肿瘤血管靶向隐形纳米粒对 HCT-15 和 HUVEC 的细胞毒性评价 *

白帆 於得红王 超管滢芸陆 琴方 超△

(上海交通大学医学院药理学教研室 上海 200025)

摘要 目的 :优化制备 K237 多肽修饰的紫杉醇隐形纳米粒 (K237-PTX-NP),并评价其对 HCT-15 和 HUVEC 两种细胞的细胞毒 性。方法 :乳化 - 溶剂挥发法优化制备 K237-PTX-NP ;HPLC 法测定其包封率、载药量 ;激光粒度分析仪测定其粒径和 Zeta 电位 ; CBQCA 试剂盒测定纳米粒表面多肽密度。以 Taxol 和 PTX-NP 为对照 ,采用 CCK-8 方法研究比较 K237-PTX-NP 对 HCT-15 和 HUVEC 细胞的细胞毒性差异。结果 :优化制备的 K237-PTX-NP 粒径为约 150 nm Zeta 电位为 -20 mv ,包封率为 33.5 % ,载药量 为 2.8 % ,多肽连接效率为 24.5 % ,平均每个纳米粒表面连接的 K237 数目约为 474 个。作用 24 h 时 ,K237-PTX-NP 抑制 HUVEC 活性的 IC50 为 0.01 nM ,而抑制 HCT-15 活性的 IC₅₀ 大于 1 μ M。结论 :与 HCT-15 相比 ,HUVEC 对 K237-PTX-NP 高度敏感 提示 K237-PTX-NP 具有潜在通过抑制肿瘤血管内皮细胞的生长治疗以 HCT-15 为代表的、P-gp 等膜转运蛋白高表达的耐药肿瘤的能 力。

关键词 隐形纳米粒 紫杉醇 多药耐药 HCT-15 中图分类号 R730.5 R943 文献标识码 A 文章编号 :1673-6273(2012)18-3420-05

Cytotoxicity of Stealth Nanoparticles Targeting to Tumor Neovasculature to HCT-15 and HUVEC Cells*

BAI Fan, YU De-hong, WANG Chao, GUAN Ying-yun, LU Qin, FANG Chao⁴ (Department of Pharmacology, Institute of Medical Sciences, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine,

Shanghai,200025, PR China)

ABSTRACT Objective: To optimize paclitaxel-loaded stealth nanoparticles decorated with K237 peptides (K237-PTX-NP) and evaluate the cytotoxicity to HCT-15 and HUVEC cells. Methods: Paclitaxel-loaded stealth nanoparticles decorated with K237 peptides (K237-PTX-NP) were prepared by emulsification-evaporation method. The encapsulation efficiency and drug loading were determined by HPLC. The particle sizes, polydispersity, zeta potential were measured by dynamic light scattering assay. K237 density on the nanoparticle surface was determined by CBQCA Protein Quantitation Kit. With Taxol and PTX-NP as control, the cytotoxicity of K237-PTX-NP to HCT-15 and HUVEC were determined using CCK-8 assay. Results: The average particle size of K237-PTX-NP was 150 nm. The zeta potential was -20 mV; Encapsulating efficiency was 33.5 %; Drug loading was 2.8 %, K237 conjuation efficiency was 24.5 % and K237 density on the nanoparticle surface was 474. After 24 h incubation, the IC50 values of K237-PTX-NP for HUVEC and HCT-15 cells were about 0.01 nM and over 1 μ M respectively. Conclusion: Compared with HCT-15 cells, HUVEC cells are much more sensitive to K237-PTX-NP, which suggested that K237-PTX-NP may have the capacity to treat multidrug resistant tumors like HCT-15, and it was highly expressed with P-gp or other multidrug resistance associated proteins, through inhibiting the growth of tumor endothelial cells.

