

## 抗肿瘤药物长循环高分子脂质体的研究\*

王生<sup>1)\*\*</sup> 王化泉<sup>2)\*\*</sup> 王汉杰<sup>1)</sup> 苏文雅<sup>1)</sup> 王亮亮<sup>1)</sup>

彭瑶<sup>1)</sup> 韩磊<sup>2)\*\*\*</sup> 常津<sup>1)\*\*\*</sup>

(<sup>1)</sup>天津大学材料学院纳米生物技术研究所, 天津 300072; (<sup>2)</sup>天津医科大学总医院, 天津 300052)

**摘要** 脂质体作为一种药物基因载体已得到广泛应用, 然而其仍然具有物理化学稳定性差、易发生团聚、难以多功能化等缺点. 通过使用合成的双亲性高分子共轭亚油酸修饰聚赖氨酸(PC)代替小分子磷脂制备的高分子脂质体(PLs), 不仅保留了脂质体的优势, 并且克服了上述缺点; 通过对高分子进行聚乙二醇(PEG)修饰, 可使制备的高分子脂质体具有长循环性. 结果表明, 高分子脂质体粒径为纳米级, 具有药物缓释性能、较低的细胞毒性及较高的细胞内吞效率.

**关键词** 抗肿瘤, 药物载体, 高分子脂质体, 聚赖氨酸, 共轭亚油酸

**学科分类号** Q5, Q7

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2013.00180

脂质体是由胆固醇和双亲性小分子磷脂组成的双分子层所形成的囊泡包裹药物而形成的制剂, 可作为载体包载亲水性或疏水性药物. 由于其具有生物相容性好、制备工艺简单、药物包封率高等优点, 受到研究者的广泛关注<sup>[1-2]</sup>. 但是由于其自身存在无法克服的缺陷, 如粒径偏大、稳定性差、药物易渗漏、难以功能化等, 从而严重限制了脂质体技术的进一步应用. 目前, 针对传统脂质体稳定性差的缺点, 国内外学者已采用多种方法加以改善, 如采用二氧化硅分子层包壳<sup>[3]</sup>、采用高分子物质替代小分子磷脂<sup>[4]</sup>等.

聚赖氨酸(PLL)是由赖氨酸单体聚合而形成的一种阳离子聚合物, 由于其具有生物降解性、降解产物无毒、多官能团等优点, 广泛应用于药物载体系统<sup>[5-8]</sup>. 然而, 由于聚赖氨酸具有优异的亲水性, 使其自身难以单独用于制备载体, 并且由于其高密度的氨基造成较高的正电性, 对细胞毒性较大. 共轭亚油酸(CLA)是一种疏水性的天然不饱和脂肪酸, 广泛存在于各种食物及人体组织中, 对人体无任何毒副作用. 并且, 一些研究表明, 快速生长的肿瘤细胞需要大量的营养物质, 比如脂肪酸, 因此共轭亚油酸会在一定程度上起到靶向肿瘤细胞的作用<sup>[9]</sup>. 另外, 研究表明共轭亚油酸会对肿瘤区域新血管的生成起抑制作用, 从而可间接地抑制肿瘤细

胞的快速生长与扩散<sup>[10-13]</sup>.

为改进传统脂质体的粒径大、稳定性差、难以多功能化等缺陷, 采用自主合成的双亲性高分子共轭亚油酸修饰聚赖氨酸(PC)代替小分子磷脂, 通过脂质体制备技术制备出高分子脂质体(PLs). 这种高分子脂质体保留了脂质体的特性, 如囊泡结构、高包封率等, 并且充分利用了聚赖氨酸与共轭亚油酸的优点. 聚赖氨酸主链为大分子, 具有亲水性, 并且提供大量的官能团, 易于改性. 共轭亚油酸的引入使高分子具有双亲性, 可通过脂质体制备技术制备成高分子脂质体, 并且消耗了聚赖氨酸主链上的部分氨基, 进而降低了由正电性造成的细胞毒性. 另外, 将亲水性长链聚乙二醇(PEG)接在高分子上, 可使制备的高分子脂质体不易被人体网状内皮系统捕捉, 增加了其体内长循环性<sup>[14]</sup>.

