

多烯紫杉醇纳米粒的制备、表征及其抗肿瘤作用研究

赵爽^{1,2}, 季宇彬¹, 王向涛², 郭一飞^{2*} (1.哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心, 哈尔滨 150076; 2.中国医学科学院&北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193)

摘要: 目的 制备多烯紫杉醇(docetaxel, DTX)纳米粒, 并进行体内外抗肿瘤研究。方法 采用反溶剂沉淀联合高压均质法制备 DTX-G2 纳米粒; 采用动态光散射法、扫描电镜考察粒径和形态, 并对其体外释放、膜毒性、体外抗肿瘤活性进行研究; 建立 4T1 荷瘤小鼠模型, 以紫杉醇注射液为对照组, 10 mg·kg⁻¹ iv 给药, 考察体内抗肿瘤作用。结果 制备的 DTX-G2 纳米粒粒径为(356.8±6.709)nm, PDI 值为(0.147±0.02), Zeta 电位为(-14.4±0.07)mV, 载药量为(62.3±1.9)%。扫描电镜观察纳米粒为片状。DTX-G2 纳米粒体外缓释释放, 在 192 h 累积释放率达到 80.4%; 无溶血现象, 可采用静脉注射给药; MTT 结果显示 DTX-G2 纳米粒对 4T1 细胞的毒性强于 DTX 溶液(IC₅₀, 2.374 μg·mL⁻¹ vs 5.664 μg·mL⁻¹, P<0.05); 4T1 细胞摄取结果显示 DTX-G2 纳米粒的摄取量显著高于 DTX 溶液(20.46 vs 11.01, P<0.05); 体内研究中 DTX-G2 纳米粒对 4T1 荷瘤小鼠的抑瘤率显著高于紫杉醇注射液组(75.7% vs 52.4%, P<0.05)。结论 制备的 DTX-G2 纳米粒载药量高、稳定性好, 显著提高了 DTX 的抗肿瘤效果, 有望作为一种新型的药物输送系统应用到 DTX 的临床治疗中。

关键词: 多烯紫杉醇; 纳米粒; 4T1 细胞; 药效学

中图分类号: R943; R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2018)02-0153-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.02.001

引用本文: 赵爽, 季宇彬, 王向涛, 等. 多烯紫杉醇纳米粒的制备、表征及其抗肿瘤作用研究[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(2): 153-158.

Study on Preparation, Characterization, and Anti-tumor Activities of Docetaxel Nanoparticles

ZHAO Shuang^{1,2}, JI Yubin¹, WANG Xiangtao², GUO Yifei^{2*} (1.Life Sciences and Environmental Sciences Center, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China; 2.Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare docetaxel(DTX) nanoparticles and study its anti-tumor activities *in vitro* and *in vivo*. **METHODS** The DTX-G2 nanoparticles were prepared via the method of anti-solvent precipitation combined high-pressure homogenization. Dynamic light scattering method was used to measure the particle size and scanning electron microscopy was used to observe the morphology. Drug release *in vitro*, the membrane toxicity and the cytotoxicity were studied. Anti-tumor effect *in vivo* was investigated on 4T1-bearing mice using Paclitaxel injections as the control at the dose of 10 mg·kg⁻¹. **RESULTS** The particle size of DTX-G2 nanoparticles was (356.8±6.709)nm with polydisperse index of 0.147±0.02 and a Zeta potential of (-14.4±0.07)mV, the drug loading capacity was (62.3±1.9)%. The nanoparticles exhibited schistose morphology in SEM. The accumulative release achieved 80.4% in 192 h. DTX nanoparticles presented no hemolytic activity, could be utilized *via iv* administration. MTT assay displayed that DTX-G2 nanoparticles had stronger cytotoxicity against 4T1 cells than solution (IC₅₀, 2.374 μg·mL⁻¹ vs 5.664 μg·mL⁻¹, P<0.05), the uptake ratio of nanoparticles was enhanced significantly(20.46 vs 11.01, P<0.05). The anti-tumor efficacy of DTX was promoted *in vivo* comparing with Paclitaxel injections (75.7% vs 52.4%, P<0.05). **CONCLUSION** The DTX-G2 nanoparticles present high drug-loading content, good stability, higher cellular uptake ability, and enhance anti-tumor efficacy which is expected to be a new drug delivery system in clinical trials of DTX.

