

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2021.02.004

❖ 基础研究 ❖

# 聚(对氧环己酮-co-l-苯丙氨酸氮芥)纳米颗粒用于乳腺癌移植瘤治疗

蒲宇<sup>1</sup>, 冯成敏<sup>2</sup>, 王冰<sup>3</sup>, 董军<sup>4</sup>

(1. 医学影像四川省重点实验室, 川北医学院附属医院; 2. 川北医学院临床医学系耳鼻咽喉科; 3. 医学影像四川省重点实验室, 川北医学院基础医学院化学教研室; 4. 川北医学院基础医学院化学教研室, 四川南充 637000)

**【摘要】目的:** 探讨具有缓释功能的聚(对氧环己酮-co-l-苯丙氨酸氮芥)静电喷雾纳米颗粒(PDCM NP)对乳腺癌细胞及裸鼠移植瘤的增殖抑制作用。**方法:** 不同 l-苯丙氨酸氮芥含量的 PDCM NP 分别与人乳腺癌细胞 MCF-7 共同培养 1、3、5、7 d 后观察 PDCM NP 对细胞增殖的影响。荧光标记的 PDCM NP 与 MCF-7 细胞共同培养 24 h 后在荧光显微镜下观察 MCF-7 对 PDCM NP 的吞噬情况。0.1 mL 10 mg/mL 的 PDCM-2 NP 混悬液用于治疗皮下种植 MCF-7 细胞的移植瘤裸鼠 20 d, 期间测量、记录肿瘤体积变化。20 d 后处死, 肿瘤组织进行苏木精-伊红染色(HE)、TUNEL 染色以统计瘤内细胞坏死、凋亡状况。**结果:** PDCM NP 可抑制 MCF-7 细胞增殖, 其抑制能力与 PDCM 所含 l-苯丙氨酸氮芥量成正比, 另外 PDCM NP 可被 MCF-7 吞噬, 单次瘤内注射 PDCM NP 可有效抑制 MCF-7 移植瘤的增殖。**结论:** PDCM NP 可有效抑制 MCF-7 细胞及其裸鼠移植瘤的增殖。

**【关键词】** 聚(对氧环己酮-co-l-苯丙氨酸氮芥); 纳米颗粒; 人乳腺癌 MCF-7 细胞; 乳腺癌移植瘤

**【中图分类号】** R737.9 **【文献标志码】** A

## Poly ( p-dioxanone-co-l-melphalan ) nanoparticles for the treatment of breast cancer xenografts

PU Yu<sup>1</sup>, FENG Cheng-min<sup>2</sup>, WANG Bing<sup>3</sup>, DONG Jun<sup>4</sup>

(1. Sichuan Key Laboratory of Medical Imaging, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College; 2. Otorhinolaryngology, Department of Clinical Medicine, North Sichuan Medical College; 3. Sichuan Key Laboratory of Medical Imaging, Department of Chemistry, School of Preclinical Medicine, North Sichuan Medical College; 4. Department of Chemistry, School of Preclinical Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

**【Abstract】Objective:** To investigate the suppressive effect of poly ( p-dioxanone-co-l-melphalan ) nanoparticles ( PDCM NP ) on breast cancer cells in vitro and xenograft in vivo. **Methods:** PDCM NP with different content of l-melphalan was prepared to culture with MCF-7 cells for 1, 3, 5, 7 d and then the effect of PDCM NP on cell proliferation was observed. Subsequently, fluorescence labeling PDCM NP was cultured with MCF-7 cells to investigate the phagocytosis of MCF-7 cells on these NPs. At last, the MCF-7 xenograft models on nude mice were established and 0.1 mL 10 mg/mL PDCM-2 NP was used to treat nude mice for 20 d. The tumor size was measured and recorded during 20 d. After that, the mice were sacrificed and the xenografts were stained with hematoxylin-eosin ( HE ) and TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling ( TUNEL ) to observe the necrosis and apoptosis conditions of the cell in tumor. **Results:** PDCM NP suppressed the proliferation of MCF-7 cells in vitro, and the suppression efficiency increased with the l-melphalan content in PDCM. PDCM NP could be phagocytosed by MCF-7 cells. In addition, PDCM NPs could suppress the proliferation of MCF-7 xenograft with single intratumor injection. **Conclusion:** PDCM NPs can suppress the proliferation of human breast cancer MCF-7 cells in vitro and its xenografts in vivo effectively.

