

Nghiên cứu tạo hệ phân phối thuốc hướng đích chủ động chitosan-mixen-paclitaxel-aptamer ứng dụng điều trị ung thư

Nguyễn Kim Thạch^{1*}, Liêu Mỹ Đông², Lê Đức Vinh³, Lê Quang Huân⁴

¹Bộ môn Hoá - Sinh hoá đại cương, Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch

²Khoa Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp thực phẩm

³Bộ môn Kỹ sinh - Vi nấm học, Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch

⁴Phòng Công nghệ tế bào động vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

Ngày nhận bài 30/3/2018; ngày chuyển phản biện 3/4/2018; ngày nhận phản biện 2/5/2018; ngày chấp nhận đăng 7/5/2018

Tóm tắt:

Nghiên cứu này nhằm phát triển phức hệ hạt Chitosan, Pluronic® F127 bằng phương pháp tạo gel ion bao paclitaxel (PTX) và gắn DNA aptamer đích ứng dụng trong điều trị ung thư in vitro. Các mixen polyme tự kết hợp thành các khối đồng polyme với đường kính tương đương 69 nm trong dung dịch. Thuốc chống ung thư (PTX) được bao gói với hiệu quả 83,28±0,13% và mang tải 9,12±0,34%. Các hạt Ap-mixen được chế tạo có dạng hình cầu và đường kính trung bình 86,22 ±1,45 nm. Trong khảo sát sự phóng thích thuốc, hạt Ap-mixen phóng thích thuốc ở giai đoạn đầu đạt 29-35% trong 12 giờ đầu tiên và đạt 85-93% sau 12 ngày trong môi trường pH 7,5. Trong thí nghiệm gây độc tế bào, dùng PTX tự do và các hạt Ap-mixen được khảo sát trên dòng tế bào ung thư vú SK-BR-3. Các liều IC₅₀ được xác định bằng phương pháp MTT cho thấy, các hạt Ap-mixen chống lại tế bào SK-BR-3 hiệu quả hơn PTX tự do và gây độc diệt tế bào lên đến 89-93% sau 6-48 giờ. Kết quả của nghiên cứu đã chứng minh các hạt mixen kết hợp DNA aptamer có tính tương thích sinh học và có tiềm năng sử dụng như hệ dẫn truyền thuốc chống ung thư.

Từ khóa: Chitosan, DNA aptamer, mixen, paclitaxel, pluronic.

Chỉ số phân loại: 3.4

Đặt vấn đề

PTX là nhóm thuốc hóa trị chống ung thư. Chúng làm ức chế sự phân rã mạng lưới vi thể của thoi vô sắc, kích thích quá trình ghép các dimer của vi ống thành mạng lưới vi thể và ổn định mạng lưới vi thể bằng cách ngăn chặn quá trình tháo xoắn của chúng. PTX đã được chứng minh tác dụng trong thử nghiệm lâm sàng điều trị các khối u rắn như ung thư buồng trứng, ung thư vú di căn, ung thư phổi tế bào không nhỏ, AIDS liên quan ung thư trên da Kaposi sarcoma [1, 2]. PTX là một pseudoalkaloid diterpenoid kỵ nước cao với độ hòa tan kém, khoảng 1 µg/ml [3]. Vì vậy, ngoài việc ức chế sự phát triển của các tế bào ung thư, chúng còn gây nhiều tác dụng phụ không mong muốn trên các tế bào khỏe mạnh. Để khắc phục hạn chế này, các nhà nghiên cứu đã không ngừng tìm kiếm các hệ dẫn truyền thuốc mới có tác dụng ức chế hoặc làm tiêu biến tế bào ung thư nhưng ít có tác dụng phụ. Trong những năm gần đây, các phức hệ mixen phân hủy sinh học được quan tâm nghiên cứu phát triển như những hệ dẫn truyền thuốc mang lại nhiều hiệu quả [4]. Các khối đồng polyme lưỡng tính (amphiphilic block

copolymer) đã được nghiên cứu rộng rãi, được xem như là các tác nhân giúp các loại thuốc kém tan ổn định trong hệ dẫn truyền thuốc [5]. Chúng có thể tự kết hợp thành các mixen polyme trong môi trường dung dịch. Hầu hết các mixen polyme được tạo thành từ một nhân bên trong kỵ nước và một lớp bao thân nước bên ngoài [6]. Một số loại thuốc kém tan có thể được bao vào bên trong lõi kỵ nước của các mixen để tăng độ tan của chúng trong nước. Vô thân nước có khả năng kéo dài thời gian lưu của chúng trong cơ thể, giảm quá trình thực bào và thanh thải qua thận. Các mixen polyme thường có kích thước đường kính trung bình 10-100 nm, chúng dễ tích lũy trong mô sinh ung thư thông qua cơ chế tăng cường tính thấm và tồn lưu (Enhanced Permeation and Retention, EPR) nhiều hơn so với các mô lành bình thường [7]. Một trong các mixen thường được sử dụng nhất trong dẫn truyền thuốc là Pluronic, một tam khối đồng polyme lưỡng tính, gồm poly (ethylene oxide) (PEO) và poly (propylene oxide) (PPO). Khối thân nước (PEO) tạo thành lớp vỏ và khối kỵ nước (PPO) tạo nhân của các mixen. Pluronic® F127 (PF) đã thu hút nhiều sự chú ý bởi chúng không có độc tính với cơ thể và có khả năng đóng gói

*Tác giả liên hệ: Email: nguyengkimthach@pnt.edu.vn

Investigation on preparing an active drug delivery system for a chitosan-micelle-paclitaxel-aptamer to treat cancer

Kim Thach Nguyen^{1*}, My Dong Lieu², Duc Vinh Le³,
Quang Huan Le⁴

¹Department of Chemistry and Biochemistry, Pham Ngoc Thach University of Medicine, Ho Chi Minh city

