

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.01.006

藻蓝蛋白/羧甲基壳聚糖纳米球的制备及其对人宫颈癌 HeLa 细胞增殖的抑制

吕丛仪, 李冰, 杨鹏(青岛大学 医学院 生物学教研室, 山东 青岛 266021)

[摘要] **目的:** 制备新型负载藻蓝蛋白(C-phycoyanin, C-PC)的羧甲基壳聚糖(carboxymethyl chitosan, CMC)纳米微球(nanoparticle, NP), 探讨藻蓝蛋白羧甲基壳聚糖纳米微球(C-PC/CMCNP)对人宫颈癌 HeLa 细胞生长的影响及其分子机制。**方法:** 采用正交分析方法, 以 CMC 和 C-PC 的质量比、CMC 浓度、CaCl₂ 浓度为考察因素, 通过检测 C-PC/CMCNP 的粒径和 CMC 的包封率, 优选制备 C-PC/CMCNP 的最佳条件, 并制备 C-PC/CMCNP。CCK-8 法检测 C-PC、CMC 和 C-PC/CMCNP 对 HeLa 细胞增殖的影响, 流式细胞术检测 HeLa 细胞凋亡情况, Western blotting 检测 HeLa 细胞中 caspase-3 蛋白的表达。**结果:** CMC 与 C-PC 的质量比为 1:2、CMC 质量浓度为 1 mg/ml, CaCl₂ 质量浓度为 1 mg/ml 为最佳制备条件, 最终制备的 C-PC/CMCNP 的平均粒径为(118.4 ± 2.07)nm, 并具有较高的包封率(63.2%), 其缓释 12 h 的累积缓释率超过 60%。C-PC、CMC 和 C-PC/CMCNP 均能抑制 HeLa 细胞的增殖, 诱导细胞凋亡, 并促进 caspase-3 蛋白的表达, 但 C-PC/CMCNP 的作用效果最为显著。**结论:** 优化制备条件得到具有高效缓释性能的 C-PC/CMCNP, 其对 HeLa 细胞显著的抑制作用可能是通过促进 caspase-3 蛋白的表达进而诱导肿瘤细胞凋亡来实现的。

[关键词] 藻蓝蛋白; 纳米微粒; 羧甲基壳聚糖; 人宫颈癌 HeLa 细胞; 增殖

[中图分类号] Q737.33; R931.77; R730.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2015)01-0034-07

Optimized preparation of novel C-phycoyanin-carboxymethyl chitosan nanoparticles and its inhibitory effects on human cervical carcinoma HeLa cells proliferation

Lü Congyi, Li Bing, Yang Peng(Department of Biology, Medical College, Qingdao University, Qingdao 266021, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a methodology of preparing novel C-phycoyanin-carboxymethyl chitosan nanoparticles(C-PC/CMCNPs) and determine the effect of C-PC/CMCNPs on the growth of HeLa cells. **Methods:** An orthogonal experiment was designed with the particle diameter and entrapment efficiency as index and CMC: C-PC mass ratio, CMC concentration, and CaCl₂ concentration as factors to determine the best preparing condition of C-PC/CMCNPs. The effects of the generated C-PC/CMCNPs on the growth and apoptosis of HeLa cells were assessed by CCK-8 assay and flow cytometry respectively. Caspase-3 protein expression in HeLa cells was quantified by Western blotting. **Results:** The optimal condition for C-PC/CMCNPs preparations were as follows: C-PC to CMC ratio of 1:2, CMC concentration of 1 mg/ml and CaCl₂ concentration of 1 mg/ml. The C-PC/CMCNPs prepared in these optimal conditions had a high entrapment efficiency with an average particle diameter of 118.4 nm. C-PC, CMC and C-PC/CMCNPs were all capable of inhibiting proliferation and inducing apoptosis in HeLa cells by up-regulating the expression of the caspase-3 protein, but the effect of C-PC/CMCNPs was significantly more pronounced (*P* < 0.05). **Conclusions:** We have optimized the conditions of preparing C-PC/CMCNPs. The nanoparticles prepared under these conditions have an acceptable safety profile of sustained C-PC

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81001346, No. 81471546); 山东省医药卫生科技发展计划项目(No. 2011HZ023); 青岛市科技局公共领域科技支撑计划项目(No. 2012-1-3-5-(4)-nsh)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 81001346, No. 81471546), the Medical Health Science and Technology Development Plan of Shandong Province (No. 2011HZ023), and the Science and Technology Support Plan in Public Sphere from the Science and Technology Bureau of Qingdao City (No. 2012-1-3-5-(4)-nsh)

[作者简介] 吕丛仪(1988 -), 女, 山东省烟台市人, 硕士生, 主要从事抗肿瘤药物研究, E-mail: congylv@163.com

[通信作者] 李冰(Li Bing, corresponding author), E-mail: libing_516619@163.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20150205.1443.006.html>

release and possess a caspase-3-dependent anti-tumor activity, suggesting potential clinical implications.

