

叶酸靶向的 PGA联合 N-苯乙酰化阿霉素的抗肿瘤活性

张 奇, 项光亚*, 龙 娜, 林佳亮, 曾凡波

(华中科技大学 同济医学院 药学院, 湖北 武汉 430030)

摘要: 目的 考察叶酸靶向的青霉素酰化酶 G(PGA)联合前药 N-苯乙酰化阿霉素(DOXP)对叶酸受体阳性肿瘤细胞的活性。方法 通过双功能偶联剂 EDC将叶酸与 PGA偶联, 荧光显微镜观察 HeLa和 SKOV3细胞对叶酸-PGA的摄取, MTT法检测 DOXP联合叶酸-PGA对 HeLa和 SKOV3细胞的毒性。结果 叶酸-PGA能被 HeLa和 SKOV3细胞选择性摄取; DOXP在叶酸-PGA的作用下对 HeLa和 SKOV3细胞的 IC_{50} 分别为 0.72 和 0.75 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 均低于阿霉素。结论 叶酸-PGA的特异性靶向作用提高了阿霉素对 HeLa和 SKOV3细胞的敏感性。

关键词: 叶酸靶向; 青霉素酰化酶 G; 阿霉素; 抗肿瘤活性

中图分类号: R962 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2005)11 - 1046 - 05

Anticancer activity of N-(phenylacetyl) doxorubicin combined with folate-targeted PGA

ZHANG Qi, XIANG Guang-ya*, LONG Na, LIN Jia-liang, ZENG Fan-bo

(School of Pharmacy, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: **Aim** To demonstrate the specific killing of folate receptor (FR)-positive tumor cells can be achieved by folate-targeted penicillin-G amidase (PGA) combined with its prodrug substrate N-(phenylacetyl) doxorubicin (DOXP). **Methods** Folic acid was covalently linked to PGA and folate content value was determined by quantitative UV spectrophotometry. The ability of folate conjugated PGA to hydrolyze DOXP was measured by RP-HPLC. Visual demonstration of uptake by FR(+) HeLa and SKOV3 cells was detected by using FITC labeled folate-PGA and a fluorescence microscopy. The cytotoxicity of DOXP towards the cells in the presence or absence of folate-PGA was assayed by using MTT method. **Results** The folate-PGA has a specific activity of 29.8 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (protein). FR selectivity was confirmed by fluorescence microscopy. The combination of DOXP prodrug with folate-PGA generated higher cytotoxicity towards the FR(+) cells than free doxorubicin. The IC_{50} was 0.72 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for HeLa cells and 0.75 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for SKOV3 cells, respectively. Further, the enhanced cytotoxicity reduced greatly with the addition of free folic acid. **Conclusion** Folate conjugated PGA did not significantly compromise PGA catalytic activity and enabled binding prodrug-activating enzyme PGA to folate receptor expressing cells, and increased the sensitivity of the cells to doxorubicin followed by administration of its prodrug substrate.

Key words: folate-targeted; penicillin-G amidase; doxorubicin; antitumor activity

收稿日期: 2004-12-27.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30300430); 教育部回国留学人员启动基金资助项目(2003-406); 武汉市青年科技晨光计划资助项目(20015005042).

* 通讯作者 Tel: 86 - 27 - 67156611, Fax: 86 - 27 - 83692892, E-mail: youjiti@mails.tjmu.edu.cn

抗体靶向酶催化的前体药物治疗(ADEPT)是提高肿瘤化疗选择性的有效途径^[1,2]。该疗法利用抗体与抗原-酶与底物的双重选择性提高抗癌药物的靶向性,在降低毒性的同时增强抗癌活性。但由于抗体-酶交联体的分子量大且易产生免疫原性,使这种应用受到限制。与抗体相比,叶酸对叶酸受体

