

# 多烯紫杉醇主动靶向脂质体 对 S180 肉瘤细胞小鼠移植瘤生长的影响

李翔<sup>1,2</sup>, 罗晓健<sup>1</sup>, 王东凯<sup>2</sup>, 潘卫三<sup>2\*</sup>, 张婧<sup>1\*</sup>

(1. 江西中医药大学 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330006;

2. 沈阳药科大学 药学院, 沈阳 110016)

**[摘要]** **目的:**研究叶酸受体多烯紫杉醇主动靶向脂质体(FA-PDCT-L)对 S180 肉瘤细胞小鼠移植瘤的抑制作用及体内毒性。**方法:**利用自制两亲性嵌段共聚物叶酸-聚乙二醇-聚胆固醇氰基丙烯酸脂(FA-PEG-PCHL)修饰 FA-PDCT-L, 采用激光共聚焦显微镜检测脂质体与 MCF-7 细胞的结合机制;建立 S180 肉瘤细胞小鼠皮下移植瘤动物模型,随机分为 DCT 注射液(DCT-I)、未修饰 DCT 脂质体(DCT-L)和 FA-PDCT-L 和模型组(生理盐水),按  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  尾静脉注射给药,观察小鼠移植瘤生长变化并计算抑瘤率;采用 TUNEL 法测定细胞凋亡;观察各组动物肝功能及骨髓抑制血液生化指标。**结果:**FA-PDCT-L 与 MCF-7 细胞的结合量明显高于其他试验组。与模型相比,DCT-I,DCT-L 和 FA-PDCT-L 组小鼠瘤体体积均减少,其中 FA-PDCT-L 的作用最为显著,抑瘤率 79.03%,凋亡指数(45.7 ± 3.4)%。FA-PDCT-L 组动物的肝功能及骨髓抑制生化指标均与空白组无显著差异。**结论:**FA-PDCT-L 通过 FA-PEG-PCHL 介导的细胞内化使脂质体进入细胞,显示出了比市售 DCT-I 更好的抗肿瘤疗效和更低的毒性。

**[关键词]** 多烯紫杉醇;主动靶向脂质体;抗肿瘤活性;毒性;香豆素 6

**[中图分类号]** R283.6;R945;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)12-0077-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015120077

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150428.1017.008.html>

**[网络出版时间]** 2015-04-28 10:17

**Inhibitory Effect of Active Targeting Docetaxel-loaded Liposomes on S180 Cell Transplanted Tumor in Mice** LI Xiang<sup>1,2</sup>, LUO Xiao-jian<sup>1</sup>, WANG Dong-kai<sup>2</sup>, PAN Wei-san<sup>2\*</sup>, ZHANG Jing<sup>1\*</sup> (1. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China; 2. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study inhibitory effect of folate receptor active targeting docetaxel-loaded liposomes (FA-PDCT-L) on S180 cell transplanted tumor and its *in vivo* toxicity in mice. **Method:** A self synthesized amphiphilic copolymer, folate-poly (PEG-cyanoacrylate-co-cholesteryl cyanoacrylate) (FA-PEG-PCHL) was used as liposomal modifying material to form FA-PDCT-L. Confocal laser scanning microscopy was adopted to detect affinity between liposomes and MCF-7 cells. Subcutaneous transplanted model of S180 sarcoma was made. Tumor mice were randomized into 4 groups, such as docetaxel (DCT) injection (DCT-I), unmodified DCT-loaded liposomes (DCT-L), FA-PDCT-L and model group (saline), dosages were  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  through tail vein. Tumor weight and inhibition rate of tumor were detected at the end of experiments, tumor cell apoptosis was analyzed by TUNEL. Hepatic function and hematology assay for myelosuppression were evaluated. **Result:**

**[收稿日期]** 20140926(011)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81202927);江西省教育厅青年基金项目(GJJ12536);江西省科技支撑计划项目(20123BBG70181);江西省青年科学基金项目(20132BAB215022,20122BAB215018);江西省卫生厅中医药科研计划项目(2012A157)

