论著

文章编号:1000-5404(2013)11-1048-05

新型生物素接枝改性聚乳酸-多烯紫杉醇纳米粒体外抗肿瘤研究

赵俪梅[1],张寅星[2],陈振波[1],梁志清[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院妇产科[1];400044 重庆,重庆大学生物工程学院[2])

[摘要] **目的** 以人卵巢癌细胞SKOV3为模型,研究负载多烯紫杉醇(TXT)的新型生物素接枝改性聚乳酸纳米粒(TXT-BPLA NPs)的体外抗肿瘤作用。**方法** 以不同剂量TXT-BPLA NPs(1、10、100、1 000、10 000 nmol/L)处理SKOV3细胞不同时间(12、24、48、72、96、120 h)后用CCK-8检测细胞增殖抑制率,流式细胞仪检测细胞凋亡率,Western blot检测caspase-3表达。**结果** 在10~10 000 nmol/L浓度范围内,相同时间点下,TXT和TXT-BPLA NPs对SKOV3细胞生长的抑制率均呈现出剂量依赖性。在相同浓度下,TXT组在24 h和48 h对SKOV3细胞的增殖抑制率、凋亡率及caspase-3的表达均明显高于TXT-BPLA NPs组($P<0.05$);72 h后,TXT-BPLA NPs组对SKOV3细胞的增殖抑制率、凋亡率及caspase-3的表达均明显高于TXT组($P<0.05$)。**结论** 与TXT相比,TXT-BPLA NPs能够更加持续地抑制SKOV3细胞的增殖,并促进caspase-3介导的细胞凋亡,具有更强的持续性抗肿瘤作用。

[关键词] 多烯紫杉醇;聚合物纳米微粒;卵巢癌;细胞增殖;细胞凋亡;caspase-3

[中图法分类号] R737.31; R944.9; R979.1 [文献标志码] A

In vitro antitumor efficacy of novel docetaxel-loaded polyethylene glycol-modified poly(lactic acid) nanoparticles

Zhao Limei[1], Zhang Yinxing[2], Chen Zhenbo[1], Liang Zhiqing[1] ([1]Department of Gynecology and Obstetrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing, 400044, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the antitumor effects of the novel docetaxel (TXT)-loaded biotinylated poly (lactic acid) nanoparticles (TXT-BPLA NPs) on human ovarian cancer cell line SKOV3. **Methods** SKOV3 cells were cultured with TXT-BPLA NPs at different concentrations (1, 10, 100, 1 000 and 10 000 nmol/L) and durations (12, 24, 48, 72, 96 and 120 h) respectively. Then proliferation and apoptosis of SKOV3 cells were determined by CCK-8 assay and flow cytometry, respectively. The apoptosis-related protein caspase-3 was measured by Western blotting. **Results** Both TXT and TXT-BPLA NPs resulted in inhibited proliferation in SKOV3 cells in a dose-dependent manner when the concentration was given at 10 to 10 000 nmol/L within same duration. Under the same dose, TXT-treated SKOV3 cells for 24 and 48 h had obviously higher proliferative rate, apoptotic rate and caspase-3 expression than the cells treated by TXT-BPLA NPs ($P<0.05$), while these phenomena was reversed when the treatment time was prolonged to 72 h ($P<0.05$). **Conclusion** Comparing with TXT, TXT-BPLA NPs could more persistently inhibit the proliferation of SKOV3 cells and promote caspase-3-mediated apoptosis. Thus, TXT-BPLA NPs, as a new nanometer drug, has a special application value for the therapy of ovarian cancer.

[**Key words**] docetaxel; nanoparticles; SKOV3 cells; cell proliferation; cell apoptosis

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30872748). Corresponding author: Liang Zhiqing, E-mail: zhiq.lzliang@gmail.com

多西他赛(docetaxel,TXT)又名多烯紫杉醇,是来源于红豆杉属太平紫杉的一种细胞毒性物质[1-2],被广泛用于乳腺癌[3]、前列腺癌[4]、卵巢癌[5]、头颈部肿瘤[6]和非小细胞肺癌[7]的治疗。卵巢癌是发生于卵巢组织的恶性肿瘤,在女性生殖道恶性肿瘤中占第

[基金项目] 国家自然科学基金(30872748)

