

共载吡柔比星和长春瑞宾混合胶束的构建及其 对乳腺癌的治疗研究*

陈丹¹, 周红利¹, 赵婷¹, 郭晨琦¹, 张荣苹¹, 李佳², 龚涛^{1△}

1. 四川大学华西药学院 靶向药物与释药系统教育部重点实验室(成都 610041); 2. 四川大学华西口腔医院(成都 610041)

【摘要】目的 研究使用硫酸软骨素-胆固醇聚合物(CS-Chol)和二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇(DSPE-mPEG₂₀₀₀)构建一种共载吡柔比星(pirarubicin, THP)和长春瑞宾(vinorelbine, VRL)的混合胶束(T+V-CS胶束), 并对其治疗乳腺癌的效果进行评价。**方法** 用超声-透析法制备T+V-CS胶束并对其理化性质进行表征, 用MTT实验和细胞周期实验评价T+V-CS胶束的体外抗肿瘤效果, 同时在4T1乳腺癌小鼠模型上研究T+V-CS胶束的体内抗肿瘤效果。**结果** T+V-CS胶束在透射电镜下呈近球形; 马尔文粒径为(155.5±4.5) nm, 多分散系数(PDI)为0.170±0.003, Zeta电位为(-23.0±0.9) mV; 在T+V-CS胶束中, THP的包封率为(81.87±2.56)%, VRL的包封率为(87.54±2.82)%, 总载药量为(10.20±1.20)%。体内药效实验结果表明, 与单载药胶束和游离药物溶液相比, T+V-CS胶束具有协同抗肿瘤作用, 能诱导G₂/M期的细胞数明显增加, 能明显抑制荷瘤小鼠的肿瘤生长并延长小鼠生存期。**结论** T+V-CS胶束表现出良好的抗肿瘤效果, 对乳腺癌的治疗具有一定的参考意义。

【关键词】 吡柔比星 长春瑞宾 胶束 乳腺癌 药效学

Co-delivery of Pirarubicin and Vinorelbine by Micelles for the Treatment of Breast Cancer CHEN Dan¹, ZHOU Hong-li¹, ZHAO Ting¹, GUO Chen-qi¹, ZHANG Rong-ping¹, LI Jia², GONG Tao^{1△}. 1. Key Laboratory of Drug Targeting and Delivery System of the Ministry of Education, West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: gongtaoy@126.com

【Abstract】Objective To develop a pirarubicin (THP) and vinorelbine (VRL) codelivery nano-micellar system (T+V-CS micelles) of pirarubicin (THP) and vinorelbine (VRL) by using chondroitin sulfate-cholesterol polymers (CS-Chol) and DSPE-mPEG₂₀₀₀ and to evaluate the therapeutic efficacy of the codelivery nano-micelles in breast cancer treatment. **Methods** T+V-CS micelles were prepared by ultrasonic-dialysis method, and the physicochemical characterization were evaluated using multiple technological means. The anti-tumor efficacy of T+V-CS micelles *in vitro* was evaluated by MTT assay and cell cycle arrest analysis. Evaluation of the therapeutic effect of T+V-CS micelles *in vivo* was carried out on xenograft 4T1 murine breast cancer bearing BALB/c mice model. **Results** T+V-CS micelles displayed a nearly spherical shape when observed through transmission electron microscope. The particle size and polydispersity indexes (PDI) of T+V-CS micelles was (155.5±4.5) nm and 0.170±0.003 respectively, while the Zeta potential was (-23.0±0.9) mV. Meanwhile, T+V-CS micelles demonstrated high encapsulation efficiency of (81.87±2.56)% for THP and (87.54±2.82)% for VRL and a high overall drug loading efficiency of (10.20±1.20)%. *In vitro* and *in vivo* studies of the therapeutic efficacy of breast cancer showed that T+V-CS micelles had synergistic anti-tumor effect and induced increased G₂/M cell cycle arrest in 4T1 cells, which could significantly inhibit tumor growth and prolong survival compared with the therapeutic efficacy of micelles loaded with a single kind of drug or free drug solutions. **Conclusion** The study showed that T+V-CS micelles had excellent anti-tumor effect, offering a reference to the clinical treatment of breast cancer.

【Key words】 Pirarubicin Vinorelbine Micelles Breast cancer Pharmacodynamics

乳腺癌是女性发病率最高的恶性肿瘤, 极大地威胁着女性的生命健康^[1-2]。化疗是治疗乳腺癌的主要手段之一^[3]。吡柔比星(pirarubicin, THP)和长春瑞宾(vinorelbine, VRL)是临床治疗乳腺癌的常用药物。THP是阿霉素的衍生物, 能抑制DNA拓扑异构酶 II 的活性, 干扰DNA合

成, 杀死肿瘤细胞^[4]。VRL能与β微管蛋白结合, 抑制微管聚合, 诱导肿瘤细胞凋亡^[5]。另有研究表明VRL能破坏细胞内的高尔基体结构^[6], 临床上已有将VRL与阿霉素联用治疗晚期乳腺癌的策略^[7-8], 但患者存活率仍较低。这可能是由于药物在肿瘤部位的分布有限和透过率低导致的^[9]。

