

## 基于点击化学修饰的肿瘤靶向阿霉素脂质体的制备与表征

尚云凯, 鞠曹云, 谢达平, 张 灿\*

(中国药科大学新药研究中心, 江苏省代谢性疾病重点实验室, 南京 210009)

**摘要** 首先合成了叠氮化的胆固醇和炔基化的奥曲肽, 并基于叠氮化的胆固醇制备了叠氮修饰的阿霉素脂质体 Dox@N<sub>3</sub>-L; 随后利用点击反应在其表面修饰了具有肿瘤靶向功能的奥曲肽, 得到奥曲肽靶向阿霉素脂质体 Dox@Oct-L; 最后考察了点击反应的进程、点击修饰对药物封装率的影响以及脂质体的体外靶向性。结果表明, 通过点击反应能成功将奥曲肽修饰到载药载体表面, 点击修饰对脂质体中荷载的药物没有影响, 封装率为 99.8%, 与点击前无显著差异。细胞毒性实验结果显示, Dox@Oct-L 对肿瘤细胞 HepG2 的杀伤作用强于 Dox@N<sub>3</sub>-L, 表明 Dox@Oct-L 对 HepG2 细胞具有一定的靶向性。因此, 利用点击化学在荷载药物的载体表面修饰是一种温和有效的方式, 可方便地实现载药载体表面的功能化。

**关键词** 点击化学; 脂质体; 表面修饰; 阿霉素; 奥曲肽; 肿瘤靶向

**中图分类号** R944 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2016)06-0708-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20160613

**引用本文** 尚云凯, 鞠曹云, 谢达平, 等. 基于点击化学修饰的肿瘤靶向阿霉素脂质体的制备与表征[J]. 中国药科大学学报, 2016, 47(6):708-713.

**Cite this article as:** SHANG Yunkai, JU Caoyun, XIE Daping, *et al.* Preparation and characterization of tumor targeting doxorubicin liposomes modified via click chemistry[J]. *J China Pharm Univ*, 2016, 47(6):708-713.

## Preparation and characterization of tumor targeting doxorubicin liposomes-modified via click chemistry

SHANG Yunkai, JU Caoyun, XIE Daping, ZHANG Can\*

*Jiangsu Key Laboratory of Drug Discovery for Metabolic Diseases, Center of Drug Discovery, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China*

**Abstract** In this study, octreotide targeting doxorubicin liposome (Dox@Oct-L) was prepared by modifying cholesterol with azide group to prepare azide-modified doxorubicin liposome (Dox@N<sub>3</sub>-L), followed by click reaction on the vehicle surface with alkyne-modified octreotide. HPLC chromatographic determination showed that octreotide was successfully attached to drug loaded liposome. No significant effect of click modification on the drug loaded within liposome was detected, and the entrapment efficiency of Dox@Oct-L was 99.8%. Dox@Oct-L showed improved *in vitro* anti-tumor activity against HepG2 cell when compared with Dox@N<sub>3</sub>-L, demonstrating that Dox@Oct-L possessed targeting ability against HepG2 cell. Therefore, the click chemistry in modification of drug-loading carrier surface is gentle and efficient, providing the possibility to functional modification in drug-loading carrier surface conveniently.

**Key words** click chemistry; liposome; surface modification; doxorubicin; octreotide; tumor targeting

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81273468, No. 81473153, No. 81503003)

