

MUC1 靶向性载药纳米粒的构建及其体外抗肿瘤效应的评估

于琛琛¹, 胡燕¹, 段金虹¹, 王琛², 许海燕¹, 杨先达^{1*}

(1. 中国医学科学院 基础医学研究所, 北京 100005; 2. 国家纳米科学中心, 北京 100190)

摘要:目的 构建 MUC1 靶向纳米粒, 并在体外评估其抗肿瘤效应。方法 采用聚乳酸聚乙醇酸共聚物(PLGA)制备包载紫杉醇的纳米粒, 并在表面偶联具有 MUC1 蛋白靶向性的核酸适配体。紫外分光光度法、动态光散射法测定 MUC1 靶向载药纳米粒的基本表征; 以 MUC1 过表达的乳腺癌细胞 MCF-7 为实验组, 肝癌细胞 HepG2 为对照组, 用流式细胞仪检验纳米粒的选择性, MTS 法评估其杀伤效果和 IC₅₀。结果 MUC1 靶向载药纳米粒粒径(225.3 ± 9.2) nm, 药物包封率 83.6% ± 1.7%, 在体外可以特异性地被 MUC1⁺ 癌细胞摄入, 对 MCF-7 细胞杀伤作用显著强于普通载药纳米粒($P < 0.01$), IC₅₀ 为 1.52 mg/L。结论 该靶向纳米粒可以在体外特异性地增加 MUC1⁺ 肿瘤细胞对纳米粒的摄入, 降低 IC₅₀ 值, 提高化疗药物对肿瘤细胞的杀伤效率。

关键词: MUC1; 核酸适配体; 靶向给药; 肿瘤

中图分类号: R 979.1 文献标志码: A

Preparation of MUC1-targeted nanoparticles and evaluation of its cytotoxicity *in vitro*

YU Chen-chen¹, HU Yan¹, DUAN Jin-hong¹, WANG Chen², XU Hai-yan¹, YANG Xian-da^{1*}

(1. Dept. of Physiology and Pathophysiology, Institute of Basic Medical Sciences, CAMS & PUMC, Beijing 100005; 2. National Center of Nanoscience and Technology, Beijing 100190, China)

Abstract: Objective To construct MUC1-targeted nanoparticles and evaluate its cytotoxicity *in vitro*. **Methods** MUC1 aptamers were conjugated to the surface of nanoparticles which were made of poly (lactic-co-glycolic-acid) (PLGA) nanoparticles and loaded with paclitaxel (PTX). The MUC1-targeted nanoparticles (Apt-NP-PTX) were characterized by UV spectrophotometry and dynamic light scattering. Using MUC1-overexpressing MCF-7 breast cancer cell as experimental group, and HepG2 as control group, the specificity of the Apt-NP-PTX was detected by flow cytometry. The cytotoxicity and IC₅₀ of Apt-NP-PTX against MCF-7 were evaluated using a standard MTS assay. **Results** The Apt-NP-PTX were about (225.3 ± 9.2) nm in size with an encapsulation efficiency of 83.6% ± 1.7%. The Apt-NP-PTX enhanced *in vitro* drug delivery and cellular toxicity to MUC1⁺ cancer cells, as compared with non-targeted nanoparticles that lack the MUC1 aptamer ($P < 0.01$), with IC₅₀ of 1.52 mg/L and 4.10 mg/L, respectively. **Conclusion** The Apt-NP-PTX can effectively enhance the PTX delivery to MUC1-overexpressing MCF-7 cells *in vitro*.