**[第一作者]** 李翔,博士,副教授,从事中药新剂型研究,Tel:0791-87119650,E-mail:sterlinghawk@126.com

**[通讯作者]** \*潘卫三,博士,教授,从事药物新剂型的研究与开发,Tel:024-23986313,E-mail:ppwss@163.com;

\*张婧,博士,副教授,从事中药新剂型研究,Tel:0791-87119027,E-mail:evens\_zhang@163.com

FA-PDCT-L had better affinity to cells than the other two reference preparation. Compared with model group, weight of tumor in DCT-I, DCT-L and FA-PDCT-L were decreased, especially for FA-PDCT-L, its inhibitory rates was 79.03% with apoptosis index at  $(45.7 \pm 3.4)\%$ . There was no significant difference of hepatic function and hematology assay between the FA-PDCT-L group and the blank group. **Conclusion:** FA-PDCT-L is internalized into cells by mediation of FA-PEG-PCHL with better anti-tumor activity and lower *in vivo* toxicity by compared with DCT-I.

[**Key words**] docetaxel; active targeting liposomes; anti-tumor activity; toxicity; coumarin 6

多烯紫杉醇 (docetaxel, DCT) 是由欧洲浆果紫杉的针叶中提取的无活性化合物半合成的紫杉醇衍生物,是非小细胞肺癌单药治疗和联合化疗中最有效的药物之一,也是蒽环类耐药乳腺癌二线治疗中最有效的药物。DCT 具有较大的毒副作用,如骨髓抑制、胃肠道反应、肝功损害、液体潴留等<sup>[1]</sup>。上市剂型多烯紫杉醇注射用浓溶液中含有的大量聚山梨酯-80 可干扰 P2 蛋白表达,产生严重过敏反应。目前文献报道的 DCT 改进给药系统较多,尤其是脂质体<sup>[2]</sup>。前期选择自制的叶酸-聚乙二醇-聚胆固醇氰基丙烯酸酯 [folate-poly (polyethylene glycol-cyanoacrylate-co-cholesteryl cyanoacrylate), FA-PEG-PCHL] 为脂质体修饰材料,采用有机溶剂注入法制备了 FA-PEG-PCHL 修饰的多烯紫杉醇脂质体 (FA-PEG-PCHL-modified DCT-loaded liposomes, FA-PDCT-L)。本实验拟建立 S180 肉瘤细胞小鼠皮下移植瘤动物模型,考察 FA-PDCT-L 的疗效与毒性,为该叶酸介导的主动靶向给药系统的抗癌作用研究提供技术支撑和基础研究资料。

## 1 材料

LSM 710 型共聚焦激光成像仪 (德国蔡司公司), XSP-13 型荧光显微镜 (上海豫光仪器有限公司), Sysmex F-820 型自动血球计数仪 (日本希森美康公司)。多烯紫杉醇 (宁波市医药技术研究所, 批号 20091034), 叶酸-聚乙二醇-聚胆固醇氰基丙烯酸酯 [FA-PEG-PCHL, 相对分子质量  $(6388 \pm 115)$  kDa, 多分散系数 1.4, 自制], 大豆磷脂 (S100, 上海艾韦特医药科技有限公司, 纯度 > 95%), 胆固醇 (上海艾韦特医药科技有限公司, 纯度  $\geq 99\%$ ), 未修饰多烯紫杉醇脂质体 (DCT-L, 自制), FA-PEG-PCHL 修饰的多烯紫杉醇脂质体 (FA-PDCT-L, 自制)<sup>[3]</sup>, 多烯紫杉醇注射用浓溶液 (DCT-I,  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 英国 Aventis Pharma Dagenham), 洛斯维 (RPMI) 1640 无叶酸培养基 (美国 Hyclone 公司), 胎牛血清 (FBS, 美国 Gibco 公司), 胰酶 (北京索莱宝科技有限公司), 碘化丙啶 (PI) 和香豆素 6 (COU-6) 均购自

