

面两亲性分子改造的铂类脂质体的分泌性磷脂酶 A₂ 响应性和体外抗肿瘤活性

刘燕娇, 文成, 李丹, 高佩, 朱国东*

(五邑大学生物科技与大健康学院, 江门 529030)

摘要 铂类脂质体在肿瘤部位的定点药物释放是其发挥疗效的关键, 本研究以二棕榈酰磷脂酰胆碱和二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2k两种磷脂为基础, 构建带有面两亲性分子石胆酸(lithocholic acid, LCA)或3-酮石胆酸(3-keto lithocholic acid, kLCA)的新型脂质体(LCA-Lip, kLCA-Lip), 测试其对肿瘤分泌性磷脂酶 A₂ (secretory phospholipase A₂, sPLA₂) 的响应性。采用薄膜水化-挤出法制备脂质体, 对所制备脂质体进行理化性质表征, 通过酶刺激脂质体释放荧光素CF实验研究其酶响应性, 并通过体外毒性实验研究其抑制肿瘤细胞增殖的活性。结果表明: 所制备的面两亲分子改造的奥沙利铂脂质体平均粒径约为100 nm, 且分散均匀(PDI < 0.11), 相比于不含面两亲性分子的脂质体(C-Lip), 包封率和载药量没有显著性差异; 与不加胎牛血清(FBS)的孵育条件相比, 加入10%, 50%的FBS没有显著性地增加奥沙利铂从脂质体的泄漏率。体外荧光素CF释放特性实验结果表明, 相比C-Lip脂质体, LCA-Lip和kLCA-Lip脂质体对Colo205结肠癌细胞分泌的sPLA₂响应度更高, 在酶的作用下LCA-Lip和kLCA-Lip在24 h释放约70%的荧光素CF, 而C-Lip释放率仅约20%; 体外抗肿瘤活性结果表明, 奥沙利铂LCA-Lip和奥沙利铂kLCA-Lip对高表达sPLA₂的Colo205细胞增殖的抑制效果明显高于奥沙利铂C-Lip。本研究表明, LCA或者3-kLCA面两亲性分子可提高脂质体对肿瘤细胞分泌的sPLA₂的响应性, 为未来开发可应用于临床, 具有定点释药功能的铂类脂质体提供了新的思路。

关键词 分泌性磷脂酶 A₂; 触发释放; 石胆酸; 3-酮石胆酸; 酶响应性脂质体; 抗肿瘤活性; 面两亲性分子

中图分类号 R944 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2022)04-0441-11

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20220407

引用本文 刘燕娇, 文成, 李丹, 等. 面两亲性分子改造的铂类脂质体的分泌性磷脂酶 A₂ 响应性和体外抗肿瘤活性[J]. 中国药科大学学报, 2022, 53(4): 441 - 451.

Cite this article as: LIU Yanjiao, WEN Cheng, LI Dan, *et al.* Secretory phospholipase A₂ responsiveness and *in vitro* anti-tumor activity of oxaliplatin-loaded liposomes modified with facial amphiphiles[J]. *J China Pharm Univ*, 2022, 53(4): 441 - 451.

Secretory phospholipase A₂ responsiveness and *in vitro* anti-tumor activity of oxaliplatin-loaded liposomes modified with facial amphiphiles

LIU Yanjiao, WEN Cheng, LI Dan, GAO Pei, ZHU Guodong*

School of Biotechnology and Health Sciences, Wuyi University, Jiangmen 529030, China

Abstract Modulating drug release from liposomes at tumor sites are important for eliciting therapeutic effects of platinum drugs considering their low permeability through liposomal membranes, here a novel secretory phospholipase A₂ (sPLA₂) responsive-liposome system was constructed for oxaliplatin (L-OHP). Lipid ingredients dipalmitoyl phosphatidylcholine and distearoyl phosphoethanolamine-PEG2k, together with facial amphiphiles (FAs) including lithocholic acid (LCA) or 3-keto lithocholic acid (kLCA) were used to prepare sPLA₂ responsive-liposome (LCA-Lip or kLCA-Lip) by thin-film hydration method. The physicochemical properties, sPLA₂-responsive drug release and anti-tumor activity were evaluated *in vitro*. The results indicated L-OHP loaded liposomes modified with FAs had similar particle sizes of approximately 100 nm and narrow size distributions (PDI < 0.11). Compared with non-FAs-containing liposomes (C-Lip), LCA-Lip or kLCA-Lip has a comparable entrapment effi-

收稿日期 2022-02-25 * 通信作者 Tel: 18826443916 E-mail: wyuchemzgd@126.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (No. 8167131086)

ciency and loading efficiency. LCA-Lip or kLCA-Lip didn't show significant higher drug leakage at the presence of 10% or 50% fetal bovine serum (FBS) in media than that in media without FBS. Treated with secretory phospholipase A₂ from Colo205 cells culture conditioned medium (CCM sPLA₂) for 24 h, FAs modified liposomes released about 70% of carboxyfluorescein (CF), while C-Lip only released 20% of CF. Compared to L-OHP loaded C-Lip, L-OHP-loaded FAs-included formulations had much greater anti-proliferative activity against sPLA₂-secreting Colo205 cells. In summary, our results shows that LCA or kLCA promotes responsiveness of liposomes to tumor-related sPLA₂ and points to a new way to develop platinum drugs-loaded liposomal delivery systems with better release mechanisms.

Key words secretory phospholipase A₂; triggered-release; lithocholic acid; 3-keto lithocholic acid; enzyme-responsive liposome; anti-tumor activity; facial amphiphiles

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 8167131086)

铂类化疗药是临床上广泛使用的药物,具有较高的抗肿瘤活性,但因其非靶向体内分布以及无选择性进而杀伤正常细胞造成严重的不良反应,从而限制了其临床应用^[1]。脂质体作为铂类化疗药的运输载体,可以提高药物靶向性,减少药物不良反应,但是如果载药脂质体到达肿瘤部位后不能有效地释放药物,会影响治疗效果^[2]。比较典型的例子是SPI-077脂质体,在临床Ⅱ期研究中治疗头颈癌、晚期非小细胞肺癌以及复发的卵巢癌,结果发现,SPI-077虽然在肿瘤部位靶向积累,但由于极其缓慢的药物释放,其抗肿瘤效果远低于游离顺铂化疗药^[3]。因此,开发具有可控释放药物性能的铂类脂质体对于肿瘤治疗至关重要。

分泌性磷脂酶 A₂ (secretory phospholipase A₂, sPLA₂) 在大部分肿瘤类型中高表达,包括前列腺癌、乳腺癌、胰腺癌和结直肠癌等^[4-7]。研究人员以这种酶作为触发脂质体释放药物的刺激物,研究酶响应性脂质体以提高载药脂质体在靶点部位的药物释放能力^[8-11]。sPLA₂是一种酯酶,倾向于水解脂质体中磷脂的 sn-2 位酯键,破坏磷脂膜释放药物,且水解产物为 1 分子溶血磷脂和 1 分子脂肪酸可作为膜渗透增强剂进一步触发药物释放^[11]。因为 sPLA₂ 对水解底物有选择性,所以脂质体对 sPLA₂ 的响应性与脂质体组成成分有关,研究表明该酶更倾向于水解破坏由带负电荷的磷脂形成的脂质体,比如带磷脂酰乙醇胺(PE)或磷脂酰甘油(PG)等磷脂头的脂质^[9-10],但是较高含量的阴离子磷脂形成的脂质体会激活补体反应使载药脂质体的体内不良反应增加。目前进入临床研究阶段的酶敏感脂质体 LiPlaCis,脂质体配方中通过加入物

