

键合紫杉醇的纳米胶束与 C₆ 胶质瘤细胞的相互作用

王占峰¹, 罗毅男¹, 郑勇辉², 韩海玲³, 洪新雨¹, 景遐斌²

(1. 吉林大学第一附属医院神经外科, 长春 130021;

2. 中国科学院长春应用化学研究所高分子物理与化学国家重点实验室, 长春 130022;

3. 北华大学附属医院心脑科, 吉林 132011)

摘要 制备了键合紫杉醇(PTX)的聚乙二醇-聚乳酸嵌段共聚物(PEG-PLA/PTX)的纳米胶束,采用四氮唑(MTT)比色法、流式细胞术、透射电镜及激光共聚焦显微镜等技术,考察了PEG-PLA/PTX胶束对C₆胶质瘤细胞的影响,包括C₆细胞超微结构的变化和细胞周期的改变,以及纳米颗粒在细胞内的分布,探讨了PEG-PLA/PTX胶束对肿瘤细胞的作用机理.结果表明,PEG-PLA/PTX胶束进入到C₆细胞内,聚集于细胞浆中,通过与细胞核中DNA的作用改变细胞生长的周期,造成在G₂-M期的阻滞,引起细胞的凋亡.因此,PEG-PLA/PTX胶束有望用于脑胶质瘤的化疗.

关键词 键合紫杉醇;聚乙二醇-聚乳酸嵌段共聚物;流式细胞术;透射电镜;激光共聚焦显微镜;C₆胶质瘤细胞;诱导凋亡;细胞周期.

中图分类号 O631; O629; R730

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2008)08-1671-06

纳米胶束作为一种新型药物释放载体,是由具有亲水性链段和疏水性链段的两亲性嵌段或接枝共聚物在水溶液中形成的一种自组装结构,具有粒径小(一般小于100 nm)、粒度分布窄、载药范围广、结构稳定、体内滞留时间长、载药量高和独特的体内分布等特点^[1].两亲性共聚物胶束对难溶性药物具有增溶效果^[2],可作为抗肿瘤药^[3]、抗菌药^[4]、降压药^[5]及基因治疗药^[6]等的载体,受到了广泛的关注.自20世纪90年代以来,人们开始把纳米药物载体缓控释放应用于神经科学,用纳米粒子转运药物不需要开放血脑屏障和对药物本身进行修饰,即可将各种药物(包括亲水的)转运入脑,降低外周药物浓度,减少药物引起的不良反应^[7,8],也可避免因直接将药物注射入脑而导致中枢神经系统的各种副作用.另外还可以用纳米控释系统使药物缓慢释放,维持长时间脑内药物浓度,提高疗效^[9,10].

紫杉醇(Paclitaxel,简称PTX)是从短叶红豆杉(*Taxus brevifolia*)中提取的双萜类天然产物经化学修饰而成,其以稳定微管并防止微管解聚及调节信号传导的双重作用机理而成为又一类新型抗肿瘤药物^[11,12],对治疗多种肿瘤有效;被用作一线广谱抗癌药物^[13-18].然而,由于紫杉醇资源匮乏,水溶性低,难以通过血脑屏障等,使其在临床上的应用受到很大程度的限制^[14].本文将紫杉醇键合在聚乙二醇-聚乳酸嵌段共聚物(PEG-PLA)上,制成高分子前药PEG-PLA/PTX,进而制成纳米胶束.紫杉醇为亲脂性药物,胶束是一个很好的输送载体,可以增加其在水中或体液中的溶解度,延长药物在体内的循环时间,提高生物利用度,降低毒副作用^[19-22];并且紫杉醇键合在高分子上,释放速度受聚合物降解和键合酯键水解的双重控制,可避免一般物理包裹纳米胶束载药体系的初期暴释问题.同时,采用MTT、流式细胞仪、透射电镜及激光共聚焦显微镜等技术,考察了C₆胶质瘤细胞经PEG-PLA/PTX胶束作用后的凋亡率和细胞周期的变化,为了解PEG-PLA/PTX胶束的作用机理提供一些细胞水平的信息,以期实现PEG-PLA/PTX对脑胶质瘤的靶向治疗.

