

青蒿琥酯mPEG-PLGA纳米粒的制备及其对K562细胞的凋亡作用

许娜¹, 王霜², 杜庆锋¹, 许露露¹, 张进芳¹, 李国峰³, 刘晓力¹

(¹南方医科大学南方医院血液科, 广州 510515; ²湘潭市中心医院儿科, 湘潭 411100; ³南方医科大学南方医院药理学部, 广州 510095)

摘要:目的: 探讨负载青蒿琥酯的聚乙二醇单甲醚-聚乳酸-乙醇酸亲性嵌段共聚物(mPEG-PLGA)纳米粒的制备工艺及其对人白血病K562细胞的生长抑制作用。方法: 采用改良的自乳化法制备青蒿琥酯mPEG-PLGA纳米粒(Art-Nps), 应用扫描电镜表征纳米粒的形态; 激光散射粒度测定仪测其粒径分布及Zeta电位; 高效液相色谱法测定Art-Nps的载药量、包封率和体外释放样品; MTT法及Hoechst染色观察其对人白血病K562细胞的增殖及促凋亡作用。结果: Art-Nps为类球形实体粒子, 表面光滑, 平均粒径为(156.70±1.01) nm, Zeta电位为-(26.23±1.86) mV, 平均载药量为(14.51±0.20)%, 平均包封率为(86.51±0.50)%, 体外释放规律符合Higuchi方程: $Q=4.11t^{1/2}+27.05$, $R^2=0.98$ 。MTT法显示Art-Nps抑制K562细胞增殖呈时间-剂量依赖性, 且作用72h后抑制率超过青蒿琥酯处理组, 具有缓释作用; 经不同浓度Art-Nps培养K562细胞48h后可见细胞数量明显减少, 细胞大小不一, 形态不规则, 高倍镜可见细胞核固缩、凝集, 并有凋亡小体, 且随着浓度增加凋亡小体增多。结论: 本研究所制Art-Nps具有粒径小、高载药量及包封率的特点, 体外实验证明其可诱导人白血病K562细胞凋亡, 且具有缓释作用, 延长了药物对白血病细胞的作用时间, 本研究为开发青蒿琥酯新剂型提供了实验依据。

关键词: 青蒿琥酯; 聚乙二醇单甲醚-聚乳酸-乙醇酸亲性嵌段共聚物; 纳米粒; K562细胞

基金资助: 国家自然科学基金面上项目(No.30973421-C171003)

Study on preparation of Artesunate-loaded mPEG-PLGA-nanoparticles and its inhibition on K562 cells

XU Na¹, WANG Shuang², DU Qing-feng¹, XU Lu-lu¹, ZHANG Jin-fang¹, LI Guo-feng³, LIU Xiao-li¹

(¹Department of Hematology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; ²Pediatrics Department, Central Hospital of Xiangtan, Xiangtan 411100, China; ³Department of Pharmacy, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510095, China)

Abstract: Objective: To investigate the characterization of Artesunate-loaded methoxy poly (ethylene glycol) -poly (lactic-co- glycolic acid) copolymer (mPEG-PLGA) nanoparticles and the anti-tumoral activity of the Art-Nps on human leukemia k562. Methods: The Artesunate (Art) poly (ethylene glycol-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles were prepared by modified-Spontaneous emulsion solvent diffusion method. The shape of the nanoparticles was observed by SEM. The mean diameter and the size distribution of nanoparticles were determined by laser light scattering. The drug loading efficiency, encapsulation rate and releasing behavior of Art -Nps in vitro were examined by HPLC. The effects of Art-Nps on the proliferation of K562 cells were studied by MTT assay and Hoechst staining. Results: Artesunate loaded mPEG-PLGA nanoparticles were spheric with the mean size of (156.70±1.01)nm, zeta potential was -(26.23±1.86)mV, and the average drug loading and encapsulation efficiency were (14.51±0.20)% and (86.51±0.50)%, respectively. In vitro release behavior could be described by the Higuchi equation: $Q=4.11t^{1/2}+27.05$, $R^2=0.98$ MTT assay showed different concentrations, different times of Art-Nps could inhibit the proliferation of K562 cells, and both have a synergistic effect, it showed that concentration was dependent with time, and the inhibition rate after 72h was exceeded to the the control group, it was showed the Art-Nps had sustained-release effect. Art-Nps of the cells (treated by 12.5, 25, 50µg/mL) resulted in significantly higher apoptosis than blank groups. Conclusion: The Art-Nps obtained