[**Key words**] C- phycocyanin(C-PC);nanoparticles(NP);carboxymethyl chitosan(CMC);HeLa cell;growth

[Chin J Cancer Biother, 2015, 22(1): 34-40]

随着纳米技术的不断发展,以纳米粒子作为药物载体的研究已引起广泛关注^[1-2];靶向载药纳米粒子在给药体系中表现出独特的纳米效应,具有很好的发展前景^[3]。羧甲基壳聚糖(carboxymethyl chitosan, CMC)是壳聚糖的衍生物,是一种具有很好生物相容性的高分子材料,具有很好的水溶性,可作为良好的药物载体材料应用于医药领域^[4-5]。研究^[6-8]发现,一些天然药物如紫杉醇、喜树碱类药物都可吸附于壳聚糖微球中,从而可将药物有效地运送到实体瘤中,发挥缓释和长效的抗肿瘤作用。

藻蓝蛋白(C-phycocyanin, C-PC)是钝顶螺旋藻中含有的一种重要的天然光合色素,因其具有安全、无毒、水溶性强、清亮且着色力强等优点,作为天然色素被广泛应用于食品、化妆品、染料等工业领域。藻蓝蛋白发出紫色荧光,可用作荧光标记物,在波长 620 nm 有特异性吸收峰^[9]。李冰等^[10-11]研究发现,藻蓝蛋白具有抗肿瘤和增强机体免疫的功效,但其稳定性较差、在体内易降解等也限制了它在肿瘤治疗领域的应用。

本研究利用离子交联法,通过对影响制备负载 C-PC 的 CMC 纳米微粒/球(nanoparticle, NP)(C-PC/CMCNP)的 3 个主要因素设计正交实验[$L_9(3^3)$],优选能合成较小粒径、较高包封率的纳米载体的最佳条件,并在最优制备条件下制备 C-PC/CMCNP;同时检测 C-PC/CMCNP 对 HeLa 细胞增殖和凋亡的影响,揭示其抗肿瘤的作用机制,为新型海洋药物的研发及其抗肿瘤的应用提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 细胞株

人宫颈癌 HeLa 细胞株由青岛大学医学院附属医院惠赠,用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中常规培养,传代至对数生长期。

1.2 主要试剂及仪器

Cell Counting Kit-8(CCK-8 试剂盒)购自北京 Solarbio 科技有限公司, caspase-3 抗体购自 Santa Cruz Biotechnology 公司, CMC(取代度 $\geq 85\%$, 黏度 $\leq 80\%$)购自青岛弘海生物技术有限公司,钝顶螺旋藻粉购自中国海洋大学, CaCl₂ 购自天津市化学试剂有限公司, CD59_{sp} 购自中肽生化有限公司。恒

温磁力搅拌器购自海门市麒麟医用仪器厂,精密 pH 计(pH S-3C 型)购自上海雷磁仪器厂,冷冻干燥器(BYK-FD-1)购自北京恒奥德仪器仪表有限公司,台式高速冷冻离心机(H1850R)购自广州沪瑞明仪器有限公司,紫外分光光度计(6715 UV/VIS, JENWAY)购自仪高南仪器(深圳)有限公司,激光粒度仪(WJL-608)购自上海仪电物理光学仪器有限公司,水平恒温振荡器(HZO-振荡器)购自哈尔滨东明医疗仪器厂,扫描电子显微镜(JEOL JSM-840)购自日本电子光学株式会社,傅立叶变换红外光谱仪(Nicolet IR200, Axygen)购自北京千百叶电子科技有限公司,流式细胞仪(iQue Screener, Intellicyt)购自上海典奥生物科技有限公司,酶标分析仪(9602A)购自上海创奕科教设备有限公司。

1.3 正交分析实验筛选制备 C-PC/CMCNP 的最佳条件

采用正交实验设计,根据 $L_9(3^3)$ 优选制备 C-PC/CMCNP 的最佳条件,其中温度(27 °C)、搅拌速度(800 r/min)和 pH(7.4)为固定值,观察 CMC 和 C-PC 的质量比、CMC 浓度、CaCl₂ 浓度 3 个因素(每因素分 3 个不同水平)对纳米载体表征的影响,以包覆后纳米载体的粒径大小和包封率作为评价指标。每种实验条件重复 4 次,制备出的样品评估指标取平均值。正交实验考察因素及其水平见表 1。

表 1 正交实验的因素与水平编码表[$L_9(3^3)$]

Tab.1 Code table about the factors and levels of orthogonal test [$L_9(3^3)$]

