

# 叶酸靶向载顺铂羧甲基- $\beta$ -环糊精纳米复合物的制备及对鼻咽癌的体外抑制效应

刘涛<sup>1</sup> 马栋<sup>2</sup> 柯波<sup>3</sup> 谢民强<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>南方医科大学珠江医院耳鼻咽喉头颈外科, 广州 510282; <sup>2</sup>暨南大学生物医学工程系, 广州 510630;

<sup>3</sup>江西省人民医院江西血液肿瘤细胞生物学重点实验室, 南昌 330006)

**摘要** 为达到鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)的靶向化疗, 该研究通过酰胺化反应和配位偶联技术制备叶酸(folic acid, FA)分子靶向载顺铂(cisplatin, CDDP)羧甲基- $\beta$ -环糊精(carboxymethyl- $\beta$ -cyclodextrin, CM- $\beta$ -CD)纳米复合物(FA-CM- $\beta$ -CD-CDDP), 采用邻苯二胺(o-phenylenediamine, OPDA)比色法检测复合物中CDDP含量, 紫外分光光谱检测FA含量, 透射电镜观察复合物形态, 激光粒度仪测定复合物粒径大小。荧光显微镜观察NPC叶酸受体(folate receptor, FR)阳性HNE-1细胞及FR阴性CNE-2细胞对偶联FITC的复合物的吞噬及OPDA比色法检测细胞内CDDP的浓度。通过MTT法、集落形成实验和流式细胞术检测复合物对HNE-1细胞增殖能力和凋亡的影响。研究结果显示, 复合物中偶联的FA和CDDP浓度分别为340  $\mu\text{g/mL}$ 和2  $\text{mg/mL}$ , CDDP包封率达20.00%, 复合物粒径均匀且大小为157.8 nm。HNE-1细胞内见较多FITC, 细胞内CDDP浓度为6.24  $\text{ng/mL}$ , 而CNE-2细胞内FITC较少, 细胞内CDDP浓度仅约2.01  $\text{ng/mL}$ 。HNE-1生长抑制率在24 h明显高于对照组(CM- $\beta$ -CD-CDDP), 其 $\text{IC}_{50}$ (4.80  $\mu\text{g/mL}$ )明显低于对照组(6.97  $\mu\text{g/mL}$ ), 但当所载的CDDP终浓度达到16.00  $\mu\text{g/mL}$ 时, 两组抑制率均达到80%以上; 作用48 h两组抑制率无明显差异。在24 h, 当复合物的CDDP终浓度为1.00  $\mu\text{g/mL}$ 时, HNE-1的集落形成率为33.21%, 明显低于对照组(52.27%)。当复合物的CDDP终浓度为0.25  $\mu\text{g/mL}$ 和1.00  $\mu\text{g/mL}$ 时, HNE-1的凋亡率分别达12.65%和22.35%, 明显高于对照组(6.91%和14.21%)。研究结果表明, 成功构建的FA-CM- $\beta$ -CD-CDDP纳米复合物能够靶向抑制FR阳性的NPC细胞增殖并促进其凋亡。

**关键词** 叶酸; 分子靶向; 纳米复合物; 鼻咽癌; 顺铂

## The Preparation of Folate-targeted Carboxymethyl- $\beta$ -cyclodextrin Nanocomposites Loaded with Cisplatin and Its Evaluation of Inhibitory Effect on Nasopharyngeal Carcinoma *in vitro*

Liu Tao<sup>1</sup>, Ma Dong<sup>2</sup>, Ke Bo<sup>3</sup>, Xie Minqiang<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Otolaryngology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China; <sup>2</sup>Department of Medical Engineering, Jinan University, Guangzhou 510630, China; <sup>3</sup>Jiangxi Key Laboratory of Hematological Oncology and Cell Biology, Jiangxi Provincial People's Hospital, Nanchang 330006, China)

收稿日期: 2013-09-21 接受日期: 2013-11-06

国家自然科学基金(批准号: 81372477、81260406)、教育部高等学校博士学科点专项科研基金(批准号: 20114433110001)和江西省自然科学基金(批准号: 20122BAB205068)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 020-61643389, E-mail: min\_qiang\_x@hotmail.com

Received: September 21, 2013 Accepted: November 6, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81372477, 81260406), the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education from the Ministry of Education of China (Grant No.20114433110001) and the Natural Science Foundation of Jiangxi Province (Grant No.20122BAB205068)

\*Corresponding author. Tel: +86-20-61643389, E-mail: min\_qiang\_x@hotmail.com

网络出版时间: 2013-12-20 16:59 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.01.0304.html>

**Abstract** In order to achieve targeted chemotherapy for NPC, FA-CM-β-CD-CDDP nanocomposites was prepared by amidation reaction and ligand coupling technology in this research. The concentration of CDDP, concentration of FA, morphology and particle size of nanocomposites were detected by OPDA colourimetry, UV spectroscopy, transmission electron microscopy and laser particle detector, respectively. The phagocytic effects of NPC FR expressing positive HNE-1 cells and FR expressing negative CNE-2 cells on FA-CM-β-CD-CDDP coupling with FITC were observed using fluorescence microscope and the concentration of CDDP in cells was detected by OPDA colourimetry. The effects of nanocomposites on HNE-1 cells proliferation and apoptosis were measured with MTT, colony forming experiment and flow cytometry. Results showed that concentration of FA and CDDP coupled with nanocomposites were 340 μg/mL and 2 mg/mL, respectively, and the encapsulation efficiency of CDDP was 20.00%. FA-CM-β-CD-CDDP nanocomposites was in uniform dispersion, and its average particle size was 157.8 nm. More FITC was seen in HNE-1 cells, concentration of CDDP in cells was 6.24 ng/mL, but less FITC was seen in CNE-2 cells, and concentration of CDDP in cells was only 2.01 ng/mL. The growth inhibiting ratio of HNE-1 cells in FA-CM-β-CD-CDDP group was significantly increased compared to control group (CM-β-CD-CDDP) after cells were treated for 24 h. IC<sub>50</sub> (4.80 μg/mL) of CDDP in FA-CM-β-CD-CDDP group was significantly decreased compared to control group (6.97 μg/mL). Cell growth inhibition rate of the two groups all were above 80% when the final concentration of CDDP of the two kinds of nanocomposites reached 16.00 μg/mL, and cell growth inhibition rate of the two groups had no significant difference after 48 h. Colony forming rate (33.21%) of HNE-1 cells in FA-CM-β-CD-CDDP group was significantly lower than that of control group (52.27%) when the final concentration of CDDP in two groups were 1.00 μg/mL, and apoptosis rates of HNE-1 cells in FA-CM-β-CD-CDDP group (12.65% and 22.35%, respectively) were significantly higher than that of control group (6.91% and 14.21%, respectively) when the final concentration of CDDP both were 0.25 μg/mL and 1.00 μg/mL respectively after cells were treated for 24 h. The results showed that constructed FA-CM-β-CD-CDDP nanocomposites can targeted to inhibit FR expressing positive NPC cells proliferation and promote their apoptosis.

