

## T7 肽修饰的载长春新碱低密度脂蛋白纳米粒的制备及脑胶质瘤靶向性和治疗作用评价

张越<sup>1,2</sup>, 杨阳<sup>2</sup>, 翟美芳<sup>2,3</sup>, 陈志江<sup>1,2</sup>, 崔琳<sup>2,3</sup>, 付诗瑶<sup>2,3</sup>,  
喻芳邻<sup>2</sup>, 李志平<sup>2</sup>, 梅兴国<sup>1,2\*</sup>

(1. 湖北科技学院药学院, 湖北 咸宁 437100; 2. 北京军事医学研究院毒物药物研究所, 北京 100850;  
3. 佳木斯大学, 黑龙江 佳木斯 154007)

**摘要:** 本研究的目的是制备 T7 肽修饰的载长春新碱低密度脂蛋白 (T7 peptide modified vincristine loaded low density lipoprotein, T7-LDL-VCR) 纳米粒, 用于血脑屏障 (blood brain barrier, BBB) 和脑肿瘤细胞双级靶向药物递送。首先通过超速离心法从人血浆中提取 LDL 纳米粒, 然后采用干膜法将药物载入纳米粒脂质内核, 再将 T7 肽共价修饰于纳米粒表面, 表征其粒径、包封率和靶头连接效率。以 DiR 为探针, 通过活体成像观察 T7-LDL-VCR 纳米粒在荷脑胶质瘤小鼠脑部中的分布情况, 通过核磁共振成像 (magnetic resonance imaging, MRI) 观察纳米粒对脑胶质瘤的治疗作用, 最后对小鼠的相对肿瘤体积和生存曲线进行测定。结果表明: 制备的 T7-LDL-VCR 纳米粒粒径约 30 nm, 包封率为 30.1%, T7-VCR-LDL 的靶头连接效率为 63.88%; 在小鼠体内的脑靶向性及对脑胶质瘤治疗作用良好: T7-VCR-LDL、LDL-VCR 和 VCR 的相对肿瘤体积分别为 30%, 51.50% 和 79.25%; 中位生存期为 36 天, 高于 VCR-LDL 1.38 倍、游离 VCR 1.85 倍和对照组 2 倍。本研究表明, T7-LDL-VCR 具有 BBB 和脑肿瘤细胞双级靶向能力, 是一种有前景的靶向治疗制剂。

**关键词:** 低密度脂蛋白; 肽; 长春新碱; 靶向; 脑胶质瘤

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 03-0460-07

## Preparation of vincristine loaded low density lipoprotein nanoparticles modified by T7 peptide and evaluation of therapeutic effect on glioma

ZHANG Yue<sup>1,2</sup>, YANG Yang<sup>2</sup>, ZHAI Mei-fang<sup>2,3</sup>, CHEN Zhi-jiang<sup>1,2</sup>, CUI Lin<sup>2,3</sup>,  
FU Shi-yao<sup>2,3</sup>, YU Fang-lin<sup>2</sup>, LI Zhi-ping<sup>2</sup>, MEI Xing-guo<sup>1,2\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Hubei University of Science and Technology, Xianning 437100, China; 2. Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, Beijing 100850, China; 3. Jiamusi University, Jiamusi 154007, China)

**Abstract:** The purpose of this study was to prepare T7 peptide modified vincristine loaded low density lipoprotein (T7-LDL-VCR) nanoparticles to penetrate through blood brain barrier for targeting the brain tumor cells. Firstly, the low density lipoprotein (LDL) nanoparticles were extracted and separated from human serum by density gradient centrifugation method, and then was loaded into the nanoparticle's lipid core by the dry film method, T7 peptide was covalent modified on the surface of the nanoparticles. T7-LDL-VCR was characterized by particle size, entrapment efficiency and peptide attachment efficiency. The fluorescent probe DiR was used to track the brain biodistribution of T7-LDL-VCR in mice bearing intracranial C6 glioma by means of *in vivo*

收稿日期: 2017-11-08; 修回日期: 2017-11-25.

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目 (7172162); 北京市科委科技新星资助项目 (Z161100004916162).

\*通讯作者 Tel: 86-10-66932644, Fax: 86-10-66932654, E-mail: newdds@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-1108

imaging. The therapeutic effect of nanoparticles was observed with magnetic resonance imaging (MRI). Finally, relative tumor volume and survival curve were determined in mice. The results showed that the mean size of the prepared T7-LDL-VCR nanoparticle was about 30 nm, encapsulation efficiency was 30.1%, and peptide attachment efficiency was 63.88%. As expected, the prepared preparation has good brain targeting and good effect on the treatment of glioma in mice: the relative tumor volumes of T7-VCR-LDL, LDL-VCR and VCR were 30%, 51.50% and 79.25%, respectively; the median survival time (36 days), which was 2, 1.85 and 1.38 fold higher than that of physiological saline, free VCR and LDL-VCR, respectively. This study suggests that dual modified liposomes possessed a better ability penetrating the blood brain barrier to target the brain tumor with significant antitumor activities.

