

【基础研究】

作者简介:曾文(1976-),男,湖南新化人,硕士,副主任医师,主要从事肝脏及胰腺方面的工作。

fect the growth of tumor, there was no statistic difference of tumor volumes between NPs group and control group ($P > 0.05$); there was statistic difference of tumor volumes between GemC18-NPs group and NPs group, control group at the 13th, 15th, 17th and 19th day ($P < 0.05$). The blood vessel number in tumor in GemC18-NPs group and control group was 60.9 ± 16.0 , 85.4 ± 26.5 respectively; there was statistic difference of blood vessel number between the two groups ($P < 0.05$). The average length of blood vessel in GemC18-NPs group and control group was $(12.6 \pm 18.9) \mu\text{m}$ and $(27.9 \pm 45.4) \mu\text{m}$ respectively; there was statistic difference of the average length of blood vessel between the two groups ($P < 0.05$). The positive cell number of Caspase-3 in GemC18-NPs group and control group was 13.9 ± 5.3 and 5.9 ± 2.3 respectively; there was statistic difference of the positive cell number between the two groups ($P < 0.05$). There were no statistic difference of tumor volumes between PEG-GemC18-NPs group and GemC18-NPs group at all time point ($P > 0.05$); there were statistic difference of tumor volumes between PEG-GemC18-NPs group, GemC18-NPs group and control group at all time point ($P < 0.05$). **Conclusion** The new GemC formulation of GemC18-NPs and PEG-GemC18-NPs can potentially improve the curative effect of GemC in the treatment of tumor.

Key words: gemcitabine; nanoparticle derivatives; *in vivo*; nude mice

吉西他滨 (gemcitabine, GemC) 是一线用于治疗胰腺癌的药物, 并常联合用药治疗转移性乳腺癌、小细胞肺癌、卵巢癌^[1]等。尽管其对肿瘤组织生长杀伤性很强, 但由于代谢速度快, 半衰期短, 临床疗效较差。因此, 有研究通过将长脂肪酸链结合在 GemC 上改变其构造以提高其亲脂性^[2], 并将该衍生物中的硬脂酸和卵磷脂/甘油纳米粒结合获得一种新型 GemC 纳米粒 (nanoparticles, NPs), 较游离的 GemC 能更有效地控制肿瘤细胞生长^[3]。有研究对以 NPs 作为传输载体的 GemC 脂肪酸酰胺衍生物 [4-(N)-stearoyl gemcitabine, GemC18] (GemC18-NPs) 进行研究, 并报道称聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 链修饰的吉西他滨纳米粒子 [polyethylene glycol-4-(N)-stearoyl gemcitabine-NPs, PEG-GemC18-NPs] 能够延长 NPs 在血液中的循环时间并增加 NPs 在肿瘤组织中的积聚 (>6 倍)^[4-5], 提示合成 NPs 对有效发挥药物抗肿瘤活性非常重要。本研究即通过体内实验观察 GemC18-NPs 与 PEG-GemC18-NPs 的抗肿瘤效果。

1 材料与方法

1.1 材料及实验动物 肺癌细胞系 TC-1 细胞和人类胰腺癌细胞系 BxPC-3 细胞购于中国科学院生物化学与细胞生物研究所。用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 稀释的体积分数 10% 小牛血清 (美国 Hyclone 公司), $100 \times 10^3 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素 (哈药集团制药总厂, 国药准字 H23020930), $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素 (山东瑞阳制药有限公司, 国药准字 H37021948), 甘露醇注射液 (四川科伦药业股份有限公司, 国药准字 H20043785), GemC (法国礼来公司, 注册证号 H20100300)。已通过动物协议的 6~8 周龄裸鼠 72 只, 体质量 $18 \sim 20 \text{ g}$, 全部为雌鼠, 购自第四军医大学实验动物中心, 许可证号 SCKK (军)2002-05。