**【Key words】** Poly( p-dioxanone-co-l-melphalan ); Nanoparticles; Human breast cancer MCF-7 cell; Breast cancer xenograft

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤, 发病率仅次于肺癌<sup>[1]</sup>。随着技术进步及对乳腺癌认知的不断深入, 越来越多的治疗手段被应用于临床, 如辅助化疗、免疫治疗、靶向治疗等<sup>[2]</sup>。l-苯丙氨酸氮芥, 又

名 l-溶肉瘤素, 为烷化剂, 是目前仍应用于临床的抗肿瘤药物; 主要作用于 DNA, 适用于治疗多发性骨髓瘤、乳腺癌、卵巢癌<sup>[3-4]</sup>。其盐酸盐可静脉注射, 但该药物毒性较大, 全身给药容易造成多种毒副作

基金项目: 川北医学院博士启动基金(CBY15-QD07)

作者简介: 蒲宇(1983-), 男, 硕士研究生。E-mail: 329789968@qq.com

通讯作者: 董军, 博士, 副教授。E-mail: dongj46@163.com

用,且其分子在水相环境中极不稳定容易水解,导致药物血液半衰期短,生物利用率低<sup>[5-6]</sup>。因此,为了降低 1-苯丙氨酸氮芥的毒副作用,提高其在水相环境中的稳定性和生物利用率,本文将 1-苯丙氨酸氮芥结合于疏水大分子链上制备了适用于局部注射或局部植入给药的 1-苯丙氨酸氮芥大分子前药纳米颗粒,并探究了其对乳腺癌移植瘤的治疗作用。该纳米颗粒通过大分子链的折叠、缠绕可有效减少 1-苯丙氨酸氮芥与水相环境的接触从而减少其自发水解作用。且随着大分子的降解,1-苯丙氨酸氮芥被释放至作用部位,从而提高药物的生物利用率。另外,通过局部植入纳米颗粒可保持药物在病灶部位的局部高浓度,从而降低药物的全身性毒副作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂、细胞及动物

L-苯丙氨酸氮芥 (l-melphalan, 成都艾科试剂), 对氧环己酮 (PDO, 北京伊诺凯试剂), 三光气 (北京伊诺凯试剂), 尼罗红、辛酸亚锡 (Sigma-Aldrich, 美国默克), 戊巴比妥钠 (川北医学院实验动物中心), DMEM、胎牛血清、双抗 (Life Technologies, 美国)。

人乳腺癌细胞株 MCF-7 购于中国科学院细胞库/干细胞库。

体重为 18 ~ 22 g SPF 级裸鼠 10 只来源于川北医学院实验动物中心【SCXK(川)2013-18】, 雄性, 操作在川北医学院实验动物中心进行【SYXK(川)2013-076】, 实验过程对动物的处置符合相关动物伦理学要求。

### 1.2 实验方法

聚(对氧环己酮-co-1-苯丙氨酸氮芥) (PDCM) 大分子前药、PDCM 纳米颗粒 (PDCM NP)、聚对氧环己酮 (PPDO) 纳米颗粒、尼罗红标记 PDCM 静电喷雾纳米颗粒均按照本课题组先前报道的方法制备<sup>[7]</sup>。纳米颗粒信息如表 1 所示。

表 1 PDCM 大分子前药信息及其纳米颗粒平均粒径 ( $\bar{x} \pm s$ )

系列	PDCM 平均分子量 (g/mol)	L-苯丙氨酸氮芥含量 (mg/g)	纳米颗粒直径 (nm, 动态光散射法测定)
PPDO	9 065	0	334.0 ± 54.1
PDCM-1	9 765	11.5	380.6 ± 28.7
PDCM-2	8 399	116.9	276.0 ± 20.8
PDCM-3	7 472	169.1	351.6 ± 31.6

MCF-7 细胞接种于 96 孔板 (2.5 × 10<sup>3</sup>/孔) 加入正常培养基贴壁 12 h 后, 吸出原有培养基, 分别加入正常培养基及含 PDCM-1 NP、PDCM-2 NP、PDCM-3 NP 和 PPDO NP 的培养基 (纳米颗粒经环氧乙

烷事先灭菌, 浓度为 200 mg/L, 培养基含 89% DMED, 10% 胎牛血清, 1% 双抗), 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C 培养 1、3、5、7 d 后加入 CCK-8 培养 4 h 后将孔板置于酶标仪, 450 nm 检测各孔吸光度 (6 复孔/组/时间点)。MCF-7 细胞接种于 96 孔板 (2.5 × 10<sup>3</sup>/孔) 加入正常培养基贴壁 12 h 后, 吸出原有培养基, 加入含 200 mg/L 尼罗红标记 PDCM-2 NP 的培养基, 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C 培养 24 h 后, DAPI 染细胞核, 置于倒置荧光显微镜下观察 PDCM NP 被进入细胞情况。

