

N-三甲基壳聚糖包衣多柔比星脂质体肿瘤新生血管靶向性的体内评价

何文¹ 郭咸希¹ 张小杰² (武汉大学 1. 人民医院药学部; 2. 药学院 武汉 430060)

摘要 目的: 考察 N-三甲基壳聚糖(TMC)包衣的多柔比星(ADM)阳离子脂质体抗肿瘤活性及对肿瘤新生血管的靶向性。**方法:** 采用动物移植性肿瘤实验法,建立小鼠 H₂₂ 肿瘤模型,比较 TMC 包衣脂质体组和其他各给药组的肿瘤抑制率并通过小鼠尾静脉注射异硫氰酸荧光素标记的葡聚糖(FITC-Dextran),分析肿瘤组织中的在体荧光,定性观察肿瘤新生血管的形态分布情况,定量测定肿瘤组织中的血管相对密度。**结果:** TMC 包衣的 ADM 脂质体组,其小鼠的瘤重抑制率达 53.47%,显著高于游离药物组和未包衣脂质体组(8.75%, 34.88%)($P < 0.05$);给予 TMC 包衣 ADM 脂质体的小鼠,其肿瘤新生血管形态良好,分布均匀,血管分支少,而其他给药组的肿瘤新生血管多扭曲,粗细不均,一个节点有多个血管分支等;通过比较不同给药组肿瘤组织黏附的 FITC-Dextran 量,TMC 包衣 ADM 脂质体组的肿瘤血管密度明显低于游离药物组和未包衣脂质体组($P < 0.05$)。**结论:** TMC 包衣的 ADM 阳离子脂质体不仅具有较强的抗肿瘤活性,而且具有很好的肿瘤新生血管靶向性。

关键词 N-三甲基壳聚糖; 多柔比星; 阳离子脂质体; 肿瘤新生血管; 肿瘤抑制率; 靶向性

中图分类号: R945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-049X(2011)07-0911-04

Evaluation of *in vivo* Tumor Angiogenesis Targeting of Adriamycin Cationic Liposomes Coated by N-trimethyl Chitosan

He Wen¹, Guo Xianxi¹, Zhang Xiaojie² (1. Department of pharmacy, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China; 2. School of Pharmaceutical Science, Wuhan University)

ABSTRACT Objective: To study the anti-tumor activity and the tumor angiogenesis targeting of adriamycin (ADM) cationic liposomes coated by N-trimethyl chitosan (TMC). **Method:** The mice H₂₂ tumor model was established by animal transplanted tumor experiment. In addition to compare the tumor inhibition rate of liposomes coated by TMC with that of the other experimental groups, the fluorescence in tumor tissue was also investigated through the tail vein injection of fluorescein isothiocyanate conjugated dextran (FITC-Dextran). The shape and arrangement conditions of tumor angiogenesis were observed qualitatively and relative density of tumor angiogenesis was also determined quantitatively. **Result:** The tumor weight inhibition rate of the mice given TMC-coated ADM liposomes was 53.47%, which was significantly higher than that of free drug group and the uncoated liposomes group (8.75% and 34.88%, respectively) ($P < 0.05$). In the mice given TMC-coated ADM liposomes, the tumor angiogenesis had good shape, uniform arrangement and small vascular branches, while the tumor angiogenesis of the other treatment groups showed more distorted shape, uneven thickness and a node with multiple vascular branches. The vascular density of liposomes coated by TMC was significantly lower than that of the free drug group and uncoated liposomes ($P < 0.05$). **Conclusion:** ADM liposomes coated by TMC not only have strong anti-tumor activity, but also have good tumor angiogenesis targeting ability.