Key words: Stealth nanoparticles; Paclitaxel; Multidrug resistance; HCT-15 Chinese Library Classification(CLC): R730.5, R943 Document code: A Article ID:1673-6273(2012)18-3420-05

前言

恶性肿瘤是严重威胁人类健康的重大疾病,化疗药物是目前临床治疗恶性肿瘤的首选,然而,肿瘤多药耐药(Multidrug resistance,MDR)严重影响了肿瘤化疗的成功率。肿瘤多药耐药 是指肿瘤细胞对一种药物产生耐药性的同时,对其他化学结构 不同、作用机制各异的抗肿瘤药物亦具有交叉耐药性。肿瘤多 药耐药是导致临床肿瘤化疗失败的重要原因。 肿瘤血管生成与肿瘤的生长、侵袭、转移、复发及预后密切 相关。已有研究发现,肿瘤抗血管生成治疗在治疗耐药肿瘤方 面具有潜在优势^[1-3] (1)治疗"靶"是增殖过程中的肿瘤血管 内皮细胞,而非具有 MDR 特性的肿瘤细胞本身 (2)肿瘤新生 血管内皮细胞遗传性状稳定,诱导产生肿瘤耐药的机会相对较 小 (3) 与肿瘤细胞相比,肿瘤血管内皮细胞对化疗药物的敏感 性更高。研究表明,紫杉醇(PTX)具有直接破坏肿瘤新生血管的 活性,能够抑制肿瘤新生血管内皮细胞增殖、迁移和抑制血管

^{*}基金项目 国家自然科学基金项目(30873179)

[△]通讯作者 方超 副教授 硕士生导师 ,Tel: 021-63846590-778013 ,E-mail: fangchao100@hotmail.com (收稿日期 2011-12-10 接受日期 2011-12-30)

内皮细胞形成小管形态^[4]。

本研究通过单因素筛选的方法优化制备了能够靶向肿瘤 血管内皮细胞的 K237 多肽修饰的载 PTX 隐形纳米粒,并评价 其对 HCT-15 人结肠癌多药耐药肿瘤细胞和 HUVEC 人脐静 脉内皮细胞(模拟肿瘤血管内皮细胞)的毒性,为体内 K237-PTX-NP 治疗多药耐药肿瘤研究提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

Hydroxy-PEG-Aldehyde(SUNBRIGHTTM Mw = 5000)购自 日本 NOF 公司 Hydroxy-PEG -OCH3(Mw = 5000)和 NaCNB3 (氰基硼氢化钠)购自美国 Fluka 公司 紫杉醇(原料药)购自上海 金贸泰化工有限公司 K237 多肽(HTMYYHHYQHHL)购自上 海吉尔生化有限公司 胆酸钠(进口分装)购自中国医药集团上 海化学试剂公司 CBQCA Protein Quantitation Kit 购自美国 Invitrogen 公司 ,高效液相色谱柱 C18(Cat.no.99906)购自迪马科 技有限公司 ,二氯甲烷(CH₂Cl₂)、乙腈(分析纯)购自上海化学试 剂有限公司。

泰素 R(TaxolR PTX 紫杉醇注射液)购自美国 Bristol-Myers Squibb 公司 CCK-8 试剂盒购自上海同仁化学研究所。原代 人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 购自 Cascade Biologics 公司。 CHO-PEG-PLA(Mn=63929)和 CH3O-PEG-PLA(Mn=64054)由 本实验室采用开环共聚法合成^[5]。

1.2 方法

1.2.1 纳米粒的制备 将 3 mg CHO-PEG-PLA 27 mg CH₃O-PEG-PLA 和 1.5 mg PTX 混合溶解于 1 mL CH₂Cl₂中,加入 3 mL 1% 胆酸钠溶液 160 W 连续超声 25 s,得 O/W 型初乳。将此 初乳加入到 40 mL 0.5 %的胆酸钠溶液中,磁力搅拌下过夜,挥 发除去 CH₂Cl₂ A [°]C 11,000 g 下离心 30 min,沉淀即为装载 PTX 的隐形纳米粒(PTX-NP)。

表面含有醛基的 PTX-NP 能与 K237 多肽末端氨基在还原 剂存在下发生共价结合反应,具体反应步骤如下 5 mL PBS(pH 7.4)溶解所得 PTX-NP 沉淀,按醛基 - 氨基一定摩尔比加入多 肽 K237(Mw = 1666.85 g/moL)量,再加入相应体积的还原剂 NaCNB₃(0.2 mg/mL),室温下搅拌反应 8-12 h。反应后于 4 ℃, 11,000 g 下离心 30 min,沉淀即为 K237-PTX-NP。收集上清,另 加入 4 mL 双蒸水洗涤纳米粒,合并收集上清液,用于测定 K237 多肽的连接量和连接效率。

