

# 不同表面性质纳米脂质体对肝肿瘤细胞摄取的影响

李文婷, 王璐, 张灿\*

(中国药科大学新药研究中心, 南京 210009)

**摘要** 以紫杉醇为模型药物, 选用不同的脂质材料制备不同电性和粒径的紫杉醇脂质体, 考察其体外药物释放特性。通过细胞摄取实验研究不同表面性质脂质体在肝肿瘤细胞系中的摄取。制剂的体外释药实验显示, 48 h 累积释放量均不超过 30%, 具有缓释特征。采用 MTT 法考察了制剂的细胞毒性, 发现紫杉醇质量浓度低于 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 细胞 48 h 存活率不低于 80%。比较了两种肿瘤细胞摄取能力的差异, 并测定了肝肿瘤细胞 BEL-7402 细胞和 HepG2 细胞 48 h 内对药物的摄取。结果表明, 随着制剂粒径的减小和表面 Zeta 电位的增大, 细胞摄取药物增加。

**关键词** 紫杉醇; 脂质体; 表面性质; 释放; 肝肿瘤细胞; 细胞摄取

**中图分类号** R944    **文献标志码** A    **文章编号** 1000-5048(2013)03-0244-05

## Influence of surface characteristics on hepatocellular carcinoma cells uptake of nano-liposomes

LI Wenting, WANG Lu, ZHANG Can\*

Center of Drug Discovery, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

**Abstract** Liposomes with different surface characteristics were prepared based on different lipid materials and preparation conditions. Paclitaxel (PTX) was selected as the model drug. The release characteristics of these liposomes were investigated. The uptake of liposomes of different surface properties in hepatocellular carcinoma cells were studied through cellular uptake experiment. All these liposomes showed sustained release property, as their accumulative release amounts were less than 30% in 48 h. The cytotoxicity of every preparation was evaluated with MTT method. Hepatocellular carcinoma cells survived more than 80% when the concentration of PTX was below 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in 48 h. The effect of different surface characteristics on uptake of liposomes by hepatocellular carcinoma cell lines (BEL-7402 cells and HepG2 cells) was investigated through quantification of PTX in cells. Cell uptake results indicated that preparations with smaller size or higher Zeta potential showed more PTX uptake.

**Key words** paclitaxel; liposomes; surface characteristics; release; hepatocellular carcinoma cell; cell uptake

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81072589, 81273468)

近年来, 脂质体广泛应用于抗肿瘤药物载体的研究。如何提高细胞对脂质体的摄取, 是进一步提高脂质体药物传递效率及降低不良反应的关键。纳米载体的表面性质如粒径、表面电性及亲水性等是影响细胞摄取的主要因素<sup>[1-2]</sup>。其中, 纳米载体表面的 Zeta 电位对摄取具有较大的影响。由于细胞膜表面带负电, 使得正电性纳米粒更容易被这些细胞摄取或内化。本实验室设计合成了模拟磷脂

的阳离子脂质 2-(2,6-二氨基己酰胺基)乙酸十八醇酯(图 1)。该脂质以十八烷基为疏水链, 在脂质体制备过程中可以进入磷脂双分子层的疏水区域。脂质结构中, 甘氨酸充当连接臂作用, 分别通过酯化反应和酰胺化反应链接十八醇和赖氨酸。赖氨酸上的氨基在水中质子化, 脂质体呈正电性<sup>[3]</sup>。Prabha 等<sup>[4]</sup>研究发现, 纳米粒的粒径尺寸会影响基因表达水平, 在 COS-7 细胞中, 小粒径纳米粒转

\* 收稿日期 2013-04-07    \*通信作者 Tel: 025-83271171 E-mail: zhangcan@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81072589, 81273468)

染效率比大粒径高出 27 倍; Champion 等<sup>[5]</sup>考察了粒径范围在 60 nm~30 μm 的 20 多种形态不一的聚合物粒子的细胞吞噬行为, 进一步验证了细胞吞噬作用具有粒径尺寸选择性。

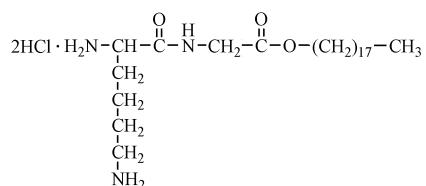


Figure 1 Structure of amino acid based cationic lipid

本研究以紫杉醇为模型药物, 制备具有不同表面电性和粒径的脂质体, 考察其体外药物释放特性; 通过 MTT 法评价不同制剂对肝肿瘤细胞系 (BEL-7402 细胞和 HepG2 细胞) 的毒性; 最后通过细胞摄取实验研究了不同表面性质脂质体在两种肝肿瘤细胞系中摄取的差异。

