

肿瘤发病机制与治疗

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000048

转铁蛋白修饰共载紫杉醇和金雀异黄素脂质体抑制卵巢癌株和荷瘤裸鼠肿瘤的生长

胡琢瑛, 唐良芮, 楼 梦, 李克花

(重庆医科大学附属第一医院妇产科, 重庆 400016)

【摘要】目的:制备转铁蛋白修饰共载紫杉醇(paclitaxel, PTX)和金雀异黄素(genistein, Gen)脂质体(liposome, LP), 并对其 A2780 细胞及对荷瘤裸鼠的治疗效果进行初步评价。**方法:**采用薄膜分散法制备普通载药 LP, 后采用插入法制备转铁蛋白修饰载药 LP。考察 LP 的粒径, 电位以及包封率; 通过细胞摄取实验考察卵巢癌细胞对普通 LP 和转铁蛋白修饰脂质体(transferrin conjugated liposome, TFLP)的摄取效率。MTT 实验考察不同 LP 对耐药卵巢癌细胞的细胞毒性; 构建卵巢癌细胞肿瘤球模型, 考察不同 LP 对肿瘤球的穿透能力以及不同载药 LP 对肿瘤球的生长抑制能力。构建卵巢癌裸鼠异位模型, 考察不同载药 LP 对肿瘤生长抑制效果。**结果:**TFLP-PTX/Gen 的粒径在 (115.0 ± 9.5) nm, 电位为 (-4.00 ± 2.15) mV, PTX 与 Gen 的包封率分别为 83.4% 和 79.6%。细胞摄取实验结果显示, A2780 细胞对 TFLP 的摄取效率是 LP 的 2.8 倍; MTT 实验表明 TFLP-PTX/Gen 对耐药卵巢癌细胞的毒性显著强于 TFLP-PTX、TFLP-Gen 和 LP-PTX/Gen; 肿瘤球抑制实验和荷瘤裸鼠肿瘤生长抑制实验结果都表明 TFLP-PTX/Gen 具有良好的抗肿瘤效果。**结论:**转铁蛋白修饰共载 PTX 和 Gen LP 具有良好的卵巢癌细胞靶向性和抗卵巢癌作用, 是一种潜在的卵巢癌靶向给药系统。

【关键词】转铁蛋白; 紫杉醇; 金雀异黄素; 脂质体**【中图分类号】**R737.31**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-09-03

作者介绍: 胡琢瑛, Email: huzhuoying@sina.com,

研究方向: 妇科肿瘤。

基金项目: 重庆市卫生局医学科研项目 (编号: 2012-2-015)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000048.html>

鼻咽癌变重要机制之一。

MIMT1 基因, 基因号: 100073347, 定位于 19q13.43, 它是一个比较保守的与种族进化有关的基因^[9]。FAM150B 基因, 基因号: 285016, 定位于 2p25.3。目前有关此 2 基因与肿瘤关系的研究比较少, 本课题发现, 此 2 基因亦在鼻咽癌癌变后发生了明显的甲基化, 提示其低表达亦可能为鼻咽癌变重要机制之一。

通过基因芯片及荧光定量 PCR 证实, ADAM23、MIMT1、FAM150B、GRIN2A、LRRC4 5 个基因在鼻咽癌发病前后发生了明显甲基化变化, 这仅是 RNA 表达层面的研究, 今后实验宜扩大样本, 从蛋白表达层面进一步验证。

参 考 文 献

[1] 周小军, 陈江华, 王士贞, 等. 鼻咽上皮细胞癌变与 DNA 甲基化特征的相关性研究[J]. 中国中西医结合耳鼻喉科杂志, 2013, 21(1): 22-26.

[2] Esteller M, Corn PG, Baylin SB, et al. A gene hypermethylation profile of human cancer[J]. Cancer Res, 2001, 61: 3225-3229.

[3] 胡春燕, 周建华, 邓征浩, 等. ADAM23、 $\alpha v \beta 3$ 在非小细胞肺癌中的表达及临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2010, 26(4): 433-437.