Key words: MUC1; aptamer; targeted drug delivery; tumor

收稿日期: 2011-04-18 修回日期: 2011-05-19

基金项目: 国家重大科学计划(2011CB911003, 2011CB911004, 2011CB933504); 国家自然科学基金(81071870)

* 通信作者(corresponding author): ayangmd@gmail.com

核酸适配体 (aptamer) 是一类经筛选得到的小序列 DNA 或 RNA, 它们自身形成的空间三维结构可以特异性地和靶点结合。核酸适配体具有容易合成, 结合力高, 靶点范围广, 免疫原性低等优点, 是目前研究最活跃的新型靶向分子之一^[1]。已有多项研究表明, 核酸适配体可成功地应用于抗肿瘤靶向给药系统, 如针对前列腺癌的靶向纳米粒^[2-4], 针对 T 细胞急性淋巴细胞白血病的药物-核酸适配体共轭物等^[5]。这些基于核酸适配体的研究为其在药物领域的应用奠定了基础。尽管如此, 用于治疗癌症的靶向纳米制剂一般只对某一种特定的肿瘤有效, 具有一定的局限性, 而不能广泛地应用于肿瘤的治疗。发展新型广谱抗肿瘤靶向性纳米药物载体系统具有重要的科学意义和应用价值。MUC1 蛋白是一种分布在细胞膜表面的糖蛋白, 在多种肿瘤细胞表面的表达量显著高于正常细胞, 是一个具有应用潜能的广谱肿瘤靶点^[6]。本研究以针对 MUC1 蛋白的核酸适配体 S2.2^[7] 为靶向分子, 首次构建了 MUC1 靶向载药纳米粒, 并在体外检测了其杀伤细胞的杀伤效率。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 主要试剂: 聚乳酸聚乙醇酸 [poly (lactide-coglycolide acid), PLGA, $M_w = 16000$] (济南岱罡生物科技有限公司); 碳二亚胺盐酸盐 (EDC · HCl)、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) (上海吉尔生化有限公司); MUC1 核酸适配体 S2.2 (Invitrogen 公司); 泊洛沙姆 188 ($M_w = 8400$, 药用级) (武汉康隆世纪科技有限公司); 罗丹明-123 (Rho-123) (Sigma 公司); 原料药紫杉醇 (西安宝赛生物科技有限公司); MTS 试剂盒 (Promega 公司); 其余药品、试剂均为国产分析纯。

1.1.2 细胞: 人乳腺癌 MCF-7 细胞和人肝癌细胞 HepG2 由中国医学科学院基础所细胞中心提供。

1.2 方 法

1.2.1 载药纳米粒制备: 将 0.1 mg 紫杉醇 (PTX) 和 2.0 mg PLGA 溶于 0.2 mL 乙酸乙酯中, 加入 1.0 mL 5% 泊洛沙姆 188 溶液, 充分混匀, 冰浴超声 1 min。将超声乳化好的乳液置于通风橱内搅拌挥发有机溶剂。待挥发完全后, 收集所剩液体, 超速离心

30 min, 去掉上清, 用去双蒸水重悬沉淀, 超声使之充分分散, 冷冻干燥后 4 °C 保存备用。

1.2.2 偶联 MUC1 核酸适配体 S2.2: 用双蒸水将上述载药纳米粒重悬, 配制成 0.01 g/L 溶液。加入 0.04 mol/L EDC 溶液和 0.01 mol/L NHS 溶液, 放置摇床中室温条件下反应 15 min, 加入 3'-NH₂ 修饰的核酸适配体 S2.2, 放置摇床中室温条件下反应 2 h。将反应物超速离心 30 min, 去掉上清, 用双蒸水重悬沉淀, 超声使之充分分散。将纳米粒冷冻干燥后, 4 °C 保存备用。

1.2.3 粒径的测定: 采用激光光散射法, 以去离子水作为重悬纳米粒, 使用激光粒度光散射仪在 25 °C 和 90° 角度测定纳米粒粒径, 取 3 次测试结果计算平均值。

1.2.4 包裹效率的测定: 分别称取冷冻干燥的纳米粒 (NP) 和载药纳米粒 (PTX-NP) 1.0 mg, 重悬于 1.0 mL 1 mol/L NaOH 溶液中, 置于摇床中振摇过夜, 使纳米粒裂解。用紫外分光光度仪在 227 nm 处测定 PTX 吸收值, 根据紫杉醇的标准曲线计算 PTX 的含量。