纳米制剂具有一系列独特的优势, 包括载药量高、靶向性、可同时包载多种药物、释药行为可控以

及可逆转肿瘤耐药性等, 在肿瘤治疗中显示出重要的作用。为了提高纳米药物的递送效率, 进而提高

肿瘤的治疗效果,通常需要对载体表面进行修饰,并赋予纳米载体多种功能。因此,简单高效的纳米载体表面修饰方法受到人们越来越多的关注。

近年来,一种温和高效的反应类型——点击反应被广泛应用于纳米载体的表面修饰研究中。点击反应是一种发生在模块分子之间的反应,具有选择性强、条件温和、反应迅速和产物稳定等诸多优点,为纳米载体尤其是载药纳米载体的表面修饰提供了一条新的方法<sup>[1-3]</sup>。其中,铜催化的叠氮-炔环加成反应[Cu(I)-catalyzed azides-alkynes cycloaddition, CuAAC]是最经典、应用最广泛的一类点击反应<sup>[4]</sup>。此外,奥曲肽(octreotide, Oct)是一种具有肿瘤靶向性功能的环状多肽,可以特异性的靶向于肿瘤表面过度表达的生长抑素受体(somatostatin receptor, SSTRs),将其修饰到载体表面后,能赋予纳米粒肿瘤靶向性。因此,本研究利用CuAAC反应将肿瘤靶向性分子奥曲肽修饰到包载阿霉素的脂质体表面,制备了奥曲肽靶向阿霉素脂质体,并考察了点击反应的进程、点击反应对药物包封率的影响,以及通过细胞毒性实验体外验证了脂质体的靶向性能。

## 1 材料

### 1.1 试剂

盐酸阿霉素(纯度99%,北京华奉联博科技有限公司);葡聚糖凝胶Sephadex G-50(美国Pharmacia公司);DMEM高糖培养基、青霉素-链霉素-胎牛血清(FBS,美国Hyclone公司);胰蛋白酶(美国Gibco公司);四甲基噻唑蓝(MTT,南京生兴生物技术有限公司);大豆磷脂(SPC,上海太伟药业有限公司);胆固醇(纯度95%,上海惠兴生化试剂有限公司);其他试剂均为市售分析纯。

### 1.2 细胞株

人源肝肿瘤细胞HepG2细胞株(中国科学院上海细胞库)。

### 1.3 仪器

BS110S电子天平(德国赛多利斯公司);Zeta Plus电位粒径分析仪(美国Brookhaven公司);EU-2600A紫外可见分光光度计(上海昂拉仪器有限公司);LC-20A型高效液相色谱仪(日本岛津公司);酶标仪(美国赛默飞世尔公司)。

## 2 方法

### 2.1 点击化学模块分子的合成与表征

#### 2.1.1 叠氮化胆固醇(N<sub>3</sub>-Chol)的合成与表征

叠氮化胆固醇的合成参照本课题组之前的报道<sup>[3]</sup>,基本合成方法如下。

2-[(2-叠氮乙基)氨基甲酰]苯甲酸(N<sub>3</sub>-HHPA)的合成 2-氯乙胺盐酸盐(5.0 g, 43.1 mmol)与叠氮钠(8.4 g, 129.0 mmol)溶于水中,油浴80℃搅拌15 h。然后加入氢氧化钾固体,调节pH 12~14。乙醚萃取,浓缩,产率50.5%。将产物(2.1 g, 24.4 mmol)和六氢苯酐(HHPA, 3.7 g, 24.4 mmol)溶于氯仿中,室温搅拌3 h。反应结束后柱色谱纯化,得到白色粉末状固体N<sub>3</sub>-HHPA,产率80.3%。<sup>1</sup>H NMR(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 11.8(1H, br. s, COOH), 7.86(1H, s, CONHCH<sub>2</sub>), 3.36~3.11(4H, m, CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 2.74~2.56(1H, m, CHCOOH), 2.48~2.53(1H, m, CHCONH), 2.05~1.86(2H, m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 1.71~1.49(3H, m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH and CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.45~1.22(3H, m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)。

N<sub>3</sub>-Chol的合成 将N<sub>3</sub>-HHPA(5.9 g, 24.5 mmol), DMAP(0.6 g, 4.9 mmol)和EDCI(9.4 g, 49 mmol)溶于氯仿,0℃搅拌1 h。加入胆固醇(9.5 g, 24.5 mmol),室温继续搅拌12 h。反应结束后柱色谱纯化,得到白色粉末状固体N<sub>3</sub>-Chol,产率68.4%。<sup>1</sup>H NMR(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5.36(1H, s, C=CH), 3.71(1H, m, CHOCO), 3.50(4H, m, N<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 2.89(1H, m, CHCONH), 2.5(1H, m, CHCOO), 2.0~1.5(8H, m, CH<sub>2</sub>(hexahydrobenzene)), 1.5~1.01(43 H, m, CH<sub>2</sub>(Chol))。

