

# 麦胚凝集素修饰的长春瑞滨阳离子脂质体的处方优选及细胞毒性试验<sup>Δ</sup>

肖瑶\*, 王鑫, 符敏, 刘晶晶, 李学涛, 程岚<sup>#</sup>(辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)05-0611-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.05.09

**摘要** 目的:制备麦胚凝集素(WGA)修饰的长春瑞滨(VRB)阳离子脂质体(WGA-VRB阳离子脂质体),优化处方并进行细胞毒性试验。方法:以磷脂、胆固醇为辅料,以 $3\beta$ -[N-(N'-N'-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基]胆固醇盐酸盐(DC-Chol)为阳离子材料,以二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000(DSPE-PEG2000)为长循环链,采用薄膜分散法及硫酸铵梯度法制备WGA-VRB阳离子脂质体。以包封率为指标,采用星点设计-响应面法优化处方中DC-Chol、胆固醇和VRB用量。测定所制VRB脂质体和WGA-VRB阳离子脂质体中VRB含量,比较二者和空白阳离子脂质体作用于人乳腺癌细胞MCF-7和人非小细胞肺癌细胞A549后对细胞存活率的影响。结果:5 mL WGA-VRB阳离子脂质体的最优处方为磷脂22 mg、胆固醇12 mg、DC-Chol 8 mg、VRB 0.5 mg,其包封率为 $(92.24 \pm 1.21)\%$  ( $n=3$ ),与预测值的相对误差为5.3%。VRB脂质体和WGA-VRB阳离子脂质体中VRB含量分别为 $(96.01 \pm 3.26)$ 、 $(93.39 \pm 1.59)$   $\mu\text{g/mL}$  ( $n=3$ );与空白阳离子脂质体和VRB脂质体比较,WGA-VRB阳离子脂质体可明显降低MCF-7、A549细胞的存活率( $P<0.05$ )。结论:成功制得WGA-VRB阳离子脂质体,其对MCF-7、A549细胞存活的抑制作用强于VRB脂质体。

**关键词** 麦胚凝集素;长春瑞滨;阳离子脂质体;处方优选;星点设计-响应面法;含量测定

## Optimization of Wheat Germ Agglutinin Modified Vinorelbine Cationic Liposomes Formulation and Cytotoxicity Test

XIAO Yao, WANG Xin, FU Min, LIU Jingjing, LI Xuetao, CHENG Lan (School of Pharmacy, Liaoning University of TCM, Liaoning Dalian 116600, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To prepare Wheat germ agglutinin (WGA) modified vinorelbine (VRB) cationic liposomes (WGA-VRB cationic liposomes), and to optimize the formulation and conduct cytotoxicity test. METHODS: Thin-film diffusion and ammonium sulfate gradient method were used to prepare WGA-VRB cationic liposomes using phospholipid and cholesterol as excipient,  $3\beta$ -[N-(N'-N'-dimethyl aminoethane)-carbonyl] cholesterol hydrochloride (DC-Chol) as cationic material, distearoyl phosphatidylethanolamine-polyethylene glycol 2000 (DSPE-PEG2000) as long cycle chain. Using encapsulation rate as index, central composite design-response surface methodology was used to optimize the amount of DC-Chol, cholesterol and VRB. The contents of VRB in VRB liposomes and WGA-VRB cationic liposomes were determined. The effects of them and blank cationic liposomes on survival rates of human breast cancer cell MCF-7 and human non-small cell lung cancer cells A549 were compared. RESULTS: The optimal formulation of 5 mL WGA-VRB cationic liposomes was as follows as phospholipid 22 mg, cholesterol 12 mg, DC-Chol 8 mg, VRB 0.5 mg. Encapsulation rate of the liposomes was  $(92.24 \pm 1.21)\%$  ( $n=3$ ), relative error of which to predicted value was 5.3%. The contents of VRB in VRB liposomes and WGA-VRB cationic liposomes were  $(96.01 \pm 3.26)$ ,  $(93.39 \pm 1.59)$   $\mu\text{g/mL}$  ( $n=3$ ). Compared with blank cationic liposomes and VRB liposomes, WGA-VRB cationic liposomes could significantly reduce survival rate of MCF-7 and A549. CONCLUSIONS: WGA-VRB cationic liposomes are prepared successfully. Inhibitory effect of WGA-VRB cationic liposomes on MCF-7 and A549 cell survival is stronger than that of VRB liposomes.