KEY WORDS: docetaxel; nanoparticles; 4T1 cell; pharmacodynamics

多烯紫杉醇(docetaxel, DTX)是新一代紫杉烷类的广谱抗肿瘤药物, 结构见图 1a。临床上, DTX 已被广泛应用于乳腺癌、卵巢癌、非小细胞肺癌

和头颈部肿瘤的治疗, 单独及联合用药均有显著疗效^[1-4]。但是作为一种典型的难溶性抗肿瘤药物, DTX 溶解度低、稳定性差、口服吸收效果差、生

基金项目: 国家自然科学基金(U1401223)

作者简介: 赵爽, 女, 硕士 Tel: (010)57833264 E-mail: yzys946@163.com

(010)57833266 E-mail: ffguo@163.com

*通信作者: 郭一飞, 女, 博士, 副研究员 Tel:

物利用度低、肿瘤选择性差、不良反应大^[5], 这些是长期以来其制剂研究中亟待解决的问题。纳米粒的粒径在 10~1 000 nm 之间, 具有粒径小、载药量高、改善药物溶解度、增加药物稳定性、控制药物释放、提高生物利用度以及良好的肿瘤靶向性、较长的体内循环时间、易被肿瘤细胞摄取、降低不良反应等特点^[6-9], 近年来成为肿瘤治疗的热门研究领域。聚合物 G2 为亲水性的二代三乙二醇树枝化基元寡聚乙二醇[oligo(ethylene glycol), OEG], 形状类似于扇形, 结构见图 1b。本研究尝试以聚合物 G2 为载体制备高载药量的 DTX-G2 纳米粒, 并对其表征及体内外抗肿瘤作用的研究, 以期在解决 DTX 难溶的基础上, 为难溶性抗肿瘤药物找到一种新型的扇形的亲水性载体。

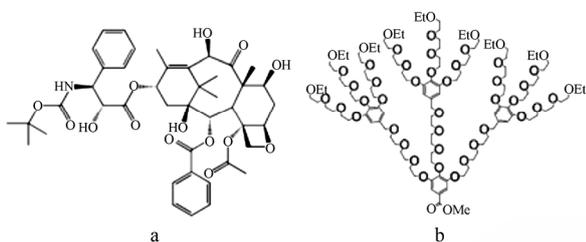


图 1 多烯紫杉醇(a)及聚合物 G2(b)的分子结构
Fig. 1 Molecular structure of DTX (a) and polymer G2 (b)

1 仪器与材料

Purelab Classic 综合纯水仪(英国 ELGA 公司); AL204 电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; 90-3 恒温双向磁力搅拌器(上海振荣科学仪器有限公司); KQ3200DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); JN-3000 PLUS 高压均质机(广州聚能生物科技有限公司); Zetasizer Nano ZS 型粒度仪/电位仪(英国 Malvern Instruments 公司); Ultimate 3000 高效液相色谱仪(美国 Dionex 公司); SHA-B 水浴恒温振荡器(金坛国旺实验仪器厂); LGL-10B 冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂有限公司); MCA-15AC 细胞培养箱(日本 Sanyo 公司); S-4800 场发射扫描电子显微镜(日本 Hitachi 公司); UQuant 酶标仪(美国 Biotek 仪器公司)。

DTX(北京耦合生物科技有限公司); 聚合物 G2(Mr=2 500, 实验室合成); *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF, 北京化工厂); 十二烷基硫酸钠(SDS, 国家集团化学试剂有限公司); 1640 培养基、PBS 缓冲液(美国 Hyclone 公司); 胎牛血清、青链霉素双抗、0.25%胰酶(美国 Gibco 公司); 0.9%氯化钠注射液、5%葡萄糖注射液(山东华鲁制药有限公司);

紫杉醇注射液(PTX, 北京协和药厂); 乙腈和甲醇为色谱纯, 其余为分析纯。

Balb/c 小鼠 24 只, ♂, 体质量(20±2)g, 实验动物合格证号: SCXK(京)2016-0011, 购自北京斯贝福实验动物有限公司; 4T1 乳腺癌细胞(北京协和医学院基础所细胞中心)。

2 方法

2.1 DTX-G2 纳米粒的制备

采用反溶剂沉淀联合高压均质法制备 DTX-G2 纳米粒。将 10 mg DTX 及 2.5 mg 聚合物 G2(药载比为 4:1)共同溶解于 0.4 mL DMF 中, 在一定温度下缓慢滴注入 5 mL 双纯水中, 然后用双纯水透析 3 h 除去 DMF, 最后均质数次, 得到 DTX-G2 纳米粒溶液。以粒径为指标, 通过单因素考察对制备过程中的滴注方式、滴注温度、均质次数进行筛选。

