研究论文

DOI:10.3969/j.issn. 1673–1689.2018.12.007

# 透明质酸修饰阿霉素脂质体的制备及抑制肿瘤细胞生长活性

黄 燕， 邱立朋， 朱梦琴， 宿丹丹， 陈敬华*

（江南大学 药学院，江苏 无锡 214122）

**摘要：** 制备了一种透明质酸修饰的脂质体作为疏水性抗肿瘤药物阿霉素（Doxorubicin，DOX）的载体，以增强其受体介导的细胞内吞，提高其抗肿瘤效果。以透明质酸为原料，通过酰胺键和十八烷胺制备透明质酸–十八烷基（Hyaluronic acid–Octodecane，HOA）聚合物，以 DOX 为模型药物，脂质体为药物载体，通过薄膜分散法和后插入法，制备得到 HOA 修饰的 DOX 靶向脂质体（DOX/LP/HOA），测定其平均粒径为（50.17±0.60）nm，电位为（–7.61±0.43）mV，包封率为（98.85±0.40）%。体外释放和细胞毒性结果表明，所得到 DOX/LP/HOA 脂质体可控制药物缓慢释放，抑制肿瘤细胞生长，活性良好，具有潜在应用价值。

**关键词：** 透明质酸；脂质体；阿霉素；抗肿瘤活性

**中图分类号：**R 944　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1673—1689(2018)12—1272—06

# Preparation and Antitumor Activity of Doxorubicin–Loaded Hyaluronic Acid Modified Liposomes

*HUANG Yan*， *QIU Lipeng*， *ZHU Mengqin*， *SU Dandan*， *CHEN Jinghua**

（School of Pharmaceutical Science，Jiangnan University，214122 Wuxi，China）

**Abstract：** Doxorubicin（DOX）-loaded hyaluronic acid（HA）modified Liposomes（DOX/LP/ HOA）were prepared to enhance receptor mediated endocytosis and improve anti-tumor effect. Octadecyl was chosen to conjugate HA backbone by amide bond to prepare hyaluronic acid-octodecane（HOA）polymers. DOX，as a model drug，was encapsulated into HOA modified liposomes by the film dispersion method and post-insertion method. The average particle size，zeta potential and encapsulation of DOX/LP/HOA were （50.17±0.60）nm，（-7.61±0.43）mV and （98.85±0.40）%，respectively. In vitro release and cytotoxicity results showed that DOX/LP/HOA could release DOX slowly and improve tumor targeting ability. DOX/LP/HOA with excellent anti-tumor activity can be used as the potential carrier for delivery of anti-tumor drugs.

**Keywords：** hyaluronic acid，liposomes，doxorubicin，antitumor activity

**收稿日期：** 2016–01–28

**基金项目：** 国家自然科学基金项目（81503007）。

* **通信作者：** 陈敬华（1971—），男，湖北黄石人，理学博士，教授，博士研究生导师，主要从事药剂学及药用高分子材料学方面的研究。E–mail：jhchenwhut@126.com

**引用本文：** 黄燕，邱立朋，朱梦琴，等. 透明质酸修饰阿霉素脂质体的制备及抑制肿瘤细胞生长活性[J]. 食品与生物技术学报，2018，37（12）：1272–1277.

脂质体是磷脂分散在水中时形成的脂质双分子层闭合囊泡[1],其各层之间被水相隔开,在水中平衡后具有亲水性和疏水性两性性质,被作为药物载体以控制药物释放,减少毒性,提高疗效。阿霉素(Doxorubicin,DOX)是有效的抗肿瘤药物之一,但其具有严重的心脏毒性等毒副作用[2]。通过脂质体包裹阿霉素静脉注射,能够减少阿霉素的心脏分布,降低心脏毒性,提高抗肿瘤疗效[3-4]。然而,普通脂质体存在肿瘤靶向性不足的缺点,因此,通过生物材料对其表面进行修饰是一种提高脂质体靶向性和稳定性,增强细胞内吞能力,延长体内循环作用时间的有效手段[5]。

