

激光扫描共聚焦显微镜观测大黄素 β -环糊精包合物在鼻咽癌细胞的跨膜转运及分布

王春苗¹ 侯华新^{1*} 黎丹戎² 陈云龙¹ 莫春燕¹ 李 竞¹ 莫媛媛¹

(¹ 广西医科大学药学院, 广西 南宁 530021
² 广西医科大学医学科学实验中心, 广西 南宁 530021)

摘要 利用激光扫描共聚焦显微镜动态研究大黄素 β -环糊精包合物在鼻咽癌 CNE-1 细胞的跨膜转运及分布。结果显示, 大黄素 β -环糊精包合物以颗粒的形式主要分布于胞浆中, 在其浓度为 $5 \sim 40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时细胞对其摄取量随浓度的增加呈非线性增加; NaN_3 、甘露醇可抑制 CNE-1 细胞对大黄素 β -环糊精包合物的摄入量, 环孢菌素 A(CsA) 在药物浓度低(小于 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 时可显著增加细胞对大黄素 β -环糊精包合物的摄入量, 而在药物浓度大时, 反而抑制细胞的摄取量。相对大黄素而言, 大黄素 β -环糊精包合物在细胞内持续时间较长。大黄素 β -环糊精包合物在鼻咽癌 CNE-1 细胞的跨膜转运主要遵循能量依赖的内吞模式且受 P-gp 蛋白的调控, 这一特性可为药物剂型研究提供参考。

关键词 医学光学; 药物跨膜转运; 大黄素 β -环糊精包合物; 鼻咽癌 CNE-1 细胞; 激光扫描共聚焦显微镜

中图分类号 R966 **文献标识码** A **doi:** 10.3788/CJL201441.0504001

Observation of Emodin- β -CD Inclusion Complex's Transmembrane Transport in Nasopharyngeal Carcinoma Cells and Its Distribution by the Laser Scanning Confocal Microscope

Wang Chunmiao¹ Hou Huaxin¹ Li Danrong² Chen Yunlong¹ Mo Chunyan¹
Li Jing¹ Mo Yuanyuan¹

(¹ College of Pharmaceutical Science, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530021, China
² Scientific Experiment Center, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

Abstract The transmembrane transport and distribution characteristics of emodin- β -CD inclusion complex in the nasopharyngeal carcinoma CNE-1 cells are observed using laser scanning confocal microscope. The results show that both emodin and emodin- β -CD inclusion complex are mainly distributed in the cytoplasm in granules. In the concentration range of $5 \sim 40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, the intake of emodin- β -CD inclusion complex nonlinearly increases with the increase of concentrations. Compared with the control group, emodin- β -CD inclusion complex uptake in cells is significantly lower than that of treatment with NaN_3 and mannitol. After treatment with P-glycoprotein inhibitors cyclosporin A (CsA), intake of emodin- β -CD inclusion complex at low concentrations (smaller than $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) significantly increases, but at high concentrations, intake of emodin- β -CD inclusion complex significantly decreases. Emodin- β -CD inclusion complex has long time of maintaining high concentration in cell relative to emodin. The mechanism of emodin- β -CD inclusion complex uptake in cells may involve energy-dependent endocytosis and P-glycoproteins participates in the conveying process of emodin- β -CD inclusion complex in CNE-1 cells. It provides a reference to improving emodin formulations.

Key words medical optics; transmembrane transport of drug; emodin- β -CD inclusion complex; nasopharyngeal carcinoma CNE-1 cell; laser scanning confocal microscope

OCIS codes 170.1530; 170.1790

收稿日期: 2013-11-22; 收到修改稿日期: 2013-12-08

基金项目: 国家自然科学基金(81060270)、广西医学科学实验中心开放基金(KFJJ2011-25)

作者简介: 王春苗(1989—), 女, 硕士研究生, 主要从事分子药理学方面的研究。E-mail: 15296498689@163.com

导师简介: 侯华新(1960—), 男, 教授, 硕士生导师, 主要从事分子药理学方面的研究。

E-mail: houhuaxin@163.com(通信联系人)