[4] Calmon MF, Colombo J, Carvalho F, et al. Methylation profile of genes CDKN2A (p14 and p16), DAPK1, CDH1, and ADAM23 in head and neck cancer[J]. Cancer Genet Cytogenet, 2007, 173: 31-37.

[5] 王夫景, 张 强, 于洪亮, 等. ADAM23 基因在结直肠癌中的表达及其意义[J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16(30): 3406-3409.

[6] Wei X, Walia V, Lin JC, et al. Exome sequencing identifies GRIN2A as frequently mutated in melanoma[J]. Nat Genet, 2011, 43(5): 442-446.

[7] 武明花, 李小玲, 黄 琛, 等. LRRC4 基因在脑胶质瘤细胞系中表达缺失[J]. 中南大学学报(医学版), 2007, 32(2): 231-234.

[8] Tang H, Wang Z, Liu X, et al. LRRC4 inhibits glioma cell growth and invasion through a miR-185-dependent pathway[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2012, 12(8): 1032-1042.

[9] Kim J, Bergmann A, Choo JH, et al. Genomic organization and imprinting of the Peg3 domain in bovine[J]. Genomics, 2007, 90(1): 85-92.

(责任编辑: 关蕴良)

Transferrin modified paclitaxel and genistein co-loaded liposome for the inhibition of ovarian carcinoma cells and ovarian carcinoma bearing nude mice

Hu Zhuoying, Tang Liangdan, Lou Meng, Li Kehua

(Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To prepare transferrin conjugated paclitaxel (PTX) and genistein (Gen) loaded liposome and to evaluate their properties and effect on the treatment of ovarian carcinoma in vitro and in vivo. **Methods:** Liposomes were prepared by thin film hydration method. The particle size, Zeta potential and entrapment efficiency were evaluated. Efficiency of cellular uptake and tumor spheroids penetration on MDR A2780 cells in vitro was evaluated. Anti-proliferation efficiency of TFLP-PTX/Gen was evaluated by MTT assay. Tumor spheroids were used to evaluate anti-tumor ability of TFLP-PTX/Gen. A2780 cells was xenografted in athymic mice to establish the animal model, which were used to evaluate the effect of anti-cancer. **Results:** Particle diameter of the TFLP-PTX/Gen was (115.0 ± 9.5) nm with the Zeta potential of (-4.00 ± 2.15) mV (Entrapment efficiency of PTX and Gen were 83.4% and 79.6% respectively). Transferrin conjugated liposome (TFLP) uptaken by A2780 were 2.8 times higher than that of liposome (LP). The MTT assay, the inhabitation of tumor spheroid and the inhabitation of tumor in vivo confirmed strong inhibitory effect of TFLP-PTX/Gen. **Conclusions:** TFLP-PTX/Gen is easy to prepare and it is a potential delivery system for the treatment of ovarian carcinoma.

【Key words】transferrin; paclitaxel; genistein; liposomes

卵巢癌发病率居妇科恶性肿瘤发病率的第 3 位,然而其死亡率却居首位^[1]。晚期卵巢癌患者长期生存率仍不超过 20%^[2]。化疗是目前卵巢癌的重要治疗手段之一,但是由于一般化疗药物具有极大的毒副作用,在杀灭肿瘤细胞的同时对正常细胞也有很大的影响,导致患者对化疗的顺应性低下,因此,肿瘤的靶向治疗便显得尤为重要。

转铁蛋白受体是一种在正常细胞和肿瘤细胞表面都普遍存在的受体,但是在肿瘤细胞的表面(尤其是卵巢癌)转铁蛋白受体的表达是正常细胞的 4~5 倍^[3-5]。脂质体(liposome, LP)具有良好的生物相容性,被广泛应用于肿瘤靶向研究^[6]。金雀异黄素(genistein, Gen)是异黄酮类化合物的主要成分之一,研究表明 Gen 可抑制多种肿瘤细胞的生长且具有抗癌增敏作用^[7-8]。研究发现,Gen 体内外对卵巢癌细胞具有显著的增殖抑制和诱导凋亡作用,且 Gen 可阻断卵巢癌细胞 β -catenin 信号途径,下调 β -catenin 核表达,上调其胞膜表达^[9]。紫杉醇(paclitaxel, PTX)能够通过干扰细胞有丝分裂和分裂间期细胞功能所必需的微管网络而起抗肿瘤作用^[10]。Gen 和 PTX 能够从不同机制发挥抗卵巢癌作用。因此本研究将转铁蛋白连接到 LP 表面,以 PTX 和 Gen 为模型药物构建了卵巢癌靶向给药 LP,对其理化性质、与卵巢癌细胞的亲和力、对卵巢癌细胞和肿瘤的抑制效果进行评价。