#### 2.1.2 炔基化奥曲肽(al-Oct)的合成与表征

5-己炔醛的合成 草酰氯(0.6 mL, 5.0 mmol)溶于二氯甲烷10 mL中,置于-78℃液氮-乙醇浴中,搅拌5 min,加入DMSO(0.7 mL, 10 mmol), 20 min后加入5-己炔-1-醇(0.5 mL, 4.5 mmol),维持反应温度在-78℃,搅拌20 min后加入三乙胺2.5 mL,在10 min内升温至室温,加入二氯甲烷40 mL,先用1/2饱和碳酸氢钠溶液(40 mL×2)再用0.5 mol/L稀盐酸(40 mL×2)洗,无水硫酸钠干燥,浓缩,硅胶柱色谱纯化(石油醚-乙酸乙酯, 2:1)得到黄色油状物,产率60.4%。<sup>1</sup>H NMR(300 MHz,

$CDCl_3$ )  $\delta$ : 9.82 (1H, t,  $J = 1.2$  Hz, CHO), 2.60 (2H, m,  $CH_2C \equiv CH$ ), 2.27 (2H, m,  $CH_2CHO$ ), 1.95 (1H, t,  $J = 2.4$  Hz,  $C \equiv CH$ ), 1.86 (2H, m,  $CH_2$ )。

al-Oct 的合成 醋酸奥曲肽 (20 mg, 20 nmol) 溶于 pH 5.0 醋酸-醋酸钠缓冲液 (0.1 mmol/L) 20 mL 中, 加入氰基硼氢化钠 (25 mg, 4 mmol), 然后加入 5-己炔醛 (40 mg, 400 nmol) 的二氯甲烷溶液, 剧烈搅拌, 室温反应 24 h, 反应结束后分离出水相, 冻干得到白色粉末。

al-Oct 的理化表征 高效液相色谱法: 色谱柱: Inertsil ODS-SP  $C_{18}$  (250 mm  $\times$  3.6 mm, 5  $\mu$ m) 分析柱; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 215 nm; 柱温: 30  $^{\circ}C$ ; 流动相 A: 0.01% 三氟乙酸水溶液, B: 0.01% 三氟乙酸乙腈溶液, 采用梯度洗脱, 流动相 B 比例在 20 min 内由 35% 升至 50%。

圆二色谱法: 将奥曲肽与 al-Oct 溶解在 pH 7.4 的 0.01 mol/L 磷酸缓冲液中 (质量浓度均为 100  $\mu$ g/mL), 扫描波长范围 190 ~ 250 nm, 带宽 1 nm, 扫描速度 100 nm/min, 每个样品扫描 3 次, 将 CD 值转换成氨基酸残基平均摩尔椭圆度 ( $deg \cdot cm^2/dmol$ )。

## 2.2 叠氮修饰的阿霉素脂质体 (Dox@ $N_3$ -L) 的制备

采用薄膜分散法制备叠氮修饰的脂质体, 随后采用硫酸铵梯度法包载盐酸阿霉素。

2.2.1 叠氮修饰的脂质体的制备 称取大豆磷脂 120 mg、 $N_3$ -Chol 36 mg, 加氯仿 4 mL、甲醇 1 mL 溶解, 置于 500 mL 茄形瓶中, 40 $^{\circ}C$  减压蒸发成膜, 真空干燥过夜, 加入 250 mmol/L 硫酸铵溶液 (pH 5.5) 5 mL, 37  $^{\circ}C$  水合, 30 min 后取出置于西林瓶中, 探头超声 (功率 30%) 分散 15 min, 过 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜, 得到叠氮修饰的脂质体  $N_3$ -L, 4  $^{\circ}C$  保存备用。

2.2.2 硫酸铵梯度法载盐酸阿霉素 将  $N_3$ -L 置于 10% 蔗糖溶液中 (pH 6.8) 透析过夜; 称取盐酸阿霉素 3 mg, 溶于 50 mmol/L Hepes 缓冲液 (pH 7.4) 4.5 mL, 与等体积经过透析处理的  $N_3$ -L 55  $^{\circ}C$  共孵育 1 h, 得到叠氮修饰的阿霉素脂质体 Dox@  $N_3$ -L。