1 引 言

大黄素为脂溶性蒽醌类衍生物,在激发波长为400~465 nm时,可发射波长为515~525 nm绿色荧光^[1]。本课题组前期研究^[2]发现大黄素对鼻咽癌CNE-1细胞在放射增敏方面有独特的药效,可明显增强鼻咽癌CNE-1细胞对射线的敏感性。为了提高大黄素的放射增敏活性,又尝试合成了能自发荧光的大黄素 β -环糊精包合物,期待该包合物能改善大黄素的溶解性^[3-4];控制释药速率;提高药物稳定性^[5];降低药物的毒副作用和药物的刺激性^[6]等。药物改变剂型后能否很好地透过细胞膜进入细胞内发挥药效是药物剂型改造是否有意义的前提,而药物在细胞的跨膜转运研究常采用的高效液相色谱技术,但该技术要求细胞数量大、细胞须裂解、药物需富集,而且难以在间隔时间较短内测定细胞对药物的摄取量,更无法观察到药物在胞内分布。激光扫描共聚焦显微镜是近代最先进医学图像分析仪器之一,广泛应用于细胞分子生物学等各领域^[7-8],由于其高清晰度成像,配备完美对焦系统和强大的图像分析软件,可以实现对活细胞、活组织内自发荧光药物的定性、定量、定时、定位动态分析^[9]。本文利用大黄素 β -环糊精包合物自发绿色荧光的特性,采用激光扫描共聚焦显微镜研究大黄素 β -环糊精包合物在细胞中的摄取和分布规律,观察不同透膜抑制剂如 NaN_3 、甘露醇和环孢菌素A等对细胞摄取药物的影响,探讨药物的跨膜转运机制,为鼻咽癌的药物治疗,抗肿瘤药物的剂型研究和临床合理用药提供理论依据。

2 材 料

2.1 试 剂

大黄素从广西何首乌分离获得并经结构鉴定,纯度为99%;大黄素 β -环糊精包合物(以下简称大黄素包合物,由课题组自行合成,经红外和紫外光谱鉴定;包合率为66.93%,含药量为20.53%);RPMI-1640培养基(GIBCO公司),小牛血清(杭州四季青生物公司),胰酶(AMRESCO公司);二甲基亚砜(DMSO,分析纯,天津市博迪化工); NaN_3 (Sigma公司);环孢菌素A(江莱生物科技有限公司);甘露醇(山东华鲁制药有限公司);Hoechst 33258(Sigma公司)。

2.2 仪 器

NIKON TS100 倒置相差生物显微镜;激光共

聚焦显微镜 Nikon Al(日本尼康公司出品);二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司出品)。

2.3 细 胞

人鼻咽癌 CNE-1 细胞,由广西医科大学实验中心提供。

3 方 法

3.1 鼻咽癌 CNE-1 细胞的培养

细胞于37℃,5%CO₂培养箱内,以含10%小牛血清的RPMI-1640培养液在培养瓶内单层传代培养,取对数生长期细胞进行实验。

3.2 激光共聚焦显微镜工作条件

采用完美对焦系统动态双向扫描模式,选择激发波长488 nm,发射波长530 nm,激光功率9.0 mW,光电倍增管电压110 V条件下摄图。

3.3 鼻咽癌 CNE-1 细胞摄取实验

3.3.1 大黄素及大黄素包合物在细胞内的分布情况

取对数生长期细胞,以 5×10^4 个密度接种于共聚焦培养皿,每皿体积2 ml,贴壁24 h。加入工作浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Hoechst 33258对细胞核染色30 min后,分别加入无细胞毒浓度为 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的大黄素和大黄素包合物,在激光共聚焦显微镜下摄图。

3.3.2 药物浓度对细胞摄取特性的影响

取对数生长期细胞,以 5×10^4 个密度接种于共聚焦培养皿,每皿体积2 ml,贴壁24 h后,分别加入无细胞毒浓度为5、10、20、40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的大黄素和大黄素包合物的培养基,在激光共聚焦显微镜下摄图,记录药物进入细胞的时间、荧光强度。