Group	A	B	C
1	1:1	1	1
2	1:2	2	2
3	1:4	4	4

A: Mass ratio of CMC and C-PC; B: Concentration of CMC(mg/ml); C: Concentration of CaCl₂(mg/ml)

1.4 离子交联法制备 C-PC/CMCNP

根据上述正交实验所得出的优化条件,采用离子交联法制备 C-PC/CMCNP 载药纳米微球。具体制备方法:在 5 ml CMC 溶液中加入适量藻蓝蛋白,不断搅拌 5 min,加入 2 ml CaCl₂,继续搅拌 30 min。

12 000 × *g* 离心 20 min, 取沉淀, 蒸馏水洗涤后重悬, 冷冻干燥。

1.5 纳米粒子基本性质的检测

1.5.1 纳米粒子粒径的测定 取所制样品适量, PBS 溶解, 用激光粒度仪测定微球直径, 30 s 内测 6 次, 取平均值。

1.5.2 载药量及包封率的测定 采用紫外分光光度计分别测量 650 nm 和 615 nm 处溶液的光密度。利用公式 $C_{C-PC} = (D_{615} - 0.474 D_{650}) / 5.34$ 计算 C-PC 浓度 (C_{C-PC})。

载药量 (drug loading, DL) 是指粒子中药物的质量百分数, 载药量 (%) = C-PC/CMCNP 中 C-PC 的质量/纳米粒子的质量 × 100% ;

包封率 (embedding ratio, ER) 是指粒子中药物量与投药量之比, 包封率 (%) = C-PC/CMCNP 中 C-PC 的质量/C-PC 的投药量 × 100% 。

测定方法为: 准确称取干燥的 C-PC/CMCNP 粉末 10 mg, 溶于 50 ml PBS 中, 封口膜封口, 常温下 800 r/min 持续搅拌 24 h 后, 12 000 × *g* 离心 20 min, 取上清液, 用紫外分光光度计测量其在 615 nm 和 650 nm 处的光密度。同时以不载 C-PC 的空白纳米粒子, 经上述相同操作后的 PBS 溶液作空白对照。将光密度值代入公式, 可得到相应的 C-PC 浓度。载药量为微球中 C-PC 的含量, 重复实验 5 次取其平均值; 包封率为实际载药量与理论载药量的比值。

1.5.3 红外光谱仪检测纳米粒子表面官能团的特征 取适量溴化锌粉末, 干燥后充分研磨, 适量的待测纳米粒子与之充分混合后, 充分研磨, 并制成溴化锌压片, 置于红外光谱仪中检测粒子表面的特征官能团, 并用同样的方法制备 C-PC、CMCNP 溴化锌压片作为对照。

1.5.4 C-PC/CMCNP 的紫外吸收光谱 由于 C-PC 的紫外吸收峰在 620 nm 左右, 故本实验选择 200 ~ 800 nm 波长分别对 C-PC、C-PC/CMCNP 进行波长扫描。10 mg/ml 的各物质 0.5 ml, PBS 定溶至 3 ml, 保温 10 min, 以 PBS 缓冲液为对照, 对 200 ~ 800 nm 波长范围内进行紫外光谱扫描。

1.5.5 载药纳米粒子药物释放实验 精确称取载药纳米微球 5 mg 置 5 ml 离心管中, 加入 3 ml PBS (pH 7.4), 封口膜封紧, 漩涡 1 min 后置于 (37.0 ± 0.5) °C 的水平恒温振荡器内进行动态透析 (频率为 100 r/min), 并分别于相应时间取出离心管, 12 000 × *g*, 离心 20 min, 离心得到的上清液用紫外分光光度计测其在 615 nm 和 650 nm 处的光密度; 同时, 离

心得到的粒子补充同温的 PBS 3 ml, 漩涡 1 min 后继续振荡。依据公式计算不同时间纳米微球释放 C-PC 的量, 再计算累计释放量, 并绘制载药纳米微球体外释放曲线。

1.6 CCK-8 法检测细胞增殖能力

实验共分 4 组: 对照组 (无药物处理)、C-PC 处理组 (仅以 C-PC 处理细胞)、CMC 处理组 (仅以 CMC 处理细胞)、C-PC/CMCNP 处理组 (以 C-PC/CMCNP 处理细胞)。

取对数生长期 HeLa 细胞 (1 × 10⁴ cells/well) 接种于 96 孔培养板中, 每孔 100 μl, 每组设 5 个复孔。孵育 24 h 后, 每组加入不同浓度的药物处理 48 h, 加入 CCK-8 10 μl, 孵育 4 h。酶标仪于波长 450 nm 处检测光密度值 (D_{450})。计算各组的细胞活力以及 C-PC、CMC 和 C-PC/CMCNP 对 HeLa 细胞的半数抑制浓度 (IC_{50}) 值。取各组 1/2 IC_{50} 作为后续实验中 C-PC、CMC 和 C-PC/CMCNP 的处理浓度。实验重复 3 次。