**Key words** folic acid; molecular targeted; nanocomposites; nasopharyngeal carcinoma; CDDP

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是中国南方最常见的头颈部恶性肿瘤, 一直以来, 放射治疗是NPC的首选治疗手段。尽管放疗设备和技术不断地更新, 晚期NPC单纯放疗的平均5年生存率仍低于40%。近年来化疗的作用已越来越被重视, 特别是以顺铂(cisplatin, CDDP)为主的诱导化疗和同期放化疗在NPC的治疗中已显示出重要的作用<sup>[1]</sup>。但目前临床使用的CDDP化疗都是非靶向性的, 如何达到更安全有效的靶向治疗是提高化疗疗效中急需解决的技术难题。

我们课题组前期研究发现, 叶酸受体(folate receptor, FR)在人NPC组织和HNE-1细胞中高表达, 并随NPC临床分期进展增加, 而在正常组织不表达<sup>[2]</sup>, FR已经成为恶性肿瘤的分子靶点之一<sup>[3]</sup>。羧甲基-β-环糊精(carboxymethyl-β-cyclodextrin, CM-β-CD)具有腔内疏水、腔外亲水的两亲性特点, 且有良好的生物相容性。其腔内可包含疏水化疗药物, 表面羧

基可取代CDDP的氯(-Cl)并与叶酸(folic acid, FA)分子氨基偶联, 利用FR与其配体高效、特异的结合能力实现对肿瘤细胞的主动靶向化疗。本研究构建了FA分子靶向载CDDP的复合物(FA-CM-β-CD-CDDP), 并以FR表达阳性的NPC细胞株HNE-1为研究对象, 观察该复合物治疗NPC的体外疗效, 现将结果报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂及仪器

人NPC HNE-1、CNE-2细胞由本实验室保存。细胞培养板、微孔滤过膜(美国Corning公司)。无叶酸RPMI-1640培养液(美国GIBCO公司)。CDDP(山东齐鲁制药厂)。β-CD(国药集团化学试剂有限公司)。FITC(上海生工生物工程有限公司)。SDS细胞裂解液(上海碧云天生物技术有限公司)。Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(美国eBioscience公

司)。TGL-16G高速离心机(中国上海安亭科学仪器厂)、UVIKON923紫外-可见分光光度计(美国BIO-TEK公司)、台式微量离心机(美国Beckman公司)、BIORAD3550酶联免疫吸附仪(美国Bio-Rad公司)、FACSCalibur流式细胞仪(美国BD公司)、JEM-100CX II型透射电子显微镜和Brookhaven ZetaPlus激光粒度散射仪(暨南大学测试中心)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 FA-CM- $\beta$ -CD-CDDP复合物制备

(1)CM- $\beta$ -CD的合成: 将一氯乙酸修饰 $\beta$ -CD羟基得到CM- $\beta$ -CD。按已有的文献步骤<sup>[4]</sup>, 称取一氯乙酸6.8 g, 用少量水溶解后, 加入30%的NaOH溶液15 mL, 再加入 $\beta$ -CD 11.35 g使之形成混悬液, 在电磁搅拌下, 在5 h内加入30% NaOH溶液7.5 mL。反应持续10~12 h。将反应液用盐酸调节pH至5~6, 再加入甲醇120 mL, 产生大量沉淀, 抽滤。用蒸馏水30 mL重新溶解滤渣, 再加入甲醇200 mL, 将产物沉淀, 抽滤。用少量水溶解滤渣后冷冻干燥, 得白色粉末状CM- $\beta$ -CD。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) 4.90 (s, 7H, OCH(CH)O), 4.20 (s, 8H, OCH<sub>2</sub>COOH), 3.95 (s, 7H, OCH(CH)CH<sub>2</sub>OH), 3.60-3.80 (m, 14H, CHCH(CH)OH), 3.50 (m, 14H, CHCH<sub>2</sub>O), 2.85 (s, 7H, OCH(CH)CH)。(2)FA-CM- $\beta$ -CD的合成: 将1.2 g CM- $\beta$ -CD溶解于15 mL二甲基亚砜(DMSO)中, 然后再加入0.88 g FA, 待样品完全溶解。向体系中加入0.42 g二环己基碳二亚胺(DCC)和0.23 g N-羟基琥珀酰亚胺(NHS), 在室温条件下CM- $\beta$ -CD的侧链羧基与靶分子FA的氨基进行酰胺化反应24 h。反应结束后将偶联产物透析, 每12 h换水, 透析3 d后, 过滤。将所得滤液冷冻干燥, 即得FA-CM- $\beta$ -CD共聚物。将1 g FA-CM- $\beta$ -CD与10 mg绿色荧光素(FITC)共同溶解于20 mL水溶液中, 避光, 4 °C反应12 h后, 避光透析3 d。将透析液冷冻干燥, 得到FITC修饰的FA-CM- $\beta$ -CD。(3)FA-CM- $\beta$ -CD-CDDP复合物制备: 将0.1 g FA-CM- $\beta$ -CD溶解于1 mL水中, 再加入10 mg CDDP, 充分摇匀后放置于恒温摇床上24 h, 温度37 °C, 85~90 r/min。将反应后溶液用超纯水透析48 h后冷冻干燥保存。同时将FA-CM- $\beta$ -CD-CDDP冻干物溶解于1 mL水中为下一步实验备用。

### 1.2.2 FA-CM- $\beta$ -CD-CDDP复合物表征

紫外分析该纳米复合物FA成分及浓度: 由于FA分子中含高度共轭的苯环结构, 在363 nm处存在特征性的强吸收

峰, 利用这个特点可采用紫外分光光度计法分析物质中FA成分及测定含量<sup>[5]</sup>, 以吸光度值为横坐标, FA浓度为纵坐标, 根据不同浓度的FA和相对应的紫外吸光度绘制标准曲线。根据标准曲线, 以稀释10倍后的FA-CM- $\beta$ -CD-CDDP复合物所测得的吸光度值计算出FA浓度。

