

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.01.003

具有 pH 响应及细胞核靶向功能的胶束的体内抗肿瘤活性的研究 *

敬雨亭^{1,2} 熊翔² 明阳² 杨光² 赵静雅^{2Δ} 周绍兵^{1,2Δ}

(1 西南交通大学 生命科学与工程学院 四川 成都 610031; 2 西南交通大学 材料科学与工程学院 四川 成都 610031)

摘要 目的: 研究具有 pH 响应性及细胞核靶向功能的, 由细胞穿透肽 Tat 修饰的聚乙二醇-聚己内酯共聚物胶束 (PECL/DA-Tat-M) 的体内抗肿瘤活性。**方法:** 用溶剂挥发法制备了胶束, 通过透射电镜 (TEM) 观察胶束形貌和大小。考察在不同 pH 条件下胶束的药物释放行为。在 Balb/c 雌性小鼠的乳腺脂肪垫注射鼠源 4T1 乳腺癌细胞, 建立小鼠乳腺癌原位模型, 通过尾静脉向荷瘤小鼠注射具有 pH 响应及细胞核靶向功能的载药胶束。记录 18 天治疗期内肿瘤的体积、小鼠体重以及存活率的变化情况, 并进行肿瘤组织的免疫组化研究。**结果:** TEM 结果显示 PECL/DA-Tat-M 胶束呈球形结构, 粒径在 80 nm 左右。在 72 小时内, 胶束在 pH 5.0 条件释放 80 % 的药物, 而在 pH 7.4 条件下仅释放 11 % 的药物。PECL/DA-Tat-M 胶束组小鼠的肿瘤生长最缓慢, 在治疗第 18 天, 非靶向胶束 (PECL-M) 组肿瘤体积为 0.82 cm³, PECL/DA-Tat-M 组的肿瘤体积仅有 0.51 cm³。生理盐水 (Saline) 组和空白胶束 (PECL/DA-Tat-blank M) 组的小鼠的肿瘤生长较为迅速, 体积分别是 PECL/DA-Tat-M 胶束组肿瘤体积的 4.43 倍和 3.76 倍, 差异具有统计学意义 (P<0.05 或 P<0.01); 各组小鼠经过治疗后体重均呈现出上升趋势; 治疗期后第 42 天, PECL/DA-Tat-M 胶束组和非靶向胶束 (PECL-M) 组小鼠的存活率分别为 60 % 和 40 %, 其他组的小鼠均在 39 天内全部死亡 (n=5); 肿瘤组织免疫组化分析结果表明 PECL/DA-Tat-M 载药胶束能有效抑制肿瘤生长, 其抑瘤率 (IR)、及肿瘤细胞凋亡率 (AR) 明显高于其他组, 差异具有统计学意义 (P<0.05)。**结论:** 具有 pH 响应及细胞核靶向功能的胶束 (PECL/DA-Tat-M) 具有良好的体内抗乳腺癌活性。

关键词: 胶束; 细胞核靶向; pH 响应; 原位乳腺癌; 体内抗肿瘤**中图分类号:** R-33; R737.9; R730.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2018)01-12-06Study on the *in vivo* Antitumor Efficacy of the pH Responsive and Nuclear Targeting Micelles*JING Yu-ting^{1,2}, XIONG Xiang², MING Yang², YANG Guang², ZHAO Jing-ya^{2Δ}, ZHOU Shao-bing^{1,2Δ}

(1 School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu, Sichuan, 610031, China;

2 School of Materials Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu, Sichuan, 610031, China)

ABSTRACT Objective: To study the *in vivo* antitumor efficacy of the pH responsive and nuclear targeting micelles (PECL/DA-Tat-M), which was assembled by Tat and DA modified PEG-PCL copolymer. **Methods:** The micelle was prepared by using the solvent evaporation method. The morphology and the size were observed via transmission electron microscope (TEM). And the drug release behavior under different pH condition was detected through high performance liquid chromatography (HPLC). The orthotopic 4T1 mouse breast tumor model was established by injecting the 4T1 tumor cells on the right mammary gland of female Balb/c mice. The drug loaded micelles PECL/DA-Tat-M were injected into the mice via tail vein. The tumor volumes, body weight and the survival rate of the mice were recorded in the 18-day treatment period, and the immunohistochemically analysis of the tumor tissue was also performed. **Results:** The results of TEM analysis revealed the spherical morphology of the micelles, the size of which was about 80 nm. The micelle released 80 % of the drug at pH 5.0 in 72 h, while only 11 % of the drug was released at pH 7.4 in 72 h. The tumor of the PECL/DA-Tat-M group grew slowly. 18 days after the first treatment, the tumor volume of the non-targeting micelle (PECL-M) group was 0.82 cm³, while that of the PECL/DA-Tat-M group was only 0.51 cm³. The tumor of the saline group and the blank micelle (PECL/DA-Tat-blank M) group grew quickly, The tumor volume was 4.43 folds and 3.76 folds much larger than that of the PECL/DA-Tat M group, respectively, the difference was statistically significant (P<0.05 or P<0.01). The mice body weight of all the groups exhibited an increasing tendency. 42 days after the first treatment, the survival rates of the PECL/DA-Tat-M group and the non-targeting micelle group were 60 % and 40 %, respectively. The mice of other groups all died before the 39th day after the first treatment (n=5). The results of the tumor immunohistochemical analysis indicated the PECL/DA-Tat-M could inhibit the tumor effectively, both the tumor inhibition rate and apoptotic rate of which were much higher than that of other groups, the difference was statistically sig-

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (51373138; 21574105; 51603172)

作者简介: 敬雨亭 (1991-), 硕士研究生, 主要研究方向: 药物控制释放, E-mail: 780309268@qq.com

Δ 通讯作者: 赵静雅 (1987-), 讲师, 主要研究方向: 药物控制释放, E-mail: jyzhao@home.swjtu.edu.cn;

周绍兵 (1972-), 博士生导师, 教授, 主要研究方向: 生物材料, E-mail: shaobingzhou@home.swjtu.edu.cn

(收稿日期: 2017-04-23 接受日期: 2017-05-17)

nificant ($P < 0.05$). **Conclusions:** The pH responsive and nuclear targeting micelle (PECL/DA-Tat-M) exhibits good in vivo antitumor efficacy.

