

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.09.004

线粒体靶向 TPP-DOX 连接物的制备及其 逆转肿瘤耐药活性研究 *

崔 晗¹ 宦梦蕾¹ 宋彦峰¹ 刘道洲¹ 叶威良¹ 张邦乐¹ 王玉琨^{2△} 周四元^{1△}

(1 第四军医大学药学院药剂学教研室; 2 第四军医大学药学院药事管理与药物信息学教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的:阿霉素(DOX)是常用的抗肿瘤药物,但是它的毒副作用大,而且肿瘤细胞易对 DOX 产生耐药,限制了其临床应用。本研究利用肿瘤细胞线粒体跨膜电位较高的特性,将亲脂性阳离子(3- 丙羧基)三苯基溴化磷(TPP)与 DOX 相连接制备具有线粒体靶向功能的 TPP-DOX,以期达到逆转肿瘤细胞耐药的目的。**方法:**以 DOX、TPP 为原料,合成 TPP-DOX,通过核磁、质谱等方法进行结构鉴定。采用 MTT 方法研究 TPP-DOX 对 KB 细胞、A549 细胞及耐 DOX 肿瘤细胞 MDA-MB-231/ADR 的体外抗肿瘤活性。采用激光共聚焦显微镜观察 TPP-DOX 在肿瘤细胞内的分布。**结果:**TPP-DOX 对 KB 细胞和 A549 细胞的毒性低于 DOX, TPP-DOX 对耐 DOX 肿瘤细胞 MDA-MB-231/ADR 的毒性明显大于 DOX。激光共聚焦显示 TPP-DOX 分布于细胞核和线粒体中。**结论:**TPP-DOX 具有线粒体靶向特性,可有效逆转肿瘤耐药,有进一步研究的价值。

关键词:(3- 丙羧基)三苯基溴化磷;阿霉素;线粒体;多药耐药

中图分类号:R730.5;R965 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)09-1619-04

Preparation of Mitochondrial Targeting TPP-DOX Conjugate to Overcoming the Drug Resistance of Doxorubicin*

CUI Han¹, HUAN Meng-lei¹, SONG Yan-feng¹, LIU Dao-zhou¹, YE Wei-liang¹, ZHANG Bang-le¹, WANG Yu-kun^{2△}, ZHOU Si-yuan^{1△}

(1 Department of Pharmaceutics, 2 Department of Pharmacy administration and Drug Information, School of Pharmacy, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: Doxorubicin (DOX) is a commonly used chemotherapy drug for tumor treatment. However, the severe side effects and multiple drug resistance (MDR) hinder its clinical application. The mitochondrial trans-membrane potential is relative high, thus lipophilic cations show high affinity with mitochondria. In this paper, (3-carboxyl) phenyl bromide phosphine (TPP) was conjugated with DOX to prepare mitochondria targeting TPP-DOX to overcome drug resistance of tumor cells. **Methods:** TPP-DOX was synthesized by connecting TPP and DOX. The structure of TPP-DOX was confirmed by ¹HNMR and MS. The antitumor activity of TPP-DOX was tested in vitro against KB cells, A549 cells and MDA-MB-231/ADR cells by MTT method. The laser confocal microscope was used to observe the cellular uptake and distribution of the TPP-DOX in tumor cells. **Results:** TPP-DOX exhibited lower cytotoxicity than free DOX on KB cells and A549 cells, but it showed higher cytotoxicity than free DOX on MDA-MB-231/ADR cells. Confocal microscopy confirmed that TPP-DOX distributed in the mitochondria and nucleus. **Conclusions:** TPP-DOX can overcome drug resistance in tumor cells, and it is worthy of further investigation.

Key words: (3-Carboxypropyl)Triphenylphosphonium; Doxorubicin; Mitochondria; Multi-drug resistance

Chinese Library Classification(CLC): R730.5; R965 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)09-1619-04

前言

阿霉素(doxorubicin, DOX)属于广谱抗肿瘤药,广泛应用于肿瘤的临床治疗。然而它的选择性低、毒副作用大,具有明显的剂量依赖性心脏毒性,而且肿瘤细胞易对其产生耐药,从而

限制了阿霉素的临床使用。阿霉素主要通过进入细胞核内,插入细胞 DNA,干扰转录过程,抑制 DNA 和 RNA 的合成而发挥药效。肿瘤细胞在耐 DOX 的情况下,DOX 不能进入细胞核发挥作用,造成化疗失败。据报道,阿霉素能够刺激肿瘤细胞线粒体,增加凋亡蛋白的数量,最终导致细胞凋亡。在耐药的情况

