

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 32720131150557

UDC_____

廈門大學

硕士学位论文

聚多肽纳米诊疗制剂逆转肿瘤耐药的基础研究

Polypeptide Micelle-based Theranostic Nanoplatfrom for
Overcoming Cancer Multidrug Resistance

杨彩霞

指导教师姓名: 刘刚教授

专业名称: 流行病学与卫生统计学

论文提交日期: 2016 年 4 月

论文答辩时间: 2016 年 5 月

学位授予日期: 2016 年 月

答辩委员会主席:

评阅人:

2016 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为(SM 12M)课题(组)的研究成果，获得(SM 12M)课题(组)经费或实验室的资助，在(分子影像暨转化医学研究中心)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。)

声明人(签名): 杨帆

2016 年 5 月 22 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

2016 年 5 月 23 日

摘要

癌症是全球范围内导致人口死亡的一个重要原因，在各种癌症中，胃癌是一种较为高发的癌症，特别是在发展中国家。在发展中国家中，胃癌是造成男性死亡的第三大死因。由于胃癌容易产生潜在的淋巴结转移，单纯的手术切除通常不是很有效。因而，临床治疗过程中，常在手术切除肿瘤病灶后，常利用化学疗法对晚期或是已经发生转移的胃癌进行治疗。化学疗法在癌症的治疗中已经得到广泛的应用，但化学治疗的同时，也产生了一个新的问题，即癌细胞在经过化疗药物治疗后，出现了耐药性。为了解决癌细胞对化疗药物耐药的问题，临床常选用联用其他化学治疗药物或者增加化疗药物用量的方法，但这种方式并不能从根本上解决耐药性问题，且常伴有显著的副作用。因而，与自身毒性小，但能与化疗药物协同作用的化疗药物增敏剂联合使用，是另一种较为可行的逆转肿瘤耐药性的方式。

XMD8-92 是一种 BMK1 抑制剂，能够上调 p53 的表达。本研究中发现，XMD8-92 对胃癌耐药细胞 P-糖蛋白的表达也有一定的影响。在 XMD8-92 的作用下，细胞膜上的 P-糖蛋白表达降低，从而提高癌细胞对药物的敏感性，逆转肿瘤的耐药性。另外，利用纳米颗粒包裹化学治疗药物也可以增加药物对耐药性肿瘤细胞的毒性。与单一的化疗药物递送系统相比，将多种药物（包括化学治疗药物，化疗增敏剂，成像造影剂等）同时装载在同一载药体系中，然后将其递送到肿瘤部位具有更加显著的优势。

本研究中，我们利用聚乙二醇嵌段聚合聚亮氨酸所形成的聚合物作为药物载体 PEG-b-Leu，并在该载体上修饰生物素形成含有靶向基团的生物靶向载体系统。Biotin-PEG-b-Leu 聚合物能够自组装形成球状结构，通过在超声条件下，将药物装载在球体内部疏水核结构中，构成纳米载药系统。该系统中同时装载化学治疗药物阿霉素，化疗增敏剂 XMD8-92 以及磁共振成像造影剂 SPIO，构建了成像与治疗一体化的诊疗探针。在多药耐药肿瘤的治疗中，具有良好的效果，并有效减弱了阿霉素对机体的系统毒性。

关键词：肿瘤化疗；多药耐药；XMD8-92；P-糖蛋白；磁共振

Abstract

Cancer is the leading cause of death worldwide, and stomach cancer is one of the most frequently diagnosed ones. In less developed countries, stomach cancer is the third most frequently diagnosed cancer among men and the leading cause of cancer death. Owing to the suspected lymph nodes metastasis, sole surgical resection is usually not very effective. Therefore, chemotherapy has been widely used to treat advanced gastric cancer. However, the development of multidrug resistance (MDR) greatly limited the efficacy of chemotherapy.

