

载紫杉醇的大黄酸偶联物胶束对 MCF-7 细胞的毒性与细胞摄取研究

王晓颖, 王夏英, 邱梁桢, 欧阳惠枝, 徐 伟*

(福建中医药大学药学院, 福州 350122)

摘要 通过 MTT 法评估了羧甲基壳聚糖-大黄酸偶联物(CR 偶联物)和载紫杉醇(PTX)的 CR 偶联物胶束(PTX/CR 偶联物胶束)对 MCF-7 细胞的细胞毒性,结果显示,CR 偶联物具有良好的安全性;PTX/CR 偶联物胶束 24 h 内表现出优于 Taxol® 的抗肿瘤活性。通过包载环境响应型荧光探针 P4,考察了共载 P4 和 PTX 的 CR 偶联物胶束[(P4 + PTX)/CR 偶联物胶束]在 MCF-7 细胞中的摄取情况,结果显示,MCF-7 细胞对其具有较好的摄取效果,(P4 + PTX)/CR 偶联物胶束组与其加维拉帕米组摄取量无显著性差异,提示 CR 偶联物胶束可以保护其所载荧光探针和/或药物不被 P-gp 外排到细胞外。该研究结果为 CR 偶联物及 PTX/CR 偶联物胶束的进一步体内研究奠定了基础。

关键词 紫杉醇;羧甲基壳聚糖-大黄酸偶联物;聚合物胶束;抗肿瘤;细胞摄取

中图分类号 R944 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2020)01-0033-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20200106

引用本文 王晓颖,王夏英,邱梁桢,等.载紫杉醇的大黄酸偶联物胶束对 MCF-7 细胞的毒性与细胞摄取研究[J].中国药科大学学报,2020,51(1):33-37.

Cite this article as: WANG Xiaoying, WANG Xiaying, QIU Liangzhen, et al. Cytotoxicity and cellular uptake of paclitaxel-loaded carboxymethyl chitosan-rhein polymeric micelles in MCF-7 cells[J]. J China Pharm Univ, 2020, 51(1): 33-37.

Cytotoxicity and cellular uptake of paclitaxel-loaded carboxymethyl chitosan-rhein polymeric micelles in MCF-7 cells

WANG Xiaoying, WANG Xiaying, QIU Liangzhen, OUYANG Huizhi, XU Wei*

School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

Abstract In this study, *in vitro* cytotoxicity of carboxymethyl chitosan-rhein conjugate (CR conjugate) and paclitaxel-loaded carboxymethyl chitosan-rhein polymeric micelles (PTX/CR PMs) was evaluated by MTT method in MCF-7 cells. The results showed that CR conjugate displayed good security; PTX/CR PMs in 24 h showed better antitumor activity than Taxol®. Environment-responsive fluorescent probe P4 was used to determine the cellular uptake of PTX/CR PMs in MCF-7 cells. The results also showed that P4 and PTX co-loaded carboxymethyl chitosan-rhein polymeric micelles [(P4 + PTX)/CR PMs] could be taken up by MCF-7 cells. There was no difference between (P4 + PTX)/CR PMs group and (P4 + PTX)/CR PMs with verapamil group, suggesting that CR PMs could protect fluorescent probe and/or drugs in their cores avoiding efflux by P-glycoprotein. These results will contribute to *in vivo* study of CR conjugate and PTX/CR PMs in the future.

Key words paclitaxel; carboxymethyl chitosan-rhein conjugate; polymeric micelles; anti-tumor; cellular uptake

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81603301), the Personnel Training Funding of Fujian Province Health Department (No. 2016-ZQN-69), and the National Special Fund for Chinese medicine Resources Research in the Public Interest of China (No. 2017-66)

收稿日期 2019-07-17 *** 通信作者** Tel: 0591-22861693 E-mail: 2000017@fjtcu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81603301);福建省卫计委中青年骨干人才培养项目(No. 2016-ZQN-69);中医药公共卫生服务补助专项(财社[2017]66号)

聚合物胶束是由两亲性高分子聚合物在水中自组装而成的,具有壳-核结构的纳米递药载体。其疏水内核能增溶难溶性药物;其亲水性外壳能提高其在水溶液中的稳定性,保护药物,减少其在体内被网状内皮系统识别从而降低被快速清除的机率;其纳米级粒径,利于其携带药物利用肿瘤血管的高通透性通过增强渗透滞留效应(EPR)被动靶向肿瘤部位^[1-2]。

