

聚轮烷-喜树碱偶联物的制备及其抗肿瘤作用

赖春丽, 赖 乐, 赵建彬, 陈建海*

(南方医科大学南方医院, 广东 广州 510515)

摘要: 本文研究了聚轮烷-喜树碱偶联物的制备及其抗肿瘤作用。制备了聚轮烷-喜树碱偶联物, 并对其体外释药行为进行研究; MTT 法及形态学考察偶联物对卵巢癌细胞株 A2780 的体外增殖抑制作用; 考察偶联物对 S180 荷瘤小鼠的生长影响, 进一步评价偶联物抗肿瘤效果。结果表明, 聚轮烷-喜树碱偶联物对卵巢癌细胞株 A2780 的增殖有明显抑制作用, 且呈量效关系; 对 S180 荷瘤小鼠的生长影响结果表明能显著减少肿瘤的生长、浸润程度以及血管数量, 提示其抗肿瘤作用机制可能是通过影响肿瘤的血管生成, 减少供血而导致肿瘤细胞坏死。

关键词: 偶联物; 制备; 抗肿瘤作用

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 07-0920-06

Synthesis of polyrotaxane-camptothecin conjugates and evaluation of its anti-tumor effect

LAI Chun-li, LAI Le, ZHAO Jian-bin, CHEN Jian-hai*

(Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: To prepare polyrotaxane-camptothecin conjugates and evaluate its anti-tumor effect, polyrotaxane-camptothecin conjugates were successfully synthesized, and the release behavior was performed; MTT assay and cell morphology were used to examine the inhibition of cells' proliferation effect *in vitro*. The experimental study of the antitumor effect on S180 mice *in vivo* was also performed to further evaluate the anti-tumor effect of conjugate. The result showed polyrotaxane-camptothecin conjugates can effectively inhibit the proliferation in a dose dependent effect. *In vivo* study and cell morphology observation of S180 mice showed significant decrease in growth of tumor, degree of tumor infiltration and blood vessel number. The result indicated anti-tumor mechanism may be through affect the angiogenesis and reduced blood supply to tumor cells and then leading to necrosis.

Key words: conjugate; synthesis; anti tumor effect

喜树碱 (camptothecin, CPT) 是喜树中所含的吲哚类生物碱, 在临床上用于治疗复发性及难治性乳腺癌和卵巢癌等多种癌症, 具有显著的抗癌活性。喜树碱水溶性极低, 毒副作用较大, 限制了其在临床上的广泛使用。

近年来, 聚轮烷作为一种新型的药物载体材料越来越引起人们的关注。它是以环状分子环糊精 (CD)

为客体分子, 长链线性 PEG 为骨架, 通过非共价键链接, 两端大分子基团封端后形成的一类新型的高效低毒的药物载体。由于 CD 环上有丰富的活泼-OH 基团, 可通过活化 CD 上的羟基, 将喜树碱等抗癌药物与载体进行链接, 从而改善药物的水溶性差、载药量低和生物利用度低等缺点。本实验室以新型药物载体聚轮烷为主体, 通过化学聚合反应, 合成新的聚轮烷-喜树碱偶联物, 提高了难溶性药物喜树碱的水溶性及降低毒副作用。

收稿日期: 2010-03-23.

*通讯作者 Tel / Fax: 86-20-61642173, E-mail: jhchen06@126.com

材料与amp;方法

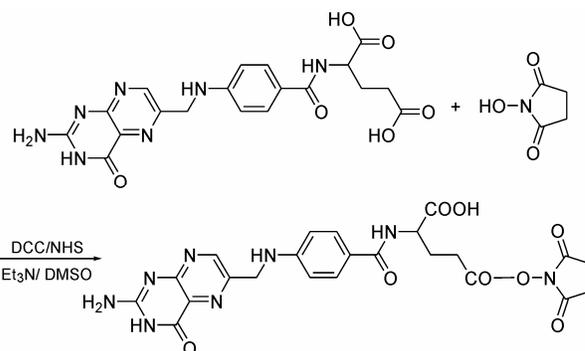
试剂 喜树碱 (CPT)、 α -环糊精 (α -CD)、*N*-羧基琥珀酰亚胺 (NHS)、二环己基碳二亚胺 (DCC)、叶酸、三乙胺 (Et_3N) 及吡啶等购自 Sigma 公司; 聚乙二醇二胺 4000 (PEG-BA 4000) 购自北京凯正生物公司; 其余试剂均购自日本和光纯公司 (WAKO Pure Chemical), 蒸馏水为双蒸水。