收稿日期: 2007-12-18.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20674084, 50733003)资助.

联系人简介: 景遐斌,男,研究员,博士生导师,主要从事高分子化学物理和生物降解及医用高分子的研究.

E-mail: xbjing@cjal.jl.cn

1 实验部分

1.1 材料与仪器

鼠 C₆ 胶质瘤细胞系 (鼠 C₆ 细胞) 由吉林大学基础医学院生化教研室提供. 培养基: 1640 (Sigma Inc., 美国) + 10% (体积分数) 热灭活小牛血清 + 青霉素 100 U/mL + 链霉素 100 U/mL, pH = 7.2 ~ 7.3, 过滤消毒. 小牛血清由杭州四季青生物材料有限公司生产. 青霉素、链霉素由华北制药厂生产. 化学键合紫杉醇 PEG-PLA/PTX 为自制^[23,24], 原料药紫杉醇购自西安宝赛生物科技有限公司. 二氯甲烷 (DCM), 分析纯, 购自北京化工厂. 乙腈, 色谱纯, 购自上海复旦化学试剂有限公司. 二次蒸馏水, 使用 SZ-93 型自动双重纯水蒸馏器 (上海亚荣生化仪器厂) 制备. 磷酸盐缓冲溶液 (PBS), 配制浓度为 0.01 mol/L (pH = 7.4). 透析袋为醋酸纤维素材质, 截留分子量 3500.

细胞荧光使用 FV1000 型共聚焦激光扫描显微镜 (CLSM) 观察.

1.2 化学键合紫杉醇胶束制备及表征

将 10 mg PEG-PLA/PTX 溶解于 5 mL DMF 中, 置于透析袋中, 用 1000 mL 二次蒸馏水透析 24 h, 每 4 h 更换一次双蒸水. 离心, 取上清液, 冷冻干燥, 置于 4 °C 冰箱中保存. 采用高效液相色谱仪 (LC-10AT 型, 岛津公司) 测定纳米粒子的载药量, 用荧光光谱、动态激光光散射 (DLS) 和扫描电子显微镜 (SEM) 方法进行表征.

1.3 MTT 实验

将消化对数生长期的 C₆ 细胞, 制成 2×10^5 cell/mL 的悬液, 接种于 96 孔培养板, 每孔 100 μ L 悬液 (2×10^4 cell), 分别加入 200 μ L 质量浓度为 180.0, 90.0, 45.0, 22.5 和 11.25 μ g/mL 的空白 PEG-PLA 胶束/RPMI1640 溶液, 培养 1, 2, 3, 4 和 5 d, 采用台盼蓝染色法检测各组的细胞数, 考察载体材料 PEG-PLA 的细胞毒性. 在另一组 96 孔板中接种每孔 2×10^4 个 C₆ 细胞, 并加入 200 μ L 质量浓度为 200.0, 100.0, 50.0, 25 和 12.5 μ g/mL 的 PEG-PLA/PTX 胶束 (其紫杉醇含量为 20.0, 10.0, 5.0, 2.5 和 1.25 μ g/mL), 在 RPMI1640 培养液中, 培养 24, 48 和 72 h, 以 RPMI1640 培养液为对照, 采用 MTT 法检测各组细胞的抑制率. 由于含 PTX 20.0 和 10.0 μ g/mL 的 PEG-PLA/PTX 胶束效果最好, 因此在电镜和流式细胞仪 (FCM) 测试中 PEG-PLA/PTX 的 PTX 质量浓度分别选为 20.0 和 10.0 μ g/mL.

1.4 电镜观测

细胞经传代培养后, 分别加入 PTX 质量浓度为 0, 10.0 和 20.0 μ g/mL 的 PEG-PLA/PTX 胶束/RPMI 1640 溶液, 3 d 后用倒置显微镜拍片, 消化并收集细胞, 用 Epon 812 包埋, 切片, 随机拍摄电镜照片, 观察超微结构.