美国 Sigma Aldrich, TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (TdT-mediated dUTP nick end labeling, 美国 Promega 公司), 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI, 美国 Burlingame Vector 实验室), 人乳腺癌细胞系 MCF-7 (中国科学院细胞库), 小鼠腹水瘤细胞 S180 (沈阳药科大学药理教研室), 其他试剂均为分析纯。

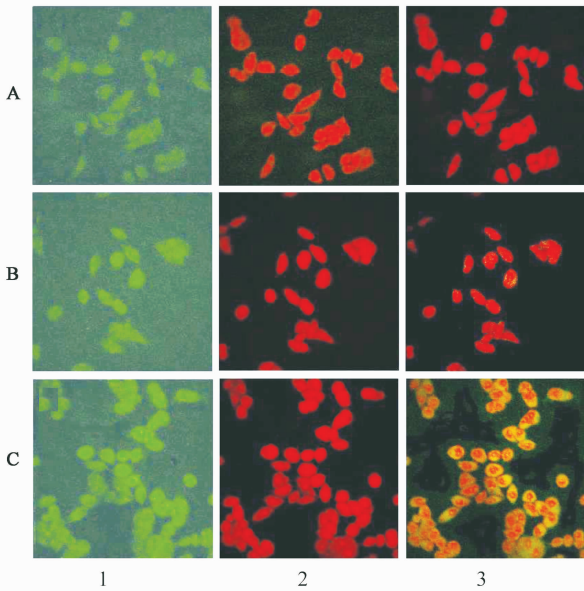
SPF 级昆明种小鼠, 体重 25 ~ 28 g, 雌雄各半, 由沈阳药科大学实验动物中心提供, 合格证号 SCXK (辽) 2009-008。

## 2 方法与结果

**2.1 FA-PDCT-L 对 MCF-7 细胞的亲和力** 以 COU-6 为荧光标记代替 DCT。COU-6 溶液配制方法同 DCT 市售注射液 (将 COU-6 溶于乙醇和聚山梨酯 80 后, 加生理盐水稀释至所需浓度)。COU-6 标记的普通脂质体 (COU-L) 和 FA-PEG-PCHL 修饰的脂质体 (FA-PCOU-L) 制备方法分别与 DCT-L 和 FA-PDCT-L 的制备方法相同<sup>[2]</sup>。各组制剂中 COU-6 质量浓度均为  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。将 MCF-7 细胞以密度  $1.0 \times 10^6$  个/mL 接种于铺有载玻片的 6 孔板中, 于 5%  $\text{CO}_2$ , 37 °C 的培养箱中培养 24 h, 将 COU-6 溶液, COU-L 及 FA-PCOU-L 经 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤除菌, 各取 50  $\mu\text{L}$  加入孔中, 分别于 5%  $\text{CO}_2$ , 37 °C 的培养箱中培养 2 h。取出后用磷酸盐缓冲液清洗 3 次, 加入 4% 多聚甲醛 100  $\mu\text{L}$  室温固定 10 min, 每孔加入 20  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  PI 染液, 摇匀, 室温避光染色 30 min。取出载玻片于共聚焦激光扫描显像观察, 异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 通道 COU-6 激发波长 485 nm, 发射波长 538 nm, PI 通道 PI 激发波长 488 nm, 发射波长 615 nm, 拍照记录, 见图 1。结果显示 FA-PCOU-L 组的 COU-6 荧光强度显著高于其余 2 组, 提示 FA-PEG-PCHL 能够介导脂质体进入细胞。

## 2.2 FA-PDCT-L 对 S180 腹水瘤的抑瘤率

**2.2.1 肿瘤模型制备**<sup>[4-6]</sup> 低温冰箱中取出冻存的 S180 细胞, 于 37 °C 水浴中复苏。复苏后的 S180



1. FITC 通道; 2. PI 通道; 3. 双通道合并; A. COU-6 溶液; B. COU-L; C. FA-PCOU-L

图 1 香豆素 6 溶液及其脂质体与 MCF-7 细胞亲和机制的荧光标记  
Fig. 1 Affinity mechanism labeling of coumarin 6 solution and its liposomes with MCF-7 cells