2.1.1 不同滴注方式的考察 在滴注温度为 25 °C、均质次数为 5 次的条件下, 分别采用搅拌滴注和超声滴注制备 DTX-G2 纳米粒, 用马尔文粒度仪测定纳米粒的粒径和电位, 记录测定结果。

2.1.2 不同滴注温度的考察 在滴注方式为超声滴注、均质次数为 5 次的条件下, 分别设定滴注温度为 4, 25, 32 °C 制备 DTX-G2 纳米粒, 用马尔文粒度仪测定纳米粒的粒径和电位, 记录测定结果。

2.1.3 不同均质次数的考察 在滴注方式为超声滴注、滴注温度为 25 °C 的条件下, 分别设定均质次数为 0, 5, 10 次制备 DTX-G2 纳米粒, 用马尔文粒度仪测定纳米粒的粒径和电位, 记录测定结果。

2.2 粒径、电位和形态的考察

2.2.1 粒径和电位 按照筛选的制备工艺制备 DTX-G2 纳米粒, 依据动态光散射(dynamic light scattering, DLS)原理, 用马尔文粒度仪测定纳米粒的粒径和电位, 平行操作 3 次, 记录测定结果。

2.2.2 扫描电镜(SEM)观察 取 DTX 原料药及 DTX-G2 纳米粒冻干粉, 用导电胶固定于铜柱, 喷金 6 min(真空、30 mA 电流), SEM 下加速电压为 30 mV 观察纳米粒的形态。

2.3 稳定性考察

2.3.1 储存稳定性 DTX-G2 纳米粒在 4 °C 条件下储存, 分别在 0, 1, 3, 7, 15 d DLS 测其粒径, 观察粒径的变化及有无沉淀或浑浊。

2.3.2 注射液中稳定性 DTX-G2 纳米粒与 1.8% 氯化钠溶液、10%葡萄糖溶液按照 1:1 体积比混

合, 37 °C 孵育, 分别在 0, 2, 4, 6 h DLS 测其粒径, 观察粒径的变化及有无沉淀或浑浊。

2.4 载药量(drug loading capacity, DL)的测定

2.4.1 色谱条件 选用 HPLC 进行 DTX 含量测定。色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 35 : 65 的 0.1% 乙酸-乙腈体系; 检测波长为 230 nm; 流速为 0.8 mL·min⁻¹; 进样量为 20 μL; 柱温为 30 °C。

2.4.2 标准曲线 用甲醇配制质量浓度分别为 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 μg·mL⁻¹ 的 DTX 对照品溶液, HPLC 测定峰面积。以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 线性回归得 DTX 标准曲线。

2.4.3 DL 的测定 取 3 mL 制备好的 DTX-G2 纳米粒, 冻干后称重得 DTX 和 G2 的总质量 W_1 , 再用 3 mL 甲醇复溶并稀释到检测范围内, HPLC 测定 DTX 质量浓度, 计算纳米粒中 DTX 的质量 W_2 , 平行操作 3 次。DL(%)= $W_2/W_1 \times 100\%$ 。

2.5 体外释放

将 DTX-G2 纳米粒、DTX 溶液及 DTX 粗粉混悬液稀释至 1 mg·mL⁻¹, 分别精密吸取 1 mL 装入透析袋(Mr=8 000~10 000)内, 以 50 mL 含 0.5% SDS 的 PBS(pH=7.4)为释放外液, 在 37 °C 水浴恒温振荡器内进行释放(100 r·min⁻¹), 每个样品平行 3 份。在 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 h 取样 1 mL 并补入 1 mL 释放外液, 在 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 h 取样 1 mL 并更换释放外液。将释放样品离心 10 min(10 000 r·min⁻¹), HPLC 测定药物浓度, 计算累积释放率, 绘制释放曲线。

2.6 红细胞膜毒性考察

Balb/c 小鼠眼球取血后, 5 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 红细胞沉淀用 0.9% 生理盐水吹洗数次, 直至上清澄清没有血色为止, 用 0.9% 生理盐水配成 4% 红细胞悬液。将浓度分别为 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 mg·mL⁻¹ 的 DTX-G2 纳米粒调等渗后加入等体积的 4% 红细胞悬液, 以 0.9% 生理盐水与 4% 红细胞悬液等体积混合为阴性对照, 双纯水与 4% 红细胞悬液等体积混合为阳性对照, DTX-G2 纳米粒等渗液与 0.9% 生理盐水等体积混合为空白对照, 37 °C 孵育 3~4 h, 5 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 取上清, 用酶标仪在 540 nm 处测吸光度(A)值, 计算溶血率: 溶血率(%)=(实验组 A 值-空白对照组 A 值-阴性对照 A 值)/(阳性对照 A 值-阴性对照 A 值)×100%。

