *et al.* Berberine sensitizes multiple human cancer cells to the anticancer effects of doxorubicin in vitro [J]. *Oncol Lett*, 2012, 3(6): 1263-1267
- 4 Eom KS, Hong JM, Youn MJ, *et al.* Berberine induces G1 arrest and apoptosis in human glioblastoma T98G cells through mitochondrial/caspases pathway [J]. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31(4): 558-562
- 5 Park SH, Sung JH, Chung N. Berberine diminishes side population and down-regulates stem cell-associated genes in the pancreatic cancer cell lines PANC-1 and MIA PaCa-2 [J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 394(1-2): 209-215
- 6 Kheir MM, Wang Y, Hua L, *et al.* Acute toxicity of berberine and its correlation with the blood concentration in mice [J]. *Food Chem Toxicol*

- col, 2010, 48(4): 1105–1110
 - 7 Tan XS, Ma JY, Feng R, *et al.* Tissue distribution of berberine and its metabolites after oral administration in rats[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e77969
 - 8 Lu J, Cao Y, Cheng K, *et al.* Berberine regulates neurite outgrowth through AMPK – dependent pathways by lowering energy status[J]. Exp Cell Res, 2015, 334(2): 194–206
 - 9 Visser O, Ardanaz E, Botta L, *et al.* Survival of adults with primary malignant brain tumours in Europe; Results of the EUROCARE – 5 study[J]. Eur J Cancer, 2015, 51(15): 2231–2241
 - 10 De la Garza – Ramos R, Kerezoudis P, Tamargo RJ, *et al.* Surgical complications following malignant brain tumor surgery: an analysis of 2002–2011 data[J]. Clin Neurol Neurosurg, 2016, 140: 6–10
 - 11 Tan W, Li Y, Chen M, *et al.* Berberine hydrochloride: anticancer activity and nanoparticulate delivery system[J]. Int J Nanomedicine, 2011, 6: 1773–1777
 - 12 Xie Z, Shen Q, Xie C, *et al.* Retro – inverso bradykinin opens the door of blood – brain tumor barrier for nanocarriers in glioma treatment [J]. Cancer Lett, 2015, 369(1): 144–151
 - 13 Bhaw – Luximon A, Jhurry D. New avenues for improving pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) treatment: selective stroma depletion combined with nano drug delivery[J]. Cancer Lett, 2015, 369(2): 266–273
 - 14 Gromnicova R, Yilmaz CU, Orhan N, *et al.* Localization and mobility of glucose – coated gold nanoparticles within the brain[J]. Nanomedicine (Lond), 2016, 11(6): 617–625
 - 15 Barbaro D, Di Bari L, Gandin V, *et al.* Glucose – coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles prepared by metal vapour synthesis are electively internalized in a pancreatic adenocarcinoma cell line expressing GLUT1 transporter [J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0123159
 - 16 Venturelli L, Nappini S, Bulfoni M, *et al.* Glucose is a key driver for GLUT1 – mediated nanoparticles internalization in breast cancer cells [J]. Sci Rep, 2016, 6: 21629
 - 17 Hu C, Niestroj M, Yuan D, *et al.* Treating cancer stem cells and cancer metastasis using glucose – coated gold nanoparticles[J]. Int J Nanomedicine, 2015, 10: 2065–2077
 - 18 Gromnicova R, Davies HA, Sreekanthreddy P, *et al.* Glucose – coated gold nanoparticles transfer across human brain endothelium and enter astrocytes in vitro[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e81043
 - 19 Bafghi AF, Daghighi M, Daliri K, *et al.* Magnesium oxide nanoparticles coated with glucose can silence important genes of Leishmania major at sub – toxic concentrations[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2015, 136: 300–304
 - 20 Ding Y, Shen SZ, Sun H, *et al.* Design and construction of polymerized – chitosan coated Fe₃O₄ magnetic nanoparticles and its application for hydrophobic drug delivery[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2015, 48: 487–498
 - 21 Barbaro D, Di Bari L, Gandin V, *et al.* Glucose – coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles prepared by metal vapour synthesis are electively internalized in a pancreatic adenocarcinoma cell line expressing GLUT1 transporter [J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0123159
 - 22 Yin J, Gao Z, Liu D, *et al.* Berberine improves glucose metabolism through induction of glycolysis[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008, 294(1): E148–156
- (收稿日期: 2022–03–27)
(修回日期: 2022–04–05)

(上接第 14 页)

- 27 Landemaine T, Jackson A, Bellahcène A, *et al.* A six – gene signature predicting breast cancer lung metastasis[J]. Cancer Res, 2008, 68(15): 6092–6099
 - 28 Kong J, Du J, Wang Y, *et al.* Focal adhesion molecule Kindlin – 1 mediates activation of TGF – β signaling by interacting with TGF – β RI, SARA and Smad3 in colorectal cancer cells[J]. Oncotarget, 2016, 7(46): 76224–76237
 - 29 Sin S, Bonin F, Petit V, *et al.* Role of the focal adhesion protein kindlin – 1 in breast cancer growth and lung metastasis[J]. J Natl Cancer Inst, 2011, 103(17): 1323–1337
 - 30 Sarvi S, Patel H, Li J, *et al.* Kindlin – 1 promotes pulmonary breast cancer metastasis[J]. Cancer Res, 2018, 78(6): 1484–1496
 - 31 王鹏, 战军, 宋佳桂, 等. Kindlin – 1 和 Kindlin – 2 的差异表达与食管癌的进程及流行病学特点的相关性[J]. 中国科学: 生命科学, 2017, 60(11): 1214–1222
 - 32 马华星, 葛勇胜, 侯昌龙, 等. Kindlin – 1 在肝细胞性肝癌中的表达作用及其临床意义[J]. 安徽医科大学学报, 2014, 49(12): 1762–1765
 - 33 Mizutani H, Masuda K, Nakamura N, *et al.* Cutaneous and laryngeal squamous cell carcinoma in mixed epidermolysis bullosa, kindler syndrome[J]. Case Rep Dermatol, 2012, 4(2): 133–138
 - 34 Nusse R, Clevers H. Wnt/ β – catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities[J]. Cell, 2017, 169(6): 985–999
 - 35 苏小珊, 吴炜景, 林晓萍, 等. Kindlin 家族调控 Wnt/ β – catenin 信号通路的研究进展[J]. 生命科学, 2020, 32(5): 424–430
 - 36 Rognoni E, Widmaier M, Jakobson M, *et al.* Kindlin – 1 controls Wnt and TGF – β availability to regulate cutaneous stem cell proliferation[J]. Nat Med, 2014, 20(4): 350–359
- (收稿日期: 2022–01–25)
(修回日期: 2020–03–22)