XMD8-92 has been widely used as a BMK1 inhibitor which is involved in p53 up-regulation and chemotherapy anti-cancer capacity enhancement. We found that XMD8-92 is also a potent P-gp inhibitor which has the ability to reduce the expression of P-gp and reverse the multidrug resistance of MDR cells. Nanomedicine is another promising strategy to combat drug resistance. Compared to simple chemotherapeutic drug delivery nanomedicine, an improved MDR reversing method is to load the chemotherapeutic drug and chemosensitizing agents including transporter protein inhibitors or gene-silencing agents into one nanocarrier. In this context, we present a multifunctional thermosensitive DDS for cancer imaging and chemical therapy using poly(ethylene glycol)-blocked-poly(L-leucine) as the polymer backbone. The hydrophobic L-leucine core provides plenty of space for drugs loading, whereas the hydrophilic PEG shell is helpful for stabilization of the micelles and prolongs the blood circulation time[2-4][2-4]. As a commonly used cancer-targeting moiety, biotin was incorporated into the PEG-b-Leu backbone for tumor localization and effective cellular uptake. The chemotherapeutic drug Doxorubicin (DOX), chemosensitizing agents XMD8-92 and magnetic resonance imaging (MRI) agent superparamagnetic iron oxide (SPIO) were loaded into the Biotin-PEG-b-Leu DDS simultaneously (DXS@NPs) by simple one-step method and further delivered into multi-drug resistant cancer cells (SCG 7901/VCR). It was demonstrated with MRI

imaging that the accumulation of the DXS@NPs in tumor sites increased dramatically in 3 hours, and the DDS showed an improved anticancer drugs release under the tumor tissue's acidic conditions. The DXS@NPs exhibited high performance to overcome cancer multidrug resistance, leading to excellent cytotoxicity on SCG 7901/VCR cells. In vitro and in vivo studies showed that DXS@NPs was much better than the free DOX administered simultaneously, in terms of both safety and antitumor efficacy. Except for up-regulation of p53, XMD8-92 plays an important role in P-gp down-regulation in vitro and in vivo. The nanocarriers we developed would be promising candidates with simultaneous delivery of DOX and XMD8-92 for treating MDR cancers.

Keywords: chemotherapy; MDR; XMD8-92; P-gp; MRI

目录

中文摘要	I
英文摘要	II
缩写词语表	1
第一章绪论	2
1.1. 癌症情况简介	2
1.2. 癌症耐药性的出现及治疗方案	3
1.2.1. 肿瘤耐药性产生原理	6
1.2.2. 逆转肿瘤耐药性化合物	9
1.3. 纳米载药系统简介	11
1.3.1. 纳米载药系统的设计原则	14
1.3.2. 纳米载药系统典型结构	15
1.3.3. 纳米载药系统的优势	16
1.3.4. 纳米载药系统的缺点与发展前景	17
1.4. 分子影像学技术简介	17
1.4.1. 光学成像	18
1.4.2. 光声成像	20
1.4.3. 正电子发射计算机断层成像、单光子发射计算机断层成像	20
1.4.4. 超声成像	21
1.4.5. 磁共振成像	22
1.4.6. 总结	22
1.5. 本论文选题依据及研究内容	23
第二章材料与方法	25
2.1. 实验仪器	25
2.2. 实验材料	26
2.2.1. 实验试剂	26

2.2.2. 常用试剂及溶液、培养基的配制	27
2.2.3. 实验细胞和动物	27
2.3. 实验方法	27
2.3.1. 纳米材料的合成及基本表征	27
2.3.2. 细胞培养	28
2.3.3. 细胞毒毒性试验	29
2.3.4. 药物入胞试验	30
2.3.5. DXS@NPs 纳米颗粒靶向效果验证	30
2.3.6. 细胞磁共振成像效果测定	31
2.3.7. 细胞 P-糖蛋白表达测定	31
2.3.8. 动物模型的建立	33
2.3.9. 磁共振成像	33
2.3.10. 体内治疗效果监测	33
2.3.11. HE 染色	34
2.3.12. 肿瘤的免疫组化分析	35
第三章结果与讨论	36
3.1. 纳米材料的合成与表征	36
3.2. 细胞毒性试验	39
3.2.1. SCG 7901/VCR 细胞耐药性验证	39
3.2.2. XMD8-92 细胞毒性	40
3.2.3. 游离阿霉素与 XMD8-92 联合细胞毒性	40
3.2.4. DXS@NPs 的细胞毒性	41
3.3. 纳米材料的细胞吸收	43
3.3.1. 游离药物孵育后的细胞分布	43
3.3.2. 纳米颗粒孵育后的细胞分布	44
3.4. 纳米材料的靶向效果	45
3.5. 纳米材料的细胞磁共振成像	48
3.6. 细胞 P-糖蛋白表达测定	48
3.6.1. 细胞免疫荧光	49
3.6.2. 流式细胞分析	49
3.6.3. 蛋白免疫印迹分析	51

