

• 药理与临床 •

乳糖化-去甲斑蝥素纳米粒的肝靶向抗癌活性研究

胡展红, 周 奕, 张学农*

(苏州大学药学院 药剂学教研室, 江苏 苏州 215123)

摘要:目的 研究新型的乳糖化-去甲斑蝥素纳米粒 (Lac-NCTD-NPs) 的体内外抗癌活性。方法 通过 MTT 法考察去甲斑蝥素 (NCTD)、乳糖化-去甲斑蝥素 (Lac-NCTD) 及 Lac-NCTD-NPs 对肿瘤细胞株 HepG2、SMMC-7721 和 SGC-7901 的细胞毒作用和半乳糖化小牛血清 (Gal-FBS) 的竞争性抑制作用; 采用 HPLC 法评价肝肿瘤细胞 SMMC-7721 对 Lac-NCTD 的摄取效果; 通过 H₂₂ 荷瘤小鼠模型考察药物体内对肝癌的抑制作用。结果 体外细胞毒试验结果显示, 对 HepG2 和 SMMC-7721 细胞, 培养 48 h 时 Lac-NCTD-NPs 的 IC₅₀ 最低, 细胞毒作用最强, 其次是 Lac-NCTD, 且均能显著地被 Gal-FBS 抑制; 对 SGC-7901 细胞, Lac-NCTD-NPs 和 Lac-NCTD 的细胞毒作用并不比 NCTD 强, 且不受 Gal-FBS 的影响; 培养 12 h 后 SMMC-7721 对 Lac-NCTD 的摄取量为 3.89 μg (7.02 × 10⁻³ μmol, 1 × 10⁶ 个细胞); 小鼠体内抑瘤实验结果显示 Lac-NCTD-NPs 中剂量的抑瘤率为 63.9%, 显著高于相同浓度的 NCTD 和 Lac-NCTD。结论 Lac-NCTD-NPs 能有效地靶向于肝肿瘤组织, 抑制肿瘤的生长, 是一种强的具有体内外抗癌活性的新型肝靶向性制剂。

关键词: 乳糖化-去甲斑蝥素; 纳米粒; 抗癌活性; 肝靶向

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)12-2005-06

Investigation on anticancer activity of nanoparticles loaded lactosyl-norcantharidin

HU Zhanhong, ZHOU Yi, ZHANG Xue'ong

(Department of Pharmaceutical, College of Pharmacy, Soochow University, Suzhou 215123, China)

Abstract: **Objective** To investigate the anticancer activity of the novel lactosyl-norcantharidin nanoparticles (Lac-NCTD-NPs) *in vivo* and *in vitro*. **Methods** The MTT method was used to study the cytotoxic effects of Lac-NCTD and Lac-NCTD-NPs on HepG2, SMMC-7721, and SGC-7901 cell lines for 12 and 48 h, respectively, and the inhibitory effects of Gal-FBS; Lac-NCTD accumulated in SMMC-7721 cells was assayed by HPLC; The *in vivo* anticancer activity was evaluated by the tumor growth inhibition in H₂₂ tumor bearing mice. **Results** The *in vitro* studies showed that the cytotoxic effects of Lac-NCTD-NPs against HepG2 and SMMC-7721 cells were the most powerful, as well as the IC₅₀ was the lowest, then Lac-NCTD, and they were inhibited remarkably by Gal-FBS; As for SGC-7901 cell line, the cytotoxic effects of Lac-NCTD-NPs and Lac-NCTD were not stronger than that of NCTD, and Gal-FBS had no influence on them at all; The amount of Lac-NCTD accumulated in SMMC-7721 cells was 3.89 μg (7.02 × 10⁻³ μmol, 1 × 10⁶ cell) after treatment for 12 h; The results of the antitumor activity *in vivo* suggested that the inhibitory rate of Lac-NCTD-NPs on tumor weight was 63.9%, which was significantly higher than that of NCTD and Lac-NCTD groups at the same molar concentration. **Conclusion** The tumor-growth is inhibited effectively by Lac-NCTD-NPs which may be a kind of novel liver-targeting agents and could strongly inhibit the tumor-growth.