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡及细胞周期变化

将消化 C₆ 细胞以 5×10^5 cell/mL 悬液接种 25 cm² 培养瓶, 24 h 后更换培养液, 分别加入 PTX 质量浓度为 0, 10.0 和 20.0 μ g/mL 的 PEG-PLA/PTX 胶束/RPMI 1640 溶液, 3 d 后分别收集各组细胞, 加入 0.5 mL 冰冷的体积分数为 70% 的乙醇中, 于 -20 °C 冰箱中保存. 将制备好的单细胞悬液以 1000 r/min 转速离心 10 min, 弃去固定液, 用冷 PBS 漂洗 2 次 (1000 r/min, 5 min), 调整细胞为 1×10^9 cell/L, 加入 PI 染液 1.0 mL, 避光染色 30 min, 用 ModFit 软件收集、贮存和分析数据, 获得各组细胞的凋亡比例和细胞周期变化.

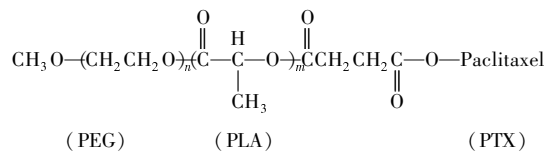
1.6 激光共聚焦显微镜检测标记的胶束与 C₆ 细胞的作用

实验前分别将 100 mg 胶束溶解于 10 mL DMSO 中, 加入过量的荧光物质四甲基异硫氰酸罗丹明 (TRITC) 标记, 于 40 °C 避光搅拌 6 h, 然后将溶液装入透析袋中, 用蒸馏水透析 48 h, 得到胶束, 同时除去游离的 TRITC. 离心冷冻干燥后溶解在 PBS 缓冲液 (0.01 mol/L pH = 7.4 的 PBS 加 1 mg/mL BSA, 1 mmol/L CaCl₂, 0.5 mmol/L MgCl₂) 中. 用质量分数为 1% 的 PBS 缓冲液冲洗预先接种在盖玻片上的 C₆ 细胞 3 次, 加 1.25 μ g/mL 荧光标记胶束, 于 37 °C 避光孵育特定时间, 洗涤细胞, 用质量分数为 3.7% 的多聚甲醛固定 12 min, 用 PBS 洗涤, 用 50 μ L PBS/甘油混合溶液 (体积比 1:1) 封片. 在激光共聚焦显微镜下观察 (TRITC 的激发波长为 550 nm, 发射波长 620 nm).

2 结果与讨论

2.1 键合紫杉醇及其胶束的表征

两亲性嵌段共聚物 PEG-PLA 及其键合紫杉醇 PEG-PLA/PTX 的分子结构可表示为



其制备方法参见文献[23,24], 基本性质见表 1、图 1 和图 2. 共聚物中 PEG 嵌段的分子量为 5000, 用 NMR 测得 PLA 嵌段的分子量为 2600, 紫杉醇的分子量约 850, 所以 PEG-PLA/PTX 的总分子量为 8530, 紫杉醇的质量分数约为 10%. 由图 1 可见, PEG-PLA/PTX 胶束基本呈球形, 粒径 55 ~ 80 nm, 与 DLS 方法测得的结果基本吻合(图 2). 由于紫杉醇键合在 PLA 链端, 与 PLA 一起构成共聚物的疏水段, 因而紫杉醇处于胶束的核部位, 受 PLA 和 PEG 层的双重保护, 是较理想的药物控制释放体系. 其临界胶束浓度(cmc)在 1 mg/L 量级, 预期它在水中 和 体液中 有 较 好 的 稳 定 性.

Table 1 Summary of various characteristics of the polymers

Sample	M_n^a	cmc ^b /(g · L ⁻¹)	Micelle size ^c /nm
PEG-PLA	7600	6.3×10^{-4}	58.9
PEG-PLA/PTX	8530	6.0×10^{-4}	62.6

a. Molecular weight calculated from the ¹H NMR spectra;
b. calculated from the excitation spectra of pyrene as a function of polymer concentration in water; c. measured from the SEM images.