仪器 智能药物溶出仪 (ZBS-4 天津大学无线电厂); 匀速搅拌器 (D60-2F 上海华岩仪器设备有限公司); 涡旋混合仪 (XW-80A 上海医科大学仪器厂); 核磁共振仪 (Varian INOVA500NB 美国); 酶标仪 (SpectraMax M5 美国); Waters 高效液相色谱仪 (2478 双波长吸收检测仪, Empower 数据工作站) 等。

动物 BALB/c 小鼠, 体重 18~22 g, 雌雄各半, 由南方医科大学实验动物中心提供, 合格证号: SCXK 粤 2009-0045。

活性叶酸酯的制备 将适量叶酸预先溶解于无水二甲基亚砜溶液中, 依次加入 DCC、NHS 及 Et_3N , 叶酸/DCC/NHS/ Et_3N 的摩尔比: 1.2 : 1.5 : 1.5 : 5。反应溶液在 $300 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的条件下室温避光搅拌过夜。反应完毕后, 过滤除去异环己基脲。所得物冷冻干燥后, 制得淡黄色粉末即为叶酸活性酯 (合成路线 1), 产率 85%。

聚轮烷 (PR) 的制备 取 PEG-BA ($3.0 \times 10^{-4} \text{ mol}$) 1.2 g 溶解于 1 mL 水溶液中, 与 α -CD 饱和溶液 (12 g, $1.20 \times 10^{-2} \text{ mol}$) 混合, 室温下搅拌 24 h 后, 即得白色轮烷包合溶液。产物经过离心, 冷冻干燥后得白色粉末, 反应产率 90%。取上述粉末 12 g 与叶酸活性酯 5 g, 溶于无水 DMSO 中, 搅拌反应 96 h, 反应液倒入冰乙醚中, 淡黄色沉淀物经乙醇和水各洗涤 3 次, 真空干燥后即得聚轮烷 (图 1), 反应产率为 88%。



Scheme 1 The synthesis of active folic acid ester

聚轮烷-喜树碱偶联物 (PR-CPT conjugates) 的制备 取聚轮烷粉末 1 g, 溶解于无水吡啶溶液中, 加入丁二酸酐 (SA, $5 \times 10^{-4} \text{ mol}$), 室温下反应 48 h 后, 随后加入 CPT, $1 \times 10^{-3} \text{ mol}$, 共沸反应 2 h 后停止反应。随后反应液于冰浴 20 min, 加入 4-甲基吡啶碘 (DMAP, $4.1 \times 10^{-3} \text{ mol}$)。室温下搅拌反应 96 h, 过量乙醚沉淀, 反应产物用乙醇和水洗涤 3 次, 干燥后以 $\text{DMSO-}d_6$ 为溶剂测 $^1\text{H NMR}$ 谱, 结构确认 (图 2)。

聚轮烷-喜树碱偶联物的体外药物释放度测定 取偶联物 1 mg 于透析袋中 (截留相对分子质量 3 000), 加入 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 2 mL 溶解, 置于 100 mL PBS (pH 7.4) 圆底烧瓶中, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 下 $100 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 搅拌透析, 分别于 3、6、12、24、46、48、72、96、120 和 144 h 取透析液 1 mL, 并补充同体积溶出介质, $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤后进行 HPLC 分析, 色谱条件: Diamonsil ODS C_{18} 柱 ($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \text{ }\mu\text{m}$); 乙腈/水: 30 : 70; 流速 $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 检测波长 254 nm; 进样量 $10 \text{ }\mu\text{L}$, 进行含量测定。计算聚轮烷-喜树碱偶联物中喜树碱的含量及累积释放度, 以时间为横坐标, 累积释放度为纵坐标, 绘制药物的累积释放度-时间曲线。