²Faculty of Food Technology, University of Food Industry, Ho Chi Minh city

³Department of Parasitology and Mycology, Pham Ngoc Thach University of Medicine, Ho Chi Minh city

⁴Laboratory of Animal Cell Technology, Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

Received 30 March 2018; accepted 7 May 2018

Abstract:

Development of paclitaxel-loaded was prepared by an ionic-gelation method using Chitosan, Pluronic® F127, and DNA aptamer conjugate to treat cancer cells in vitro. These polymeric micelles were self-assembled into copolymer blocks of approximately 69 nm diameter in an aqueous media. Anticancer drug (PTX) can be loaded at a high encapsulation efficiency of $83.28 \pm 0.13\%$ and loading capacity of $9.12 \pm 0.34\%$. The prepared Ap-micelles had a spherical shape and a mean diameter ranging at 86.22 ± 1.45 nm. Through an in vitro release study, the Ap-micelle formulation exhibited a biphasic drug release with a moderate initial burst, followed by a sustained release profile of 29-35% in the first 12 hours and 85-93% after 12 days at pH 7.5 receiving media. In vitro cytotoxicity of free PTX and PTX loaded Ap-micelles were evaluated using SK-BR-3 breast cancer cell line. The IC_{50} doses determined by the MTT assay showed the greater activity of PTX loaded Ap-micelles over free PTX, and these Ap-micelles killed cells up to 89-93% after 6-48 hours. These results demonstrated that DNA aptamer incorporated with copolymer micelles are biocompatible and have the potential to be used as anticancer drug carriers.

Keywords: Chitosan, DNA aptamer, micelle, paclitaxel, pluronic.

Classification number: 3.4

được với các loại thuốc kém tan. Tuy nhiên, mặt hạn chế khi sử dụng các mixen polyme này là sự bất ổn định của chúng [7]. Để khắc phục mặt hạn chế này, chúng tôi nghiên cứu kết hợp PF với chitosan (Chi) để tạo thành một đồng polyme. Chi đã được sử dụng rộng rãi trong các ứng dụng y sinh học và dược phẩm vì chúng có khả năng tương thích sinh học và phân hủy sinh học. Mặc dù phức hợp Chi kết hợp PF đã được sử dụng ở nhiều dạng như dịch hydrogel, mixen kết tập và các phân tử hạt mixen, nhưng chúng chưa được sử dụng làm hệ dẫn truyền thuốc chống ung thư. Trong nghiên cứu này, chúng tôi chế tạo phức hệ dẫn truyền hạt mixen bao PTX bằng phương pháp tạo gel ion từ sự kết hợp Chi và PF. Mạch đơn oligonucleotide từ thư viện ban đầu được chọn lọc theo quy trình DNA SELEX thu được các mạch ái lực liên kết cao với các tế bào SK-BR-3 biểu hiện mạnh HER-2 [8, 9]. Chúng được gắn vào phức hệ hạt mixen, giúp tăng ái lực nhận diện các tế bào SK-BR-3 đặc hiệu [10]. Hiệu quả của phức hệ hạt mixen được đánh giá qua các giá trị kích thước hạt, sự ổn định, khả năng bao thuốc, khả năng phóng thích thuốc in vitro và khả năng gây độc lên dòng tế bào ung thư vú SK-BR-3.

Vật liệu - phương pháp nghiên cứu

Acid acetic 6%; acid acetic 1 N; chitosan F-MMW 400 kDa (Sigma Aldrich); natri nitrite ($NaNO_2$); acid hydrochloric (HCl, Merck); natri hydroxid (NaOH) 4 N; acetone; natri triphosphat ($Na_3P_3O_{10}$) (TPP, Merck); pluronic® F-127 (PF, Life Technologies); PTX (PTX, Life Technologies); 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid (MTT, Life Technologies); dimethylsulfoxid (DMSO, Merck); succinic anhydride (SA, Acros Organics); 4-dimethylaminopyridine (DMAP, Acros Organics); triethylamine (TEA, Acros Organics); N,N dimethylformamide (DMF, Acros Organics); 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC, Acros Organics); N-hydroxysuccinimide (NHS, Acros Organics); 2-mercaptoethanol và diethyl ether (Merck); amicon Ultra-15 (MWCO = 3kD, Merck Milipore); nước cất hai lần.

Dòng tế bào ung thư vú SK-BR-3 (HTB-30TM, ATCC®); môi trường McCoy's 5A (Life Technologies); huyết thanh bê (FBS, Life Technologies); Trypsin-EDTA (Life Technologies); Ceftriaxon và Vancomycin (Công ty CP dược Bidiphar). Trong quy trình chọn lọc SELEX sử dụng RNeasy Mini Kit của Qiagen (Chatsworth, CA) và Taq Gold DNA polymerase của Promega (Madison, USA).

Chọn lọc DNA aptamer theo quy trình SELEX (Ap)

Các mạch đơn oligonucleotid từ thư viện ban đầu (khoảng 10^{14} - 10^{15} mạch đơn khác nhau, IDT Singapore)

5'-TCA CCG GGA GGA GAC CCT GA-N40-GTG GCT TGG TGG TGG TTC AA -3', mỗi xuôi 5'-TCA CCG GGA GGA GAC CCT GA-3' và mỗi ngược 3'-TTG AAC CAC CAC CAA GCC AC-5'. Các mồi của gen HER-2 (mỗi xuôi 5'-AGC CGC GAG CAC CCA AGT-3', mỗi ngược 5'-TTG GTG GGC AGG TAG GTG AGT T-3') và các mồi của gen Beta-actin (mỗi xuôi 5'-GAT GAG ATT GGC ATG GCT TT-3', mỗi ngược 5'-CTC AAG TTG GGG GAC AAAA-3') được ủ với các tế bào SK-BR-3 biểu hiện mạnh HER-2. Chọn lọc loại bỏ các oligonucleotide mạch đơn và tế bào không gắn kết với nhau, thu các phức hợp liên kết.