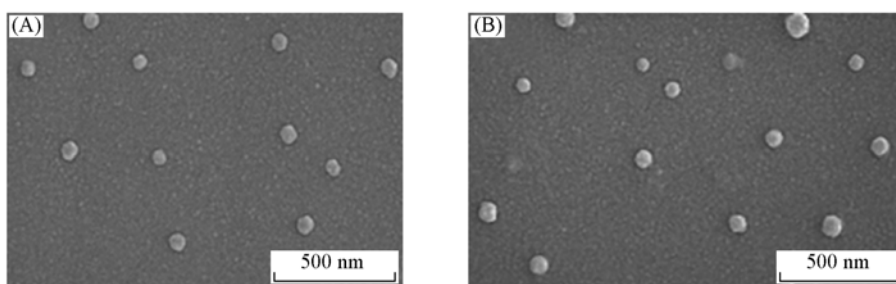


Fig. 1 SEM micrographs of PEG-PLA(A) and PEG-PLA/PTX(B) micelles

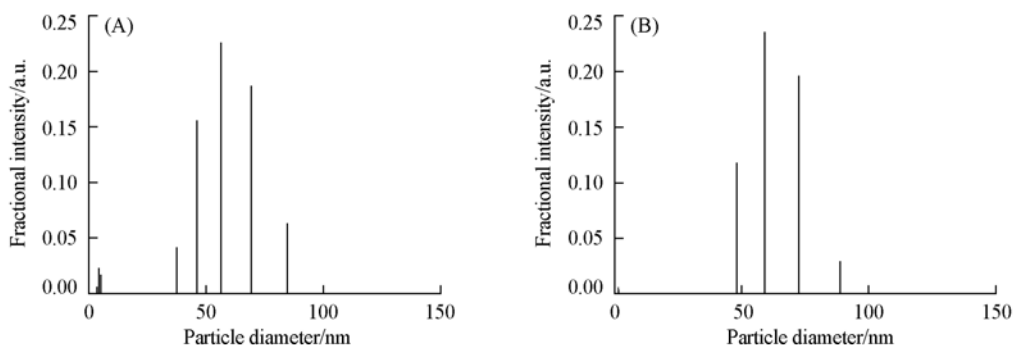


Fig. 2 Particle size distribution of PEG-PLA(A) and PEG-PLA/PTX(B) micelles measured by DLS

2.2 四氮唑(MTT)比色法

采用四氮唑(MTT)比色法考察了 PEG-PLA 和 PEG-PLA/PTX 胶束对 C₆细胞生长的抑制作用, 细胞悬液 100 μL, 含 C₆细胞 2×10^4 个. 胶束溶液体积 200 μL, 其中 PTX 的质量浓度分别为 20.0, 10.0, 5.0, 2.5 和 1.25 μg/mL, 含聚合物的质量浓度分别为 180.0, 90.0, 45.0, 22.5 和 11.25 μg/mL.

由于脑胶质瘤是颅内最为常见的恶性肿瘤, 发病率占颅内肿瘤的 44%^[25], 因此, 选择脑胶质瘤 C₆细胞作为 MTT 评价的试验细胞. 脑胶质瘤往往呈多润性生长, 手术很难将颅内侵袭灶完全切除, 因此术后药物化疗非常重要. 近年来, 应用生物可降解高分子材料缓释化疗药物技术治疗脑胶质瘤引起人们重视^[25,26]. 临床上使用较多的是卡氮芥, 虽有一定的疗效, 但卡氮芥在体内的循环寿命只有几分

钟且存在耐药性,因而不得不使用较大剂量和高施药频率,其毒副作用显著^[25,27].紫杉醇对于多种肿瘤具有显著疗效,但它不能越过血脑屏障,对脑胶质瘤疗效不佳,因此利用纳米颗粒不受血脑屏障限制的特性,探索键合紫杉醇纳米颗粒用于脑胶质瘤术后化疗的可能性.我们选用C₆细胞考察PEG-PLA的细胞相容性和PEG-PLA/PTX对C₆细胞的杀灭效果.