**KEYWORDS** Wheat germ agglutinin; Vinorelbine; Cationic liposomes; Formulation optimization; Central composite design-response surface methodology; Content determination

麦胚凝集素(WGA)是从小麦胚芽中提取的一种能与专一性糖结合、促进细胞凝集的二聚体蛋白质。研究

<sup>Δ</sup> 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81541081; 81673603)

\* 硕士研究生。研究方向:新型给药系统。E-mail: 272484633@qq.com

<sup>#</sup> 通信作者:教授,博士。研究方向:新型给药系统。E-mail: sychenglan@163.com

表明将其与药物或载体结合,可借助凝集素对癌细胞的亲和作用增强抗癌活性<sup>[1]</sup>。脂质体是由磷脂双分子层组成的类生物细胞膜结构,有降低药物不良反应、提高药物体内靶向性的优点<sup>[2]</sup>。但普通脂质体体内循环周期短、主动靶向性弱,限制了脂质体的进一步应用<sup>[3-4]</sup>。研究发现,与正常细胞相比,肿瘤细胞膜表面通常带有较多的负电荷<sup>[5]</sup>。阳离子脂质体是利用阳离子磷脂材料制

备成表面带有正电荷的靶向给药制剂<sup>[6]</sup>,阳离子脂质体可通过与肿瘤细胞膜的静电吸附作用提高药物的主动靶向效果。长春瑞滨为人工半合成类生物碱,广泛应用于肺癌、乳腺癌、卵巢癌、淋巴瘤、食管癌等研究<sup>[7]</sup>。本课题制备 WGA 修饰的长春瑞滨 (VRB) 阳离子脂质体 (WGA-VRB 阳离子脂质体),通过凝集素与肿瘤细胞的主动亲和作用<sup>[8]</sup>以及阳离子脂质体与肿瘤细胞膜的静电吸附作用来增强 VRB 对肿瘤细胞的细胞毒性。采用星点设计-响应面法优选 WGA-VRB 阳离子脂质体处方,测定脂质体中 VRB 的含量并比较 VRB 脂质体和 WGA-VRB 阳离子脂质体对人乳腺癌细胞 MCF-7 和人非小细胞肺癌细胞 A549 存活率的影响。

## 1 材料

### 1.1 仪器

FA1004 电子天平(上海越平科学仪器有限公司);RE52CS 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);JY92-2D 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技公司);PHS-25pH 计(上海精密科学仪器有限公司);20AT 液相色谱仪与紫外检测器(日本岛津公司);WJ-80B- II 二氧化碳细胞培养箱(上海新苗医疗器械制造有限公司);HBS-1096A 酶标分析仪(南京德铁实验设备有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

WGA 蛋白(瑞典 Medicago 公司,批号:050102100,含量:>98%);二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000 (DSPE-PEG2000,上海艾伟特医药科技有限公司);VRB 原料药、VRB 对照品(大连美仑生物技术有限公司,批号:MB20886、MB5301,纯度:>98%、≥98%);葡聚糖凝胶 Sephadex G-50(北京索莱宝科技有限公司);卵磷脂(日本 NOF 公司);胆固醇(普迈生物科技有限公司); $3\beta$ -[N-(N'-N'-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基]胆固醇盐酸盐(DC-Chol,美国 Avanti 公司);胎牛血清(FBS)和 RPMI-1640 培养液(北京迈晨科技有限公司);胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);96 孔细胞培养板(无锡耐思生物科技有限公司);甲醇、氯仿、三乙胺、磷酸等均为分析纯。

### 1.3 细胞

MCF-7 细胞和 A549 细胞均购自中国医学科学院基础医学研究所。

## 2 方法与结果

### 2.1 WGA-VRB 阳离子脂质体的制备

以磷脂、胆固醇为辅料,以 DC-Chol 为阳离子材料,以 DSPE-PEG2000 为长循环链,采用薄膜分散法和硫酸铵梯度法制备 WGA-VRB 阳离子脂质体。取处方量磷脂、胆固醇、DC-Chol、DSPE-PEG2000,加氯仿溶解,40 ℃ 水浴旋转蒸发形成均匀脂膜,加入 250 mol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  水溶液 5 mL,超声水化(功率 180 W),然后超声 10 min(超声时间与间歇时间各 10 s,功率 200 W),过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜 2 次,过膜后密封于透析膜袋中(截留分子量 12 000~14 000 Da),以磷酸盐缓冲液(PBS,