Key words: lactosyl-norcantharidin (Lac-NCTD); nanoparticles (NPs); anticancer activity; liver targeting

去甲斑蝥素 (norcantharidin, NCTD) 为斑蝥素的合成衍生物, 是由我国首先开发的治疗肝癌的新药, 主要用于原发性肝癌的治疗。NCTD 临床应

用时体内消除较快, 且对泌尿系统毒性较大, 临床应用剂量受到严格限制^[1]。因此, 国内外学者期望采用先进技术, 制备 NCTD 的新的抗癌衍生物, 以提

收稿日期: 2010-03-03

基金项目: 国家科技支撑计划课题资助项目 (2006BAI09B00); 国家科技部科技型中小企业技术创新基金项目 (07C26223201333); 江苏省“六大人才高峰”资助项目; 江苏省卫生厅招标项目 (H200630)

作者简介: 胡展红 (1983-), 女, 湖南长沙人, 硕士研究生, 研究方向为药物新技术与新剂型。

Tel: (0512) 65884912 E-mail: huzhanhong1983@yahoo.com.cn

* 通讯作者 张学农 Tel: (0512) 65880030 E-mail: zhangxuenong@163.com

高 NCTD 肝靶向性,降低不良反应和延长药效^[2]。

新型的乳糖化-去甲斑蝥素纳米粒 (lactosyl norcantharidin nanoparticles, Lac-NCTD-NPs) 内包裹的新化合物乳糖化-去甲斑蝥素 (Lac-NCTD) 上的半乳糖残基能被体内肝细胞膜表面的无唾液酸糖蛋白受体 (ASGP-R) 特异性识别,达到主动肝靶向性^[3],同时结合纳米粒自身的被动靶向,实现药物在体内的双重肝靶向性^[4],提高药物的体内外抗癌活性,降低毒性。

本研究通过 Lac-NCTD 及其纳米粒对不同肿瘤细胞株的细胞毒作用,研究 Lac-NCTD 及其纳米粒的体外抗癌活性,同时通过细胞对 Lac-NCTD 的摄取实验初步探讨药物发挥作用的可能机制;通过体内移植肝肿瘤 H22 小鼠模型研究药物的体内抗肿瘤活性。

1 材料

1.1 仪器:JC-10A 高效液相色谱仪 (日本岛津), ODS 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 大连依利特公司), Model ELx 808 全自动定量绘图酶标仪 (Bio-Tek Instruments)。

1.2 药品与试剂:NCTD (质量分数 99.21%,批号 20060508,苏州市苏瑞医药化工有限公司),Lac-NCTD-NPs (本实验室自制),三聚磷酸钠 (TPP,化学纯,国药集团化学试剂有限公司),壳聚糖 (相对分子质量 8 000~10 000,脱乙酰度 91.2%,黏度 2.95 mPa·s),MTT、小牛血清 (FBS)、RPMI 1640、胰蛋白酶、青霉素、链霉素 (苏州八八金实验器材有限公司),半乳糖化小牛血清 (Gal-FBS) (Sigma 公司),其他试剂均为分析纯。

1.3 动物和细胞:C57BL/6 小鼠 (苏州大学实验动物中心),体质量 (20 ± 2) g,雌雄各半;人肝癌细胞 HepG2、SMMC-7721 和胃癌细胞 SGC-7901 (苏州大学药理教研室提供);小鼠肝癌细胞 H22 (复旦大学生物细胞库提供)。HepG2、SMMC-7721、SGC-7901 细胞用含 10% 小牛血清 (56 °C 水浴 30 min 灭活),青霉素 (100 U/mL) 和链霉素 (100 U/mL) 的 RPMI 1640 培养液在 37 °C、5% CO₂ 培养箱内常规培养。

2 方法与结果

2.1 Lac-NCTD-NPs 的制备:依据文献方法^[5-6] 制备,即称取壳聚糖 0.1 g,溶解于 0.2% 醋酸水溶液中,制得 2 g/L 壳聚糖高分子溶液,加入 0.1 g Lac-NCTD 后,置 35 °C 水浴中,4 000 × g 搅拌溶解,逐滴加入 1.2 mg/mL TPP 水溶液 21 mL,继续搅拌

10 min,0.45 μm 滤膜滤过,得乳白色溶液。所制得纳米粒的平均粒径为 (142.10 ± 2.71) nm,包封率为 (81.01 ± 0.85)%,载药量 (10.23 ± 0.17)%。

2.2 统计学方法:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计程序进行单因素方差分析处理,组间采用 Dunnett *t* 方法比较。