## 1 材 料

### 1.1 药品、细胞与试剂

紫杉醇(纯度 99.66%, 无锡红豆杉药业有限公司); 大豆卵磷脂[磷脂酰胆碱(PC)含量 80%、95%, 上海太伟有限公司]; 寡肽阳离子脂质[2-(2,6-二氨基己酰胺基)乙酸十八醇酯, 本课题组自制]; 海藻糖、吐温 80(国药集团化学试剂有限公司); 人肝癌细胞系 HepG2 和人肝癌细胞系 BEL-7402(中国药科大学新药研究中心提供); 高糖 DMEM、胎牛血清、噻唑蓝(MTT)、蛋白定量分析试剂盒(美国 Thermo 公司); 其余试剂均为分析纯; 水为超纯水。

### 1.2 仪 器

透析袋(截留相对分子质量 14 000, 北京经科宏达生物技术有限公司); ZRS-8G 智能溶出实验仪器(天津市天大天发科技有限公司); 激光粒度分析仪(美国 Brookhaven 公司); LC-2010AHT 高效液相色谱仪、紫外检测器(日本岛津公司); 标准细胞培养箱、酶联免疫检测仪(美国 Thermo 公司); 倒置显微镜(日本 Olympus 公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 薄膜分散法制备紫杉醇脂质体

精密称取大豆卵磷脂 150 mg、胆固醇 5 mg、紫

杉醇 5 mg, 溶于氯仿 5 mL 中, 置于 500 mL 茄形瓶中, 于 40 ℃ 水浴中旋蒸除去有机溶剂, 在茄形瓶内壁形成脂质薄膜, 加入超纯水 5 mL, 37 ℃ 充分振荡水合, 得到约含 1 mg/mL 紫杉醇的脂质体混悬液, 用超声波细胞粉碎机分散, 即得紫杉醇脂质体。

**2.1.1 负电性脂质体的制备** 使用 PC 含量为 80% 大豆卵磷脂, 制备紫杉醇脂质体混悬液, 并将其用超声波细胞粉碎机进行分散, 超声强度分别为 13, 65, 130 W, 超声时间分别为 1, 10, 30 min, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 制备不同粒径的负电性脂质体制剂。

**2.1.2 正电性脂质体的制备** 将 PC 含量为 95% 的大豆卵磷脂与正电性脂质寡肽阳离子脂质 2-(2,6-二氨基己酰胺基)乙酸十八醇酯一起分散于氯仿中, 按“2.1.1”项下的超声条件制备不同粒径的正电性脂质体制剂。

**2.1.3 近中性脂质体的制备** 使用 PC 含量为 95% 的大豆卵磷脂, 按“2.1.1”项下的超声条件制备不同粒径的近中性脂质体制剂。由于近中性制剂粒子间几乎没有静电排斥作用, 稳定性差, 因此需制成冻干粉。为保证冻干粉复溶, 在溶液中加入 60% 海藻糖作为冻干保护剂。冻干后渗漏率为  $(1.96 \pm 0.93)\%$ , 冻干粉外观性状良好。