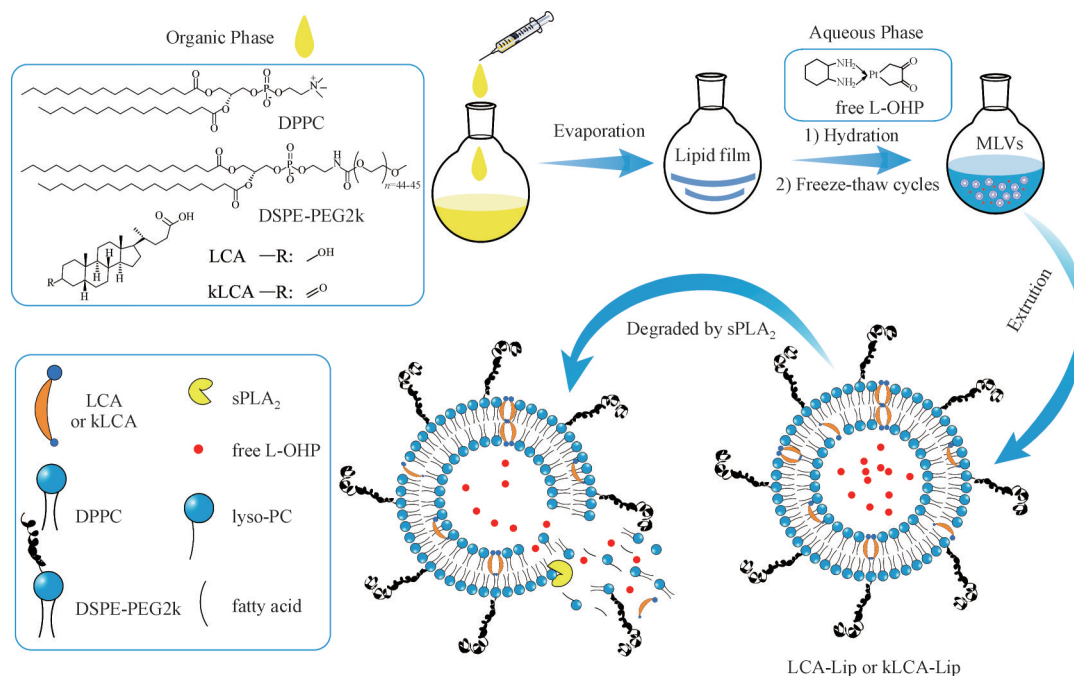
质的量分数为 25% 阴离子磷脂二棕榈酰磷脂酰甘油(distearoyl phosphoglycerol, DSPG) 以确保脂质体对 sPLA₂ 的响应性,但是,动物实验和临床 I 期安全性评价实验表明,引入过高的 PG 阴离子磷脂会激活补体反应,造成严重的肝毒性和输液反应等副作用^[10,12],因此,需要寻找能提高酶刺激响应性的其他两亲性分子用于构建酶响应性脂质体,使酶响应性脂质体能在靶点部位可控释放药物的同时也具有较高的生物相容性。

石胆酸是胆酸类化合物,是人体内胆固醇代谢的次级胆酸,其疏水甾核结构和甲基基团形成疏水凸面,其羟基和羧基形成亲水凹面,是一个面两亲性分子,可自身相互作用形成胶束,也可与磷脂、胆固醇等形成混合胶束,用于运输药物,相比于不含石胆酸改造的脂质体,加入石胆酸改造脂质体的优势在于石胆酸能提高脂溶性药物溶解性,并且可作为膜渗透性增强剂,促进药物透过生物障碍,包括皮肤、血脑屏障、肠壁、鼻黏膜和角膜^[13]。另外,De Luca 等^[14]研究表明胆酸类分子(5 μmol/L)能显著提高 sPLA₂ 的活性($P = 0.012$)。将这类能提高 sPLA₂ 的活性和提高细胞膜渗透性的胆酸类分子与磷脂共制备成脂质体,其酶响应性如何目前还没有相关研究^[8-11]。

本研究选择石胆酸(lithocholic acid, LCA)和 3-酮石胆酸(3-keto lithocholic acid, kLCA)两种面两亲性胆酸类分子与磷脂制备成脂质体,LCA 相比于其他的胆酸类分子,其甾核含羟基个数最少(只有 1 个 3α-OH),疏水性更强,不易造成包封药物的早期泄漏。本研究以二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)和二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2k(DSPE-

PEG2k)两种磷脂为基础,加入 LCA 或者 kLCA 构建脂质体,研究其 sPLA₂ 酶刺激响应释放药物的特性和体外抗肿瘤效果。面两亲性分子 LCA 或者

kLCA 改造脂质体的制备流程及其响应 sPLA₂ 刺激触发药物释放的示意图见路线 1。



Scheme 1 Schematic diagram of the preparation of facial amphiphiles-included liposomes (LCA-Lip), ($n(\text{DPPC}):n(\text{LCA}):n(\text{DSPE-PEG2k})=95:10:5$); kLCA-Lip, ($n(\text{DPPC}):n(\text{kLCA}):n(\text{DSPE-PEG2k})=95:10:5$) and subjection to secretory phospholipase A₂ (sPLA₂) degradation for drug release. DPPC: Dipalmitoyl phosphatidylcholine; DSPE-PEG2k: distearoyl phosphoethanolamine-PEG2k; LCA: Lithocholic acid; kLCA: 3-keto-lithocholic acid; L-OHP: Oxaliplatin; MLVs: Multilamellar vesicles

1 材料

1.1 药品与试剂

1,2-二棕榈酰-*sn*-甘油-3-磷酸胆碱(dipalmitoyl phosphatidylcholine, DPPC)、1,2-硬脂酰-*sn*-甘油-3-磷酸乙醇胺-*N*-[甲氧基(聚乙二醇)-2000](distearoyl phosphoethanolamine-PEG2k, DSPE-PEG2k)(美国 Avanti Polar Lipids 公司);石胆酸(Lithocholic Acid, LCA, 英国 Fluorochem 有限公司);3-酮基-5 β -胆烷-24-羧酸(3-keto lithocholic acid, kLCA)按文献方法合成^[15];磷酸标准液(上海西格玛奥德里奇贸易有限公司);曲拉通 X-100、5(6)-荧光素[5(6)-carboxyfluorescein, CF](北京百灵威公司);细胞膜绿色荧光探针(DiO, 北京索莱宝科技有限公司);奥沙利铂(oxaliplatin, L-OHP, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司);细胞计数试剂盒(CCK-8, 上海陶术生物科技有限公司);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 上海依科赛生物制品有限公司);胰酶(0.25% trypsin-EDTA)、双抗(pen strep)、RPMI

1640 和 DMEM 培养基(美国赛默飞公司);蜂毒型分泌性磷脂酶(bee venom secretory phospholipase A₂, Bv sPLA₂)、sPLA₂(human type IIA)试剂盒(深圳欣博盛生物科技有限公司);实验用水为超纯水(电阻>3 M Ω , 美国密里博 Milli-Q 纯水仪);乙腈、甲醇和三氯甲烷为色谱级;其他溶剂为分析级,未经进一步处理直接使用。

1.2 仪器

超高效液相色谱-三重四极杆液质联用仪(美国 Sciex 公司);高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司);纳米粒度与 Zeta 电位仪(美国麦奇克公司);Gen5 多功能酶标仪(美国伯腾仪器公司);CytoFLEX 流式细胞仪、高速冷冻离心机(美国贝克曼贝尔特公司);中型挤压仪(美国 Northern Lipids 公司)。

