

# 齐墩果酸线粒体靶向脂质体的制备及抗胰腺癌研究

谭晓柯<sup>1</sup>, 武香香<sup>2</sup>, 曾华辉<sup>2</sup>, 朱鑫<sup>1\*</sup> (1. 河南中医药大学药学院, 郑州 450046; 2. 河南中医药大学中医药科学院, 郑州 450046)

**摘要:** **目的** 制备齐墩果酸(OA)线粒体靶向脂质体( $\alpha$ -TOS-TPP-OA), 以实现药物的靶向性并提高其抗胰腺癌的活性。**方法** 通过两步反应, 合成三苯基膦(TPP)修饰的生育酚琥珀酸酯( $\alpha$ -TOS)得到线粒体靶向载体( $\alpha$ -TOS-TPP); 采用过膜挤压法制备 $\alpha$ -TOS-TPP-OA, 并通过超滤法分离 $\alpha$ -TOS-TPP-OA和游离药物, 测得其包封率和载药量; 通过动态光散射、透射电子显微镜对 $\alpha$ -TOS-TPP-OA的粒径大小、表面电荷、形态进行表征, 并通过线粒体共定位考察其线粒体靶向性; 通过MTT法和流式细胞仪考察OA、 $\alpha$ -TOS-TPP、 $\alpha$ -TOS-TPP+OA和 $\alpha$ -TOS-TPP-OA对胰腺癌细胞(Bxpc-3)增殖的抑制和诱导凋亡的作用。**结果** 制备的 $\alpha$ -TOS-TPP-OA平均粒径为(137.01±0.82) nm, PDI为(0.23±0.01), 表面电荷为+(43.09±1.22) mV;  $\alpha$ -TOS-TPP的包封率和载药量分别为(76.21±7.74)%和(39.06±5.51)%, OA的包封率和载药量分别为(70.96±9.13)%和(3.90±0.75)%; 能较好地定位于线粒体;  $\alpha$ -TOS-TPP-OA组与其他组相比抗胰腺癌的效果有明显增强。**结论**  $\alpha$ -TOS-TPP-OA具有良好的稳定性和线粒体靶向性, 能增强OA的抗胰腺癌活性。

**关键词:** 三苯基膦; 胰腺癌; 齐墩果酸; 脂质体; 线粒体靶向

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)05-1057-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.017

## Preparation of oleanolic acid mitochondrial targeting liposome and its anti-pancreatic cancer effect

TAN Xiao-ke<sup>1</sup>, WU Xiang-xiang<sup>2</sup>, ZENG Hua-hui<sup>2</sup>, ZHU Xin<sup>1\*</sup> (1. School of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046; 2. Academy of Chinese Medical Sciences, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046)

**Abstract: Objective** To prepare oleanolic acid (OA) mitochondria-targeted liposomes ( $\alpha$ -TOS-TPP-OA) for drug targeting and improve anti-pancreatic cancer activity. **Methods** A mitochondrial targeting carrier ( $\alpha$ -TOS-TPP) was synthesized from tocopherol succinate ( $\alpha$ -TOS) modified by triphenylphosphine (TPP) by two-step reaction. The  $\alpha$ -TOS-TPP-OA was prepared by extrusion through the membrane. Free drugs and  $\alpha$ -TOS-TPP-OA were separated by ultrafiltration, and the entrapment efficiency and drug loading were measured. The particle size, surface charge and morphology of  $\alpha$ -TOS-TPP-OA were characterized by dynamic light scattering and transmission electron microscope. The targeting property of  $\alpha$ -TOS-TPP-OA was determined by co-localization of mitochondria. The effects of OA,  $\alpha$ -TOS-TPP,  $\alpha$ -TOS-TPP + OA and  $\alpha$ -TOS-TPP-OA on the proliferation and apoptosis of pancreatic cancer cells (BxPC-3) were investigated by MTT and flow cytometry. **Results** The average particle size, PDI and surface charge of  $\alpha$ -TOS-TPP-OA were (137.01±0.82) nm, (0.23±0.01) and + (43.09±1.22) mV, respectively. The entrapment efficiency and drug loading of  $\alpha$ -TOS-TPP were (76.21±7.74)% and (39.06±5.51)%, while the entrapment efficiency and drug loading of OA were (70.96±9.13)% and (3.90±0.75)%. The anti-pancreatic cancer effect of  $\alpha$ -TOS-TPP-OA group was much stronger than that of other groups. **Conclusion**

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (No.U1604185, No.21601053); 河南省优秀青年基金项目 (No.212300410057); 河南省科技攻关项目 (No.202102310515); 河南省科技创新人才工程项目 (No.20HASTIT050); 河南省教育厅重点科研项目 (No.20B350003)。

**作者简介:** 谭晓柯, 男, 在读硕士研究生, 主要从事药物剂型研究, email: 3154468622@qq.com \*通信作者: 朱鑫, 女, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事药物化学研究, email: 13603869261@139.com

$\alpha$ -TOS-TPP-OA has good stability and mitochondrial targeting, which can enhance the anti-pancreatic cancer activity of OA.

