

键合紫杉醇纳米胶束对 H22 肝癌小鼠的体内疗效评估

盛世厚^a 于惠秋^a 刘铜军^{a*} 柳 时^b 郑勇辉^b 胡秀丽^b 宋祥福^c

(^a吉林大学中日联谊医院 长春 130033; ^b中国科学院长春应用化学研究所 长春; ^c吉林大学公共卫生学院 长春)

摘 要 以 H22 肝癌的 balb/c 荷瘤小鼠为动物模型,考察了紫杉醇纳米胶束、紫杉醇注射液和生理盐水对小鼠肿瘤的抑制效果。紫杉醇注射液组、紫杉醇纳米胶束低剂量组和紫杉醇纳米胶束高剂量组在给药后 10 d 的肿瘤相对体积抑制率分别为 22%、49% 和 67%,瘤重抑制率分别为 29%、45% 和 47%;蛋白表达检测结果显示,紫杉醇纳米胶束组呈现 p53 的高表达和 bcl-2 的低表达,说明紫杉醇纳米胶束对小鼠 H22 肝癌的抑制作用强于紫杉醇注射液。

关键词 H22 肝癌小鼠,紫杉醇,纳米胶束,键合药

中图分类号:O632

文献标识码:A

文章编号:1000-0518(2011)11-1280-06

DOI:10.3724/SP.J.1095.2011.00734

紫杉醇(PTX)是从红豆杉属植物中分离的天然抗癌活性物质,其抗癌机制是促进微管蛋白聚合形成稳定的微管,抑制微管的解聚,从而抑制癌细胞的增殖,对肺癌、乳腺癌、肝癌和宫颈癌等多种恶性肿瘤具有良好的治疗效果^[1],已经在临床治疗中推广应用^[2]。但因其水溶性很低,临床用注射液是以聚氧乙烯蓖麻油和无水乙醇的混合液溶解药物,对机体有较强的不良反应,如过敏和低血压等^[3],致使临床应用受到很大限制。因此,解决其水溶性和降低其毒副作用备受关注。

过去的几十年,纳米胶束在药物传递方面的研究显示出诸多的优势,如高水溶性、高载药能力、低毒性、血液中的长循环和增加在肿瘤组织的蓄积等^[4]。聚合物键合药是将药物分子用共价键结合到高分子上,在生理条件下药物分子从高分子上解离下来,发挥治疗或诊断的作用。药物与两亲性聚合物键合后可以改善亲油性药物的亲水性,自组装成胶束后,药物一般处于胶束的内核,且与高分子结合牢固,很难通过扩散从胶束中逃逸出来。在高分子的保护下,药物可以免受生理环境中酶和免疫系统的攻击。所以它具有传统物理包埋胶束的优点,又避免了因动力学上的不稳定造成的药物突释,从而提高药物的生物利用度并减少药物的毒副作用^[5]。肝脏是人体内最大的器官,具有非常重要的代谢和解毒功能。中国是世界上乙肝和肝癌患病人数最多的国家,而治疗肝病的药物往往对其它正常器官有非常大的毒副作用,而且药物在循环过程中的寿命较短等均是目前面临的问题。为了解决这类问题,人们研究利用不同的载体对药物进行包埋,以延长药物的血液半衰期,使大部分药物能够到达肝部,发挥药效。为减少其不良反应,提高靶位的药物浓度,人们积极利用相关生物材料对其进行修饰。

本研究选用两亲性生物降解高分子聚乙二醇-b-聚(乳酸-co-碳酸酯)(MPEG-b-P(LA-co-MCC))同紫杉醇(paclitaxel, PTX)键合,制成高分子的前体药物,并将其组装成纳米胶束。紫杉醇是一种脂溶性药物,形成胶束后会增加其在水中的溶解度,延长药物在体内的循环时间,提高生物利用度,降低毒副作用。为探讨其对肿瘤的抑制作用,采用 H22 肝癌荷瘤小鼠进行动物实验,并进行相关检测,以期临床应用提供理论依据。