\* 国家高技术研究发展计划(863)(2012AA022603), 高等学校博士学科点专项科研基金(20120032110027)和国家自然科学基金(51373117)资助项目, 天津市自然科学基金重点项目(13JCZDJC33200).

\*\* 共同第一作者.

\*\*\* 通讯联系人.

常津. Tel/Fax: 022-27401821, E-mail: jinchang@tju.edu.cn

韩磊. Tel/Fax: 022-60362662, E-mail: superhanlei@hotmail.com

收稿日期: 2013-04-25, 接受日期: 2013-08-19

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

聚赖氨酸盐酸盐(PLL, 分子质量 10 000~15 000)购自桂林多肽技术有限公司; 共轭亚油酸(CLA)购自青岛澳海生物技术有限公司; 端羟基聚乙二醇(mPEG, 分子质量 2000)、苾、三乙胺购自 Sigma 公司; 1-(3- 二甲基氨基丙基)-3- 乙基碳二酰亚胺盐酸盐(EDC·HCl)与 N- 羟基琥珀酰亚胺(NHS)购自上海吉尔生化公司. LN229 细胞由天津医科大学总医院神经外科研究所馈赠.

### 1.2 PC 与聚乙二醇修饰 PC(PPC)的合成

PC 的合成路线如图 1a 所示. 首先将 160 mg

CLA 溶解在 20 ml 乙醇中, 加入 EDC·HCl 200 mg, NHS 200 mg, 室温搅拌 30 min. 然后加入 2 ml 溶解有 200 mg PLL 的水溶液与 0.5 ml 三乙胺, 在氩气保护下室温避光反应 6 h. 反应结束后, 将反应液加入到 500 ml 乙醚中沉淀, 抽滤收集产物, 真空干燥保存.

对于 PPC 的合成, 首先依照参考文献将 mPEG 进行羧基化改性, 使其一端带有羧基<sup>[15]</sup>, 并用 NHS 活化. 然后按图 1b 的路线进行合成. 20 mg PC 溶于 10 ml 去离子水, 100 mg PEG-NHS 溶于 5 ml 二甲基亚砜, 氩气保护下室温避光反应 24 h. 反应结束后以截留分子质量 3500 的透析袋放在去离子水中透析 48 h, 之后冻干并真空保存.

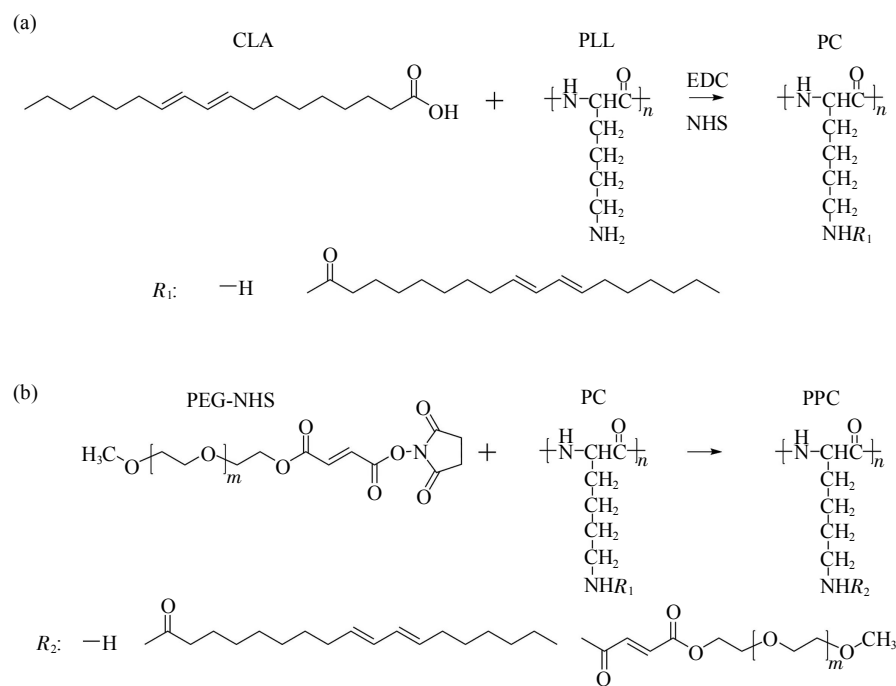


Fig. 1 Synthetic route of PC (a) and PPC (b)

