

## · 论 著 ·

## 自组装白蛋白纳米粒作为阿克拉霉素 A 递送载体

陈美惠<sup>1</sup>, 丁厚伟<sup>1</sup>, 张庆明<sup>1</sup>, 龚光明<sup>1</sup>, 朱 庆<sup>2</sup>, 王曙东<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的 本研究旨在通过阿克拉霉素(ACM)共价结合氨基氧乙酸(AOA)产生的活性中间体,以降低 ACM 毒性和提高靶向药物。方法 采用三(2-羧乙基)膦(TCEP)作为二硫键断裂分子,通过分子间的“打开-中间-闭合”开关制备人血清白蛋白(HSA)的自组装纳米粒(Nanoparticle, NPs)。结果 核磁共振氢谱(<sup>1</sup>H-NMR)分析表明 ACM 和 AOA 之间的结合发生在 ACM 的酮基(<sup>12</sup>C)位置。HSA 纳米粒(NPs-ACM)负载 ACM 的载药量为 7.4%。NPs-ACM 的释放与 pH 相关。与游离 ACM 相比, NPs-ACM 的细胞毒性和心脏毒性降低。体内研究表明, NPs-ACM 对荷瘤小鼠靶向性比游离 ACM 高 4 倍( $P < 0.05$ )。结论 纳米粒 NPs-ACM 前体药物是理想的 ACM 肿瘤靶向药物载体。

**[关键词]** 白蛋白;阿克拉霉素 A;药物递送

**[中图分类号]** R945 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-271X(2017)06-0565-05

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1672-271X.2017.06.002

## Self-assembled albumin nanoparticles as a nanocarrier for aclacinomycin A

CHEN Mei-hui<sup>1</sup>, DING Hou-wei<sup>1</sup>, ZHANG Qing-ming<sup>1</sup>, GONG Guang-ming<sup>1</sup>, ZHU Qing<sup>2</sup>, WANG Shu-dong<sup>1</sup>

(1. Department of Pharmaceutical Preparation, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Region, PLA, Nanjing 210002, Jiangsu, China; 2. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, Jiangsu, China)

**[Abstract]** **Objective** This study aimed to reduce the cytotoxicity and improve the targeting of aclacinomycin (ACM) by covalently coupling it with amino-oxyacetic acid (AOA) to generate an active intermediate, AOA-ACM. **Methods** AOA-ACM was conjugated with self-assembled human serum albumin (HSA) nanoparticles constructed using Tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) as disulfide bond breaking molecules. **Results** Conjugation between ACM and albumin nanoparticles was found to occur at an ACM ketone site using <sup>1</sup>H-NMR. The drug loading efficiency of ACM conjugated with HSA nanoparticles (NPs-ACM) was 7.4% (molar ratio=6:1). The release of NPs-ACM was pH dependent. The cytotoxicity and cardiotoxicity of NPs-ACM were reduced compared with the free ACM. Vivo studies indicated that NPs-ACM exhibited fourfold higher tumor targeting capability on S180-tumor-bearing mice compared with the free ACM ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The NPs-ACM prodrug is ideal tumor targeting drug carriers for ACM.

**[Key words]** Albumin; Aclacinomycin A; Drug delivery

阿克拉霉素(aclacinomycin, ACM)是来自于链霉菌属(*Streptomyces galilaeus*)的一种强效抗生素,有抑制拓扑异构酶 II 和拓扑异构酶 I 毒素的作用<sup>[1]</sup>。ACM 可用于有效治疗多种人类恶性肿瘤。然而, ACM 临床使用中的两个主要问题是导致心肌炎症和骨髓抑制<sup>[2]</sup>。药物输送系统(drug delivery systems, DDS)用以增强制剂抗肿瘤作用,减少其毒性,并显示出对肿瘤微环境的优势,引起了很大的关注<sup>[3]</sup>。不同的 DDS,如乳剂、脂质体和磁性纳米粒均可作为 ACM

载体<sup>[4-5]</sup>。然而,静脉注射乳剂可在肝脏和脾脏被单核吞噬系统(MPS)迅速吞噬<sup>[6]</sup>。此外,脂质体的缺陷,如不稳定和复杂的制备工艺,限制了其应用。前药可增加母体化合物预期的治疗指数,同时以一种可控的方式降低其不利影响<sup>[7]</sup>。

