

## 转铁蛋白功能化的 $\beta$ -榄香烯-雷公藤红素共传递微乳协同靶向抗结直肠癌研究

沈展, 陈文斌\*

浙江大学医学院附属第一医院, 浙江 杭州 310011

**摘要:**目的 验证转铁蛋白修饰的  $\beta$ -榄香烯-雷公藤红素共传递微乳 (Tf-EC-MEs) 协同靶向抗结直肠癌作用。方法 采用四甲基偶氮唑盐 (MTT) 法检测  $\beta$ -榄香烯、雷公藤红素及联合给药对结直肠癌 Lovo 细胞和结肠癌 HT-29 细胞的细胞毒活性, 优化最佳质量配比; 采用“混匀-滴注”方法制备 Tf-EC-MEs, 并利用高效液相 (HPLC)、激光粒度仪、透射电镜等表征粒子的制剂学及理化性质; 采用 MTT 法、高效液相-二喹啉甲酸 (HPLC-BCA) 法、膜联蛋白 V-PE/7-氨基放线菌素 D (Annexin V-PE/7-AAD) 试剂盒考察 Tf-EC-MEs 的体外抗肿瘤活性及对细胞摄取、细胞凋亡的影响; sc Lovo 细胞制备荷瘤裸鼠模型, 每隔 2 d 分别 iv 给予  $\beta$ -榄香烯+雷公藤红素、 $\beta$ -榄香烯-雷公藤红素共传递微乳 (EC-MEs)、Tf-EC-MEs, 考察 Tf-EC-MEs 对小鼠肿瘤生长、体质量及生存时间的影响。**结果**  $\beta$ -榄香烯-雷公藤红素 40:1 联合给药对 Lovo 和 HT-29 细胞的半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 分别为 (17.5±2.9)、(36.4±3.6)  $\mu\text{g/mL}$ , 联合指数 (CI) 分别为 0.89 和 0.96, 具有明显的协同抗结直肠癌效应; Tf-EC-MEs 对 Lovo 和 HT-29 细胞的 IC<sub>50</sub> 分别为 (11.7±0.6) 和 (27.4±1.2)  $\mu\text{g/mL}$ , CI 分别为 0.61 和 0.72。Tf-EC-MEs 与 Lovo 细胞孵育 4 h 后的摄取量为 7.2  $\mu\text{g/mg}$ , 是  $\beta$ -榄香烯+雷公藤红素给药组的 3.3 倍。Tf-EC-MEs 能够引发 59.2% 的 Lovo 细胞凋亡, 显著高于  $\beta$ -榄香烯+雷公藤红素和 EC-MEs 组。Tf-EC-MEs 对荷 Lovo 大肠癌裸鼠的肿瘤生长抑制率最为明显, 且裸鼠 60 d 后生存率为 37.5%。Tf-EC-MEs 给药组裸鼠的肿瘤组织 HE 染色切片出现大量的细胞坏死, Ki-67 免疫组化切片显示肿瘤细胞增殖被明显抑制。**结论** 相较于  $\beta$ -榄香烯+雷公藤红素组和 EC-MEs 组, Tf-EC-MEs 具有更优的协同靶向抗结直肠癌的潜力。

**关键词:**  $\beta$ -榄香烯; 雷公藤红素; 微乳; 协同靶向治疗; 结直肠癌

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)02-0471-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.02.029

## Transferrin-functionalized co-delivery microemulsion of $\beta$ -elemene and celastrol for synergistic anti-colorectal cancer treatment

SHEN Zhan, CHEN Wen-bin

The First Affiliated Hospital of Zhejiang University Medical College, Hangzhou 310011, China

**Abstract: Objective** To verify the synergistic effect of transferrin modified  $\beta$ -elemene and celastrol co-loaded microemulsion (Tf-EC-MEs) on anti-colorectal cancer treatment. **Methods** The optimal mass ratio of  $\beta$ -elemene and celastrol to growth inhibition of Lovo and HT-29 colorectal cancer cells was optimized by MTT staining method *in vitro*. Tf-EC-MEs was prepared by “mixing-dripping” method, and the preparation and physicochemical properties of the particles were characterized by high performance liquid chromatography (HPLC), laser particle analyzer, and transmission electron microscope. The MTT staining, HPLC-BCA combined method, and Annexin V-PE/7-Aminoactinomycin D (Annexin V-PE/7-AAD) kit were used to investigate the antitumor activity of Tf-EC-MEs *in vitro*, and its effect on cell uptake, and apoptosis of tumor cells. The tumor-bearing nude mice model was established by subcutaneous injection of Lovo cells, and the tumor growth, weight, and survival time were observed after intravenous injection of  $\beta$ -elemene + celastrol,  $\beta$ -elemene-celastrol co-loaded microemulsion (EC-MEs), and Tf-EC-MEs. **Results** The combined administration of  $\beta$ -elemene and celastrol (40:1) had significant synergistic effect on the anti-colorectal cancer of Lovo and HT-29 cells. IC<sub>50</sub> of  $\beta$ -elemene + celastrol in Lovo and HT-29 cells were (17.5 ± 2.9) and (36.4 ± 3.6)  $\mu\text{g/mL}$ , with the CI as 0.89 and 0.96, respectively. IC<sub>50</sub> of Tf-EC-MEs in Lovo and HT-29 cells were (11.7 ± 0.6) and (27.4 ± 1.2)  $\mu\text{g/mL}$ , with the CI as 0.61 and 0.72 respectively. The 4 h of Lovo uptake of Tf-EC-MEs was 7.2  $\mu\text{g/mg}$ , which was 3.3 times higher than that of  $\beta$ -elemene +

收稿日期: 2018-09-06

作者简介: 沈展 (1985—), 男, 本科, 专业方向为结直肠癌肿瘤学研究。Tel: 15988836029 E-mail: zhan.shen@shulan.com

\*通信作者 陈文斌 (1971—), 男, 博士, 硕士生导师, 研究方向为结直肠癌肿瘤学研究。Tel: 13396553806 E-mail: wenbinchen@zju.edu.cn

celastrol. Tf-EC-MEs induced apoptosis in 59.2% of Lovo cells, which was significantly higher than that in beta-elemene + celastrol and EC-MEs groups. Tf-EC-MEs showed the overwhelming inhibition of growth of Lovo tumor-bearing tumors. The survival rate of Tf-EC-MEs-treated mice was 37.5% at day 60. In Tf-EC-MEs treated group, HE staining sections of tumor tissues showed substantial cell necrosis and the Ki-67 immunohistochemical sections displayed the significant inhibition of proliferation of tumor cells.

**Conclusion** Compared with the combination group (beta-elemene and celastrol) and EC-MEs groups, Tf-EC-MEs has a promising potential in the synergistic anti-colorectal cancer treatment.