[通信作者] 梁志清,E-mail:zhiq.lzliang@gmail.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130325.0917.007.html(2013-03-25)

3位,占所有妇科恶性肿瘤的15%左右,具有起病隐匿、早期不易发现、易转移、预后差等特点,是病死率极高的一种肿瘤[8]。TXT目前已经无可争议地成为晚期卵巢癌化疗的一线药物,无论是单一或联合用药都优于以往传统的化疗方案,可以不同程度地改善患者的预后,延长患者无瘤生存时间并提高生存率[2,9]。

由于TXT难溶于水及多种药用溶媒,目前国内外绝大部分TXT都是以聚氧乙基代蓖麻油与无水乙醇作为混合溶媒制成的注射剂,常导致机体产生严重的过敏反应,从而使TXT的临床应用受到限制。因此开发新的TXT剂型,增加TXT的水溶性,改善TXT在体内的分布代谢过程,避免由于复合溶媒带来的过敏反应和其他不良反应,对加强TXT的临床应用,改善卵巢癌等恶性肿瘤的治疗效果具有重要的意义。

重庆大学生物工程学院合作课题组以聚乙二醇(PEG)为原料,对聚乳酸(PLA)进行接枝改性,合成了PEG接枝改性PLA(PPLA),又进一步利用N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化酯法,将生物素(biotin)连接到PPLA侧链,制备出生物素接枝改性聚乳酸(BPLA)材料。该过程中并未改变PLA的主链结构,不影响其可降解特性,同时可通过调节PEG的接枝率以及所用PEG的分子量来控制聚合物的亲水性、分子量等特性[10]。本研究利用该BPLA高分子材料,通过自乳化/溶剂扩散技术对TXT进行包裹,制备成TXT-BPLA纳米粒(TXT-BPLA NPs),在体外观察其对人卵巢癌细胞SKOV3的生物学效应,包括抑制SKOV3细胞的增殖,调节SKOV3细胞凋亡,并初步探讨其调节机制。

1 材料与方法

1.1 材料

TXT(江苏恒瑞医药股份有限公司),TXT-BPLA NPs、BPLA NPs(重庆大学生物工程学院制备),人卵巢癌细胞株SKOV3(中国科学院上海细胞库),CCK-8(日本Dojind公司),Annexin V-FITC/PI双染细胞凋亡试剂盒(美国BD公司),caspase-3抗体(美国Upstate公司),辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG抗体(武汉博士德公司),细胞裂解液和BCA蛋白浓度测定试剂盒(碧云天公司),RPMI1640培养液、胎牛血清和小牛血清(美国Gibco公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将SKOV3细胞置于含有100 mg/L胎牛血清的RPMI1640培养基中培养,培养条件为5% CO_2,饱和湿度,温度为37 ℃。待细胞汇合度为0.80~0.90时,用2.5 mg/L胰酶消化传代,取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 CCK-8检测细胞增殖抑制率 取对数生长期SKOV3细胞,调整细胞数为3×10^7/L,将细胞悬液接种于96孔板中,每孔取200 μL(6×10^3/孔),每个浓度设置3个复孔。培养12 h后,吸去培养液,分别加入用1640完全培养基系列稀释的TXT-BPLA NPs、TXT、BPLA NPs,使前2组的终浓度为1、10、100、1 000、10 000 nmol/L,BPLA NPs的终浓度为10 000 nmol/L(其内为10 000 nmol/L TXT-BPLA NPs所需的空球量),并设对照组。培养12、24、48、72、96、120 h后,每孔加入CCK-8 20 μL继续培养2 h,用酶标仪测定各细胞培养孔450 nm波长处的光密度值[$D(450)$],每组重复3次,并按公式计算抑制率。

抑制率 = $[1-D(450)_{实验组}/D(450)_{对照组}]\times100\%$

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡 取对数生长期SKOV3细胞,将细胞接种于6孔培养板(6×10^4/孔),培养24 h后换含100 nmol/L的TXT-BPLA NPs、TXT、BPLA NPs的培养液继续培养,并设对照组。共同培养24、48、72、120 h后消化,1 000 × g离心5 min,弃上清,PBS洗2次,收集细胞,用美国BD公司的Annexin V-FITC/PI双染细胞凋亡试剂盒检测细胞凋亡,严格按照试剂盒和说明书操作[11]。先用常规方法收集细胞,用冰冷的PBS缓冲液洗涤细胞后用1 × Binding buffer重悬细胞,制成1×10^5/mL的细胞悬液;在100 μL的细胞体系中,分别加入Annexin V-FITC和(或)PI工作液,轻轻混匀,室温避光孵育15 min;每份细胞加入1 × Binding buffer 400 μL,在1 h内用流式细胞仪进行分析。