人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)是一种多功能血浆蛋白,能将铁、药物和小分子输送到组织到身体各处。近年来,白蛋白因为其无免疫原性、生物降解性和丰度,已成为合适的候选药物载体<sup>[8]</sup>。HSA 纳米粒通过增强的渗透性和保留效应(EPR)的被动靶向和通过 gp60 受体引起的主动靶向而具备双靶向功能<sup>[9]</sup>。以 HSA 为基础的 DDS 可以通过共价连接药物荧光探针以及暴露的活性基团或非共价组装,如交联和高压均质化被开发<sup>[10-11]</sup>。白蛋白的水化膜在去溶剂化法中易被破坏。ACM 盐酸盐是水溶性的化学药品。因此,前药法是 ACM 制备 DDS 的一种

基金项目: 国家自然科学基金(31671026)

作者单位: 1. 210002 南京,南京军区南京总医院制剂科;  
2. 210023 南京,南京中医药大学药学院

通信作者: 王曙东, E-mail: sdwangpharm@126.com

引用格式: 陈美惠, 丁厚伟, 张庆明, 等. 自组装白蛋白纳米粒作为阿克拉霉素 A 递送载体[J]. 东南国防医药, 2017, 19(6): 565-569.

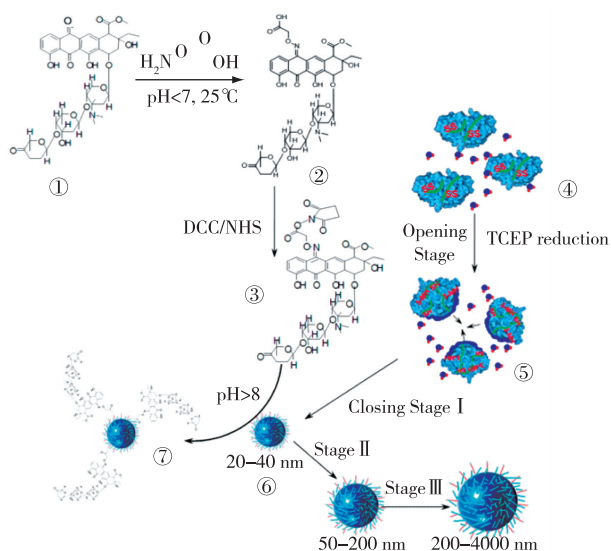
合适的方法。各种交联剂,如二硫脲肽<sup>[12]</sup>,可以在母体药物释放的微环境被代谢。这些交联剂已用于 DDS 的制备肿瘤靶向化疗<sup>[13]</sup>。目前,缺乏 ACM 的前药递送系统。基于这些概念,本研究开发了氨基氧乙酸(AOA)为交联剂的 HSA 纳米粒(NPs-ACM)靶向递送系统。AOA 通过 C=N 键耦联 ACM,与 TCEP 为还原剂制备的 HSA 纳米粒形成 NPs-ACM。用电喷雾电离质谱(ESI-MS)、核磁共振氢谱(<sup>1</sup>H-NMR)、药物释放、高分辨电镜(HRTEM)、活体成像等方法对 NPs-ACM 进行了表征。

## 1 材料与方法

**1.1 主要材料** HSA,近红外 797(NIR-797)和 TCEP 均购自 Sigma Aldrich(圣路易斯,美国)。阿克拉霉素盐酸盐(98%,化学级)购自万乐药业有限公司(深圳,中国),小鼠肛门纤维肉瘤细胞 S180 和乳腺癌细胞 MCF-7 购自上海博谷生物公司,ICR 小鼠(SPF 级,购自南通大学,许可证号:2008001683031。通风条件,室温 25℃,自由采食)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 合成 AOA-ACM** AOA-ACM 和 NPs-ACM 的制备见图 1。100 mg 的 ACM 溶解在 10 mL 的 5%葡萄糖溶液,37℃条件下,加入 100 mg AOA。3 h 后,用 100 mL 氯仿提取 AOA-ACM,蒸发至干燥。在室温下,以四甲基硅烷作为内标,以 Bruker AVANCE III 光谱仪(400 MHz),<sup>1</sup>H-NMR 分析 ACM-AOA 的结构。电喷雾质谱(ESI-M)定 AOA-ACM 的相对分子量。