3.7. 小动物活体磁共振成像	52
3.8. 体内联合化疗效果	53
3.8.1. 肿瘤生长抑制效果	53
3.8.2. 治疗后肿瘤组织形态变化	53
3.9. 药物治疗系统毒性	55
3.9.1. 裸鼠体重变化	55
3.9.2. 裸鼠主要脏器 HE 染色	56
3.10. 肿瘤 P-糖蛋白表达检测	58
第四章结论与展望	60
参考文献	61
硕士期间论文发表情况	61
致谢	69

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	II
Abbreviations	1
Chapter 1. Introduction	2
1.1. Introduction of tumor	2
1.2. The emergence and therapy methods of multidrug-resistant tumors	3
1.2.1. The principle of multidrug resistance	6
1.2.2. Compounds used to reverse multidrug resistance.....	9
1.3. Nano-drug delivery system	11
1.3.1. Design principles of DDSs.....	14
1.3.2. Common structure of DDSs.....	15
1.3.3. Advantages.....	16
1.3.4. Limitations and perspectives.....	17
1.4. Molecular imaging	17
1.4.1. Optial imaging	18
1.4.2. Photoacoustic imaging	20
1.4.3. PET, SPET imaging	20
1.4.4. Ultrasonic imaging.....	21
1.4.5. Magnetic resonance imaging	22
1.4.6. Conclusion	22
1.5. A review of this paper	19
Chapter 2. Materials and Methods	25
2.1. Equipments	25
2.2. Materials	26
2.2.1. Reagents.....	26

2.2.2. The preparation of the reagents.....	27
2.2.3. Cells and animals	27
2.3. Methods	27
2.3.1. Synthesis and characteriazation of DXS@NPs	27
2.3.2. Cells culture	28
2.3.3. Cytotoxicity test.....	29
2.3.4. Cellular distribution of the nanoparticles.....	30
2.3.5. DXS@NPs active targeting ability test.....	30
2.3.6. MRI imaging of cells	31
2.3.7. Expression of P-gp on cells.....	31
2.3.8. Animal model.....	33
2.3.9. Megnetic resonance imaging	33
2.3.10. Assessment of DXS@NPs therapy	33
2.3.11. HE staining.....	34
2.3.12. Immunohistochemical analysis of tumors	35
Chapter 3. Results and Disscussion.....	36
3.1. Synthesis and characterization of DXS@NPs.....	36
3.2. Cytotoxicity test	39
3.2.1. The sensitivity of SCG 7901/VCR cells to DOX	39
3.2.2. The cytoxicity of XMD8-92	40
3.2.3. The proper ratio between DOX and XMD8-92	40
3.2.4. The cytoxicity of DXS@NPs.....	41
3.3. Cellular distribution.....	43
3.3.1. Cells incubated with free drugs.....	43
3.3.2. Cells incubated with DXS@NPs	44
3.4. DXS@NPs active targeting ability	45
3.5. MRI of DXS@NPs.....	48
3.6. Cellular P-gp expression	48
3.6.1. Immunoflorescence analysis	49
3.6.2. Flow cytometry analysis	49
3.6.3. Westen blot (WB) analysis	51

3.7. In vivo MRI.....	52
3.8. In vivo chemicaltherapy of DXS@NPs.....	53
3.8.1. Tumors growth inhibition effect.....	53
3.8.2. Histomorphology changes of tumores after therapy.....	53
3.9. Systemic toxicity	55
3.9.1. Mice body weights change.....	55
3.9.2. HE stain of main organs.....	56
3.10. P-gp expression of tumors	58
Chapter 4. Conclusions and Perspectives.....	60
References	61
Publications list	69
Acknowledgement.....	70

缩写词语表

MRI	磁共振成像
MDR	多药耐药
DWI	扩散加权成像
T2WI	T2 加权成像
T2*WI	T2*加权成像
DDSs	药物递送系统
P-gp	P-糖蛋白
TMDs	跨膜区
NBDs	核苷酸结合区
HIV	人免疫缺陷病毒
PEG	聚乙二醇
PET	正电子发射计算机断层成像
SPECT	单光子发射计算机断层成像
PA	光声成像
US	超声成像
OI	光学成像

