

载紫杉醇的聚乙二醇修饰的大黄酸偶联物胶束的体内安全性及抗肿瘤药效学研究

许雪雅, 王夏英, 郑雅玲, 陆伟利, 徐伟, 王晓颖^{*}(福建中医药大学, 福州 350122)

摘要:目的 探讨载紫杉醇(paclitaxel, PTX)的聚乙二醇修饰的羧甲基壳聚糖-大黄酸(CRmP)偶联物胶束(PTX/CRmP 胶束)作为静脉注射给药制剂的安全性, 并对 PTX/CRmP 胶束在小鼠体内的抗肿瘤效果进行研究。方法 测定 PTX/CRmP 胶束的 pH 值及渗透压。以新鲜兔血红细胞检测溶血性。新西兰白兔耳缘静脉注射 PTX/CRmP 胶束溶液、CRmP 偶联物溶液, 光镜下对血管连同周围组织切片进行组织学检查。建立 H-22 荷瘤小鼠模型, 随机分组, 分别尾静脉注射给予 0.9%氯化钠注射液、注射用 PTX 脂质体、PTX 注射液和 PTX/CRmP 胶束低、中、高剂量(5, 10, 15 mg·kg⁻¹)。给药过程中每天观察小鼠活动情况, 记录小鼠体质量变化、肿瘤体积, 绘制体质量变化曲线、肿瘤体积变化曲线, 计算抑瘤率, HE 染色观察肿瘤组织切片。结果 不同浓度 PTX/CRmP 胶束溶液的 pH 值与血液 pH 值相近, 渗透压为 286~292 mOsm·kg⁻¹。浓度在 0.01~0.05mg·mL⁻¹ 内, CRmP 偶联物及 PTX/CRmP 胶束的溶血率<5%; 经耳缘静脉注射后, 注射部位肉眼可见血管无红肿、充血等刺激性现象, 血管均未见到明显的病理变化。PTX/CRmP 胶束能抑制肿瘤生长和转移, 抑制效果呈现剂量依赖。当给药剂量为 10 mg·kg⁻¹ 时, PTX/CRmP 胶束的抑瘤率达到了 52.11%, 抑瘤效果优于注射用 PTX 脂质体与 PTX 注射液。PTX/CRmP 胶束组小鼠体质量增长, 肿瘤无明显的全身扩散现象, 精神状态良好。病理组织切片表明, PTX/CRmP 胶束高剂量组肿瘤组织坏死程度最大。结论 PTX/CRmP 胶束具有良好的生物安全性, 用于静脉注射给药可有效抑制肿瘤生长, 同时可降低 PTX 的不良反应, 提高 PTX 抗肿瘤效果, 为临床应用提供参考。

关键词: 紫杉醇; 聚合物胶束; 大黄酸偶联物; 抗肿瘤

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2023)05-0577-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20220289

引用本文: 许雪雅, 王夏英, 郑雅玲, 等. 载紫杉醇的聚乙二醇修饰的大黄酸偶联物胶束的体内安全性及抗肿瘤药效学研究[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(5): 577-583.

Study on *in Vivo* Safety and Anti-tumor Pharmacodynamics of Paclitaxel-loaded PEGylated Rhein Conjugate Micelles

XU Xueya, WANG Xiaying, ZHENG Yaling, LU Weili, XU Wei, WANG Xiaoying^{*}(Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the safety of paclitaxel(PTX)-loaded PEGylated carboxymethyl chitosan-rhein (CRmP) polymeric micelles(PTX/CRmP PMs) as intravenous drug delivery preparations, and to investigate the anti-tumor effect of PTX/CRmP PMs in mice. **METHODS** The pH value and osmotic pressure of PTX/CRmP PMs were measured. The hemolysis was detected using the blood cells of New Zealand Rabbit. New Zealand rabbits were injected with PTX/CRmP PMs and CRmP conjugate solutions via the auricle vein. The vessels along with surrounding tissue sections were examined histologically under light microscopy. H-22 tumor-bearing mice models were established and divided into 0.9% sodium chloride injection group, paclitaxel liposome for injection group, paclitaxel injection group, PTX/CRmP PMs groups in low, medium and high dose(5, 10, 15 mg·kg⁻¹). The mice were administered via tail vein. During administration, the activity was observed every day. Changes of body weight and tumor volume were measured. The body weight change curve and tumor inhibition rate were plotted. Morphological changes in tumor tissues were observed by HE staining. **RESULTS** The pH values of PTX/CRmP PMs at different concentrations were similar to blood, with an osmotic pressure of 286~292 mOsm·kg⁻¹. In the concentration range of 0.01~0.05 mg·mL⁻¹ the hemolysis of CRmP conjugate and PTX/CRmP PMs were <5%. After intravenous injection via the auricle vein, no irritation phenomena were observed in the blood vessels at the injection site, and no obvious pathological