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81301303)

作者简介:崔晗(1986-),男,硕士研究生,助教,主要研究方向:药剂学,电话:15829678875, E-mail: lchurch@163.com

△ 通讯作者:周四元,男,博士生导师,教授,主要研究方向:药剂学, E-mail: zhousy@fmmu.edu.cn;

王玉琨,男,硕士生导师,教授,主要研究方向:药物临床试验统计, E-mail: wyk@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2014-10-26 接受日期:2014-11-20)

下,如果能将 DOX 运送至线粒体,则有可能杀死耐药肿瘤细胞,从而逆转耐药^[1-4]。研究表明脂质阳离子三苯基磷对线粒体具有很高的亲和力^[5-8],本文将 DOX 与三苯基磷相连接,合成得到具有线粒体靶向特性的 TPP-DOX 复合物。采用 MTT 方法研究 TPP-DOX 对 KB 细胞(人口腔表皮样癌细胞)、A549 细胞(人肺癌细胞)及耐 DOX 肿瘤细胞 MDA-MB-231/ADR(耐阿霉素人乳腺癌细胞)的体外抗肿瘤活性,采用激光共聚焦显微镜观察 TPP-DOX 在肿瘤细胞内的分布。结果显示 TPP-DOX 可进入耐药肿瘤细胞的线粒体;与游离 DOX 相比,其对耐药细胞的细胞毒性显著增加,提示 TPP-DOX 可逆转肿瘤细胞耐药。

1 材料与方法

1.1 药品、试剂和仪器

(3-丙羧基)三苯基溴化磷(TPP)购自北京百灵威公司;阿霉素(DOX)购自浙江海正药业股份有限公司;N-羟基丁二酰亚胺(NHS),1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDCI),3-(4,5-二甲苯基)-2-噻唑啉酮(MTT)购自北京鼎国生物技术有限责任公司;线粒体探针 Mito Track green 购自 Invitrogen 公司;RPMI1640 培养液、胎牛血清均购自 HyClone 公司;4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)购自碧云天生物技术有限公司;INOVA-400MHz 型超导核磁共振仪(美国 Varian 公司),Waters Quattro-premier 质谱仪(美国 Waters 公司);LeicaTCSSP2 激光共聚焦显微镜(德国 LEICA 公司);酶标仪(美国 Awareness 公司)。

1.2 细胞培养

人口腔表皮样癌 KB 细胞、人肺癌 A549 细胞(购自中国科学院上海药物研究所)及 MDA-MB-231/ADR 细胞(耐 DOX 细胞,由本教研室采用小剂量 DOX 长期孵育诱导而成)接种于培养瓶中,加入于 1640 培养液(含 10% 胎牛血清),置于孵箱中孵育(37℃、5% CO₂),定期更换培养液。

1.3 TPP-DOX 的合成及表征

TPP-DOX 的合成路线如图 1 所示,称取 43 mg TPP、25 mg NHS、40 mg EDCI 溶于 20 mL 二氯甲烷中,50 mg DOX 溶于 10 mL 二氯甲烷中,加入 20 μL 三乙胺,将 DOX 二氯甲烷溶液缓慢滴加入 TPP 溶液中,室温搅拌反应 24 h。目标产物通过硅胶柱层析纯化。运用质谱(MS)、核磁氢谱(¹H NMR)进行结构鉴定。

1.4 细胞毒性实验

采用 MTT 法^[9]检测 TPP-DOX 的体外抗肿瘤活性。分别将 MDA-MB-231/ADR 细胞、KB 细胞和 A549 细胞接种于 96 孔板中(接种密度为 1×10⁴ 个/孔),培养至对数生长期,吸弃培养液,向培养板中分别加入含有不同药物浓度的无血清培养基(不含药物的培养液为空白组),孵育 48 h 后,每孔加入 MTT(5 mg/mL)20 μL,继续孵育 4 h;孵育结束后弃去上清液,每孔加入 150 μL 的 DMSO 溶解培养板中的结晶紫沉淀,酶标仪于 490 nm 下检测吸光度值。