第一章 绪论

1.1. 癌症情况简介

癌症是现今世界面临的一个重要的公共健康问题，造成了严重的社会负担。在全球各个国家，包括发达国家以及发展中国家，恶性肿瘤都是造成人口死亡的最主要原因。预计全世界癌症死亡人数将继续上升，至 2030 年估计有 12 万人因癌症死亡^[1]。癌症的发生与多种因素相关，癌症发生时，组织细胞在基因水平上失去正常调控，异常增生分化，正常组织器官被破坏，功能失调，严重时甚至导致死亡。随着人口老龄化的日益严峻，癌症的发生率日渐增高，而癌症所造成的疾病负担也在世界范围内不断加重。现代社会人们的生活方式为一种久坐的生活方式，运动量少，部分人还有不良生活习惯，例如吸烟等，这些都对癌症发生有影响。据全球癌症统计数据，2012 年，全球约有 14,100,000 新发癌症病例，8,200,000 人死于癌症。虽然发展中国家和发达国家同样承受着沉重的癌症负担，据统计，癌症负担正逐渐向发展中国家转移。发展中国家癌症发病率占了全球癌症发病率的 57%，而死亡率占了 65%。胃癌是各种癌症中较为常见的一种。在发展中国家，胃癌和肝癌是两种最主要致死性癌症。虽然发达国家癌症发病率几乎是发展中国家癌症发病率的两倍，其致死率（8%）只有发展中国家的大约二分之一（15%）。这种差异性反应了癌症的地区差异性，这与环境、生活习惯、癌症发生检测手段以及是否及时治疗都有很大关系。因此，早期诊断、及时治疗是缓解癌症问题的重要手段。通过发展、应用现有的抗癌知识，例如倡导禁烟、注射疫苗（用于预防肝癌、宫颈癌）、早期诊断、倡导运动以及健康的饮食习惯等，减少癌症发生，即可减轻癌症负担。另外，通过适当的抗癌治疗以及支持性治疗，不仅可以减少癌症患者的痛苦，也可以减少癌症死亡率^[1]。

经过一个多世纪的发展，随着手术、化疗、放疗技术的提高，癌症治疗效进步明显。其中手术方案和技术优化，放疗技术与设备，包括智能化精确定放疗的发展，以及化疗药物从非特异性杀伤到近十年来的靶向药物的研发，使得癌症治疗从单一到综合、从单元到多元化，有了明显的进步。但不可否认的是效果还无法令人满意。虽然对癌症的发生及治疗已经取得了一些进展，但仍然有许多未

知的领域，仍然有许多困难要面对，因而需要多方的共同努力。

1.2. 癌症耐药性的出现及治疗方案

手术治疗、化学疗法以及放射性疗法是临床上用于肿瘤治疗的三大疗法。手术治疗是一种局部疗法，只对肿瘤局部进行治疗，对机体其他部位的正常组织器官很少造成损伤，因而其副作用较小，但该治疗方法只适用于良性、无转移病灶的肿瘤。对于已经出现转移，或者潜在转移（已经发生癌症转移，但由于检测手段的限制，无法检测到肿瘤转移病灶）的恶性肿瘤，手术治疗不能完全清除体内的癌细胞，对癌症治疗意义不大。手术治疗存在着一定的优势，如①癌症手术疗效直接，可彻底切除原发病灶，使患者获得治愈的机会；②肿瘤对手术切除没有生物抵抗性，且手术费用相对没有放化疗昂贵，且属一次性。但手术治疗同时也有其缺点，例如①手术存在风险性，尤其是对于部位敏感的肿瘤，如脑肿瘤，手术危险性大，成功率低②癌症手术对人体创伤大，使患者免疫力降低，对疾病抵抗能力下降③手术后易产生一系列手术并发症④为局部治疗手段，只适用于早期癌肿范围局限。