### 1.3 PPC 的理化特性表征

**1.3.1 核磁共振光谱分析.** 使用 JEOLGX 400 D 光谱仪在 400 MHz 条件下室温测试.

**1.3.2 临界聚集浓度(CAC)的测定.** 采用苾探针法进行测定, 测试步骤如下<sup>[16]</sup>: 将苾溶于四氢呋喃, 取一定量溶液加入到离心管中, 并使四氢呋喃挥发干净, 加入 3 ml 不同浓度的 PPC 水溶液 (0~2.0 g/L), 使苾的最终浓度为  $6 \times 10^{-7}$  mol/L; 将溶液在室温条件下保存 24 h, 然后采用荧光分光光度计测量其荧光光谱. 测试条件如下: 激发波长

339 nm, 激发狭缝 5 nm, 发射狭缝 2.5 nm, 扫描速度 240 nm/min, 扫描范围 360~500 nm.

### 1.4 高分子脂质体的制备

采用反相蒸发法制备高分子脂质体, 制备步骤如下: 取 8 mg PPC 与 2 mg 胆固醇, 溶于 2 ml 二氯甲烷中, 形成油相, 在探头式超声波粉碎仪 200 W 超声功率下, 加入到 4 ml 去离子水中, 继续超声 2 min. 然后使用旋转蒸发器于 37℃ 下将二氯甲烷蒸发出, 即得高分子脂质体溶液.

对于包载表阿霉素的高分子脂质体的制备, 先

将 0.5 mg 表阿霉素溶于 0.5 ml 去离子水中, 在超声条件下加入到油相中形成初乳液, 然后将初乳液加入到外水相中超声, 其他条件同上。

### 1.5 高分子脂质体理化性能表征

**1.5.1 粒径与 Zeta 电位测试.** 采用动态光散射对高分子脂质体的粒径、多分散指数、Zeta 电位进行测试, 每个样品重复测试 3 次。

**1.5.2 形貌表征.** 采用透射电镜对高分子脂质体的形貌进行表征。样品经 2% 磷钨酸进行负染后观测。

**1.5.3 包封率与载药率的测定.** 通过过柱分离的方法将载药高分子脂质体与未载药的游离药物分离, 通过紫外分光光度计于 480 nm 处测定吸光度, 计算高分子脂质体的包封率与载药率。

### 1.6 体外药物释放

取 2 ml 包载表阿霉素的高分子脂质体放置于截留分子质量为 3500 的透析袋中, 并将透析袋封口后放置于 10 ml 的 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 中, 在 37°C 条件下置于摇床震荡。在特定时间取出 5 ml PBS 缓冲液, 于 480 nm 波长测试其吸光度, 并补加相同体积的 PBS 缓冲液。根据所测吸光度与标准曲线计算得到药物释放率。本实验采用相同浓度的表阿霉素与聚赖氨酸混合溶液作为对照组。

### 1.7 高分子脂质体细胞毒性测试

采用 MTT 比色法对高分子脂质体的细胞毒性进行测试。步骤如下: 取人胶质瘤细胞 LN229, 经胰蛋白酶消化后形成单细胞悬浮液, 调整细胞浓度

为 40 000 个 /ml; 向 96 孔板每孔加入 100  $\mu$ l, 在 37°C、5% 二氧化碳培养箱中培养 24 h; 加入 100  $\mu$ l 含有不同浓度待测物质的培养基, 继续培养 48 h; 每孔加入 20  $\mu$ l 浓度为 0.5 g/L 的噻唑蓝 (MTT) 水溶液, 孵育 4 h; 吸除孔内培养基, 并向每孔加入 200  $\mu$ l 二甲基亚砜, 置于摇床震荡 20 min; 用酶联免疫检测仪在 570 nm 波长处, 以空白管调零, 测定各孔的吸光值, 以空白细胞为 100% 存活计算存活率。