透射电镜观察复合物粒径外形: 将制备的FA-CM- $\beta$ -CD-CDDP悬液用双蒸水稀释至合适浓度超声振荡(200 W, 3 min)后滴至专用覆膜铜网上, 常温干燥后在透射电子显微镜下观察并拍摄照片。

激光粒度仪测定其粒径大小: 将FA-CM- $\beta$ -CD-CDDP悬液用双蒸水稀释超声振荡, 采用激光粒度散射仪(选择632 nm的发射光源, 散射角为90度)测定水动力学粒径。

采用邻苯二胺(OPDA)比色法测定复合物所载CDDP含量: 将FA-CM- $\beta$ -CD-CDDP冻干后精确称重, 蒸馏水稀释、容量瓶定容后以分光光度计法测定703 nm波长下复合物所载CDDP浓度<sup>[6-7]</sup>, 计算包封率, 包封率(%)=CDDP含量/CDDP总量 $\times$ 100%。并将溶液稀释到CDDP浓度为100  $\mu$ g/mL, 用于下一步的体外实验。

### 1.2.3 FA-CM- $\beta$ -CD-DOC包合物体外FA靶向性观察

FA靶向吞噬实验: FR表达阳性的HNE-1细胞和阴性的CNE-2细胞在无FA RPMI-1640全培养基贴壁生长24 h后, 与无FA RPMI-1640稀释的偶联FITC的FA-CM- $\beta$ -CD-CDDP复合物共培养2 h(CDDP终浓度2.00  $\mu$ g/mL), PBS洗涤后在荧光显微镜下观察细胞内的FITC。6孔培养板上生长的上述细胞用冰PBS清洗3次, 每孔加入100  $\mu$ L SDS细胞裂解液, 37 °C裂解细胞30 min, 收集裂解溶液放入微管, 涡旋10 min, 4 000 r/min离心5 min后, 取上清液采用OPDA比色法测定细胞内吞噬的CDDP浓度。

### 1.2.4 FA-CM- $\beta$ -CD-CDDP复合物对HNE-1的体外抑制实验

采用噻唑蓝比色实验(即MTT法)检测作用前后细胞增殖能力: 将HNE-1细胞用无叶酸RPMI-1640全培养基在96孔板培养, 培养体系100  $\mu$ L。分为对照组、调零孔组(仅有培养基)、FA-CM- $\beta$ -CD组、实验对照组CM- $\beta$ -CD-CDDP及实验组FA-CM- $\beta$ -CD-CDDP, CDDP的终浓度均依次为: 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 4.00, 8.00, 16.00  $\mu$ g/mL。分别作用24 h和48 h。每孔加入MTT(5 mg/mL) 20  $\mu$ L继续培养4 h, 倾去培养液加入DMSO 150  $\mu$ L, 震荡摇匀于

酶标仪上测490 nm波长处的吸光度( $D_{490}$ )。计算复合物对HNE-1细胞生长的抑制率: 抑制率=(对照组调零后 $D_{490}$ -实验组调零后 $D_{490}$ )/对照组调零后 $D_{490}$ 。

**集落形成实验:** 收集处于指数生长期的HNE-1细胞, 接种于培养皿, 细胞贴壁24 h后, 分组同上, CM-β-CD-CDDP及FA-CM-β-CD-CDDP的CDDP浓度均为1.00 μg/mL, 于培养箱孵育24 h, 消化收集细胞, 然后每组细胞进行稀释重新接种到6孔板培养皿中。每个培养皿接种的细胞数如下: 空白对照组100个, FA-CM-β-CD组100个, CM-β-CD-CDDP组和FA-CM-β-CD-CDDP组各200个。置细胞于培养箱中培养, 2周后计数克隆。计数方法: 吸出培养液, 用结晶紫染色, 在低倍显微镜下计数细胞数大于50个的集落数, 求出细胞集落形成率, 集落形成率(%)=(集落数/接种细胞数)×100%。

**流式细胞仪检测细胞凋亡:** 分组同上, CDDP终浓度分别为0.25 μg/mL、1.00 μg/mL, 细胞分别作用24 h后用不含EDTA的胰酶消化收集, 用PBS洗涤细胞; 加入200 μL Binding Buffer(1×)悬浮细胞, 细胞密度为(2~5)×10<sup>5</sup>/mL; 加入5 μL Annexin V-FITC到195 μL细胞悬液中混合, 在室温下孵育10 min; 用200 μL Binding Buffer(1×)洗涤细胞, 加入190 μL Binding Buffer(1×)悬浮细胞; 加入10 μL Propidium Iodide(碘化丙啶, 20 μg/mL)混匀行FACS分析细胞凋亡。

### 1.3 统计学分析

采用SPSS 11.5统计软件对数据分析, 两组样本均数比较采用独立样本的t检验, 多个样本均数两两比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 表示为 $\bar{x}\pm s$ ,  $P<0.05$ 为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 FA-CM-β-CD-CDDP复合物的表征

为证实成功得到FA修饰的CM-β-CD, 我们利用紫外-可见吸收光谱对产物进行了表征, 结果如图1所示, 未被FA修饰的CM-β-CD在210~600 nm波长范围内无特征吸收峰; 修饰连接上FA后, 所得FA-CM-β-CD在365、280和255 nm处出现了FA的特征吸收峰, 说明FA已成功偶连到CM-β-CD上。

为得到FA-CM-β-CD中FA的含量, 利用紫外-可见吸收光谱测定其标准曲线, 在2.5~100 μg/mL范围内FA的含量与OD值有良好的线性关系, 回归公式Y(FA

浓度)=112.08X(D值)-0.3832( $R^2=0.9996$ )。按此公式测得该化合物中FA的浓度为340.00±0.08 μg/mL。

**FA-CM-β-CD-CDDP复合物的粒径形态:** 电镜观察纳米复合物颗粒呈球形, 分散均匀(图2)。

**激光粒度仪测定其粒径大小:** 平均水动力学粒径为157.8±8.9 nm(图3)。

**按照OPDA比色法测定CDDP含量:** CDDP含量和吸光度有良好线性关系, 回归公式Y(CDDP浓度)=0.1129X(吸光度)-0.1871;  $R^2=0.9861$ 。按此方法和公式测定计算得到该复合物所载CDDP含量为: 2.00±0.52 mg/mL, 复合物中CDDP包封率为: 20.00%±2.37%。