2.3 细胞毒性实验和 Gal-FBS 抑制实验^[7]:取对数期生长的 HepG2、SMMC-7721、SGC-7901 细胞于 96 孔培养板上 (每孔 1×10^4 个细胞),在 37 °C、5% CO₂ 培养箱内让其贴壁 24 h,更换 10% FBS-RPMI 1640 培养基,并加入 Lac-NCTD 系列质量浓度 (2.75、8.25、16.5、33.0、49.5、66.0、98.99 g/mL) 的药物溶液,同时设置对照和空白孔,分别培养 12、24、48、72 h。实验终止前,每孔加入 5 g/L MTT 溶液 (MTT 溶于 0.01 mol/L、pH 7.2 的 PBS 中) 10 μL,继续置培养箱中孵育 4 h,终止培养,每孔加入 100 μL SDS,震荡 10 min,4 h 后使结晶充分溶解。用酶联免疫检测仪于波长 570 nm 处测定各孔吸光度 (*A*) 值,以空白孔调零,计算细胞存活率及药物对细胞的抑制率:细胞存活率 = 实验组 *A* 值 / 对照组 *A* 值 × 100%,抑制率 = (1 - 实验组 *A* 值 / 对照组 *A* 值) × 100%,并计算药物作用的 IC₅₀ 值。Lac-NCTD 对 HepG2、SMMC-7721、SGC-7901 的细胞毒作用见图 1,结果显示 Lac-NCTD 的细胞毒作用具有时间和剂量依赖性。

按上法操作,加入相同浓度的 NCTD、Lac-NCTD 和 Lac-NCTD-NPs 的药物溶液,按 MTT 法对 3 种细胞分别在介质 RPMI 1640-10% FBS 和 RPMI 1640-10% Gal-FBS 中培养 24、48 h,比较相同浓度的 3 种药物对 3 种肿瘤细胞的细胞毒性差异,并考察 Gal-FBS 对细胞毒性的抑制作用。NCTD、Lac-NCTD 和 Lac-NCTD-NPs 对各种细胞的 IC₅₀ (以 mmol/L 为单位) 及 Gal-FBS 对 IC₅₀ 的影响见表 1~3,结果显示孵育 24 h 时,Lac-NCTD 对 HepG2 和 SMMC-7721 细胞的 IC₅₀ 值低于 NCTD 和 Lac-NCTD-NPs,而孵育 48 h 时 Lac-NCTD-NPs 的 IC₅₀ 是最低的,其次是 Lac-NCTD;而对 SGC-7901,Lac-NCTD 的 IC₅₀ 值并不比 NCTD 低,随着孵育时间的延长甚至还高于 NCTD。同时,细胞用 Gal-FBS 预处理后,Lac-NCTD 和 Lac-NCTD-NPs 对 HepG2 和 SMMC-7721 的 IC₅₀ 升高,对 SGC-7901 则不变;而 NCTD 对 3 种细胞的 IC₅₀ 都不变。因此,对于 HepG2 和 SMMC-7721 细胞而言,当给予相同物质的量的药

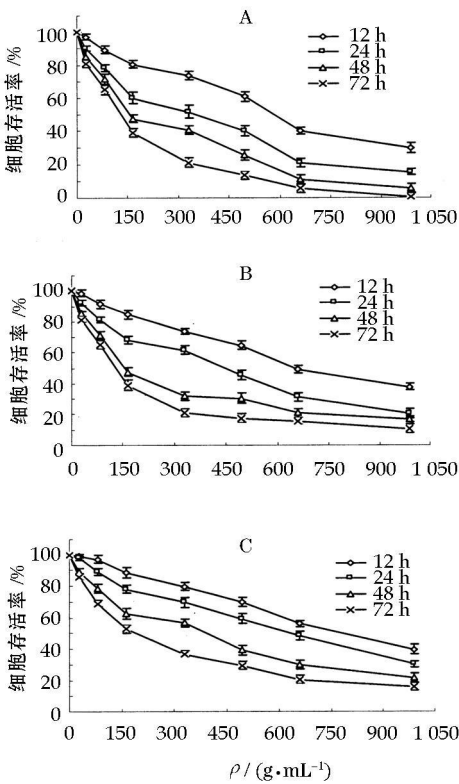


图 1 Lac NCTD 对 HepG2 (A)、SMMC 7721 (B)、SGC 7901 (C) 的细胞毒性 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Fig. 1 Cytotoxicity of Lac NCTD on HepG2 (A), SMMC 7721 (B), and SGC 7901 (C) cell lines ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

物时, *Lac-NCTD* 的抗癌效果要明显优于 *NCTD*。而 *Lac-NCTD-NPs* 对细胞处理 24 h 时, 它的抗癌活性不如 *Lac-NCTD*, 甚至 *NCTD*, 但当孵育 48 h 时, *Lac-NCTD-NPs* 的抗癌活性则远强于 *Lac-NCTD* 和 *NCTD*, 且能被 *GaIFBS* 抑制; 而对 *SGC-7901* 的抗癌活性则不如 *NCTD*。 *NCTD*、*Lac-NCTD* 和 *Lac-NCTD-NPs* 对两种细胞株 (一种是表面表达 *ASGPR* 的肝癌细胞株, 另一种是表面不表达 *ASGPR* 的胃癌细胞株) 的细胞毒作用的差异, 证实了部分药物是通过与肝细胞表面 *ASGPR* 结合而发挥抗癌活性的。