### 1.8 细胞内吞实验

取 LN229 细胞培养于 24 孔板, 细胞密度为 30 000 个 / 孔, 在 37°C、5% 二氧化碳条件下培养 24 h。然后将样品加入到培养体系中, 通过载药率测试结果调节表阿霉素浓度均为 5 mg/L。培养 2 h 后, 除去培养基, 用 PBS 洗 2 次, 用荧光显微镜观测细胞内红色荧光, 红色荧光越强, 表明越多的药物被投递进入细胞; 将细胞消化下来, 离心, 用 PBS 洗 2 次, 用流式细胞仪测试。

## 2 结果与分析

### 2.1 PC 与 PPC 的结构表征

通过核磁共振光谱分析来表征所合成高分子的结构, PLL、CLA、PC 与 PPC 的核磁共振谱图如图 2 所示。对比图 2a, b, c 可发现合成的 PC 同时出现了  $\delta = 1.22 \sim 1.72$ 、0.96、5.30~6.50 的峰, 证明合成成功, 通过核磁积分面积计算可知 CLA 的

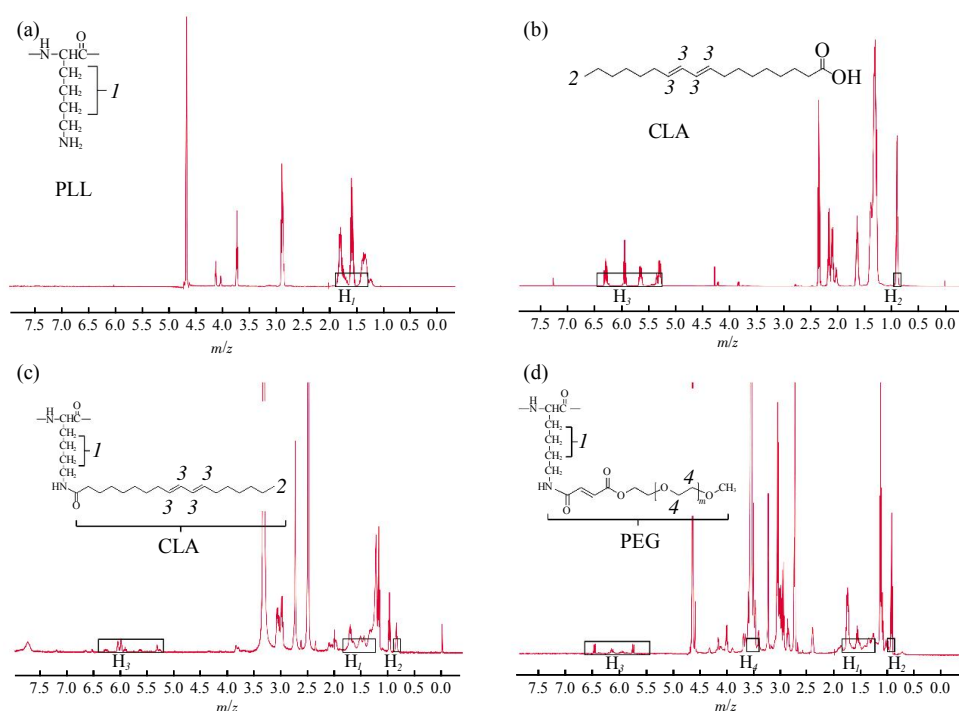


Fig. 2  $^1\text{H-NMR}$  spectra of PLL (a), CLA (b), PC (c) and PPC (d)

接枝率大概为 34.2%，而图 2d 中  $\delta = 3.56$  处峰的出现证明成功将 PEG 接到了 PC 分子链上，且接枝率约为 15.7%。

### 2.2 CAC 的测定

PPC 在水中的自聚集行为通过芘荧光探针法测定。芘的荧光发射光谱在 360~460 nm 之间呈现五重峰，通常以第一发射峰和第三发射峰的比值 ( $I_{372}/I_{383}$ ) 变化来描述溶液中的自聚集行为。图 3 为不同高分子浓度时的比值变化，其中两条直线交点所

