

RGD 与 R8 肽共修饰麦角甾醇联合顺铂脂质体在裸鼠体内的肿瘤靶向性及抑瘤作用研究

王娟, 米完完, 应园园, 王航利, 张梦迪, 黄绳武* (浙江中医药大学药学院, 杭州 310053)

摘要:目的 对于 Cyclo [Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys(Ac-CH₂-SH)] (RGD) 与 R8 肽共修饰麦角甾醇联合顺铂脂质体递药系统进行裸鼠体内靶向性及抗肺癌作用初步评价。**方法** 第一步,对造模成功的 A549 荷瘤裸鼠尾静脉注射包封有近红外 DiR 荧光染料的 RGD 环肽与 R8 肽修饰、单一 RGD 环肽修饰、单一 R8 肽修饰、不修饰麦角甾醇联合顺铂脂质体,在小动物活体成像仪下不同时间点下观察脂质体的体内分布并评价其靶向性。第二步,连续给药 14 d,观测小鼠体重、肿瘤生长情况,于第 14 天处死动物,取血,并摘取各小鼠瘤组织、脾脏、肺组织,以瘤重、抑瘤率、血清转化生长因子-β1 (TGF-β1)、组织金属蛋白酶抑制剂 (TIMPs)、肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 水平、脾脏指数、瘤组织及肺脏的病理组织改变为指标,初步评价各脂质体在小鼠体内的抑瘤作用。**结果** 靶向性结果表明,RGD 与 R8 共修饰脂质体在荷瘤裸鼠肿瘤部位的荧光强度最高,高浓度下靶向性最为明显,其他几组的靶向作用均较弱。初步药效学结果表明,各给药组对于小鼠体重无明显变化,RGD 与 R8 共修饰脂质体高、中剂量组有明显抑瘤作用,其中,高剂量组抑瘤作用最为显著,且血清中高表达 TNF-α 细胞因子,RGD 与 R8 共修饰脂质体中、低剂量组脾脏指数较阳性药组显著升高。**结论** RGD 环肽与 R8 肽共修饰麦角甾醇联合顺铂靶向脂质体递药系统,进一步提高了体内肿瘤靶向性及抗肺癌作用。

关键词: 麦角甾醇; 顺铂; 脂质体; Cyclo [Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys(Ac-CH₂-SH)]; R8 肽; 活体荧光成像; 抑瘤作用

doi:10.11669/cpj.2019.05.004 中图分类号:R965 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2019)05-0364-09

Tumor Targeting and Suppression Effect in Nude Mice Induced by RGD and R8 Peptides Modified Liposomes Loading Ergosterol and Cisplatin

WANG Juan, MI Wan-wan, YING Yuan-yuan, WANG Hang-li, ZHANG Meng-di, HUANG Sheng-wu* (College of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To preliminarily evaluate the targeting and anti-lung cancer effect *in vivo* in nude mice induced by Cyclo [Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys(Ac-CH₂-SH)] (RGD) and R8 peptides modified ergosterol combined cisplatin liposomes. **METHODS** The first step, injected RGD cyclo peptide and R8 peptide-modified, single modified or no modified ergosterol combined cisplatin liposome in the caudal vein of nude mouse bearing the tumor, the body distribution and targeting of each group under the different time points through small animals living imager were observed. The second step, continuously, dose every other day for 14 d, observing the weight of mice and the tumor growth situation. The animals were drawn blood and then were put to death, removing the tumor, the spleen and the lung tissue of all the mice. As the index of the tumor weight, the tumor suppression effect, the level of TGF-β1, TIMPs and TNF-α in serum, the spleen index and changes of the tumor and lung tissue, investigate the tumor suppression effect in mice of the liposomes preliminary. **RESULTS** The targeting result of tumor-bearing nude mice displays that the fluorescence intensity of RGD and R8 peptides-modified liposome is the highest and the targeting is most obvious under high concentration and other group of liposome are weaker. Preliminary pharmacodynamics results show that each dosage group of mice have no obvious change in body weight and the high and middle dose group of RGD and R8 peptides-modified liposomes has tumor suppression effect obviously. The high dose group of RGD and R8 peptides-modified liposome is the most significant. It has high expression of cytokines (TNF-α) in serum. The spleen index of middle and low dose group of RGD and R8 peptides-modified liposomes significantly increased compared with positive medicine group. **CONCLUSION** RGD cyclo peptide and R8 peptide-modified ergosterol combined cisplatin targeting liposome drug delivery system further improves the tumor targeting and anti-lung cancer effect *in vivo*.

KEY WORDS: ergosterol; cisplatin; liposome; RGD cyclopeptide; R8 peptide; *in vivo* fluorescence imaging; tumor suppression effect

基金项目:国家自然科学基金项目资助(81473361);浙江省自然科学基金项目资助(LY16H280010)

作者简介:王娟,女,硕士 研究方向:药物新剂型与新技术 * 通讯作者:黄绳武,男,教授 研究方向:药物新剂型与新技术
Tel:(0571)86613524 E-mail:hsw55@163.com

一直以来,肿瘤的临床药物治疗疗效并不理想,其主要原因除了化疗药物的毒副作用外,还与其肿瘤靶向性较差、在治疗过程中易产生耐药等有关。为增强药物抗肿瘤活性,降低不良反应,将药物定向转运并蓄积于靶器官、靶组织和靶细胞的靶向给药系统已成为现代药剂学的研究热点。主动靶向制剂是用修饰的药物载体作为“导弹”,将药物定向运送到靶区浓集发挥药效作用。

Cyclo [Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys (Ac-CH₂-SH)] 简称 RGD 环肽,是含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸序列的多肽,相对分子质量为 691.8,结构稳定,不易引起免疫反应。肿瘤细胞和新生血管内皮细胞中含高表达整合素 $\alpha v \beta_3$, RGD 环肽为整合素 $\alpha v \beta_3$ 受体的识别配体,能主动靶向肿瘤部位^[1-4]。研究表明,具有 PEG 链修饰的脂质体在体内具有长循环作用,可降低网状内皮系统对脂质体的清除,提高制剂在血液循环中的稳定性^[5-7]。如果脂质体的粒径小于 150 nm,它可以通过高通透性和滞留效应(EPR 效应)有效地穿透肿瘤区的血管,在肿瘤区富集,这样就改变了药物在体内的分布,降低了毒性^[8]。但是,当 PEG 修饰的脂质体到达肿瘤部位后,PEG 较弱的穿透能力会限制脂质体入胞进一步发挥作用。而高效的穿肽膜 R8 (RRRRRRRR) 可以有效地将脂质体递送至肿瘤细胞内部,但是穿肽膜 R8 缺乏组织选择性,能够穿透所有细胞膜。鉴于穿肽膜 R8 和 PEG 的优劣,为了利用 PEG 的长循环效应和穿肽膜的高效入胞能力以及 RGD 主动靶向肿瘤部位的能力,本实验构建了 RGD-R8-PEG-ERG/DDP 给药系统。