① ACM; ② AOA-ACM; ③ ACM 中间体; ④ HSA; ⑤ TCEP 还原的 HSA 分子暴露的疏水区域; ⑥ 纳米白蛋白; ⑦ NPs-ACM 纳米粒

图 1 AOA-ACM 的合成和 NPs-ACM 纳米粒制备示意图

**1.2.2 NPs-HSA 及 NPs-ACM 的制备** 200 mg 的 HSA 在 37℃下溶解于 50 mL Tris buffer(5 mmol/L, pH 7.4),添加 TCEP(5 mmol/L)。搅拌 10 min 制备纳米粒 HSA。合成的纳米 HSA 与 AOA-ACM 结合。HSA 蛋白粒子耦联 AOA-ACM: 2 mL 二甲酰胺(DMF)溶解 AOA-ACM(80 mg),加入 DCC(50 mg, 0.225 mmol)和 NHS(60 mg, 0.51 mmol)。混合物在室温下搅拌 8 h 后 0.45 μm 小滤器(密理博公司产品)过滤,。上清液中加入 HSA(200 mg)磷酸盐缓冲液(10 mL)进一步搅拌 12 h。透析出去未结合的小分子后冻干。

**1.2.3 细胞摄取** 异硫氰酸荧光素(FITC)标记 NPs-ACM: 20 mg 的前药被溶解在 2 mL 碳酸氢盐缓冲液(0.05 M),加入 2 mg FITC。溶液在 37℃孵育 12 h, pH 7.4 的 PBS 透析。MCF-7 细胞( $1 \times 10^5$ )/孔接种到共聚焦培养板(生物科技,美国)后,培养 24 h。用 FITC 标记的 NPs-ACM,等量的 ACM( $1 \mu\text{mol/L}$ )分别共培养 2 h 和 4 h。PBS 清洗去除残留的 FITC,并用 400 μL 4,6-diamidino-2 苯基吡啶(DAPI)染细胞核 15 min,甲醇固定。奥林巴斯 FV1000 激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)观察细胞。FITC 和 DAPI 的激发(EX)波长和发射(EM)波长分别为 490 nm 和 525 nm, 358 nm 和 461 nm。

**1.2.4 ACM 和 NPs-ACM 的细胞毒性和心脏毒性** 培养 24 h 后, MCF-7 和 S180 肿瘤细胞与 ACM 和 NPs-ACM 孵育(0.1 ~ 100 μmol/L, pH 7.4)共孵育 24 h。每孔加入 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)(5 mg/mL) 10 μL, 37℃孵育 4 h 后,加入 200 μL 二甲亚砜(DMSO)溶解甲瓚晶体。采用分光光度法(570 nm)测定甲瓚吸光度。组织病理学评价 ACM 和 NPs-ACM 的心脏毒性。15 只健康雄性 ICR 小鼠(22~25 g)分为 3 组,每组 5 只。ACM 组和 NPs-ACM 组第 1 天、第 3 天和第 5 天,注射入 6 mg/kg 游离 ACM 和 NPs-ACM,对照组注射等渗盐水。最后一次注射后 4 d,剥离小鼠心脏,HE 染色,并进行组织学分析。

**1.2.5 荷瘤小鼠模型的构建以及 ACM 和 NPs-ACM 的体内分布** 200 μL S180 细胞悬浮液( $5 \times 10^5$  细胞/mL, PBS 稀释)注射至 ICR 小鼠左腋下,制备荷瘤小鼠模型。ACM 和 NPs-ACM 按照 6 mg/kg 剂量静脉注射荷瘤小鼠。48 h 后,处死小鼠,取瘤组织、心、肝、脾、肺和肾。对照组小鼠注射等渗盐水(0.1 mL/只)。用 IVIS Spectrum(Caliper, USA)成像