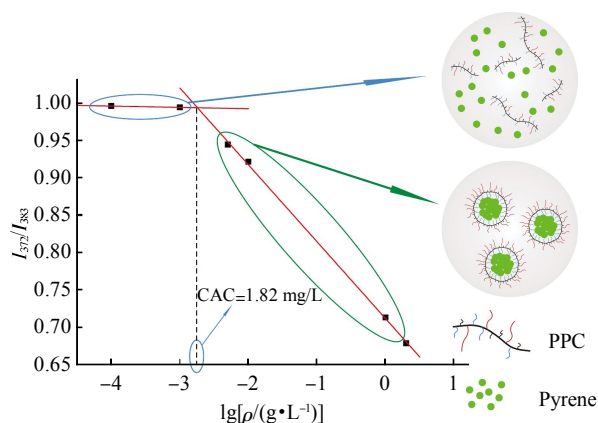


Fig. 3 The change of intensity ratio ( $I_{372}/I_{383}$ ) versus the concentration of PPC values

对应的浓度值即为 PPC 的 CAC 值，由图中可得测定的 CAC 值为 1.82 mg/L。结果表明，合成的高分子具有双亲性，可在水中发生自组装行为。

### 2.3 高分子脂质体性能表征

图 4a 示高分子脂质体的组装过程示意图，图 4b 示所制备的高分子脂质体的透射电镜照片，由图中可以看到制备的高分子脂质体呈球形，具有类似于传统脂质体的核壳层状结构，粒径在 50 nm 左右，较均匀。通过动态光散射测得的高分子脂质体的粒径与 Zeta 电位如图 4c, d 所示，结果显示高分子脂质体的水合粒径为  $(202.6 \pm 2.5)$  nm，多分散指数为 0.196，Zeta 电位为  $(14.54 \pm 0.44)$  mV。封装率与载药率测试结果显示，制备的高分子脂质体对药物的封装率高达 81.35%，载药率为 4.07%，可用作药物载体。

### 2.4 体外药物释放

可控的药物释放可提高药物利用率并降低药物毒副作用。高分子脂质体的药物释放行为在 37°C 恒温条件下的 PBS 缓冲液中测得，释放曲线如图 5 所示。由图中可得，表阿霉素与聚赖氨酸混合溶液在 8 h 内几乎释放完全，而高分子脂质体在前 8 h 内的药物释放率仅为 58.9%，总体释放时间可达 30 h，证明高分子脂质体包载药物可实现药物缓释。

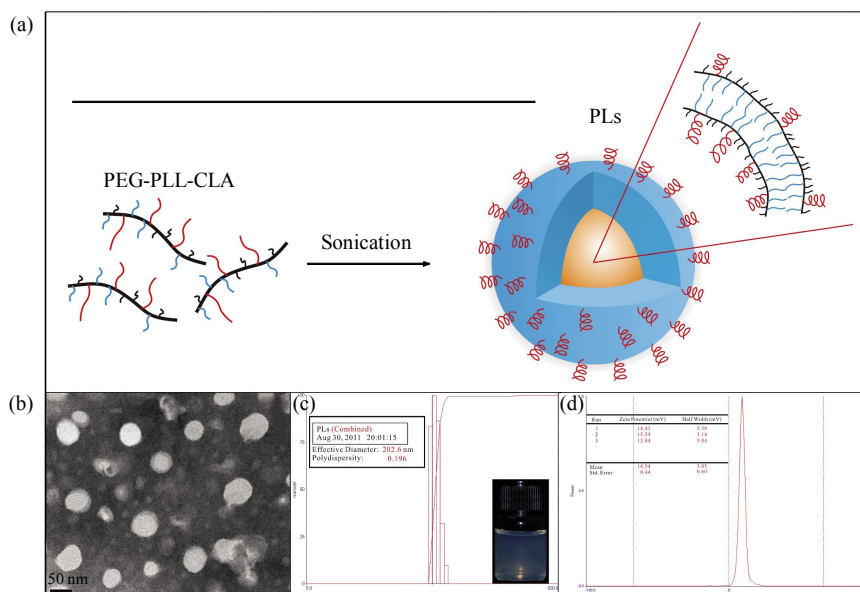


Fig. 4 Synthesis and characterizations of PLs

(a) Schematic representation of the PPC and the self-assembled PLs. (b) A TEM image of the PLs. (c) The effective diameter and size distribution of the PLs. (d) The zeta potential of the PLs.