0.01 mol/L, pH 为 7.2~7.4)为透析介质,透析 3 次,每次 8 h,加入 WGA 2 mg,室温匀速搅拌 2 h,得空白阳离子脂质体。空白阳离子脂质体中加入处方量的 VRB 原料药,40 ℃ 水浴振摇 20 min,即得。

### 2.2 VRB 的含量测定

2.2.1 色谱条件 参考文献[9],色谱柱:Agilent C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ );流动相:乙腈-0.06 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (0.3% 三乙胺)(33:67, V/V, 磷酸调 pH=4.0);流速:1.0 mL/min;检测波长:267 nm;柱温:30 ℃;进样量:20  $\mu\text{L}$ 。

2.2.2 溶液的制备 取 WGA-VRB 阳离子脂质体 1 mL,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇破乳定容,制成供试品溶液。取 VRB 对照品适量,甲醇溶解稀释制成质量浓度分别为 12.5、25、50、100、200、400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的系列标准溶液,作为对照品溶液。取空白阳离子脂质体 1 mL,置于 10 mL 量瓶,甲醇定容,作为空白溶液。

2.2.3 系统适用性试验 取供试品溶液、对照品溶液(0.1 mg/mL)及空白溶液各 20  $\mu\text{L}$ ,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱。结果显示,VRB 的出峰时间为 7.9~8.1 min,空白溶液在此无色谱峰出现,可见空白脂质体对 VRB 的测定无干扰。理论板数按 VRB 峰计不低于 3 000。

2.2.4 标准曲线的绘制 按“2.2.1”项下色谱条件,进样测定“2.2.2”项下不同质量浓度的系列标准溶液的峰面积,以质量浓度为横坐标(x)、峰面积为纵坐标(y)进行回归分析。得回归方程为  $y=2\ 068.1x+31\ 671$  ( $r=0.999\ 9$ ,  $n=6$ );结果表明,VRB 检测质量浓度在 12.5~400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内与峰面积线性关系良好。

2.2.5 重复性试验 取供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,重复 5 次,计算峰面积的 RSD 为 1.27% ( $n=5$ ),表明该方法重复性良好。

2.2.6 稳定性试验 取供试品溶液,分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定,记录峰面积,计算峰面积的 RSD 为 1.62% ( $n=6$ ),表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.7 加样回收率试验 取空白阳离子脂质体 1 mL,于 10 mL 量瓶,加 0.1 mg/mL VRB 对照品溶液 1 mL,甲醇定容制成质控样品溶液,重复 6 次,进样测定,记录峰面积,计算平均加样回收率为 99.00% (RSD 为 1.10%,  $n=6$ )。

### 2.3 包封率的测定

取 Sephadex G-50 2.0 g,于 PBS 中浸泡 24 h,湿法装柱(10 cm×1.5 cm)备用。取 WGA-VRB 阳离子脂质体 0.5 mL,置于凝胶柱上方,以 1.0 mL/min 流速用 PBS 洗脱,收集乳光部分加 PBS 定容混匀。取 WGA-VRB 阳离子脂质体 0.5 mL,加 PBS 定容至相同体积混匀。按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,重复 3 次,计算包封率(%) =  $(W_{后}/W_{前}) \times 100\%$ ,式中  $W_{后}$  和  $W_{前}$  分别为过柱后和过柱前脂质体中 VRB 的含量。

### 2.4 优化脂质体处方

根据单因素考察结果和文献[10],依据星点设计-响应面法设计原理选择对阳离子脂质体包封率影响较大的3个因素即DC-Chol用量( $X_1$ )、胆固醇用量( $X_2$ )、VRB用量( $X_3$ )为因素,以包封率( $Y$ )为指标,固定处方量为5 mL、磷脂为22 mg,确定各因素的用量范围为: $X_1$  4~12 mg, $X_2$  4~12 mg, $X_3$  0.2~0.6 mg,并分别设立3个水平设计试验。因素与水平见表1,星点设计与结果见表2。