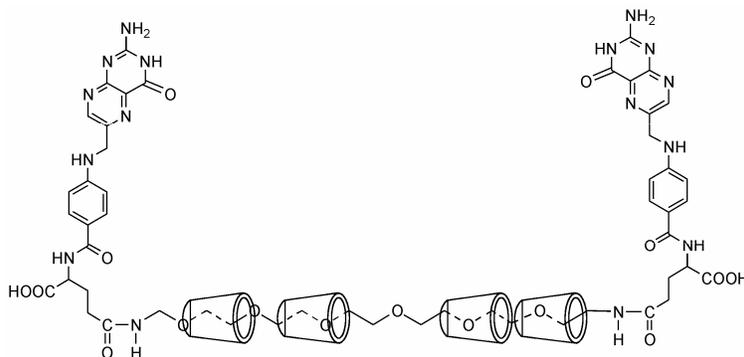


Figure 1 The structure schematic figure of polyrotaxanes (PR)

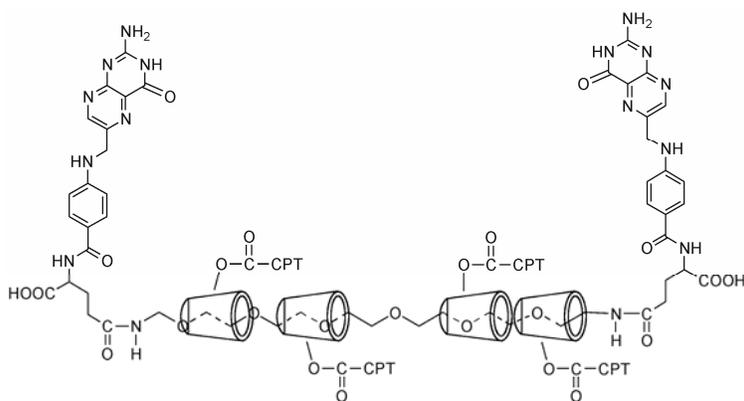


Figure 2 The structure schematic figure of polyrotaxane-camptothecin conjugates (PR-CPT)

MTT 法检测聚轮烷-喜树碱偶联物对卵巢癌细胞株 A2780 的增殖抑制作用 实验分为喜树碱组和聚轮烷-喜树碱偶联物组。偶联物体外释药含量测定结果表明载药量为 8%，偶联物组给药浓度按载药量折算成相应的含喜树碱的量。每组药物设置 7 个浓度梯度，终质量浓度分别为 0.1、0.5、2.5、10、25、50 和 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，每个浓度设 6 个复孔，每板设一个空白孔。取对数生长期 A2780 细胞，按细胞数 5×10^3 /孔接种于 96 孔板，24 h 贴壁后，吸出培养液，每孔加入培养液稀释的不同浓度药物 100 μL ，继续培养 48 h。每孔加入 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MTT 10 μL ，37 $^{\circ}\text{C}$ 继续孵育 4 h，弃除培养液，再加入二甲基亚砷 150 μL ，在酶标仪上以 490 nm 和 630 nm 的波长测定吸收度 (A) 值。根据公式计算细胞增殖率：细胞增殖抑制率 (%) = (1 - 加药孔平均 A 值) / 对照孔 A 值 $\times 100\%$ ，并以线性回归法计算各药物对细胞的半数抑制浓度 (IC_{50})。

细胞形态学观察 取对数生长期细胞，以细胞数 5×10^5 /孔接种于 6 孔板中，孵育 24 h 贴壁后，分别以 0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 喜树碱及按载药量折算含喜树碱质量浓度为 0.1、1 和 5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的聚轮烷-喜树碱偶联物作用于 A2780 细胞，48 h 后于倒置显微镜下观察细胞的生长及形态的变化。

动物体内抗肿瘤试验 肿瘤模型的建立：BALB/c 小鼠饲养于无特定病原菌环境，将常规复苏后的 S180 腹水癌细胞接种于小鼠腹腔内。当移植瘤生长 3 d 后，选择肿瘤生长旺盛且动物一般状况良好的荷瘤鼠，消毒后吸取腹水，用生理盐水以 1 : 5 的比例稀释后，调整细胞数为 1×10^7 ，取 0.1 mL 接种于小鼠大腿内侧皮下，密切观察肿瘤生长。