3.3.3 内吞抑制剂 NaN_3 和甘露醇对细胞摄取特性的影响

取对数生长期细胞,以 5×10^4 个密度接种于共聚焦培养皿,每皿体积2 ml,贴壁24 h后,撤去原培养基,除空白组外,分别以 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇和 $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaN_3 的培养基孵育30 min后,各组加入终浓度为5、10、20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 大黄素包合物,在激光共聚焦显微镜下摄图,记录药物进入细胞的时间、荧光强度。

3.3.4 P-gp 抑制剂(环孢菌素A)对细胞摄取特性的影响

取对数生长期细胞,以 5×10^4 个密度接种于共聚焦培养皿,每皿体积2 ml,贴壁24 h后,撤去原培养基,除空白组外,加入含 $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 环孢菌素A的培养基孵育30 min后,分别加入终浓度为1.25、2.5、5、10、20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 大黄素包合物,在激光共聚焦

显微镜下摄图,记录药物进入细胞的时间、荧光强度。

3.4 统计学处理

采用激光共聚焦显微镜系统荧光定量分析软件NIS-Elements AR测定细胞的荧光强度。使用SigmaPlot10.0对实验数据进行分析,组间差异比较用 t 检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

4 实验结果

4.1 CNE-1细胞对不同浓度大黄素和大黄素包合物摄取规律

大黄素浓度在 $5 \sim 40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内,药物浓度与细胞摄取的最大荧光强度之间呈线性关系,即药物的细胞摄取量随浓度的增加而增加,表明大黄素主要以被动扩散的方式被细胞摄取;而大黄素包合物在相应浓度范围内,低浓度时随浓度增加,细胞摄取的荧光强度值增加,但高浓度时细胞内荧光强度变化不明显,提示鼻咽癌CNE-1细胞对包合物的摄取并不完全遵循被动扩散方式,可能同时存在某种载体的介导,结果见图1。

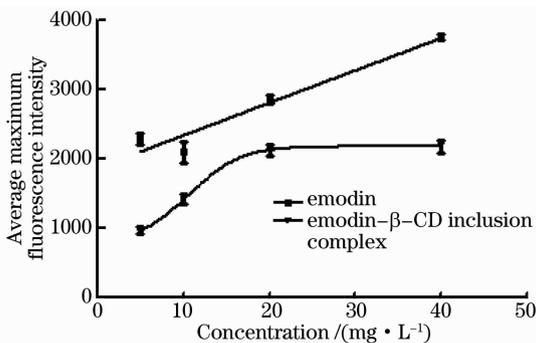
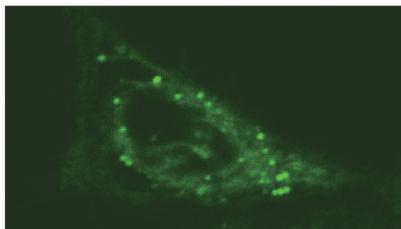
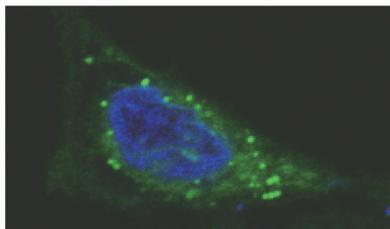


图1 不同浓度大黄素及其包合物对细胞摄取特性的影响($n=3$)

Fig. 1 Effect of different concentrations of emodin and its inclusion complex on cells uptake ($n=3$)



(a) emodin (FITC)



(b) hoechst 33258+ emodin

图4 大黄素分布图($\times 600$)

Fig. 4 Distribution of emodin ($\times 600$)

4.3 胞吞抑制剂 NaN_3 和甘露醇对细胞摄取特性的影响

在 $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaN_3 抑制剂存在的情况下,

在动态观察的10 min内,不同浓度大黄素在细胞内达到最大荧光强度所需的时间较短,其最大荧光强度持续时间也较短;而大黄素包合物在到达最大荧光强度所需的时间相对较长,其最大荧光强度持续时间也较长。结果见图2、图3。