系统分析,自发背景荧光利用软件进行抑扣除。激发波长 425 nm,发射波长 510 nm,评价 ACM 及前体药物在各器官的分布。

**1.3 统计学分析** 用 Excel 进行数据统计分析,组间比较采用 *t* 检验,以  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 合成 AOA-ACM**  $^1\text{H-NMR}$  显示 ACM 可以通过其他的  $^{12}\text{C}$ -酮基基团与小分子 AOA 反应形成 AOA-ACM,见图 2。ESI-MS 显示 AOA-ACM 以正离子模式  $[\text{M} + \text{H}]$  形成离子峰,相对分子质量为  $m/z = 885.42$ ,见图 3。

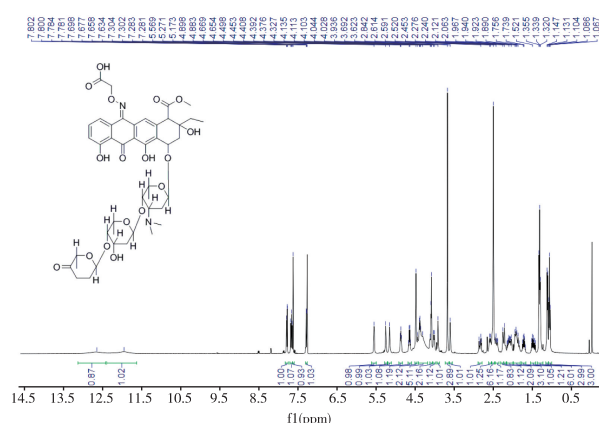


图 2 AOA-ACM 的核磁共振氢谱

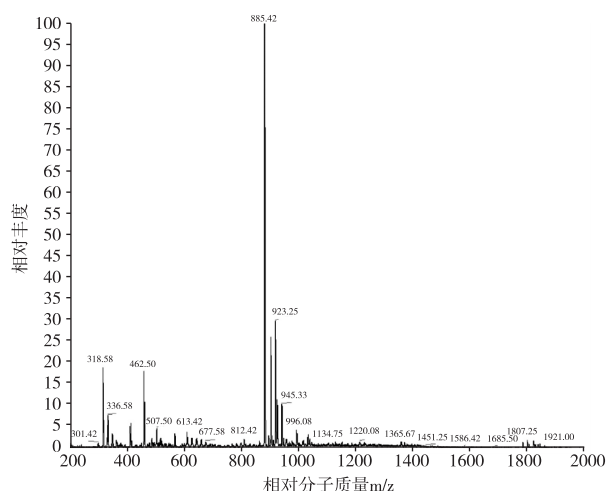
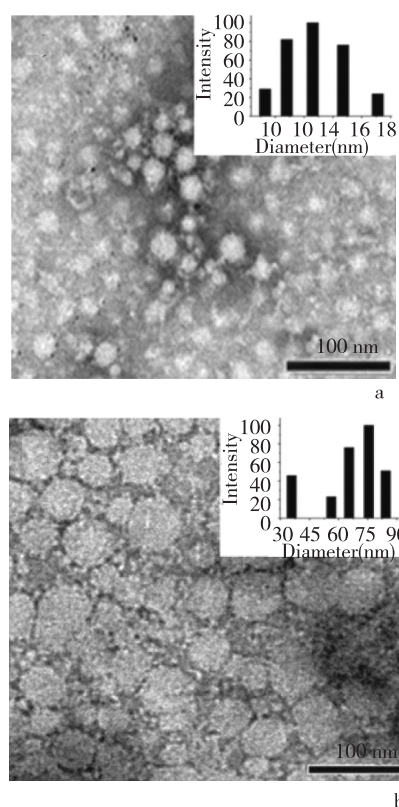