1 资料与方法

1.1 材料与仪器

Sizer Nano ZS90 型激光粒度仪及 ZETA 电位分析仪(英国 Malvern instruments Ltd)。大豆磷脂(SPC,上海太伟药业有限公司);DSPE-PEG2000(美国 Avanti polar lipids);异硫氰黄荧光素标记的磷脂(FITC-PE,美国 sigma);DSPE-PEG2000-MAL(美国 sigma);转铁蛋白(美国 sigma);DMEM 高糖培养基(美国 GIBCO 公司);其余试剂为分析纯。人源卵巢癌细胞(A2780, ATCC);人静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)(上海细胞研究所)。

1.2 方法

1.2.1 卵巢癌 A2780 细胞与 HUVEC 的培养 将 A2780 细胞置于含有 100 mg/L 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养,培养条件为 5%CO₂, 饱和湿度,温度为 37 ℃。待细胞汇合度为 0.8~0.9 时,用 2.5 mg/L 胰酶消化传代,取对数生长期细胞进行实验。HUVEC 的培养与 A2780 细胞相同。

1.2.2 TFLP-PTX/Gen 的制备以及理化性质考察 精密称取大豆磷脂 15.05 mg,胆固醇 1.16 mg,DSPE-PEG2000 1.15 mg, PTX 0.33 mg, Gen 0.24 mg,将以上材料和药物溶于氯仿中,在茄形瓶中减压蒸馏成膜,除去有机溶剂,置于真空干燥器中过夜,使其充分干燥,加入 1 ml PBS 水化,探头超声(80 W, 10 s, 5 次)得到 LP-PTX/Gen。参照文献[11-12]用后插入法制备 TFLP-PTX/Gen。首先将转铁蛋白巯基化,再与商品化的 DSPE-PEG2000-MAL 孵育得到转铁蛋白胶束,将胶束后插入已经制备的 LP-PTX/Gen 得到 TFLP-PTX/Gen。

取适量制备得到的 LP 样品,用激光粒度仪测定其粒径和电位。采用葡萄糖凝胶柱色谱法分离 LP 与未加载的 PTX 和 Gen,将过柱后的 LP 采用甲醇破乳,用 HPLC 法在 260 nm 检

表 1 LP 的粒径、电位以及包封率 ($n=3$)Tab.1 Characteristics of liposomes: particle size, size distribution, zeta-potential and entrapment efficiency ($n=3$)

组别	粒径 (nm)	PDI	电位 (mV)	包封率 (PTX)	包封率 (Gen)
TFLP-PTX/Gen	115.0 ± 9.5	0.230 ± 0.080	-4.00 ± 2.15	83.4%	79.6%
TFLP-PTX	111.4 ± 10.3	0.150 ± 0.060	-2.70 ± 3.15	80.2%	/
TFLP-Gen	106.4 ± 8.5	0.160 ± 0.070	-3.20 ± 2.54	/	84.6%
LP-PTX/Gen	113.5 ± 8.8	0.180 ± 0.050	2.30 ± 3.87	78.6%	83.5%

注: “/”, 未计算

测 Gen 含量, 在 227 nm 检测 PTX 含量。按照 $W_{\text{包}}/W_{\text{投}} \times 100\%$ 计算包封率。 $W_{\text{包}}$: LP 中包载的药物量。 $W_{\text{投}}$: 制备 LP 的投药量。