**Key words:** triphenylphosphine; pancreatic cancer; oleanolic acid; liposome; mitochondrial targeting

胰腺癌 (pancreatic cancer, PC) 是一种难治性恶性肿瘤<sup>[1]</sup>, 预后非常差, 通常在确诊后, 只有 24% 的人存活 1 年, 9% 的人存活 5 年<sup>[2]</sup>。预后不良的主要原因是缺乏早期症状、肿瘤进展迅速以及局部/转移性疾病的有效药物疗效有限<sup>[3]</sup>。

齐墩果酸 (oleanolic acid, OA) 是一种五环三萜类天然产物, 广泛存在于多种中药材中, 如三七、怀牛膝、甘草、石斛夹竹桃和女贞等<sup>[4]</sup>。研究发现, OA 具有多种有益的药理学活性, 比如抗氧化作用、抗炎作用、降糖作用、抗病毒作用、肝功能保护作用、胃黏膜保护作用、抗微生物作用、抗肿瘤作用等<sup>[5]</sup>。虽然 OA 具有一定的抗肿瘤活性, 能够抑制多种肿瘤细胞的增殖<sup>[6]</sup>, 但该药物的水溶性较差, 在水中的溶解度仅为  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 肠黏膜透过性较差且具有较大的首过效应, 致使其生物利用度低且个体间差异较大, 这些性质限制了其临床应用与开发<sup>[7]</sup>。目前, OA 在市场上销售的药物制剂只有片剂和胶囊剂, 国内外有关学者进行了 OA 新剂型的研究, 大多数新型制剂制备工艺较复杂, 载药量低, 对设备要求较高, 而且存在靶向性较低的问题, 使药物疗效不佳以及易产生不良反应<sup>[8]</sup>。因此, 我们需要开发基于脂质体的靶向性制剂来提高 OA 的治疗效果, 并减少毒副作用。

$\alpha$ -生育酚琥珀酸酯 ( $\alpha$ -TOS) 是维生素 E 最主要的成分  $\alpha$ -生育酚 ( $\alpha$ -TOH) 的一种酯化衍生物。维生素 E 在储存和应用过程中易被氧化, 因而常将其酯化衍生物作为商业的供应形式,  $\alpha$ -TOS 即是其中的一种<sup>[9]</sup>。近年来研究发现,  $\alpha$ -TOS 除作为维生素 E 的供应前体外, 还具有广泛的抗肿瘤活性, 可通过多种机制发挥抗肿瘤作用, 如诱导细胞凋亡、抑制 NF- $\kappa$ B 功能、抑制血管生成等。此外,  $\alpha$ -TOS 能选择性杀死肿瘤细胞而对正常组织无不良反应<sup>[10]</sup>。三苯基磷基团 (TPP) 中含有 3 个苯基, 使得整个分子具有很强的脂溶性, 同时 TPP 中磷原子上的正电荷可以离域到 3 个苯环上, 在更大空间分散正电荷, 降低扩散渗透膜时的自由能, 促使 TPP 穿越磷脂膜。正常细胞的线粒体膜电位为  $- (130 \sim 150) \text{ mV}$ , 远高于内质网、核糖体等细胞器的膜电位, 因此亲脂性阳离子可以很容易地通过脂质双分子层的疏水屏障并在线粒体中积聚。此外, 肿瘤细胞较

正常细胞具有更高的线粒体膜电位 (大约为 200 mV), 可将抗肿瘤药物优先靶向肿瘤细胞的线粒体, 诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[11]</sup>。因此, 通过亲脂性阳离子对抗肿瘤药物进行修饰, 可以实现将药物递送至线粒体的目的。

因此, 本研究通过 TPP 修饰  $\alpha$ -TOS 构成具有线粒体靶向能力的三苯基磷基生育酚琥珀酸酯 ( $\alpha$ -TOS-TPP) 偶联物作为线粒体靶向载体, 以期通过静电作用使药物更容易富集于肿瘤细胞线粒体。此外脂质体表面修饰聚乙二醇 (PEG) 可使脂质体清除速率减慢, 延长其在血液中的循环时间, 提高 OA 的生物利用度, 进而提高其抗肿瘤活性。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); 手动挤压器 (型号: HE8433 Genizer 公司); 粒径分析仪 (型号: 250144, Brookhaven Instruments); 高倍显微镜 (型号: TS100, Nikon); 万分之一电子天平 (型号: AL204, 梅特勒-托利多仪器上海有限公司); 透射电子显微镜 [型号: JEM-1230 (HC)]; UV-2201 紫外分光光度计 (日本岛津公司); 全波长酶标仪 (Multiskan GO); 激光共聚焦显微镜 (德国, ZEISS); 流式细胞仪 (美国贝克曼)。

### 1.2 试剂

$\alpha$ -TOS (阿拉丁, 批号: T109349, 纯度 > 98%); 6-溴正己醇 (阿拉丁, 批号: B138834, 纯度 > 97%); 三苯基磷 (阿拉丁, 批号: T104475, 纯度 > 99.0%); 大豆卵磷脂 (阿拉丁, 批号: B1504087, 纯度 > 98%); 胆固醇 (北京百灵威科技有限公司, 批号: LK40Q28, 纯度: 95%); PEG (SIGMA, 批号: BCBQ6878V); 二甲基亚砜 (Solarbio, 批号: 710N032, 细胞培养级); 香豆素 6 (阿拉丁, 批号: 12009083, 纯度 > 98.0%); Mito-Tracker Red (Beyotime, 批号: 062320210302); DAPI 溶液 (Solarbio, 批号: 20190923); Annexin V-FITC/PI apoptosis kit 凋亡试剂盒 (联科生物, 批号: A11015); 其他试剂均为分析纯。

### 1.3 细胞

胰腺癌 BxPC-3 细胞 (武汉普诺赛生命科技

有限公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 $\alpha$ -TOS-TPP 的合成

将  $\alpha$ -TOS (5.0000 g, 9.4201 mmol)、6-溴正己醇 (1938.3  $\mu$ L, 14.1302 mmol)、二环己基碳二亚胺 (2.3307 g, 11.3041 mmol)、4-二甲基吡啶 (0.0575 g, 0.4710 mmol) 分别用适量二氯甲烷溶解后, 在冰浴条件下, 将其混合, 搅拌 10 min 后转至室温, 再搅拌 12 h 后加入 6-溴正己醇 (646.1  $\mu$ L, 4.7101 mmol), 继续搅拌 12 h<sup>[12]</sup>。通过柱层析分离收集, 初始展开剂为石油醚-乙酸乙酯 (24:1), 之后适当改变比例增大极性, 收集的预测产物在真空管干燥箱 60  $^{\circ}$ C 下减压干燥 5 h, 得到无色或浅黄色油状物化合物 A, 收率为 64.56%。经核磁验证, 如图 1 所示。

