

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2013.01.009

叶酸纳米偶联紫杉醇在人卵巢癌裸鼠移植瘤中抗肿瘤效应的实验研究

陈 卫,李红霞

Experimental Research of FR-targeted Liposomal Formulation of Paclitaxel against Human Ovarian Cancer Xenografts in Nude Mice Models

Chen Wei,Li Hongxia

Department of Obstetrics and Gynecology, Affiliated Beijing Shijitan Hospital of Capital Medical University The Ninth Clinical Hospital of Peking University Health Science Center, Beijing 100038, China

Corresponding Author: Li Hongxia, E-mail: lihx69@hotmail.com

Abstract: Objective To explore the influence of folic acid receptor (FR)-targeted liposomal formulation of paclitaxel on human ovarian cancer xenografts in nude mice models. **Methods** Human ovarian cancer xenografts in nude mice models were established by using of human ovary cancer cell line SKOV3, and randomly divided into 2 groups ($n=8$): the FR-targeted liposomal formulation of paclitaxel (the experiment group) group and the paclitaxel (the control group) group. The volumes and weight of tumor mass were detected, and the tumor inhibitory rates were calculated. The growth curves of xenograft tumors were draw up. Morphological changes and ultramicrostructure of cells were observed with inverted phase contrast microscope and transmission electron microscope, respectively. Meanwhile, cell apoptosis was investigated with TUNEL staining. **Results** The tumor inhibitory rate of the experiment group was 38.1%, which was significantly lower than that of the control group ($P<0.05$). The apoptosis index (AI) of the experiment group was $(53.45 \pm 6.82)\%$, significant difference was found between the two groups ($P<0.01$). **Conclusions** FR-targeted liposomal formulation of paclitaxel may actively targeting the folic acid receptor, enable to deliver the nanoscale drugs directively into cancer cells, which could increase therapeutic effect of drug largely. Compared to traditional preparations, the novel FR-targeted nanoscale drug may offer a more promising approach for tumor-targeting therapy.

Key words: Folic acid receptor; Ovarian cancer; Paclitaxel; Tumor-targeting therapy

摘 要:目的 通过动物实验探究叶酸纳米偶联紫杉醇对卵巢癌的治疗作用。**方法** 体外培养人卵巢癌 SKOV-3 细胞,裸鼠皮下接种 SKOV-3 细胞建立裸鼠移植瘤动物模型,随机分为叶酸纳米偶联紫杉醇组(实验组,10 mg/kg 尾静脉注射)、紫杉醇组(对照组,10mg/kg 尾静脉注射,每周给药 2 次,共 4 疗程)、每组各 8 只。观察移植瘤的生长情况,绘制裸鼠移植瘤的生长曲线,实验结束依肿瘤体积,计算肿瘤生长抑制率,光学显微镜及透射电子显微镜下观察组织形态和细胞超微结构的改变,同时采用 TUNEL 法检测各组细胞凋亡指数(apoptosis index, AI)。**结果** 实验组裸鼠移植瘤体积明显小于对照组($P<0.05$),实验组抑瘤率为 38.1%。光学显微镜和透射电子显微镜观察可见实验组凋亡改变明显多于对照组。TUNEL 法显示,实验组的 AI 为 $(53.45 \pm 6.82)\%$,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 叶酸纳米偶联紫杉醇药物,可能利用叶酸受体为作用靶点,将药物主动靶向肿瘤细胞,提高药物在肿瘤细胞内的分布,显示出了比传统的紫杉醇药物更好的抗肿瘤疗效。

关键词: 叶酸受体;卵巢癌;紫杉醇;靶向治疗

中图分类号: R737.31;R73-35⁺4 **文献标识码:** A

收稿日期:2012-03-16;修回日期:2012-05-30
基金项目:北京市科委资助项目(Z080507030808028)
作者单位:100038 北京,首都医科大学附属北京世纪坛医院妇产科 北京大学第九临床医学院
通信作者:李红霞, E-mail: lihx69@hotmail.com
作者简介:陈卫(1986-),女,硕士在读,主要从事妇科肿瘤的研究