1.2.2 纳米粒理化参数表征 纳米粒理化参数表征包括粒径 (粒径分布) Zeta 电位 K237 多肽连接效率,纳米粒表面多肽 连接密度,包封率和载药量。粒径(粒径分布)和 Zeta 电位采用 K237-PTX-NP 加水分散并稀释至适当的浓度后采用 Zeta Potential/Particle Sizer NICOMPTM 380ZLS 测定。K237 多肽测定 方法^[7] 采用 CBQCA Protein Quantitation kit 试剂盒测定未连接 至纳米粒表面的 K237 多肽数。连接在纳米粒表面的多肽分子 个数为处方投入量减去未连接的多肽数量,计作 X。

K237 多肽修饰在纳米粒表面的连接效率 (conjugation efficiency) = 连接在纳米粒表面的 K237 数量 × 100%

K237 处方投入量

采用恒重法测定纳米粒重量为 W, 动态光散射法经

NICOMPTM 380 ZLS 测定粒径 D(nm),经文献查得纳米粒密 度为 g/cm³ 根据公式:

$$Y = \frac{6 \times W \times 10^{\circ}}{[\pi \times (D \times 10^{\circ})^{3} \times \rho]}$$
计算得到纳米粒个数。据此,

K237-PTX-NP 表面 K237 多肽密度 (K237 density on the nanoparticle surface) 是指每个纳米粒表面连接的 K237 多肽的 数量,其计算方法为 S = X/Y

包封率和载药量的测定:取适量已制备好的空白 NP、 PTX-NP 和 K237-PTX-NP,冷冻干燥 6h。将其分别用 1 mL 二 氯甲烷溶液溶解,用移液器吹打均匀,涡旋 10 s,并置通风厨中 将二氯甲烷挥干。然后用一定量的乙腈重悬萃取出的紫杉醇, 于 8 000 r/min 离心 10 min,将上清转移至另一干净 EP 管,补 加与乙腈相等量的水,充分混匀。HPLC 测定样品的峰面积 结 合紫杉醇的标准曲线,按下列公式计算载药量和包封率。纳米 粒的载药量(drug loading)是指单位重量的纳米粒中所含药物的 量,其计算方法为:

载药量(DL%)=<u>纳米粒中所含药物重量</u>×100% 纳米粒总重量

纳米粒的药物包封率(encapsulation efficiency)是指单位体 积或重量纳米粒制剂中被载入纳米粒中的药物重量与体系中 药物重量之比。其定义为:

包封率(EE%)=<u>纳米粒中实际药物量</u>×100% 纳米粒中理论投药量

1.2.3 多肽 K237 修饰纳米粒制备条件的优化 为了优化 K237-PTX-NP 的制备工艺,本文以粒径、K237 多肽密度和连 接效率为指标,对 CHO-PEG-PLA 与 CH₃O-PEG-PLA 质量比, 醛基基团与多肽 K237 的摩尔比,多肽连接反应时间等三个因 素进行优化筛选。

1.2.4 纳米粒表面多肽 K237 的鉴定 将 CHO-PEG-PLA 和 CH₃O-PEG-PLA(1:9)混合制备空白 NP 和空白 K237-NP,冷冻 干燥。另制备 CHO-PEG-PLA 和 CH₃O-PEG-PLA(1:9)的混合 物,充分混匀。采用 X-射线光电子能谱(XPS)分析 NP 和 K237-NP 冻干样品以及高分子材料混合物表面的元素组成(C, O,N)^[7] :采用铝/镁靶,高压 14.0 KV,功率 250 W,真空优于 1× 10⁸ Torr。采用美国 RBD 公司的 RBD147 数据采集卡和 AugerScan 3.21 软件分别采集样品的 0~1200 eV 的全扫描谱, 而后采集各元素相关轨道的窄扫描谱。并采用 AugerScan 3.21 软件进行数据分析。以 C1s = 284.6 eV 为基准进行结合能校 正。

1.2.5 紫杉醇纳米粒中药物含量测定方法的建立 (1)标准溶液 配制 精密称取紫杉醇 2 mg ,用乙腈 - 水(1:1, v/v)准确配置浓 度为 2 mg/mL的 PTX 储备液。精密吸取该储备液 ,用流动相乙 腈 - 水(1:1, v/v)稀释成浓度为 1.0 2.0 4.0 8.0 ,16 32 μg/mL的 紫杉醇标准溶液。以流动相溶液做对照 ,在 227 nm 下检测标准 液 UV 吸收值 ,每个浓度点重复 3 份 ,以平均吸收值 A 对相应 浓度 C 线性回归 ,制备标准曲线。