1.2.4 Western blot检测caspase-3蛋白的表达 设对照组及100 nmol/L的TXT-BPLA NPs、TXT、BPLA NPs组。收集培养24、48、72、120 h后的各组细胞1×10^6个,用RIPA液裂解提取总蛋白,BCA蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。取40 μg总蛋白,选择10%分离胶和5%浓缩胶进行SDS-PAGE电泳,完毕后将蛋白质电转印至PVDF膜。5%脱脂奶粉的TBST封闭1 h后加入1∶500稀释的caspase-3多克隆抗体,4 ℃孵育过夜,TBST洗涤3次,再加入1∶1 000稀释的HRP标记的羊抗鼠IgG温育2 h,TBST洗涤3次,用BeyoECL Plus显影,观察各组细胞中的凋亡蛋白caspase-3的水平[12]。以caspase-3/β-actin的比值表示caspase-3蛋白的相对表达量。

1.3 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件行t检验和单因素方差分析。

2 结果

2.1 载药纳米粒电位、粒径及分布、稳定性

动态激光光散射仪分析结果显示,浓度为1 mg/mL时的TXT-BPLA纳米粒Z均粒径为159.4 nm,分散系数(PDI)为0.058,Zeta电位为-24.3 mV,稀释10倍和100倍后Z均粒径分别为163.7、165.5 nm,PDI分别为0.122、0.252,Zeta电位分别为-24.3、-26.5 mV,说明TXT-BPLA NPs稀释稳定性较好。

2.2 TXT-BPLA NPs抑制SKOV3细胞增殖

CCK-8检测结果显示,与对照组比较,BPLA NPs对细胞增殖无明显抑制作用($P>0.05$);TXT和TXT-BPLA NPs能显著

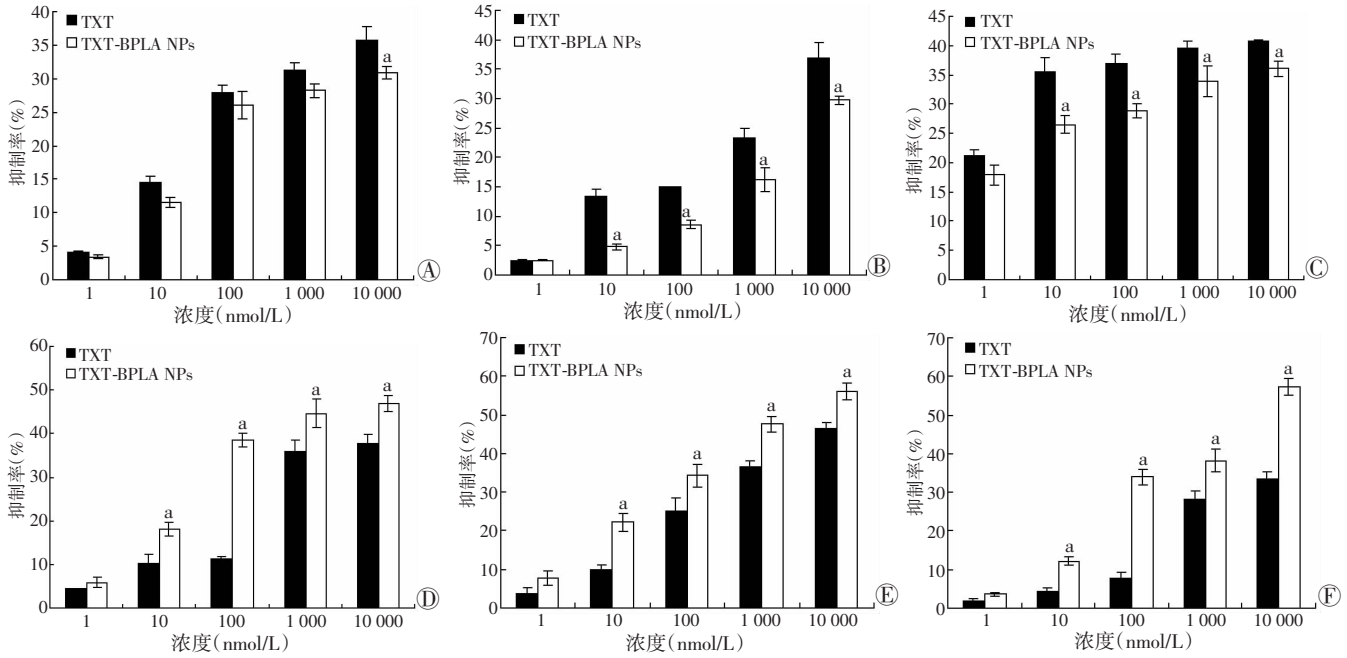
抑制SKOV3细胞的增殖,存在剂量和时间依赖性。在10～10 000 nmol/L浓度之间,相同时间点下,2种药物对SKOV3细胞增殖抑制率均随药物浓度的增加而增加,而且两者还呈现出不同的时间依赖性。在相同浓度下,药物作用后48 h以前,TXT对SKOV3细胞增殖的抑制能力明显强于TXT-BPLA NPs;72 h后,TXT的抑制能力趋于平缓,而TXT-BPLA NPs仍然表现出更强的抑制能力;TXT-BPLA NPs能够更加持续地发挥其抑制细胞增殖的效应,且TXT和TXT-BPLA NPs比较差异有统计学意义($P<0.05$)。见图1。