KEY WORDS N-trimethyl chitosan; Adriamycin; Cationic liposomes; Tumor angiogenesis; Tumor inhibition rate; Targeting

在肿瘤治疗中,肿瘤血管被认为是一个重要的治疗靶点。靶向到肿瘤新生血管具有许多优点^[1],包括血液中的药物可以直接与内皮细胞接触、破坏小部分肿瘤内皮细胞使许多肿瘤细胞缺乏养分而坏死等。近年来,靶向肿瘤新生血管受到越来越多的关注。阳离子脂质体具有一定的靶向肿瘤血管的作用,可选择性作用于肿瘤血管内皮细胞^[2]。因此将细胞毒类抗肿瘤药物制成阳离子脂质体,不仅可以降低其毒性,还可以提高肿瘤血管的靶向性,是提高肿瘤治愈率的一种新方法。

多柔比星(adriamycin, ADM)是蒽醌类广谱抗肿瘤药,临床上用于治疗乳腺癌、甲状腺癌、肺癌、卵

巢癌、肉瘤等实体瘤^[3],但 ADM 的毒性较大,除产生恶心、呕吐、骨髓抑制等不良反应外,还可引起与剂量有关的心脏毒性^[4]。本文采用 N-三甲基壳聚糖(N-trimethyl chitosan, TMC)这种低毒性的阳离子多糖^[5]对 ADM 脂质体进行包衣,使其成为阳离子脂质体,采用 FITC-Dextran 标记肿瘤血管,考察其对肿瘤新生血管的靶向性,以期为临床提供一种高效、低毒、且具有肿瘤新生血管靶向作用的 ADM 新制剂。

1 材料与方法

1.1 仪器

RE-52C 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂); EmulsiFlex-C5 高压均质机(加拿大 AVESTIN 公

司);超净工作台(SW-CJ-IFD,苏州净化设备有限公司);倒置显微镜(Olympus CK40-SL,日本);CO₂培养箱(Thermo Forma,美国);酶联免疫检测仪(Biotec);96孔培养板(Costar);激光共聚焦荧光显微镜(LEICA TCS-SP2,德国)。

1.2 试剂

ADM(北京华奉联博科技有限公司,批号:HF070312);卵磷脂、胆固醇、维生素E(国药集团化学试剂有限公司);TMC(季铵化程度为64.4%,实验室自制);RPMI1640(GIBCO,批号:8109102);无支原体胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司,批号:090603);注射用青霉素钠(华北制药股份有限公司,批号:D0904209);注射用硫酸链霉素(华北制药股份有限公司,批号:0910103);FITC标记的右旋糖酐(FITC-Dextran,Mr500 000,Sigma,美国);注射用生理盐水(双鹤药业,批号:080504);其他试剂均为分析纯。

1.3 细胞株

小鼠肝癌细胞H₂₂(购买于武汉大学保藏中心)。

1.4 实验动物

雄性昆明小鼠,体质量20~22 g,武汉生物制品研究所提供,动物许可证号:SCXK(鄂)2008-0003。

1.5 TMC包衣 ADM 阳离子脂质体(TMC-ADML)的制备

采用薄膜分散法和硫酸铵梯度法^[6]制备ADML。将处方量的卵磷脂、胆固醇和维生素E置于梨形瓶中,加氯仿振荡溶解后于旋转蒸发仪上40℃减压除去氯仿,制备磷脂膜,加入200 mmol·L⁻¹的(NH₄)₂SO₄溶液水化磷脂膜,即得空白脂质体初悬液。将该空白脂质体初悬液经高压均质机在一定压力下乳匀后,悬置于磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4)中透析,12 h后换等量的同种透析液,透析3次,直至脂质体膜内外硫酸铵梯度达到1 000倍以上。精密称取ADM适量,溶于少量蒸馏水中,将空白脂质体混悬液和ADM溶液分别置40℃水浴中预热片刻,混合,在40℃水浴中孵育30 min(不时振摇),取出,即得ADML初悬液。

称取适量TMC60溶于蒸馏水,制得浓度为0.1%的TMC 60溶液,将ADML以1 ml·min⁻¹的速度滴加到一定体积的TMC 60溶液中(体积比TMC 60:ADML=4:1^[7]),以300 r·min⁻¹速度边滴加边磁力搅拌,待脂质体滴加完后,再继续搅拌约10 min,即得TMC-ADML。