**Key words:** low density lipoprotein; peptide; vincristine; target; glioma

脑胶质瘤作为恶性肿瘤之一, 严重危及人类生命。因胶质瘤强浸润性的特点使得患者预后极差<sup>[1,2]</sup>, 且中位生存期低于 16 个月<sup>[3]</sup>。发生浸润性生长的脑胶质瘤细胞可以存在于远离肿瘤原发部位的脑组织中, 甚至可以存在于对侧大脑半球, 并由正常脑组织包被, 拥有正常的血液供应及血脑屏障的保护作用<sup>[4]</sup>, 血脑屏障的存在使得大部分化学药物无法透过 BBB 进入脑内<sup>[5]</sup>。因此, 手术治疗无法将肿瘤切除干净, 容易导致复发<sup>[6]</sup>, 而放射治疗也不能全部杀死癌细胞, 并且不良反应大, 容易导致放射性痴呆。因而, 构建一个可以有效杀伤原发及浸润区脑胶质瘤细胞的主动靶向药物递送系统, 是胶质瘤细胞综合治疗策略中至关重要的一步<sup>[3]</sup>。

低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 受体相关蛋白是一个广泛存在于细胞表面的跨膜内吞受体蛋白, 在脑内皮细胞、神经细胞、平滑肌细胞、星形细胞和肝细胞等均呈现高表达。研究表明, LDL 受体家族在 BBB 上存在高表达<sup>[7]</sup>。LDL 是内源性、大小约为 22 nm 的球形纳米微粒, 其壳表面的载脂蛋白基本只有一种, 即 ApoB-100。它使 LDL 能够特异性地识别细胞表面的 LDL 受体, 从而介导 LDL 的内吞, 并且可以通过共价偶联的方式将其他靶向分子修饰在 ApoB-100 上, 起到多靶点靶向作用。脑毛细血管内皮细胞和许多恶性肿瘤细胞上还过度表达转铁蛋白 (transferrin, Tf) 受体, T7 和 Tf 与转铁蛋白受体的特异性配体的结合能力相当, 并且 T7 肽具有极大优势: 内源性 Tf 反而会促进 T7 修饰的纳米载体与转铁蛋白受体发生特异性结合<sup>[8]</sup>。因此, 将 T7 共价修饰于 LDL 载体表面, 期待两者协同作用达到双级靶向的效果, 穿透 BBB 后进一步靶向于脑胶质瘤细胞。本实验从人血浆中提取 LDL, 通过双功能基团将 T7 插入至 LDL 表面的载脂蛋白上, 并通过荧光探针标记结合超滤离心法, 对插入的效率进行评价, 间接

证明 T7-LDL 复合物的生成。

长春新碱 (vincristine, VCR) 为广谱抗肿瘤药, 通过与微管蛋白结合, 阻止微管装配并阻碍纺锤体形成, 使细胞分裂停止于 M 期<sup>[9]</sup>。长春新碱为脂溶性药物, 有较强抗肿瘤效果, 毒性也较大, 将它包载于 LDL 疏水内核中可以提高其靶向性, 提高其对脑胶质瘤的治疗作用。因此, 构建 T7-LDL-VCR 纳米给药系统穿透 BBB 靶向于脑胶质瘤具有良好的理论基础。

## 材料与方法

**主要仪器** 纳米粒径仪 (美国 Symptec 公司); 激光共聚焦 (德国 Zeiss 公司); 低温超速离心机、透射电子显微镜 (日本 Hitachi 公司); 活体成像仪 (美国 Caliper 公司); 细胞超声破碎仪 (宁波新芝生物技术有限公司)。

**药品与试剂** T7 肽 (北京塞伯坦医药科技有限公司); 硫酸长春新碱 (广州白云山现代汉方药业有限公司); 75% 乙醇消毒液 (山东利尔康医疗科技股份有限公司); 三氯甲烷、二甲基亚砷、磷酸二氢钾、氯化钠、氯化钾、二乙胺 (国药集团化学试剂有限公司); 甲醇、乙腈 (Fisher 公司); 氢氧化钠 (西陇科学股份有限公司); 胎牛血清 (浙江天杭生物科技股份有限公司); DMEM 培养基、1640 培养基 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

**动物** 昆明小鼠, 体重 22~24 g, 雌雄各半。军事医学科学院动物实验中心, 动物合格证号: SCXK (京) 2007-004。

**LDL 纳米粒的制备**<sup>[10]</sup> 本研究采用密度梯度离心法从人血浆中提取 LDL。先将血浆在室温下溶解, 高速离心 ( $8\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 10 min, 4 °C), 吸弃最上层白色的乳糜微粒; 按 Radding-Steining 公式计算需加入的干燥 KBr 重量:  $X = V_0 (d_1 - d_0) / (1 - 0.312d_1)$ 。式中,  $V_0$  代表原血浆毫升数,  $d_0$  代表初始血浆密度,  $d_1$  代表