实验动物分组与处理：BALB/c 小鼠接种后按随机数字法分为 CPT 阳性对照组、偶联物治疗组与荷

瘤模型组，每组 8 只。接种第 2 天开始，每组分别腹腔注射 0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CPT、1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 聚轮烷-喜树碱偶联物生理盐水溶液和生理盐水各 100 μL ，每日 1 次，连续给药 7 次。实验期间观察小鼠进食、排便、精神状态及活动情况。于接种后第 7、9、11、13、15、17 和 19 天应用游标卡尺 (精度为 0.1 mm) 测量并记录小鼠皮下瘤结节大小，计算肿瘤体积， $V (\text{mm}^3) = 0.52ab^2$ (a 为瘤体最长径， b 为最短径)，取每组均数，制作肿瘤生长曲线。于接种后第 19 天，以 10% 水合氯醛 3 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 麻醉小鼠，剥离皮下瘤，称瘤重，计算肿瘤抑制率。肿瘤抑制率 = (荷瘤模型组平均瘤重 - 治疗组平均瘤重) / 荷瘤模型组平均瘤重 $\times 100\%$ 。最后以常规 10% 中性多聚甲醛固定，制成石蜡切片备用。

统计学分析 实验数据采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，SPSS13.0 软件进行 one way ANOVA 分析，多重比较用 LSD 法，方差不齐时用 Welch 法和 Games-Howell 法。

结果

1 聚轮烷-喜树碱偶联物的合成

聚轮烷载体 ^1H NMR 结果： ^1H NMR: 2.9~3.8 (1H, m, H-3, 5, 6, 4, 2), 4.44 (1H, t, OH-6), 4.79 (1H, d, H-1), 5.3 (1H, d, OH-3), 5.45 (1H, d, OH-2) 为载体上 α -CD 中的 H; 3.51 (2H, s, CH_2) 为 PEG 中 H; 6.65 (2H, d, H-3', 5'), 7.65 (2H, d, H-2', 6'), 8.77 (1H, s, H-7) 为叶酸中 H。

α -CD 的 ^1H NMR: δ 3.08 (1H, t, H-4), 3.19 (1H, d, H-2), 3.39 (1H, m, H-5), 3.44 (2H, m, H-6), 3.57 (1H, t, H-3), 4.52 (1H, t, OH-6), 4.60 (1H, d, H-1), 5.43 (1H, d, OH-3), 5.57 (1H, d, OH-2)^[1]。从核磁共振数据来看，聚轮烷载体上 α -CD 中的 H-1、H-3 及 C 2、3、6 位

羟基的化学位移有明显移向低场的变化, 证实 PEG 穿过 CD 空腔, 形成了“管形”结构, 与文献报道相符^[1]; δ 3.51 为 PEG 中 CH_2 特征峰, δ 6.65、7.65 和 8.77 处为叶酸的核磁共振峰, 分别为叶酸结构中 3'、5' 的 H、2'、6' 的 H 及嘧啶环 7 位 H 的化学位移。由上述数据可见, 聚轮烷载体已合成。

聚轮烷-喜树碱偶联物 ^1H NMR 结果: δ 0.9 (3H, t, H-18), 1.9 (2H, m, H-19), 8.3 (1H, q, H-12) 为偶联物中喜树碱的 H 特征峰; 3.51 (2H, s, CH_2) 为 PEG 中 H; 5.3 (1H, d, OH-3), 5.45 (1H, d, OH-2) 为载体上的 α -CD 的 H; 6.65 (2H, d, H-3', 5'), 7.65 (2H, d, H-2', 6'), 8.77 (1H, s, H-7) 为叶酸中 H 的特征峰。从上述数据可见, 位移为 4.44 (1H, t, OH-6) 处的羟基特征峰被取代后消失, 而 C 2、3 位羟基未被取代, 说明喜树碱链接于 CD 环上的 C6 位, 与文献^[1]报道相符。而在 0.9、1.9 和 8.3 处为喜树碱的特征性核磁共振峰, 分别为 C 18、19、12 位氢的化学位移。以上数据表明, 聚轮烷-喜树碱偶联物已合成。