1 实验部分

1.1 实验材料

Balb/c 雌性小鼠,体重为(20 ± 2) g,购自北京协和医院动物中心。实验用紫杉醇注射液购自北京

华素制药股份有限公司,是紫杉醇在聚氧乙烯蓖麻油/无水乙醇 1:1 的混合溶液中的溶液,浓度 6 g/L,使用前用生理盐水稀释。紫杉醇原料药购自重庆美联制药有限公司,纯度 99.5%。实验用紫杉醇纳米胶束冻干粉由中国科学院长春应用化学研究所景遐斌课题组提供^[6]。其分子结构为 MPEG-b-P(LA-co-MCC/PTX),其中 MPEG(甲氧基聚乙二醇)嵌段的分子量是 5 000,P(LA-co-MCC)(丙交酯与 2-甲基-2-羧基丙二醇碳酸酯的无规共聚物)嵌段的分子量约 1 500,紫杉醇(PTX)与 MCC 上的羧基以酯键相连,质量含量 10%。bcl-2(批号 BS1511)、p53(批号 BS1565)鼠抗单克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司。免疫组织化学染色 UltrasensitiveTMS-P 超敏染色试剂盒(批号 KIT-9710/9720/9730)、浓缩型 DAB 购自福州迈新生物技术开发有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型的建立与分组 抽取在 balb/c 鼠腹腔内传代到第 3 代的 H22 肿瘤腹水,用无菌生理盐水按 1:3 比例稀释后,接种至 balb/c 鼠右后肢皮下,0.1 mL/只。7 d 后,待瘤体积达到 400 mm³左右,选择肿瘤生长良好、无自发性出血坏死的 balb/c 鼠,随机分为 4 组,每组 10 只,分别为生理盐水对照组、紫杉醇注射液组(6 mg/kg)、紫杉醇纳米胶束低剂量组(相当于 PTX 3 mg/kg)、紫杉醇纳米胶束高剂量组(相当于 PTX 6 mg/kg)。采用尾静脉注射,每隔 2 d 给药一次,共给药 4 次。

1.2.2 观察生存时间和由肿瘤体积变化计算肿瘤体积抑制率 给药后动物正常饲养,每天观察动物一般状态,记录生存天数。以平均生存天数(mean survival time)评价每组生存时间,观察至接种后 30 d。每周 2 次测量肿瘤直径(游标卡尺),计算肿瘤体积(V): $V=(ab^2)/2$ (式中, a 为肿瘤长径, b 为肿瘤短径)。比较各组相对肿瘤体积(Relative tumor volume, RTV), $RTV=V_t/V_0$,式中, V_0 为分笼给药当天(Day 0)测量所得肿瘤体积, V_t 为每一次测量时的肿瘤体积。用相对肿瘤体积计算药物对肿瘤体积的抑制率(Tumor volume inhibition rate, VIR):

$$VIR=(1-\frac{RTV_{\text{治疗组}}}{RTV_{\text{阴性对照组}}})\times 100\%。$$

1.2.3 肿瘤重量抑制率 动物模型的建立、分组和给药方法同 1.2.1 节,于给药后的第 3、6 和 10 d 处死动物,完全分离皮下肿瘤组织,称重,计算各组的瘤重抑制率(Tumor weight inhibition rate, WIR):

$$WIR=(1-\frac{\text{治疗组平均瘤重}}{\text{对照组平均瘤重}})\times 100\%。$$

取第 10 d 处死动物的新鲜肿瘤组织,4% 多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,4 μm 厚切片,先行 HE 染色,再贴附于涂有多聚赖氨酸的玻片上,备用于免疫组化染色。

1.2.4 瘤组织 p53、bcl-2 抗原表达检测 采用 SABC 免疫组织化学方法检测^[7]:石蜡切片经常规脱蜡和水化后,抗原微波热修复 10 min,试剂盒中的 p53 抗体和 bcl-2 抗体溶液稀释 50 倍,PBS 代替第一抗体作阴性对照,DAB 显色,苏木精复染,自来水冲洗返蓝,盐酸酒精分化后充分水洗,酒精脱水,二甲苯透明化处理,封固片。细胞质或细胞核着色,阳性染色呈棕黄色颗粒物。利用 CX-Olympus 自动数码图象分析系统对 p53、bcl-2 蛋白表达进行分析,在高倍镜下取 5 个视野,输入分析系统内,计算平均灰度值。