载药聚合物胶束的抗肿瘤活性研究对预测其临床药效具有重要意义,一直受到研究者关注。而体外细胞研究为其抗肿瘤活性及其机制研究奠定了研究基础^[3]。本课题组前期用水溶性、生物相容性良好、可降解的羧甲基壳聚糖(carboxymethyl chitosan, CMCS)与具有抗炎、抗肿瘤、抗肿瘤血管生成的中药有效成分大黄酸(rhein, R)合成了两亲性的羧甲基壳聚糖-大黄酸偶联物(CR 偶联物)^[4],作为难溶性药物递送载体材料,并制备了载抗肿瘤药物紫杉醇(paclitaxel, PTX)的 CR 偶联物胶束(PTX/CR 偶联物胶束),本研究对其 MCF-7 细胞毒性及其细胞摄取进行研究,为其进一步抗肿瘤研究提供依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

紫杉醇(上海中西三维药业有限公司);CR 偶联物(自制,大黄酸物质的量取代度为 7.2%),P4 荧光探针由上海复旦大学自制提供。透析袋(MWCO14000,上海绿鸟科技发展有限公司);磷酸盐缓冲液(1×)、0.25%胰蛋白酶(1×)、青霉素链霉素溶液(美国 HyClone™ 公司);胎牛血清、人重组胰岛素(美国 Sigma 公司);四甲基偶氮唑蓝(德国 BioFroxx 公司);MEM、Glutamax、非必需氨基酸(100×)(美国 Invitrogen 公司);Hoechst 33342(中国美仑生物公司),其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器

Zetasizer Nano ZS90 型激光粒度仪(英国 Malvern 公司);ESCALAB 250 型 X 射线光电能谱仪(美国 VG 公司);Infinite M200 PRO 多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司);LSM710 型激光共聚焦显微镜(德国蔡司公司);MS105DU 十万分之一电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);JY92-2D 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);

ALPHA1-2 LD 冷冻干燥机(德国 Christ 公司)。

1.3 细胞株

乳腺癌 MCF-7 细胞株(中国科学院细胞库)。

2 方法

2.1 PTX/CR 偶联物胶束的制备与表征

2.1.1 PTX/CR 偶联物胶束的制备^[5] 本课题组前期完成了透析法对 PTX/CR 偶联物胶束载药方法的考察,具体为:7 mg/mL CR 偶联物水溶液 2.6 mL,加入含 30 mg/mL PTX 的乙醇溶液 430 μ L,搅拌 20 min,冰水浴探头超声 30 min,蒸馏水透析 12 h,冰水浴探头超声 20 min,0.8 μ m 滤膜过滤,冷冻干燥,得 PTX/CR 偶联物胶束。并以 HPLC 法测得 PTX/CR 偶联物胶束的载药量为 32%。动态激光散射法(DLS)测得 PTX/CR 偶联物胶束的平均粒径为(187.8 ± 1.0) nm, PDI 为(0.13 ± 0.03)($n=3$),其 Zeta 电位为(-31.5 ± 4.2) mV($n=3$)。

2.1.2 X 射线衍射(XRD) 将 PTX、CR 偶联物、CR 偶联物 + PTX 的物理混合物、PTX/CR 偶联物胶束分别置于样品槽内,以 $5^\circ/\text{min}$ 的速度扫描,扫描的角度范围为 $3^\circ \sim 45^\circ$ 。测试电压及电流分别为 20 kV、20 mA,发射源为 Cu-K α 。

2.2 细胞毒实验

取对数生长期的 MCF-7 细胞,消化后调整细胞悬浮液至每毫升含 5×10^4 个细胞,向 96 孔板中每个孔各加入该细胞悬浮液 100 μ L,培养箱中孵育 24 h 使其贴壁,吸去培养液。设置不同分组:Cremophor EL-无水乙醇混合溶剂(1:1)组、CR 偶联物组、Taxol®组、PTX/CR 偶联物胶束组、空白组和正常对照组。向 96 孔板中加入上述各组受试液各 150 μ L, Taxol®组和 PTX/CR 偶联物胶束组分别含 PTX 浓度为 1、5、10、50、100、500、1 000 nmol/L 6 种不同浓度, Cremophor EL-无水乙醇混合溶剂(1:1)组和 CR 偶联物组按上述 Taxol®组和 PTX/CR 偶联物胶束组所含的溶剂或载体量计算,以上每个浓度平行 6 个孔,以不含细胞的培养基和 MTT 溶液作为空白组,含细胞不给药物的细胞作为正常对照组, 37°C , 5% CO_2 培养箱中孵育。