将 0.1 mL 含 10<sup>7</sup> 个 MCF-7 细胞的悬液注射于裸鼠右侧腋窝部位皮下, 构建裸鼠移植瘤模型。注射细胞悬液后均予以单笼饲养 (20 ~ 25 °C 保暖), 肿瘤体积达 80 ~ 100 mm<sup>3</sup> 后进行瘤内给药处理, 记录给药前肿瘤体积并记为第 0 天。10 只荷瘤裸鼠随机均分为 Control 及 PDCM-2 NP 两组, Control 组裸鼠瘤内注射 0.1 mL 生理盐水, PDCM-2 NP 组裸鼠瘤内注射 0.1 mL 含 1 mg PDCM-2 NP 的悬浊液。给药第 2、4、6、8、10、12、14、16、18 及 20 天测量瘤体体积并记录, 并于第 20 天, 采用颈椎脱臼法处死实验裸鼠。同时, 取下肿瘤组织, 用 4% 中性甲醛溶液固定。对组织进行梯度乙醇脱水、二甲苯透明, 石蜡包埋处理后, 切片。苏木精-伊红染色后于显微镜下肿瘤组织坏死及浸润情况, TUNEL 染色后观察组织细胞凋亡状况并用 Image pro plus 软件统计切片 IOD 值。

### 1.3 统计学分析

统计各组细胞在不同培养时间的细胞活力, 肿瘤体积增长倍数, 及 TUNEL 染色切片 IOD 值。采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 计量资料以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较使用方差分析 (analysis of variance, ANOVA) 进行统计学显著性检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

PPDO NP 及 PDCM NP 对 MCF-7 细胞增殖的影响如图 1 所示, 不含 1-苯丙氨酸氮芥的 PPDO NP 与 MCF-7 细胞共培养 1 d 后表现出对细胞增殖的抑制作用, 第 3 天及以后对细胞增殖无明显抑制作用。PDCM NP 在整个培养过程中均表现出对细胞增殖的抑制作用, 且抑制效率与 PDCM 中所含的 1-苯丙氨酸氮芥量成正比。PDCM NP 对细胞增殖抑制的最高峰出现在培养第 3 天, 第 3 天后 PDCM NP 对细胞增殖的抑制作用有所减弱。

红色荧光标记的 PDCM-2 NP 与 MCF-7 细胞共培养 24 h 后, 用 DAPI 对细胞核着色, 后用荧光显微镜观察, 结果如图 2 所示。纳米颗粒红色荧光区域

与细胞核蓝色荧光区域重叠程度极高,表明 PDCM NP 可被 MCF-7 细胞吞入细胞内部,这有助于 1-苯丙氨酸氮芥在胞内的释放。

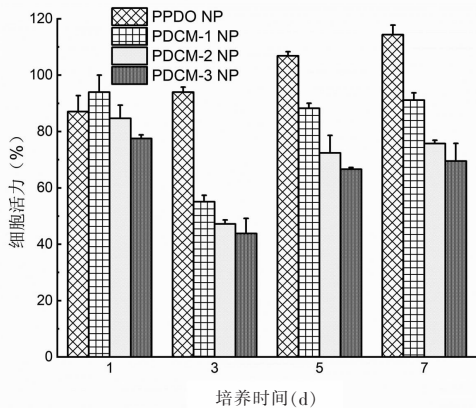


图1 PPDO NP 及 PDCM NP 对 MCF-7 细胞增殖的影响

细胞活力(%)=与纳米颗粒共培养细胞平均 OD 值/对照组细胞平均 OD 值 $\times$ 100%(所有实验组平均 OD 值与对照组平均 OD 值差异具有统计学显著性, $P<0.05$ )。