Key words: Micelle; Nuclear targeting; pH Responsive; Orthotopic breast cancer; In vivo antitumor

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R737.9; R730.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)01-12-06

前言

靶向药物传递系统(TDDS)是提高药物治疗效果和减小其副作用的重要手段,尤其是在癌症的治疗中取得了突破性的进展,在过去的50年内,纳米颗粒的设计和制备受到了广泛的关注^[1,2]。胶束作为纳米颗粒的一种,由两亲性聚合物在水中自组装形成,有良好的“核-壳”结构,能将许多疏水性抗癌药物包载入其内核,如阿霉素(DOX)、喜树碱(CPT)、羟基喜树碱(HCPT)等,且粒径在10~100 nm的胶束可以通过被动靶向到达肿瘤部位,对于癌症的靶向治疗具有明显优势^[3,4]。具有刺激响应性和细胞核靶向的胶束,可以实现多级的肿瘤靶向效果,增加胶束在肿瘤组织的富集量并同时实现细胞核药物传递。由于不同组织的pH值不同,在大多数实体瘤的细胞外pH值在6.5-7.2之间,胞内内涵体/溶酶体pH在4.5~6.5之间,均低于正常组织的pH值(pH 7.4)^[5],pH响应性传递系统是众多刺激响应性传递系统中应用最为广泛的^[6,7]。HIV-1的反式转录激活因子(Tat)具有细胞核靶向作用^[8-12],Tat带正电,在体循环中易与正常组织发生非特异性吸附,所以常常在Tat上修饰一些小分子,使其在体循环中具有负电荷,避免与正常组织发生吸附,同时又能响应肿瘤微环境,实现Tat的完全暴露,发挥穿透细胞膜的作用^[13]。Jin等人将Tat修饰在聚合物胶束表面^[14],设计了一种能响应肿瘤弱酸性环境,实现细胞对该胶束的大量内吞和细胞核的药物传递。然而,许多具有pH响应及细胞核靶向功能的胶束缺乏体内抗肿瘤活性的研究,限制了其进入临床应用。因此,我们制备了一种具有pH响应及细胞核靶向功能的胶束(PECL/DA-Tat-M),并考察了其体内抗肿瘤活性。这种胶束表面由细胞穿透肽Tat和小分子2,3-二甲基马来酸酐(DA)修饰。有文献报道,DA和氨基连接形成的酰胺键有灵敏的pH响应性,在弱酸性环境下(pH 6.8)该酰胺键会断裂,DA发生脱落^[15]。当胶束到达肿瘤部位时,DA响应肿瘤组织的弱酸性(pH 6.8)环境而脱落,胶束表面电荷由负变正,促进肿瘤细胞对其的摄取,进入细胞后在Tat的作用下进一步实现细胞核的靶向传递。传统使用的啮齿动物模型,例如小鼠异位肿瘤模型,是通过在皮下注射肿瘤细胞建立的,这种非原位的肿瘤在其发展过程中存在着基因的改变,并不能反映临床上的自发性原位肿瘤的真实情况^[16]。为此,我们建立了小鼠乳腺癌原位模型对该载药胶束进行了体内抗肿瘤活性的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

四氢呋喃(THF)购买于成都科龙化工试剂厂;鼠源乳腺癌细胞4T1由西南交通大学生命科学与工程学院提供;SPF级雌性Balb/c小鼠,5~6周龄,体重 20 ± 2 g,购买于四川大学动物实验中心;游标卡尺及分析天平购买于杭州贝特工具有限公

司;HCPT购买于成都兰贝生物科技有限公司;胶束材料DA-Tat-PEG-PCL以及甲氧基改性的HCPT(mPEG-HCPT)由本实验室合成;载mPEG-HCPT的胶束冻干粉末及空白胶束冻干粉末由本实验室制备。

1.2 方法

1.2.1 胶束的制备 制备方法参照文献^[17],通过溶剂挥发法制备胶束。称取DA-Tat-PECL 10 mg,溶于5 mL四氢呋喃(THF)中,另取10 mL去离子水于50 mL烧杯中,置于磁力搅拌器上搅拌,用注射器将DA-Tat-PECL的THF溶液逐滴加入到去离子水中,继续搅拌直至THF完全挥发,得到空白胶束的水溶液,冷冻干燥后得空白胶束的冻干粉末。载药胶束的制备方法与上述制备空白胶束方法相同,区别在于,取一定量的mPEG-HCPT和胶束材料共同溶于THF后,再使用注射器滴加到水中。待THF完全挥发后,将剩余溶液冷冻干燥,得到载药胶束的冻干粉末。

1.2.2 胶束的形貌表征 透射电镜(TEM)样品制备方法:在碳膜铜网的正面滴一滴胶束溶液,一分钟后,用滤纸沿铜网边缘吸走多余液体,再滴加2 wt%的磷钨酸溶液于铜网上进行染色1分钟,然后用滤纸沿铜网边缘吸走多余液体,待铜网自然干燥后可用于透射电镜的拍摄。