Tiến hành phân tách phức hợp liên kết giữa oligonucleotide mạch đơn và tế bào SK-BR-3 biểu hiện mạnh HER-2 để thu được các oligonucleotid mạch đơn đích mong muốn. Dùng PCR nhân lượng mạch đơn oligonucleotide đích, tạo nguồn thư viện DNA mới cho lần lặp lại quy trình chọn lọc trên. Quy trình chọn lọc được lặp lại 5-20 lần để thu được các sản phẩm DNA aptamer có số lượng lớn và ái lực liên kết cao. Thực hiện kiểm tra các trình tự DNA aptamer bằng kỹ thuật giải trình tự Sanger (ABI prism® 3100 genetic analyser).

Tạo hạt nano chitosan phân tử lượng thấp

Pha 1 g chitosan (400 kD) trong 50 ml dung dịch acid acetic 6% (Moghaddam và cộng sự) [1]. Thêm vào dung dịch trên 10 ml dung dịch NaNO₂ (7 mg/ml), sau đó khuấy 1 giờ ở nhiệt độ phòng để hòa tan Chi. Điều chỉnh pH đến 9,0 bằng dung dịch NaOH 4 N. Ly tâm 10.000 vòng/phút, thời gian 5 phút. Loại bỏ dung dịch ly tâm, phần cặn màu trắng vàng được rửa 3 lần với acetone. Sau khi làm bay hơi hoàn toàn acetone, cặn ly tâm được hòa tan trong dung dịch acid acetic 0,1 N, sau đó thẩm tích trong nước với kích thước lỗ màng bán thấm là 12 KDa, thời gian thẩm tích 24 giờ, sau 4-6 giờ thay nước 1 lần. Đông khô dịch sau thẩm tích và bảo quản ở 4°C.

Tạo hạt mixen Chi-TPP-PF

Các hạt mixen Chi được chế tạo bằng phương pháp tạo gel ion (tạo liên kết ion) (S.K. Bong và cộng sự) gắn TPP để tạo hạt mixen Chi kích thước nhỏ [6]. Hòa tan Chi phân tử lượng thấp trong acid acetic 1% (v/v) và lần lượt thêm vào TPP 0,01%; 0,015%; 0,02%; 0,025% và 0,03% tạo sản phẩm riêng rẽ theo thể tích Chi:TPP là 2:1. Khuấy từ các sản phẩm trong 1 giờ để hòa tan hoàn toàn, đến khi độ đục ở các sản phẩm xuất hiện. Dùng Chi-TPP 0,025% hòa tan lần lượt với PF ở các nồng độ 10, 15 và 20%.

Carboxyl hoá nhóm COOH của Chi-TPP-Pluronic (CT-Pluronic F127)

Khử nguyên tử hydro của nhóm COOH tận cùng của

chuỗi PEO-PPO-PEO (Pluronic F127, MW 12.500) bằng succinic anhydride (G. Zahra và cộng sự) [8]. Chi-TPP-Pluronic (15 g, 2 mmol), succinic anhydride (0,56 g, 3 mmol), DMAP (0,5 g), và TEA (0,5 ml) được hòa tan trong 30 ml 1,4-dioxane, khuấy liên tục qua đêm ở 30°C. Sau đó làm bay hơi 1,4-dioxane bằng ly tâm chân không 900 vòng/phút, 120 phút. Phần dư lượng cô đặc được hòa tan trong 1 ml chloroform. Thêm 3 ml diethyl ether để thu kết tủa, thực hiện lặp lại vài lần để loại bỏ hoàn toàn succinic anhydride, DMAP và TEA. Ly tâm chân không 900 vòng/phút, 120 phút đúng, để qua đêm thu CT-Pluronic F127.

Gắn CT-Pluronic F127 với Ap và PTX

40 g (7,4 mmol của nhóm -COOH) CT-Pluronic F127 được hòa tan trong 20 ml N, N-dimethylformamide (DMF) ở nhiệt độ phòng. Thêm 1 g EDC và 2 g NHS vào hỗn hợp dung dịch. Sau phản ứng 15 phút, thêm 2,8 ml 2-mercaptoethanol, 10 mg TEA, 50 ng Ap và PTX. Khuấy liên tục qua đêm ở nhiệt độ phòng. Sau đó sản phẩm được ly tâm qua màng lọc Amicon Ultra-15 với tốc độ 6.000 vòng/phút trong 30 phút.

Xác định hình thái và cấu trúc các hạt mixen bằng kính hiển vi điện tử

Việc xác định hình thái và cấu trúc dưới kính hiển vi điện tử SEM (440, Leica Cambridge Ltd., Cambridge, UK) được thực hiện như sau: Các mẫu bột phức hệ thu được sau đông khô được đặt lên tấm thiết bị chuyên dụng, sau đó phủ với 60% vàng và 40% palladium thời gian 30 giây và đặt trong thiết bị xử lý với dòng điện 45 mA (Desk II, Denton Vacuum, Moorestown, NJ). Sau đó mẫu được quan sát trên hệ thống kính hiển vi điện tử quét SEM.

Các phức hệ đã thu nhận theo quy trình trên được kiểm tra hình thái và kích thước dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) trên hệ thống thiết bị JEM 1230 Electron Microscope (Joel Ltd., Tokyo, Japan). Một giọt dung dịch sản phẩm được nhỏ lên đầu mắt lưới đồng phủ cacbon. Lau sạch phần đầu mẫu dư thừa bằng giấy thấm. Dung dịch ammonium molybdat (1%, w/v) được sử dụng như tác nhân nhuộm âm bản. Sau 2 phút, dung dịch dư cũng được loại bằng giấy thấm. Sau đó mẫu được kiểm tra dưới kính hiển vi điện tử truyền qua TEM.