1.2.5 载药 MUC1-纳米粒的体外释放: 取适量载药纳米粒用含 0.5% 泊洛沙姆 188 的 PBS 缓冲溶液 (pH 7.4) 重悬, 将浓度调至 1.0 mg/mL, 取 5.0 mL 转入透析袋中 (分子截留量: 3 500), 将透析袋浸入 95 mL PBS 溶液中, 在摇床中于 37 °C 及摇速 120 rpm 下振摇。在预定的时间取出 5.0 mL 释放液, 并补充等量新的 PBS 缓冲溶液。用上述紫外分光光度法测定紫杉醇的浓度, 每个样品测定 3 次。

1.2.6 载药 MUC1-纳米粒体外选择性测定: 用包载荧光染料 Rho-123 的 MUC1 纳米粒与细胞共同培养后, 用流式细胞仪检测细胞的摄入纳米粒的情况。人乳腺癌 MCF-7 为 MUC1⁺ 细胞, 人肝癌 HepG2 为 MUC1⁻ 细胞。取对数生长期 MCF-7 和 HepG2 细胞接种于 24 孔板中培养 24 h 后, 分别加入荧光纳米粒和 S2.2 修饰荧光纳米粒悬液 (0.5 g/L), 37 °C 温育 4 h。D-Hank's 液洗涤 2 次后, 加入 0.25% 胰蛋白酶消化 1~2 min, 用 4% 福尔马林固定细胞 10 min。用流式细胞分析仪检测荧光强度。

1.2.7 载药 MUC1-纳米粒体外杀伤实验: 在 96 孔板中培养 MCF-7 细胞和 HepG2 细胞, 每孔细胞 3 000 个, 置于 37 °C 孵箱中培养 24 h, 分别做以下处

理: NP 组加入空白纳米粒; PTX 组加入游离紫杉醇; NP-PTX 组加入包载紫杉醇的纳米粒; Apt-NP-PTX 组加入包载紫杉醇的 MUC1 靶向纳米粒。并按 MTS 试剂盒说明书设置生长对照组和背景组。待生长对照组的 MCF-7 细胞长满时,将各孔的上清去掉,用 D-Hank's 溶液洗涤 3 遍,然后每孔加入 100 μ L 的 RPMI-1640 和 20 μ L 的 MTS 液,置于 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中反应约 1 h,待反应液由黄色变为棕色时,用酶标仪测定 490 nm 处吸光度 A ,计算细胞存活率。

1.2.8 IC_{50} 的测定:将处于对数生长期 MCF-7 和 HepG2 细胞接种在 96 孔板上,每孔细胞 3 000 个。细胞培养 24 h 后,按 1.2.6 所述分别加入 PTX、NP-PTX 和 Apt-NP-PTX。以上各组每个浓度皆设 6 个复孔。处理后,在温箱中培养 4 h,将各孔培养基吸出,将细胞洗涤 3 遍后,每孔再加入新培养基,将 96 孔板置于细胞培养箱中过夜。待对照细胞组长满时,按细胞杀伤实验中所述 MTS 方法检测计算各组细胞生存率并求出 IC_{50} 。

1.3 统计学分析

数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 Excel 软件作 t 检验。

2 结果

2.1 载药纳米粒的制备及其表征

本研究中构建的 MUC1 靶向载药纳米粒结构如图 1 所示。纳米粒粒径为 (225.3 ± 9.2) nm。PTX 通过与 PLGA 之间的疏水作用,经过超声,被包载在

PLGA 纳米粒中,包封率为 $83.6\% \pm 1.7\%$,载药量 $4.2\% \pm 0.1\%$ 。

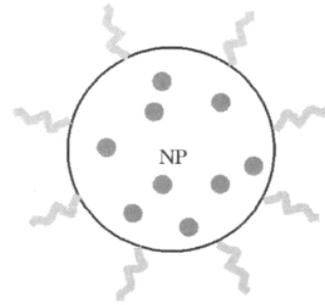


图 1 MUC1 靶向载药纳米粒 (Apt-PTX-NP) 结构示意图

Fig 1 Structure of MUC1 aptamer conjugated nanoparticles

2.2 载药 MUC1-纳米粒体外选择性测定

对于 MCF-7 细胞, MUC1 纳米粒 (Apt-NP) 的荧光曲线明显右移,证明 S2.2 促进了细胞对纳米粒的摄入,由荧光强度计算得纳米粒摄入量增加了 131%。而 HepG2 细胞对两种纳米粒的摄入量没有明显变化(图 2)。

