

## RGD-FasL 羟乙基壳聚糖缓释纳米粒制备及生物学研究

刘彬<sup>1,3</sup>, 张晶<sup>2</sup>, 杨晶晶<sup>1</sup>, 黄小平<sup>1</sup>, 张敏萍<sup>1</sup>, 罗芳洪<sup>1</sup>, 庄国洪<sup>1</sup>

(1. 厦门大学医学院 抗癌中心, 福建 厦门 361005; 2. 厦门市第二医院 检验科, 福建 厦门 361024; 3. 汕头市卫生学校 药学教研室, 广东 汕头 515073)

**摘要:**目的 使用羟乙基壳聚糖制备纳米颗粒(NPs), 用来包载 RGD-FasL 融合蛋白(RF), 鉴定其功能并评估其在肝癌治疗中的作用。方法 采用离子凝胶法制备 RF 羟乙基壳聚糖缓释纳米粒(RF-NPs); 通过透射电镜、动态光散射法考察其理化性质; 用紫外分光光度计检测蛋白浓度来计算其载药率、包封率和体外释药度; 通过 MTT 比色法检测对 H22 细胞增殖活性的影响, 应用 H22 细胞建立小鼠肝癌模型进行体内抑瘤研究。结果 制备的 RF-NPs 呈球形或类球形, 平均粒径 198.3 nm, Zeta 电位 +25 mV, 包封率较高, 且具有缓释效果, 150 mg/L 浓度时对 H22 细胞抑制率大于 70%, 并能小鼠体内产生比较明显的抑瘤效果。结论 离子凝胶法制备 RF-NPs 的条件缓和、方法简单, 是癌症治疗中具有很好的前景的蛋白药物载体。

**关键词:** 纳米粒; RGD-FasL; H22

中图分类号: TQ460.6; R966 文献标识码: A 文章编号: 1005-4678(2012)06-0772-04

## Preparation and bioactivities assaying of RGD-FasL glycol chitosan based nanoparticles

LIU Bin<sup>1,3</sup>, ZHANG Jing<sup>2</sup>, YANG Jing-jing<sup>1</sup>, HUANG Xiao-ping<sup>1</sup>, ZHANG Min-pin<sup>1</sup>,  
LUO Fang-hong<sup>1</sup>, ZHUANG Guo-hong<sup>1</sup>

(1. Anti-Cancer Research Center, Medical School, Xiamen University, Xiamen 361005, China;  
2. The No. 2 Hospital of Xiamen City, Xiamen 361024, China; 3. Pharmacy Teaching and  
Researching Department, Shantou Health School, Shantou 515073, China)

**Abstract: Purpose** To prepare nanoparticles for encapsulating RGD-FasL with glycol chitosan and to evaluate the functions of nanoparticles and the roles in therapy for cancer of the liver. **Methods** RGD-FasL glycol chitosan based nanoparticles (RF-NPs) were prepared by ionic gelation method. The physicochemical properties were determined by the way of TEM and DLS. The release behaviour *in vitro* was determined. The encapsulation efficiency and loading rate of RF-NPs were examined with ultraviolet spectrophotometer. H22 Cell proliferative activity was examined by MTT. Anticancer effect of the H22 hepatoma model established in mice was evaluated. **Results** The obtained RF-NPs were approximately spherical in shape with average particle size of 198.3 nm Zeta potentials of +25 mV. When RF-NPs concentration was to 150 mg/L, its H22 tumor inhibitory rate can be over 70% *in vivo*. Also RF-NPs showed obvious tumor inhibiting effect and manifested sustained-release of RF *in vitro*. **Conclusion** RGD-FasL-NPs prepared by ionic gelation method was simple with mild preparing conditions and had the potential to make cancer therapy *in vivo* achievable.

**Key words:** nanoparticles; RGD-FasL; H22

**收稿日期:** 2012-07-03

**基金项目:** 福建省公益基金资助项目( NO. 2011R1039-2)

**作者简介:** 刘彬, 男, 硕士, E-mail: Binbinyouli689@qq.com; 张晶, 女, 硕士, 检验师, 主要从事肿瘤诊断, E-mail:

zhangjing\_98111@163.com; 庄国洪, 女, 通信作者, 博士, 副教授, 主要从事抗体工程和抗肿瘤方向研究, E-mail: zhuangguohong@yahoo.com.cn; 罗芳洪, 男, 通信作者, 在读博士, 主要从事药物纳米粒靶向抗肿瘤研究, E-mail: luofanghong@163.com.

