

叶酸靶向顺铂聚合物胶束对肺癌细胞 SPC-A-1 的毒性和辐射增敏作用

黄宇翔 王萱怡 刘永彪 吴银霞 杨航 姚志峰 徐国平

(南京医科大学第一附属医院放疗科 南京 210029)

摘要 以顺铂为对照,使用具有叶酸靶向基团的聚乙二醇枝接聚天冬氨酸聚合物胶束顺铂载体 FA-PEG-g-PAsp-CDDP 和无叶酸靶向基团的 mPEG-g-PAsp-CDDP,通过比较这3种药物对肺癌细胞 SPC-A-1 体外的细胞毒性以及单独用药和同步放疗对裸鼠移植瘤的生长抑制作用,验证 FA-PEG-g-PAsp-CDDP 的肿瘤抑制和辐射增敏效果。在体外 CCK-8 实验中比较顺铂、FA-PEG-g-PAsp-CDDP 和 mPEG-g-PAsp-CDDP 对过表达叶酸受体的肺癌细胞株 SPC-A-1 的细胞毒性作用,在体内试验中比较顺铂、FA-PEG-g-PAsp-CDDP 和 mPEG-g-PAsp-CDDP 单独用药和同步放疗对裸鼠移植瘤的生长抑制及放射增敏作用,并观察对裸鼠体重的影响。结果显示:含过量叶酸的普通培养基中 FA-PEG-g-PAsp-CDDP 和 mPEG-g-PAsp-CDDP 的细胞毒性作用相似,而在不含叶酸培养基中 FA-PEG-g-PAsp-CDDP 的细胞毒性高于 mPEG-g-PAsp-CDDP, IC₅₀ 约为后者的 1/3 ($p < 0.05$)。单独用药实验中 FA-PEG-g-PAsp-CDDP 和 CDDP 体内抑瘤效果无统计学差异 ($p > 0.05$),但均高于 mPEG-g-PAsp-CDDP 组和空白对照组 ($p < 0.05$);同步放化疗实验中 FA-PEG-g-PAsp-CDDP 的抑瘤效果优于 CDDP ($p < 0.05$),并且两者均优于 mPEG-g-PAsp-CDDP 组和单独放疗组 ($p < 0.05$)。裸鼠 CDDP 给药后体重下降明显,最多下降约 10%,而 FA-PEG-g-PAsp-CDDP 和 mPEG-g-PAsp-CDDP 组裸鼠体重无明显下降。FA-PEG-g-PAsp-CDDP 能有效抑制肿瘤生长,叶酸靶向基团增强了其对过表达叶酸受体肿瘤的抑制作用,并且较 CDDP 有更强的放射增敏效果和更低的毒副作用。

关键词 顺铂, 叶酸, 聚合物胶束, 肿瘤靶向, 放疗, 肺癌细胞

中图分类号 R734.2, R730.55, R730.53

顺铂[cis-Diamminedichloroplatinum (II), CDDP]是一种临床常用的广谱抗肿瘤药物,对非小细胞肺癌的治疗具有里程碑式意义,也是第一个能治愈小细胞肺癌的药物,可以显著改善睾丸癌、卵巢癌、膀胱癌、头颈部癌等的预后^[1]。顺铂还是一种放疗增敏剂,广泛用于 IV 期不能手术的 NSCLC 患者的局部放疗,将局部晚期 NSCLC 的 5 年生存率提高了 15%^[2]。然而小分子的顺铂缺乏靶向性,在杀伤肿瘤细胞的同时,对正常细胞也有较明显的毒副作用,如胃肠道毒性,神经毒性,耳毒性,骨髓抑制,特别是急性肾毒性^[3]。其次,肿瘤的内源性和获得性药物抵抗也降低了顺铂的疗效。而顺铂同步放疗在增加疗效的同时,毒副反应也明显增加。解决的方法之一,是构建新型纳米载药系统,比如非胶束形态的水溶性聚合物,长循环脂质体和聚合物胶束。

