

· 工艺研究 ·

响应面法优化多烯紫杉醇外泌体的载药工艺

郭密密, 王婴, 梁达均, 林定梅, 王瑜桑, 杨佳敏, 王岩(广东药科大学, 广东 广州 510006)

摘要: **目的** 构建一种多烯紫杉醇的外泌体递药系统。**方法** 采用超速离心法提取 A549 肿瘤细胞外泌体, 电穿孔法制备多烯紫杉醇外泌体(DTX-EXO)。以包封率为考察指标, 采用星点设计-响应面法考察制备工艺, 动态透析法测定 DTX-EXO 的体外释药行为。以体外细胞摄取实验和体内小鼠活体成像实验考察外泌体的靶向性。**结果** DTX-EXO 的最优制备工艺参数为: 多烯紫杉醇浓度 $120 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 电压 0.75 V, 电击次数 5 次。透射电镜下 DTX-EXO 呈现杯碟状, 平均粒径为 151 nm。DTX-EXO 在体外模拟正常体液环境和肿瘤环境下 24 h 累计释放度分别为 40.5% 和 56.9%。细胞摄取实验中, 香豆素-6(C6)-EXO 组细胞摄取荧光强度高于 C6 组。小鼠活体成像实验中, 生理盐水组在肿瘤部位没有荧光, Cy5.5-N-羧基琥珀酰亚胺脂(Cy5.5)-DTX-EXO 组在肿瘤部位的荧光最强, Cy5.5-EXO 组次之, Cy5.5-DTX 组最弱。**结论** 外泌体可以用于多烯紫杉醇的传递载体, 并且具有良好的缓释性和靶向性。

关键词: 多烯紫杉醇; 外泌体; 药物传递系统; 缓释性; 靶向性

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)08-1189-08

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.08.018

Optimization of Docetaxel Loaded Exosomes Preparation by Response Surface Methodology

GUO Mimi, WANG Ying, LIANG Dajun, LIN Dingmei, WANG Yusang, YANG Jiamin, WANG Yan(Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To construct an exosome delivery system of docetaxel. **Methods** Exosomes of A549 tumor cells were extracted by ultracentrifugation, the DTX-EXO were prepared by electroporation. The encapsulation efficiency was used as an evaluation index, the preparation process was investigated by response surface methodology, and *in vitro* release behavior of DTX-EXO was analyzed by dynamic dialysis. *In vitro* cell uptake assay and *in vivo* mouse imaging assay were chosen to evaluate the targeting of exosomes. **Results** Optimal preparation process for DTX-EXO were: concentration of DTX was $120 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, voltage was 0.75 V, number of electric shocks was 5. Transmission electron microscope(TEM) observation showed that DTX-EXO had a typical cup-shaped structure, Nanoparticle Tracking Analysis indicated the mean diameter was 151 nm. The cumulative release of DTX-EXO in 24 hours was 40.5% and 56.9% in normal environment and in tumor environment, respectively. In the cell uptake experiment, the fluorescence intensity of cells in the C6-EXO group was higher than that in the C6 group. In the *in vivo* imaging experiment of mouse, the normal saline group showed no fluorescence in the tumor site, while the fluorescence in the Cy5.5-DTX-EXO group was the strongest, followed by the Cy5.5-EXO group and the Cy5.5-DTX group. **Conclusion** Exosomes can be used to delivery DTX and have good slow-release property and targeting.

Keywords: Docetaxel; exosomes; drug delivery system; slow-release property; targeting

多烯紫杉醇(docetaxel, DTX)是浆果紫杉针叶的提取物, 属于紫杉类抗肿瘤药物, 用于乳腺癌、卵

巢癌、非小细胞肺癌、前列腺癌等多种实体肿瘤的治疗^[1]。其主要作用机制是使细胞在有丝分裂期不形

收稿日期: 2021-03-08

作者简介: 郭密密(1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药制剂研究与开发。Email: 1623820431@qq.com。通信作者: 王岩, 男, 博士, 教授, 研究方向: 药物新剂型与新技术。Email: gdpwy@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81673608)。

成纺锤体,引起肿瘤细胞死亡^[2]。多烯紫杉醇为脂溶性药物,难溶于水,目前临床使用的多烯紫杉醇注射液使用吐温-80、乙醇作为增溶剂增加溶解度,其不良反应较大,临床应用受到很大的限制^[3]。

外泌体(exosomes, EXO)是一种由细胞分泌,粒径大小在 40~200 nm 的分子膜泡^[4],首次由 Johnstone 等^[5]发现并命名。外泌体作为载体,可以在细胞间进行物质交换,其在人体内分布广泛,具有非免疫性和靶向性的特点,被认为是天然的药物载体^[6]。有学者^[7]发现癌细胞的外泌体优先与其亲本癌细胞融合,具有靶向母体癌症的特点,可以作为有效的载体包载药物。同时,外泌体具有对自身肿瘤的靶向能力,作为载体传递药物可以增加肿瘤部位的药物浓度。肿瘤细胞通常过表达正常细胞中不存在的表面特异性受体,这些受体可能是其外泌体靶向肿瘤细胞的基础^[8-9]。因此,利用肿瘤细胞外泌体对其表面特异性受体的识别,有望将治疗药物靶向传递到病变细胞,与普通细胞分泌的外泌体相比,可达到更高的靶向效率。临床上最常见的肺癌病理学类型是非小细胞肺癌,其中 A549 细胞呈鳞状,含有高度不饱和脂肪酸,能够有效维持细胞膜完整性,可较好地模拟肿瘤生长,因此被广泛用于体外研究^[10]。本研究以 A549 肿瘤细胞外泌体为载体,采用电穿孔法包载多烯紫杉醇,构建一种具有肺癌主动靶向性的递药系统,并采用响应面法优化了其载药工艺。