1.2.3 模拟体内药物释放行为 载药胶束PECL/DA-Tat-M的体外释放通过高效液相色谱(HPLC)检测。取一定量透析后的载药胶束于分子截留量1000的透析袋中,封好透析袋两端,置于装有pH 7.4或pH 5.0缓冲液的离心管中,将离心管放在孵箱中震荡,温度保持在37℃。从0.5小时到72小时内,在设定的时间点取出1 mL分散介质,并向离心管中加入1 mL新的分散介质。实验结束后,根据建立的HCPT的标准曲线,用HPLC检测每个时间点取出的分散介质中mPEG-HCPT的浓度。测试条件:色谱柱,(100-5C18, 4.6 mm×250 mm, 5 micron);流动相,水溶液:乙腈溶液(70:30, v/v);流速,0.8 mL/min;检测波长,255 nm;25℃^[18]。

1.2.4 建立动物肿瘤模型 对于原位模型的建立,我们将培养好的4T1细胞用胰酶消化并收集,重悬于PBS中,在小鼠右侧第二个乳腺脂肪垫下注射 10×10^5 个4T1细胞^[19]。继续饲养一周后,待肿瘤体积约为25 mm³,可开始给药治疗。用游标卡尺测量肿瘤的长径和短径。

1.2.5 小鼠体重、肿瘤体积及存活率的测定 将建有4T1乳腺癌原位肿瘤模型的小鼠随机分为6组,在第0,3,6,9天时,每组通过尾静脉分别注射生理盐水(Saline),非载药空白靶向胶束(PECL/DA-Tat-blank M),HCPT,mPEG-HCPT,载mPEG-HCPT的非靶向胶束(PECL-M),载mPEG-HCPT的靶向胶束(PECL/DA-Tat-M),HCPT浓度均为5 mg HCPT equiv./kg,进行每隔3天一次,为期18天的治疗。

$$\text{肿瘤抑制率(\%)} = \frac{\text{生理盐水组肿瘤体积} - \text{样品组肿瘤体积}}{\text{生理盐水组肿瘤体积}}$$

× 100%

1.2.6 组织学分析 治疗第 18 天时,处死部分小鼠,用于苏木精-伊红(H&E)染色和原位末端转移酶标记技术(TUNEL)染色,其它小鼠继续饲养,记录 42 天内每三天小鼠的存活率。组织切片染色由成都里来生物科技有限公司制作。具体方法:处死小鼠并取出肿瘤组织,10%福尔马林固定 24 h,石蜡包埋,去石蜡化后切片,用苏木精和伊红(H&E)染色。对于 TUNEL 染色,去石蜡和无水处理的肿瘤组织在室温下与蛋白酶 K 孵育 20 分钟,用生理盐水冲洗三次后用 TUNEL 试剂盒染色处理,棕色代表凋亡细胞,蓝色代表正常细胞。

$$\text{细胞凋亡率(\%)} = \frac{\text{凋亡细胞数量}}{\text{凋亡细胞数量} + \text{正常细胞数量}} \times 100\%$$

1.3 统计学分析

采用 SPSS 软件进行统计分析,所有数据均以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,通过单因素方差分析比较数据之间的显著性差异,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ 。

2 结果

2.1 胶束的形貌以及药物释放行为

我们用溶剂挥发法成功制备了 PECL/DA-Tat-M 胶束。如图 1(A)所示,通过透射电镜(TEM)观察,胶束呈现出均匀球形结构,粒径在 80 nm 左右。通过模拟体内环境进行药物释放行为的考察,结果显示,在正常生理条件下(pH 7.4),胶束在 72 小时内仅能释放 11 % 的药物,而在模拟肿瘤细胞内环境(pH 5.0)条件下同样时间内能释放 80 % 的药物,表明该胶束能在肿瘤细胞内大量释放药物,而在体循环内药物释放量很少,可以避免对正常组织造成损害(图 1(B))。

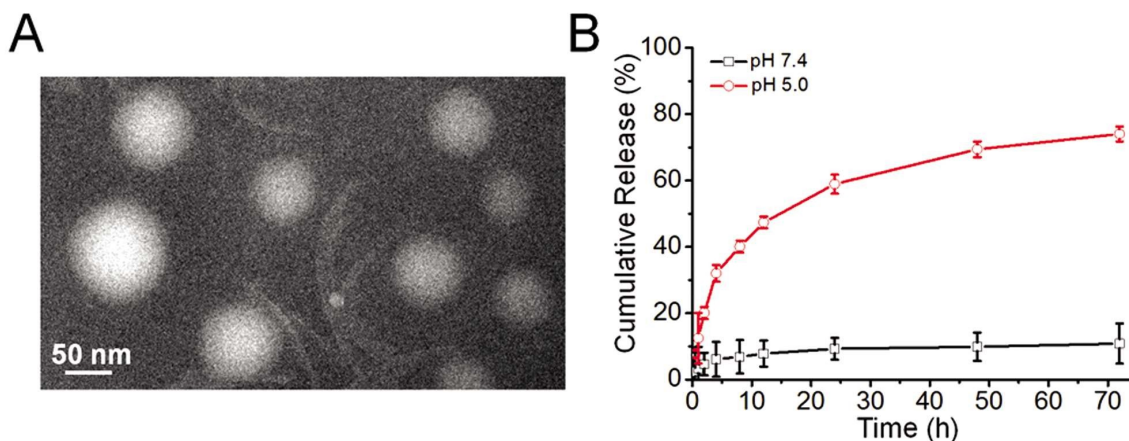


图 1 胶束的表征。(A)透射电镜观察胶束的形貌大小;(B)胶束的体内模拟释药曲线

Fig. 1 Characterization of the micelles. (A) Size and morphology of the micelles observed via transmission electron microscopy (TEM); (B) quantitative drug release profile of the micelles simulated the in vivo condition