2 聚轮烷-喜树碱偶联物的体外药物释放测定

偶联物在 PBS 缓冲液中稳定释放 (图 3), 3、6、12 和 24 h 内未见突释的情况, 6 天内缓慢释放, 第 6 天达到约 92%, 得到偶联物的载药量为 8%。

3 聚轮烷-喜树碱偶联物对卵巢癌细胞株 A2780 的增殖抑制作用

以药物浓度为横坐标, 细胞存活率为纵坐标作图 (图 4)。结果表明, 随药物浓度的增大聚轮烷-喜树碱偶联物对卵巢癌细胞株 A2780 的抑制作用增高, 具有量效关系。喜树碱与偶联物的 IC_{50} 分别为 5.37 和 44.8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。与喜树碱相比, 偶联物组 IC_{50} 提高了

约 8 倍, 提示聚轮烷-喜树碱偶联物的毒副作用相对较低。

4 细胞形态学观察

未加药物组 A2780 细胞生长状态良好, 呈菱形或梭形, 大小正常, 生长旺盛; 经过喜树碱和聚轮烷-喜树碱偶联物处理后, 普遍出现细胞凋亡、失去正常生长形态, 其生长明显受到抑制 (图 5)。

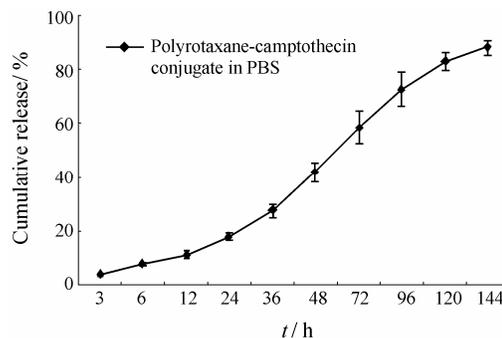


Figure 3 Drug-releasing curves of polyrotaxanes-camptothecin conjugates ($n = 3$)

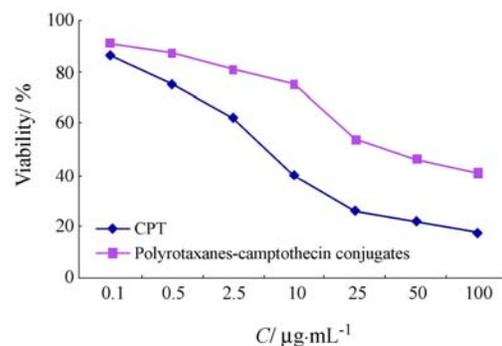


Figure 4 Viability of free camptothecin (CPT) and polyrotaxane-camptothecin conjugates against A2780 human ovarian cancer cells. ($n = 3$)

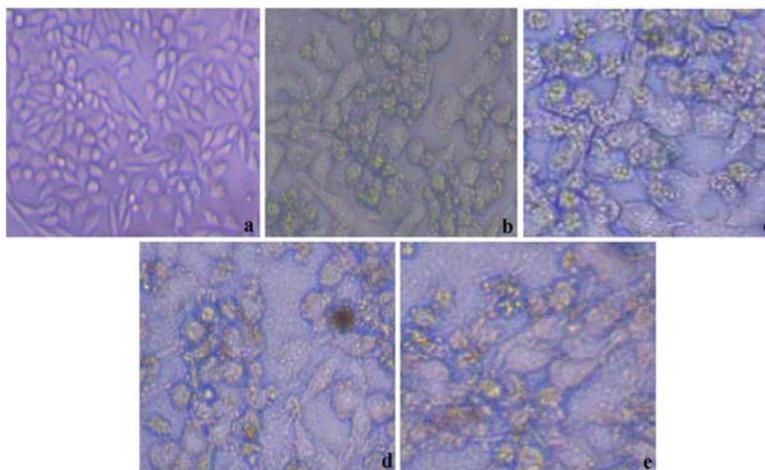


Figure 5 Cells treated with CPT and PR-CPT conjugates for 48 h ($\times 100$). a: A2780 cells; b: $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CPT; c: $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ PR-CPT conjugates; d: $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ PR-CPT conjugates; e: $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ PR-CPT conjugates