纳米药物递送系统的出现有望解决该问题, 其在肿瘤治疗中具有增加难溶性药物溶解性、实现主/被动靶向

* 国家自然科学基金(No. 81872804)资助

△ 通信作者, E-mail: gongtaoy@126.com

以及缓/控释等优势^[10]。硫酸软骨素是一种天然的硫酸化糖胺聚糖,具有生物相容性、非免疫原性、极低毒性、可化学修饰^[11]等特点。它可作为配体与肿瘤细胞表面过表达的CD44受体特异性结合,具有肿瘤“归巢效应”^[12-14]。同时,我们课题组首次报道了硫酸软骨素具有高尔基体靶向性^[15],而高尔基体是细胞内蛋白(包括肿瘤发展过程中多种调控蛋白,例如血管内皮生长因子、血小板衍生因子等)加工、运输与分泌的重要场所^[16],因而利用硫酸软骨素作为载体构建胶束,包载化疗药物和针对高尔基体的治疗药物,有望发挥多重癌症靶向治疗效果。

在前期研究基础上,我们合成了硫酸软骨素-胆固醇聚合物(chondroitin sulfate-cholesterol polymers, CS-Chol),它具有较低的临界胶束浓度,可用作载体载药^[17]。研究发现在纳米粒表面修饰聚合物,如聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG),可以避免纳米粒被网状内皮血管系统识别清除,从而延长体内血液循环时间^[18]。本研究旨在利用CS-Chol与二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇(DSPE-mPEG₂₀₀₀)构建一种混合胶束给药系统共载THP与VRL的胶束(T+V-CS胶束),靶向肿瘤细胞/细胞内的高尔基体,进而增加药物在肿瘤细胞内的蓄积并破坏高尔基体结构功能,通过体内外实验证实该混合胶束可有效抑制乳腺癌的生长,延长小鼠生存期。现报道如下。

1 材料和方法

1.1 主要药品与试剂

吡柔比星(四川百利药业有限公司,橘红色粉末,纯度99.0%);酒石酸长春瑞宾(湖北宏中药业股份有限公司,白色或类白色粉末,纯度99.0%);CS-Chol(本实验室自制);DSPE-mPEG₂₀₀₀(上海芃硕生物科技有限公司);透析袋(上海源叶生物有限公司);DMEM高糖培养基(美国Hyclone公司);青霉素/链霉素(美国Hyclon公司);胎牛血清(美国Gibco);G75凝胶、MTT粉末、胰酶粉末、碘化丙啶(PI)、RNase酶以及PBS粉末均购于北京索莱宝科技有限公司;甲醇(色谱纯);其余试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器

BP 211D电子天平(德国Sartorius公司);DF-101S磁力搅拌器(巩义予华仪器有限责任公司);SCIENTZ-II D细胞超声破碎仪(宁波新芝科技研究所);H2-16K高速台式离心机(湖南可成仪器设备有限公司);Nanosizer Nano ZS90激光粒度仪(英国Malvern公司);H-600型透射电镜(日本Hitachi公司);RF-6000荧光分光光度计(日本岛津公司);Agilent 1260 Infinity高效液相色谱仪(美国Agilent公司);Tecan spark 10 M多功能酶标仪(瑞士

Tecan公司);UPH-II-10T优普超纯水仪(成都超纯科技有限公司);BD FACSCelesta流式细胞仪(美国BD公司)。

1.3 实验细胞和实验动物

小鼠乳腺癌细胞株4T1购自ATCC,由本实验室保种。培养条件:将4T1细胞用含1%青霉素/链霉素和10%胎牛血清的高糖DMEM完全培养基在37℃、体积分数为5%CO₂的恒温培养箱中培养,隔天传代。

SPF级的BALB/c小鼠,雌性,6~8周龄,体质量18~22 g,购于成都达硕实验动物有限公司。饲养条件:室温(25±2)℃,相对湿度(50±10)%,自由进食和饮水。所有动物实验操作均按照《四川大学关于实验动物的饲养和实验准则》进行,符合伦理学标准。

1.4 实验方法

1.4.1 T+V-CS胶束的制备 将等质量比的CS-Chol与DSPE-mPEG₂₀₀₀溶于12.5 mL纯化水,得到两者质量浓度均为2 mg/mL的混合水溶液,称取10 mg THP与10 mg VRL共溶于5 mL DMSO中得到药物混合溶液,取2.5 mL药物混合溶液边搅拌边滴加至CS-Chol和DSPE-mPEG₂₀₀₀的混合水溶液中,继续搅拌30 min。搅拌结束后将混合液用细胞超声破碎仪超声,超声条件为200 W,5 min,而后转移至透析袋(截留相对分子质量为3500)中以纯化水为介质透析过夜,以除去DMSO和游离药物,最后将胶束溶液于4000 r/min离心10 min,取上清,即得共载药胶束(T+V-CS)。取10 mg THP溶于2.5 mL DMSO中,制备方法同上,得单载THP的胶束(T-CS);取10 mg VRL溶于2.5 mL DMSO中,制备方法同上,得单载VRL的胶束(V-CS)。