目前,靶向抗新生血管生成的抗恶性肿瘤治疗因具有高效、无毒副作用、难耐药及广泛通用等优点已成为抗癌研究的热点<sup>[1]</sup>。其中,RGD肽(一类含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸序列的短肽)及其偶合物能够与一些肿瘤细胞或者肿瘤新生血管内皮细胞表面高表达的整合素受体结合抑制肿瘤迁移和肿瘤新血管生成,是一类很有前景的肿瘤治疗药物<sup>[2]</sup>。此前,本实验室所构建的RGD-FasL以整合素 $\alpha\beta3$ 为靶点,RGD肽为靶向载体,FasL蛋白为抗肿瘤效应分子,作为双靶向性抗肿瘤融合蛋白,并在抗癌研究中取得了较好的效果<sup>[3-6]</sup>。

然而,RGD-FasL融合蛋白(RF)在体内容易被代谢分解,影响了蛋白在肿瘤患处的作用效果,制成一种稳定高效的药物制剂成为一种需要。随着纳米技术的发展,纳米制剂能从肿瘤的内皮组织、血管中溢出而滞留在肿瘤内(EPR效应),肿瘤的血管壁对纳米粒有黏附性,由于自身具有的靶向和缓释的优点而逐渐引起了生物医学界广泛的关注<sup>[7-8]</sup>。本文以水溶性羟乙壳聚糖(GCS)为载体材料,采用离子凝胶法将RF进行包封,制备GCS纳米粒(NPs)药物载体(RF-NPs),初步考察其抑癌效果。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 药品、试剂及仪器

RF,本实验室制备,制备方法参见文献<sup>[3]</sup>。

GCS(相对分子质量为82.1 kD),Sigma公司;多聚磷酸钠(TPP,分析纯)、冰乙酸(分析纯),上海生工生物工程有限公司。

Model 3550 酶标仪,Bio-Rad 司;JEM2100HC 透射电子显微镜,日本电子株式会社。

### 1.2 动物及瘤株

雄性昆明小鼠48只,体重(20±2)g,厦门大学医学院实验动物中心,许可证号:SCXK(闽)2008-0001。

H22细胞系和腹水由厦门大学医学院实验动物中心保存。

### 1.3 RF-NPs 的制备

GCS适量溶于双蒸水中,用0.45 μm滤纸过滤,配制成质量浓度为2 mg/mL的溶液。TPP溶于双蒸水,配制成质量浓度为10 mg/mL的溶液。采用离子凝胶法,将1.0 mg/mL RF溶液与GCS溶液按1:4比例混合,用冰乙酸调节pH值至4.5,在持续磁力搅拌下,以20~40滴/min速度滴加TPP溶液,直至溶液呈现乳光为止,继续搅拌20 min,RF即包封于NPs中,得到RF-NPs。空白纳米粒(Blank

NPs)采用同样方法制备。

## 1.4 NPs 的理化性质

1.4.1 粒径、粒径分布 采用动态光散射法(DLLS 氩离子激光器,波长670 nm,25℃、动态光散射角90°)对NPs的粒径、粒径分布进行检测,平均粒径根据Stokes-Einstein公式进行计算。

1.4.2 NPs形态的观察 用铜网打捞样品溶液中的NPs,多余的液体用滤纸迅速吸去,置空气中自然干燥,于透射电镜下观察其形态。

1.4.3 包封率和载药量测定<sup>[9]</sup> 将新制备的NPs溶液于25℃,20 000 r/min离心30 min,沉淀冻干后称重,计算纳米粒浓度;上清液中的蛋白浓度,即为未被包封的RF浓度。蛋白浓度测定采用Bradford法,以Blank NPs离心后所得上清液为对照,每个样品重复4次。

包封率(%) = [(总蛋白量 - 游离蛋白量) / 总蛋白量] × 100%。载药量(%) = [(总蛋白量 - 游离蛋白量) / 纳米粒量] × 100%。

## 1.5 NPs 释放度检测<sup>[9]</sup>

将载RF-NPs溶液20 mL离心,弃上清液,加入磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4)20 mL后轻微振荡,在第2,4,8,16,24,48 h时取样500 μL,离心,测定蛋白浓度,同时向原样品补入PBS 500 μL,继续振荡,每个样品测定4次。计算释放度。