制备的FA-CM-β-CD-CDDP复合物在常温下静置, 液体无浑浊, 外观流动性佳, 连续观察3个月未发现颗粒沉淀。

### 2.2 FA-CM-β-CD-CDDP复合物体外FA靶向性观察

HNE-1细胞和CNE-2细胞分别与FA-CM-β-CD-CDDP复合物(CDDP终浓度2.00 μg/mL)共培

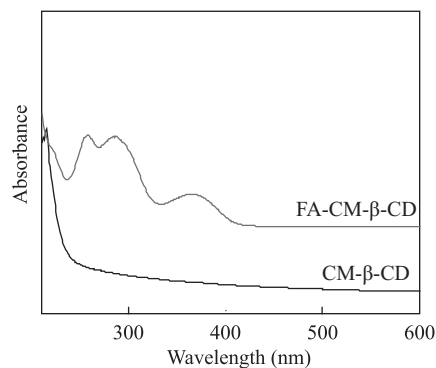


图1 FA-CM-β-CD紫外光谱图

Fig.1 Ultraviolet spectrum graphics of FA-CM-β-CD

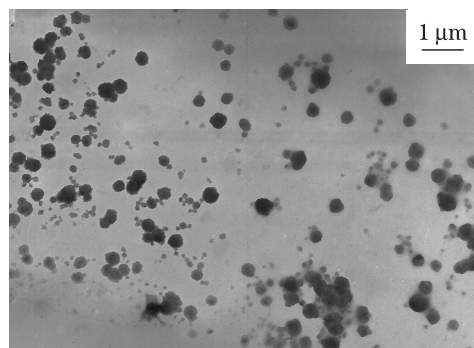


图2 FA-CM-β-CD-CDDP纳米复合物透射电镜

Fig.2 TEM of FA-CM-β-CD-CDDP nanocomposites

养2 h后,显微镜下观察可见,HNE-1细胞内有较多FITC(图4A和图4B)。而CNE-2细胞内的FITC很少(图4C和图4D)。

OPDA比色法测定HNE-1细胞内吞噬的CDDP浓度为 $6.24 \pm 1.10$  ng/mL,明显高于CNE-2细胞内吞噬的CDDP(浓度为 $2.01 \pm 0.65$  ng/mL)( $P < 0.05$ )。

### 2.3 FA-CM- $\beta$ -CD-CDDP复合物对HNE-1细胞的体外抑制实验

MTT实验结果显示,终浓度为40, 80, 160, 320  $\mu$ g/mL

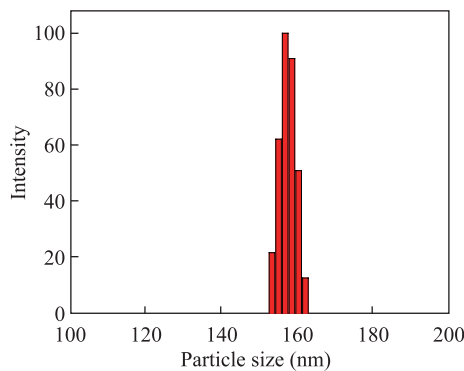


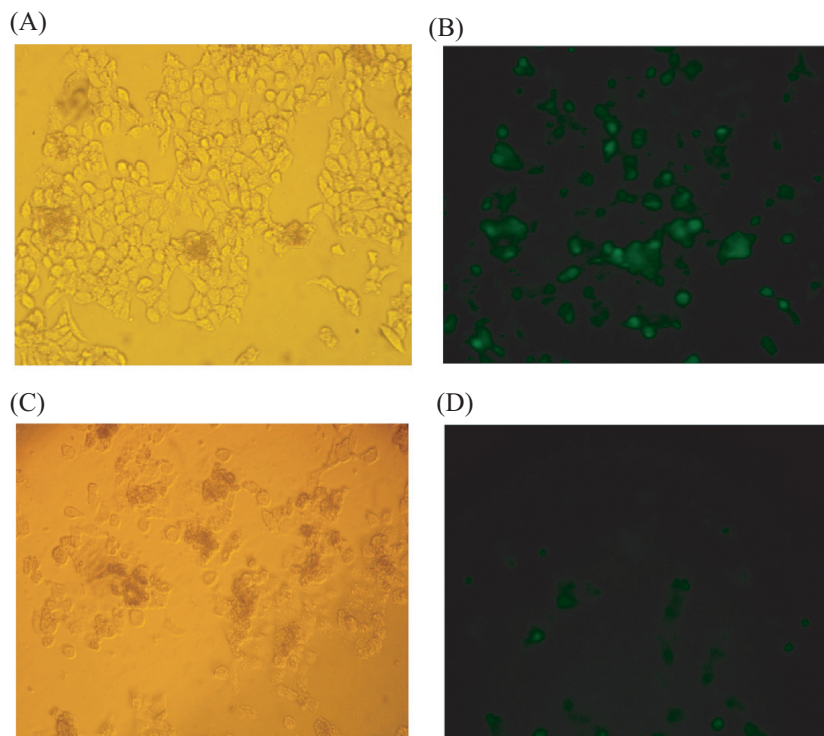
图3 FA-CM- $\beta$ -CD-CDDP纳米复合物粒径

Fig.3 Particle size of FA-CM- $\beta$ -CD-CDDP nanocomposites

的FA-CM- $\beta$ -CD载体与HNE-1细胞作用24 h后,细胞抑制率分别为:  $0.16\% \pm 0.04\%$ 、 $0.25\% \pm 0.02\%$ 、 $0.32\% \pm 0.09\%$ 、 $1.07\% \pm 0.03\%$ 。作用48 h后,细胞抑制率分别为:  $0.23\% \pm 0.32\%$ 、 $0.49\% \pm 0.13\%$ 、 $1.66\% \pm 0.04\%$ 、 $3.03\% \pm 2.11\%$ 。实验组与空白对照组相比较,差别无显著性( $P > 0.05$ )。不同药物浓度的FA-CM- $\beta$ -CD-CDDP复合物与HNE-1细胞共培养24 h,抑制效果明显强于CM- $\beta$ -CD-CDDP复合物,但当复合物所载CDDP终浓度达到 $16.00$   $\mu$ g/mL时,两组抑制率均达到80%以上,无明显差异。随着共培养时间延长至48 h,两种包合物的细胞抑制率均增强,但组间差距缩小,FA-CM- $\beta$ -CD-CDDP的抑制作用略高于CM- $\beta$ -CD-CDDP,细胞抑制率无明显差异( $P > 0.05$ )(表1和图5)。