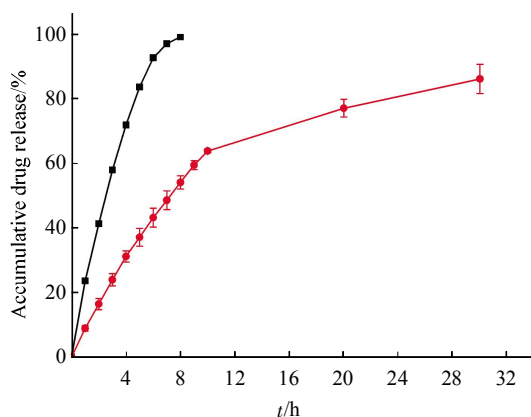


Fig. 5 *In vitro* release behavior of EPI from PLs in PBS solution (pH 7.4) at 37°C

■—■: EPI-PLL; ●—●: EPI-PLs.

## 2.5 细胞毒性分析

用 MTT 比色法测定高分子脂质体对 LN229 细胞的细胞毒性, 高分子脂质体的浓度范围设定为 250~1250 mg/L, 本实验采用 PLL 作为对照组. 测定结果如图 6 所示, 在浓度低于 750 mg/L 时, 高分子脂质体未表现出明显的细胞毒性, 证明所制备的高分子脂质体具有较高的生物安全性; 当浓度介于 750~1250 mg/L 时, 随着浓度增大, 细胞毒性升高, 但高分子脂质体的细胞毒性仍显著低于 PLL 的毒性, 是由于接枝反应消耗了 PLL 分子链上的部分氨基, 进而降低了正电性, 从而使其具有更低的细胞毒性.

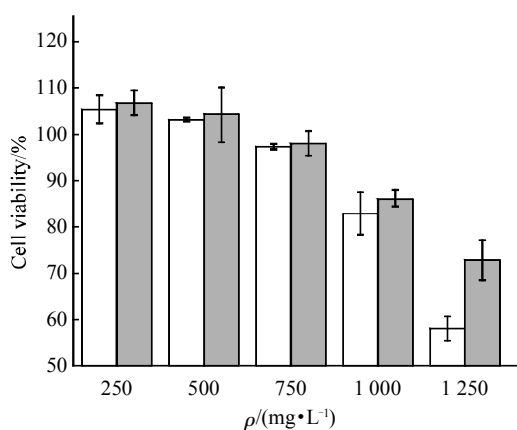


Fig. 6 Cytotoxicity of PLL and PLs against LN229 cells *in vitro*

□: PLL; ■: PLs.

## 2.6 高分子脂质体的细胞内吞实验

使用荧光显微镜及流式细胞仪观测了包载表阿霉素的高分子脂质体的细胞内吞行为. 图 7 示空白对照、表阿霉素-PLL 混合溶液与包载药物的高分子脂质体的荧光显微镜和流式细胞仪的观测结果. 结果表明, 包载表阿霉素的高分子脂质体具有较高的细胞内吞效率, 可能是由于高分子脂质体表面带有较低的正电性, 使其通过静电作用更易于通过细胞内吞作用包载药物进入细胞.