表1 因素与水平(处方量为5 mL)

Tab 1 Factors and levels (formulation amount is 5 mL)

因素	水平		
	-1	0	1
$X_1$ ,mg	4	8	12
$X_2$ ,mg	4	8	12
$X_3$ ,mg	0.2	0.4	0.6

表2 星点设计与结果

Tab 2 Central composite design and results

序号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$Y$ , %
1	0	0	0	72.43
2	0	1	-1	92.43
3	1	0	1	66.07
4	0	0	0	75.00
5	-1	0	1	80.93
6	0	0	0	76.80
7	-1	-1	0	24.02
8	1	1	0	96.22
9	1	-1	0	18.75
10	0	-1	1	49.47
11	0	0	0	75.80
12	0	0	0	71.27
13	0	1	1	83.08
14	1	0	-1	66.56
15	-1	1	0	74.19
16	0	-1	1	6.60
17	-1	0	-1	85.00

将表2中数据输入Design-Expert 8.0.6.1软件,拟合方程为 $Y=21.3200-2.2669X_1+18.9738X_2-178.0375X_3+0.4266X_1X_2+1.1188X_1X_3+10.4750X_2X_3-0.1319X_1^2-1.1784X_2^2+62.2500X_3^2$ ( $R=0.9703, P<0.05$ ),说明模型能够很好地反映响应值的变化,可用于分析和预测WGA-VRB阳离子脂质体的最优处方。对上述拟合模型进行显著性检验,结果显示, $X_2$ 和 $X_2^2$ 对 $Y$ 有显著影响( $P<0.01$ ); $X_1, X_3, X_1X_2, X_2X_3, X_1X_3$ 对 $Y$ 没有显著影响( $P>0.05$ )。固定一个因素的水平为0,使用Design-Expert 8.0.6.1软件生成其他因素对包封率的响应面图和等高线图,响应面图见图1,等高线图见图2。

从图1和图2可以看出,3个因素间没有明显的交互作用,在磷脂固定不变的情况下 $X_1$ 和 $X_3$ 对 $Y$ 的影响不大,但 $X_2$ 对 $Y$ 有显著影响。因此结合实验室脂质体处方考察经验及脂质体制备的实际要求和脂质体性状,确定最优处方为磷脂22 mg、DC-Chol 8 mg、胆固醇12 mg、VRB 0.5 mg,处方量为5 mL。根据最优处方制备3批