0 引言

卵巢癌是妇科恶性肿瘤中发病率占第三位,死亡率却占第一位的恶性疾病^[1]。在满意的肿瘤细胞减灭术的基础上,辅助紫杉醇+铂类为主联合化疗的治疗策略虽明显改善了初治卵巢癌的预后,但是传统的化疗药物普通剂型缺乏靶向性,在

杀伤肿瘤细胞的同时也对正常细胞产生毒性,常使患者不能耐受^[2]。90%卵巢癌细胞有叶酸受体的过度表达,而正常卵巢组织不表达或极少量表达^[3],使叶酸靶向治疗卵巢癌成为可能。已有临床前的实验研究显示^[4],叶酸偶联纳米药物对高表达叶酸受体的肿瘤细胞具有特异的高效杀伤作用。本实验室探索应用纳米新技术将卵巢癌化疗的一线药物紫杉醇偶联于叶酸,来实现卵巢癌的靶向治疗。本实验将人卵巢癌细胞株 SKOV-3 进行体外培养后移植于裸鼠,建立裸鼠动物肿瘤模型,探讨叶酸纳米偶联紫杉醇在卵巢癌移植瘤模型中的抗肿瘤作用及可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人卵巢浆液性囊腺癌细胞系 SKOV-3,由中国人民解放军军事医学科学院分子生物学实验室李春海教授惠赠,由本室传代保存。RPMI 1640 细胞培养液、胰蛋白酶购自 Gibco 公司;胎牛血清购自天津市正江高科技有限公司;Balb/c(nu/nu)裸小鼠,雌性,鼠龄 4~6 周龄,体质量 16~18 g,购于北京大学医学部实验动物中心,在北京大学医学部实验动物中心无特定病原体(SPF)级动物实验室内饲养。

1.2 细胞培养

SKOV-3 细胞株按常规方法培养于 10%的胎牛血清(FCS)的 RPMI 1640 培养液中(内含 2 mM/L 谷氨酰胺、青霉素 100 u/ml、链霉素 100 μg/ml)培养,并置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养,每 2~3 天传代 1 次。实验选用对数生长期细胞。

1.3 瘤细胞悬液接种法

常规消化收集对数生长期细胞,计数活细胞数,并调整细胞浓度为 2.5×10⁷ 个/毫升。消毒裸鼠注射部位皮肤,用注射器抽取细胞悬液 200 μl,接种于裸鼠右侧腋窝皮下。

1.4 瘤组织块接种法

细胞接种成功的原代移植瘤长至直径约 8 mm 时,采用颈椎脱臼法处死裸鼠,剥取皮下肿瘤,剪成直径为 1~2 mm 小块。用 12 号套管针吸取瘤块,接种至裸鼠皮下。接种过程在肿瘤离体后 30 min 内完成。

1.5 药物在体内的治疗

待肿瘤直径平均为 6 mm 时,裸鼠被随机分为 2 组,每组 8 只。(1)叶酸纳米偶联紫杉醇组(实验组):尾静脉内注射给药 10 mg/kg;(2)紫杉醇组(对照组):尾静脉内给药 10 mg/kg。每周用药 2 次,共 4 疗程。每 3 天测量一次动物体质量及肿瘤直径。

1.6 裸鼠移植瘤疗效的评估

用药后每 3 天采用游标卡尺测量移植瘤最大径(a)及最小径(b),直到治疗结束。移植瘤体积(V)=π×ab²/2。治疗结束后,根据肿瘤体积与相应天数绘制肿瘤生长曲线,治疗结束后处死动物。肿瘤生长抑制率(IR)=(对照组的平均瘤体积-实验组的平均瘤体积)/对照组的平均瘤体积×100%。

1.7 移植瘤标本的处理

实验结束后取裸鼠皮下移植瘤,瘤组织剪成约 1 mm³ 大小固定于 2.5%戊二醛,送军事医学科学院电镜室进行透射电子显微镜观察细胞超微结构。其余每块瘤组织分为两部分,一部分用 10%中性福尔马林固定,石蜡包埋切片,行细胞凋亡检测,另一部分经苏木精-伊红(HE)染色后在光学显微镜下进行组织学观察。