透明质酸(Hyaluronic acid,HA)是一种广泛存在于体内各组织中的大分子链状黏多糖[6]。HA 结构中有羧基、羟基和酰胺键,使其利于载体材料的修饰。研究表明,细胞表面 CD44、RHAMM、LYVE-1 和 HARE 等是 HA 的四类特异性受体[7]。其中,CD44 是细胞表面最重要的 HA 受体[8]。与正常细胞相比,CD44 受体在乳腺癌、卵巢癌、肺腺癌等多种恶性肿瘤细胞表面过表达[9]。根据受体-配体理论,HA 作为抗肿瘤药物靶向载体时,能与肿瘤细胞表面的CD44 受体特异性结合,使更多的抗肿瘤药物分子靶向进入肿瘤细胞内,提高抗肿瘤药物的药物疗效[10-12]。

因此,为提高脂质体的细胞内吞能力及主动靶向性,延长循环时间,并增大疏水性药物携载能力,作者制备了 HA 修饰的 DOX 脂质体。通过 HA 与十八烷胺(Octadecylamine,OA)进行反应透明质酸-十八烷基(Hyaluronic acid-Octodecane,HOA)聚合物,然后通过后插入法制备 HOA 修饰的 DOX 靶向脂质体(DOX/LP/HOA),并对其物理化学性质及体外抑制肿瘤细胞生长活性进行研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 试剂** HA(相对分子质量 5 300):购自华熙福瑞达生物医药有限公司;大豆磷脂(纯度 98%):购于上海太伟有限公司;胆固醇:购于上海生工生物工程股份有限公司;十八烷胺、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC):购于上海晶纯生化科技股份有限公司;三乙胺(TEA)、甲酰胺、N,N-二甲基甲酰胺酰胺(DMF)、二氯甲烷($CH_2Cl_2$)二胺四乙酸二钠(EDTA):购自购自国药集团化学试剂公司。反应用的溶剂使用前均需重蒸纯化。

**1.1.2 仪器** RV10BS96 旋转蒸发仪:德国 IKA 仪器设备有限公司制造;DF-101S 型恒温加热磁力搅拌器:郑州科泰实验设备有限公司制造;AVANCEⅢ型核磁共振仪:瑞士 Bruker 公司制造;UV-1800 型紫外分光光度计:日本岛津仪器有限公司制造;FreeZone 冷冻干燥仪:美国 Labconco 公司制造;Zetasizer Nano ZS 纳米粒度分析仪:英国 Malven 公司制造;JY92-ⅡN 型超声波细胞粉碎机:宁波新芝生物科技股份有限公司制造;JEM-2100 型透射电子显微镜:日本 Jeol 公司制造;Multiskan Go 型酶标仪:美国 Thermo 公司制造。

**1.1.3 细胞** MCF-7 细胞:购自中国科学院保藏中心(上海)。

### 1.2 HOA 的合成及结构确证

精确称取 HA 100 mg 溶于 10 mL 无水甲酰胺中,加入 100 mg EDC 和 60 mg NHS,冰浴下磁力搅拌 2 h。称取 72 mg OA 胺溶于 5 mL 无水 DMF,将其缓慢滴入上述 HA 混合液中,30 ℃氮气环境下搅拌反应 40 h。反应结束后,将反应液装入透析袋(截留相对分子质量 3 500)中,于过量的水/乙醇混合液(1/3~1/1)中依次透析 1 d,去离子水中透析 2 d,0.45 μm 水系滤膜过滤后,冷冻干燥得白色 HOA 聚合物[13-14],用核磁共振波谱($^1$H NMR)确定其结构。

### 1.3 脂质体制备

**1.3.1 阿霉素碱基的制备** 精密称量 30 mg 盐酸阿霉素,将其溶于 30 mL 甲醇溶液中,加入 30 μL 三乙胺,室温下避光搅拌过夜,旋转蒸发除去有机溶剂后,再加入四氢呋喃复溶,得到 1 mg/mL 的阿霉素碱基溶液,避光保存。