分别于加药后 24 和 48 h,将培养板取出,每孔各加入 0.5 mg/mL MTT 溶液 100 μ L, 37°C 培养箱中继续孵育 4 h 后取出,小心吸取上清液。每孔各

加入 DMSO 150 μL 溶解蓝紫色结晶物。用酶标仪在 570 nm 处测定吸收度(A)。并根据各孔的吸收度,按公式(1)计算细胞的存活率:

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{A_{\text{test}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{normal}} - A_{\text{blank}}} \times 100 \quad (1)$$

2.3 细胞摄取实验

2.3.1 共载 P4 和 PTX 的 CR 偶联物胶束的制备

称取 CR 偶联物 18 mg,加蒸馏水 2.6 mL 室温下冰水浴探头超声 10 min 使其充分溶解。称取 PTX 12.86 mg,精密称定,溶于 P4 的甲醇溶液(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)200 μL 中,超声使其溶解并混匀,然后逐滴加至 CR 偶联物胶束溶液中,剧烈搅拌 20 min,冰水浴探头超声 30 min,透析 12 h 后,结束透析定容至 6 mL,冰水浴探头超声 20 min,3 500 r/min 离心 5 min,取上清液,得共载 P4 和 PTX 的 CR 偶联物胶束,即(P4 + PTX)/CR 偶联物胶束。

2.3.2 细胞摄取实验 将 MCF-7 细胞以每毫升含 1×10^5 个细胞的密度接种于激光共聚焦培养皿上,每孔加入该细胞悬浮液 1 mL,培养至 4 d。从培养箱中取出激光共聚焦皿,弃去培养液,加入 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 PBS 溶液轻轻冲洗细胞 3 次。加入各含药制剂 0.5 mL,孵育 2 h 后,弃去药液,加入 4 $^{\circ}\text{C}$ 的冰冷 PBS 终止摄取,清洗细胞 3 次。弃去 PBS 溶液,用 4% 多聚甲醛固定 20 min,冷 PBS 清洗 5 次,加入 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 细胞核染色液 Hoechst 33342 1 mL 继续孵育 15 min,用冷 PBS 清洗 3 次后加入 PBS 200 μL ,于激光共聚焦显微镜 (CLSM) 下观察并拍照。

2.3.3 流式细胞半定量实验 将 MCF-7 细胞以每毫升含 2×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔板上,每孔加入该细胞悬浮液 2 mL,培养至 4 d。用 PBS 溶液轻轻冲洗细胞 2 次,加入各含药制剂 1 mL,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h 后,移除药液,加入 4 $^{\circ}\text{C}$ 的冰冷 PBS 终止摄取,清洗细胞 3 次,0.25% 胰蛋白酶消化细胞,加入含血清的培养液吹散细胞。收集细胞,离心,然后加入 PBS 洗涤,离心如此重复 3 次后加入 PBS 0.5 mL 将细胞制成细胞悬液。

3 结果

3.1 XRD 测定结果

PTX/CR 偶联物、CR 偶联物 + PTX 物理混合物以及 PTX/CR 偶联物胶束的 XRD 图谱见图 1。

PTX 在 5.1 $^{\circ}$ 和 12.8 $^{\circ}$ 处有 2 个强吸收峰,在 15 $^{\circ}$ ~ 30 $^{\circ}$ 之间又有若干个弱峰。CR 偶联物仅在 20 $^{\circ}$ 有一较弱吸收峰。CR 偶联物 + PTX 物理混合物图谱具有明显的 PTX 和 CR 偶联物的特征吸收峰,而 PTX/CR 偶联物胶束图谱中仅 5.1 $^{\circ}$ 处有较明显的吸收峰,可能是冻干前 PTX/CR 偶联物胶束释放在水溶液中的少量游离 PTX 造成的,但与相同量 CR 偶联物与 PTX 物理混合物的 XRD 图相比,PTX 其他各吸收峰极弱,推测大部分 PTX 可能以无定型状态包载于胶束内部。