1.5 TPP-DOX 在肿瘤细胞内的分布实验

将 MDA-MB-231/ADR 细胞和 A549 细胞于孵箱中培养,

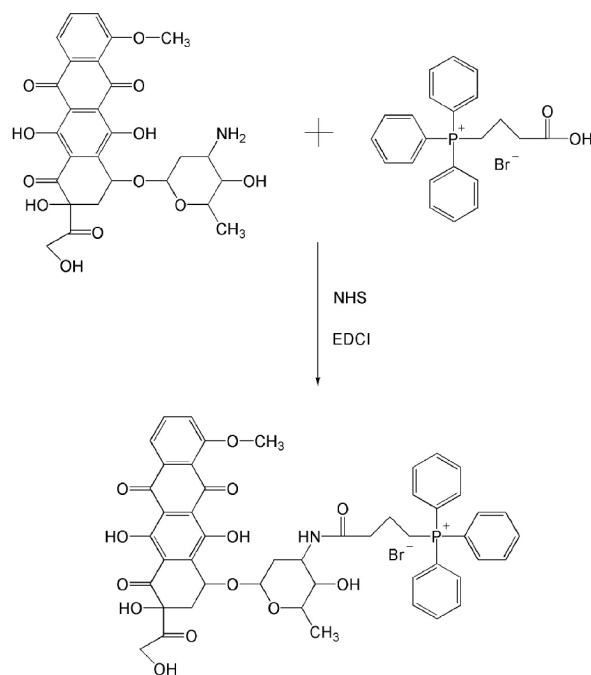


图 1 TPP-DOX 的合成路线

Fig. 1 Synthetic scheme of TPP-DOX

长满后,接种于放置有盖玻片的 24 孔板中(密度为 1×10⁴/mL,体积为 500 μL),孵育 24 h 后弃去培养液,分别加入 500 μL 的 DOX 以及 TPP-DOX(DOX 浓度均为 2 mol/L)。37℃ 孵育 4 h 后弃去培养液,PBS 震荡清洗 3 次,每次 5 min,用线粒体探针 Mito Track green 染色,15 min 后吸弃染料,用 PBS 震荡清洗 3 次;然后加入 50 μL 500 ng/mL 的 DAPI 染色,5 min 后吸弃 DAPI 染料,用 PBS 震荡清洗 3 次;最后用 50 μL 4% 多聚甲醛固定 10 min 后,吸弃固定液,甘油封片,激光共聚焦显微镜下观察。

2 结果

2.1 TPP-DOX 的结构表征

TPP-DOX 为红色固体,其质谱如图 2 所示,TPP-DOX 的准分子离子峰[M+H]⁺ 为 875。核磁图谱如图 3 所示,7.97 (m, 1H) H3, 7.63 (m, 15H) 为苯环氢化学位移,5.46 (s, 1H) 为酰胺键氢化学位移,其他氢的化学位移分别为 5.32 (s, 1H) H1', 4.00 (s,

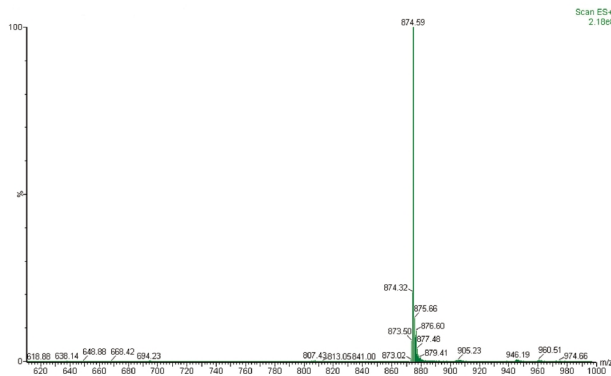


图 2 TPP-DOX 的质谱图

Fig. 2 The mass spectrum of TPP-DOX conjugate

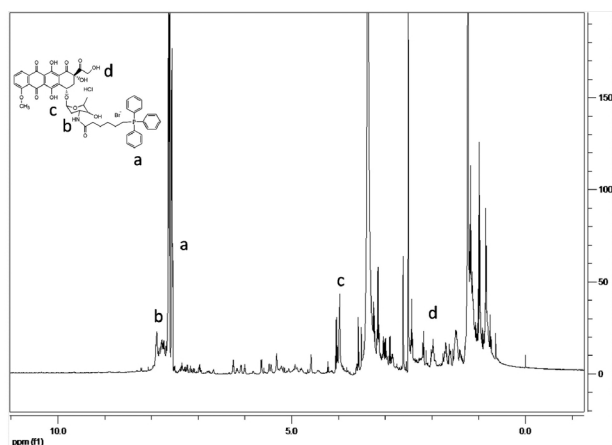


图3 TPP-DOX 的核磁氢谱图

Fig. 3 ^1H NMR spectrum of the TPP-DOX conjugate

3H) OCH₃, 3.55(m, 1H) H_{4'}, 3.16(dd, 1H) H₁₀, 2.16(m, 1H) H_{3'}, 1.72(m, 2H) H_{2'}, 1.25(d, 3H) CH₃, 3.35 (m, 2H) H₃, 2.49 (m, 2H) H₁, 2.01(m, 2H)。