(FR)的亲合力(K_d 约 $0.1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)比单克隆抗体对肿瘤细胞表面的受体的亲合力强 100倍以上。且叶酸具有免疫原性低、易于修饰、体积小($M_r = 441.4$)、易穿透肿瘤、化学和生物稳定性高、成本低、易贮存等优点^[3,4]。因此本文以叶酸替代 ADEPT的抗体,将叶酸与前药活化酶青霉素酰化酶 G(PGA)偶联,利用叶酸对叶酸受体的特异性靶向作用,将 PGA靶向到 FR(+)肿瘤细胞,PGA催化水解 N-苯乙酰化阿霉素(DOXP)释放出活性的阿霉素(DOX)在靶细胞表面发挥细胞毒作用,从而提高阿霉素的抗肿瘤活性。

材料和方法

材料 FR(+)细胞:HeLa(人宫颈癌细胞株)和 SKOV3(人卵巢癌细胞株);FR(-)细胞:A549(人肺癌细胞株)由华中科技大学同济医学院附属同济医院馈赠。无叶酸的 RPMI-1640 培养基(Gibco)。青霉素酰化酶 G(PGA, M_r 约 70 000, $56 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),青霉素 G钾盐(PeniG-K),1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDC), FITC和 MTT均为 Sigma产品。BCA和无水 DMSO为 Pierce产品。Sephadex™ G-25(Amersham Biosciences)。乙腈和 GF₂₅₄薄层板为 Merck产品, cremophor EL(BASF),阿霉素(DOX,浙江海正药业提供),N-苯乙酰化阿霉素(DOXP,参考文献[5]制备)。756紫外分光光度计(北京瑞利仪器厂),Waters 600高效液相色谱仪,Olympus荧光显微镜(日本),Elx800酶标仪(美国)。

叶酸-PGA的制备^[6,7] 取适量叶酸溶于 DMSO中,加入 5倍量的 EDC,于 23℃暗处搅拌 1 h得叶酸活化酯。将 PGA加入到 30倍量的叶酸活化酯中,搅拌 30 min后用 G-25柱纯化。按 BCA法测定酶含量。根据叶酸在 363 nm处的摩尔吸收系数 6 197,计算叶酸与 PGA的偶联比约为 3~4。偶联酶的荧光标记参照文献[6]。按对二甲氨基苯甲醛法(PDAB)测定偶联酶的催化活力^[8]。

叶酸-PGA催化酶解 DOXP的 HPLC测定 将 DOXP溶解在 cremophor EL中,PBS稀释,37℃下与酶混合,振荡。每隔一段时间取样,乙腈稀释,离心,取上清液进样。流动相:乙腈-水,85%磷酸调节 pH为 2.4。梯度程序:0~3 min为 24%乙腈,3~15 min为 80%乙腈。检测波长:495 nm^[5]。流速:1 mL·min⁻¹。每次进样量 10 μL。色谱柱为 Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm)。

细胞试验 HeLa细胞,SKOV3细胞和 A549细胞在含 10%热灭活的胎牛血清(FCS)、100 μg·mL⁻¹链霉素和 2 mmol·L⁻¹L-谷氨酰胺的无叶酸 RPMI-1640培养基中贴壁培养 24 h(5% CO₂,37℃孵箱)。

叶酸-PGA的选择性摄取 叶酸-PGA,PGA或含 1 mmol·L⁻¹游离叶酸的叶酸-PGA与细胞培养 4 h,PBS洗涤,细胞固定,镜检,拍片。

MTT法检测 DOXP联合叶酸-PGA对细胞的毒性 分别加入 PGA, Folate-PGA, Folate-PGA + 1 mmol·L⁻¹游离叶酸于细胞孔内,每孔细胞数为 5×10^4 ,孵育 2 h,洗涤,加入 0.12, 0.24, 1.2, 2.4, 12和 24 μmol·L⁻¹ DOXP,37℃孵育 24 h,洗涤,继续培养 36 h后加 MTT的 PBS溶液孵育 2 h。以含 0.01 mol·L⁻¹ HCl的异丙醇裂解细胞,测吸收度 A_{570} 。

数据分析 实验数据采用 Origin 6.0 软件处理,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。显著性检验采用 *t*检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