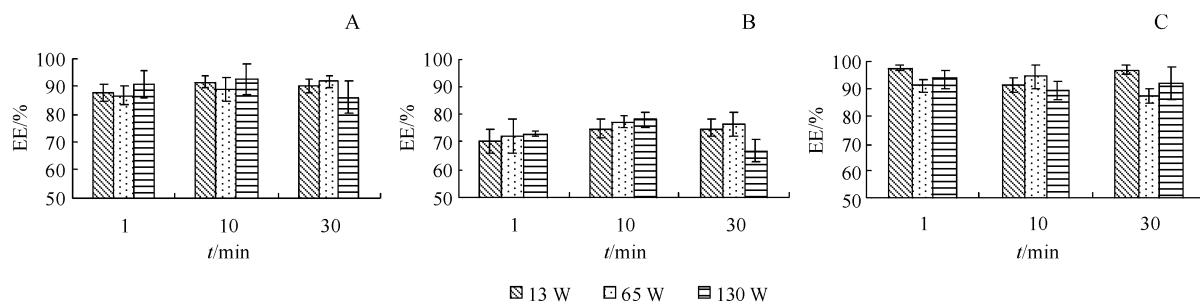
### 2.2 脂质体包封率测定

采用 RP-HPLC 法测定脂质体中紫杉醇的含量<sup>[6]</sup>。色谱条件:Diamonsil® C<sub>18</sub> 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(75:25); 检测波长: 227 nm; 流速: 1 mL/min; 柱温: 25 ℃; 进样体积: 20 μL。峰面积对质量浓度的线性回归方程为:  $A = 4.65 \times 10^4 c - 3.62 \times 10^4$  ( $r = 0.9999$ ), 紫杉醇在 10~100 μg/mL 范围内线性良好, 符合定量分析要求。

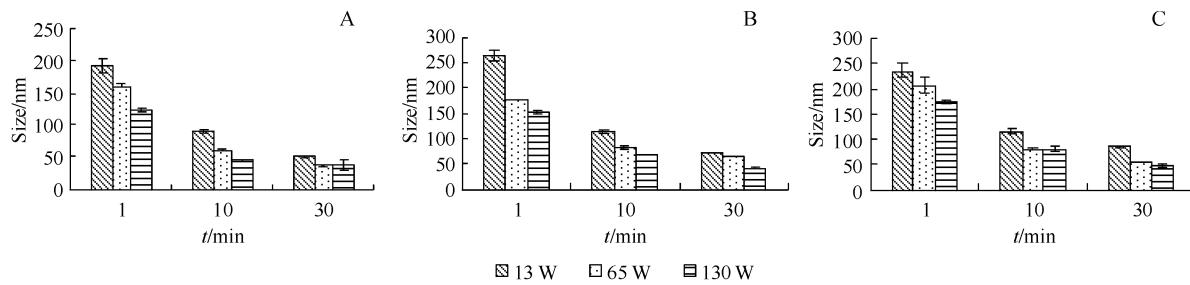
精密量取紫杉醇脂质体溶液 200 μL 于 5 mL 量瓶中, 甲醇定容, 振摇混匀, 取 20 μL 进样分析, 测定紫杉醇含量, 计算包封率。不同表面性质的紫杉醇纳米脂质体包封率测定结果如图 2 所示。其中负电性脂质体包封率在 85% 左右, 正电性包封率在 75% 左右, 近中性脂质体包封率在 90% 左右。

### 2.3 粒径和 Zeta 电位的测定

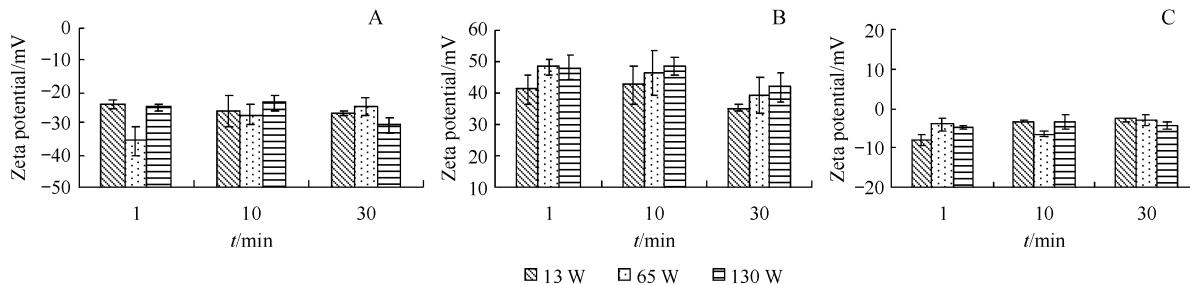
取适量紫杉醇脂质体溶液, 去超纯水稀释 100 倍, 用激光粒度分析仪测定其粒径及 Zeta 电位, 结果见图 3,4。



**Figure 2** Influence of ultrasonic conditions on the encapsulation efficiency (EE) of drug loaded negative (A), positive (B) and neutral liposomes (C) ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )



**Figure 3** Influence of ultrasonic conditions on the size of drug loaded negative (A), positive (B) and neutral liposomes (C) ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )



**Figure 4** Influence of ultrasonic conditions on the Zeta potential of drug loaded negative (A), positive (B) and neutral liposomes (C) ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

为了获得不同表面电性的制剂,本研究选用PC含量不同的磷脂材料制备了近中性脂质体(Zeta电位约为-5 mV)和负电性脂质体(Zeta电位约为-25 mV),加入阳离子脂质材料制备了正电性脂质体(Zeta电位约为45 mV)。

