

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.30.011

N- 三甲基壳聚糖包裹喜树碱治疗卵巢癌淋巴结转移的研究

周莉娜¹ 向江东²

(1 同济大学附属第一妇婴保健院 上海 200040; 2 上海交通大学附属第一人民医院 上海 200080)

摘要 目的:采用 N- 三甲基壳聚糖包裹喜树碱(CPT-TMC)以增加其水溶性,并检测其抑制卵巢癌细胞淋巴结转移的效应。**方法:**体外实验,PI 染色检测 CPT-TMC 促肿瘤细胞凋亡作用,体内实验,荷瘤裸鼠随机分为 4 组(5 只/组):NS 组、TMC 组、CPT 组及 CPT-TMC 组,通过尾静脉给药,每周 2 次,持续 3 周,Evan's Blue Dye 染色,显影腹腔肿大转移的淋巴结。**结果:**PI 染色提示 CPT-TMC 显著促进肿瘤细胞凋亡($P<0.05$);Evan's Blue Dye 显影显示 CPT-TMC 显著抑制肿瘤细胞淋巴结转移($P<0.05$)。**结论:**CPT-TMC 具有明显抑制卵巢癌细胞淋巴结转移效应,它可能成为一种新的有效的卵巢癌治疗药物。

关键词:N- 三甲基壳聚糖;喜树碱;卵巢癌;淋巴结转移

中图分类号:R737.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)30-5841-04

The Impact on Lymph node Metastasis of Ovarian Cancer Based on N-trimethyl Chitosan Chloride-encapsulated Camptothecin

ZHOU Li-na¹, XIANG Jiang-dong²

(1 Shanghai First Maternity and Infant Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai, 200040, China;

2 Shanghai Jiao Tong University Affiliated Fist People's Hospital, Shanghai, 200080, China)

ABSTRACT Objective: In the current study, we encapsulated camptothecin with N-trimethyl chitosan (CPT-TMC) to increase its solubility and tested it on ovarian cancer model. **Methods:** For in vitro study, PI staining was performed to evaluate cell apoptosis. For in vivo study, tumor-bearing mice were randomly divided into four groups (5 per group): NS, TMC, CPT and CPT-TMC group, and different group received the corresponding treatment via tail vein twice per week for three weeks. Evan's Blue Dye was used to indicate lymphatic vessels and swell lymph nodes in abdominopelvic cavity. **Results:** In vitro, PI staining showed CPT-TMC can significantly induce cell apoptosis ($P<0.05$). In vivo, CPT-TMC can effectively inhibit metastasis to lymph nodes ($P<0.05$). **Conclusions:** The present findings indicate that CPT-TMC may provide an effective approach to inhibit lymph node metastasis of ovarian cancer and it may be a potential novel effective approach to ovarian cancer.

Key words: Camptothecin; N-trimethyl chitosan; Lymphatic metastasis; Ovarian cancer

Chinese Library Classification(CLC): R737.31 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)30-5841-04

前言

卵巢癌是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤之一,死亡率高,五年生存率为 20%-30%之间^[1]。肿瘤复发和转移率高,导致长期生存率低下,成为临床卵巢癌治疗的主要障碍^[2]。寻找有效的化疗药物及其衍生物以提高中晚期卵巢癌患者的生存率,改善其生存质量,已成为目前临床研究的热点和关键。

喜树碱 (Camptothecin, CPT) 是一种从中国珙桐科植物喜树中提取出来的生物碱,是典型的 Topo I 抑制剂,能特异性结合拓扑异构酶 I(Topo I),形成药物-酶-DNA 复合物,阻断细胞 DNA 复制,触发细胞程序性凋亡,实现抗肿瘤作用^[3]。正因为这种特殊的抗肿瘤机制,降低了 CPT 与其他抗肿瘤化疗药物之间的交叉耐药性。研究发现 CPT 对结肠癌、直肠癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、黑色素瘤等多种恶性肿瘤均有一定疗效^[4-7]。同时,大量实验证实多种肿瘤细胞如结肠癌、宫颈癌、卵巢癌等 Topo I 含量大大高于正常组织,且在 S 期肿瘤细胞中此酶活性大幅提高,因此 CPT 可选择性抑制增殖期肿瘤细胞 DNA 复制,具

有较好的选择性^[8]。

然而,天然喜树碱极难溶于水,易受光、湿度、氧化剂等影响,在体内其活性内酯环不稳定,毒性和不良反应较大^[9]。因此,寻找有效的药物传递系统来弥补药物的自身缺陷,使喜树碱的功能得以更好地发挥,进而更好地应用于临床,成为目前研究的焦点。