## 2.3 载药脂质体表面的点击反应

催化剂点击反应溶液的制备: 抗坏血酸钠水溶液 (1 mg/mL) 80  $\mu$ L 和五水硫酸铜水溶液 (1 mg/

mL) 10  $\mu$ L 混合, 然后加入铜离子络合配体水合红菲绕啉二磺酸钠水溶液 (1 mg/mL) 40  $\mu$ L。

取 Dox@  $N_3$ -L 500  $\mu$ L, 加入催化剂点击反应溶液 110  $\mu$ L, 然后加入 al-Oct 溶液 [1 mg/mL, 炔基-叠氮 (0.03: 1)] 72  $\mu$ L, 置于水浴 37  $^{\circ}C$  摇床中, 反应 2 h, 采用葡聚糖凝胶 Sephadex G-50 柱纯化, 除去游离的盐酸阿霉素、炔基奥曲肽和催化剂, 得到奥曲肽修饰的阿霉素脂质体 Dox@ Oct-L。

采用激光粒度测定仪, 分别测定 Dox@  $N_3$ -L 与 Dox@ Oct-L 的粒径与表面电位。

## 2.4 al-Oct 点击反应的表征

2.4.1 al-Oct 标准曲线 (HPLC 法) 的绘制 精密称取 al-Oct 4.2 mg 置于 5 mL 量瓶中, 加水定容至刻度, 作为储备液。精密量取上述储备液适量, 置 5 mL 量瓶中, 纯水定容至刻度, 分别配制成质量浓度为 10, 20, 50, 100, 200, 800  $\mu$ g/mL 的工作液, HPLC 检测, 以峰面积 ( $A$ ) 对 al-Oct 的浓度 ( $c$ ) 进行线性回归, 绘制标准曲线。

2.4.2 制剂中游离 al-Oct 浓度的测定 取 Dox@  $N_3$ -L 500  $\mu$ L, 加入催化剂点击反应溶液 110  $\mu$ L, 然后加入 al-Oct 溶液 (1 mg/mL) 72  $\mu$ L, 置 37  $^{\circ}C$  摇床中, 反应 2 h, 制备 Dox@ Oct-L, 另取 al-Oct 溶液 72  $\mu$ L, 加入水 610  $\mu$ L 稀释作为对照。

将上述两种制剂各取 200  $\mu$ L, 加入 2 倍体积乙腈将脂质体破乳, 涡旋 5 min, 置于离心机中离心 (12 000 r/min, 10 min), 然后取上清液进样, 记录各组制剂所得 HPLC 峰面积, 代入标准曲线计算相应浓度。

## 2.5 点击修饰对包封率的影响

2.5.1 阿霉素标准曲线 (UV 法) 的绘制 精密称取盐酸阿霉素 5.0 mg, 置 10 mL 量瓶中, 纯水定容至刻度, 做为储备液。精密量取上述储备液适量, 置于 10 mL 量瓶中, 用 80% 甲醇水溶液定容至刻度, 分别配制成 0.5, 2.0, 5.0, 20, 50, 100  $\mu$ g/mL 的工作液。采用紫外可见分光光度计测定 480 nm 下各工作液的吸收度  $A_{480}$ 。以  $A_{480}$  对盐酸阿霉素质量浓度 ( $c$ ) 进行线性回归, 绘制标准曲线。

2.5.2 阿霉素包封率的测定 取 Dox@  $N_3$ -L 500  $\mu$ L, 加入催化剂点击反应溶液 110  $\mu$ L, 然后加入 al-Oct 溶液 (1 mg/mL) 72  $\mu$ L, 置于水浴 37  $^{\circ}C$  摇床中, 反应 2 h, 制备 Dox@ Oct-L, 另取 Dox@  $N_3$ -L 500  $\mu$ L, 加入水 182  $\mu$ L 稀释作为对照。

取上述两种制剂, Sephadex G-50 柱色谱纯化, 稀释至相同的程度。取两组纯化后的制剂各 100  $\mu\text{L}$ , 加 4 倍体积的甲醇破乳, 涡旋, 离心 (12 000 r/min, 10 min), 取上清液, 于紫外可见分光光度计中测定吸收度  $A_{480}$ , 代入标准曲线中计算各组制剂中阿霉素的浓度, 计算点击修饰前后阿霉素的封装率。

## 2.6 细胞毒性实验

**2.6.1 细胞培养** 采用人肝癌细胞 HepG2 进行制剂的细胞毒性研究, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基进行培养, 加入 1% 青霉素, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$  含 5%  $\text{CO}_2$  的恒温细胞培养箱中。每隔两天更换新鲜的细胞培养液, 待细胞融合率达到 80% 以上, 以 1:6 的比例进行细胞传代。

