

红细胞膜包裹载药 PLGA 纳米颗粒的制备 及用于抑制癌细胞的研究

谢晓田 王海军 朱利民*

(东华大学化学化工与生物工程学院,上海 201620)

摘 要 红细胞(RBCs)是血液中最丰富的血细胞,从中提取的红细胞膜(RBCM)作为载体因具有体内循环时间长,高载药量,极好的生物相容性及低免疫原性,被作为理想的体内药物运载体应用于肿瘤治疗的研究。使用 RBCM 包裹载有抗癌药物紫杉醇(PTX)的多孔聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)纳米颗粒,经透射电镜(TEM)可以清楚地观察到 RBCM 结构包裹在 PLGA 纳米颗粒表面。采用动态光散射仪(DLS)观察制备的纳米颗粒水动力学粒径,发现 RBCM 包裹后的纳米颗粒粒径增大约为 $125 \pm 4\text{nm}$ 。使用 PTX 作为模型药物,测得制备的 PLGA 纳米颗粒载药率约为 6.42%,包封率约为 96.31%,加入 TPGS 作为致孔剂,48h 体外释药率可以提高到 83%。MTT 结果表明,RBCM 包裹的载药 PLGA 体系对 MCF-7 具有很强的杀灭作用。

关键词 红细胞膜,纳米沉淀法,PLGA 纳米颗粒,抗癌研究

Preparation of RBCM-encapsulated drug-loaded PLGA nanoparticles and its application in inhibiting cancer cells

Xie Xiaotian Wang Haijun Zhu Limin

(College of Chemistry, Chemical Engineering and Biotechnology, Donghua University,
Shanghai 201620)

Abstract Red blood cells (RBCs) are the most abundant blood cells. With the long circulation time, high drug loading rate, excellent biocompatibility and low immunogenicity, the extracted red blood cell membrane (RBCM) are used as ideal drug carriers for tumor therapy. Using the red blood cell membrane to encapsulate polylactic acid-glycolic acid copolymer (PLGA) carrying the anticancer drug paclitaxel (PTX) and the pore former vitamin E succinic acid polyethylene glycol ester (TPGS) by squeeze extrusion. Transmission electron microscopy (TEM) can clearly observe that the erythrocyte membrane was wrapped on the surface of PLGA nanoparticles. The dynamic light scattering instrument (DLS) was used to observe the hydrodynamic particle size of the prepared nanoparticles. It was found that the particle size of the nanoparticles after the erythrocyte membrane coating was $125 \pm 4\text{nm}$. Using PTX as a model drug, the prepared drug loading rate of PLGA nanoparticles was about 6.42%, and the encapsulation efficiency was about 96.31%. With the addition of TPGS as a pore forming agent, the *in vitro* release rate can be increased to 83% after 48h. The MTT results showed that the RBCM-encapsulated drug-loaded PLGA system had a strong inhibitory effect on MCF-7 cells.

Key words erythrocyte membrane, nanoprecipitation method, PLGA nanoparticle, anticancer research

癌症作为难以治愈的疾病之一,最常见的治疗类型是手术、化学疗法和放射疗法。然而,使用传统药物治疗癌症不仅会杀死肿瘤细胞,还会杀死健康细胞,导致许多副作用。此外,在使用化学疗法的过

程中,由于癌细胞具有抗药性,使抗癌药物的治疗功效受到限制。为了解决这一问题,选择合适的药物载体对于癌症的治疗具有重要意义。

红细胞膜(RBCM)仿生纳米载药体系近年来引

基金项目:国家自然科学基金资助项目(21303014);中央高校基本科研业务经费,东华-伦敦都市大学中英药用纺织品联合实验室

作者简介:谢晓田(1995-),女,硕士,主要从事生物材料、药物控释的研究。

联系人:朱利民,教授。

起了极大的关注。RBCM 作为载体,具有优异的生物相容性、体内长效循环性,已被广泛应用于药物输送和其他治疗^[1]。CD47 是红细胞表面的膜蛋白,通过与巨噬细胞表面 CD47 受体——信号调节蛋白之间的作用,从而调控巨噬细胞的摄取^[2-3]。因此,选择 RBCM 作为理想的体内药物运载体可以实现体内的长效循环,避免巨噬细胞对其吞噬,调控载药体系的粒径,通过实体瘤的高渗透性和滞留效应(EPR)聚集在肿瘤部位,从而实现对癌细胞的抑制作用。因此,使用 RBCM 对纳米载药体进行仿生包衣展现出广阔的应用前景。

聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)是一种高分子材料,具有生物相容性、可降解性,被广泛用于生物医学领域^[4-6],因此本课题组选择 PLGA 作为药物递送的载体进行实验。利用 PLGA 不溶于水,溶于丙酮的特性,通过纳米沉淀的方法自组装成纳米颗粒(NPs),具有粒径小、分散均匀等优势。选择抗癌药物紫杉醇(PTX)作为模型药物^[7]。PTX 作为当今公认的广谱、高效、低毒的天然抗癌药物,其对各种肿瘤都具有抑制作用,包括卵巢癌、乳腺癌、肺癌和其他类型的癌症。

维生素 E 琥珀酸聚乙二醇酯(TPGS),别名托可索仑,是一种广泛应用于药学领域的重要辅料,可用于制备载体前体药物、胶束和固体分散体,修饰脂质体,并作为增溶剂、吸收促进剂等应用于制剂研究。因此,使用 TPGS 作为纳米粒子中的致孔剂,以增加难溶性水溶性药物的溶解度,提高药物的释放率^[8-10]。

本研究通过制备 RBCM 包裹的载 PTX 的 PLGA 纳米颗粒(PLGA-NPs),观察药物的释放速率,检测药物载体的细胞毒性、材料细胞相容性,为实现红细胞仿生包衣长效循环的纳米载药体系奠定基础^[11-12]。

1 实验部分

1.1 材料与仪器

PLGA(50:50, $M_w = 21000$),济南岱罡生物工程有限公司;雄性 SD 大鼠(清洁级,体重 200g 左右),上海斯莱克实验动物有限责任公司;PTX(纯度 >99%),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;TPGS(纯度 99.99%),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;胎牛血清(纯度 99.99%),美国 Gibco 公司;3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐

(MTT,纯度 98%),美国 Sigma 公司;人乳腺癌细胞 MCF-7(纯度 94%),中国科学院;实验中所用的水均为 Milli-Q Plus 185 净水系统纯化所得超纯水。

磁力搅拌器(DF-101S 型),巩义予华公司;挤压器(LF-1 型),长沙纳仪仪器科技有限公司;电子分析天平(FA/JA-B 型),上海精科仪器有限公司;真空干燥箱(ZKF030 型),上海实验室仪器有限公司;紫外-可见分光光度计(UV-3600 型),上海 SHJH 公司;高速台式离心机(TGL-16G 型),上海安亭科学仪器厂;透射电子显微镜(TEM,2010F 型),日本 JEOL 公司;酶标仪(DNM-9602A 型),普朗医疗器械公司;动态光散射仪(DLS,BI-200SM 型),美国布鲁克海文仪器公司。

1.2 实验方法

1.2.1 PLGA-NPs 的制备

使用纳米沉淀法^[13]制备 PLGA 纳米颗粒:先称取 PLGA 10mg,溶于 1mL 丙酮中;再分别缓慢加入到转速为 400、600、800、1000 和 1200r/min,含 5mL 的去离子水圆底烧瓶中,探索最佳粒径;磁力搅拌 3h 后,放入真空干燥箱中,使丙酮挥发,生成物即为 PLGA-NPs,放入 4℃冰箱中备用。

1.2.2 RBCM 的制备^[14]

SD 大鼠心脏取血;将血液以 3000r/min 离心 5min,然后用磷酸盐缓冲盐水(PBS,pH=7.4)洗涤 3 次以除去血清;将红细胞重悬于 0.2mmol/L 乙二胺乙酸二钾(EDTA-2K)溶液中以诱导膜破裂,然后在 4℃下以 14800r/min 离心 7min 除去上清液;重复上述步骤直到上清液没有血色;将提取的 RBCM 储存在含 2mmol/L 蛋白酶抑制剂的磷酸盐缓冲盐水(pH=7.4)中,于-20℃下保存备用。