Xác định thế zeta và kích thước các hạt mixen

Kích thước trung bình và thế zeta của phức hệ được xác định trên máy "size analysis" (Nano Partica SZ-100, Horiba, Japan) với góc quét 90° đến 173°. 0,2 mg mẫu được hòa tan trong 2 ml nước cất hai lần trước khi xác định trên máy.

Khảo sát sự phóng thích thuốc PTX trong in vitro

Theo dõi sự phóng thích PTX của các hạt Ap-mixen-PTX trong dung dịch PBS pH 7,5 ở nhiệt độ phòng, tiến hành đo quang phổ ở bước sóng 280 nm ở các thời điểm trong 12 ngày [5].

$$\text{PTX phóng thích (\%)} = \frac{\text{Lượng PTX phóng thích}}{\text{Lượng PTX ban đầu}} \times 100$$

Khảo sát khả năng bao và tải thuốc PTX của hạt Ap-mixen

Hòa tan 0,5 mg hạt Ap-mixen-PTX trong 5 ml nước cất hai lần và ly tâm 14.000 vòng/phút trong 30 phút ở 15°C. Lượng PTX tự do phân tách từ phức hệ hạt được đo bởi hệ thống UV-Vis bước sóng 247-494 nm. Dùng hạt mixen không bao PTX làm mẫu chứng hiệu chỉnh. Mỗi mẫu thực hiện thí nghiệm 3 lần (n = 3). Khả năng bao và tải thuốc PTX được đánh giá theo công thức [6]:

$$\text{Hiệu quả bao (EE, \%)} = \frac{\text{Tổng phức hệ bao PTX} - \text{PTX phân tách tự do}}{\text{Tổng phức hệ bao PTX}} \times 100$$

$$\text{Hiệu quả tải thuốc (LC, \%)} = \frac{\text{Tổng phức hệ bao PTX} - \text{PTX phân tách tự do}}{\text{Trọng lượng phức hệ}} \times 100$$

Khảo sát khả năng gây độc của phức hệ hạt Ap-mixen-PTX (phương pháp MTT)

Tiến hành khảo sát mật độ sống của dòng tế bào ung thư vú SK-BR-3 dưới tác động gây độc của PTX bằng phương pháp MTT [7, 10]. Thí nghiệm được thực hiện với các hạt Ap-mixen không mang thuốc, hạt Ap-mixen-PTX và PTX tự do.

Dòng tế bào SK-BR-3 được nuôi trong môi trường Mc'Coy 5A có bổ sung 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 1% ceftriaxon-vancomycin, ở 37°C trong tủ CO₂ 5%. Điều chỉnh pH các mẫu thử nghiệm về pH 6,5. Phân phối tế bào vào đĩa nuôi cấy 96 giếng với mật độ 12.000 tế bào/giếng. Sau 12, 24, 48 giờ môi trường nuôi cấy được thay thế với 100 µl dung dịch các mẫu hạt Ap-mixen không mang thuốc, hạt Ap-mixen-PTX và PTX tự do. Sau đó, thêm 20 µl MTT (5 mg/ml) vào mỗi giếng. Sau 4 giờ, hút bỏ dung dịch trong các giếng và thêm 200 µl DMSO vào mỗi giếng để hòa tan tinh thể MTT.

Đo mật độ hấp thu màu của phản ứng ở mỗi giếng với bước sóng 570 nm dùng hệ thống thiết bị PlateReader AF2200 (Eppendorf, Germany).

Xử lý số liệu và thống kê

Các kết quả hiển thị giá trị trung bình ± độ lệch và độ

lập thực hiện các thí nghiệm ít nhất 3 lần. Các giá trị trung bình được xử lý bằng thuật toán ANOVA một đuôi và các giá trị xác suất P<0,05 mới có ý nghĩa thống kê.

Kết quả và bàn luận

Kết quả tạo hạt nano Chi-TPP

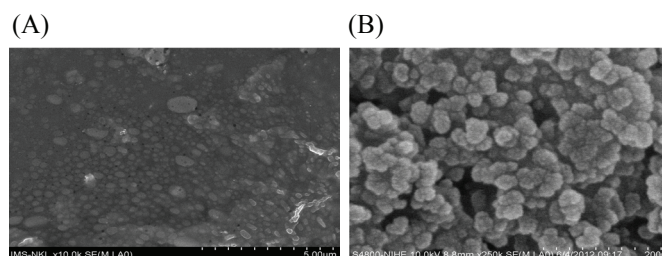
Sử dụng phương pháp tạo gel ion bằng TPP để tạo hạt nano Chi kích thước nhỏ, nhằm tăng khả năng hấp thụ thuốc. Điều kiện thí nghiệm được thực hiện ở nồng độ Chi phân tử lượng thấp 1% (v/v) trong acid acetic và TPP 0,01%; 0,015%; 0,02%; 0,025%; 0,03% (bảng 1).

Bảng 1. Nồng độ TPP ảnh hưởng đến kích thước và thế zeta của hạt Chi 1%.

Nồng độ TPP (%w/v)	Kích thước trung bình (nm)	Thế zeta (mV)
0,01	26,24±4,37	49,18±1,14
0,015	29,43±1,23	43,22±0,58
0,02	37,11±5,42	40,31±1,52
0,025	53,26±3,21	38,31±0,92
0,03	82,51±7,46	35,82±0,34