表 1 多烯紫杉醇各组制剂对 S180 荷瘤小鼠的抑瘤作用

Table 1 Anti-tumor effect of docetaxel preparations on S180 tumor bearing mice

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	小鼠数/只		体重/g		瘤重/g	抑瘤率/%
		试验前	试验后	试验前	试验后		
模型	-	10	10	24.90 ± 2.19	20.59 ± 2.96 <sup>4</sup>	1.24 ± 0.29	-
DCT-I	10	10	9	24.50 ± 2.24	17.97 ± 0.90 <sup>4</sup>	0.59 ± 0.17 <sup>1,4)</sup>	52.42
DCT-L	10	10	9	25.56 ± 2.43	18.34 ± 1.32 <sup>4</sup>	0.55 ± 0.26 <sup>1,4)</sup>	55.65
FA-PDCT-L	10	10	10	25.59 ± 2.73	24.13 ± 2.12	0.26 ± 0.06 <sup>1,2,3)</sup>	79.03 <sup>2,3)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup>P < 0.05,与 DCT-I 组比较<sup>2)</sup>P < 0.05,与 DCT-L 组比较<sup>3)</sup>P < 0.05,与 FA-PDCT-L 组比较<sup>4)</sup>P < 0.05。

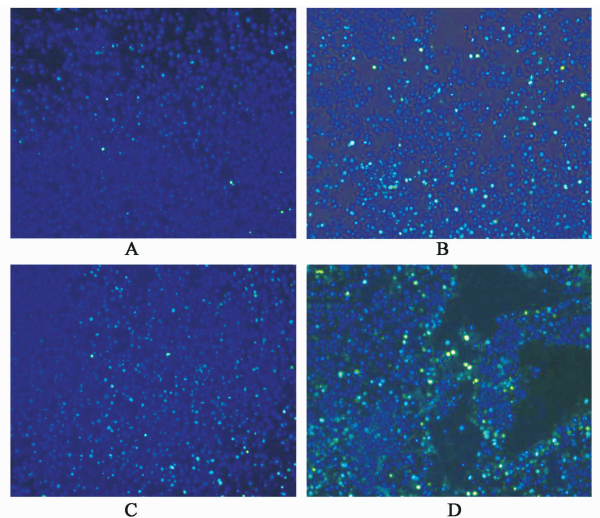
**2.3 TUNEL 法检测细胞凋亡** 第 12 天给药结束后取皮下移植瘤组织剪成约 1 mm<sup>3</sup> 大小,固定于 10% 中性福尔马林中,石蜡包埋切片。按 TUNEL 检测试剂盒说明书操作检测各试验组和模型组的凋亡情况,见图 2。凋亡细胞经 FITC 通道观测显绿色,细胞核经 DAPI 染色显蓝色。在荧光显微镜下随机选 10 个高倍视野 × 20 计数凋亡细胞数和凋亡指数(凋亡细胞占细胞总数的比例,apoptosis index, AI)。结果显示模型组,FA-PDCT-L 组的 AI 分别为 (1.8 ± 0.9)% 和 (45.7 ± 3.4)%,显著高于 DCT-I 组 (22.4 ± 2.6)% 及 DCT-L 组 (19.5 ± 3.1)%。

**2.4 病理生化指标测定** 第 12 天给药结束时,选取试验组及空白组小鼠各 5 只,摘取小鼠眼球取外周血,收集全血后一部分用血球计数仪进行红细胞 (red blood cells, RBC) 计数、白细胞 (white blood cells, WBC) 计数、血小板 (platelets, PLT) 计数、平均

细胞悬液加生理盐水稀释,按 0.2 mL/个接种于小鼠腹腔内,待小鼠腹部明显隆起时,无菌条件下抽取腹水,活细胞计数后加生理盐水稀释至 1 × 10<sup>8</sup> 个/mL。将腹水稀释液按 0.2 mL/个接种于小鼠右侧腋下,每日观察小鼠状态,称重。