据统计,目前在化疗或联合化疗治疗恶性肿瘤的方案中,大多都会用到铂类药物。继顺铂 (cisplatin,以下简称 DDP) 后,有卡铂、奈达铂、奥沙利铂、舒铂、乐铂和米铂等 6 个铂类抗肿瘤药物先后在各国上市。尽管铂类抗肿瘤药物取得了巨大的成功,但同时也存在很多临床应用的障碍,如无靶向性、易产生毒副作用、耐药性或交叉耐药性等问题^[9]。

近年来,药用真菌在治疗非小细胞肺癌方面以其可靠的疗效显示出良好的趋势,本实验前期选用中国台湾特有的真菌牛樟芝开展体外抗肿瘤作用研究。结果显示,牛樟芝醇提物作用于肺癌 A549 细胞时,细胞增殖抑制作用最强。为了进一步挖掘其抗肺癌的单体成分,对醇提部位进行分离,将分离出的组分进行鉴定并分别作用于 A549

细胞,结果显示牛樟芝中成分麦角甾醇具有很强的肺癌抑制作用。

而目前两药联用的方式增强药效解决化疗药物的耐药性得到了广泛的应用,本课题组前期进行了 ERG 与 DDP 两药联用在体外对肿瘤细胞 A549 增殖的影响,结果表明,两药联用增加了比单一用药时对 A549 细胞的抑制率。所以本实验将 ERG 与 DDP 一同载入载体当中。

本实验选用 BABL/C 裸鼠,在其背侧接种 A549 细胞,待肿瘤生长至体积为 200 mm³ 时,尾静脉给予共修饰脂质体及其他脂质体,采用小动物活体荧光成像系统,观察给药后第 0、2、5、7、24、30 h 脂质体的体内分布,并连续给药 7 次,以小鼠体重、瘤体积变化情况,瘤重,抑瘤率,血清中 TGF- β 1、TIMPs、TNF- α 水平,脾脏指数,脾脏及瘤组织病理特点为指标,进行初步药效学研究,用以评价靶向脂质体在裸鼠体内的肿瘤靶向性及抑瘤作用。

1 材料与方法

1.1 细胞与动物

24 只 BABL/C 裸鼠,SPF 级,3~4 周龄,雄性 [上海西普尔-必凯实验动物有限公司,动物许可证号:SCXK(沪)2013-0016]。裸鼠在浙江中医药大学动物实验中心的动物实验房饲养,温度 21~25 °C,湿度为 45%~55%。人肺癌细胞 A549 (中国科学院上海生命科学研究院细胞库)。

1.2 试剂

DiR 碘化物 (DiR iodide, 美国 AAT Bioquest 公司);IVIS Lumina K Series III 小动物活体成像系统 (浙江中医药大学动物实验研究中心);小鼠转化生长因子 β 1 (TGF- β 1)、小鼠金属蛋白酶组织抑制因子 (TIMPs)、小鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 酶联免疫试剂盒 (上海信帆生物科技有限公司)。

1.3 RGD 与 R8 肽共修饰麦角甾醇联合顺铂脂质体的制备

采用后插入法 (于 55 °C 水浴中孵育 1 h) 按 SPC、Chole、DSPE-PEG₁₀₀₀-R8、DSPE-PEG₃₄₀₀-c (RGD-fk) 物质的量比为 5:1:0.07:0.07 精密称取,制备 RGD 环肽与 R8 肽共修饰脂质体。对于 DiR 标记的脂质体,将适量的 DiR 的二甲基亚砜 (DMSO) 溶液加入至脂质材料中共同旋蒸至形成薄膜,经水化,探头超声,高压挤出,透析除盐,顺铂孵育,多肽孵育一系列步骤,形成 DiR 标记脂质体。

1.4 靶向性实验

1.4.1 DiR 碘化物的毒性 采用四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法试验考察 DiR 碘化物在体外的毒性。设置浓度梯度为 0.50、0.25、0.13、0.06、0.03 $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.4.2 DiR 碘化物用于体内成像的浓度筛选 本实验利用荧光染料 DiR 包裹的脂质体,在体内呈深红色荧光,观察各脂质体在裸鼠体内的靶向分布情况,操作简单。细胞膜荧光探针 DiR,碘化物 (DiR iodide),相对分子质量 1 013.39,激发波长 748 nm,发射波长 780 nm,是一种脂溶性荧光探针。DiR 本身荧光产率很低,是一类环境敏感型荧光染料,但和膜类物质结合后荧光产率显著升高。由于和细胞膜稳定结合,在体内不容易和细胞分离,同时激发和发射波长比较适合用来进行活体成像,因此这种染料在活体成像或者示踪中非常有用。根据预实验筛选,考查了 10 和 5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 2 种浓度。

1.4.3 活体成像试验 取体重约为 29 g,瘤体积为 200 mm^3 的雄性裸鼠,分别尾静脉注射 0.2 mL 的生理盐水,含 DiR 的普通脂质体中剂量、RGD 修饰脂质体中剂量、RGD 与 R8 共修饰脂质体高、中、低剂量,采用异氟烷麻醉,后置于活体成像仪下观察脂质体的体内分布 ($E_x = 748 \text{ nm}, E_m = 780 \text{ nm}$,曝光时间 2 s)。

1.5 药效学实验

1.5.1 动物分组 将 A549 肺癌细胞株从培养瓶中消化后用 0.9% 生理盐水重悬,调整细胞浓度至 1×10^7 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 接种于 BABL/C 裸鼠后背侧。每只裸鼠接种 0.2 mL 细胞悬液。待皮下肿瘤生长至米粒大小时,采用游标卡尺测量肿瘤体积,每周 2 次,待肿瘤体积长至 200 mm^3 时,采用随机数字表法将小鼠随机分为正常对照组、模型对照组、阳性药组、不修饰 ERG 与 DDP 脂质体组、RGD 修饰脂质体组、RGD 联合 R8 高、中、低浓度脂质体组,每组 3 只。