**Key words:**  $\beta$ -elemene; celastrol; microemulsion; synergistic targeted treatment; colorectal cancer

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是一种常见的消化道肿瘤, 由于饮食习惯和生活习惯的变化, 其发病率在我国有逐年上升的趋势<sup>[1-2]</sup>。据中国国家癌症中心发布最新数据, 我国 CRC 发病率在近 10 年来增长约 1 倍, 在各项恶性肿瘤发病率中已升至第 3 位。多药联合治疗是目前临床抗肿瘤的常用手段, 如帕尼单抗联合 FOLFOX4<sup>[3]</sup>、健脾解毒方联合长春新碱<sup>[4]</sup>等在大肠癌治疗中表现出明显的效果。

$\beta$ -榄香烯是从姜科植物莪术 *Curcuma zedoaria* (Christm.) Rosc. 中提取分离的倍半萜烯类化合物, 可以将多种肿瘤细胞阻滞于 G<sub>2</sub>/M 期, 在抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡、阻滞新生血管形成和肿瘤转移方面具有优势<sup>[5-7]</sup>。近年来报道的  $\beta$ -榄香烯微乳和  $\beta$ -榄香烯脂质体能进一步提高药物的体内生物利用度和肿瘤靶向性, 进而显著改善药效<sup>[8-9]</sup>。雷公藤红素是从雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 根皮中提取出来的一种三萜类化合物, 被誉为 21 世纪最有可能成药的 5 种天然药物之一<sup>[10]</sup>。作为一种有效的蛋白酶抑制剂, 雷公藤红素在多种肿瘤细胞模型上均表现出明显的抗肿瘤活性, 文献报道其活性与抗炎作用密切相关<sup>[11-12]</sup>。但是, 雷公藤红素的细胞毒性非常大, 如何提高靶向性, 降低治疗毒性一直以来都是抗肿瘤领域的研究热点<sup>[13-14]</sup>。通过与其他药物协同治疗, 以降低剂量的方式减轻毒副作用是一条切实可行的途径。

本研究以  $\beta$ -榄香烯为微乳油相, 雷公藤红素为难溶性药物, 转铁蛋白为结直肠癌的肿瘤靶向配体, 构建一种转铁蛋白修饰的  $\beta$ -榄香烯-雷公藤红素共传递微乳 (Tf-EC-MEs), 通过双药组分配比优化、微乳制备以及体内外抗肿瘤活性检测验证给药系统协同抗肿瘤优势, 为多药联合治疗结直肠癌提供新的思路和方法。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

免疫缺陷型裸鼠购自上海杰思捷实验动物有限公司, 雌雄各半, 体质量为 (23±2) g, 实验动物

质量合格证号为 SCXK (沪) 2017-0007, 于恒温恒湿的 SPF 级层流架中饲养。

### 1.2 细胞

人源结直肠癌 Lovo 细胞及人源结肠癌 HT-29 细胞均购自中国科学院上海细胞库。

### 1.3 药品与试剂

$\beta$ -榄香烯购自南京阿仙奴生物科技有限公司 (质量分数 >98%, 批号 20179384); 雷公藤红素购自合肥博美生物科技有限公司 (质量分数 >98%, 批号 4854291); 表面活性剂 Kolliphor HS15 (HS15) 购自德国巴斯夫有限公司; 聚乙二醇 400 (PEG-400)、Labrafil M 1944CS (1944CS) 以及转铁蛋白 (Tf) 购自国药集团化学试剂有限公司; 二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-转铁蛋白 (DSPE-PEG-Tf) 由吉尔生化 (上海) 有限公司合成; DSPE-PEG-NH<sub>2</sub> 购自上海艾维特生物科技有限公司; DMEM 培养基、F-12K 培养基、胎牛血清 (FBS)、四甲基偶氮唑盐 (MTT) 及相关细胞实验耗材由 Thermo-Fisher 有限公司提供; 聚山梨酯-80 购自国药集团化学试剂有限公司。

### 1.4 仪器

MS250 DU 型十万分之一天平 (美国梅特勒-托利多公司); 8S-1 型磁力搅拌器 (江苏金坛金城国胜实验仪器厂); Agilent 1260 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); JEM-2100 型透射电子显微镜 (TEM, 日本 JEOL 公司); HY-5A 气浴恒温恒速摇床 (毅腾生物科技有限公司); Spectra Max190 全波长酶标仪 (美国热电集团); Nano-ZS 型动态光散射 (DLS) 粒度仪 (英国马尔文公司); Milli-Q flex5 超纯水系统 (美国 Millipore 公司); IX73 荧光倒置显微镜 (日本奥林巴斯公司)。

## 2 方法

### 2.1 $\beta$ -榄香烯-雷公藤红素联合给药的细胞毒活性检测

**2.1.1 细胞培养** Lovo 细胞置于含 10% FBS 的 F-12K 培养液中, HT-29 细胞置于含 10% FBS 的

DMEM 培养液中, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的饱和湿度孵育箱中静置培养。每 24~48 h 换液 1 次, 待细胞覆盖率达到 70%~80% 时胰酶消化, 传代。

**2.1.2 细胞毒活性检测** 取 100 μL 1×10<sup>5</sup> 个/mL 的 Lovo 和 HT-29 细胞悬液, 分别接种于 96 孔培养板内, 培养箱中孵育 24 h 后, 吸弃孔内培养液, 每孔分别加入 100 μL 不同质量浓度的雷公藤红素 (0.001~5.000 μg/mL)、β-榄香烯 (0.1~500 μg/mL)、β-榄香烯+雷公藤红素 (20:1~80:1), 继续培养 48 h 后, 每孔加入 20 μL MTT (0.5 mg/mL) PBS 溶液, 避光孵育 4 h 后, 弃去培养基, 每孔加入 100 μL DMSO, 摇床低速震荡 10 min 后, 采用酶标仪检测 570 nm 处吸光度 (A) 值。计算细胞的存活率和药物对细胞的半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>)。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

## 2.2 微乳制备及表征

**2.2.1 药物含量测定** 雷公藤红素色谱条件<sup>[15]</sup>为 Agilent SB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温为 30 °C; 流动相为甲醇-2%醋酸水溶液 (90:10); 体积流量为 1 mL/min; 检测波长为 426 nm; 进样量为 10 μL。

β-榄香烯色谱条件<sup>[16]</sup>为 Agilent SB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温为 30 °C, 流动相为甲醇-乙腈-水 (40:45:15); 体积流量为 1 mL/min; 检测波长为 230 nm; 进样量为 10 μL。

**2.2.2 Tf-EC-MEs 制备** 称取 β-榄香烯 200 mg、1944CS 200 mg、HS15 390 mg、PEG400 200 mg、雷公藤红素 5 mg、DSPE-PEG-Tf 10 mg, 37 °C 下磁力搅拌 2 h, 逐滴加水, 直至形成澄清透明的溶液, 即得 Tf-EC-MEs。EC-MEs 制备方法与 Tf-EC-MEs 类似, 不同点在于将 DSPE-PEG-Tf 替换成等质量的 DSPE-PEG-NH<sub>2</sub>。

**2.2.3 表面性质及形态学考察** 微乳溶液稀释成总质量浓度为 2 mg/mL, 样品经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后在动态光散射 (DLS) 粒度仪下检测其粒径、多分散指数 (PDI) 和 Zeta 电位。微乳溶液稀释成总质量浓度为 20 mg/mL, 取 20 μL 滴于镀膜铜栅上, 3 s 后滤纸吸去多余液体, 20 μL 1% 磷钼酸染色, 红外灯下干燥 30 min 后, 立即在 TEM 下观察形态学特性。