超声时间越长,强度越大则粒径越小,但是持续增强超声条件不仅损耗机器还会影响脂质体稳定性。参考相关文献<sup>[7]</sup>,综合考虑脂质体的粒径范围(80~200 nm),本研究制备正电性和近中性脂质体的超声条件分别为130 W,30 min;13 W,10 min及65 W,1 min,所得脂质体粒径分别为40,110,200 nm。制备负电性脂质体的超声条件分别为65 W,30 min;130 W,1 min;13 W,1 min所得脂质体粒径为40,110,200 nm。

#### 2.4 不同电性脂质体的体外释放

取紫杉醇脂质体溶液1.0 mL放入透析袋

中,置于含1.0%吐温80的pH 7.4磷酸盐缓冲液150 mL中,分别于1,3,6,10,14,19,24,30,36,48 h取出透析袋外溶液1.0 mL,0.45 μm微孔滤膜过滤,同时补充同温同量释放介质,HPLC测定含量,计算各时间点累积释药百分率,绘制释药曲线。

据文献<sup>[8]</sup>报道,在本研究所用的透析介质中,紫杉醇的饱和溶解度为76 μg/mL,释放实验符合漏槽条件。不同电性的紫杉醇脂质体的释放特性如图5。结果显示,所有脂质体48 h累积释放都低于30%,均呈现了明显的缓释特性。从不同电性的紫杉醇脂质体的释放曲线可知,粒径对脂质体释放有一定的影响,随着粒径增大,脂质体的累积释放呈现减少的趋势。不同电性,相同粒径尺寸的载药脂质体中,正电性和负电性脂质体的累积释放量接近,近中性脂质体的累积释放明显较低。

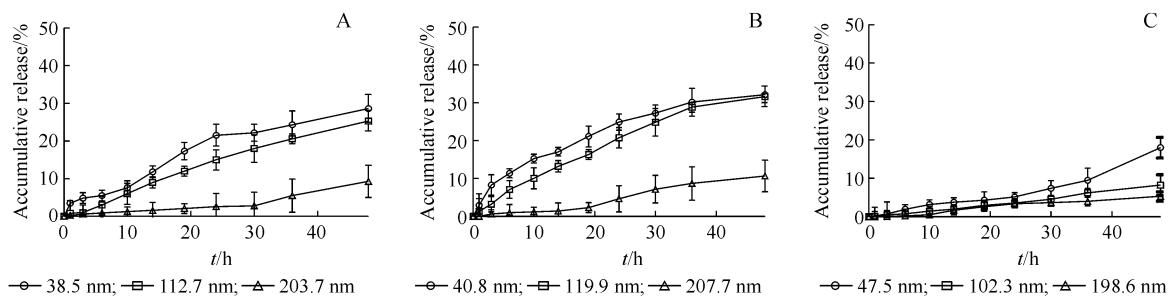


Figure 5 Accumulative release profiles of drug loaded negative (A), positive (B), neutral (C) liposomes ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

## 2.5 MTT 法评价制剂毒性

将对数生长期 BEL-7402、HepG2 细胞,按每孔  $1 \times 10^5$  个细胞的密度接种于 96 孔板中,加培养液至  $200 \mu\text{L}$ ,培养 24 h 后移出培养液,加入不同电性的脂质体,用培养基稀释至  $200 \mu\text{L}$ ,使药物浓度分别为  $1, 20, 50, 100, 250, 500 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,培养 48 h 后,

每孔加噻唑蓝 (MTT,  $5 \text{ mg}/\text{mL}$ )  $20 \mu\text{L}$ ,  $37^\circ\text{C}$  继续孵育 4 h。弃去上清液,加入 DMSO  $150 \mu\text{L}$  溶解甲瓒结晶,用酶联免疫检测仪于  $570 \text{ nm}$  测定吸收度。以空白培养基为对照,以不含细胞孔为细胞培养板的空白背景,每个样品做 5 个复孔。MTT 实验结果如图 6 所示。