1 仪器与材料

LC-10A 高效液相色谱仪、AY120 十万分之一托盘电子分析天平(日本岛津公司);Diamondsil C₁₈ 色谱柱(250.0 mm×4.6 mm, 5 μm);SB-100D 超声波清洗仪(宁波新芝生物科技股份有限公司);TGL-16 医用离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);JEM 透射电镜(日本 JEOL 电子株式会社);Nanosight NS300 纳米颗粒跟踪分析仪(英国 Malvern 公司);Thermo 二氧化碳培养箱、STIK 高压灭菌锅(广州飞迪生物科技有限公司);OLYMPUS CKX41 倒置显微镜、IX73 型荧光倒置显微镜(日本奥林巴斯株式会社);DW-HL828 超低温冰箱(中科美菱低温科技有限公司);血球计数板(上海市求精生化试剂仪器有限公司);NightOWL II LB983 小动物活体成像系统(德国 Berthold 公司)。

多烯紫杉醇原料药(DTX, 南通飞宇生物科技股份有限公司,批号:FY353530103);DTX 对照品(成都克洛玛生物科技股份有限公司,批号:CHB190309,

纯度≥98.0%);香豆素-6(C6, 美国 Sigma-Aldrich 公司,含量≥98.0%);Cy5.5-N-羧基琥珀酰亚胺脂(Cy5.5, 西宝生物科技(上海)股份有限公司,批号:BDVVB/28);二甲基亚砜 DMSO(北京索莱宝科技有限公司);DMEM 高糖培养基、胎牛血清、0.25%EDTA 胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);磷酸缓冲液溶液(PBS, 美国 HyClone 公司);DAPI 染液(北京博奥森生物技术有限公司);4%多聚甲醛(北京雷根生物技术有限公司);乙醚(上海穗试公司,批号:2020120307);乙腈(色谱纯,德国默克公司);水为蒸馏水,其余试剂均为分析纯。A549 细胞(美国 ATCC 细胞库)。

4~6 周龄雄性 BALB/c 裸鼠,SPF 级,体质量(20±2)g。南方医科大学,动物许可证号:SCXK(粤)2016-0041。动物饲养于通气排风笼盒中,每盒饲养 6 只,温度 20~26 ℃,湿度 40%~70%。每天 12 h 照明和黑暗更替。每 2 d 更换新鲜的垫料、饲料和水。所有的动物实验均在广东药科大学动物伦理委员会的指导下进行。

2 方法与结果

2.1 外泌体的提取纯化 取经过饥饿培养的 A549 细胞上清于离心管中,以 300×g 离心 10 min 去除死细胞,取上清;以 2 000×g 离心 20 min 去除杂质,取上清;再以 10 000×g 离心 30 min 去除杂质,取上清;以 100 000×g 离心 70 min 使外泌体沉淀,弃上清;以 100 000×g 离心 70 min 清洗外泌体,弃上清,加 PBS 重悬后即得纯化后的外泌体。

2.2 外泌体的蛋白含量测定 采用 BCA 蛋白定量分析法测定外泌体的含量。将 BCA 试剂盒中的 A 液和 B 液按照 50:1 的比例配制 BCA 工作液:取蛋白标准品溶液 25 μL 用 PBS 稀释到 100 μL,得到浓度为 0.5 mg·mL⁻¹ 的蛋白标准品溶液;然后精密量取 0、4、8、12、16、20 μL,分别加至 96 孔板中;再补充 PBS 至 20 μL,各孔加入 200 μL BCA 工作液,混匀,于 37 ℃放置 30 min;测定各孔在 562 nm 处的吸光度,绘制标准曲线。实验得到 BCA 蛋白标准曲线为 $Y=1.996X+0.0111$, $r=0.999$ 。表明蛋白浓度在 0~0.5 mg·mL⁻¹ 时与吸光度线性关系良好。将外泌体用 PBS 稀释至一定的倍数,使其浓度落在线性范围内,按照上述方法测得吸光度,代入方程计算外泌体的蛋白浓度。

2.3 DTX-EXO 制备工艺 采用电穿孔法进行载药。精密称取处方量的 DTX 于容量瓶中,加 DMSO 溶

解,并用无水乙醇稀释至刻度。另取外泌体重悬液,采用“2.2”项下的蛋白定量方法用无水乙醇将外泌体稀释至蛋白浓度为 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,然后加入等量的 DTX 溶液,使得外泌体的蛋白浓度为 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。将上述体系置于电穿孔仪下,调节电穿孔的参数,电击 5 次,取出,即得 DTX-EXO。