1.4.2 T+V-CS胶束的表征 取200 μL胶束溶液用纯化水稀释至1 mL于室温下使用马尔文激光粒度仪测定其粒径分布与Zeta电位。采用透射电镜(TEM)对载药胶束的形态进行考察;取少量载药胶束溶液于铜格网上,用滤纸吸干后滴加1%磷钨酸溶液室温负染3 min,晾干,于镜下观察。凝胶柱法^[19]测定载药胶束的包封率(encapsulation efficiency, EE)和载药量(drug loading efficiency, DLE),分别使用荧光分光光度法和高效液相色谱法测定THP与VRL的含量。荧光分光光度计条件:激发波长480 nm,发射波长588 nm,激发和发射波长带宽均为5 nm。高效液相色谱条件:色谱柱(Kromasil-C₁₈, 150 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇:0.05 mol/L磷酸二氢钠(磷酸调节pH4.2)=67:33(V/V),流速为1 mL/min,检测波长为267 nm,柱温为30℃,进样体积为20 μL。按照公式(1)和(2)分别计算载药胶束的EE和DLE。

$$EE(\%) = C_1/C_2 \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{DLE}(\%) = W_1/W \times 100\% \quad (2)$$

其中, C_1 和 C_2 分别表示载药胶束过凝胶柱后和柱前 THP与VRL的质量浓度; W_1 表示载药胶束中THP或VRL的质量; W 表示胶束的总质量。

1.4.3 细胞毒性实验 取对数生长期的4T1细胞以 2×10^4 /孔的密度接种于96孔板中, 放置培养箱中培养 24 h。弃去培养基, 分别加入用不完全培养基配制的系列质量浓度的药液, 组别为THP溶液(T-SOL)、VRL溶液(V-SOL)、THP与VRL的混合溶液(T+V-SOL)、T-CS胶束、V-CS胶束和T+V-CS胶束, 其中THP与VRL质量比为 1:1, 药物质量浓度梯度为0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20 $\mu\text{g/mL}$, 同时设置阳性(不给药的细胞孔)和阴性对照组(背景孔), 每组每个质量浓度设置3个复孔。将细胞板放入孵箱中孵育 48 h, 弃去药液, 加入100 μL MTT溶液(用不完全培养基稀释, 质量浓度为0.5 mg/mL)放置孵箱中继续孵育 4 h, 吸去培养基再在每孔加入150 μL DMSO。将细胞板放入37 $^\circ\text{C}$ 恒温摇床中振摇10 min, 使用酶标仪测定各孔在490 nm波长处的吸光度(A)。按照公式(3)计算细胞存活率(cell viability), 绘制4T1细胞生长曲线计算出各给药组的半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC_{50})。为了评价THP与VRL两种药物联用是否具有协同抗肿瘤作用, 应用Chou-Talalay法^[20]根据公式(4)计算THP与VRL联合用药的联合指数(combination index, CI_X), $\text{CI}_X < 1$ 、 $\text{CI}_X = 1$ 、 $\text{CI}_X > 1$ 分别表示联合用药具有协同、相加和拮抗的抗肿瘤作用。 CI_{20} 、 CI_{50} 和 CI_{80} 均可用于判断两药是否具有协同作用, 我们选择了常用的 CI_{50} 作为最终的指标进行分析。 CI_{50} 表示抑制率为50%(即半数抑制浓度)时THP与VRL联合用药的联合指数。

$$\text{Cell viability}(\%) = (A_X - A_0)/(A_1 - A_0) \times 100\% \quad (3)$$

$$\text{CI}_X = (C_X)_T/(C)_T + (C_X)_V/(C)_V \quad (4)$$

其中 A_X 、 A_0 和 A_1 分别表示给药孔、阴性对照孔和阳性对照孔在490 nm波长处的吸光度; $(C_X)_T$ 和 $(C_X)_V$ 分别表示抑制率为X%时共给药剂中THP和VRL的质量浓度; $(C)_T$ 和 $(C)_V$ 分别表示抑制率为X%时单一给药剂中THP和VRL的质量浓度。

1.4.4 细胞周期实验 采用PI/DNA染色法^[21]测定细胞周期, 步骤如下: 取对数生长期的4T1细胞以 5×10^5 /孔的密度接种于6孔板中, 放置培养箱中培养。待细胞长至80%左右, 弃去培养基, 分别加入T-CS胶束、V-CS胶束和T+V-CS胶束, THP与VRL给药质量浓度均为60 ng/mL , 另设空白对照组(未加药细胞), 每组设置3个复孔, 放置培养箱中继续孵育。24 h后用胰酶消化并收集细胞至1.5 mL离心管中, 2 000 r/min离心3 min, 弃去上清, 用

PBS重悬, 离心洗3遍, 收集沉淀; 用300 μL PBS重悬, 加入700 μL 预冷的无水乙醇, 轻轻混匀, 4 $^\circ\text{C}$ 固定过夜, 离心收集沉淀; 用1 mL PBS离心洗两遍, 200 μL PBS重悬, 加入100 μL RNase溶液(100 $\mu\text{g/mL}$), 37 $^\circ\text{C}$ 孵育15 min, 再加入100 μL PI染液(50 $\mu\text{g/mL}$), 37 $^\circ\text{C}$ 避光孵育15 min。将样品经300目尼龙网过滤, 以分散细胞, 24 h内使用流式细胞仪检测, 最后用ModFit LT软件分析各组的细胞周期。