1.7 流式细胞术检测细胞凋亡

收集对数生长期的 HeLa 细胞, 调整细胞密度为 1 × 10⁶ 个/ml, 接种 24 孔板, 2 ml/孔, 每组设 3 个复孔, 加入相应药物处理。48 h 后离心收集细胞, PBS 洗涤 3 次。根据 Guava Nexin Reagent 细胞凋亡检测试剂盒检测说明, 加入 80 μl Guava Nexin Reagent (含有 Annexin V-PE 和 7-AAD 的缓冲液), 混匀后室温避光孵育 20 min, 置于流式细胞仪上进行检测。每组实验重复 3 次。

1.8 Western blotting 检测 HeLa 细胞 caspase-3 蛋白的表达

药物处理后, 离心收集悬浮及贴壁的细胞, 冰上裂解 2 h, 离心, 取上清, 测蛋白浓度。SDS-PAGE 分离蛋白后转移至 PVDF 膜上, 封闭 2 h。分别加入兔抗人 caspase-3 和兔抗人 β-actin 的一抗, 4 °C 孵育过夜。辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 2 h。化学发光显色, 用 Image J 图像软件进行分析。实验重复 3 次。

1.9 统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件及 Origin 7.0 化学实验数据处理软件分析数据。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间均数比较采 *t* 检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 制备 C-PC/CMCNP 的最佳实验条件

根据表 1 的正交设计进行实验, 以包覆纳米微

球的包封率和粒径作为目标值进行评估,统计分析结果见表 2。

表 2 正交设计实验结果[$L_9(3^3)$]
Tab. 2 Results of orthogonal test [$L_9(3^3)$]

No.	A	B	C	Encapsulating rate (%)	Diameter (d/nm)	Score
1	1	1	62	115	15	
2	1	2	2	53	155	6
3	1	3	3	48	180	3
4	2	1	2	56	150	10
5	2	2	3	59	121	12
6	2	3	1	60	118	14
7	3	1	3	56	136	10
8	3	2	1	57	124	11
9	3	3	2	58	120	12
T1	23	42	33			
T2	41	28	31			
T3	28	24	29			
R	16	18	3			

A: Mass ratio of CMC and C-PC; B: Concentration of CMC (mg/ml); C: Concentration of CaCl_2 (mg/ml)

根据 R 值对实验结果进行分析可知,3 因素对实验结果的影响程度大小依次为 CMC 质量浓度 > C-PC/CMC 质量比 > CaCl_2 质量浓度。且当反应液中 CMC 浓度越大,所得样品的包封率越小;当反应液 CMC 质量浓度为 1 mg/ml 时,所得样品的包封率较高。而反应体系中 CaCl_2 的质量浓度对实验结果影响最小。比较 9 个实验的综合评分可知,以实验 1 得分最高,通过比较各因素 T 值大小得出最佳组合条件为 A2B1C1(表 2),即 C-PC 与 CMC 的质量比为 1:2,CMC 质量浓度为 1 mg/ml、 CaCl_2 质量浓度为 1 mg/ml 为最佳制备条件。由于上述实验中没有罗列 A2B1C1 水平组合,故追加了该水平实验,4 次重复实验结果得出 C-PC/CMC 的包封率为 63.2%、平均粒径为 (118.4 ± 2.07) nm。后续实验均以此条件组合制备纳米载体。

2.2 C-PC/CMCNP 的结构特点

2.2.1 粒径 根据 A2B1C1 水平组合制备的 C-PC/CMCNP,经激光粒度仪粒度分析,结果(图 1)显示,C-PC/CMCNP 的粒径为 (118.4 ± 2.07) nm,主要分布范围在 100 ~ 130 nm,并具有较好的分散度。