聚合物胶束具有高水溶性、高药物装载率、低毒性等优点,并有肿瘤靶向作用,包括被动靶向和主动靶向。肿瘤生长迅速,未成熟血管大量增生,外膜细胞缺乏,淋巴管道回流障碍引起肿瘤血管渗透性增加,聚合物胶束穿过缺损的肿瘤血管内皮,因清除障碍而蓄积在肿瘤组织中,即 EPR 效应 (Enhanced permeability and retention effect)^[4,5]。而低分子量的药物如顺铂可以通过自由扩散返回到血循环之中,不能长时间停留在肿瘤之内。且直径 20—100 nm 的聚合物胶束不能透过正常血管,在靶向肿瘤的同时减少了正常组织中的非特异性聚集,这便是聚合物胶束的被动靶向。聚合物胶束表面还可以结合肿瘤靶向分子,如抗体、凝集素、糖类、激素等,通过与肿瘤组织中高表达的特异性受体结合,递送药物到肿瘤部位而实现主动靶向给药的作用。

国家自然科学基金 (30870741)、江苏省自然科学基金 (BK2007245) 资助

第一作者: 黄宇翔,男,1984 年 10 月出生,2008 年于中山大学中山医学院获医学学士学位,现为南京医科大学硕士研究生,肿瘤学专业

通讯作者: 刘永彪, Email: yongbiaoliu@yahoo.com.cn

收稿日期: 初稿 2012-03-23, 修回 2012-04-26

用。叶酸受体 (Folate acid receptor, FR) 在非小细胞肺癌, 卵巢癌, 宫颈癌, 头颈部癌等多种恶性肿瘤中高表达, 但在正常组织中低表达。因此, 叶酸 (Folate acid, FA) 被广泛应用于抗肿瘤药物主动靶向研究^[6]。

本研究的目的是检测并比较带或不带叶酸靶向基团的聚乙二醇接枝聚天冬氨酸聚合物胶束顺铂载体, FA-PEG-g-PAsp-CDDP、mPEG-g-PAsp-CDDP 与 CDDP 在体外对人肺腺癌细胞的细胞毒性, 及其单独用药和同步放疗对荷瘤裸鼠模型的肿瘤抑制和放疗增敏效果, 并初步探讨其毒副作用, 为顺铂聚合物胶束的临床应用提供理论依据。

1 实验材料和方法

1.1 叶酸靶向顺铂聚合物胶束

叶酸靶向的顺铂聚合物胶束载体 FA-PEG-g-PAsp-CDDP 和无叶酸靶向基团的顺铂聚合物胶束载体 mPEG-g-PAsp-CDDP 由华东师范大学余家会教授提供。该聚合物胶束按照文献^[7]所列举的方法合成。所有顺铂聚合物胶束药物的粒径均在 100 nm 左右, 呈核壳结构, CDDP 载药量 (质量分数) FA-PEG-g-PAsp-CDDP 为 15.2%, mPEG-g-PAsp-CDDP 为 17.9%。

1.2 人肺腺癌细胞株和细胞培养条件

高表达叶酸受体的 SPC-A-1 人肺腺癌细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。细胞生长于含 10% 胎牛血清 (四季青, 中国) 的 RPMI 1640 含叶酸培养基 (Gibco, 美国) 或 RPMI 1640 无叶酸培养基 (Gibco) 中, 并含青霉素和链霉素各 100 U/mL (Gibco)。在恒温培养箱中以 5% CO₂、37℃ 及饱和湿度条件下传代培养。

1.3 体外细胞毒性试验 (CCK-8)

对数生长期的 SPC-A-1 细胞, 调整细胞浓度, 以 2.5×10^4 /L, 每孔 100 μ L 接种于 96 孔培养板中。设阴性对照组、CDDP 组、mPEG-g-PAsp-CDDP 组和 FA-PEG-g-PAsp-CDDP 组。1—4 组为含叶酸培养基培养的细胞, 5—8 组为无叶酸培养基培养的细胞, 每组设 6 个平行孔。细胞培养 24 h 贴壁后, 实验组每孔加入 100 μ L 含药培养基, 以 CDDP 计量加药至终浓度为 0.1、1、10 和 100 μ g/mL, 阴性对照组加入 100 μ L 不含药培养基。置正常培养条件下培养 48 h 后, 每孔加入 CCK-8 (Dojindo, 日本) 溶液 10 μ L, 继续培养 4 h, 然后用酶标仪测定在

450 nm 处的吸光度 (OD)。实验重复 3 次, 计算细胞存活率, 细胞存活率 (%) = 实验组平均 OD 值 / 阴性对照组平均 OD 值 $\times 100\%$, 使用 GraphPad Prism 5.0 软件计算 IC₅₀, 使用 SPSS 16.0 软件独立样本 *t* 检验统计 IC₅₀ 差异。