N- 三甲基壳聚糖 (N-trimethyl chitosan, TMC) 是将壳聚糖 (Chitosan, CS) 分子中的氨基进行甲基化修饰而制得的生物高分子季铁盐。研究指出,TMC 能溶解于酸性、中性甚至是碱性溶液,具有良好的生物降解性、生物相容性和高安全性,可增加黏膜促透性,是大分子药物的黏膜吸收促进剂,在作为药物载体时可以控制药物释放、延长药物疗效、降低药物毒副作用^[12,13],能有效促进大分子药物在黏膜细胞间的转运,大大促进药物的吸收^[14,15]。在本实验中,我们采用 TMC 包裹 CPT,以提高其水溶性,增强其抗癌活性,并命名该复合物为 CPT-TMC。我们将 CPT-TMC 应用于人卵巢浆液性囊腺癌淋巴转移细胞株 SKOV3/VEGF-D,观察其抗肿瘤细胞淋巴结转移的效应。

1 材料与方法

1.1 材料

作者简介:周莉娜(1982-),女,硕士,住院医师,研究方向:妇科肿瘤,电话:13661847225,E-mail:nanazhou1213@163.com

(收稿日期:2014-03-07 接受日期:2014-04-01)

人卵巢浆液性囊腺癌淋巴转移细胞株 SKOV3/VEGF-D, 由四川大学国家重点实验室友情提供。BALB/c 雌性裸鼠, 鼠龄 6~8 周, 体重 18~20 克, 购自北京利华维通公司。喜树碱购自西安 Sciphar Biotechnology 公司, N-三甲基壳聚糖购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 SKOV3/VEGF-D 细胞为贴壁生长细胞, 用含 10% 胎牛血清及 100mg G418 的 RPMI-1640 培养液在 37℃、5% CO₂ 条件下进行培养, 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。

1.2.2 CPT-TMC 的制备 CPT-TMC 是通过微量沉淀反应和超声处理相结合而制备的。概括而言, 首先将 30 mg 喜树碱溶于 5 mL 二甲亚砜, 制备浓度为 6 mg/mL 的喜树碱溶液。然后将 TMC 溶解于水, 浓度制备为 5 mg/mL。接下来, 在 4℃ 条件下, 将 0.1 mL 喜树碱溶液滴加入 2 mL TMC 溶液中。然后在 4℃ 条件下将获得的胶体溶液超声处理 10 min。最后用截留分子量为 8000-10000 的膜 (Solarbio, China) 将胶体溶液从水中透析出来。透析 3 天后, 用 10000×g 离心溶液 10 分钟, 以除去不溶解的 CPT。

1.2.3 PI 染色检测细胞凋亡 PI 为特异性 DNA 染料, 不能通过正常的细胞膜, 但能特异性透过凋亡或坏死细胞膜使其红染, 可以将正常细胞和凋亡或坏死细胞区分开来。具体步骤如下: 将生长至瓶壁 60-80% 且状态良好的 SKOV3/VEGF-D 细胞, 用胰酶消化后接种于六孔板, 每孔接种 2.5×10^5 个细胞, 37℃、5% CO₂ 孵箱培养 24 h; 吸尽各孔培养液, 分别用不同浓度的 CPT-TMC、CPT (0.04 μg/mL 0.08 μg/mL 0.16 μg/mL) 及 TMC 处理细胞 48 小时, 对照组细胞加 RPMI-1640 完全培养基 2 mL; 48 h 后弃上清, PBS 洗两遍, 加入 70% 冷乙醇 0.5 mL/孔固定 10 分钟后吸尽固定液, PBS 洗两遍。加入 0.5 mL/孔 PI 染液 (50 μg 碘化丙啶、0.1 枸橼酸钠、0.1% Triton X-100), 在暗室状态下染色 10 min; 于倒置荧光显微镜下观察细胞形态学变化。

1.2.4 动物模型的建立及治疗方案 收集处于对数生长期、状

态良好的 SKOV3/VEGF-D 细胞, 在每只小鼠左后肢足垫皮下接种 2×10^6 个肿瘤细胞。接种 1 周后, 将荷瘤裸鼠随机分为 4 组 (5 只/组): NS 组、TMC 组、CPT 组和 CPT-TMC 组, 并通过尾静脉注射给药, 每周 2 次, 持续 3 周, 药物浓度分别为: CPT-TMC (2.5 mg/kg)、CPT (2.5 mg/kg)、TMC (25 mg/kg)、0.9% NS。