## 1.6 MTT 法检测对 H22 细胞增殖活性的影响<sup>[5]</sup>

取对数生长期的H22细胞,计数后以 $3 \times 10^5$ 个/mL,100 μL/孔接种于96孔培养板中,细胞培养过夜,试验组分别加入Blank NPs(终浓度为100,200,300,400 μg/mL),RF(终浓度为30,60,120,180 μg/mL),RF-NPs(终浓度为30,60,120,180 μg/mL);阴性对照组中仅加细胞不加药物,空白对照孔中不加药物和细胞,阳性对照组加入紫杉醇(终浓度为0.04 mg/L)。各组各浓度设5个平行孔,37℃培养24 h后加入5 mg/mL MTT溶液20 μL/孔,继续培养4 h,弃上清,每孔加入二甲亚砜200 μL振荡,用酶标仪测定在570 nm波长处的吸光度(A)值,实验重复3次,计算细胞抑制率。

## 1.7 肿瘤动物模型的建立及药物治疗

1.7.1 肿瘤动物模型的建立 取肝癌细胞H22,移植至40只9~12周龄的雄性昆明小鼠右腋旁(腋周毛已除尽),每只 $1 \times 10^6$ 个细胞(即0.1 mL)。待所有小鼠长出肿瘤后,随机将40只小鼠分成5组,每组8只:PBS组、RF组、RF-NPs组、Blank NPs组、环磷酰胺(CTX)组。

1.7.2 药物治疗及检测 RF、RF-NPs、Blank NPs 浓度为 0.2 mg/mL 按 200  $\mu$ L/只,CTX 按 100 mg/kg 腹腔注射给药,1 次/d,连续 10 d。给药后,每天称量小鼠的体重,记录小鼠体重的变化。自第 4 天给药开始每天观察肿瘤生长及小鼠存活状况,第 14 天观察结束,处死小鼠。根据肿瘤的部位、形状、大小、颜色以及与周围组织的关系,有无完整或不完整的包膜,取每只小鼠皮下肿瘤组织。

## 2 结果

### 2.1 NPs 的理化性质

在 pH 6.0 时,Blank NPs 和 RF-NPs 溶液呈胶体状,可见明显的乳光,透射电镜观察显示,所得 NPs 均呈较规则的球体或类球体,部分粒子相互聚合,见图 1。理化性质见表 1。

### 2.2 壳聚糖 NPs 适宜浓度测定

表 1 Blank NPs 和 RF-NPs 理化性质

Tab. 1 The physico-chemical properties of NPs and RF loaded NPs

| 样品       | 平均粒径/nm | 粒径分布指数 | Zeta 电位 | 载药率/%           | 包封率/%            |
|----------|---------|--------|---------|-----------------|------------------|
| 空白纳米粒    | 183.4   | 0.189  | +21.0   | -               | -                |
| RF 蛋白纳米粒 | 198.3   | 0.197  | +25.2   | 7.75 $\pm$ 0.29 | 78.94 $\pm$ 0.32 |

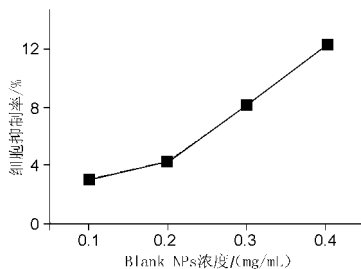


图 2 不同浓度 Blank NPs MTT 毒性试验结果

Fig. 2 Viability of mice hepatitis cell lines H22 in response to Blank NPs in MTT assay

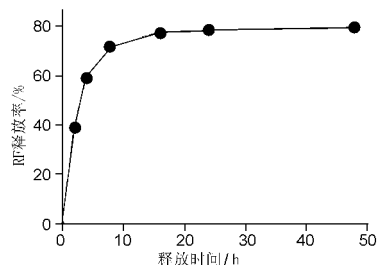


图 3 RF-NPs 的 RF 释放度检测

Fig. 3 RF release profiles from RF loaded nanoparticles

### 2.4 RF-NPs 对细胞的抑制效果

浓度为 30, 60, 120, 180 mg/L RF 和 RF-NPs 分别作用于 H22 细胞 24 h 后,通过 MTT 检测 RF 的抑制率分别为 31.52%, 41.97%, 65.17% 和 80.67%; RF-NPs 的抑制率分别为 39.77%, 63.55%, 78.21% 和 86.1%。相同浓度下,RF-NPs 对 H22 细胞的抑制率均略高于 RF; 紫杉醇对 H22 细胞的抑