基金项目: 国家自然科学基金项目(81603301); 福建省科技厅引导性项目(2020Y0050)

作者简介: 许雪雅, 女, 硕士生 E-mail: 1319629488@qq.com *通信作者: 王晓颖, 女, 博士, 教授 E-mail: wangxy623@yeah.net

changes were observed in the blood vessels. Tumor growth and metastasis were inhibited in PTX/CRmP PMs group, and the tumor-inhibiting effect showed dose-dependent. At the administered dose was $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, the tumor inhibition rate of PTX/CRmP PMs reached 52.11%, better than that of paclitaxel liposome for injection group and paclitaxel injection group. Moreover, the mice in the PTX/CRmP PMs group gained weight, and no apparent whole-body diffusion was observed at the tumor site. During the treatment, the mice were in a good mental state. Pathological tissue sections indicated that the degree of tumor tissue necrosis was the greatest in the PTX/CRmP PMs high-dose group. **CONCLUSION** PTX/CRmP PMs have good biosafety and can be used for intravenous administration to effectively inhibit tumor growth, while reducing the toxic side effects of PTX and improving the anti-tumor effect of PTX, providing a reference for clinical application.

KEYWORDS: paclitaxel; polymer micelles; rhein conjugate; anti-tumor

紫杉醇(paclitaxel, PTX)是一种天然存在的二萜生物碱,最初从紫杉树皮中分离得到,目前是治疗肺癌、卵巢癌、乳腺癌、肝癌等的重要化疗药物之一^[1-2]。PTX通过抑制微管解聚,诱导肿瘤细胞的细胞周期阻滞,促进细胞凋亡,进而杀死肿瘤细胞^[3-4]。但由于PTX水溶性差,临床上常溶解于聚氧乙烯蓖麻油和无水乙醇(50:50)混合溶剂中使用。然而,增溶剂的使用容易引起严重不良反应,如急性过敏反应、周围神经毒性、胃肠道反应等,使PTX的临床治疗受限^[5-8]。

近几十年来,基于两亲性聚合物的纳米胶束递药系统在肿瘤治疗中受到广泛关注^[9]。聚合物胶束具有核-壳型结构,直径大小在20~200 nm。通过对聚合物胶束进行结构设计赋予其特定功能,物理或化学结合包载药物后,增加疏水药物的溶解度,生物相容性好,增强药物体内稳定性,对药物进行可控释放,并实现药物靶向给药^[10-12]。羧甲基壳聚糖(carboxymethyl chitosan, CMCS)由于其结构优势及其生物可降解性,通常作为聚合物胶束的骨架材料递送疏水性药物^[13-16]。聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)具有高溶解度、生物相容性和良好的耐受性,PEG修饰纳米载体表面可以提高体内稳定性和药物溶解性,降低药物清除率,提高药物疗效,已被广泛用于药物递送领域^[17-19]。大黄酸(rhein, Rh)是从大黄中提取分离的蒽醌衍生物,生物活性高,可以抑制多种肿瘤细胞的生长^[20]。笔者所在课题组前期成功合成了PEG修饰的CMCS-Rh偶联物(CRmP偶联物),并制备了载PTX的CRmP偶联物胶束(PTX/CRmP胶束)^[21],本研究对其安全性及体内抗肿瘤作用进行研究,为其抗肿瘤治疗提供依据。

1 材料

普通级健康新西兰兔,♂,体质量(2.0 ± 0.2)kg,9只,合格证号为20170008001582,生产许可证为SCXK(沪)2017-0008,购于吴氏动物中心;清洁级ICR小鼠,♂,体质量(20 ± 2)g,90只,购于吴

氏动物中心,生产许可证为SCXK(沪)2016-0002,合格证号:2018000510392。本研究中的所有动物实验均经福建中医药大学动物委员会批准,并根据机构动物护理要求进行。

CRmP偶联物(自制);PTX/CRmP胶束(自制);PTX(上海中西三维药业有限公司,批号:201801004);0.9%氯化钠注射液(批号:20170510)、5%葡萄糖注射液(批号:161217B21)均购自福州海王福药制药有限公司;4%多聚甲醛通用型组织固定液(北京索莱宝科技有限公司,批号:1608145);PTX注射液(Taxol[®],百时美施贵宝,批号:7J04591);注射用PTX脂质体(Liposome[®],南京绿叶制药有限公司,批号:2017100109)。

JY92-2D型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技有限公司);Infinite M200 PRO多功能酶标仪(瑞士TECAN公司);MS105DU十万分之一电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);MNT-150数显卡尺(上海美耐特实业有限公司)。

2 方法

2.1 pH值及渗透压测定

PTX/CRmP胶束冻干制剂用0.9%氯化钠注射液稀释至系列浓度为4,2,1,0.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,测定pH及渗透压。

