

• 基础研究 •

面包酵母 β -葡聚糖颗粒负载甲氨蝶呤抗急性单核细胞白血病的体外研究*陈妍灵[#], 孙莹[#], 罗子怡, 张冬冬, 江宏强, 灿灿, 谭御心, 周芙玲[△], 许小娟[△]

430071 武汉, 武汉大学中南医院 血液内科(陈妍灵、罗子怡、江宏强、灿灿、谭御心、周芙玲); 430072 武汉, 武汉大学 化学与分子科学学院(孙莹、许小娟); 441000 湖北 襄阳, 湖北医药学院附属襄阳市第一人民医院 肿瘤科(张冬冬)

[摘要] 目的: 探讨面包酵母 β -葡聚糖颗粒负载甲氨蝶呤缓释药物(以下简称:BBG/MTX/Alg)抗急性髓系白血病 M5 型(acute myeloid leukemia-M5, AML-M5)的效果。方法:采用溶解-沉淀法制备 BBG/MTX/Alg, 利用紫外分光光度计测定载药量, 通过透射电子显微镜进行形貌表征, X 射线粉末衍射反映负载情况, 并在体外模拟胃肠道的释放条件测定缓释效率。CCK-8 法检测药物细胞毒性及安全性。采用流式细胞仪检测各组凋亡和周期的比例。结果:MTX 成功载入 BBG 空腔, 负载量为 7.8%, 2 h 时胃液模拟液中 MTX 释放率小于 15%, 24 h 时在肠液模拟液释放率约 95%。与生理盐水对照组相比, BBG/MTX/Alg 能有效抑制 AML-M5 细胞系增殖且具有时间及浓度依赖性, 流式细胞术结果表明其可显著促进 AML-M5 细胞的凋亡($P < 0.001$), 且阻滞细胞周期于 G0/G1 期($P < 0.0001$)。与等量游离 MTX 相比, BBG/MTX/Alg 处理 24 h 后对正常细胞系毒性较小($P < 0.05$)。结论:BBG 可以作为 MTX 的有效缓释载体, BBG/MTX/Alg 可对 AML-M5 细胞起到抑制增殖、诱导凋亡及阻滞细胞周期的作用, 并且对正常细胞系毒性较小, 提示其或可作为有效的抗 AML-M5 临床口服药物缓释剂。

[关键词] 甲氨蝶呤; 面包酵母 β -葡聚糖; 急性单核细胞白血病

[中图分类号] R733.71; R73-36+1 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1674-0904.2021.06.001

引文格式: Chen YL, Sun Y, Luo ZY, et al. In vitro study on BBG/MTX/Alg against acute monocytic leukemia[J]. J Cancer Control Treat, 2021, 34(6): 475-484. [陈妍灵, 孙莹, 罗子怡, 等. 面包酵母 β -葡聚糖颗粒负载甲氨蝶呤抗急性单核细胞白血病的体外研究[J]. 肿瘤预防与治疗, 2021, 34(6): 475-484.]

In Vitro Study on BBG/MTX/Alg against Acute Monocytic Leukemia

Chen Yanling[#], Sun Ying[#], Luo Ziyi, Zhang Dongdong, Jiang Hongqiang, Can Can, Tan Yuxin, Zhou Fuling, Xu Xiaojuan[#]Contributed equally

Department of Hematology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China (Chen Yanling, Luo Ziyi, Jiang Hongqiang, Can Can, Tan Yuxin, Zhou Fuling); College of Chemistry and Molecular Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, Hubei, China (Sun Ying, Xu Xiaojuan); Department of Oncology, Xiangyang No. 1 People's Hospital & Affiliated Hospital of Hubei University of Medicine, Xiangyang 441000, Hubei, China (Zhang Dongdong)

Corresponding author: Zhou Fuling, E-mail: zhoufuling@whu.edu.cn; Xu Xiaojuan, E-mail: xuxj@whu.edu.cn

This study was supported by National Natural Science Foundation of China (No. 21875167, No. 81770179).

[收稿日期] 2021-01-03 **[修回日期]** 2021-05-24

[基金项目] * 国家自然科学基金(编号:21875167, 81770179)

[#]共同第一作者

[通讯作者] [△]周芙玲, E-mail: zhoufuling@whu.edu.cn; 许小娟, E-mail: xuxj@whu.edu.cn

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of BBG/MTX/Alg[methotrexate (MTX) carried by baker's yeast-derived β -glucan (BBG) embedded in alginate gel crossed by Ca^{2+} (Alg), hereinafter referred to as BBG/MTX/Alg] on

acute myeloid leukemia-M5 (AML-M5). **Methods:** Dissolving-precipitating method was used to prepare BBG/MTX/Alg. The load of MTX was determined by ultraviolet-visible spectrophotometry. Particle morphology was observed by transmission electron microscope. X-ray diffraction was used to observe the encapsulation of MTX. The efficiency of BBG/MTX/Alg release was measured by releasing MTX in vitro simulated gastrointestinal tract. The cytotoxicity and safety of drugs were measured by CCK-8. Percentages of cells in different cycles and apoptotic cells were measured by flow cytometry. **Results:** 7.8% of MTX was loaded into BBG cavities successfully. The release rate of MTX in simulated gastric fluid was less than 15% at 2 h, and was about 95% in simulated intestinal fluid at 24 h. Compared with the control group (saline), BBG/MTX/Alg inhibited the proliferation of AML-M5 cells effectively in a time- and dose-dependent manner. Flow cytometry results showed that it significantly promoted the apoptosis of AML-M5 cells ($P < 0.001$), and arrested cell cycle at G0/G1 phase ($P < 0.0001$). **Conclusion:** BBG could be used as an effective sustained-release carrier of MTX. BBG/MTX/Alg could inhibit proliferation, induce apoptosis, and block cell cycle of AML-M5 cells, which has low toxicity to normal cell lines, indicating that it could be used as an effective sustained-release oral anti-AML-M5 agent.