手术治疗的作用及常用的手术方法大概有以下几类：1. 根治性手术：手术中把肿瘤及肿瘤细胞转移的淋巴结一起整块切除。施行进行这种手术的条件是：①要求处于疾病的早期阶段；②要根据肿瘤的具体位置而定。例如大肠癌，可以允许广泛的组织切除而对病人以后的生活质量影响较小；但是对于脑肿瘤而言手术切除的范围非常有限，因切除范围过大会造成严重的后果。2. 姑息性手术：如果肿瘤已经向远处转移扩散，但原发肿瘤仍可以手术切除时，可以通过手术切除原发肿瘤来减轻全身症状，提高机体免疫功能，从而有利于其它的肿瘤治疗方式(如化疗、放疗等)的作用发挥。但手术时应根据病人的具体情况而定。例如大肠癌已有肝或肺转移时，手术切除原发肿瘤既无多大困难又无多大危险，这时应争取手术。如原发性肺癌已有骨转移时，手术创伤大、风险高，且术后可能会严重影响患者的生活质量，则不宜实施手术切除。3. 姑息性减症手术：部分肿瘤虽已不能手术切除或手术切除的意义不大，但出现了严重的威胁生命的并发症(如晚期胃肠道癌大出血、梗阻)，也可通过手术的方法解除直接威胁生命的并发症。手术治疗的目的是减轻患者的痛苦，提高患者的生活质量，延长患者的生命。4.

内分泌腺体切除的手术：临床上有些手术并不是直接切除病变的部位，而是通过切除与该肿瘤发生、发展有关的内分泌腺体从而实现延缓肿瘤进展的目的。如通过切除卵巢或肾上腺而治疗乳腺癌，切除睾丸治疗前列腺癌。对这类手术戏称为“曲线救国”手术。

5. 修复性手术：临床上有些手术对病人的创伤大，严重破坏患者的形体美，随着医学科学的发展，对其已有很多补救性手术，如乳腺癌切除术后进行乳房重建，头面部肿瘤切除后自体组织修复，直肠癌切除的原位肛门重建术等。从肿瘤治疗的角度上看，此类手术属于“锦上添花”的范畴，因此对于这类手术的效果要求较高，故应严格掌握适应证。

6. 预防性手术：临床上某些手术还应用于肿瘤的预防。如有些先天性或后天性病变，在发展到一定程度时可能恶变，如能及时做手术治疗，则可能预防癌症的发生。如家族性结肠息肉病的肿瘤或肠切除术等。

7. 诊断性或分期性手术：临床上，大部分肿瘤经过医生的检查以及X线、B超、CT、磁共振、内镜、穿刺细胞学检查等诊断性检查可做出较准确的诊断，但仍有一部分肿瘤手术前难以确诊或难以准确分期，需要通过手术探查或取出部分或全部肿瘤作病理检查，如乳腺肿块的定性诊断或腹腔恶性淋巴瘤的分期性诊断。临床对这类带有诊断目的或分期目的而施行的手术称为诊断性或分期性手术。

化学疗法简称化疗，也是临床上较为常用的一种癌症治疗方案。化疗属全身性给药方案，可以用于发生转移的恶性肿瘤，其治疗范围广泛，对全身细胞都可以发生作用，因而不受肿瘤部位限制。化疗通常采用三种给药方式：口服、静脉注射以及体腔给药。但化学治疗有一个显著的缺点，即药物会随血液循环全身分布，对机体的各个正常组织器官产生损伤，产生严重的副作用。传统化疗药物治疗肿瘤的原理是利用增殖旺盛的肿瘤细胞对化疗药物更敏感从而发挥作用的，也就是说药物能够杀死迅速分裂的细胞，而增殖快也是大多数肿瘤细胞都具有的特性。当然这也就意味着化疗也危害正常情况下快速分裂的正常细胞，如骨髓细胞、消化道细胞、毛囊细胞等。从而导致化疗的最常见的副作用：骨髓抑制（血细胞生成减少，因此也免疫抑制），粘膜炎（消化道粘膜的炎症），和脱发。肿瘤化疗的效果取决于癌症的类型和阶段。某些癌症，如白血病可能会治愈，对某些脑部肿瘤也具有一定的效果，但是对某些肿瘤可能完全没有效果，比如，非黑素瘤皮肤癌。根据所使用的化疗药物类型，化疗会产生一系列副作用。最常见是对机体正常的快速

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.