were characted with a small size and high drug loading and entrapment efficiency, in vitro release showed a good sustained-release nature, and it can inhibit the proliferation of human leukemia K562 cells in vitro, extending the time on leukemia cells. This study was provide an experimental basis for develop a new intravenous artesunate formulations.

Key words: Artesunate ; mPEG-PLGA ; Nanoparticles ; K562 cell

Fund assistance: National Natural Science Foundation of China (No.30973421-C171003)

青蒿琥酯 (artemisinin, Art) 是我国自主开发研制的具有倍半萜结构的青蒿素类抗疟特效药, 近年研究发现其对白血病、直肠结肠癌、口腔癌等多种肿瘤都具有较强的抑制作用, 尤其是对白血病细胞具有高度敏感性^[1], 美国国家癌症研究所已将其纳入抗癌药物筛选与抗癌活性研究计划中。但Art可引起外周血网织红细胞降低及致畸等毒副作用, 并且半衰期只有30min, 生物利用度低, 为了降低药物的毒性, 延长药物的半衰期, 提高生物利用度, 减少给药次数, 本研究将其制成生物降解的纳米粒 (nanoparticles, Nps)。实验选用生物相容性好且可生物降解的聚乙二醇单甲醚-聚乳酸-乙醇酸亲性嵌段共聚物 (mPEG-PLGA) 为载体, 利用自乳化法制备 Art-mPEG-PLGA 纳米粒, 对其理化性质进行考究, 并以青蒿琥酯为对照, 研究载药纳米粒溶剂对白血病K562细胞的生长抑制及促凋亡作用, 旨在探讨青蒿琥酯新剂型在抗白血病效用上的价值。

材料

1. 材料 青蒿琥酯 (广西桂林南药股份有限公司, 批号: 091129-6); 聚乙二醇单甲醚-聚乳酸-乙醇酸嵌段共聚物 (mPEG-PLGA, mPEG 分子量5 000, 占4%, PEG/PLGA=50/50, PLGA分子量15 000, 山东济南岱罡生物技术有限公司); 青蒿琥酯对照品 (中国生物制品检验所); 泊洛沙姆F-68、噻唑兰 (MTT)、二甲基亚砜 (DMSO) (均为美国Sigma公司); 透析膜 (截留分子量14 000); 小牛血清 (杭州四季青公司); PRM-1640培养基 (美国Gibco公司); 其他试剂均为分析纯。

2. 仪器 Rotavapor R-114旋转蒸发仪 (瑞士BUCHI公司); CL-2型磁力搅拌器 (河南巩义市予华仪器有限公司); Zeta-sizer 3 000HS激光散射粒度测定仪 (英国马尔文公司); TMP电子天平 (德国Satorius公司); 离心机 (美国THERMO LEGEND); xw-80A型涡旋振荡器 (江苏海门林贝仪器有限公司); JSM-6330F型扫描电镜 (日本电子株式会社); WATERS 600E-2487型高效液相色谱仪 (美国Waters Corporation); 冷冻干燥机 (美国LABCONCO FreeZone 12L); 溶出仪器 (德国HTY-EU802)。