2.7 体外细胞毒作用

采用 MTT 法测定 DTX-G2 纳米粒对 4T1 细胞的体外细胞毒作用。对数期的 4T1 细胞, 接种于 96 孔板(每孔 10⁴ 个), 细胞培养箱培养 24 h, DTX-G2 纳米粒、DTX 溶液及 G2 溶液用不含胎牛血清的培养基稀释成 0.01, 0.1, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 μg·mL⁻¹, 以空白培养基为对照, 每个浓度平行 6 个复孔, 每孔 150 μL, 孵育 48 h 后加入 MTT(5 mg·mL⁻¹), 每孔 20 μL, 孵育 4 h 后加入 DMSO 溶液, 每孔 200 μL, 用酶标仪在 570 nm 处测吸光度(A)值, 计算细胞抑制率及半数抑制浓度(IC₅₀ 值): 细胞抑制率(%)=(1-给药组 A 值/对照组 A 均值)×100%。

2.8 细胞摄取试验

对数期的 4T1 细胞, 接种于 12 孔板(每孔 5×10⁵ 个), 细胞培养箱培养 48 h, 分别加入用不含胎牛血清的培养基配制的蔗糖、羟丙基-CD、及细胞松弛素 D 等细胞抑制剂, 每孔 1 mL, 孵育 1 h 后, 以 DTX 溶液为对照, DTX-G2 纳米粒用不含胎牛血清的培养基稀释成 50 μg·mL⁻¹, 每孔 1 mL, 孵育 3 h, 用 PBS 冲洗 3 遍, 再用胰酶消化后离心(5 000 r·min⁻¹, 5 min)收集细胞。加入 200 μL 细胞裂解液水浴 15 min, 再加入 1 mL 乙酸乙酯静置 15 min, 离心(10 000 r·min⁻¹, 15 min)取上清后氮吹除去有机溶剂, 加入 200 μL 甲醇复溶, HPLC 测定 DTX 含量。

2.9 体内药效试验

培养 4T1 细胞, 达到所需接种数量后, 用培养基配制细胞悬液的浓度为 1×10⁷·mL⁻¹, 取 0.2 mL 在 Balb/c 小鼠右侧腋下接种, 待肿瘤生长到 100 mm³ 左右, 将肿瘤体积相对一致的小鼠随机分为 3 组(空白对照组即生理盐水组、PTX 注射液组、DTX-G2 纳米粒组), 每组 8 只, 尾静脉注射给药, 每 2 d 给药 1 次, 给药量为 10 mg·kg⁻¹, 注射体积为 0.2 mL。每日观察小鼠毛发色泽、有无脱落、活动情况、睡眠情况及有无死亡。实验结束后, 脱颈椎处死小鼠, 完整剥离腋下肿瘤组织称瘤重, 计算抑瘤率: 抑瘤率(%)=(1-治疗组平均瘤重/生理盐水组平均瘤重)×100%。

3 结果和讨论

3.1 DTX-G2 纳米粒的制备

以粒径为指标, 通过单因素试验对 DTX-G2 纳米粒制备过程中的滴注方式、滴注温度、均质次

数的考察结果见表 1。可以看出, 超声滴注粒径明显小于搅拌滴注, 因此选用超声滴注; 滴注温度对粒径的影响不大, 考虑到操作的简单性, 选择室温 25 °C 滴注; 高压均质 10 次相较于 5 次粒径变化不大, 为了节省制备时间, 选择均质 5 次制备纳米粒。

表 1 制备工艺的考察

Tab. 1 Screening of preparation techniques

项目	分组	粒径/nm	PDI	电位/mV
滴注方式	搅拌滴注	671.9±12.3	0.320	-9.95
	超声滴注	366.2±7.46	0.157	-13.9
滴注温度	4 °C	370.3±14.7	0.164	-11.9
	25 °C	366.2±7.46	0.157	-13.9
	32 °C	390.3±11.8	0.178	-12.7
均质次数	0	848.6±22.9	0.241	-11.2
	5	366.2±7.46	0.157	-13.9
	10	394.7±13.0	0.212	-13.5

