

[制 剂]

IL13 修饰雷公藤红素/人参总皂苷脂质体的制备及其抑制 BT325 细胞作用

郭晓远, 吴国建, 王 宏, 陈陆飧*
(东南大学附属中大医院神经外科, 江苏 南京 210009)

摘要: **目的** 制备白介素 13 (IL13) 修饰雷公藤红素/人参总皂苷脂质体, 并评价其对人脑胶质瘤细胞 BT325 的抑制作用。**方法** 薄膜分散法制备脂质体, 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) /*N*-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 水相缩合法将 IL13 锚定在粒子表面, 考察其形态、粒径、Zeta 电位、IL13 修饰密度的质量分数、包封率、体外释放。以药脂比 (雷公藤红素/卵磷脂)、胆脂比、水合时间、IL13 投料比为影响因素, 粒径、Zeta 电位、聚合物分散性指数 (PDI) 为评价指标, 正交试验优化制备工艺。荧光定性和胞内药物定量法评价 BT325 细胞摄取行为, MTT 法和流式细胞仪法分别测定脂质体抗肿瘤和诱导细胞凋亡作用。**结果** 最佳条件为药脂比 1 : 20, 胆脂比 1 : 4, 水合时间 45 min, IL13 投料比 0.6%。所得脂质体均一圆整, 粒径分布较窄, 平均粒径 (118.3 ± 3.2) nm, Zeta 电位 (−38.3 ± 3.4) mV, IL13 修饰密度的质量分数 0.3%, 雷公藤红素和人参总皂苷包封率分别为 (82.3 ± 2.9)% 和 (71.2 ± 3.2)%, 24 h 累计释放度分别为 (42.5 ± 4.9)% 和 (24.3 ± 2.1)%。它可显著促进 BT325 细胞摄取, IC₅₀ 为 (2.8 ± 0.3) μg/mL (以雷公藤红素计), 低于 IL13 未修饰脂质体和物理混合物 (雷公藤红素-人参总皂苷)。当雷公藤红素质量浓度为 10 μg/mL 时, 它还能诱导 84.3% 的 BT325 细胞发生凋亡。**结论** IL13 修饰雷公藤红素/人参总皂苷脂质体在体外表现出明显的人脑胶质瘤细胞 BT325 靶向性和体外抗肿瘤作用。

关键词: 白介素 13 (IL13); 雷公藤红素/人参总皂苷脂质体; 制备; 优化; 人脑胶质瘤细胞 BT325; 抑制作用

中图分类号: R944 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2017)02-0283-08

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.02.010

Preparation of IL13-modified tripterine/total ginsenosides liposomes and the inhibitory effect on BT325 cells

GUO Xiao-yuan, WU Guo-jian, WANG Hong, CHEN Lu-kui*

(Department of Neurosurgery, Zhongda Hospital Affiliated to Southeast University, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT: **AIM** To prepare the interleukin-13 (IL13) -modified tripterine/total ginsenosides liposomes and to evaluate the inhibitory effect on human brain glioma BT325 cells. **METHODS** By 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) /*N*-hydroxysuccinimide (NHS) aqueous phase condensation method, IL13 was anchored onto the particle surface of liposomes prepared by film dispersion method. The morphology, particle size, Zeta potential, concentration of IL13-modification density, encapsulation efficiency and *in vitro* release were investigated. In addition to the influencing factors of drug-lipid ratio (tripterine/lecithin), cholesterol-lipid ratio, hydration time and IL13 feed ratio, the evaluation indices of particle size, Zeta potential and polydispersity index (PDI) for the preparation were taken into account in the optimization by orthogonal test. The uptake behaviors of BT325 cells were evaluated by fluorescence qualitative method and intracellular drug quantitative method, after which the liposomes' anti-tumor activity and apoptosis induction were investigated by MTT method and flow cytometry method, respectively. **RESULTS** The optimal conditions were determined to be 1 : 20 for drug-lipid ratio, 1 : 4 for cholesterol-lipid ratio, 45 min for hydration time, and 0.6% for IL13 feed ratio. The obtained

收稿日期: 2016-04-01
作者简介: 郭晓远, 男, 主治医师, 研究方向为脑肿瘤精确药物治疗。Tel: 13655198916, E-mail: guoxiaoyuan@21cn.com
* 通信作者: 陈陆飧, 男, 主任医师, 博士生导师, 研究方向为脑靶向药物递送。E-mail: Chenlukui@outlook.com

liposomes were uniformly round with narrow particle size distribution, the average particle size was (118.3 ± 3.2) nm, Zeta potential was (-38.3 ± 3.4) mV, the concentration of IL13-modification density was 0.3%, and the encapsulation efficiencies of tripterine and total ginsenosides were $(82.3 \pm 2.9)\%$ and $(71.2 \pm 3.2)\%$ with the cumulative release rates of $(42.5 \pm 4.9)\%$ and $(24.3 \pm 2.1)\%$ at 24 h, respectively. It could significantly promote the uptake of BT325 cells, and the IC_{50} value was (2.8 ± 0.3) $\mu\text{g/mL}$ (in terms of tripterine), which was lower than those of non-IL13-modified liposomes and physical mixture of tripterine and total ginsenosides. At 10 $\mu\text{g/mL}$ for tripterine concentration, the liposomes induced 84.3% apoptosis of BT325 cells. **CONCLUSION** IL13-modified tripterine/total ginsenosides liposomes exhibit obvious human brain glioma BT325 cells-targeting ability and *in vitro* anti-tumor effect.

