

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00337

键合多西紫杉醇的聚乳酸-聚乙二醇嵌段共聚物对前列腺癌 PC-3 细胞增殖抑制作用

Inhibitory effect of docetaxel conjugate PLA-PEG block copolymers on proliferation of prostate cancer cell line PC-3

刘韶晖¹, 徐效义¹, 田玉新², 王 瑞³, 刘铜军^{4*}, 景遐斌³

1. 吉林大学白求恩第一医院急诊科, 长春 130021
2. 吉林省肿瘤医院泌尿外科, 长春 130012
3. 中国科学院长春应用化学研究所高分子物理与化学国家重点实验室, 长春 130022
4. 吉林大学中日联谊医院结直肠肛门外科, 长春 130030

[摘要] **目的** 研究键合多西紫杉醇(TSD)的聚乳酸-聚乙二醇嵌段共聚物(PLA-PEG/TSD)对人前列腺癌细胞 PC-3 的增殖抑制作用。**方法** TSD、PLA-PEG/TSD 和聚乳酸-聚乙二醇(PLA-PEG)作用于 PC-3 细胞,应用 MTT 法检测各组药物在不同浓度下作用 24、48、72 h 后 PC-3 细胞的抑制率,应用流式细胞仪检测 PC-3 细胞周期变化,应用电镜观察 PC-3 细胞凋亡的形态学特征。**结果** PLA-PEG/TSD 和 TSD 比较,对 PC-3 细胞的增殖抑制作用相似($P>0.05$),并且两组均具有浓度和时间依赖性,随药物浓度和作用时间的增加,抑制率逐渐增高。PLA-PEG 和对照组比较,对 PC-3 细胞的增殖没有影响($P>0.05$)。流式细胞仪检测结果显示:PLA-PEG/TSD 和 TSD 两组 PC-3 细胞明显阻滞于 G₂/M 期,两组相比较差异无统计学意义($P>0.05$),与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。电镜观察:PLA-PEG/TSD 和 TSD 两组 PC-3 细胞凋亡的形态学特征一致。**结论** PLA-PEG/TSD 与 TSD 相比较,抑制 PC-3 细胞增殖的特点和机制相似,PLA-PEG/TSD 在治疗前列腺癌方面有研究价值。

[关键词] 多西紫杉醇;聚乳酸-聚乙二醇嵌段共聚物;前列腺肿瘤;PC-3 细胞;细胞增殖;细胞凋亡

[中图分类号] R 737.25 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2011)03-0337-02

近年来,以多西紫杉醇(docetaxel, taxotere, TSD)为基础的联合化疗被证实可延长激素抵抗性前列腺癌(HRPC)患者的生存期^[1-2]。聚乳酸-聚乙二醇嵌段共聚物(PLA-PEG)是由疏水部分和亲水部分共聚而成的,这种两性亲水共聚物在水溶液中能形成具有壳-核结构的胶束,有利于携带药物^[3],实现药物的靶向性作用^[4]、缓释作用^[5]等。本研究 PLA-PEG/TSD 对激素非依赖性前列腺癌 PC-3 细胞的增殖抑制作用特点,为其进一步研究提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 PLA-PEG/TSD、PLA-PEG 由中国科学院长春应用化学研究所合成。人前列腺癌 PC-3 细胞(购自宝泰克公司)培养于含 10% 小牛血清(购自 BIOCHROM AG 公司)的 RPMI 1640 培养液(购自 Gibco 公司)中,培养液中添加 100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素。孵箱中常规培养(37℃, 5% CO₂, 饱和湿度),2~3 d 消化传代 1 次,待细胞进入对数生长期后备用。

1.2 细胞增殖抑制率检测(MTT)实验 消化对数生长期的 PC-3 细胞,制成 5×10⁴/ml 细胞悬液,接种于 96 孔平板,每孔加入 5×10³ 细胞悬液,置于 37℃、5% CO₂ 条件下培养 24 h,使细胞贴壁。分别加入不同浓度(0.1、0.5、1、5、10、50、100 μmol/L)的 TSD、PLA-PEG/TSD 和 PLA-PEG 200 μl,