2.2.1 PEG-PLA胶束对C₆细胞的毒性 表2给出了用PEG-PLA胶束溶液处理C₆鼠胶质瘤细胞的增殖情况.由表2可见,在所使用的胶束剂量(180~11.25 μg/mL)范围及所观察的培养时间内,PEG-PLA胶束试验组与不加胶束的对照组相比,没有显著区别,由第5天的数据计算细胞活度(5个样品平均的值)为(101.3±2.4)%,说明PEG-PLA胶束对C₆细胞生长和繁殖没有抑制作用;PEG-PLA用作药物载体,不会带来细胞毒性.

Table 2 Cell quantity of C₆ glioma treated with PEG-PLA micelles as a function of micelle concentration and incubation time

Micelle mass concentration/ (μg·mL ⁻¹)	Cell count(×10 ⁴)						Cell viability on the 5th day(%)
	0 day	1st day	2nd day	3rd day	4th day	5th day	
Control	2.0	5.0	10.0	19.0	35.3	45.3	100.0
11.25	2.0	4.5	11.0	19.5	38.0	44.0	97.1
22.5	2.0	4.3	9.8	21.0	37.0	48.0	106.0
45.0	2.0	5.2	9.5	18.0	36.0	45.0	99.3
90.0	2.0	4.8	9.1	20.0	37.5	46.0	101.5
180.0	2.0	4.7	9.4	20.2	38.0	46.5	102.6

2.2.2 PEG-PLA/PTX胶束对C₆细胞增殖的抑制作用 图3给出了PEG-PLA/PTX胶束溶液对C₆胶质瘤细胞生长的抑制情况.随着PEG-PLA/PTX胶束用量的增加和作用时间的延长,C₆细胞生长的抑制率增加明显.经统计学处理,各试验组与对照组之间有显著性差异($P < 0.05$).PEG-PLA胶束的试验结果表明,PEG-PLA本身对C₆细胞的生长没有抑制作用,所以,PEG-PLA/PTX胶束的抑制作用,来自于胶束中所键合的紫杉醇.由于高分子与紫杉醇之间的酯键的水解,或者高分子中PLA本身的水解,紫杉醇从前药中解离下来,发挥其功能.

2.3 电镜检测细胞凋亡和超微结构变化

用电子显微镜观察C₆细胞的形态,典型结果见图4.由图4(B)可见,经PEG-PLA/PTX处理后,C₆细胞呈现形态学改变:细胞变圆;细胞核内染色质离散,向核膜下集中;细胞表面微绒毛变细,细胞体及细胞核进一步缩小,核内染色质呈颗粒状或块状凝集于核膜下,内质网和粒体膜碎裂呈空泡状;微绒毛脱落、减少,核膜在核膜孔处断裂,将染色质分割成若干个核碎片;胞质内空泡增多.而对照组[图4(A)]细胞体积大,胞质少,核内染色质分布均匀;细胞表面有大量的微绒毛.可见,PEG-PLA/

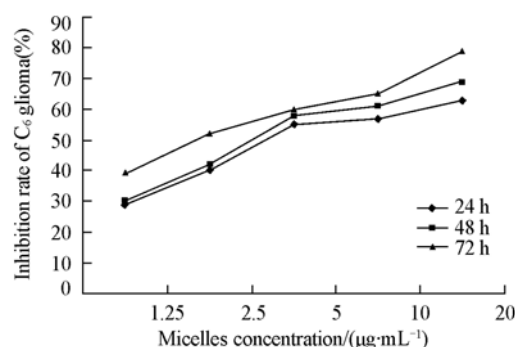


Fig. 3 Cell inhibition of C₆ glioma by PEG-PLA/PTX micelles as a function of micelle concentration and incubation time