5 聚轮烷-喜树碱偶联物对小鼠肿瘤的影响

接种后第3天全部小鼠成瘤,皮下结节直径均超过0.5 cm,成瘤率100%。CPT阳性对照组及偶联物治疗组小鼠的肿瘤增长速度逐渐减缓,明显受到抑制,而荷瘤模型组小鼠的肿瘤增长速度较快,生长曲线明显上升(图6)。

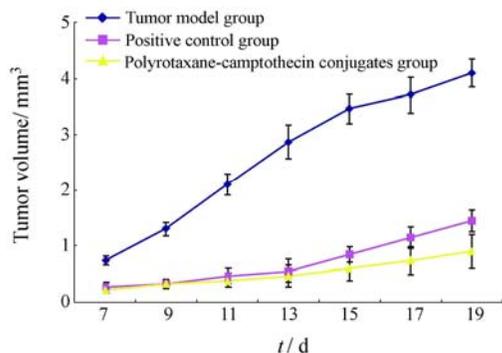


Figure 6 The growth effect of S180 mice after treated with CPT and polyrotaxanes-camptothecin conjugates ($n = 8$)

接种19天后偶联物治疗组与荷瘤模型组小鼠的肿瘤平均体积之间差异有统计学意义($P < 0.01$),偶联物治疗组与荷瘤模型组小鼠的肿瘤平均瘤重之间差异亦有统计学意义($P < 0.01$),见表1。实验期间,偶联物治疗组与荷瘤模型组小鼠健康状况良好,进食、排便、精神及活动等比较正常,小鼠对偶联物治疗的耐受性较好,未见明显的出血、腹泻及其他药物副作用,偶联物治疗组小鼠的体重较治疗前增加。CPT阳性对照组则出现轻微毒副反应,表现为反应迟钝,眼睛呆滞,眼角有分泌物等,实验结束时各组小鼠无死亡。

Table 1 The mean volume and weight of tumor on 19th days. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs tumor model group

Group	Tumor volume/mm ³	Tumor weight/g	Inhibition rate/%
Tumor model group	4.10 ± 2.35	7.2 ± 1.3	-
Positive control group	1.24 ± 0.13**	2.1 ± 0.6**	81
PR-CPT group	0.95 ± 0.24**	1.8 ± 0.8**	85

将预先用石蜡包埋的肿瘤组织进行切片,HE染色,在光学显微镜下进行组织病理学观察。结果显示,荷瘤模型组瘤细胞生长旺盛,细胞较密集或呈大片状,核分裂数多,浸润较深,至脂肪、肌层等处,血管较丰富,坏死范围较小。治疗组各指标程度较轻,但坏死较严重(图7)。

讨论

聚轮烷是一种通过非共价键相互作用组合得到的超分子结构,与生物体有良好的相容性,这类超分子优点是可溶于水,又能包含或负载药物和基因,还可生物降解,被机体吸收并且毒副作用极小。作为一种新兴的高分子材料,在药物的缓控释载药、基因转染和组织工程支架材料等方面有较强的优势^[2-5]。

作为轮烷骨架的PEG是中性、无毒且具有独特理化性质和良好的生物相容性的高分子聚合物,也是经FDA批准的极少数能体内注射药用的合成聚合物之一,具有高度的亲水性。当偶联到药物分子中或药物表面时,可以将其优良性质赋予修饰后的药物分子,改变它们在水溶液中的生物分配行为和溶解性,从而提高药物的溶解性。作为客体分子的CD原料为淀粉,其构成单位为葡萄糖,被广泛应用于各种食品或药品中作为添加剂使用,毒性极低。CD表面有丰富的羟基,经活化后可以与多种活性基团反应,从而链接上药物。

本课题采用聚轮烷为载体,通过聚合反应制备出聚轮烷-喜树碱偶联物,以降低喜树碱毒性、提高药物的水溶性。体外释放实验结果表明,聚轮烷-喜树碱偶联物在体外缓慢稳定释放。MTT法表明,不同浓度的偶联物对卵巢癌细胞株A2780均有明显的抑制作用,其 IC_{50} 与喜树碱相比,提高了8倍,提示聚轮烷-喜树碱偶联物的毒副作用相对较低,并且呈现良好的剂量效应关系;细胞形态学检测证实其对A2780细胞有抑制增殖的作用。