1.6 FITC-Dextran 标准曲线的绘制

精密称取FITC-Dextran 5 mg,置100 ml棕色量

瓶中,用生理盐水溶解并定容至刻度,可得浓度为50 μg·ml⁻¹的储备液。精密吸取0.05,0.1,0.4,1.0,1.6,2.0,6.0 ml储备液至10 ml的棕色量瓶中,用生理盐水定容,得到浓度分别为0.25,0.5,1,5,8,10,30 μg·ml⁻¹的FITC-Dextran。分别吸取200 μl到96孔板中,每个浓度设5个复孔,在酶联免疫检测仪上,激发波长480 nm,发射波长530 nm的条件下,测得各浓度的荧光强度,以荧光强度F对浓度C进行线性回归,得回归方程为: $F = 1\,288.1C + 189.8$ ($r = 0.999\,9$),FITC-Dextran在0.25~30.00 μg·ml⁻¹范围内,线性关系良好。

1.7 小鼠 H₂₂ 肿瘤模型的建立

1.7.1 小鼠肝癌细胞H₂₂的培养与传代 小鼠肝癌细胞H₂₂为悬浮细胞,在传代培养时,将培养瓶内的培养基用吸管移到离心管中,在1 000 r·min⁻¹的转速下,离心10 min,小心吸弃上清液,加入新的培养基,吹打成细胞悬液,转移到细胞培养瓶中。置于5% CO₂,37℃下的培养箱中培养,重复上述过程,隔天换一次培养液,将细胞培养一段时间。将肝癌细胞H₂₂浓度调至2~5×10⁷,接种于小鼠腹腔内(0.4 ml/只),7 d后抽取腹水,用生理盐水稀释,重新接种于小鼠腹腔内传代,共传3代。

1.7.2 小鼠腋下接种瘤细胞悬液 处死已在小鼠腹腔传过3代的H₂₂腹水瘤小鼠,抽取乳白色腹水,加生理盐水稀释至1~2.5×10⁷的瘤细胞悬液,每只昆明小鼠右前肢腋下注射0.2 ml,整个接种时间在1 h内完成。

1.8 动物分组与给药

将腋下接种过H₂₂瘤细胞悬液的40只小鼠,随机分成A、B、C、D组,每组10只。接种后第7天给药1次,A组小鼠尾静脉注射生理盐水(空白对照组);B组小鼠尾静脉注射游离ADM(阳性对照组);C组小鼠尾静脉注射未包衣的ADM脂质体;D组小鼠尾静脉注射TMC60包衣的ADM脂质体。游离药物、未包衣的ADM脂质体、TMC60包衣的ADM脂质体均按5 mg·kg⁻¹给药,空白对照组注射等体积的生理盐水。

1.9 FITC-Dextran 标记肿瘤血管

注射药物7 d后,各组小鼠尾静脉注射FITC-Dextran(50 mg·ml⁻¹)0.2 ml,体内循环15 min后断颈处死,取出肿瘤块,剥去纤维组织,准确称重,比较各组肿瘤组织质量间的差异。取各肿瘤组织用含4%多聚甲醛的PBS溶液浸泡过夜使组织固定,再用含20%蔗糖的PBS溶液浸泡2 d使组织脱水,脱水后的组织采用冰冻切片,采用激光共聚焦荧光显微镜观察组织切片中的在体荧光;称重后的肿瘤组

织剪碎,按重量每克组织加入生理盐水 2 ml,磨碎成均浆,在摇床上摇动 1 h 后,在 1 500 r·min⁻¹转速下离心 5 min,取上清液 200 μl,测定荧光强度。