方法

1. 青蒿琥酯mPEG-PLGA纳米粒的制备^[2] 采用

自乳化法制备青蒿琥酯mPEG-PLGA纳米粒。称取青蒿琥酯粉末10mg和mPEG-PLGA 50mg溶于850 μ L丙酮和150 μ L无水乙醇中, 待完全溶解后, 将油相缓慢滴加到中速磁力搅拌中的10mL 0.1%的泊洛沙姆F-68水溶液中, 室温反应5h, 再将上述溶液减压旋转蒸发至有机溶剂完全挥发, 最后0.22 μ m滤膜过滤得到纳米胶体溶液。该溶液于4 超速离心 (20 000r/min) 0.5h, 沉淀加蒸馏水洗涤, 同法再离心洗涤3次, 冷冻干燥, 即得青蒿琥酯mPEG-PLGA纳米粒。

2. 纳米粒径、跨距测定及形态学观察 取少量洗涤后的青蒿琥酯纳米粒, 稀释后溶液呈淡蓝色乳光。使用激光散射粒度测定仪测定纳米粒的粒径分布及Zeta电位。在扫描电镜下观察纳米粒形态。

3. 纳米粒的载药量和包封率测定 采用高效液相色谱法 (HPLC) 测定。色谱条件如下: 色谱柱: ECOSIL C₁₈ 色谱柱 (150mm \times 4.6mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈:0.02mol/L 硫酸铵溶液:12%三乙胺溶液 (60:40:0.2, 稀氨水调pH值至4.5); 流速: 1.0mL/min; 柱温: 室温; 检测波长: 210nm。

称取10mg青蒿琥酯标准品, 乙腈定容于10mL容量瓶中, 得1 000 μ g/mL青蒿琥酯储备液。制备浓度为25、50、100、200、300、400、500 μ g/mL的青蒿琥酯标准液。20 μ L进样, 以峰面积Y对青蒿琥酯标准品浓度X (mg/L) 回归得青蒿琥酯在25-500 μ g/mL范围内标准方程: $Y=579.44X-14814$ ($R^2=0.998$)。青蒿琥酯的保留时间是 (8.57 \pm 0.12) min。日内RSD 2.60%, 日间RSD 5%。低、中、高浓度平均回收率为99.5%, RSD=2.55% ($n=5$); 空白纳米粒不影响HPLC测定。

取适量冻干纳米粒10mg于5mL离心管中, 加入0.5mL二氯甲烷, 超声完全溶解后再加入2.5mL乙腈, 涡旋10min, 8 000r/min离心10min。取上清液进样20 μ L。测定峰面积, 代入标准曲线计算青蒿琥酯浓度。载药量为纳米粒中青蒿琥酯的含量除以纳米粒的重量, 取3份平均值; 包封率由载药量与理论载药量比值求得。

4. 纳米粒体外释放 称取青蒿琥酯mPEG-PLGA纳米粒1mg, 混悬于pH值7.4的磷酸盐缓冲液 (PBS) 中, 超声分散后在37 和转速 (75 \pm 5) r/min 条件下于0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、24、30、48、72、96、120h时取1mL PBS溶液, 超速离心取上清

液,同时补加等量新鲜同温PBS,涡旋倒回原溶液。HPLC检测离心上清液中的药物含量。色谱条件同“3.”项。

5. 细胞培养及药物处理 采用MTT比色法检测细胞存活率。人白血病细胞株K562购自中国医学科学院血液学研究所,将细胞置于含10%小牛血清的PRM-1640培养基中,37℃、5%CO₂常规培养。选择对数生长期细胞,调整细胞为 5×10^5 接种于96孔培养板中,置于37℃、5%CO₂培养箱中培养,每孔200 μL,实验组分别给予终浓度为12.5、25、50、100 μg/mL的青蒿琥酯纳米粒和青蒿琥酯溶液,同时设立二甲基亚砜(DMSO)和RPMI-1640液对照,每个浓度设3个复孔,分别于24、48、72h,每孔加入20 μL MTT溶液(5g/L),孵育4h,弃上清,加入DMSO终止反应,微振荡后,用酶标光度计在波长570nm时测定每空的吸光度(A)值并计算各组的细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率=(1-实验组A/对照组A)×100%。