1.5.2 给药方法 各组小鼠均采用尾静脉注射的方法给药。正常对照组及模型对照组给予生理盐水,0.4 mL \cdot 只⁻¹;阳性对照组给予顺铂 0.9% 氯化钠溶液,1 mg \cdot kg⁻¹, 0.4 mL \cdot 只⁻¹;普通脂质体组给予未修饰 ERG 联合 DDP 脂质体,采用 0.9% 氯化钠溶液稀释 2 倍,0.4 mL \cdot 只⁻¹;RGD 脂质体组给予 RGD 修饰 ERG 联合 DDP 脂质体,采用 0.9% 氯化钠溶液稀释 2 倍,0.4 mL \cdot 只⁻¹;RGD 联合 R8 脂质体高、中、低脂质体组给予 RGD + R8 修饰 ERG 联合 DDP 脂质体,分别采用 0.9% 氯化钠溶液不稀释,稀释 2、4 倍,0.4 mL \cdot

只⁻¹;隔天注射,共注射 7 次。

1.5.3 观测指标 各组小鼠体重、肿瘤体积变化及抑瘤率:开始给药后,每周 2 次测定小鼠体重,同时用游标卡尺测量肿瘤最长及最短直径,并计算肿瘤的体积。连续给药 7 次后,测量各组肿瘤体积并计算各给药组抑瘤率。抑瘤率% = [(对照组平均瘤重 - 治疗组平均瘤重)/对照组平均瘤重] \times 100%。

1.5.4 测定小鼠血清 TGF- β 1、TIMPs、TNF- α 水平 测量小鼠体重、瘤径后,对小鼠摘眼球取血,置于抗凝管中,并迅速颈椎脱臼处死。离心取血清,严格按试剂盒说明操作,测定各组 TGF- β 1、TIMPs、TNF- α 的含量。

1.5.5 各组小鼠脾脏指数 完整取出小鼠脾脏并称重,计算脾脏指数。脾脏指数为小鼠脾脏的重量 (mg) 与体重 (g) 的比值。

1.5.6 各组小鼠瘤组织、肺脏病理改变 各组小鼠瘤组织、肺脏、脾脏进行 HE 染色。

1.5.7 统计学处理 实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,用 SPSS17.0 统计学软件进行单因素方差分析,两两比较。以 $P < 0.05$ 为有显著性差异, $P < 0.01$ 为有极显著性差异。

2 结果

2.1 靶向性实验

2.1.1 DiR 碘化物的毒性 实验结果见图 1,各个浓度下 DiR 碘化物对于细胞的增殖抑制率均较小。

2.1.2 DiR 碘化物体内浓度 通过预实验开展 DiR 荧光物质浓度的考察,发现适宜质量浓度为 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,见图 2,因此将该浓度用于后续体内肿瘤靶向性研究。

2.1.3 各组脂质体的体内成像情况 荷瘤裸鼠的近红外成像结果显示 RGD 与 R8 共修饰脂质体高剂量组在肿瘤组织的荧光强度显著强于其他组。结果见图 3。

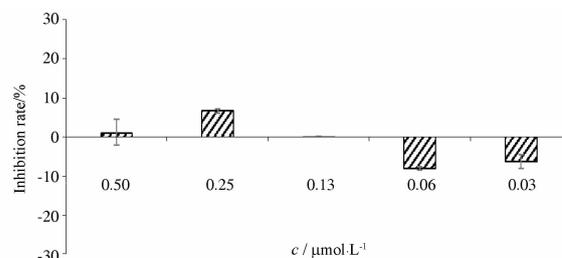


图 1 DiR 碘化物的四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法试验。 $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 1 The MTT test results of DiR iodide. $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.2 抑瘤作用研究

2.2.1 各组小鼠体重、肿瘤体积及抑瘤率 小鼠体重变化: 各组小鼠的体重变化曲线见表1。通过SPSS17.0统计学软件进行各组内单因素方差分析, 结果表明, 各组体重的4次测定值之间均无显著性差异, 说明各组给药前后, 对于小鼠的体重改变不大。

肿瘤体积变化: 开始给药后, 于第1、5、10、14天测定小鼠肿瘤的长短径, 计算肿瘤体积。4次测定平均值见表2。模型对照组的肿瘤体积呈快速增长的趋势, 第10、14天的体积与给药第1天相比, 显著增加($P < 0.01$); 阳性药组的瘤体积在5 d内基本维持不变, 在之后的1个星期内较第1天有所增加($P < 0.01$); 普通脂质体与RGD脂质体组的抑瘤作用并未体现, 给药结束后肿瘤体积较给药前有显著性增高($P < 0.01$); RGD + R8脂质体高剂量组在给药期间肿瘤体积不断减小, 与给药前相比差异有显著性($P < 0.01$); 中剂量组较第1次测量亦有减小, 差异无显著性;

低剂量组未体现明显的抑瘤作用, 最后一次测定值较第1次明显增大, 差异有显著性($P < 0.01$)。实验结果说明, RGD + R8脂质体高、中剂量组有体内抑瘤作用, 其中, 高剂量组作用最为显著($P < 0.01$)。

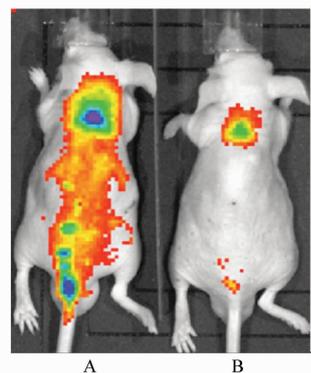


图2 不同浓度DiR碘化物的鼠体内成像情况
A - $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ DiR; B - $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ DiR

Fig. 2 *In vivo* imaging of different concentrations of DiR iodide
A - $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ DiR; B - $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ DiR