1.10 评价指标

1.10.1 计算肿瘤抑制率 抑瘤率=(空白对照组平均瘤重-给药组平均瘤重)/空白对照组平均瘤重×100%。

1.10.2 肿瘤组织切片中的在体荧光分析 在激光共聚焦荧光显微镜下,由各组肿瘤组织冰冻切片中的在体荧光,观察肿瘤新生血管的形态变化,分布情况。

1.10.3 FITC-Dextran 黏附测定肿瘤组织血管的相对密度 在酶联免疫检测仪上测定各个样本的荧光强度,对照相应标准曲线(用不同浓度的 FITC-Dextran 绘制的标准曲线),就可得出各个肿瘤组织黏附的 FITC-Dextran 值。

2 结果

2.1 各组小鼠的肿瘤重量和肿瘤抑制率

给药 7 d 后,将小鼠拉断颈椎处死,局部用 75%乙醇溶液消毒,用消毒过的剪刀取皮下肿瘤块,剥去纤维组织,准确称重,计算抑瘤率。结果见表 1。给予 TMC60 包衣的 ADM 脂质体组小鼠,其肿瘤重量明显小于空白对照组、游离药物组、未包衣脂质体组小鼠,其抑瘤率亦显著高于其他实验组($P < 0.05$),因此,TMC 包衣的 ADM 阳离子脂质体有很强的抗肿瘤活性。

表 1 各组小鼠平均肿瘤质量和抑瘤率($\bar{x} \pm s, n = 6$)

各实验组	平均瘤质量(g)	抑瘤率(%)
空白对照组	1.931 ± 0.006 ^a	-
游离药物组	1.762 ± 0.041 ^a	8.75 ^a
未包衣脂质体组	1.258 ± 0.041 ^a	34.88 ^a
TMC60 包衣脂质体组	0.899 ± 0.008	53.47

注:与 TMC60 包衣脂质体组比较,^a $P < 0.05$ 。

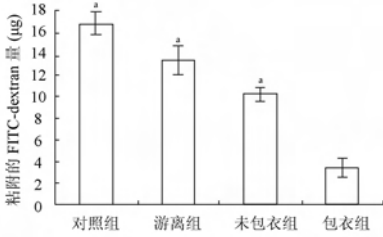
2.2 肿瘤组织切片中的新生血管排布情况

采用激光共聚焦荧光显微镜,观察各肿瘤组织冰冻切片中的在体荧光,结果发现,生理盐水组的肿瘤切片中新生血管分化不成熟,分布紊乱,扭曲、扩张、动静脉短路及分叉,不能适当地吻合,各血管相互粘连;游离药物组和未包衣脂质体组新生血管分支较多,粗细不均匀;而 TMC60 包衣 ADM 脂质体组肿瘤切片中新生血管形态良好,排布均匀,血管分支少,说明 TMC 包衣 ADM 脂质体能够显著调节和改善微血管的结构,形态和数目,具有很好的肿瘤血管靶向作用。

2.3 肿瘤组织黏附的 FITC-Dextran 量

各肿瘤组织中黏附的 FITC-Dextran 量见图 1,可以看出:给予 TMC60 包衣的 ADM 脂质体组小鼠,

其肿瘤组织黏附,吸收和滞留的 FITC-Dextran 量是(4.33 ± 0.51) μg,显著低于生理盐水组(16.72 ± 0.53) μg,游离药物组(13.36 ± 0.89) μg 和未包衣脂质体组(10.27 ± 0.21) μg($P < 0.05$),说明 TMC 包衣的 ADM 脂质体肿瘤组织中新生成血管密度明显减少,具有很好的靶向抗肿瘤新生血管生成作用。



注:与包衣组比较,^a $P < 0.05$ 。

图 1 各实验组小鼠肿瘤组织中黏附的 FITC-Dextran 量

3 讨论

抗肿瘤血管生成研究是当今肿瘤研究的一个热点。肿瘤的生长,侵袭,转移依赖于新生血管的形成,抑制肿瘤介导的血管生成,阻断肿瘤细胞的营养途径,就可有效地抑制肿瘤细胞的增殖,治疗肿瘤。任何有效的抗肿瘤血管生成的治疗方案,除了表现为肿瘤体积减少和重量减轻外,整个肿瘤组织血管形态排布情况和血管密度也会相应发生变化。FITC-Dextran 为高分子物质,体内静脉注射后在短时间内无法通过内皮细胞间隙或被内皮细胞摄取,因此可用于标记体内血管^[8]生成过程。肿瘤组织中血管密度相对减少,其血管黏附,吸收和滞留葡聚糖的数量也会相应减少,通过比较不同肿瘤组织吸收 FITC-Dextran 相对荧光强度,就能够量化了解不同肿瘤组织的血管密度^[9]。