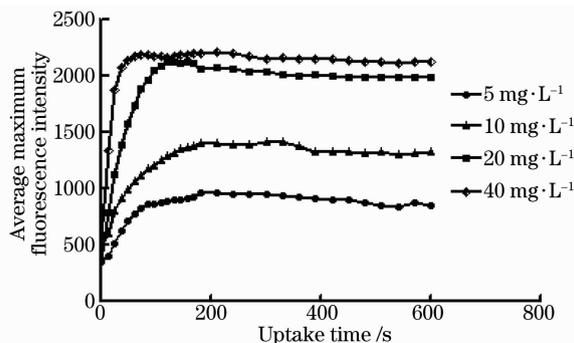


图2 CNE-1细胞对大黄素包合物的摄取曲线图

Fig. 2 Uptake curve of emodin- β -CD inclusion complex in CNE-1 cells

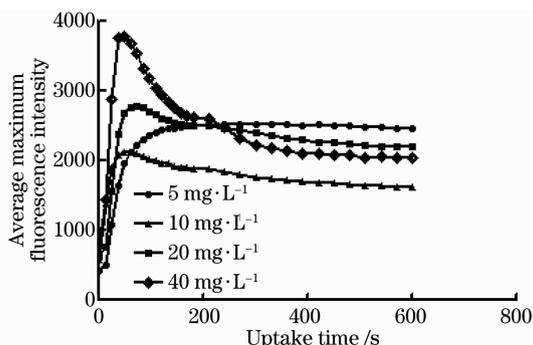


图3 CNE-1细胞对大黄素的摄取曲线图

Fig. 3 Uptake curve of emodin in CNE-1 cells

4.2 大黄素和大黄素包合物在CNE-1细胞内的分布情况

激光共聚焦显微镜下可见大黄素及其大黄素包合物在CNE-1细胞内均以颗粒的形式主要分布于胞浆中,细胞核内基本无分布。结果见图4和图5。

细胞对不同浓度的大黄素包合物的摄取量均显著低于相应浓度的空白对照组($P < 0.01$),说明包合物的摄取过程与能量有关。而在 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇抑

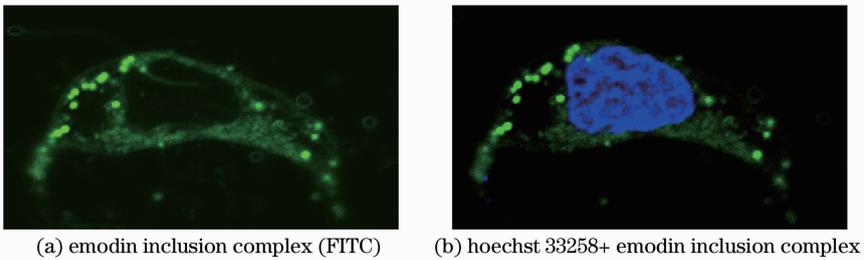


图 5 大黄素包合物分布图 (×600)

Fig. 5 Distribution of emodin inclusion complex (×600)

制剂存在下,细胞对大黄素包合物的摄取量受药物浓度的影响,药物浓度在 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,甘露醇可显著抑制细胞对包合物的摄入量 ($P < 0.01$)。这两组实验结果提示在一定浓度范围内细胞对大黄素包合物的摄取可能采用内吞形式进行。结果见图 6。

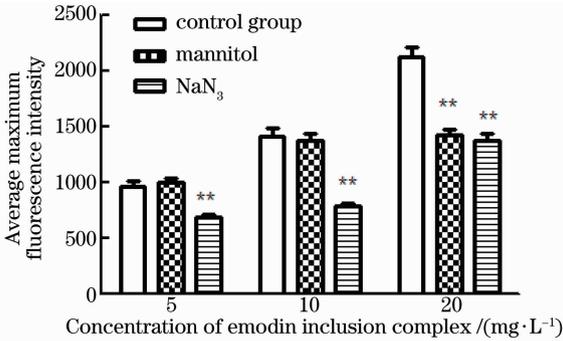


图 6 NaN_3 和甘露醇对细胞摄取特性的影响 ($n=3$) ($**$: $P < 0.01$)

Fig. 6 Effect of NaN_3 and mannitol on cells uptake ($n=3$) ($**$: $P < 0.01$)

4.4 P-gp 抑制剂 (环孢菌素 A) 对细胞摄取特性的影响

当环境中存在 P-gp 抑制剂 $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 环孢菌素 A 时,可双向调控细胞对不同浓度大黄素包合物的摄入量,表现为:细胞对较低浓度(小于 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