KEY WORDS: interleukin-13 (IL13); tripterine/total ginsenosides liposomes; preparation; optimization; human brain glioma BT325 cells; inhibitory effect

脑胶质瘤是最常见的脑瘤,其恶性程度高、治疗效果差、易复发。近年来研究发现,白细胞介素 13 (IL13) 受体在脑胶质瘤细胞表面的表达较高,对其恶性增殖有重要影响。以 IL13 受体为靶标,介导细胞外毒素以杀伤恶性胶质瘤细胞在美国已经进入 II 期临床试验^[1]。因此,将其作为靶修饰基团设计定向脑胶质瘤抗肿瘤药物递送系统,具有广阔的研究前景。

脂质体作为临床应用中最成熟的纳米药物递送系统,具有高效包载抗肿瘤药物、肿瘤被动聚集、无毒、可修饰等优点^[2]。但常规脂质体并不具备主动靶向肿瘤组织的能力,若将 IL13 修饰于抗肿瘤脂质体表面,可望实现脂质体主动加被动靶向脑胶质瘤组织的能力,进一步提高抗肿瘤活性^[3]。

雷公藤红素主要来自雷公藤根皮,具有显著的抗肿瘤、抗炎、免疫抑制等作用,可控制癌细胞蛋白酶体并诱发其凋亡,有效率 65% ~ 93%,超过了紫杉醇^[4]。此外,它还能降低肿瘤细胞和内皮细胞的血管内皮生长因子受体 2 (VEGFR2) 表达^[5],抑制血管生成,进而抑制脑胶质瘤生长,但其毒性较大,溶解度低^[6-7],故急需开展高效低毒剂型的研究。红参中提取得到人参皂苷 Rh₂、Rg₃、Rg₅、Rg₁、Rh₁、Rb₁ 等成分具有较好抗肿瘤活性^[8-11],临床上常与化疗药物协同抗肿瘤,而且具有表面活性剂作用,能够促进雷公藤红素在水中的溶解,提高生物利用度。因此,本实验制备 IL13 修饰雷公藤红素/人参总皂苷脂质体,并评价其对入脑胶质瘤细胞 BT325 的抑制作用,以探讨 IL13 提高抗肿瘤药物靶向性和活性的优势。

1 仪器与试剂

1.1 实验仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); 紫外分光光度计 (上海凤凰光学 284

仪器有限公司); Tecnai12 型透射电子显微镜 (荷兰 Philips 公司); Nano-ZS 型马尔文激光散射粒径测定仪 (英国马尔文公司); 台式冷冻离心机 (长沙湘仪离心机仪器有限公司); 真空干燥箱 (天津市华北实验仪器有限公司); 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); 智能药物溶出仪 (天津大学无线电厂); Pall 离心超滤管 (美国 Pall 公司); CO₂ 细胞培养箱 (美国 Thermo Forma 公司); ZEISS 倒置显微镜 (南京微弗德科学仪器有限公司); 全自动酶标仪 (美国 Thermo 公司)。

1.2 试剂与试药 雷公藤红素 (含有量 > 99%)、人参总皂苷 (含有量 > 85%) (南京泽朗医药科技有限公司); 大豆卵磷脂 (SPC, 江苏曼氏科技有限公司); 末端氨基聚乙二醇-硬脂酸磷脂酞乙醇胺 (DSPE-PEG-NH₂, 法国 Gattefosse 公司); 胆固醇 (中国惠兴生化试剂有限公司); 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) (国药集团化学试剂有限公司); 白介素 13 (IL13, 赛业生物科技有限公司)。胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司); 四甲基偶氮唑盐 (MTT, SunShine 公司); RPMI1640 培养基、胰蛋白酶溶液 (美国 Gibco 公司); 二甲基亚砜 (DMSO, 南京化学试剂有限公司); BCA 试剂盒 (凯基生物科技有限公司); 异硫氰酸荧光素 (FITC, 天津百萤科技有限公司)。

2 实验方法与结果

2.1 最佳处方筛选

2.1.1 正交试验 称取雷公藤红素、人参总皂苷、大豆卵磷脂、胆固醇、DSPE-PEG-NH₂ 适量,溶于 30 mL 氯仿-甲醇 (2:1) 中,再置于 100 mL 磨口圆底烧瓶中,30 ℃ 恒温水浴减压蒸发 (转速 100 r/min) 除去有机溶剂至形成均匀薄膜,真空

干燥器中过夜，去除残留溶剂。加入 50 mL pH 7.4 磷酸盐缓冲液，于 37 ℃ 恒温水浴上旋转水合 45 min，使脂质体膜脱落，得到橙色混悬液，冰浴下探头超声 2 s，间歇 3 s，重复 60 次（功率 100 W），依次过 0.8 μm 和 0.45 μm 微孔滤膜，即得脂质体混悬液。室温下将适量 IL13、EDC、NHS 依次加入混悬液中，搅拌 24 h，反应体系置于透析袋（截留分子量 12 000 Da）中，流动水透析 3 h，即得 IL13 修饰脂质体。