[Key words] Methotrexate; Baker's yeast-derived β -glucan; Acute monocytic leukemia

急性单核细胞白血病(acute monocytic leukemia, AMoL)是一类血液系统的恶性肿瘤,是急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML) FAB 分型中的 M5 型,占儿童 AML 的 20%,在婴儿 AML 中占比甚至超过一半^[1]。临床上,该病常表现为白细胞增多、髓外浸润和凝血功能异常^[2]。该病治疗以药物治疗、骨髓移植以及支持治疗为主,但易耐药复发,患者生存率低下^[3]。甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)为二氢叶酸还原酶抑制剂,化学结构与叶酸相似,是一种抗代谢和抗叶酸药物,可干扰 DNA、RNA 和蛋白质的形成。MTX 广泛应用于治疗实体瘤、血液系恶性肿瘤和自身免疫疾病,如乳腺癌、白血病、类风湿关节炎等^[4-5]。然而 MTX 在水中的不溶性和低生物利用度限制了其临床应用^[6]。MTX 对热和光敏感,暴露后易分解,在 20℃ 蒸馏水中的溶解度只有 0.01 mg/mL,并且是 pH 依赖性的,易溶于稀碱,微溶于稀盐酸,合适 pH 值为 6.6 ~ 8.2^[7]。肾脏能在短时间内消除大量的 MTX,血浆半衰期只有 4.5 ~ 10 h^[8]。由于其半衰期短且消除率高,临床上需要高剂量给药,但低水溶性会导致其生物利用度低,更重要的是高剂量的 MTX 导致许多严重的毒性作用,例如骨髓抑制、肝毒性、肾毒性、神经毒性和肺毒性^[9-10]。为了降低毒性并提高治疗效果,需要开发新型 MTX 缓释递送系统。本次研究制备了以面包酵母 β -葡聚糖(baker's yeast-derived β -glucan, BBG)为载体、以生物相容性海藻酸钙凝胶(alginate gel crossed by Ca^{2+} , Alg)进行封装的 MTX 缓释体系(以下简称:BBG/MTX/Alg),并对结构进行表征,初步探究了其体外抗急性单核细胞白血病的毒性及安全性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

面包酵母多糖购于东方酵母有限公司(日本,东京),由神戸大学 Hishoshi Ashida 教授友情提供, β -葡聚糖含量约为 75%;氢氧化钠(NaOH)、盐酸(HCl)、氯化钙(CaCl_2)、二甲亚砜(DMSO)等化学试剂购自国药集团,由申试化工提供;MTX 购自 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO);海藻酸钠(32 ~ 250 kDa)购自上海源叶生物技术有限公司,并测定其在 25℃ 下 0.1 M NaCl 水溶液中的特性粘度($[\eta]$)为 12.562 dL/g;胎牛血清,胰蛋白酶,购自 Gibco;RP-MI-1640 培养基,DMEM 培养基,IMDM 培养基,PBS 缓冲液,购自 Hyclone;双抗(青霉素和链霉素),购自 Biosharp;CCK-8 试剂盒,购自日本同仁;Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒,细胞周期试剂盒,购自联科生物。

1.2 细胞系及培养

人急性单核细胞白血病细胞株 THP-1 和 MV-4-11 购自中国科学院(上海)细胞库。正常细胞株小鼠胚胎成骨细胞 MC3T3-E1、人成骨细胞 hFOB1.19 由武汉大学中南医院科学研究中心保存。THP-1 培养于含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 RP-MI-1640 培养基;MV-4-11 培养于含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 IMDM 培养基;MC3T3-E1、hFOB1.19 培养于含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基。以上细胞均于 37℃, 5% CO_2 条件下培养。

1.3 主要仪器与设备

紫外分光光度计, Shimadzu UV-2600, 日本;X 射线粉末衍射(X-ray diffraction, XRD)仪, Rigaku Miniflex600, 日本;透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM), JEM-2100F, 日本;细胞计数仪, Thermo, 德国;恒温细胞培养箱, Heraeus, 德

国;超净台,苏州苏净;酶标仪,UNICO,上海;流式细胞仪,BD,美国;电子分析天平,Sartorius,德国。

1.4 方法

1.4.1 BBG/MTX/Alg 的制备 基于 MTX 易溶于稀碱,微溶于稀盐酸的特性,采用溶解-沉淀法^[11]制备 BBG/MTX/Alg,具体步骤为:将 250 mg MTX 粉末分散在 5 mL 去离子水中,添加 3.5 mL 浓度为 0.25 M 的 NaOH 溶液,从而得到澄清的 MTX · 2Na 溶液。然后加入 1 g BBG,持续搅拌 12 h 后离心收集上清。根据上清体积,加入适量 HCl 中和,搅拌 10 min,同时使 BBG 内部 MTX 沉淀。离心收集沉淀,超纯水清洗后冻干。为了进一步将 MTX 固定在 BBG 中,将 BBG/MTX 冻干粉浸泡在 0.5% 的海藻酸钠中并搅拌 6 h。5 000 rpm 离心 10 min,弃上清。将沉淀边添加边搅拌至 50 mL 2% CaCl₂ 溶液中,随后静置 15 min,离心去上清,沉淀用超纯水漂洗后冻干,便得到水凝胶固定包裹在 BBG 中的 MTX (BBG/MTX/Alg)。BBG/MTX/Alg 为黄色粉末,室温避光保存于干燥器中。

1.4.2 TEM 形貌表征 将样品溶于 DMSO,配置成适当浓度,取 5 μ L 溶液滴于碳膜涂覆的铜网上,60℃ 真空烘干 6 h,然后用 TEM 观察形貌。

1.4.3 XRD 通过粉末衍射仪测定 BBG、MTX、BBG/MTX/Alg 的 X 射线衍射光谱,扫描区域设置为 $2\theta = 3^\circ \sim 40^\circ$,步距为 0.02° ,扫描速度为 $2^\circ/\text{min}$ 。

1.4.4 载药量测定 将 BBG/MTX/Alg 溶于 DMSO,并使用紫外分光光度计在 303 nm 处测量其紫外吸收。配置 MTX 溶于 DMSO 的不同浓度标准品,并测定其紫外吸收,得到标准曲线。基于标准曲线得到载入 MTX 的重量,再根据公式载药量 (%) = (载入 MTX 的重量/BBG/MTX/Alg 的总重量) × 100% 计算 MTX 在冻干 BBG/MTX 中的载药量。