取化合物 A (3.0769 mmol, 2.1349 g)、三苯基膦 (6.1538 mmol, 1.6141 g)、无水  $K_2CO_3$  (0.3000 g) 在适量乙腈中混合, 90  $^{\circ}$ C 回流 30 h<sup>[12]</sup>。过滤除去  $K_2CO_3$  后, 浓缩滤液, 加入石油醚超声, 过滤除去滤液, 不溶物经柱层析, 初始展开剂为乙酸乙酯-甲醇 (20:1), 之后适当改变比例增大极性, 收集的预测产物在真空管干燥箱 60  $^{\circ}$ C 下减压干燥 5 h, 得到无色或浅黄色油状物化合物 B, 收率为 46%, 纯度为 98.53%。经核磁验证, 如图 2 所示。

通过  $^1H$ -NMR 对化合物 A 和 B 进行了表征。在化合物 A 的  $^1H$ -NMR 谱中, 在  $\delta = 4.11 \sim 4.14$  (2H) 和 3.37 ~ 3.41 (2H) 处出现的三重峰, 在  $\delta = 1.84 \sim 1.91$  (2H), 1.78 ~ 1.86 (2H), 1.74 ~ 1.81 (2H), 1.64 ~ 1.71 (2H) 处出现的多重峰证实了 6-溴正己醇通过酯键与  $\alpha$ -TOS 连接。 $\delta = 2.92 \sim 2.95$  (2H)、2.75 ~ 2.80 (2H)、2.58 ~ 2.64 (2H) 处存在三重峰和代表单线态峰,  $\delta = 2.09$  (3H)、2.02 (3H)、1.98 (3H) 证实了  $\alpha$ -TOS 部分的存在, 如图 1。在化合物 B 的  $^1H$ -NMR 谱中,  $\delta = 7.6 \sim 7.9$  (15H) 证实了苯基的存在, 剩余特征质子峰与化合物 A 位置相同, 如图 2。经验证化合物 B 为  $\alpha$ -TOS-TPP。

### 2.2 $\alpha$ -TOS-TPP-OA 的制备

精密称取 5.0 mg 卵磷脂, 10.0 mg  $\alpha$ -TOS-TPP, 1.0 mg OA, 1.0 mg 胆固醇, PEG 1.0 mg (1:2:0.2:0.2:0.2) 分别溶于 2.0 mL 的二氯甲烷中, 混合上述溶液, 20  $r \cdot min^{-1}$ 、40  $^{\circ}$ C 下旋转蒸发除去二氯甲烷, 40  $^{\circ}$ C 真空干燥 2 h 以彻底除去有机溶剂, 加入去离子无菌水 2.0 mL, 60  $^{\circ}$ C 下磁力搅拌水化 2 h, 250 W 水浴超声 5 min, 在 60  $^{\circ}$ C 下依次挤压通过 200 nm、100 nm 聚碳酸酯