结果

1 叶酸-PGA偶联酶的制备和催化活力的测定

叶酸与 PGA化学偶联物的洗脱曲线(图 1A)中的第 1个洗脱组分既有 280 nm的吸收又有 363 nm的叶酸特征吸收,因此对应为叶酸偶联的 PGA。第 2个洗脱组分对应的是未反应的叶酸活化酯或叶酸。物理混合物(图 1B)的第 1个洗脱组分只有 280 nm的吸收。此外,第 1洗脱组分的紫外扫描图显示,化学偶联物(图 2A)在 280 nm和 363 nm均有吸收,物理混合物(图 2B)只在 280 nm处有吸收。以上表明叶酸已成功与 PGA酶偶联。

以 PeniG-K为底物,采用 PDAB法测得叶酸偶联的 PGA的催化活力为 $29.8 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$,原酶为 $37 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。可见叶酸与酶偶联后仍可保留原酶约 80%的活力。原酶和偶联酶的动力学性质研究的结果也表明叶酸的修饰对 PGA的催化活性影响很小(数据另外报道)。利用 RP-HPLC, DOX和 DOXP的保留时间分别约为 5.5和 12.3 min。以 DOXP酶解产生的 DOX峰面积对时间作图(图 3)。与 PGA相比,叶酸偶联的 PGA水解 DOXP较慢,但 1 h后变化趋于一致,2 h内均能将前药完全水解。

2 叶酸-PGA的选择性摄取

如图 4所示,HeLa和 SKOV3细胞与 PGA 37℃培养 4 h后荧光很弱,而与叶酸-PGA培养后均可见

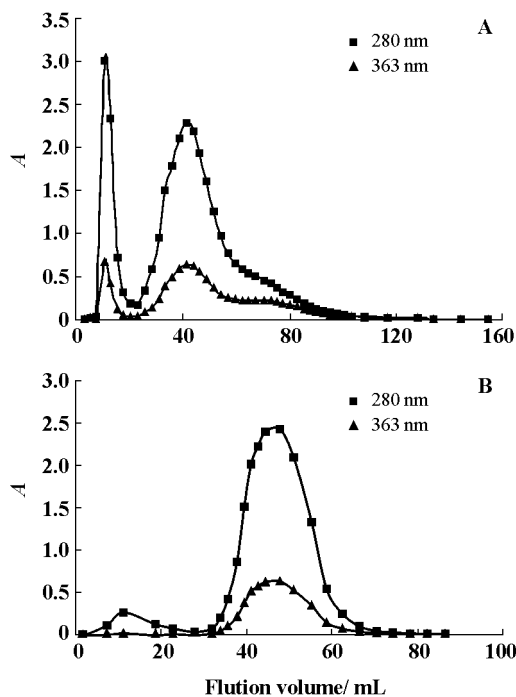


Figure 1 Chromatography of the folate-PGA conjugate (A) and mechanical mixture (B) on a sephadex G-25 column eluted with PBS buffer (pH 7.4)

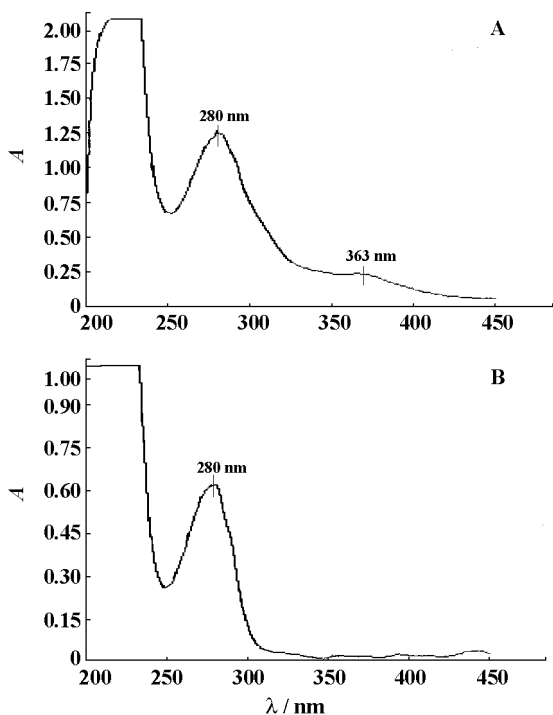


Figure 2 Absorbance spectrum of folate-PGA conjugate (A) and mechanical mixture (B)