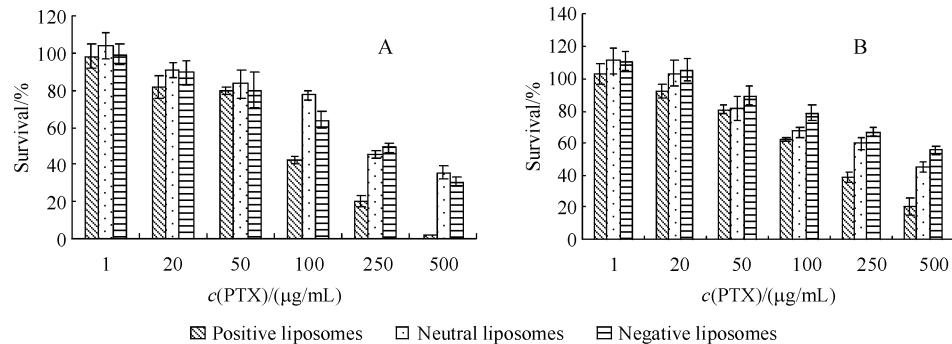


Figure 6 Cytotoxicity of paclitaxel (PTX) loaded positive, neutral, negative liposomes against BEL-7402 cells (A) and HepG2 cells (B) ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

由两种肝癌细胞的 MTT 毒性考察结果可见,相同药物浓度下正电性脂质体的毒性强于近中性和负电性脂质体,且随着药物浓度增大,细胞存活率下降趋势较另外两种制剂更为明显。所有脂质体在药物质量浓度为  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$  时,细胞存活率均高于 80%。因此选择  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$  作为细胞摄取实验的最大药物浓度。

## 2.6 细胞摄取

按“2.2”项下方法制得不同电性紫杉醇脂质体,测定含量和包封率,用 pH 7.4 的 PBS 溶液稀释,使紫杉醇终浓度为  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,分别测定稀释后的粒径大小和电位。

分别将 BEL-7402 细胞和 HepG2 细胞培养至对数生长期。以每孔  $1 \times 10^5$  个细胞的密度接种于 24 孔细胞培养板中,  $37^\circ\text{C}$  培养 24 h 后,吸去培养液,每孔加不含血清培养液  $400 \mu\text{L}$  孵化 15 min 后

弃去,再加入不含血清培养液稀释的制剂 ( $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ )  $400 \mu\text{L}$ ,  $37^\circ\text{C}$  继续孵化。48 h 后移去培养液,每孔加 PBS  $400 \mu\text{L}$  洗涤 3 次,除去游离细胞和脂质体溶液。加入细胞裂解液 ( $0.1\%$  的十二烷基硫酸钠水溶液)  $200 \mu\text{L}$  裂解细胞,  $12\,000 \text{ r}/\text{min}$  离心 10 min。取上清液  $10 \mu\text{L}$  进行 BCA 蛋白含量分析,并取上清液  $100 \mu\text{L}$  加入相同体积甲醇沉淀蛋白,提取紫杉醇,离心后 HPLC 分析紫杉醇含量。紫杉醇细胞摄取量 ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) = 摄取入胞紫杉醇浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) / 细胞蛋白含量 ( $\text{mg}/\text{mL}$ )。

由图 7 可知, BEL-7402 细胞及 HepG2 细胞摄取脂质体,药物摄取总量均随着粒径的减少而增大;摄取表面电性不同的脂质体时,摄取量大小依次为正电性制剂、近中性制剂和负电性制剂。相同条件下, BEL-7402 细胞摄取的药量多于 HepG2 细胞。

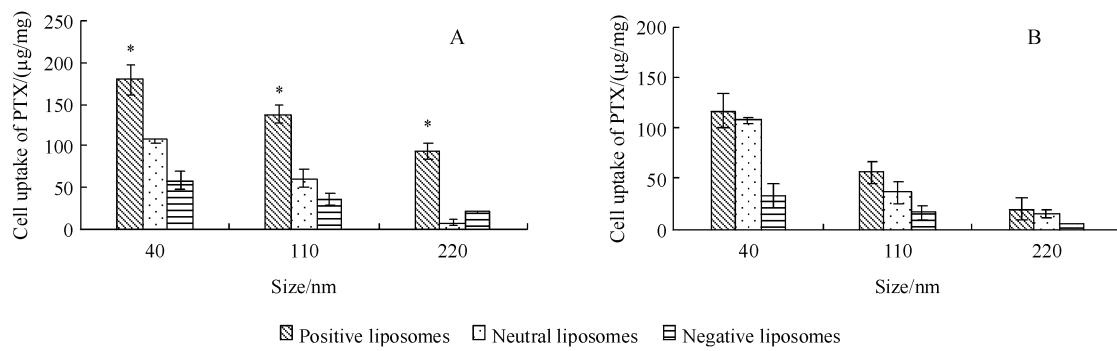


Figure 7 Uptake of PTX-loaded liposomes by BEL-7402 cells (A) and HepG-2 cells (B) ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