1.2.3 RBCM-PLGA NPs 的制备^[15-16]

首先,解冻 RBCM 并摇匀;按照比例为 1mg PLGA-NPs 使用 100 μ L 血液提取的 RBCM 进行包裹;取出 200 μ L 悬液,加入 2mL 去离子水重悬,10000r/min 离心 5min 后倒去上清液,重悬;然后将 RBCM 悬液缓慢加入含 2mL PLGA-NPs 的圆底烧瓶中搅拌 10min,并在功率 100W 下超声 10min;最后,使用滤孔为 200nm 的挤压器挤压 11 次,得到微乳光的透明溶液 RBCM-PLGA NPs。

1.2.4 载药

取 10mg PLGA 和 1mg PTX 溶于丙酮中,为了使得不溶于水的 PLGA 产生孔径,再加入 2mg

TPGS 表面活性剂,确定 TPGS 与 PLGA 的比例为 1:5^[17-19];将该溶液超声直至溶解,然后缓慢加入到转速为 1000r/min,含 5mL 的去离子水圆底烧瓶中;搅拌 3h,放入真空干燥箱中,使丙酮挥发;再进行 RBCM 的包裹,方法与 1.2.3 一致,即可得到 PTX@RBCM-PLGA NPs。

1.2.5 载药率与包封率研究

取 3mL PTX@PLGA-NPs,16000r/min 离心 10min 吸取上清溶液,并稀释至合适的质量浓度,然后根据光谱条件测定 PTX 的含量。载药率和包封率分别按式(1)和式(2)计算。

$$\text{载药率}(\%) = \frac{\text{PTX 质量} - \text{上清液中 PTX 质量}}{\text{载体总质量}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{包封率}(\%) = \frac{\text{PTX 质量} - \text{上清液中 PTX 质量}}{\text{投药量}} \times 100\% \quad (2)$$

1.2.6 材料表征

粒径测定:取一定量的 PLGA-NPs 及 RBCM-PLGA NPs,稀释后,使用美国布鲁克海文仪器公司的 BI-200SM 型静态光散射仪分别检测其分散系数和粒径大小。每组测 3 次,取平均值。

形貌观察:使用日本 JEOL 公司的 JEM-2100 型透射电子显微镜观察 PLGA-NPs 及 RBCM-PLGA NPs 的形态。

药物释放测定:取 2mL 载 PTX 的 PLGA-NPs 和 TPGS-PLGA NPs,分别加入透析袋(MWCO:7000Da)中,将它们分别浸入 18mL 的缓冲液(0.1%吐温 80,PBS,pH=7.4)和缓冲液(0.1%吐温 80,PBS,pH=5.5),在 37℃避光条件下,放进转速为 100r/min 的摇床中震荡;分别在 0.5、1、2、4、8、12、24、36 和 48h,取出 1mL 检测其吸光度并补足 1mL 相应的新鲜缓冲液,于最大吸收波长 227nm 下测它们的紫外吸收,并计算释药率。

1.2.7 细胞毒性

使用 MTT 法测试细胞毒性。于 37℃、5% CO₂ 下,预培养人乳腺癌 MCF-7 细胞铺满 96 孔板;吸去培养液,加入浓度梯度的药物,平均分为 4 组进行对照试验,即 PBS、PTX、PTX@PLGA-NPs 和 PTX@RBCM-PLGA NPs。其中除了空白对照 PBS 组外,其余 3 组依次配置 PTX 浓度为 100、80、60、40、20、10 和 5μg/mL;孵育 24h,吸去培养液,每孔加入 20μL MTT 溶液(5mg/mL,即 0.5% MTT)和 180μL 培养液,在摇床中避光培养 3~

4h;吸去孔内培养液,每孔加入 200μL 二甲基亚砷,放置于摇床上以 100r/min 振荡 15min;结晶物充分溶解后,使用酶标仪检测各孔的吸光度值,计算细胞存活率。