1.3 细胞株

人结肠直肠癌 HT-29 细胞和人结肠直肠癌 Colo205 细胞购自广州赛库生物技术有限公司。

2 方法

2.1 脂质体的制备

脂质体通过薄膜水化-冻融循环挤出法制备。首先按配方要求将定量的磷脂、LCA、kLCA或DiO(质量分数,3%磷脂)先溶于三氯甲烷中,然后使用微量玻璃进样针将其转移到圆底烧瓶中,使用减压旋蒸仪除去有机溶剂三氯甲烷以形成均匀薄膜。痕量有机溶剂通过过夜真空干燥除去。加入所要包封物质的水溶液(100 mmol/L 荧光素 CF 水溶液或 9 g/L 的奥沙利铂水溶液),在 55 °C 中水化 2 min,然后涡旋 2 min,重复此步骤使薄膜全部水化成脂质体混悬液。混悬液在液氮冻结,然后在 55 °C 下水浴溶解,重复此冻融循环 6 次。使用中型挤压仪使混悬液挤压通过两层聚碳酸酯膜(100 nm)5 次以上,获得分散均一的单层囊泡脂质体。未包封的荧光素 CF 或者 DiO 通过 G75 凝胶柱分离除去,未包封的奥沙利铂通过透析法透析 48 h 除去,透析袋截留相对分子质量大小为 7 kD。制备好的脂质体放在 4 °C 下保存待用。

2.2 包封率和载药量分析

脂质体磷脂浓度通过 Bartlett 无机磷酸盐分析法测定^[16]。通过透析法分析载药脂质体包封率。采用高效液相色谱法测定奥沙利铂质量^[17]。将待分析载药脂质体混悬液 2 mL 加入透析袋(截留相对分子质量为 7 kD),透析液为 400 mL,24 h 透析完成时取出保留液 20 μL(其间换透析液两次),加入 10% 曲拉通 20 μL 破膜,并用超纯水定容到 1 mL 后进样分析测定包裹的奥沙利铂质量。取透析液 1 mL 进样分析测定未被包裹的奥沙利铂质量。包封率(entrapment efficiency, EE, %) = 包载的药物质量 / (包载的药物质量 + 未被包载的药物质量) × 100; 载药量(loading efficiency, LD, %) = 包载的药物质量 / 脂质体载体的质量 × 100。

2.3 电位和粒径分布分析

载药脂质体的电位、粒径大小及分散度通过纳米粒度与 Zeta 电位仪检测,检测时的磷脂浓度为 2.5 mmol/L。

2.4 酶刺激响应性分析

脂质体对 sPLA₂ 酶刺激响应性通过考察包裹荧光素 CF 脂质体的 CF 释放特性进行分析。首先把包裹荧光素 CF 的脂质体和氯化钙加入玻璃试

管中,用 Tri-HCl 缓冲液稀释使磷脂和氯化钙的最终浓度分别为 50 μmol/L 和 1 mmol/L,实验组加入 sPLA₂ 酶(100 μg/L),对照组不加 sPLA₂ 酶,然后放置在 27 °C 水浴中孵育,首先在 0 h 取样品 200 μL,通过酶标仪检测荧光强度 F_0 ,作为荧光背景强度,检测激发光波长为 480 nm,发射光波长为 510 nm,然后分别在不同时间点取样品 200 μL 检测荧光强度 F_t ,最后加入 10% 曲拉通 X-100 10 μL 破膜后检测总的荧光强度 F_{triton} 。荧光素 CF 释放率 = $(F_t - F_0) / (F_{\text{triton}} - F_0) \times 100\%$ 。

2.5 体外血液稳定性分析

为了预测载药脂质体在体内生理条件下的稳定性,使用 10%, 50% FBS 体外模拟生理条件,使用透析法分析载药脂质体的药物泄漏率。首先使用 0%, 10%, 50% FBS/HEPES 缓冲液(HEPES 缓冲液含 5% 葡萄糖和 10 mmol/L, pH 7.4)稀释载药脂质体并定容到 2 mL,最终使药物质量浓度统一为 58 μg/mL,待分析液加入到透析袋(截留相对分子质量为 7 kD)中,透析液为 HEPES 缓冲液 15 mL,放在 37 °C 摇床上振荡,在 24 h 和 48 h 时,收集透析液 1 mL 进样测量载药脂质体泄漏的奥沙利铂峰面积 A_{free} ,另外取相同体积的脂质体,使用曲拉通破膜,定容到 15 mL,取 1 mL 进样分析载药脂质体总的奥沙利铂的峰面积 A_{tot} 。采用超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用仪测定奥沙利铂峰面积。奥沙利铂脂质体药物泄漏率(%) = $A_{\text{free}} / A_{\text{tot}} \times 100$ 。

液相色谱条件:反向色谱柱为 Kinetex C₁₈(100 mm × 2.1 mm, 2.6 μm);进样体积为 5 μL;流动相为 10% 甲醇和 90% 水(含 0.1% 甲酸);流速为 0.5 mL/min;柱温为 40 °C。

质谱条件:离子源,ESI 源;扫描模式,正离子模式的多反应监控模式(MRM);采集离子对,母离子 Q1 mass/子离子 Q3 mass (m/z): 397.90/96.0;离子化电压,5.5 kV;离子化温度,550 °C;去簇电压,60 V;碰撞电压,52 eV。

2.6 sPLA₂ 酶的收集与定量

结肠癌 Colo205 细胞分泌的磷脂酶 A₂(secretory phospholipase A₂ from Colo205 cells culture conditioned medium, CCM sPLA₂) 来源于体外培养 Colo205 细胞的上清液,通过超滤管浓缩上清液的 CCM sPLA₂ 到合适浓度。将 3×10^6 个 Colo205 细胞接种于 T75 培养皿中,使用含有 10% FBS, 1% 双抗

的全培 RPMI 1640 培养基培养,置于 37 °C、5% CO₂ 的条件下培养,24 h 贴壁后,弃掉旧培养基,使用 PBS 缓冲液润洗 1 次,然后加入不含 FBS 和酚红的新鲜培养基继续孵育 48 h,收集细胞上清液,18 瓶 T75 共收集上清液 350 mL。使用高速离心机,转速为 6 000 r/min 离心 10 min,除去死细胞和其他沉淀物,收集上清液。使用超滤管(截留相对分子质量为 3 kD)浓缩上清液,转速为 6 000 r/min,最终浓缩体积为 2 mL。使用 sPLA₂ (human type IIA) 免疫检测试剂盒检测酶的质量浓度为 (11.19 ± 30) mg/L。CCM sPLA₂ 放在 -80 °C 保存待用。

2.7 体外细胞摄取分析

脂质体体外细胞摄取量通过流式细胞仪分析测定。制备 4 g/L DiO 储备液,取 DiO 4 mg 溶于氯仿 1 mL 中,使用甲醇稀释成 4 000, 400, 40, 4 μg/L 4 个标准溶液浓度,通过酶标仪测定荧光强度,激发光波长和发射光波长分别为 484 nm 和 501 nm,以荧光强度为纵坐标,以 DiO 浓度为横坐标绘制标准曲线。线性方程和相关系数分别为 $y = 0.736x + 51.56$, $R^2 = 0.998$, 表明 DiO 荧光强度在 4 ~ 4 000 μg/L 质量浓度范围间线性相关性好。制备待测样品溶液,取 DiO 标记的脂质体 100 μL,加入甲醇 900 μL,在 65 °C 下加热 2 min,超声 2 min 破膜,然后移取 200 μL 加入 96 孔板中,使用酶标仪测定 DiO 荧光强度,然后通过标准曲线推出 DiO 标记脂质体的 DiO 质量浓度。