已有文献证实,载有紫杉醇的 DOTAP 阳离子脂质体^[10~12]表现出很好的肿瘤血管靶向作用。本课题组在前期研究中已证实 TMC 包衣的 ADM 阳离子与普通脂质体相比,具有很好的抗肿瘤活性。由各给药组的肿瘤组织石蜡切片 HE 染色显示,TMC 包衣组瘤细胞坏死较严重,局部可见出血,肿瘤间质中血管显著减少。本实验在此基础上,采用 FITC-Dextran 标记肿瘤血管,能很好的显现出肿瘤内新生血管的形态和数量。从本实验可以看出:包衣纳米脂质体组的肿瘤抑制率远高于游离给药组,肿瘤血管形态和数目也有明显的改变,表明粒径在 100 nm 左右的肿瘤清除率是很高的,脂质体从肿瘤毛细血管到肿瘤组织的过程可能由其粒径决定,同时也证实了阳离子脂质体的确具有靶向肿瘤新生血管的作用;通过实验进一步地证实了,给予 TMC 包衣的 ADM 阳离子脂质体具有很好的肿瘤新生血管靶向

性和很强的抗肿瘤活性。

参 考 文 献

- 1 Feron O. Targeting the tumor vascular compartment to improve conventional cancer therapy[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2004, 25:542-546
- 2 Wu J, Lee A, Lu YH, *et al.* Vascular targeting of doxorubicin using cationic liposomes[J]. *Int J Pharmaceutics*, 2007, 337:329-335
- 3 郑虎. 药物化学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2003. 6
- 4 Hayward R, Hydock DS. Doxorubin cardiotoxicity in the rat: An *in vivo* characterization[J]. *J Am Assoc Lab Anim*, 2007, 46(4):20-32
- 5 何文, 张小杰. N-三甲基壳聚糖包衣脂质体的细胞毒性考察[J]. *中国药师*, 2010, 13(10):1416-1119
- 6 Haran G, Cohen R, Bar LK, *et al.* Transmembrane ammonium sulfate gradients in liposomes produce efficient and stable entrapment of amphipathic weak base[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1993, 1151:201-215
- 7 魏学农, 陆彬. 结肠定位壳聚糖包衣氟尿嘧啶脂质体的制备、形态与体外释放[J]. *药学学报*, 2003, 38(1):53-56
- 8 赵惟, 马会利, 齐宪荣. 靶向肿瘤新生血管的多柔比星脂质体的体外研究[J]. *药学学报*, 2007, 42(9):982-988
- 9 谭光宏, 黄凤迎, 王华, 等. FITC 标记葡聚糖粘附定量测定肿瘤组织血管密度[J]. *海南医学院学报*, 2007, 13(5):409-413
- 10 Strieth S, Eichhorn ME, Sauer B, *et al.* Neovascular targeting chemotherapy: encapsulation of paclitaxel in cationic liposomes impairs functional tumor microvasculature[J]. *Int J Cancer*, 2004, 110:117-124
- 11 Schmitt-Sody M, Strieth S, Krasnici S, *et al.* Neovascular targeting therapy: paclitaxel encapsulated in cationic liposomes improves antitumoral efficacy[J]. *Clinical Cancer Research*, 2003, 9:2335-2341
- 12 杨莉斌, 胡荣. 抗肿瘤药物脂质体粒径对肿瘤靶向性的影响[J]. *国际药学研究杂志*, 2007, 34(3):174-176

(2011-03-09 收稿 2011-04-07 修回)