(2)HPLC 实验条件和进样量 流动相为乙腈 - 水(1:1, v/v), 流速 1.0 mL/min 检测波长 227 nm 进样量 25 μL。

(3)精密度和回收率考察:回收率:以 2 β ,32 μg/mL做为 低、中、高三个浓度,各取 25 μL 进样,每个浓度点重复5份根 据标准曲线算出三个浓度点的测定值,以平均测定值和实际配 制值之比考察方法回收率。日内和日间精密度;同一天内测定 低、中、高浓度各5份样品,计算测定值的RSD即为日内精密 度。连续5天测定低、中、高浓度各5份样品,计算5天平均值 的RSD即为日间精密度。

(4)专属性:将(1)中的标准溶液与空白纳米粒经相同步骤 处理后的溶液按前述色谱条件进样,记录色谱图,确证方法的 专属性。

1.2.6 CCK-8 法检测细胞活力 取对数生长期的 HCT-15 和 HUVEC 细胞以 5× 10⁴/mL 密度接种 96 孔板,每孔加 100 μL M200 培养液。待细胞生长 24 h 达到 80 %融合后,將 PTX 终 浓度为 0.01 0.1 1,10 ,100 ,1000 nM 的 K237-PTX-NP 溶液加 入含 HUVEC 细胞的孔中,PTX 终浓度为1,10,30 ,100 ,300 , 1000 nM 的 K237-PTX-NP 溶液加入含 HCT-15 细胞的孔中, 24 h 后每孔加与孔内体积比为 1:10 体积的 CCK-8 溶液,置于 37 ℃培养箱继续孵育 2 h,用可调波长式微孔酶标仪在 450 nm 处检测 OD 值。以细胞培养液和 CCK-8 溶液但不含细胞的孔 做为空白对照 同时设置 Taxol[®] 和 PTX-NP 实验组。按如下公 式计算抑制率:

抑制率(%)=(OD_{对照}-OD_{样品})/(OD_{对照}-OD_{空白})× 100% 实验重复 3 次 数据表示为 x ± SD。

2 结果

2.1 多肽 K237 修饰纳米粒制备条件的优化

2.1.1 CHO-PEG-PLA 与 CH₃O-PEG-PLA 比例的影响 如表 1 所示,其它因素不变,CHO-PEG-PLA 与 CH₃O-PEG-PLA 比例 (w:w)越高,多肽连接效率越大,纳米粒表面多肽密度亦越大。 细胞表面 K237 配体密度过高,可能会因空间位阻作用影响多 肽正常构象的形成,进而降低其与 KDR 受体结合的效率。而将 CHO-PEG-PLA 与 CH₃O-PEG-PLA 比例降低至 1:19,纳米粒表 面连接的多肽数量较少,同样不利于纳米粒的靶向摄取。因此 我们选择纳米粒表面多肽密度较适当的聚合物比例(1:9)作为 优化的聚合物比例参数用于纳米粒的制备。

表1 CHO-PEG-PLE 与 CH3O-PEG-PLA 比例对纳米粒粒径、粒径分布、多肽连接效率和多肽表面密度的影响

Table 1 Influences of the ratio of CHO-PEG-PLA to CH3O-PEG-PLA on the particle size, size distribution, K237 conjuation efficiency and K237 density on the nanoparticle surface

Ratio of CHO-PEG-PLA to CH ₃ O-PEG-PLA/ w:w	Particle size/nm	P.I.	Conjugation efficiency/ %	K237 per nanoparticle
1:5	141.4 ± 2.1	0.086 ± 0.002	37.6 ± 8.5	754 ± 171
1:9	149.7 ± 5.2	0.056 ± 0.004	24.5 ± 7.3	474 ± 43
1:19	154.8 ± 3.4	0.110 ± 0.005	14.8 ± 3.6	121 ± 92

Note: P.I = polydispersity index.