FA-CM- $\beta$ -CD-CDDP组24 h的 $IC_{50}$ ( $4.80 \pm 0.42$ )  $\mu$ g/mL低于CM- $\beta$ -CD-CDDP组的 $IC_{50}$ 值( $6.97 \pm 0.59$ )  $\mu$ g/mL( $P < 0.05$ )。但48 h两组 $IC_{50}$ 值接近[分别为( $1.59 \pm 0.31$ )  $\mu$ g/mL, ( $1.61 \pm 0.25$ )  $\mu$ g/mL],差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

细胞集落形成实验显示,空白对照组和FA-CM- $\beta$ -CD(320  $\mu$ g/mL)载体组细胞集落形成率分别为



A: HNE-1细胞普通光显微镜图; B: HNE-1细胞对应荧光显微镜图; C: CNE-2细胞普通光显微镜图; D: CNE-2细胞对应荧光显微镜图。

A: HNE-1 cells picture under ordinary optical microscope; B: HNE-1 cells corresponding picture under fluorescence microscope; C: CNE-2 cells picture under ordinary optical microscope; D: CNE-2 cells corresponding picture under fluorescence microscope.

图4 体外细胞吞噬(200 $\times$ )

Fig.4 Cell phagocytosis *in vitro* (200 $\times$ )

表1 复合物对HNE-1细胞的抑制率

Table 1 Inhibition rate of compounds on HNE-1 cell growth

载CDDP浓度(μg/mL)	CM-β-CD-CDDP (%)		FA-CM-β-CD-CDDP (%)	
Concentration of loading CDDP (μg/mL)	24 h	48 h	24 h	48 h
0.25	8.52±0.76	14.75±1.42	14.65±1.34*	17.82±3.51
0.50	15.95±1.83	23.47±0.53	21.34±0.73*	25.56±4.72
1.00	17.80±2.84	45.23±0.89	28.95±3.31*	47.07±5.42
2.00	23.26±0.85	53.39±3.26	36.28±2.40*	55.18±1.45
4.00	36.68±4.62	67.57±4.23	49.81±5.66*	68.10±1.59
8.00	58.83±4.56	78.60±4.00	69.48±4.58*	80.62±5.03
16.00	82.72±0.90	93.55±0.51	85.72±2.44	92.41±1.27

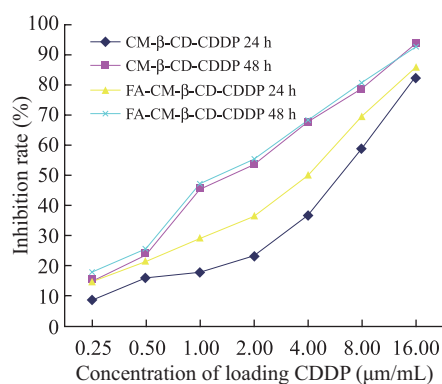
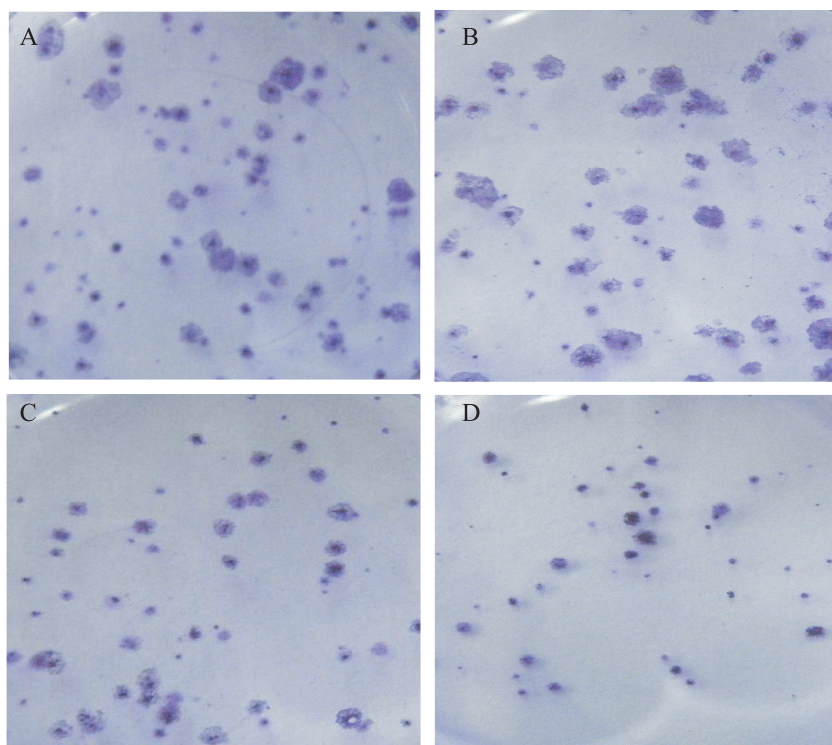
\* $P < 0.05$ , 与24 h CM-β-CD-CDDP组比较。\* $P < 0.05$  compared with CM-β-CD-CDDP group (24 h).

图5 复合物对HNE-1细胞生长的抑制作用

Fig.5 Effects of compounds on HNE-1 cell growth

(70.38%±4.34%和68.79%±5.01%), 两组无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。当载CDDP终浓度为1.00 μg/mL, FA-CM-β-CD-CDDP组细胞集落形成率为33.21%±4.28%, 低于CM-β-CD-CDDP组(52.27%±6.01%) ( $P < 0.05$ ), 两组细胞集落形成率均低于空白对照组和FA-CM-β-CD载体组 ( $P < 0.05$ )。FA-CM-β-CD-CDDP组的集落形成率最小(图6)。

流式细胞仪检测结果显示, 空白对照组和FA-CM-β-CD载体组凋亡率及死亡率无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。当载CDDP终浓度分别为0.25 μg/mL和1.00 μg/mL, CM-β-CD-CDDP组和FA-CM-β-CD-CDDP