**2.6.2 Dox@ Oct-L、Dox@  $\text{N}_3$ -L 和阿霉素溶液的细胞毒性试验** 取对数生长期的 HepG2 细胞, 分别以每孔  $1 \times 10^4$  个细胞的密度接种在 96 孔细胞培养板中, 每孔体积为 200  $\mu\text{L}$ 。置于恒温培养箱里培养 24 h 后, 弃去培养基, 然后分别加入以无血清 DMEM 高糖培养基稀释至不同浓度的 Dox@ Oct-L、Dox@  $\text{N}_3$ -L 和阿霉素溶液各 200  $\mu\text{L}$ , 各组中阿霉素的质量浓度为 0.31, 1.25, 2.50, 10, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 设 3 个复孔, 并以未经药物处理的 HepG2 细胞为对照组, 空白培养基为空白组。于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中继续培养 24 h, 然后每孔加入含 MTT (5 mg/mL) 20  $\mu\text{L}$ , 培养 3 h 后弃去 MTT 溶液, 每孔加入 DMSO 200  $\mu\text{L}$ , 用酶标仪检测 570 nm 处吸收度, 计算各组细胞存活率, 计算方法见公式 (1):

$$\text{Cell viability} = \frac{A_i - A_0}{A_c - A_0} \times 100\% \quad (1)$$

其中:  $A_i$ 、 $A_c$  和  $A_0$  分别代表实验组、对照组和空白组测得的吸收度  $A_{570}$ 。

## 3 结果与讨论

### 3.1 al-Oct 的合成

奥曲肽的一级结构如图 1 所示。奥曲肽是一个 8 肽结构, 具有两个游离的氨基, 通常会对这两个游离氨基进行功能性修饰。但是, 在对其进行衍生化研究时发现, N 端单衍生的产物具备较好的结构稳定性和生物活性<sup>[5-6]</sup>, 因而本研究将致力于合成 N 端单衍生的 al-Oct。文献研究表明, 由于 N

端氨基 ( $\text{pK}_a = 7.8$ ) 和 Lys 残基 ( $\text{pK}_a = 10.1$ ) 在 pH 5.0 时质子化程度不同, 导致 N 端氨基反应活性强于 Lys 残基的氨基, 因此, 在酸性 (pH 5.0) 条件下进行奥曲肽烷基化反应, 可以筛选得到 N 端单衍生化的 al-Oct<sup>[6]</sup>。

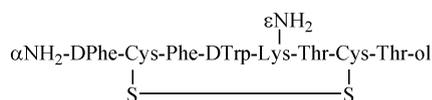


Figure 1 Primary structure of octreotide (Oct)

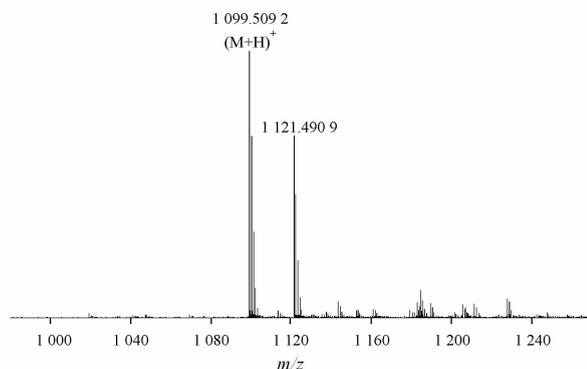


Figure 2 HR-MS spectrum of alkyne-octreotide (al-Oct)

al-Oct 的高分辨质谱结果见图 2, 结果表明, 相对分子质量 1 000 ~ 1 200 附近主要的碎片峰为  $m/z$  1 102.490 7, 与单衍生的 al-Oct 相对分子质量相符。

