

[文章编号 1000-1182(2005)05-0445-04]

隐形顺铂聚乳酸纳米微粒对口腔鳞癌 原发灶的靶向性研究

杨凯¹, 陈绍维², 陈睿¹, 温玉明²

(1. 重庆医科大学附属第一医院 口腔颌面外科, 重庆 400016;

2. 四川大学华西口腔医学院 口腔颌面外科学教研室, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 研究隐形顺铂聚乳酸纳米微粒(CDDP-PLA-PEG-NP)的物理特性及对口腔鳞癌原发灶的靶向性。方法 用乳化溶剂蒸发法制备 CDDP-PLA-PEG-NP;建立小鼠口腔颊鳞癌模型,并随机将 64 只动物分为实验组和对照组,每组各 32 只。实验组和对照组分别静脉注射 CDDP-PLA-PEG-NP(6.6 mg/kg)和 CDDP(1 mg/kg),每组于给药后 0.083、0.5、1、2、4、6、12、24 h 各处死 4 只动物。用高效液相色谱仪测定两组各时间点血浆和癌组织中药物浓度,求出 CDDP-PLA-PEG-NP 对口腔鳞癌原发灶的靶向指数、选择性指数和口腔鳞癌原发灶对 CDDP-PLA-PEG-NP 的相对摄取率。结果 CDDP-PLA-PEG-NP 的平均粒径为(143.2 ± 1.8) nm,粒径分布范围为 103.5 ~ 175.8 nm,载药量和包封率分别为(15.2 ± 0.9) %、(89.0 ± 0.8) %;在 8 个时间点的靶向指数和选择性指数均远大于 1,口腔癌组织对 CDDP-PLA-PEG-NP 的摄取量是 CDDP 的 10.36 倍。结论 CDDP-PLA-PEG-NP 在动物体内对口腔鳞癌原发灶具有良好的靶向性,是具有发展前途的口腔癌纳米靶向给药系统。

[关键词] 鳞状细胞癌; 纳米粒; 顺铂; 聚乙二醇; 聚乳酸

[中图分类号] R 739.8 **[文献标识码]** A

Experimental Study of Cisplatin Loaded Poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) Nano-particles for Targeting Oral Carcinoma

YANG Kai¹, CHEN Shao-wei², CHEN Rui¹, WEN Yu-ming². (1. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, The First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China; 2. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the target deliver of Cisplatin to oral carcinoma tissues by intravenous injection of Cisplatin loaded poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles(CDDP-PLA-PEG-NP). **Methods** CDDP-PLA-PEG-NP was prepared by the emulsion-solvent evaporation method. The buccal cancer model was established in 64 golden hamsters, which were divided randomly into two groups for 32 animals in each group, CDDP-PLA-PEG-NP(6.6 mg/kg) and CDDP(1 mg/kg) were respectively injected into mice tail vein. At 0.083, 0.5, 1, 2, 4, 6, 12, 24 h after drug administration. 4 animals in each group were sacrificed and CDDP concentration in the plasma and tumor were determined by high performance liquid chromatography. Targeting ability was evaluated by targeting index(TI), selectivity index(SI) and relative extraction efficiency(r_e). **Results** The average diameter of CDDP-PLA-PEG-NP was (143.2 ± 1.8) nm. The diameter distribution was from 103.5 nm to 175.8 nm. Drug loading and embedding ratio were (15.2 ± 0.9) %, (89.0 ± 0.8) % respectively. Values of TI and SI are more than 1 at 8 time points. The area under CDDP concentration-time curve of oral carcinoma tissues in CDDP-PLA-PEG-NP group was 10.36 times as many as that in CDDP group. **Conclusion** CDDP-PLA-PEG-NP can specifically deliver CDDP to oral carcinoma tissues by vein injection. Stealth anticancer nano-particle system can be regarded as a valuable drug deliver system to treat oral carcinoma.