6. Hoechst33342染色观察经处理后细胞的形态变化 取对数生长期细胞,制备不同细胞密度的悬液,接种细胞至24孔板,置细胞培养箱24h后,按实验设计要求分别加入浓度为12.5、25、50、100 μg/mL Art-Nps(每个浓度设3个复孔,终体积1mL/孔)后继续培养。根据实验设计的要求,在药物作用的不同时间后取出,加入Hoechst33342,终浓度为10 μg/mL,闭光染色15min,倒置荧光显微镜下观察细胞形态变化。

7. 统计学方法 实验所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS 13.0软件进行统计学分析,MTT法采用重复测量方差分析及单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1. 青蒿琥酯纳米粒的形态及粒径 所制的青蒿琥酯mPEG-PLGA纳米粒胶体溶液外观呈淡蓝色乳光。激光散射测定结果显示,纳米粒表面带负电,Zeta电位是 $- (26.23 \pm 1.86) \text{ mV}$ 。粒径分布较窄,且基本呈正态分布,平均粒径是 $(156.70 \pm 1.01) \text{ nm}$,多分散指数平均为0.08,见图1。扫描电镜显示,纳米为类球形,表明光滑,大小均匀,粒子间基本无粘连,见图2。

2. 青蒿琥酯纳米粒的载药量和包封率 重复制备3批青蒿琥酯纳米粒,测得平均载药量为 $(14.51 \pm 0.20) \%$,平均包封率为 $(86.51 \pm 0.50) \%$,重现性良好。

3. 青蒿琥酯纳米粒体外释放 青蒿琥酯mPEG-PLGA纳米粒体外累积释放曲线,见图3。模拟体内环

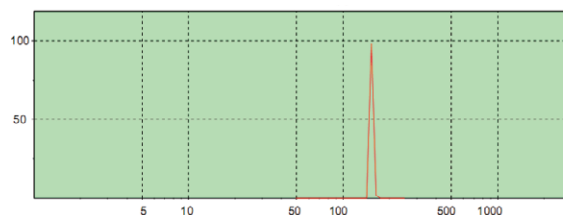


图1 青蒿琥酯纳米粒的粒径分布

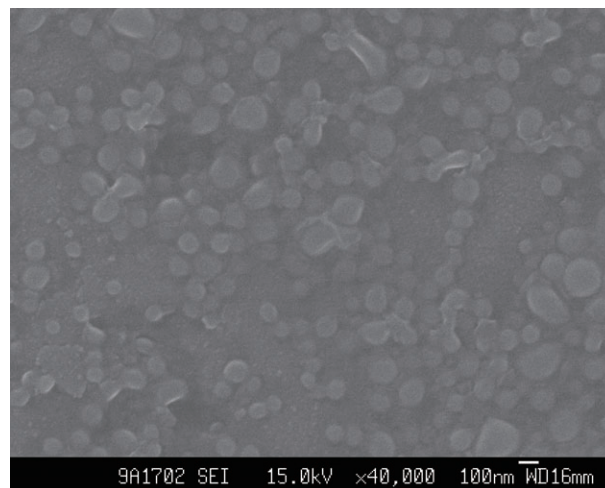


图2 青蒿琥酯纳米粒扫描电镜照片(×40 000)

境开始阶段有突释现象,释放5d后释放度达70%。以累积释放率和时间进行拟合,纳米的体外释放规律符合Higuchi方程: $Q=4.11t^{1/2}+27.05$, $R^2=0.98$ 。按其计算Art-Nps的释药半衰期为22.61h。Art-Nps体外累计释放曲线见图3。模拟体内环境开始24h,累积释放45%,50h之后进入一个相对平缓的释放过程,释放5d后释放度达70%。