综合以上因素, DTX-G2 纳米粒的制备过程如下: 将 10 mg DTX 及 2.5 mg 聚合物 G2(药载比为 4 : 1)共同溶解于 0.4 mL DMF 中, 25 °C 条件下缓慢超声滴注入 5 mL 双纯水中, 继续超声 10 min, 然后转移至透析袋(Mr=8 000~10 000)中, 用双纯水(1 L)透析 3 h 除去 DMF, 每小时换 1 次水, 最后均质 5 次, 得到 DTX-G2 纳米粒溶液。

3.2 粒径、电位和形态的考察

3.2.1 粒径和电位 按照筛选的制备工艺制备 DTX-G2 纳米粒, 用马尔文粒度仪测得 DTX-G2 纳米粒的粒径为(356.8±6.709)nm, PDI 值为(0.147±0.02), 电位为(-14.4±0.07)mV, 粒径分布见图 2, 可以看出粒径分布较为集中, 分散较为均匀。

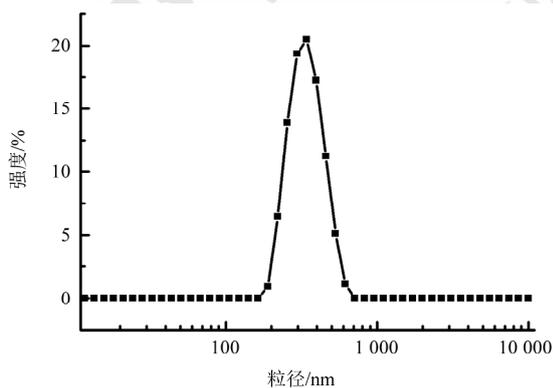


图 2 多烯紫杉醇-G2 纳米粒的粒径分布

Fig. 2 The particle size distribution of DTX-G2 nanoparticles

3.2.2 SEM 观察 DTX 原药和 DTX-G2 纳米粒的 SEM 照片见图 3。可以看出, 在 500 nm 的标尺下, DTX 原药和 DTX-G2 纳米粒均呈片状, 大小比较

均匀, 其中 DTX-G2 纳米粒的粒径在 350 nm 左右。

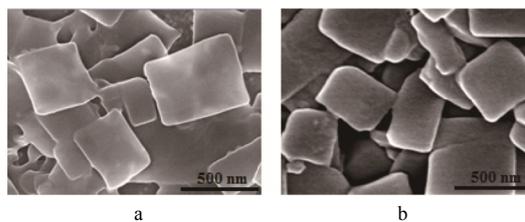


图 3 DTX 原药(a)和 DTX-G2 纳米粒(b)的 SEM 照片

Fig. 3 SEM images of DTX bulk powders (a) and DTX-G2 nanoparticles (b)

3.3 稳定性考察

3.3.1 储存稳定性 DTX-G2 纳米粒在 4 °C 条件下储存, 分别在 0, 1, 3, 7, 15 d 测其粒径, 结果见图 4。可以看出, 随放置时间的延长, DTX-G2 纳米粒的粒径有一定程度的增大, 并且放置 15 d, 粒径从(356.8±6.71)nm 变为(397.6±8.41)nm, 粒径变化幅度较小且无沉淀或浑浊现象, 说明 DTX-G2 纳米粒在 4 °C 条件下储存比较稳定。

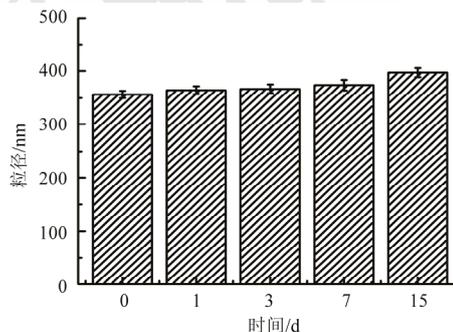


图 4 DTX-G2 纳米粒的储存稳定性(n=3)

Fig. 4 Storage stability study of DTX-G2 nanoparticles at 4 °C(n=3)

3.3.2 注射液中稳定性 DTX-G2 纳米粒在生理盐水、葡萄糖注射液中 37 °C 孵育, 分别在 0, 2, 4, 6 h 测其粒径, 结果见图 5。可以看出, 6 h 之内, DTX-G2 纳米粒的粒径均有一定程度的增大, 但粒径变化幅度较小且无沉淀或浑浊现象, 说明纳米粒在生理盐水、葡萄糖注射液中能稳定存在, 这为其静脉注射给药提供了可能。