1.2 GemC18-NPs 和 PEG-GemC18-NPs 制备

GemC 经修饰后制备生成 GemC18^[6], GemC18-NPs 的制备方法除将预定量的 GemC18 与单硬脂酸甘油酯 (上海化学试剂有限公司) 和卵磷脂 (美国 Sigma 公司) 混合外, 余参照常规自由纳米粒子制备法^[7]。PEG-GemC18-NPs 的制备则在 GemC18-NPs 的制备方法中额外加入二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000 {1, 2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy (polyethylene glycol)-2000], DSPE-PEG(2000) 胶束} (美国 Avanti Polar Lipids 公司)。测量到的 GemC18-NPs 直径 $(192.0 \pm 13.0) \text{ nm}$, zeta 电位 -31.0 mV ; PEG-GemC18-NPs 直径 $(237.0 \pm 19.0) \text{ nm}$, zeta 电位 -32.6 mV 。为确定其稳定性, 在模拟生物培养基中, GemC18-NPs 和 PEG-GemC18-NPs 分别稀释到生理盐水、体积分数 10% 胎牛血清混合液中, 并测量即时和 37°C 孵育 30 min 后 GemC18-NPs 和 PEG-GemC18-NPs 的物理体积, 证实 PEG-GemC18-NPs 大小未发生变化。

1.3 裸鼠肿瘤模型建立 分别给予裸鼠右腹部皮下注射 TC-1 或 BxPC-3 肿瘤细胞 (每只 5×10^5 个) 构建荷瘤鼠。在 GemC18-NPs 对肿瘤细胞生长的抑制作用实验中, 皮下注射 TC-1 的荷瘤鼠随机分为 GemC18-NPs 组、GemC 组和对照组, 每组 6 只裸鼠。于第 4、13 天分别注射 GemC18-NPs $200 \mu\text{L}$ ($100 \mu\text{L}$ 含 0.5 mg GemC18)、GemC 0.5 mg 和 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 无菌甘露醇 PBS 溶液 $200 \mu\text{L}$ 。第 1 次给药后每日测量肿瘤大小, 并于第 21 天时处死裸鼠测肿瘤质量。皮下注射 BxPC-3 的荷瘤鼠随机分为 GemC18-NPs 组、GemC 组和对照组, 每组 6 只裸鼠。于第 6、19 天分别注射 GemC18-NPs $200 \mu\text{L}$ 、GemC 0.5 mg 和 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 无菌甘露醇 PBS 溶液 $200 \mu\text{L}$ 。第 1 次给药后每隔 1 d 测量肿瘤大小及裸鼠体质量。为进一步判断 NPs 本身是否会对肿瘤生长产生影响, 皮下

注射 BxPC-3 的荷瘤鼠随机分为 GemC18-NPs 组、NPs 组和对照组,每组 6 只裸鼠,于第 11、19 天分别注射 GemC18-NPs 200 μL 、NPs 200 μL 和 50 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 无菌甘露醇 PBS 溶液 200 μL ,第 1 次给药后每隔 1 d 测量肿瘤大小。在体内 PEG-GemC18-NPs 和 GemC18-NPs 抗肿瘤活性实验中,将注射 TC-1 的荷瘤鼠随机分为 PEG-GemC18-NPs 组、GemC18-NPs 组和对照组,每组 6 只裸鼠。当裸鼠肿瘤平均直径达到 5 mm 时,给予 PEG-GemC18-NPs 200 μL 和 GemC18-NPs 200 μL 治疗(分别行即时 1 次静脉注射及第 1 次注射后第 10、12、14、16、18 天瘤周注射给药,第 1 次给药后每隔 1 日测量肿瘤大小)。

1.4 肿瘤病理及免疫组织化学检查 GemC18-NPs 组与对照组裸鼠在种植肿瘤细胞后 21 d 处以安乐死。收集肿瘤组织,甲醛固定,切片,苏木精-伊红(hematoxylin-eosin,HE)染色。并进一步行 Ki67(美国 Sigma 公司)、CD31(美国 sigma 公司)、Caspase-3 抗体染色(美国 Sigma 公司)免疫组织化学。高倍显微镜下观察切片,测量每 0.25 mm^2 视野中血管管腔的平均长度(μm)、血管数、Caspase-3 免疫组织化学染色呈阳性细胞的数目。