需调定的血浆密度, 0.312 为 KBr 的比容 ( $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ ),  $X$  代表需加 KBr 克数。然后用干燥 KBr 调血浆密度至  $1.300\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 离心时在其上层铺加约等体积的密度为  $1.006\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 NaCl 溶液, 仔细配平后, 设置各项参数: 温度  $4\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $15\,000\times\text{g}$  离心  $120\text{ min}$ 。提取成功后加入 2% 蔗糖溶解于 LDL 纳米粒的悬液中, 冻干, 置于  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  冰箱储存。

**LDL 纳米粒的鉴定**<sup>[11]</sup> 红外吸收光谱法可用于分子结构的基础研究, 根据光谱的峰位、强度及峰形来判断化合物的类别。因此, 用红外光谱法测定样品的结构, 可以判断 LDL 是否从血浆中提取成功。

**T7-LDL-VCR 纳米粒的制备** 采用干膜法制备载长春新碱低密度脂蛋白 (vincristine loaded low density lipoprotein, LDL-VCR) 纳米粒<sup>[12]</sup>, 首先精密称取 LDL 冻干样品  $120\text{ mg}$ , 加磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS)  $2\text{ mL}$  溶解; 然后精密称取 VCR  $15\text{ mg}$  溶于  $3\text{ mL}$  氯仿, 与上述 LDL 溶液混合于茄形瓶中减压旋蒸 ( $40\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $100\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ) 得干燥膜后, 加入  $5\text{ mL}$  PBS ( $\text{pH } 8.0$ ) 水化  $30\text{ min}$  后, 用细胞超声破碎仪超声 (3号探头, 60%, 共  $30\text{ min}$ : 超声  $5\text{ s}$ , 停  $1\text{ s}$ ) 后, 置于 EP 管中备用。再取  $5\text{ mg}$  马来酰亚胺-聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG)<sub>3500</sub>- $N$ -羧基琥珀酰亚胺双功能基团 (MAL-PEG<sub>3500</sub>-NHS) 和 T7 肽  $10\text{ mg}$  溶于 PBS 溶液中, 于室温下反应  $2\text{ h}$ , 使 MAL-PEG<sub>3500</sub>-NHS 中 MAL 基团与 T7 肽半胱氨酸残基上巯基发生特异性的反应生成 T7-PEG<sub>3500</sub>-NHS, 然后再将 T7-PEG<sub>3500</sub>-NHS 与上述备用的 LDL-VCR 纳米粒混合, 室温搅拌反应  $24\text{ h}$ , 使 LDL 表面上的伯氨基与双官能 PEG 衍生物的末端 NHS 基团特异性反应。最后用截留分子量 (molecular mass cutoff, MWCO) 为  $300\text{ kDa}$  透析袋去除未反应的 T7-PEG<sub>3500</sub>-NHS, 制得 T7-LDL-VCR 纳米粒混悬液。

**封装率的测定** 采用超滤离心法对纳米粒的封装率进行测定, 所得样品借助高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 进行定量分析。

**色谱条件** 色谱柱为 ZORBA $\times$ SB-C8 柱 ( $250\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$ ,  $5\text{ }\mu\text{m}$ ); 流动相为 1.5% 二乙胺溶液: 甲醇 ( $30:70$ ,  $w/w$ ); 流速:  $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; 检测波长:  $297\text{ nm}$ ; 柱温:  $30\text{ }^\circ\text{C}$ ; 进样量:  $20\text{ }\mu\text{L}$ 。

**测定方法** 取 T7-LDL-VCR 纳米粒混悬液两份: 一份用超滤离心管离心 ( $13\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $10\text{ min}$ ) 后取滤过液得到游离 VCR 质量 ( $W_{\text{游离 VCR}}$ ); 另一份加入 Triton-X100 ( $200\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 振荡后超声  $30\text{ min}$ , 超

滤离心得总 VCR 质量 ( $W_{\text{总 VCR}}$ )。用 HPLC 仪对样品进行分析, 计算封装率 (encapsulation efficiency, EE)。

$$EE = (W_{\text{总 VCR}} - W_{\text{游离 VCR}}) / W_{\text{总 VCR}} \times 100\%$$

**T7 肽插入 LDL-VCR 纳米粒效率的评价** 对于多肽、蛋白等生物大分子为靶向识别的载体, 靶头插入的定性和定量评价存在困难, 尤其是对于多肽性靶头, 目前尚未有高效简便的方法来判断靶头与载体连接复合物的是否生成。本研究通过荧光探针标记结合超滤离心法, 对 T7 肽插入 LDL 的效率进行评价, 也间接证明了反应产物——连接复合物的生成。