\*  $P < 0.05$  vs neutral and negative liposomes

### 3 讨论

#### 3.1 不同表面性质纳米脂质体释放特性差异

粒径 200 nm 左右的脂质体呈现了一定的多室脂质体性质,其释放更为缓慢且累积释放的药量在电性相同的制剂之中最小。另一方面,不同电性,相同粒径的载药脂质体中,近中性脂质体的累积释放明显较低,这主要是由于近中性脂质体为了解决制剂稳定性问题,加入了冻干保护剂所致。冻干保护剂海藻糖分子中丰富的羟基结构可与磷脂极性基团形成氢键结合于磷脂膜上,并且冻干保护剂在发挥渗透及体积效应同时还会在脂质体周围形成玻璃态的间隔基质<sup>[9-10]</sup>。同时由于这些因素,脂质体冻干制剂复溶后渗漏率较低,药物释放的阻力增加,因此相较其他两种脂质体具有更为缓慢释放特性。正电性载药脂质体制剂的释放略高于负电性脂质体,这可能是由于正电性材料中十八醇结构在磷脂双分子层的疏水区域与疏水性药物的相互作用,在一定程度上促进了药物从疏水区域释放出来。

#### 3.2 不同表面性质纳米脂质体肿瘤细胞摄取行为差异

表面电性不同的载体细胞摄取结果差异显著,主要是因为细胞膜为负电性,表面正电性的制剂通过静电吸引力作用富集在肿瘤细胞周围,细胞周围药物浓度升高,摄取药物的量也随之增大。而载体表面负电性会与细胞膜表面产生静电斥力,不利于细胞对载药制剂的吸附。

制剂释放特性的差异是影响摄取的因素之一。在给药的 48 h 内,脂质体释放出一部分游离的紫杉醇,其相对分子质量小,更容易进入肿瘤细胞。从释放特性可见,200 nm 左右的载体表现出了多

室脂质体的某些性质,如释放缓慢且累积释放量较小,相应的细胞摄取也相对较少。同时,不同粒径的载体和不同种类的肿瘤细胞相互作用,还可能产生不同的空间位阻效应,从而影响细胞摄取。

### 参考文献

- [1] Batrakova EV, Gendelman HE, Kabanov AV. Cell-mediated drug delivery [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2011, **8**(4): 415-433.
- [2] Nowacek AS, Miller RL, McMillan JE, et al. NanoART synthesis, characterization, uptake, release and toxicology for human monocyte-macrophage drug delivery [J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2009, **4**(8): 903-917.
- [3] Obata Y, Suzuki D, Takeoka S. Evaluation of cationic assemblies constructed with amino acid based lipids for plasmid DNA delivery [J]. *Bioconjugate Chem*, 2008, **19**: 1 055-1 063.
- [4] Prabha S, Zhou WZ, Panyam J, et al. Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection: studies with fractionated nanoparticles [J]. *Int J Pharm*, 2002, **244**(1/2): 105-115.
- [5] Champion JA, Katare YK, Mitragotri S. Making polymeric micro- and nanoparticles of complex shapes [J]. *PNAS*, 2007, **104**(29): 11 901-11 904.
- [6] Wang LZ, Hol C, Lee HS, et al. Quantitation of paclitaxel in micro-sample rat plasma by a sensitive reversed-phase HPLC assay [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2003, **31**: 283-289.
- [7] Zheng N, Zhang LD. A general situation in studies of quality control for liposomes [J]. *Chin New Drug J (中国新药杂志)*, 2004, **13**(12): 1 282-1 286.
- [8] Liu J, Li HX, Jiang XQ, et al. Novel pH-sensitive chitosan-derived micelles loaded with paclitaxel [J]. *Carbohydr Polym*, 2010, **82**(2): 432-439.
- [9] Tang WY, Song YZ, Deng YH. Progress on liposomal lyoprotectants and the mechanism of action [J]. *J Shenyang Pharm Univ (沈阳药科大学学报)*, 2012, **29**(7): 560-569.
- [10] Chen CJ, Han DD, Cai CF, et al. An overview of liposome lyophilization and its future potential [J]. *J Controlled Release*, 2010, **142**(3): 299-311.