Colo205 细胞或者 HT-29 细胞以每孔 2×10^5 个的细胞密度接种于 6 孔板中,24 h 细胞贴壁后,移弃旧培养液,加入使用无 FBS 培养基稀释的 DiO 标记脂质体 (3 μmol/L DiO) 1 mL,孵育箱避光培养 2 h 后,移弃培养液,用冷的 PBS 清洗两次,加入胰酶 200 μL,消化并收集细胞,使用超速离心机在 1 800 r/min 转速中离心 5 min,然后用冷的 PBS 缓冲液 600 μL 重悬,再次离心,离心完成后重悬,使用流式细胞仪分析细胞摄取脂质体情况。

2.8 抗肿瘤活性分析

采用 CCK-8 分析法考察药物抑制细胞增殖的能力。将 Colo205 和 HT-29 细胞接种于 96 孔板上,细胞密度分别为每孔 6×10^3 个和 5×10^3 个,使用含有 10% FBS, 1% 双抗的完全培养基培养,置于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养,24 h 贴壁后,移弃旧培养基,加入使用培养基两倍梯度稀释后的药液(游离奥

沙利铂,载药脂质体,奥沙利铂浓度范围为 0.43 ~ 110 μmol/L;空白脂质体,其最高磷脂浓度与载药脂质体的最高磷脂浓度相同),空白对照组加入新鲜培养基,培养 72 h 后,加入 CCK-8 10 μL,37 °C 避光孵育 2 h 后,通过酶标仪检测吸收度 A ,检测波长为 450 nm。细胞存活率 (%) = $A_{\text{test}}/A_{\text{blank}} \times 100$ 。

2.9 数据分析

所有数据均检测 3 次以上,以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表达。粒径分布数据用 Origin v9.0 软件处理,稳定性、细胞内吞、抗肿瘤活性数据用 GraphPad Prism v8.0 软件处理。采用 GraphPad Prism v8.0 软件的非线性回归方法分析药物半数抑制浓度 (IC₅₀),采用 GraphPad Prism v8.0 软件的双因素方差分析方法对荧光素 CF 释放数据进行统计学分析,采用 GraphPad Prism v8.0 软件的单因素方差分析方法对稳定性和细胞内吞数据进行统计学分析。

3 结果与讨论

3.1 脂质体配方的设计与理化性质表征

胆酸类分子与磷脂膜共存时,胆酸类分子浓度超过一定的阈值会破坏磷脂膜结构。研究表明,胆酸类分子与磷脂的物质的量比例小于 0.11 的时候,胆酸类分子(如去氧胆酸和鹅去氧胆酸)会完全嵌入磷脂膜内;当其比例高于 0.11 时,胆酸类分子和磷脂会形成胶束^[18]。因此,加入物质的量分数为 9% LCA 或者 9% kLCA 以制备脂质体 LCA-Lip 或者 kLCA-Lip。所制备脂质体的磷脂主要为两亲性磷脂 DPPC,加入 5% DSPE-PEG2k 磷脂以提高脂质体体内循环半衰期^[19]。所制备载药脂质体粒径大小、多分散指数 (polymer dispersity index, PDI) 如图 1 和表 1 所示。制备的脂质体粒径分散均一 (PDI < 0.11), 粒径大小约为 100 nm。如表 1 所示, LCA-Lip 和 kLCA-Lip 的电位大小与 C-Lip 相似,均为 -20 mV 左右,表明 LCA 或者 kLCA 所带的羧基并没有影响脂质体表面电荷大小,可能是聚合物 DSPE-PEG2k 的加入,屏蔽了其羧基所带来的电荷干扰^[20]。在奥沙利铂包封率及载药量方面,如表 1 所示, LCA-Lip 和 kLCA-Lip 与 C-Lip 相比没有显著性差异 (EE: LCA-Lip vs C-Lip, $P = 0.89$, kLCA-Lip vs C-Lip, $P = 0.71$; LD: LCA-Lip vs C-Lip, $P = 0.34$, kLCA-Lip vs C-Lip, $P = 0.94$), 而

LCA-Lip 比 kLCA-Lip 略高 (EE: LCA-Lip vs kLCA-Lip, $P = 0.46$; LD: LCA-Lip vs kLCA-Lip, $P = 0.50$), $P < 0.05$ 为具有显著性差异, 结果表明, LCA 的 3- α 位羟基的改变可能会影响其构建的脂质体对药物的包载率, LCA 分子在磷脂膜中以 3- α 羟基之间的氢键相互作用形成二聚体, 而 kLCA 的 3- α 酮基脂溶性较高, 兼容于磷脂膜可单独存在, 不一定以二聚体形式相交, 这种差别可能造成所构建磷脂膜性质的不同从而导致脂质体的药物包封率和载药量的差异。

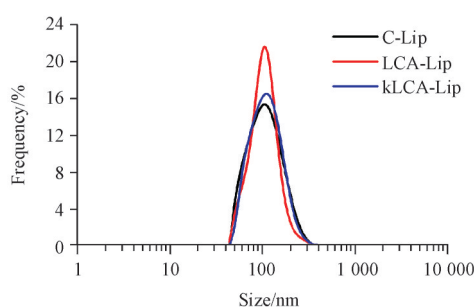


Figure 1 Size distribution of liposome suspensions was determined by dynamic light scattering (DLS)

C-Lip, $n(\text{DPPC}): n(\text{DSPE-PRG2k}) = 95:5$; LCA-Lip, $n(\text{DPPC}): n(\text{LCA}): n(\text{DSPE-PEG2k}), 95:10:5$; kLCA-Lip, $n(\text{DPPC}): n(\text{kLCA}): n(\text{DSPE-PEG2k}), 95:10:5$

Table 1 Characterization of liposomes in three formulations prepared by the thin-film hydration method ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Group	Size/nm	PDI	Zeta potential/mV	LD/%	EE/%
C-Lip	105 \pm 1	0.11 \pm 0.02	-20.4 \pm 0.3	2.1 \pm 0.2	4.3 \pm 0.3
LCA-Lip	96 \pm 4	0.09 \pm 0.00	-19.6 \pm 0.3	1.8 \pm 0.2	4.7 \pm 1.7
kLCA-Lip	105 \pm 2	0.10 \pm 0.01	-19.6 \pm 0.1	2.1 \pm 0.3	3.6 \pm 0.6

PDI: Polymer dispersity index; LD: Loading efficiency; EE: Encapsulation efficiency

3.2 酶刺激响应性分析

荧光素 CF 释放实验可以用来推断包裹亲水性药物脂质体在刺激物作用下的释放特性^[9]。荧光素 CF 包封在脂质体水性内腔时会发生高浓度荧光淬灭现象 (50 ~ 100 mmol/L), 当荧光素 CF 被释放出来后, 恢复去淬灭状态, 其荧光强度可以被酶标仪检测^[21]。在哺乳动物中, sPLA₂ 有 11 种被表征出来的亚型 (IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X, XIA, XIIB), 不同亚型的分泌型磷脂酶存在于不同组织部位和细胞部位, 在不同生理病理部位中扮