2.2.2 粒子表面官能团特征 经分析测定 C-PC/CMCNP 的红外光谱,并与 CMC 的红外光谱比较,结

果(图 2)发现,C-PC/CMCNP 表面的化学键发生了变化,说明两者已相连。

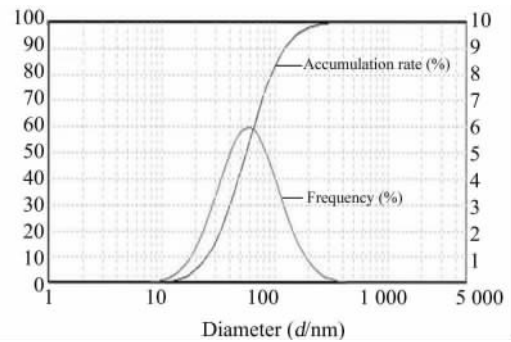


图 1 C-PC/CMCNP 的粒径分布

Fig. 1 Particle size distribution of C-PC/CMCNP

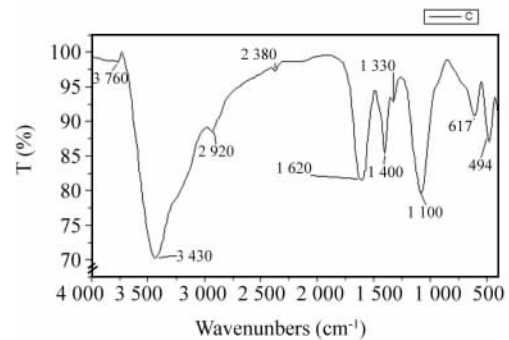


图 2 C-PC/CMCNP 的红外光谱图

Fig. 2 Infrared spectrogram of C-PC/CMCNP

已知 C-PC 在 620 nm 处有特殊的吸收峰。为了再次证实制得的纳米微球包裹了 C-PC,采用紫外分光光谱仪测量 620 nm 处的吸光度。结果如图 3 所示,载药的纳米微球在 620 nm 处有明显的吸收峰,而空载药物的空白纳米微球则没有此特殊的吸收峰,再次验证了采用离子交联法可以制得包裹 C-PC 的微球。

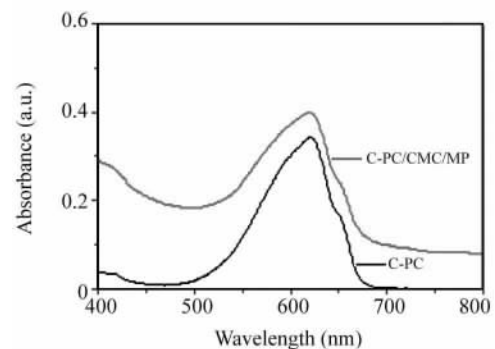


图 3 C-PC 和 C-PC/CMCNP 的紫外光谱图

Fig. 3 Ultraviolet spectrum of C-PC and C-PC/CMCNP

2.3 载药纳米粒子药物释放特征

C-PC/CMCNP 体外药物释放检测结果(图 4)显示,在最初的 6 h 内 C-PC 从纳米微球中缓慢持续释放,12 h 累计释放超过 60%,并且可以进一步释放,表明 C-PC/CMCNP 可满足缓释要求。图中可见药物前期释放明显,后期释放速度逐渐降低,原因可能是由于 C-PC 为水溶性药物,会自动向缓冲溶液中释放。C-PC 的释放行为应该是由羧甲基壳聚糖的降解过程发动的。

2.4 C-PC/CMCNP 明显抑制 HeLa 细胞的增殖

CCK-8 法检测(图 5)结果表明,C-PC、CMC 和 C-PC/CMCNP 均具有抑制 HeLa 细胞增殖的作用,且浓度越高,抑制作用越显著。C-PC、CMC 和 C-PC/CMCNP 的 IC_{50} 分别为 192.75、398.74 和 89.63

$\mu\text{g/L}$, C-PC/CMCNP 的 IC_{50} 不到 C-PC IC_{50} 的 1/2、CMC IC_{50} 的 1/4,结果显示 C-PC/CMCNP 对 HeLa 细胞增殖的抑制作用最强。

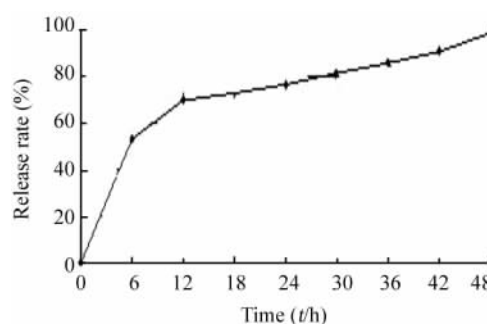


图 4 C-PC/CMCNP 的体外 C-PC 释放曲线

Fig. 4 Release curve of C-PC from C-PC/CMCNP in vitro

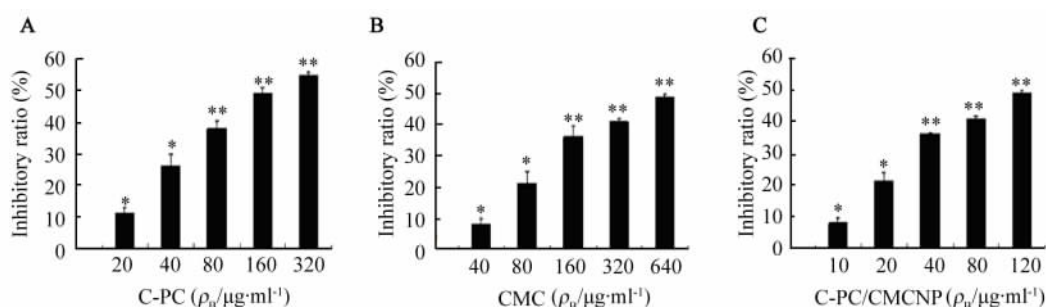


图 5 C-PC、CMC 和 C-PC/CMCNP 对 HeLa 细胞增殖的抑制作用

Fig. 5 Inhibitory effect of C-PC, CMC and C-PC/CMCNP on proliferation of HeLa cells