根据前期研究，本实验中确定雷公藤红素与人参总皂苷比例为 1∶5，选择药脂比（A，雷公藤红素/卵磷脂）、胆脂比（B）、水合时间（C）和 IL13 投料比（D）进行正交试验。其中，药脂比选择 1∶30、1∶20、1∶10，胆脂比选择 1∶8、1∶4、1∶2，水合时间选择 15、30、45 min，IL13 投料比选择 0.6%、0.9%、1.2%，再以粒径、Zeta 电位、聚合物分散性指数（PDI）为评价指标进行正交试验设计。因素水平见表 1，直观分析见表 2，

表 2 正交试验设计及结果

Tab. 2 Design and results of orthogonal tests

试验号	A 药脂比	B 胆脂比	C 水合时间/min	D IL13 投料比/%	粒径/nm	Zeta 电位/mV	PDI
1	1∶30	1∶8	15	0.6	221.4	-26.7	0.271
2	1∶30	1∶4	30	0.9	197.5	-30.3	0.204
3	1∶30	1∶2	45	1.2	188.4	-22.2	0.326
4	1∶20	1∶8	30	1.2	147.3	-30.9	0.347
5	1∶20	1∶4	45	0.6	104.9	-38.2	0.194
6	1∶20	1∶2	15	0.9	132.3	-25.7	0.185
7	1∶10	1∶8	45	0.9	171.3	-33.5	0.223
8	1∶10	1∶4	15	1.2	205.9	-36.6	0.328
9	1∶10	1∶2	30	0.6	213.1	-19.1	0.252
以粒径为指标							
K_1		202.433		180.000	186.533		179.800
K_2		128.167		169.433	185.967		167.033
K_3		196.767		177.933	154.867		180.533
R		74.266		10.567	31.666		13.500
以 Zeta 电位为指标							
K_1		-26.400		-30.367	-29.667		-28.000
K_2		-31.600		-35.033	-26.767		-29.833
K_3		-29.733		-22.333	-31.300		-29.900
R		5.200		12.700	4.533		1.900
以 PDI 为指标							
K_1		0.267		0.280	0.261		0.239
K_2		0.242		0.245	0.268		0.204
K_3		0.268		0.254	0.248		0.334
R		0.026		0.038	0.020		0.130

2.1.2 验证试验 按最优处方制备 3 批样品，测得平均粒径为 (110.1 ± 2.6) nm，Zeta 电位为 - (37.5 ± 2.8) mV，PDI 为 0.189 ± 0.015，表明工艺合理可行，重复性好。

方差分析见表 3。

由表 2 可知，以粒径为指标时，各因素影响程度因此为 A > C > D > B；以 Zeta 电位为指标时，依次为 B > A > C > D；以 PDI 为指标时，依次为 D > B > A > C，综合比较，得到最优水平组合为 A₂B₂C₃D₁。由表 3 可知，因素 A 对脂质体粒径有显著性影响 ($P < 0.05$)，因素 B 对脂质体 Zeta 电位有显著性影响 ($P < 0.05$)，因素 D 对脂质体 PDI 有显著性影响 ($P < 0.05$)，因素 C 无显著性影响 ($P > 0.05$)。因此，最终确定最佳条件为药脂比 1∶20，胆脂比 1∶4，水合时间 45 min，IL13 投料比 0.6%。

表 1 因素水平

Tab. 1 Factors and levels

因素	A 药脂比	B 胆脂比	C 水合时间/min	D IL13 投料比/%
1	1∶30	1∶8	15	0.6
2	1∶20	1∶4	30	0.9
3	1∶10	1∶2	45	1.2

2.2 脂质体制备 按上述最优处方称取雷公藤红素 30 mg、人参总皂苷 150 mg、大豆卵磷脂 600 mg、胆固醇 150 mg、DSPE-PEG-NH₂ 6.0 mg，按“2.1.1”项下方法制备脂质体混悬液。室温下

将 6.0 mg 白介素 13、2.0 mg EDC、1.2 mg NHS 依次加入混悬液中，搅拌 24 h，反应体系置于透析袋（截留分子量 12 000 Da）中，流动水透析 3 h，即得 IL13 修饰脂质体。同法制得未修饰脂质体（不含 DSPE-PEG-NH₂ 和后续 IL13 反应步骤）。

表 3 方差分析

Tab. 3 Analysis of variance

指标	因素	离均差平方和	自由度	F 比	F 临界值	P 值
粒径	A	10 253.609	2	54.489	19.000	<0.05
	B	188.176	2	1.000	19.000	>0.05
	C	1 970.309	2	10.471	19.000	>0.05
	D	345.776	2	1.838	19.000	>0.05
	误差	188.18	—	—	—	—
电位	A	41.636	2	5.968	19.000	>0.05
	B	247.602	2	35.493	19.000	<0.05
	C	31.629	2	4.534	19.000	>0.05
	D	6.976	2	1.000	19.000	>0.05
	误差	6.98	—	—	—	—
PDI	A	0.001	2	1.000	19	>0.05
	B	0.002	2	2.000	19	>0.05
	C	0.001	2	1.000	19	>0.05
	D	0.027	2	27.000	19	<0.05
	误差	0.00	—	—	—	—