1.4.5 体外药物模拟释放 模拟药物体外胃肠道释放条件:胃液 pH 通常位于 1~2 之间^[12],食物或药物停留大约 1~3 h,使用 0.04 M HCl 溶液作为模拟缓冲液,pH 值为 1.2;肠液 pH 值约为 5.5~7.5^[12],使用 0.9% NaCl 缓冲液作为模拟缓冲液,pH 值为 7。称取 5 mg BBG/MTX/Alg 载药颗粒,分散于 1 mL 0.9% NaCl 溶液,置于截留分子量 8~10 kDa 透析管中。将透析管放置于 80 mL 胃液模拟液 (pH1.2 的 HCl 溶液) 中,37℃ 下 70 rpm 模拟释放。在设定时间点取出 1 mL 模拟液,并迅速加入等量新鲜模拟液。使用紫外分光光度计在 303 nm 下测量紫外吸收,并计算 MTX 的累积释放量。2 h 后将透

析管转移至 80 mL 肠液模拟液 (pH7 的 0.9% NaCl 溶液),后期实验步骤同上。模仿药物体外缓冲液释放条件:使用 0.9% NaCl 溶液作为释放介质,测量方法同上。

1.4.6 细胞增殖/毒性实验 (CCK-8 法) 取实验细胞用台盼蓝染色后,使用细胞计数仪计数并测定细胞活力。取 $2 \times 10^4/100 \mu\text{L}$ 每孔的标准均匀铺于 96 孔板中,每个试验孔至少设计三个副孔,培养箱孵育过夜后进行药物处理。根据预实验结果,设定实验组 BBG/MTX/Alg 用生理盐水稀释至终浓度为 50、100、200、400 ng/mL,对照组为等量生理盐水。根据实验设计处理相应时长后,每孔加入 10 μL CCK-8 检测工作液,混合均匀后置于培养箱避光孵育 1~4 h,用酶标仪检测 450 nm 处吸光度值 (OD 值),再根据公式细胞存活率 (%) = (实验孔 OD 值 - 空白对照孔 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白对照孔 OD 值) × 100% 计算细胞存活率。

1.4.7 细胞凋亡检测 (Annexin V-FITC/PI) 取实验细胞 $1 \times 10^6/2 \text{ mL}$ 每孔的标准均匀铺于 6 孔板中,培养箱孵育 6 h 后进行药物处理。根据预实验结果,实验组 BBG/MTX/Alg 终浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$,对照组用等量生理盐水。处理 24 h 后收集细胞,用预冷 PBS 离心洗涤 2 次,用 500 μL 的 $1 \times \text{Binding Buffer}$ 重悬细胞。每管加入 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI,轻柔涡旋混匀后,室温避光孵育 5 min。随后在流式细胞仪上通过 FITC 通道检测 Annexin V-FITC 和通过 PE 通道检测 PI。实验独立重复 3 次。

1.4.8 细胞周期检测 取实验细胞 $1 \times 10^6/2 \text{ mL}$ 每孔的标准均匀铺于 6 孔板中,培养箱孵育 6 h 后进行药物处理。实验组 BBG/MTX/Alg 终浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$,对照组用等量生理盐水。处理 24 h 后收集细胞,用预冷 PBS 离心洗涤 1 次,加入 1 mL DNA Staining Solution 和 10 μL Permeabilization Solution,轻柔涡旋振荡混匀,室温避光孵育 30 min。选择低速上机,流式细胞仪检测处理前后细胞周期变化。实验独立重复 3 次。

1.5 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析,实验数据用均数 ± 标准差呈现。两组数据选用 *t* 检验,多组间分析选用方差分析。 $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。流式分析数据主要应用 CytExpert 2.3 进行分析。XRD 数据采用 Origin 2019b 进行分析。

2 结果

2.1 BBG/MTX/Alg 的制备

按 1.4.1 的步骤,通过重沉淀法将橙黄色小分子药物 MTX 载入到乳白色 BBG 粉末的空腔内,并用 Alg 进一步固定,得到淡黄色 BBG/MTX/Alg 复合药物。BBG、MTX、复合药物 BBG/MTX/Alg 的实物如图 1 所示。

2.2 BBG/MTX/Alg 的表征

2.2.1 TEM 形貌表征 BBG、BBG/MTX/Alg 横截面的 TEM 图像如图 2 所示,呈扁平态,可见 BBG 内部为中空结构,封装 MTX 后,BBG/MTX/Alg 依然保持着 BBG 的形态,但显示出更高的衬度,表明 MTX 成功载入 BBG 空腔并保持 BBG 自身结构不变。

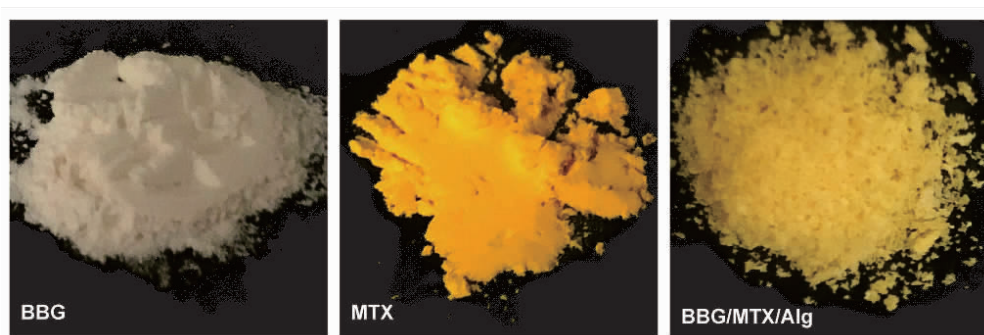


图 1 BBG、MTX 和 BBG/MTX/Alg 的图片

Figure 1. BBG, MTX and BBG/MTX/Alg

BBG: Baker's yeast-derived β -glucan; MTX: Methotrexate; Alg: Alginate gel crossed by Ca^{2+} .

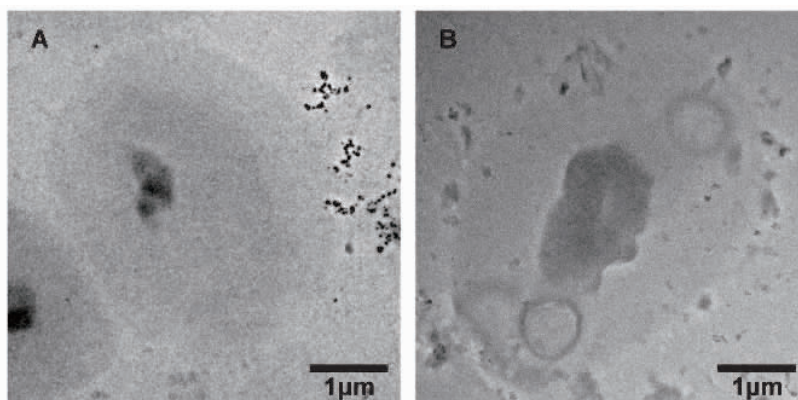


图 2 BBG 和 BBG/MTX/Alg 形貌特征

Figure 2. Morphological Characteristics of BBG and BBG/MTX/Alg

A. The TEM image of BBG; B. The TEM image of BBG/MTX/Alg.

TEM: Transmission electron microscope, other abbreviations as indicated in Figure 1.