**2.2.4 包封率测定** 将上述新鲜制备的微乳定容至 10 mL 后, 12 000×g 离心 10 min, 取 50 μL 上清液进行 HPLC 测定。

$$\text{包封率} = \text{测得药物量} / \text{理论投药量}$$

**2.2.5 稳定性考察** 将上述新鲜制备的 1 mL Tf-EC-MEs 置于 10 mL pH 7.4~4.5 的 PBS 缓冲溶液中, 2 h 后经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后在 DLS 粒度仪下检测其粒径、PDI 和 Zeta 电位; 将上述新鲜制备的 2 mL Tf-EC-MEs 置于 10 mL 西林瓶中密封, 室温分别静置 3~21 d, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后在 DLS 粒度仪下检测其粒径、PDI 和 Zeta 电位。

## 2.3 药物释放研究

取含 80 mg β-榄香烯 (和 2 mg 雷公藤红素) 的 Tf-EC-MEs 溶液 1.0 mL 置于透析袋中, 37 °C 下分别置于 50 mL pH 7.4 和 pH 6.5 的磷酸盐缓冲液 (含 0.5% 聚山梨酯-80) 介质中振荡, 转速为 60 r/min, 分别于 1~48 h 在透析介质中取样 0.5 mL, 再补充等体积等温度的空白介质。样品加 5 倍量甲醇稀释, 涡旋 5 min, 12 000×g 离心 10 min, 取上清液测定药物含量。

$$\text{累积释放率} = \text{测得药物量} / \text{起始药物量}$$

## 2.4 微乳体外细胞活性研究

**2.4.1 对细胞增殖的影响** 按“2.1”项下操作方法, 加入含不同质量浓度 (0.5~100 μg/mL, 以 β-榄香烯计) 的 EC-MEs 和 Tf-EC-MEs 溶液, 与 2 种肿瘤细胞孵育 1~48 h, 相同方法检测 A, 计算细胞存活率。

**2.4.2 对细胞摄取的影响** 取 400 μL 1×10<sup>5</sup> 个/mL 的 Lovo 细胞悬液, 分别接种于 24 孔培养板内, 培养箱中孵育 24 h 后, 吸弃孔内原培养液, 每孔分别加入 400 μL β-榄香烯+雷公藤红素 (40:1)、EC-MEs、Tf-EC-MEs、Tf (0.6 mg/mL, 预孵育 30 min) + Tf-EC-MEs 的溶液, β-榄香烯质量浓度为 40 μg/mL, 雷公藤红素质量浓度为 1 μg/mL, 并设置不完全培养基为对照组。移入培养箱继续培养 4 h 后, 弃去培养基, 500 μL 冰 PBS 清洗 3 次, 每孔加入 0.1% SDS 细胞裂解液常温孵育 5 min, 裂解液 12 000×g 离心 5 min, 上清液取 20 μL 用 BCA 试剂盒测蛋白含量; 另取上清液 100 μL, 等倍量甲醇稀释沉淀蛋白/溶解药物, 涡旋振荡 5 min, 12 000×g 离心 5 min, 样品采用 HPLC 法测定 β-榄香烯含量。

$$\text{细胞摄取量} = \beta\text{-榄香烯量} / \text{细胞蛋白量}$$

**2.4.3 微乳对细胞凋亡的影响** 取 400 μL 1×10<sup>5</sup> 个/mL 的 Lovo 细胞悬液, 分别接种于 24 孔培养板内, 培养箱中孵育 24 h 后, 吸弃孔内原培养液, 每孔分别加入 400 μL β-榄香烯+雷公藤红素 (40:1)、EC-MEs、Tf-EC-MEs、Tf (0.6 mg/mL, 预孵

育 30 min) + Tf-EC-MEs 的溶液,  $\beta$ -榄香烯质量浓度为 40  $\mu\text{g/mL}$ , 雷公藤红素质量浓度为 1  $\mu\text{g/mL}$ , 并设置不完全培养基为对照组。移入培养箱继续培养 4 h 后, 弃去培养基, 500  $\mu\text{L}$  冰 PBS 清洗 3 次, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  无色胰酶消化, 加入含有 10% FBS 的 PBS 终止消化, 将细胞洗脱得细胞悬液, 取 50  $\mu\text{L}$  细胞悬液于 96 孔板, 加入 50  $\mu\text{L}$  细胞凋亡检测试剂 Annexin V-PE, 避光孵育 15 min, 流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

### 2.5 体内抗肿瘤活性评价

**2.5.1 模型制备、给药及指标检测** 将 48 只裸鼠  $sc\ 2 \times 10^7$  个/mL 的 Lovo 单细胞悬液 0.2 mL, 构建结直肠癌皮下移植异位瘤模型。将裸鼠随机分成模型组、 $\beta$ -榄香烯+雷公藤红素 (40:1) 组、EC-MEs 组和 Tf-EC-MEs 组, 待平均肿瘤体积长至 80~100  $\text{mm}^3$ , 分别在第 6、9、12、15、18 天进行尾 iv 给药, 剂量为 80 mg/kg  $\beta$ -榄香烯 (2 mg/kg 雷公藤红素)。治疗期间每天测定体质量和肿瘤体积。

$$\text{肿瘤体积} = \text{长径} \times \text{短径}^2 / 2$$

**2.5.2 病理学检测** 给药结束后 72 h, 裸鼠断颈处死, 剥离肿瘤, 将其制备成石蜡包埋的病理切片, 常规步骤进行 HE 染色, 观察细胞核形态; 根据 Ki-67 免疫组化试剂盒说明书进行染色, 观察褐色 Ki-67 的阳性细胞染色情况。

## 3 结果

### 3.1 $\beta$ -榄香烯、雷公藤红素联合给药对结直肠癌细胞存活率的影响

结果如图 1 所示, 当  $\beta$ -榄香烯质量浓度高于 20  $\mu\text{g/mL}$  时, 对 Lovo 细胞的增殖有明显抑制作用, 随着质量浓度增高至 50  $\mu\text{g/mL}$ ,  $\beta$ -榄香烯对 HT-29 细胞也表现出明显的细胞毒活性。由表 1 可知,  $\beta$ -榄香烯对 Lovo 和 HT-29 细胞的  $\text{IC}_{50}$  分别为 (43.2 $\pm$ 3.6)、(74.2 $\pm$ 4.4)  $\mu\text{g/mL}$ , 提示  $\beta$ -榄香烯对 2 种不同的结直肠癌细胞表现出明显的药效学差异。0.5  $\mu\text{g/mL}$  的雷公藤红素即可明显抑制 2 种细胞的增殖, 且在 1~10  $\mu\text{g/mL}$  雷公藤红素对 Lovo 细胞的细胞毒活性更高, 其对 2 种细胞的  $\text{IC}_{50}$  分别为 (0.9 $\pm$ 0.1)、(1.9 $\pm$ 0.1)  $\mu\text{g/mL}$ 。

根据 2 种抗肿瘤药物的  $\text{IC}_{50}$ , 设置了质量比为 20:1、40:1 和 80:1 的联合给药组, 考察  $\beta$ -榄香烯+雷公藤红素联合给药对 2 种细胞增殖抑制的最佳质量浓度配比。如图 1 所示, 联合给药组的质量浓度高于 20  $\mu\text{g/mL}$  (以  $\beta$ -榄香烯计) 时, 不同质量比的药物对 2 种细胞的细胞毒活性表现出明显差异,  $\beta$ -榄香烯-雷公藤红素为 20:1 和 40:1 时抑制细胞生长的能力明显高于 80:1 组。此外, 通过计算几种不同配比的联合给药组在 Lovo 细胞和 HT-29 细胞模型上的协同指数 (combined index,