2.1.2 醛基与多肽 K237 比例的影响 由表 2 可见,其它因素不变,將醛基与多肽 K237 的摩尔比例从 1:1 调整到 1:5,即增加多肽 K237 的投料量,可提高纳米粒表面连接的多肽的数量和连接效率。如上所述,K237 配体连接数量较少将影响靶向效率,连接过多会因空间位阻作用影响多肽正常构象的形成,同样不利于纳米粒的靶向性,故我们选择多肽密度居中的

CHO-PEG-PLA 与 K237 摩尔比(1:3)作为优化比例参数用于纳 米粒的制备。

2.1.3 多肽连接反应时间的影响 由表 3 可见,反应 6 h 时 纳
米粒表面多肽数目较少,可能会影响纳米粒的靶向摄取。反应
10 h 和 12 h 时多肽连接效率和纳米粒表面多肽密度均无显著
性差异,故选择反应时间较短的 10 h 作为优化参数。

表 2 CHO-PEG-PLA 与 K237 摩尔比对纳米粒粒径、粒径分布、多肽连接效率和多肽表面密度的影响

Table 2 Influence of molar ratio of CHO-PEG-PLA to K237 on particle size, size distribution, K237 conjuation efficiency and K237 density on the nanoparticle surface

_						
	Molar ratio of CHO-PEG-PLA to K237	Particle size/nm	P.I.	Conjugation efficiency/ %	K237 per nanoparticle	
	1:1	179.5 ± 5.5	0.119 ± 0.001	20.9± 11.6	85 ± 36	
	1:3	149.7 ± 5.2	0.056 ± 0.004	24.5 ± 7.3	474 ± 43	
	1:5	155.6 ± 3.4	0.126 ± 0.006	32.4 ± 7.8	971 ± 347	

Note: P.I.=polydispersity index.

表 3 连接反应时间对纳米粒粒径、粒径分布、多肽连接效率和纳米粒表面多肽密度影响

Table 3 Influence of incubation time on particle size, size distribution, K237 conjuation efficiency and K237 density on the nanoparticle surface

Incubation time/ h	Particle size/nm	P.I.	Conjugation efficiency/ %	K237 per nanoparticle
6	138.6 ± 4.4	0.112 ± 0.003	20.9 ± 2.3	159 ± 30
10	149.7 ± 5.2	0.056 ± 0.004	24.5 ± 7.3	474 ± 43
12	143.2 ± 5.2	0.091 ± 0.002	22.6 ± 3.1	370 ± 29

Note: P.I.=polydispersity index.

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

• 3423 •

2.1.4 通过单因素分析筛选出 K237-PTX-NP 制备的优化条件 CHO-PEG-PLA 与 CH₃O-PEG-PLA 的质量比为 1:9。CHO-PEG-PLA 与 K237 的摩尔比为 1:3。多肽连接反应时间为 10 h。 2.2 纳米粒的表征

采用优化处方制备得到的 K237-PTX-NP 粒径为约 150 nm Zeta 电位为 -20 mv,包封率为 33.5 %,载药量为 2.8 %,多 肽连接效率为 24.5 %,平均每个纳米粒表面连接的 K237 数目 约为 474 个。对照 PTX-NP 的粒径约为 135 nm Zeta 电位为 -21.9 mV,包封率为 39.9 %,载药量为 3.3 %。

2.3 表面元素分析

由 XPS 分析可以推测 CHO-PEG-PLA: CH₃O-PEG-PLA(1: 9 ,w/w)混合物、空白 NP 和空白 K237-NP 表面元素的组成(表 4)。聚合物混合物和 NP 表面没有可以检测到的 N 元素,而 K237-NP 表面元素组成中 N 元素占 0.47 %,提示 K237 成功修 饰在纳米粒的表面。

2.4 紫杉醇纳米粒中药物 HPLC 检测测定方法的建立

2.4.1 标准曲线的建立 紫杉醇在 1.0~32 μg/mL 浓度范围内峰 面积(A)对浓度(C)的线性回归方程为 :A=2635.0 C-94.43 (r=

0.9999)。在此浓度范围内线性关系良好。

表4 CHO-PEG-PLA 和 CH₃O-PEG-PLA 混合物(1:9)、空白纳米粒 (NP)以及多肽修饰空白纳米粒(K237-NP)的 XPS 分析

Table 4 XPS analysis of CHO-PEG-PLA:CH₃O-PEG-PLA (1:9) mixture,

blank nanoparticles (CHO-PEG-PLA: CH₃O-PEG-PLA ratio is 1:9)

coupled without or with K237 peptide

Atomic mass concentration (%)	С	0	Ν
CHO-PEG-PLA: CH3O-PEG-PLA (1:9) mixture	70.22	29.78	-
NP	68.46	31.54	-
K237-NP	65.86	33.67	0.47