2.4 DTX 含量测定方法的建立

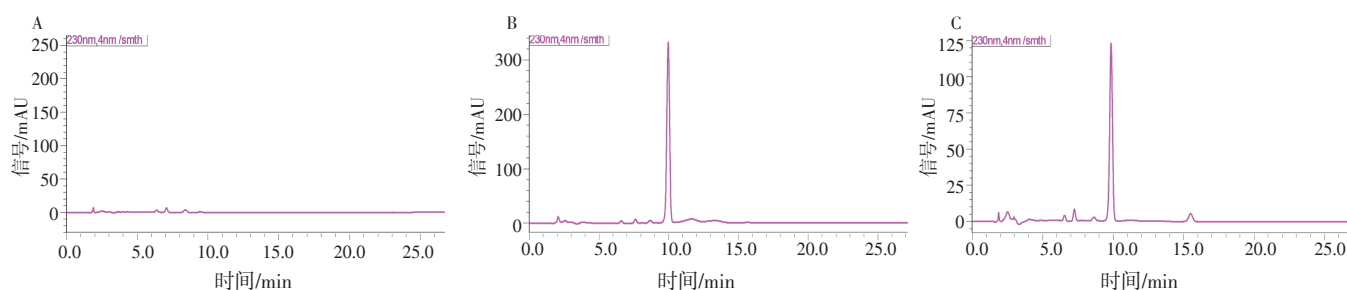
2.4.1 色谱条件 以 Diamonsil C_{18} 色谱柱($250.0 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$)为色谱柱;以乙腈-水(45:55)为流动相;流速为 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;柱温为 $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$;检测波长为 230 nm ;进样量为 $20 \mu\text{L}$ 。

2.4.2 对照品溶液的制备 精密称取 DTX 对照品 5 mg 于 5 mL 容量瓶中,加入乙醇适量,超声处理 10 min

使其溶解,加乙醇定容至刻度,制得浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液。

2.4.3 供试品溶液的制备 精密量取 DTX-EXO 0.4 mL 于 1 mL 容量瓶中,加入无水乙醇稀释至刻度,摇匀,用 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.4.4 专属性考察 精密量取空白外泌体 0.5 mL ,按照“2.4.3”项下方法操作,制得空白外泌体溶液。分别精密吸取空白溶液、对照品和 DTX-EXO 供试品溶液按照“2.4.1”项下的条件进样,记录色谱图,结果见图 1。供试品溶液与对照品溶液的主峰出峰时间一致,分离情况良好,空白对照无干扰,说明本法专属性良好。



注: A. 空白对照; B. 多烯紫杉醇(DTX)对照品; C. DTX-EXO

图 1 专属性考察结果

Figure 1 The results of specificity tests

2.4.5 线性关系考察 分别精密量取不同体积的 DTX 对照品溶液于 10 mL 容量瓶中,用无水乙醇稀释定容,摇匀,得到浓度分别为 12.5 、 25 、 50 、 100 、 200 、 400 、 $1\,000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列对照品溶液。按照“2.4.1”项下的条件进样,以峰面积(Y)为纵坐标,DTX 浓度(X)为横坐标,绘制标准曲线。得到回归方程为 $Y=23\,109X+698\,58$, $r=0.999\,9$,表明 DTX 浓度在 $12.5 \sim 1\,000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

2.4.6 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液 $20 \mu\text{L}$,按照“2.4.1”项下条件连续进样 6 次,测定峰面积,得对照品峰面积的 RSD 为 0.01% ,表明仪器的精密度良好。

2.4.7 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于室温放置 0 、 2 、 4 、 6 、 8 、 10 h 后进样测定,其峰面积的 RSD 为 0.27% ,表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

2.4.8 重复性试验 精密吸取同一批 DTX-EXO,按照“2.4.3”项下的方法平行制备 6 份供试品溶液,按照“2.4.1”项下的条件进样测定,结果供试品溶液

峰面积的 RSD 为 0.4% ,说明该方法的重复性良好。

2.4.9 加样回收率试验 精密量取浓度为 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DTX 对照品溶液 0.5 mL ,置 5 mL 容量瓶中,随机分为 3 组。各组分别加入相当于样品含量 80% 、 100% 、 120% 的对照品溶液,加无水乙醇定容至刻度,摇匀,用 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液,注入液相色谱仪,测定峰面积,计算回收率。结果见表 1。结果供试品的平均加样回收率在 $95\% \sim 105\%$ 之间,各浓度回收率的 RSD 均小于 3% ,表明该方法的准确度良好。

2.5 包封率的测定 采用超滤法测定 DTX-EXO 的包封率^[11]。精密量取 DTX-EXO 0.5 mL ,置于超滤管中,以离心半径 3 cm 、 $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 10 min ,吸取上清液于 1 mL 容量瓶中,加无水乙醇定容至刻度,摇匀,经 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过后,取续滤液注入液相色谱仪,测定游离 DTX 的含量。另取 DTX-EXO 0.5 mL 于 1 mL 容量瓶中,超声破乳后,加乙醇定容至刻度,摇匀,同法测定 DTX-EXO 中 DTX 的总药量。

表 1 加样回收率试验结果

Table 1 The results of the sample recovery

组别	样品含量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
低浓度组	20	16	35.32	98.11	99.07	1.27
	20	16	36.18	100.50		
	20	16	35.50	98.61		
中浓度组	20	20	40.56	101.40	101.23	1.58
	20	20	41.09	102.73		
	20	20	39.82	99.55		
高浓度组	20	24	44.35	100.80	102.40	1.60
	20	24	45.79	104.07		
	20	24	45.03	102.34		

包封率公式： $EE = \left(1 - \frac{W_1}{W_2}\right) \times 100\%$ 。

其中 EE 为 DTX-EXO 的包封率； W_1 为游离 DTX 的药量； W_2 为 DTX-EXO 溶液中的总药量。

2.6 响应面法优化外泌体的载药工艺

2.6.1 响应面法实验设计 先进行单因素考察，分别观察蛋白浓度、药物浓度、电压和电击次数对 DTX 外泌体制备的影响。结果表明蛋白浓度对包封率的影响较其他因素小，故将蛋白浓度固定为 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，然后选择对包封率影响较大的 3 个因素，DTX 浓度(A)、电压(B)、电击次数(C)为考察对象，进行响应面设计。因素的取值范围见表 2，实验安排及结果见表 3。