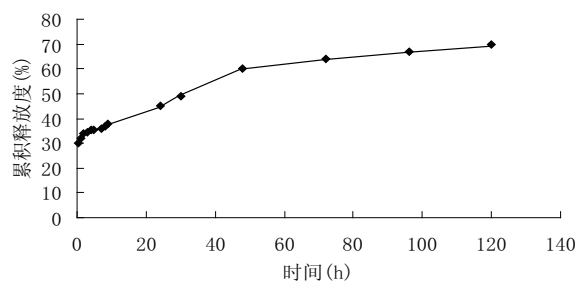


图3 青蒿琥酯mPEG-PLGA纳米粒体外释放曲线

4. 对K562白血病细胞生长的影响与不同药物的对比 见图4,表1。不同浓度青蒿琥酯纳米粒与K562细胞共同孵育后,细胞生长受到抑制,并呈剂量效应关系。重复测量方差分析、单因素方差分析结果显示,不同剂量($F=407.47$, $P=0.00$)、不同药物作用时间($F=1301.00$, $P=0.00$)对K562细胞的生长抑制均有显著差异,并且两者有显著的交互效应($F=6.93$, $P=0.00$),提示Art-Nps对K562细胞的生长抑制作用呈时间-剂量依赖。进一步LSD多重比较

表1 Art-Nps不同剂量及不同作用时间对K562细胞的增殖抑制率的比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

时间(h)	Art-Nps ($\mu\text{g/mL}$)				F值	P值
	12.5	25	50	100		
24	0.145±0.005	0.300±0.003	0.431±0.004	0.471±0.040	44.709	0.000
48	0.299±0.003	0.414±0.211	0.538±0.012	0.604±0.005	64.133	0.000
72	0.506±0.016	0.638±0.026	0.702±0.010	0.710±0.035	51.161	0.000
合计	0.317±0.003	0.451±0.002	0.557±0.002	0.595±0.012	407.469 [*]	0.000 [*]
F值	91.182	41.696	172.973	401.581	F=6.932 [#]	
P值	0.000	0.000	0.000	0.000	P=0.002 [#]	

注:主效应的F统计量和P值;#交互效应的F统计量和P值。药物作用时间主效应 $F=1301.003, P=0.000$,提示Art-Nps不同作用时间之间存在显著差异,进一步LSD多重比较:24h Vs 48h ($P=0.004$),24h Vs 72h ($P=0.000$),48h Vs 72h ($P=0.001$)。药物不同剂量主效应 $F=407.469, P=0.000$,提示Art-Nps不同剂量之间存在显著差异,进一步LSD多重比较:12.5 Vs 25 ($P=0.001$),12.5 Vs 50 ($P=0.000$),12.5 Vs 100 ($P=0.002$),25 Vs 50 ($P=0.001$),25 Vs 100 ($P=0.005$),50 Vs 100 ($P=0.102$)。

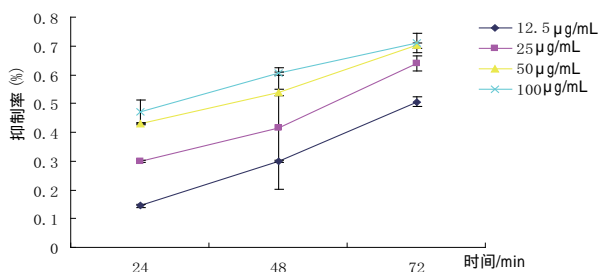
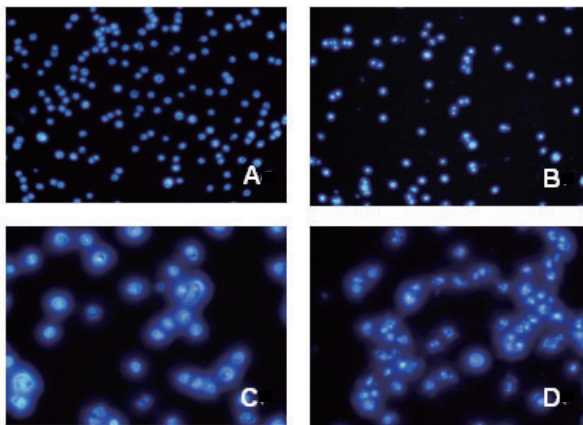