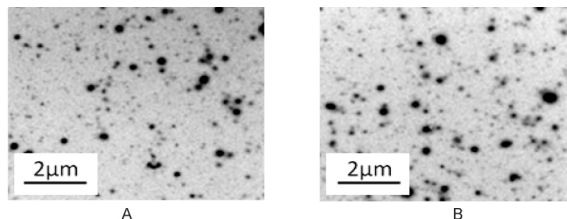


图 1 Blank NPs(A) 和 RF-NPs(B) 的透射电镜照片

Fig. 1 TEM imaging of Blank NPs(A) and RF loaded NPs(B)

结果见图 2。为确定壳聚糖 NPs 的适宜应用浓度,分别加入壳聚糖 NPs 作用于 H22 细胞,其抑制率分别为 3.04%, 4.28%, 8.12% 和 12.27%,紫杉醇对 H22 细胞抑制率达 67.74%。

### 2.3 RF-NPs 释放度的考察

结果见图 3。RF-NPs 2 h 时的释放为 38.94%, 8 h 时达到 71.78%, 随后缓慢持续释放,至 48 h 时达到 81.10%。

制率为 67.7%。

### 2.5 RF-NPs 的体内抑瘤作用

第 14 天处死小鼠,取肿瘤组织,称肿瘤重量。PBS 组和 Blank NPs 组的肿瘤重量分别为(3.96  $\pm$  0.55) 和(3.76  $\pm$  0.31) g,明显高于 RF 组的(2.58  $\pm$  0.36) g 和 RF-NPs 组的(2.11  $\pm$  0.26) g( $P < 0.05$ ); RF 组、RF-NPs 组的肿瘤重量与 CTX 组(1.95  $\pm$  0.49) g 相比,无显著性差异( $P > 0.05$ )。RF 组和 RF-NPs 组体重变化(实验结束时的体重 - 开始给药时的体重)分别为(11.28  $\pm$  3.39) 和(11.69  $\pm$  2.31) g,均显著高于 CTX 组的(7.00  $\pm$  2.54) g( $P < 0.05$ ),PBS 组和 Blank NPs 组的体重变化值分别为(14.45  $\pm$  2.52) 和(13.74  $\pm$  2.08) g。说明 RF-NPs 对肿瘤生长的抑制作用与环磷酰胺作用相近并且 RF-NPs 的毒性更小。

## 3 讨论

NPs 一般指由天然或合成的高分子材料制成的、粒度为纳米级的(1 ~ 1000 nm) 固态胶体微粒。靶向给药指运用载体将药物选择性地浓集定位于靶器官、靶组织或靶细胞,使其药物浓度高于其他正常组织。离子交联法主要通过 GCS 的阳离子基团与 TPP 的阴离子交联产生纳米粒,该方法操作简便,条件温和,产物均一可调,无需使用有机溶剂,避免了可能存在的潜在安全隐患。

本实验通过制得离子交联法的 Blank NPs 和 RF-NPs, 其粒径平均值分别为 183.4 nm 和 198.3 nm, 粒径分布指数分别为 0.189 和 0.197, 符合纳米级标准, Zeta 电位分别为 +21.0 mV 和 +25.2 mV, 结果均大于 +20 mV, 说明 NPs 较为稳定。通过释放度实验明确 2 h 时 RF 释放率为 38.94%, 并发生突释现象, 到 8 h 释放率为 71.78%, 并持续缓慢释放。Gan 等<sup>[9]</sup>认为初始阶段出现的突释可能是由于被包裹在 NPs 外围的蛋白从 NPs 上脱附, 之后由于 NPs 的溶解和降解, 使被包封在内部蛋白缓慢释放。

通过 MTT 检测发现, 在浓度 100 ~ 200 mg/L 时, NPs 的细胞死亡率小于 5%, 而浓度为 300 ~ 400 mg/L 时细胞的死亡率为 8.12% ~ 12.27%, 但细胞平均存活率均显著高于紫杉醇阳性对照组 ( $P < 0.05$ )。故选用 100 ~ 200 mg/L 浓度 RF 及 NPs 进行进一步研究。并且 H22 细胞对 RF 和 RF-NPs 呈剂量依赖性, 浓度为 30 ~ 180 mg/L 时 H22 细胞的生长抑制率分别为 39.8% ~ 86.1% 和 31.5% ~ 80.7%, 抑制效果接近, 说明 RF-NPs 与 RF 具有相同的作用效果, NPs 并未改变 RF 本身的活性。