2.2 细胞毒性实验

DOX 和 TPP-DOX 对 MDA-MB-231/ADR 细胞、KB 细胞以及 A549 细胞的毒性如图 4 所示, DOX 和 TPP-DOX 能够剂量依赖性地抑制肿瘤细胞增殖。DOX 对 KB 细胞以及 A549 细胞的毒性均高于 TPP-DOX。但是 DOX 对 MDA-MB-231/ADR 细胞的毒性很小, TPP-DOX 对 MDA-MB-231/ADR 细胞的毒性明显高于 DOX。

2.3 TPP-DOX 在肿瘤细胞内的分布

DOX 通过嵌入细胞核 DNA 从而抑制肿瘤细胞的增殖, 因此进入细胞核的阿霉素的量决定其抗肿瘤活性的强弱。如图 5 所示, 当 DOX 与 A549 细胞一起孵育时, DOX 蓄积于肿瘤细胞

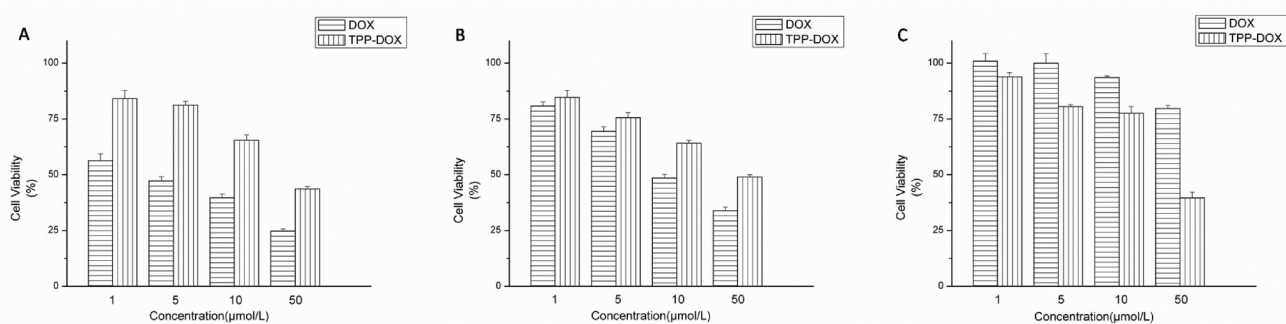


图4 阿霉素和 TPP-DOX 对 KB 细胞(A)、A549 (B)和 MDA-MB-231/ADR 细胞 (C) 的细胞毒性, 细胞孵育 48 h

Fig. 4 The cytotoxicity of DOX and TPP-DOX on KB cells (A), A549 cells (B) and MDA-MB-231/ADR cells (C) after 48 h of incubation

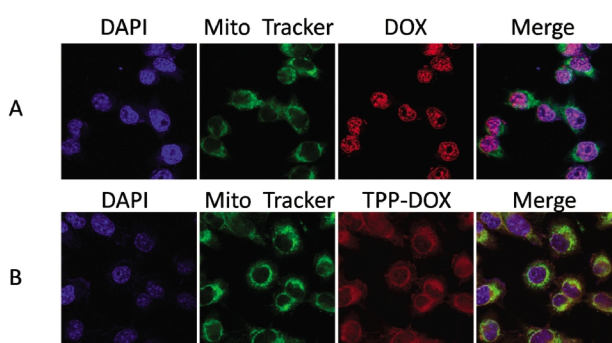


图5 A549 细胞的激光共聚焦扫描图。阿霉素(A)和 TPP-DOX(B) 分别与 A549 细胞在 37 °C 孵育 4 h。阿霉素浓度 2 μmol/L。黄色区域显示的为线粒体(绿色)中的阿霉素(红色)。粉红色区域显示的为细胞核(蓝色)中阿霉素(红色)(60×)

Fig. 5 Confocal laser scanning microscopy image of A549 cells treated with DOX (A) and TPP-DOX (B) at 37 °C for 4 h. The DOX concentration was 2 μmol/L. The yellow color shows the localization of DOX (red) in mitochondria (green). The pink region shows the localization of DOX (red) in the nucleus (blue)(60×)