1.2.3 A2780 细胞对荧光标记 TFLP 的摄取 按照“1.2.2”项下方法, 用 FITC-PE 取代适量大豆磷脂, 制备 FITC 标记的 LP。将对数生长期的细胞以 5×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板中, 37 °C 培养 24 h 后, 每孔加入适量不载药 LP 和 TFLP 使孔中 LP 浓度为 0.2 mg/ml, 37 °C 分别孵育 2 h 和 4 h 后除去含 LP 培养基, 冷 PBS 清洗 2 次, 0.25% 胰酶消化后离心, PBS 清洗 3 次, 流式细胞仪测定细胞荧光值。

为了定性观察细胞对 LP 的摄取情况, 将 LP 与细胞共同孵育 4 h 后, 将细胞用 PBS 漂洗 3 次, 加入 2 $\mu\text{g/ml}$ DAPI 溶液, 室温孵育 20 min, 加冰 PBS 漂洗 3 次, 加 4% 多聚甲醛固定 15 min, 弃去多聚甲醛, 置激光共聚焦显微镜观察细胞摄取情况。

1.2.4 MTT 实验考察不同载药体 LP 的细胞毒性 培养 A2780 细胞接种于 96 孔板中, 当孔板中细胞完全贴壁且处于对数生长期时加入无菌过滤后的 LP, 使每孔的最终脂质浓度为 6.5 $\mu\text{mol/ml}$ 。将孔板移入 37 °C CO_2 孵箱中培养 24 h 和 48 h 后取出, 每孔加入 20 μl 5 mg/ml MTT 溶液, 再放回孵箱中继续孵育 4 h, 将孔板中液体倒出, 每孔加入 200 μl DMSO, 37 °C 避光振荡 15 min, 用酶标仪在 490 nm 处测定各孔的吸光度值。不同载药 LP 对 HUVEC 的毒性评价实验同于 A2780 细胞。

1.2.5 肿瘤球的培养 取对数生长期的 A2780 细胞用 0.125% 胰酶消化后, 用含血清的培养基中和胰酶, 并将细胞吹打下来后离心, 弃去上清液用培养基重悬细胞后接种于用低熔点琼脂糖预处理的 96 孔板中, 将 96 孔板移入 37 °C CO_2 孵箱中培养。7 d 后成长为肿瘤球。

为了考察不同 LP 对肿瘤球的穿透能力, 肿瘤球生长 7 d 后, 分别加入 FITC 标记的转铁蛋白修饰脂质体 (transferrin conjugated liposome, TFLP) TFLP 和 LP, 加培养基调整 LP 的终浓度为 120 nmol/ml。37 °C 孵育 4 h 后, 将肿瘤球用 PBS 漂洗 3 次, 加 4% 多聚甲醛固定 15 min, 弃去多聚甲醛, 用冰 PBS 保存。置激光共聚焦荧光倒置显微镜观察肿瘤球摄取情况。

为了考察不同载药 LP 对肿瘤球生长的抑制效果, 肿瘤球生长 7 d 后, 加入 TFLP-PTX/Gen, TFLP-PTX, TFLP-Gen 与 LP-PTX/Gen。以生理盐水为阴性对照组, 统计肿瘤球体积大小变化情况。

1.2.6 卵巢癌异位瘤模型的构建及 TFLP-PTX/Gen 对肿瘤的生长抑制实验 A2780 细胞经胰酶消化, 离心后将其悬浮

于 DMEM 培养液中, 计数调节浓度至 5×10^7 个/ml。取 4~6 周龄, 体质量 20~25 g 的雌性裸鼠, 将准备好的 A2780 细胞悬液皮下接种于裸鼠背部, 每只裸鼠接种 0.1 ml 细胞悬液。接种后 1~2 周可见背部长出肿瘤块, 证明接种成功。

将优选后的 30 只荷瘤裸鼠随机分为 5 组, 每组 6 只, 分别为 TFLP-PTX/Gen 组、TFLP-PTX 组、TFLP-Gen 组、LP-PTX/Gen 组和生理盐水组。荷瘤裸鼠每天观察其活动度和饮食习惯, 每 2 d 给药 1 次并测量其肿瘤大小。