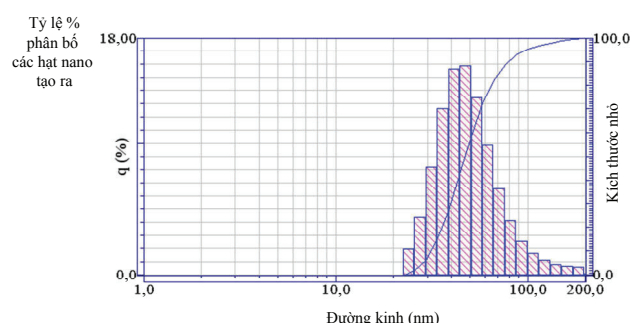
Do bản chất phân cực, TPP phân cực trong nước và giải phóng ion OH⁻, do đó trong dung dịch TPP đồng thời tồn tại cả ion OH⁻ và ion P₃O₁₀⁵⁻ có thể cạnh tranh phản ứng với nhóm NH₃⁺ của Chi. Những mảnh Chi phân tử lượng thấp sẽ tham gia vào phản ứng tạo gel ion với phân tử TPP, kết hợp với quá trình khuấy trộn để hình thành các hạt nano Chi kích thước nhỏ. Hạt nano Chi không bị tách lớp sau khi tạo ra qua 4 ngày bảo quản ở 4°C chứng tỏ hạt nano có kích thước nhỏ, nếu hạt nano có kích thước lớn sẽ gây ra sự lắng cặn và tách pha trong quá trình bảo quản.

Ảnh SEM của Chi cho thấy hình dạng nguyên liệu Chi ban đầu từng mảng polyme kích thước hạt lớn. Hạt nano Chi tạo ra bằng phương pháp tạo gel ion dùng TPP có kích thước hạt nhỏ, tương đối đồng đều (hình 1).



Hình 1. Ảnh SEM của Chi. (A) Chi ban đầu chưa tạo nối; (B) Hạt mixen Chi sau khi chế tạo, tỷ lệ Chi:TPP là 2:1.

Kết quả đo cho thấy, kích thước trung bình của hạt nano tạo ra là 53,2 nm. Trong đó có 81% hạt kích thước 55,6 nm, 9% hạt có kích thước 38 nm, còn lại là các hạt có kích thước lớn hơn 100 nm (hình 2).



Hình 2. Kết quả phân bố kích thước của hạt mixen Chi.

Kết quả tạo hạt mixen Chi-TPP-PF

Dùng Chi 1%-TPP 0,025% thực hiện tiếp các thí nghiệm với PF 10%, 15% và 20%. Khi kết hợp với PF nồng độ cao nhưng kích thước phức hệ hạt mixen giảm có thể là do sự hình thành cấu trúc gel đặc ở bên trong dẫn đến sự hấp thụ nước thấp nên đường kính trung bình của các hạt trong dung dịch giảm (bảng 2). Ngoài ra, không có sự thay đổi rõ rệt của thế zeta khi gia tăng nồng độ của PF ($P < 0,028$). Có thể kết luận rằng, PF được kết hợp chủ yếu vào bên trong các hạt mixen.

Bảng 2. Nồng độ PF ảnh hưởng đến kích thước và thế zeta của hạt mixen Chi 1%-TPP 0,025%.

Nồng độ PF (%w/v)	Kích thước trung bình (nm)	Thế zeta (mV)
10	61,24±3,17	32,14±0,36
15	69,11±6,42	28,47±1,42
20	64,53±1,42	28,14±0,91

Kết quả chọn lọc DNA aptamer theo quy trình SELEX (Ap)

Qua quy trình chọn lọc SELEX thu được các oligonucleotide mạch đơn ái lực liên kết cao với các tế bào SK-BR-3 biểu hiện mạnh HER-2. Dùng PCR nhân lượng mạch đơn oligonucleotide đích mong muốn. Kiểm tra các trình tự mạch đơn oligonucleotide bằng kỹ thuật giải trình tự Sanger được thể hiện ở bảng 3. Với sự tuân thủ nghiêm ngặt về thao tác kỹ thuật trong suốt các vòng chọn lọc SELEX, nghiên cứu này đã thu được một lượng aptamer có ái lực cao với dòng tế bào biểu hiện mạnh HER-2. Trên thực tế, trong các chu kỳ chọn lọc, nghiên cứu này tìm thấy được sự phong phú đa dạng đáng kể của các chuỗi đơn DNA, trong đó có loại có ái lực cao với dòng tế bào SK-BR3 biểu hiện

mạnh HER-2 và có loại có ái lực rất thấp. Sau 18 vòng chọn lọc, xuất hiện các aptamer có ái lực cao gần đạt tối ưu, cho thấy sự chọn lọc làm tăng dần ái lực của aptamer với các tế bào đích. Không có sự thay đổi đáng kể khi quan sát trong hai vòng chọn lọc tiếp theo. Do đó, quy trình chọn lọc được dừng ở giai đoạn này. Chúng tôi đã kiểm chứng sự biểu hiện HER-2 của dòng tế bào SK-BR3 ở mức độ mRNA. Phân tích các kết quả phiên mã ngược RT-PCR xác định sự biểu hiện mạnh HER-2 có ở dòng tế bào SK-BR3.

Bảng 3. Các oligonucleotide sử dụng chọn lọc DNA aptamer theo quy trình SELEX.

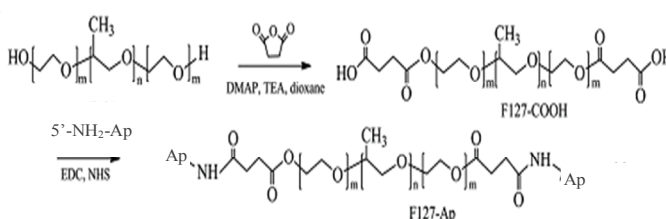
Tên các oligonucleotide	Trình tự nucleotide
Thư viện ban đầu	5'-NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN-3'
Ap sau chọn lọc	5'-AAC TTG GTG GTG GTT CGG TGG CTG TTC AGG GTC TCC TCC CGG TGA-3'

*N là 1 trong 4 loại nucleotide A, T, C, G.