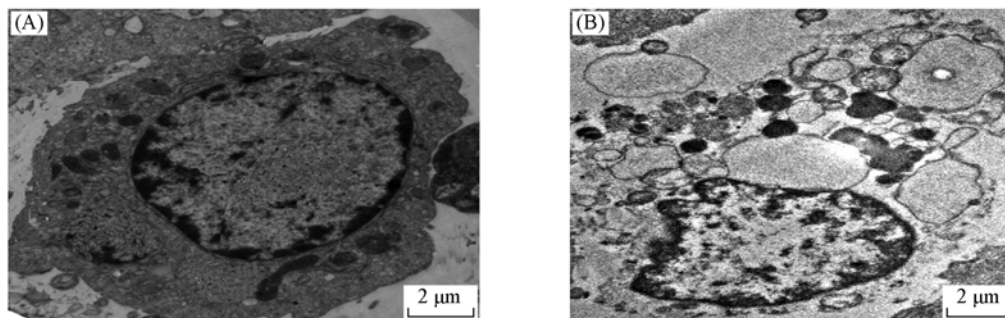


Fig. 4 TEM images of C₆ glioma cells

(A) Control group; (B) test group, treated with PEG-PLA/PTX micelles for 72 h.

PTX 对 C₆ 细胞的伤害表现在细胞结构的各个部位, 从核内的染色质到核膜, 从细胞质到细胞外表面的微绒毛. 显然, 对细胞骨架的破坏是很明显的, 也是最致命的. 这与文献[11, 27~30]中报道的紫杉醇的抗癌机制是一致的. 即促进微管聚合并稳定微管结构, 阻止其解聚成亚单位, 因而阻碍纺锤丝的形成, 阻滞细胞分裂和增殖.

2.4 流式细胞仪检测

表 3 给出了用流式细胞仪检测的 C₆ 胶质瘤细胞的凋亡率数据和存活细胞在各生长期的分布. 可见, 经 PEG-PLA/PTX 胶束处理 3 d 的 C₆ 胶质瘤细胞, 与对照组相比凋亡比率有明显提高, 从 1.6% 增加到 22.5% (PTX 质量浓度 10 μg/mL) 或 35.5% (PTX 质量浓度 20 μg/mL), 具有显著性差异 ($P < 0.01$). 同时 C₆ 细胞在各生长期的分布, 由对照组的以 G₀-G₁ 期为主 (约 55%) 变为试验组的以 G₂-M 期为主 (10 μg/mL 组约 58%, 20 μg/mL 组约 48%), 也有显著差异.

以上结果表明, PEG-PLA/PTX 胶束对 C₆ 细胞的作用, 表现为诱导细胞凋亡和将细胞阻滞于 G₂-M 期两个方面. 细胞凋亡是一种由基因调控的程序化的细胞自主死亡形式^[28], 有针对性地诱导肿瘤细胞凋亡, 而不太大面积伤害周围正常细胞, 对于肿瘤治疗十分重要. PEG-PLA/PTX 胶束能有效地诱导 C₆ 细胞凋亡, 而且, 胶束含量越高, 凋亡的比率越高 (表 3). 细胞周期调控理论研究表明, 细胞生长周期的改变可引起细胞的增殖、分化或凋亡, 而生长周期是由细胞基因所决定的^[30]. PEG-PLA/PTX 胶束使 C₆ 细胞阻滞于 G₂-M 期, 说明在紫杉醇的影响下, 细胞周期已经发生了根本性的变化, 与文献[27, 31, 32]报道的紫杉醇作用于 G₂-M 期的结果一致, 说明含紫杉醇的纳米颗粒已经进入 C₆ 细胞, 其中的紫杉醇已经释放出来, 引起细胞基因的变化、细胞生长周期的改变和细胞的凋亡.

2.5 激光共聚焦显微镜检测

图 5 是经荧光标记的 PEG-PLA/PTX 胶束处理过的 C₆ 细胞的 CLSM 显微照片. 虽然使用了过量的荧光染料, 但经过充分的透析处理 (对胶束) 和冲洗 (对细胞), 已经看不到游离的染料, 细胞外游离的纳米颗粒也很少. 图 5 中蓝色部分显示用 Hoechst 33342 标记的 C₆ 细胞的细胞核. 红色荧光来自罗丹明标记的纳米颗粒. 红色荧光来自细胞浆部位, 说明 PEG-PLA/PTX 胶束已经被 C₆ 细胞所吸收且多聚集于细胞浆中. 考虑到细胞核的形态改变和细胞生长的 G₂-M 期阻滞, 我们认为, 荧光标记的 PEG-PLA/PTX 胶束已经过了“内吞”的过程, 进入到 C₆ 细胞内部, 形成了内含体; 进而内含体破裂, 其中包裹的胶束颗粒分散到细胞浆中; 紫杉醇从高分子载体上解离和释放, 高分子停留在胞浆中, 紫杉醇进入细胞核, 与基因发生作用.