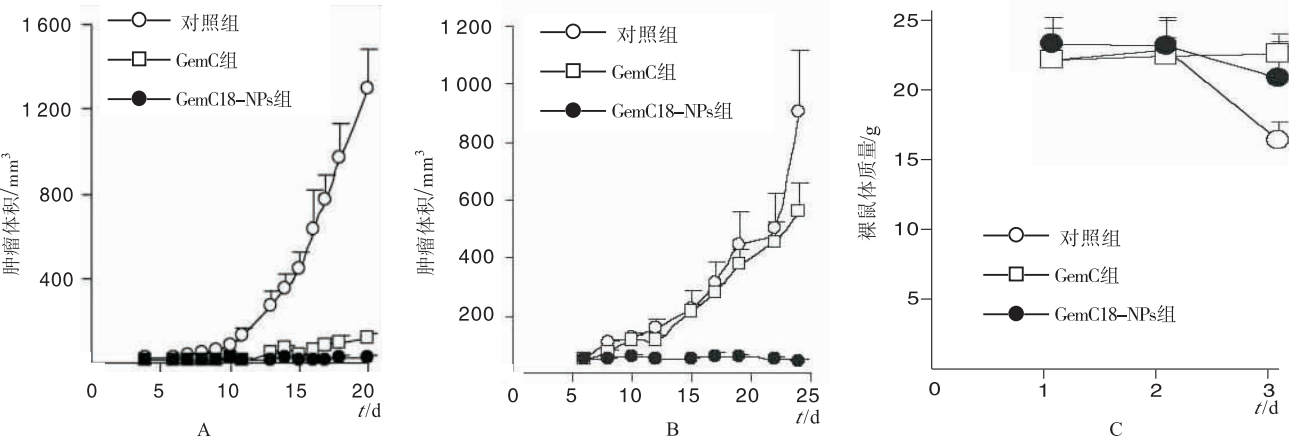
1.5 统计学处理 应用 SPSS 19.0 软件进行实验数据处理,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组

间比较采用 ANOVA 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GemC18-NPs 对肿瘤细胞生长的抑制作用 GemC18-NPs 与 GemC 均可抑制裸鼠 TC-1 肿瘤的生长(图 1A)。GemC18-NPs 组和 GemC 组从第 1 次给药后第 11 天起至第 20 天裸鼠肿瘤体积均小于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);GemC18-NPs 组与 GemC 组从第 17 天至第 20 天裸鼠肿瘤体积比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。对照组、GemC 组和 GemC18-NPs 组的裸鼠肿瘤质量分别为(1.15 ± 0.26)、(0.10 ± 0.05)、(0.03 ± 0.03)g,3 组之间两两比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

GemC18-NPs 与 GemC 在抑制裸鼠 BxPC-3 肿瘤生长方面存在差异(图 1B)。GemC18-NPs 组与 GemC 组和对照组在第 15 天后肿瘤体积比较差异有统计学意义($P < 0.05$);GemC 组与对照组在第 25 天前肿瘤体积比较差异均无统计学意义($P > 0.05$);GemC 组和 GemC18-NPs 组裸鼠体质量比较差异无统计学意义($P > 0.05$),注射 3 周后,对照组裸鼠的体质量较 GemC18-NPs 组和 GemC 组减轻($P < 0.05$)(图 1C)。



A:TC-1 肿瘤模型;B、C:BxPC-3 肿瘤模型。

图 1 各组裸鼠不同时间点皮下肿瘤体积或裸鼠体质量

Fig.1 Tumor volume in subcutaneous or body weight of nude mouse at different time point in each group

2.2 NPs 对肿瘤生长的影响 NPs 组与对照组裸鼠各个时间点肿瘤体积比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。GemC18-NPs 组在第 13、15、17、19 天时肿瘤体积与对照组和 NPs 组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)(图 2)。