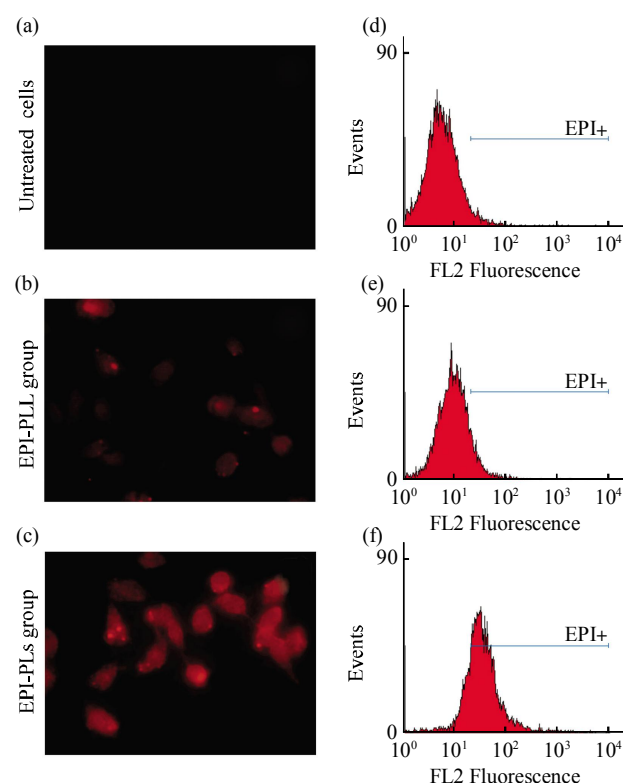


Fig. 7 Fluorescent microscopic images of LN229 cells incubated with the samples

(a) Untreated group, (b) EPI-PLL group, (c) EPI-PLs group and flow cytometry of the samples, (d) Untreated group, (e) EPI-PLL group, (f) EPI-PLs group.

## 3 讨 论

实验结果表明, 成功地将共轭亚油酸及聚乙二醇接到了聚赖氨酸主链上, 合成的高分子具有双亲性, 可通过脂质体制备技术制备成高分子脂质体. 高分子脂质体具有类似于传统脂质体的结构, 且粒径在 50 nm 左右, 粒径均匀, 因此可充分利用肿瘤组织的增强渗透和保留(EPR)效应, 达到被动靶向肿瘤组织的目的. 高分子脂质体表面带有微弱的正

电性,在不造成较高细胞毒性的同时,可通过静电吸附使其更易被细胞内吞,细胞毒性实验与细胞内吞实验的结果也都证明了上述结论.

上述结果表明,所制备的高分子脂质体在保留了传统脂质体特性的基础上,在一定程度上改善了传统脂质体的缺点,且具有药物缓释性能、低细胞毒性和较高的细胞内吞效率,有望作为一种药物载体应用于肿瘤治疗领域.