Table 3 Effect of micelle treatment on apoptosis rate and cell cycle

Micelle mass concentration	Apoptosis rate (%)	Cell cycle distribution (%)		
		G ₀ -G ₁	S	G ₂ -M
Control	1.6 ± 1.1	57.2 ± 2.7	34.9 ± 2.4	10.9 ± 3.1
10 μg/mL	22.5 ± 2.2*	37.3 ± 1.9*	12.9 ± 3.0*	57.8 ± 2.5*
20 μg/mL	35.5 ± 2.6*	33.6 ± 1.6*	18.9 ± 1.5*	47.5 ± 1.3*

* Indicates that difference between the test specimen and the control is statistically significant.

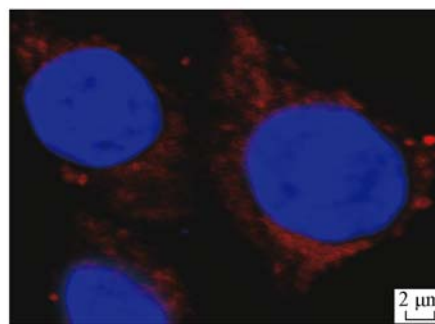


Fig. 5 CLSM image of C₆ cells after incubation for 24 h in the presence of PEG-PLA/PTX micelles (×1800)

参 考 文 献

- [1] Kumar N., Pavikumar M. N., Domb A. J. Adv. Drug Deliv. Rev. [J], 2001, **53**(1): 23—44
- [2] Zhang X., Jackson J. K., Burt H. M. Int. J. Pharm. [J], 1996, **132**(1/2): 195—206
- [3] Nakanish T., Fukushima S., Okamoto K., et al. J. Controlled Release [J], 2001, **74**(1—3): 295—302
- [4] Yu B. G., Okano T., Kataoka K., et al. J. Controlled Release [J], 1998, **53**(1—3): 131—136
- [5] Hu Y., Jiang X., Ding Y., et al. Biomaterials [J], 2003, **24**(13): 2395—2404
- [6] Kakizawa Y., Kataoka K. Adv. Drug Deliv. Rev. [J], 2002, **54**(2): 203—222
- [7] YUAN Xu-Bo (原续波), KANG Chun-Sheng (康春生), PU Pei-Yu (浦佩玉), et al. Chinese Journal of Neurosurgery (中华神经外科)