2 结果与讨论

2.1 RBCM-PLGA NPs 的制备及性质

2.1.1 RBCM-PLGA NPs 的 TEM 分析

将制备的 RBCM-PLGA NPs 重新分散在水溶液中,超声使其均匀分散进行 TEM 的表征,结果如图 1 所示。由图可见,RBCM 包裹后的 PLGA-NPs [图 1(b)]粒径大小约为 80~100nm,可以观察到有一层深色的膜状结构包裹在 PLGA 颗粒表面,说明 RBCM 成功地包裹在 PLGA-NPs 上,即得到了 RBCM-PLGA NPs。

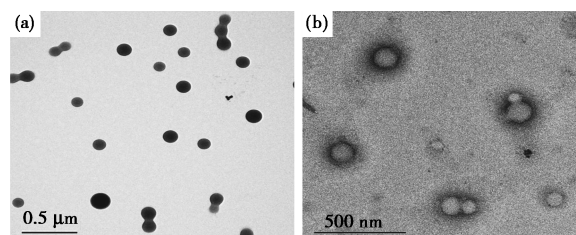


图 1 PLGA-NPs(a)和 RBCM-PLGA NPs(b)的 TEM 图

2.1.2 DLS 分析

在其他条件相同下,分别在转速为 400、600、800、1000 和 1200r/min 的情况下制备 PLGA-NPs,结果如图 2 所示。由图可见,当转速达到 800r/min 及以上时,粒径大小几乎不再变化,从而确定最佳转速为 1000r/min。图 3 为 1000r/min 下制备的 PLGA-NPs 及 RBCM-PLGA NPs 的水动力学粒径。由图可见,以 1000r/min 转速下制备的 PLGA-NPs 粒径大小为 120.5±3nm;RBCM 包裹后,RBCM-PLGA NPs 的流体动力学平均直径为 125.0±4nm。RBCM 的厚度大约为 7nm,由于超声和挤压器挤压,使得 RBCM 以碎片附着在 PLGA-NPs 表

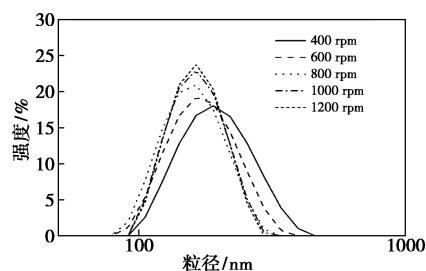


图 2 不同转速下 PLGA-NPs 的水动力学粒径

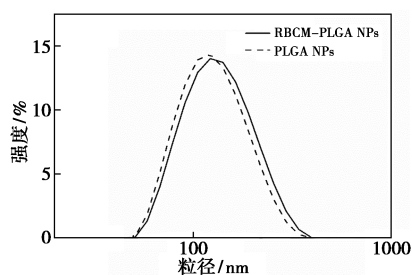


图3 1000r/min下制备的 PLGA-NPs 及 RBCM-PLGA NPs 的水动力学粒径

面。RBCM 包裹后的纳米粒子粒径明显增大,进一步说明 RBCM 成功包裹在 PLGA-NPs 上。

2.1.3 Zeta-电势分析

图 4 为 PLGA-NPs 和 RBCM-PLGA NPs 的 Zeta-电势,由图可见,PLGA 空白纳米颗粒 Zeta-电势为 $-28.4 \pm 1\text{mV}$;RBCM 包裹的 PLGA 空白胶束的 Zeta-电势为 $-34.3 \pm 1.2\text{mV}$ 。图 4 结果表明,RBCM 的 PLGA 空白胶束 Zeta-电势变小,证明 RBCM 成功包裹,制得了 RBCM-PLGA NPs。

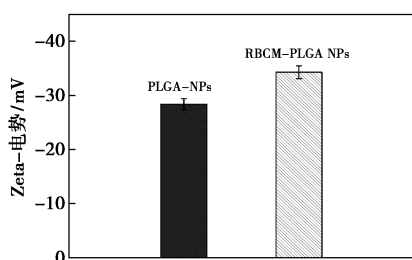


图4 PLGA-NPs 和 RBCM-PLGA NPs 的 Zeta-电势

2.2 PTX@PLGA-NPs 的体外释药研究

研究负载 PTX 的 PLGA-NPs 在不同条件下的体外释放行为,结果如图 5 所示。由图可见,TPGS-PLGA NPs 组在中性环境中的累积释药率约为 76%,低于在弱酸性环境中的累积释药率。PLGA-NPs 组在弱酸性和中性环境下的累积释药率分别约为 38%和 29%。由此可以得出结论:在 pH 低的条件下,药物释放的更快。相同 pH 条件下,加入