2.2 溶血试验

新西兰白兔心脏取血,肝素抗凝,用玻璃棒轻轻搅拌,约5 min后,去除纤维蛋白,取出血液,加入约10倍量的0.9%氯化钠注射液,混匀并以1 000 \times g离心10 min,弃去上清液,再加入0.9%氯化钠注射液混匀并离心,反复洗涤直至上清液不显红色。将所得红细胞用0.9%氯化钠注射液稀释成10%的红细胞混悬液,备用。

分别配制含PTX浓度为1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的PTX/CRmP胶束溶液与CRmP偶联物溶液(按胶束溶液中对应的量)^[21]。将CRmP偶联物与PTX/CRmP胶束分散于0.9%氯化钠注射液中,探头超声溶解,过0.22 μm 滤膜。配制含PTX终浓度为0.01,0.03,

0.05, 0.08, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg·mL⁻¹ 的样品溶液, 各取 0.1 mL, 分别编号 1~12 号, 依次加入 0.1 mL 10%兔红细胞混悬液和 0.9 mL 0.9%氯化钠注射液。11 号管不加受试药作为空白对照, 12 号管不加受试药以蒸馏水 0.1 mL 代替受试药作为完全溶血对照, 将各管轻轻摇匀, 立即置(37±0.5)°C恒温水浴下, 孵育 2 h 后, 1 000 ×g 离心 10 min, 取上清液于 96 孔板上, 用酶标仪在 540 nm 波长处检测其吸光度 *A*。溶血率的计算公式(1)如下:

$$\text{溶血率} = (A_{\text{sample}} - A_{0\%}) / (A_{100\%} - A_{0\%}) \times 100\% \quad (1)$$

注: 其中, *A*_{sample}、*A*_{0%}和 *A*_{100%}分别表示样品溶液、0.9%氯化钠注射液和蒸馏水的吸光度。

按照上述方法, 同样测定 PTX 注射液、聚氧乙烯蓖麻油-无水乙醇混合溶剂(1:1)的溶血率, 考察其安全性。

2.3 血管刺激性试验

新西兰兔, 任意分为 3 组(*n*=3), 耳缘静脉缓慢推注 0.9%氯化钠注射液、PTX/CRmP 胶束溶液、CRmP 偶联物溶液(胶束中对应的量), 给药剂量为含 PTX 5 mg·kg⁻¹, 推注速度为 1 mL·min⁻¹, 连续给药 3 d, 每天 1 次, 最后 1 次给药后间隔 24 h 处死家兔, 以耳缘静脉注射点至向心方向, 连续取 3 段血管连同周围组织, 每段 1 cm, 共 3 段。经 4% 甲醛溶液固定后, 常规脱水, 石蜡包埋, 切 5 μm 薄片, HE 染色, 光镜下做组织学检查, 观察组织变性、坏死等刺激性反应。

2.4 体内药效学评价

2.4.1 小鼠 H-22 皮下移植瘤模型的建立 鼠源性 H-22 肝癌细胞注射入 ICR 小鼠腹腔内 8 d, 待腹水生成后取腹水, 用生理盐水稀释, 并调整细胞数为 1×10⁷·mL⁻¹, 分别接种于 ICR 小鼠左侧腋下, 每只 0.1 mL。接种后待肿瘤体积长到 150~200 mm³ 时即可开始分组给药。

2.4.2 分组给药 将荷瘤小鼠称重后随机分为 6 组, 每组 8 只, 分别为对照组(0.9%氯化钠注射液)、注射用 PTX 脂质体组(含 PTX 10 mg·kg⁻¹)、PTX 注射液组(含 PTX 10 mg·kg⁻¹)和 PTX/CRmP 胶束低、中、高剂量组(含 PTX 5, 10, 15 mg·kg⁻¹)。

以第 1 次给药记为第 0 天, 按上述分组及给药剂量, 分别在第 0, 2, 4, 6, 8 天尾静脉注射给药, 共给药 5 次, 第 10 天处死小鼠, 解剖, 剖取肿瘤组织。

2.4.3 对荷瘤小鼠一般情况的观察 在每次给药之后观察小鼠活动情况及生存状态。

2.4.4 小鼠体质量考察 给药后, 隔天测定荷瘤小鼠体质量, 绘制小鼠体质量变化曲线, 以此评价各组制剂对小鼠的毒性。

2.4.5 抑瘤效果评价 以第 1 次给药记为第 0 天, 隔天测肿瘤长径及短径, 按照公式(2)计算肿瘤体积(*V*_{tumor}), 并绘制肿瘤生长体积-时间曲线。

$$V_{\text{tumor}} = \frac{1}{2} \times a \times b^2 \quad (2)$$

注: 其中 *a* 为肿瘤长径, *b* 为肿瘤短径, 单位均为 mm。

于第 10 天将荷瘤小鼠处死, 剖离肿瘤组织, 称重, 按公式(3)计算抑瘤率(tumor inhibition rate, IR), 进行统计学分析, 评价疗效。

$$\text{IR}(\%) = \frac{W_{\text{control}} - W_{\text{drug}}}{W_{\text{control}}} \times 100\% \quad (3)$$