图 3 AOA-ACM 的质谱图

**2.2 HSA 蛋白与 NPs-ACM 外貌和大小** AOA-ACM 与 NPs-HSA 粒子耦联形成 NPs-ACM 前药。HSA 和 NPs-ACM 的半径和外貌见图 4。两者分别为 10~18 nm 及 30~90 nm 的球形粒子。粒径 100 nm 可以获得较好的靶向性能<sup>[14]</sup>。



a;游离的 HSA;b:NPs-ACM 粒子

图 4 高分辨电镜观察粒子外貌和动态光散射察粒子大小

**2.3 NPs-ACM 的载药量和体外释放** 紫外吸光法测定 NPs-ACM 的载药量。HSA 和 ACM 分别在 280 nm 和 430 nm 处具有吸收峰。纳米粒中的 HSA 含量为 42.5 mg/mL (BCA 试剂盒定量),ACM 浓度为 3.06 mg/mL。载药率为  $3.06/42.5 \times 100 = 7.4\%$ 。耦联物中,ACM 与 HAS 的比例为 6:1。36 h 内,pH 5.0 条件下,约 60% 的 ACM 从 NPs-ACM 释放,而 pH 7.2 条件下,只有 10% 左右。NPs-ACM 的释放是依赖于酸不稳定 C=N 之间的连接 ACM 和 AOA 部分。见图 5。

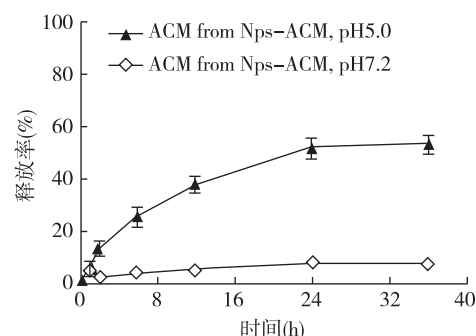
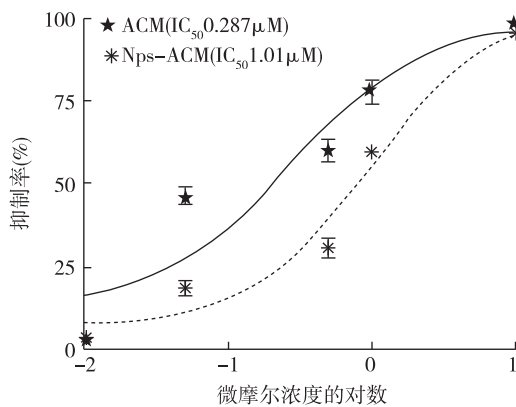


图 5 不同 pH 条件下 ACM 从 NPs-ACM 中累积释放

**2.4 NPs-ACM 的体外细胞毒性和心脏毒性** 结果显示,NPs-ACM 相对于 ACM 的细胞毒下降,见图 6。可能与 NPs-ACM 相对分子量比较大,ACM 迅速扩散抑制肿瘤细胞生长有关。NPs-ACM 释放



ACM 依赖于细胞内释放酸性环境,在发挥抗肿瘤活性方面有滞后性。NPs-ACM 穿透细胞膜较慢,进入溶酶体后释放 ACM,呈现对抗肿瘤细胞较低的细胞毒性。其  $IC_{50}$  较 ACM 大。



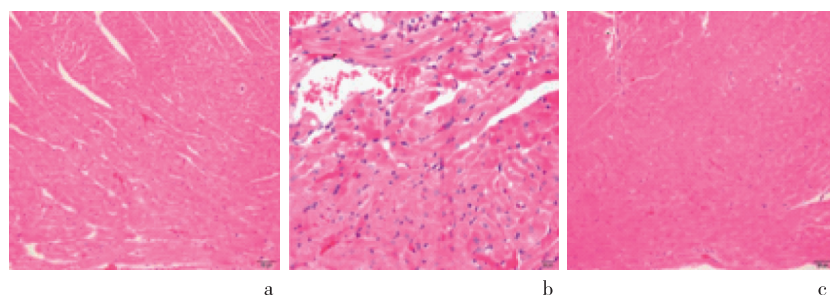
MTT 测定细胞半数抑制率 ( $n=6$ )

图 6 ACM 和 NPs-ACM 对 S180 肿瘤细胞的体外细胞毒性

小鼠心脏组织病理分析结果显示:与对照组相比,ACM 组心脏显示出了严重的空泡和嗜酸性病变,而 NPs-ACM 组与对照组无明显细胞病变,见图 7。显示纳米制剂对小鼠的心脏毒性显著下降,可能与选择性的肿瘤靶向有关。