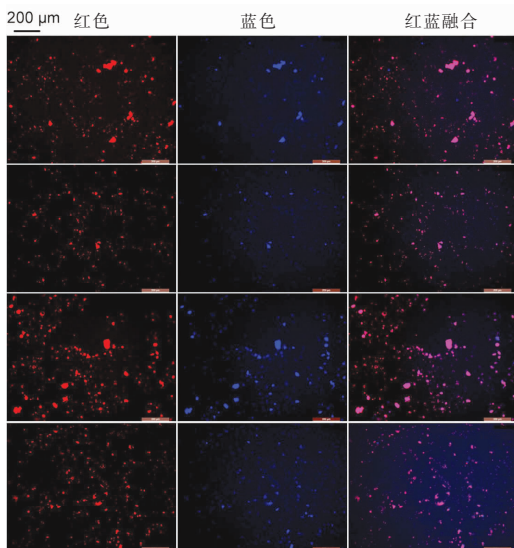


图2 PDCM-2 NP 与 MCF-7 细胞共培养后荧光显微镜照片

从左至右依次为红色荧光通道、蓝色荧光通道、及二者融合后的荧光显微镜照片。

图3为对照组及单次瘤内注射 PDCM-2 NP 后 MCF-7 裸鼠移植瘤体积增长曲线,对照组裸鼠移植瘤体积在 20 d 内持续增长,至第 20 天增长到处理前体积的 2 倍。注射瘤内 PDCM-2 NP 的裸鼠移植瘤在 20 d 内体积无明显变化,表明 PDCM-2 NP 可有效抑制 MCF-7 细胞裸鼠移植瘤的生长。肿瘤组织病理学相关检查结果如图 4 所示。由图 4A 可见,与对照组相比,PDCM-2 NP 处理的肿瘤可观察到较多的坏死组织。由图 4B 及图 4C 可得,与对照组相比,PDCM-2 NP 处理的裸鼠肿瘤组织 TUNEL 着色范围更广,深度更深,单位面积 IOD 值更高,这表明 PDCM-2 NP 处理的肿瘤组织中有更多凋亡的

肿瘤细胞。可见 PDCM-2 NP 处理可导致肿瘤组织坏死、促进肿瘤细胞凋亡,从而抑制肿瘤增殖。

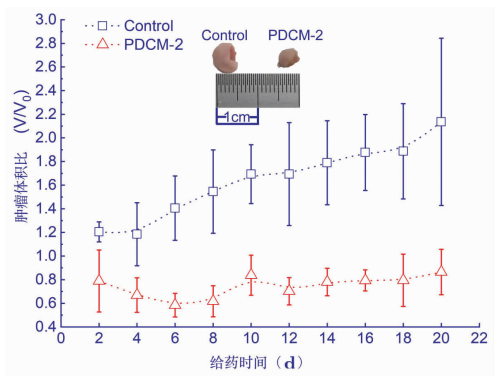


图3 对照组及单次瘤内注射 PDCM-2 NP 后 MCF-7 裸鼠移植瘤体积增长曲线

MCF-7 裸鼠移植瘤生长至  $80 \sim 100 \text{ mm}^3$ ;瘤内注射生理盐水(Control)或 PDCM-2 NP (PDCM-2)后肿瘤体积增长倍数=测得肿瘤体积(V)/处理前肿瘤体积( $V_0$ )(对照组肿瘤体积增长倍数与 PDCM-2 NP 处理组瘤体增长倍数差异具有统计学意义, $P<0.05$ )。

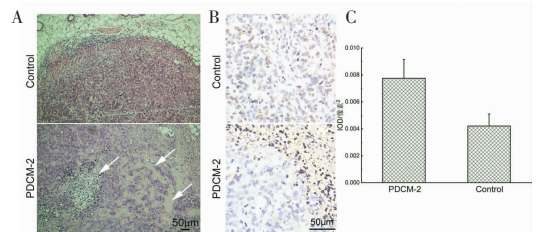


图4 给药处理 20 d 后裸鼠移植瘤组织切片

A.HE 染色照片(白色箭头显示坏死的肿瘤组织);B.TUNEL 染色照片;C.TUNEL 染色照片单位面积 IOD 值统计(PDCM-2 NP 处理组移植瘤切片 TUNEL 染色单位面积 IOD 值与对照组差异具有统计学意义, $P<0.05$ )。

### 3 讨论

PDCM NP 可在体外抑制人乳腺癌细胞株 MCF-7 的增殖。与 MCF-7 细胞共培养的第 1 天,PPDO 也表现出对 MCF-7 细胞增殖的抑制作用,这是由于 PPDO NP 的加入影响了 MCF-7 细胞的贴壁,而培养后期细胞贴壁完成后这种抑制作用消失,表明 PPDO NP 本身不具有抑制 MCF-7 细胞增殖的作用。PDCM NP 与 MCF-7 细胞共培养 1 d 对细胞增殖仅表现出轻微的抑制作用且抑制作用与 PDCM 所含 1-苯丙氨酸氮芥的量成正比。抑制作用不显著可能是因为共培养时间过短,PDCM 未能及时降解以释放出 1-苯丙氨酸氮芥。但 PDCM NP 对细胞增殖的抑制作用与 PPDO NP 相比并无明显差别,这可能是因为 PDCM 分子链中含有的酰胺键更有利于细胞黏