2.4.2 精密度和回收率考察 日内、日间精密度和回收率考察 的结果见表 5。精密度的 RSD<5% 表明该方法的精密度较好。 回收率在 93-102 %之间 符合实验要求。

2.4.3 专属性 在已设定的色谱条件下 PTX 在 227 nm 检测波 长下的出峰时间 8.3 min,而该出峰时间处空白纳米粒无任何 杂质峰,表明空白纳米粒对 PTX 测定无干扰,方法专属性好 (图 1)。

表 5 HPLC 测定 PTX 浓度的方法学数据 (n = 5)

Table 5 Wethod valuation for FTX determination by $FFEC$ ($II = 5$)					
Theoretical	Within-day precision		Between-day precisi	Average recovery	
$(\mu g/mL)$	{EMBED Equation.3 }± SD	RSD (%)	{EMBED Equation.3 }± SD	RSD (%)	(%)
2.0	1.80 ± 0.04	2.22	1.84 ± 0.09	4.89	93.68 ± 0.89
8.0	7.52 ± 0.05	0.66	7.39 ± 0.15	2.02	97.78 ± 0.65
32.0	32.88 ± 0.12	0.36	32.93 ± 0.34	1.03	101.28 ± 0.6



2.5 K237-PTX-NP 对 HCT-15 和 HUVEC 细胞的细胞毒性

HCT-15 对原形药物 Taxol 极不敏感,在 PTX 1 μM 时仍 有 66% 的细胞存活,提示 IC₅₀大于 1 μM,与文献报道一致^[13]。 PTX-NP 在测试浓度范围内未对 HCT-15 产生显著毒性,而 K237-PTX-NP 仅在最高浓度下(1 μM)抑制约 30% 的 HCT-15 细胞的生长,该浓度下与 Taxol 抑制 HCT-15 活性的能力无显 著性差异(图 2)。



Fig.2 Effect of various paclitaxel formulation, Taxol[®], PTX-NP and K237-PTX-NP on the viability of HCT-15 after 24 h incubation. *P< 0.05, ***P< 0.001 as compared with K237-PTX-NP; #P< 0.05, ###P < 0.001 as compared with PTX-NP

与 HCT-15 细胞相比 K237-PTX-NP 对 HUVEC 细胞在所 有测试浓度下均表现出强的细胞毒性。其中 0.01 μM 浓度下, K237-PTX-NP 对 HUVEC 的抑制率为约 50 %,而在 1 μM 浓 度时 K237-PTX-NP 可完全抑制 HUVEC 的生长。与 PTX-NP 相比 ,Taxol 在除 0.1 μM 浓度外的其他各浓度下,均具有显著 增强的细胞毒性。





3 讨论

肿瘤多药耐药主要由以 P- 糖蛋白(P-gp)、多药耐药相关蛋白(MRP)、乳腺癌耐药蛋白(BCRP)等为代表的 ATP 结合盒 (ABC)膜转运蛋白超家族成员介导,这些膜转运蛋白过度表达 于肿瘤细胞表面并将进入细胞内的抗肿瘤药物泵出,使胞内药 物有效浓度降低而导致肿瘤细胞产生化疗抵抗^[89]。抗血管生成 治疗的 " 靶 " 为非 P-gp 等膜转运蛋白高表达的肿瘤血管内皮 细胞,因此,具有潜在治疗多药耐药肿瘤的活性。已有研究表 明,抗血管生成治疗对耐药肿瘤治疗有效^[10,11]。

通过对 CHO-PEG-PLA 与 CH₃O-PEG-PLA 的质量比, CHO-PEG-PLA 与 K237 的摩尔比,以及多肽连接反应时间等 3 个指标的单因素筛选,本研究优化制备了 K237 多肽修饰载有 紫杉醇的隐形纳米粒。K237 是通过菌体展示技术研究发现的 由 12 个氨基酸组成的多肽,K237 能够特异性地与内皮细胞上 的 KDR 受体结合^[12]。本课题组前期研究证实,K237 与 KDR 受 体结合后,可启动细胞的内化作用(internalization),介导载香豆 素 -6(coumarin-6)纳米粒的内吞^[6]。这一机制提示 K237 多肽可 作为靶向配体特异性地向肿瘤血管内皮细胞递送药物。