**2.5 NPs-ACM 细胞摄取** 结果表明,NPs-ACM 在 MCF-7 细胞质中的浓度增加具有时间依赖性(2 h 到 4 h)。见图 8。

**2.6 ACM 和 NPs-ACM 的体内分布** 结果显示,NPs-ACM 主要聚集于肿瘤和肝组织,在肝组织的荧光强度高于 ACM,但差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。NPs-ACM 对肿瘤的靶向性约为 ACM 的 4 倍 ( $P=0.023$ )。NPs-ACM 的 EPR 效应以及在血液循环时间的延长可能是导致其对肿瘤靶向性的重要因素。见图 9。



a: 等渗盐水对照组; b: ACM 组; c: NPs-ACM 组

图 7 各组小鼠心脏组织病理形态 (HE  $\times 200$ )

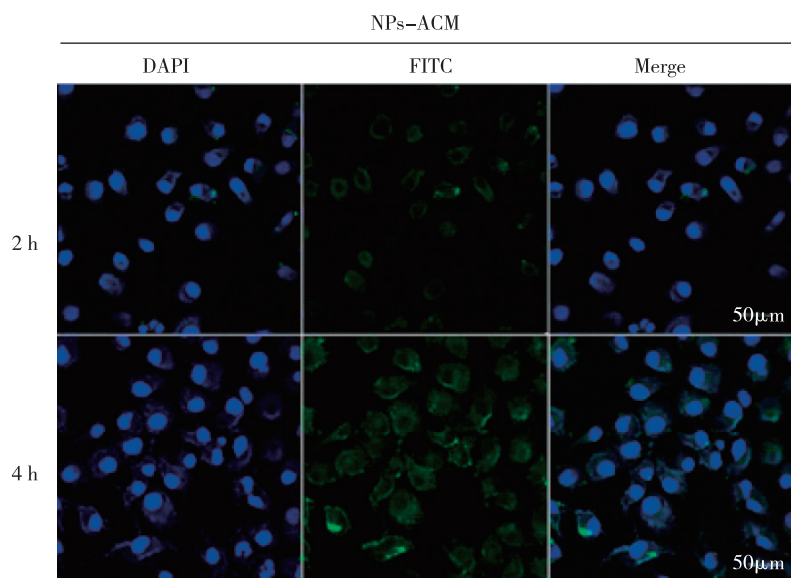
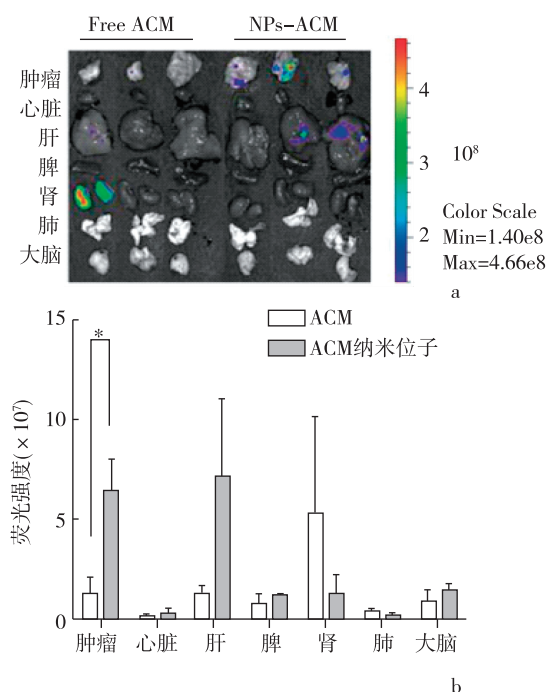


图 8 LSCM 显示 FITC 标记的 NPs-ACM 在 37  $^{\circ}C$  下孵育 2 h 和 4 h 的 MCF-7 细胞



a: 离体 NIRF 光学图像; b: 荧光定量

荷瘤小鼠注射游离 ACM 和 NPs-ACM 后, 各器官或组织携带小鼠荧光量比较 ( $n=3$ ), \*  $P<0.05$

图 9 荷瘤小鼠 ACM 制剂的体内分布

### 3 讨论

本研究提出了一种简便的方法, 制备活性中间体和药理物质 (含有酮基的 ACM) 靶向输送系统。AOA 与 ACM 在酮基的<sup>12</sup>C 位置发生偶联, 随后结合 NPs-HSA 生成 NPs-ACM 前药, 载药量为 7.4%。NPs-ACM 的释放依赖于 pH。与游离 ACM 相比, NPs-ACM 肿瘤靶向性大大提高, 心脏毒性大大降低。因此, NPs-ACM 是一种安全的、可注射的, 有前景的用于肿瘤靶向的 DDS。