1.4 裸鼠移植模型肿瘤抑制、放疗增敏试验及对裸鼠体重的影响

BALB/c 雄性裸鼠 60 只, 4—5 周, 体重 18—20 g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。在南京医科大学实验动物中心饲养, 室温 20℃—23℃、湿度 45%—55%。由于普通小鼠饲料中含有过量叶酸, 会影响实验结果, 所以喂食裸鼠的是订制的低叶酸饲料, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。每只裸鼠右腹股沟皮下注射含 5×10^6 SPC-A-1 细胞的细胞悬液 0.2 mL, 构建人肺腺癌裸鼠移植模型。肿瘤种植 10 d 后, 除 4 只未成瘤裸鼠外, 56 只荷瘤裸鼠随机分为 8 组, 每组 7 只, 分别为: (1) 空白对照组、(2) CDDP 组、(3) mPEG-g-PAsp-CDDP 组、(4) FA-PEG-g-PAsp-CDDP 组、(5) 单独放疗组、(6) CDDP+放疗组、(7) mPEG-g-PAsp-CDDP +放疗组、(8) FA-mPEG-g-PAsp-CDDP+放疗组。分组后给予处理如下: 对照组尾静脉注射给予 0.2 mL 的 PBS; 实验组尾静脉注射以 CDDP 计量 3 mg/kg 的 CDDP 或聚合物胶束, 连续 3 d 每天给一次药。同步放疗组在给药后 4 h 给予 2 Gy 剂量射线照射瘤灶, 连续 3 d。照射源为南京医科大学第二附属医院提供的为 6 MV 直线加速器, 射线为 X 线, 源皮距 100 cm, 射线方向由下朝上。照射时肌肉注射 100 mg/kg 体重的盐酸氯胺酮将裸鼠麻醉, 肿瘤下放置 2 cm 厚的蜡板, 每次同时照射 4 只小鼠, 照射野 1.5 cm $\times$ 15 cm, 照射右腹股沟肿瘤区, 避免照射腹部、脊柱等重要区域。隔日观察裸鼠的肿瘤生长情况, 测体重及肿瘤长短径, 肿瘤体积公式: $V = ab^2/2$ (V 为肿瘤体积, a 为肿瘤长径, b 为肿瘤短径)。给予处理 10 d 后终止实验, 计算肿瘤净增率 = [(第 10 天体积 - 第 0 天体积) / 第 0 天体积 - 1] $\times 100\%$, 小鼠体重改变比率 = [(第 10 天体重 - 第 0 天体重) / 第 0 天体重 - 1] $\times 100\%$, 使用 SPSS 16.0 软件独立样本 *t* 检验统计各组肿瘤净增率差异。

2 结果

2.1 顺铂聚合物胶束对肿瘤细胞的生长抑制作用

CCK8 法检测结果显示, 对含叶酸培养基培养

的肿瘤细胞的抑制作用, CDDP>FA-PEG-g-PAsp-CDDP $\approx$ mPEG-g-PAsp-CDDP (见图 1(a)和表 1), 而对不含叶酸培养基培养的肿瘤细胞的抑制作用, CDDP>FA-PEG-g-PAsp-CDDP>mPEG-g-PAsp-CDDP (见图 1(b)和表 1)。由于市售的普通培养基中含有过量叶酸, 所以 SPC-A-1 细胞表面的 FR 饱和, 两

种聚合物胶束肿瘤抑制效果相当。而不含叶酸培养基中, 10%胎牛血清即可提供生理浓度的叶酸, 通过与叶酸受体高亲和力结合, FA-PEG-g-PAsp-CDDP 显著提高了对肿瘤的抑制作用, IC₅₀ 约为 mPEG-g-PAsp-CDDP 的 1/3 (见图 1, $p<0.05$)。