2.3 TXT-BPLA NPs持续诱导SKOV3细胞凋亡

对照组和BPLA NPs组在24、48、72、120 h凋亡率无明显差异($P>0.05$)。TXT-BPLA NPs组、TXT组与对照组比较,TXT-BPLA NPs组与TXT组比较,差异均具有统计学意义($P<0.05$);且药物处理24、48 h,TXT组比TXT-BPLA NPs组凋亡率更高,72 h后,TXT-BPLA NPs组比TXT组高。这提示72 h后TXT-BPLA NPs比TXT具有更强的诱导肿瘤细胞凋亡的能力,而且其持续诱导细胞凋亡的时间更长。见图2。

2.4 TXT-BPLA NPs影响SKOV3细胞中caspase-3的表达

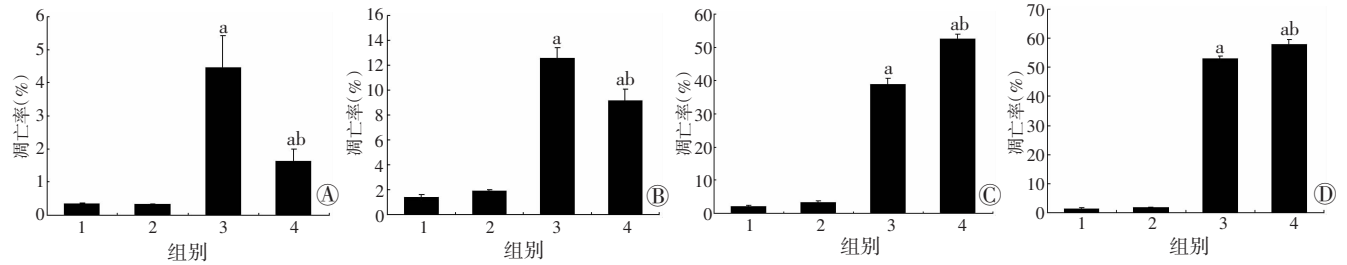
各组细胞中内参蛋白β-actin条带亮度相似,和对照组相比,TXT-BPLA NPs组和TXT组均能明显上调SKOV3细胞中caspase-3的表达,在药物作用后的24 h和48 h,TXT组caspase-3的表达明显高于TXT-BPLA NPs组;72 h后TXT-BPLA NPs组caspase-3的表达明显高于TXT组,其变化的时间动力学趋势与SKOV3细胞的凋亡变化趋势一致,TXT-BPLA NPs组、TXT组与对照组比较,TXT-BPLA NPs组与TXT组比较,差异均具有统计学意义($P<0.05$);BPLA NPs组和对照组caspase-3的表达无明显差异($P>0.05$)。见图3。