注: 其中 *W*_{drug} 为给药组瘤重, *W*_{control} 为对照组瘤重, 单位为 g。

2.4.6 肿瘤组织切片苏木精-伊红(HE)染色形态学观察 于第 10 天将荷瘤小鼠处死后, 切除一部分肿瘤组织置于 4%多聚甲醛固定液内固定, 使用石蜡进行包埋, 切 6 μm 薄片, 通过 HE 染色法对制备的荷瘤组织切片进行染色, 并在光学显微镜下观察其病理学变化。

2.5 统计学方法

所有实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 GraphPad Prism 5.0 统计软件进行统计和处理, 对实验结果进行单因素方差分析(ANOVA)检验统计学差异。*P*<0.05 和 0.01 时, 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 pH 值及渗透压

不同浓度 PTX/CRmP 胶束的 pH 值与血液 pH 值相近, 渗透压为 286~292 mOsm·kg⁻¹, 符合人体静脉给药制剂渗透压 280~300 mOsm·kg⁻¹ 的要求。pH 值及渗透压测定结果见表 1。

表 1 不同浓度 PTX/CRmP 胶束的 pH 值($\bar{x} \pm s$, *n*=3)

Tab. 1 pH values of different concentrations of PTX/CRmP PMs ($\bar{x} \pm s$, *n*=3)

PTX/CRmP 胶束浓度/mg·mL ⁻¹	pH 值	渗透压/mOsm·kg ⁻¹
4	4.97±0.13	290±2
2	5.02±0.13	289±3
1	5.07±0.12	289±1
0.5	5.16±0.12	288±2

3.2 溶血性

以聚氧乙 烯蓖麻油-无水乙醇混合溶剂(1:1)、PTX 注射液作为对照, CRmP 偶联物和 PTX/CRmP 胶束的溶血率结果见图 1。结果显示, 在所测的浓度范围内, CRmP 偶联物的溶血率均<5%, 而聚氧乙 烯蓖麻油-无水乙醇混合溶剂(1:1)在浓度为 $0.15 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时已出现溶血现象, PTX/CRmP 胶束浓度在 $0.01\sim 0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内均不会引起溶血或凝集反应。

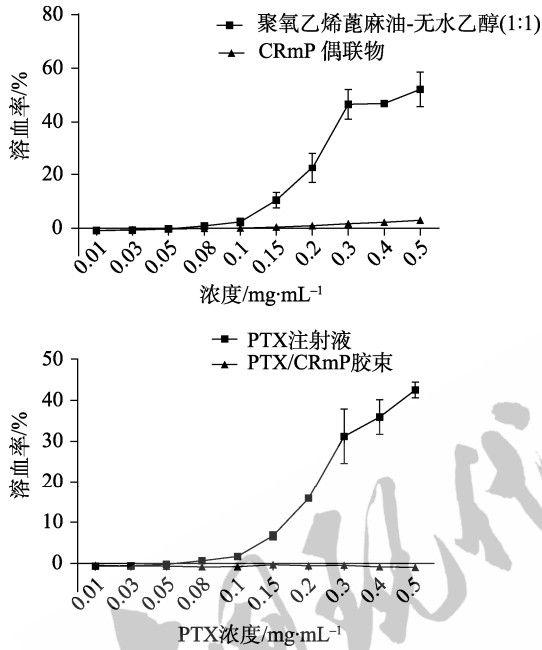


图 1 不同浓度制剂、溶剂和 CRmP 偶联物溶血率图 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 1 Hemolysis ratio of different concentrations of preparations, solvent and CRmP conjugate ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.3 血管刺激性

家兔耳缘静脉连续 3 d 推注 0.9% 的氯化钠注射液、CRmP 偶联物溶液和 PTX/CRmP 胶束溶液后, 家兔耳缘静脉注射部位肉眼均未见红肿、充血等血管刺激性现象。兔耳取下后用 4% 多聚甲醛溶液固定, HE 染色, 制作组织切片, 对组织病理学检查, 拍照, 结果见图 2。0.9% 的氯化钠注射液、CRmP 偶联物、PTX/CRmP 胶束组家兔耳缘静脉注射部位管腔内有轻微的血栓形成, 主要是由于注射造成的物理损伤。CRmP 偶联物与 PTX/CRmP 胶束组, 距注射部位 1 cm 处血管静脉完整, 血管扩张程度较低, 内皮细胞排列正常, 血管腔内无血栓, 无炎细胞浸润。在距离注射部位 3, 5 cm 处未见创伤性病变和炎症细胞, 血管壁和内皮细胞结构保持完整, 管壁内未见纤维组织增生、坏死等形态学改变, 管腔内无血栓形成。结果表明, CRmP 偶联物与 PTX/CRmP 胶束对血管无刺激性。