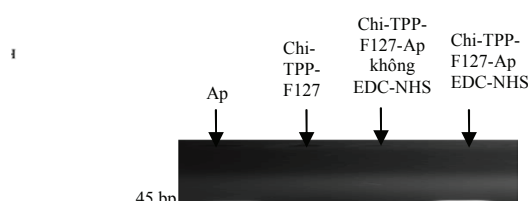
Tạo liên kết polymer Pluronic F127 và aptamer

Sử dụng phức hệ hạt mixen Chi 1%-TPP 0,025%-PF 15% để tiến hành thí nghiệm tạo liên kết polymer với aptamer. Liên kết Pluronic F127 và aptamer được tạo ra bởi nhóm 5'-NH₂-Ap và nhóm Pluronic F127-COOH bị carboxyl hoá (hình 3). Từ hình ảnh điện di Novex® gel (hình 4), có thể thấy rằng các Ap tự do hiện diện vạch rõ nét đặc trưng của Ap.

Ngược lại, Chi-TPP-F127 tự do không hiện diện trên gel. Khi tạo liên kết polymer không sử dụng EDC và NHS thì liên kết cũng không hình thành, không có sản phẩm hiện diện trên gel. Mặt khác, khi tạo liên kết polymer có sử dụng EDC và NHS thì liên kết được tạo thành, khi điện di trên gel xuất hiện vạch rõ nét đặc trưng của Ap.



Hình 3. Phương trình phản ứng tạo liên kết polymer Pluronic F127-Ap.



Hình 4. Kiểm tra liên kết polymer Pluronic F127 với Ap bằng điện di Novex® 12% Tris-Glycine mini gel.

Gắn CT-Pluronic F127 với PTX

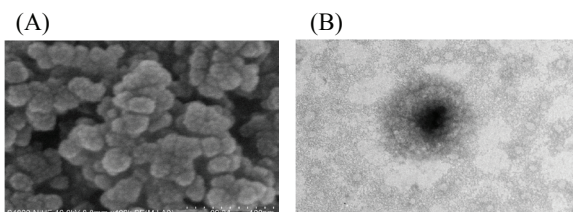
Thực hiện thí nghiệm dùng CT-Pluronic F127-Ap (Chi 1%-TPP 0,025%-PF 15%-Ap) với các nồng độ PTX khác nhau (hạt Ap-mixen-PTX). Bảng 4 cho thấy, nồng độ PTX không ảnh hưởng đến thể zeta của các hạt mixen PTX ($P < 0,02$). Ảnh hưởng của nồng độ PTX đến kích thước hạt Ap-mixen rõ hơn khi nồng độ tăng lên 0,2-0,4 mg/ml ($P < 0,015$). Kích thước hạt Ap-mixen-PTX tăng đều nhau ở nồng độ PTX 0,6-1 mg/ml. Hiệu quả bao và mang tải thuốc ở nồng độ PTX 0,4 mg/ml là cao nhất (EE: $83,28 \pm 0,13\%$; LC: $9,12 \pm 0,34\%$) với kích thước trung bình $86,22 \pm 1,45$ nm.

Bảng 4. Đặc điểm của phức hệ hạt Ap-mixen ở các nồng độ PTX.

Nồng độ PTX (mg/ml)	Kích thước trung bình (nm)	Thế zeta (mV)	EE (%)	LC (%)
0,2	$65,11 \pm 3,81$	$23,22 \pm 1,56$	$67,31 \pm 0,51$	$3,94 \pm 1,19$
0,4	$86,22 \pm 1,45$	$60,12 \pm 0,55$	$83,28 \pm 0,13$	$9,12 \pm 0,34$
0,6	$89,55 \pm 2,05$	$48,35 \pm 0,24$	$68,01 \pm 3,77$	$8,15 \pm 3,63$
0,8	$99,32 \pm 7,14$	$40,21 \pm 1,43$	$80,62 \pm 1,28$	$6,41 \pm 1,23$
1	$110,46 \pm 4,32$	$38,33 \pm 1,12$	$59,36 \pm 1,53$	$5,85 \pm 1,57$

Hình thái và cấu trúc hạt Ap-mixen-PTX

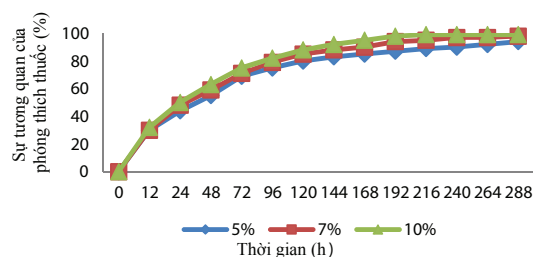
Ảnh SEM và TEM hạt Ap-mixen-PTX với nồng độ PTX 0,4 mg/ml đều cho thấy hạt có dạng hình cầu, khá đồng nhất với kích thước trung bình xấp xỉ 86,2 nm, phù hợp với kết quả ở phần trên (hình 5). Đặc biệt từ ảnh TEM cho thấy PTX được đóng gói chặt bên trong hình cầu (hình 5B). Đó là nhờ khả năng tương tác kỵ nước của PTX xếp vào bên trong lõi khi quá trình tự lắp ráp của mixen xảy ra, vì thế cấu trúc của các mixen được ổn định.



Hình 5. Ảnh SEM (A) và TEM (B) của hạt Ap-mixen-PTX.

Sự phóng thích thuốc của phức hệ hạt Ap-mixen-PTX trong in vitro

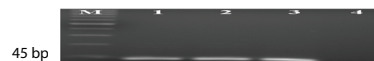
Dung dịch hạt Ap-mixen-PTX được sử dụng làm thí nghiệm có nồng độ 5, 7 và 10%. Sau 12 giờ làm thí nghiệm, các hạt Ap-mixen-PTX phóng thích PTX đạt từ 29 đến 35%, đến ngày thứ 12 (288 giờ) đạt 85-93% ở pH 7,5. 12 giờ đầu tiên ghi nhận sự phóng thích nhanh lượng lớn PTX do sự rạn vỡ cấu trúc. Sau đó sự phóng thích PTX tăng lũy tiến theo thời gian tiếp xúc với PBS, pH 7,5. Sự phóng thích bình nguyên xảy ra ở ngày thứ 6, sự phóng thích PTX tương đối ổn định, gần đạt mức cực đại (hình 6).