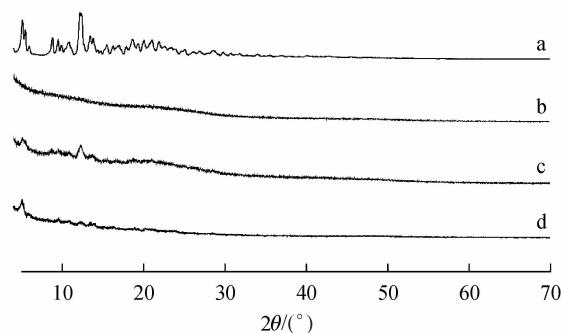


Figure 1 X-Ray diffraction spectra

a: Paclitaxel (PTX); b: Carboxymethyl chitosan-rhein conjugate (CR conjugate); c: CR conjugate and PTX mixture; d: Paclitaxel-loaded carboxymethyl chitosan-rhein polymeric micelles (PTX/CR PMs)

3.2 细胞毒实验结果

MTT 法检测 Taxol $^{\circledR}$ 的溶剂 Cremophor EL-无水乙醇混合溶剂(1:1)、CR 偶联物、Taxol $^{\circledR}$ 及 PTX/CR 偶联物胶束的细胞毒性的结果见图 2。结果显示,在实验浓度范围内,CR 偶联物具有良好的安全性。Taxol $^{\circledR}$ 及 PTX/CR 偶联物胶束均对 MCF-7 细胞有一定的抑制率。24 和 48 h 时,Taxol $^{\circledR}$ 及 PTX/CR 偶联物胶束对 MCF-7 细胞的抑制作用均随着 PTX 浓度的增加而增强,表明 Taxol $^{\circledR}$ 及 PTX/CR 偶联物胶束对 MCF-7 细胞的杀伤作用均有时间和浓度依赖性。24 h 时,在 10 ~ 1 000 nmol/L 范围内,PTX/CR 偶联物胶束表现出比 Taxol $^{\circledR}$ 更好的细胞杀伤力。PTX/CR 偶联物胶束 24 h 的 IC_{50} 为 293.9 nmol/L。48 h 时,PTX/CR 偶联物胶束与 Taxol $^{\circledR}$ 对 MCF-7 细胞的杀伤力相近。

3.3 细胞摄取实验结果

为了进一步考察 CR 偶联物胶束以载药胶束完整的形式被细胞摄取还是释放药后药物以游离的形式被细胞摄取,环境响应型荧光探针 P4 被应用于细胞摄取实验。利用 CLSM 定性观察(图 3)

和流式细胞仪定量测定(图 4)的方法对 P4 与 PTX 共载的 (P4 + PTX)/CR 偶联物胶束在 MCF-7 细胞中的摄取情况进行了研究。CLSM 拍摄的 MCF-7 细胞摄取照片(图 3)中,红色荧光信号为 P4 荧光探针发出,蓝色荧光信号为 Hoechst 33342 染色的细胞核。图中显示,游离的 P4 溶液处于水环境中,荧光淬灭,因此只能观察到蓝色的细胞核,而 (P4 + PTX)/CR 偶联物胶束组的红色荧光主要分布在细胞核(蓝色荧光)周围,说明 (P4 + PTX)/CR 偶联物胶束主要分布于细胞质。与此同时,给予 MCF-7 细胞相同浓度的制剂并通过流式细胞仪分析,其结果如图 4 所示,游离 P4 溶液的荧光强度极弱,可

认为是细胞自身所发出的荧光,而 (P4 + PTX)/CR 偶联物胶束的荧光强度是游离 P4 的 500 倍以上,表明 (P4 + PTX)/CR 偶联物胶束是以完整的胶束形式被 MCF-7 细胞内吞摄入,这些结果与通过 CLSM 观察的结果相吻合,这为之后体内的进一步研究提供了理论依据。

CLSM 观察结果和流式细胞术检测的 (P4 + PTX)/CR 偶联物胶束加维拉帕米组的细胞摄取结果显示,其与 (P4 + PTX)/CR 偶联物胶束在 MCF-7 细胞中的摄取量无明显差异,说明 CR 偶联物胶束可以保护其所载的荧光探针和/或药物不被 P-糖蛋白(P-gp)外排到细胞外。