1.8 TUNEL 法检测细胞凋亡

上述石蜡切片,采用脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的末端标记法(TUNEL 法)检测实验组和对照组的凋亡情况,具体步骤按 TUNEL 检测试剂盒说明书操作。在光学显微镜下随机选数个高倍视野(×400),计数其中凋亡细胞数,并算出凋亡细胞占肿瘤细胞总数的百分比值,即凋亡指数 AI。

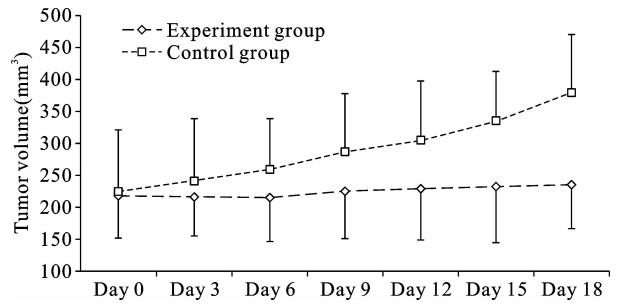
1.9 统计学方法

采用 SPSS16.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验,以 *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 SKOV-3 裸鼠移植瘤体积的变化

给药后,实验组与对照组比较,瘤体积增大速度较慢,从第 15 天开始,明显小于对照组(*P* < 0.05),见图 1。



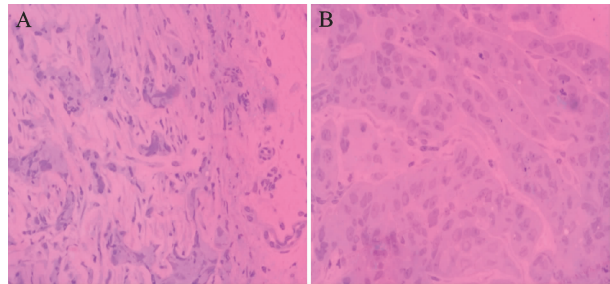
Growth rate of tumors volumes of the experiment group is slow
图 1 两组 SKOV-3 裸鼠移植瘤体积变化曲线
Figure 1 Curve of tumor volume change of the two nude mice transplanted groups

2.2 实验组 SKOV-3 裸鼠移植瘤抑瘤率

实验结束后,实验组皮下瘤体积为(234. 83 ± 68. 44) mm³,对照组皮下瘤体积为(379. 36 ± 90. 88) mm³,实验组的抑瘤率为 38. 1%,显著小于对照组($P<0. 01$)。

2.3 两组 SKOV-3 裸鼠移植瘤光镜下组织形态学观察

实验组细胞核碎裂,形状不规则,可见细胞固缩,细胞间质较多,细胞排列紊乱;对照组细胞核结构较完整,核仁较大,间质较少,细胞排列较紧密,见图 2。

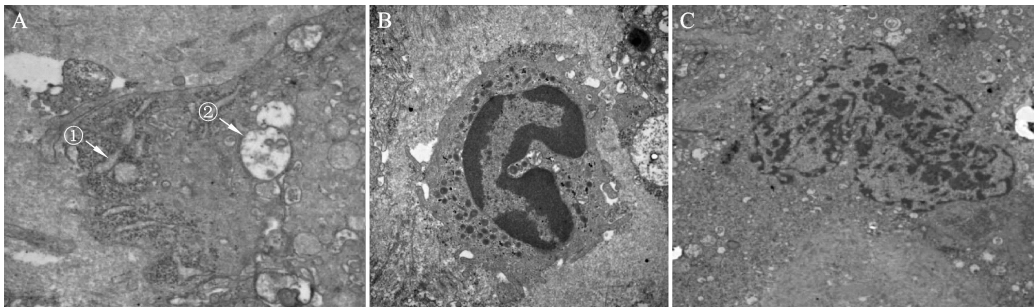


A: experiment group(the experimental group were found to have more stromal cells,more cells arranged in disorder,visible cell shrinkage and nuclear fragmentation); B: control group(in control group, the cells arranged closely, the nucleus structure was more complete, to have fewer stromal cells)