3.4 体内药效学评价

3.4.1 肿瘤生长抑制率 注射给予各种 PTX 制剂后, 荷瘤小鼠的肿瘤体积随时间变化曲线结果见图 3。与对照组相比, 各组肿瘤体积较小, 对肿瘤生长有抑制作用。PTX/CRmP 胶束剂量与肿瘤体积呈负相关。PTX/CRmP 胶束低剂量组的肿瘤体积仍然呈减小趋势。在同等注射剂量下 PTX/CRmP 胶束组与注射用 PTX 脂质体组、PTX 注射液组的肿瘤生长速度和生长趋势相近, 与对照组比较, PTX/CRmP 胶束组的肿瘤体积在第 6 天后显著降低, 并且一直持续至第 10 天。实验结束时, PTX/

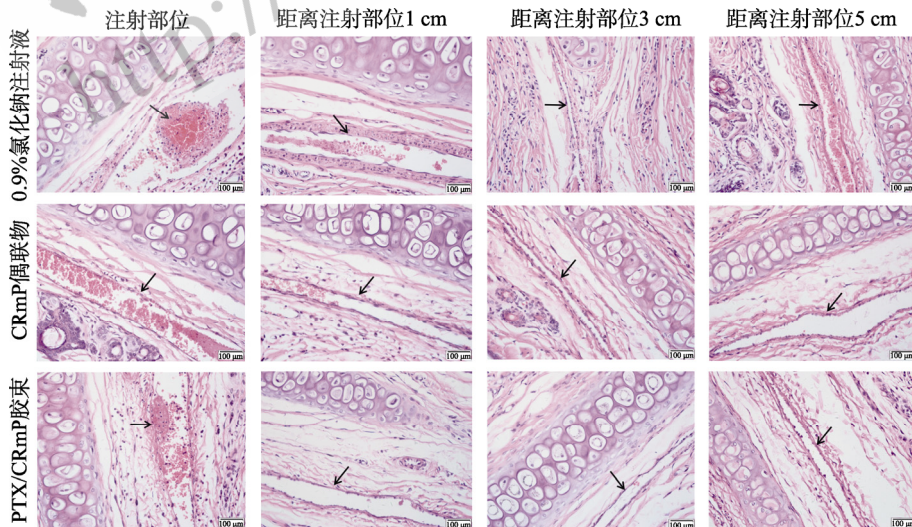


图 2 兔耳缘静脉血管组织病理切片(400×)
Fig. 2 Pathological section of rabbit marginal ear vein(400×)

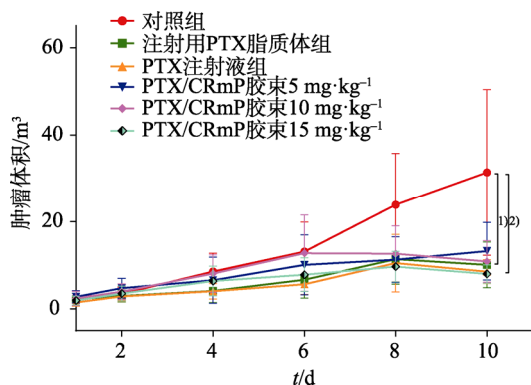


图3 荷瘤小鼠肿瘤体积随时间变化曲线($\bar{x} \pm s$, $n=8$)与对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 3 Curve of tumor volume of tumor bearing mice with time($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

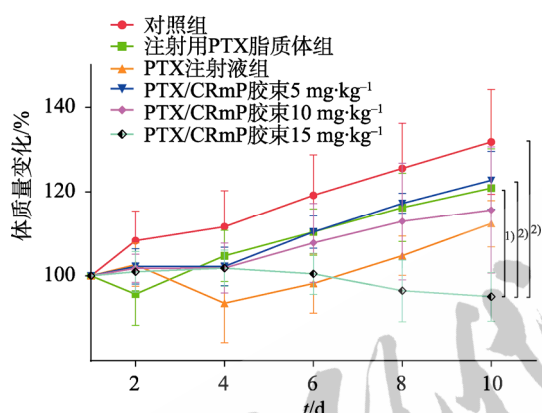


图4 荷瘤小鼠体质量随时间变化曲线($\bar{x} \pm s$, $n=8$)与PTX/CRmP胶束 $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 4 Curve of body weight of tumor bearing mice with time($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Compared with PTX/CRmP PMs $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

CRmP 胶束中剂量组的肿瘤体积显著低于对照组($P<0.05$), 且 PTX/CRmP 胶束高剂量组的肿瘤体积最小, 均小于注射用 PTX 脂质体组、PTX 注射液组。从上述数据可以初步表明, 在目前的给药方案下, PTX/CRmP 胶束制剂对肿瘤的抑制作用较强。