[Key words] squamous cell carcinoma; nanoparticles; cisplatin; poly(lactic acid); poly(ethylene glycol)

顺铂(cisplatin, CDDP)由于抗癌活性强,抗癌谱广,与其他抗癌药物较少产生交叉耐药等特点,是目前口腔颌面部恶性肿瘤应用最广泛和最有效的抗癌

药物之一,但顺铂较大的剂量依赖性毒副作用使其在临床上应用受到很大限制,如何增强顺铂在体内对肿瘤细胞的靶向性,从而达到减毒增效的目的,一直是顺铂等抗癌药物在临床应用中亟需解决的问题之一。近年来发展起来的纳米靶向给药系统在提高药物对癌细胞的靶向性、降低药物的毒副作用方面显示出巨大的发展前景^{1~6}。由于普通抗癌纳米粒进入血液后易被单核吞噬系统(mononuclear phagocyte system,

[收稿日期 2005-03-09; 修回日期 2005-08-03]

[基金项目]重庆市科委应用基础研究资助项目(渝科发字[2003]43号);重庆医科大学科技基金资助项目(XB200207)

[作者简介]杨凯(1965-),男,重庆人,副教授,博士

[通讯作者]杨凯, Tel: 023-89011227

MPS) 细胞作为异物识别而吞噬,影响其对癌细胞的靶向性,目前研究的策略就是对纳米粒进行表面修饰,制备能逃避 MPS 细胞吞噬的隐形纳米系统 (stealth nanoparticles system)^{7,8}。本研究用可在体内生物降解的聚乳酸 (polylactic acid, PLA) 为纳米载体,用 CDDP 为模型药物,以能阻止 MPS 细胞吞噬的亲水性长链聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 为纳米表面修饰剂,制备隐形顺铂聚乳酸纳米 (cisplatin loaded polylactic acid-polyethylene glycol nanoparticles, CDDP-PLA-PEG-NP), 并采用此隐形纳米系统对口腔鳞癌动物模型静脉注射,探索该制剂对口腔鳞癌原发灶的靶向性。

1 材料和方法

1.1 主要仪器和试剂

JME-100CX 型透射电子显微镜 (日本电子公司), 2040 型冷冻干燥机 (Snijfers scientific 公司, 荷兰), LC-6A 高效液相色谱仪 (日本岛津公司), 78-1 型磁力加热搅拌器 (杭州仪表电机厂), SALD-2001 型激光散射粒度分析仪 (日本岛津公司), L8-80M 型超速冷冻离心机 (Beckman 公司, 美国), 顺铂 (辽宁锦州制药一厂), 聚乳酸-聚乙二醇共聚物 (Birmingham polymers 公司, 美国)。金黄地鼠 (四川大学华西动物实验中心提供) 64 只, 鼠龄 6~8 周, 体重 (90 ± 10) g, 雌雄各半。

1.2 CDDP-PLA-PEG-NP 的制备

用乳化溶剂蒸发法制备 CDDP-PLA-PEG 纳米粒^{3,7,8}: 将 CDDP 与聚乳酸-聚乙二醇共聚物 (PLA-PEG) 按质量比 1.1:4.5 的比例溶于二氯甲烷溶液中, 混合均匀后缓慢加入到 0.3% 聚乙烯醇水性溶液内, 在室温下高速搅拌直至二氯甲烷完全挥发, 然后用微孔滤膜抽滤, 分离离心, 用蒸馏水洗涤 3 次, 冷冻干燥即得 CDDP-PLA-PEG-NP 冻干针剂。

1.3 CDDP-PLA-PEG-NP 形态学观察及粒径测量

CDDP-PLA-PEG-NP 冻干针剂加注射用水分散后取适量制片, 以 1.5% 磷钨酸负染, 然后于透射电镜下观察形态, 用激光散射粒度分析仪测定粒径分布。

1.4 CDDP-PLA-PEG-NP 载药量 (drug loading, DL) 和包封率 (embedding ratio, ER) 测量^{3,8}

取 2 mg CDDP-PLA-PEG-NP 冻干针剂, 加 5 ml 注射用水分散后, 行低温超速离心 (4℃, 40 000 r/min, 120 min) 分离上清液, 用高效液相色谱仪测定上清液中游离 CDDP 浓度, 记为 C_1 , 另取同量 CDDP-PLA-PEG-NP 冻干针剂以混合溶剂溶解, 同法测定总 CDDP 浓度, 记为 C_2 , PLA-PEG 的浓度记为 C_3 , 按下列公式计算包封率和载药量。包封率 (ER) = $[(C_2 - C_1)/C_2] \times 100\%$, 载药量 (DL) = $[(C_2 - C_1)/C_3] \times 100\%$ 。