A: C-PC treated group; B: CMC treated group; C: C-PC/CMCNP treated group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 $\mu\text{m/ml}$ group

2.5 C-PC/CMCNP 明显诱导 HeLa 细胞凋亡

取 C-PC、CMC、C-PC/CMCNP 的 1/2 IC_{50} 值为作用剂量处理 HeLa 细胞,流式细胞术检测结果(图 6)显示,与对照组相比,C-PC 组和 CMC 组均可诱导细胞发生凋亡[(48.7 ± 0.18)%、(22.7 ± 0.15)% vs (18.12 ± 0.11)%],均 $P < 0.05$,但 C-PC/CMCNP 组的凋亡强度最显著[(52.5 ± 0.14)%], $P < 0.01$ 。表明 C-PC/CMCNP 可诱导产生更大程度的细胞凋亡(图中左上、右上、左下、右下四个象限中右上象限代表死亡的细胞,左下象限是存活的细胞,右下象限是凋亡的细胞)。

2.6 C-PC/CMCNP 可更明显促进 HeLa 细胞 caspase-3 蛋白的表达

Western blotting 检测用药前后 caspase-3 蛋白的表达情况,结果(图 7)显示,与对照组相比,C-PC 组与 CMC 组 caspase-3 蛋白表达量均有明显升高[(0.83 ± 0.09)、(0.64 ± 0.11) vs (0.27 ± 0.14),

均 $P < 0.05$),而 C-PC/CMCNP 处理组 caspase-3 的表达量又显著高于 C-PC 和 CMC 组[(0.92 ± 0.03) vs (0.83 ± 0.09)、(0.64 ± 0.11)], $P < 0.05$ 。结果表明,3 种药物均可促进 caspase-3 的表达水平,C-PC/CMCNP 的表达促进作用更为显著。

3 讨论

纳米控释给药系统是运用纳米技术改变制剂结构,使药物在预定时间内自动按某一速度恒速释放于靶器官和靶组织,并在较长时间内维持有效浓度的一类制剂,该制剂可以大大提高药效和降低毒性作用^[12],从而达到靶向输送的目的。CMC 是壳聚糖的羟基或氨基羧甲基化后的衍生物,富含游离的羧基和氨基,这种改性后的壳聚糖,不仅保留了壳聚糖的一般特性,而且还具有良好的水溶性、吸湿性、保湿性,在医药、日用化学、造纸工业、烟草工业等方面有着十分广阔的用途,尤其因为其具有良好的生

物相容性和生物降解性,已广泛应用于生物医学领域^[13-14],近年来常用作药物控释载体^[15]。Anitha 等^[16]以 N,O-CMC 纳米颗粒为载体合成了 N,O-