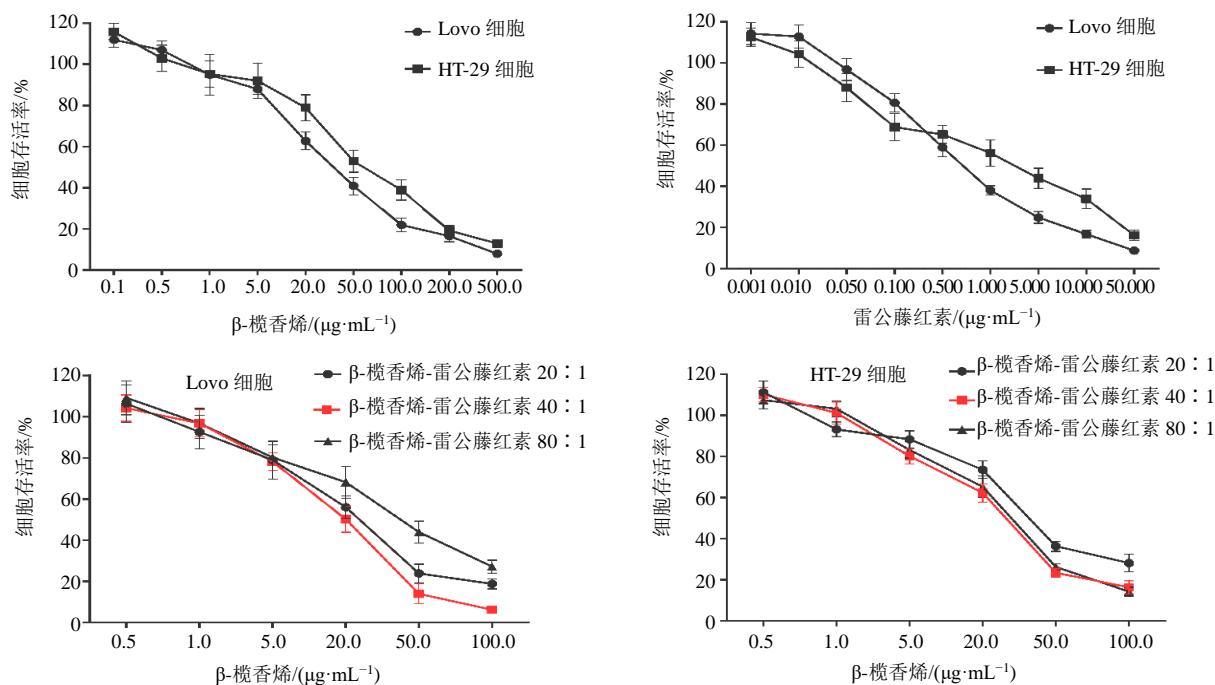


图 1  $\beta$ -榄香烯、雷公藤红素及联合给药对 2 种不同肠癌细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 1 Combinational anti-colorectal treatment of  $\beta$ -elemene and celastrol against two types of colorectal cancer cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

CI, CI=联用组 IC<sub>50</sub>a/单用组 IC<sub>50</sub>a+联用组 IC<sub>50</sub>b/单用组 IC<sub>50</sub>b, a、b 分别代表 β-榄香烯和雷公藤红素), 发现 40:1 时 CI 分别为 0.89 和 0.96 (表 1), 提示该配比下 β-榄香烯+雷公藤红素对 2 种细胞的增殖抑制有明显的协同作用。因此, 选用 β-榄香烯-雷公藤红素 40:1 进行后续研究。

### 3.2 微乳形态表征

结果如表 2 所示, 所制备的 Tf-EC-MEs 粒径为 (45.0±1.3) nm, PDI 为 0.117±0.001, Zeta 电位为 (-20.8±2.1) mV。EC-MEs 在粒径上比 Tf-EC-MEs

有小幅减小, 表面电荷有大幅提高, 这些变化可能与 Tf 修饰在微乳表面有关。Tf-EC-MEs 体系对 β-榄香烯和雷公藤红素的包封率均在 95% 左右, 提示双药共载的微乳制备工艺符合后续实验要求。

图 2-A、2-B 分别是 EC-MEs 和 Tf-EC-MEs 在正常 pH 环境下的 TEM 图, Tf 修饰后的微乳在外观形态上并未发生较大改变, 仅在粒径上有小幅增加, 这与前述结果相一致。此外, 电镜图中显示的粒径分布相对较窄, 该趋势也经过图 2-C 验证。

为了考察 β-榄香烯和雷公藤红素不同配比对于

表 1 β-榄香烯、雷公藤红素及联合给药对 2 种不同肠癌细胞的 IC<sub>50</sub> 和 CI ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1 IC<sub>50</sub> and CI of various formulations against two types of colorectal cancer cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	IC <sub>50</sub> /( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )		CI	
	Lovo 细胞	HT-29 细胞	Lovo 细胞	HT-29 细胞
β-榄香烯	43.2±3.6	74.2±4.4	—	—
雷公藤红素	0.9±0.1	1.9±0.1	—	—
β-榄香烯-雷公藤红素 20:1	20.2±2.1**	40.3±2.9**	1.02	1.06
β-榄香烯-雷公藤红素 40:1	17.5±2.9**	36.4±3.6**	0.89	0.96
β-榄香烯-雷公藤红素 80:1	32.1±1.8**	37.4±2.3**	1.63	0.97

与 β-榄香烯组比较: \*\*P<0.01; 除雷公藤红素组外, 所有 IC<sub>50</sub> 都以 β-榄香烯质量浓度计算

\*\*P < 0.01 vs β-elemene group; IC<sub>50</sub> of various formulations except celastrol were calculated by concentration of β-elemene

表 2 EC-MEs 和 Tf-EC-MEs 的制剂学评价 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Pharmaceutical evaluation of EC-MEs and Tf-EC-MEs ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	EE <sup>a</sup> /%	EE <sup>b</sup> /%
EC-MEs	42.5±2.2	0.122±0.001	-9.2±1.3	89.2±2.3	93.3±1.2
Tf-EC-MEs	45.0±1.3	0.117±0.001	-20.8±2.1	92.5±2.6	94.7±2.6

EE<sup>a</sup> 和 EE<sup>b</sup> 分别代表 β-榄香烯和雷公藤红素的包封率

EE<sup>a</sup> and EE<sup>b</sup> represent encapsulation efficiency of β-elemene and celastrol, respectively