1.2.5 Evan's Blue Dye 显影淋巴管及淋巴结 处死小鼠之前, 进行 Evan's Blue Dye 灌注显影。首先, 小鼠腹腔内注射少量水合氯醛。麻醉显效后, 将 5 mg/ml 的 Evan's Blue Dye 缓慢平稳的注射入裸鼠爪垫肿瘤皮下。通过 Evan's Blue Dye 的显影, 直观观察区域淋巴结蓝染、肿大及淋巴管扩张情况。

1.2.6 HE 染色显示转移淋巴结 取各组淋巴结以 4% 多聚甲醛固定、石蜡包埋, 连续切片, HE 染色光学显微镜下观察各组腹壁淋巴结的转移情况。

1.2.7 毒副作用观察 规律测量裸鼠体重, 观察各组裸鼠的精神状况和生存状态, 如有无体重减轻、厌食、腹泻、皮肤溃疡、活动减少及恶病质等。裸鼠处死后, 取各组裸鼠的心脏、肝、脾、肺、肾等器官作组织切片, 行 HE 染色, 镜下观察各脏器改变。

1.2.8 统计学分析 计量资料以均数±标准差表示, 均数比较采用方差分析 (ANOVA), 样本率比较采用卡方检验。SPSS 13.0 软件进行统计学差异分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CPT-TMC 体外诱导 SKOV3/VEGF-D 细胞凋亡

SKOV3/VEGF-D 细胞分为 4 个观察组, 接种于 6 孔板, 分别接受 CPT-TMC、CPT、TMC 及完全培养基的处理。48 小时后行 PI 染色, 倒置荧光显微镜下观察细胞形态学变化, 结果显示对照组细胞状态良好, 形态完整, 细胞数明显增多, 而接受 CPT-TMC 及 CPT 处理的细胞, PI 染色见凋亡阳性细胞逐渐增多, 与 NS 及 TMC 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), (图 1)。

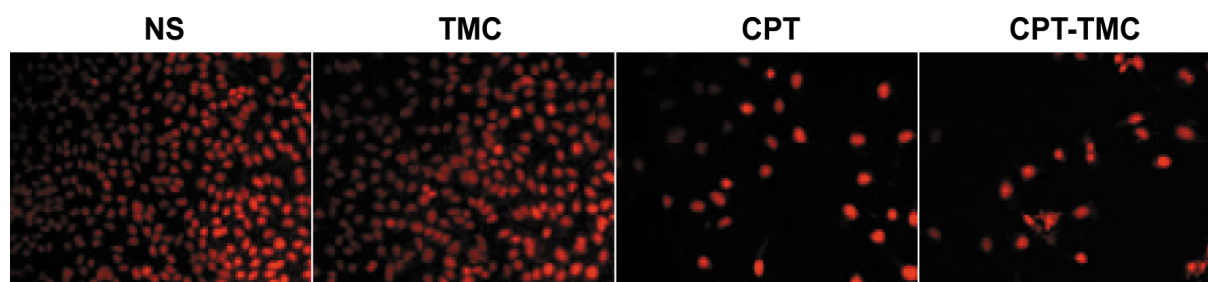


图 1 PI 染色显示 CPT-TMC 及 CPT 诱导 SKOV3/VEGF-D 细胞凋亡的作用 ($\times 400$)。CPT-TMC 及 CPT 组细胞数目明显减少、细胞稀疏、细胞核浓缩变圆, 凋亡细胞较对照组明显增多, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)

Fig.1 PI staining showed apoptosis inducible effects of CPT-TMC and CPT on SKOV3/VEGF-D cells ($\times 400$). CPT-TMC and CPT obviously decreased the cell number, increased apoptosis cells ($P < 0.05$)

2.2 Evan's Blue Dye 显示腹腔淋巴结转移情况。

肿瘤细胞在小鼠盆腹腔的转移淋巴结主要包括髂动脉旁淋巴结和肾门旁淋巴结。瘤细胞沿着淋巴回流的方向经各级淋巴结, 最后到达全身而发生远处转移。对小鼠进行解剖, 显示经 Evan's Blue Dye 显影后的腹腔淋巴结着色情况, 间接提示可能的淋巴结转移情况。