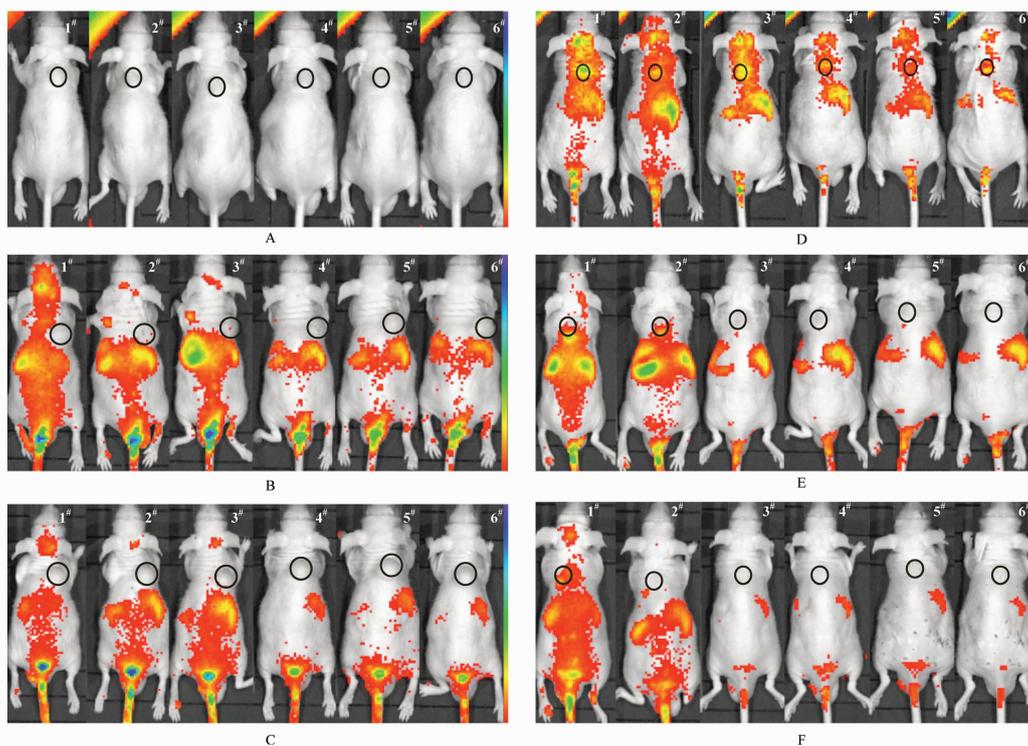


图3 载DiR的不同脂质鼠体在不同时间点下的鼠体内分布

A - 模型对照; B - 普通脂质体中剂量; C - RGD修饰脂质体中剂量; D - RGD + R8修饰脂质体高剂量; E - RGD + R8修饰脂质体中剂量; F - RGD + R8修饰脂质体低剂量; 1[#] - 0 h; 2[#] - 2 h; 3[#] - 5 h; 4[#] - 7 h; 5[#] - 24 h; 6[#] - 30 h; 黑色圆圈中为A549肿瘤接种部位

Fig. 3 The distribution of different liposomes with DiR loaded in the body at different time points

A - model reference group; B - normal liposome middle-dose group; C - RGD modified liposome middle-dose group; D - RGD + R8 modified liposome high-dose group; E - RGD + R8 modified liposome middle-dose group; F - RGD + R8 modified liposome low-dose group; 1[#] - 0 h; 2[#] - 2 h; 3[#] - 5 h; 4[#] - 7 h; 5[#] - 24 h; 6[#] - 30 h; the black circle area is the place where A549 tumor inoculated

各组小鼠抑瘤率:对于 A549 荷瘤裸鼠,与模型组相比,阳性药及 RGD + R8 脂质体高剂量组有显著抑瘤作用 ($P < 0.01$), RGD + R8 脂质体中、低剂量组亦有明显抑瘤作用 ($P < 0.05$)。与阳性药组相比, RGD + R8 脂质体高剂量组的抑瘤作用更强。RGD + R8 脂质体高剂量组的抑瘤作用较普通脂质体显著 ($P < 0.01$), 较 RGD 脂质体与低剂量组明显 ($P < 0.05$)。表明制备成 RGD + R8 靶向脂质体对于小鼠 A549 肺癌移植瘤有更强的抑制作用。结果

见表 3。

2.2.2 小鼠血清 TGF- β 1、TIMPs、TNF- α 水平 按试剂盒说明操作,得到 TGF- β 1、TIMPs、TNF- α 标准曲线,分别为 $Y = 0.0309\rho + 0.1032$, $r^2 = 0.9934$, 线性范围: $7.5 \sim 120 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$; $Y = 0.0265\rho + 0.1265$, $r^2 = 0.9718$, 线性范围: $3.75 \sim 60 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; $Y = 0.002\rho + 0.182$, $r^2 = 0.9701$, 线性范围: $50 \sim 800 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

测得 TGF- β 1、TIMPs、TNF- α 的含量见表 4。各组间的差异见图 4。

表 1 各组小鼠质量的变化. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Tab. 1 The change of body mass in mice. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Group	m/g			
	Day 1	Day 5	Day 9	Day 14
Normal control group	26.46 ± 3.18	26.66 ± 3.79	26.50 ± 2.67	26.54 ± 3.55
Model control group	25.19 ± 3.63	26.01 ± 3.20	26.19 ± 3.82	26.86 ± 3.68
Positive group	27.74 ± 2.80	27.12 ± 3.16	26.76 ± 3.34	26.75 ± 3.31
Ordinary liposome middle dose group	24.47 ± 2.75	24.42 ± 3.41	25.06 ± 5.72	25.77 ± 6.39
RGD modified liposome middle dose group	27.35 ± 1.60	28.90 ± 1.24	28.25 ± 0.82	29.36 ± 1.14
RGD and R8 modified liposome high dose group	29.10 ± 1.73	29.11 ± 2.28	28.28 ± 2.00	28.80 ± 2.49
RGD and R8 modified liposome middle dose group	27.42 ± 1.30	28.11 ± 1.55	28.19 ± 1.53	29.40 ± 1.50
RGD and R8 modified liposome low dose group	26.85 ± 1.58	25.97 ± 3.55	26.36 ± 2.01	26.54 ± 2.92

表 2 各组小鼠肿瘤体积的变化. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Tab. 2 The change of tumor volume in mice of each group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Group	Tumor volume/mm ³			
	Day 1	Day 5	Day 9	Day 14
Model control group	198.46 ± 33.86	223.75 ± 35.10	289.39 ± 11.70	339.02 ± 24.06
Positive group	195.67 ± 36.21	202.38 ± 14.99	254.08 ± 14.92	245.13 ± 18.26
Ordinary liposome middle dose group	195.19 ± 23.40	255.13 ± 35.27 ¹⁾	322.72 ± 26.46 ¹⁾	320.66 ± 23.71 ¹⁾
RGD modified liposome middle dose group	183.95 ± 22.92	206.64 ± 25.86	256.18 ± 23.30 ¹⁾	298.02 ± 19.77 ¹⁾
RGD and R8 modified liposome high dose group	253.74 ± 25.30	224.06 ± 30.27	178.99 ± 14.52 ¹⁾	170.51 ± 19.02 ¹⁾
RGD and R8 modified liposome middle dose group	274.12 ± 20.70	269.59 ± 27.77	291.78 ± 12.83	264.44 ± 17.89
RGD and R8 modified liposome low dose group	219.32 ± 25.22	274.14 ± 17.15 ¹⁾	308.88 ± 10.92 ¹⁾	281.51 ± 14.33 ¹⁾