**荧光探针标记与表征** 先用 MAL-PEG-NHS 中的马来酰亚胺基团与巯基化的 T7 发生 Michael 加成反应, 然后再利用 NHS-PEG-T7 中 T7 含有的伯胺与 5(6)-羧基二乙酸荧光素 [5-(6)-carboxyfluorescein diacetate, CFDA] 的羧基反应连接, 实现双功能基团的探针标记。精密称取 CFDA  $5.0\text{ mg}$ , 溶于  $1\text{ mL}$  二甲基亚砜, 依次加入  $N, N'$ -二环己基碳酰亚胺  $2.4\text{ mg}$  和 NHS  $1.3\text{ mg}$ 。该体系室温避光搅拌  $24\text{ h}$ , 离心 ( $4\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $15\text{ min}$ ) 除去不溶物, 上清液转移后加入  $2\text{ mg}$  NHS-PEG<sub>3500</sub>-T7 和  $1\text{ }\mu\text{L}$  三乙胺, 室温避光反应  $24\text{ h}$ , 所得体系以双蒸水避光透析 (MWCO  $3\,500\text{ Da}$ )  $24\text{ h}$ , 冷冻干燥, 得膨松状固体产物。取少量 NHS-PEG<sub>3500</sub>-T7 和 NHS-PEG<sub>3500</sub>-T7 (CFDA) 样品进基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) 分析确证。

**紫外光谱扫描** 采用紫外-可见分光光度检测荧光标记的功能基团插入至 LDL 载体的效率。取适量 VCR 溶液、NHS-PEG-T7 (CFDA) 和 LDL 混悬液分别制备了 PBS ( $\text{pH } 7.4$ ) 分散体系, 利用紫外可见分光光度计, 在  $600\sim 200\text{ nm}$  内进行光谱扫描, 确定其最大吸收波长。

**CFDA 线性和范围** 精密称取 CFDA 样品  $10\text{ mg}$  于  $100\text{ mL}$  量瓶中, 作为储备液; 将上述  $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  储备液分别用 PBS ( $\text{pH } 7.4$ ) 稀释成一系列浓度, 实际配制的 CFDA 质量浓度分别为  $1.50$ 、 $2.00$ 、 $2.50$ 、 $3.00$  和  $3.50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 采用紫外-可见分光光度计测定样品在  $493\text{ nm}$  的吸光度 ( $A$ ), 以紫外吸收强度对浓度作图, 并进行线性回归分析。

**插入效率评价** 将制备好的样品稀释  $10$  倍, 先用紫外-可见分光光度计测定总吸光度 ( $A_{\text{总}}$ ), 再将上述样品放入超滤离心管中 (MWCO  $300\text{ kDa}$ ) 离心 ( $8\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $15\text{ min}$ ) 后, 收集下层液体, 稀释  $4$  倍后测定游离吸光度 ( $A_{\text{游离}}$ ), 根据公式: 靶头连接率 =

$(10A_{\text{总}} - 4A_{\text{游离}}) / 10A_{\text{总}} \times 100\%$ , 计算靶头的连接效率。

**粒径的测定及透射电镜观察** 将样品用 PBS (pH 7.4) 稀释, 配成合适浓度后于纳米粒径仪中检测。取 T7-LDL-VCR 纳米粒 1 滴置于 300 目碳支持膜, 待其干燥后, 用醋酸铀负染 10 min, 用滤纸小心吸干支持膜, 置于透射电镜下观察。

### 活体成像实验

**脑胶质瘤原位模型的建立**<sup>[13]</sup> 用 1% 戊巴比妥钠麻醉小鼠, 剂量 0.2 mL/只, 头部备皮, 用刀片刮开颅骨骨膜约 5 mm, 暴露颅骨; 将小鼠头部固定于脑立体定位仪上。以凶门为坐标原点, 在右侧 1.8 mm 处钻孔, 以  $1 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$  的速度注射  $5 \mu\text{L}$  活细胞悬液 ( $1 \times 10^6$  个细胞), 针头深度为 3 mm (进 4 mm, 退 1 mm), 最后对小鼠进行消毒和缝合。

**活体成像观察** 将 DiR 的甲醇溶液加至 T7-LDL-VCR 混悬液中孵育 24 h 后, 于 PBS (pH 7.4) 溶液中透析 24 h, 制备得到载荧光探针 DiR 的 T7-LDL-VCR 纳米粒。将造模成功的小鼠, 随机分为 3 组: ① 尾静脉注射 200  $\mu\text{L}$  生理盐水为对照组; ② 注射载荧光探针 DiR 的 LDL-VCR 纳米粒组; ③ 尾静脉注射 T7-LDL (DiR) 纳米粒组。

### 荷 C6 脑胶质瘤小鼠治疗作用的考察

**给药方案** 选择荷 C6 脑胶质瘤小鼠 40 只, 随机分成 4 组: ① 空白对照生理盐水组; ② 游离 VCR 组; ③ LDL-VCR 组; ④ T7-LDL-VCR 组。每组 10 只, 采用尾静脉注射, 参考相关文献<sup>[14]</sup>报道给药量为  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 于肿瘤接种后第 8 天开始给药, 每两天给药 1 次, 共给药 4 次。