聚轮烷-喜树碱偶联物对荷瘤小鼠的影响表明,

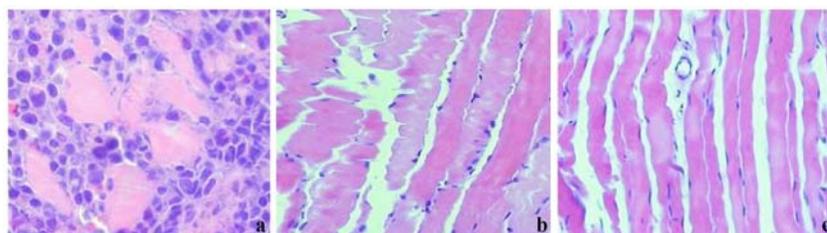


Figure 7 Pathological results of tumor tissues ($\times 200$). a: Tumor model group; b: Positive control group; c: PR-CPT conjugates group

它具有明显的抗肿瘤作用。病理形态学的变化证实了聚轮烷-喜树碱偶联物的作用并揭示其作用的可能机制。光镜下可以看出荷瘤小鼠瘤细胞生长旺盛、细胞较密集或呈大片状,核分裂数多,浸润较深;治疗组上述各指标程度较轻,而坏死较严重,且有大量淋巴细胞、巨噬细胞浸润,与荷瘤小鼠组比较具有显著性差异。聚轮烷-喜树碱偶联物对瘤细胞的生长浸润及血管数抑制作用更明显,进一步提示聚轮烷-喜树碱偶联物在直接杀伤肿瘤细胞的同时,影响肿瘤的血管生成,使其供血减少而导致瘤细胞坏死^[6-12]。

References

- [1] Ooya T, Yui N. Synthesis and cracterization of biodegradable polyrotaxane as a novel supramolecular structured drug carrier [J]. *J Biomater Sci Polym Edn*, 1997, 8: 437-455.
- [2] Moon C, Kwon YM, Lee WK, et al. A novel polyrotaxane-based intracellular delivery system for camptothecin: *in vitro* feasibility evaluation [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2008, 84: 238-246.
- [3] Duchene D, Ponchel G, Wouessidjewe D. Cyclodextrins in targeting-application to nanoparticles [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1999, 36: 29-40.
- [4] Le Ferrec E, Chesne C, Artusson P, et al. *In vitro* models of intestinal barrier. The report and recommendations of ECVAM Workshop 46. European Centre for the Validation of Alternative methods [J]. *Altern Lab Anim*, 2001, 29: 649-668.
- [5] Harada A, Li J, Kamachi M. Preparation and properties of inclusion complexes of poly(ethylene glycol) with α -cyclodextrin [J]. *Macromolecules*, 1993, 26: 5698-5703.
- [6] Xu Q, Wang JJ, Guo J, et al. Apoptosis induced by hydroxycamptothecin in human lung cancer cell SPC-A-1 [J]. *Tumor (肿瘤)*, 2000, 20: 11-12.
- [7] Chai LP, Su ZZ, Xian ZX. Inhibition of hydroxycamptothecin on laryngeal squamous carcinoma cell line [J]. *Chin J Cancer (癌症)*, 2003, 22: 372-375.
- [8] Ikegam T, MatsuzakY, Al Rashid M, et al. Enhancement of DNA topoisomerase I inhibitor induced apoptosis by ursodeoxycholic acid [J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5: 68-79.
- [9] Zhou YL, Hu WX, Lü YP, et al. Effect of ZGDHu-1 on proliferation and apoptosis of A549 cells *in vitro* and antitumor activity *in vivo* [J]. *Acta Pharm Sin (药学学报)*, 2007, 42: 26-34.
- [10] Wang HY, Cai B, Cui CB, et al. Vitexicarpin, a flavonoid from *Vitex trifolia* L., induces apoptosis in K562 cells via mitochondria-controlled apoptotic pathway [J]. *Acta Pharm Sin (药学学报)*, 2005, 40: 27-31.
- [11] Li YK. Experimental Methodology of TCM Pharmacology (中药药理实验方法学) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1991: 512-513.
- [12] Gong ZJ, Zhan RZ. Pathological Tissues Preparation and Staining Technology (病理组织制片和染色技术) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1994: 296-302.