1.5 口腔颊鳞癌模型的建立⁹

金黄地鼠 64 只, 将地鼠固定于特制的固定夹上, 用自制的开口器牵开口腔暴露颊囊, 第 15 周后进行实验。即用 0.5% 二甲基苯并葱丙酮液涂擦颊囊黏膜, 每周星期一、星期三、星期五涂擦 (共 3 次), 共 12 周。

1.6 靶向性实验^{5,6}

将 64 只颊癌金黄地鼠随机分为实验组和对照组, 每组 32 只。实验组和对照组分别用 CDDP-PLA-PEG-NP 6.6 mg/kg (相当于 CDDP 1 mg/kg) 和 CDDP 1 mg/kg 行静脉注射。2 组分别于给药后 0.083、0.5、1、2、4、6、12、24 h 各处死 4 只动物, 处死前取静脉血 2 ml, 离心后取上层血清, 留取癌组织称重后匀浆, 将匀浆液和血清用高效液相色谱仪测定其在各时间点的药物浓度, 根据各药物浓度值用实用药代动力学计算程序 3P97 软件计算出药物 CDDP 在血浆和癌组织中药物浓度-时间曲线下面积 (areas under concentration-time curves, AUC), 然后计算靶向指数 (targeting index, TI)、选择性指数 (selectivity index, SI) 和癌组织对药物的相对摄取率 (relative extraction efficiency, r_e)。计算方法为: TI 是指给予实验动物载药纳米粒或游离药物后, 两组癌组织在各时间点药物浓度之比值; SI 是指给予实验动物载药纳米粒或游离药物后, 癌组织内药物浓度与血液中药物浓度在各时间点之比; r_e 是指给予实验动物载药纳米粒或游离药物后, 两组癌组织的 AUC 值之比。当以上值大于 1 时, 表明纳米对癌细胞有靶向性, 其值越大, 代表靶向性越强。

2 结果

2.1 纳米粒径大小、分布及载药量和包封率

纳米粒呈圆形和椭圆形 (图 1), 平均粒径 (143.2 ± 1.8) nm, 粒径分布范围为 103.5 ~ 175.8 nm; 载药量 (15.2 ± 0.9) %、包封率 (89.0 ± 0.8) %。

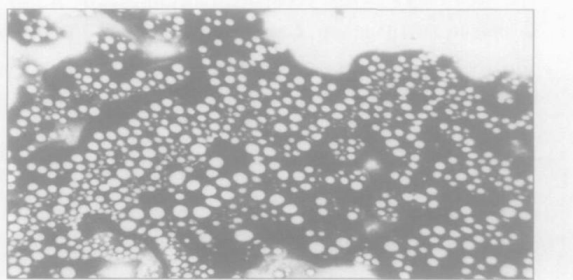


图 1 CDDP-PLA-PEG-NP 形态 TEM ×10 000

Fig 1 Image of CDDP-PLA-PEG-NP TEM ×10 000

2.2 血药浓度

CDDP-PLA-PEG-NP 和 CDDP 分别行颊癌地鼠静脉注射后血中药物浓度随时间变化结果见图 2。在

所测的8个时间点内,两组地鼠的血药浓度峰值分别为4.02 mg/L、2.01 mg/L ($P < 0.01$)。

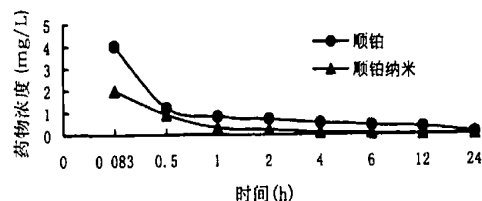


图2 CDDP-PLA-PEG-NP和CDDP静脉注射后颊癌地鼠血药浓度-时间曲线

Fig 2 The drug concentration-time curves in the plasma of the golden hamsters buccal cancer model injected with CDDP-PLA-PEG-NP and CDDP