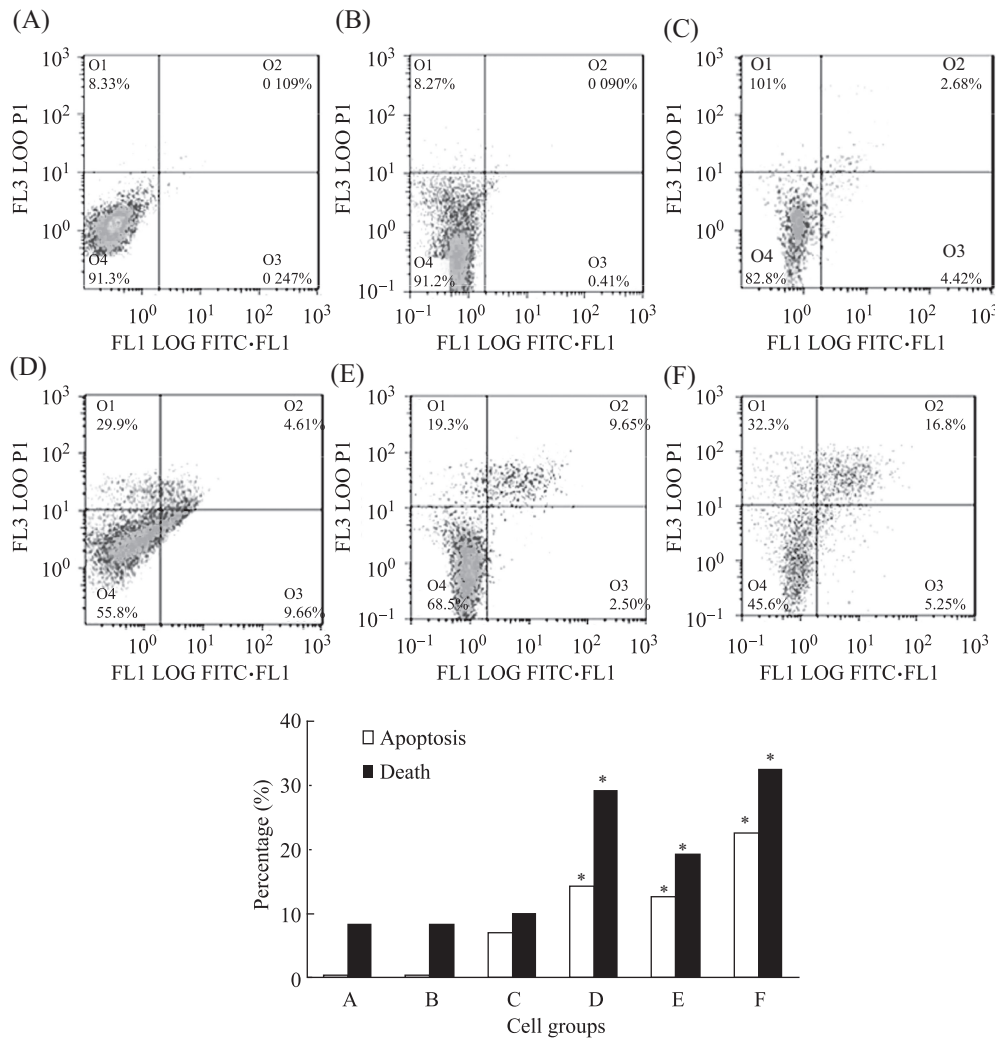
A: 空白对照组; B: FA-CM-β-CD (320 μg/mL); C: CM-β-CD-CDDP (CDDP, 1.00 μg/mL); D: FA-CM-β-CD-CDDP (CDDP, 1.00 μg/mL)。  
A: control group; B: FA-CM-β-CD (320 μg/mL); C: CM-β-CD-CDDP (CDDP, 1.00 μg/mL); D: FA-CM-β-CD-CDDP (CDDP, 1.00 μg/mL).

图6 细胞集落

Fig.6 Cell colony

组凋亡率和死亡率均随药物浓度增加而增加, FA-CM- $\beta$ -CD-CDDP组凋亡率分别为12.65% $\pm$ 1.43%和22.35% $\pm$ 2.52%, 高于相应浓度的CM- $\beta$ -CD-CDDP组

凋亡率(6.91% $\pm$ 0.32%和14.21% $\pm$ 1.02%)( $P<0.05$ ), 两组凋亡率均高于空白对照组和FA-CM- $\beta$ -CD载体组( $P<0.05$ )(图7)。



A: 空白对照; B: FA-CM- $\beta$ -CD (320  $\mu$ g/mL); C: CM- $\beta$ -CD-CDDP (CDDP, 0.25  $\mu$ g/mL); D: CM- $\beta$ -CD-CDDP (CDDP, 1.00  $\mu$ g/mL); E: FA-CM- $\beta$ -CD-CDDP (CDDP, 0.25  $\mu$ g/mL); F: FA-CM- $\beta$ -CD-CDDP (CDDP, 1.00  $\mu$ g/mL)。\* $P<0.05$ , 与空白对照组比较。

A: control group; B: FA-CM- $\beta$ -CD (320  $\mu$ g/mL); C: CM- $\beta$ -CD-CDDP (CDDP, 0.25  $\mu$ g/mL); D: CM- $\beta$ -CD-CDDP (CDDP, 1.00  $\mu$ g/mL); E: FA-CM- $\beta$ -CD-CDDP (CDDP, 0.25  $\mu$ g/mL); F: FA-CM- $\beta$ -CD-CDDP (CDDP, 1.00  $\mu$ g/mL)。\* $P<0.05$  vs control group.

图7 流式检测细胞凋亡

Fig.7 Cell apoptosis by flow cytometry

### 3 讨论

晚期NPC单纯放疗效果不佳, 联合化疗可改善5年生存率, 目前最常用的药物之一是CDDP。CDDP为重金属铂的络合物, 可以与细胞的核酸和蛋白质反应, 抑制DNA复制和转录, 导致DNA断裂和误码, 抑制细胞有丝分裂, 可诱导肿瘤细胞凋亡而抑制肿瘤生长。虽然CDDP对NPC具有确切疗效, 但由于其水溶性低、在体内代谢速度快、对正常细胞也造

成很大伤害, 限制了其抗肿瘤作用更好的发挥。如果采用具备缓释效果的靶向药物载体给药, 就能使CDDP在体内缓慢释放, 降低药物的毒副作用, 提高治疗效果。现有采用高分子材料, 如PGLA<sup>[8]</sup>、mPEG-PLGA-PLL<sup>[9]</sup>、PEG PAsp<sup>[10]</sup>、聚( $\gamma$ , L-谷氨酸)<sup>[11]</sup>等作为CDDP载体制备大分子药物, 虽然所得大分子药物能有效地降低CDDP的毒性, 并在一定程度上提高局部药物浓度, 但也存在着载体合成