各组淋巴结显影结果: NS 和 TMC 组, 髂动脉旁淋巴结及肾门旁淋巴结明显肿大、蓝染, 胸导管蓝染并有脾肿大; CPT

组: 髂动脉旁淋巴结肿大较明显, 变蓝, 肾门旁淋巴结稍肿大、蓝染; CPT-TMC 组: 髂动脉旁淋巴结隐约蓝染, 稍肿大, 肾门旁淋巴结几乎不可见 (图 2)。

2.3 盆腹腔淋巴结转移率比较

HE 染色结果显示 CPT-TMC 组盆腹腔各级淋巴结转移率均低于对照组, 与 NS 及 TMC 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 与 CPT 组无明显差异, 淋巴结转移情况见表 1。

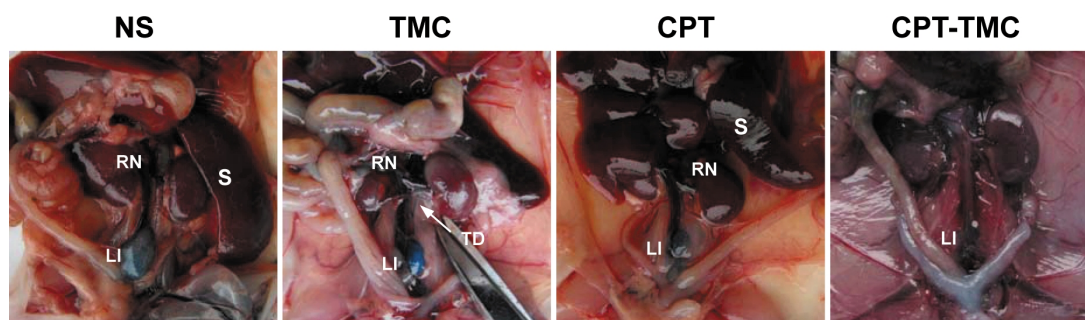


图2 Evan's Blue Dye 显示盆腹腔蓝染淋巴结。NS 和 TMC 组:髂动脉旁淋巴结及肾门旁淋巴结明显蓝染,胸导管蓝染(箭头所示),脾肿大;CPT 组:髂动脉旁淋巴结蓝染明显,肾门旁淋巴结可见蓝染;CPT-TMC 组:仅见髂动脉旁淋巴结隐约蓝染

LI: 髂淋巴结; RN: 肾门淋巴结; TD: 胸导管; S: 脾

Fig.2 Evan's Blue Dye visualized lymph nodes in abdominopelvic cavity. In NS and TMC groups, lymphoglandulae iliaca and renal hilar lymph nodes were swell and blue-stained apparently, thoracic duct was also delineated blue (indicated by arrow), and spleen was swell. In CPT group, lymphoglandulae iliaca was significantly blue-stained, renal hilar lymph node was blue-stained ambiguously. In CPT-TMC group, lymphoglandulae iliaca was only tenuous blue

LI: lymphoglandulae iliaca; RN: renal hilar lymph node; TD: thoracic duct; S: spleen.

Table 1 Comparison of lymph node metastases in abdominopelvic cavity

Treatment	n	LI	RN
NS	5	3(60%)	2(40%)
TMC	5	3(60%)	1(20%)
CPT	5	1(20%)	0(0%)
CPT-TMC	5	0(0%)	0(0%)

注: LI: 髂动脉旁淋巴结; RN: 肾门旁淋巴结。

Note: PN: Popliteal lymph node; LI: lymphoglandulae iliaca; RN: Renal hilar lymph node.

2.4 毒副作用

为了观察 CPT-TMC 有无明显的毒副作用,每隔 4 天测量一次小鼠体重,并对小鼠食欲,情绪等进行观察,时间长达 3 个月。接受 CPT 治疗的小鼠,在 3 周治疗结束后逐渐出现尾静脉给药部位周围组织发黑及坏死,CPT-TMC 组只有 1 只出现坏死,NS 及 TMC 组无此现象,四组小鼠之间体重无明显差异 ($P>0.05$)(图 3)。处死小鼠后,取各组小鼠的心、肝、脾、肺、肾、脑、胰腺、小肠、骨髓等脏器,进行肉眼观察,并制成石蜡切片,HE 染色,光学显微镜下观察没有发现明显的病理性改变。