1.3 统计学方法

实验数据以均数 $\pm$ 标准差表示, SPSS 11.0 统计软件进行数据分析, 两组间比较用 t 检验, 多组间比较用单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 LP 的粒径、电位以及包封率

制备得到的各种 LP 的粒径均在 110 nm 左右, 多分散性指数 (polydispersity index, PDI) 小于 0.3。PTX 和 Gen 的包封率分别为 83.4% 和 79.6%。结果见表 1。

2.2 TFLP 的体外肿瘤细胞摄取实验

在 A2780 细胞表面转铁蛋白受体高度表达。细胞摄取的定量实验结果 (表 2) 显示: A2780 细胞对 TFLP 摄取效率是普通 LP 的 2.8 倍。由于测得荧光值为扣除空白后的细胞内荧光值, 因此本研究采用细胞内荧光强度表示摄取效率。

表 2 A2780 细胞对不同 LP 的摄取效率 ($n=3$)Tab.2 Uptake of different liposomes by A2780 cells ($n=3$)

组别	2 h	4 h
LP	28.00 ± 2.55	42.00 ± 3.60
TFLP	73.00 ± 6.62	117.00 ± 7.50 ^a

注: a, 二者差异具有统计学意义, $P < 0.01$

定性的激光共聚焦荧光倒置显微镜观察结果如图 1 所示, TFLP 组荧光强度显著强于普通 LP, 这与定量的实验结果相一致。

2.3 TFLP-PTX/Gen 对肿瘤细胞和正常细胞的生长抑制作用

MTT 实验结果显示, 各组载药 LP 均能显著抑制肿瘤细胞的增殖。TFLP-PTX/Gen 对肿瘤细胞的增殖抑制作用显著大于 TFLP-PTX 和 TFLP-Gen (表 3), 而经转铁蛋白修饰的 LP 对正常 HUVEC 的细胞毒性与无转铁蛋白修饰 LP 基本相同, 无统计学差异 (表 4), 细胞存活率是指给药 24 h 或者

48 h后,细胞培养板中存活的细胞数量与未给药孔板细胞数量之间的比值。

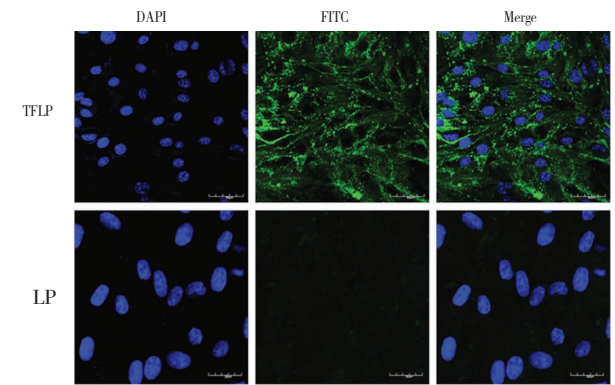


图 1 激光共聚焦观察 A2780 细胞对 FITC 标记的 LP 和 TFLP 的摄取

Fig.1 Uptake of FITC labeled LP and TFLP by A2780 cells based on confocal laser scanning microscopy

表 3 A2780 细胞在不同 LP MTT 实验中的存活率 (%,n=3)

Tab.3 A2780 cell viability at various drugs at 24 h and 48 h after the treatment (%,n=3)

组别	24 h	48 h
LP-PTX/Gen	78.00 ± 6.34	69.00 ± 3.88
TFLP-PTX	52.00 ± 4.43	40.00 ± 4.25
TFLP- Gen	63.00 ± 4.50	48.00 ± 3.25
TFLP-PTX/Gen	31.00 ± 2.20	18.00 ± 3.60 ^{ab}

注:a,与 LP-PTX/Gen 相比, $P<0.01$;b,与各单独给药组分别相比, $P<0.05$,差异具有统计学意义

表 4 HUVEC 细胞在不同 LP MTT 实验中的存活率 (%,n=3)