2.4 SMMC-7721 细胞对药物的摄取实验^[8]

2.4.1 HPLC 色谱条件: ODS 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 pH 3.2 磷酸水溶液 (10: 90); 体积流量: 0.8 mL/min; 柱温: 25 °C; 检测波长: 221 nm; 进样量: 20 μL。在上述色谱条件下, *Lac-NCTD* 的保留时间约为 5 min, 样品峰尖锐, 对称性良好, 杂质对有效成分的测定无干扰, 方法专属性好, 见图 2。

表 1 *NCTD*、*Lac NCTD* 和 *Lac NCTD NPs* 作用 24 和 48 h 对 HepG2 细胞的 IC_{50} 值 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 IC_{50} Value of *NCTD*, *Lac NCTD*, and *Lac NCTD NPs* on HepG2 cells at 24 and 48 h ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

药 物	24 h		48 h	
	10% FBS	10% GaIFBS	10% FBS	10% GaIFBS
<i>NCTD</i>	0.732 ± 0.12	0.734 ± 0.08	0.439 ± 0.06	0.429 ± 0.11
<i>LacNCTD</i>	0.602 ± 0.13 [#]	0.734 ± 0.04 [*]	0.300 ± 0.08 [#]	0.456 ± 0.05 [*]
<i>LacNCTD-NPs</i>	0.786 ± 0.09 ^{△△}	0.801 ± 0.06	0.219 ± 0.05 ^{△△}	0.311 ± 0.03 [*]

与 *NCTD* 比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与同组 10% FBS 比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$; 与 *Lac-NCTD* 比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$; 表 2、3 同

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs *NCTD*; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs 10% FBS of same group; [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs *Lac NCTD*; Tables 2 and 3 are same

表 2 *NCTD*、*Lac NCTD* 和 *Lac NCTD NPs* 作用 24 和 48 h 对 SMMC 7721 细胞的 IC_{50} 值 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

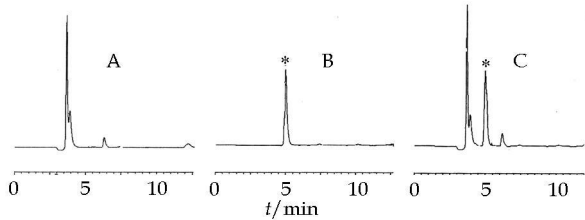
Table 2 IC_{50} Value of *NCTD*, *Lac NCTD*, and *Lac NCTD NPs* on SMMC 7721 cells at 24 and 48 h ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

药 物	24 h		48 h	
	10% FBS	10% GaIFBS	10% FBS	10% GaIFBS
<i>NCTD</i>	0.893 ± 0.07	0.890 ± 0.07	0.378 ± 0.06	0.377 ± 0.05
<i>LacNCTD</i>	0.815 ± 0.04 [#]	0.901 ± 0.10 [*]	0.285 ± 0.07 ^{##}	0.369 ± 0.04 [*]
<i>LacNCTD-NPs</i>	0.899 ± 0.05 [△]	0.945 ± 0.06	0.121 ± 0.05 ^{△△}	0.214 ± 0.03 [*]

表 3 *NCTD*、*Lac NCTD* 和 *Lac NCTD NPs* 作用 24 和 48 h 对 SGC 7901 细胞的 IC_{50} 值 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 IC_{50} Value of *NCTD*, *Lac NCTD*, and *Lac NCTD NPs* on SGC 7901 cells at 24 and 48 h ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

药 物	24 h		48 h	
	10% FBS	10% GaIFBS	10% FBS	10% GaIFBS
<i>NCTD</i>	0.987 ± 0.11	0.996 ± 0.13	0.499 ± 0.05	0.490 ± 0.11
<i>LacNCTD</i>	0.998 ± 0.13	0.999 ± 0.14	0.584 ± 0.08 [#]	0.581 ± 0.05
<i>LacNCTD-NPs</i>	0.965 ± 0.09	0.962 ± 0.11	0.419 ± 0.05 ^{△△}	0.417 ± 0.02



A- 空白细胞匀浆液 B- *Lac NCTD* 对照品
C- 加入 *Lac NCTD* 的细胞匀浆液 * - *Lac NCTD*
A- blank cell homogenate B- *Lac NCTD* reference substance
C- cell homogenate sample with *Lac NCTD* * - *Lac NCTD*

图 2 乳糖化-α-甲斑螫素在 SMMC 7721 细胞中 HPLC 图
Fig. 2 HPLC Chromatogram of *Lac NCTD* in SMMC 7721 cells