注：F_{0.05}(2, 2) =19

2.3 形态学研究 所得脂质体为均一圆整、粒径分布较窄的类球形粒子，见图 1。

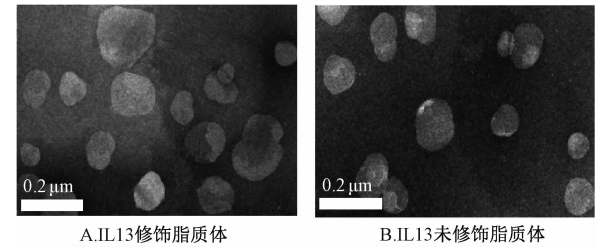


图 1 透射电镜显微照片

Fig. 1 Transmission electron micrographs

2.4 粒径和 Zeta 电位测定 室温下取 IL13 修饰和未修饰脂质体溶液各 200 μL，分散于 1.8 mL 超纯水中，测定其平均粒径和 Zeta 电位。结果见表 4。由表可知，与未修饰产物比较，IL13 修饰后，脂质体粒径增大，而且表面负电荷被小幅度屏蔽。

表 4 脂质体粒径和 Zeta 电位 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 Particle sizes and Zeta potentials of liposomes ($\bar{x} \pm s$)

脂质体	粒径/nm	Zeta 电位/mV
IL13 未修饰	105.3 ± 2.7	-42.6 ± 2.3
IL13 修饰	118.3 ± 3.2	-38.3 ± 3.4

2.5 IL13 修饰密度的质量分数测定 取 IL13 修饰和未修饰脂质体混悬液各 0.5 mL，分别精密吸取 20 μL，置于 96 孔板内，按照 BCA 试剂盒说明书，286

将白蛋白标准品按 0、1、2、4、8、12、16、20 μL 加入蛋白标准品孔中，缓冲溶液补足至 20 μL。各孔加入 200 μL BCA 工作液。37 ℃ 下孵育 30 min 后，测定 562 nm 波长处吸光度，测得白蛋白浓度 (C) 与吸光度 (A) 的线性方程为 $A = 0.372C + 0.081$ ($r = 0.9994$)。另外，在 IL13 投料比为 0.6% 时，其修饰密度的质量分数为 0.3%。

2.6 包封率测定及体外释放情况考察

2.6.1 HPLC 法测定雷公藤红素含量

2.6.1.1 色谱条件 Agilent HC-C₁₈ 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm)；流动相乙腈-0.4% 磷酸 (80 : 20)；检测波长 425 nm；体积流量 1.0 mL/min；柱温 25 ℃；进样量 20 μL。

2.6.1.2 对照品贮备液制备 精密称取干燥至恒重的对照品 2.0 mg，置于 10 mL 量瓶中，流动相定容，即得 200 μg/mL 对照品贮备液。

2.6.1.3 供试品溶液制备 精密量取脂质体混悬液 0.5 mL，置于 Pall 离心超滤管的内管中，3 500 r/min 下离心 20 min，取外管中的超滤液，流动相定容至 1 mL，即得包封率测定中的供试品溶液。再精密量取释放液 2 mL，0.22 μm 微孔滤膜过滤，取 800 μL 续滤液，氮气吹干，加入 100 μL 流动相，涡旋溶解，即得释放度测定中的供试品溶液。

2.6.1.4 标准曲线绘制 吸取“2.6.1.2”项下对照品贮备液适量，置于 5 mL 量瓶中，流动相定容，制备成 0.025、0.05、0.1、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、32.0、64.0 μg/mL 对照品溶液，在“2.6.1.1”项色谱条件下测定。以出峰时间为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y) 进行回归，得到回归方程为 $Y = 40.131X + 1.667$ ($r = 0.9996$)，表明雷公藤红素在 0.025 ~ 64.0 μg/mL 范围内呈良好的线性关系。

2.6.1.5 精密度试验 精密吸取 0.1、4.0、32.0 μg/mL 对照品溶液各 20 μL，日内重复进样 6 次，日间连续 3 d 进样，测得雷公藤红素峰面积 RSD 分别为 0.9% 和 2.0%，表明仪器精密度良好。

2.6.1.6 稳定性试验 精密吸取“2.6.1.3”项下 2 种供试品溶液，在离心后 0、2、4、6、8、12、24 h 进样，测得雷公藤红素峰面积 RSD 分别为 1.4% 和 1.8%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.6.1.7 重复性试验 精密量取脂质体混悬液 0.5 mL、释放液 2 mL，各 6 份，按“2.6.1.3”项下方法制备 2 种供试品溶液，测得雷公藤红素含有

量 RSD 分别为 1.6% 和 2.0% , 表明该方法重复性良好。

2.6.1.8 回收率试验 精密吸取“2.6.1.2”项下对照品贮备液适量, 分别加入空白脂质体溶液和空白释放液中, 按“2.6.1.3”项下方法制备 2 种供试品溶液, 平行 6 份, 测得两者回收率分别为 98.7% 和 100.9% , RSD 分别为 1.3% 和 1.8% 。