2.3 GemC18-NPs 对肿瘤细胞病理学的影响 HE 染色结果表明,GemC18-NPs 组裸鼠肿瘤细胞内细胞间隙更大,且其细胞和细胞核也更大(图 3A)。Ki67 增殖标记显示,GemC18-NPs 组裸鼠肿瘤细胞

增殖减少(图 3B),CD31 反映出 GemC18-NPs 组裸鼠肿瘤细胞内血管内皮细胞的生成减少(图 3C)。GemC18-NPs 组裸鼠肿瘤内血管数为 60.9 ± 16.0 ,对照组为 85.4 ± 26.5 ,2 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。GemC18-NPs 组裸鼠肿瘤内血管的平均长度为(12.6 ± 18.9) μm ,对照组为(27.9 ± 45.4) μm ,2 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。Caspase-3 免疫组织化学染色显示,GemC18-NPs 组裸鼠体内 Caspase-3 阳性细胞数为 13.9 ± 5.3 ,对照

组为 5.9 ± 2.3 , 2 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 3D)。

2.4 PEG-GemC18-NPs 和 GemC18-NPs 抗肿瘤活性的比较 PEG-GemC18-NPs 组和 GemC18-NPs 组裸鼠各时间点肿瘤体积比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$) (注射后第 12 天前) (图 4A); PEG-GemC18-NPs 组和 GemC18-NPs 组裸鼠各时间点肿瘤体积与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。注射 GemC18-NPs 后 12 d, 2 组中均有 50% (3/6) 的裸鼠肿瘤消失, PEG-GemC18-NPs 组 1 只裸鼠由于肿瘤体积过大处以安乐死。剔除肿瘤消失的裸鼠和处以安乐死的裸鼠后, 二者的抗肿瘤活性仍是相似的, PEG-GemC18-NPs 组和 GemC18-NPs 组裸鼠各时间点裸鼠肿瘤体积比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 4B); PEG-GemC18-NPs 组和 GemC18-NPs 组裸鼠各时间点肿瘤体积与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

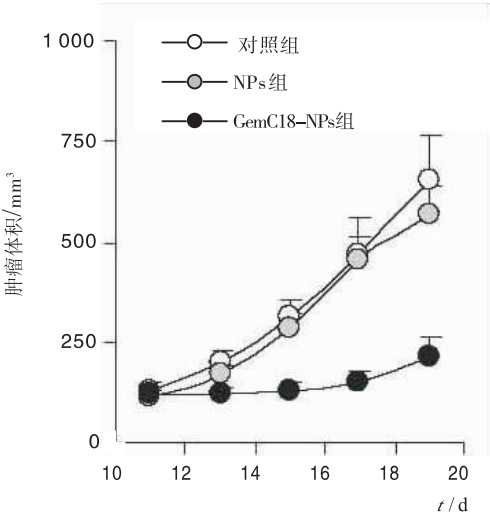


图 2 各组裸鼠不同时间点皮下肿瘤体积
Fig. 2 Tumor volume in subcutaneous of nude mouse at different time point in each group