Tab.4 HUVEC viability at various drugs at 24 h and 48 h after the treatment (%,n=3)

组别	24 h	48 h
LP-PTX/Gen	71.00 ± 5.60	57.00 ± 4.30
TFLP-PTX	75.00 ± 4.85	62.00 ± 3.20
TFLP- Gen	85.00 ± 5.55	78.00 ± 4.10
TFLP-PTX/Gen	73.00 ± 5.25	55.00 ± 3.60 ^a

注:a,各组与 LP-PTX/Gen 相比, $P>0.05$,差异无统计学意义

2.4 TFLP 的肿瘤球穿透能力考察以及 TFLP-PTX/Gen 对肿瘤球生长抑制作用

构建 A2780 细胞肿瘤球模型考察不同 LP 对肿瘤球实体的穿透能力。结果表明,FITC 标记的 LP 与肿瘤球共孵育 4 h 后,TFLP 组的荧光强度强于 LP。结果见图 2。

LP 对肿瘤球的抑制实验结果显示,TFLP-PTX/Gen、TFLP-PTX、TFLP-Gen 和 LP-PTX/Gen 均能抑制肿瘤球的生长。给药 7 d 后,生理盐水组肿瘤球持续生长,体积增大 1.38 倍,各载药 LP 组肿瘤体积出现了不同程度的减小,LP-PTX/Gen、TFLP-Gen、TFLP-PTX 和 TFLP-PTX/Gen 分别使肿瘤体积减小到原体积的 76%、79%、61% 和 34%(表 5)。

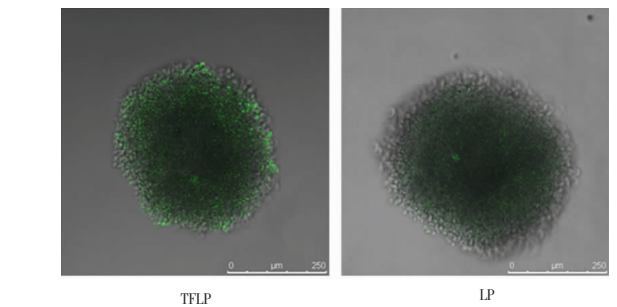


图 2 FITC 标记 LP 对 A2780 肿瘤球的穿透实验

Fig.2 Uptake of FITC labeled liposomes by A2780 tumor spheroids

表 5 给药 7 d 后肿瘤球体积变化 (n=3)

Tab.5 Changes in ratio of tumor spheroid at 7 d after the treatment (n=3)

组别	3 d	5 d	7 d
生理盐水	1.17 ± 0.08	1.32 ± 0.11	1.38 ± 0.09
LP-PTX/Gen	0.93 ± 0.04	0.83 ± 0.03	0.76 ± 0.04 ^a
TFLP-Gen	0.95 ± 0.04	0.86 ± 0.05	0.79 ± 0.02 ^a
TFLP-PTX	0.80 ± 0.03	0.69 ± 0.04	0.61 ± 0.02 ^{ab}
TFLP-PTX/Gen	0.77 ± 0.02	0.58 ± 0.03	0.34 ± 0.04 ^{ab}

注:a,与生理盐水组相比, $P<0.01$,差异具有统计学意义;b,与各单独给药组相比, $P<0.05$,差异具有统计学意义

2.5 TFLP-PTX/Gen 对荷瘤裸鼠肿瘤的抑制作用

对荷瘤裸鼠每 2 d 给药 1 次,记录裸鼠肿瘤体积的大小,与初始肿瘤体积的比值计算相对肿瘤大小。荷瘤裸鼠的治疗实验结果显示,对裸鼠肿瘤生长的抑制能力 TFLP-PTX/Gen>TFLP-PTX>TFLP-Gen>LP-PTX/Gen。结果见表 6。肿瘤体积比是指以给药后不同时间测得肿瘤的体积大小与给药前肿瘤体积的比值,体积比能够更有效的反应出给药前后肿瘤体积的变化。

表 6 各给药组对荷瘤裸鼠肿瘤生长的抑制效果 (n=6)