2.6.2 紫外分光光度法测定人参总皂苷含量

2.6.2.1 对照品贮备液制备 精密称取干燥至恒重的人参皂苷 Re 对照品 5 mg, 置于量瓶中, 甲醇定容至 10 mL, 即得 0.504 mg/mL 人参皂苷 Re 贮备液, 以其为对照进行定量测定^[12]。

2.6.2.2 供试品溶液制备 精密量取脂质体混悬液 0.5 mL, 置于 Pall 离心超滤管的内管中, 3 500 r/min 下离心 20 min, 取外管中的超滤液, 流动相定容至 1 mL, 并吸取其中 0.5 mL, 甲醇定容至 5 mL, 即得包封率测定中的供试品溶液。再精密量取 2 mL 释放液, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液 1.0 mL, 甲醇定容至 5 mL, 即得释放度测定中的供试品溶液。

2.6.2.3 标准曲线绘制^[13] 精密吸取“2.6.2.1”项下对照品贮备液 10、20、40、80、120、160、200 μL, 置于具塞试管中, 低温下挥去溶剂, 加入 1% 香草醛高氯酸试液 0.5 mL, 置于 60 ℃ 恒温水浴上, 充分混匀后加热 15 min, 再立即用冰水冷却 2 min, 加入 77% 硫酸溶液 5 mL, 摇匀, 以试剂为空白, 消除气泡后在 540 nm 波长处测定吸光度, 以质量浓度为横坐标 (C), 吸光度为纵坐标 (A) 进行回归, 得线性方程为 $A = 4.802\ 9C + 0.032\ 8$ ($r = 0.999\ 5$), 表明人参总皂苷在 5.04 ~ 100.8 μg 范围内呈良好的线性关系。

2.6.2.4 精密度试验 按“2.6.2.3”项下方法处理, 在 540 nm 波长处重复测定 6 次, 测得吸光度 RSD 为 1.3% , 表明仪器精密度良好。

2.6.2.5 稳定性试验 取“2.6.2.2”项下 2 种供试品溶液, 按“2.6.2.3”项下方法处理, 于 0、2、4、6、8、12、24 h 测定, 测得吸光度 RSD 分别为 1.6% 和 2.1% , 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.6.2.6 重复性试验 精密量取脂质体混悬液 0.5 mL、释放液 2 mL, 各 6 份, 按“2.6.2.2”项下方法制备 2 种供试品溶液, 按“2.6.2.3”项下方法处理, 在 540 nm 波长处测定, 测得人参总皂苷含量 RSD 分别为 1.5% 和 1.7% , 表明该方法

重复性良好。

2.6.2.7 回收率试验 精密移取“2.6.2.1”项下对照品贮备液适量, 分别加入空白脂质体混悬液和空白释放液中, 按“2.6.2.2”项下方法制备 2 种供试品溶液, 按“2.6.2.3”项下处理, 平行 6 份, 在 540 nm 波长处测定, 测得两者回收率分别为 103.2% 和 97.8% , RSD 分别为 1.9% 和 1.7% 。

2.6.3 脂质体包封率测定 精密量取 IL13 修饰和未修饰脂质体混悬液 0.5 mL, 置于 Pall 离心超滤管的内管中, 3 500 r/min 下离心 20 min, 取外管中的超滤液, 流动相定容至 1 mL, 在“2.6.1.1”项色谱条件下测定游离雷公藤红素含量, 同时吸取进样溶液 0.5 mL, 甲醇定容至 5 mL, 按“2.6.2”项下方法测定游离人参总皂苷含量。再另取 2 种混悬液各 0.5 mL, 甲醇破乳, 同法测定两者含量, 计算包封率, 公式为包封率 = $[(\text{药物总含量} - \text{游离药物含量}) / \text{药物总含量}] \times 100\%$, 结果见表 5。

表 5 脂质体包封率 ($\bar{x} \pm s$)

脂质体	包封率/%	
	雷公藤红素	人参总皂苷
IL13 未修饰	84.7 ± 4.4	68.7 ± 4.6
IL13 修饰	82.3 ± 2.9	71.2 ± 3.2

2.6.4 脂质体体外释放情况考察 精密量取脂质体溶液 4 mL, 装入透析袋(截留分子量 12 000 Da)中, 密封, 置于 200 mL pH 6.8 磷酸盐缓冲液(含 1% 吐温 80)中, 在 37 ℃、100 r/min 下释放, 于 0.5、1、2、4、6、8、12、24 h 吸取 2 mL 释放液, 并补充 2 mL 相同介质, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取 800 μL, 氮气吹干, 加入 100 μL 流动相, 涡旋溶解, 离心后进样测定雷公藤红素含量。另取续滤液 1.0 mL, 甲醇定容至 5 mL, 按“2.6.2”项下方法测定人参总皂苷含量, 绘制药物累积释放度-时间曲线, 结果见图 2, 可知雷公藤红素和人参总皂苷均持续缓慢释放, 24 h 后两者释放基本达到平台期。再分别用零级、单指数、Higuchi、Weibull 分布模型对各时间点累积释放度进行拟合, 发现前者符合 Weibull 分布方程 ($Y = 0.466\ 6X - 2.103\ 1$, $r = 0.980\ 9$), 后者符合 Higuchi 方程 ($Y = 3.988\ 4X + 1.194\ 2$, $r = 0.947\ 1$), 表明脂质体具有缓释作用 (X 为时间, Y 为累积释放度)。