**2.2.2 抑瘤率评价** 待小鼠成瘤后 [肿瘤垂直相交直径乘积的开方 (MTD<sup>1/2</sup>) 达 4 ~ 7 mm], 选取符合条件的小鼠 40 只,称重,随机分为 4 组,包括模型组 (生理盐水), DCT-I 组, DCT-L 组和 FA-PDCT-L 组,均按 10 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 尾静脉注射给药,每 3 d 给药 1 次,给药后小鼠正常饲养,每日观察肿瘤生长变化及小鼠体重,接种后第 12 天处死,剥离肿瘤组织并称量<sup>[2]</sup>,计算抑瘤率,见表 1。结果 DCT-L 表现出与 DCT-I 相似的抑瘤率,而修饰脂质体组的抑瘤率显著高于其余 3 组,说明 FA-PDCT-L 具有较普通溶液和普通脂质体更好的抗癌效果。

$$\text{抑瘤率} = (\text{模型组平均瘤重} - \text{给药组平均瘤重}) / \text{模型组平均瘤重} \times 100\%$$



A. 模型组; B. DCT-I; C. DCT-L; D. FA-PDCT-L

图 2 多烯紫杉醇各制剂组 TUNEL 检测 (× 20)

Fig. 2 TUNEL detection of different docetaxel preparations (× 20)

血红蛋白 (hemoglobin, HGB) 浓度、红细胞压积 (hematocrits, HCT); 其余全血经  $400 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min, 取上清液测定丙氨酸转移酶 (alanine aminotransferase, ALT), 天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST), 见表 2。结果发现

除 DCT-I 组外, 其余各组的肝功能生化指标 ALT, AST 均在正常范围内, DCT-I 组小鼠显示肝组织损伤。与空白组相比, DCT-I 组 WBC 数显著降低, DCT-L 及 FA-PDCT-L 组的血液分析与空白组无显著差别。

表 2 多烯紫杉醇各制剂组对血液分析、肝功能生化指标的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 2 Effects of docetaxel preparations on hematology assay and hepatic function biomarkers ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	ALT	AST	RBC × 10 <sup>12</sup>	WBC × 10 <sup>9</sup>	PLT × 10 <sup>9</sup>	HGB	HCT
		/U·L <sup>-1</sup>	/U·L <sup>-1</sup>	/L	/L	/L	/g·L <sup>-1</sup>	/%
空白	-	55.6 ± 3.6	188 ± 23.1	(9.4 ± 0.9) × 10 <sup>-3</sup>	6.6 ± 1.3	798.2 ± 130.7	1 276 ± 113	41.9 ± 3.8
模型	-	99.0 ± 12.8	215 ± 91.1	(7.2 ± 0.6) × 10 <sup>-3(1)</sup>	7.7 ± 2.1	524.3 ± 209.2	983 ± 121	39.2 ± 5.1
DCT-I	10	113.7 ± 27.2	372 ± 20.5	(8.5 ± 1.2) × 10 <sup>-3</sup>	4.1 ± 0.9 <sup>(1,2)</sup>	614.0 ± 32.1	845 ± 214	42.5 ± 3.4
DCT-L	10	60.6 ± 9.5	207 ± 44.6	(7.3 ± 2.7) × 10 <sup>-3</sup>	5.7 ± 1.2	598.4 ± 97.2	1 000 ± 312	36.7 ± 3.7
FA-PDCT-L	10	59.2 ± 8.1	215 ± 64.2	(8.9 ± 1.1) × 10 <sup>-3</sup>	6.2 ± 2.0	629.8 ± 113.2	998 ± 157	38.5 ± 4.1

