

学校编码: 10384
学号: 32320141153426

分类号__密级__
UDC__

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

二十二碳六烯酸纳米制剂在肿瘤治疗中的应用研究

Application of Nanoparticles Containing Docosahexaenoic
Acid in Tumor Therapy

范馨莉

指导教师姓名: 吕忠显 教授
刘文杰 助理教授

专业名称: 药理学

论文提交日期: 2017年4月

论文答辩时间: 2017年5月

学位授予日期: 2017年 月

答辩委员会主席:
评阅人:

2017年4月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

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（ ）课题（组）的研究成果，获得（ ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ ）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）：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

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）：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

摘 要.....	1
ABSTRACT.....	2
第一章 前言	4
1.1 化学药物与肿瘤治疗	5
1.1.1 抗癌药物阿霉素及其应用	5
1.1.2 肿瘤多药耐药	6
1.1.3 二十二碳六烯酸（DHA）及其应用	9
1.2 纳米载药系统与肿瘤治疗	11
1.2.1 纳米载药系统的定义与分类	12
1.2.2 纳米载药系统的特点	13
1.2.3 纳米载药系统与生理屏障	15
1.3 本课题研究的目标、内容与意义	20
第二章 实验材料与方法	22
2.1 实验材料	22
2.1.1 细胞系及实验动物	22
2.1.2 主要仪器与试剂	22
2.1.3 缓冲液和溶液配制	24
2.2 实验方法	26
2.2.1 DOX-DHA 纳米结构脂质载体 (NLC-DOX-DHA)的制备	26
2.2.2 DOX-DHA 纳米结构脂质载体(NLC-DOX-DHA)的表征	26
2.2.3 DOX-DHA 纳米结构脂质载体(NLC-DOX-DHA)的体外细胞实验	27
2.2.4 裸鼠肝癌多药耐药移植瘤模型的建立	30
2.2.5 小动物活体荧光成像	31

2.2.6 肿瘤组织形态与病理学检测	31
2.2.7 DHA 柔性脂质体的制备	33
2.2.8 DHA 柔性脂质体的表征	33
2.2.9 DHA 柔性脂质体对阿霉素经皮吸收的作用影响	33
2.2.10 数据处理	35
第三章 结果与分析	36
3.1 DOX-DHA 纳米结构脂质载体(NLC-DOX-DHA)逆转肝癌细胞多药耐药 .36	
3.1.1 DOX-DHA 纳米结构脂质载体(NLC-DOX-DHA)的性质表征	36
3.1.2 人肝癌细胞 Bel7402 和其 5-氟尿嘧啶耐药细胞株的鉴定	37
3.1.3 DOX-DHA 纳米结构脂质载体(NLC-DOX-DHA)抑制细胞活性	38
3.1.4 DOX-DHA 纳米结构脂质载体(NLC-DOX-DHA)增强耐药细胞的摄取能力	39
3.1.5 DOX-DHA 纳米结构脂质载体(NLC-DOX-DHA)促进肝癌多药耐药细胞的凋亡	41
3.1.6 DOX-DHA 纳米结构脂质载体(NLC-DOX-DHA)增强阿霉素对裸鼠移植瘤的杀伤作用	43
3.2 DHA 柔性脂质体经皮吸收的研究	46
3.2.1 DHA 柔性脂质体的性质表征	47
3.2.2 DHA 柔性脂质体增强阿霉素的透皮吸收效率	48
3.2.3 阿霉素醇质体增强阿霉素透皮吸收效率	51
第四章 讨论与结论	53
参考文献	58
致 谢	65