2.7 BT325 细胞摄取实验

2.7.1 细胞培养 当细胞复苏后, 将其置于含

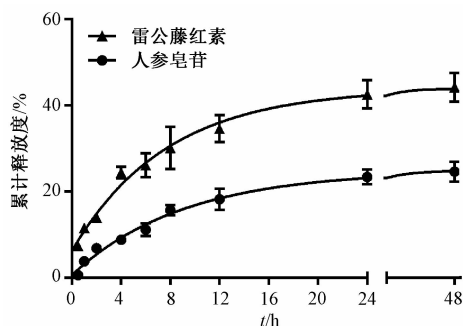


图2 体外释放曲线 ($n=3$)

Fig. 2 *In vitro* release curves ($n=3$)

10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中, 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度孵育箱中静置培养。隔天更换完全培养基, 每 5~7 d 传代 1 次, 取对数生长期细胞用于实验。

2.7.2 试药制备

2.7.2.1 游离异硫氰酸荧光素 (FITC) 溶液制备

精密称取 FITC 1 mg, 去离子水溶解定容至 50 mL, 即得 50 $\mu\text{mol/L}$ 溶液, 4 ℃ 下避光保存, 待用。

2.7.2.2 脂质体制备

除加入 50 mL 含 1 mg FITC 的 pH 7.4 磷酸盐缓冲液外, 按“2.2”项下方法制备脂质体混悬液。室温下将 IL13 6.0 mg、EDC 2.0 mg、NHS 1.2 mg 依次加入混悬液中, 搅拌 24 h, 反应体系置于透析袋(截留分子量 12 000 Da)中, 流动水透析 3 h, 所得脂质体用荧光分光光度计定量至含 50 $\mu\text{mol/L}$ FITC。同法制备 IL13 未修饰脂质体(不含 DSPE-PEG- NH_2 和后续 IL13 反应步骤)。

2.7.3 显微镜定性观察

取对数生长期细胞, 胰蛋白酶消化以使其脱壁, 10% 胎牛血清 RPMI1640 培养液重悬成单细胞悬液, 进行细胞计数, 相同培养液稀释至细胞密度 $1 \times 10^5/\text{mL}$, 吹打均匀, 接种于 24 孔细胞培养板中, 每孔培养液 400 μL , 在 37 ℃、5% CO_2 培养箱中孵育 24 h。移除孔内原培养液, 将 FITC 溶液、IL13 未修饰脂质体、IL13 修饰脂质体、IL13 修饰脂质体 + IL13 (500 ng/mL) 用不完全培养基稀释至 5 $\mu\text{mol/L}$, 给药于 BT325 细胞, 每孔 400 μL , 移入细胞培养箱继续培养 8 h, 孵育结束后立即弃去培养基, 加入冰磷酸盐缓冲液终止细胞摄取, 并冲洗细胞 3 遍, 荧光倒置显微镜下观察并比较各孔细胞形态及荧光强度, 结果见图 3。由图可知, IL13 修饰脂质体荧光强度显著强于

FITC 溶液和 IL13 未修饰脂质体, 表明 IL13 修饰后能够进一步增强细胞摄取作用; 但 IL13 修饰脂质体 + IL13 的荧光强度明显低于 IL13 修饰脂质体, 表明游离 IL13 对其摄取有竞争性抑制作用。

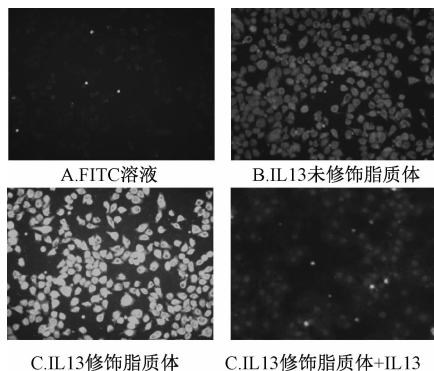


图3 荧光倒置显微镜照片

Fig. 3 Inverted fluorescent microscope images

2.7.4 流式细胞仪检测

取对数生长期细胞, 按“2.7.3”项下方法处理。将四者用不完全培养基稀释至 10、20、50 $\mu\text{g/mL}$, 给药于 BT325 细胞, 每孔 400 μL , 每个质量浓度设 3 个平行复孔, 移入培养箱继续培养 24 h 后, 弃去培养基, 每孔加入 500 μL 冰磷酸盐缓冲液, 振荡, 弃去细胞表面药物及死细胞, 反复清洗 3 次, 每孔加入 100 μL 胰酶消化, 稍微振荡后立即移除消化液, 加入含胎牛血清的磷酸盐缓冲液 (1:9) 中终止消化, 流式细胞仪检测细胞摄取情况, 结果见图 4。由图可知, 3 种质量浓度下, IL13 修饰脂质体荧光强度均显著高于 IL13 未修饰脂质体和 IL13 修饰脂质体 + IL13 ($P < 0.01$), 表明 IL13 介导可促进细胞对脂质体的摄取, 但游离 IL13 反而会抑制细胞对药物的摄取, 该结果与“2.7.3”项一致。