附、贴壁。PDCM NP 对 MCF-7 细胞增殖的抑制作用在与细胞共培养的第三天达到峰值,之后逐渐衰减,这可能是由于细胞贴壁完成后进入快速增殖阶段时由 PDCM NP 降解而释放的 1-苯丙氨酸氮芥浓度过低。从 PDCM NP 抑制 MCF-7 细胞增殖的情况来看,在培养第 3 天抑制率可达到 50%,由此推断除了 PDCM NP 胞外降解释放 1-苯丙氨酸氮芥以抑制 MCF-7 细胞增殖外,可能还存在其他途径导致 1-苯丙氨酸氮芥被快速释放并被有效应用。为此,本研究还制备了荧光标记的 PDCM-2 NP,与 DAPI 染色的细胞核共定位来判断 PDCM 是否可被癌细胞吞噬至胞内从而实现胞内释放。结果显示,PDCM NP 确实可被癌细胞吞噬至胞内,并且极可能被溶酶体捕获。这主要是因为含有大量酯键和肽键的 PDCM 使溶酶体内大量的酶加速降解,从而快速在胞内释放 1-苯丙氨酸氮芥以抑制细胞的增殖。

此外,PDCM NP 体内抑制肿瘤细胞增殖的作用也在 MCF-7 裸鼠移植瘤模型中得以验证。单次瘤内注射 PDCM NP 后肿瘤的增长受到明显抑制,肿瘤体积在处理后的 20 d 内几乎未发生明显变化,这说明 PDCM NP 可在瘤内长时间抑制肿瘤的生长。这说明 1-苯丙氨酸氮芥的结构得到了大分子前药分子链的有效保护,且 1-苯丙氨酸氮芥只能随着 PDCM NP 在细胞外的水解或被癌细胞吞噬且酶解后才被释放,即 PDCM NP 是 1-苯丙氨酸氮芥的缓释剂型。再者,移植瘤组织相关病理学检测显示 PDCM NP 对肿瘤增殖的抑制作用是通过促进肿瘤组织坏死、诱导肿瘤细胞凋亡而实现的。

综上,PDCM NP 可有效抑制 MCF-7 细胞体外

增殖,且抑制作用的强弱与 PDCM 所含 1-苯丙氨酸氮芥的量成正比。PDCM NP 可被 MCF-7 吞噬至胞内从而实现 1-苯丙氨酸氮芥的胞内释放。作为 1-苯丙氨酸氮芥的缓释剂型,PDCM NP 单次瘤内注射可较长期地抑制 MCF-7 细胞裸鼠移植瘤的增殖,并且这个抑制作用是通过促进肿瘤组织坏死及细胞凋亡而实现的。

#### 参考文献

- [1] 令狐锐霞,司文,李莹,等. 846 例乳腺癌流行病学及临床病理学分析[J]. 解放军医学院学报,2015,36(10):1017-1021,1038.
- [2] 赖建国,肖伟镔,廖宁. 2019 年乳腺癌临床研究进展[J]. 循证医学,2020,20(1):14-16.
- [3] Wadler S, Yeap B, Vogl S, et al. Randomized trial of initial therapy with melphalan versus cisplatin-based combination chemotherapy in patients with advanced ovarian carcinoma: initial and long-term results-Eastern Cooperative Oncology Group study E2878 [J]. *Cancer*,1996,77(4):733-742.
- [4] Sarosy G, Leyland-Jones B, Soochan P, et al. The systemic administration of intravenous melphalan[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 1988,6:1768.
- [5] Ma DQ, Rajewski RA, Stella VJ. New injectable melphalan formulations utilizing (SBE)(7m)-beta-CD or HP-beta-CD [J]. *International Journal of Pharmaceutics*,1999,189(2):227-234.
- [6] Shaw PJ, Nath CE, Lazarus HM. Not too little, not too much-just right! (better ways to give high dose melphalan) [J]. *Bone Marrow Transplant*,2014,49(12):1457-1465.
- [7] Wen A, Mei X, Feng C, et al. Electrosprayed nanoparticles of poly (p-dioxanone-co-melphalan) macromolecular prodrugs for treatment of xenograft ovarian carcinoma [J]. *Materials Science & Engineering C*,2020,111:110759.

(收稿日期:2020-04-28

修回日期:2020-06-12)