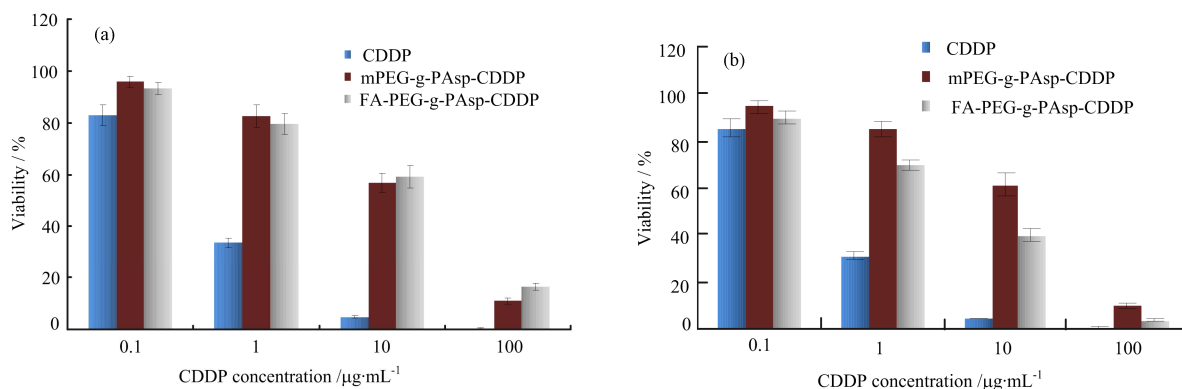


Fig.1 Cytotoxicity of CDDP, mPEG-g-PAsp-CDDP and FA-PEG-g-PAsp-CDDP after 48 h incubation time on FR-positive SPC-A-1 cell lines. Data are presented as $\bar{x} \pm s$ ($n=6$). (a) Folate-overdose culture medium; (b) Folate-free culture medium

Table 1 Cytotoxicity of CDDP, mPEG-g-PAsp-CDDP and FA-PEG-g-PAsp-CDDP in FR-positive SPC-A-1 cell lines determined by CCK8 assay. (FA+) Folate-overdose culture medium; (FA-) Folate-free culture medium

	IC ₅₀ /µg·mL ⁻¹	
	FA+	FA-
CDDP	0.52±0.06	0.46±0.06
mPEG-g-PAsp-CDDP	14.63±0.63	16.38±0.97
FA-PEG-g-PAsp-CDDP	16.67±1.01	5.87±0.68

2.2 顺铂聚合物胶束对荷瘤裸鼠肿瘤抑制及放射增敏效果

各组间的肿瘤抑制效果的差异通过比较各组肿

瘤净增率得出。在单独化疗组中 (见图 2(a)), 3 种药物组的肿瘤抑制效果较对照组均显著提高 ($p<0.05$), CDDP 和 FA-PEG-g-PAsp-CDDP 肿瘤抑制效果无明显差异 ($p>0.05$), 但均高于 mPEG-g-PAsp-CDDP 组 ($p<0.05$)。在同步放射治疗组中 (见图 2(b)), CDDP 和 FA-PEG-g-PAsp-CDDP 的肿瘤抑制效果较单独放疗组显著提高 ($p<0.05$), 并且 FA-PEG-g-PAsp-CDDP 的放射增敏效果优于 CDDP ($p<0.05$)。以上结果说明, mPEG-g-PAsp-CDDP 和 FA-PEG-g-PAsp-CDDP 均能有效抑制肿瘤生长, 叶酸靶向基团增强了 FA-PEG-g-PAsp-CDDP 的肿瘤抑制作用, 并且 FA-PEG-g-PAsp-CDDP 较 CDDP 有更强的放射增敏效果。