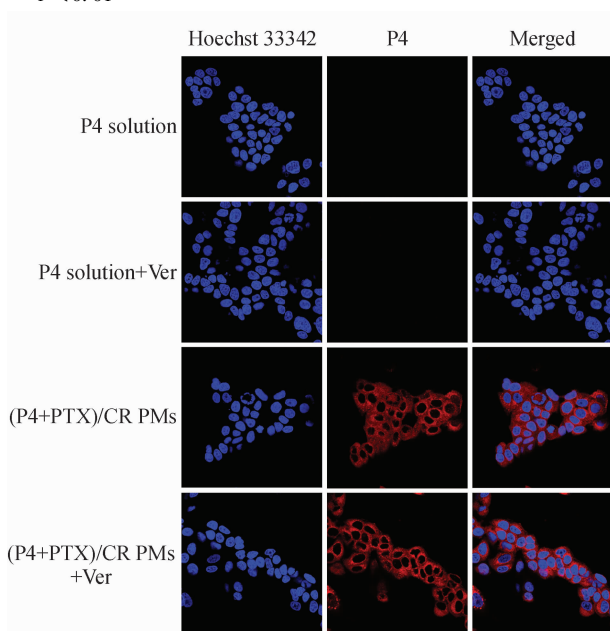
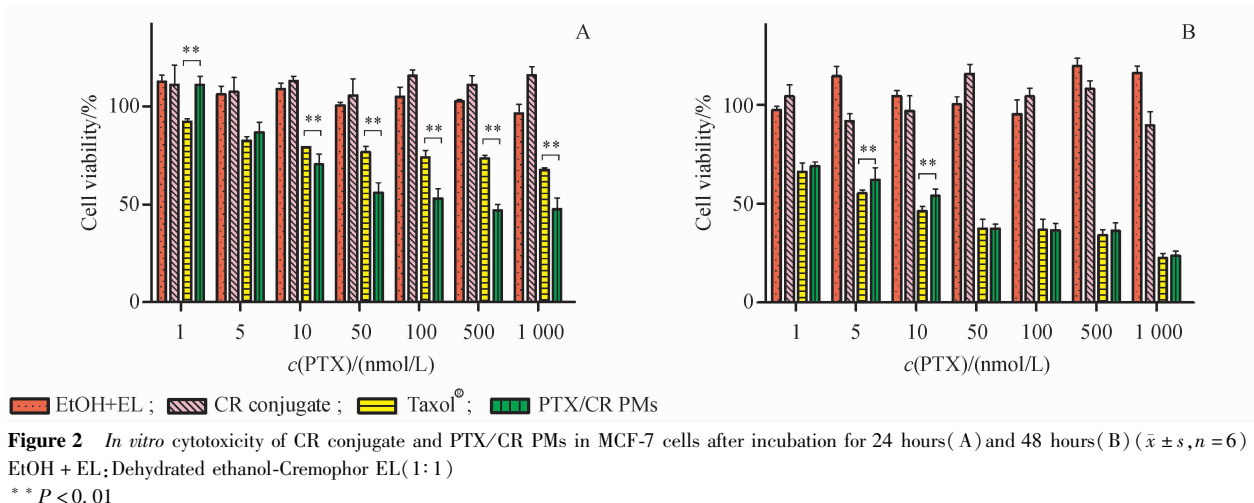


Figure 3 Cellular uptake of P4 and PTX co-loaded carboxymethyl chitosan-rhein polymeric micelles [(P4 + PTX)/CR PMs] in MCF-7 cells by confocal laser scanning microscope
Ver: Verapamil

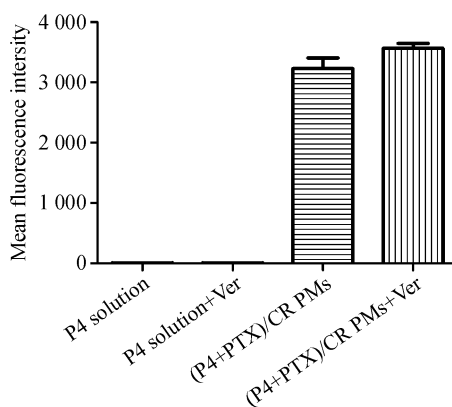


Figure 4 Cellular uptake of (P4 + PTX)/CR PMs in MCF-7 cells by flow cytometry ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

PTX 主要是通过抑制微管解聚,阻止肿瘤细胞的有丝分裂,因而对肿瘤细胞产生较强的细胞毒作用^[6-7]。因此,聚合物胶束是否能够递送 PTX 到达细胞内其作用靶点上,对能否对肿瘤细胞