1.2.5 统计学分析 所有数据均用 SPSS13.0 统计软件处理,分别用单因素方差分析、 t 检验。

2 结果与讨论

2.1 生存时间

图 1 给出了生理盐水对照组、紫杉醇注射液组(6 mg/kg)、紫杉醇纳米胶束低剂量组(相当于 PTX 3 mg/kg)、紫杉醇纳米胶束高剂量组(相当于 PTX 6 mg/kg)尾静脉注射给药后,各组的平均生存时间,分别为 10、20、19 和 22 d。与生理盐水注射组相比,紫杉醇及紫杉醇纳米胶束组的平均生存时间均有显著延长($P<0.01$),但纳米胶束组与紫杉醇注射液组之间的差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 相对肿瘤体积和肿瘤体积抑制率

给药后的第 0、6 和 10 d 处死动物,完全分离皮下肿瘤组织,相对肿瘤体积及按相对肿瘤体积计算

的肿瘤体积抑制率见表 1。治疗前 (Day 0) 各组移植瘤的体积差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。给药第 6 d, 紫杉醇注射液组和生理盐水对照组的相对肿瘤体积 RTV 分别为 5.6 ± 1.1 和 6.7 ± 1.3 , 二者之间的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。紫杉醇纳米胶束的低剂量组和高剂量组的相对肿瘤体积分别为 3.3 ± 1.5 和 2.2 ± 0.8 , 二者均明显小于生理盐水对照组 ($P < 0.01$), 其中, 高剂量组 (6 mg/kg) 的 RTV 小于低剂量组 (3 mg/kg) ($P < 0.05$)。给药第 10 d, 生理盐水对照组、紫杉醇注射液组、紫杉醇纳米胶束低剂量组和紫杉醇纳米胶束高剂量组的 RTV 分别为 15.2 ± 3.4 、 11.8 ± 3.6 、 7.7 ± 3.3 和 5.0 ± 1.4 。根据其相对肿瘤体积, 按照 1.1.2 节中的公式计算出 3 个试验组在给药后 6 和 10 d 的相对肿瘤体积抑制率分别为 16%、51%、67% 和 22%、49%、67%。

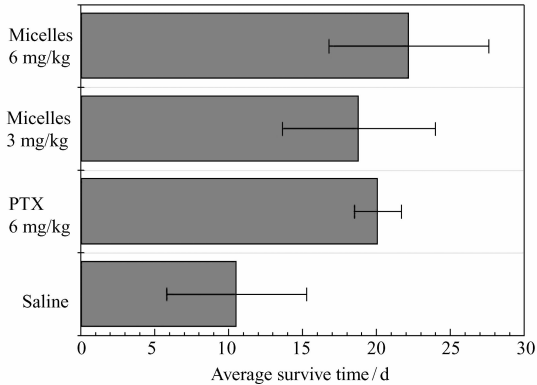


图 1 荷 H22 肿瘤小鼠各治疗组平均生存时间
Fig. 1 Average surviving time of H22 liver cancer mice after drug administration

表 1 H22 肝癌荷瘤小鼠各治疗组移植瘤的相对肿瘤体积
Table 1 Relative tumor volume of H22 liver cancer mice

Group	0 Day		6 Days		10 Days		
	V_t/mm^3	V_t/mm^3	RTV	VIR/%	V_t/mm^3	RTV	VIR/%
Saline	439 ± 147	$2\,942 \pm 1\,022$	6.7 ± 1.3	—	$6\,674 \pm 908$	15.2 ± 3.4	—
PTX (6 mg/kg)	458 ± 169	$2\,564 \pm 938$	5.6 ± 1.1	16	$5\,403 \pm 1\,054$	11.8 ± 3.6	22
Micelles (3 mg/kg)	418 ± 210	$1\,381 \pm 745$	3.3 ± 1.5	51	$3\,219 \pm 1\,841$	7.7 ± 3.3	49
Micelles (6 mg/kg)	467 ± 217	$1\,027 \pm 609$	2.2 ± 0.8	67	$2\,335 \pm 934$	5.0 ± 1.4	67