a:$P<0.05$,与TXT比较

A:12 h; B:24 h;C:48 h;D:72 h;E:96 h;F:120 h

图1 不同浓度TXT-BPLA NPs作用不同时间对SKOV3细胞增殖抑制率的变化

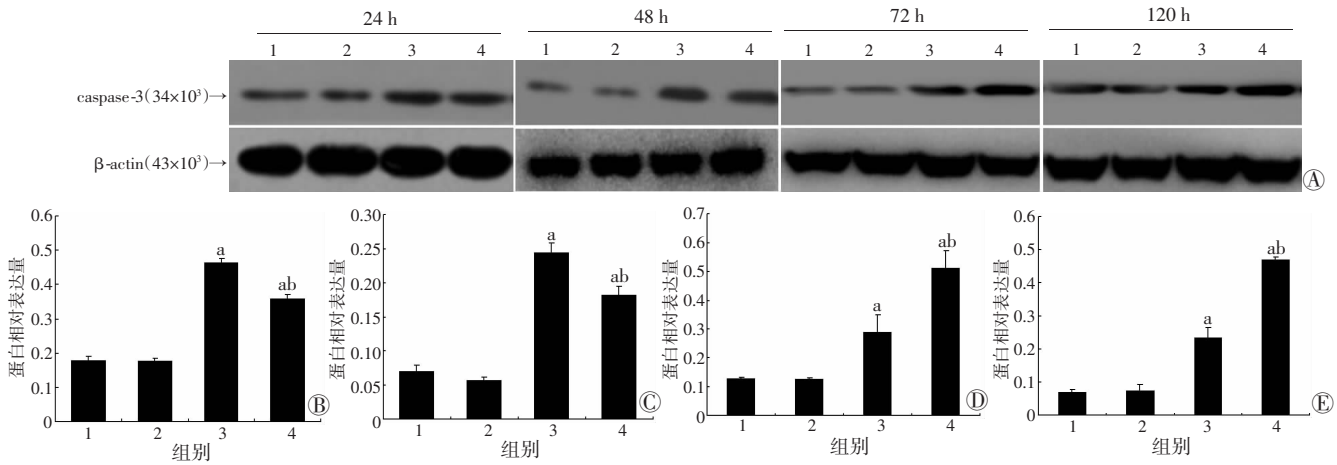


a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与TXT组比较

1:对照组;2:BPLA NPs组;3:TXT组;4:TXT-BPLA NPs组

A:24 h; B:48 h;C:72 h;D:120 h

图2 TXT-BPLA NPs诱导不同时间SKOV3细胞凋亡率的变化



1:对照组;2: BPLA NPs 组;3: TXT 组;4: TXT-BPLA NPs 组

A:Western blot 检测结果;B ~ E:半定量分析结果 B:24 h; C:48 h; D:72 h; E:120 h a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 TXT 组比较

图 3 Western blot 检测 TXT-BPLA NPs 上调 SKOV3 细胞中 caspase-3 蛋白的表达

3 讨论

卵巢癌是影响妇女身心健康的一种恶性肿瘤,其不易被早期发现和诊断,恶性程度高,从而导致患者病死率高[13-14]。卵巢癌治疗的基本原则是手术治疗辅以化学治疗,后者在卵巢癌的治疗中具有极为重要的地位[15]。TXT 是卵巢癌化学治疗的一线药物,属于紫杉类化合物抗肿瘤药,其基本作用机制是加强微管蛋白聚合作用和抑制微管解聚作用,导致形成稳定的非功能性微管束,因而破坏肿瘤细胞的有丝分裂[16]。由于 TXT 难溶于水及多种药用溶媒,客观上严重限制其临床应用。因此开发新的 TXT 剂型,增加 TXT 的水溶性,改善 TXT 在体内的分布代谢过程,对优化 TXT 的临床应用,改善卵巢癌等恶性肿瘤的治疗效果具有重要的意义[17-20]。已有研究者开展了很多这些方面的工作,其中采用最多的是脂质体和改性脂质体包裹 TXT[21-24]。本研究采用 BPLA 包裹 TXT 有以下优点:BPLA 是改性的聚乳酸,有着良好的生物相容性;通过自组装的方式实现包裹,减少溶剂的使用,增加安全性;容易对 BPLA 做进一步的化学改性,赋予其更多的功能,如靶向性等。因此,我们在前期研究的基础上,以体外培养卵巢癌细胞为模型,研究了 TXT-BPLA NPs 体外抗肿瘤作用,重点在于其抑制靶细胞增殖和诱导靶细胞凋亡。