演着不同的角色, 有其独特的酶功能^[22]。蜂毒型 (bee venom, Bv) sPLA₂ 类似于人源性 sPLA₂-III, 有相似结构, 且经济易得, 常用来代替人源性 sPLA₂-III 用于研究酶功能^[9, 23-24], 但 Bv sPLA₂ 和人源性 sPLA₂-III 具有不同的底物亲和性, sPLA₂-III 对 PG 磷脂有强亲和力而 Bv sPLA₂ 没有这种选择性^[25]。Colo205 细胞分泌的 sPLA₂ 含有多种磷脂酶亚型, 主要的磷脂酶亚型为 sPLA₂-IIA^[10, 26]。sPLA₂-III 和 sPLA₂-IIA 在不同的肿瘤细胞中超表达^[4-7, 23, 27], 所以本研究选用 Bv sPLA₂ 和 CCM sPLA₂ 两种不同来源的酶研究脂质体的酶响应释放药物特性。如图 2-A 所示, 在 Bv sPLA₂ 作用的 48 h 范围内, LCA-Lip 和 kLCA-Lip 荧光释放率和 C-Lip 相比, LCA 并没有明显提高脂质体的响应性, 而 kLCA 实际上降低了脂质体的酶响应性。如图 2-B 所示, 在 CCM sPLA₂ 作用的 31 h 范围内, 包含 LCA 及 kLCA 的脂质体的释放效能远优于普通脂质体, 特别在 24 h 时 LCA-Lip 和 kLCA-Lip 的荧光素 CF 释放率为 70% 左右, 而 C-Lip 仅释放了 20% 荧光素 CF。此外从图中可以看出 kLCA 的出现可以缩短酶作用延滞时间, 孵育作用 2 h 后明显提高荧光素释放率, 而 C-Lip 和 LCA-Lip 需要较长的作用时间才能获得较高的释放率。以上实验结果表明, 对于不同亚型的 sPLA₂, LCA 和 kLCA 可以提高或降低脂质体的响应性。Bv sPLA₂ 虽然类似于人源性 sPLA₂-III, 但其底物选择性并不尽相同, Bv sPLA₂ 的响应性荧光素 CF 释放分析结果可能不能代表人源性 sPLA₂-III 的酶响应性荧光素 CF 释放特性, 因此基于 CCM sPLA₂ 作用下的荧光素 CF 释放特性, 表明 LCA-Lip 和 kLCA-Lip 酶响应性优于 C-Lip。

3.3 体外血液稳定性

纳米药物载体在体内血液循环中应避免早期药物泄漏, 使更多包载药物到达肿瘤部位, 减少药物不良反应和提高药物疗效。通过静脉给药的载药脂质体, 血循环系统中的磷脂酶、高密度脂蛋白以及调理素会破坏脂质体的基本结构, 造成脂质体药物泄漏或者被网状巨噬系统清除^[28]。本研究检测脂质体在 0%, 10% 或 50% FBS/HEPES 缓冲液条件下孵育的药物泄漏率以初步评估其在体内的血液循环稳定性。实验结果如图 3 所示, 加入 10% 或者 50% FBS 孵育 24 h 或者 48 h, 载药脂质体的药物泄露率并没有显著性地提高, 在 24 h 或者 48 h

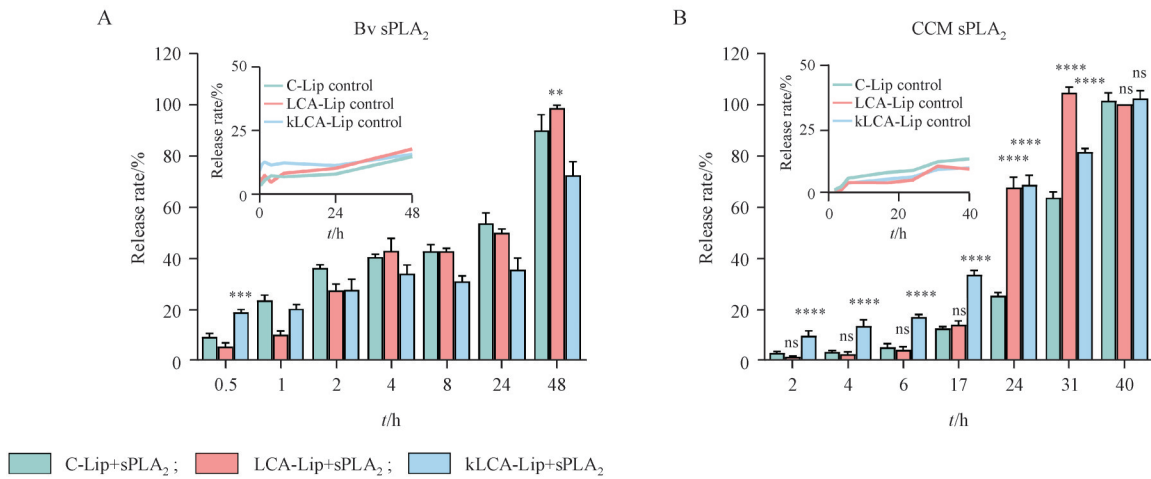


Figure 2 Release rate of 6-CF from liposomal formulations C-Lip, LCA-Lip or kLCA-Lip induced by (A) sPLA₂ from bee venom (Bv sPLA₂) or (B) sPLA₂ from Colo205 cells culture conditioned medium (CCM sPLA₂) at 27 °C; Inset figures describe the release pattern of the mentioned systems in the absence of sPLA₂ at 27 °C ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs group of C-Lip+sPLA₂ and determined by Two-Way ANOVA. ns:Not significant

时均没显著性差异,结果表明,FBS对C-Lip,LCA-Lip以及kLCA-Lip均影响不大,不会造成载药脂质体的药物快速泄漏,kLCA-Lip在10%FBS/HEPES缓冲液条件下释放率比在50%FBS/HEPES缓冲液高,但没有显著性差异,可能是FBS中的蛋白与kLCA-Lip之间复杂的相互作用造成^[29]。另外,如

图3所示在相同孵育条件下,加入面两亲性分子LCA或者kLCA改造的脂质体的药物泄漏率与C-Lip脂质体相比,虽没有显著性差异,但药物泄漏率均比C-Lip脂质体高,这可能是LCA或者kLCA在一定程度上造成磷脂膜的缺陷从而加速脂质体内部药物的释放,与前人研究一致^[30-32]。

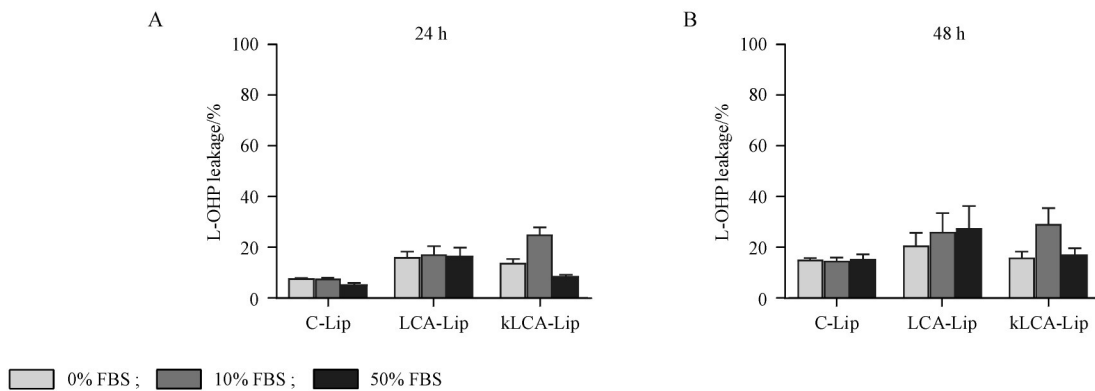


Figure 3 Leakage of oxaliplatin (L-OHP) from C-Lip, LCA-Lip and kLCA-Lip which were incubated in HEPES buffer including 0%, 10%, or 50% FBS for 24 h (A) and 48 h (B) at 37 °C ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.4 体外细胞摄取实验