图 2 两组 SKOV-3 裸鼠移植瘤组织形态学表现(×400)
Figure 2 Histomorpholog performance of tumor of the two nude mice transplanted groups(×400)

2.4 两组 SKOV-3 裸鼠移植瘤电镜下细胞超微结构观察

实验组绝大部分细胞出现皱缩,体积缩小,不同程度的内质网扩张,见图 3A①,细胞内空泡状结构,见图 3A②,染色质边聚、凝集成块、核固缩、碎裂等各期细胞凋亡征象,对照组也有一些细胞出现凋亡,但病变程度较轻,凋亡细胞数量少于实验组,见图 3。

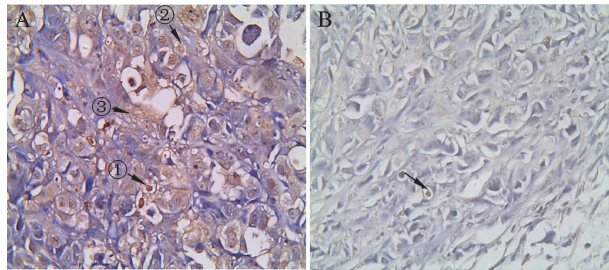


A :dilatation of endoplasmic reticulum①,vacuolar structure②(500 nm);B :cell nucleus condensation (500 nm);C :nucleus fragmentation,necrosis(2 microns)

图 3 裸鼠移植瘤电镜下细胞凋亡超微结构表现
Figure 3 Ultramicrostructure of tumor cell apoptosis with transmission electron microscope

2.5 TUNEL 染色结果

TUNEL 染色阳性细胞其核染成棕黄色,非凋亡细胞的核呈蓝色,见图 4。实验组的凋亡细胞可见细胞皱缩,胞浆致密,细胞核呈棕褐色,见图 4A①,可见裂解的细胞核及胞浆芽突见图 4A②,也可见膜包被的凋亡小体见图 4A③。对照组可见及少量的凋亡细胞,见图 4B。实验组染色阳性细胞明显多于对照组。



A:experiment group(a large number of nuclei were stained brown in the experiment group①, with visible decomposed nuclei② and apoptotic bodies③); B: control group(a few of cells were stained brown in the experiment group, as the shear head showed)

图 4 两组 SKOV-3 裸鼠移植瘤组织凋亡细胞(TUNEL ×400)
Figure 4 Apoptotic cells of the two nude mice transplanted groups(TUNEL ×400)

2.6 AI 的测定

TUNEL 法显示,实验组的 AI 为(53. 45 ± 6. 82)%,对照组的 AI 为(20. 23 ± 3. 67)%,实验组与对照组间的差异有统计学意义($P<0. 05$)。

3 讨论

叶酸相对分子质量小、无毒、无免疫原性、价廉易得、稳定性好、与药物或载体之间的化学键合简单易行,与叶酸受体的结合力强,对肿瘤有高度选择性^[5]。近年来,利用叶酸受体进行肿瘤特异性治疗受到关注,已有研究证实^[6],叶酸介导的靶向给药系

统能增加药物疗效,减少了全身不良反应。同时纳米材料在癌症治疗领域展示独特的优势^[7],纳米囊泡是双亲性聚合物,有着分子可设计性好、囊泡强度高、稳定性好、渗透性强等优点^[8],包封药物后的纳米囊泡给药系统可以起到增效、减毒、增加药物稳定性及延长药物在体内的存留时间等优点。研究证实^[9],其可作为药物、核苷酸的载体,用于疾病的诊断与治疗。叶酸导向的纳米药物已有临床前的研究,其有良好的抗肿瘤效果,同时减少了全身不良反应^[10]。紫杉醇(Paclitaxel,PTX)作为卵巢癌治疗中的一线化疗药物,由于其在水中的溶解度极低,临床以聚氧乙烯蓖麻油和乙醇溶解后给药,这种形式有有限的溶解度及与溶剂相关的临床毒性^[11]。90%卵巢癌细胞有叶酸受体的过度表达,而正常卵巢上皮不表达或极少量表达,且与卵巢癌恶性程度、生物学行为及预后有关。所以,使得叶酸偶联紫杉醇纳米囊泡药物靶向治疗卵巢癌成为可能。