本研究结果显示,TXT 组和 TXT-BPLA NPs 组均可抑制细胞增殖和促进凋亡的作用。然而,TXT 组在给药 48 h 及以前的细胞增殖抑制率和凋亡率显著增加,TXT-BPLA NPs 组在给药 72 h 及以后的细胞增殖抑制率和凋亡率显著增加,分析原因可能是 TXT 组的药物直接释放到肿瘤细胞,可以在较短的时间内达到药物峰浓度,对细胞的增殖产生较快的抑制作用,但这种抑制作用维持时间较短;TXT-BPLA NPs 组的药物是从纳米粒中持续、稳定释放,达到峰浓度的时间相对较慢,但其满足有效抗癌浓度的时间相对较长,对卵巢癌细胞的抑制作用可以维持较长的时间[21]。同时,本研究证实了肿瘤细胞在持续、稳定的抗肿瘤药物作用下,更能促进细胞的凋亡作用,并且 TXT-BPLA NPs 组和 TXT 组 SKOV3 细胞的 caspase-3 表达明显升高,72 h 后,前者较后者表达量更高。这也可以从细胞凋亡的机制上进一步证明持续释药可以延长肿瘤细胞凋亡蛋白的表达,从而达到持久的抗肿瘤作用。

本研究结果表明,与对照组相比,BPLA NPs 组对细胞增殖无明显的抑制作用,其凋亡率及凋亡蛋白 caspase-3 表达明显低于 TXT 组和 TXT-BPLA NPs 组,与对照组比较无明显差异。这说明 BPLA NPs 组没有明显抑制肿瘤细胞增殖和促进肿瘤细胞凋亡的作用,TXT-BPLA NPs 组的药理作用均由 TXT 药物本身引起。本研究同时也证实,BPLA NPs 组是一种安全可靠的新型纳米粒,可用于进一步的临床药物研究。

综上所述,TXT-BPLA NPs 对人卵巢癌 SKOV3 细胞有明显的增殖抑制及促凋亡作用,且其药物缓释效应可以使其对卵巢癌细胞增殖的抑制和凋亡作用更稳

定、作用时间更长、更安全。本实验为TXT抗肿瘤药的进一步开发应用、降低副作用并提高化疗效果提供了新思路及实验依据。然而,TXT-BPLA NPs还有待改进,开发具有靶向、可控释放和更长缓释时间的聚乳酸类药物释放系统是我们下一步的工作。

参考文献:

[1] Ziebarth A J, Landen C N Jr, Alvarez R D. Molecular/genetic therapies in ovarian cancer: future opportunities and challenges[J]. Clin Obstet Gynecol, 2012, 55(1): 156-172.

[2] Hernandez-Vargas H, Palacios J, Moreno-Bueno G. Telling cells how to die: docetaxel therapy in cancer cell lines[J]. Cell Cycle, 2007, 6(7): 780-783.

[3] Mackey J R, Martin M, Pienkowski T, *et al*. Adjuvant docetaxel, doxorubicin, and cyclophosphamide in node-positive breast cancer: 10-year follow-up of the phase 3 randomised BCIRG 001 trial[J]. Lancet Oncol, 2013, 14(1): 72-80.

[4] Lattanzio L, Tonissi F, Monteverde M, *et al*. Differential molecular mechanism of docetaxel-octreotide combined treatment according to the docetaxel-resistance status in PC3 prostate cancer cells[J]. Anticancer Drugs, 2013, 24(2): 120-130.

[5] Garcia A A, Yessaian A, Pham H, *et al*. Phase Ⅱ study of gemcitabine and docetaxel in recurrent platinum resistant ovarian cancer[J]. Cancer Invest, 2012, 30(4): 295-299.

[6] Nakamura T, Fuwa N, Takayama K, *et al*. Phase I study of weekly docetaxel and cisplatin arterial infusion for recurrent head and neck cancer[J]. Head Neck, 2012, 34(11): 1634-1639.