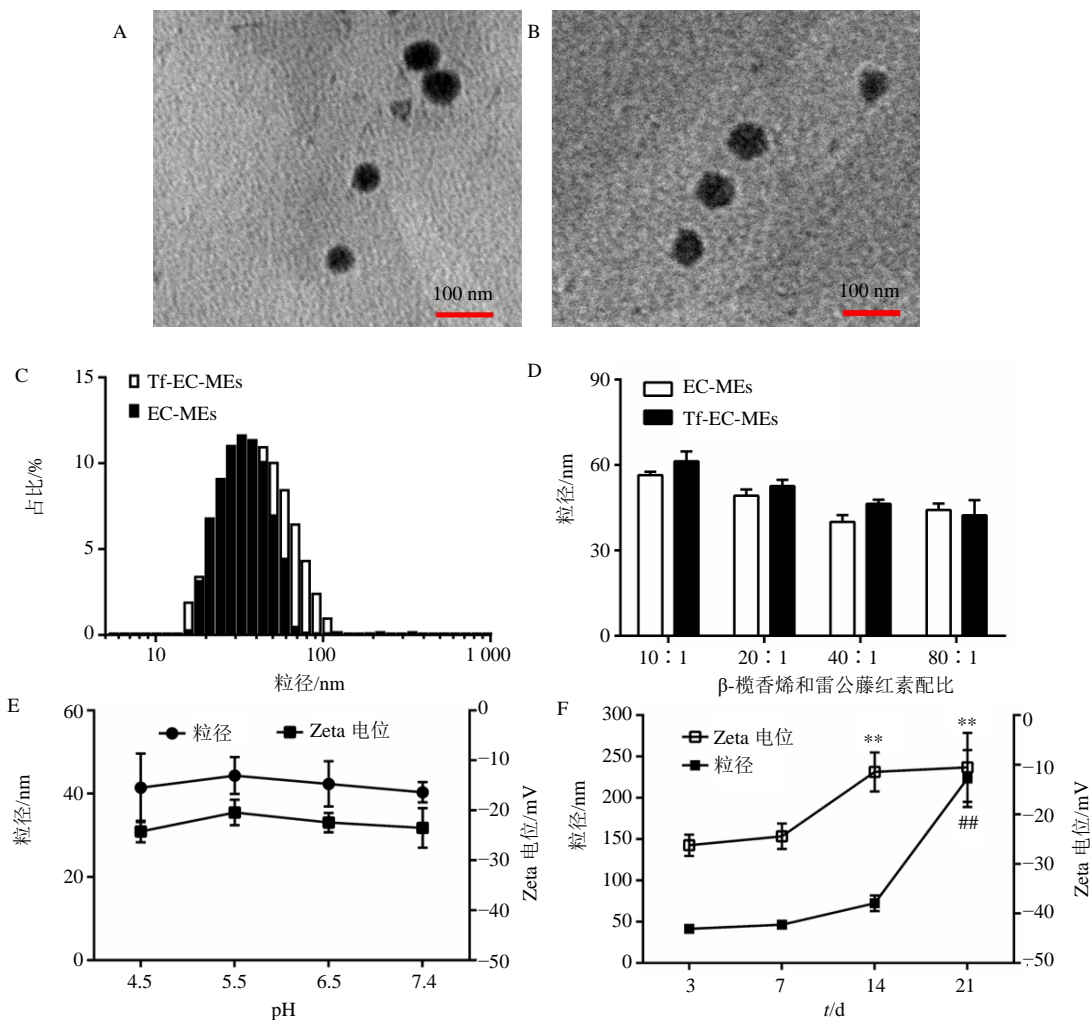
微乳制剂学的影响, 设置了不同的 β-榄香烯-雷公藤红素配比。由图 2-D 所示, β-榄香烯-雷公藤红素为 10:1 时, 2 种微乳的粒径均为 60 nm 左右, 而 40:1 和 80:1 组的微乳粒径仅为 45 nm 左右 (且没有统计学差异), 考虑到 β-榄香烯-雷公藤红素 40:1 协同抗肿瘤效应最强, 因此后续研究选定此比例为最终工艺的投料比。稳定性是微乳制备及后续治疗过程中关键的环节。通过设置不同的 pH 环境和储存时间来考察 Tf-EC-MEs 在体内的潜在稳定性和室外存放的稳定性。由图 2-E 所示, Tf-EC-MEs 在 pH 4.5~7.4 时, 粒径和 Zeta 电位均未发生明显变化, 提示对不同 pH 环境耐受性较高, 也预示有较弱的体内稳定性。由图 2-F 所示, 当 Tf-EC-MEs 存放超过 14 d 后, 粒径明显增大; 存放超过 7 d 后, Zeta 电位显著向中性靠近, 提示 Tf-EC-MEs 在不作任何稳定性处理的情况下, 可以稳定存放至少 7 d。

### 3.3 药物释放特性

药物释放结果如图 3 所示, 在 pH 7.4 和 pH 6.5 环境下 β-榄香烯的 48 h 累积释放率分别为 61.6% 和 78.3%; 而雷公藤红素的累积释放率分别是 53.5% 和 62.7%。β-榄香烯的释放速率会随着 pH 的降低而增大, 可能与相对分子质量较小且质量占比较多有关。但是 pH 对雷公藤红素的释放影响较小, 提示微乳体系能够减少其在血液循环过程中的提前释放, 这对于减轻大毒类药物的系统毒性有重要意义。

### 3.4 微乳体外细胞活性

3.4.1 微乳对细胞增殖的影响 结果如图 4 所示, 在各质量浓度, 微乳对 Lovo 细胞的增殖抑制活性均明显强于物理混合组, 显示出双药共载协同抗肿瘤的优势。此外, 修饰 Tf 后的微乳 CI 值锐减至 0.61 (表 3), 提示协同抗肿瘤效率进一步提高, 这可能与 Tf-EC-MEs 被细胞内化的能力显著增强有关。尽



A, B-EC-MEs 和 Tf-EC-MEs 的 TEM 图 C-EC-MEs 和 Tf-EC-MEs 的粒径分布图 D-不同组分质量配比下的微乳粒径 E、F-不同 pH 和不同存储时间下的 Tf-EC-MEs 粒径和电位变化 与第 3 天时的电位比较: \*\* $P < 0.01$  与第 3 天时的粒径比较: ## $P < 0.01$   
A, B-TEM image of EC-MEs and Tf-EC-MEs C-size distribution of EC-MEs and Tf-EC-MEs studied by DLS D-changes in size of microemulsion with different mass ratios of  $\beta$ -elemene and celastrol E, F-stability of microemulsion under different pH values and storage time \*\* $P < 0.01$  vs Zeta at day 3 ## $P < 0.01$  vs size at day 3

图 2 微乳的形态学及制剂学表征 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Fig. 2 Morphology and pharmaceuic characterization of microemulsion ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

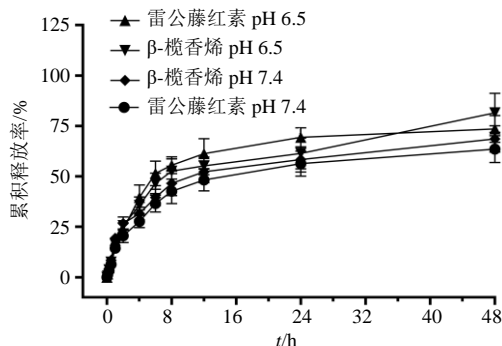


图 3 Tf-EC-MEs 不同 pH 条件下 48 h 累积释放率 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 3 Accumulative drug release of Tf-EC-MEs under PBS of pH 7.4 and 6.5 within 48 h ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