2.4.2 线性范围: 精密称取 *Lac-NCTD* 对照品 10 mg, 置 10 mL 量瓶中, 用 PBS 定容后将其稀释不同的倍数, 得系列质量浓度的对照品储备液。将处于

对数生长期的 SMMC-7721 细胞用细胞刮取器刮下,并用适量 PBS 冲洗后,匀浆,得空白细胞匀浆液。分别在空白匀浆液中加入系列质量浓度的 Lac-NCTD 对照品储备液,涡旋混合 2 min, $250\,000\times g$ 离心 15 min,上清液过 $0.45\,\mu\text{m}$ 微孔滤膜,取 20 μL 进样,以峰面积对药物质量浓度作图,得到 Lac-NCTD 的线性范围为 $10\sim 1\,000\,\mu\text{g/mL}$,线性方程为 $Y=5\,324+3\,468.9 X$, $r=0.999\,1$,线性关系良好。

2.4.3 回收率和精密度:在空白细胞匀浆液中分别加入已知质量浓度的对照品储备液,配制高、中、低 3 个质量浓度的供试液,按 2.4.2 线性范围项处理样品,按上述色谱条件测定,得到回收率分别为 $(98.88\pm 1.73)\%$ 、 $(102.46\pm 1.06)\%$ 、 $(101.01\pm 1.38)\%$;一日内各质量浓度供试液重复测定 5 次得日内精密度分别为 0.913% 、 2.110% 、 2.613% ;连续测定 5 d,得日间精密度分别为 1.051% 、 2.456% 、 3.119% ;均符合样品的测定要求。

2.4.4 药物在培养基中的稳定性研究:将适量 Lac-NCTD 溶于 RPMI 1640-10% FBS 中,在 $37\,^{\circ}\text{C}$ 、 5% CO_2 培养箱中培养 6 d,于不同时间点取样, $250\,000\times g$ 离心 15 min,上清液过 $0.45\,\mu\text{m}$ 微孔滤膜,取 20 μL 进样,测定,结果见图 3。可见 Lac-NCTD 在细胞培养基中的稳定性不是很好,半衰期约 3.82 d,但在本实验所研究的摄取时间 (12 h) 内, Lac-NCTD 基本保持原型,故不影响摄取实验结果。

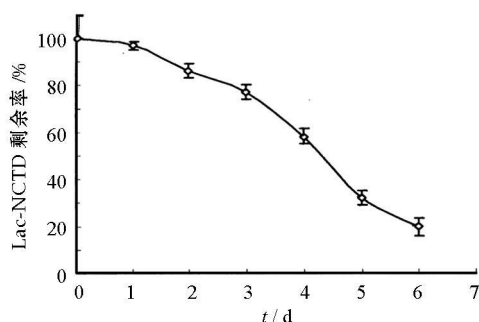


图 3 Lac-NCTD 在 RPMI 1640-10% FBS 中的半衰期 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Fig. 3 Half life of Lac-NCTD in RPMI 1640-10% FBS ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

2.4.5 SMMC-7721 细胞摄取实验:取对数期生长的 SMMC-7721 细胞于 6 孔培养板上 (每孔 1×10^6 个细胞), $37\,^{\circ}\text{C}$ 、 5% CO_2 培养箱内,让其贴壁 24 h,更换培养基 RPMI 1640-10% FBS,并加入 Lac-NCTD,使其终质量浓度为 $100\,\mu\text{g/mL}$,继续置培养

箱中培养 12 h 后,去除培养基,并用 PBS 轻轻冲洗 3 遍,去除细胞表面的杂质,用细胞刮取器刮下细胞,用适量 PBS 冲洗细胞后,进行细胞计数,并转移至具塞离心管,制备匀浆,按 2.4.2 线性范围项继续处理样品,进样得细胞摄取药物质量浓度,根据标准曲线方程,在 RPMI 1640-10% FBS 培养基中培养 12 h 后, SMMC-7721 细胞对 Lac-NCTD 的摄取量为 $3.89\,\mu\text{g}$ ($7.02\times 10^{-3}\,\mu\text{mol}$, 1×10^6 个细胞)。