CMC 负载 5-FU 纳米微球用于乳腺癌的治疗, Li 等^[17-18]以戊二醛为交联剂,通过乳化交联法制备了 O-CMC 载白屈菜红碱纳米微球。

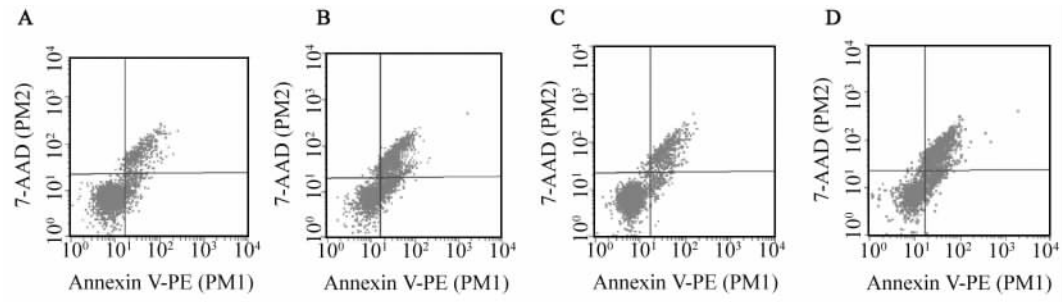


图 6 流式细胞术检测 C-PC/CMCNP 对 HeLa 细胞的凋亡诱导作用

Fig. 6 C-PC/CMCNP induced apoptosis of HeLa cells detected by flow cytometry

A: PBS group; B: C-PC group; C: CMC group; D: C-PC/CMCNP group

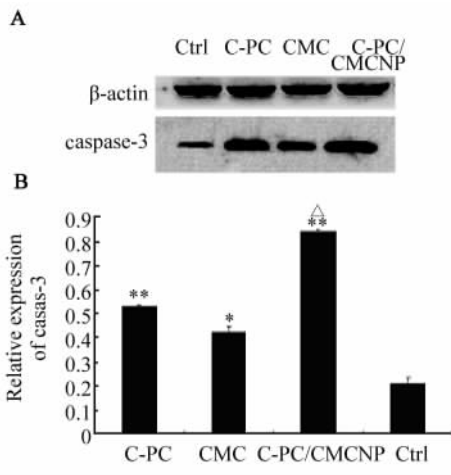


图 7 Western blotting 检测各组 HeLa 细胞 caspase-3 蛋白表达量

Fig. 7 Expression of caspase-3 protein in HeLa cells in each group detected by Western blotting

A: Electrophoretogram of caspase-3 and β -actin;

B: The grayscale ratio of caspase-3/ β -actin

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Ctrl group

$\Delta P < 0.05$ vs C-PC or CMC group

本研究以水溶性的 C-PC 为模型药物,采用离子交联法,以 CaCl_2 为交联剂,制备了 CMC/C-PC 纳米微球。使用激光粒度仪测定了纳米微粒的直径,并用紫外分光光度计测定了其载药率和包封率,红外光谱仪和紫外光谱仪分析了 C-PC/CMCNP 纳米微球的结构,及其体外释放性能的考察。实验结果

表明纳米微球分散性能良好,平均粒径为 (106 ± 3.07) nm,包封率为 63.2%,在生理条件下具有明显的缓释作用,这为开发水溶性易分解药物缓释剂提供了一条新的有效途径。该载药纳米微球的活性成分(C-PC)被包裹于微球内部,可增大药物浓度,保护药物活性,增加药物稳定性,改变药物在体内的分布,增加药物在靶器官中的累积,提高治疗指数,减少毒性作用。利用 C-PC 的无毒高效性和 CMC 的生物相容性,构建二位一体的新型载药纳米微球(C-PC/CMCNP)。CCK-8 检测结果表明,三种药物均具有抑制 HeLa 细胞生长的作用,且存在浓度剂量效应。C-PC/CMCNP 的作用效果更为明显。

肿瘤是一类细胞凋亡异常的疾病。研究表明,细胞凋亡信号转导途径是细胞发生凋亡的关键,在此过程中, caspase 蛋白酶家族起到关键作用^[19]。caspase 依赖性细胞凋亡途径包括死亡受体引起的外源途径和由线粒体引起的内源途径两大类,这两类凋亡途径均是通过最终活化 caspase-3 而使细胞发生凋亡的。

利用流式细胞术法检测三种药物诱导 HeLa 细胞凋亡的情况,发现三种药物均可导致 HeLa 细胞发生凋亡,但 C-PC/CMCNP 的凋亡效果更为显著。进一步研究发现,三种药物均可促进 caspase-3 的表达,C-PC/CMCNP 的促进作用更为明显。由此推测,C-PC/CMCNP 诱导 HeLa 细胞发生凋亡的分子机制可能是通过促进效应 caspase-3 蛋白的表达来实现的,而不是与起始 caspase 的活化有关,尚需进一步研究。

本研究下一步将在 CMC 上连接 CD59 特异性

配体肽(CD59_{sp}),制备包埋 C-PC 的新型纳米微球。利用 CD59_{sp} 的导向作用,将 C-PC 定向输送到肿瘤细胞表面实现靶向杀伤作用。本研究为肿瘤的靶向治疗开辟了新途径,具有广阔的开发和应用前景。

[参 考 文 献]