2.2 小鼠体重、肿瘤体积以及存活期内的变化情况

我们用小鼠乳腺癌原位肿瘤模型进行了体内抗肿瘤效果的评价。在第 0, 3, 6, 9 天通过尾静脉注射各种 HCPT 制剂对荷瘤小鼠给药,进行为期 18 天的治疗,每隔三天对小鼠体重称重,测量肿瘤体积大小。由图 2 可知,胶束组的小鼠肿瘤体积较 HCPT 组和 mPEG-HCPT 组小,肿瘤生长缓慢,尤其是 PECL/DA-Tat-M 胶束明显的抑制了肿瘤的生长,在治疗第 18 天,PECL-M 组的肿瘤体积为 0.82 cm³,而 PECL/DA-Tat-M 组的肿瘤体积仅有 0.51 cm³。相比之下,生理盐水组(Saline)和空白胶束组(PECL/DA-Tat-blank M)的小鼠的肿瘤生长较为迅速,体积达到了 2.26 cm³ 和 1.92 cm³,分别是 PECL/DA-Tat-M 胶束组的 4.43 倍和 3.76 倍。此外,裸药 HCPT 对肿瘤也起到了一定的抑制作用,肿瘤体积为 1.32 cm³,是 PECL/DA-Tat-M 胶束的 2.59 倍(图 3)。

如图 4 所示,各组小鼠在治疗过程中体重均呈现上升趋势,说明 HCPT 的系统毒性比一些常用抗癌药物要小,例如阿霉素^[20,21]。同时,胶束组的小鼠存活率明显提高了,在治疗后第 42 天时,PECL/DA-Tat-M 组内仍然有小鼠存活,且存活率为 60 %,是 PECL-M 组的 1.5 倍,而其他组的小鼠在治疗第 39 天

内已全部死亡(图 5)。

2.3 组织学分析

为了进一步研究胶束对于肿瘤的治疗效果,我们对肿瘤进行了组织学分析。在治疗期的第 18 天,处死小鼠,我们对肿瘤组织进行 H&E 染色和 TUNEL 染色。我们可以从 H&E 染色图片看出,生理盐水组以及空白胶束组的肿瘤组织致密,细胞核完整(图 6)。裸药 HCPT 组和 mPEG-HCPT 组有一定的肿瘤抑制效果,而胶束组对于肿瘤的抑制最为明显,尤其是 PECL/DA-Tat-M 组,该组的肿瘤组织出现较多空泡,且有明显的细胞核缺失(红圈)及细胞核固缩(红色箭头)现象发生。TUNEL 染色图片结果显示(图 6),PECL/DA-Tat-M 胶束组内的内大部分细胞肿瘤呈现出棕色,表明肿瘤细胞发生凋亡。通过计算,PECL/DA-Tat-M 治疗 4T1 原位肿瘤的抑瘤率(IR)和凋亡率(AR)分别为 87.40 %± 3.88 %和 90.47 %± 4.38 %,明显高于 PECL-M 组 IR (63.78 %± 1.89 %)和 AR(65.18 %± 1.62 %) (表 1)。

3 讨论

Tat 肽是一类应用最为广泛的细胞穿透肽。Tat 上富含的精

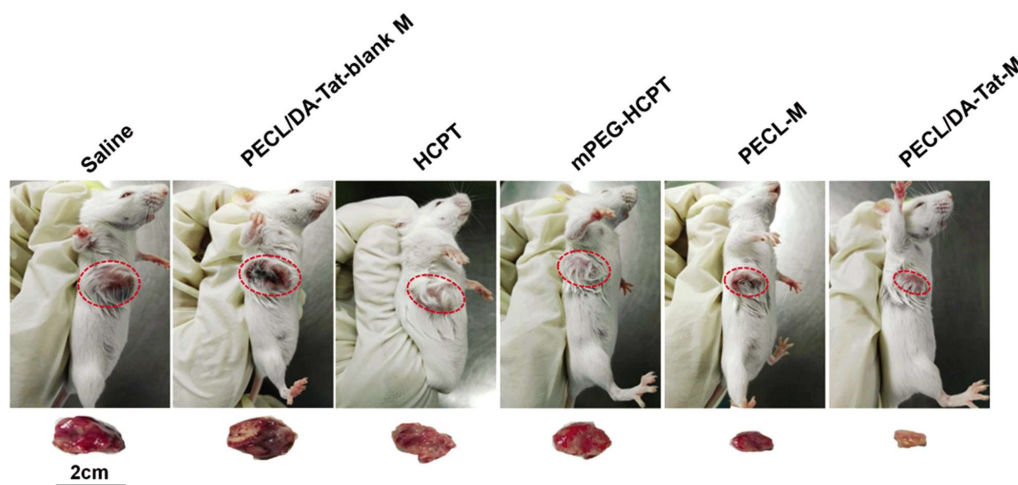


图2 在治疗期第18天6组乳腺癌原位模型小鼠的照片

Fig. 2 Photos of the orthotopic model of six groups on the 18th day in the treatment period

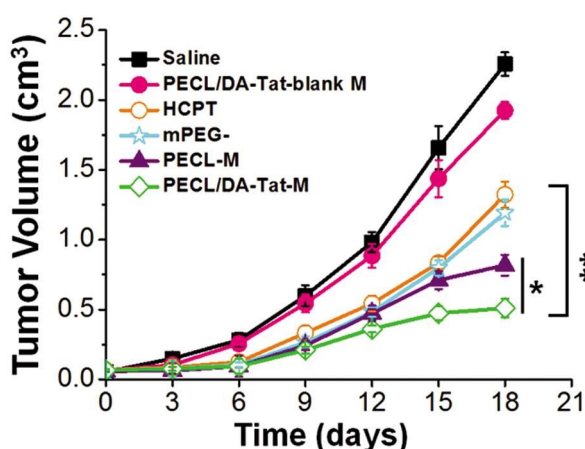


图3 治疗期内小鼠肿瘤体积的变化情况

Fig. 3 The change of the tumor volume in the treatment period

Note: Compared with the PECL-M group, $P < 0.05$; compared with the HCPT group, $P < 0.01$.