为了考察LCA或者kLCA是否对脂质体的细胞内吞程度造成影响,本研究使用流式细胞仪分析Colo205细胞和HT-29细胞对DiO标记脂质体的摄取量。如图4所示,对于HT-29和Colo205细胞,DiO标记的C-Lip,LCA-Lip和kLCA-Lip均可以被细胞内吞,相比于不含两亲性分子的C-Lip,加入

LCA或者kLCA的脂质体的内吞程度显著性降低,且面两亲性分子抑制Colo205细胞内吞脂质体的程度比HT-29细胞的强。结果表明,相比于C-Lip,加入面两亲分子LCA或者kLCA改造的脂质体会减弱脂质体细胞内吞程度,且对不同类型的细胞抑制内吞的程度也不一样。

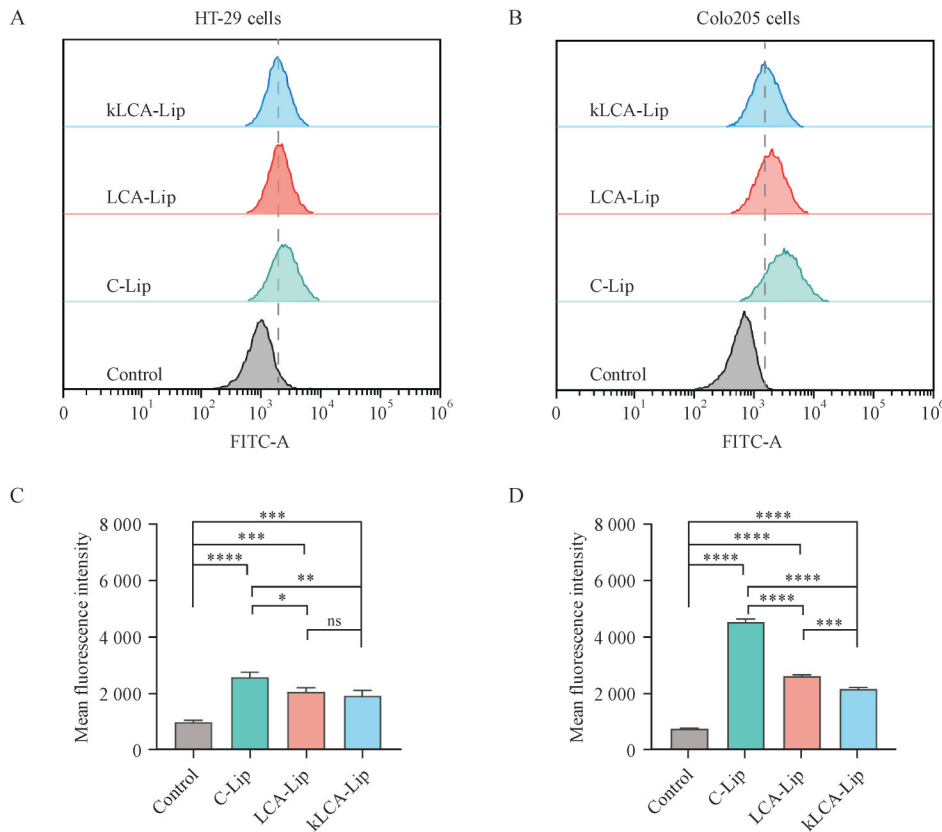


Figure 4 Flow cytometric histograms illustrating fluorescence from (A) HT-29 cells or (B) Colo205 cells incubated with DiO-labelled liposomes; Quantitative analysis of cellular uptake efficiency of DiO-labelled liposomes by (C) HT-29 cells or (D) Colo205 cells. Cells were treated with different DiO-labelled liposomes (3 $\mu\text{mol/L}$ DiO) for 2 h. The flow cytometric analysis was performed in triplicate ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; ns represents not significant and data were analyzed by One-Way ANOVA

3.5 体外抗肿瘤活性

Pourhassan 等^[10]研究表明, Colo205 细胞上清液中的 sPLA₂-IIA 酶质量浓度为 (185.43 \pm 92.46) $\mu\text{g/L}$, HT-29 细胞上清液中的 sPLA₂-IIA 酶浓度为 (0.01 \pm 0.01) $\mu\text{g/L}$, 因此本研究选择分泌 sPLA₂ 的 Colo205 细胞和不分泌 sPLA₂ 的 HT-29 细胞作为实验对象, 研究载药面两亲性分子 LCA 或者 kLCA 改造脂质体对高表达 sPLA₂ 肿瘤细胞的增殖抑制能力是否更强。采用 CCK-8 法分析载药脂质体抑制癌细胞增殖能力。阳性对照组为游离奥沙利铂和载药 C-Lip, 实验组为载药 LCA-Lip 和载药 kLCA-Lip。如图 5 所示, 游离奥沙利铂的 IC₅₀ 小于大部分载药脂质体配方, 归因于游离奥沙利铂不用经过药物释放这个过程, 直接抑制肿瘤细胞增殖。如图 5-A 所示, 载药 LCA-Lip 和载药 kLCA-Lip 抑制高表达 sPLA₂ 的 Colo205 细胞增殖的能力强于载药 C-Lip, 与游离奥沙利铂的细胞毒性相似。

如图 5-B 所示, 载药 LCA-Lip 和载药 kLCA-Lip 抑制不表达 sPLA₂ 的 HT-29 细胞增殖的能力与载药 C-Lip 相似, 且其 IC₅₀ 明显大于游离奥沙利铂, 是游离奥沙利铂 IC₅₀ 的 2.6 ~ 2.9 倍。实验结果表明, 载药 LCA-Lip 和载药 kLCA-Lip 相比于载药 C-Lip, 其抑制分泌 sPLA₂ 的 Colo205 细胞增殖能力更强, 抑制不分泌 sPLA₂ 的 HT-29 细胞增殖能力相近, 结合前面的荧光释放及细胞内吞实验结果, LCA-Lip 和 kLCA-Lip 相比于 C-Lip, 酶响应度更高而细胞内吞程度较低, 这些结果表明, 在 Colo205 细胞分泌的 sPLA₂ 酶作用下, 能比 C-Lip 释放更多的药物, 从而提高其细胞毒性。

为了确定在载药脂质体杀死癌细胞过程中脂质体载体本身对癌细胞的杀伤性大小, 本研究进一步分析了空白脂质体的细胞毒性。如图 5-C 所示, 奥沙利铂 C-Lip 抑制 50% Colo205 细胞增殖的磷脂浓度为 534 $\mu\text{mol/L}$, 相对应磷脂浓度的空白脂

质体的 Colo205 细胞增殖率为 58% (黑色箭头指向处),说明奥沙利铂 C-Lip 可通过脂质载体本身的毒性来抑制 Colo205 细胞增殖,结合内吞实验结果,空白 C-Lip 抑制细胞存活可能是通过内吞作用造成细胞发生应激反应引起细胞凋亡^[33-34],也可能是 sPLA₂ 的水解产物溶血磷脂和脂肪酸提高细胞渗透性导致细胞膜裂解或者引起细胞凋亡程序从而杀死细胞^[35]。奥沙利铂 LCA-Lip 和奥沙利铂 kLCA-Lip 抑制 50% Colo205 细胞增殖的磷脂浓度分别为 173 和 257 μmol/L,相对应磷脂浓度的空白 LCA-Lip 和空白 kLCA-Lip 对 Colo205 细胞增殖率分别为 88% 和 82% (黑色箭头指向处),说明载体本身对细胞毒性较小,也进一步表明载药 LCA-Lip 和载药 kLCA-Lip 在有效药物浓度下,其载体生物相容性高,毒性较小。如图 5-D 所示,奥沙利铂 C-