注:与第 1 天相比, ¹⁾ $P < 0.05$

Note: ¹⁾ $P < 0.05$, compared with the same group and the first day

表 3 各组小鼠平均瘤重及抑瘤率. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Tab. 3 The average tumor weight and the inhibitory rate in mice of each group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Group	Average tumor mass on day 14/mg	Tumor inhibition rate/%
Model control group	374.00 ± 28.80	-
Positive group	258.37 ± 60.72 ²⁾	30.92
Ordinary liposome middle dose group	317.30 ± 43.14 ⁴⁾	15.16
RGD modified liposome middle dose group	294.00 ± 23.81 ³⁾	21.39
RGD and R8 modified liposome high dose group	199.10 ± 57.20 ²⁾	46.76
RGD and R8 modified liposome middle dose group	278.43 ± 66.06 ¹⁾	25.55
RGD and R8 modified liposome low dose group	285.97 ± 24.58 ¹⁾³⁾	23.54

注:与模型对照组相比, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 RGD + R8 脂质体高剂量组相比, ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$

Note: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, compared with the model control group; ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$, compared with the RGD and R8 modified liposome high dose group

表 4 各组小鼠血清中 TGF-β1、TIMPs、TNF-α 的含量. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Tab. 4 The content of TGF-β1, TIMPs and TNF-α in serum alpha in mice of each group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Group	$\rho(\text{TGF-}\beta 1)/\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$	$\rho(\text{TIMPs})/\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	$\rho(\text{TNF-}\alpha)/\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$
Normal control group	179.54 ± 26.51	64.20 ± 4.07	987.08 ± 30.73
Model control group	207.08 ± 16.00	120.60 ± 5.45 ¹⁾	983.33 ± 58.26
Positive group	197.04 ± 16.11	108.46 ± 16.22 ¹⁾	1 188.75 ± 239.42
Ordinary liposome middle dose group	202.36 ± 38.16	120.00 ± 27.09 ¹⁾	995.00 ± 300.52 ³⁾
RGD modified liposome middle dose group	200.82 ± 38.91	104.43 ± 21.61	1 158.75 ± 70.37
RGD and R8 modified liposome high dose group	187.09 ± 31.32	84.62 ± 20.74	1 388.75 ± 204.31 ¹⁾²⁾
RGD and R8 modified liposome middle dose group	188.04 ± 27.54	86.19 ± 33.59	1 266.67 ± 257.41
RGD and R8 modified liposome low dose group	188.86 ± 47.66	90.94 ± 17.91	1 271.25 ± 292.58

注:与正常对照组相比,¹⁾ $P < 0.05$;与模型对照组相比,²⁾ $P < 0.05$;与 RGD + R8 脂质体高剂量组相比,³⁾ $P < 0.05$

Note:¹⁾ $P < 0.05$, compared with the normal control group; ²⁾ $P < 0.05$, compared with the model control group; ³⁾ $P < 0.05$, compared with the RGD and R8 modified liposome high dose group

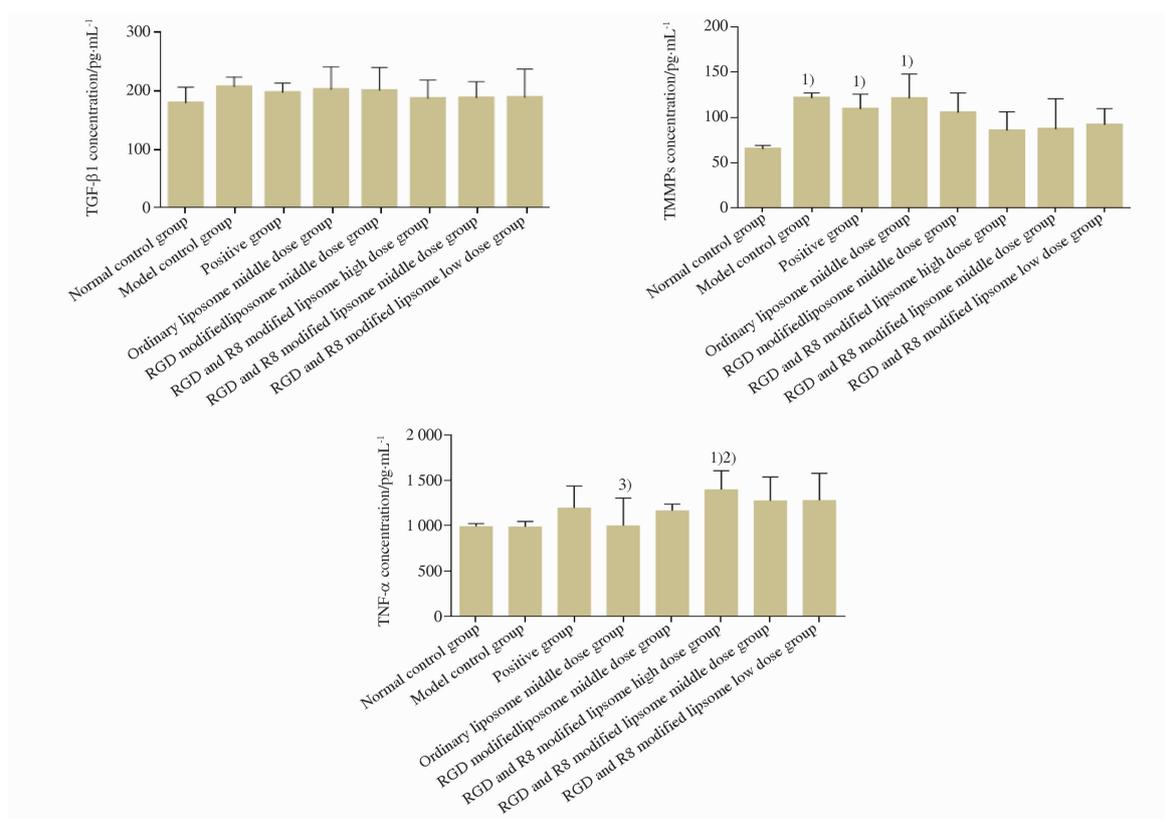


图 4 各组小鼠血清中 TGF-β1、TIMPs、TNF-α 的含量. $n = 3, \bar{x} \pm s$

与正常对照组相比,¹⁾ $P < 0.05$;与模型对照组相比,²⁾ $P < 0.05$;与 RGD + R8 脂质体高剂量组相比,³⁾ $P < 0.05$

Fig. 4 The content of TGF-β1, TIMPs and TNF-α in serum in mice of each group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

¹⁾ $P < 0.05$, compared with the normal control group; ²⁾ $P < 0.05$, compared with the model control group; ³⁾ $P < 0.05$, compared with the RGD and R8 modified liposome high dose group

对于 TGF-β1 含量,由数据可知,模型组及各给药组的含量均高于正常对照组,模型组含量最高,各组之间差异不大。对于 TIMPs 含量,各组数值均高于正常对照组,其中模型对照、阳性药、普通脂质体组含量与正常组相比显著增加($P < 0.05$)。TNF-α 含量数据显示,RGD + R8 脂质体高剂量组含量显著高于