2.2.2 XRD 图谱 为了进一步进行物相分析, BBG、MTX、BBG/MTX/Alg 行 XRD,衍射光谱如图 3 所示。MTX 在 9.3° 、 13.7° 、 14.1° 、 19.6° 、 27.8° 处显示出特征性晶体峰,与 Agrawal^[13] 等报导的 MTX 的 XRD 图谱一致。BBG 与 BBG/MTX/Alg 的 XRD 图谱在 6.4° 处均表现出 Hisamatsu 等^[14] 曾报道的三螺旋酵母 β -葡聚糖有序排列晶体峰,说明 BBG 依然保持着原有的结构和部分结晶。但 BBG/MTX/Alg 中未见 MTX 结晶峰,表明 MTX 被封装在 BBG 颗粒内,且呈非晶态,可能是由于 MTX 在重沉淀的过程

中来不及结晶。

2.2.3 载药量及体外药物模拟释放 通过紫外分光光度计测得 BBG/MTX/Alg 中 MTX 的负载量约 7.8%。其体外药物释放效率如图 4 所示,在 2 h 的胃液模拟液中 MTX 的累积释放率小于 15%,能保证后续肠道中 BBG/MTX/Alg 负载的 MTX 具有足够的浓度。另一方面,pH 值对药物释放速率有明显影响,当 0~2 h 处于胃液模拟液中时,药物释放速率明显较生理盐水中快,并对后续释放有促进作用,这可能是因为海藻酸盐凝胶在酸性环境下具有更强

的溶胀特性^[15]。但 BBG/MTX/Alg 中包裹的 MTX 在 24 h 释放率均达到 95% 左右,这有利于体外实验数据为体内实验提供参考。

2.3 各组细胞增殖抑制率

2.3.1 BBG/MTX/Alg 对 AML-M5 增殖的影响 不

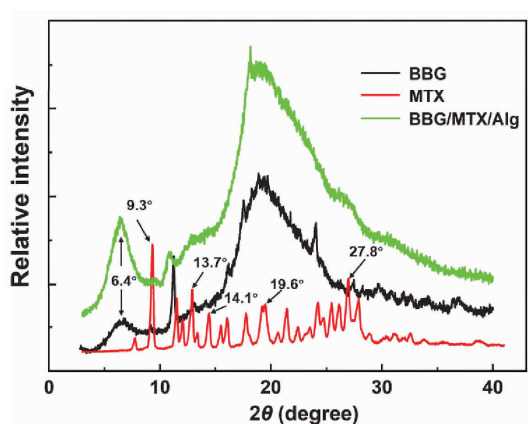


图3 BBG、MTX 和 BBG/MTX/Alg X 射线粉末衍射光谱
Figure 3. XRD Spectra of BBG, MTX and BBG/MTX/Alg
XRD: X-ray diffraction.

同浓度不同时间 BBG/MTX/Alg 处理 THP-1 和 MV-4-11 后结果如图 5 所示,可见与等量生理盐水对照组即药物浓度为 0 相比,BBG/MTX/Alg 能有效抑制 AML-M5 细胞的增殖,且细胞增殖抑制率呈浓度及时间依赖性。

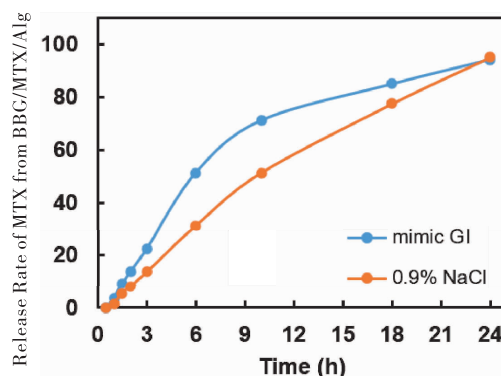


图4 BBG/MTX/Alg 模拟在胃肠道及 0.9% NaCl 中的 MTX 释放
Figure 4. Release of MTX in simulated GI and 0.9% NaCl
GI: Gastrointestinal tract; NaCl: Sodium chloride.

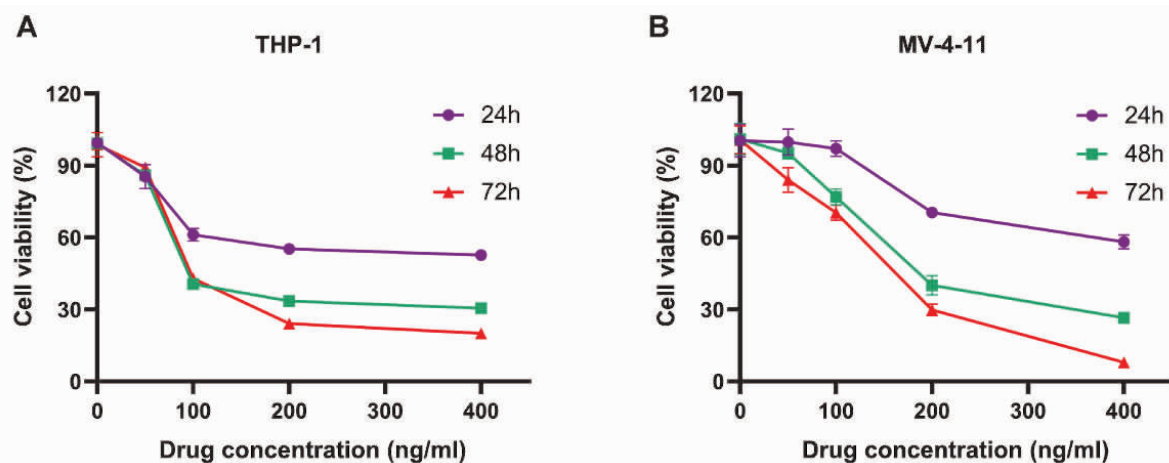


图5 BBG/MTX/Alg 对 THP-1 和 MV-4-11 增殖的影响
Figure 5. Effect of BBG/MTX/Alg on the Proliferation of THP-1 and MV-4-11 Cells

A. THP-1 cells were treated with different concentrations of BBG/MTX/Alg (0 ~ 400 ng/mL) for 24 h, 48 h and 72 h; B. MV-4-11 cells were treated with different concentrations of BBG/MTX/Alg (0 ~ 400 ng/mL) for 24 h, 48 h and 72 h. The viability of cells was measured by CCK-8; each value in the figure represents the mean value calculated by data from three independent experiments.