3.4 载药量的测定

在“2.3.1”的色谱条件下, 测定系列浓度的 DTX 对照品溶液的峰面积, 线性回归得 DTX 标准曲线: $Y=0.6828X+0.1958$ ($r=0.9999$), 表明 DTX 在 $0.1\sim 100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内与峰面积线性关系良好。根据载药量公式计算 DTX-G2 纳米粒的载药量为(62.3±1.9)%。比理论载药量(80%)略低, 可能在制备过程中尤其是均质时损失较为严重。

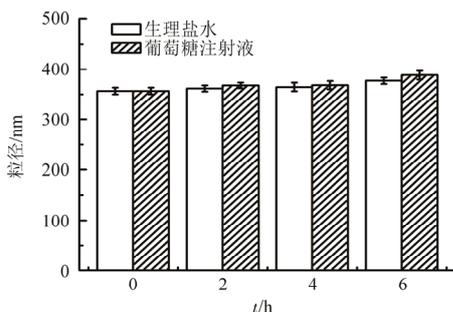


图5 DTX-G2 纳米粒在注射液中的稳定性($n=3$)
Fig. 5 Stability study of DTX-G2 nanoparticles in saline and glucose at 37 °C ($n=3$)

3.5 体外释放

DTX-G2 纳米粒在 100 h 前近乎为零级释放且无突释, 之后释放开始变得缓慢, 192 h 累积释放达到 80.4%, 相对于 DTX 溶液及粗粉混悬液, 具有明显的缓释效果。结果见图 6。

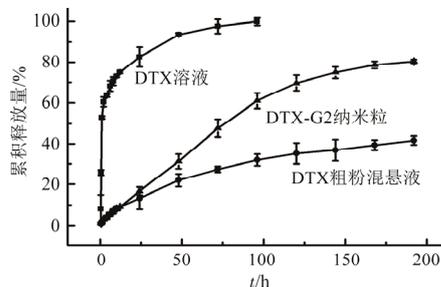


图6 DTX-G2 纳米粒的释放曲线($n=3$)
Fig. 6 The curve of release of DTX-G2 nanoparticles ($n=3$)

3.6 红细胞膜毒性考察

不同浓度的 DTX-G2 纳米粒溶血百分比均 $<10\%$ ^[10], 即无溶血现象, 说明 DTX-PGD 纳米粒具有良好的生物相容性, 可以静脉注射。结果见图 7。

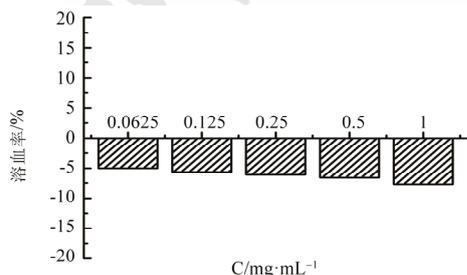


图7 DTX-G2 纳米粒的膜毒性
Fig. 7 Membrane toxicity of DTX-G2 nanoparticles

3.7 体外细胞毒作用

DTX-G2 纳米粒和 DTX 溶液对 4T1 细胞的抑制作用均呈现浓度依赖性, 且 DTX-G2 纳米粒对 4T1 细胞的毒性强于 DTX 溶液(IC_{50} , $2.374 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ vs $5.664 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $P<0.05$), 原因可能是肿瘤细胞与多烯紫杉醇纳米粒之间的非特异性内化作用, 使纳米粒更容易通过内吞、吞噬或胞饮等作用被

摄取^[11-12], 从而提高了纳米粒对 4T1 细胞的抑制作用。DTX-G2 纳米粒能显著提高体外抗肿瘤效果, 为进一步进行体内抗肿瘤药效实验奠定了基础。此外, 聚合物 G2 在 $0.01\sim 100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时对 4T1 细胞的抑制作用只有 $0.93\%\sim 12.4\%$, 由于 DTX 和 G2 的药载比为 4 : 1, G2 的含量仅为 DTX 的 1/4, 几乎不会对 DTX-G2 纳米粒的体外细胞毒作用产生影响。结果见图 8。

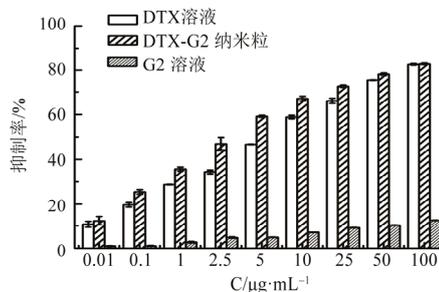


图8 DTX-G2 纳米粒对 4T1 细胞的体外细胞毒作用
Fig. 8 Cytotoxicity of DTX-G2 nanoparticles towards 4T1 cells