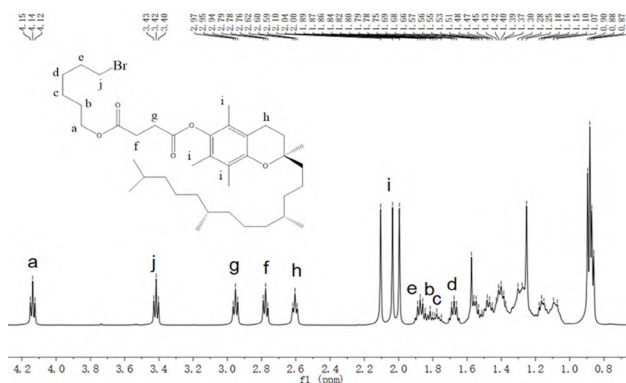


图 1 化合物 A 的氢核磁谱图

Fig 1  $^1H$ -NMR spectrum of compound A

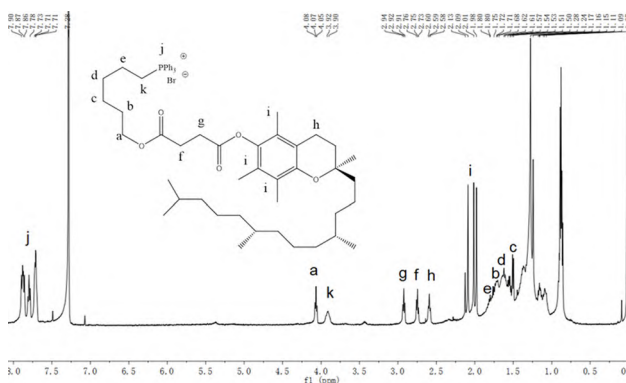


图 2 化合物  $\alpha$ -TOS-TPP 的氢核磁谱图

Fig 2  $^1H$ -NMR spectrum of compound  $\alpha$ -TOS-TPP

膜, 即得  $\alpha$ -TOS-TPP-OA, 在 4  $^{\circ}$ C 下储存备用<sup>[13]</sup>。

### 2.3 形态、粒径和电位

在室温下采用粒径分析仪对制备的脂质体的粒径与多分散系数 (PDI) 进行表征, 结果平均粒径为 (137.0  $\pm$  0.82) nm, PDI 为 (0.23  $\pm$  0.01), PDI 的值较大, 可能是因为挤压膜时聚碳酸酯膜的孔径大小不一所造成的, 如图 3A 所示。使用  $\alpha$ -TOS 制备的  $\alpha$ -TOS-OA, 测得其 Zeta 电位为 - (31.9  $\pm$  0.97) mV, 将  $\alpha$ -TOS 换成  $\alpha$ -TOS-TPP 后制备的  $\alpha$ -TOS-TPP-OA 的 Zeta 电位为 + (43.09  $\pm$  1.22) mV, Zeta 电位由负电荷转变为正电荷, 见图 3B, 说明 TPP 可分散在脂质体表面, 使其具有线粒体靶向的能力, 与预期一致。采用高倍透射电子显微镜观察  $\alpha$ -TOS-TPP-OA 的形貌, 形态见图 3C ~ 3E。由电镜照片可以观察到, 脂质体单分散, 呈球形, 粒度较均一, 其结果与粒径仪所测到的脂质体粒径相吻合。

### 2.4 包封率和载药量的测定

**2.4.1  $\alpha$ -TOS-TPP 标准曲线的建立** 配制质量浓度为 10、30、50、80、120 和 150  $\mu g \cdot mL^{-1}$  的溶液, 通过紫外可见分光光度计在  $\lambda = 287$  nm 检测溶液的吸光度。以吸光度 (y) 对质量浓度 (x) 进行线性拟合, 得到回归方程  $y =$

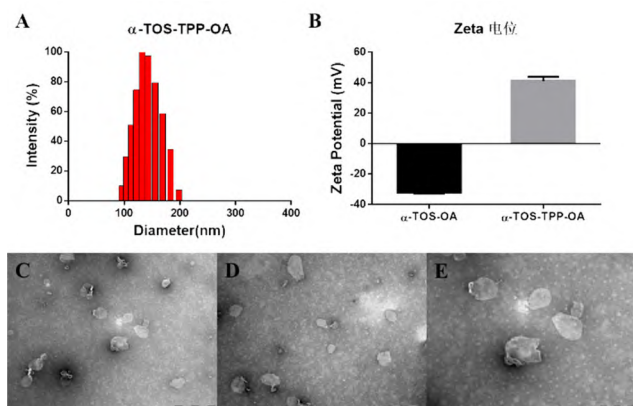


图3  $\alpha$ -TOS-TPP-OA 的粒径分布 (A)、Zeta 电位及透射电子显微镜图 (C~E)

Fig 3 Particle size distribution (A), Zeta potential (B), and transmission electrons (C~E) of  $\alpha$ -TOS-TPP-OA microscope picture

$10.082x + 0.1995$ ,  $R^2 = 0.997$ , 表明  $\alpha$ -TOS-TPP 在  $10 \sim 150 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  内与吸光度线性关系良好。  
**2.4.2 OA 标准曲线的建立** 采用高效液相色谱法 (HPLC) 测定 OA 的含量。采用 ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5  $\mu\text{m}$ )；流动相：甲醇-1%醋酸水 (90:10, V/V)；柱温：25  $^{\circ}\text{C}$ ；流速：1.0 mL·min<sup>-1</sup>；波长：220 nm；进样量：20  $\mu\text{L}$ 。配制质量浓度为 10、50、80、100、150、200 和 300  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 OA 溶液，进样测定，以峰面积 ( $y$ ) 对质量浓度 ( $x$ ) 进行线性拟合，得回归方程  $y = 5495.8x - 34.366$ ,  $R^2 = 0.9991$ , 表明 OA 在  $10 \sim 300 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  内与峰面积线性关系良好。

取 1.0 mL  $\alpha$ -TOS-TPP-OA 溶液置于超滤离心管内 (截留相对分子质量为 30 000)，以 4000 r·min<sup>-1</sup> 离心 30 min，分离溶液中游离的 OA 及  $\alpha$ -TOS-TPP，截留在离心管内的为  $\alpha$ -TOS-TPP-OA，离心管内加入 5 倍体积的甲醇破坏脂质体结构，促使 OA 和  $\alpha$ -TOS-TPP 从胶束中释放出来，采用 HPLC 测定脂质体中包封的 OA 质量，离心管外为游离的 OA，采用同样的方法可测定游离的 OA 的质量。 $\alpha$ -TOS-TPP 的含量则通过紫外可见分光光度计在  $\lambda = 287 \text{ nm}$  检测；用以下公式计算包封率和载药量：

包封率 = 脂质体内包封的药物质量 / (脂质体内包封的药物质量 + 未包封的游离药物质量) × 100%

载药量 = 包封于脂质体内的药物质量 / (载体的质量 + 脂质体包封的药物总质量) × 100%

经计算得到  $\alpha$ -TOS-TPP 的包封率和载药量分别为 (76.21±7.74)% 和 (39.06±5.51)%，OA 的包封率和载药量分别为 (70.96±9.13)% 和 (3.90±0.75)%。

## 2.5 脂质体的稳定性

将  $\alpha$ -TOS-TPP-OA 分别在 4  $^{\circ}\text{C}$  纯水中及 37  $^{\circ}\text{C}$  的 PBS 环境中分别存放 7 d 和 3 d，模拟存储环境和体内环境，检测其粒径及 PDI 变化。如图 4 所示，在 4  $^{\circ}\text{C}$  的纯水下储存 7 d 后粒径从 (137.0±0.82) nm 变为 (131.1±0.80) nm，PDI 从 (0.227±0.005) 变为 (0.248±0.009)。在 37  $^{\circ}\text{C}$  的 PBS 储存 3 d 后，粒径增加到 (176.7±3.9) nm，PDI 则变为 (0.257±0.013)。由此表明，该脂质体在 4  $^{\circ}\text{C}$  的纯水中有良好的储存稳定性，且在 37  $^{\circ}\text{C}$  的 PBS 中也有较好的稳定性 (见图 4)。