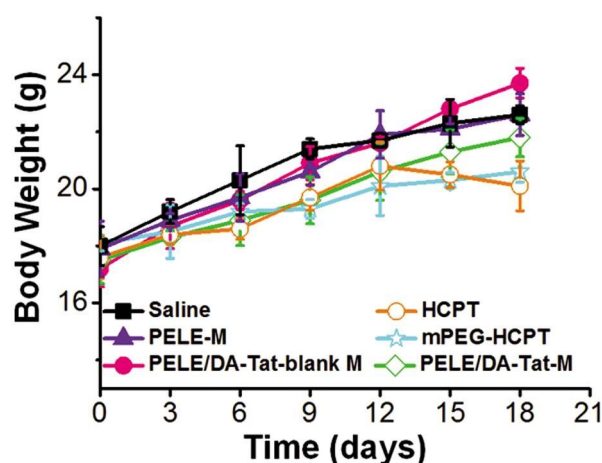


图4 治疗期内小鼠体重的变化情况

Fig. 4 The change of the body weight in the treatment period

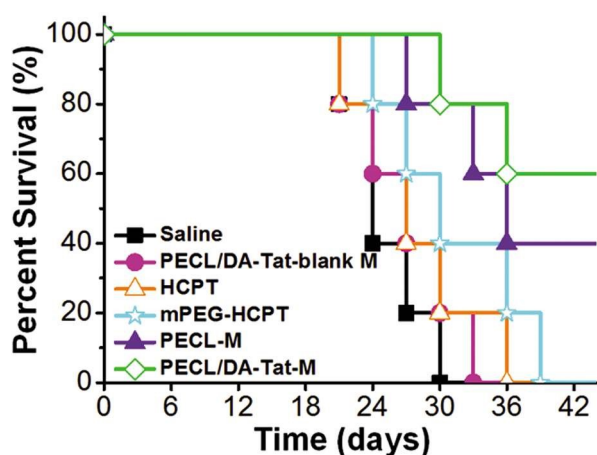


图5 42天内小鼠存活率的变化

Fig. 5 The change of the survival rate of the mice in 42 days

氨酸和胍基使它能快速穿过细胞膜^[7,8],此外,Tat 还是一种细胞核定位信号(NLS),可以有效的促进细胞核的药物传递^[9,10]。传统的主动靶向胶束是在胶束表面修饰一种或几种靶向基团,这些靶向基团会与肿瘤细胞膜上过表达的受体结合,从而增加肿瘤细胞与胶束的亲合力,促进细胞对胶束的内吞作用^[22-27]。然

而,不同的肿瘤细胞表面表达不同的受体,有的受体甚至是低水平表达,因此,仅仅修饰一类靶向分子的纳米颗粒不能有效抑制不同种类的癌症。如果在纳米颗粒表面修饰多种靶向基团,也将使工作量大大增加,甚至由于纳米颗粒表面基团之间的空间构象相互阻碍,而无法实现有效接枝,最后事倍功半。Tat 的引入恰好克服了上述限制^[28]。Tat 的优点甚多,以至于有很多研究都利用 Tat 作为靶向分子连接在纳米颗粒表面。然而,Tat 几乎对所有细胞都具备良好的穿透性,且带正电性的 Tat 易与体内带负电的正常组织发生非特异性吸附^[13,29]。为避免 Tat 与正常组织相互作用,使胶束具有较长的体循环时间,只在肿瘤部位发生作用,通常可以使纳米颗粒具有刺激响应性,而 pH 响应性在肿瘤的靶向治疗中应用最广泛。不同组织的 pH 值不同,在大多数实体瘤的细胞外 pH 在 6.5~7.2 之间,胞内内溶体/溶酶体 pH 在 4.5~6.5 之间,均低于正常组织的 pH 值(pH 7.4)^[6]。在设计使用 Tat 修饰纳米颗粒时,常常需要在 Tat 上连接一些小分子如 DA 来屏蔽 Tat 的正电荷,使纳米颗粒在体循环中带负电荷,避免与正常组织发生非特异性吸附,同时又能响应肿瘤弱酸性微环境,实现 Tat 的完全暴露,促进肿瘤细胞对纳米颗粒的摄取。

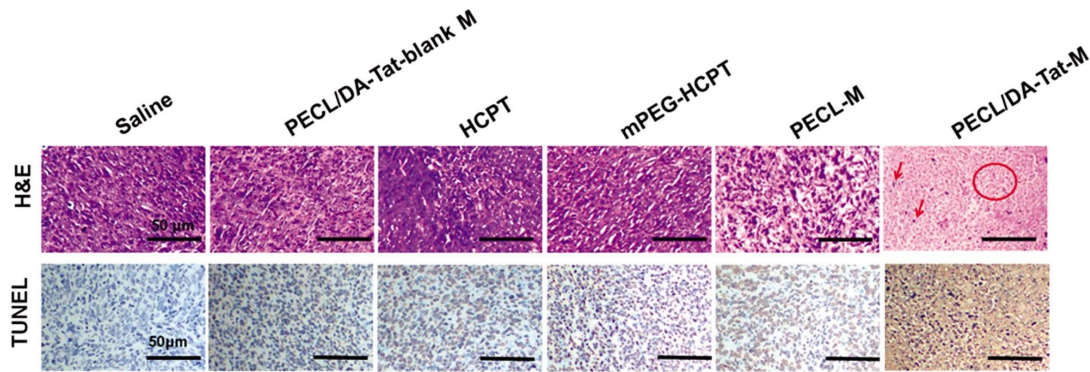


图 6 治疗期第 18 天 6 组小鼠肿瘤组织的 H&E 染色和 TUNEL 染色结果(红圈:细胞核缺失;红色箭头:细胞核固缩)

Fig. 6 The H&E staining and TUNEL staining results of the six groups on the 18th day in the treatment period (red circle: lack of cell nucleus; red arrow: nuclear condensation)

表 1 六组制剂对原位模型小鼠肿瘤组织的抑瘤率和死亡率

Table 1 Tumor inhibition rate and apoptotic rate of the orthotopic tumor model treated with the six formulations

Groups	Inhibition Rate (%)	Apoptosis Rate (%)
Saline	—	1.89± 2.36
PECL/DA-Tat-blank M	—	2.26± 1.07
HCPT	41.52± 1.78	46.53± 1.99
mPEG-HCPT	50.17± 2.01	54.31± 2.27
PECL-M	63.78± 1.89	65.18± 1.62
PECL/DA-Tat-M	87.40± 3.88*	90.47± 4.38*

Note: Compared with the PECL-M group, $P < 0.05$.