**核磁共振成像与肿瘤体积抑制率测定** 肿瘤接种后第 16 天 (给药结束后第 2 天), 每组取小鼠 4 只, 用 1% 异氟烷快速麻醉后进行 MRI 检查并计算相对肿瘤体积 (RTV),  $\text{RTV} = V_{\text{给药组}} / V_{\text{对照组}} \times 100\%$ , 其中  $V$  为肿瘤体积, 最后数据用 SPSS 进行  $t$  检验。

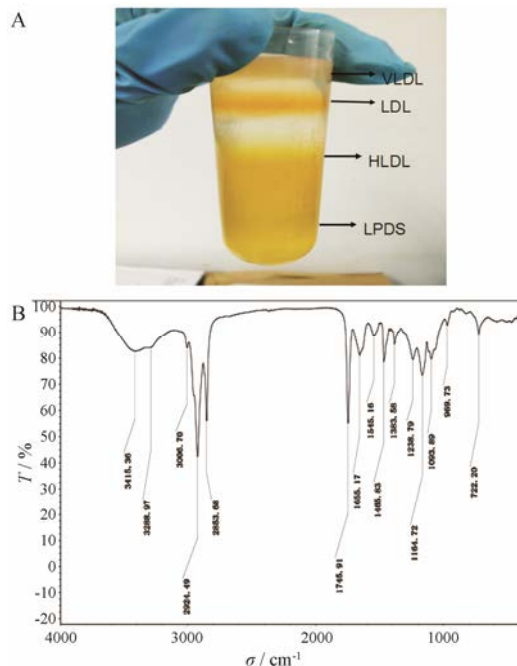
**生存曲线测定** 给药后, 每组取小鼠 6 只, 每天对其行为状态进行考察, 记录小鼠活动情况、症状和死亡日期, 考察生存曲线。用 SPSS 绘制卡普兰-迈耶生存曲线 (Kaplan-Meier survival curves), 并计算生存时间中位数及生存时间平均数。

## 结果

### 1 LDL 纳米粒的制备

用密度梯度离心法提取分离 LDL, 可见血浆脂蛋白自动分层; 超速离心结束后可见离心管中液体分为 7 层, 结果见图 1A。顶部乳白色为极低密度脂

蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL), 第 3 层浅黄色为 LDL, 第 5 层淡黄色边界不很清楚的为高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL), 最下层为无脂血清 (lipoprotein deficient serum, LPDS), 其余层为 NaCl 溶液。用注射长针小心收集 LDL。在此过程中, LDL 与上下层的界面会出现逐渐明显的折光面, 针头旋转收集, 可以提高收集效率<sup>[15]</sup>。



**Figure 1** Low density lipoprotein (LDL) extracted and separated from lipoprotein, layer distribution from top to bottom as following: first layer is very low density lipoprotein (VLDL), third layer is LDL, fifth layer is high density lipoprotein (HDL) and seventh layer is lipoprotein deficient serum (LPDS) (A); Infrared spectrum of LDL (B)

### 2 LDL 纳米粒的鉴定

红外结果 (图 1B) 可见, 在  $3282.8 \text{ cm}^{-1}$  的弱吸收峰为水分子的羟基 O-H 伸缩振动,  $2925$  和  $2852 \text{ cm}^{-1}$  是脂肪链的对称与非对称伸缩振动; LDL 中存在大量的酯链, 于磷脂、甘油三酯和胆固醇酯中。由图中可见,  $1736 \text{ cm}^{-1}$  为磷脂酯链 C=O 的伸缩振动;  $1653 \text{ cm}^{-1}$  处强吸收峰归属于蛋白质肽键中 C=O 的伸缩振动;  $1241 \text{ cm}^{-1}$  为 P=O 键伸缩振动;  $1088 \text{ cm}^{-1}$  处为  $\text{PO}_2^-$  的均衡拉伸振动,  $969 \text{ cm}^{-1}$  处的峰为磷脂中胆碱聚集体  $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$  的不对称振动峰, 这些特征峰与文献<sup>[11]</sup>报道基本一致, 证明实验所采用方法适合从人血中提取 LDL 纳米粒。