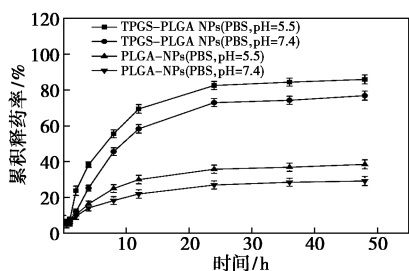


图5 负载 PTX 的 PLGA-NPs 在不同条件下的体外释药行为

TPGS 后使得 PLGA 纳米颗粒表面产生孔径,从而使药物释放的更快。在弱酸性条件下,TPGS 组 48h 释药率可以达到 83%左右,且具有一定药物缓释的效果。

2.3 细胞毒性研究

采用 MTT 法检测 PTX 对人乳腺癌 MCF-7 的毒性,结果如图 6 所示。由图可见,随着 PTX 浓度的增加,细胞存活率整体呈下降趋势。从对比实验可以看出,在低浓度时,只加入药物 PTX 具有最强的毒性;当 PTX@RBCM-PLGA NPs 的 PTX 浓度达到 $80\mu\text{g/mL}$ 以上时,其毒性强度较未用 RBCM 包裹的显著提高。从而可以说明,RBCM 仿生包衣的载药纳米材料更有利于癌细胞的摄取,从而表现出更好的抗癌效果。

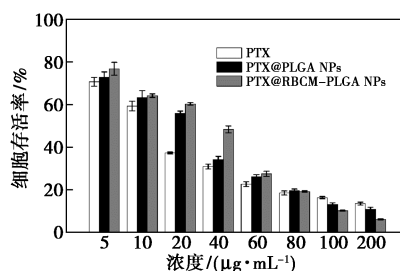


图6 MCF-7 在不同 PTX 浓度下的细胞毒性比较

3 结论

通过纳米沉淀法制备了粒径大小约为 $120.5 \pm 3\text{nm}$ 的 PLGA-NPs,使用超声和挤压器挤压的方式,将 RBCM 成功包裹在 PLGA-NPs 表面,成功制备粒径大小约为 $125.0 \pm 4\text{nm}$ 的 RBCM-PLGA NPs。载入抗癌药物 PTX 进行药物释放及细胞毒性的研究,结果发现,致孔剂 TPGS 的加入可以提高药物的释放率并且有一定的缓释效果。制备的 PTX@RBCM-PLGA NPs 具有很好的抗癌效果。

这种纳米级的 RBCM 仿生纳米载药系统,通过 RBCM 的包裹,可以大大延长纳米粒子在血液中的循环时间。当静脉注射后,这些具有纳米级尺寸的 PTX@RBCM-PLGA NPs 可以通过血管到达肿瘤部位,产生对癌细胞的抑制作用。另外,RBCM 的包裹不会造成显著的副作用,具有低免疫原性,可减少排异反应^[20-22]。由于该系统中使用的所有组分都是临床证明的或高度生物相容的,因此这种 RBCM 包裹的纳米颗粒作为纳米级“人工红细胞^[23]”将会成为一种简单、安全,且相当有效的载体。