2.3 癌组织内药物浓度

CDDP-PLA-PEG-NP和CDDP分别行颊癌地鼠静脉注射后癌组织内药物浓度随时间变化结果见图3。在所测的8个时间点内,两组地鼠癌组织内药物浓度峰值分别为3.53 μg/g、0.73 μg/g ($P < 0.01$),实验组在出现峰值后药物浓度还有一相对平台维持期(0.5~2 h),然后下降,而对照组出现峰值后迅速下降。

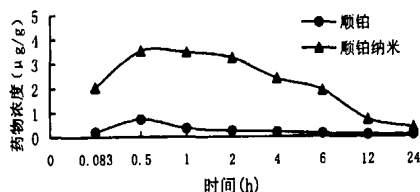


图3 CDDP-PLA-PEG-NP和CDDP静脉注射后颊癌地鼠癌组织内血药浓度-时间曲线

Fig 3 The drug concentration-time curves in the cancer tissue of the golden hamsters buccal cancer model injected with CDDP-PLA-PEG-NP and CDDP

2.4 CDDP-PLA-PEG-NP对癌组织靶向性的定量评价

用靶向指数(TI)、选择性指数(SI)定量评价CDDP-PLA-PEG-NP对口腔癌组织的靶向性结果见表1,由表1可见TI和SI各值均大于1。计算相对摄取率(r_c)为10.36。

表1 CDDP-PLA-PEG-NP对小鼠颊癌组织靶向性指标计算结果

Tab 1 The drug-targeting index values to the cancer tissue in golden hamsters buccal cancer model

检测指标	时间(h)							
	0.083	0.5	1	2	4	6	12	24
靶向指数(TI)	9.71	4.84	9.91	12.07	11.43	14.77	7.10	4.75
选择性指数(SI)	1.02	3.84	11.57	14.17	24.00	27.42	23.67	18.50

3 讨论

纳米靶向治疗是指借助纳米粒为运输载体,将治

疗药物或制剂定向作用于靶部位,从而达到减毒增效的作用。在纳米靶向给药系统中,目前将纳米粒的粒径界定在1~1000 nm(0.001~1 μm)^{1,2},由于纳米级微粒(1~1000 nm)比人体内最小的毛细血管内径(4000 nm)和红细胞(6000~9000 nm)小得多,故它可以在血中自由运动到达人体的各部位,这为纳米粒作为靶向给药载体提供了基础。但由于纳米粒进入体内后会被单核吞噬系统(MPS)细胞作为异物识别在几秒钟至几分钟之内迅速被吞噬清除^{7,8},因此,目前经静脉纳米靶向治疗主要是针对含MPS细胞丰富的肝脾等器官进行,随着近年来人们对恶性肿瘤自身特性的深入研究和纳米技术的进一步发展,为纳米靶向技术对非肝脾器官的恶性肿瘤进行静脉给药靶向治疗提供了基础。