2.3.2 BBG/MTX/Alg 对正常细胞的毒性 为了确定药物的安全性,我们进一步检测了 BBG/MTX/Alg 对正常细胞的细胞毒性。根据 Vis-UV 光谱法测得的 BBG/MTX/Alg 中 MTX 的载药量比例,以等量游离 MTX 作为对照组,不同浓度 BBG/MTX/Alg 作为

实验组处理正常细胞系 24 h,结果如图 6。可见在 200 ng/mL 以下未见 BBG/MTX/Alg 细胞毒性($P < 0.05$),而在较高的浓度,BBG/MTX/Alg 对 MC3T3-E1 和 hFOB1.19 的细胞毒性比等量游离 MTX 的毒性小。

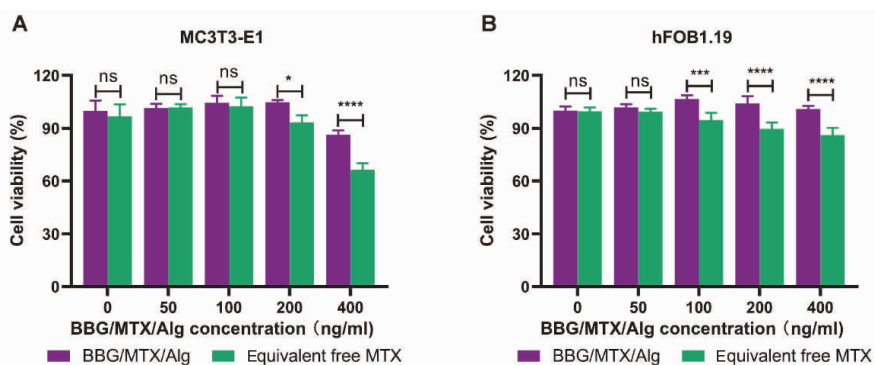


图6 BBG/MTX/Alg 和 MTX 对正常细胞的毒性

Figure 6. Cytotoxicity of BBG/MTX/Alg and MTX to Normal Cells

A. MC3T3-E1 cells were treated with different concentrations of BBG/MTX/Alg (0 ~ 400 ng/mL), and with equivalent free MTX for 24 h; B. hFOB1.19 cells were treated with different concentrations of BBG/MTX/Alg (0 ~ 400 ng/mL), and with equivalent free MTX for 24 h.

The viability of cells was measured by CCK-8; each value in the figure represents the mean value calculated by data from three independent experiments; ns: No significance, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

2.4 BBG/MTX/Alg 对 THP-1 和 MV-4-11 凋亡的

BBG/MTX/Alg 处理后, THP-1 及 MV-4-11 细胞凋亡率显著升高。与 THP-1 对照组 ($7.27\% \pm 3.29\%$) 相比, $1 \mu\text{g/mL}$ BBG/MTX/Alg 处理 THP-1 24 h 时, 细胞凋亡率为 $34.22\% \pm 3.77\%$ 。与 MV-4-

11 对照组 ($11.63\% \pm 4.72\%$) 相比, $1 \mu\text{g/mL}$ BBG/MTX/Alg 处理 MV-4-11 24 h 时, 细胞凋亡率为 $46.1\% \pm 2.10\%$ 。差异均具有统计学意义 ($P < 0.001$) (图 7、8)。

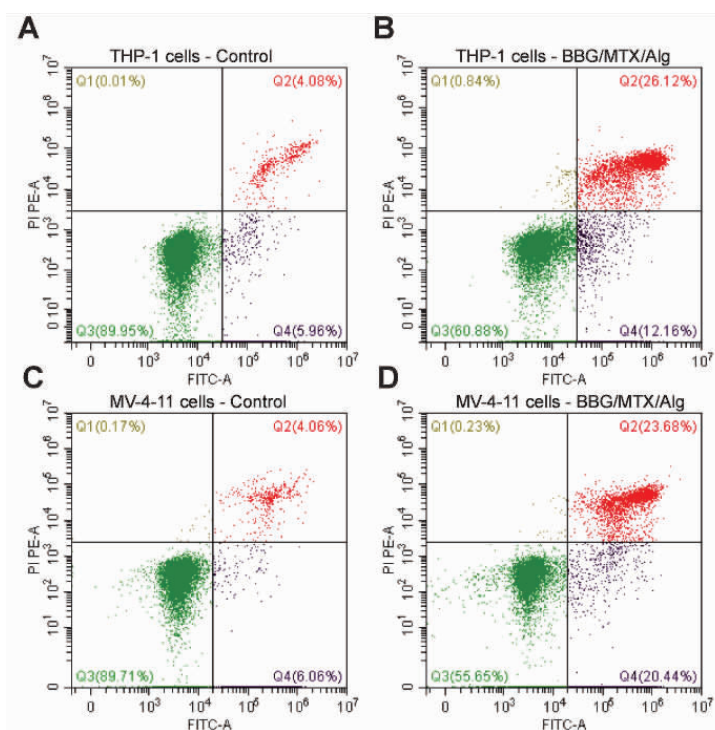


图7 BBG/MTX/Alg 促进 THP-1 和 MV-4-11 凋亡

Figure 7. Apoptosis of THP-1 and MV-4-11 Promoted by BBG/MTX/Alg

A. THP-1 cells were treated with saline for 24 h; B. THP-1 cells were treated with $1 \mu\text{g/mL}$ BBG/MTX/Alg for 24 h; C. MV-4-11 cells were treated with saline for 24 h; D. MV-4-11 cells were treated with $1 \mu\text{g/mL}$ BBG/MTX/Alg for 24 h.

The apoptosis of cells was tested by flow cytometry.