[7] Komiyama K, Kobayashi K, Minezaki S, *et al*. Phase Ⅰ/Ⅱ trial of a biweekly combination of S-1 plus docetaxel in patients with previously treated non-small cell lung cancer (KRSG-0601)[J]. Br J Cancer, 2012, 107(9): 1474-1480.

[8] Berns E M, Bowtell D D. The changing view of high-grade serous ovarian cancer[J]. Cancer Res, 2012, 72(11): 2701-2704.

[9] De-Souza R, Zahedi P, Moriyama E H, *et al*. Continuous docetaxel chemotherapy improves therapeutic efficacy in murine models of ovarian cancer[J]. Mol Cancer Ther, 2010, 9(6): 1820-1830.

[10] 江伟民, 潘君, 严好, 等. 新型生物素接枝聚乳酸纳米球的制备及性能研究[J]. 功能材料, 2012, 43(4): 417-420.

[11] Zhang J, Xiao Z, Lai D, *et al*. miR-21, miR-17 and miR-19a induced by phosphatase of regenerating liver-3 promote the proliferation? and metastasis of colon cancer[J]. Br J Cancer, 2012, 107(2): 352-359.

[12] Yang M, Yuan F, Li P, *et al*. Interferon regulatory factor 4 binding protein is a novel p53 target gene and suppresses cisplatin-induced apoptosis of breast cancer cells[J]. Mol Cancer, 2012, 11: 54.

[13] Marchion D C, Cottrill H M, Xiong Y, *et al*. BAD phosphorylation determines ovarian cancer chemosensitivity and patient survival[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(19): 6356-6366.

[14] 何迎盈,刘娜娜,罗治彬,等. 阿苯达唑抑制P-糖蛋白表达对耐顺铂卵巢癌细胞耐药性的影响[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(17): 1762-1765.

[15] Banerjee S, Kaye S B. New strategies in the treatment of ovarian cancer: current clinical perspectives and future potential[J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(5): 961-968.

[16] 李高辉,范秋虹. 多西他赛联合卡铂治疗复发性卵巢癌的疗效观察[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(3): 549-551.

[17] 陈力,黄亮,张伶俐. 紫杉类药物的研发现状及治疗卵巢癌的研究进展[J/CD]. 中华妇幼临床医学杂志:电子版, 2011, 7(5): 488-492.

[18] Campbell N, Greenaway J, Henkin J, *et al*. ABT-898 induces tumor regression and prolongs survival in a mouse model of epithelial ovarian cancer[J]. Mol Cancer Ther, 2011, 10(10): 1876-1885.

[19] Hensley M L. Update on gemcitabine and docetaxel combination therapy for primary and metastatic sarcomas[J]. Curr Opin Oncol, 2010, 22(4): 356-361.

[20] Miles D W, Chan A, Dirix L Y, *et al*. Phase Ⅲ study of bevacizumab plus docetaxel compared with placebo plus docetaxel for the first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer[J]. J Clin Oncol, 2010, 28(20): 3239-3247.

[21] Zhao P, Astruc D. Docetaxel nanotechnology in anticancer therapy[J]. ChemMedChem, 2012, 7(6): 952-972.

[22] Wang S, Luo Y, Zeng S, *et al*. Dodecanol-poly(D, L-lactic acid)-b-poly (ethylene glycol)-folate (Dol-PLA-PEG-FA) nanoparticles: evaluation of cell cytotoxicity and selecting capability *in vitro*[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2013, 102: 130-135.

[23] Roy A, Singh M S, Upadhyay P, *et al*. Nanoparticle mediated co-delivery of paclitaxel and a TLR-4 agonist results in tumor regression and enhanced immune response in the tumor microenvironment of a mouse model[J]. Int J Pharm, 2013, 445(1/2): 171-180.

[24] Biswas S, Dodwadkar N S, Deshpande P P, *et al*. Liposomes loaded with paclitaxel and modified with novel triphenylphosphonium-PEG-PE conjugate possess low toxicity, target mitochondria and demonstrate enhanced antitumor effects *in vitro* and *in vivo*[J]. J Control Release, 2012, 159(3): 393-402.

(**收稿**:2013-01-18;**修回**:2013-02-25)

(编辑 吴培红)