表 2 显示了各组动物平均瘤重和瘤重抑制率。至治疗第 6 d, 紫杉醇注射液与生理盐水对照组的瘤重差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 紫杉醇纳米胶束组 (3 和 6 mg/kg) 的瘤重则低于生理盐水对照组 ($P < 0.05$), 但低剂量紫杉醇纳米胶束组 (3 mg/kg) 与高剂量紫杉醇纳米胶束组 (6 mg/kg) 的瘤重差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 2)。至治疗第 10 d, 各试验组的瘤重抑制率分别为 29%、45% 和 47%。

表 2 荷 H22 肝癌小鼠各治疗组瘤重和抑瘤率
Table 2 Tumor weight and tumor weight inhibition rate (WIR) of H22 liver cancer mice

Group	3 Days		6 Days		10 Days	
	Tumor mass/g	WIR/%	Tumor mass/g	WIR/%	Tumor mass/g	WIR/%
Saline	1.4 ± 0.2	—	2.2 ± 0.5	—	2.9 ± 0.8	—
PTX (6 mg/kg)	1.1 ± 0.3	18	1.9 ± 0.3	16	2.1 ± 0.7	29
Micelles (3 mg/kg)	0.9 ± 0.5	29	1.6 ± 0.4	27	1.6 ± 0.5	45
Micelles (6 mg/kg)	0.9 ± 0.1	36	1.5 ± 0.4	32	1.5 ± 0.8	47

2.3 p53 和 Bcl-2 的表达

细胞凋亡受阻是肿瘤发病的重要机制之一, 恶性病变是肿瘤细胞丧失自发凋亡反应能力的最终结果。故诱导肿瘤细胞凋亡成为肿瘤治疗研究中的主要目标与手段, 许多抗癌药物正是通过诱发细胞凋亡而发挥抗癌作用, 细胞凋亡已成为评价抗癌药物的重要指标之一。研究表明, 紫杉醇的作用机制是诱导与促进微管蛋白聚合、微管装配, 使微管稳定化而不发生解聚, 打破微管蛋白聚合和解聚之间的平衡, 从而阻止癌细胞生长, 引起凋亡^[8]。研究还表明, 癌细胞的凋亡往往伴随相关蛋白的表达行为的变化, 因而可以通过检测这些蛋白的表达情况来判断细胞凋亡的程度和机制。bcl-2 基因是目前研究较为深入的凋亡调控基因之一, 是线粒体凋亡途径的主要调控因子。bcl-2 及其所编码蛋白能抑制细胞凋亡, 并能在生长因子缺乏时延长细胞存活时间, 甚至使细胞“永生化”。研究表明, 作为凋亡抑制因子, bcl-2 蛋白的高表达与恶性肿瘤的发生、发展密切相关^[9-10]。p53 则是最常见的抑癌基因, 是维持细胞基因稳定和完整的关键因子。p53 主要是通过周期依赖性激酶 2 (cyclin-dependent kinase 2, CDK) 途径阻止细

胞生长,使 DNA 出现损伤的细胞停滞于 G1 期,有利于细胞启动自身修复机制。若 DNA 受损的细胞修复无效,则 p53 可介导细胞凋亡。p53 基因可分为野生型 p53 (wt-p53) 和突变型 p53 (mt-p53) 2 种, wt-p53 参与了 DNA 损伤修复、细胞周期调控、细胞凋亡及抑制血管生成等过程。当 P53 基因突变至结构和功能缺失时,失去对细胞周期的负调控作用,刺激细胞旺盛分裂,最终失去控制并向癌变发展^[11-13]。

所以本研究用免疫组化的方法来考察 p53 蛋白和 bcl-2 蛋白的表达情况。随机选取 5 个视野 (×400),采用 Olympus CX41 生物显微图象分析系统对蛋白表达进行分析,以平均灰度值表示。平均灰