3.8 细胞摄取试验

DTX-G2 纳米粒组的细胞摄取量均较 DTX 溶液高, 且蔗糖、羟丙基-CD、细胞松弛素 D 等对 DTX-G2 纳米粒的细胞摄取均起到了一定的抑制作用, 其中羟丙基-CD 的抑制作用最强。由于 DTX-G2 纳米粒可以通过内吞、吞噬或胞饮等非特异性内化作用进入细胞, 因此其相较于被动扩散进入细胞的 DTX 溶液摄取效率显著提高(20.46 vs 11.01 , $P<0.05$)。由文献可知, 羟丙基-CD 为小窝蛋白介导的细胞内吞抑制剂, 蔗糖为网格蛋白介导的细胞内吞抑制剂, 而细胞松弛素 D 为巨胞饮抑制剂^[13-14], 因此细胞摄取试验中依据羟丙基-CD 对 DTX-G2 纳米粒抑制作用最强, 可初步推测该纳米粒可能通过小窝蛋白介导的细胞内吞途径被 4T1 细胞摄取。结果见图 9。

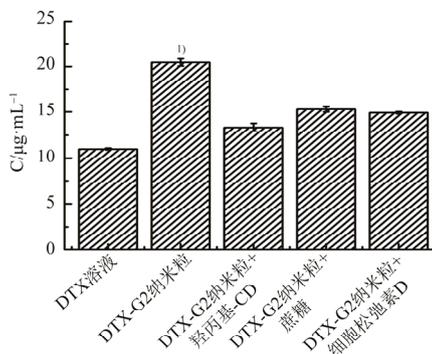


图9 各组 4T1 细胞内 DTX 含量($n=3$)
 与 DTX 溶液相比, ¹⁾ $P<0.05$ 。
Fig. 9 The concentration of DTX in 4T1 cells ($n=3$)
 Compared with DTX solution, ¹⁾ $P<0.05$.

3.9 体内药效试验

实验结束后,脱颈椎处死小鼠,完整剥离腋下肿瘤组织称瘤重,计算各组抑瘤率汇总于表2,可以看出,DTX-G2 纳米粒对 4T1 荷瘤小鼠的抑瘤率显著高于 PTX 注射液组(75.7% vs 52.4%, $P<0.05$),说明 DTX-G2 纳米粒相较于市售的 PTX 注射液可以达到更好的抑制肿瘤生长的效果。原因除了 DTX-G2 纳米粒具有更强的 4T1 细胞毒性的之外,更有可能是由于相较于 DTX 溶液该纳米粒以更高的摄取效率被肿瘤细胞摄取^[15-16],从而达到更好的抑制肿瘤生长的效果。

表 2 各组 4T1 荷瘤小鼠的抑瘤率($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 The tumor inhibition rate of 4T1 bearing mice ($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

组别	平均瘤重/g	抑瘤率/%
生理盐水	2.28±0.71	-
PTX 注射液	1.09±0.59	52.4
DTX-G2 纳米粒	0.55±0.17	75.7

尾静脉注射生理盐水、PTX 注射液及 DTX-G2 纳米粒后 4T1 荷瘤小鼠肿瘤生长曲线见图 10。可以看出,实验结束时,生理盐水组小鼠肿瘤体积增长最多,PTX 注射液组次之,而 DTX-G2 纳米粒组小鼠肿瘤体积增长较生理盐水和 PTX 注射液组显著降低,进一步佐证了 DTX-G2 纳米粒具有更好的抑瘤效果。

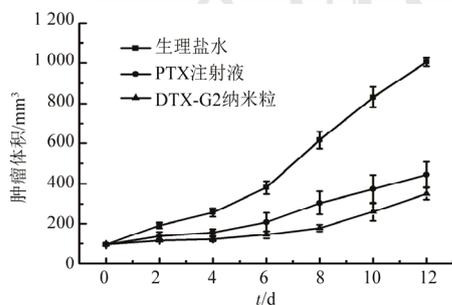


图 10 给药后 4T1 荷瘤小鼠肿瘤生长曲线($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

Fig. 10 The tumor growth curve of 4T1 bearing mice after the delivery ($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