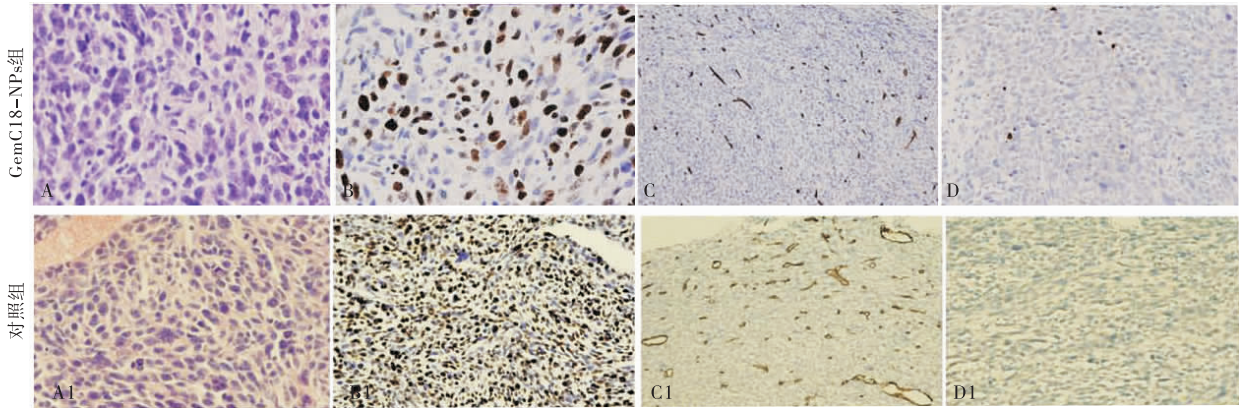
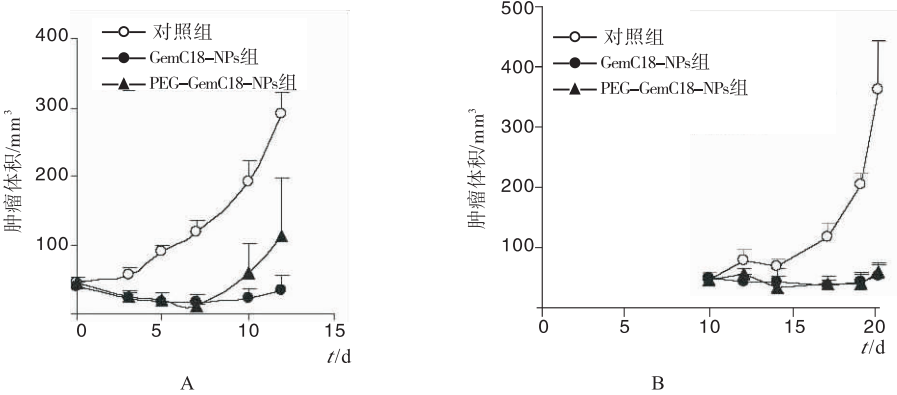


图 3 GemC18-NPs 组和对照组肿瘤组织病理学改变

Fig. 3 Pathological changes of tumor tissue of GemC18-NPs group and control group



A: 部分裸鼠肿瘤消失前的平均肿瘤体积; B: 剔除肿瘤消失裸鼠后的平均肿瘤体积。

图 4 各组裸鼠不同时间点皮下肿瘤体积

Fig. 4 Tumor volume in subcutaneous of nude mouse at different time point in each group

3 讨论

GemC 作为一种常用的化学治疗药物, 其作用

机制主要依赖于细胞内磷酸化形成有活性的三磷酸腺苷衍生物^[8]。约 90% 的三磷酸腺苷 GemC 很快被清除, 主要由它脱氨后形成的 GemC 衍生物 2, 2-dFdU

产生抗肿瘤活性^[9]。GemC 代谢快,临床效果弱,通过将长脂肪酸链结合在 GemC 上可提高其亲油性,延长其半衰期^[10]。研究表明,给裸鼠口服或腹腔注射 GemC 脂肪酸酯衍生物可提高其抗肿瘤活性^[11]。最近,NPs 作为抗肿瘤药物的传输载体越来越受到重视^[12]。目前有报道从卵磷脂/甘油单硬脂酸中制备 180~200 nm 固体油脂 NPs 的方法,并被认为是安全的^[13]。

本研究结果显示,GemC18-NPs 保持了 GemC18 抗肿瘤的活性,2 种药物均可抑制肿瘤的生长,并且 GemC18-NPs 表现出了较 GemC18 更为明显的抗肿瘤活性,尤其是对 GemC18 不敏感的 BxPC-3 细胞株,这与我们在 GemC18-NPs 对 TC-1 与 BxPC-3 肿瘤细胞生长的抑制作用实验中也得到了印证。通过 GemC18-NPs 与空白 NPs 对裸鼠肿瘤体积的抑制实验明确了 NPs 单方面不会产生肿瘤抑制的效果,提示 GemC18-NPs 的抗肿瘤活性不受 NPs 影响。说明将 NPs 作为 GemC18 的传输载体在活体实验中可以提高 GemC18 抗肿瘤的活性。进一步的病理检测也明确了 GemC18-NPs 能抑制肿瘤细胞增殖和血管生成,促进更多肿瘤细胞凋亡,这说明 GemC18-NPs 抗肿瘤活性高。在瘤周注射 PEG-GemC18-NPs 和 GemC18-NPs,二者的抗肿瘤活性仍是相似的,并没有出现 PEG-GemC18-NPs 较 GemC18-NPs 可能表现出抗肿瘤活性增强的结果。所以推测,在瘤周注射后,肿瘤组织中 GemC18-NPs 与 PEG-GemC18-NPs 的聚集量可能不相同,但 2 组药物抗肿瘤活性没有明显差别,不太可能是由于 GemC18 剂量不同所导致的,因为在当前剂量下,2 组均未引起肿瘤复原,2 种药物抗肿瘤活性相似可能与 GemC18 的缓慢释放有关。总之,GemC18-NPs 与 PEG-GemC18-NPs 均能较对照组更好地控制肿瘤生长。研究中新的以 NPs 为载体的 GemC 在裸鼠肿瘤模型中表现出高抗肿瘤活性。为未来的临床抗肿瘤实践提供一个新思路。这种新的 GemC-NPs 有可能进一步改善 GemC 化学治疗的效果。