2.3 载药 MUC1-纳米粒体外释放测定

载药纳米粒的释放过程呈现两相,开始的 12 h 药物突释,释放量达 54.1%,随后出现平稳的缓慢释放。最终有 65% 的紫杉醇释放到环境中(图 3)。

2.4 载药 MUC1-纳米粒体外杀伤实验

图 4 显示, NP 对 MCF-7 细胞和 HepG2 都没有杀伤,证明制剂的材料无毒。游离 PTX 对两种细胞

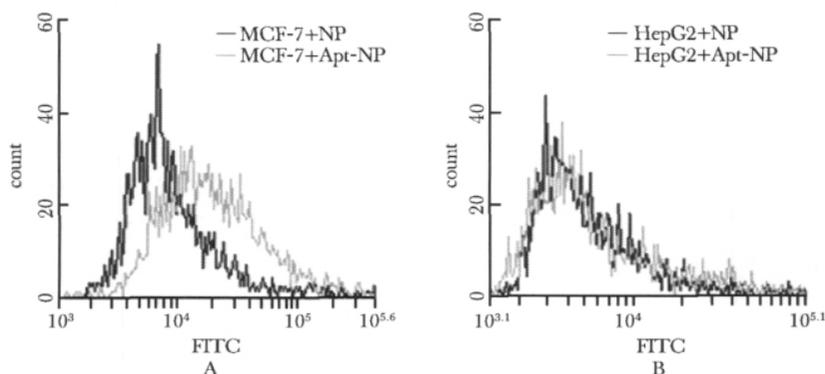


图 2 流式细胞仪测定 MCF-7 细胞 (A) 和 HepG2 细胞 (B) 对纳米粒 (NP) 与靶向纳米粒 (Apt-NP) 的摄入量

Fig 2 Flow cytometry analysis of MCF-7 (A) and HepG2 (B) cells treated with Apt-NPs and NPs

A. MCF-7 cells; B. HepG2 cells

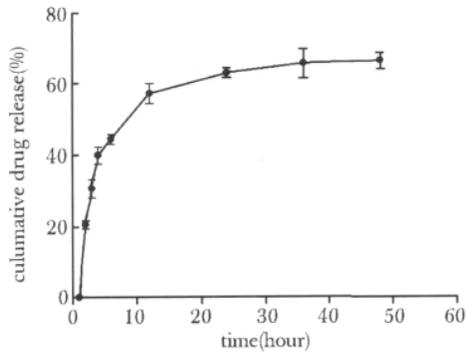


图3 MUC1 靶向载药纳米粒 (Apt-NP-PTX) 在 PBS (pH 7.4) 中释放曲线

Fig 3 *In vitro* drug release profile of the PTX encapsulated Apt-NP-PTX

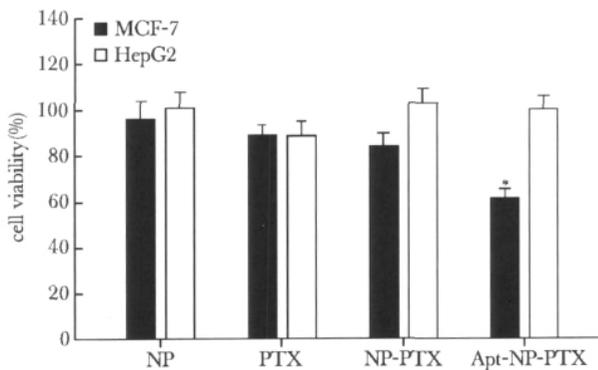


图4 MTS 法测定空白纳米粒 (NP), 游离紫杉醇 (PTX), 载药纳米粒 (NP-PTX), 靶向载药纳米粒 (Apt-NP-PTX) 对 MUC1⁺ MCF-7 细胞和 MUC1-HepG2 细胞的杀伤作用