胞产生杀伤作用具有重要意义。本实验结果表明,PTX/CR 偶联物胶束主要分布于细胞质中,与紫杉醇作用部位相一致,有利于紫杉醇抗肿瘤作用的发挥。

PTX/CR 偶联物胶束在 24 h 时表现出优于 Taxol® 对 MCF-7 细胞的杀伤效果,本课题组前期实验已证明 CR 偶联物与 PTX 具有一定的协同抗肿瘤作用^[4],因此推测,其对 MCF-7 细胞良好的细胞杀伤作用可能与载体材料 CR 偶联物与 PTX 的协同作用相关。

本实验中所使用的荧光探针 P4 为上海复旦大学药学院吴伟教授课题组开发的具有 4,4'-二氟-4-硼-3 α ,4 α -二氮杂-s-并二苯(BODIPY)结构的荧光探针。这种荧光探针在水环境中荧光分子因疏水作用会发生分子间 π - π 堆积,使荧光发生淬灭(aggregation-caused quenching, ACQ 效应)^[8-10]。该 ACQ 探针具有高度亲脂性,可以紧密嵌入脂质或包裹在聚合物胶束内部中从而发出荧光信号。一旦聚合物胶束解聚或探针从胶束中泄漏,荧光探针即因被释放进入水环境中而快速聚集发生荧光淬灭,从而与保留在聚合物胶束中的荧光探针发射出的强烈荧光信号形成鲜明对比,由此可以判断纳米胶束在细胞内外的完整性。以 P4 为荧光探针的实验结果表明,CR 偶联物胶束是以完整形态进入 MCF-7 肿瘤细胞内,并且可以保护其所载荧光探针和/或药物避免被 P-gp 外排到细胞外,此研究将为 CR 偶联物的进一步研究奠定基础。

致谢:感谢复旦大学吴伟教授和赵伟利教授提供 P4 探针。感谢闽台中药分子生物技术国家地方联合工程研究中心,福建省中药学重点实验室,福建省中药资源研究与开发利用重点实验室对本研究的支持。

参考文献

- [1] Wang XY, Qiu LZ, Li QZ, et al. Synthesis of PEGylated carboxymethyl chitosan-rhein conjugate and preparation of paclitaxel-loaded polymeric micelles[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2018, **49**(5): 596-602.
- [2] Sun JF, Guo CJ, Zhang YD, et al. Preparation and characterization of multi-functional targeting nano-carrier based on pH-redox tumor microenvironment[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2017, **48**(3): 305-310.
- [3] Wang XY, Chen YH, Dahmani FZ, et al. Amphiphilic carboxymethyl chitosan-quercetin conjugate with P-gp inhibitory properties for oral delivery of paclitaxel[J]. *Biomaterials*, 2014, **35**(26): 7654-7665.
- [4] Wang XY, Guo YL, Qiu LZ, et al. Preparation and evaluation of carboxymethyl chitosan-rhein polymeric micelles with synergistic antitumor effect for oral delivery of paclitaxel[J]. *Carbohydr Polym*, 2019, **206**: 121-131.
- [5] Guo YL, Qiu LZ, Lin X, et al. Preparation of paclitaxel loaded carboxymethyl chitosan-rhein polymeric micelles[J]. *Fujian J Tradit Chin Med* (福建中医药), 2017, **48**(1): 16-18.
- [6] Bernabeu E, Gonzalez L, Cagel M, et al. Novel soluplus (+)-TPGS mixed micelles for encapsulation of paclitaxel with enhanced *in vitro* cytotoxicity on breast and ovarian cancer cell lines[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2016, **140**: 403-411.
- [7] Ahmed AA, Wang XY, Lu Z, et al. Modulating microtubule stability enhances the cytotoxic response of cancer cells to Paclitaxel[J]. *Cancer Res*, 2011, **71**(17): 5806-5817.
- [8] Hu XW, Zhang J, Yu Z, et al. Environment-responsive aza-BODIPY dyes quenching in water as potential probes to visualize the *in vivo* fate of lipid-based nanocarriers[J]. *Nanomed-Nanotechnol Biol Med*, 2015, **11**(8): 1939-1948.
- [9] Ma YH, He HS, Xia F, et al. *In vivo* fate of lipid-silybin conjugate nanoparticles: implications on enhanced oral bioavailability[J]. *Nanomed-Nanotechnol Biol Med*, 2017, **13**(8): 2643-2654.
- [10] Xie YK, Shi BK, Xia F, et al. Epithelia transmembrane transport of orally administered ultrafine drug particles evidenced by environment sensitive fluorophores in cellular and animal studies[J]. *J Control Release*, 2018, **270**: 65-75.