我们运用溶剂挥发法成功制备了 PECL/DA-Tat-M 胶束, 该胶束呈均匀球形结构, 且粒径为 80 nm 左右, 有研究表明, 粒径在 10 nm 至 100 nm 范围内的纳米颗粒能利用 EPR 效应富集在肿瘤组织^[3,17], 表明 PECL/DA-Tat-M 胶束具有良好的被动靶向优势。在药物释放实验中, 我们模拟了体内正常生理环境 (pH 7.4) 和肿瘤细胞内环境 (pH 5.0), 在酸性条件下, 胶束能在短时间内大量释放药物, 而相同时间内在正常生理条件下, 胶束释放的药物量很少, 这可能是由于胶束具有 pH 响应性, 在 pH 5.0 时胶束表面的 DA 响应了酸性环境, 从胶束表面脱落, 使 Tat 恢复正电性, 因此, 胶束的亲水链段之间相互排斥, 使胶束的结构受到一定影响, 致密性减弱, 促进内部的药物释放出来^[30]。

运用小鼠乳腺癌原位模型考察具有 pH 响应及细胞核靶向功能胶束 (PECL/DA-Tat-M) 的体内抗肿瘤活性我们发现, PECL/DA-Tat-M 载药胶束对 4T1 乳腺癌原位肿瘤有明显的抗肿瘤效果, 肿瘤体积增长缓慢, 抑瘤率较高, 这可能是由于 PECL/DA-Tat-M 胶束具有多级靶向功能。当胶束被动靶向到肿瘤部位, DA 响应肿瘤的弱酸性微环境, 促进肿瘤细胞大量摄取该胶束; 胶束进入细胞后, Tat 发挥了细胞核靶向功能, 实现了对细胞核的药物传递, 有效的抑制了癌细胞的生长繁殖, 导致肿瘤体积增加较慢。生理盐水组和空白胶束组的肿瘤体积十分迅速, 这表明空白胶束是不具有抗肿瘤活性的, 而是胶束包载的抗癌药物发挥抗肿瘤效果, 这也体现了作为药物载体, 这种具有 pH 响应及细胞核靶向功能的胶束在体内有良好的生物相容性。裸药 HCPT 组和 mPEG-HCPT 组小鼠的肿瘤生长也在一定程度上受到了抑制, 但肿瘤体积仍然比胶束组大, 说明单独使用化疗药物的抗肿瘤效果比使用载药胶束的效果差, 因

为药物很有可能在未到达肿瘤部位就被清除了, 能到达肿瘤部位的药量十分有限, 故抑瘤效果较差。各组小鼠的体重在治疗期内呈现出上升趋势, 是由于 HCPT 对于小鼠的系统毒性相对较小。PECL/DA-Tat-M 胶束延长了实验小鼠的寿命, 这表明该胶束有效的抑制肿瘤增殖, 小鼠的生存状态得到改善。生理盐水组和空白胶束组的小鼠分别在治疗后第 30 天和第 34 天前全部死亡, 说明如果不对肿瘤进行治疗, 实验动物在短时期内死亡率非常高。单独使用化疗药物的 HCPT 组和 mPEG-HCPT 组的小鼠分别在第 36 天和第 39 天前全部死亡, 表明单独使用裸药进行化疗只能在短时期内延长荷瘤小鼠的寿命, 并不能达到满意的治疗效果。而使用载药胶束进行治疗, 特别是 PECL/DA-Tat-M 胶束, 在治疗后第 42 天仍有 60 % 的小鼠存活, 且肿瘤的生长缓慢。该胶束就像 " 纳米胶囊 ", 把抗癌药物包载并携带到病灶部位发挥药效, 这样就避免了化疗药物在未到达肿瘤部位就被代谢或清除, 同时减少了单独使用化疗药物的系统毒性。

肿瘤部位的 H&E 染色结果显示, 生理盐水组和空白胶束组的肿瘤组织结构致密, 细胞形态和细胞核都正常, 没有出现组织空泡, 说明肿瘤生长迅速; 裸药 HCPT 组和 mPEG-HCPT 组的肿瘤组织内细胞密集度降低, 出现了细胞核缺失现象, 表明裸药能对肿瘤部位有一定的抑制作用; 胶束组的肿瘤组织都出现了明显的细胞核缺失现象, 说明胶束对肿瘤的抑制作用明显, 在 PECL/DA-Tat-M 组的切片中, 细胞核大量缺失, 且有较多的组织空泡, 有的细胞核固缩, 由于肿瘤细胞缺乏细胞核难以增殖, 所以肿瘤的生长受到了有效抑制^[31-34]。