1.4.5 体内药效学研究 取对数生长期的4T1细胞经胰酶消化后用PBS重悬配制成 $2 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 的细胞悬液, 取100 μL 细胞悬液皮下接种到雌性BALB/c小鼠左侧第二对乳房垫下, 建立荷4T1原位瘤模型(计为第0天)。待肿瘤长至约100 mm^3 时, 将荷瘤小鼠随机分为7组, 每组12只, 分别为生理盐水组(SALINE)、游离THP组(T-SOL)、游离VRL组(V-SOL)、游离THP/VRL组(T+V-SOL)、T-CS组、V-CS组和T+V-CS组。采取尾静脉给药方式, 每3天给药1次, 共给药4次, 其中THP和VRL的给药剂量均为3 mg/kg 。每两天测量并记录肿瘤的长径 L 、短径 D 和小鼠的体质量, 根据公式(5)^[22]和(6)计算肿瘤体积 V 和小鼠体质量变化率(body mass shift, BMS), 绘制肿瘤生长曲线和小鼠体质量变化曲线。第23天实验结束后, 每组处死5只小鼠, 剖出小鼠体内肿瘤, 拍照后称重, 并根据公式(7)计算肿瘤抑制率(tumor growth inhibition, TGI)。剩余的动物用于检测小鼠生存期, 每天检查小鼠死亡情况并记录, 绘制小鼠生存曲线并计算各组小鼠的中位生存期和平均生存期, 再根据公式(8)计算荷瘤小鼠的寿命延长百分比(increase in life spans, ILS)。

$$V = 0.5 \times L \times D^2 \quad (5)$$

$$\text{BMS}(\%) = M_{\text{treat}}/M_0 \times 100\% \quad (6)$$

$$\text{TGI}(\%) = (1 - W_{\text{treat}}/W_{\text{saline}}) \times 100\% \quad (7)$$

$$\text{ILS}(\%) = (T/C - 1) \times 100\% \quad (8)$$

其中, M_0 和 M_{treat} 分别代表治疗前和治疗后的小鼠体质量; W_{treat} 和 W_{saline} 分别代表治疗组和生理盐水组的平均瘤重; T 和 C 分别代表治疗组和对照组的平均生存期。

1.5 统计学方法

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 T+V-CS胶束的表征

结果见表1、图1。制备的载药胶束粒径在130 ~ 160 nm之间, 多分散系数(PDI)均小于0.2, 说明载药胶束粒径较小, 粒度均一, 分散性良好。制备的胶束粒子形态

表 1 载药胶束的理化性质表征 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Table 1 The physicochemical characterization of the drug loaded micelles ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Micelles	Size/nm	PDI	Zeta potential/mV	EE of THP/%	EE of VRL/%	DLE/%
T-CS	135.4±1.8	0.143±0.030	-22.6±1.1	87.70±1.86	/	10.01±1.08
V-CS	132.2±1.7	0.132±0.007	-17.7±2.3	/	73.87±2.59	8.30±0.17
T+V-CS	155.5±4.5	0.170±0.003	-23.0±0.9	81.87±2.56	87.54±2.82	10.20±1.20

T-CS: Chondroitin sulfate-modified micelles loaded THP; V-CS: Chondroitin sulfate-modified micelles loaded VRL; T+V-CS: Chondroitin sulfate-modified micelles co-loaded THP and VRL; PDI: Polydispersity indexes; EE: Encapsulation efficiency; DLE: Drug loading efficiency.

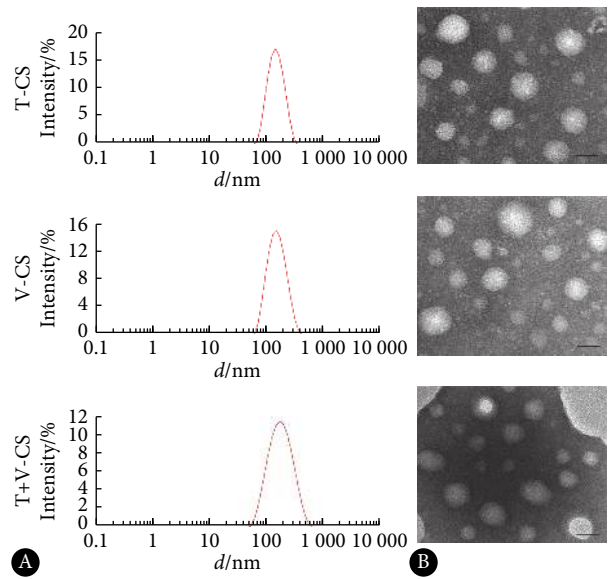


图 1 各载药胶束的粒径分布与形态

Fig 1 The particle size distribution and morphology of the prepared drug-loaded micelles

A: Particle size distribution of these micelles measured by dynamic light scattering (DLS); B: Morphology of these drug-load micelles observed by transmission electron microscope (TEM), the scale bar being 100 nm. T-CS, V-CS, T+V-CS denote the same as those in table 1.