并用 RPMI 1640 培养液设对照组。分别培养 24、48、72 h,采用 MTT 法,加 MTT 工作液 20 μl/孔,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 4 h,小心吸去上清,加入二甲基亚砜 0.15 ml/孔,置平板振荡器上振荡 10 min。用 Bio-Red550 酶标仪测定 490 nm 波长处的光密度值(D 值)。实验重复 3 次,设复孔 5 个,检测各组细胞的抑制率。细胞增殖抑制率=(对照孔 D 值-实验孔 D 值)/对照孔 D 值×100%。

1.3 电镜检测 PC-3 细胞中分别加入 50 μmol/L 的 TSD、PLA-PEG/TSD 和 RPMI 1640 培养液,2 d 后消化并收集细胞,戊二醛固定,丙酮逐级脱水,用 Epon812 包埋,进行超薄切片,拍摄电镜照片,观察超微结构。

1.4 流式细胞仪检测细胞周期变化 取对数生长期细胞,制成 5×10⁵/ml 浓度的细胞悬液,接种于 24 孔板。24 h 后更换培养液,分别加入浓度为 50 μmol/L 的 PLA-PEG/TSD、TSD 和 RPMI 1640 培养液。在 48 h 后分别消化各组细胞,制成细胞悬液,PBS 溶液洗涤 2 次,加入 70% 冷乙醇,4℃ 固定 24 h。将制备好的单细胞悬液离心(230×g, 10 min),弃去固定液,冷 PBS 漂洗 2 次(230×g, 5 min),调整细胞密度为 1×10⁶/L,加入 PI 染液,避光染色 30 min,消化后的细胞悬液用 300 目的尼龙膜过滤。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,均数间比较采用 *t* 检验,样本率的比较采用 χ^2 检验。

[收稿日期] 2011-01-20 **[接受日期]** 2011-02-24

[作者简介] 刘韶晖,博士生,主治医师, E-mail: lsh751213@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0431-84995554, E-mail: tongjunliu@163.com

检验水平(α)为0.05。

2 结果

2.1 PLA-PEG/TSD对PC-3细胞增殖抑制作用 用TSD和PLA-PEG/TSD处理的PC-3细胞,随浓度的增加和作用

时间的延长,抑制率增加。PLA-PEG/TSD组和TSD组差异无统计学意义($P>0.05$)。用PLA-PEG和RPMI 1640培养液处理的PC-3细胞增殖抑制率差异无统计学意义($P>0.05$)。见图1。

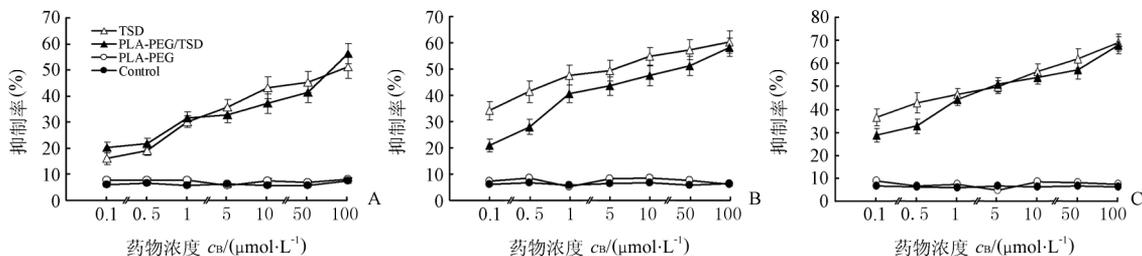


图1 PC-3细胞经各组药物不同浓度下作用之后的抑制率
A: 作用24 h; B: 作用48 h; C: 作用72 h. $n=5, \bar{x} \pm s$

2.2 细胞凋亡超微结构变化 PC-3细胞分别经PLA-PEG/TSD和TSD作用48 h后,细胞凋亡的超微结构变化特征一致。早期凋亡细胞表现为细胞基质浓缩,电子密度变深,细胞核异染色质边集,线粒体内室肿胀;晚期凋亡细胞基质进一步浓缩,电子密度更深,染色质逐渐凝聚,呈新月状附于核膜周边,细胞核固缩、核膜内陷,碎裂成小块,直至形成许多形态各异的凋亡小体。