Hình 6. Sự phóng thích PTX trong PBS, pH 7,5.

Sự phóng thích Ap của phức hệ hạt Ap-mixen-PTX trong in vitro

Đây là thí nghiệm đánh giá khả năng gắn của Ap trên phức hệ hạt Chi-TPP-PF. Ap gắn vào phức hệ hạt mixen được ủ trong dung dịch heparin, là dung dịch cạnh tranh anion. Nhìn chung, các kết quả cho thấy Ap gắn chặt chẽ và hiệu quả trên phức hệ hạt. Tuy nhiên, nó không phải là liên kết bền vững mà có thể bị phá vỡ khi mạng lưới cấu trúc polymer của phức hệ hạt bị tác động.

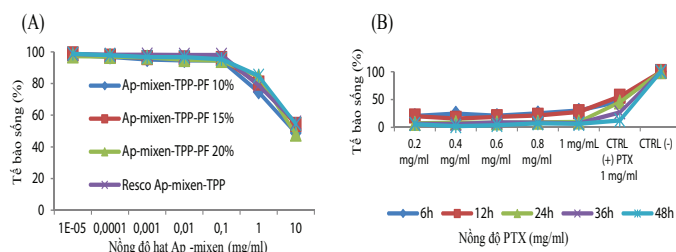


Hình 7. Điện di gel agarose sản phẩm khi ủ phức hệ Ap-mixen trong dung dịch heparin cạnh tranh ion. Giếng M: Thang đo DNA 100 bp; giếng 1: Ủ trong 1h; giếng 2: Ủ trong 4h; giếng 3: Ap tự do; giếng 4: Nước cất.

Kết quả phân tích điện di ở hình 7, Ap dễ dàng bị phá vỡ liên kết với phức hệ hạt khi có sự hiện diện của heparin. Ap tự do được sử dụng làm chứng dương trong thí nghiệm. Có sự cạnh tranh với Ap trong sự gắn kết PF, làm cho cấu trúc không ổn định. Kết quả này đã chứng minh rằng, Ap gắn với các phức hệ không chỉ đơn giản là qua quá trình trung gian tương tác ion, mà đúng hơn là Ap nổi kẹt trong mạng lưới polyme được hình thành bởi liên kết ngang. Như vậy, từ kết quả chụp TEM (hình 5B) và thí nghiệm cạnh tranh anion trong dung dịch heparin cho thấy rằng, trong phức hệ hạt cấu trúc TPP-PF làm Ap vướng mắc vào trong phức hệ.

Khả năng gây độc tế bào của phức hệ hạt Ap-mixen-PTX

Khảo sát khả năng gây độc tế bào của các hạt Ap-mixen không bao và bao PTX 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 mg/ml, dung dịch PTX 1 mg/ml tự do bằng phương pháp MTT trên tế bào ung thư vú SK-BR-3 (hình 8).



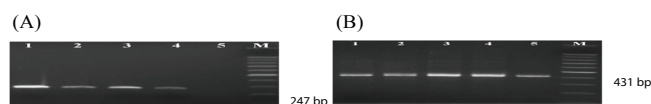
Hình 8. Sự ảnh hưởng của hạt Ap-mixen không mang thuốc (A) và bao thuốc PTX (B) lên sự sống của tế bào SK-BR-3 (n = 4).

Với các loại hạt Ap-mixen khác nhau không mang thuốc, chúng không có sự khác biệt nhiều trong quá trình gây độc chết tế bào sau 6, 12, 24, 36 và 48 giờ. Tế bào vẫn sống bám đáy và tăng sinh tốt. Có thể kết luận, các hạt Ap-mixen liên kết gắn TP-PF không có khả năng gây độc chết tế bào. Các hạt Ap-mixen không mang PTX đã được chứng minh là có tác dụng gây độc tối thiểu và chúng không phá vỡ tế bào (IC50: 7,3-9,5 mg/ml). Các liều IC50 của PTX tự do chống lại tế bào SK-BR-3 là 0,73 μ g/ml, cao hơn phức hệ Ap-mixen bao PTX (0,05-0,11 μ g/ml) 7 lần. Mặt khác, hạt Ap-mixen không mang thuốc xử lý đông khô lưu trữ (Resco Ap-mixen-TPP, Resco Ap-mixen-TPP-PF), khi hoàn nguyên trong nước cất vô trùng, chúng vẫn không gây độc với tế bào (hình 8A).

Với hạt Ap-mixen bao PTX 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 và 1 mg/ml, tỷ lệ tế bào SK-BR-3 chết tương ứng là 75-88%; 89-93%; 78-88%; 74-86% và 69-84% sau 6-48 giờ. Vách bị phá hủy dẫn đến tế bào bị vỡ hàng loạt sau 6 giờ (hình 8B).

PTX là thuốc kháng ung thư kỵ nước, vì vậy chúng cần được vận chuyển qua màng tế bào để vào tế bào. Các tế bào có thể hấp thụ các phức hệ mixen qua đường xâm nhập xuyên màng. Do đó, các phức hệ Ap-mixen hoạt động như hệ thống phân phối thuốc tạo điều kiện đưa thuốc vào và tích lũy chúng bên trong tế bào. Với dung dịch thuốc PTX 1 mg/ml tự do, tỷ lệ tế bào chết chiếm 13-14%. Các phân tử thuốc PTX tự do xâm nhập vào tế bào không hiệu quả.