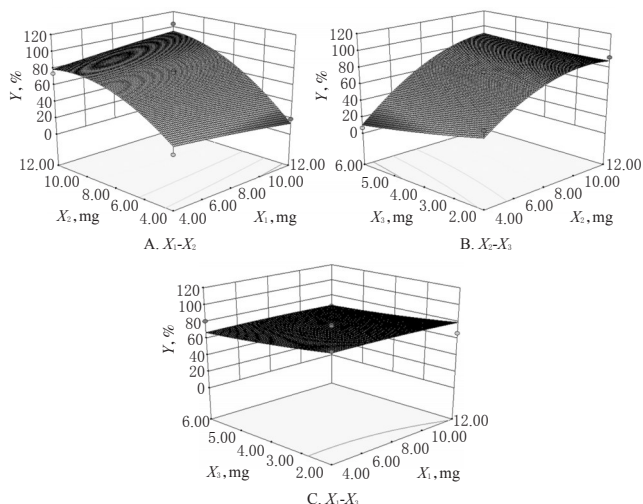


图1 各因素对包封率的响应面图

Fig 1 Response surface plot of each factor on encapsulation rate

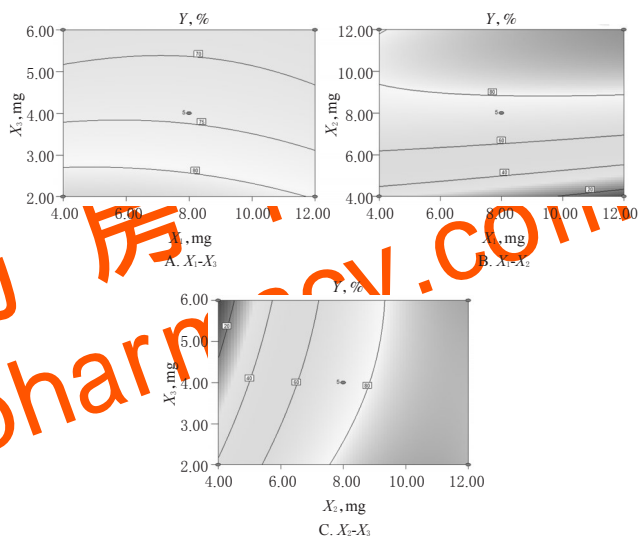


图2 各因素对包封率的等高线图

Fig 2 Contour map of each factor on encapsulation rate

WGA-VRB阳离子脂质体,测定包封率。结果显示,3批样品的包封率为 $(92.24 \pm 1.21)\%$ ,其与预测值 $(87.56\%)$ 的相对误差为5.3%。表明该处方合理,方法可行。

## 2.5 脂质体中VRB的含量比较

2.5.1 脂质体的制备 按最优处方,根据“2.1”项下方法制备WGA-VRB阳离子脂质体,同法制备,不含DC-Chol和WGA的VRB脂质体。

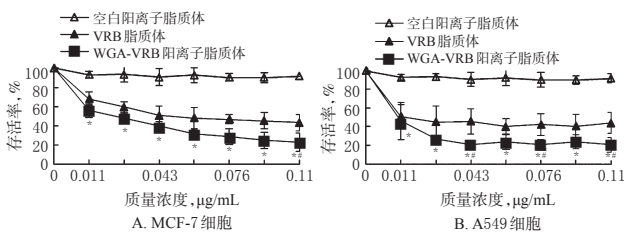
2.5.2 VRB的含量测定 分别测定WGA-VRB阳离子脂质体和VRB脂质体中VRB的含量,各3批。结果显示,WGA-VRB阳离子脂质体和VRB脂质体中VRB的含量分别为 $(93.39 \pm 1.59)$ 、 $(96.01 \pm 3.26) \mu\text{g/mL}$ ( $n=3$ )。

## 2.6 脂质体的细胞毒性试验

2.6.1 细胞培养 MCF-7细胞和A549细胞常规培养于

RPMI 1640 培养液(含 10% FBS、100 μg/mL 青-链霉素)培养液中,于 5% CO<sub>2</sub> 的 37 °C 培养箱中培养。

2.6.2 细胞存活率的测定 收集对数生长期 MCF-7 细胞和 A549 细胞(约 2×10<sup>4</sup> 个/孔)接种于 96 孔培养板中,于培养箱中培养 24 h。分别加入 0(空白对照)、0.011、0.027、0.043、0.059、0.076、0.092、0.110 μg/mL WGA-VRB 阳离子脂质体或 VRB 脂质体,以空白阳离子脂质体为对照,继续培养 48 h。采用 SRB 法<sup>[11]</sup>测定细胞存活率,细胞存活率(%)=药物处理后的光密度值/空白对照的光密度值×100%。结果显示,与空白阳离子脂质体和 VRB 脂质体比较,WGA-VRB 阳离子脂质体作用后细胞的存活率明显降低( $P < 0.05$ )。3 种脂质体作用后 MCF-7、A549 细胞存活率结果见图 3。



注:与空白阳离子脂质体比较,\* $P < 0.05$ ;与 VRB 脂质体比较,\* $P < 0.05$

Note: vs. blank cationic liposomes, \* $P < 0.05$ ; vs. VRB liposomes, \* $P < 0.05$

图 3 3 种脂质体作用后 MCF-7、A549 细胞存活率结果比较

Fig 3 Comparison of survival rate of MCF-7 and A549 cells after treated with 3 kinds of liposomes

### 3 讨论

星点设计-响应面法是目前常用的将数学和统计学相融合的试验设计方法,将星点设计应用于脂质体处方优选的研究也不断增多。脂质体研究中常常将膜材用量比例作为研究指标,本试验在传统脂质体处方基础上,固定磷脂量,以胆固醇、DC-Chol、VRB 用量为因素,脂质体包封率为指标优化了脂质体处方,最终确定制备 WGA-VRB 阳离子脂质体(5 mL)的最优处方为磷脂 22 mg、DC-Chol 8 mg、胆固醇 12 mg、VRB 0.5 mg。2015 年版《中国药典》有关脂质体包封率的要求为 80% 以上<sup>[12]</sup>,经验证该阳离子脂质体最终处方的平均包封率为(92.24 ± 1.21)% ( $n = 3$ )。结果表明,该阳离子脂质体处方符合要求,并为该阳离子脂质体的进一步研究奠定了基础。