- 杂志)[J], 2007, **23**: 103—106
- [8] Gref R. , Lück M. , Quellec P. , *et al.* . Colloids Surf. B: Biointerfaces[J] , 2000, **18**(3/4) : 301—313
- [9] Olivier J. C. . NeuroRx[J] , 2005, **2**(1) : 108—119
- [10] Azmin M. N. , Stuart J. F. , Florence A. T. . Cancer Chemother. Pharmacol. [J] , 1985, **14**(3) : 238—242
- [11] SHI Bing-Xing(石炳兴) , LIANG Shi-Le(梁世乐) , YUAN Ying-Jin(元英进) , *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J] , 2000, **21**(3) : 401—406
- [12] QIU Xiao-Hang(邱晓航) , OUYANG Di(欧阳砥) , ZHOU Yong-Qia(周永洽) , *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J] , 2000, **21**(3) : 415—416
- [13] Lluch A. , Ojeda B. , Colomer R. , *et al.* . Cancer[J] , 2000, **89**(11) : 2169—2175
- [14] Koziara M. , Lockman P. R. , Allen D. D. , *et al.* . J. Controlled Release[J] , 2004, **99**: 259—269
- [15] Ohnson J. D. , Arriagada R. , Barthelemy N. , *et al.* . Lung Cancer[J] , 1997, **17**(Suppl. 1) : S23—S25
- [16] Thigpen J. T. . Semin. Oncol. [J] , 2000, **27**(Suppl. 7) : 11—16
- [17] Chang A. Y. , Rubins J. , Asbury R. , *et al.* . Semin. Oncol[J] , 2001, **28**(Suppl. 14) : 10—13
- [18] Peretz T. , Sulkes A. , Chollet P. , *et al.* . European Journal of Cancer[J] , 1995, **31**(Suppl. 6) : 75—76
- [19] Gao Z. , Lukyanov A. N. , Singhal A. , *et al.* . Nano Lett. [J] , 2002, **2**: 979—982
- [20] Luo L. , Tam J. , Maysinger D. , *et al.* . Bioconjug. Chem. [J] , 2002, **13**: 1259—1265
- [21] Kumar R. , Chen M. H. , Parmar V. S. , *et al.* . J. Am. Chem. Soc. [J] , 2004, **126**: 10640—10644
- [22] Kataoka K. , Harada A. , Nagasaki Y. . Adv. Drug Deliv. Rev. [J] , 2001, **47**: 113—131
- [23] Zhang X. F. , Li Y. X. , Chen X. S. , *et al.* . Biomaterials[J] , 2005, **26**(14) : 2121—2128
- [24] Xie Z. G. , Lu T. C. , Chen X. S. , *et al.* . J. Appl. Polym. Sci. [J] , 2007, **105**(4) : 2271—2279
- [25] WANG Zhong-Cheng(王忠诚). WANG Zhong-Cheng's Neurosurgery(王忠诚神经外科学)[M] , Wuhan: Hubei Sci. & Tech. Press, 2005: 512
- [26] Emignani M. L. , Hensley M. L. , Cohen R. , *et al.* . Gynecological Oncology[J] , 2001, **80**: 16—20
- [27] Brem H. , Gabikian P. . J. Control. Release[J] , 2001, **74**: 63—67
- [28] Tseng C. J. , Wang Y. J. . Toxicology[J] , 2002, **175**(1—3) : 123—142
- [29] Gupta N. , Hu L. J. , Deen D. F. . Radiation Oncology Biol. [J] , 1997, **37**: 885—895
- [30] Yu Q. , Geng Y. , Sicinski P. . Nature[J] , 2001, **411**: 1017—1021
- [31] Xie J. W. , Marijnissen J. C. M. , Wang C. H. . Biomaterials[J] , 2006, **27**(17) : 3321—3332
- [32] Riccardi A. , Servidei T. , Tornesello A. , *et al.* . European Journal of Cancer[J] , 1995, **31**: 494—499

Interaction of Copolymer-paclitaxel Conjugate Micelles with C₆ Glioma Cells

WANG Zhan-Feng¹ , LUO Yi-Nan¹ , ZHENG Yong-Hui² , HAN Hai-Ling³ , HONG Xin-Yu¹ , JING Xia-Bin^{2*}

(1. Department of Neurosurgery, First Clinical Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China;

2. State Key Lab of Polymer Physics and Chemistry, Changchun Institute of Applied Chemistry,
Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China;

3. Department of Cardiac, Affiliated Hospital of Beihua University, Jilin 132011, China)

Abstract Nanoscale micelles of poly(ethylene)-*b*-poly(lactic acid)/paclitaxel conjugate (PEG-PLA/PTX) were prepared and their interaction with rat brain glioma C₆ cells was examined by MTT, electron microscopy, flow cytometry(FCM), and confocal laser scanning microscopy(CLSM). The results show that the copolymer/paclitaxel conjugate micelles can enter the cell, and are distributed in cytoplasm. The paclitaxel can be released from the conjugate micelles and react with the genes in the cell nuclei, causing changes in the gene molecules, and thus, leading to changes in growth cycle of the cells, resulting in G₂-M cell cycle arrest and inducing apoptosis of C₆ cells. Therefore, PEG-PLA/PTX micelles may be used in chemotherapy of brain glioma.

Keywords Paclitaxel conjugate; Poly(ethylene)-*b*-poly(lactic acid) block copolymer; Flow cytometry; TEM; CLSM; Glioma C₆ cells; Apoptosis; Cell cycle (Ed.: D, Z)