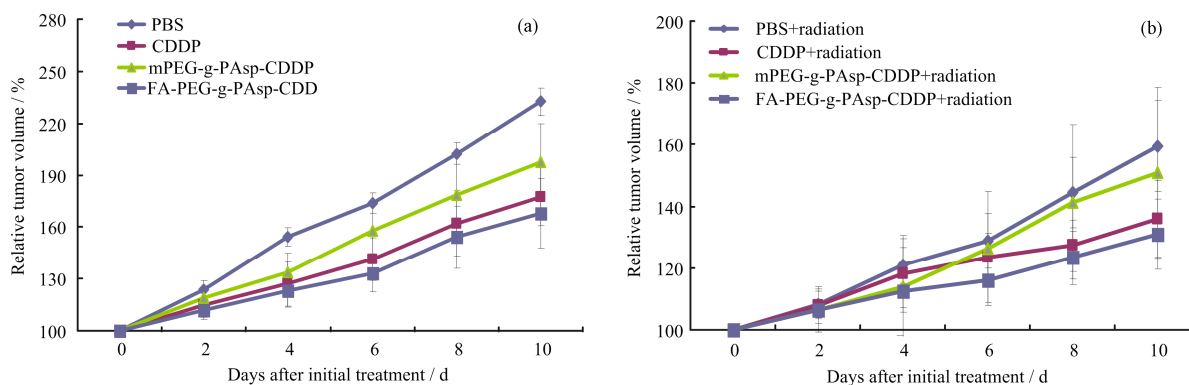


Fig.2 Effect of CDDP, mPEG-g-PAsp-CDDP and FA-PEG-g-PAsp-CDDP on the growth of SPC-A-1 tumor-bearing mice. Drugs were administered at a dose of 3 mg/kg on a cisplatin basis once per day from day 0 to day 2. 2 Gy of radiation was given 4 h after drug delivery in concurrent chemo-radiation groups. (a) Chemo-therapy alone; (b) Concurrent chemo-radiation

2.3 各组裸鼠给药后体重的变化

在单独化疗组(见图3(a))和同步放化疗组(见图3(b))中, CDDP 给药后裸鼠体重出现明显下降, 给药后第4天下降最明显, 体重下降约10%。而对

对照组、mPEG-g-PAsp-CDDP 组和 FA-PEG-g-PAsp-CDDP 组体重无明显降低, 顺铂聚合物胶束显示出良好的安全性。

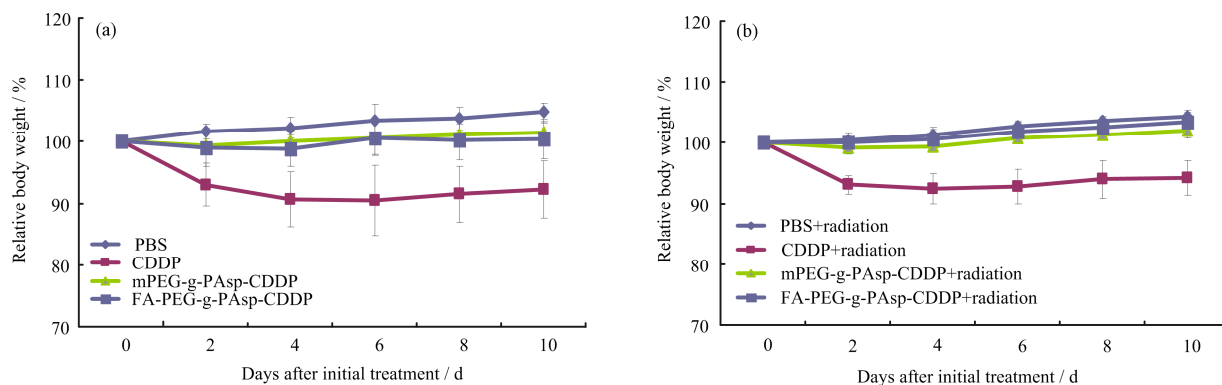


Fig.3 Body weight change with time of SPC-A-1 tumor-bearing mice treated with CDDP, mPEG-g-PAsp-CDDP and FA-PEG-g-PAsp-CDDP. Drugs were administered at a dose of 3 mg/kg on a cisplatin basis once per day from day 0 to day 2.2 Gy of radiation was given 4 h after drug delivery in concurrent chemo-radiation groups. (a)Chemo-therapy alone; (b)Concurrent chemo- radiation

3 讨论

聚合物胶束是由疏水基团为内核, 亲水基团为外壳, 在水中自组装形成的直径 10—100 nm 的纳米载体。其内核可以装载疏水性药物、核酸和蛋白质等, 而外壳具有亲水性, 将内核装载的药物等与外界环境隔离, 提高了胶束的水溶性和体内的生物相容性。并且外壳可以修饰分子靶向配体, 使之具有组织或者器官的特异性^[8]。聚乙二醇[Poly (ethylene glycol), PEG]是聚合物胶束最常用的亲水基团, 在体内水环境中, 胶束表面的 PEG 链伸展开来, 通过立体排斥机制抑制蛋白、抗体等大分子的吸附。除此之外, PEG 还能阻止网状内皮系统和单核吞噬系统对胶束的识别和清除, 使胶束血液循环时间明显延长^[9,10]。