HCT-15 为人结肠癌肿瘤细胞 其表面高表达 P-gp 表现出 对包括 PTX 等化疗药物的多药耐药^[14-18]。CCK-8 细胞毒实验表 明 HCT-15 对 Taxol 和 K237-PTX-NP 高度抵抗 (IC₅₀>1 μ M), 而 Taxol 和 K237-PTX-NP 抑制人脐静脉内皮细胞 HUVEC^[19,20] (一种评价肿瘤血管生成的经典细胞模型)的 IC50 分别为约 10 nM 和 0.01 nM。由此可见 ,与 HCT-15 多药耐药肿瘤细胞相 比,HUVEC对Taxol和K237-PTX-NP的敏感性显著增强,其中HUVEC对K237-PTX-NP的敏感性最高,IC₅₀仅为Taxol的1/1000。

隐形纳米粒表面具有 K237 多肽的修饰,静脉给药以后 K237-PTX-NP 可以快速、准确地靶向肿瘤血管内皮细胞⁽⁶⁾。本 研究提示,与 HCT-15 细胞相比,内皮细胞对 K237-PTX-NP 的 高敏感特性使得靶向肿瘤血管治疗以 HCT-15 为代表的、P-gp 等膜转运蛋白高表达的耐药肿瘤成为可能,为进一步探索体内 K237-PTX-NP 治疗肿瘤多药耐药实验打下良好基础。

参考文献(References)

- Schenone S, Bondavalli F, Botta M. Antiangiogenic agents: an update on small molecule VEGFR inhibitors [J]. Curr Med Chem, 2007, 14 (23): 2495-2516
- [2] Kamat AA, Kim TJ, Landen CN Jr, et al. Metronomic chemotherapy enhances the efficacy of antivascular therapy in ovarian cancer [J]. Cancer Res, 2007, 67(1): 281-288
- [3] Kerbel RS, Kamen BA. The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy[J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(6): 423-436
- [4] Fan TP, Yeh JC, Leung KW, et al. Angiogenesis: from plants to blood vessels[J]. Trends Pharmacol Sci, 2006, 27(6): 297-309
- [5] Grant DS, Williams TL, Zahaczewsky M, Dicker AP. Comparison of antiangiogenic activities using paclitaxel (taxol) and docetaxel (taxotere)[J]. Int J Cancer, 2003,104:121-129
- [6] Yu DH, Lu Q, Xie J, et al. Peptide-conjugated biodegradable nanoparticles as a carrier to target paclitaxel to tumor neovasculature[J]. Biomaterials, 2010, 31(8): 2278-2292
- [7] Pastorino F, Brignole C, Marimpietri D, et al. Vascular damage and anti-angiogenic effects of tumor vessel-targeted liposomal chemotherapy[J]. Cancer Res, 2003, 63(21): 7400-7409
- [8] Wu CP, Anna Maria Calcagno, Suresh V. Ambudkar. Reversal of ABC drug transporter-mediated multidrug resistance [J]. Curr Mol Pharmacol, 2008, 1(2): 93-105
- [9] Szaká cs G, Paterson JK, Ludwig JA, et al. Targeting multidrug resistance in cancer [J]. Nat Rev Drug Discov, 2006, 5(3): 219-234
- [10] Browder T, Butterfield CE, Kraling BM, et al. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer[J]. Cancer Res, 2000, 60(7): 1878-1886
- [11] Amino N, Ideyama Y, Yamano M, et al. YM-231146, a novel orally bioavailable inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor-2, is effective against paclitaxel resistant tumors [J]. Biol Pharm Bull, 2005, 28(11): 2096-2210
- [12] Hetian L, Ping A, Shumei S, et al. A novel peptide isolated from a phage display library inhibits tumor growth and metastasis by blocking the binding of vascular endothelial growth factor to its kinase domain receptor[J]. J Biol Chem, 2002, 277(45): 43137-43142
- [13] Joanna MK, Tyler RW, Michael TT, et al. In-vivo efficacy of novel paclitaxel nanoparticles in paclitaxel-resistant human colorectal tumors[J]. J Control Release, 2006, 112(3): 312-319
- [14] Joanna MK, Paul RL, David DA, et al. Mumper. Paclitaxel nanoparticles for the potential treatment of brain tumors [J]. J Control Release, 2004, 99(2): 259-269 (下转第 3419 页)