管 EC-MEs 对 HT-29 细胞也表现出强大的杀伤作用, 但是 Tf-EC-MEs 在细胞增殖抑制方面的优势没有显现, 因此后续工作均以 Lovo 细胞作为细胞模型。

**3.4.2 微乳对 Lovo 细胞摄取的影响** 各组细胞摄取结果如图 5 所示, Tf-EC-MEs 的细胞摄取量为  $7.2 \mu\text{g}/\text{mg}$ , 显著高于物理混合组和 EC-MEs 组, 提示 Tf-EC-MEs 对肿瘤细胞的增殖抑制活性是基于摄取能力的提高和两药共传递效应。为验证 Tf-EC-MEs 摄取能力的提高是通过 Tf 受体介导的内吞途径实现的, 进行了 Tf 竞争性抑制实验。当游离的 Tf 预处理细胞后, Tf-EC-MEs 的细胞摄取能力显著降低, 提示其细胞内吞机制可能由 Tf 介导。



**3.4.3 微乳对 Lovo 细胞凋亡的影响** 图 5 结果表明, EC-MEs 和 Tf-EC-MEs 分别可以诱导约 40.1% 和 59.2% 的 Lovo 细胞凋亡, 显著高于物理混合组。而当 Tf 竞争性抑制后, 细胞凋亡率迅速下降至 31.4%。上述结果提示 Tf-EC-MEs 的凋亡诱导能力比物理混合物和 EC-MEs 更强的原因可能是在相同时间内能够运送更多的治疗药物进入细胞, 这也体

现出药物组合和剂型设计的合理性和科学性。

**3.5 体内抗肿瘤活性评价**

Tf-EC-MEs 的靶向性和协同抗肿瘤优势在细胞水平已经得到证实, 但是体内的药效学还受微乳体内循环稳定性、药动学以及毒性等影响, 因此通过抑制肿瘤生长、生存时间等指标验证 Tf-EC-MEs 体内协同抗肿瘤优势。结果如图 6-A 所示, 各给药组

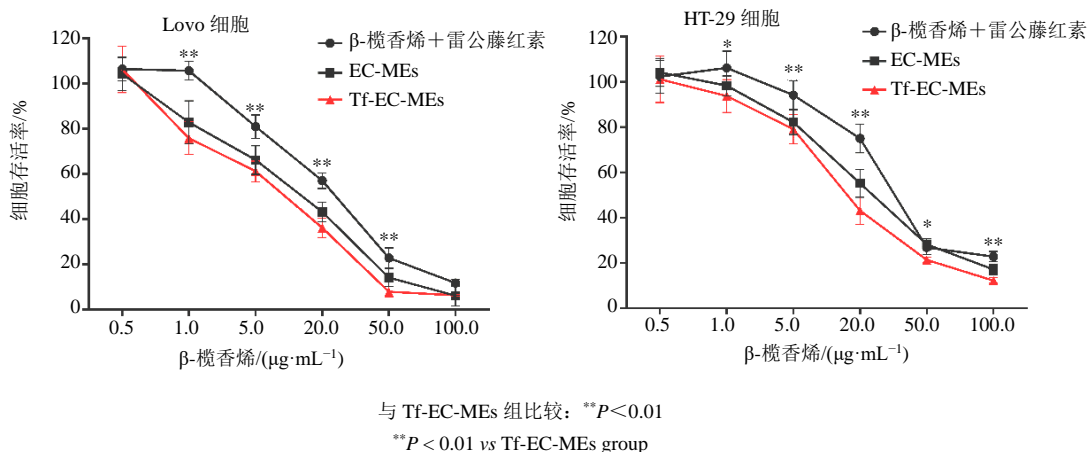


图 4 微乳对细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 4 Antiproliferative effects of microemulsion against tumor cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

表 3 微乳对 2 种不同肠癌细胞的 IC<sub>50</sub> 和 CI ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 IC<sub>50</sub> and CI of various formulations against two types of lung cancer cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )		CI	
	Lovo 细胞	HT-29 细胞	Lovo 细胞	HT-29 细胞
β-榄香烯-雷公藤红素 40 : 1	17.5 ± 2.9	36.4 ± 3.6	0.89	0.96
EC-MEs	15.6 ± 0.9	33.6 ± 2.4	0.79	0.95
Tf-EC-MEs	11.7 ± 0.6 <sup>###</sup>	27.4 ± 1.2 <sup>**</sup>	0.61	0.72

与 β-榄香烯-雷公藤红素 40 : 1 组比较: \*\* $P < 0.01$  与 EC-MEs 组比较: <sup>##</sup> $P < 0.01$

\*\* $P < 0.01$  vs β-elemene-celastral 40 : 1 group <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs EC-MEs group

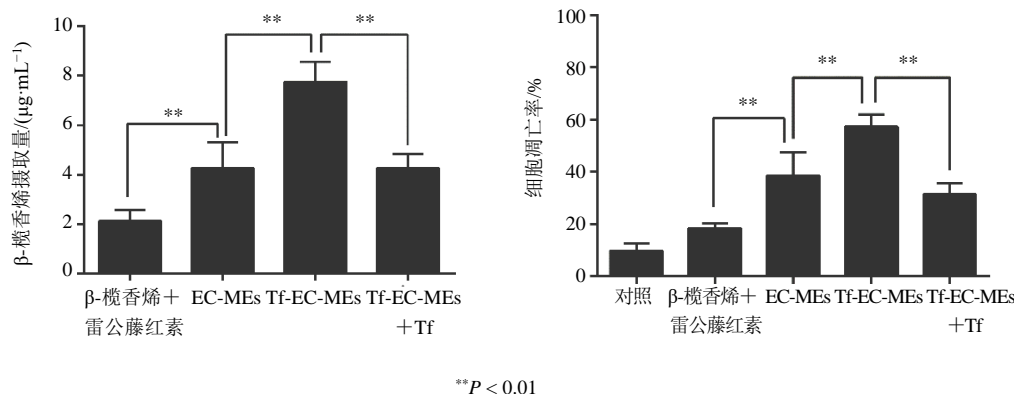
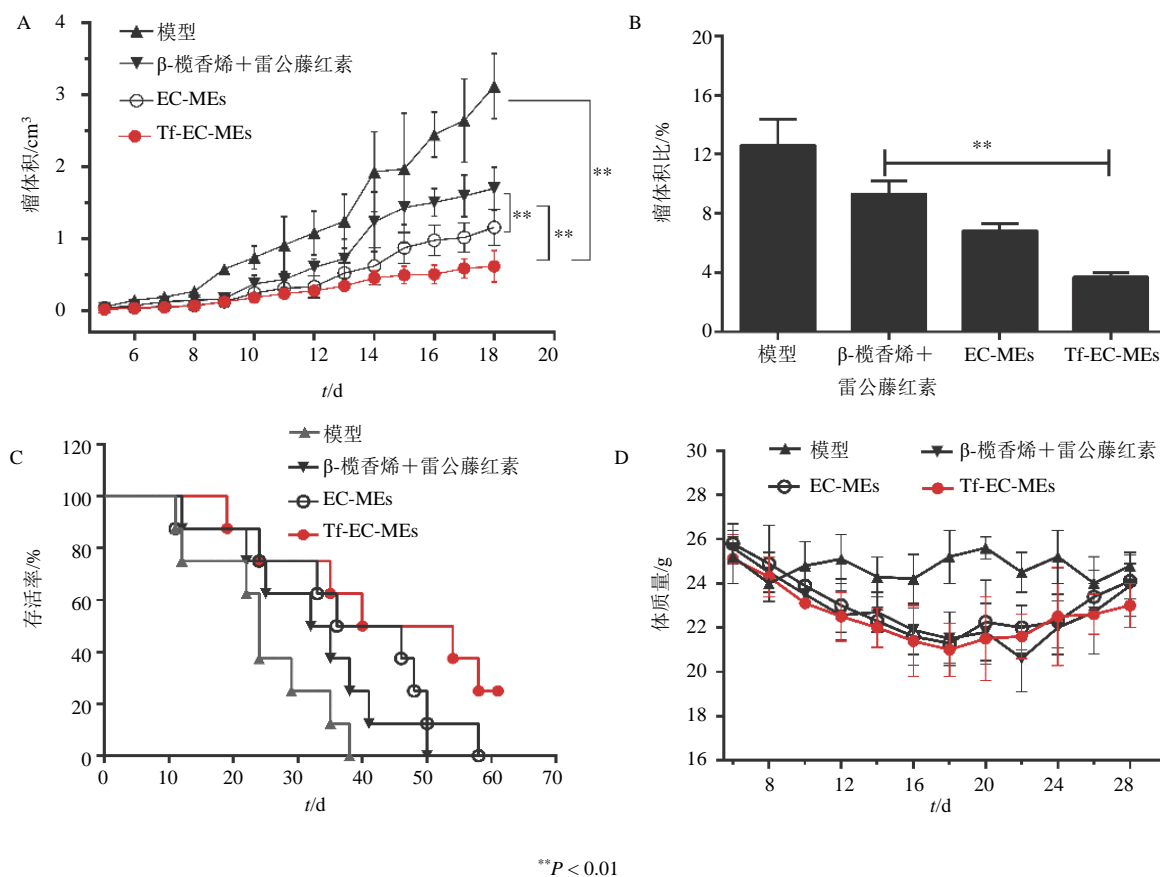