注:与空白组比较<sup>1)</sup>P < 0.05,与模型组比较<sup>2)</sup>P < 0.05。

### 3 讨论

本文通过共聚焦显微观察了 FA-PCOU-L 与 MCF-7 细胞的亲和力,证明 FA-PCOU-L 较 COU-I 及 COU-L 进入细胞的能力的更强。一般认为,脂质体药物释放到肿瘤细胞有 4 种机制,包括细胞外释药、亲脂性药物从脂质双分子层转移到肿瘤细胞膜、抗体介导的内吞、与细胞膜或核内体膜融合后释药<sup>[7-8]</sup>。本文利用 COU-6 的强荧光性、高脂溶性、低淬灭性,代替 DCT 对各制剂进行荧光标记,并通过体外释放试验证明,在试验过程中 COU-6 未产生荧光泄露。采用激光共聚焦显微镜观察,均发现 DCT-L 及 FA-PDCT-L 在细胞内有绿色荧光,证明脂质体切实进入了细胞质内,故判断叶酸介导的脂质体靶向不是以第一或第二种机制进行。而制备 FA-PCOU-L 所用磷脂为大豆磷脂,与细胞膜不存在黏附作用,不会发生膜融合作用,故认为 FA-PCOU-L 与细胞发生了受体介导的细胞内吞。

抑瘤试验提示设计长循环 FA-PDCT-L 具有比普通溶液和普通脂质体更好的抗癌效果。TUNEL 试验结果表明 FA-PDCT-L 较 DCT-L 和市售注射液诱导凋亡的能力更强。以上结果与 FR 介导的细胞内吞有直接联系,由于 FR 介导的胞吞使更多的 FA-PDCT-L 进入细胞,脂质体中的 DCT 可直接作用于处于细胞核中的 DNA,阻碍有丝分裂,最终表现为细胞凋亡及细胞毒性。采用修饰脂质体在较低剂量就可得到与 DCT 溶液相同的细胞毒性,故推测修饰脂质体在达到疗效的同时可降低由 DCT 引起的毒副作用。

试验过程中在 DCT 溶液组和普通脂质体组出现了动物死亡现象,这可能是由于 DCT 本身的毒性

所致;在各组中均观察到体重减轻现象,而修饰脂质体组的体重减轻幅度显著低于其余各组,这提示修饰脂质体可能具有更低的毒性。该推测在动物血液分析及肝功能检测结果得到证明,与 DCT-I 组相比, DCT 的脂质体制剂能更好地起到保护肝组织功能、维持血液组成结构尤其是白细胞数目的作用。

#### [参考文献]

[1] 张先林. 抗肿瘤药多西紫杉醇制剂的应用研究近况 [J]. 药学进展, 2006, 30(11): 516-520.

[2] 李翔, 张婧, 王东凯, 等. 叶酸受体靶向两亲性嵌段共聚物修饰多烯紫杉醇脂质体的制备及体外性质考察 [J]. 药学学报, 2012, 47(9): 1219-1226.

[3] 李翔, 张婧, 王东凯, 等. 叶酸受体靶向多烯紫杉醇膜修饰脂质体的抗肿瘤活性实验研究 [J]. 药学学报, 2013, 48(7): 1142-1147.

[4] 何欣, 曾柏荣, 刘华. 丹参酮 II<sub>A</sub> 对小鼠 S180 肿瘤获得性多药耐药及 P-gp、LRP 的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2010, 30(7): 16-18.

[5] Li C L, Cui J X, Wang C X, et al. Encapsulation of mitoxantrone into pegylated SUVs enhances its antineoplastic efficacy [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2008, 70(2): 657-665.

[6] Li C L, Cui J X, Wang C X, et al. Development of pegylated liposomal vinorelbine formulation using "post-insertion" technology [J]. Int J Pharm, 2010, 391(1/2): 230-236.

[7] 柯爱武, 李羲. 聚乙二醇修饰免疫脂质体研究进展 [J]. 国外医学: 预防、诊断、治疗用生物制品分册, 2004, 27(4): 170-174.

[8] 苑振贵, 陈大为, 张守堂, 等. 叶酸受体介导多西他赛长循环脂质体与肿瘤细胞结合机理的研究 [J]. 沈阳药科大学学报, 2011, 28(2): 139-143.

[责任编辑 刘德文]