规则, 呈近球状, 粒径分布良好。在T-CS和T+V-CS胶束中, THP与VRL的包封率均大于80%, 载药量约10%, V-CS胶束中VRL的包封率为(73.87±2.59)%, 载药量约为8%, 说明制备的载药胶束包封率和载药量均较高。

2.2 T+V-CS胶束对4T1细胞增殖活性的影响

结果见图2、表2。胶束组和溶液组对肿瘤细胞的生长均呈现出浓度依赖性抑制作用; 当THP与VRL质量比为1 : 1时, 相同药物质量浓度下, 与T+V-SOL组相比, T+V-CS组的细胞存活率更低, 表现出更强的细胞杀伤作用; T+V-SOL和T+V-CS给药组的联合指数 $CI_{50} < 1$, 说明共给药组均具有协同抗肿瘤作用, 但T+V-CS组 CI_{50} 更小, 且T+V-CS组的 IC_{50} 低于T+V-SOL组($P < 0.05$), 表明T+V-CS胶束协同抗肿瘤作用更强。

2.3 T+V-CS胶束对4T1细胞周期的影响

结果见图3。与空白对照组相比, T-CS、V-CS和

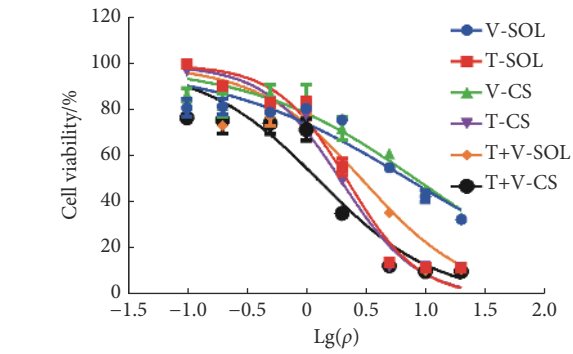


图 2 在体外经不同制剂处理48 h后4T1细胞的活力 ($n=3$)

Fig 2 *In vitro* cell viability of 4T1 cells treated with different formulations for 48 h ($n=3$)

V-SOL: Free VRL; T-SOL: Free THP; T+V-SOL: Free combination of THP and VRL; T-CS, V-CS, T+V-CS denote the same as those in table 1.

表 2 在体外经不同制剂处理48 h后4T1细胞的半数抑制浓度和联合指数值 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 *In vitro* IC_{50} and CI_{50} of 4T1 cells treated with different formulations for 48 h ($\bar{x} \pm s$)

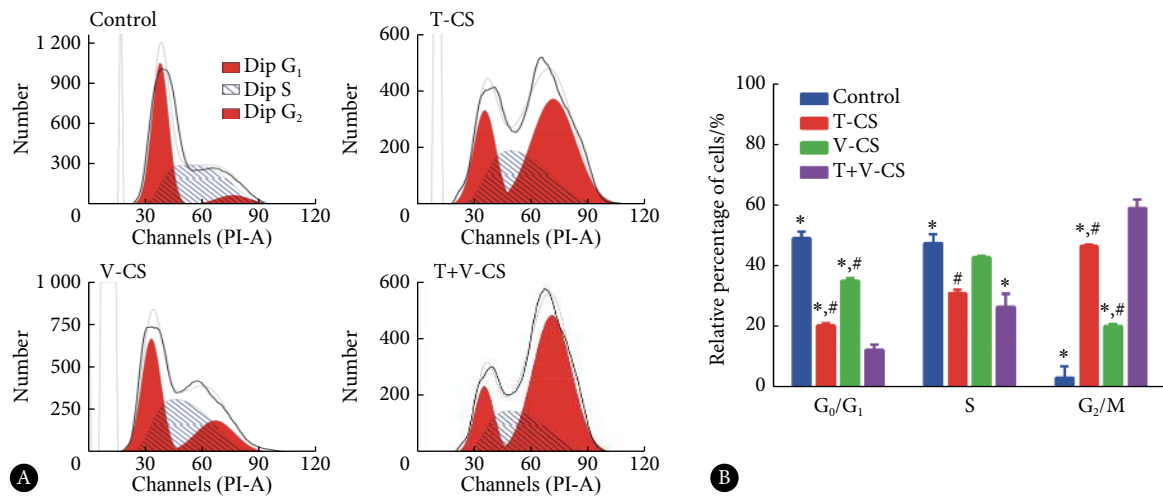
Treatment	<i>n</i>	$IC_{50}/(\mu g/mL)$	CI_{50}
V-SOL	3	7.816±2.310*	/
T-SOL	3	2.245±0.312*	/
V-CS	3	8.990±2.290*	/
T-CS	3	1.984±0.272*	/
T+V-SOL	3	3.127±1.001*	0.897±0.287
T+V-CS	3	1.326±0.358	0.408±0.110

V-SOL, T-SOL, V-CS, T-CS, T+V-SOL, T+V-CS denote the same as those in fig 2; IC_{50} : Half-maximal inhibitory concentration; CI_{50} : The combination index of THP and VRL at half-maximal inhibitory concentration. * $P < 0.05$, vs. T+V-CS.

T+V-CS胶束使周期停滞在 G_2/M 期的细胞数量均增加($P < 0.05$)。与其余各组比, T+V-CS组 G_2/M 期的细胞数最多且差异有统计学意义($P < 0.05$), 说明T+V-CS胶束能协同阻滞细胞周期, 进而抑制肿瘤细胞分裂。

2.4 T+V-CS胶束的体内抗肿瘤作用

结果见图4、表3。与生理盐水组比较, 各治疗组小鼠的肿瘤生长均被不同程度地抑制, 肿瘤体积缩小, 肿瘤质量降低($P < 0.05$)。接瘤第23天, 生理盐水组的肿瘤平均

图 3 细胞周期实验结果 ($n=3$)Fig 3 The results of cell cycle assay ($n=3$)

A: Representative image of cell cycle analysis by flow cytometry; B: Relative percentage of 4T1 cells at each cycle phase treated with different formulations. * $P<0.05$, vs. T+V-CS; # $P<0.05$, vs. control. T-CS, V-CS, T+V-CS denote the same as those in table 1.