图 5 微乳对 Lovo 细胞摄取能力和细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Fig. 5 Cellular uptake and apoptosis induction of microemulsion in Lovo cells ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )



A-各组小鼠的肿瘤生长曲线 B-小鼠第 18 天和第 6 天肿瘤体积比 C-各组小鼠生存曲线 D-各组小鼠体重变化  
A-changes in tumor size B-ratio of volume of tumors at day 18 to that at day 6 C-survival curve of mice D-changes in body weight of mice

图 6 微乳对荷瘤小鼠的体内抗肿瘤活性 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Fig. 6 Antitumor activity of microemulsions in tumor-bearing mice model ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

均表现出明显的肿瘤生长抑制作用。相比 β-榄香烯 + 雷公藤红素组, EC-MEs 表现出更显著的抗肿瘤活性, 可能的原因有 2 点: (1) 纳米给药系统的渗透及滞留增强 (EPR) 效应提高了被动靶向递药效率; (2) 双药共传递优化了协同抗肿瘤效率。Tf-EC-MEs 的肿瘤抑制活性比 EC-MEs 更强, 体现出 Tf 修饰带来的靶向抗肿瘤优势。最后 1 次给药与第 1 次给药时裸鼠瘤体积比值 (图 6-B) 反映的是给药期间肿瘤的增长情况。在此期间, 对照组和物理混合组裸鼠肿瘤体积分别增长了约 12 倍和 9 倍, 而微乳组的裸鼠肿瘤体积增长趋势明显减缓, 其中 Tf-EC-MEs 组的增长比值显著低于其他治疗组。此外, Tf-EC-MEs 组裸鼠的生存率在 60 d 后可达到 37.5%, 而 EC-MEs 和 β-榄香烯 + 雷公藤红素组裸鼠的最大生存时间分别为 58 d 和 52 d (图 6-C)。雷公藤红素在抗肿瘤过程中常导致动物体质量锐减, 影响给药方案的实施。本研

究不仅借助纳米技术减少药物的体内毒性, 还同时采用小剂量 + 间隔给药的方式控制体质量骤减问题。如图 6-D 所示, Tf-EC-MEs 组在第 14 天时动物体质量降至最低点, 但在第 16 天开始恢复平稳, 整个治疗过程体质量丢失率控制在 16% 以内, 在保证抗肿瘤疗效的同时, 也将安全性调整至可控范围。

通过 HE 染色切片和 Ki-67 免疫组化切片观察 Tf-EC-MEs 治疗后对肿瘤组织内的肿瘤细胞坏死和增殖能力的影响。如图 7-A (箭头) 所示, Tf-EC-MEs 给药组的 HE 染色切片细胞核明显弥散、破裂, 提示肿瘤细胞大量坏死, 而 β-榄香烯 + 雷公藤红素组的肿瘤细胞核形态相对完整, 表明协同抗肿瘤优势未能完全发挥。此外考察了 Ki-67<sup>+</sup> (一种细胞增殖标志物<sup>[17]</sup>) 细胞免疫组化情况, 如图 7-B 所示, Tf-EC-MEs 给药组瘤切片的褐色区域明显少于其他给药组, 提示经过该制剂治疗后, 肿瘤细胞增殖受



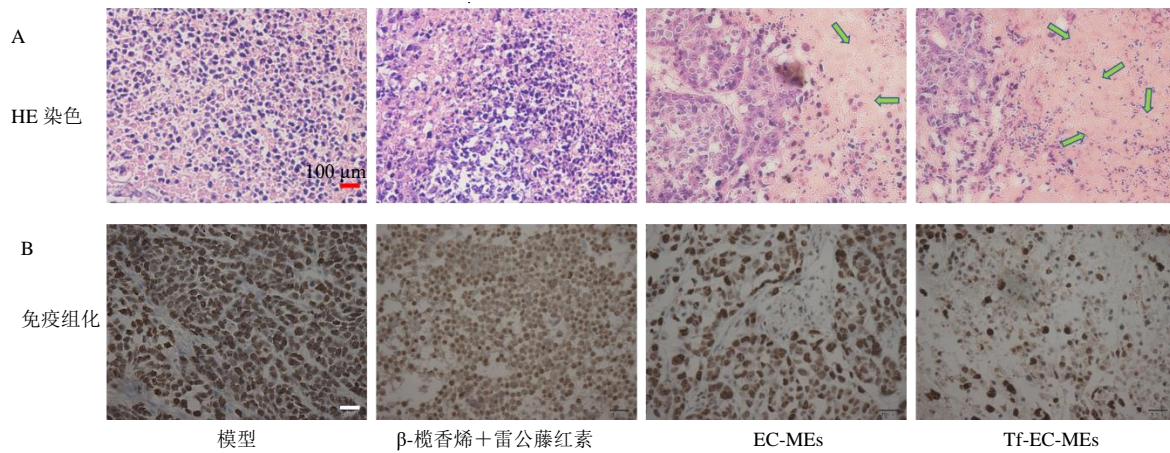


图 7 各组裸鼠肿瘤的 HE 染色 (A) 及 Ki-67 免疫组化 (B) 结果

Fig. 7 HE-stained images of tumor sections (A) and immunohistochemical image of tumor sections (B) of mice