Fig 4 MTS assay to determine the differential cytotoxicity of NP, PTX, NP-PTX and Apt-NP-PTX after incubation with MCF-7 and HepG2 cells

* $P < 0.01$ compared with NP-PTX group

的杀伤作用是相似的。在 MCF-7 细胞各处理组中, Apt-NP-PTX 的杀伤作用显著高于其他组 ($P < 0.01$)。而对于阴性对照 HepG2 细胞, 载药纳米粒表面是否偶联 MUC1 核酸适配体 S2.2 对细胞的杀伤作用没有显著差异, 结果与流式细胞仪的检测一致。

2.5 IC_{50} 的测定

图 5 为不同浓度的游离 PTX (PTX), 载药纳米粒 (NP-PTX), 靶向载药纳米粒 (Apt-NP-PTX) 对 MCF-7 细胞作用的浓度-生长率曲线, 求出回归公式

计算得到 PTX、NP-PTX、Apt-NP-PTX 的 IC_{50} 值分别为 14.59、4.10、1.52 mg/L。与上述实验结果一致, Apt-NP-PTX 的杀伤效率比游离 PTX 高 8.6 倍, 比 NP-PTX 高 1.7 倍。这个结果与流式细胞仪检测 MCF-7 细胞摄入纳米粒的结果相似 (Apt-NP 比 NP 的摄入量增加了 1.3 倍)。

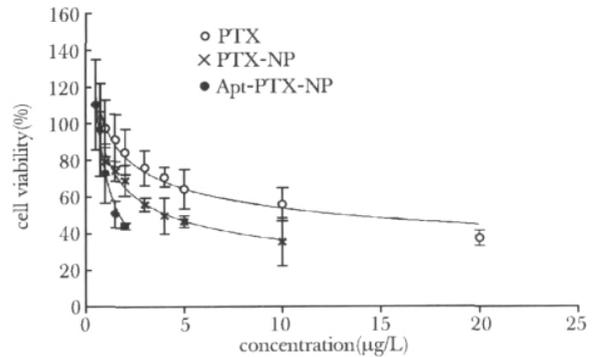


图5 MTS 法测定不同浓度下游离紫杉醇 (PTX), 载药纳米粒 (NP-PTX), 靶向载药纳米粒 (Apt-NP-PTX) 对 MUC1⁺ MCF-7 细胞的杀伤效率以计算 IC_{50} 值

Fig 5 MTS assay to determine the IC_{50} of PTX, NP-PTX and Apt-NP-PTX towards MCF-7 cells

3 讨论

靶向给药纳米粒系统是改善抗肿瘤药物毒副作用和耐药性的一个有效方法。纳米尺度引起的高通透高滞留效应 (Enhanced permeability and retention) 可以使纳米粒实现肿瘤被动靶向^[8]。此外, 在纳米粒表面修饰靶向分子, 可以使纳米粒主动靶向富集在肿瘤部位。本研究选择在多种肿瘤细胞表面表达量显著增加的 MUC1 蛋白为靶点, 以 MUC1 核酸适配体 S2.2 作为靶向分子, 偶联到纳米粒表面, 使其可以将抗肿瘤药物选择性地运载到 MUC1 过表达肿瘤细胞, 有针对性地发挥杀伤作用。

实验结果表明, MUC1 核酸适配体 S2.2 与纳米粒偶联后仍然可以特异性地与 MUC1 过表达癌细胞结合, 促进细胞对与其偶联的纳米粒的摄入。MCF-7 细胞表面有丰富的 MUC1 蛋白, 在 S2.2 与 MUC1 蛋白的共同作用下, 纳米粒可以被 S2.2 引导至细胞周围, 因此增加了纳米粒被 MCF-7 细胞摄入的概率。而 HepG2 细胞表面由于 MUC1 蛋白的缺