3.4.2 不良反应 各组荷瘤小鼠的体质量随时间变化曲线结果见图 4。在给药期间, 对照组小鼠由于没有得到治疗, 肿瘤逐渐扩散增大导致体质量逐渐增加。与对照组相比, 注射用 PTX 脂质体组、PTX 注射液组、PTX/CRmP 胶束低剂量组和中剂量组的相对体质量增长缓慢且持续。在给药前期, 注射用 PTX 脂质体组和 PTX 注射液组的相对体质量处于明显的降低状态, 表明其产生了严重的系统毒性; 而 PTX/CRmP 胶束低剂量组、中剂量组在给药期间荷瘤小鼠的体质量持续上升, 表明 PTX/CRmP 胶束能有效降低药物的系统毒性。在

给药后期, PTX/CRmP 胶束高剂量组的荷瘤小鼠体质量缓慢下降, 可能与剂量有关。

在实验过程中, 每天观察荷瘤小鼠的生活状态。给药第 6 天后, 对照组多数小鼠肿瘤剧增, 部分小鼠出现肿瘤全身扩散, 四肢行动不便, 精神萎靡, 饮食量较少等现象。注射用 PTX 脂质体组、PTX 注射液组小鼠给药期间略显消瘦, 肿瘤无全身扩散现象。PTX/CRmP 胶束各剂量组 10 d 内大部分小鼠行动自如, 精神状况良好, 肿瘤无全身扩散现象。观察注射部位时发现, PTX 注射液和注射用 PTX 脂质体组尾静脉注射部位皮下组织出现溃破、糜烂现象。而 PTX/CRmP 胶束尾静脉注射部位皮下组织完整, 未出现肿胀现象。综合以上, 可认为载药胶束组的毒副作用较小。

3.4.3 肿瘤抑制率 第 10 天处死荷瘤小鼠, 剖离肿瘤组织, 称重计算抑制率。结果见表 2, 各 PTX 制剂组对肿瘤均有一定抑制作用。PTX/CRmP 胶束的抑制率表现出剂量依赖性。以 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量给药后, 胶束制剂组的抑制率为 52.11%, 肿瘤的抑制效果优于同剂量注射用 PTX 脂质体与 PTX 注射液, 但差异无统计学意义。结合毒副作用评价, PTX/CRmP 胶束具有良好的抗肿瘤效果的同时, 减少了药物毒副作用, 显示出其优势。

表 2 荷瘤小鼠的肿瘤质量和抑制率($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Tab. 2 Tumor weight and tumor inhibition rate of tumor bearing mice($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	肿瘤质量/g	抑制率/%
对照组	3.04±1.44	-
注射用 PTX 脂质体组	1.62±0.45 ¹⁾	46.62±14.68
PTX 注射液组	1.53±0.82 ¹⁾	49.61±27.03
PTX/CRmP 胶束 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组	1.54±0.77 ¹⁾	49.48±25.07
PTX/CRmP 胶束 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组	1.46±0.33 ¹⁾	52.11±10.84
PTX/CRmP 胶束 $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组	1.43±0.21 ¹⁾	53.13±6.79

注: 与对照组相比, ¹⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared the control group, ¹⁾ $P<0.01$.

3.4.4 肿瘤组织情况及病理切片分析 对照组肿瘤组织瘤体巨大, 肿瘤侵袭胸壁及周围的肌肉组织, 瘤内夹杂坏死及液化组织; 采用 PTX 注射液、注射用 PTX 脂质体及 PTX/CRmP 胶束治疗后, 肿瘤瘤体均较小、质韧, 瘤体内可见脂质沉积。

从肿瘤组织切片图 5 中可以看出, 对照组肿瘤细胞密集生长, 细胞核肿胀且深染, 形状不规则, 有较多细胞核分裂相。PTX 注射液、注射用

PTX 脂质体及 PTX/CRmP 胶束给药治疗后肿瘤组织均出现了不同程度的坏死, 表现为肿瘤细胞数量减少, 细胞核固缩, 淡红色胞浆面积增大。尤其是 PTX/CRmP 胶束高剂量组肿瘤组织坏死程度最大, 显示出了较好的抗肿瘤效果。