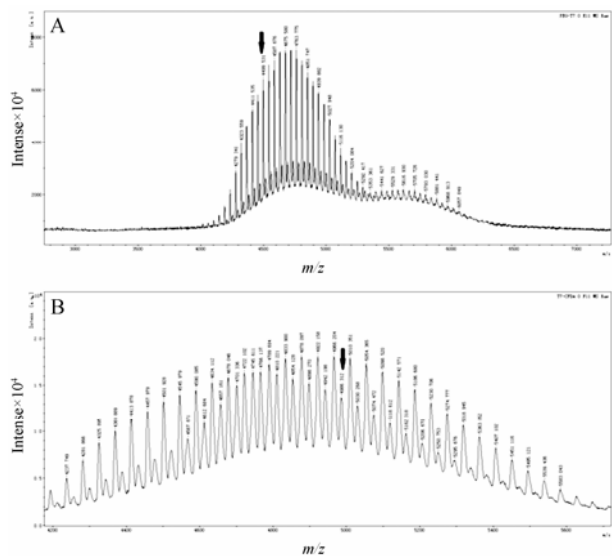
### 3 T7-LDL-VCR 纳米粒包封率的测定

实验结果得到, T7-LDL-VCR 纳米粒的 EE 为

30.1%。由参考文献<sup>[12]</sup>可知,此结果相对纳米制剂而言相对偏低,但是,对于 LDL 包载亲酯性药物属于正常值。

#### 4 T7 肽插入 LDL-VCR 纳米粒效率的评价

借助 MALDI-TOF MS 对产物进行分析。NHS-PEG<sub>3500</sub>-T7 (图 2A) 的理论相对分子质量为 4 495, NHS-PEG<sub>3500</sub>-T7 (CFDA) (图 2B) 的理论相对分子质量为 4 935, 并且观察到响应的离子峰之间相差 44 个单位,代表构成 PEG 结构中的重复单元-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O<sup>[16]</sup>。



**Figure 2** MALDI-TOF MS spectrum of NHS-PEG-T7 (A) and MALDI-TOF MS spectrum of NHS-PEG-T7 (CFDA) (B). CFDA: 5-(6)-carboxyfluorescein diacetate

**4.1 紫外全波长扫描** LDL 和 VCR 在波长为 493 nm 处对 NHS-PEG<sub>3500</sub>-T7 (CFDA) 荧光检测无干扰,结果见图 3A。

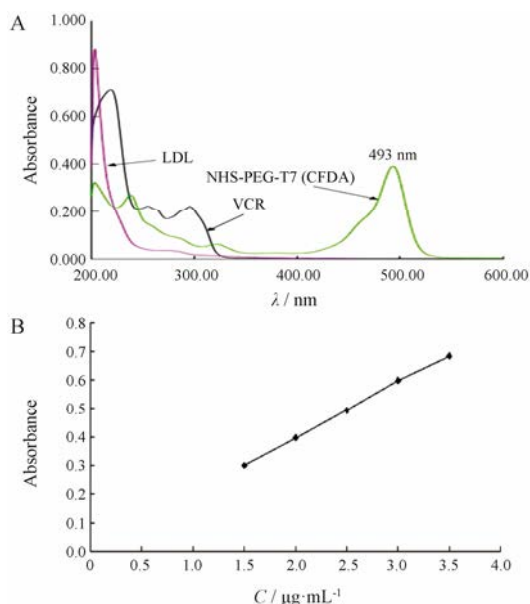
**4.2 CFDA 的线性及范围** CFDA 的线性回归方程为  $A=0.1950C+0.0071$  ( $R^2=0.9993, n=5$ ), 在 1.5~3.5 μg·mL<sup>-1</sup> 内紫外吸收强度与浓度的线性关系良好,结果见图 3B。计算得到靶头连接率为 63.88%。

#### 5 T7-LDL-VCR 纳米粒的构建与表征

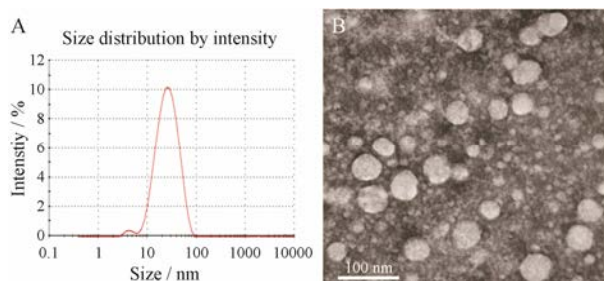
粒径分布测试结果表明, T7-LDL-VCR 纳米粒的平均粒径为 30 nm (图 4A); 由透射电镜结果可知, 纳米粒呈近圆形, 粒径约 20~45 nm (图 4B)。

#### 6 活体成像

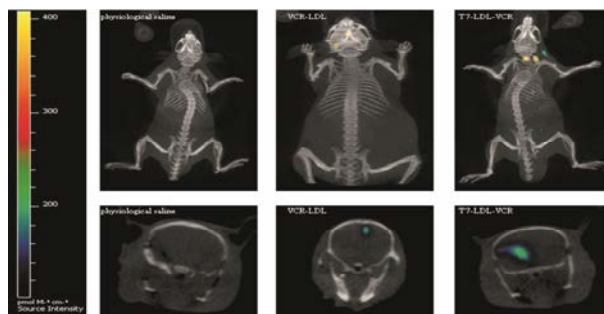
参考文献<sup>[12]</sup>于 2 h 后采用活体成像 Spectrum-CT 仪器进行荧光强度的检测。结果见图 5 所示, 两种 LDL 纳米粒载体均对小鼠脑胶质瘤有靶向作用, 但是 DiR-T7-LDL 相对 DiR-LDL 脑部富集作用更好, 说明将 T7 肽共价修饰于 LDL 表面, 使载体达到了协