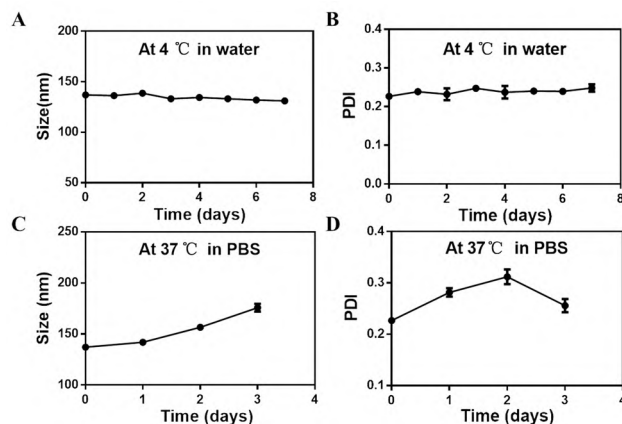


图4  $\alpha$ -TOS-TPP-OA 的稳定性

Fig 4 Stability of  $\alpha$ -TOS-TPP-OA

## 2.6 线粒体靶向

由于 OA 自身不发荧光，因此采用脂溶性的带绿色荧光的香豆素 6 作为替代 OA 的模型药物，按“2.1”“2.2”项下方法制备含有香豆素 6 (C6) 的脂质体。将 BxPC-3 细胞以  $1 \times 10^4$  个的密度接种于 24 孔培养板内，用血清培养基培养 24 h，将质量浓度为 100 ng·mL<sup>-1</sup> 的载 C6 (显绿色荧光) 的  $\alpha$ -TOS-C6 和载 C6 的  $\alpha$ -TOS-TPP-C6 加入其中，再与细胞共同孵育 1、3 h 后，用 37  $^{\circ}\text{C}$  的 PBS 洗涤。用 100 nmol·L<sup>-1</sup> 的 Mitotracker Red 染线粒体 (红色荧光) 20 min，10  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 DAPI 溶液染细胞核 (蓝色荧光) 5 min，然后在激光共聚焦显微镜下观察 C6 在细胞内的分布情况。

结果如图 5 所示，孵育 1、3 h 后，含有 C6 的脂质体进入肿瘤细胞，且随着孵育时间的延长，绿色荧光逐渐增强，表明随着孵育时间的延长，肿瘤细胞对脂质体的摄取增加。带有绿色荧光的脂质体与呈红色荧光的线粒体重合，会呈现为黄色。随着孵育时间的增加黄色逐渐变深，说明脂质体逐步聚集在线粒体周围。脂质体与线粒体的共定位通过皮尔逊系数 (PCC) 来体现，通过 Image J 分析的到共定位散点图及 PCC。通过共定位散点图表明，随着孵育时间的增加， $\alpha$ -TOS-TPP-C6 的红色荧光和绿色荧光共定位关

系明显好于  $\alpha$ -TOS-C6。PCC 结果如图 6 显示,  $\alpha$ -TOS-TPP-C6 的 PCC 明显高于  $\alpha$ -TOS-C6, 且存在显著性差异。由此可知, TPP 阳离子能促进脂质体聚集在肿瘤细胞的线粒体部位。

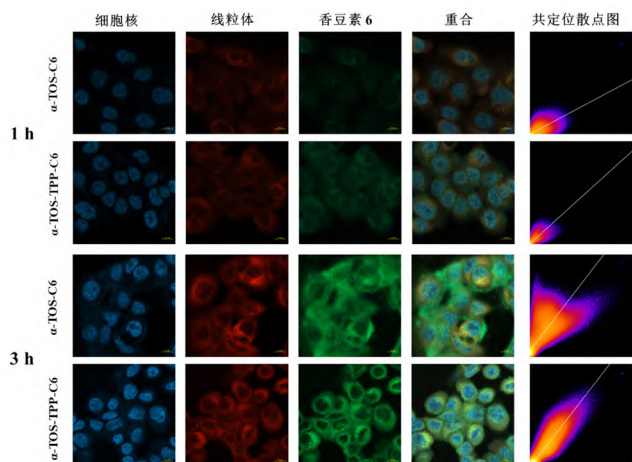


图 5  $\alpha$ -TOS-C6 和  $\alpha$ -TOS-TPP-C6 孵育 1、3 h 后激光共聚焦显微镜图片及共定位散点图

Fig 5 Confocal laser confocal microscopy images and colocalization scatter plots of  $\alpha$ -TOS-C6 and  $\alpha$ -TOS-TPP-C6 after incubation for 1 and 3 h

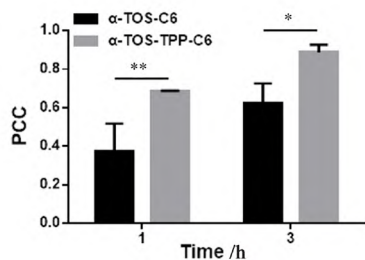


图 6  $\alpha$ -TOS-C6 和  $\alpha$ -TOS-TPP-C6 孵育 1、3 h 后的 PCC 值 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig 6 PCC of  $\alpha$ -TOS-C6 and  $\alpha$ -TOS-TPP-C6 after 1 and 3 h incubation ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

注: 与同等条件下  $\alpha$ -TOS-C6 的比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

Note: Comparison with  $\alpha$ -TOS-C6 under the same conditions, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