目前研究证实,随着癌症的发生和发展,癌组织及周围伴有大量的新生毛细血管生成,这些新生血管有极大的通透性,它允许400~600 nm以下的纳米级微粒透过血管壁而到达癌组织区域¹⁰,同时,又由于癌细胞膜的通透性较正常细胞大为提高,据报道¹¹,癌细胞较正常细胞的通透性增加10倍以上,因此,如何阻止进入血内的纳米粒被MPS细胞吞噬而使其进入对纳米粒具有“通透性和吸收性”的癌细胞,这成为抗癌纳米粒对口腔等实体癌行静脉给药靶向治疗的关键。研究发现,MPS细胞对纳米粒具有强大吞噬作用是通过血中亲脂性的调理蛋白介导的,因此目前研究的策略就是用亲水性长链物质对纳米粒进行表面修饰,制备能逃避MPS细胞识别吞噬的隐形纳米粒。本实验用顺铂(CDDP)和聚乳酸-聚乙二醇共聚物(PLA-PEG)制备隐形顺铂聚乳酸纳米系统,是因为亲水段PEG和疏水段PLA的溶解度有很大差别,在介质中呈现不同的构象形态,因而在反应体系中能够自组装成具有核-壳结构的纳米粒,疏水段PLA通过成核聚集形成包裹药物的核,亲水段PEG则包围核形成修饰在纳米表面的外壳,由于该纳米系统表面的PEG具有亲水性,它可以降低纳米粒对亲脂性调理蛋白的结合力,同时PEG亲水性长链结构具有很好的柔韧性,其柔韧性不仅使纳米粒的空间结构时刻发生变化而使MPS细胞难以对其产生有效的识别而难以吞噬,而且亲水性长链的柔韧性在纳米微粒表面形成的“空间栅栏”作用,也能有效地减少体内调理蛋白对纳米粒的吸附,使其修饰后的纳米粒能逃避MPS细胞的识别吞噬而靶向癌细胞。

本实验用CDDP-PLA-PEG-NP行颊癌地鼠静脉注射后,口腔癌组织内药物浓度值在各时间点均高于CDDP对照组;8个时间点的靶向指数(TI)和选择性指数(SI)均提示CDDP-PLA-PEG-NP对口腔癌具有高

度的靶向性;AUC值是代表组织在某一段时间内吸收药物程度的量化指标,本实验组中癌组织的AUC值是对照组的10.36倍,这进一步证实了该隐形顺铂纳米系统对口腔癌具有高度的靶向性。

[参考文献]

- 1] Kawashima Y. Nanoparticulate systems for improved drug delivery J. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 47(1):1-2.
- 2] Kumaresh S, Tejrjaj M, Anandrao R, et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices J. *J Control Release*, 2001, 70(1):1-4.
- 3] 杨凯,温玉明,李龙江,等. 颈淋巴结靶向葫芦素BE聚乳酸纳米微粒冻干针剂的研制 J. *华西口腔医学杂志*, 2001, 19(6):347-350.
(Yang K, Wen YM, Li LJ, et al. Preparation of cucurbitacinBE poly-lactic acid nano-particles for targeting cervical lymph nodes J. *West China J Stomatology*, 2001, 19(6):347-350.)
- 4] 杨凯,温玉明,李龙江,等. 颈淋巴结靶向葫芦素BE聚乳酸纳米微粒的急性毒性和局部刺激实验研究 J. *华西口腔医学杂志*, 2001, 19(6):380-382.
(Yang K, Wen YM, Li LJ, et al. Acute toxicity and local stimulate test of cucurbitacinBE poly-lactic acid nano-particles of targeting cervical lymph nodes J. *West China J Stomatology*, 2001, 19(6):380-382.)
- 5] 杨凯,温玉明,王昌美,等. 葫芦素BE聚乳酸纳米微粒对口腔癌颈淋巴结转移灶靶向治疗的应用研究 J. *华西口腔医学杂志*, 2003, 21(6):447-450.
(Yang K, Wen YM, Wan CM, et al. Clinical application of anticancer

nanoparticles targeting metastasis foci of cervical lymph nodes in patients with oral carcinoma J. *West China J Stomatology*, 2003, 21(6):447-450.)