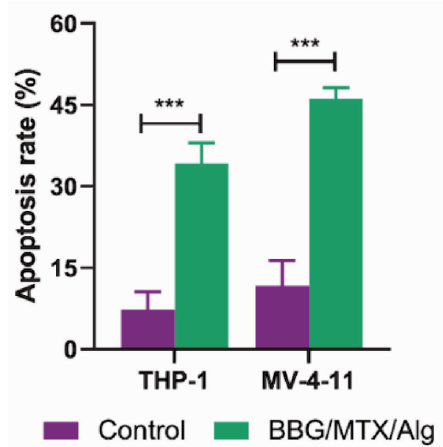


图 8 BBG/MTX/Alg 作用后 THP-1 和 MV-4-11 的凋亡率

Figure 8. Apoptosis Rates of THP-1 and MV-4-11

THP-1 and MV-4-11 were treated with 1 μ g/mL BBG/MTX/Alg for 24 h.

*** $P < 0.001$, compared with the control group.

2.5 BBG/MTX/Alg 对 THP-1、MV-4-11 周期的影

细胞周期流式检测结果如图 9、10 所示,与对照组相比,BBG/MTX/Alg 处理后,THP-1 及 MV-4-11

处于 G0/G1 期的细胞比例均明显上升,且差异具有统计学意义 ($P < 0.0001$),这提示 BBG/MTX/Alg 处理后阻滞细胞于 G0/G1 期。

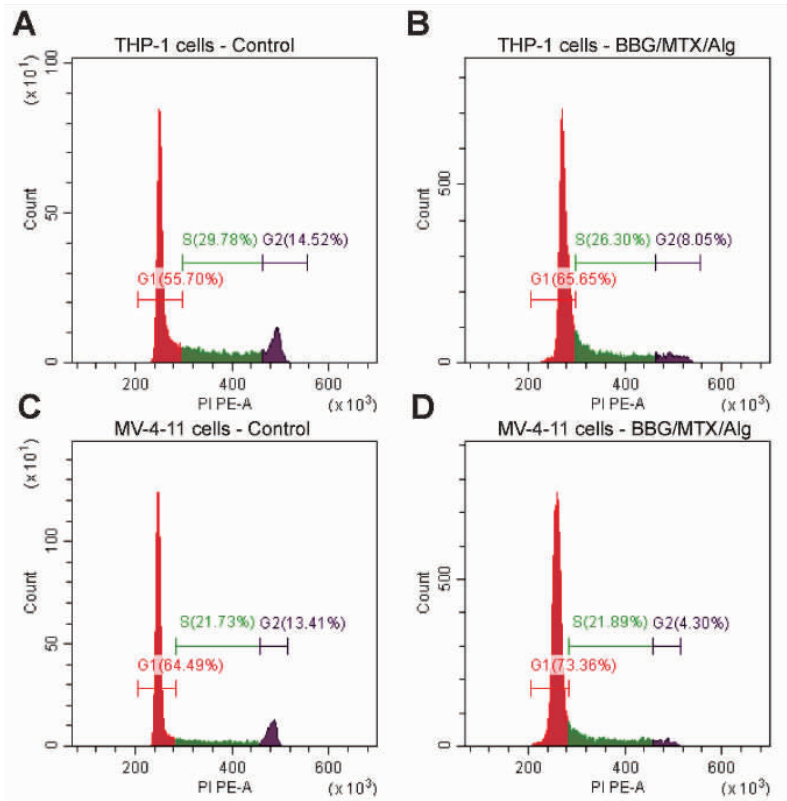


图 9 BBG/MTX/Alg 对 THP-1 和 MV-4-11 细胞周期的影响

Figure 9. Effects of BBG/MTX/Alg on Cycles of THP-1 and MV-4-11 Cells

A. THP-1 cells were treated with saline for 24 h; B. THP-1 cells were treated with 1 μ g/mL BBG/MTX/Alg for 24 h; C. MV-4-11 cells were treated with saline for 24 h; D. MV-4-11 cells were treated with 1 μ g/mL BBG/MTX/Alg for 24 h.

Cell cycle was analyzed by flow cytometry.

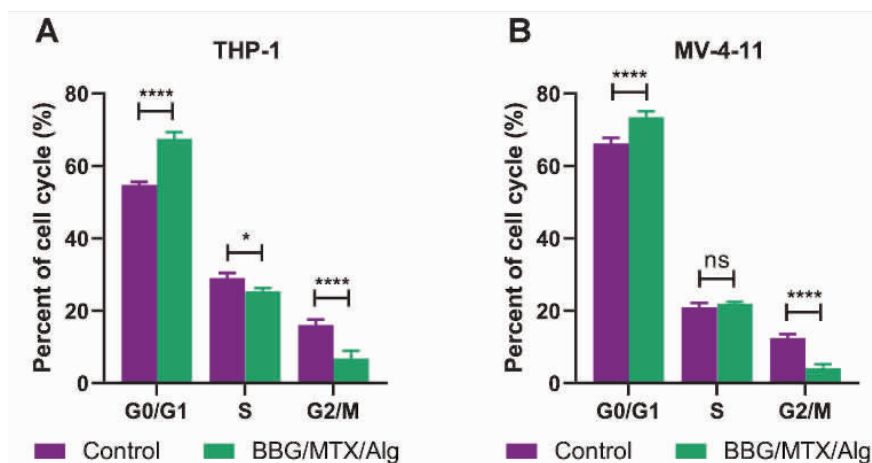


图 10 BBG/MTX/Alg 作用后 THP-1 和 MV-4-11 各周期比例

Figure 10. Percents of Cell Cycle of THP-1 and MV-4-11

A. THP-1 cells were treated with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BBG/MTX/Alg for 24 h; B. MV-4-11 cells were treated with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BBG/MTX/Alg for 24 h.

ns: No significance, * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$.