正常对照、模型对照、普通脂质体组($P < 0.05$)。

2.2.3 各组小鼠脾脏指数 与正常对照组相比,阳性药组脾脏指数降低,差异有显著性($P < 0.05$),与阳性药组相比,RGD + R8 脂质体各剂量组脾脏指数均升高,其中中、低剂量组显著升高小鼠脾脏指数($P < 0.05$)。结果见表 5。

表 5 各组小鼠的脾脏指数. $n=3, \bar{x} \pm s$

Tab. 5 The spleen index in mice of each group. $n=3, \bar{x} \pm s$

Group	Spleen index/mg · g ⁻¹
Normal control group	4.78 ± 1.11
Model control group	4.44 ± 0.77
Positive group	3.26 ± 0.48 ¹⁾
Ordinary liposome middle dose group	3.37 ± 1.88
RGD modified liposome middle dose group	3.42 ± 0.68
RGD and R8 modified liposome high dose group	3.47 ± 0.32
RGD and R8 modified liposome middle dose group	4.41 ± 0.93 ²⁾
RGD and R8 modified liposome low dose group	5.23 ± 1.00 ²⁾

注:与正常对照组相比,¹⁾ $P < 0.05$;与阳性药组相比,²⁾ $P < 0.05$

Note: ¹⁾ $P < 0.05$, compared with the normal control group; ²⁾ $P < 0.05$, compared with the positive group

2.2.4 各组小鼠肿瘤、肺、脾脏组织病理特点 各组小鼠肿瘤组织 HE 染色结果见图 5,模型对照组肿瘤组织呈片状或弥散分布,核浆比例失调,核大深染,异型性明显,核病理性分裂多见,间质血管增生,偶见腺管、腺腔样结构,瘤组织中可见灶状坏死,给药各组瘤组织细胞形态结构得到一定程度改善,瘤组织坏死面积扩大,呈分隔状;瘤细胞出现不同程度的退变;细胞核固缩,分裂相减少,间质血管减少,肿瘤间质及边缘有大量淋巴细胞浸润,瘤组织边缘可见纤维性包裹。

各组小鼠肺脏 HE 染色结果见图 6,正常对照组肺泡管及肺泡结构清晰,肺泡腔未见扩张,肺泡壁毛细血管未见充血、炎性细胞浸润,肺泡壁及肺泡腔未见炎症改变,肺泡上皮未见损伤。模型对照组肺泡隔内的毛细血管的通透性增加,红细胞外渗。肺组织出现炎性细胞浸润,肺泡间隔增厚。肺泡管、肺泡腔内可见透明膜形成,部分肺泡正常结构消失而被炎症细胞充斥,出现不同程度的间质水肿与实质水肿。在肺边缘、小血管周围或支气管周围可见结节状转移灶。各给药组肺组织未见转移灶,肺泡结构有所改善,炎性细胞浸润状况均有所减轻。

各组小鼠脾脏 HE 染色结果见图 7,正常对照组小鼠脾脏细胞大小均一、排列有序、形态规则;模型对照组与阳性组小鼠脾脏细胞较正常对照组数量明显减少、细胞形态不规则、排列紊乱,可见凋亡细胞、成纤维细胞及脂肪变性等退行性改变,组织充血严重,可见大量多核细胞。各给药组脾脏细胞的情况均有所好转。其中共修饰脂质体组脾脏细胞明显增多,且细胞形态较规则,排列紊乱及各种退行性变化均明显改善。

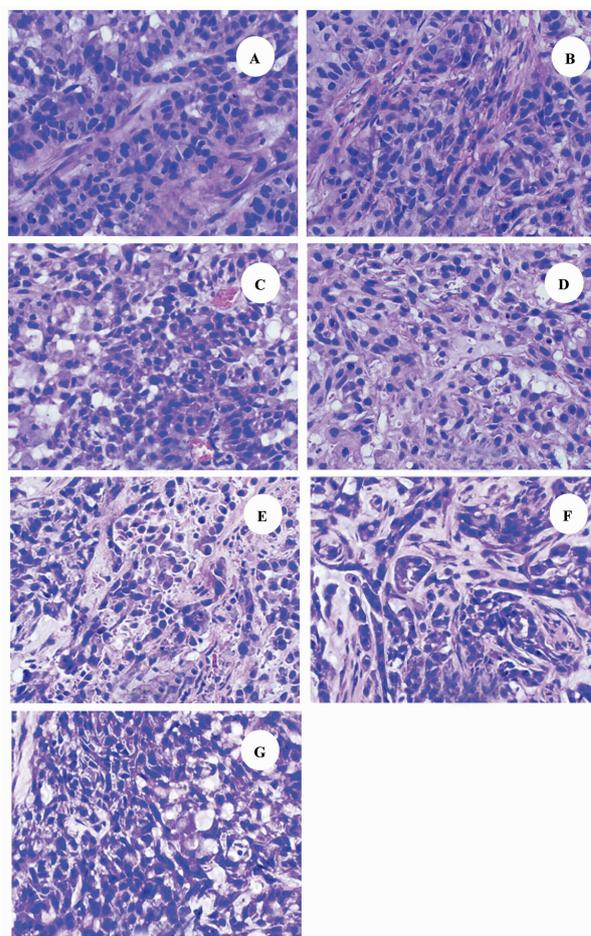


图 5 小鼠 A549 肿瘤组织病理学特点(×100)

A - 模型对照组; B - 阳性组; C - 普通脂质体中剂量组; D - RGD 修饰脂质体中剂量组; E - RGD + R8 修饰脂质体高剂量组; F - RGD + R8 修饰脂质体中剂量组; G - RGD + R8 修饰脂质体低剂量组

Fig. 5 The pathology characteristic of A549 tumor tissue in mice(×100)

A - model control group; B - positive group; C - ordinary liposome middle dose group; D - RGD peptide modified liposome middle dose group; E - RGD + R8 peptides modified liposome high dose group; F - RGD + R8 peptides modified liposome middle dose group; G - RGD + R8 peptides modified liposome low dose group

3 讨论

本实验将 RGD 特异性靶向配体连接到脂质体的表面,能够增强脂质体对肿瘤细胞的选择性,并修饰细胞穿膜肽 R8,结果显示,共修饰靶向脂质体可以靶向到肿瘤组织,避免载药后对正常细胞的损伤。

据文献[10]报道,近红外光(700~1 000 nm)属于非离子光源,受生物组织本底影响小,能够在不损伤活体动物的情况下,穿透深层组织而产生信号响应,而对组织本身几乎没有影响,同时还可以避免同位素可能造成的放射性污染。本实验利用 DiR 近红外荧光染料形成清晰的体内生物光源,从而实现活体示踪。与传统技术相比不需要处死动物,