### 2.7 细胞存活率的测定

将胰腺癌细胞株 BxPC-3 复苏传代, 在 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h, 然后分为 OA 组、 $\alpha$ -TOS-TPP 组、 $\alpha$ -TOS-TPP + OA 组和  $\alpha$ -TOS-TPP-OA 组, 给予对应药物处理, 由于不同给药组在相同浓度时的抑制率相差较大, 在计算 IC<sub>50</sub> 时容易造成误差, 故给药浓度有所不同。其中  $\alpha$ -TOS-TPP + OA 游离药物组和  $\alpha$ -TOS-TPP-OA 组的给药浓度为 1、2、5、10、15、20、25、30  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (以 OA 浓度为准), OA 组、 $\alpha$ -TOS 组和  $\alpha$ -TOS-TPP 组给药浓度为 15、20、25、30、35、40、45、50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 每个浓度设 6 个复孔, 加药后孵育 48 h 后, 取出 96 孔板, 避光条件下加入 MTT

溶液 20  $\mu\text{L}$ , 继续培养 4 h 后取出, 加入 150  $\mu\text{L}$  二甲基亚砜, 轻微振荡 10 min, 在 490 nm 波长下检测下吸光度, 计算 IC<sub>50</sub>。

结果如表 1 所示, 通过 TPP 对  $\alpha$ -TOS 的修饰,  $\alpha$ -TOS-TPP 对 BxPC-3 的抑制作用较  $\alpha$ -TOS 明显增加。 $\alpha$ -TOS-TPP + OA 给药组合对 BxPC-3 的抑制作用高于  $\alpha$ -TOS-TPP 和 OA 单独给药。而  $\alpha$ -TOS-TPP-OA 对 BxPC-3 的毒性高于  $\alpha$ -TOS-TPP + OA 的给药组合, 其 IC<sub>50</sub> 明显低于其他给药组。

表 1 OA、 $\alpha$ -TOS-TPP、 $\alpha$ -TOS-TPP + OA 游离药物和  $\alpha$ -TOS-TPP-OA 在 48 h 的 IC<sub>50</sub>

Tab 1 IC<sub>50</sub> of OA,  $\alpha$ -TOS-TPP,  $\alpha$ -TOS-TPP + OA free drugs and  $\alpha$ -TOS-TPP-OA at 48 h

药物种类	IC <sub>50</sub> / ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )
OA	57.04 ± 1.41
$\alpha$ -TOS	53.41 ± 4.09
$\alpha$ -TOS-TPP	27.51 ± 1.08
$\alpha$ -TOS-TPP + OA	16.84 ± 2.42
$\alpha$ -TOS-TPP-OA	8.65 ± 5.73

### 2.8 流式细胞仪检测细胞凋亡

为检测  $\alpha$ -TOS-TPP-OA 诱导 BxPC-3 细胞凋亡的作用, 将 BxPC-3 细胞以  $2 \times 10^6$  个每孔加入 6 孔板中, 孵育过夜贴壁。孔内分别加入相应 IC<sub>50</sub> 的  $\alpha$ -TOS-TPP-OA, 其中 OA、 $\alpha$ -TOS、 $\alpha$ -TOS-TPP 和  $\alpha$ -TOS-TPP + OA 的加入量与  $\alpha$ -TOS-TPP-OA 中相应含量相等。孵育 24 h 后, 分别收集孔中的细胞, PBS 洗涤两次后, 加入 5  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC 和 10  $\mu\text{L}$  PI 标记。通过流式细胞仪分析凋亡情况。如图 7 所示,  $\alpha$ -TOS-TPP-OA 处理的细胞处于早期和晚期凋亡阶段的分别占 45.34% 和 37.55%, 而  $\alpha$ -TOS-TPP + OA 分别诱导 46.74% 和 5.73% 的细胞进入早期和晚期凋亡阶段。从流式细胞仪分析可以看出,  $\alpha$ -TOS-TPP-OA 比  $\alpha$ -TOS-TPP + OA 能诱导更多的 BxPC-3 细胞凋亡, 可能是因为靶向作用让更多的药物进入线粒体所致。

### 3 讨论

OA 具有潜在的抗肿瘤活性, 可诱导许多肿瘤细胞系凋亡, 但 OA 的低水溶性和低渗透性限制了其使用<sup>[14]</sup>。因此, 有必要选择合适的纳米给药系统来增加 OA 的溶解度, 减少口服首过效应, 提高生物利用度。近年来, 为了克服低溶解度药物的缺点, 目前已有脂质体<sup>[15]</sup>、纳米脂质体<sup>[16]</sup>、纳米混悬剂<sup>[17]</sup>、口服微乳<sup>[18]</sup>、固体分散体<sup>[19]</sup>等剂型的报道, 但存在长期稳定性差、载药量小、靶向性多、仅依靠通透性保留 (EPR) 效应的被动靶向等不足。

$\alpha$ -TOS 能与线粒体电子传递链复合物 II 结合, 通过线粒体外膜通透性诱导不同类型肿瘤细

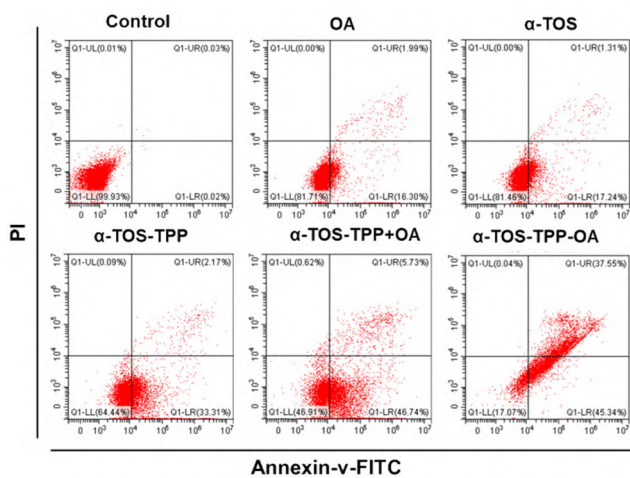


图7 流式细胞仪分析 OA、 $\alpha$ -TOS、 $\alpha$ -TOS-TPP、 $\alpha$ -TOS-TPP + OA 和  $\alpha$ -TOS-TPP-OA 诱导 BxPC-3 细胞凋亡的作用