图4 Art-Nps不同剂量及不同作用时间对K562细胞生长抑制的影响

分析显示,在所有观察时间内,各Art-Nps浓度处理组(除50 $\mu\text{g/mL}$ 组与100 $\mu\text{g/mL}$ 组比较外)对K562细胞抑制率均有显著性差异($P<0.01$),提示Art-Nps剂量越大、作用时间越长,Art-Nps对K562细胞增殖抑制越明显。在所有观察时间内,50 $\mu\text{g/mL}$ 处理组与100 $\mu\text{g/mL}$ 处理组对K562细胞作用差异无统计学意义。

5. Hoechst染色观察Art-Nps作用后K562细胞形态的改变 见图5。空白对照组细胞生长良好、数量随生长时间增长而增多,细胞大小均匀、形态一致并呈圆形,高倍镜下可见细胞核呈弥漫均匀蓝色荧光。

图5 Hoechst33342染色观察不同浓度的Art-Nps作用K562细胞48h后细胞凋亡的形态学改变($\times 40$)

注:A.空白对照组;B.12.5 $\mu\text{g/mL}$ 组;C.25 $\mu\text{g/mL}$ 组;D.50 $\mu\text{g/mL}$ 组。

不同浓度(12.5、25、50 $\mu\text{g/mL}$)Art-Nps培养K562细胞48h后,均可见细胞数量明显减少,细胞大小不一,形态不规则,高倍镜可见细胞核固缩、凝集,并有凋亡小体,表现为明亮的颗粒状蓝染,随着浓度增加凋亡小体逐渐增多。

讨论

纳米技术的发展为生物医学提供了新的载药系统,已成为医药领域新的研究热点,目前国内外关于负载抗肿瘤药物的纳米微粒的研究甚多,抗肿瘤药物包括5-氟尿嘧啶、阿霉素、三氧化二砷、紫杉醇等,并取得了一定的成果。青蒿琥酯作为近几年新型抗癌药物正处于研究的热点,Zhang Z Y等^[3]报道青蒿琥酯联合化疗能提高中晚期非小细胞肺癌患者近期疾病控制率,延缓疾病进展,且安全性好;另外,Sieber S等^[4]报道青蒿琥酯可联合美罗华疗非霍奇金淋巴瘤,且二者具有协同作用,但是静脉注射Art后血药浓度很快下降,半衰期为30min左右,需反复给药,因此如何研制出具有抗肿瘤活性的青蒿琥酯缓释纳米粒成为研究的重点。

PLGA和mPEG是通过美国食品药品监督管理局可用于人体的两种可降解生物材料,目前常用于载药纳米粒制备,两者通过共价键或非共价键的作用组成了mPEG-PLGA两亲性嵌段共聚物,可有效地改善纳米粒的亲水性和降解性,延长纳米粒在体内的循环时间^[5],mPEG亲水性强,在共聚物中含量2%-5%时是抵抗蛋白吸附的临界值,可产生有效的立体稳定作用,形成一层或多层保护性的亲水性衣膜,阻止调理蛋白的吸附,从而达到减少吞噬的目的^[6],亲水性聚合物的分子链也可以自由摆动,在纳米粒表面形成类似电子云的保护层,较好地阻止调理蛋白对纳米的吸附。本实验使用的PLGA载体键合了4%PEG,

可以有效减少吞噬细胞的吞噬^[7],具有靶向性和缓释性,且PEG的免疫原性和抗原性极低,因此,使用PEG修饰纳米表面将会得到较好的结果,这也在本实验中得到了较好的验证。

本实验结果显示,青蒿琥酯裸药与载药纳米粒对人白血病细胞株K562的体外杀伤能力呈时间和剂量依赖关系。在所有观察时间内,细胞抑制率结果提示Art-Nps剂量越大、作用时间越长,Art-Nps对K562细胞增殖抑制越明显。纳米粒的胞吞性能及其在细胞中的分布与纳米粒的理化性能(如粒径大小、电荷和亲疏水性)、浓度、培养时间、温度和细胞系有关。一般说来,粒径越小越容易被细胞吞噬,带负电荷越大被表面带正电荷的细胞捕捉的可能性越大。通常增加纳米粒的浓度可以增加被胞吞的纳米粒的量,在达饱和浓度前,纳米粒的浓度加倍,被胞吞的粒子量也加倍,但是随着粒子浓度的不断增大,胞吞效率也会逐步降低。本研究中涉及Art-Nps浓度从50 μg/mL到100 μg/mL增大时抑制率差异无统计学意义,可能与细胞胞吞的效率下降有关。