- 6] 杨凯,温玉明,王昌美,等. 葫芦素BE聚乳酸纳米微粒对口腔癌颈淋巴结转移灶的靶向性评价 J. *华西口腔医学杂志*, 2003, 21(6):477-480.
(Yang K, Wen YM, Wan CM, et al. The study of cucurbitacinBE poly-lactic acid nanoparticles delivering cucurbitacinBE to metastasized cervical lymph nodes in mice with oral cancer J. *West China J Stomatology*, 2003, 21(6):477-480.)
- 7] Peracchia MT, Fattal E, Desmaele D, et al. Stealth PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting J. *J Control Release*, 1999, 60(1):121-128.
- 8] Gref R, Quellec P, Sanchez A, et al. Development and characterization of CyA-loaded poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) PEG micro- and nanoparticles, comparison with conventional PLA particulate carriers J. *Eur J Pharm and Biopharm*, 2000, 51(2):111-118.
- 9] 李龙江,温玉明,王昌美. 颊癌微血管分支类型的动物实验研究 J. *华西口腔医学杂志*, 1996, 14(2):79-82.
(Li LJ, Wen YM, Wan CM. The animal experimental study of micro-vascular branching in buccal carcinoma J. *West China J Stomatology*, 1996, 14(2):79-82.)
- 10] Yuan F, Dellian M, Fukumura D, et al. Vascular permeability in a human tumor xenograft: Molecular size dependence and cutoff size J. *Cancer Res*, 1995, 55(17):3752-3756.
- 11] Anna M, Edgardo M, Alexei B, et al. Tumoral distribution of long-circulating dextran-coated iron oxide nanoparticles in a rodent model J. *Radiology*, 2000, 214(2):568-576.

(本文编辑 汤亚玲)

(上接第444页)

能下调 Tca8113 细胞中端粒酶催化亚基 mRNA 基因的表达和翻译。端粒酶催化亚基 mRNA 和端粒酶在 Tca8113 细胞、口腔鳞癌中均高表达,正常口腔黏膜无表达⁷。由此,可以设想,诱导细胞凋亡、抑制口腔鳞癌端粒酶催化亚基表达是 As₂O₃ 作用于 Tca8113 细胞的机制之一。有几种可能: As₂O₃ 直接抑制 hTERT 基因, hTERT 下降参与细胞凋亡。 As₂O₃ 通过抑制细胞凋亡相关基因如 c-myc,间接下调 hTERT,因为 c-myc 能与 hTERT 启动子结合,促进 hTERT 转录。在一些因素作用下, hTERT 下调与凋亡同时发生,加速细胞衰竭,死亡,这还需进一步研究。

综上所述,本研究表明,As₂O₃ 能抑制 Tca8113 细胞增殖,诱导其凋亡,还能抑制端粒酶催化亚基基因的转录和翻译。这也为针对端粒酶的肿瘤治疗提供了实验资料。As₂O₃ 不但能通过诱导细胞凋亡治疗口腔肿瘤,还可作为针对 hTERT 治疗肿瘤的药物。

[参考文献]

- 1] Fei G, Jing YI, Jing QY, et al. The cell cycle related apoptotic sus-

ceptibility to arsenic trioxide is associated with the level of reactive oxygen species J. *Cell Res*, 2004, 14(1):81-85.

- 2] Liu P, Han ZC. Treatment of acute promyelocytic leukemia and other hematologic malignancies with arsenic trioxide: Review of clinical and basic studies J. *Int J Hematol*, 2003, 78(1):32-39.
- 3] Tong Q, Zeng F, Zhu Z, et al. Preliminary study of the *in vitro* growth inhibition of human bladder cancer cell line BIU-87 by arsenic trioxide J. *J Tongji Med Univ*, 2000, 20(2):112-115.
- 4] 王韞芳,孙红炎,李昕全,等. 三氧化二砷对 NB4 及 Jurkat 细胞系端粒酶活性的抑制效应 J. *中国实验血液学杂志*, 2003, 1(4):359-362.
(Wang YF, Sun HY, Wang QL, et al. Inhibiting effect of arsenic trioxide on telomerase activity of NB4 and Jurkat cell lines J. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 2003, 11(4):359-362.)
- 5] Miller WH Jr. Molecular targets of arsenic trioxide in malignant cells J. *Oncologist*, 2002, 7(Suppl 1):14-19.
- 6] Janknecht R. On the road to immortality: hTERT upregulation in cancer cells J. *FEBS Lett*, 2004, 564(1-2):9-13.
- 7] 姚华,吴葆萱,吴求亮. 口腔鳞癌和癌前病变中端粒酶活性检测和意义 J. *中华口腔医学杂志*, 1999, 34(6):328-330.
(Yao H, Wu BX, Wu QL. Study and detection of telomerase activity in oral squamous cell carcinomas and precancerous lesions J. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 1999, 34(6):328-330.)

(本文编辑 汤亚玲)