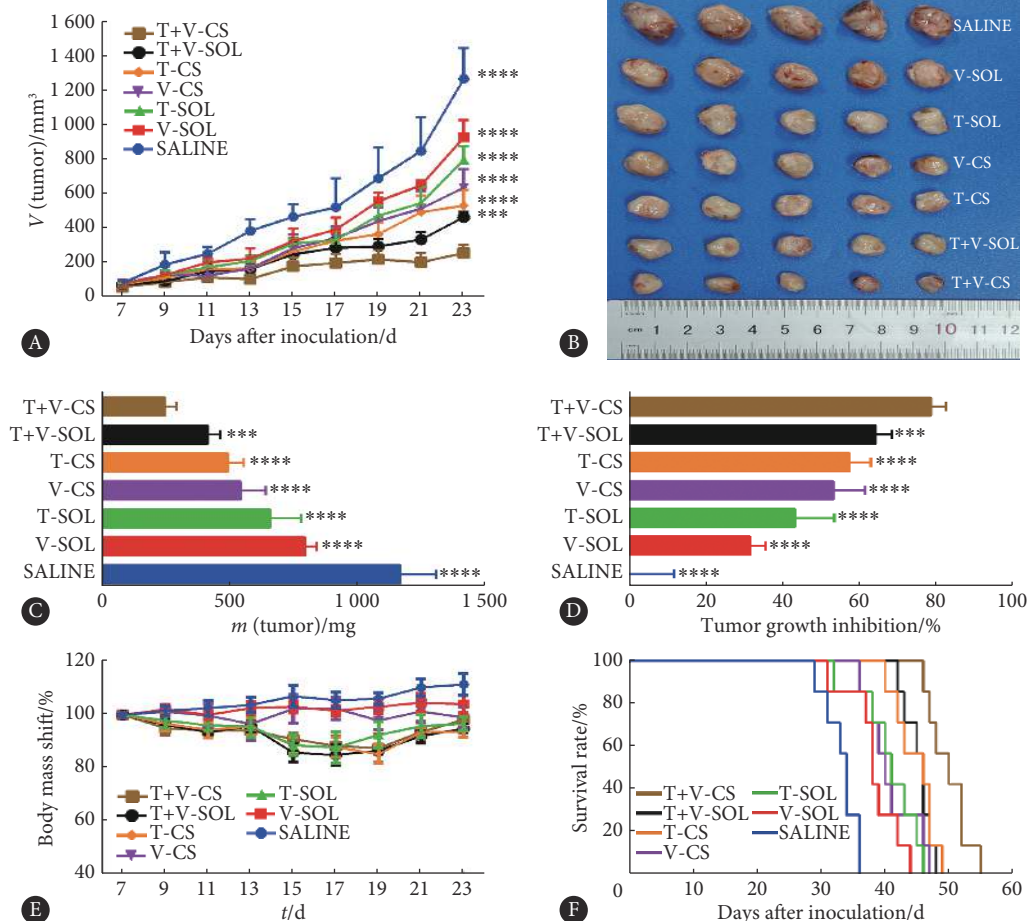


图 4 体内抗肿瘤效果评价

Fig 4 Evaluation of antitumor efficacy *in vivo*

A: The 4T1 tumor growth curves during the treatment ($n=5$); B: Image of 4T1 tumors were captured on the day 23 after treatment with different formulations or saline; C: The tumor mass were evaluated ($n=5$); D: The tumor growth inhibition were evaluated ($n=5$); E: The body mass change of 4T1 tumor-bearing mice during the treatment ($n=5$); F: Kaplan-Meier survival curve of mice bearing 4T1 tumors in different treatment groups ($n=7$). *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, vs. T+V-CS. T+V-CS, T+V-SOL, T-CS, V-CS, T-SOL, V-SOL denote the same as those in fig 2.

表 3 经过不同制剂和生理盐水治疗后的荷4T1肿瘤小鼠的中位生存期和寿命延长情况 (n=7)

Table 3 Median survival and ILS of 4T1 tumor-bearing mice treated with different formulations and saline (n=7)

Group	Median survival/d	Mean survival/d	ILS/%					
			V-SOL	T-SOL	V-CS	T-CS	T+V-SOL	T+V-CS
SALINE	34.0	33.3±2.6 [*]	15.5 [*]	22.3 [*]	22.7 [*]	34.8 [*]	36.1 [*]	50.2
V-SOL	38.0	38.4±4.1 [*]	/	5.9 [*]	6.3 [*]	16.7 [*]	17.8 [*]	30.1
T-SOL	41.0	40.7±4.8 [*]	/	/	0.4 [*]	10.2 [*]	11.2 [*]	22.8
V-CS	40.0	40.9±4.2 [*]	/	/	/	9.8 [*]	10.8 [*]	22.4
T-CS	46.0	44.9±3.2 [*]	/	/	/	/	1.0 [*]	11.5
T+V-SOL	46.0	45.3±2.1 [*]	/	/	/	/	/	10.4
T+V-CS	50.0	50.0±3.2	/	/	/	/	/	/

* P<0.05, vs. T+V-CS. ILS: Increase in life spans; T+V-CS, T+V-SOL, T-CS, V-CS, T-SOL, V-SOL denote the same as those in fig 2.