Art-mPEG-PLGA-NP作为缓释剂,其药物释放从1-5d逐渐增加,发现在50h左右作为一个转折点,50h之前释放作用较快,50h之后随着时间的推移,则进入一个相对平缓的释放过程,这也符合本文中纳米粒在72h后抑制率超过对照组的实验结果。实验结果提示,Art-mPEG-PLGA-NP随着时间延长,通过不断释放青蒿琥酯,并维持在较高的浓度,从而延长青蒿琥酯对肿瘤细胞的有效作用时间。其原理是纳米粒在体外释放的初期,药物主要是在浓度梯度作用下释放,随着纳米的降解和融蚀,药物从孔道扩散至组织,随着降解的进行,纳米完全崩解,药物全部释放出来。本实验制备的纳米粒前24h有明显的突释,累积释放百分比为45%,可能是由于药物吸附在纳米粒表面或是小粒径的纳米迅速降解而使药物大量释放^[8]。

为达到较好的治疗效果,减少毒副作用及延长药物在体内作用时间,本研究首次尝试用可降解生

物聚合物将青蒿琥酯制成载药纳米粒并初步探讨其抑制白血病细胞生长的作用,并取得了较好的实验结果。研究表明,Art-mPEG-PLGA-NP作为缓释剂,在不影响Art生物活性的同时,可在较长时间内维持有效的抑癌浓度,从而为采用Art-mPEG-PLGA-NP进行抗肿瘤的靶向治疗提供了依据。

参 考 文 献

- [1] Efferth T. Willmar Schwabe Award 2006: antiplasmodial and antitumor activity of artemisinin - from bench to bedside. *Planta Med*, 2007, 73(4): 299-309
- [2] Anshu Yang, Lin Yang, Wei Liu, et al. Tumor necrosis factor alpha blocking peptide loaded PEG-PLGA nanoparticles: Preparation and in vitro evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 2007, 33(1): 123-132
- [3] Zhang Z Y, Yu S Q, Miao L Y, et al. Artesunate combined with vinorelbine plus cisplatin in treatment of advanced non-small cell lung cancer: a randomized controlled trial. *Journal of Chinese Integrative Medicine*, 2008, 6(2): 134-138
- [4] Sieber S, Gdynia G, Roth W, et al. Combination treatment of malignant B cells using the anti-CD20 antibody rituximab and the anti-malarial artesunate. *Int J Oncol*, 2009, 35(1): 149-158
- [5] Du J, Shi Q S, Sun Y, et al. Enhanced delivery of monomethoxypoly (ethylene glycol)-poly(lactic-co-glycolic acid)-poly L-lysine nanoparticles loading platelet-derived growth factor BB small interfering RNA by ultrasound and/or microbubbles to rat retinal pigment epithelium cells. *J Gene Med*, 2011, 13(6): 312-323
- [6] Wang H, Zhao Y, Wu Y, et al. Enhanced anti-tumor efficacy by co-delivery of doxorubicin and paclitaxel with amphiphilic methoxy PEG-PLGA copolymer nanoparticles. *Biomaterials*, 2011, 32(32): 8281-8290
- [7] Boennelycke M, Christensen L, Nielsen L F, et al. Tissue response to a new type of biomaterial implanted subcutaneously in rats. *Int Urogynecol J*, 2011, 22(2): 191-196
- [8] Peng K T, Chen C F, Chu I M, et al. Treatment of osteomyelitis with teicoplanin-encapsulated biodegradable thermosensitive hydrogel nanoparticles. *Biomaterials*, 2010, 31(19): 5227-5236

(收稿日期: 2011年7月10日)