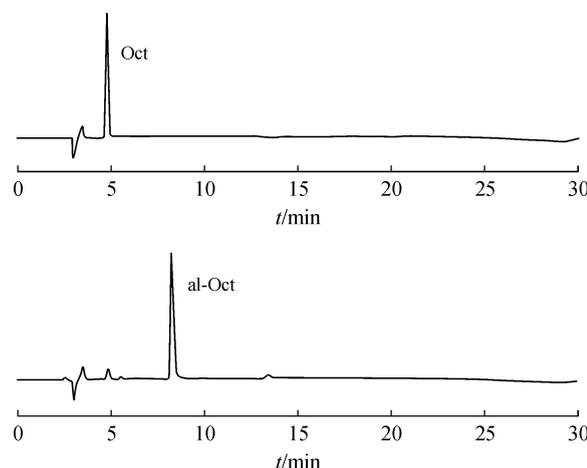
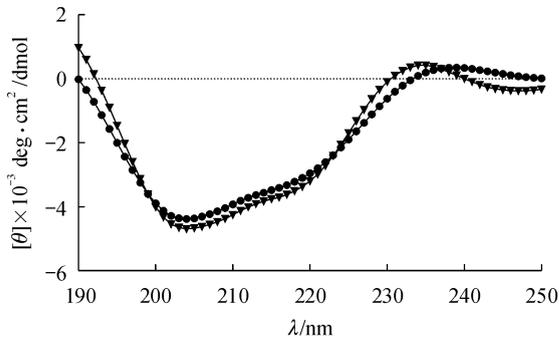


Figure 3 HPLC chromatograms of Oct and al-Oct

图 3 为奥曲肽和 al-Oct 的高效液相色谱图, 保留时间在 8.2 min 附近的信号峰为 al-Oct, 经过面积归一化法计算, al-Oct 的纯度为 93%。

随后, 对合成的 al-Oct 通过圆二色谱进行了二级结构表征, 结果如图 4 所示。在 190 ~ 250 nm 范

围内,奥曲肽与 al-Oct 的谱图走向基本一致,说明合成的 al-Oct 与奥曲肽相比,二级结构没有发生明显的改变,仍具有肿瘤靶向功能。



—▼—Alkyne-octreotide; —●—Octreotide

**Figure 4** Circular dichroism spectra of octreotide and alkyne-octreotide

通过高分辨质谱、高效液相色谱以及圆二色谱的表征,成功合成了 N 端单衍生的 al-Oct, 得到的 al-Oct 不仅纯度较高,而且仍然保留了游离奥曲肽的肿瘤靶向功能,有利于后续实验的进行。

### 3.2 脂质体表面的点击修饰

为了考察点击修饰对载体表面理化性质的影响,本研究表征了点击修饰前的 Dox@ N<sub>3</sub>-L 与点击修饰后的 Dox@ Oct-L 的粒径分布和表面电位。结果显示, Dox@ N<sub>3</sub>-L 粒径为 (159.8 ± 1.2) nm, 多分散系数为 0.246 ± 0.015, 电位为 - (0.13 ± 0.81) mV, Dox@ Oct-L 粒径为 (162.6 ± 1.4) nm, 多分散系数为 0.244 ± 0.027, 电位为 (0.63 ± 0.11) mV。结果表明,本文制备的阿霉素脂质体的粒径分布均一,表面电位在 0 mV 附近,有利于降低载体血液循环中的毒性,且点击修饰后载体粒径和电位都无明显的变化,表明靶向分子奥曲肽的点击修饰对脂质体的粒径电位几无影响,是一种温和的修饰方式。

### 3.3 al-Oct 点击反应的表征

**3.3.1 al-Oct 的 HPLC 标准曲线** 以 al-Oct 质量浓度 (*c*) 为横坐标,峰面积 (*A*) 为纵坐标,线性回归方程为  $A = 8\,943.6c - 110\,850$ ,  $r = 0.999\,9$ ,表明 al-Oct 在质量浓度为 10 ~ 800 μg/mL 范围内线性良好。

**3.3.2 游离 al-Oct 浓度的测定** al-Oct 与叠氮修饰的阿霉素脂质体反应之后,炔基与叠氮基团会形成三氮唑结构,将两端的奥曲肽和胆固醇分子连接在一起,从而使奥曲肽分子固定在脂质体表面,造成游离的 al-Oct 减少甚至消失,可以从 HPLC 谱图

中观察到游离 al-Oct 的峰面积减少。参考相关文献研究<sup>[7]</sup>,认为 HPLC 检测结果中减少的 al-Oct 已经成功修饰到载体表面,并以此计算加入的 al-Oct 反应的比例,计算方法见公式(2):

$$\text{al-Oct conjugated} = \left[ 1 - \frac{c_{\text{remained}}}{c_{\text{control}}} \right] \times 100\% \quad (2)$$