明显的荧光,添加游离叶酸 ($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)后则荧光减弱。与 A549 细胞培养,偶联酶和原酶荧光均较弱。以上表明偶联比为 3~4 的叶酸-PGA 能较好地实现对 HeLa 和 SKOV3 细胞 [FR(+)] 的靶向输

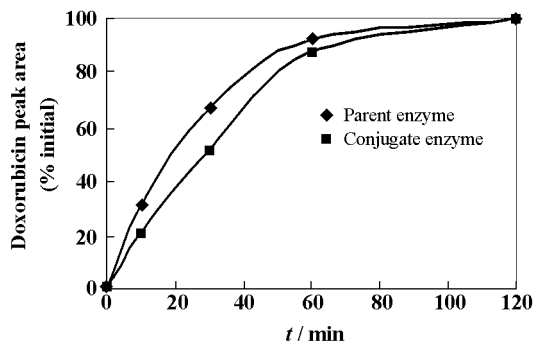


Figure 3 Enzymatic hydrolysis of $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ DOXP by $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PGA

送,且叶酸能竞争性结合细胞表面的叶酸受体从而抑制叶酸-PGA 的摄取。

3 DOXP 在叶酸-PGA 的靶向作用下对各细胞株的毒性

3.1 DOXP 达到 IC_{50} 所需 PGA 的浓度 DOXP ($1.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 达到 HeLa 细胞或 SKOV3 细胞的 IC_{50} 所需 PGA 的质量浓度分别为 $0.38 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($0.0142 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和 $0.39 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($0.0142 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$)。当 PGA 质量浓度为 $0.28 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($0.01036 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) 时,细胞存活率均高于 90%,即酶在此浓度下不会因为非特异性的细胞结合催化 DOXP 而对细胞产生毒性。为了比较特异性靶向的 PGA 和非特异性的 PGA 对 DOXP 细胞毒性的影响,将 MTT 实验中的 PGA 质量浓度都设为 $0.28 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($0.01036 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

3.2 DOXP 在叶酸-PGA 的靶向作用下对各细胞株的毒性 由表 1,对于 HeLa 和 SKOV3 细胞 [FR(+)], DOX 的 IC_{50} 分别为 2.26 和 $2.45 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, DOXP 或 DOXP 联合未偶联叶酸的 PGA 对细胞的毒

Table 1 Cytotoxic effect of DOXP on HeLa, SKOV3 cells [FR(+)] and A549 cells [FR(-)]

| Sample | $\text{IC}_{50} / \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ | | |
|--------------------------------|--|-----------------|-----------------|
| | HeLa | SKOV3 | A549 |
| DOX | 2.26 ± 0.29 | 2.45 ± 0.31 | 4.37 ± 0.25 |
| DOXP | 2.37 ± 0.21 | 2.32 ± 0.13 | 2.04 ± 0.11 |
| DOXP + PGA | 2.12 ± 0.28 | 1.99 ± 0.61 | 2.36 ± 0.37 |
| DOXP + Folate-PGA | 0.72 ± 0.24 | 0.75 ± 0.11 | 2.34 ± 0.35 |
| DOXP + Folate-PGA + Folic acid | 1.92 ± 0.59 | 2.02 ± 0.17 | - |

Cells were treated with $0.28 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PGA or folate-PGA, folate-PGA plus $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ folic acid for 2 h at 37°C and exposed to the prodng DOXP. Subsequent cell growth was measured by staining with MTT after a further 72 h. In control experiments, DOX and DOXP were directly incubated with the cells in the absence of enzyme pretreatment. Values shown represent the $\bar{x} \pm s$ of data from three experiment