参考文献:

[1] Fang J,Nakamura H,Maeda H. The EPR effect;unique features of

tumor blood vessels for drug delivery,factors involved,and limitations and augmentation of the effect[J]. *Adv Drug Deliv Rev*,2011,63(3):136-151.

[2] Jin Y,Yang F,Du L. Nanoassemblies containing a fluorouracil/zidovudine glyceryl prodrug with phospholipase A2-triggered drug release for cancer treatment[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*,2013,112:421-428.

[3] Jordheim L P,Durantel D,Zoulim F,*et al.* Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases[J]. *Nat Rev Drug Discov*,2013,12(6):447-464.

[4] Khaled H M,Shafik H E,Zabhloul M S,*et al.* Gemcitabine and cisplatin as neoadjuvant chemotherapy for invasive transitional and squamous cell carcinoma of the bladder: effect on survival and bladder preservation[J]. *Clin Genitourin Cancer*,2014,12(1):e233-e240.

[5] Moysan E,Bastiat G,Benoit J P. Gemcitabine versus modified gemcitabine;a review of several promising chemical modifications[J]. *Mol Pharm*,2013,10(2):430-444.

[6] Zhu S,Wonganan P,Lansakara P D S P,*et al.* The effect of the acid-sensitivity of 4-(N)-stearoyl gemcitabine-loaded micelles on drug resistance caused by RRMI overexpression[J]. *Biomaterial S*,2013,34(9):2327-2339.

[7] Guo Z W,Gallo J M. Selective protection of 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine)[J]. *J Org Chem*,1999,64(22):8319-8322.

[8] 陈菊香,周红轩,马兰,等. 吉西他滨联合奥沙利铂或替吉奥对比吉西他滨单药治疗晚期胰腺癌临床观察[J]. *安徽医药*,2015(2):359-362.

[9] Pratt S E,Durland-Bushice S,Shepard R L,*et al.* Human carboxylesterase-2 hydrolyzes the prodrug of gemcitabine (LY2334737) and confers prodrug sensitivity to cancer cells[J]. *Clin Cancer Res*,2013,19(12):1159-1168.

[10] Wickremsinhe E,Bao J,Smith R,*et al.* Preclinical absorption,distribution,metabolism,and excretion of an oral amide prodrug of gemcitabine designed to deliver prolonged systemic exposure[J]. *Pharmaceutics*,2013,5(2):261-276.

[11] Gupta A,Asthana S,Konwar R,*et al.* An insight into potential of nanoparticles -assisted chemotherapy of cancer using gemcitabine and its fatty acid prodrug;a comparative study[J]. *J Biomed Nanotechnol*,2013,9(5):915-925.

[12] Siegel R,Ma J,Zou Z,*et al.* Cancer statistics[J]. *Cancer J Clin*,2014,64(1):9-29.

[13] Huguet F,Girard N,Guerche C S,*et al.* Chemoradiotherapy in the management of locally advanced pancreatic carcinoma;aqualltative systematic review[J]. *J Clin Oncol*,2009,27:2269-2277.

(本文编辑:孟 月 英文编辑:孟 月)