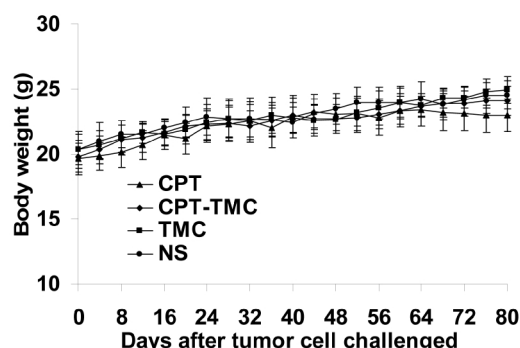


图3 各组裸鼠体重比较。

CPT-TMC 组与其他对照组比较体重变化无明显差异 ($P>0.05$)

Fig.3 Body weight comparison

CPT-TMC-treated group paralleled very closely to that of the control groups with no significant differences among them ($P>0.05$). Values presented as means $\pm$ SE

3 讨论

卵巢癌是严重威胁妇女健康的恶性疾病,其发病率仅次于宫颈癌,死亡率居妇科恶性肿瘤首位^[16],5 年生存率在 20% ~ 30%。卵巢癌对化疗敏感,但化疗药物的毒副作用往往使病人无法继续接受化疗。为此,研究者们开始不断尝试寻找各种新型、有效、全身毒副作用小的化疗药物和治疗方式。

喜树碱 (Camptothecin, CPT) 是从我国珙桐科植物喜树根皮中分离出的一种细胞毒性很强的生物碱。喜树碱类药物属于拓扑异构酶 I 抑制剂,其通过与 Topo I - DNA 复合物可逆结合,形成 CPTs - Topo I - DNA 三元复合物,抑制拓扑异构酶活性,降低肿瘤细胞的 DNA 复制、重组、转录、修复过程中超螺旋化 DNA 的扭转应力,诱导细胞周期阻滞,促进细胞凋亡,从而达到抗肿瘤的作用^[17]。正因为这种特殊的抗肿瘤机制,喜树碱与其他抗肿瘤化疗药物间几乎无交叉耐药性。

然而,喜树碱在体内代谢不稳定、水溶性差、生物利用度低、毒副作用大,限制了它的临床应用。近年来,采用新型纳米粒子药物传递系统增加化疗药物水溶性,改善溶解度和稳定性,制备高抗肿瘤活性、低毒副作用的化疗药物复合物,已成为目前肿瘤界研究的热点。

N- 三甲基壳聚糖(N-trimethyl chitosan, TMC)是目前应用较多的一种壳聚糖的季铁盐,易溶于水,且保持了壳聚糖的生物可降解性、组织生物相容性好、低毒性、粘附性和成膜能力良好等优良特性^[18],能显著增加药物在体内的吸收^[19]。TMC 作为药物载体,目前已被成功应用于多种药物给药途径,例如经鼻

给药、经肠道给药、经眼部给药等^[20-23]。本实验中,我们采用TMC包裹喜树碱,有效地解决了喜树碱水溶性差的问题,明显地降低了毒副作用,改善了喜树碱的生物利用度。

本实验将CPT-TMC应用于人卵巢癌淋巴结转移模型,观察其在体内的抗肿瘤细胞淋巴结转移的效应以及其在体外促进肿瘤细胞凋亡的效应。体外实验中CPT-TMC与对照组相比较,能够明显促进卵巢癌细胞凋亡,这一结果符合CPT的抗肿瘤机制,与既往关于CPT在其他肿瘤中的应用研究结果相符。与对照组比较,CPT-TMC在体内能够明显抑制肿瘤细胞发生淋巴结转移。这一结果与CPT能够抑制卵巢癌细胞增殖促进其凋亡相关,具体的抑制淋巴结转移的机制,需进一步行后续实验深入研究。盆腹腔淋巴结转移率在CPT-TMC(0%)及CPT(20%)组之间无统计学差异,这与本实验样本量有限有关,在后续实验中可通过增加样本量得到更全面的结果。连续测量裸鼠体重显示,CPT-TMC组裸鼠体重与对照组相比无显著差异,提示CPT-TMC在体内无明显毒副作用。

综上,TMC包裹CPT之后并没有降低其抗肿瘤细胞增殖,促进凋亡的作用;在体内,CPT-TMC能够显著抑制肿瘤细胞发生淋巴结转移,并且没有明显毒副作用。本实验为卵巢癌,尤其是晚期卵巢癌患者的治疗提供指导意义。

参考文献(References)