**Figure 3** Ultraviolet visible spectrum scan of LDL, NHS-PEG-T7 (CFDA) and free vincristine (VCR) solution (A). Linear graph of CFDA solution in the range 200-600 nm (B)



**Figure 4** Particle size distribution of T7 peptide modified vincristine loaded low density lipoprotein (T7-LDL-VCR) (A); Transmission electron microscopy of T7-LDL-VCR (B)

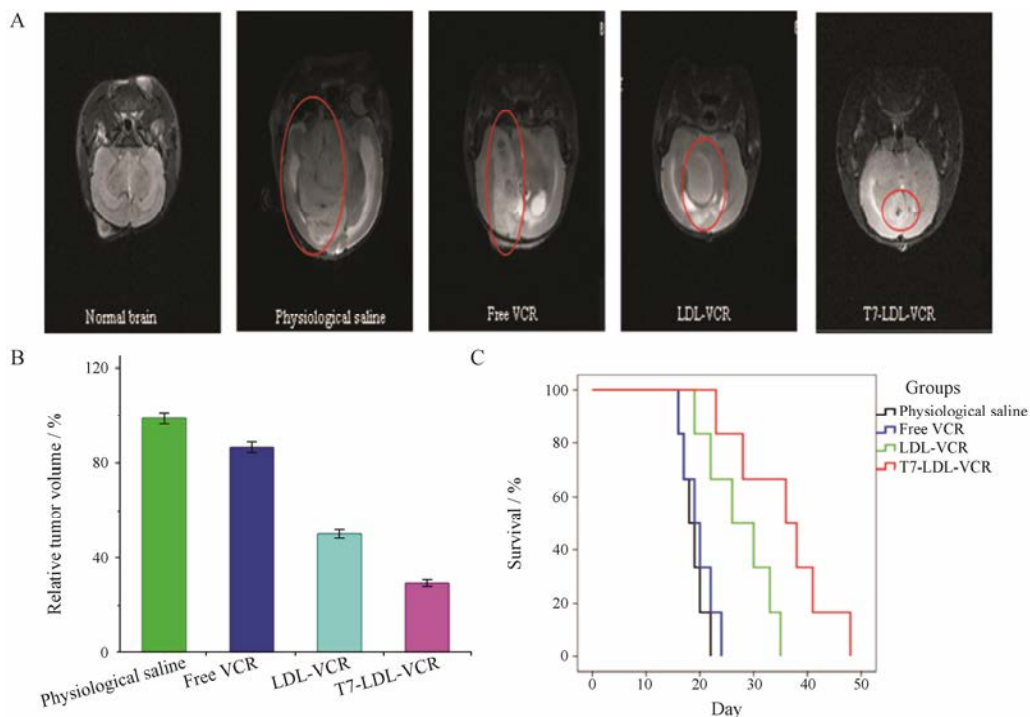


**Figure 5** Biodistribution of DiR contained in LDL-VCR and T7-LDL-VCR in mice bearing intracranial C6 glioma determined by an IVIS R Spectrum-CT

同靶向于脑胶质瘤的目的。

#### 7 荷 C6 脑胶质瘤小鼠治疗作用的考察

荷瘤小鼠经 4 次给药治疗后, MRI 结果显示, 与对照组小鼠脑部肿瘤相比, VCR 溶液或含 VCR 载体均对脑瘤有治疗作用, 且 T7-LDL-VCR 效果最为显



**Figure 6** MRI of normal and pathological brains at 16 days after inoculation (A). Relative tumor volume of the brain glioma (B). Kaplan-Meier survival curves of C6 glioma-bearing rats treated with free VCR, LDL-VCR and T7-LDL-VCR (C)

著 (图 6A); 采用核磁技术对荷瘤小鼠脑组织进行扫描, 可以获得肿瘤体积, 进而计算得到相对肿瘤体积, 结果显示, 游离 VCR 为  $(79.25 \pm 8.14)\%$ , LDL-VCR 为  $(51.50 \pm 4.73)\%$ , T7-LDL-VCR 为  $(30.00 \pm 4.32)\%$  (图 6B)。T7-LDL-VCR 比 LDL-VCR 的瘤抑制作用更强。给药后, 观察记录小鼠活动情况、症状和死亡日期, 根据观察结果绘制 Kaplan-Meier survival 曲线可知, 生存时间平均值和中位值分别为 30.57 和 36 天 (图 6C), 分别是 VCR-LDL 的 1.69 和 1.38 倍、游离 VCR 的 1.81 和 1.85 倍。说明 T7 修饰的 LDL 可增强 LDL 对肿瘤的靶向作用。