VRB 对肿瘤有较好的临床治疗效果,因毒副作用大,常将其制备成靶向制剂。脂质体是由磷脂和胆固醇组成的类细胞膜结构,因其具有可与细胞膜融合、体内可降解的特点被广泛用于靶向给药系统。脂质体作为一种安全稳定的载体形式,多用于基因靶向治疗的研究中<sup>[13]</sup>。本课题在此基础上引入阳离子材料,利用药物与

细胞膜表面负电荷的静电吸附作用,增加其靶向性效果<sup>[14]</sup>。WGA 可与肿瘤细胞表面的特定受体相结合,因此引入 WGA 修饰于脂质体表面。最终制备了理论上具有双重靶向治疗作用的 WGA-VRB 阳离子脂质体。通过细胞存活率的比较,评价了 VRB 脂质体和 WGA-VRB 阳离子脂质体对 MCF-7、A549 细胞的影响,结果显示,WGA-VRB 阳离子脂质体对 MCF-7、A549 细胞存活的抑制作用强于 VRB 脂质体。

### 参考文献

- [1] 段晓颖,贾庆涵,刘丽娜.苦参碱纳米粒及其麦胚凝集素修饰产物的制备[J].中成药,2017,39(1):55-60.
- [2] 何文,胡翠苹,郭成希.N-三甲基壳聚糖包覆水飞蓟宾脂质体在小鼠体内的药动学及靶向性[J].中国医院药学杂志,2016,36(3):196-200.
- [3] 喻樊,杨锦明,李金娟.PEG 修饰β-谷甾醇制备新型胶束蓝总皂苷长循环脂质体的研究[J].中国中药杂志,2014,39(6):997-1001.
- [4] 袁端锋,宗太丽,高会乐.穿膜肽 TAT 和脑肿瘤靶向肽 T7 双修饰脂质体的制备和体外靶向性评价[J].药学学报,2015,50(1):104-110.
- [5] 吴迪,赵颖,任会丹.等.阳离子抗癌肽 Temporin-1CEa 脂质体的构建及其体外抗乳腺癌活性评价[J].中国生化药物杂志,2016,36(11):22-26.
- [6] 陈伟光,刘源岗,王士斌.等.阳离子脂质体共载 siRNA 与紫杉醇的制备与性能表征[J].科学通报,2013,58(11):1014-1020.
- [7] 马一平.异长春花碱抑制人乳腺癌细胞转移侵袭的作用及其机制[J].中草药,2013,44(13):1786-1792.
- [8] 王艳红,王晓敏,刘爽.星点设计-响应面法优化 WGA 修饰柔红霉素-粉防己碱脂质体处方[J].食品与药品,2016,18(4):229-234.
- [9] 杨雯妹,邱利焱,金一.RP-HPLC 法测定脂质体中重酒石酸长春瑞滨的含量[J].药物分析杂志,2006,26(5):646-648.
- [10] 姜英,王晓敏,王艳红.星点设计-效应面法优化转铁蛋白修饰粉防己碱与硫酸长春新碱脂质体的处方[J].中国药房,2015,26(31):4399-4401.
- [11] SHI JF, SUN MG, LI XY, et al. A combination of targeted sunitinib liposomes and targeted vinorelbine liposomes for treating invasive breast cancer[J]. Journal of Biomedical Nanotechnology, 2015, 11(9): 1568-1582.
- [12] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S]. 2015 年版.北京:中国医药科技出版社,2015:371-374.
- [13] 赵铁男,刘安,付莹.等.阳离子脂质体基因载体的稳定性研究[J].大连民族大学学报,2017,19(3):202-206.
- [14] 陈伟光,刘源岗,王士斌.等.阳离子脂质体共载基因与化疗药物用于癌症治疗的研究进展[J].药学学报,2012,47(8):986-992.

(收稿日期:2017-08-29 修回日期:2017-11-09)

(编辑:邹丽娟)