困难、载体本身毒性较高、缺乏特异分子主动靶向等不足。为此, 开发新型高效低毒的分子靶向CDDP药物成为近年肿瘤治疗的研究热点。

环糊精(CD)是由6~8个葡萄糖单元通过 $\alpha$ -1,4糖苷键相连而形成的环状化合物( $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ -CD), 由7分子葡萄糖组成者称为 $\beta$ -CD。由于 $\beta$ -CD具有空腔内径大小适中、包力强、原料能大量生产、经济易得等优点而应用最广。其呈两端开口中空的一环筒状立体结构, 具有腔内疏水、腔外亲水的两亲性特点, 具有良好的生物相容性, 可与多种客体化合物形成超分子包合物, 通过结构修饰、聚合或超分子组合等设计被逐渐应用于药物载体系统, 改善药物理化性质, 包括提高水溶性、促进吸收度等。为达到靶向治疗效应, 已有将 $\beta$ -CD聚合物为载体连接药物及半乳糖基配体<sup>[12]</sup>、转铁蛋白配体<sup>[13]</sup>, 发现均可以靶向到特殊细胞。羧甲基(CM)- $\beta$ -CD在人体肠道pH6~7的环境中具有很好的溶解性, 可在药物延长释放剂型中使用, 同时具有比 $\beta$ -CD、 $\gamma$ -CD和HP- $\beta$ -CD等更低的溶血性<sup>[14]</sup>, CM- $\beta$ -CD在药学领域的应用将具有极大的潜力。

国内外研究发现, FR在人NPC等众多恶性肿瘤中高表达, 是恶性肿瘤的分子靶点之一<sup>[1-2]</sup>。FA是一种人体细胞必需的维生素, 与FR有高度亲和性, 而且FA被偶联后仍然能够保持与FR的高亲和性<sup>[15]</sup>, 通过胞吞作用被特异性摄入细胞内。FA靶向载化疗药物(紫杉醇、阿霉素)能选择性识别并靶向进入KB细胞<sup>[16-17]</sup>、Bel 7402细胞<sup>[18]</sup>及裸鼠移植瘤, 明显增加抗肿瘤效应。FA靶向载甲氨蝶呤树状聚合物对头颈部鳞状细胞癌细胞(UM-SCC-1、UM-SCC-17B、UM-SCC-22B等)生长和裸鼠成瘤等有着很强的抑制效应和更低的全身毒性<sup>[19]</sup>。FR介导的细胞内吞转运机制以及FR的组织分布特点为靶向恶性肿瘤的载药和释药奠定了基础, 为增强常规化疗的杀伤特异性提供了条件。

CDDP也是一种配位化合物, 其中氨基是稳定的配位体, 而氯原子是不稳定的配位体, 可以被高分子材料的羧基取代。我们制备了CM- $\beta$ -CD, 利用其侧链的羧基与靶向分子FA的氨基进行酰胺化反应偶联, 同时又能取代氯原子与CDDP进行配位偶联, 制成了FA-CM- $\beta$ -CD-CDDP纳米药物。主动靶向纳米药物通常要满足以下两个条件: 粒径200 nm以内和含有亲水的改性表层, 这样才有可能逃避网状内

皮系统的吞噬, 获得更长的循环时间和更高的靶向能力<sup>[20]</sup>。本文按照以往我们制备的FA靶向纳米载体实验程序<sup>[21-22]</sup>, 对FA-CM- $\beta$ -CD-CDDP复合物进行的表征结果显示, 该纳米药物颗粒分散均匀, 形态规则, 平均水动力学粒径为157.8 nm, 复合物符合主动靶向纳米药物的应用要求。

观察结果显示, 该纳米药物常温下稳定性好, 紫外分析证实载体成功与FA分子偶联。纳米药物中CDDP包封率稍低, 为20.00%, 可能与FA-CM- $\beta$ -CD载体表面的羧基欠丰富有关。我们将该纳米药物表面偶联上FITC, 通过观察细胞内的FITC和检测细胞内吞噬的CDDP浓度证实FR表达阳性的HNE-1细胞对FA-CM- $\beta$ -CD-CDDP复合物有良好的分子靶向吞噬效应。本文制备的药物采用CM- $\beta$ -CD连接CDDP, 是一种可逆释放的连接方式, 理论上推测进入细胞后能够有效解离发挥疗效。我们通过体外实验证实FA-CM- $\beta$ -CD-CDDP复合物在24 h就表现出对人NPC的HNE-1细胞株很高的细胞抑制效果, 且IC<sub>50</sub>较CM- $\beta$ -CD-CDDP明显降低。但当两组复合物载高浓度CDDP作用24 h以及复合物作用时间延长至48 h时则两组细胞毒性差异不明显。原因可能是偶联FA的复合物高亲和、高效特异性被HNE-1细胞内吞, 但这种FR介导的吞噬有饱和性<sup>[23]</sup>, 因此在较短的作用时间和较低的药物浓度下, 通过FR途径可以获得更显著的细胞抑制效果; 而随着作用时间延长和药物浓度的增大, FR途径饱和, 这种优势逐渐消失, 不同治疗药物可通过非特异性途径进入细胞<sup>[24]</sup>, 就产生了环境中高药物浓度和长时间直接接触所产生的随机细胞毒性, 故表现出非靶向药物在高浓度和长时间作用的效果与靶向药物几乎相似。

克隆形成实验是测定细胞增殖能力的有效方法之一, 通过该方法, 我们发现FA-CM- $\beta$ -CD-CDDP复合物作用24 h细胞集落形成率小于CM- $\beta$ -CD-CDDP复合物, FA-CM- $\beta$ -CD-CDDP表现出更强的抑制细胞增殖能力。流式细胞术也证实了FA-CM- $\beta$ -CD-CDDP复合物作用24 h细胞凋亡率随浓度增加而增加, 并明显高于CM- $\beta$ -CD-CDDP组。

总之, 本研究成功地制备出一种新的载CDDP高分子FA靶向复合物, 提高了CDDP的水溶性, 降低了CDDP的毒副作用, 靶向抑制FR阳性人NPC HNE-1细胞株增殖和促进其凋亡, 体外抗肿瘤效果良好。载CDDP药量不足可通过包合其他疏水化疗