## 讨论

低密度脂蛋白靶向机制: 一方面是纳米粒具有被动靶向作用, 能通过渗透滞留效应聚集于肿瘤部位; 另一方面是经 T7 修饰或未修饰的载脂蛋白 B-100 所产生的主动靶向作用, 基于上述作用原理, 本研究构建了 T7-LDL-VCR 药物递送系统, 并借助 MALDI-TOF MS 定性分析 T7 与 LDL 载体连接后的产物和效率, 但在某些情况下, 由于机器飘移或其他原因的影响, 导致实际响应离子峰与理论上不完全一致。

通过包含不同的探针对载体在实验动物体内进行追踪, 提高了成像方法的安全性、特异性和灵敏

度<sup>[17]</sup>。本文用 DiR 标记 LDL 及 T7-LDL 纳米粒, 观察纳米粒对脑胶质瘤的体内靶向性。结果显示, 载 VCR 的 LDL 纳米粒相比游离药物均有较强的脑瘤靶向性及治疗作用, 且 T7-LDL-VCR 体内效果优于 LDL-VCR 纳米粒, 这说明 LDL 作为纳米载体的可行性, 用 T7 修饰 LDL 可达到 BBB 和脑肿瘤细胞双级靶向效果。

## References

- [1] Wrensch M, Minn Y, Bondy M, et al. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature [J]. *J Neuro-Oncol*, 2002, 4: 99-108.
- [2] Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier AF, et al. Primary brain tumours in adults [J]. *Lancet*, 2003, 361: 323-331.
- [3] Weil RJ, Palmieri DC, Bronder JL, et al. Breast cancer metastasis to the central nervous system [J]. *Am J Pathol*, 2005, 167: 913-920.
- [4] Agarwal S, Sane R, Oberoi R, et al. Delivery of molecularly targeted therapy to malignant glioma, a disease of the whole brain [J]. *Expert Rev Mol Med*, 2011, 13: e17.
- [5] Pardridge WM. BBB-Genomics: creating new opening for brain-drug targeting [J]. *Drug Discov Today*, 2001, 6: 381-383.
- [6] Yan H, Wang J, Yi P, et al. Imaging brain tumor by dendrimer-based optical/paramagnetic nanoprobe across the blood-brain

- barrier [J]. Chem Commun (Camb), 2011, 47: 8130–8132.
- [7] Bell RD, Sagare AP, Friedman AE, et al. Transport pathways for clearance of human Alzheimers amyloid beta-peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system [J]. J Cere Blood Flow Metab, 2007, 27: 909–918.
- [8] Oh S, Kim BJ, Singh NP, et al. Synthesis and anti-cancer activity of covalent conjugates of utemisinin and a transferrin-receptor targeting peptide [J]. Cancer Lett, 2009, 274: 33–39.
- [9] Kaplan LD, Deitcher SR, Silverman JA, et al. Phase II study of vincristine sulfate liposome injection and rituximab for patients with relapsed and refractory diffuse large B-cell lymphoma or Mantle cell lymphoma in need of palliative therapy [J]. Clinic Lymph Myelom Leuk, 2014, 14: 37–42.
- [10] Zhu QL, Zhou Y, Guan M, et al. Low-density lipoprotein-coupled *N*-succinyl chitosan nanoparticles co-delivering siRNA and doxorubicin for hepatocyte-targeted therapy [J]. Biomaterials, 2014, 35: 5965–5976.
- [11] Iwanik MJ, Shaw KV, Ledwith BJ, et al. Preparation and interaction of a low density lipoprotein: daunomycin complex with P388 leukemic cells [J]. Cancer Res, 1984, 44: 1206–1215.
- [12] Geng WQ, Lu Y, Gao J, et al. Preparation and *in vitro* evaluation of salinomycin-loaded low-density lipoprotein particles [J]. Chin J New Drugs (中国新药杂志), 2016, 25: 447–450.
- [13] Mei DY. A Study of Doxorubicin Hydrochloride Liposome Targeting to Glioma (盐酸多柔比星脂质体靶向神经胶质瘤的研究) [D]. Shanghai: Fudan University, 2010.
- [14] Li MY, Li ZP, Gong W, et al. Thermo-sensitive liposome co-loaded of vincristine and doxorubicin based on their similar physicochemical properties had synergism on tumor treatment [J]. Pharm Res, 2016, 33: 1881–1898.
- [15] Lai YH. Study on Low Density Lipoprotein-based Targeting Nano-carrier (基于低密度脂蛋白的靶向性纳米载体研究) [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2008.
- [16] Suh W, Han SO, Yu L, et al. An angiogenic, endothelial-cell-targeted polymeric gene carrier [J]. Mol Ther, 2002, 6: 664–672.
- [17] Li M, Yang YT, He Q, et al. Recent advances of nanocarriers in tumor immunotherapy [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2017, 52: 1839–1848.