3 讨论

白血病是血液系统常见的恶性肿瘤,占 2020 年全球癌症新发人数的 2.5% 和死亡人数的 3.1%^[16]。AML-M5 是最常见的急性白血病之一,与其他 AML 亚型相比,混合系白血病基因 (mixed lineage leukemia, MLL) 重排和不良预后基因更多是其遗传学特点^[17]。AML-M5 发病急,化疗敏感性差,化疗后复发率高。诊断为 AML-M5 的老年患者由于治疗引发的不良反应导致差的预后,其平均总生存期仅 5 ~ 10 个月^[18]。因此,需要寻找毒性更小且更有效的治疗方式来应对 AML-M5。其中,口服缓释制剂因释药缓慢,血药浓度“峰谷”波动小,可避免超过浓度范围的毒副作用,又能维持疗效,具有给药方便、用药次数少、毒性小、药效高、开发周期短等优势,引起了越来越多关注。

MTX 作为常用叶酸拮抗剂,是治疗白血病及其他癌症的有效药物,它可以竞争性地抑制叶酸合成的关键酶,进一步阻止嘌呤和嘧啶地合成,从而抑制肿瘤细胞地生长^[19]。MTX 价格便宜,最方便的给药途径是口服,然而其渗透性低溶解性差,在胃肠道中的吸收主要通过质子依赖的主动吸收,且具有浓度依赖性,因此口服 MTX 生物利用度较低。MTX 缺少靶向性,在肠道部位对正常肠道上皮细胞也有伤害作用,因此副作用较大,在临床应用上受限。目前已经报道了许多类型的新型 MTX 缓释递送系统,例如纳米颗粒、脂质体、聚合物胶束、微球等^[20-21],

能够实现 MTX 的缓慢释放和靶向治疗,取得较好的疾病治疗效果,但仍存在一些问题,比如释放时长远大于胃肠道停留时间或使用的交联剂对胃肠道产生毒性。

近年来,由于天然多糖良好的生物活性及生物相容性,其作为药物缓释载体的功能引起广泛关注^[22]。酵母多糖作为美国食品药品监督管理局认定的安全食品成分,是酵母细胞壁的主要成分,为水不溶性多糖,其主要成分为 β -1,3-D-葡聚糖,含有少量 β -1,6-D-葡聚糖。采取不破坏酵母细胞壁结构的温和化学提取方法,可以得到保持酵母细胞壁结构形态的酵母 β -葡聚糖颗粒,呈中空结构,粒径 2 ~ 4 μm ,是药物释放的天然载体^[11,23]。在肠道部位,酵母 β -葡聚糖颗粒能够在肠道部位通过小肠 M 细胞主动吸收的方式进入体内^[24],可促进负载药物在肠道部位的吸收,减少副作用。另外,酵母 β -葡聚糖具有良好的生物活性,课题组前期研究已证明 BBG 具有良好的抗炎活性^[23]。除此之外, β -葡聚糖还具有良好的免疫调节、抗肿瘤活性等^[25],相比于合成高分子药物载体,酵母 β -葡聚糖颗粒作为药物载体具有其内在优势。

MTX 呈弱酸性,在碱性条件下可溶,在中性和酸性条件下水不溶,利用该特点,本研究通过调节 pH,将 MTX 溶解后重新沉淀载入 BBG 的空腔,为了实现 MTX 在 BBG 空腔内的缓慢释放,我们利用生物相容性良好的 Alg 封装,制备 MTX 缓释制剂,以期提高口服 MTX 的疗效及减少毒性。透射电镜和

XRD 表征实验结果均证明 MTX 成功载入 BBG 空腔。口服药物载体的第一道挑战就是通过胃部强酸性环境时保证载体的完整性和稳定性,体外模拟胃肠道释放实验证明, BBG/MTX/Alg 复合物在 pH = 1.2 的模拟胃液中 2 小时药物释放量低于 15%, 大部分 MTX 通过载体到达肠道部位, 保证 BBG/MTX/Alg 到达肠道部位 MTX 依然具有足够的有效剂量, 到达肠道部位后 3 ~ 10 小时 MTX 的累积释放量急剧增加, 在 10 h 内达到 70% 左右, 然后缓慢释放, 在 24 h 释放量达到 95% 左右, 使 MTX 在肠道部位迅速达到有效的吸收浓度, 并长时间维持有效浓度, 这有利于药物于胃肠道安全释放及被吸收。

课题组前期研究已证明 BBG 负载 MTX 颗粒可以有效促进 MTX 在结肠炎治疗中的临床应用。^[11] 由于 MTX 还具有良好的抗白血病特性, 课题组进一步合作研究 BBG 负载 MTX 抗急性单核细胞白血病的效果, 并根据预实验结果调整药物成分, 以期得到最佳的释放速率与抗白血病效果。体外实验证明, 新合成的 BBG/MTX/Alg 能有效抑制急性单核细胞白血病细胞系 THP-1 和 MV-4-11 增殖, 随着时间的延长, 抑制增殖的作用增强。在 200 ng/mL 的较低浓度下, 72 h 对 THP-1 和 MV-4-11 的增殖抑制率达 75% 和 70%, 随着处理浓度的增加, MV-4-11 增殖抑制作用更强, 而增加浓度对 THP-1 增殖的影响较小。在正常细胞系中, 与等量游离 MTX 相比, BBG/MTX/Alg 处理 24 h 后对正常细胞系的毒性较小, 说明合成的缓释制剂具备更低的毒性, 提示其更有利于临床应用。体外细胞实验环境下 BBG/MTX/Alg 中 MTX 的释放特性可以通过 BBG/MTX/Alg 在生理盐水的环境中释放来模拟(图 4), 在 0 ~ 24 h 内, MTX 保持着平稳缓慢的释放, 因此相比于游离 MTX, BBG 负载后能够降低 MTX 与正常细胞的接触, 从而降低 MTX 对于正常细胞的毒性。

细胞凋亡实验结果显示, 与生理盐水对照组相比, BBG/MTX/Alg 能显著触发 AML-M5 细胞系的凋亡反应, 阻滞白血病细胞从 G1 期进入 S 期从而抑制增殖, 这与 Zhao 等^[26] 合成的寡核苷酸适体-MTX 偶联物抗 AML 结果一致。BBG/MTX/Alg 在体外通过抑制白血病细胞增殖, 并阻滞细胞于 G0/G1 期促进其凋亡, 有效抑制白血病细胞生长, 且对正常细胞具有更低的毒性, 说明 BBG 作为 MTX 的缓释载体, 能够保证 MTX 发挥正常的药效, 并降低对正常的毒性, 具有一定的应用前景。

综上所述, BBG/MTX/Alg 因其低毒高效, 或可

作为良好的抗急性单核细胞白血病口服缓释药。我们的实验为临床应用 MTX 治疗 M5 型白血病提供了新的治疗手段和理论依据, BBG/MTX/Alg 在体外对白血病细胞系具有良好的抑制作用, 其体内代谢途径、白血病治疗效果以及作用机制还有待进一步深入研究。