TUNEL 染色结果显示, 生理盐水组和空白胶束组的肿瘤组织内, 肿瘤细胞保持良好的活性, 在切片上显示蓝色。当给予裸药 HCPT 或 mPEG-HCPT 治疗时, 有一部分肿瘤细胞凋亡, 在切片上显示棕色, 裸药对肿瘤组织有一定的抑制作用。而载药胶束使肿瘤凋亡最明显, 尤其是 PECL/DA-Tat-M 胶束组的切片上几乎难以找到蓝色的活性细胞, 大部分细胞都是凋亡的棕色细胞, 说明该载药胶束能够有效的使肿瘤细胞发生凋亡, 从而抑制肿瘤的生长。这可能是由于 PECL/DA-Tat-M 胶束被肿瘤细胞摄取后, 在 Tat 作用下靶向到细胞核, 然后 mPEG-HCPT 进入细胞核, 抑制拓扑异构酶 I, 使肿瘤细胞大量凋亡^[35]。

以上结果均表明, PECL/DA-Tat-M 胶束具有较强的体内抗肿瘤活性, 在肿瘤的靶向治疗领域有很好的应用前景。然而, 要使 PECL/DA-Tat-M 胶束能在临床上得到实际应用, 我们还将进一步考察其在体内的药代学行为、抗肿瘤机理等, 同时还要进一步降低该胶束的制备成本以便提高其应用的可行性。综上所述, 这种具有 pH 响应及细胞核靶向的胶束 (PECL/DA-Tat-M) 在肿瘤的靶向治疗领域有很高的临床意义和研究价值。

参考文献(References)

- [1] Riehemann K, Schneider S W, Luger T A, et al. Nanomedicine-challenge and perspectives[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2009, 48(5): 872-897
- [2] Muthu MS, Singh S. Targeted nanomedicines: effective treatment modalities for cancer[J]. *AIDS and brain disorders*[J]. *Nanomedicine*, 2009, 4(1): 105-118
- [3] Maeda H, Wu J, Sawa T, et al. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review [J]. *Journal of controlled release*, 2000, 65(1): 271-284
- [4] Han K, Lei Q, Wang SB, et al. Dual stage light guided tumor inhibition by mitochondria targeted photodynamic therapy [J]. *Advanced Functional Materials*, 2015, 25(20): 2961-2971
- [5] Ge Z, Liu S. Functional block copolymer assemblies responsive to tumor and intracellular microenvironments for site specific drug delivery and enhanced imaging performance [J]. *Chemical Society Reviews*, 2013, 42(17): 7289-7325
- [6] Vives E, Brodin P, Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(25): 16010-16017
- [7] Wender PA, Galliher WC, Goun EA, et al. The design of guanidinium-rich transporters and their internalization mechanisms [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, 60(4): 452-472
- [8] Nitin N, LaConte L, Rhee WJ, et al. Tat peptide is capable of importing large nanoparticles across nuclear membrane in digitonin permeabilized cells [J]. *Annals of Biomedical Engineering*, 2009, 37(10): 2018-2027
- [9] Pan Z, Wang H, Zhang M, et al. Nuclear-targeting TAT-PEG-Asp8-doxorubicin polymeric nanoassembly to overcome drug-resistant colon cancer[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2016
- [10] Cardarelli F, Serresi M, Bizzarri R, et al. In vivo study of HIV-1 Tat arginine-rich motif unveils its transport properties[J]. *Molecular Therapy*, 2007, 15(7): 1313-1322
- [11] Kim K, Kim J H, Park H, et al. Tumor-homing multifunctional nanoparticles for cancer theragnosis: simultaneous diagnosis, drug delivery, and therapeutic monitoring [J]. *Journal of Controlled Release*, 2010, 146(2): 219-227
- [12] Yuan YY, Mao CQ, Du XJ, et al. Surface charge switchable nanoparticles based on zwitterionic polymer for enhanced drug delivery to tumor[J]. *Advanced Materials*, 2012, 24(40): 5476-5480
- [13] Yamamoto Y, Nagasaki Y, Kato Y, et al. Long-circulating poly (ethylene glycol)-poly (D, L-lactide) block copolymer micelles with modulated surface charge [J]. *Journal of Controlled Release*, 2001, 77(1): 27-38
- [14] Jin E, Zhang B, Sun X, et al. Acid-active cell-penetrating peptides for in vivo tumor-targeted drug delivery [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(2): 933-940
- [15] Du JZ, Du XJ, Mao CQ, et al. Tailor-made dual pH-sensitive polymer-doxorubicin nanoparticles for efficient anticancer drug delivery [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133 (44): 17560-17563
- [16] Liu H, Patel MR, Prescher JA, et al. Cancer stem cells from human breast tumors are involved in spontaneous metastases in orthotopic mouse models [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107(42): 18115-18120
- [17] Guo X, Shi CL, Wang J, et al. pH-triggered intracellular release from actively targeting polymer micelles [J]. *Biomaterials*, 2013, 34: 4544-4554
- [18] Hong M, Zhu S, Jiang Y, et al. Novel anti-tumor strategy: PEG-hydroxycamptothecin conjugate loaded transferrin-PEG-nanoparticle[J]. *Journal of Controlled Release*, 2010, 141(1): 22-29
- [19] Shen JN, Sun HP, Xu PF, et al. Simultaneous inhibition of metastasis and growth of breast cancer by co-delivery of twist shRNA and paclitaxel using pluronic P85-PEI/TPGS complex nanoparticles[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(12): 1581-1590
- [20] Li D, Tang Z, Gao Y, et al. A bio-inspired rod shaped nanoplatform for strongly infecting tumor cells and enhancing the delivery efficiency of anticancer drugs [J]. *Advanced Functional Materials*, 2016, 26(1): 66-79
- [21] Qu Q, Wang Y, Zhang L, et al. A nanoplatform with precise control over release of cargo for enhanced cancer therapy[J]. *Small*, 2016, 10 (12): 1378-1390
- [22] Gump JM, Dowdy SF. TAT transduction: the molecular mechanism and therapeutic prospects[J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2007, 13 (10): 443-448
- [23] Ross JF, Chaudhuri PK, Ratnam M. Differential regulation of folate receptor isoforms in normal and malignant tissues in vivo and in established cell lines. Physiologic and clinical implications [J]. *Cancer*, 1994, 73(9): 2432-2443
- [24] Bueno R, Appasani K, Mercer H, et al. The α folate receptor is highly activated in malignant pleural mesothelioma [J]. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 2001, 121(2): 225-233
- [25] Platt VM, Szoka Jr FC. Anticancer therapeutics: targeting macromolecules and nanocarriers to hyaluronan or CD44, a hyaluronan receptor[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2008, 5(4): 474
- [26] Journo-Gershfeld G, Kapp D, Shamay Y, et al. Hyaluronan oligomers-HPMA copolymer conjugates for targeting paclitaxel to CD44-overexpressing ovarian carcinoma [J]. *Pharmaceutical Research*, 2012, 29(4): 1121-1133
- [27] Choi KY, Chung H, Min KH, et al. Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles for active tumor targeting[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(1): 106-114
- [28] Lin J, Alexander-Katz A. Cell membranes open "doors" for cationic nanoparticles/biomolecules: insights into uptake kinetics [J]. *ACS Nano*, 2013, 7(12): 10799-10808
- [29] Kondo E, Saito K, Tashiro Y, et al. Tumour lineage-homing cell-penetrating peptides as anticancer molecular delivery systems [J]. *Nature Communications*, 2012, 3: 951