到了明显的抑制。这些病理学研究再一次证明了 Tf-EC-MEs 所具备的靶向治疗和共传递药物特性在抗结肠癌过程中的优势。

#### 4 讨论

肿瘤细胞通过多种调控增殖和抗凋亡的通路逃避药物对其的攻击<sup>[18]</sup>，因此在临床抗肿瘤治疗过程中，往往采用多药联用的手段协同抑制肿瘤的发生发展。然而，多药联用治疗肿瘤的最大难点在于各药物之间的体内生物药剂学特性差异性，导致协同治疗效率难以得到优化。纳米给药系统是药物共传递的理想载体，能够将理化性质差异较大的数种药物同时送到靶区域，不仅避免了药物因无选择性分布而导致的毒副作用，还改善了多药之间的联合治疗效率。微乳作为一种多组分协同共传递的纳米给药系统，能够有效地将多种药物组合在同一体系中，在抗肿瘤领域有广阔的应用前景。但是，微乳的常规辅料添加量较高，载药量较低，限制了这种剂型的大规模应用。Qu 等<sup>[19]</sup>针对微乳的这种问题，提出了“药辅合一”的设计理念，用具有抗肿瘤活性的薏苡仁油作为油相，搭载化疗药物，极大地提高了系统载药量，整合了多种药物之间的抗肿瘤优势。受此思路启发，本研究用同为油类药物的 β-榄香烯作为油相，难溶性中药成分雷公藤红素作为包埋药物，以 DSPE-PEG-Tf 作为亲和/识别肿瘤细胞的靶配体，引入可作为注射用的乳化剂 HS15，组装一种能够靶向到结直肠癌细胞的双药共传递微乳体系。

本研究首先验证了 β-榄香烯与雷公藤红素在 2 种结直肠癌细胞模型上均具有协同抗肿瘤作用，确

立了两药联合应用的必要条件。在此基础上，摸索出 2 组分抗肿瘤的最佳质量配比，并以此组装一种可高效共传递这种质量配比的药物传递系统 EC-MEs。该系统在细胞水平和体内水平均表现出比物理混合组明显的抗肿瘤优势，提示共传递系统对于优化 2 种药物的协同效率具有重要的意义。此外，通过将 Tf 修饰到微乳表面后，Tf-EC-MEs 在制剂学行为上没有发生显著的改变，但是在体内和体外水平均表现出比 EC-MEs 更为显著的协同治疗效果，这种效果通过初步的机制实验被认定为是由于肿瘤细胞摄取增强所致。这些结果也提示理性的药物组合、合理的质量配比、较好的细胞摄取和优良的肿瘤细胞识别能力对于多药协同共传递系统联合治疗肿瘤的重要性。本研究所设计的 Tf-EC-MEs 为多组分协同靶向抗结直肠癌提供了一种有前景的解决方案。

#### 参考文献

- [1] Fang J Y, Dong H L, Sang X J, *et al.* Colorectal cancer mortality characteristics and predictions in China, 1991—2011 [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(17): 7991-7995.
- [2] Zheng Z X, Zheng R S, Zhang S W, *et al.* Colorectal cancer incidence and mortality in China, 2010 [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(19): 8455-8460.
- [3] Douillard J Y, Siena S, Cassidy J, *et al.* Final results from PRIME: Randomized phase III study of panitumumab with FOLFOX4 for first-line treatment of metastatic colorectal cancer [J]. *Ann Oncol*, 2014, 25(7): 1346-1355.
- [4] 隋 华, 靳宝辉, 殷佩浩, 等. 脾解毒方对人结肠癌多药耐药细胞的逆转作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*,

- 2012, 18(9): 196-200.
- [5] Li J, Jun Y, Liu A, *et al.*  $\beta$ -Elemene against human lung cancer via up-regulation of P53 protein expression to promote the release of exosome [J]. *Lung Cancer*, 2014, 86(2): 144-150.
- [6] Liu Y, Jiang Z Y, Zhou Y L, *et al.*  $\beta$ -Elemene regulates endoplasmic reticulum stress to induce the apoptosis of NSCLC cells through PERK/IRE1 $\alpha$ /ATF6 pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, doi: 10.1016/j.biopha.2017.06.073.
- [7] 赵志梅, 张立杰, 夏天, 等. 莪术主要单体成分抗炎、抗肿瘤作用研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2017, 40(1): 119-124.
- [8] Hu C J, Zhao X L, Li J Z, *et al.* Preparation and characterization of  $\beta$ -elemene-loaded microemulsion [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2011, 37(7): 765-774.
- [9] Wang Y, Deng Y, Mao S, *et al.* Characterization and body distribution of beta-elemene solid lipid nanoparticles (SLN) [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2005, 31(8): 769-778.
- [10] Corson T W, Crews C M. Molecular understanding and modern application of traditional medicines: Triumphs and trials [J]. *Cell*, 2007, 130(5): 769-774.
- [11] Lu L, Shi W, Deshmukh R R, *et al.* Tumor necrosis factor- $\alpha$  sensitizes breast cancer cells to natural products with proteasome-inhibitory activity leading to apoptosis [J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e113783.
- [12] Hu M, Luo Q, Alitongbieke G, *et al.* Celastrol-induced Nur77 Interaction with TRAF2 alleviates inflammation by promoting mitochondrial ubiquitination and autophagy [J]. *Mol Cell*, 2017, 66(1): 141-153.
- [13] Xu S W, Law B Y, Mok S W, *et al.* Autophagic degradation of epidermal growth factor receptor in gefitinib-resistant lung cancer by celastrol [J]. *Int J Oncol*, 2016, 49(4): 1576-1588.
- [14] Shah M A, Zhang X, Rossin R, *et al.* Metal-free cycloaddition chemistry driven pretargeted radioimmunotherapy using  $\alpha$ -particle radiation [J]. *Bioconjug Chem*, 2017, 28(12): 3007-3015.
- [15] Ding B, Wahid M A, Wang Z, *et al.* Triptolide and celastrol loaded silk fibroin nanoparticles show synergistic effect against human pancreatic cancer cells [J]. *Nanoscale*, 2017, 9(32): 11739-11753.
- [16] Yang F Q, Wang Y T, Li S P. Simultaneous determination of 11 characteristic components in three species of *Curcuma rhizomes* using pressurized liquid extraction and high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1134(1/2): 226-231.
- [17] Nielsen P S, Bentzer N K, Jensen V, *et al.* Immunohistochemical Ki-67/KL1 double stains increase accuracy of Ki-67 indices in breast cancer and simplify automated image analysis [J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2014, 22(8): 568-576.
- [18] Ho W S, Wang H, Maggio D, *et al.* Pharmacologic inhibition of protein phosphatase-2A achieves durable immune-mediated antitumor activity when combined with PD-1 blockade [J]. *Nat Commun*, 2018, doi: 10.1038/s41467-018-04425-z.
- [19] Qu D, He J, Liu C, *et al.* Triterpene-loaded microemulsion using *Coix lacryma-jobi* seed extract as oil phase for enhanced antitumor efficacy: Preparation and *in vivo* evaluation [J]. *Int J Nanomed*, 2014, doi: 10.2147/IJN.S54796.