Nishiyama 等^[11]报道了 PEG-聚天冬氨酸[PEG-P(Asp)] 聚合物胶束作为 CDDP 载体。铂离子以配位键与聚天冬氨酸侧链的羧基连接, 该胶束在蒸馏水中十分稳定, 而在有充足氯离子的环境中, 比如生理盐水或血液中顺铂可持续而缓慢地游离出来发挥作用, 静脉注射 4—8 h 后, 血浆铂浓度仍能保持在给药浓度的 61%左右。尾静脉注射荷瘤小鼠后, 该胶束的顺铂浓度-时间曲线下面积, 在血浆和肿瘤中分别比 CDDP 原药高 5.2 倍和 4.6 倍, 抗癌效果和 CDDP 原药相当。最近 Nishiyam 等还报道了 PEG-聚谷氨酸[PEG-P(Glu)] 聚合物胶束作为奥沙利铂载体^[12]。和 PEG-P(Asp)载体一样, PEG-P(Glu)延长了药物的血循环时间, 并且在原发和转移性肿

瘤小鼠模型中抗肿瘤效果均优于奥沙利铂原药。

许多动物实验表明, 聚合物胶束显著提高了药物的生物相容性和生物利用率, 增强了抗肿瘤效果, 降低了毒副作用^[9-12]。但是在体外试验中, 聚合物胶束往往需要几倍到几十倍的浓度才能到达和原药相同的效果^[13]。这是因为聚合物胶束主要是通过胞吞途径被细胞摄取, 并且释药较缓慢, 而小分子原药如顺铂则可以迅速通过被动扩散进入细胞。因此, 在体外相同浓度下显示出更强的杀伤作用^[14]。而在体内环境下, 小分子原药从血浆中迅速清除, 聚合物胶束的循环时间长, 肿瘤靶向等优势便体现出来, 表现出和体外实验完全不同的结果。聚合物胶束等药物载体治疗肿瘤的优势不仅在于空间的靶向性, 还在于长时间稳定释药带来的肿瘤敏感性增强。最近一项研究显示, 与大剂量短时间的化疗药物相比, 肿瘤细胞对小剂量长时间的药物更敏感^[15]。实验结果表明, 在体外环境下, CDDP 抑瘤效果优于顺铂聚合物胶束, 但在体内环境中, 单独用药组抑瘤效果 FA-PEG-g-PAsp-CDDP 有高于顺铂的趋势(见图 2(a)), 虽然差异无统计学意义。

聚合物胶束本身具有肿瘤被动靶向的 EPR 效应, 但是由于不同种类的肿瘤血管通透性有差异, 单独通过 EPR 效应可能无法产生足够的抑瘤效应。如在体内实验单独用药组中, mPEG-g-PAsp-CDDP 的抑瘤效果显著低于 CDDP。在修饰肿瘤主动靶向分子后, 理论上将进一步增强肿瘤部位的药物摄取。体外实验结果显示, 在有过量叶酸的条件下, mPEG-g-PAsp-CDDP 组和 FA-PEG-g-PAsp-CDDP 的抑瘤效

果接近(见图1(a)和表1),但是生理叶酸浓度下,叶酸靶向基团使顺铂聚合物胶束抑瘤效果提高了3倍(见图1(b)和表1)。体内实验结果显示,在单独用药组和同步放化疗组中,FA-PEG-g-PAsp-CDDP的抑瘤效果均显著优于mPEG-g-PAsp-CDDP($p<0.05$)。

放射增敏剂是提高肿瘤局部控制率和提高生存率的重要途径,含顺铂的同步放化疗已成为鼻咽癌、宫颈癌、局部晚期非小细胞肺癌等多种肿瘤推荐的治疗方案。但疗效提高的同时,顺铂带来的毒副作用也增加了患者的痛苦。本实验中FA-PEG-g-PAsp-CDDP和CDDP对荷瘤裸鼠连续3天给药,并同步给予放疗2 Gy,肿瘤抑制效果均优于单独放疗。更重要的是,虽然单独用药两者效果无显著差异,联合放疗后FA-PEG-g-PAsp-CDDP的疗效优于CDDP($p<0.05$),显示出更强的放射增敏效果。