2.5 体内抗肿瘤活性研究^[9]:H₂₂ 肝癌细胞复苏,离心,除去上清液,用生理盐水稀释重悬细胞,无菌条件下注射入小鼠腹腔,连续传代培养。肿瘤细胞传代培养 7 d 后,选取肿瘤腹水生长良好、腹部膨隆明显的小鼠,在无菌条件下,颈椎脱臼处死;75% 乙醇浸泡 0.5 h,切开腹部皮肤,用一次性无菌注射器经腹壁刺入腹腔,抽取腹水,腹水呈乳白色,用生理盐水稀释腹水肿瘤细胞悬液,调整细胞浓度为 $1\times 10^7/\text{mL}$ 。于每只实验小鼠右侧腋部皮下接种 0.1 mL/10 g,接种后小鼠随机分成模型组, NCTD (2.0 mg/kg) 组, Lac-NCTD 高、中、低剂量 (3.3、6.6、13.8 mg/kg) 组, Lac-NCTD-NPs 高、中、低剂量 (3.3、6.6、13.8 mg/kg) 组,每组 10 只。Lac-NCTD 与 Lac-NCTD-NPs 相应剂量组的摩尔浓度相同, NCTD 组的药物浓度与 Lac-NCTD 中剂量组一致。次日起每日定时 ip 给药 1 次,每日用游标卡尺测量并计算肿瘤体积 (肿瘤体积 = $d_1\times d_2^2\times 0.5$, d_1 为长径, d_2 为短径),连续给药 8 d。给药结束次日,将每组动物称体质量后颈椎脱臼处死,剥离小鼠皮下肿瘤、胸腺和脾脏,进行各指标的检测。

抑瘤率 = $(1 - \text{给药组瘤质量} / \text{模型组瘤质量}) \times 100\%$

脏器指数 = $\text{脏器质量} / \text{体质量} \times 100\%$

以各组小鼠每日肿瘤平均体积为纵坐标,时间为横坐标,绘制肿瘤生长曲线,部分结果见图 4。可见, NCTD、Lac-NCTD 和 Lac-NCTD-NPs 均能有效抑制肿瘤生长,在相同剂量下, Lac-NCTD-NPs 的体内抗肿瘤效果最为明显 ($P<0.01$)。

抑瘤结果见表 4,与肿瘤生长曲线结果一致,在相同剂量下, Lac-NCTD-NPs 的体内抗肿瘤效果最为明显,且随着剂量的增加, Lac-NCTD 和 Lac-NCTD-NPs 抑瘤率亦增加。

脏器指数结果 (表 5) 表明, Lac-NCTD-NPs 3 个剂量组的胸腺和脾脏指数均显著增加,说明其有保护脏器和促进免疫的功能,而 Lac-NCTD 只有高剂量组的胸腺和脾脏指数显著增加,说明其对免疫系统的影响没有 Lac-NCTD-NPs 大。

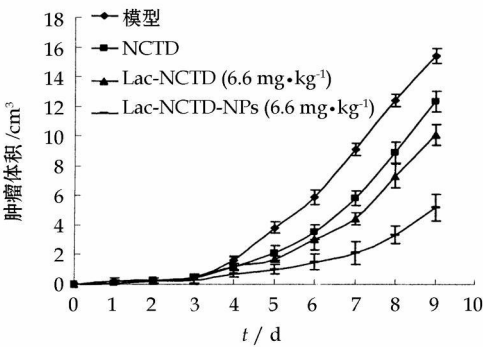


图 4 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤生长曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
Fig 4 Curve of tumor growth of H₂₂ tumor bearing mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

表 4 NCTD、Lac NCTD 和 Lac NCTD NPs 对 H₂₂ 荷瘤小鼠的抑瘤作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
Table 4 Inhibition of NCTD, Lac NCTD, and Lac NCTD NPs on tumor weight of H₂₂ tumor bearing mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组 别	剂 量 / (mg · kg ⁻¹)	体 质 量 / g		肿 瘤 质 量 / g	抑 瘤 率 / %
		给 药 前	给 药 后		
模型	-	19.4 ± 1.0	29.4 ± 3.4	1.44 ± 0.29	-
NCTD	2.0	18.7 ± 1.3	28.0 ± 3.5	1.01 ± 0.12*	29.8
Lac NCTD	3.3	19.0 ± 1.1	28.5 ± 2.9	1.05 ± 0.21*	27.1
	6.6	18.9 ± 0.9	27.9 ± 3.2	0.84 ± 0.14*	41.7 [△]
	13.8	20.0 ± 1.2	28.9 ± 3.1	0.67 ± 0.17**	53.5 ^{△△}
Lac NCTD NPs	3.3	19.3 ± 0.9	28.4 ± 2.9	0.98 ± 0.26*	31.9
	6.6	18.4 ± 0.9	27.6 ± 2.9	0.52 ± 0.21**	63.9 ^{△△}
	13.8	18.9 ± 1.4	29.3 ± 3.7	0.43 ± 0.10**	70.1 ^{△△}