Tiến hành thí nghiệm về tác động của hạt Ap-mixen bao PTX 0,4 mg/ml đến mức độ biểu hiện gen HER-2 (247 bp) và Beta-actin (431 bp) từ mRNA trên dòng tế bào SK-BR-3 sau 6-48 giờ. Sau 6 giờ, mức độ biểu hiện gen HER-2 mạnh và giảm dần theo thời gian tiếp xúc 48 giờ ($P < 0,01$) (hình 9A). Ở thời gian tiếp xúc 6-48 giờ đều có sự biểu hiện gen Beta-actin mạnh ($P < 0,05$) (hình 9B). Với kết quả này, có thể khẳng định khả năng hiệu quả đặc hiệu của phức hệ hạt đối với các mức độ biểu hiện thụ thể HER-2 trên dòng tế bào SK-BR-3, không có sự biểu hiện protein nào khác trên bề mặt các tế bào.



Hình 9. Sự biểu hiện gene HER2 và Beta-actin ở dòng tế bào SK-BR-3 khi tiếp xúc hạt Ap-mixen bao PTX 0,4 mg/ml sau 6-48h. RNA tổng số từ các tế bào SK-BR-3 được chuyển mã thành cDNA. Gen HER2 và Beta-actin được nhân lượng bằng PCR. Các sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5%. Giếng M là thang đo DNA 100 bp. Phân đoạn gen HER2- 247 bp (A) được nhân lượng từ giếng 1: 6h, giếng 2: 12h, giếng 3: 24h, giếng 4: 36h và giếng 5: 48h. Phân đoạn gen Beta-actin 431 bp (B) được nhân lượng từ giếng 1: 6h, giếng 2: 12h, giếng 3: 24h, giếng 4: 36h và giếng 5: 48h.

Kết quả của các thí nghiệm về khả năng gây độc của phức hệ hạt chế tạo được ở trên cho thấy, phức hệ hạt có khả năng tương thích sinh học cao và được dùng như hệ dẫn truyền thuốc chống ung thư.

Kết luận

Bước đầu chúng tôi đã nghiên cứu thành công quy trình chế tạo các hạt mixen bằng phương pháp tạo gel ion sử dụng Chi, TPP và PF. Kết quả đã tạo được hạt Ap-mixen-PTX có dạng hình cầu, khá đồng nhất, kích thước trung bình 86,22 nm và thế zeta 60,12 mV. Khả năng đóng gói 83% và khả năng mang tải thuốc 9%. Chọn lọc được Ap đích theo quy trình SELEX, có số lượng phong phú và ái lực liên kết đặc hiệu với các tế bào SK-BR-3 biểu hiện mạnh HER-2. Ap đích có chiều dài 45 nucleotide và tỷ lệ C-G chiếm ~ 82%. Nghiên cứu thành công quy trình gắn chúng vào hệ hạt mixen đã tạo ra. Bước đầu đánh giá khả năng dẫn truyền thuốc của hạt Ap-mixen-PTX lên dòng tế bào ung thư vú SK-BR-3 cho thấy, chúng có khả năng gây độc tế bào khoảng 89-93% và đạt hiệu quả hơn gấp 7 lần so với dung dịch thuốc PTX tự do.

Những kết quả trong nghiên cứu đã chứng minh các hạt Ap-mixen-PTX khối đồng polymer có tính tương thích sinh học và có tiềm năng sử dụng làm hệ dẫn truyền thuốc chống ung thư.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] F.A. Moghaddam, F. Atyabi, R. Dinarvand (2009), "Preparation and in vitro evaluation of mucoadhesion and permeation enhancement of thiolated chitosan-pHEMA core-shell nanoparticles", *Nanomedicine*, **5**(2), pp.208-215.
- [2] W. Yanrong, S. Kwame, L. Haipeng, W. Rouwen, T. Weihong (2010), "DNA aptamer-micelle as an efficient detection/delivery vehicle toward cancer cells", *PNAS*, **107**, pp.5-10.
- [3] A.K. Singla, A. Garg, D. Aggarwal (2002), "PTX and its formulations", *Int. J. Pharm.*, **235**(1-2), pp.179-192.
- [4] A.L. Samah, M.A.E.D. Hanaa, H.E. Mostafa, G.A. Nanis, M.T.M. Hasanin, M.A. Ahmed (2016), "Synthesis, characterization and cytotoxic evaluation of chitosan nanoparticles: in vitro liver cancer model", *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.*, **7**(3), 035008.
- [5] S.C. Kim, D.W. Kim, Y.H. Shim, J.S. Bang, H.S. Oh, S. Wan Kim, M.H. Seo (2001), "In vivo evaluation of polymeric micellar PTX formulation: toxicity and efficacy", *J. Control Release*, **72**(1-3), pp.191-202.
- [6] S.K. Bong, E.L. Sang, L.N. Choon, K.K. Jin, S.P. Jeong (2015), "Exploring the preparation of albendazole loaded chitosan tripolyphosphate nanoparticles", *Materials*, **8**, pp.486-498.
- [7] H. Hosniyeh, A. Fatemeh, D. Rassoul, N.O. Seyed (2012), "Chitosan pluronic nanoparticles as oral delivery of anticancer gemcitabine: preparation and in vitro study", *International Journal of Nanomedicine*, **7**, pp.1851-1863.
- [8] G. Zahra, D. Rassoul, M. Fatemeh, E.M. Mehdi, S. Elmira, A. Fatemeh (2014), "Aptamer decorated hyaluronan/chitosan nanoparticles for targeted delivery of 5-fluorouracil to MUC1 overexpressing adeno carcinomas", *Carbohydrate Polymers*, **121**, pp.190-198.
- [9] Pooja Dua, Soyoun Kim, Dong Ki Lee (2008), "Patents on SELEX and therapeutic aptamers", *Recent Patents on DNA & Gene Sequences*, **2**, pp.172-186.
- [10] Kim Thach Nguyen, Duc Vinh Le, Dinh Ho Do, Quang Huan Le (2016), "Development of chitosan graft pluronic®F127 copolymer nanoparticles containing DNA aptamer for PTX delivery to treat breast cancer cells", *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. and Nanotechnol.*, **7**(2), 025018.