**1.3.2 脂质体的制备** 采用薄膜分散法制备载 DOX 普通脂质体(DOX/LP)。精确称取大豆磷脂 400 mg,胆固醇 50 mg,加入 10 mL 无水乙醚使其溶解后,置于 500 mL 的圆底烧瓶中。精密量取 2 mL 含 DOX 的四氢呋喃溶液,缓慢滴加至上述溶液中,80 r/min 条件下于旋转蒸发仪上减压蒸发,除尽有机溶剂,脂质则均匀地分布在圆底烧瓶内表面。加入 10 mL 磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline,PBS,pH 7.4)振摇,水化 30 min,使脂质膜充分水合溶胀,得均匀白色混悬液。然后将所得到的初脂质体再冰浴超声 10 min(超声功率 400 W,工作 5 s,

间歇 5 s)，离心 5 min，除去未载入的药物，即得 DOX/LP。

采用后插入法制备 HA 修饰的靶向脂质体(DOX/LP/HOA)[15]。取适量 HOA 胶束溶液滴入 DOX/LP 中,50 ℃下恒温孵育 2 h，冷却后得(DOX/LP/HOA)。

### 1.4 粒径、zeta 电位及形貌表征

取适量脂质体溶液于测量杯内,通过 Malven 纳米粒度分析仪测定脂质体的粒径、粒径分布及 zeta 电位值。

将上述脂质体溶液混合均匀后,滴至覆有支持膜的铜网上,待液体挥干后用 2%磷钨酸钠负染,室温干燥,用透射电镜(TEM)观察其外貌形态。

### 1.5 包封率的测定

**1.5.1 检测波长的选择** 分别取空白 HOA 修饰的脂质体和 DOX 溶液,稀释至一定浓度,用紫外分光光度计在 200~700 nm 范围内进行紫外扫描，确定 DOX 的检测波长。

**1.5.2 DOX 标准曲线的测定** 精确称取阿霉素 10 mg,置于容量瓶中,用纯水溶解并定容至 100 mL,配制成 100 μg/mL 的母液。精密量取适量 DOX 母液置于 10 mL 的棕色容量瓶中,纯水稀释定容得到 1、2、8、12、16、32、40 μg/mL 的系列 DOX 标准溶液。利用紫外分光光度计测定阿霉素的紫外吸收值,以吸光度 $A$ 对 DOX 的质量浓度 $c$ 作图,绘制标准曲线。

**1.5.3 精密度的测定** 按照上述方法分别配制 2、12 μg/mL 和 32 μg/mL 的低、中、高质量浓度待测溶液,在同一天的内测定 5 次,计算日内精密度,并连续测 5 天计算日间精密度。

**1.5.4 回收率的测定** 取 0.5 mL 空白脂质体溶液，加入阿霉素储备液适量，稀释至质量浓度分别 2、12、32 μg/mL 的低、中、高质量浓度待测溶液,测定吸光度,并按照标准曲线计算回收率。

**1.5.5 包封率的测定** 采用超速离心法测定包封率[16]。精确量取 1.5 mL 脂质体于截留相对分子质量为 3 000 的超滤杯中,10 000 r/min 离心 30 min,测定滤出液吸光度,计算得到药物的包封率(EE)。

### 1.6 体外释放

采用动态透析法考察载药脂质体的体外释放行为。取 2 mL DOX/LP 和 DOX/LP/HOA 置于透析袋内(截留相对分子质量为 3 500),封口后投入装有 10 mL、pH 7.4 的 PBS 释放介质的棕色瓶中,于(37±0.5) ℃、100 r/min 避光振摇。分别于不同时间点取样 1 mL，同时补充相同体积和温度的新鲜 PBS。利用紫外分光光度法测定样品的吸光度值,计算累积释放百分数。

### 1.7 抑制肿瘤细胞生长活性评价

取处于对数生长期的 MCF-7 细胞，以 $6\times10^3$ 个/孔接种于 96 孔板,37 ℃、5% $CO_2$ 条件下培养 24 h，分别加入 100 μL 的游离 DOX、DOX/LP、DOX/LP/HOA 溶液,同时设空白对照组。孵育 48 h 后,吸去含药培养液，每孔加入 100 μL 的 MTT 溶液(0.5 mg/mL)，继续孵育 4 h。然后每孔加入 100 μL 的 DMSO 用酶标仪测定每孔的吸光度值(OD),并计算细胞存活率,评价其抑制肿瘤细胞生长的活性。