2.6.2 回归方程拟合 运用 Design Expert 8.0.6 软件绘制二维和三维响应面图，确定 DTX-EXO 的最佳载药工艺。经过分析得到拟合方程： $Y = 17.62 - 2.05A - 1.28B + 0.13C + 0.055AB + 1.02AC + 1.81BC - 3.21A^2 - 4.35B^2 - 7.36C^2 + 1.47AC^2$ ， $r = 0.9902$ ，校正系数(R^2_{adj})

为 0.9481。从拟合方程中可以看出 r 大于 0.9000，因此可以用于模拟处方筛选。根据所得二元多项式模型，绘制包封率对 3 个自变因素的各二维等高线图和三维效应面，见图 2~图 4。

表 2 外泌体载药工艺响应面实验设计因素水平

Table 2 Factors and levels of response surface design

因素	水平		
	-1	0	1
药物浓度 (A)/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	80	120	160
电压(B)/V	0.5	0.75	1
电击次数 (C)/次	3	5	7

表 3 外泌体载药工艺实验安排及结果

Table 3 Experiment arrangements and results

实验 编号	因素			包封率/%
	A	B	C	
1	-1.000	0.000	-1.000	8.68
2	0.000	-1.000	-1.000	7.68
3	-1.000	0.000	1.000	6.57
4	0.000	0.000	0.000	17.69
5	0.000	-1.000	1.000	4.64
6	0.000	0.000	0.000	17.46
7	1.000	0.000	1.000	7.47
8	-1.000	1.000	0.000	9.75
9	1.000	-1.000	0.000	10.28
10	0.000	0.000	0.000	17.75
11	1.000	1.000	0.000	5.77
12	0.000	1.000	-1.000	3.54
13	-1.000	-1.000	0.000	14.46
14	0.000	0.000	0.000	17.58
15	0.000	1.000	1.000	7.76
16	0.000	0.000	0.000	17.63
17	1.000	0.000	-1.000	5.48

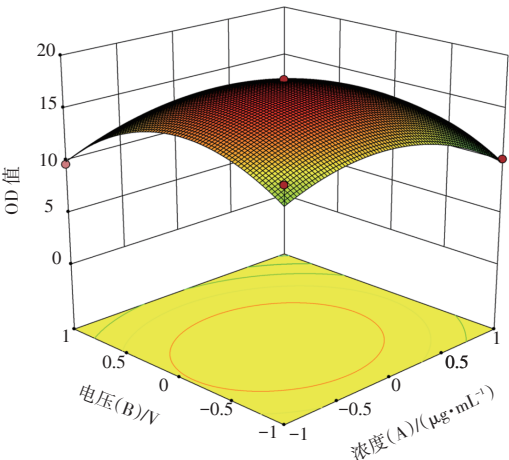
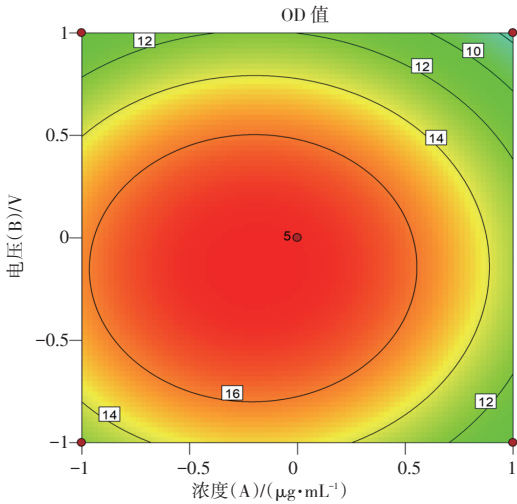


图 2 浓度(A)与电压(B)的二维等高线图和三维效应面图

Figure 2 Two-dimensional contour and three-dimensional effect surface of concentration(A)and voltage(B)

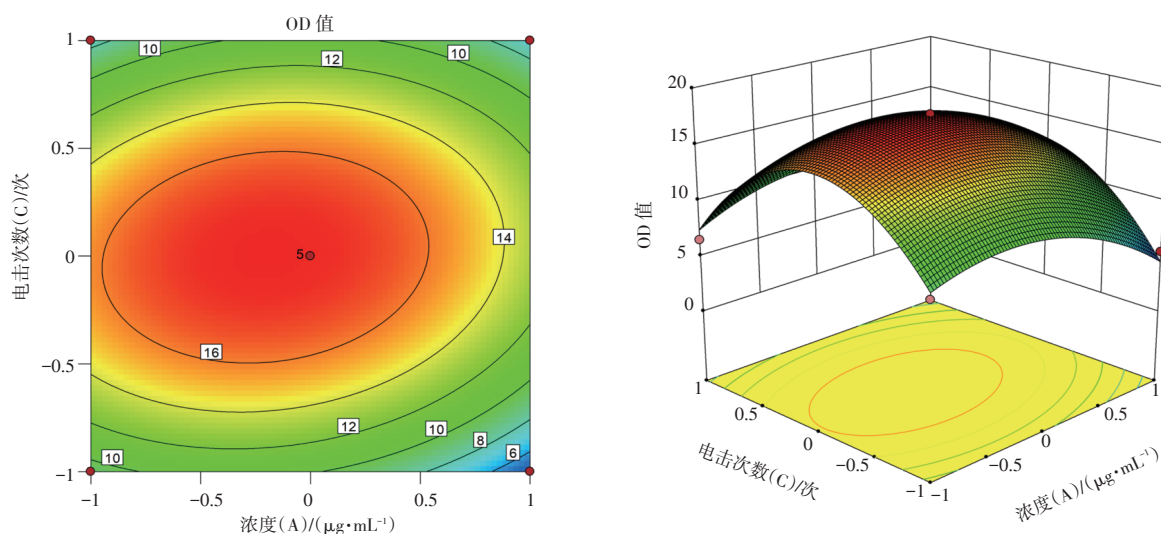


图 3 浓度(A)与电击次数(C)的二维等高线图和三维效应面图

Figure 3 Two-dimensional contour and three-dimensional effect surface of concentration(A)and clicks(C)