从图3中可以看出,裸鼠CDDP给药后体重下降明显,最多下降约10%。这是由于CDDP分子量低,静脉注射后会迅速分布于全身各器官,从而产生胃肠道反应等多种毒副作用。鼠静脉注射CDDP,15 min内大部分CDDP就会从肾小球快速滤过清除,并且短时间内在肾脏聚集产生峰值浓度,而后者可能是CDDP的严重并发症急性肾毒性的元凶^[16]。而大分子的聚合物胶束则不易从肾脏滤过,血液循环时间显著延长,在各器官和肿瘤中缓慢聚集,降低了肾脏的峰值浓度,从而降低了肾毒性^[17,18]。本实验所采用的聚合物胶束载体,是由FA-PEG接枝聚天冬氨酸衍生物PAsP制得。PEG无毒,无免疫原性,分子量50000D以下时能通过肾脏排出体外,不会在体内蓄积。并且肝脏的细胞色素P450可将PEG氧化分解为小分子,从胆汁中排泄,目前已经通过FDA认证可应用于人体。而叶酸和天冬氨酸均为人体所必需的营养成分,因而该接枝共聚物胶束具有良好的安全性,本研究顺铂聚合物胶束组裸鼠体重无明显降低也证实了这一点。

4 结论

研究表明,无论体外还是体内实验,FA-PEG-g-PAsp-CDDP的抑瘤效果均优于mPEG-g-PAsp-CDDP,叶酸靶向基团的引入显著提高了该聚合物胶束的抑瘤作用。在体外实验中,CDDP的肿瘤抑制效果高于FA-PEG-g-PAsp-CDDP和mPEG-g-PAsp-CDDP,与文献报道一致^[13]。在体内同步放化疗实验中,FA-PEG-g-PAsp-CDDP显示出比CDDP更佳的放疗增敏效果。并且FA-PEG-g-PAsp-CDDP在不降低CDDP疗效的基础上,可能可以减轻

CDDP的毒副作用,但还需要在未来的实验中进一步验证。在未来的动物或临床实验中,有望通过应用更高的可耐受剂量,获得更强的抗肿瘤疗效。以上结果说明,FA-PEG-g-PAsp-CDDP无论是单独用药,还是作为放疗增敏剂,均具有良好的应用前景。

参考文献

- 1 Wang D, Lippard S J. Cellular processing of platinum anticancer drugs [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, **4**(4): 307-320
- 2 Ohe Y. Chemoradiotherapy for lung cancer [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2005, **6**(16): 2793-2804
- 3 Pinzani V, Bressolle F, Haug I J, et al. Cisplatin-induced renal toxicity and toxicity-modulating strategies: a review [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1994, **35**(1): 1-9
- 4 Kawaguchi T, Honda T, Nishihara M, et al. Histological study on side effects and tumor targeting of a block copolymer micelle on rats [J]. *J Control Release*, 2009, **136**(3): 240-246
- 5 Talelli M, Iman M, Varkouhi AK, et al. Core-crosslinked polymeric micelles with controlled release of covalently entrapped doxorubicin [J]. *Biomaterials*, 2010, **31**(30): 7797-8804
- 6 Zhao H, Yung L Y. Selectivity of folate conjugated polymer micelles against different tumor cells [J]. *Int J Pharm*, 2008, **349**(1-2): 256-268
- 7 Xue Y, Tang X, Huang J, et al. Anti-tumor efficacy of polymer-platinum(II) complex micelles fabricated from folate conjugated PEG-graft-alpha,beta-poly [(N-amino acidyl)-aspartamide] and cis-dichlorodiammine platinum(II) in tumor-bearing mice [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2011, **85**(2): 280-288
- 8 Aliabadi H M, Lavasanifar A. Polymeric micelles for drug delivery [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2006, **3**(1): 139-162
- 9 Bae Y, Nishiyama N, Kataoka K. In vivo antitumor activity of the folate-conjugated pH-sensitive polymeric micelle selectively releasing adriamycin in the intracellular acidic compartments [J]. *Bioconjug Chem*, 2007, **18**(4): 1131-1139
- 10 Bae Y, Nishiyama N, Fukushima S, et al. Preparation and biological characterization of polymeric micelle drug carriers with intracellular pH-triggered drug release property: tumor permeability, controlled subcellular drug distribution, and enhanced in vivo antitumor efficacy [J]. *Bioconjug Chem*, 2005, **16**(1): 122-130
- 11 Nishiyama N, Kato Y, Sugiyama Y, et al. Cisplatin-loaded