2.8 体外抗肿瘤活性及诱导细胞凋亡实验

2.8.1 药物制备

2.8.1.1 物理混合物

精密称取雷公藤红素 30.0 mg、人参总皂苷 150.0 mg, 分散于 10 mL pH 7.4 磷酸盐缓冲液中, 用前以移液器吹散混匀, 即得。

2.8.1.2 IL13 修饰脂质体

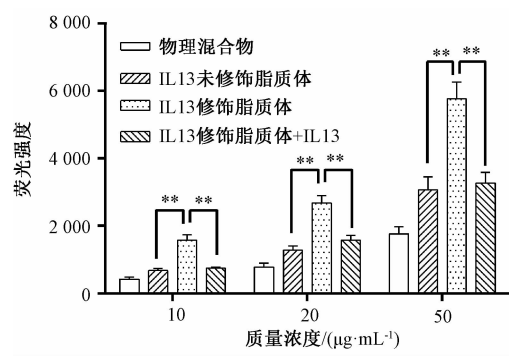
按“2.2”项下方法制备。

2.8.1.3 IL13 未修饰脂质体

按“2.2”项下方法制备。

2.8.2 MTT 法测定

收集对数生长期的 BT325 细胞, 0.25% 胰酶消化, 调整细胞密度至 $5 \times 10^3/\text{mL}$, 接种于 96 孔培养板中, 每孔 100 μL , 37 ℃、5%



注: ** $P < 0.01$

图 4 荧光强度测定结果 ($n = 3$)

Fig. 4 Results of fluorescence intensity determination ($n = 3$)

CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 取出培养板, 弃去孔内原培养液, 加入不同质量浓度 (0.01、0.1、0.4、0.8、2、5、10、32、80、200 μg/mL, 以雷公藤红素计算) 物理混合物 (雷公藤红素-人参总皂苷)、IL13 未修饰脂质体、IL13 修饰脂质体的同一培养基, 每孔 100 μL, 每个质量浓度平行 6 个复孔。继续培养 48 h 后, 每孔加入 100 μL MTT (0.5 mg/mL), 避光培养 4 h, 弃去培养基, 每孔加入 100 μL DMSO, 摇床低速震荡 10 min, 酶标仪检测 570 nm 波长处吸光度, 计算细胞存活率 [(给药组吸光度/对照组吸光度) × 100%]。

图 5 显示, 在相同质量浓度下, IL13 修饰脂质体抑制 BT325 细胞的活性均大于物理混合物和 IL13 未修饰脂质体, 并呈明显的剂量依赖性, 表明 IL13 可介导脂质体进入脑胶质瘤细胞, 发挥人参总皂苷和雷公藤红素协同抗肿瘤活性的能力, IC₅₀ 为 (2.8 ± 0.3) μg/mL (以雷公藤红素计)。

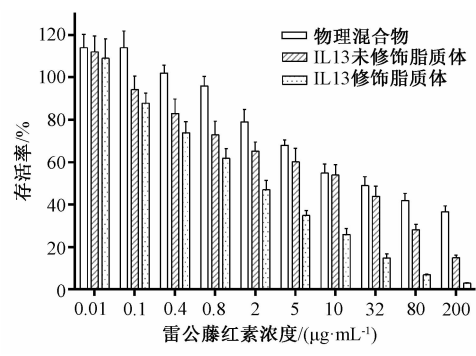


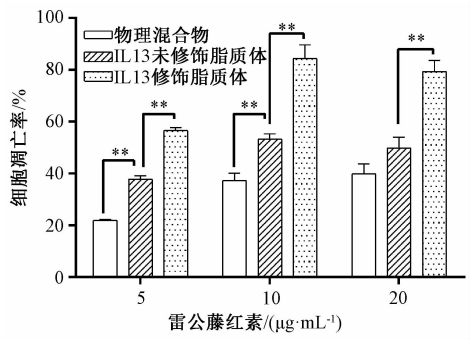
图 5 抗肿瘤活性测定结果 ($n = 6$)

Fig. 5 Results of anti-tumor activity determination ($n = 6$)

2.8.3 流式细胞仪法测定 取对数生长期细胞, 按“2.7.4”项下方法处理, 将物理混合物、IL13

未修饰脂质体、IL13 修饰脂质体用不完全培养基稀释至 5、10、20 μg/mL (以雷公藤红素计), 给药于 BT325 细胞, 每孔 400 μL, 每个质量浓度设 4 个平行复孔, 并设置空白对照组。移入培养箱继续培养 12 h 后, 弃去培养基, 每孔加入 500 μL 冰磷酸盐缓冲液, 振荡, 弃去细胞表面药物及死细胞, 反复清洗 3 次, 每孔加入 100 μL 胰酶消化, 稍微振荡后立即移除消化液, 加入含有胎牛血清的磷酸盐缓冲液 (1 : 9) 终止消化, 洗脱细胞, 得到细胞悬液, 取 50 μL 置于 96 孔板中, 以 1 : 1 比例加入 50 μL Annexin V-PE 细胞凋亡检测试剂盒, 避光孵育 15 min, 检测细胞凋亡情况。