Tab.6 Inhibition of tumor growth in each group after the treatment with different liposomes (n=6)

组别	生理盐水组	LP-PTX/Gen	TFLP-Gen	TFLP-PTX	TFLP-PTX/Gen
2 d	1	1	1	1	1
4 d	1.10 ± 0.02	1.08 ± 0.02	1.07 ± 0.03	1.03 ± 0.02	1.02 ± 0.01
6 d	1.21 ± 0.02	1.17 ± 0.03	1.15 ± 0.02 ^a	1.06 ± 0.04 ^a	1.05 ± 0.06 ^a
8 d	1.30 ± 0.01	1.24 ± 0.04 ^a	1.17 ± 0.05 ^a	1.11 ± 0.04 ^a	1.07 ± 0.06 ^a
10 d	1.51 ± 0.03	1.33 ± 0.06 ^a	1.26 ± 0.03 ^a	1.22 ± 0.04 ^a	1.09 ± 0.06 ^a
12 d	1.75 ± 0.04	1.44 ± 0.08 ^a	1.37 ± 0.04 ^a	1.31 ± 0.09 ^a	1.11 ± 0.08 ^{ab}
14 d	1.95 ± 0.06	1.51 ± 0.10 ^a	1.46 ± 0.06 ^a	1.36 ± 0.07 ^a	1.13 ± 0.05 ^{ab}
16 d	2.15 ± 0.08	1.62 ± 0.04 ^a	1.55 ± 0.07 ^a	1.41 ± 0.06 ^{ab}	1.15 ± 0.06 ^{ab}
18 d	2.40 ± 0.07	1.74 ± 0.07 ^a	1.65 ± 0.09 ^a	1.47 ± 0.09 ^{ab}	1.18 ± 0.08 ^a
20 d	2.60 ± 0.06	1.85 ± 0.08 ^a	1.76 ± 0.10 ^a	1.52 ± 0.08 ^{ab}	1.20 ± 0.09 ^{ab}

注:a,与生理盐水组相比,差异具有统计学意义, $P<0.01$;b,与各单独给药组相比,差异具有统计学意义, $P<0.05$

3 讨 论

在卵巢癌的综合治疗中化疗占据着重要的地位,PTX 作为卵巢癌化疗的最常用的药物之一,具有较好的疗效,然而其细胞毒性和多重耐药性导致对卵巢癌的治疗效果有限,PTX 可以联合其他抗肿瘤药物以增强其疗效,提高患者生存率。

本研究将 Gen 和 PTX 共载于转铁蛋白修饰的 LP 中,首先通过肿瘤组织的高通透性和滞留效应被动靶向到达肿瘤组织,再依靠卵巢癌细胞表面特异表达的转铁蛋白受体介导进入肿瘤细胞,释放出 PTX 和 Gen,发挥抗肿瘤作用。

在细胞摄取实验中,与普通 LP 相比,经转铁蛋白修饰后的 LP 被肿瘤细胞摄取量是普通 LP 的 2.8 倍,这是由肿瘤细胞表面的转铁蛋白受体介导的细胞内吞作用介导入胞。MTT 实验考查了不同的载药 LP 对卵巢癌细胞的增殖抑制作用,结果显示,TFLP-PTX/Gen 对 A2780 细胞的抑制效率显著高于其他组。TFLP-PTX/Gen 对肿瘤细胞的抑制能力强于 LP-PTX/Gen,这与摄取实验的结果相一致。本研究还考察了不同 LP 对正常 HUVEC 的细胞毒性,结果显示经过转铁蛋白修饰的 LP 与普通 LP 对 HUVEC 细胞毒性相同,这是由于 HUVEC 作为正常组织,表面很少转铁蛋白受体表达,LP 经过转铁蛋白修饰后并不能增强其细胞对其摄取能力和 LP 的毒性。这显示出转铁蛋白修饰后的 LP 具有卵巢癌肿瘤细胞选择性。在某些实体肿瘤组织中,由于肿瘤组织致密生长,肿瘤内部压力高且血管少,因此给药系统很难进入肿瘤组织深部^[13]。本研究构建了体外卵巢癌肿瘤球模型用于评价 TFLP-PTX/Gen 对实体肿瘤的穿透效率以及抑制肿瘤生长的能力。结果显示,与 TFLP 共孵育后的肿瘤球荧光强度显著强于与普通 LP 共孵育的肿瘤球。说明经过转铁蛋白修饰后,LP 的肿瘤组织深层穿透能力得到增强。肿瘤球抑制实验结果与体外细胞增殖抑制实验结果相一致。另外,本研究还构建了卵巢癌裸鼠异位瘤模型考察不同载药 LP 对肿瘤生长抑制能力,得到与体外研究相一致的结果,TFLP-PTX/Gen 对肿瘤的生长抑制作用显著强于其他组。综上所述,TFLP-PTX/Gen 能够发挥 PTX 和 Gen 的协同作用抑制肿瘤的生长,有效抑制 A2780 细胞的增殖和荷瘤裸鼠肿瘤