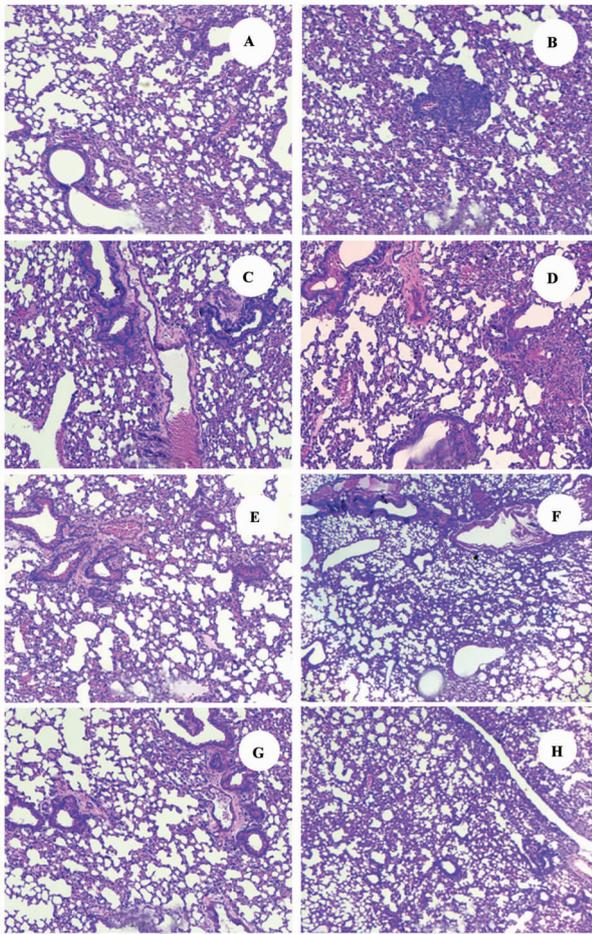


图6 各组小鼠肺组织病理学特点(×100)

A - 正常对照组; B - 模型对照组; C - 阳性组; D - 普通脂质体中剂量组; E - RGD 修饰脂质体中剂量组; F - RGD + R8 修饰脂质体高剂量组; G - RGD + R8 修饰脂质体中剂量组; H - RGD + R8 修饰脂质体低剂量组

Fig. 6 The pathology characteristic of lung tissue in mice of each group(×100)

A - normal control group; B - model control group; C - positive group; D - ordinary liposome middle dose group; E - RGD peptide modified liposome middle dose group; F - RGD + R8 peptides modified liposome high dose group; G - RGD + R8 peptides modified liposome middle dose group; H - RGD + R8 peptides modified liposome low dose group

且可以对同一个动物进行长时间反复跟踪成像,从而提高数据的可比性,避免个体差异对试验结果的影响^[11-12]。

现有研究表明,慢性炎症的刺激导致肿瘤释放许多直接促进其自身生长的因子,从而构成了一个炎性微环境,有利于肿瘤的发生和发展^[13]。转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)^[14]是一类具有多种生物学功能的多肽酶生长抑制因子,相对分子质量为 25 000。具有信号传导通路、抑制 T 细胞、巨噬细胞增殖与活性等功能,调节多种靶细胞基因的表达,是胚胎生长发育、细胞分化、增殖的免疫调节因子和凋亡促进

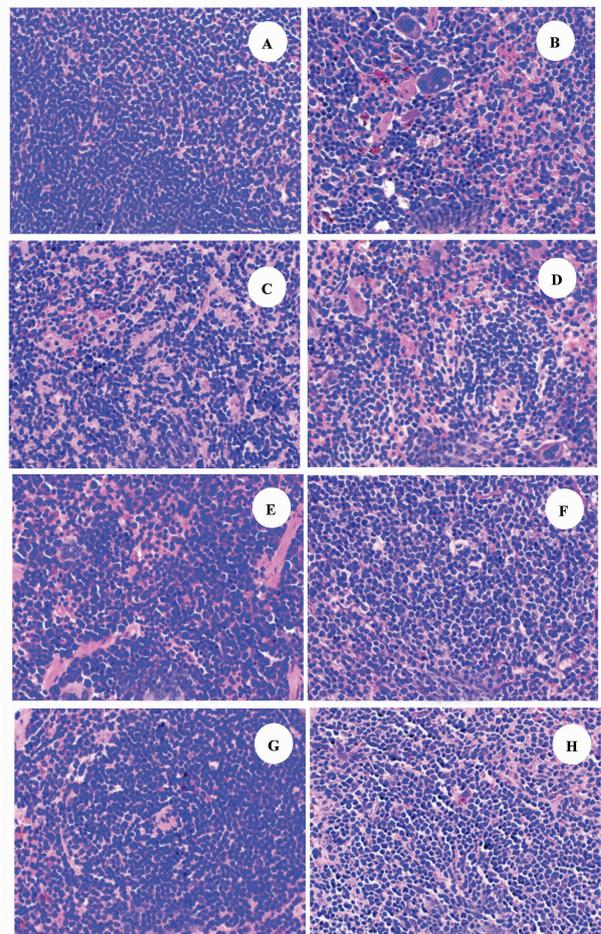


图7 各组小鼠脾脏组织病理学特点(×100)

A - 正常对照组; B - 模型对照组; C - 阳性组; D - 普通脂质体中剂量组; E - RGD 修饰脂质体中剂量组; F - RGD + R8 修饰脂质体高剂量组; G - RGD + R8 修饰脂质体中剂量组; H - RGD + R8 修饰脂质体低剂量组

Fig. 7 The pathology characteristic of spleen tissue in mice of each group(×100)

A - normal control group; B - model control group; C - positive group; D - ordinary liposome middle dose group; E - RGD peptide modified liposome middle dose group; F - RGD + R8 peptides modified liposome high dose group; G - RGD + R8 peptides modified liposome middle dose group; H - RGD + R8 peptides modified liposome low dose group

因子。TGF- $\beta 1$ 可在转录后抑制原癌基因 C-myc 的表达,使细胞生长停滞于 G₁ 期,抑制肿瘤的形成。一旦 TGF- $\beta 1$ 出现异常可导致其信号传导途径发生阻滞,C-myc 基因表达增强,Rb 蛋白及 P₅₃ 蛋白的去磷酸化也被解除。在正常情况下,TGF- $\beta 1$ 和各细胞生长因子之间相互抑制处于平衡状态,由于 TGF- $\beta 1$ 的过度表达,两者平衡被打破,可影响肿瘤免疫功能的正常发挥,使肿瘤细胞逃脱了免疫系统监测。同时,因肿瘤细胞信号传导及凋亡细胞内调控机制发生紊乱,无法对肿瘤细胞的生长发挥抑制作用,为肺癌的快速生长、转移提供了更好得微环境^[15-17]。