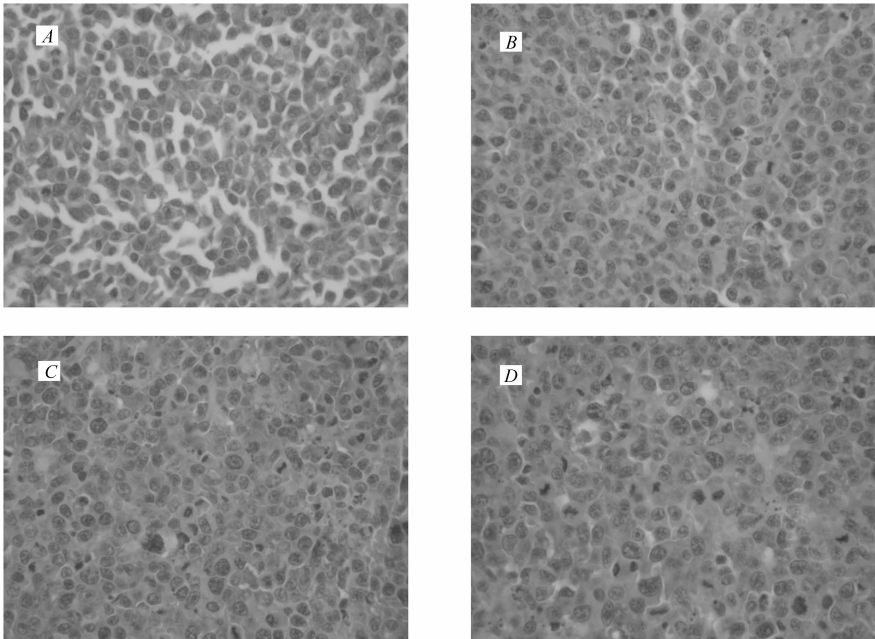


图 2 荷 H22 肝癌小鼠各治疗组肿瘤中 p53 蛋白的表达情况

Fig. 2 p53 expression of H22 liver cancer mice

A. Saline; B. PTX(6 mg/kg); C. Micelles(3 mg/kg); D. Micelles(6 mg/kg)

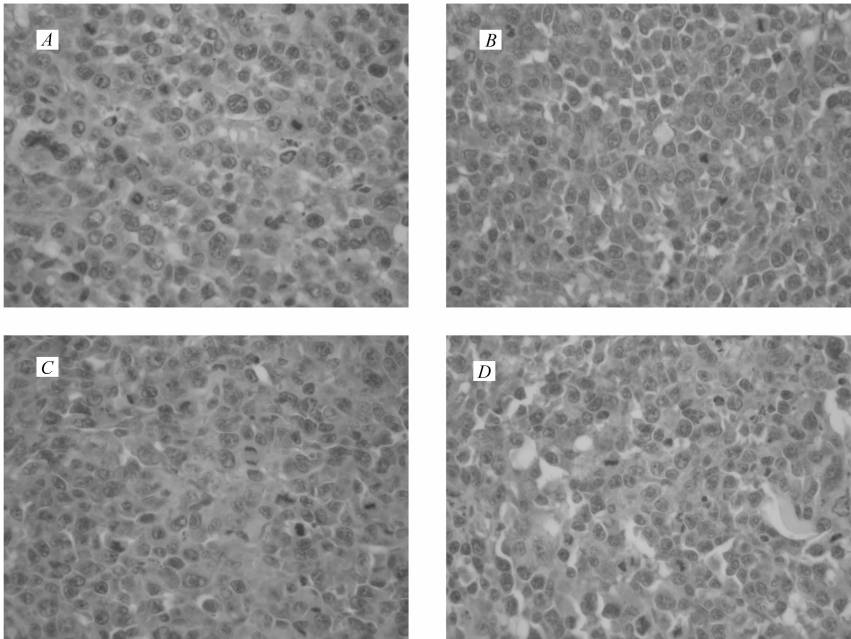


图 3 荷 H22 肝癌小鼠各治疗组肿瘤中 bcl-2 蛋白的表达情况

Fig. 3 bcl-2 expression of H22 liver cancer mice

A. Saline; B. PTX(6 mg/kg); C. Micelles(3 mg/kg); D. Micelles(6 mg/kg)

度值大(染色强度弱、透光度强)表明蛋白表达减弱,反之则表达增强。结果显示,p53 蛋白在生理盐水对照组肿瘤中阳性表达较弱,6 mg/kg 紫杉醇纳米胶束组中 p53 蛋白的表达比生理盐水对照组、紫杉醇注射液和 3 mg/kg 紫杉醇纳米胶束组强($P < 0.01$)(表 3,图 3)。而 bcl-2 蛋白在生理盐水对照组肿瘤中阳性表达较强,6 mg/kg 紫杉醇纳米胶束组中 bcl-2 蛋白的表达弱于其它各组($P < 0.01$)。

表 3 p53、bcl-2 在荷 H22 肝癌小鼠肿瘤中阳性表达的比较
Table 3 p53 and bcl-2 expression of H22 liver cancer mice

Group	<i>n</i>	p53	bcl-2
Saline	6	197.0 ± 4.7	116.0 ± 3.9
PTX(6 mg/kg)	6	172.0 ± 1.6	133.6 ± 3.8
Micelles(3 mg/kg)	6	156.4 ± 2.7	162.0 ± 2.9
Micelles(6 mg/kg)	6	133.2 ± 2.8	196.4 ± 4.7

Note;*n* is the number of mice.

3 结 论