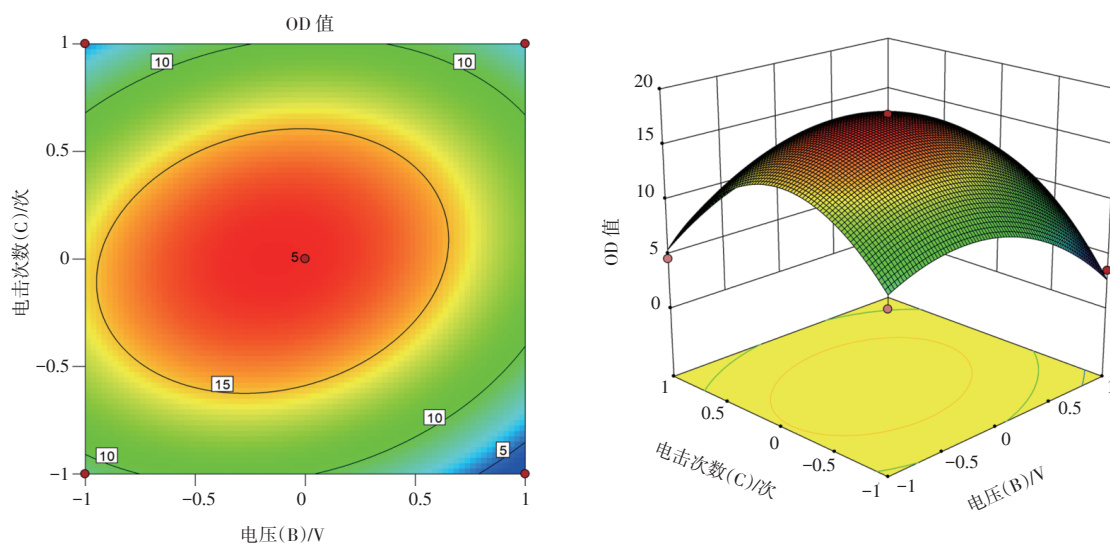


图 4 电压(B)与电击次数(C)的二维等高线图和三维效应面图

Figure 4 Two-dimensional contour and three-dimensional effect surface of and voltage(B)and clicks(C)

2.6.3 响应面优化结果 根据回归方程进行响应面分析并绘制包封率对应的 3 个因素的三维效应图和二维等高线图(见图 2~图 4), 各因素优化范围分别为: A 为 80~160 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, B 为 0.5~1 V, C 为 3~7 次。通过响应面分析确定 DTX-EXO 的最佳制备条件为: 载药浓度为 120 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 电压为 0.75 V, 电击次数为 5 次。包封率在此条件下的预测值为 17.75%。

2.6.4 工艺验证 根据上述最佳工艺条件, 平行制备 3 份样品, 测定其包封率, 并将其与预测值进行比较。所测样品的平均包封率为 18.29%, 与理论预测值接近, 实测值与预测值的平均偏差(3.04%) < 5%。表明响应面实验设计所建模型的预测性良好, 该工艺稳定可行。

2.6.5 DTX-EXO 的结构表征 取 DTX-EXO, 室温下用 2%多聚甲醛固定 30 min, 然后将 10 μL 混合物滴到直径为 2 mm 的铜网上。干燥 20 min 后, 将外泌体用 2%磷钨酸染色 10 min, 最后用透射电镜进行拍照, 结果可以看到外泌体呈杯碟状的典型结构, 见图 5。用纳米颗粒跟踪分析仪测定其粒径分布, 结果见图 6。DTX-EXO 平均粒径为 151 nm, 符合纳米制剂的粒径要求。

2.7 体外释放度的测定 采用动态透析法进行体外释放实验^[12]。模拟人体正常体液环境下[(37±1)℃, pH=7.4 的 PBS 溶液]和人体肿瘤环境下[(42±1)℃, pH=5.8 的 PBS 溶液]的释放行为。

精密量取 DTX-EXO 和 DTX 2 mL, 置于经预处

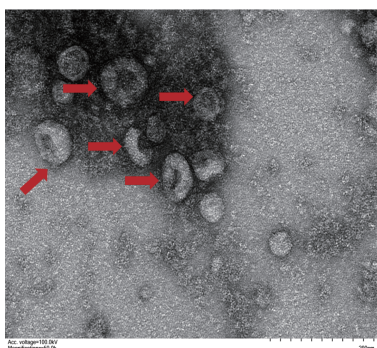


图5 DTX-EXO 的透射电镜图

Figure 5 TEM of DTX-EXO

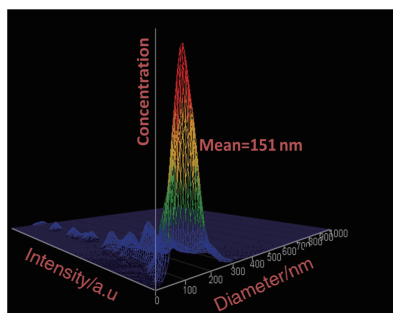
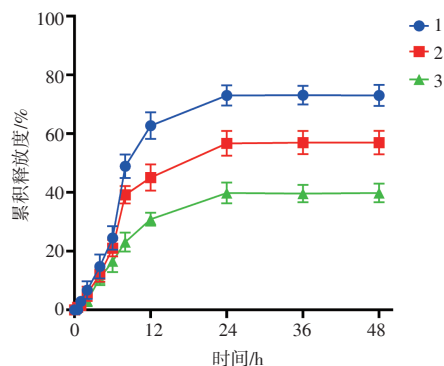