细胞核中, 因此 DOX 对 A549 细胞显示出明显的细胞毒性。然而, 当 DOX 与 MDA-MB-231/ADR 细胞共同孵育时, 只有少量 DOX 能够进入细胞核, 大部分 DOX 被肿瘤细胞外排出细胞, 因此 DOX 对 MDA-MB-231/ADR 细胞的细胞毒性很小。当

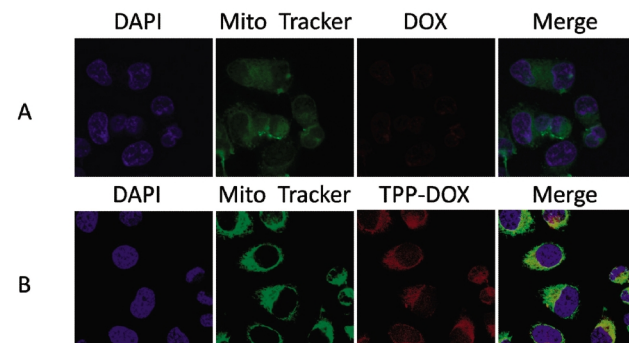


图6 MDA-MB-231/ADR 细胞激光共聚焦扫描图。阿霉素(A)和 TPP-DOX(B) 分别与 MDA-MB-231/ADR 细胞在 37 °C 孵育 4 h。阿霉素浓度 2 μmol/L。黄色区域显示的为线粒体(绿色)中的阿霉素(红色)。粉红色区域显示的为细胞核(蓝色)中阿霉素(红色)(60×)

Fig. 6 Confocal laser scanning microscopy image of MDA-MB-231/ADR cell treated with DOX (A) and TPP-DOX (B) at 37 °C for 4 h. The DOX concentration was 2 μmol/L. The yellow color shows the localization of DOX (red) in mitochondria (green). The pink region shows the localization of DOX (red) in the nucleus (blue)(60×)

MDA-MB-231/ADR 细胞与 TPP-DOX 共同孵育时, 如图 6 所示, 可以明显看到大量 TPP-DOX 蓄积于肿瘤细胞线粒体中, 还有部分分布于细胞核中, 因此提高了对耐药肿瘤细胞的杀伤力。

3 讨论

肿瘤细胞产生多药耐药(MDR)是肿瘤化疗失败的主要原因。肿瘤细胞产生多药耐药性后,表现为对化疗药物不敏感,IC50 值显著增高,且不同类型抗肿瘤药物之间具有交叉耐药性。MDR 发生的机制非常复杂,可能与 MDR 相关基因产物的过度表达,DNA 修复功能增强,抗凋亡活性提高,谷胱甘肽 S 转移酶、蛋白激酶 C 活性以及谷胱甘肽含量增高等机制有关^[9-12]。

线粒体中存在一些细胞凋亡的相关因子,如细胞色素 C、caspase 前体、凋亡诱导因子等。阿霉素能够刺激肿瘤细胞线粒体,增加凋亡蛋白的表达。细胞凋亡是由凋亡蛋白和抗凋亡蛋白的比例决定,凋亡蛋白和抗凋亡蛋白比例的增加能够破坏线粒体膜的完整性,导致细胞色素从线粒体中释放,从而活化 caspase-3,最终诱导肿瘤细胞凋亡^[13-17]。

多数肿瘤细胞较正常细胞有较高的线粒体膜电位^[18],因此亲脂阳离子已被设计成线粒体靶向递药系统的配体,将亲脂阳离子与抗癌药物相连接,达到定向破坏肿瘤细胞线粒体功能的作用。一些生物活性分子包括抗氧化剂与 TPP 有机结合而被选择性地递送到线粒体。例如,TPP 与维生素 E 的连接物能够增加维生素 E 在线粒体的蓄积量,相比于维生素 E,TPP-维生素 E 连接物可以更有效地保护线粒体免受氧化损伤^[19]。此外,一种 TPP 泛醌衍生物线粒体靶向 MitoQ,被广泛使用以防治与氧化损伤及氧化应激相关的疾病。MitoQ 在线粒体的蓄积量是无靶向辅酶 Q10 的 100 多倍并且具有明显疗效^[20]。