- polymer-metal complex micelle with time-modulated de-caying property as a novel drug delivery system [J]. *Pharm Res*, 2001, **18**(7): 1035-1041
- 12 Cabral H, Nishiyama N, Kataoka K. Optimization of (1,2-diamino-cyclohexane)platinum(II)-loaded polymeric micelles directed to improved tumor targeting and enhanced antitumor activity [J]. *J Control Release*, 2007, **121**(3): 146-155
 - 13 Yu J Y, Jun Y J, Jang S H, *et al.* Nanoparticulate platinum (II) anticancer drug: synthesis and characterization of amphiphilic cyclotriphosphazene-platinum (II) conjugates [J]. *J Inorg Biochem*, 2007, **101**(11-12): 1931-1936
 - 14 Jones A T. Gateways and tools for drug delivery: endocytic pathways and the cellular dynamics of cell penetrating peptides [J]. *Int J Pharm*, 2008, **354**(1-2): 34-38
 - 15 Ma J, Waxman D J. Modulation of the antitumor activity of metronomic cyclophosphamide by the angiogenesis inhibitor axitinib. *Mol Cancer Ther*, 2008, **7**(1): 79-89
 - 16 Levi F A, Hrushesky W J, Halberg F, *et al.* Lethal nephrotoxicity and hematologic toxicity of cis-diamminedichloroplatinum ameliorated by optimal circadian timing and hydration. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 1982, **18**(5): 471-477
 - 17 Nishiyama N, Okazaki S, Cabral H, *et al.* Novel cis-platin-incorporated polymeric micelles can eradicate solid tumors in mice. *Cancer Res*, 2003, **63**(24): 8977-8983
 - 18 Uchino H, Matsumura Y, Negishi T, *et al.* Cis-platin-incorporating polymeric micelles (NC-6004) can reduce nephrotoxicity and neurotoxicity of cisplatin in rats. *Br J Cancer*, 2005, **93**(6): 678-687

Folate-functionalized and cisplatin loaded polymeric micelles combined with concurrent radiotherapy for the treatment of lung cancer in vitro and in vivo

HUANG Yuxiang WANG Xuanyi LIU Yongbiao WU Yinxia

YANG Hang YAO Zhifeng XU Guoping

(Department of Radiation Therapy, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

ABSTRACT The tumor-targeting drug delivery system FA-PEG-g-PAsp-CDDP micelles were fabricated from folate-conjugated PEG-graft- α , β -poly [(N-aminoacidyl)-aspartamide] and CDDP. The purpose of this experiment was to test the anti-tumor and radio-sensitizing efficiency of FA-PEG-g-PAsp-CDDP in vitro and in vivo. In vitro, we compared the cytotoxicity of FA-PEG-g-PAsp-CDDP, mPEG-g-PAsp-CDDP and CDDP in the FR over-expressing cell lines SPC-A-1 by CCK-8 test. In vivo, we compared their anti-tumor efficiency in tumor-bearing nude mice when the drugs were administered along or concurrent with radiation. The body weight change was also observed. The results showed that in normal culture medium which contained over-dose folate, FA-PEG-g-PAsp-CDDP and mPEG-g-PAsp-CDDP had the same cytotoxicity, but it in folate-free culture medium, IC₅₀ of FA-PEG-g-PAsp-CDDP was only about 1/3 of that in mPEG-g-PAsp-CDDP ($p < 0.05$). When administered along, the anti-tumor efficiency of FA-PEG-g-PAsp-CDDP and CDDP had no difference ($p > 0.05$), but both were higher than mPEG-g-PAsp-CDDP and blank control ($p < 0.05$). When concurrent with radiation, the anti-tumor efficiency of FA-PEG-g-PAsp-CDDP was higher than that of CDDP ($p < 0.05$), and both were higher than that of mPEG-g-PAsp-CDDP and radiation alone ($p < 0.05$). The body weight of nude mice was decreased by about 10% in CDDP group, but had no change in FA-PEG-g-PAsp-CDDP and mPEG-g-PAsp-CDDP groups. In conclusion, FA-PEG-g-PAsp-CDDP could inhibit the growth of tumors effectively. The folate receptor targeting group enhanced the anti-tumor efficiency of the micelles in FR over-expressing tumor. And FA-PEG-g-PAsp-CDDP has greater radio-sensitization effect and low toxicity than that of CDDP.

KEYWORDS CDDP, Folate, Micelles, Tumor-targeting, Radiation, Lung cancer

CLC R734.2, R730.55, R730.53