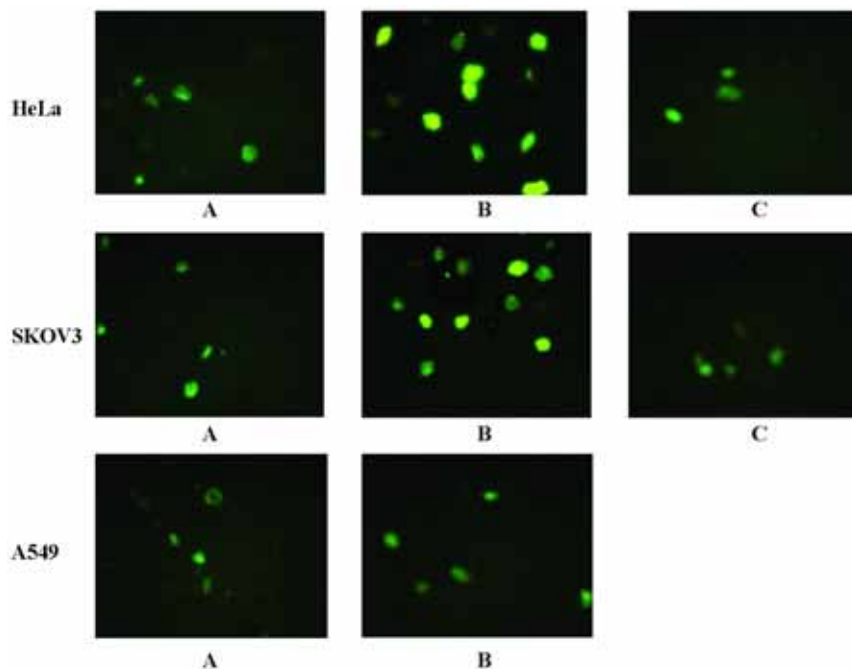


Figure 4 Fluorescent microscopy images of HeLa and SKOV3 cells incubated for 4 h at 37 °C with PGA (A), folate-PGA (B) and folate-PGA + 1 mmol·L⁻¹ free folic acid (C). Alternatively, A549 cells incubated with A and B. The concentrations of PGA were 20 μg·mL⁻¹

性与 DOX 相似。而联合特异性靶向的叶酸-PGA 的 DOXP, 其 IC₅₀ 分别为 0.72 和 0.75 μmol·L⁻¹, 细胞毒性明显增大。当添加游离叶酸, 细胞毒性又降低, 类似于未偶联叶酸的 PGA 联合 DOXP 对细胞的毒性。对于 A549 细胞 [FR(-)], DOXP 合并叶酸-PGA 或 PGA 的 IC₅₀ 分别为 2.34 和 2.36 μmol·L⁻¹, 可见联合特异性靶向的 PGA 对 A549 细胞毒性的影响很小。

讨论

叶酸受体的表达与肿瘤细胞的耐药性呈正相关, 因此叶酸靶向成为增加化疗药物对肿瘤细胞敏感性的新途径^[4]。但小分子药物不易与叶酸连接, 且叶酸与叶酸受体的高亲和力使药物释放入胞困难, 导致叶酸-小分子药物偶联物的药效偏低^[9,10]。叶酸靶向的酶-前体药物治疗 (FDEPT) 的优势在于叶酸易于酶偶联, 且专一性活化酶可催化前药在肿瘤部位形成高浓度的活性细胞毒分子。

本文选用阿霉素的耐药株——HeLa 和 SKOV3 细胞 [FR(+)] 为模型细胞, 利用 FDEPT 法, 将叶酸与 PGA 偶联, 考察 DOXP 在叶酸-PGA 的特异性靶向作用下释放出活性阿霉素对细胞的毒性。HeLa 和 SKOV3 细胞对阿霉素有严重耐受性^[11,12]。本文研究表明, 在叶酸-PGA 作用下, DOX 对这两种耐药

细胞的敏感性增强。尽管 HeLa 细胞的叶酸受体密度高于 SKOV3 细胞, 对叶酸蛋白质偶联大分子的摄取高于 SKOV3 细胞 80 倍^[13,14]。但在 8 h 内, 两种细胞对叶酸蛋白质偶联大分子的摄取水平相同^[15]。因此对这两种 FR(+) 细胞, DOXP 合并叶酸靶向的 PGA 对细胞毒性的影响相似。对 A549 细胞 [FR(-)], DOXP 合并叶酸-PGA 的 IC₅₀ 为 2.34 μmol·L⁻¹, 低于 DOX 的 IC₅₀ (4.37 μmol·L⁻¹)。但这并不能说明特异性靶向的 PGA 也提高了阿霉素对 A549 细胞的毒性。因为 DOXP 的 IC₅₀ 为 2.04 μmol·L⁻¹, 对 A549 细胞毒性比 DOX 大, 且 DOXP 合并 PGA 与合并叶酸-PGA 的 IC₅₀ 相似。总之, 特异性靶向的叶酸-PGA 被多药耐药的 HeLa 和 SKOV3 细胞选择性摄取在增加 DOX 对 FR(+) 细胞的敏感性中起了重要作用, 且 FR(+) 细胞的叶酸受体密度或者说叶酸受体对偶联物的摄取量对细胞毒性影响很小。