## 2 结果与讨论

### 2.1 HOA 合成及表征

利用十八烷胺上的氨基与 HA 结构中的羧基进行反应,制备 HOA 聚合物,合成过程见图 1。通过 $^1$H-NMR 谱图对 HOA 聚合物结构进行确证，见图 2。其中,1.95 μg/g 为 HA 结构中乙酰甲基的特征峰,0.83 μg/g 和 1.23 μg/g 处出现新的特征峰,为十八烷基长链中甲基和亚甲基的特征峰,这表明成功合成了 HOA 聚合物。

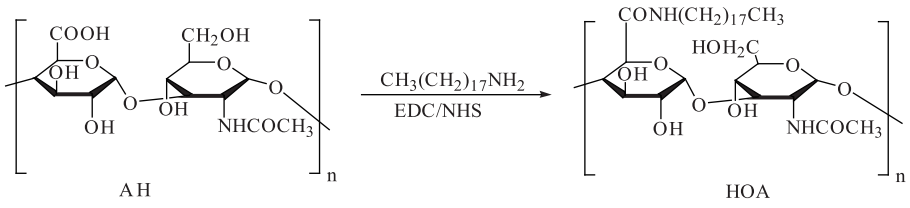



**图 1 HOA 的合成路线图**

**Fig. 1 Synthesis route of HOA conjugate**

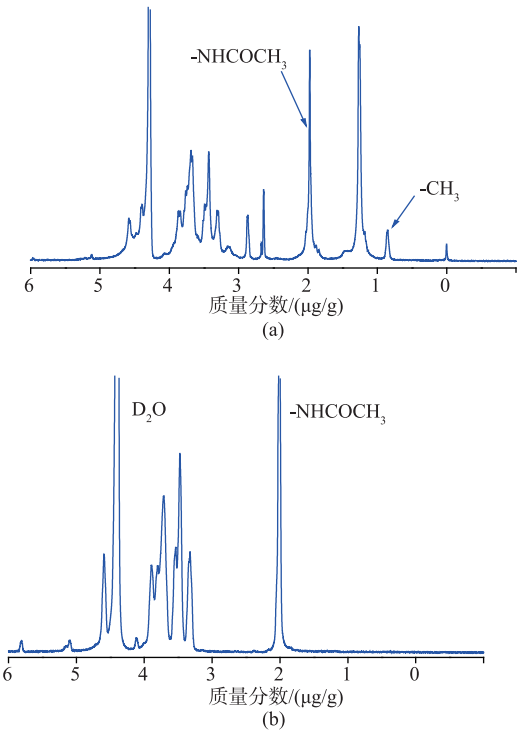



**图 2 HOA 和 HA 的 $^1$H–NMR 谱图**

**Fig. 2 $^1$H–NMR spectra of HOA and HA**

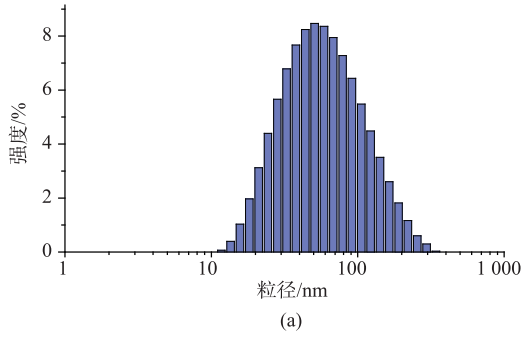
## 2.2 粒径及 zeta 电位

DOX/LP 和 DOX/LP/HOA 的粒径、多分散指数及 zeta 电位值见表 1。可以看出,制备得到的脂质体粒径较小,经 HOA 修饰后,脂质体粒径及 PDI 值无明显变化,zeta 电位有所下降。DOX/LP/HOA 负的 zeta 电位能够有效防止粒子聚集,增加脂质体稳定性,同时可以避免血浆蛋白的吸附,提高在血液中的循环稳定性。此外,图 3 显示 DOX/LP/HOA 脂质体粒径分布较窄,形貌为球形或类球形。