其中,  $c_{\text{remained}}$  代表阿霉素脂质体与 al-Oct 发生点击反应后测得的反应液中 al-Oct 的浓度;  $c_{\text{control}}$  代表 al-Oct 溶液对照组中炔基奥曲肽的浓度。

以发生反应的 N<sub>3</sub>-Chol 的比例表示连接到载体表面的 al-Oct 的数量,计算方法见公式(3)。

$$\text{N}_3\text{-Chol occupied} = (\text{alkyne: N}_3 \text{ ratio}) \times \text{al-Oct conjugated} \quad (3)$$

本文中,炔基:叠氮 = 0.03:1 (摩尔比,见“2.3”项),结果见表 1。

**Table 1** Concentration of al-Oct after clicked with Dox@ N<sub>3</sub>-L

Preparation	Dox@ Oct-L	al-Oct control
al-Oct conc. (μg/mL)	92	135
al-Oct conjugated (%)	30	-
N <sub>3</sub> -Chol occupied (%)	0.9	-

结果显示,载体表面的 al-Oct 占 N<sub>3</sub>-Chol 物质的量的 0.9%,据文献报道,载体表面奥曲肽用量在 0.5% ~ 10% 范围内可以产生靶向功能,因此这种修饰程度可以赋予脂质体肿瘤靶向功能<sup>[8-9]</sup>。然而,加入的 al-Oct 只有 30% 连接到了载体表面,修饰效率不够理想,且点击反应结束后需要除去催化剂,增加了制剂的制备步骤,这些都不利于 CuAAC 反应在载体表面修饰中的应用。

### 3.4 点击修饰对药物包封率的影响

**3.4.1 阿霉素标准曲线(UV 法)的绘制** 以阿霉素质量浓度 (*c*) 为横坐标,吸收度 (*A*) 为纵坐标,求得的直线回归方程为  $A = 0.022\,4c - 0.006\,6$ ,  $r = 0.999\,9$ ,表明阿霉素在质量浓度为 0.5 ~ 100 μg/mL 范围内线性良好。

**3.4.2 点击修饰前后药物包封率的变化** 在脂质体表面进行修饰可能会造成脂质体膜的扰动,从而导致药物的泄漏,因此,必须考察修饰方法对载体药物包封率的影响,本研究以点击修饰前后阿霉素包封率的变化来考查点击修饰对脂质体稳定性的影响。从表 2 中可以看到, Dox@ N<sub>3</sub>-L 与 Dox@ Oct-L 的包封率没有显著性差异,说明点击反应修饰基本不会造成药物的泄漏,进一步表明点击反应

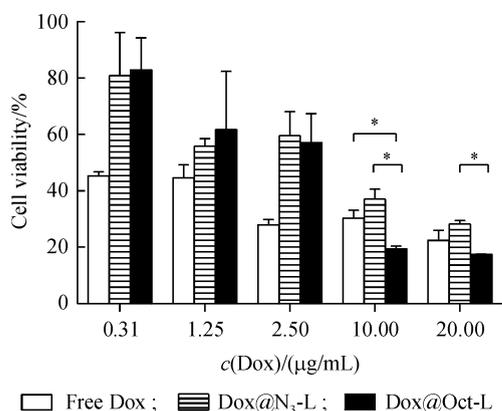
是一种温和的修饰方式,有利于载药载体表面的修饰,这一点与相关文献报道的结果一致<sup>[7]</sup>。

**Table 2** Effect of click modification on entrapment efficiency ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Preparations	EE/%
Dox@N <sub>3</sub> -L	97.3 ± 5.8
Dox@Oct-L	99.8 ± 7.8