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

与 NCTD 组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

[△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs NCTD group

表 5 NCTD、Lac NCTD 和 Lac NCTD NPs 对 H₂₂ 荷瘤小鼠脏器指数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 5 Effects of NCTD, Lac NCTD, and Lac NCTD NPs on organ indexes of H₂₂ tumor bearing mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组 别	剂 量 / (mg · kg ⁻¹)	胸 腺 指 数 /	脾 脏 指 数 /
		($\times 10^{-3}$)	($\times 10^{-3}$)
模型	-	1.02 ± 0.09	6.92 ± 1.22
NCTD	2.0	1.04 ± 0.10	7.91 ± 1.25*
Lac NCTD	3.3	1.09 ± 0.11	7.19 ± 1.34
	6.6	1.02 ± 0.14	7.22 ± 2.01
	13.8	1.03 ± 0.10	7.43 ± 1.78
Lac NCTD NPs	3.3	1.34 ± 0.17	8.75 ± 2.13*
	6.6	1.47 ± 0.20*	8.99 ± 2.00**
	13.8	1.59 ± 0.19**	9.39 ± 2.33**

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

3 讨论

HepG2 和 SMMC-7721 是人肝癌细胞株,其细胞表面表达 ASGP-R,ASGP-R 能专一性识别末端

含有半乳糖或乙酰氨基半乳糖的糖蛋白,而 SGC-7901 则是人胃癌细胞株,不表达 ASGP-R;Gal-FBS 是 ASGP-R 的竞争性抑制剂。HepG2 和 SMMC-7721 表面的 ASGP-R 能识别 Lac-NCTD 上的半乳糖残基,而达到主动肝靶向性,因此 Lac-NCTD 和 Lac-NCTD-NPs 对 HepG2 和 SMMC-7721 的细胞毒性比 NCTD 强,且这种主动靶向作用能被 Gal-FBS 抑制,而对 SGC-7901 的细胞毒性则稍差于 NCTD;NCTD 的作用与 ASGP-R 的识别无关,因此,其对 3 种肿瘤细胞的毒杀作用不受 Gal-FBS 的影响。而 Lac-NCTD-NPs 对细胞处理 24 h 时,它的细胞毒性不如 Lac-NCTD,但随着处理时间延长,Lac-NCTD-NPs 的细胞毒性则远强于 Lac-NCTD 和 NCTD,原因可能是药物从纳米粒中缓慢的释放,持续作用于细胞,避免了 HepG2 和 SMMC-7721 表面的 ASGP-R 的饱和现象,而体现出较强的抗癌活性。SMMC-7721 对 Lac-NCTD 的摄取实验结果进一步证实了部分药物是通过 ASGP-R 的识别吞噬作用而发挥抗癌效果的。

体内实验则进一步验证了 Lac-NCTD-NPs 强的抗癌活性,Lac-NCTD-NPs 进入体内后一部分 Lac-NCTD 不断从纳米粒内缓慢的释放,被血液中的酶和蛋白质等破坏或降解,部分则到达肝肿瘤的表面,而与 ASGP-R 结合,发挥抗癌活性;另一部分药物则仍包裹在纳米粒内,由于纳米粒的被动靶向性,而聚集在肝脏部位,纳米粒(粒径 < 200 nm)穿过肝脏肿瘤的窦状隙上的孔径^[10],到达肝细胞表面,释放原型药物 Lac-NCTD 与其表面的 ASGP-R 结合,而发挥作用。同时体内实验的脏器指数还表明纳米粒能促进免疫系统的活性,保护脏器。Lac-NCTD-NPs 结合了药物的主动靶向性和纳米粒自身的被动靶向性,在体内被肝细胞 ASGP-R 特异性识别,达到药物在体内的双重肝靶向作用,减少毒性,增加抗癌作用。

参考文献:

[1] Liu X H, Blazsek I, Comisso M, et al. Effects of norcantharidin, a protein phosphatase type 2A inhibitor, on the growth of normal and malignant haemopoietic cells [J]. Eur J Cancer, 1995, 31A(6): 953-963
[2] 陈晓艳,刘 扬,张 玮,等. 去甲基斑蝥素纳米粒肠道吸收的体内外相关性研究 [J]. 中草药, 2009, 40(12): 1930-1935
[3] Bettinger T, Remy J S, Erbacher P. Size reduction of galactosylated PEI/DNA complexes improves lectin mediated gene transfer into hepatocytes [J]. Bioconjug Chem, 1999, 10(4): 558-561
[4] Xu Z H, Chen L, Gu W W, et al. The performance of docetaxel loaded solid lipid nanoparticles targeted to hepatocellular carcinoma [J]. J Microencaps, 2009, 26(1): 1-10