**表 1 不同脂质体的粒径、多分散指数及 zeta 电位值($n$=3)**

**Table 1 Sizes, PDI and zeta potential of different liposomes ($n$=3)**

| 制剂 | 粒径/nm | 多分散指数 | Zeta 电位/mV |
|---|---|---|---|
| DOX/LP | 46.82±0.22 | 0.269±0.1 | −4.48±0.44 |
| DOX/LP/HOA | 50.17±0.60 | 0.265±0.1 | −7.61±0.43 |



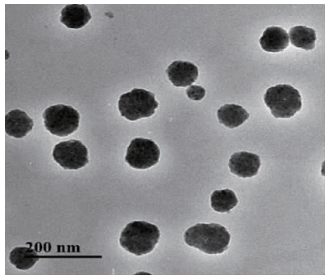




**图 3 DOX/LP/HOA 粒径分布图及透射电镜图**

**Fig. 3 Size distribution and TEM micrograph of DOX/LP/HOA**

## 2.3 载药量测定

**2.3.1 阿霉素吸收波长** 用紫外分光光度法对空白脂质体和 DOX 溶液的全波长进行扫描,结果见图 4。DOX 在 480 nm 处有最大吸收峰,而空白脂质体在此波长并无吸收,不干扰药物质量浓度测定,故选择紫外分光光度计作为 DOX 质量浓度的检测方法,检测波长为 480 nm。

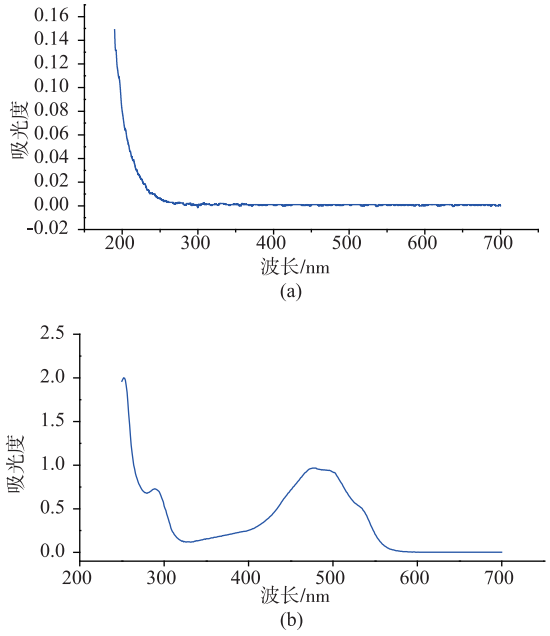



**图 4 空白脂质体和 DOX 的紫外全波长扫描图谱**

**Fig. 4 UV–scanning spectrometry of blank liposomes and DOX**

**2.3.2 阿霉素标准曲线** 以吸光度($A$)对阿霉素质量浓度($c$)作图,得到 DOX 回归方程为:$A$=0.018 5$c$−0.001 5($r$=0.999 7),结果表明阿霉素在 1~40 μg/mL 范围内有良好的线性相关性,可用于 DOX 的定量分析。

**2.3.3 精密度** 质量浓度为 2、12、32 μg/mL 的阿

霉素标准溶液的日内精密度和日间精密度结果见表2。结果表明该方法的重复性良好,各个质量浓度的精密度RSD值均小于2%,符合方法学要求。

**2.3.4 回收率** 质量浓度为2、12、32 μg/mL的阿霉素标准溶液的平均回收率分别为100.24%、99.14%和98.95%,RSD值在0.67~1.53,说明该方法的回收率良好。

表2 阿霉素精密度的测定(*n*=5)

Table 2 Precision determination of DOX(*n*=5)

| 阿霉素质量浓度/(μg/mL) | 日间精密度/% | 日内精密度/% |
|---|---|---|
| 2 | 1.32 | 1.79 |
| 12 | 0.23 | 0.853 |
| 32 | 0.16 | 0.429 |