Lip 抑制 50% HT-29 细胞增殖的磷脂浓度为 376 μmol/L,相对应磷脂浓度的空白脂质体的 HT-29 细胞增殖率为 56% (黑色箭头指向处),说明奥沙利铂 C-Lip 可通过脂质载体本身的毒性杀伤 HT-29 细胞,这可能是细胞内吞引起的应激效应导致细胞死亡。类似于空白 C-Lip,空白 LCA-Lip 和空白 kLCA-Lip 同样能抑制 HT-29 细胞的存活,这可能是脂质体被内吞后,LCA 或 kLCA 被释放出来杀死细胞。Katona 等^[36]发现 LCA 可以激活结肠癌细胞 (HT-29, HCT-116) 的 caspase-2 和 caspase-8,导致细胞凋亡或坏死。空白脂质体毒性实验表明,空白 LCA-Lip 和空白 kLCA-Lip 在较高浓度下有一定毒性,需要提高脂质体的药脂比,在安全的浓度范围内使用新型配方。

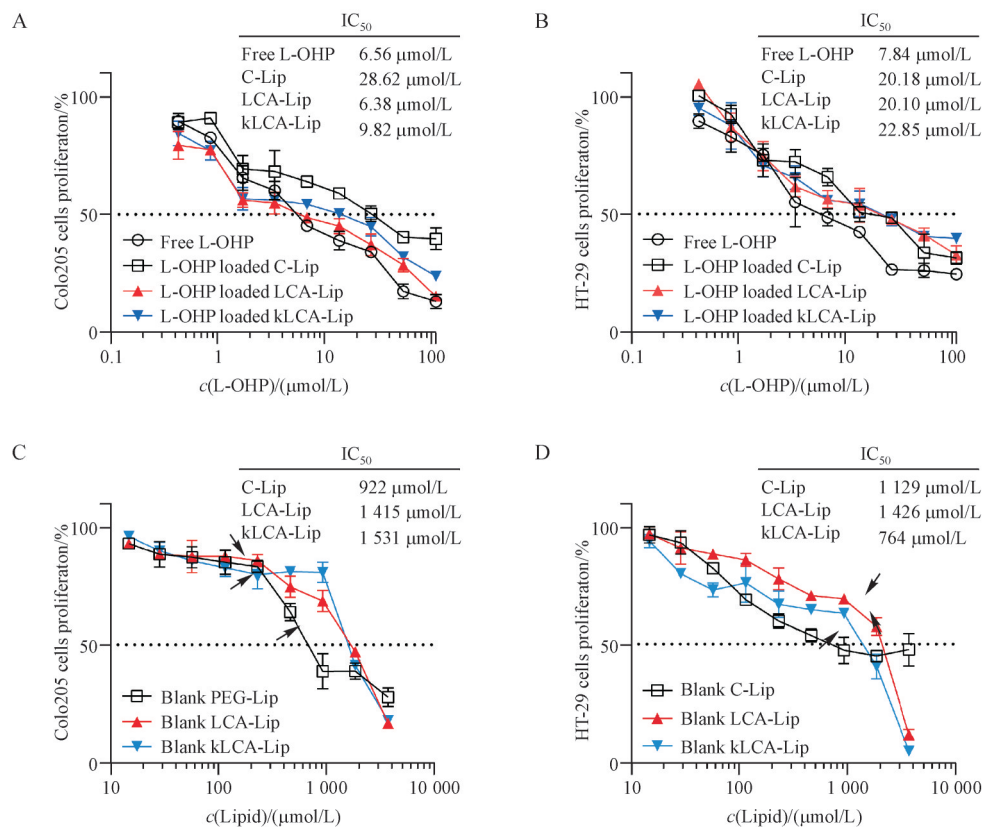


Figure 5 Cytotoxicity on free L-OHP, L-OHP-loaded liposomes and blank liposomes against sPLA₂-secreting Colo205 cells and non sPLA₂-secreting HT-29 cells. Free L-OHP and L-OHP-loaded liposomes were added to (A) Colo205 cells or (B) HT-29 cells; Blank liposomes were added to (C) Colo205 cells or (D) HT-29 cells. The lipid concentration of the blank liposome corresponding to the lipid concentration of L-OHP loaded liposomes at the value of IC₅₀ were indicated by the arrows. Cells proliferation was determined by CCK-8 assay and the results represent as the percentage of untreated control group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 结论

本研究使用面两亲性分子 LCA 或者 kLCA 构建 sPLA₂ 酶响应性脂质体 (LCA-Lip, kLCA-Lip), 实验结果表明, 相比于普通脂质体 C-Lip, LCA-Lip 和 kLCA-Lip 脂质体对肿瘤细胞来源的 sPLA₂ 具有更佳酶刺激响应性, 且在运载铂类药物奥沙利铂时, 对高表达 sPLA₂ 的肿瘤细胞有更强的增殖抑制能力。本研究发现面两亲性分子 LCA 或者 kLCA 改造的脂质体具有一个新的功能特点, 即对肿瘤部位超表达的 sPLA₂ 具有较高的响应性, 补充并拓展了此类脂质体在抗肿瘤领域中的应用。