由此可见,RBCM 仿生包衣对于构建智能纳米载药体系具有重要意义,在今后的癌症治疗研究中具有巨大潜力。

参考文献

- [1] Sun X, Han X, Xu L, et al. Surface-engineering of red blood cells as artificial antigenpresenting cells promising for cancer immunotherapy[J]. *Small*, 2017, 13(40):1701864.
- [2] Han X, Wang C, Liu Z. Red blood cells as smart delivery systems[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2018.
- [3] Chambers E, Mitragotri S. Long circulating nanoparticles via adhesion on red blood cells; mechanism and extended circulation[J]. *Experimental Biology & Medicine*, 2007, 232(7):958.
- [4] Mosafar J, Abnous K, Tafaghodi M, et al. In vitro, and in vivo, evaluation of anti-nucleolin-targeted magnetic PLGA nanoparticles loaded with doxorubicin as a theranostic agent for enhanced targeted cancer imaging and therapy [J]. *European Journal of Pharmaceutics & Biopharmaceutics*, 2017, 113:60-74.
- [5] Ramazani F, Chen W, van Nostrum C F, et al. Strategies for encapsulation of small hydrophilic and amphiphilic drugs in PLGA microspheres: state-of-the-art and challenges[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2016, 499(1-2):358.
- [6] Zhang K, Tang X, Zhang J, et al. PEG-PLGA copolymers: their structure and structure-influenced drug delivery applications[J]. *Journal of Controlled Release*, 2014, 183(1):77-86.
- [7] Alexandrino E M, Ritz S, Marsico F, et al. Paclitaxel-loaded polyphosphate nanoparticles: a potential strategy for bone cancer treatment[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2014, 2(10):1298-1306.
- [8] Yang C, Wu T, Qi Y, et al. Recent advances in the application of Vitamin E TPGS for drug delivery[J]. *Theranostics*, 2018, 8(2):464-485.
- [9] Zhu D, Tao W, Zhang H, et al. Docetaxel (DTX)-loaded polydopamine-modified TPGS-PLA nanoparticles as a targeted drug delivery system for the treatment of liver cancer[J]. *Acta Biomaterialia*, 2016, 30:144-154.
- [10] Guo Y, Luo J, Tan S, et al. The applications of Vitamin E TPGS in drug delivery[J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 2013, 49(2):175-186.
- [11] Aryal S, Hu C M, Fang R H, et al. Erythrocyte membrane-cloaked polymeric nanoparticles for controlled drug loading and release[J]. *Nanomedicine*, 2013, 8(8):1271-1280.
- [12] Zhang Z, Wang X, Li B, et al. Development of a novel morphological paclitaxel-loaded PLGA microspheres for effective cancer therapy; in vitro and in vivo evaluations[J]. *Drug Delivery*, 2018, 25(1):166.
- [13] Luk B T, Hu C M, Fang R H, et al. Interfacial interactions between natural RBC membranes and synthetic polymeric nanoparticles[J]. *Nanoscale*, 2014, 6(5):2730-2737.
- [14] Min G, Chao L, Song X, et al. Erythrocyte-membrane-enveloped perfluorocarbon as nanoscale artificial red blood cells to relieve tumor hypoxia and enhance cancer radiotherapy[J]. *Advanced Materials*, 2017, 29(35):1701429.
- [15] Hu C M J, Fang R H, Wang K C, et al. Nanoparticle biointerfacing by platelet membrane cloaking[J]. *Nature*, 2015, 526(7571):118-121.
- [16] Gao W, Fang R H, Thamphiwatana S, et al. Modulating antibacterial immunity via bacterial membrane-coated nanoparticles[J]. *Nano Letters*, 2015, 15(2):1403.
- [17] Zhu H, Chen H, Zeng X, et al. Co-delivery of chemotherapeutic drugs with vitamin E TPGS by porous PLGA nanoparticles for enhanced chemotherapy against multi-drug resistance [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(7):2391-2400.
- [18] Zhao P, Li L, Zhou S, et al. TPGS functionalized mesoporous silica nanoparticles for anticancer drug delivery to overcome multidrug resistance[J]. *Materials Science & Engineering C*, 2018, 84:108-117.
- [19] Jin Y, Wu Z, Li C, et al. Optimization of weight ratio for DSPE-PEG/TPGS hybrid micelles to improve drug retention and tumor penetration[J]. *Pharmaceutical Research*, 2018, 35(1):13.
- [20] Hu C M, Fang R H, Zhang L. Erythrocyte-inspired delivery systems[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2012, 1(5):537-547.
- [21] Hu C M, Zhang L, Aryal S, et al. Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(27):10980-10985.
- [22] Dehaini D, Wei X, Fang R H, et al. Erythrocyte-platelet hybrid membrane coating for enhanced nanoparticle functionalization [J]. *Advanced Materials*, 2017, 29(16):1606209.
- [23] Merkel T J, Jones S W, Herlihy K P, et al. Using mechanobiological mimicry of red blood cells to extend circulation times of hydrogel microparticles[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(2):586-591.

收稿日期:2018-07-19