## 2.4 包封率

通过超速离心法测定DOX/LP包封率为(95.4±0.32)%,DOX/LP/HOA的包封率为(98.85±0.40)%。经HOA聚合物修饰后,脂质体的疏水性空间增大,对DOX具有较好的亲和力,因此,DOX/LP/HOA的包封率有所提高。

## 2.5 体外释放实验

采用动态透析法考察DOX/LP和DOX/LP/HOA脂质体的体外释放行为,结果见图5。脂质体释放初期均无明显的突释效应,表明DOX被全部包载于脂质体双层中,这与测定的较高包封率结果一致。随着时间的延长,脂质体均缓慢释放,DOX/LP和DOX/LP/HOA的72 h累计释放百分率分别为32.8%和23.16%,具有明显的缓释效果。此外,由图5可以看出,DOX/LP/HOA的释放更缓慢,这可能是因为HOA的疏水段十八烷基插入脂质体双分子层膜,导致疏水作用力增强,形成的空隙更小,不利于药物向外自由扩散。

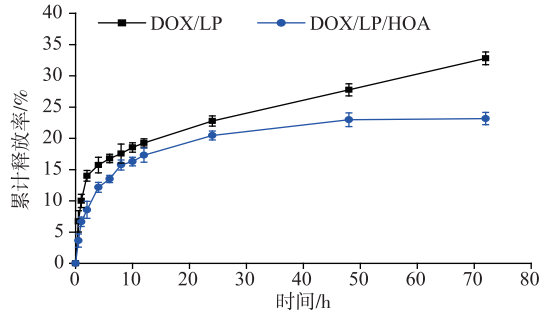



图5 DOX/LP/HOA和DOX/LP体外释放图(*n*=3)

Fig. 5 *In vitro* drug release profiles of DOX/LP/HOA and DOX/LP(*n*=3)

## 2.6 细胞毒性研究

MTT法测定的游离DOX、DOX/LP、DOX/LP/HOA的细胞毒性见图6。结果表明,随着DOX质量浓度增加,不同组的MCF-7细胞存活率逐渐降低,这表明细胞毒性具有浓度依赖性。此外,DOX/LP、DOX/LP/HOA和游离DOX的细胞半数抑制质量浓度($IC_{50}$)分别为(2.241±0.351)、(1.458±0.164)、(0.611±0.350) mg/L。DOX/LP、DOX/LP/HOA、DOX的$IC_{50}$依次变小,其抑制肿瘤细胞生长的活性越好,说明DOX的脂质体剂型(DOX/LP)更容易进入肿瘤细胞;用HA进一步修饰其脂质体剂型得到DOX/LP/HOA,DOX/LP/HOA可以通过CD44受体介导的内吞作用高效进入细胞,从而达到更好地抑制肿瘤细胞生长的活性。

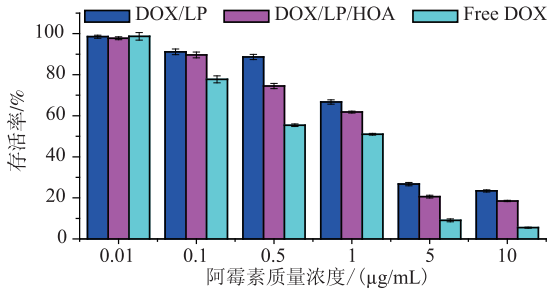



图6 DOX/LP、DOX/LP/HOA与游离DOX对MCF-7细胞生长的抑制活性(*n*=3)

Fig. 6 *In vitro* cytotoxicity of DOX/LP、DOX/LP/HOA and free DOX against MCF-7 cells(*n*=3)

# 3 结 语

脂质体作为药物载体因其主要由天然磷脂和胆固醇组成,具有良好的生物相容性,不会在体内积累,免疫原性小、无毒副作用等优点受到越来越多人的重视。并且,根据临床治疗的目的,可以改变脂质体的成分提高脂质体的靶向性。阿霉素是临床上常用的蒽环类抗恶性肿瘤药物,抗癌谱广,疗效好,但是其没有选择性,易导致骨髓抑制、胃肠道毒性以及心脏毒性等副作用,因此我们利用HA具有修饰方便、生物相容性以及受体靶向性等优点,制备了靶向性DOX/LP/HOA脂质体,增大对疏水性药物的携载能力,控制药物缓慢释放,提高药物对肿瘤细胞生长的抑制活性。