本研究利用线粒体跨膜电位较高的特性,通过亲脂性阳离子 TPP 与 DOX 有机结合,合成了新型 DOX 衍生物,使 DOX 在线粒体发挥作用。结果显示 TPP-DOX 能够分布于不同肿瘤细胞的线粒体和细胞核中,避免了 DOX 被耐药肿瘤细胞外排,对耐药肿瘤细胞毒性明显高于 DOX。TPP-DOX 的体内抗肿瘤作用还需进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Gu Z J, Wang M, Fang Q Y, et al. Inhibition of MCF-7/ADR cells by DOX-loaded pluronic-attached PAMAM dendrimer conjugate [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2014, 49(8): 1188-1193
- [2] Zhou Z, Wan L, Han Y, et al. ABCB1-overexpressing MG63/DOX cell xenograft model: maintain the MDR phenotype in vivo [J]. *Pharm Biol*, 2013, 51(8): 968-973
- [3] Wang K, Zhang X, Zhang L, et al. Development of biodegradable polymeric implants of RGD-modified PEG-PAMAM-DOX conjugates for long-term intratumoral release [J]. *Drug Deliv*, 2014 [Epub ahead of print]
- [4] Guerry A, Cottaz S, Fleury E, et al. Redox-stimuli responsive micelles from DOX-encapsulating polycaprolactone-g-chitosan oligosaccharide [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 112(2): 746-752
- [5] D'Souza G G, Wagle M A, Saxena V, et al. Approaches for targeting mitochondria in cancer therapy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011,

1807(6): 689-696

- [6] Ubah O C, Wallace H M. Cancer therapy: Targeting mitochondria and other sub-cellular organelles [J]. *Curr Pharm Des*, 2014, 20 (2): 201-222
- [7] Chamberlain G R, Tulumello D V, Kelley S O. Targeted delivery of doxorubicin to mitochondria [J]. *ACS Chem Biol*, 2013, 8 (7): 1389-1395
- [8] Hockenbery D M. Targeting mitochondria for cancer therapy [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2010, 51(5): 476-489
- [9] Rocha G G, Oliveira R R, Kaplan M A, et al. 3beta-Acetyl tormentic acid reverts MRP1/ABCC1 mediated cancer resistance through modulation of intracellular levels of GSH and inhibition of GST activity [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 741(2): 140-149
- [10] Zheng W, Cao C, Liu Y, et al. Multifunctional polyamidoamine-modified selenium nanoparticles dual-delivering siRNA and cisplatin to A549/DDP cells for reversal multidrug resistance [J]. *Acta Biomater*, 2015, 11:368-380[Epub ahead of print]
- [11] Duan Z, Zhang J, Ye S, et al. A-770041 reverses paclitaxel and doxorubicin resistance in osteosarcoma cells [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14(1): 681
- [12] Sun L, Liu L, Liu X, et al. MGr1-Ag/37LRP induces cell adhesion-mediated drug resistance through FAK/PI3K and MAPK pathway in gastric cancer [J]. *Cancer Sci*, 2014, 105(6): 651-659
- [13] Errico A. Targeted therapy: Targeting mitochondria in pancreatic cancer [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2014, 11(10): 562-563
- [14] Fulda S, Galluzzi L, Kroemer G. Targeting mitochondria for cancer therapy [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9(6): 447-464
- [15] Wang Z, Bao H, Ge Y, et al. Pharmacological targeting of GSK3beta confers protection against podocytopathy and proteinuria via desensitizing mitochondrial permeability transition [J]. *Br J Pharmacol*, 2014[Epub ahead of print]
- [16] Odeh A M, Craik J D, Ezzeddine R, et al. Targeting Mitochondria by Zn (II)N-Alkylpyridylporphyrins: The Impact of Compound Sub-Mitochondrial Partition on Cell Respiration and Overall Photodynamic Efficacy [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e108238
- [17] Sims C R, Macmillan-Crow L A, Mayeux P R. Targeting mitochondrial oxidants may facilitate recovery of renal function during infant sepsis [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2014, 96(6):662-664[Epub ahead of print]
- [18] Yamada Y, Harashima H. A method for screening mitochondrial fusogenic envelopes for use in mitochondrial drug delivery [M]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1141: 57-66
- [19] Smith R A, Porteous C M, Coulter C V, et al. Selective targeting of an antioxidant to mitochondria [J]. *Eur J Biochem*, 1999, 263 (3): 709-716
- [20] Armstrong J S. Mitochondrial medicine: pharmacological targeting of mitochondria in disease [J]. *Br J Pharmacol*, 2007, 151 (8): 1154-1165