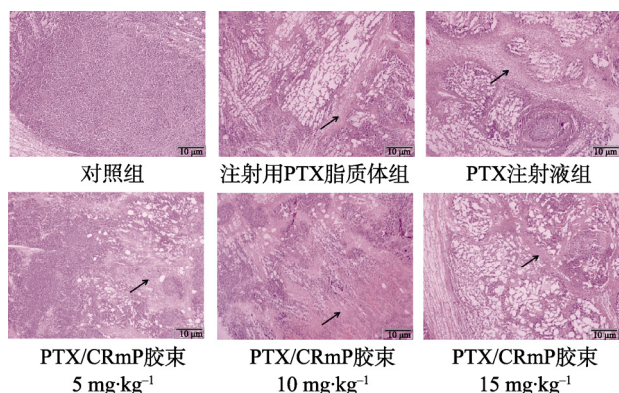


图5 各PTX制剂组荷瘤小鼠肿瘤组织病理切片HE染色图(100×)

Fig. 5 HE staining of tumor tissue pathological sections of tumor bearing mice in different PTX preparation group(100×)

4 讨论

为了解决 PTX 低水溶性的问题, 第一个紫杉醇的上市制剂 PTX 注射液(Taxol[®])用聚氧乙烯蓖麻油和无水乙醇为溶媒提高 PTX 的溶解度, 但是这种混合溶媒会产生神经毒性、肾毒性等多种不良反应^[22]。注射用 PTX 脂质体(Liposome[®])自 2003 年上市以来广泛用于各种肿瘤的治疗, 其可以在一定程度提高 PTX 的溶解度, 但临床结果显示其会带来与 Taxol[®]相似的过敏反应, 且并没有表现出更优的抗肿瘤治疗效果^[23]。

聚合物胶束作为新型纳米给药载体具有十分显著的优越性, 能够显著提高难溶性药物的溶解度, 减小不良反应的发生, 并提高抗肿瘤药物疗效。本研究对 PTX/CRmP 胶束的考察证实了其作为注射制剂的体内安全性及较好的抗肿瘤作用。

渗透压、pH 值、溶血性和血管刺激性是静脉注射药物制剂安全性评价的重要指标^[24]。注射剂应接近血液的 pH, 在 4~9 内; 渗透压应与血浆等渗; 通常认为溶血率<5%时血液相容性较好; 并且应对血管无刺激。本研究结果表明, PTX/CRmP 胶束制剂的 pH 和渗透压均符合人体静脉给药要求。在静脉注射给药后, 相比于聚氧乙烯蓖麻油-无水乙醇(1:1)组和 PTX 注射液组, CRmP 偶联物和 PTX/CRmP 胶束的溶血率较低, 血液相容性

良好, 不易引起溶血。CRmP 偶联物与 PTX/CRmP 胶束经耳缘静脉注射后, 血管无红肿、充血等刺激性现象, 且未见明显的病理变化, 安全可靠, 表明载体材料与胶束制剂具有良好的生物相容性及安全性。

为了研究载药胶束的体内抗肿瘤作用, 本研究建立了 H-22 荷瘤小鼠模型, 进行体内药效学评价。本研究结果发现, PTX/CRmP 胶束能有效抑制肿瘤生长和转移扩散, 抑瘤效果优于同剂量市售的 PTX 注射液与注射用 PTX 脂质体, 且对肿瘤的抑制效果呈现剂量依赖。给药期间, PTX/CRmP 胶束组肿瘤无明显的全身扩散现象, 小鼠精神状态良好, 能在抑制肿瘤生长的同时, 降低 PTX 治疗带来的不良反应, 避免 PTX 注射液制剂中增溶剂引起的不良反应。PTX 经 CRmP 偶联物包载后粒径在 200 nm 左右, 且药物的载药量高, 载药量为(38.24±2.78)%^[21]。均匀且较小的粒径可以使载药胶束避免在体内被快速清除, 且可以通过 EPR 效应使药物靶向递送至肿瘤部位, 从而减少对正常组织的损害, 具有较高的安全性。

综合以上, 本研究所制备的 PTX/CRmP 胶束安全性良好, 可以有效提高 PTX 抗肿瘤疗效, 降低不良反应, 是一种高效低毒的 PTX 给药系统, 具有良好的应用前景。本课题组将对其抗肿瘤机制等进行进一步的研究。

致谢:

本项目在闽台中药分子生物技术国家地方联合工程研究中心、福建省中药学重点实验室、福建省中药资源研究与开发利用重点实验室完成。

REFERENCES

- [1] WANI M C, TAYLOR H L, WALL M E, et al. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*[J]. J Am Chem Soc, 1971, 93(9): 2325-2327.
- [2] ZHU L Y, CHEN L Q. Progress in research on paclitaxel and tumor immunotherapy[J]. Cell Mol Biol Lett, 2019(24): 40.
- [3] HARDIN C, SHUM E, SINGH A P, et al. Emerging treatment using tubulin inhibitors in advanced non-small cell lung cancer[J]. Expert Opin Pharmacother, 2017, 18(7): 701-716.
- [4] EZRAHI S, ASERIN A, GARTI N. Basic principles of drug delivery systems-the case of paclitaxel[J]. Adv Colloid Interface Sci, 2019(263): 95-130.
- [5] SHARIFI-RAD J, QUISPE C, PATRA J K, et al. Paclitaxel: application in modern oncology and nanomedicine-based cancer therapy[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021(2021): 3687700.