的生长,TFLP 的摄取机制和 PTX 与 Gen 联合抗肿瘤机制目前正在研究中。

参 考 文 献

- [1] Despierre E, Lambrechts D, Neven P, et al. The molecular genetic basis of ovarian cancer and its roadmap towards a better treatment[J]. *Gynecol Oncol*, 2010, 117(2): 358–365.
- [2] Shahzad MK, Shin Y H. Biological significance of HORMA domain containing protein 1 (HORMAD1) in epithelial ovarian carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2013, 330(2): 123–129.
- [3] Calzolari A, Oliviero I, Deaglio S, et al. Transferrin receptor 2 is frequently expressed in human cancer cell lines[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2007, 39(1): 82–91.
- [4] Chang J, Jallouli Y, Kroubi M, et al. Characterization of endocytosis of transferrin-coated PLGA nanoparticles by the blood-brain barrier[J]. *Int J Pharm*, 2009, 379(2): 285–292.
- [5] Qian ZM, Li H, Sun H, et al. Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway[J]. *Pharmacol. Rev*, 2002, 54(4): 561–587.
- [6] Qin Y, Chen H, Yuan W, et al. Liposome formulated with TAT-modified cholesterol for enhancing the brain delivery[J]. *Int J Pharm*, 2011, 419(1–2): 85–95.
- [7] Scott EN, Gescher AJ, Steward WP, et al. Development of dietary phytochemical chemopreventive agents: biomarkers and choice of dose for early clinical trials[J]. *Cancer Prev Res (Phila Pa)*, 2009, 2(6): 525–530.
- [8] Zhang B, Shi ZL, Liu B, et al. Enhanced anticancer effect of gemcitabine by genistein in osteosarcoma: the role of Akt and nuclear factor- κ B[J]. *Anticancer Drugs*, 2010, 21(3): 288–296.
- [9] Iwai S, Yonekawa A, Harada C, et al. Involvement of the Wnt- β -catenin pathway in invasion and migration of oral squamous carcinoma cells[J]. *Int J Oncol*, 2010, 37(5): 1095–1103.
- [10] Suzuki R, Takizawa T, Kuwata Y, et al. Effective anti-tumor activity of oxaliplatin encapsulated in transferrin-PEG-liposome[J]. *Int J Pharm*, 2008, 346(1–2): 143–150.
- [11] Singh M, Hawtrey A, Ariatti M. Lipoplexes with biotinylated transferrin accessories: novel, targeted, serum-tolerant gene carriers[J]. *Int J Pharm*, 2006, 321(1): 124–137.
- [12] Sakaguchi N, Kojima C, Harada A, et al. Enhancement of transfection activity of lipoplexes by complexation with transferrin-bearing fusogenic polymer-modified liposomes[J]. *Int J Pharm*, 2006, 325(1–2): 186–190.
- [13] Jiang X, Xin H, Gu J, et al. Solid tumor penetration by integrin-mediated pegylated dodecyl (trimethylene-carbonate) nanoparticles loaded with paclitaxel[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(6): 1739–1746.

(责任编辑: 关蕴良)