图6 DTX-EXO 平均粒径

Figure 6 Mean particle size of DTX-EXO

理的透析袋中,用细棉绳将两端扎紧,确保袋中溶液不泄露,置于 30 mL 含 0.2%吐温-80 的 PBS(pH 为 7.4)中。在 37 ℃下,以 100 r·min⁻¹ 振摇 48 h,分别于 0、0.5、1、2、4、6、8、12、24、36 和 48 h 吸取释放介质 2 mL,再补充相同体积的释放介质,经 0.45 μm 微孔滤膜后,用 HPLC 法测定释放介质中 DTX 的含量。另取 DTX-EXO 2 mL 置于 30 mL 含 0.2%吐温-80 的 PBS(pH 为 5.8)中,在 42 ℃下同法操作,并计算累积释放度,结果如图 7。DTX 溶液在正常体液环境下 4 h 和 48 h 的累积释放率为 14.9% 和 73.4%,而 DTX-EXO 在人体正常体液环境下 4 h 和 48 h 的累积释放率分别为 10.4% 和 40.57%。表明 DTX-EXO 在正常体液和肿瘤环境下较 DTX 均有明显的缓释性。此外,DTX-EXO 在肿瘤环境下的释放速度明显快于正常体液环境,可能是因为肿瘤部位温度较高,加速了药物的释放。

2.8 体外靶向性评价 由于 DTX 本身没有荧光,故用香豆素 6(C6)代替 DTX 观察细胞对药物的摄取情况^[13]。C6 因为其荧光可运用于细胞摄取的检测,并且不会对细胞本身产生任何毒副作用。实验中将 C6 采用电穿孔的方法制备 C6 外泌体(C6-EXO),同时设置未进行包载的 C6 与细胞孵育,观察细胞对 C6 和 C6-EXO 的摄取情况,分别用荧光显微镜定性检



注: 1. 正常体液环境 DTX 释放; 2. 肿瘤部位环境 DTX-EXO 释放; 3. 正常体液环境 DTX-EXO 释放

图7 DTX-EXO 和 DTX 在不同环境下的释放曲线($n=3$)Figure 7 The release curves of DTX-EXO and DTX in different environments($n=3$)

测和 ImageJ 定量检测。

消化对数生长期的 A549 细胞,并将细胞密度调整为 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板中,在培养箱中培养 24 h,弃旧培养液。分别加入完全培养基制备的 C6、C6-EXO(C6 最终浓度为 $4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 在培养箱中分别孵育 1、2、4 h。用预冷的 PBS 洗涤细胞 3 次以除去未结合的 C6。再用 4% 多聚甲醛固定细胞 10 min,待细胞固定后弃去多聚甲醛,并用 PBS 洗涤 2 次,加入 100 μL DAPI 对细胞核进行染色标记,10 min 后用冷 PBS 洗涤 2 次,最后用 PBS 封住细胞,置于荧光显微镜下观察分析。实验结果见图 8、图 9。视野下各组细胞数目并无差异。根据 C6 的荧光强度判断细胞对各组制剂的摄取情况。两个处理组中,C6-EXO 组的荧光强度明显强于 C6 组($P < 0.05$, $P < 0.001$);表明外泌体具有靶向性,能够靶向性的到达细胞,从而促进细胞对 C6-EXO 的摄取。

2.9 体内靶向性评价 采用 Cy5.5 对外泌体进行标记,考察给药后的外泌体的靶向作用^[14]。

2.9.1 荷瘤裸鼠模型的建立 用含 0.25% EDTA 的胰蛋白酶消化生长期 A549 细胞,用 PBS 调节细胞密度至每毫升 5×10^6 个。样品一直置于冰上,使细胞处于较低的代谢状态。取 4~6 周龄裸鼠称体质量后,在左下肢注射瘤液 0.2 mL。裸鼠在 SPF 级条件下饲养,24 d 后可看到瘤块突起,测定瘤块体积。

2.9.2 活体成像实验 待裸鼠皮下肿瘤体积达到 180 mm³ 左右时,将裸鼠随机分为 4 组:生理盐水组(Control 组),Cy5.5-EXO 组,Cy5.5-DTX 组,Cy5.5-DTX-EXO 组,尾静脉注射给药,其中 Cy5.5 浓度为 $6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,DTX 剂量为 $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,每 2 d 给药 1 次,连续给药 18 d。在最后 1 次给药后,对各