本研究建立卵巢癌裸鼠移植瘤模型进行动物实验,比较经叶酸纳米偶联紫杉醇药物和紫杉醇治疗后的移植瘤生长情况,实验组肿瘤体积增长较慢,体积较对照组明显缩小。从组织结构及细胞形态方面行光学显微镜观察,实验组组织结构紊乱,间质增多,细胞形状明显不规则。透射电子显微镜观察到,实验组较多细胞出现空泡状结构、染色质边集、核碎裂等凋亡改变。TUNEL 法检测各组细胞凋亡,实验组有更多染成棕黄色的细胞。均表明叶酸纳米偶联紫杉醇比普通剂型有更明显的抗肿瘤效应。与 Gabizon 等^[4]研究的叶酸靶向药物治疗效果优于普通剂型的结果一致。结合本实验中两种紫杉醇药物的不同点及抗肿瘤效应的差异,考虑叶酸纳米偶联紫杉醇抗肿瘤作用优势可能与肿瘤细胞叶酸受体靶向结合及纳米微粒囊泡内载药量大,导致肿瘤细胞内药物浓度高有关。

实验中可见两组动物给药后均出现精神萎靡、脱水、动作减少、肌张力减低等表现,对照组较实验组严重,但是均未出现严重的毒性,实验后两组的体重没有明显的改变,未见明显的不良反应。研究报道^[12],在人类正常组织中,仅限于一些难于进入血液循环的上皮细胞如肺泡细胞、肾组织上皮细胞高表达叶酸受体,且存在于这些细胞的管腔面,不接触到血液,不产生明显的全身不良反应。

综上所述,与常规的紫杉醇相比,叶酸纳米偶联紫杉醇药物在治疗效应方面有很大的改善,这可能与叶酸受体介导的药物靶向结合致全身毒性小,以及纳米囊泡装载药物量大致肿瘤局部药物浓度高有关。但是尚需要进一步研究其作用机制、证明其抗肿瘤作用优势的证据及其在体内的代谢过程,增加该药物的给药量后评估其治疗效应和不良反应,为进一步用于临床奠定基础。

参考文献:

[1] Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008[J]. Eur J Cancer, 2010,46(4):765-81.

[2] Haley B, Frenkel E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment[J]. Urol Oncol, 2008,26(1):57-64.

[3] Li PY, Del Vecchio S, Fonti R, et al. Local concentration of folate binding protein GP38 in sections of human ovarian carcinoma by in vitro quantitative autoradiography[J]. J Nucl Med, 1996,37(4):665-72.

[4] Gabizon A, Shmieda H, Horowitz AT, et al. Tumor cell targeting of liposome-entrapped drugs with phospholipid-anchored folic acid-PEG conjugates[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2004, 56(8):1177-92.

[5] Low PS, Henne WA, Doorneweerd DD. Discovery and development of folic-acid based receptor targeting for imaging and therapy of cancer and inflammatory diseases[J]. Acc Chem Res, 2008,41(1):120-9.

[6] Reddy JA, Westrick E, Santhapuram HK, et al. Folate receptor-specific antitumor activity of EC131, a folate-maytansinoid conjugate[J]. Cancer Res, 2007,67(13):6376-82.

[7] Lines MG. Nanomaterials for practical functional uses[J]. J Alloys Compd, 2008,449:242-5.

[8] Singh R, Lillard JW Jr. Nanoparticle-based targeted drug delivery[J]. Exp Mol Pathol, 2009,86(3):215-23.

[9] Letchford K, Burt H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2007,65(3):259-69.

[10] Xia W, Low PS. Folate-targeted therapies for cancer [J]. J Med Chem, 2010,53(19):6811-24.

[11] Rowinsky EK, Eisenhauer EA, Chaudry V, et al. Clinical toxicities encountered with paclitaxel (taxol) [J]. Semin Oncol, 1993,20(4 suppl 3):1-15.

[12] Kukowska-Latallo JF, Candido KA, Cao Z, et al. Nanoparticle targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer[J]. Cancer Res, 2005, 65(12):5317-24.

[编辑:安 凤;校对:杨 卉]