本研究针对抗癌药紫杉醇水溶性差和过敏性等弱点,利用紫杉醇与侧链含有羧基的双亲性嵌段聚合物 MPEG-b-P(LA-co-MCC)共价键合并进一步自组装的方法,制备了核-壳结构的纳米胶束,紫杉醇被包裹在胶束的内部,聚乙二醇形成胶束的壳,其中的紫杉醇含量为 10%。以 H22 肝癌的 balb/c 荷瘤小鼠为动物模型,通过测量给药后小鼠的肿瘤相对体积抑制率、瘤重抑制率、p53 和 bcl-2 蛋白表达情况,考察了紫杉醇纳米胶束、紫杉醇注射液和生理盐水对小鼠肿瘤的抑制效果。

实验研究结果亦表明,紫杉醇对 H22 肿瘤生长有明显抑制作用,而键合紫杉醇的纳米胶束的抗肿瘤效果更为明显。以高剂量组疗效最佳,给药 10 d 后,其肿瘤体积抑制率为 67%,肿瘤重量抑制率为 47%,分别是紫杉醇注射液相同剂量组的 3.0 和 1.6 倍。

近来研究表明,许多抗癌药物通过诱发细胞凋亡而发挥作用,细胞凋亡已成为评价抗癌药物的重要指标之一。本实验发现,紫杉醇纳米胶束高剂量组的 bcl-2 蛋白阳性表达明显低于其它治疗组,而 p53 蛋白的阳性表达均明显高于其它治疗组,这些结果提示键合紫杉醇的纳米胶束较紫杉醇注射液可以更加显著地下调 bcl-2 蛋白的表达,上调 p53 蛋白的表达,并呈剂量依赖性,从而促进细胞凋亡,延迟或者阻滞癌的演进。

参 考 文 献

[1] WANG Xiaojun,XU Xiaoyi,LIU Guojin,*et al.* Inhibition of the Proliferation of Lewis Lung Cancer Cells by PEG-PLA-paclitaxel Conjugate Micelles Nanometer Particle[J]. *Guangdong Med J*,2007,**28**(2):175-177(in Chinese).
王晓军,徐效益,刘国津,等. 化学键合紫杉醇纳米微粒对 Lewis 肺癌细胞株的增殖抑制作用[J]. *广东医学*,2007,**28**(2):175-177.

[2] Rowinsky E K,Donehower R C. Drug-therapy-paclitaxel(taxol)[J]. *New Engl J Med*,1995,**332**:1004-1014.