## 参考文献:

[1] ZHU Bin,XU Shiying,XIA Shuqin. The preparation of liposome-based air-filling micro-bubbles[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2007,26(3):41-45.(in Chinese)

[2] ZHANG Jian,JIN Zhe. The research progress of adriamycin cardiomyopathy[J]. **Chinese and Foreign Medical Research**,2013,11(13):152-153.(in Chinese)

[3] BATIST G,BARTON J,CHAIKINP,et al. Myocet(liposome-encapsulated doxorubicin citrate):a new approach in breast cancer therapy[J]. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**,2002,3(12):1739-1751.

[4] POIVIER V J,THAMM D H,KURZMAN I D. Liposome-encapsulated do xorubicin(do xil) and doxorubicin in the treatment of vaccine-associated sarcom a in rat[J]. **Journal of Veterinary Internal Medicine**,2002,16(6):726-731.

[5] NOBLE G T,STEFANICK J F,ASHLEY J D,et al. Ligand-targeted liposome design:challenges and fundamental considerations[J]. **Trends in Biotechnology**,2014,32(1):32-45.

[6] ZHANG Wei,YAN Cuie. Hyaluronic acid and its derivatives as drug carriers[J]. **Process in Chemistry**,2006,18(12):1684-1690.(in Chinese)

[7] PARK K,LEEe M Y,KIM K S,et al. Target specific tumor treatment by VEGF siRNA complexed with reducible polyethyleneimine-hyaluronic acid conjugate[J]. **Biomaterials**,2010,31(19):5258-5265.

[8] QIU Lipeng,LONG Miaomiao,CHEN Dawei. Hyaluronic acid-based carriers for tumor targeted delivery system[J]. **Acta Pharmaceutica Sinica**,2013,48(9):1376-1382.(in Chinese)

[9] SLEEMAN J,MOLL J,SHERMAN L,et al. The role of CD44 splice variants in human metastatic cancer[J]. **Cell Adhesion and Human Disease**,2008,770:142.

[10] CHEN Jingxiao,CAO Lujuan,MENG Zhaomin,et al. Study of temperature sensitive nano drug delivery system based on hyaluronic acid[J]. **Journal of Food Sdence and Biotechnology**,2014,33(12):1294-1299.(in Chinese)

[11] XIAO L X,TONG Z X,CHEN Y C,et al. Hyaluronic acid-based hydrogels containing covalently integrated drug depots:implication for controlling inflammation in mechanically stressed tissues[J]. **Biomacromolecules**,2013,14(11):3808-3819.

[12] ZHANG Lu,CHENG Lifang,CHENG Liang,et al. Preparation and characterization of pamam dendrimer-based self-assembled ternary gene complexes[J]. **Chinese Journal of Pharmaceuticals**,2014,45(8):739-743.(in Chinese)

[13] PARK K,LEE G Y,KIM Y S,et al. Heparin-deoxycholic acid chemical conjugate as an anticancer drug carrier and its antitumor activity[J]. **Journal of Controlled Release**,2006,114(3):300-306.

[14] PARK K,KIM K,KWON I C,et al. Preparation and characterization of self-assembled nanoparticles of heparin-deoxycholic acid conjugates[J]. **Langmuir**,2004,20(26):11726-11731.

[15] XIN D C,YING W,JIANNAN X. The use of amino acid linkers in the conjugation of paclitaxel with hyaluronic acid as drug delivery system:synthesis,self-assembled property,drug release,and in vitro efficiency[J]. **Pharmaceutical Research**,2010,27(2):380-389.

[16] ZHU Wenqi,XU Weikang,HOU Xiaolin,et al. Determination of entrapment efficiency of forsythiaside compound liposome by HPLC-Ulrafiltration[J]. **Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy**,2013,30(9):1001-1004.