References

- [1] Arantseva DA, Vodovozova EL. Platinum-based antitumor drugs and their liposomal formulations in clinical trials [J]. *Russ J Bioorg Chem*, 2018, **44**(6):619-630.
- [2] Li YN, Xu PC, He DS, et al. Long-circulating thermosensitive liposomes for the targeted drug delivery of oxaliplatin [J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, **15**:6721-6734.
- [3] Seetharamu N, Kim E, Hochster H, et al. Phase II study of liposomal cisplatin (SPI-77) in platinum-sensitive recurrences of ovarian cancer [J]. *Anticancer Res*, 2010, **30**(2):541-545.
- [4] Yamashita S, Yamashita J, Sakamoto K, et al. Increased expression of membrane-associated phospholipase A₂ shows malignant potential of human breast cancer cells [J]. *Cancer*, 1993, **71**(10):3058-3064.
- [5] Jiang JZ, Neubauer BL, Graff JR, et al. Expression of group IIA secretory phospholipase A₂ is elevated in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma [J]. *Am J Pathol*, 2002, **160**(2):667-671.
- [6] Kiyohara H, Egami H, Kako H, et al. Immunohistochemical localization of group II phospholipase A₂ in human pancreatic carcinomas [J]. *Int J Pancreatol*, 1993, **13**(1):49-57.
- [7] Abe T, Sakamoto K, Kamohara H, et al. Group II phospholipase A₂ is increased in peritoneal and pleural effusions in patients with various cancers [J]. *Int Congr Ser*, 2003, **1255**:351-360.
- [8] Davidsen J, Jørgensen K, Andresen TL, et al. Secreted phospholipase A₂ as a new enzymatic trigger mechanism for localised liposomal drug release and absorption in diseased tissue [J]. *Biochim Biophys Acta BBA Biomembr*, 2003, **1609**(1):95-101.
- [9] Zhu GD, Mock JN, Aljuffali I, et al. Secretory phospholipase A₂ responsive liposomes [J]. *J Pharm Sci*, 2011, **100**(8):3146-3159.
- [10] Pourhassan H, Clergeaud G, Hansen AE, et al. Revisiting the use of sPLA₂-sensitive liposomes in cancer therapy [J]. *J Control Release*, 2017, **261**:163-173.
- [11] Andresen TL, Davidsen J, Begtrup M, et al. Enzymatic release of antitumor ether lipids by specific phospholipase A₂ activation of liposome-forming prodrugs [J]. *J Med Chem*, 2004, **47**(7):1694-1703.
- [12] De Jonge MJA, Slingerland M, Loos WJ, et al. Early cessation of the clinical development of LiPlaCis, a liposomal cisplatin formulation [J]. *Eur J Cancer*, 2010, **46**(16):3016-3021.
- [13] Moghimipour E, Ameri A, Handali S. Absorption-enhancing effects of bile salts [J]. *Molecules*, 2015, **20**(8):14451-14473.
- [14] De Luca D, Minucci A, Zecca E, et al. Bile acids cause secretory phospholipase A₂ activity enhancement, revertible by exogenous surfactant administration [J]. *Intensive Care Med*, 2009, **35**(2):321-326.
- [15] Cui JG, Fan L, Huang LL, et al. Synthesis and evaluation of some steroidal oximes as cytotoxic agents: structure/activity studies (I) [J]. *Steroids*, 2009, **74**(1):62-72.
- [16] Bartlett GR. Phosphorus assay in column chromatography [J]. *J Biol Chem*, 1959, **234**(3):466-468.
- [17] Li JY, Han JY. Determination of oxaliplatin and relative impurity by HPLC [J]. *Her Med (医药导报)*, 2008, **27**(5):597-598.
- [18] Saitō H, Sugimoto Y, Tabeta R, et al. Incorporation of bile acid of low concentration into model and biological membranes studied by ²H and ³¹P NMR [J]. *J Biochem*, 1983, **94**(6):1877-1887.
- [19] Klibanov AL, Maruyama K, Torchilin VP, et al. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes [J]. *FEBS Lett*, 1990, **268**(1):235-237.
- [20] Hatakeyama H, Akita H, Ito E, et al. Systemic delivery of siRNA to tumors using a lipid nanoparticle containing a tumor-specific cleavable PEG-lipid [J]. *Biomaterials*, 2011, **32**(18):4306-4316.
- [21] Trilli J, Caramazza L, Paolicelli P, et al. The impact of bilayer rigidity on the release from magnetoliposomes vesicles controlled by PEMFs [J]. *Pharmaceutics*, 2021, **13**(10):1712.
- [22] Murakami M, Sato H, Miki Y, et al. A new era of secreted phospholipase A₂ [J]. *J Lipid Res*, 2015, **56**(7):1248-1261.
- [23] Murase R, Taketomi Y, Miki Y, et al. Group III phospholipase A₂ promotes colitis and colorectal cancer [J]. *Sci Rep*, 2017, **7**(1):12261.
- [24] Wilschut JC, Regts J, Scherphof G. Action of phospholipase A₂ on phospholipid vesicles. Preservation of the membrane permeability barrier during asymmetric bilayer degradation [J]. *FEBS Lett*, 1979, **98**(1):181-186.
- [25] Boyanovsky BB, Webb NR. Biology of secretory phospholipase A₂ [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2009, **23**(1):61-72.
- [26] Jensen SS, Andresen TL, Davidsen J, et al. Secretory phospholipase A₂ as a tumor-specific trigger for targeted delivery of a novel class of liposomal prodrug anticancer etherlipids [J]. *Mol Cancer Ther*, 2004, **3**(11):1451-1458.
- [27] Murakami M, Masuda S, Shimbara S, et al. Cellular distribu-

- tion, post-translational modification, and tumorigenic potential of human group III secreted phospholipase A₂[J]. *J Biol Chem*, 2005, **280**(26):24987-24998.
- [28] Ramana LN, Sharma S, Sethuraman S, *et al.* Investigation on the stability of saquinavir loaded liposomes: implication on stealth, release characteristics and cytotoxicity [J]. *Int J Pharm*, 2012, **431**(1/2):120-129.
- [29] Li SH, Goins B, Phillips WT, *et al.* Remote-loading labeling of liposomes with ^{99m}Tc-BMEDA and its stability evaluation: effects of lipid formulation and pH/chemical gradient [J]. *J Liposome Res*, 2011, **21**(1):17-27.
- [30] Matloub AA, Salama AH, Aglan HA, *et al.* Exploiting bilosomes for delivering bioactive polysaccharide isolated from *Enteromorpha intestinalis* for hacking hepatocellular carcinoma [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2018, **44**(4):523-534.
- [31] Zafar A, Alruwaili NK, Imam SS, *et al.* Development and evaluation of luteolin loaded pegylated bilosome: optimization, *in vitro* characterization, and cytotoxicity study [J]. *Drug Deliv*, 2021, **28**(1):2562-2573.
- [32] Abbas H, El-Feky YA, Al-Sawahli MM, *et al.* Development and optimization of curcumin analog nano-bilosomes using 2 1.3 1 full factorial design for anti-tumor profiles improvement in human hepatocellular carcinoma; *in-vitro* evaluation, *in-vivo* safety assay [J]. *Drug Deliv*, 2022, **29**(1):714-727.
- [33] Jiang L, Li L, He XD, *et al.* Overcoming drug-resistant lung cancer by paclitaxel loaded dual-functional liposomes with mitochondria targeting and pH-response [J]. *Biomaterials*, 2015, **52**:126-139.
- [34] Herr I, Debatin KM. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy [J]. *Blood*, 2001, **98**(9):2603-2614.
- [35] Østrem RG, Parhamifar L, Pourhassan H, *et al.* Secretory phospholipase A₂ responsive liposomes exhibit a potent anti-neoplastic effect *in vitro*, but induce unforeseen severe toxicity *in vivo* [J]. *J Control Release*, 2017, **262**:212-221.
- [36] Katona BW, Anant S, Covey DF, *et al.* Characterization of enantiomeric bile acid-induced apoptosis in colon cancer cell lines [J]. *J Biol Chem*, 2009, **284**(5):3354-3364.

· 校园新闻 ·

中国药科大学2022年江苏省科技计划立项数再创新高

2022年6月,2022年度江苏省科技计划拟立项项目结果陆续公示,我校获资助数量创历史新高。

我校共申请省科技计划项目123项,获批45项,立项数比去年同期增加11项,资助率达36.6%。其中三类人才项目资助率均远高于全省25%资助率,分别为省杰青项目43%、省优青项目71%、省青年项目33%。我校孙晓莲教授、姜正羽教授、叶慧副教授获得江苏省杰出青年基金资助;马祜副教授、刘嘉莉副教授、陈思禹副教授、钱程根副教授及崔淑方副教授获得江苏省优秀青年基金资助。我校曹崇江教授获批省重点研发计划现代农业项目,这是我校时隔十多年后再次在省重点研发计划现代农业项目上取得突破。

虽然在常态化疫情防控背景下,今年各项申报工作运转受到一定的影响,我校积极应对,点面结合、多措并举,一方面以人才项目、重点项目为抓手,另一方面提升整体申报材料质量,做好各类项目在申报环节的服务,有效提升了省科技计划项目的申报质量和命中率。下一阶段,科技处将一如既往地重视和做好科技项目的管理服务,力争实现省科技计划项目新突破,为学校新一轮“双一流”建设贡献力量。

(科技处)