- [1] Kobayashi E, Ueda Y, Matsuzaki S, et al. Biomarkers for screening, diagnosis, and monitoring of ovarian cancer [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2012, 21(11):1902-1912
- [2] Ozols RF, Bookman MA, Connolly DC, et al. Focus on epithelial ovarian cancer [J]. *Cancer Cell*, 2004, 5:19-24
- [3] Liu LF, Desai SD, Li TK, et al. Mechanism of action of camptothecin [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 922(1):1-10
- [4] Van Hattum AH, Pinedo HM, Schluper HM, et al. The activity profile of the hexacyclic camptothecin derivative DX-8951f in experimental human colon cancer and ovarian cancer [J]. *Biochem Pharmacol*, 2002, 64:1267-1277
- [5] Wang Li-min, Li Qing-yong, Zu Yuan-gang, et al. Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of CPT13, a novel camptothecin analog, on human colon cancer HCT8 cell line [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2008, 176:165-172
- [6] Cichorek M. Camptothecin-induced death of amelanotic and melanotic melanoma cells in different phases of cell cycle [J]. *Neoplasia*, 2011, 58(3):227-234
- [7] Lee DH, Kim SW, Suh C, et al. Belotecan, new camptothecin analogue, is active in patients with small-cell lung cancer: results of a multicenter early phase II study [J]. *Annals of Oncology*, 2008, 19: 123-127
- [8] Adams DJ, Morgan LR. Tumor Physiology and Charge Dynamics of Anticancer Drugs: Implications for Camptothecin-based Drug Development [J]. *Curr Med Chem*, 2011, 18(9):1367-1372
- [9] Kusari S, Zühlke S, Spiteller M. Correlations between camptothecin and related metabolites in *Camptotheca acuminata* reveal similar biosynthetic principles and in planta synergistic effects [J]. *Fitoterapia*, 2011, 82(3):497-507
- [10] Batist G, Ramakrishnan G, Rao CS, et al. Reduced cardiotoxicity and preserved antitumor efficacy of liposome-encapsulated doxorubicin and cyclophosphamide compared with conventional doxorubicin and cyclophosphamide in a randomized, multicenter trial of metastatic breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2001, 19:1444-1454
- [11] Li Y, Guan H, Liu C, et al. Nanoparticle as a new gene transferring vector in specific expression gene [J]. *National Medical Journal of China*, 2002, 82(5):341-344
- [12] Nagpal K, Singh SK, Mishra DN. Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery [J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2010, 58(11):1423-1430
- [13] Park JH, Cho YW, Chung H, et al. Synthesis and characterization of sugar-bearing chitosan derivatives: aqueous solubility and biodegradability [J]. *Biomacromolecules*, 2003, 4(4):1087-1091
- [14] Hamman JH, Stander M, Kotze AF. Effect of the degree of quaternization of N-trimethyl chitosan chloride on absorption enhancement: in vivo evaluation in rat epithelia [J]. *Int J Pharm*, 2002, 232:235-242
- [15] van der Merwe SM, Verhoef JC, Verheijden JH, et al. Trimethylated chitosan as polymeric absorption enhancer for improved peroral delivery of peptide drugs [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2004, 58(2): 225-235
- [16] Mozzetti S, Ferlini C, Concolino P, et al. Class III beta-tubulin overexpression is a prominent mechanism of paclitaxel resistance in ovarian cancer patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(1):298-305
- [17] Capranico G, Marinello J, Baranello L. Dissecting the transcriptional functions of human DNA topoisomerase I by selective inhibitors: implications for physiological and therapeutic modulation of enzyme activity [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1806(2):240-250
- [18] Sinha VR, Singla AK, Wadhawan S, et al. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs [J]. *Int J Pharm*, 2004, 274:1-33
- [19] Sahni JK, Chopra S, Ahmad FJ, et al. Potential prospects of chitosan derivative trimethyl chitosan chloride (TMC) as a polymeric absorption enhancer: synthesis, characterization and applications [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2008, 60(9):1111-1119
- [20] Mourya VK, Inamdar NN. Trimethyl chitosan and its applications in drug delivery [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2009, 20(5):1057-1079
- [21] du Plessis LH, Kotzé AF, Junginger HE. Nasal and rectal delivery of insulin with chitosan and N-trimethyl chitosan chloride [J]. *Drug Deliv*, 2010, 17(6):399-407
- [22] Nazar H, Fatouros DG, van der Merwe SM, et al. Thermosensitive hydrogels for nasal drug delivery: the formulation and characterisation of systems based on N-trimethyl chitosan chloride [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2011, 77(2):225-232
- [23] Wang S, Zhang J, Jiang T, et al. Protective effect of Coenzyme Q(10) against oxidative damage in human lens epithelial cells by novel ocular drug carriers [J]. *Int J Pharm*, 2011, 403(1-2):219-229