Fig 7 Apoptosis of BxPC-3 cells induced by OA,  $\alpha$ -TOS,  $\alpha$ -TOS-TPP,  $\alpha$ -TOS-TPP + OA and  $\alpha$ -TOS-TPP-OA by flow cytometry

胞凋亡,从而损伤线粒体<sup>[20]</sup>。Mallick等<sup>[13]</sup>证明了 $\alpha$ -TOS-化疗药物偶联脂质体可以同时靶向肿瘤细胞中的线粒体和细胞核。本研究通过酯化反应将6-溴正己醇连接到 $\alpha$ -TOS上,该反应生成化合物A,进一步引入线粒体靶向TPP基团,得到 $\alpha$ -TOS-TPP。 $\alpha$ -TOS-TPP具有一定的亲脂性,更容易透过细胞膜,而且肿瘤细胞中的线粒体具有更高的膜电位,使得 $\alpha$ -TOS-TPP这种离域型亲脂阳离子(DLC)更容易选择性富集肿瘤细胞线粒体,因此使其一定程度上具有了线粒体靶向的能力<sup>[21]</sup>。

以 $\alpha$ -TOS-TPP作为线粒体靶向载体,制备了具有线粒体靶向性的OA脂质体,并且使用PEG对脂质体进行表面包覆,以避免单核吞噬系统,以确保长时间的血液循环。粒径的大小是通过独特的渗漏血管系统成功积聚到肿瘤组织中的重要决定因素之一,经证实,粒径为20~300 nm的胶束的血液循环时间和肿瘤聚集量随其直径的增大而增加,最佳粒径范围为100~160 nm<sup>[22]</sup>。该脂质体的粒径为(137.0±0.8) nm,可通过增强EPR效应和减少网状内皮系统(RES)的清除提高抗肿瘤效果和降低毒性<sup>[23]</sup>。此外, $\alpha$ -TOS-TPP-OA的表面电荷为+(43.09±1.22) mV,说明TPP覆盖在脂质体的表面,使得该脂质体表面带有正电荷,这可以使该脂质体通过胞吞进入细胞内后依靠静电效应向线粒体聚集,通过线粒体靶向性考察,证实了这一点。通过MTT实验和流式细胞仪分析发现, $\alpha$ -TOS-TPP-OA对BxPC-3细胞的抑制作用明显增强,这可能与 $\alpha$ -TOS-TPP-OA增加了药物在线粒体的聚集有关。

综上所述,本研究通过TPP对 $\alpha$ -TOS的修饰,合成了一种具有线粒体靶向性的载体,制备

了搭载OA的脂质体,并初步评价了其体外抗胰腺腺癌作用,为OA治疗胰腺癌提供了一种新的思路,但后续还需要更深入地开展细胞水平研究及动物体内实验对本结论进一步验证。

## 参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68 (6): 394-424.
- [2] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71 (1): 7-33.
- [3] Schizas D, Charalampakis N, Kole C, et al. Immunotherapy for pancreatic cancer: a 2020 update [J]. Cancer Treat Rev, 2020, 86: 102016.
- [4] Luo Y, Liu Z, Zhang X, et al. Effect of a controlled-release drug delivery system made of oleanolic acid formulated into multivesicular liposomes on hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo [J]. Int J Nanomedicine, 2016, 11: 3111-3129.
- [5] 李美雌, 卢婷, 赵建云, 等. 齐墩果酸和熊果酸的测定方法与药理作用研究进展 [J]. 青海草业, 2020, 29 (4): 58-63.
- [6] 毛午佳, 周立, 雷发敏, 等. 齐墩果酸结构修饰及抗肿瘤活性的探究 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2018, 25 (S1): 4-5.
- [7] Greatrex BW, Daines AM, Hook S, et al. Synthesis, formulation, and adjuvanticity of monodesmosidic saponins with oleanolic acid, hederagenin and gypsogenin aglycones, and some c-28 ester derivatives [J]. Chem Open, 2015, 4 (6): 740-755.
- [8] Nelson AT, Camelio AM, Claussen KR, et al. Synthesis of oxygenated oleanolic and ursolic acid derivatives with anti-inflammatory properties [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2015, 25 (19): 4342-4346.
- [9] 陈丹, 张小里, 李冰麟, 等. 正己烷/丙酮混合溶剂中非均相催化合成 $\alpha$ -生育酚琥珀酸酯 [J]. 化工进展, 2019, 38 (9): 4095-4101.
- [10] 郑益萍, 鲁春青, 纪宏宇, 等.  $\alpha$ -生育酚琥珀酸酯抗肿瘤新剂型研究进展 [J]. 中国药师, 2018, 21 (7): 1275-1277.
- [11] 杨丹琦, 王艳宏, 李洪晶, 等. 基于亲脂性阳离子、线粒体靶向信号肽和己糖激酶修饰的线粒体靶向抗肿瘤制剂的研究进展 [J]. 中国药房, 2019, 30 (2): 272-276.
- [12] Mallick A, More P, Syed MM, et al. Nanoparticle-mediated mitochondrial damage induces apoptosis in cancer [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2016, 8 (21): 13218-13231.
- [13] Mallick A, More P, Ghosh S, et al. Dual drug conjugated nanoparticle for simultaneous targeting of mitochondria and nucleus in cancer cells [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2015, 7 (14): 7584-7598.
- [14] Wu H, Zhong Q, Zhong R, et al. Preparation and anti-tumor evaluation of self-assembling oleanolic acid-loaded Pluronic P105/d- $\alpha$ -tocopheryl polyethylene glycol succinate mixed micelles for non-small-cell lung cancer treatment [J].