体积和质量分别为(1 273.24±176.53) mm³和(1 170.92±140.28) mg, 经V-SOL、T-SOL、V-CS、T-CS、T+V-SOL和T+V-CS治疗后, 各组分别实现了31.83%、43.45%、53.37%、57.68%、64.41%和78.83%的肿瘤抑制率。其中T+V-CS组的抑瘤效果最强, 优于其他治疗组(P<0.05)。生理盐水组小鼠中位生存期为34 d, T+V-CS组小鼠的中位生存期最长为50 d, 且该组小鼠的平均生存期最长, 与其他治疗组比较差异有统计学意义(P<0.05)。另外, 以生理盐水组作为对照组, T+V-CS组的寿命延长百分比高达50.2%, 与其余治疗组比较差异有统计学意义(P<0.05)。

治疗期间小鼠的体质量变化曲线图表明, 生理盐水组、V-SOL和V-CS组小鼠体质量无明显下降; T-SOL、T+V-SOL、T-CS和T+V-CS组小鼠的体质量呈不同程度下降, 各组体质量变化差异无统计学意义。

3 讨论

本研究利用CS-Chol聚合物, 采用简单的超声-透析法成功地构建了一种共载吡柔比星和长春瑞宾的硫酸软骨素修饰的纳米混合胶束递药系统。采用传统的透析法制备的载药胶束存在粒径偏大、药物包封率不佳等问题, 故本研究引入超声工艺以改进上述问题。该胶束制备过程的技术要点有二: ①吡柔比星和长春瑞宾的质量比与T+V-CS胶束能否发挥协同抗肿瘤作用密切相关, 因此我们通过单一因素法筛选出了二者的最适比例(为1:1); ②DSPE-mPEG₂₀₀₀的含量会影响CS胶束的体内循环时间以及吡柔比星和长春瑞宾的包封率, 同样地通过处方优化确定了其含量(为总载体质量的50%)。实验结果显示, 载药胶束呈类圆球形, 具有较小的粒径, 良好的分散性, 较高的包封率和载药量。接下来我们探讨了单载药

制剂、共载药制剂以及药物溶液在体内外抗肿瘤效果的差别。MTT实验结果显示, T+V-CS组具有更低的IC₅₀和理想的CI₅₀(<1)。细胞周期实验结果显示, T+V-CS组G₂/M期的细胞数最多。体内药效学实验结果显示, T+V-CS组小鼠肿瘤体积最小, 生存期最长, 且与单载药制剂和溶液组相比均有明显差异。

体内外药效学实验结果一致, 共同说明T+V-CS胶束具有更强的协同抗肿瘤作用, 推测原因如下: ①T+V-CS胶束具有肿瘤细胞靶向性, 不仅通过高渗透长滞留效应(enhanced permeation and retention effect, EPR)被动靶向至肿瘤部位^[23], 还能通过CD44受体介导的主动靶向作用将吡柔比星/长春瑞宾更多地递送至肿瘤细胞; ②硫酸软骨素具有高尔基体靶向性, 长春瑞宾能破坏高尔基体结构, 故T+V-CS胶束能将长春瑞宾更多地递送至高尔基体, 破坏高尔基体结构, 抑制肿瘤发展过程所需蛋白的加工运输, 进一步抑制肿瘤生长; ③吡柔比星和长春瑞宾具有不同的抗癌机制, 吡柔比星作用于细胞核, 干扰DNA合成, 而长春瑞宾靶向微管, 抑制细胞分裂, 干扰细胞周期; ④P38与P53是参与调控肿瘤细胞的周期与凋亡的重要因子^[24-25], 研究^[26]发现将长春瑞宾和阿霉素同时作用于两种不同的乳腺癌细胞株, 阿霉素能够增加P53蛋白的表达, 长春瑞宾能够激活P38丝裂原活化蛋白激酶信号通路, 这为吡柔比星和长春瑞宾的协同抗肿瘤作用提供了依据。我们通过细胞周期实验证明了T+V-CS胶束具有协同阻滞细胞周期的作用, 关于协同抗肿瘤的详细机制有待深入研究。综上, T+V-CS胶束能显著抑制肿瘤生长并延长小鼠生存期, 为临床应用提供较好的研究价值。我们下一步将对T+V-CS胶束的肿瘤细胞内高尔基体靶向性以及抗肿瘤转移作用进行探究。