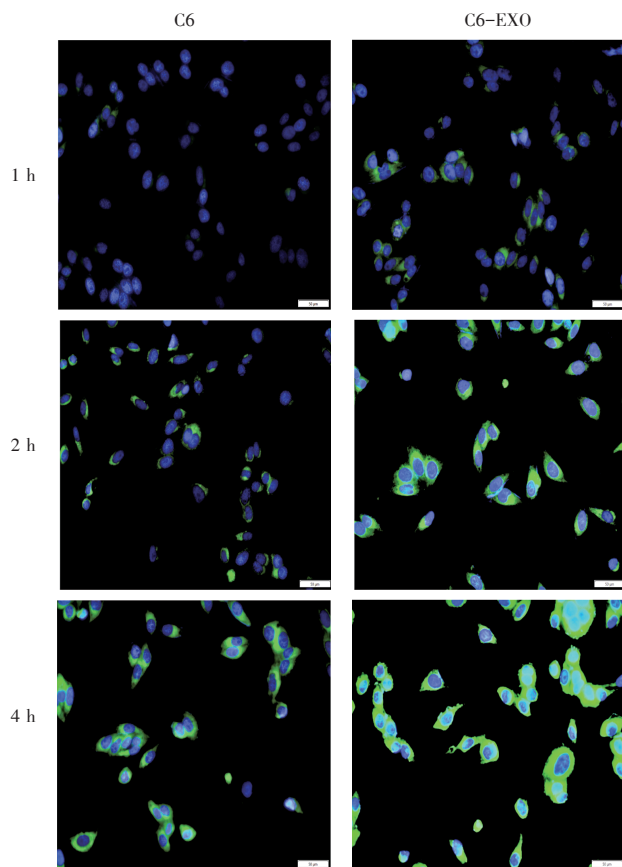
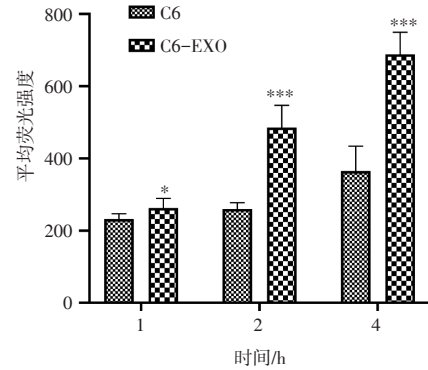


图 8 不同时间点 A549 细胞对 C6 和 C6-EXO 的摄取
Figure 8 Cell uptake of C6 and C6-EXO at different time points

组裸鼠进行乙醚吸入麻醉，并且在给药后 1、2、4、6、12、24 h，用活体成像仪进行拍照记录荧光强度。结果见图 10。根据 Cy5.5 的荧光强度判断外泌



注：与 C6 组比较，* $P < 0.05$ ，*** $P < 0.001$
图 9 不同时间点细胞摄取荧光定量分析($n=3$)
Figure 9 Fluorescence quantitative analysis of cell uptake at different time points($n=3$)

体给药后在体内的分布情况。在注射后 1、2、4、6、12、24 h，生理盐水组未检测到荧光；Cy5.5-EXO 组、Cy5.5-DTX 组、Cy5.5-DTX-EXO 组肿瘤部位均可以检测到荧光，其中 Cy5.5-DTX-EXO 组的荧光强度高于 Cy5.5-EXO 组和 Cy5.5-DTX 组。结果表明外泌体具有良好的靶向性；同时，Cy5.5-EXO 组和 Cy5.5-DTX-EXO 组在 12 h 仍可以检测到荧光，而 Cy5.5-DTX 在 12 h 时已无法检测到荧光，表明 Cy5.5-EXO 组和 Cy5.5-DTX-EXO 组在体内的滞留时间更长，具有缓释性。可能因为 Cy5.5-DTX-EXO 不但有外泌体的主动靶向作用，还有肿瘤组织本身具有高渗透长滞留效应(Enhanced Permeability and Retention effect, EPR)，使药物滞留肿瘤组织的时间

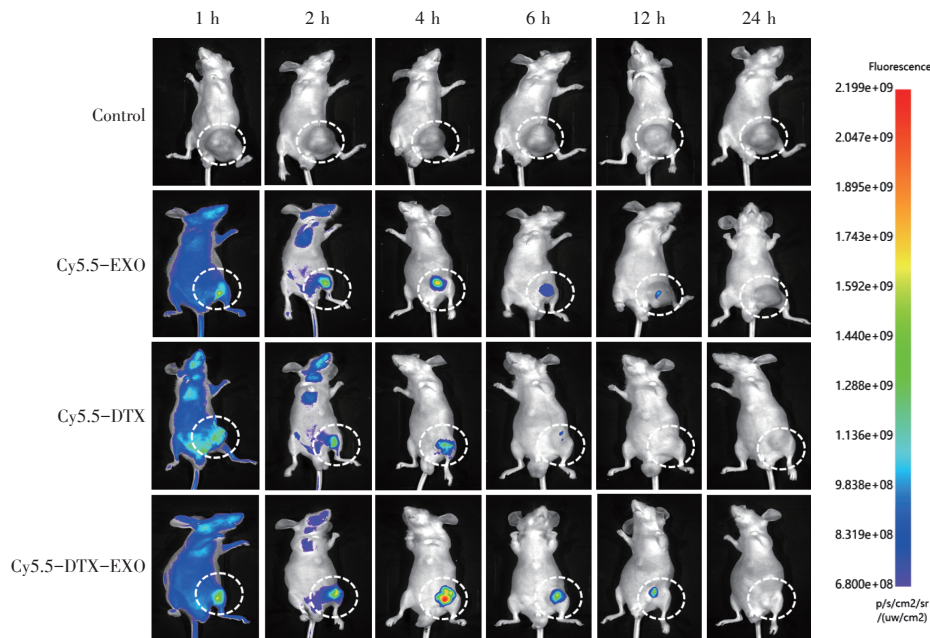


图 10 活体成像分析
Figure 10 In vivo imaging analysis

延长,起到被动靶向作用,两者共同增强 Cy5.5-DTX-EXO 的靶向作用;但 Cy5.5-EXO 依靠外泌体的主动靶向作用到达肿瘤部位;而 Cy5.5-DTX 只能依靠 EPR 效应到达肿瘤部位, Cy5.5-DTX-EXO 与其相比更有优势。因此外泌体具有一定的缓释性和靶向性。