药物来补偿,应该说是一种比较好的水溶性药物载体,该药物的体内效果如何尚待进一步研究证实。

### 参考文献 (References)

- 1 Guigay J, Temam S, Bourhis J, Pignon JP, Armand JP. Nasopharyngeal carcinoma and therapeutic management: the place of chemotherapy. *Ann Oncol* 2006; 17(10): 304-7.
- 2 Xie M, Zhang H, Xu Y, Liu T, Chen S, Wang J, *et al.* Expression of folate receptors in nasopharyngeal and laryngeal carcinoma and folate receptor-mediated endocytosis by molecular targeted nanomedicine. *Int J Nanomedicine* 2013; 8: 2443-51.
- 3 Islam T, Josephson L. Current state and future applications of active targeting in malignancies using superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Cancer Biomark* 2009; 5(2): 99-107.
- 4 宋全道, 丁易, 李新民, 米广大. 羧甲基- $\beta$ -环糊精的溶血作用及对槲皮素的增溶作用. *山东大学学报(医学版)* (Song Quandao, Ding Yi, Li Xinmin, Mi Guangtai. Synthesis of carboxymethyl- $\beta$ -cyclodextrin and its hemolysis and solubilization. *Journal of Shandong University: Health Sciences*) 2005; 43(2): 166-9.
- 5 肖苏尧, 童春义, 刘选明, 俞丹密, 刘巧玲, 薛昌刚, 等. 肿瘤靶向性药物载体叶酸-淀粉纳米颗粒的研制与应用. *科学通报* (Xiao Suyao, Tong Chunyi, Liu Xuanming, Yu Danmi, Liu Qiaoling, Xue Changgang, *et al.* Preparation of folate-conjugated starch nanoparticles and its application to tumor-targeted drug delivery vector. *Chin Sci Bull*) 2006; 51(10): 1151-5.
- 6 Anilnert B, Yalçin G, Ariöz F, Dölen E. The spectrophotometric determination of cisplatin in urine, using o-phenylenediamine as derivatizing agent. *Analyt Lett* 2001; 34(1): 113-23.
- 7 谢民强, 陈帅君, 徐雪青, 李仲汉, 沈辉, 许家瑞. 两种顺铂磁性纳米颗粒制备及其特性的比较. *科学通报* (Xie Minqiang, Chen Shuaijun, Xu Xueqing, Li Zhonghan, Shen Hui, Xu Jiarui. Preparation of two kinds of superparamagnetic carriers-supported cis-platinum-complexes and the comparison of their characteristics. *Chin Sci Bull*) 2006; 51(2): 151-7.
- 8 Fujiyama J, Nakase Y, Osaki K, Sakakura C, Yamagishi H, Hagiwara A. Cisplatin incorporated in microspheres: Development and fundamental studies for its clinical application. *J Control Release* 2003; 89(3): 397-408.
- 9 Wang Y, Liu P, Qiu L, Sun Y, Zhu M, Gu L, *et al.* Toxicity and therapy of cisplatin-loaded EGF modified mPEG-PLGA-PLL nanoparticles for SKOV3 cancer in mice. *Biomaterials* 2013; 34(16): 4068-77.
- 10 Nishiyama N, Okazaki S, Cabral H, Miyamoto M, Kato Y, Sugiyama Y, *et al.* Novel cisplatin-incorporated polymeric micelles can eradicate solid tumors in mice. *Cancer Res* 2003; 63(24): 8977-83.
- 11 Ye H, Jin L, Hu R, Yi Z, Li J, Wu Y, *et al.* Poly( $\gamma$ -L-glutamic acid)-cisplatin conjugate effectively inhibits human breast tumor xenografted in nude mice. *Biomaterials* 2006; 27(35): 5958-65.
- 12 Pun SH, Davis ME. Development of a nonviral gene delivery vehicle for systemic application. *Bioconjugate Chem* 2002; 13(3): 630-9.
- 13 Bellocq NC, Pun SH, Jensen GS, Davis ME. Transferrin-containing, cyclodextrin polymer based particles for tumor targeted gene delivery. *Bioconjugate Chem* 2003; 14(6): 1122-32.
- 14 Funasaki N, Okuda T, Neya S. Mechanisms and surface chemical prediction of imipramine-induced hemolysis suppressed by modified cyclodextrins. *J Pharm Sci* 2001; 90(8): 1056-65.
- 15 Leamon CP, Reddy JA. Folate-targeted chemotherapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56(8): 1127-41.
- 16 Wang X, Li J, Wang Y, Cho KJ, Kim G, Gjyzezi A, *et al.* HFT-T, a targeting nanoparticle, enhances specific delivery of paclitaxel to folate receptor-positive tumors. *ACS Nano* 2009; 3(10): 3165-74.
- 17 Dosio F, Arpicco S, Stella B, Brusa P, Cattel L. Folate-mediated targeting of albumin conjugates of paclitaxel obtained through a heterogeneous phase system. *Int J Pharm* 2009; 382(1/2): 117-23.
- 18 Hong G, Yuan R, Liang B, Shen J, Yang X, Shuai X. Folate-functionalized polymeric micelle as hepatic carcinoma-targeted, MRI-ultrasensitive delivery system of antitumor drugs. *Biomed Microdevices* 2008; 10(5): 693-700.
- 19 Ward BB, Dunham T, Majoros IJ, Baker JR Jr. Targeted dendrimer chemotherapy in an animal model for head and neck squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 2011; 69(9): 2452-9.
- 20 Brannon-Peppas L, Blanchette JO. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56(11): 1649-59.
- 21 刘涛, 马栋, 王蓉, 张涛, 何政. 叶酸靶向PEG-PEI-Alg-氧化铁磁性纳米基因载体的构建及鉴定. *中国现代医学杂志* (Liu Tao, Ma Dong, Wang Rong, Zhang Tao, He Zheng. FA targeted PEG-PEI-Alg-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles gene vector preparation and identification. *China Journal of Modern Medicine*) 2012; 22(19): 12-7.
- 22 刘涛, 谢民强, 马栋, 许熠铭, 张宏征, 张涛. FA-MNP-MMP-9-ASODN复合物构建及其分子靶向研究. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志* (Liu Tao, Xie Minqiang, Ma Dong, Xu Yiming, Zhang Hongzheng, Zhang Tao. FA-MNP-MMP-9-ASODN complex construction and the study of its FA molecular targeting ability. *Journal of Clinical Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*) 2013; 27(11): 593-7.
- 23 Leamon CP, Pastan I, Low PS. Cytotoxicity of folate-Pseudomonas exotoxin conjugates toward tumor cells. Contribution of translocation domain. *J Biol Chem* 1993; 268(33): 24847-54.
- 24 Hamelers IH, Staffhorst RW, Voortman J, de Kruijff B, Reedijk J, van Bergen en Henegouwen PM, *et al.* High cytotoxicity of cisplatin nanocapsules in ovarian carcinoma cells depends on uptake by caveolae-mediated endocytosis. *Clin Cancer Res* 2009; 15(4): 1259-68.