- cellular carcinoma [J]. *Biomaterials*, 2008, 30(2): 226-232
- [5] 胡展红, 章良, 周奕, 等. 肝靶向去甲斑蝥素修饰物的合成及其纳米粒的制备 [J]. 中国药学杂志, 2009, 44(9): 679-685
- [6] 张玮, 刘扬, 张学农, 等. 低分子量壳聚糖去甲基斑蝥素纳米粒的表征及体外释放研究 [J]. 中草药, 2008, 39(10): 1477-1482
- [7] Yoshie M, Kumi K, Kazuo Y, *et al*. Efficiency of liposomes surface modified with soybean derived sterylglucoside as a liver targeting carrier in HepG2 cells [J]. *J Controlled Release*, 2001, 75(3): 381-389
- [8] Teng B S, Lu Y H, Wang Z T, *et al*. *In vitro* antitumor activity of isorhamnetin isolated from *Hippophae rhamnoides* L. against BEL-7402 cells [J]. *Pharm Res*, 2006, 54(3): 186-194
- [9] 范锋, 孙晓飞. 去甲斑蝥素-半乳糖衍生物的合成与抗癌活性 [J]. 药学学报, 2008, 42(8): 157-161
- [10] James D B, Tania B, Lisa B P. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics [J]. *Adv Drug Del Rev*, 2008, 60(15): 1615-1626

虎杖苷对脑出血性损伤大鼠血清白细胞介素-1 β 和脑组织 Bcl-2 蛋白表达的影响

刘 铭¹, 刘 华², 张国平², 张宇燕³, 万海同³, 杨洁红^{3*}

(1. 浙江大学医学院附属邵逸夫医院, 浙江 杭州 310016; 2. 浙江大学医学院附属第二医院, 浙江 杭州 310009; 3. 浙江中医药大学心脑血管病研究所, 浙江 杭州 310053)

摘要:目的 探讨虎杖苷对大鼠脑出血性损伤的治疗作用及作用机制。方法 采用Ⅶ型胶原酶诱导大鼠脑出血, 建立脑出血模型, 观察虎杖苷对大鼠神经功能症状、脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)活力、丙二醛(MDA)水平、脑组织 Bcl-2 蛋白表达, 及血清中白细胞介素-1 β (IL-1 β)水平的影响。结果 与脑出血模型组相比, 虎杖苷(25、50、100 mg/kg)可显著改善脑出血后神经功能缺损, 提高脑组织 SOD 活力、降低 MDA 水平, 增加 Bcl-2 蛋白表达, 降低血清中 IL-1 β 水平, 其作用与剂量呈正相关。结论 虎杖苷通过对抗自由基损伤、抗凋亡及抗炎等作用, 发挥对大鼠脑出血损伤的治疗作用。

关键词: 虎杖苷; 脑出血; Ⅶ型胶原酶; Bcl-2 蛋白; 白细胞介素-1 β

中图分类号: R286.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)12-2010-04

Effect of polydatin on IL-1 β in serum and protein expression of Bcl-2 in brain tissue of cerebral hemorrhage injured rats

LIU Ming¹, LIU Hua², ZHANG Guo-ping², YANG Jie-hong³, ZHANG Yu-yan³, WAN Hai-tong³

(1. Sir Run Run Shaw Hospital of Medical College, Zhejiang University, Hangzhou 310053, China; 2. Second Affiliated Hospital of Medical College, Zhejiang University, Hangzhou 310053, China; 3. Institute of Cardiovascular Diseases, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

Abstract: **Objective** To explore the effects and mechanisms of polydatin on rats with brain hemorrhagic injury. **Methods** The cerebral hemorrhage model in rats was induced by local injection of type VII collagenase and they were randomly divided into six groups. The treated groups were treated with polydatin and Na₂O₂ solution; The normal and control groups were only treated with water. The changes of neurological defect were observed. The activity of SOD, the content of MDA, the protein expressions of Bcl-2 in brain tissue, and the contents of IL-1 β in serum were measured. **Results** Compared with the cerebral hemorrhage model group, polydatin (25, 50, and 100 mg/kg) could significantly reduce the symptoms of neurological deficits of cerebral hemorrhage rats, raise the activity of SOD, reduce the content of MDA, increase the protein expressions of Bcl-2, and decrease the contents of IL-1 β in serum. Its effects were positively correlated with the dose-effect. **Conclusion** Polydatin has therapeutic effect on rats of cerebral hemorrhage, through against free radical damage and inhibiting neuronal apoptosis and inflammatory.

Key words: polydatin; cerebral hemorrhage; collagenase VII Bcl-2 protein; interleukin-1 β

收稿日期: 2010-04-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30873430, 30973933); 浙江省中医药管理局项目 (2007CA061)

作者简介: 刘 铭 (1968—), 男, 主任医师, 主要开展中医临床基础研究。E-mail: yannoo7376@126.com

* 通讯作者 杨洁红 E-mail: yannoo7376@sina.com