* * *

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] DESANTIS C E, MA J, GAUDET M M, *et al.* Breast cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(6): 438–451.
- [2] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394–424.
- [3] HARBECK N, GNANT M. Breast cancer. *Lancet*, 2017, 389(10074): 1134–1150.
- [4] ZHOU C, SONG X, GUO C, *et al.* Alternative and injectable preformed albumin-bound anticancer drug delivery system for anticancer and antimetastasis treatment. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11(45): 42534–42548.
- [5] MUKHTAR E, ADHAMI V M, MUKHTAR H. Targeting microtubules by natural agents for cancer therapy. *Mol Cancer Ther*, 2014, 13(2): 275–284.
- [6] KAMATA H, SADAHIRO S, YAMORI T. Discovery of inhibitors of membrane traffic from a panel of clinically effective anticancer drugs. *Biol Pharm Bull*, 2019, 42(5): 814–818.
- [7] HUANG L, WANG X, ZHOU L, *et al.* Oral vinorelbine versus intravenous vinorelbine, in combination with epirubicin as first-line chemotherapy in Chinese patients with metastatic breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2020, 85(1): 205–215.
- [8] NORRIS B, PRITCHARD K I, JAMES K, *et al.* Phase III comparative study of vinorelbine combined with doxorubicin versus doxorubicin alone in disseminated metastatic/recurrent breast cancer: National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study MA8. *J Clin Oncol*, 2000, 18(12): 2385–2394.
- [9] BAHRAMI B, HOJJAT-FARSANGI M, MOHAMMADI H, *et al.* Nanoparticles and targeted drug delivery in cancer therapy. *Immunol Lett*, 2017, 190: 64–83.
- [10] XU X, HO W, ZHANG X, *et al.* Cancer nanomedicine: from targeted delivery to combination therapy. *Trends Mol Med*, 2015, 21(4): 223–232.
- [11] KHAN A R, YANG X, DU X, *et al.* Chondroitin sulfate derived theranostic and therapeutic nanocarriers for tumor-targeted drug delivery. *Carbohydr Polym*, 2020, 233: 115837[2021-01-27]. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115837>.
- [12] ZHAO L, LIU M, WANG J, *et al.* Chondroitin sulfate-based nanocarriers for drug/gene delivery. *Carbohydr Polym*, 2015, 133: 391–399.
- [13] LEE J Y, LEE H S, KANG N W, *et al.* Blood component ridable and CD44 receptor targetable nanoparticles based on a maleimide-functionalized chondroitin sulfate derivative. *Carbohydr Polym*, 2020, 230: 115568[2021-01-27]. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115568>.
- [14] LIU P, CHEN N, YAN L, *et al.* Preparation, characterisation and *in vitro* and *in vivo* evaluation of CD44-targeted chondroitin sulphate-conjugated doxorubicin PLGA nanoparticles. *Carbohydr Polym*, 2019, 213: 17–26.
- [15] LUO J, ZHANG P, ZHAO T, *et al.* Golgi apparatus-targeted chondroitin-modified nanomicelles suppress hepatic stellate cell activation for the management of liver fibrosis. *ACS Nano*, 2019, 13(4): 3910–3923.
- [16] TAO Y, YANG Y, ZHOU R, *et al.* Golgi apparatus: An emerging platform for innate immunity. *Trends Cell Biol*, 2020, 30(6): 467–477.
- [17] LI H, ZHANG P, LUO J, *et al.* Chondroitin sulfate-linked prodrug nanoparticles target the golgi apparatus for cancer metastasis treatment. *ACS Nano*, 2019, 13(8): 9386–9396.
- [18] ZHANG D, ZHANG J. Surface engineering of nanomaterials with phospholipid-polyethylene glycol-derived functional conjugates for molecular imaging and targeted therapy. *Biomaterials*, 2020, 230: 119646[2021-05-24]. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119646>.
- [19] ZHAO T, ZHOU H, LEI L, *et al.* A new tandem peptide modified liposomal doxorubicin for tumor “ecological therapy”. *Nanoscale*, 2020, 12(5): 3359–3369.
- [20] BANERJEE V, SHARDA N, HUSE J, *et al.* Synergistic potential of dual andrographolide and melatonin targeting of metastatic colon cancer cells: Using the Chou-Talalay combination index method. *Eur J Pharmacol*, 2021, 897: 173919[2021-05-24]. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.173919>.
- [21] BOOY E P, MCRAE E K, KOUL A, *et al.* The long non-coding RNA BC200 (BCYRN1) is critical for cancer cell survival and proliferation. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 109[2021-01-27]. <http://doi.org/10.1186/s12943-017-0679-7>.
- [22] LUO S, FENG J, XIAO L, *et al.* Targeting self-assembly peptide for inhibiting breast tumor progression and metastasis. *Biomaterials*, 2020, 249: 120055[2021-01-27]. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120055>.
- [23] GOLOMBEK S K, MAY J N, THEEK B, *et al.* Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses. *Adv Drug Deliv Rev*, 2018, 130: 17–38.
- [24] AUBREY B J, KELLY G L, JANIC A, *et al.* How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death Differ*, 2018, 25(1): 104–113.
- [25] MARTINEZ-LIMON A, JOAQUIN M, CABALLERO M, *et al.* The p38 pathway: From biology to cancer therapy. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(6): 1913[2021-01-27]. <http://doi.org/10.3390/ijms21061913>.
- [26] LIEM A A, APPELYARD M V, O'NEILL M A, *et al.* Doxorubicin and vinorelbine act independently via p53 expression and p38 activation respectively in breast cancer cell lines. *Br J Cancer*, 2003, 88(8): 1281–1284.

(2021-02-01收稿, 2021-06-16修回)

编辑 余琳