Higher Education Press, 2004: 523

[10] 庄志强 裴兆辉 陈景藻. 次声生物学效应的相关机制 [J]. 疾病控制杂志, 2005, 9(4): 328 -330

Zhuang Zhiqing, Pei Zhaohui, Chen Jingzao. The underlying mechanisms for infrasonic bioeffect [J]. Chin Dis Control Prev, 2005, 9(4): 328 -330

- [11] He L, Perkins GA, Poblenz AT, et al. Overexpression blocks Bax-mediated mitochondrial contact site formation and apoptosis in rod photoreceptors of lead-exposed mice [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100: 1022-1027
- [12] 侯忠赤,王健春,康劲松等. 萝摩甙抗自由基损伤作用的实验研究
 [J]. 中国病理生理杂志, 2002, 18(3): 292-294
 Hou Zhongchi, Wang Jianchun, Kang Jinsong, et al. Study on the protection of asclepiadaceae against free radical injury [J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2002, 18(3): 292-294
- [13] Nekhoroshev AS, Glinchikov VV. Morphofunctional changes in the myocardium under exposure to infrasound [J]. Noise Vib Bull, 1991, 12(1): 56-58
- [14] 裴兆辉,丁红新,陈景藻等.次声对大鼠心率与血压影响的实验观察 [J]. 军事医学科学院院刊,2005,29(3):208-210

Pei Zhaohui, Ding Hongxin, Chen Jingzao, et al. Experimental study on effects of infrasound on heart rate and blood pressure of rats [J]. Bull Acad Mil Med Sci, 2005, 29(3): 208-210

- [15] 王溯,夏俊杰. 大鼠循环系统与次声的相关性研究 [J]. 继续医学教育: 2010, 24(3): 82-84
 Wang Su, Xia Junjie. Correlation Study on circulation system of rat and infrasound [J]. Continuing Medical Education: 2010, 24 (3): 82-84
- [16] 朱妙章. 心血管生理学基础与临床 [M].第二版. 北京:高等教育出版社, 2011: 587-588

Zhu Miaozhang. Cardiovascular Physiology and Clinic [M]. The second edition. Beijing: Higher Education Press, 2011: 587-588

- [17] 海春旭. 自由基医学 [M]. 西安:第四军医大学出版社, 2006: 51
 Hai Chunxu. Free Radical Medicine [M]. Xi'an: Fourth Military Medical University Press, 2006: 51
- [18] 朱妙章. 心血管生理学基础与临床 [M].第二版. 北京:高等教育出版社, 2011: 298

Zhu Miaozhang. Cardiovascular Physiology and Clinic [M]. the second edition. Beijing: Higher Education Press, 2011: 298

(上接第 3424 页)

- [15] Vredenburg MR, Ojima I, Veith J, et al. Effects of orally active taxanes on P-glycoprotein modulation and colon and breast carcinoma drug resistance[J]. J.Natl. Cancer Inst, 2001, 93(16): 1234-1245
- [16] Ma P, Dong XW, Courtney L, et al. Development of idarubicin and doxorubicin solid lipid nanoparticles to overcome Pgp-mediated multiple drug resistance in leukemia [J]. J Biomed Nanotechnol, 2009, 5 (2): 151-161
- [17] S J Ahn, Y H Jeon, Y J Lee, et al. Enhanced anti-tumor effects of combined MDR1 RNA interference and human sodium/iodide symporter (NIS) radioiodine gene therapy using an adenoviral system in a

colon cancer model[J]. Cancer Gene Ther, 2010, 17(7): 492-500

- [18] M.R. Vredenburg, I. Ojima, J. Veith, et al. Effects of orally active taxanes on P-glycoprotein modulation and colon and breast carcinoma drug resistance[J]. J. Natl. Cancer Inst, 2001, 93(16): 1234-1245
- [19] Gian Carlo Alghisi, Lionel Ponsonnet, and Curzio Rü egg. The integrin antagonist cilengitide activates $\alpha V\beta 3$, sisrupts VE-Cadherin localization at cell junctions and enhances permeability in endothelial cells[J]. PLoS ONE, 2009, 4(2): e4449
- [20] Huang Y, Chen X-Mei,Zhao BX, et al. Antiangiogenic activity of sterically stabilized liposomes containing paclitaxel (SSL-PTX): in vitro and in vivo[J]. AAPS PharmSciTech, 2010, 11(2): 752-759