图 6 显示, IL13 修饰和未修饰脂质体在各质量浓度下均能诱导 BT325 细胞凋亡, 其中在 5、10 μg/mL 时作用更显著 ($P < 0.01$), 并且前者强于后者, 表明 IL13 介导能够进一步增强脂质体药物对细胞凋亡的诱导。当雷公藤红素质量浓度为 10 μg/mL 时, IL13 修饰脂质体可诱导 84.3% 的 BT325 细胞发生凋亡。



注: ** $P < 0.01$

图 6 诱导细胞凋亡作用测定结果 ($n = 6$)

Fig. 6 Results of apoptosis-induced effect determination ($n = 6$)

3 讨论

IL13 修饰是在以 EDC/NHS 组合缩合剂为催化剂的条件下, DSPE-PEG-NH₂ 中的氨基与 IL13 进行缩合反应所形成的, 反应过程中投入 0.6% IL13 时, 可得到表面密度质量分数为 0.3% 的 IL13 修饰脂质体, 缩合效率为 50%。由于引入了长链 PEG, 其粒径较 IL13 未修饰脂质体有小幅增加, 并且表面负电荷被一定程度的屏蔽。再从定性和定量角度考察 BT325 细胞摄取, 发现其体外进入细胞的能力显著增强, 并且这种效应由 IL13 介导引起, 可促进体外对 BT325 细胞抗增殖能力和诱导凋亡作用。

IL13 作为多功能的细胞因子^[14]，对某些肿瘤的治疗有一定潜在价值，其功效发挥是通过与 IL13 受体结合而实现的^[15]，而其在脑胶质瘤细胞上存在异常高的表达，故可作为恶性脑胶质瘤免疫靶向治疗中特异性的靶标^[16]。本实验根据此原理，成功构建了主动靶向脑胶质瘤的 IL13 修饰雷公藤红素/人参皂苷脂质体，后期将进一步建立荷瘤裸鼠模型，采用近红外成像技术观察其口服后体内分布情况，并验证其药效。

参考文献：

[1] 章剑剑. IL-13 与脑胶质瘤的关系[J]. 国外医学：神经病学（神经外科学分册），2005，32(3)：217-220.

[2] 丁玉玲，马淑贤，卢秀荣，等. 人参皂苷脂质体（GSL）的研制[J]. 中国药学杂志，1995，30(7)：414-417.

[3] 杜 鹃. 白介素 13 与白喉毒素融合蛋白靶向治疗活性相关的研究[D]. 北京：北京交通大学，2008.

[4] 徐峥奎. 开发雷公藤单体成分新药市场前景广阔[J]. 中国医药工业杂志，2006，37(10)：A130-A132.

[5] 黄煜伦. 雷公藤红素纳米脂质体的制备及抗胶质瘤的实验研究[D]. 苏州：苏州大学，2009.

[6] 袁 菱，周 蕾，陈 彦，等. 雷公藤红素纳米结构脂质载体的制备及其理化性质考察[J]. 中成药，2013，35(9)：2023-2027.

[7] Yang H J, Chen D, Cui Q C, *et al.* Celastrol, a triterpene extracted from the Chinese “Thunder of God Vine”, is a potent

proteasome inhibitor and suppresses human prostate cancer growth in nude mice [J]. *Cancer Res*, 2006, 66 (9) : 4758-4765.

[8] 姜卫卫，刘 嘉. 人参皂苷 Rb1、Rg3、Rh2 抗肿瘤作用与机制概况[J]. 世界科学技术：中医药现代化，2013，15(7)：1634-1637.

[9] 张兰兰，高文元，马晓慧，等. 人参皂苷 Rh2 对宫颈癌 U14 荷瘤小鼠的治疗作用研究[J]. 中成药，2013，35(2)：215-219.

[10] 徐晓军，石淑文，汤永民，等. 人参皂苷 Rh2 抗白血病多药耐药细胞 K562/VCR 作用研究[J]. 中草药，2010，41(7)：1131-1135.

[11] 苏 涛，孙宏晨，马旭东. 人参皂苷 Rg3 抑制腺样囊性癌细胞 SACC-83 增殖作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志，2011，17(23)：195-198.

[12] 杨文志，于淑莲，姜子恒，等. 论人参总皂苷的科学定量方法[J]. 人参研究，2007，19(2)：7-10.

[13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015 年版一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2015：392.

[14] Seyfizadeh N, Seyfizadeh N, Gharibi T, *et al.* Interleukin-13 as an important cytokine; a review on its roles in some human diseases[J]. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 2015, 62 (4) : 341-378.

[15] 杜 娟，胡红刚，侯玲玲. IL-13RA2 介导的毒素融合蛋肿瘤治疗中的应用[J]. 中国生物工程杂志，2009，29(4)：98-103.

[16] 高会乐. 基于不同靶向策略的脑肿瘤靶向递药系统设计及评价[D]. 上海：复旦大学，2013.