前药活化酶青霉素酰化酶由于对苯乙酰化衍生物具有作用专一性, 且为非人类酶, 常用于 ADEPT 研究中^[1]。本文选用青霉素酰化酶 G, 因为它在体内不被糖基化, 优于青霉素酰化酶 V^[5]。作者正在进行的体内实验将进一步证实叶酸靶向的 PGA 催化的前体药物治疗肿瘤的潜力。

References

- [1] Rooseboom M, Commandeur JN, Vermeulen NP. Enzyme-catalyzed activation of anticancer prodrugs [J]. *Pharmacol Rev*, 2004, **56**(1): 53 - 102.
- [2] Wang WG, Zhen YS. Antibody based targeting therapy and gene therapy of cancer [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1999, **34**(10): 795 - 800.
- [3] Low PS, Antony AC. Folate receptor-targeted drugs for cancer and inflammatory diseases [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, **56**(8): 1055 - 1058.
- [4] Lu Y, Low PS. Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, **54**(5): 675 - 693.
- [5] Vruthula VM, Senter PD, Fischer KJ, *et al.* Prodrugs of doxorubicin and melphalan and their activation by a monoclonal antibody-penicillin-G amidase conjugate [J]. *J Med Chem*, 1993, **36**(7): 919 - 923.
- [6] Leamon CP, Low PS. Delivery of macromolecules into living cells: a method that exploits folate receptor endocytosis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**(13): 5572 - 5576.
- [7] Lu JY, Lowe DA, Kennedy MD, *et al.* Folate-targeted enzyme prodrug cancer therapy utilizing penicillin-V amidase and a doxorubicin prodrug [J]. *J Drug Target*, 1999, **7**(1): 43 - 53.
- [8] Lowe DA, Romancik G, Elander RP. Enzymatic hydrolysis of penicillin V to 6-aminopenicillanic acid by *fusarium oxysporum* [J]. *Biotechnol Lett*, 1986, **8**(3): 151 - 156.
- [9] Leamon CP, Reddy JA. Folate-targeted chemotherapy [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, **56**(8): 1127 - 1141.
- [10] Leamon CP, DePrince RB, Hendren RW. Folate-mediated drug delivery: effect of alternative conjugation chemistry [J]. *J Drug Target*, 1999, **7**(3): 157 - 169.
- [11] Armstrong DK. Relapsed ovarian cancer: challenges and management strategies for a chronic disease [J]. *Oncologist*, 2002, **7**(Suppl 5): 20 - 28.
- [12] Dunton CJ. Management of treatment-related toxicity in advanced ovarian cancer [J]. *Oncologist*, 2002, **7**(Suppl 5): 11 - 19.
- [13] Leamon CP, Pastan I, Low PS. Cytotoxicity of folate-Pseudomonas exotoxin conjugates toward tumor cells. Contribution of translocation domain [J]. *J Biol Chem*, 1993, **268**(33): 24847 - 24854.
- [14] Miotti S, Bagnoli M, Ottone F, *et al.* Simultaneous activity of two different mechanisms of folate transport in ovarian carcinoma cell lines [J]. *J Cell Biochem*, 1997, **65**(4): 479 - 491.
- [15] Atkinson SF, Bettinger T, Seymour LW, *et al.* Conjugation of folate *via* gelonin carbohydrate residues retains ribosomal-inactivating properties of the toxin and permits targeting to folate receptor positive cells [J]. *J Biol Chem*, 2001, **276**(30): 27930 - 27935.