失,所以对纳米粒的摄入没有改变。细胞杀伤和 IC_{50} 实验进一步证明了 MUC1 靶向载药纳米粒可以被过表达 MUC1 的肿瘤细胞特异性摄入,提高药物在肿瘤细胞的浓度、提高疗效,降低对正常细胞的毒副作用。尽管纳米粒表面偶联 S2.2 后,药物的杀伤效率提高有限,但重要的是,S2.2 引起的细胞杀伤作用增强是特异性的。S2.2 核酸适配体使载药纳米粒具有了靶向性,可以选择性地只提高 MUC1⁺ 肿瘤细胞对纳米粒的摄入,而不会作用于正常细胞。由于 MUC1 在多种肿瘤表面过表达,因此 MUC1 靶向载药纳米粒也可能对其他 MUC1⁺ 肿瘤有效,如前列腺癌^[9]、胰腺癌^[10] 及卵巢癌^[11] 等。

综上所述,本研究构建了以 MUC1 蛋白为靶点的靶向载药纳米粒。该纳米粒采用 PLGA 包载 PTX,并在表面偶联 MUC1 核酸适配体 S2.2。实验结果表明,MUC1 靶向纳米粒制备方法简单易行,并有较高的包封率。在 S2.2 与 MUC1 蛋白的共同作用下,这种靶向纳米粒可以在体外特异性地增加 MUC1⁺ 肿瘤细胞对纳米粒的摄入,降低 IC_{50} 值,提高化疗药物对肿瘤细胞的杀伤效率。由于 MUC1 蛋白在多种癌细胞表面过量表达,因此本研究所构建的 MUC1 靶向载药纳米粒在广谱肿瘤治疗方面具有很好的应用潜能。

参考文献:

- [1] Levy-Nissenbaum E, Radovic-Moreno AF, Wang AZ, *et al.* Nanotechnology and aptamers: applications in drug delivery [J]. *Trends Biotechnol*, 2008, 26: 442 - 449.
- [2] Dhar S, Gu FX, Langer R, *et al.* Targeted delivery of cisplatin to prostate cancer cells by aptamer functionalized Pt (IV) prodrug-PLGA-PEG nanoparticles [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 17356 - 17361.
- [3] Farokhzad OC, Jon S, Khademhosseini A, *et al.* Nanoparticle-aptamer bioconjugates: a new approach for targeting prostate cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2004, 64: 7668 - 7672.
- [4] Farokhzad OC, Cheng J, Tepley BA, *et al.* Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 6315 - 6320.
- [5] Huang YF, Shangguan D, Liu H, *et al.* Molecular assembly of an aptamer-drug conjugate for targeted drug delivery to tumor cells [J]. *Chembiochem*, 2009, 10: 862 - 868.
- [6] Taylor-Papadimitriou J, Burchell J, Miles DW, *et al.* MUC1 and cancer [J]. *BBA-Mol Basis Dis*, 1999, 1455: 301 - 313.
- [7] Ferreira CSM, Matthews CS, Missailidis S. DNA aptamers that bind to MUC1 tumour marker: design and characterization of MUC1-binding single-stranded DNA aptamers [J]. *Tumor Biol*, 2006, 27: 289 - 301.
- [8] Yu B, Tai HC, Xue W, *et al.* Receptor-targeted nanocarriers for therapeutic delivery to cancer [J]. *Mol Membr Biol*, 2010, 27: 286 - 298.
- [9] O'Connor JC, Julian J, Lim SD, *et al.* MUC1 expression in human prostate cancer cell lines and primary tumors [J]. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2005, 8: 36 - 44.
- [10] Ohuchida K, Mizumoto K, Yamada D, *et al.* Quantitative analysis of MUC1 and MUC5AC mRNA in pancreatic juice for preoperative diagnosis of pancreatic cancer [J]. *Int J Cancer*, 2006, 118: 405 - 411.
- [11] Chauhan SC, Vinayek N, Maher DM, *et al.* Combined staining of TAG-72, MUC1, and CA125 improves labeling sensitivity in ovarian cancer: antigens for multi-targeted antibody-guided therapy [J]. *J Histochem Cytochem*, 2007, 55: 867 - 875.