### 3.5 细胞毒性实验

为了考察奥曲肽修饰后的载药脂质体的抗肿瘤活性,本文研究了 Dox@Oct-L、Dox@N<sub>3</sub>-L 和阿霉素溶液对表面过度表达生长抑素受体的肝肿瘤细胞 HepG2 的细胞毒性<sup>[10]</sup>,结果见图 5。由于游离阿霉素具有正电性,易与表面呈负电的细胞膜亲和,因而其细胞毒性大于普通阿霉素脂质体<sup>[11]</sup>,而奥曲肽的点击修饰明显提高了阿霉素脂质体对肿瘤细胞 HepG2 的细胞毒性,在高浓度时,奥曲肽靶向阿霉素脂质体的细胞毒性强于游离阿霉素,表明奥曲肽的点击修饰明显提高了阿霉素脂质体对肿瘤细胞 HepG2 的细胞毒性,证明通过这种方式修饰到脂质体表面的奥曲肽,可以与肿瘤细胞表面过度表达的生长抑素受体有效结合,发挥一定的靶向性,提高了 HepG2 细胞对脂质体的摄取,从而增强了其细胞杀伤作用。



**Figure 5** Cytotoxic effect of Dox@Oct-L, Dox@N<sub>3</sub>-L and free Dox on HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

\*  $P < 0.05$

## 4 结论与展望

本研究通过两种点击模块分子的合成,构建了基于点击反应的奥曲肽靶向阿霉素脂质体。该奥曲肽靶向阿霉素脂质体利用奥曲肽与 HepG2 细胞表面过度表达的 SSTRs 的特异性结合,增加了 HepG2

细胞对其的摄取,从而提高了奥曲肽靶向阿霉素脂质体的细胞毒性。从实验结果中也可以看出,点击反应是一种温和有效的修饰方式,不会显著影响药物的包封率,因而对于载药纳米载体的表面修饰是一种重要且有效的手段。但是本文采用的经典点击反应——铜催化的叠氮-炔环加成反应,会在反应体系中引入铜离子催化剂,可能会产生严重的生理毒性,不利于载体的临床应用,未来将进一步研究无铜催化的点击反应在载体系统表面修饰中的应用,推进更为安全有效的表面修饰方法的发展。

### 参考文献

- [1] Anseth KS, Klok HA. Click chemistry in biomaterials, nanomedicine, and drug delivery [J]. *Biomacromolecules*, 2016, **17**(1): 1-3.
- [2] Lai CH, Chang TC, Chuang YJ, et al. Stepwise orthogonal click chemistry toward fabrication of paclitaxel/galactose functionalized fluorescent nanoparticles for HepG2 cell targeting and delivery [J]. *Bioconjugate Chem*, 2013, **24**(10): 1698-1709.
- [3] Sun Q, Kang Z, Xue L, et al. A collaborative assembly strategy for tumor-targeted siRNA delivery [J]. *J Am Chem Soc*, 2015, **137**(18): 6000-6010.
- [4] Li N, Binder WH. Click-chemistry for nanoparticle-modification [J]. *J Mater Chem*, 2011, **21**(42): 16717-16734.
- [5] Na DH, DeLuca PP. PEGylation of octreotide: I. Separation of positional isomers and stability against acylation by poly(D, L-lactide-co-glycolide) [J]. *Pharm Res*, 2005, **22**(5): 736-742.
- [6] Na DH, Lee KC, DeLuca PP. PEGylation of octreotide: II. Effect of N-terminal mono-PEGylation on biological activity and pharmacokinetics [J]. *Pharm Res*, 2005, **22**(5): 743-749.
- [7] Blenke EO, Klaasse G, Merten H, et al. Liposome functionalization with copper-free "click chemistry" [J]. *J Control Release*, 2015, **202**: 14-20.
- [8] Dai W, Jin W, Zhang J, et al. Spatiotemporally controlled co-delivery of anti-vasculature agent and cytotoxic drug by octreotide-modified stealth liposomes [J]. *Pharm Res*, 2012, **29**(10): 2902-2911.
- [9] Zhang J, Jin W, Wang X, et al. A novel octreotide modified lipid vesicle improved the anticancer efficacy of doxorubicin in somatostatin receptor 2 positive tumor models [J]. *Mol Pharmaceut*, 2010, **7**(4): 1159-1168.
- [10] Reynaert H, Rombouts K, Vandermonde A, et al. Expression of somatostatin receptors in normal and cirrhotic human liver and in hepatocellular carcinoma [J]. *Gut*, 2004, **53**(8): 1180-1189.
- [11] Yuan D, Sun M, Wang Y, et al. Preparation and *in vitro* characterization of octreotide-targeting doxorubicin liposome [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2011, **42**(3): 223-229.