2.3 应用流式细胞仪检测 经PLA-PEG/TSD和TSD作用48 h后的PC-3细胞明显阻滞于G₂/M期,两组间差异无统计学意义($P>0.05$),与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 各组PC-3细胞经药物作用48 h后细胞周期分布
(%, $n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
对照组	67.59±5.36	19.53±3.82	12.87±3.07
TSD组	28.01±4.21*	20.64±3.17	51.35±4.56*
PLA-PEG/TSD组	32.69±4.57*	18.59±4.26	48.72±3.83*

* $P<0.05$ 与对照组比较

3 讨论

前列腺癌的治疗以内分泌治疗为主,但多数在内分泌治疗开始后的18个月左右进展为HRPC,HRPC患者的中位生存时间大约为10~20个月。美国临床肿瘤学会于2004年年会上报道了TAX327^[1]和SWOG9916^[2]这2个Ⅲ期临床试验结果,从而确立了TSD作为HRPC治疗的核心地位。

TSD是紫杉醇的衍生物,紫杉醇是从紫杉的树皮中提取的一种化合物,具有抗癌作用。临床试验中,应用TSD的患者不良反应较为明显,表现为胃肠道的症状(如恶心、呕吐)加重,心血管系统的不良事件(如静脉血栓、肺栓塞等)增多^[1]。

本研究旨在应用PLA-PEG作为TSD的载体,以期实现药物靶向治疗肿瘤,增加TSD的药效,减小其副作用。作为药物载体,PLA-PEG具有如下特点和优势:(1)PLA-PEG具有两亲性,在水溶液中能形成核-壳结构的胶束^[5];(2)用

PLA-PEG胶束载药有利于难溶性药物在血液中溶解,同时对药物还有控释作用^[5];(3)PLA-PEG胶束的壳层结构、粒子大小等特点使其可以避免被网状内皮系统(RES)摄取,具有较长的血液循环时间;PLA-PEG胶束具有抗蛋白质或多肽黏附的特点,减小了细胞非特异性黏附的可能性,避免了被单核吞噬细胞系统(MPS)吞噬^[4];(4)借助EPR效应,PLA-PEG胶束对肿瘤可产生被动靶向性;(5)PLA-PEG具有良好的生物相容性,并具有生物降解性质,其代谢产物通过肾脏等排出;(6)PLA-PEG表面有活性基团,可以连接靶向配基、特异性抗体等^[4]。

本实验中,MTT的结果显示PLA-PEG/TSD和TSD相比较具有相似的抗肿瘤细胞疗效,对PC-3细胞的抑制作用具有浓度和时间的依赖性。PLA-PEG对PC-3细胞的增殖没有抑制作用,这说明PLA-PEG/TSD对PC-3细胞的抑制作用是源于TSD,而PLA-PEG仅仅起到药物载体的作用。电镜结果和流式细胞仪检测结果显示,PLA-PEG/TSD和TSD在诱导细胞凋亡的机制上是相似的,即抑制微管解聚,干扰细胞的有丝分裂,使PC-3细胞阻滞于G₂/M期。

【参考文献】

- [1] Tannock I F, de Wit R, Berry W R, Horti J, Pluzanska A, Chi K N, et al. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer[J]. N Engl J Med, 2004, 351: 1502-1512.
- [2] Petrylak D P, Tangen C M, Hussain M H, Lara P N Jr, Jones J A, Taplin M E, et al. Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer[J]. N Engl J Med, 2004, 351: 1513-1520.
- [3] 王占峰, 罗毅男, 郑勇辉, 韩海玲, 洪新雨, 景遐斌. 键合紫杉醇的纳米胶束与C₆胶质瘤细胞的互相作用[J]. 高等学校化学学报, 2008, 29: 1671-1676.
- [4] 李珺婵, 方晓玲. 嵌段共聚物胶束作为抗肿瘤药物载体的研究进展[J]. 国外医学: 药学分册, 2004, 31: 48-53.
- [5] 李晓然, 袁晓燕. 聚乙二醇-聚乳酸共聚物药物载体[J]. 化学进展, 2007, 19: 973-981.

【本文编辑】 尹 茶