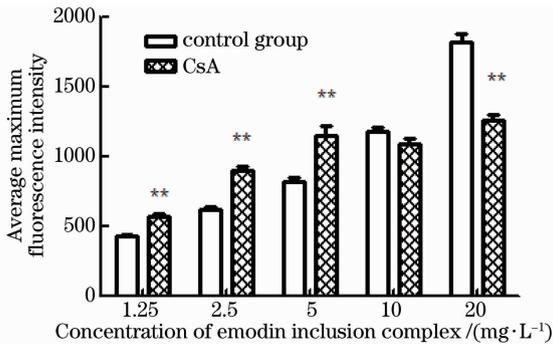


图 7 环孢菌素 A 对细胞摄取特性的影响 ($n=3$) ($**$: $P < 0.01$)

Fig. 7 Effect of cyclosporin A on cells uptake ($n=3$) ($**$: $P < 0.01$)

大黄素包合物摄入量明显增加 ($P < 0.01$); 而细胞对较高浓度的大黄素包合物摄入量反而减少 ($P < 0.01$)。结果见图 7。

5 结 论

细胞药代动力学主要研究药物在细胞内的吸收、分布、代谢过程,在新药设计、优化临床给药方案、改进剂型等方面发挥着重要的作用。在激光扫描共聚焦显微镜下观察发现大黄素和大黄素包合物进入细胞的速度均较快,在细胞内呈颗粒状分布于胞浆中,但相对大黄素而言,大黄素包合物在细胞内持续时间较长。提示大黄素包合物的剂型可以改善大黄素在细胞内的释放速率。

药物穿透细胞膜进入细胞主要通过被动扩散和被直接内吞两种方式实现。由于细胞膜是类脂质物质,因此小分子、高脂溶性、极性小,非解离型的药物通常以浓度梯度作为动力,被动扩散进入细胞内。内吞作用为耗能的主动运输过程。脂溶性低、分子量较大,分子内部存在极性的药物,通常都是以内吞的形式进入细胞内^[10]。 NaN_3 为线粒体呼吸链复合体 IV 抑制剂,可以抑制三磷酸腺苷(ATP)的生成从而抑制耗能的内吞过程^[11];高渗性粒子甘露醇则可以同时阻断网格蛋白介导的内吞和细胞膜穴样凹陷介导的内吞^[12]。发现 $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaN_3 和 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的甘露醇存在的情况下,均可以明显的抑制细胞对大黄素包合物的摄入量,表明一定浓度范围的大黄素包合物可能采用内吞形式进入细胞内,这与大黄素形成包合物后,其水溶性和分子量增加相关。

P-gp 是一种跨膜蛋白,广泛分布于机体组织中,它能够调节细胞膜的通透性,是一种 ATP 依赖的药物外排泵,可调控某些药物的胞内浓度。环孢菌素 A 为 P-gp 的专属抑制剂,可通过与药物竞争性或者非竞争性的结合 P-gp,抑制其跨膜泵作用^[13],从而减少药物的外排。发现浓度为

4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 环孢菌素 A 对鼻咽癌 CNE-1 摄取大黄素包合物的作用与其浓度有关,具体表现为:低浓度时环孢菌素 A 发挥作用,与空白组相比,增加了细胞对大黄素包合物的摄入量,而高浓度时结果恰好相反。其原因可能是:大黄素与环孢菌素 A 均为亲脂性化合物,当大黄素包合物进入细胞后,释放出的大黄素可与环孢菌素 A 竞争性的结合 P-gp 结合位点,大黄素的浓度越大,导致 P-gp 蛋白泵外排功能增加,细胞对大黄素包合物的摄取量反而降低。