- [6] WANG F H, PORTER M, KONSTANTOPOULOS A, et al. Preclinical development of drug delivery systems for paclitaxel-based cancer chemotherapy[J]. *J Control Release*, 2017(267): 100-118.
- [7] 辛文秀, 黄萍, 卢晓阳, 等. 紫杉醇制剂超敏反应预处理指导意见[J]. *中国现代应用药理学*, 2019, 36(8): 1023-1027.
- [8] KHALIFA A M, ELSHEIKH M A, KHALIFA A M, et al. Current strategies for different paclitaxel-loaded Nano-delivery Systems towards therapeutic applications for ovarian carcinoma: A review article[J]. *J Control Release*, 2019 (311/312): 125-137.
- [9] YANG J M, XU D H, LI F Z. Advance in the design and development of nanocarrier-mediated co-delivery for overcoming multidrug-resistant cancer[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2020, 37(6): 750-754.
- [10] LIN M H, DAI Y, XIA F, et al. Advances in non-covalent crosslinked polymer micelles for biomedical applications[J]. *Mater Sci Eng C*, 2021(119): 111626.
- [11] GAO M, YANG Y F, BERGFEL A, et al. Self-assembly of cholesterol end-capped polymer micelles for controlled drug delivery[J]. *J Nanobiotechnology*, 2020, 18(1): 13.
- [12] KESHARWANI S S, KAUR S, TUMMALA H, et al. Multifunctional approaches utilizing polymeric micelles to circumvent multidrug resistant tumors[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2019(173): 581-590.
- [13] WEI X, LIU L Q, LI X L, et al. Selectively targeting tumor-associated macrophages and tumor cells with polymeric micelles for enhanced cancer chemo-immunotherapy[J]. *J Control Release*, 2019(313): 42-53.
- [14] WANG X Y, WANG X Y, QIU L Z, et al. Cytotoxicity and cellular uptake of paclitaxel-loaded carboxymethyl chitosan-Rhein polymeric micelles in MCF-7 cells[J]. *J China Pharm Univ(中国药科大学学报)*, 2020, 51(1): 33-37.
- [15] WANG X Y, QIU L Z, WANG X Y, et al. Evaluation of intestinal permeation enhancement with carboxymethyl chitosan-Rhein polymeric micelles for oral delivery of paclitaxel[J]. *Int J Pharm*, 2020(573): 118840.
- [16] WANG X Y, GUO Y L, QIU L Z, et al. Preparation and evaluation of carboxymethyl chitosan-Rhein polymeric micelles with synergistic antitumor effect for oral delivery of paclitaxel[J]. *Carbohydr Polym*, 2019(206): 121-131.
- [17] ZHAO G K, SU W K, SHUAI Q. Research progress of novel multi-functional biodegradable PEG-PLA/PLGA/PCL polymeric nano-anticancer drug carriers[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2020, 37(18): 2291-2298.
- [18] RAHME K, DAGHER N. Chemistry routes for copolymer synthesis containing PEG for targeting, imaging, and drug delivery purposes[J]. *Pharmaceutics*, 2019, 11(7): 327.
- [19] FU Y P, DING Y, ZHANG L T, et al. Poly ethylene glycol (PEG)-Related controllable and sustainable antidiabetic drug delivery systems[J]. *Eur J Med Chem*, 2021(217): 113372.
- [20] HENAMAYEE S, BANIK K, SAILO B L, et al. Therapeutic emergence of Rhein as a potential anticancer drug: A review of its molecular targets and anticancer properties[J]. *Molecules*, 2020, 25(10): 2278.
- [21] WANG X Y, QIU L Z, LI Q Z, et al. Synthesis of PEGylated carboxymethyl chitosan-Rhein conjugate and preparation of paclitaxel-loaded polymeric micelles[J]. *J China Pharm Univ(中国药科大学学报)*, 2018, 49(5): 596-602.
- [22] AJANI J A, D'AMICO T A, BENTREM D J, et al. Esophageal and esophagogastric junction cancers, version 2.2019, NCCN clinical practice guidelines in oncology[J]. *J Natl Compr Cancer Netw*, 2019, 17(7): 855-883.
- [23] LI L J, ZHAN Q, YI K K, et al. Engineering Lipusu with lysophosphatidylcholine for improved tumor cellular uptake and anticancer efficacy[J]. *J Mater Chem B*, 2022, 10(11): 1833-1842.
- [24] JIN Q, GONG W, SU Z D, et al. Research progress on key physical and chemical properties of injection[J]. *Chin J New Drugs(中国新药杂志)*, 2019, 28(9): 1075-1080.

收稿日期: 2022-01-26

(本文责编: 蔡珊珊)