采用昆明种小鼠建立 H22 肝癌模型, 结果显示连续给药 10 d 后, 与 RF 组的肿瘤重量相比, RF-NPs 组的肿瘤重量更低, 说明 RF-NPs 对肿瘤生长的抑制作用更明显, 与 CTX 组相比, RF-NPs 组小鼠肿瘤重量略高, 无显著性差异, 同时 RF 组和 RF-NPs 组体重增加值与 PBS 组和 Blank NPs 组相近, 均明显高于 CTX 组, 说明 RF-NPs 抑瘤作用与 CTX 相近

并且毒性更小。

我们将在以后的试验中通过优化纳米粒的制备条件, 例如 pH、GCS 与 TPP 的浓度等, 提高 NPs 的稳定性和释放效果, 以期待将其制成新型的纳米制剂, 并在肿瘤治疗中具有更好的应用前景。

#### 参考文献:

- [1] 朱正亚, 王可凡, 张华梁, 等. 肿瘤抗血管生成治疗的研究进展 [J]. 肿瘤基础与临床, 2011, 24(5): 444-447.
- [2] 安莲效, 李慧, 顾月清. RGD 肽作为药物靶向配体的研究进展 [J]. 中国生化药物杂志, 2010, 31(1): 66-69.
- [3] 苏金华, 李文珠, 庄国洪, 等. RGD-FasL 基因的构建、表达、纯化及其活性分析 [J]. 免疫学杂志, 2008, 24(6): 647-655.
- [4] 张佳锴, 程晓峰, 庄国洪, 等. Fas 胞外区基因的构建、表达、纯化及多克隆抗体的制备 [J]. 中国生化药物杂志, 2010, 31(1): 35-39.
- [5] 罗芳洪, 李文珠, 庄国洪, 等. 重组人 RGD-FasL 对三株胶质瘤细胞 U138/U343/U373 的活性分析 [J]. 免疫学杂志, 2009, 25(6): 680-684.
- [6] Liu Zhongchen, Wang Juan, Zhuang Guohong, et al. RGD-FasL induces apoptosis in hepatocellular carcinoma [J]. Cell Mol Immunol, 2009, 6(4): 285-293.
- [7] 李冰纯, 潘一峰. 制备条件对白蛋白纳米粒表征的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19(3): 1963-1965.
- [8] Nam H Y, Kwon S M, Chung H J, et al. Cellular uptake mechanism and intracellular fate of hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles [J]. J Controlled Release, 2009, 135(3): 259-267.
- [9] Gan Quan, Wang Tao. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2007, 59(1): 24-34.
- [10] Ferreira J L, Gómez-Hospital J A, Angiolillo D J. Platelet abnormalities in diabetes mellitus [J]. Diab Vasc Dis Res, 2010, 7(4): 251-259.
- [11] Alexandru N, Jardín I, Popov D, et al. Effect of homocysteine on calcium mobilisation and platelet function in type 2 diabetes mellitus [J]. J Cell Mol Med, 2008, 12(5B): 2015-2026.
- [12] Osende J I, Badimon J J, Fuster V, et al. Blood thrombogenicity in type 2 diabetes mellitus patients is associated with glycemic control [J]. J Am Coll Cardiol, 2001, 38(5): 1307-1312.
- [13] Jennings P E. Vascular benefits of gliclazide beyond glycemic control [J]. Metabolism, 2000, 49(10 Suppl 2): 17-20.
- [14] Ting H J, Khasawneh F T. Glybenclamide: An antidiabetic with *in vivo* antithrombotic activity [J]. Eu J Pharmacol, 2010, 649(1-3): 249-254.

(上接第 771 页)

- [6] Wu G Z, Hong G, Zhang W P, et al. Effect of 1-[4-(2-(4-Bromobenzene-sulfonamino) ethyl) phenylsulfonyl]-3-(trans-4-methylcyclohexyl) urea ( $I_4$ ), a new synthetic sulfonylurea compound, on glucose metabolism *in vivo* and *in vitro* [J]. Rzneimittelforschung, 2009, 59(11): 550-556.
- [7] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 571-572.
- [8] Nakahata N. Thromboxane A2: Physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology [J]. Pharmacol Ther, 2008, 118(1): 18-35.
- [9] Yamagishi S, Nakamura K, Imaizumi T. Advanced glycation end products (AGEs) and diabetic vascular complications [J]. Curr Diabetes Rev, 2005, 1(1): 93-106.