细胞的跨膜吸收是药物运送到细胞内部的一个重要生理过程,有助于从细胞层次上理解生命现象、掌握药物的作用机制。然而大黄素包合物进入细胞后,药物的生物转化、药物与细胞器的相互作用及其细胞内基因与蛋白质的改变,仍有待于进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Wang Xiangfei, Ge Junbo, Wang Keqiang, *et al.*. Effects of emodin on fluorescence analysis [J]. Fudan Univ J Med Sci, 2006, 33(2): 262-265.
王翔飞,葛均波,王克强,等. 大黄素荧光特性对荧光分析的影响[J]. 复旦学报(医学版), 2006, 33(2): 262-265.
- 2 Liu Ying, Hou Huaxin, Li Danrong, *et al.*. Correlation of enhancement radiosensitization of emodin isolated from Guangxi P. multiflorum Thunb on hypoxic nasopharyngeal cancer cells with expression of DNA repair genes [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2009, 25(3): 348-352.
刘 瑛,侯华新,黎丹戎,等. 大黄素对乏氧鼻咽癌细胞的放射增敏性与 DNA 修复基因的关系[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(3): 348-352.
- 3 Sanghvi R, Evans D, Yalkowsky S H. Stacking complexation by nicotinamide: a useful way of enhancing drug solubility [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2007, 336(1): 35-41.
- 4 Manosroi J, Apriyani M G, Foe K, *et al.*. Enhancement of the release of azelaic acid through the synthetic membranes by inclusion complex formation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2005, 293(1-2): 235-240.

- 5 Karathanos V T, Mourtzinos I, Yannakopoulou K, *et al.*. Study of the solubility, antioxidant activity and structure of inclusion complex of vanillin with β -cyclodextrin [J]. Food Chemistry, 2007, 101(2): 652-658.
- 6 Bilensoy E, Gürkaynak O, Doğan, A L. Safety and efficacy of amphiphilic β -cyclodextrin nanoparticles for paclitaxel delivery [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2008, 347(1-2): 163-170.
- 7 Ye Yuhuang, Chen Yang, Li Yongzeng, *et al.*. Discrimination of nasopharyngeal carcinoma and normal nasopharyngeal cell lines based on confocal Raman microspectroscopy [J]. Chinese J Lasers, 2012, 39(5): 0504003.
叶宇煌,陈 阳,李永增,等. 基于拉曼光谱的鼻咽癌与正常鼻咽细胞株的分类研究[J]. 中国激光, 2012, 39(5): 0504003.
- 8 Chen Hongli, Yin Huijuan, Xu Zengrui, *et al.*. Killing effect of photodynamic therapy induced by PsD007 on human epidermoid carcinoma in vitro [J]. Chinese J Lasers, 2013, 40(5): 0504003.
陈洪丽,阴慧娟,徐增瑞,等. PsD007 诱导光动力疗法对人喉癌细胞的杀伤作用[J]. 中国激光, 2013, 40(5): 0504003.
- 9 Zhai Peng, Xu Gaixia, Zhu Xiaomei, *et al.*. Synthesis of targeting quantum dot and its application in in vivo imaging research [J]. Chinese J Lasers, 2013, 40(1): 0104003.
翟 鹏,许改霞,朱小妹,等. 靶向量子点的合成及其在活体成像研究中的应用[J]. 中国激光, 2013, 40(1): 0104003.
- 10 Hu Ling, Zhang Yuying, Gao Changyou. Influence of structures and properties of polymer nanoparticles on their cellular uptake and cell functions [J]. Progress In Chemistry, 2009, 21(6): 1254-1267.
胡 玲,张裕英,高长有. 聚合物纳米粒子的结构和性能对胞吞和细胞功能的影响[J]. 化学进展, 2009, 21(6): 1254-1267.
- 11 Karathanos V T, Mourtzinos I, Yannakopoulou K, *et al.*. Study of the solubility, antioxidant activity and structure of inclusion complex of vanillin with β -cyclodextrin [J]. Food Chemistry, 2007, 101(2): 652-658.
- 12 Jin Zhaoying. Uptake of Album Nanoparticles by Cells [D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2012. 49-50.
金召英. 白蛋白纳米粒的胞吞作用研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2012. 49-50.
- 13 Jiang Qihong, Gao Huijun, Yao Shuren. Progress of cyclosporine in reversing tumor multi-drug resistance [J]. Chin J New Drug Clin Rem, 2008, 27(11): 849-852.
姜秋红,高惠君,姚树人. 环孢菌素类抑制肿瘤多药耐药的研究进展[J]. 中国新药与临床杂志, 2008, 27(11): 849-852.

栏目编辑:韩 峰