基质金属蛋白酶抑制剂 (TIMPs) 是近年来发现的一种胶原酶即基质金属蛋白酶 (MMPs) 活性的一组多功能因子家族,它通过对 MMPs 的抑制在正常细胞外基质 (ECM) 改建和各种病理过程中,如肿瘤的侵袭、扩散转移、组织纤维化中发挥重要作用。此外,TIMPs 在细胞的生长、增殖和分化中发挥一定的作用,这种作用与 MMPs 的活性抑制无关。TIMPs 影响肿瘤组织生长的机制可能有:TIMPs 可作为一种抗血管形成因子,通过限制肿瘤组织血管形成,引起肿瘤坏死,防止微小转移瘤发展;TIMPs 表达升高,可促使肿瘤周围纤维组织合成,有利于形成肿瘤包膜,限制肿瘤生长和转移;在肿瘤的发生发展过程中,MMP 常过度表达,降解基底膜及 ECM,导致肿瘤的侵袭转移及血管形成^[18]。

作为巨噬细胞表型之一,TAMs 可分泌炎症因子发挥杀伤肿瘤细胞作用,如 TNF- α 、NO、IL-10 等。高浓度的 TNF- α 可以迅速作用于肿瘤细胞,抑制其增值和分裂,引起肿瘤细胞的凋亡,而慢性长期分泌 TNF- α ,就会为肿瘤的生长和扩散提供条件。恶性肿瘤患者血清 TNF- α 升高的原因可能与肿瘤细胞在转移过程中激活循环内单核细胞或肿瘤浸润细胞接受肿瘤抗原刺激,产生 TNF- α 增多有关。TNF- α 的内源性分泌主要来源是肿瘤细胞的自分泌,而外源性分泌主要来源是 T 淋巴细胞和巨噬细胞,大量研究表明,不同分泌来源的 TNF- α 均能发挥促肿瘤生长的作用。正常情况下,适量的 TNF- α 对机体的保护反应是必需的,但是过量的 TNF- α 则对机体产生损伤反应,肺癌患者血清中 TNF- α 水平显著增高,高水平的 TNF- α 与肺癌的发生、发展和预后有关^[19-20]。

REFERENCES

[1] TU L X, XU Y H, TANG C Y, *et al.* In vivo imaging in tumor-bearing animals and pharmacokinetics of PEGylated liposomes modified with RGD cyclopeptide[J]. *Acta Pharm Sin*(药学报),2012,47(5):646-651.

[2] CHOI N, KIM S M, HONG K S, *et al.* The use of the fusion protein RGD-HAS-TIMP2 as a tumor targeting imaging probe for SPECT and PET[J]. *Biomaterials*,2011, 32(29): 7151-7158.

[3] LI Z S, ZHOU R H, WANG L L, *et al.* Anti-cancer metastasis effect of RGD-based peptide-bound long-circulating liposome[J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志),2002,37(6):422-424.

[4] ROBINSON S D, HODIVALA-DILKE K M. The role of β 3-integrins in tumor angiogenesis: context is everything[J]. *Curr Opin*

Cell Biol,2011,23(5):630-637.

[5] IYER A K, KHALED G, FANG J, *et al.* Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting[J]. *Drug Discov Today*, 2006,11(17-18):812-818.

[6] ZHANG L, WANG P, LI Y H, *et al.* Cholesterol-PEG modified vinorelbine tartar liposomes[J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2010,45(24):1930-1932.

[7] MENG H, XUE M, XIA T, *et al.* Use of size and a copolymer design feature to improve the biodistribution and the enhanced permeability and retention effect of doxorubicin-loaded mesoporous silica nanoparticles in a murine xenograft tumor model[J]. *Acc Nano*,2011,5(5):4131-4144.

[8] JI Y H, YANG X Y, WANG L N, *et al.* Liposome particles modified with transferrin and arginine-glycine-aspartic acid peptide: laboratory preparation therapeutic potential against lung cancer[J]. *Chin J Cancer Biother*(中国肿瘤生物治疗杂志), 2015,22(3):299-303.

[9] YE Q S, LOU L G, LIU W P, *et al.* Research progress in targeted drug delivery of platinum antitumor drugs[J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志),2008,43(20):1521-1529.

[10] KLARA S, CHEN J, ZHENG G. Using molecular beacons for cancer imaging and treatment[J]. *Front Biosci*, 2007, 12(9): 4709-4721.

[11] LIANG B, WANG Y, QIU Y Y, *et al.* Tumor-targeting efficiency of bufalin-loaded mPEG-PLGA-PLL-cRGD nanoparticles in hepatocellular carcinoma-bearing nude mice[J]. *J Med Res*, 2013,42(8):37-39.

[12] WEI P P, ZHANG Z H, JIN X, *et al.* Preparation and antitumor activity of luteolin mixed micelles[J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2015,50(15):1330-1334.

[13] QIAN B Z, POLLARD J W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis[J]. *Cell*,2010, 141(1):39-51.

[14] ZHAO C G, HUANG W H, WANG Z Y, *et al.* New progress in the study of transforming growth factor- β in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2016, 51(5): 341-345.

[15] HUA S, DAN G N, SHEN J X, *et al.* TGF- β 1 induces erlotinib resistance in non-small cell lung cancer by down-regulating PTEN[J]. *Biomed Pharmacother*, 2015,77:1-6.

[16] YOKO T I, TOSHI Y, TOHRU O, *et al.* Up-regulation of syndecan-4 contributes to TGF- β 1 induced epithelial to mesenchymal transition in lung adenocarcinoma A549 cells[J]. *Biochem Biophys Reports*, 2016, 5(C):1-7.

[17] XIE M, HE C S, WEI S H. Relationship between expression of TGF- β 1, Smad2, Smad4 and prognosis of patients with resected non-small cell lung cancer[J]. *Chin J Lung Cancer*(中国肺癌杂志),2015, 18(9):543-548.

[18] SHAO B, NIE Q H. The current basic and clinical research situation of matrix metalloproteinases tissue inhibitor (TIMPs)[J]. *J Clin Hepatol*(实用肝脏病杂志),2005,8(3):182-186.

[19] TIAN C Y. The status of TAMs and the expression of TNF- α and EGFR in NSCLC[D]. Chengde: Chengde Med Coll,2014.

[20] MA M, ZHANG Y, GUO L H, *et al.* Study on the mechanism of inhibition of tumor necrosis factor- α by compound 1487B[J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志),2015,50(20):1806-1810.

(收稿日期:2018-06-21)