3 讨论

外泌体的提取方法有尺寸排除色谱法、沉淀法、膜亲和法和超速离心法^[15],但前 3 种方法提取的外泌体杂质较多,不利于后续的实验。因此本实验采用超速离心法进行外泌体的提取。

外泌体载药的方法有孵育法、超声法、反复冻融法、挤压法和电穿孔法^[16],其中孵育法和超声法包封率偏低,反复冻融和挤压法会破坏外泌体双层膜的结构。因此本实验采用电穿孔法制备外泌体,通过电击将外泌体的双层膜结构打开,药物进入膜之后双层膜会自动关闭,包封率高且不会破坏膜的结构。

本研究采用超滤法测定外泌体包封率。超滤法是根据分子量不同从而达到分离的目的。由于 DTX 是脂溶性药物,DTX-EXO 在超滤管中离心的时候,游离的药物会沉淀在超滤管外,而包封的药物会停留在上层,可以有效分离 DTX-EXO 和游离的 DTX,同时该法操作简便,准确度较高,适用于 DTX-EXO 包封率的测定。因此本研究采用超滤法测定外泌体的包封率。

电镜结果显示 DTX-EXO 具有典型的双层膜结构;粒径结果表明该制剂符合纳米制剂的要求;体外释放实验结果表明 DTX-EXO 在正常体液环境和肿瘤环境具有一定的缓释性能,在正常体液环境下能缓慢释放,在肿瘤部位则释放速度加快,有利于减少细胞在正常组织中的毒副反应,增加肿瘤部位的药效。体外细胞摄取实验和体内小鼠活体成像实验结果表明外泌体具有靶向性,能够靶向性地将药物“运输”到肿瘤部位,促进药物的摄取。利用外泌体制剂的缓释性及其在肿瘤环境下速释的特点,外泌体有望成为一种极具开发潜力的抗肿瘤药物载体。

参考文献:

[1] 邱玉琴.多烯紫杉醇经皮给药系统的设计与评价[D].北京:中国

科学院研究生院(理化技术研究所),2009.

- [2] DEWEGER V A, BEIJNEN J H, SCHELLENS J H M. Cellular and clinical pharmacology of the taxanes docetaxel and paclitaxel—a review[J]. *Anti-Cancer Drugs*, 2014, 25(5): 488–494.
- [3] 蔡敏娴,陈志奎,林礼务,等.载多烯紫杉醇聚乳酸-羟基乙酸微球的制备、表征及其药物稳定性[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(21): 3856–3860.
- [4] KIM M S, HANEY M J, ZHAO Y, et al. Engineering macrophage-derived exosomes for targeted paclitaxel delivery to pulmonary metastases: in vitro and in vivo evaluations[J]. *Nanomedicine (Nanotechnology, Biology and Medicine)*, 2017, 14(1): 195–204.
- [5] JOHNSTONE R M, ADAM M, HAMMOND J R, et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes)[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1987, 262(19): 9412–9420.
- [6] 袁鹏,郭晓辰,张军平,等.外泌体作为中药载体的研究进展[J]. *药学报*, 2017, 52(11): 1667–1672.
- [7] YONG T, ZHANG X, BIE N, et al. Tumor exosome-based nanoparticles are efficient drug carriers for chemotherapy[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 751–760.
- [8] LI Y, WU Y, WANG J, et al. Gemcitabine loaded autologous exosomes for effective and safe chemotherapy of pancreatic cancer[J]. *Acta Biomaterialia*, 2020, 101: 519–530.
- [9] 江佳佳,吴佩佩,许文荣.肿瘤外泌体标志物应用及靶向治疗进展[J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2021, 31(1): 11–16.
- [10] 林小峰,陈龙.晚期非小细胞肺癌化疗现状与进展[J]. *广西医科大学学报*, 2019, 36(5): 850–855.
- [11] 臧巧真,唐涛,龙凯花,等.Box-Behnken效应面法优化 α -细辛脑长循环纳米粒制备工艺[J]. *中成药*, 2016, 38(2): 456–460.
- [12] 巨红叶,焦莹,胡坤霞,等.穿龙薯蓣皂苷纳米混悬剂含量测定及体外释放评价[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2018, 20(9): 69–73.
- [13] NIE X, LIU Y, LI M, et al. SP94 peptide-functionalized PEG-PLGA nanoparticle loading with cryptotanshinone for targeting therapy of hepatocellular carcinoma[J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2020, 21(4): 124–135.
- [14] LIANG L, ZHAO L, WANG Y, et al. Treatment for hepatocellular carcinoma is enhanced when norcantharidin is encapsulated in exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2021, 18(3): 1003–1013.
- [15] 吕丽华,朱丽娜,王皓,等.血浆外泌体提取方法的比较[J]. *检验医学*, 2020, 35(12): 1224–1228.
- [16] 姜承耀,陈文娟,陈小慧,等.母乳外泌体载药用于新生儿相关疾病治疗的研究进展[J]. *医学综述*, 2020, 26(19): 3769–3773.

(编辑:梁进权)