作者声明: 本文全部作者对于研究和撰写的论文出现的不端行为承担相应责任; 并承诺论文中涉及的原始图片、数据资料等已按照有关规定保存, 可接受核查。

学术不端: 本文在初审、返修及出版前均通过中国知网(CNKI)科技期刊学术不端文献检测系统的学术不端检测。

同行评议: 经同行专家双盲外审, 达到刊发要求。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

文章版权: 本文出版前已与全体作者签署了论文授权书等协议。

[参考文献]

- [1] John S, Chen H, Deng M, *et al.* A novel anti-lilrb4 car-t cell for the treatment of monocytic aml [J]. *Mol Ther*, 2018, 26(10): 2487-2495.
- [2] Zhou F, Pan Y, Wei Y, *et al.* Jab1/csn5-thioredoxin signaling in relapsed acute monocytic leukemia under oxidative stress [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(15): 4450-4461.
- [3] 赵丽凤, 刘丽, 谭余庆. 三氧化二砷对人急性单核细胞白血病 shi-1 细胞增殖和凋亡的影响 [J]. *肿瘤药学*, 2020, 10(5): 531-535, 551.
- [4] Gao L, Xia L, Zhang R, *et al.* Enhanced antitumor efficacy of poly(d, l-lactide-co-glycolide)-based methotrexate-loaded implants on sarcoma 180 tumor-bearing mice [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2017, 11: 3065-3075.
- [5] Misra R, Mohanty S. Sustained release of methotrexate through liquid-crystalline folate nanoparticles [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2014, 25(9): 2095-2109.
- [6] Qindeel M, Khan D, Ahmed N, *et al.* Surfactant-free, self-assembled nanomicelles-based transdermal hydrogel for safe and targeted delivery of methotrexate against rheumatoid arthritis [J]. *ACS Nano*, 2020, 14(4): 4662-4681.
- [7] Yu WJ, Huang DX, Liu S, *et al.* Polymeric nanoscale drug carriers mediate the delivery of methotrexate for developing therapeutic interventions against cancer and rheumatoid arthritis [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 1734.
- [8] Bedoui Y, Guillot X, Sélambarom J, *et al.* Methotrexate an old drug with new tricks [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(20): 5023.
- [9] Dhanka M, Shetty C, Srivastava R. Injectable methotrexate loaded

- polycaprolactone microspheres: Physicochemical characterization, biocompatibility, and hemocompatibility evaluation [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 81 : 542-550.
- [10] Jang JH, Jeong SH, Lee YB. Enhanced lymphatic delivery of methotrexate using w/o/w nanoemulsion: In vitro characterization and pharmacokinetic study [J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12(10) : 978.
- [11] Sun Y, Duan B, Chen H, *et al.* A novel strategy for treating inflammatory bowel disease by targeting delivery of methotrexate through glucan particles [J]. *Adv Healthc Mater*, 2020, 9(6) : e1901805.
- [12] Kotla NG, Rana S, Sivaraman G, *et al.* Bioresponsive drug delivery systems in intestinal inflammation: State-of-the-art and future perspectives [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2019, 146 : 248-266.
- [13] Agrawal YO, Mahajan UB, Mahajan HS, *et al.* Methotrexate-loaded nanostructured lipid carrier gel alleviates imiquimod-induced psoriasis by moderating inflammation: Formulation, optimization, characterization, in-vitro and in-vivo studies [J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15 : 4763-4778.
- [14] Hisamatsu M, Mishima T, Teranishi K, *et al.* The correlation between adhesion of schizophyllan to yeast glucan and its effect on regeneration of yeast protoplast [J]. *Carbohydr Res*, 1997, 298(1-2) : 117-121.
- [15] Zhao J, Zhao X, Guo B, *et al.* Multifunctional interpenetrating polymer network hydrogels based on methacrylated alginate for the delivery of small molecule drugs and sustained release of protein [J]. *Biomacromolecules*, 2014, 15(9) : 3246-3252.
- [16] World Health Organization. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France; International Agency for Research on Cancer [DB/OL]. <https://gco.iarc.fr/today>, 2021-01-25.
- [17] 盘婉盈, 李可昕, 吴少杰, 等. 异基因造血干细胞移植治疗急性单核细胞白血病患者疗效及预后分析 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2020, 28(06) : 1859-1866.
- [18] Zhang Y, Geng Y, He J, *et al.* Tanshinone iia induces apoptosis and autophagy in acute monocytic leukemia via downregulation of pi3k/akt pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(5) : 2995-3006.
- [19] Madani F, Esnaashari SS, Bergonzi MC, *et al.* Paclitaxel/methotrexate co-loaded plga nanoparticles in glioblastoma treatment: Formulation development and in vitro antitumor activity evaluation [J]. *Life Sci*, 2020, 256 : 117943.
- [20] Wang X, Yan H. Methotrexate-loaded porous polymeric adsorbents as oral sustained release formulations [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 78 : 598-602.
- [21] Wu J, Deng A, Jiang W, *et al.* Synthesis and in vitro evaluation of pH-sensitive magnetic nanocomposites as methotrexate delivery system for targeted cancer therapy [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 71 : 132-140.
- [22] Hong SJ, Ahn MH, Sangshetti J, *et al.* Sugar-based gene delivery systems: Current knowledge and new perspectives [J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 181 : 1180-1193.
- [23] Sun Y, Shi X, Zheng X, *et al.* Inhibition of dextran sodium sulfate-induced colitis in mice by baker's yeast polysaccharides [J]. *Carbohydr Polym*, 2019, 207 : 371-381.
- [24] Soto ER, Caras AC, Kut LC, *et al.* Glucan particles for macrophage targeted delivery of nanoparticles [J]. *J Drug Deliv*, 2012, 2012 : 143524.
- [25] Murphy EJ, Rezoagli E, Major I, *et al.* B-glucan metabolic and immunomodulatory properties and potential for clinical application [J]. *J Fungi (Basel)*, 2020, 6(4) : 356.
- [26] Zhao N, Pei SN, Qi J, *et al.* Oligonucleotide aptamer-drug conjugates for targeted therapy of acute myeloid leukemia [J]. *Biomaterials*, 2015, 67 : 42-51.