- [1] Che M, Jack H, Zhang LF. Nanoparticle-based combination therapy toward overcoming drug resistance in cancer [J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 83 (8): 1104-1111.
- [2] Leng FJ, Wan JL, Liu W, et al. Prolongation of epidural analgesia using solid lipid nanoparticles as drug carrier for lidocaine [J]. *Reg Anesth Pain Med*, 2012, 37 (2): 159-165.
- [3] 姚述光, 张文豪, 杨培慧, 等. 羧甲基壳聚糖载药纳米微球的制备及其对喉肿瘤细胞的杀伤及靶向作用的探测 [J]. *东南大学学报(医学版)*: 2011, 30 (1): 66-71.
- [4] Feng C, Wang Z, Jiang C, et al. Chitosan/o-carboxymethyl chitosan nanoparticles for efficient and safe oral anticancer drug delivery: In vitro and in vivo evaluation [J]. *Int J Pharm*, 2013, 457 (1): 158-167.
- [5] Zhao L, Zhu BY, Jia YH, et al. Preparation of biocompatible carboxymethyl chitosan nanoparticles for delivery of antibiotic drug [J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 236469.
- [6] Yuan H, Bao X, Du YZ, et al. Preparation and evaluation of SiO₂-deposited stearic acid-g-chitosan nanoparticles for doxorubicin delivery [J]. *Int J Nanomed*, 2012, 7: 5119-5128.
- [7] Shi LL, Tang C, Yin CH. Glycyrrhizin-modified O-carboxymethyl chitosan nanoparticles as drug vehicles targeting hepatocellular carcinoma [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(30): 7594-7604.
- [8] Termsarasab U, Cho HJ, Kim DH, et al. Chitosan oligosaccharide-arachidic acid-based nanoparticles for anti-cancer drug delivery [J]. *Int J Pharm*, 2013, 441(1/2): 373-380.
- [9] Thangam R, Suresh V, Asenath PW, et al. C-Phycocyanin from *Oscillatoria tenuis* exhibited an antioxidant and in vitro antiproliferative activity through induction of apoptosis and G₀/G₁ cell cycle

- arrest [J]. *Food Chem*, 2013, 140(1/2): 262-272.
- [10] Li B, Zhang XC, Gao MH, et al. Effects of CD59 on antitumoral activities of phycocyanin from *Spirulina platensis* [J]. *Biomed Pharmacother*, 2005, 59(10): 551-560.
- [11] Li B, Gao MH, Zhang XC, et al. Molecular immune mechanism of C-phycocyanin induces apoptosis in Hela cells in vitro [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2006, 43(3): 155-164.
- [12] Maya S, Kumar GL, Sarmento B, et al. Cetuximab conjugated O-carboxymethyl chitosan nanoparticles for targeting EGFR overexpressing cancer cells [J]. *Carbohydr Polymers*, 2013, 93 (2): 661-669.
- [13] 刘晶, 李晓声, 张建武. 羧甲基壳聚糖在医药领域应用的研究进展 [J]. *中国医学工程*, 2012, 20 (1): 177-178.
- [14] Jayakumar R, Prabaharan M, Nair SV, et al. Novel carboxymethyl derivatives of chitin and chitosan materials and their biomedical applications [J]. *Prog Materials Sci*, 2010, 55 (7): 675-709.
- [15] Wang JJ, Zeng ZW, Xiao RZ, et al. Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers [J]. *Int J Nanomed*, 2011, 6: 765-774.
- [16] Anitha A, Chennazhi KP, Nair SV, et al. 5-fluorouracil loaded N, O-carboxymethyl chitosan nanoparticles as an anticancer nanomedicine for breast cancer [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2012, 8(1): 29-42.
- [17] Li GY, Zhong M, Zhou ZD, et al. Novel carboxymethyl chitosan microspheres for controlled delivery of chelerythrine [J]. *J Macromol Sci*, 2011, 48(11): 904-911.
- [18] Li GY, Zhong M, Zhou ZD, et al. Formulation optimization of chelerythrine loaded O-carboxymethylchitosan microspheres using response surface methodology [J]. *Int J Biological Macromol*, 2011, 49(5): 970-978.
- [19] 岳原亦, 张扬, 张一奇. Caspase 家族与细胞凋亡 [J]. *中国医疗前沿*, 2011, 6(6): 25-26.

[收稿日期] 2014 - 10 - 15

[修回日期] 2014 - 12 - 10

[本文编辑] 阮芳铭

· 荣誉榜 ·

热烈祝贺本刊再次被评为“RCCSE 中国权威学术期刊”

我国四大学术期刊评价体系之一——武汉大学中国科学评价研究中心于 2015 年 1 月 13 日公布了《RCCSE 中国学术期刊评价研究报告(2015 ~ 2016)》中国权威和核心期刊的评价结果,该报告以 65 个一级学科共 6 201 种学术期刊作为评价对象,按得分从高到低排序,从中产生了权威期刊 316 种(0 ~ 5%)、核心期刊 1 572 种(5% ~ 30%)、准核心期刊 1 848 种(30% ~ 60%)、一般期刊 1 828 种(60% ~ 90%)和较差期刊 637 种(90% ~ 100%)。在 316 种权威学术期刊中,医学类期刊共 48 种,占 8%,其中肿瘤学期刊有 3 种:《中华肿瘤杂志》、《中国肿瘤生物治疗杂志》和《肿瘤》。

《中国肿瘤生物治疗杂志》连续两届获“权威学术期刊”称号,取得这样的成绩离不开广大专家教授、读者、作者的支持与帮助! 成绩和荣誉是鞭策编辑部全体人员再接再厉、开拓进取的动力,我们定会发奋努力,不断创造新的业绩,以回报广大肿瘤防治工作者对本刊的厚爱和支持!

(本刊编辑部)