#### [参考文献]

- [1] Nitiss JL, Pourquier P, Pommier Y. Aclacinomycin A stabilizes topoisomerase I covalent complexes [J]. Cancer Res, 1997, 57 (20): 4564-4569.
- [2] Arijji F, Shida K, Konno K, et al. Cardiotoxic study of aclacinomycin A. Subacute cardiotoxic effect of aclacinomycin A in rats (author's transl) [J]. Jpn J Antibiot, 1980, 33(3): 281-293.
- [3] 章磊, 流小舟, 孙畅, 等. 多途径靶向给药系统在骨肉瘤治疗中的研究进展 [J]. 东南国防医药, 2016, 18(6): 632-635.

- [4] Shiokawa T, Hattori Y, Kawano K, et al. Effect of polyethylene glycol linker chain length of folate-linked microemulsions loading aclacinomycin A on targeting ability and antitumor effect in vitro and in vivo [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(5): 2018-2025.
- [5] Wang J, Maitani Y, Takayama K. Antitumor effects and pharmacokinetics of aclacinomycin A carried by injectable emulsions composed of vitamin E, cholesterol, and PEG-lipid [J]. J Pharm Sci, 2002, 91(4): 1128-1134.
- [6] Jiang XH, Liao GT, Huang GQ, et al. The antihepatoma effect of lyophilized aclacinomycin A polyisobutylcyanoacrylate nanoparticles in vitro and in vivo [J]. Yao Xue Xue Bao, 1995, 30 (3): 179-183.
- [7] Wohl AR, Michel AR, Kalscheuer S, et al. Silicate esters of paclitaxel and docetaxel: synthesis, hydrophobicity, hydrolytic stability, cytotoxicity, and prodrug potential [J]. J Med Chem, 2014, 57(6): 2368-2379.
- [8] Israel LL, Kovalenko EI, Boyko AA, et al. Towards hybrid biocompatible magnetic rHuman serum albumin-based nanoparticles: use of ultra-small (CeLn)<sup>3/4</sup> + cation-doped maghemite nanoparticles as functional shell [J]. Nanotechnology, 2015, 26 (4): 045601. doi: 10.1088/0957-4484/26/4/045601.
- [9] Kobayashi H, Watanabe R, Choyke PL. Improving conventional enhanced permeability and retention (EPR) effects; what is the appropriate target? [J]. Theranostics, 2014, 4(1): 81-89.
- [10] Wilson B, Ambika TV, Patel RD, et al. Nanoparticles based on albumin: preparation, characterization and the use for 5-fluorouracil delivery [J]. Int J Biol Macromol, 2012, 51(5): 874-878.
- [11] Subia B, Kundu SC. Drug loading and release on tumor cells using silk fibroin-albumin nanoparticles as carriers [J]. Nanotechnology, 2013, 24(3): 035103. doi: 10.1088/0957-4484/24/3/035103.
- [12] Kastl R, Wennemers H. Peptide-catalyzed stereoselective conjugate addition reactions generating all-carbon quaternary stereogenic centers [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2013, 52(28): 7228-7732.
- [13] Kitamura I, Oki T, Inui T. A sensitive analytical method for aclacinomycin A and its analogs by thin-layer chromatography and fluorescence scanning [J]. J Antibiot (Tokyo), 1978, 31(9): 919-922.
- [14] 龚光明, 陈美惠, 王曙东. 人血浆蛋白多烯紫杉醇纳米粒子的自组装及对肿瘤的靶向性 [J]. 东南国防医药, 2016, 18(5): 468-471.

(收稿日期: 2017-04-17; 修回日期: 2017-08-21)

(本文编辑: 叶华珍; 英文编辑: 王建东)