- [10] Bessueille L, Magne D. Inflammation: a culprit for vascular calcification in atherosclerosis and diabetes[J]. Cellular & Molecular Life Sciences, 2015, 72(13): 2475-2489
- [11] Legein B, Temmerman L, Biessen EA, et al. Inflammation and immune system interactions in atherosclerosis [J]. Cellular & Molecular Life Sciences, 2013, 70(20): 3847-3869
- [12] Wernersson S, Pejler G. Mast cell secretory granules: armed for battle [J]. Nature Reviews Immunology, 2014, 14(7): 478-494
- [13] 林艳, 徐其渊, 项美香. 血清 IgE 水平对于不同类型冠心病的意义 [J]. 中国现代医生, 2012, 50(17): 39-42
Lin Yan, Xu Qi-yuan, Xiang Mei-xiang. The significance of serum IgE levels for different types of coronary atherosclerotic heart diseases [J]. China modern doctor, 2012, 50(17): 39-42
- [14] Kritikou E, Kuiper J, Kovanen PT, et al. Role of IgE antibodies and mast cells in atherosclerosis [J]. European Journal of Pharmacology, 2016, 778: 103-115
- [15] Wang J, Cheng X, Xiang MX, et al. IgE stimulates human and mouse arterial cell apoptosis and cytokine expression and promotes atherogenesis in Apoe^{-/-} mice [J]. Journal of Clinical Investigation, 2011, 121(9): 3564-3577
- [16] Moon TC, Befus AD, Kulka M. Mast cell mediators: their differential release and the secretory pathways involved[J]. Frontiers in Immunology, 2014, 5: 569
- [17] Lee-Rueckert M, Kovanen PT. The mast cell as a pluripotent HDL-modifying effector in atherogenesis: from in vitro to in vivo significance[J]. Current Opinion in Lipidology, 2015, 26(5): 362-368
- [18] Conti P, Shaik-Dasthagirisae Y. Atherosclerosis: a chronic inflammatory disease mediated by mast cells [J]. Central-European Journal of Immunology, 2015, 40(3): 380-386
- [19] Sinkiewicz W, B?azejewski J, Bujak R, et al. Immunoglobulin E in patients with ischemic heart disease [J]. Cardiology Journal, 2008, 15(2): 122-128
- [20] Criqui MH, Seibles J, Hamburger RN, et al. Epidemiology of immunoglobulin E levels in a defined population [J]. Annals of Allergy, 1990, 64: 308-313
- [21] Criqui MH, Lee ER, Hamburger RN, et al. IgE and cardiovascular disease[J]. The American Journal of Medicine, 1987, 82: 964-968
- [22] Kupreishvili K, Fuijkschot WW, Vonk AB, et al. Mast cells are increased in the media of coronary lesions in patients with myocardial infarction and may favor atherosclerotic plaque instability[J]. Journal of Cardiology, 2017, 69(3): 548-554
- [23] Sinkiewicz W, B?azejewski J, Bujak R, et al. Immunoglobulin E in patients with ischemic heart disease [J]. Cardiology Journal, 2008, 15(2): 122-128
- (上接第 17 页)
- [30] Guo X, Shi C, Yang G, et al. Dual-responsive polymer micelles for target-cell-specific anticancer drug delivery [J]. Chemistry of Materials, 2014, 26(15): 4405-4418
- [31] Dong Y, Yang J, Liu H, et al. Site-specific drug-releasing polypeptide nanocarriers based on dual-pH response for enhanced therapeutic efficacy against drug-resistant tumors[J]. Theranostics, 2015, 5(8): 890
- [32] Crayton SH, Tsourkas A. pH titratable superparamagnetic iron oxide for improved nanoparticle accumulation in acidic tumor microenvironments[J]. ACS Nano, 2011, 5(12): 9592
- [33] Weissleder R, Kelly K, Sun E Y, et al. Cell-specific targeting of nanoparticles by multivalent attachment of small molecules[J]. Nature Biotechnology, 2005, 23(11): 1418-1423
- [34] Platt VM, Szoka Jr FC. Anticancer therapeutics: targeting macromolecules and nanocarriers to hyaluronan or CD44, a hyaluronan receptor[J]. Molecular Pharmaceutics, 2008, 5(4): 474
- [35] Gallo RC, Whang-Peng J, Adamson RH. Studies on the antitumor activity, mechanism of action, and cell cycle effects of camptothecin[J]. Journal of the National Cancer Institute, 1971, 46(4): 789-795