4 结论

DTX 是一种典型的难溶性抗肿瘤药物,其溶解性差、生物利用度低一直是长期以来亟待解决的问题,本研究针对这一缺点制备了可以静脉注射的 DTX 纳米粒,解决了其因难溶而带来的难于给药的问题。在以往研究中,几乎没有以一种亲水性的扇形基元为载体制备 DTX 纳米粒的先例,本实验制备的 DTX-G2 纳米粒,不仅载药量高、稳定性好、具有明显的缓释效果,而且其相较于

溶液组有更强的细胞毒作用和更高的摄取效率,从而达到更好的抑制肿瘤生长的效果。但 DTX-G2 纳米粒在提高了抗肿瘤作用的同时,也在一定程度上增加了不良反应,这有待于进一步深入研究。

REFERENCES

- [1] MACKEY J R, MARTIN M, PIENKOWSKI T, et al. Adjuvant docetaxel, doxorubicin, and cyclophosphamide in node-positive breast cancer: 10-year follow-up of the phase 3 randomised BCIRG 001 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2013, 14(1): 72-80.
- [2] GARCIA A A, YESSAIAN A, PHAM H, et al. Phase II study of gemcitabine and docetaxel in recurrent platinum resistant ovarian cancer [J]. *Cancer Invest*, 2012, 30(4): 295-299.
- [3] NAKAMURA T, FUWA N, TAKAYAMA K, et al. Phase I study of weekly docetaxel and cisplatin arterial infusion for recurrent head and neck cancer [J]. *Head Neck*, 2012, 34(11): 1634-1639.
- [4] KOMIYAMA K, KOBAYASHI K, MINEZAKI S, et al. Phase I/II trial of a biweekly combination of S-1 plus docetaxel in patients with previously treated non-small cell lung cancer (KRS-G-0601) [J]. *Br J Cancer*, 2012, 107(9): 1474-1480.
- [5] WANG T, ZHAO Y N, WANG X T, et al. Preparation, characterization, and *in vitro* cytotoxicity of docetaxel nanoparticles with a novel codendrimer as stabilizer [J]. *Drug Eval Res(药物评价研究)*, 2016, 39(5): 741-746.
- [6] LING G, ZHANG P, ZHANG W, et al. Development of novel self-assembled DS-PLGA hybrid nanoparticles for improving oral bioavailability of vincristine sulfate by P-gp inhibition [J]. *J Control Release*, 2010, 148(2): 241-248.
- [7] CUI Y N, YANG X Q, ZHANG Z Y, et al. Comparison of intracellular kinetics of two kinds of PLGA nanoparticles with different zeta sizes [J]. *Chin J New Drugs(中国新药杂志)*, 2017, 26(6): 698-703.
- [8] LIANG J K, WU D T, HU Q H, et al. Preparation and optimization of hydroxycamptothecin loaded GA-PEI-PLGA nanoparticles [J]. *Her Med(医药导报)*, 2016, 35(11): 1254-1258.
- [9] CHEN C Y, XU P, YUAN H. Tissue-distribution and anti-tumor pharmacodynamics of PEGylated solid lipid nanoparticles after oral administration [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2016, 33(5): 586-592.
- [10] CAI W H, YAO C L, JU M L, et al. Determination of Lysolecithin and *in vitro* hemolysis of propofol nano-injection [J]. *Chin Pharmacol J(中国药理学杂志)*, 2013, 48(3): 212-215.
- [11] CHO H, INDIG G L, WEICHERT J, et al. *In vivo* cancer imaging by poly(ethylene glycol)-b-poly(ϵ -caprolactone) micelles containing a near-infrared probe [J]. *Nanomedicine*, 2012, 8(2): 228-236.
- [12] ZHANG M Z, LI Y J, SU W J, et al. Preparation and anti-tumor activity of Celastrol nanoparticles [J]. *Drugs Clin(现代药物与临床)*, 2016, 31(10): 1528-1534.
- [13] 于彩桐. 纳米材料的物理化学性质对细胞摄取、内吞机制及生物安全性影响的研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2015.
- [14] JONES A T. Macropinocytosis: searching for an endocytic identity and role in the uptake of cell penetrating peptides [J]. *J Cell Mol Med*, 2007, 11(4): 670-684.
- [15] 王秋实. 纳米粒药物载体在抗癌领域的研究进展[J]. *生物技术世界*, 2014(9): 123-124.
- [16] WEI L S, JI Y X, KANG Z Q, et al. Nano-formulations for tumor targeting: research advances [J]. *J Int Pharm Res(国际药学研究杂志)*, 2014, 41(1): 68-74.

收稿日期: 2017-08-02

(本文责编: 李艳芳)