- Int J Nanomedicine, 2016, 11: 6337-6352.
- [15] 周惠恩, 王婴, 王岩, 等. 齐墩果酸长循环脂质体大鼠体内药理学及组织分布研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28 (4): 489-493.
- [16] 刘双. 齐墩果酸分离与纳米粒制备及对 CCl<sub>4</sub> 肝损伤小鼠防护作用 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2020.
- [17] 程佳慧, 刘喜纲, 常金花, 等. 不同稳定剂种类对齐墩果酸纳米混悬剂溶出度的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2020, 40 (22): 2327-2331.
- [18] Yang R, Huang X, Dou J, et al. Self-microemulsifying drug delivery system for improved oral bioavailability of oleonic acid: design and evaluation [J]. Int J Nanomedicine, 2013, 8: 2917-2926.
- [19] 武倩, 常金花, 薛禾菲, 等. 复合载体齐墩果酸固体分散体的制备及评价 [J]. 中国医院药学杂志, 2020, 40 (4): 385-390.
- [20] Sánchez-Rodríguez C, Palao-Suay R, Rodríguez L, et al.  $\alpha$ -tocopheryl succinate-based polymeric nanoparticles for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma [J]. Biomolecules, 2018, 8 (3): 97.
- [21] 叶琳. 基于三苯基膦线粒体靶向载 7-羟基香豆素纳米粒的制备及其抗肿瘤活性研究 [D]. 咸宁: 湖北科技学院, 2021.
- [22] Wang J, Mao W, Lock LL, et al. The role of micelle size in tumor accumulation, penetration, and treatment [J]. ACS Nano, 2015, 9 (7): 7195-7206.
- [23] Luan X, Yuan H, Song Y, et al. Reappraisal of anticancer nanomedicine design criteria in three types of preclinical cancer models for better clinical translation [J]. Biomaterials, 2021, 275: 120910.

(收稿日期: 2021-09-22; 修回日期: 2021-12-18)

## 基于网络药理学探讨四臣止咳颗粒治疗慢性支气管炎急性发作的作用机制

崔爽, 张明倩, 梁五林, 郭凡帆, 欧文静, 伍永鸿, 贾占红, 葛东宇, 董瑞娟\*, 张硕峰\* (北京中医药大学中药学院, 北京 102488)

**摘要:** 目的 基于网络药理学和分子对接技术探讨四臣止咳颗粒治疗慢性支气管炎 (CB) 急性发作的作用机制, 并对其进行实验验证。方法 通过 TCMSp、TCMID 数据库等筛选四臣止咳颗粒的潜在化学成分, 采用 SwissTargetPrediction 数据库预测活性成分的潜在靶点; 在 OMIM、GeneCards 数据库中检索 CB 急性发作的相关靶点, 对四臣止咳颗粒与 CB 急性发作的靶点进行 PPI 网络构建, 交互处理得到四臣止咳颗粒治疗 CB 急性发作的关键靶点, 进行 GO 和 KEGG 分析; 利用分子对接技术对成分与关键靶点蛋白进行分子对接, 通过多次气道内雾化给药的方式建立脂多糖 (LPS) 致大鼠 CB 急性发作模型加以验证。结果 获得四臣止咳颗粒靶点 823 个, CB 急性发作潜在靶点 744 个, 共同靶点 180 个, 关键靶点包括 STAT3、AKT1、NF $\kappa$ B1 等 25 个, 涉及 toll 样受体信号通路、NF- $\kappa$ B 信号通路等。分子对接结果显示, STAT3、AKT1、MAPK1、NF $\kappa$ B1 等可能为四臣止咳颗粒治疗 CB 急性发作的关键靶点。体内实验验证结果表明, 四臣止咳颗粒可明显减轻大鼠肺组织病理程度, 肺泡结构紊乱明显好转, 炎症明显减轻, WAm/Pbm、WAI/Pbm、WAt/Pbm 显著降低 ( $P < 0.01$ ), 肺泡灌洗液 (BALF) 中促炎因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量显著降低 ( $P < 0.01$ ), 肺组织 NF- $\kappa$ B p-p65 蛋白表达均降低。结论 四臣止咳颗粒可能通过下调炎症信号通路 NF- $\kappa$ B 的激活, 减轻炎性细胞浸润和气道重塑程度, 调节炎症反应进程, 从而起到抗 CB 急性发作的作用, 可为深入四臣止咳颗粒治疗 CB 急性发作分子机制提供理论依据。

**关键词:** 四臣止咳颗粒; 慢性支气管炎急性发作; 网络药理学; 分子对接; 作用机制

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)05-1063-09

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.018

基金项目: 西藏自治区科技计划项目 (No. XZ201801-GA-16)。

作者简介: 崔爽, 女, 硕士研究生, 主要从事中药防治呼吸系统相关疾病研究, email: 1306167309@qq.com \*通信作者: 张硕峰, 男, 博士研究生导师, 教授, 主要从事中药治疗临床常见病的药效评价及机制分析, email: shuofengzhang@sina.com; 董瑞娟, 女, 硕士, 中级实验师, 主要从事中药的药理、毒理以及呼吸系统等相关疾病研究, email: drjdongruijuan@126.com