[3] Kwon G S,Kaoka K. Block Copolymer Micelles as Long Circulating Drug Vehicles[J]. *Adv Drug Delivery Rev*,1995,**16**:295-309.

[4] Lee J,Cho E C,Cho K. Incorporation and Release Behavior of Hydrophobic Drug in Functionalized Poly(*D,L*-lactide)-block-poly(ethylene oxide) Micelles[J]. *J Controlled Release*,2004,**94**(3):323-335.

[5] JING Xiabin,XIE Zhigang, LV Changhai,*et al.* Amphiphilic Triblok Copolymer-paclitaxel Conjugated and Synthesis Methods;CN,200610131690. X[P],2007-05-16(in Chinese).
景遐斌,谢志刚,吕常海,等. 两亲性三嵌段共聚物-紫杉醇键合药及其合成方法:中国,200610131690. X[P],2007-05-16.

[6] He Min,Wang Kaiyu,Zhang Yu. Immunocytochemical Identification and Localization of Diffuse Neuroendocrine System (DNES) Cells in Gastrointestinal Tract of Channel Catfish(*Ictalurus punctatus*)[J]. *Agric Sci China*,2009,**8**(2):238-243.

[7] Fromes Y,Gounon P,Veitia R,*et al.* Influence of Microtubule-associated Proteins on the Differential Effects of Paclitaxel

and Docetaxel[J]. *J Protein Chem*,1996,**15**(4):377-388.

[8] DENG Jian,LIU Yunpeng. Progress of Bcl-2, Bax in Gastric Cancer[J]. *Chinese J Modern Drug Appl*,2007,**12**(11):101-102(in Chinese).

邓俭,刘云鹏. Bcl-2、Bax 在胃癌中的研究进展[J]. *中国现代药物应用*,2007,**12**(11):101-102.

[9] Buchholz T A,Garg A K,Chakravarti N,*et al.* The Nuclear Transcription Factor B/bcl-2 Pathway Correlates with Pathologic Complete Response to Doxorubicin-based Neoadjuvant Chemotherapy in Human Breast Cancer[J]. *Clin Cancer Res*,2005,**11**(11):8398-8402.

[10] Nayak S K,Panesar P S,Kumar H. p53-Induced Apoptosis and Inhibitors of p53[J]. *Current Medicinal Chem*,2009,**16**(21):2627-2640.

[11] Mercer W E. Cell Cycle Regulation and the p53 Tumor Suppress or Protein[J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*,1992,(2):251-263.

[12] Mazzatti D J,Lee Y J,Helt C E. p53 Modulates Radiation Sensitivity Independent of p21 Transcriptional Activation[J]. *Am J Clin Oncol*,2005,**28**(1):43-50.

Anti-tumor Activity of Biodegradable Polymer-Paclitaxel Conjugate Micelles on H22 Liver Cancer Mice Models

SHENG Shihou^a, YU Huiqiu^a, LIU Tongjun^{a*}, LIU Shi^b, ZHENG Yonghui^b, HU Xiuli^b, SONG Xiangfu^c
(^a*China-Japan Union Hospital of Jilin University, Changchun 130033;*
^b*State Key Laboratory of Polymer Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022;*
^c*Institute of Public Health, Jilin University, Changchun*)

Abstract The anti-tumor effects of the polymer-paclitaxel conjugate micelles and free paclitaxel on H22 liver cancer bearing mice were evaluated. After 10 days drug administration, the tumor volume inhibition rates (VIR) of free paclitaxel group, polymer-paclitaxel conjugate micelles group at doses of 3 mg/kg, and the micelles group at doses of 6 mg/kg are 22% , 49% , and 67% , respectively. In addition, the tumor weight inhibition rates (WIR) are 29% , 45% , and 47% , respectively. Protein expression results show that paclitaxel micelles group has higher expression of p53 and lower expression of bcl-2. All these results indicate that the anti-tumor effect of polymer-paclitaxel conjugate micelles is stronger than free paclitaxel.

Keywords H22 liver cancer mice, paclitaxel, nano-micelles, conjugate drug