### 参 考 文 献

- [1] Lian T, Ho R J Y. Trends and developments in liposome drug delivery systems. *J Pharmaceutical Sciences*, 2001, **90**(6): 667-680
- [2] Kamaly N, Miller A D. Paramagnetic liposome nanoparticles for cellular and tumour imaging. *International J Molecular Sciences*, 2010, **11**(4): 1759-1776
- [3] Yue X L, Jing Y M, Dai Z F. Liposomal cerasome: a nanohybrid of liposome and silica. *Asia-Pacific J Chemical Engineering*, 2011, **6**(4): 569-574
- [4] Wang H J, Zhao P Q, Liang X F, *et al.* Folate-PEG coated cationic modified chitosan-cholesterol liposomes for tumor-targeted drug delivery. *Biomaterials*, 2010, **31**(14): 4129-4138
- [5] Arihiro Kano, Kenji Moriyama, Takeshi Yamano, *et al.* Grafting of poly(ethylene glycol) to poly-lysine augments its lifetime in blood circulation and accumulation in tumors without loss of the ability to associate with siRNA. *J Controlled Release*, 2011, **149**(1): 2-7
- [6] Jeong J H, Park T G. Poly(L-lysine)-g-poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) micelles for low cytotoxic biodegradable gene delivery carriers. *J Controlled Release*, 2002, **82**(1): 159-166
- [7] Wang K, Dong H Q, Wen H Y, *et al.* Novel vesicles self-assembled from amphiphilic star-armed PEG/polypeptide hybrid copolymers for drug delivery. *Macromolecular Bioscience*, 2011, **11**(1): 65-71
- [8] Kouichi S, Kumi K, Takuya M. Preparation and *in vivo* imaging of PEG-poly(L-lysine)-based polymeric micelle MRI contrast agents. *J Controlled Release*, 2009, **136**(1): 14-20
- [9] Leonard A S, David E B, Robert T D. Dietary factors and growth and metabolism in experimental tumors. *J Nutritional Biochemistry*, 2007, **18**(10): 637-649
- [10] Masso-Welch P A, Zangani D, Ip C, *et al.* Isomers of conjugated linoleic acid differ in their effects on angiogenesis and survival of mouse mammary adipose vasculature. *J Nutrition*, 2004, **134**(2): 299-307
- [11] Kelley N S, Hubbard N E, Erickson K L. Conjugated linoleic acid isomers and cancer. *J Nutrition*, 2007, **137**(12): 2599-2607
- [12] Ke X Y, Zhao B J, Zhao X, *et al.* The therapeutic efficacy of conjugated linoleic acid e Paclitaxel on glioma in the rat. *Biomaterials*, 2010, **31**(22): 5855-5864
- [13] Guo D D, Xu C X, Quan J S, *et al.* Synergistic anti-tumor activity of paclitaxel-incorporated conjugated linoleic acid-coupled poloxamer thermosensitive hydrogel *in vitro* and *in vivo*. *Biomaterials*, 2009, **30**(27): 4777-4785
- [14] Lacasse F X, Filion M C, Phillips N C, *et al.* Influence of surface properties at biodegradable microsphere surfaces: effects on plasma protein adsorption and phagocytosis. *Pharmaceutical Research*, 1998, **15**(2): 312-317
- [15] Mao S R, Shuai X T, Unger F, *et al.* Synthesis, characterization and cytotoxicity of poly(ethylene glycol)-graft-trimethyl chitosan block copolymers. *Biomaterials*, 2005, **26**(32): 6343-6356
- [16] Zhang J X, Qiu L Y, Zhu K J, *et al.* Thermally responsive polymeric micelles self-assembled by poly (N-isopropylacrylamide) grafted polyphosphazene: synthesis, characterization and *in vitro* drug release study. *J Biomedical Materials Research Part A*, 2006, **76**(4): 773-780

## The Research of Anti-Tumor Drugs Long Circulating Polymeric Liposomes\*

WANG Sheng<sup>1\*\*</sup>, WANG Hua-Quan<sup>2\*\*</sup>, WANG Han-Jie<sup>1</sup>, SU Wen-Ya<sup>1</sup>,  
WANG Liang-Liang<sup>1</sup>, PENG Yao<sup>1</sup>, HAN Lei<sup>2\*\*\*</sup>, CHANG Jin<sup>1\*\*\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Nanobiotechnology, School of Materials Science and Engineering, Tianjin University  
and Tianjin Key Laboratory of Composites and Functional Materials, Tianjin 300072, China;

<sup>2</sup> Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China)

**Abstract** Recently, liposomes have gained attention as a promising tool for drug and gene delivery. However, their applications have been constrained by their poor stability, aggregation and difficult to functional. Using amphiphilic conjugated linoleic acid modified polylysine (PC) and cholesterol, we developed a novel polymeric liposomes (PLs). These PLs retained the advantages of conventional liposomes (CLs), and overcome the above disadvantages of CLs. In addition, PEG chains coated on the PLs surface can prolong their circulation time in the blood. These results suggest that the PLs were nano-sized, achieved a sustained release of drugs, showed limited cytotoxicity and increased uptake in LN229 glioblastoma cells.

**Key words** anti-tumor, drug delivery system, polymeric liposomes, polylysine, conjugated linoleic acid

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2013.00180

---

\*This work was supported by grants from National High Technology Program of China (2012AA022603), Doctoral Base Foundation of Educational Ministry of China (20120032110027), National Natural Science Foundation of China (51373117) and Key Project of Tianjing Natural Science Foundation (13JCZDJC33200).

\*\*These authors contributed equally to this work.

\*\*\*Corresponding author.

CHANG Jin. Tel/Fax: 022-27401821, E-mail: jinchang@tju.edu.cn

HAN Lei. Tel/Fax: 022-60362662, E-mail: superhanlei@hotmail.com

Received: April 25, 2013 Accepted: August 19, 2013