CONTENT

Abstract in Chinese	1
ABSTRACT	2
Chapter I Introduction	4
1.1 Chemical Drugs and Cancer Therapy	5
1.1.1 Anticancer Drug Doxorubicin and its Application	5
1.1.2 Cancer Mutidrug Resistance	6
1.1.3 Docosahexaenoic Acid (DHA) and its Application	9
1.2 Nanoparticle Drug Delivery System and Tumor Therapy	11
1.2.1 Definition and Classification of Nanoparticle Drug Delivery System	12
1.2.2 Characteristics of Nanoparticle Drug Delivery System	13
1.2.3 Nanoparticle Drug Delivery System and Barriers	15
1.3 Aim and Significance	20
Chapter II Material and methods	22
2.1 Materials	22
2.1.1 Cell Line and Animals	22
2.1.2 Apparatus and Reagents	22
2.1.3 Solutions	24
2.2 Methods	26
2.2.1 Preparation of DHA Nanostructured Liposome (NLC-DOX-DHA)	26
2.2.2 Characterization of DHA Nanostructured Liposome (NLC-DOX-DHA)	26
2.2.3 Cell Experiments of DHA Nanostructured Liposome (NLC-DOX-DHA)	27

2.2.4 Establishment of Multidrug Resistant Transplanted Tumor Model	30
2.2.5 Animal Vivo Fluorescence Imaging.....	31
2.2.6 Tumor Tissue Morphology and Pathology	31
2.2.7 Preparation of DHA Flexible Liposomes and Ethosomes	33
2.2.8 Characterization of DHA Flexible Liposomes and Ethosomes.....	33
2.2.9 DHA Flexible Liposomes/Ethosomes about Doxorubicin's Absorption .	33
2.2.10 Data Processing	35
Chapter III Results.....	37
3.1 DHA Nanostructured Liposomes (NLC-DOX-DHA) Reverse Hepatocellular Carcinoma Multidrug Resistance	37
3.1.1 Characterization of DHA Nanostructured Liposomes	37
3.1.2 Identification of Bel7402 and its Fluorouracil-Resistant cell Bel7402/Fu	38
3.1.3 DHA Nanostructured Liposome Inhibit Cell Viability.....	38
3.1.4 DHA Nanostructured Liposome Enhance Absorption	39
3.1.5 DHA Nanostructured Liposomes Promote Cell Apoptosis	41
3.1.6 DHA Nanostructured Liposome Enhance The Killing Effect Of Doxorubicin	43
3.2 Percutaneous Absorption of DHA Flexible Liposomes And Ethosomes.....	46
3.2.1 Characterization of DHA Flexible Liposomes and Ethosomes.....	47
3.2.2 DHA Flexible Liposomes Enhance the Absorption Efficiency of Doxorubicin	48
3.2.3 Doxorubicin Ethosomes Enhance Transdermal Absorption Efficiency .	51
Chapter IV Discussion and Conclusions	53
References	58
Acknowledgement.....	65

摘要

癌症是体内正常细胞突变所引起的一大类疾病,已经成为当今影响人类健康的最主要威胁。目前癌症治疗主要手段仍依赖于化学药物治疗,但是绝大多数化疗药物特异性较差,不易克服体内复杂的生理屏障,并且易诱发癌症多药耐药而导致化疗失败。为了靶向治疗肿瘤,减少药物的毒副作用,克服多药耐药(multidrug resistance, MDR)以达到癌症治疗效果最大化,依托纳米载药传递系统的化疗手段成为极具潜力的研究方向。二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)是 ω -3多不饱和脂肪酸家族成员之一,具有显著的抗炎抗肿瘤功效。本课题旨在通过探究含有DHA的纳米制剂在肿瘤治疗中的作用功效,为将其开发为新型抗癌制剂提供理论参考。

本课题制备DOX-DHA纳米结构脂质载体(NLC-DOX-DHA),通过MTT实验、细胞摄取实验、凋亡检测实验、免疫印迹实验等结果发现:NLC-DOX-DHA能够增强肝癌耐药细胞Bel7402/Fu对抗癌药物阿霉素(doxorubicin, DOX)的敏感性,并促使耐药细胞凋亡。随后,构建皮下接种人肝癌耐药细胞Bel7402/Fu的荷瘤裸鼠模型,尾静脉注射NLC-DOX-DHA,测量裸鼠体重、肿瘤体积、重量并进行统计学分析,同时结合活体荧光成像与肿瘤组织形态与病理学分析结果,证实NLC-DOX-DHA延长了阿霉素在体内的循环作用时间,增强了阿霉素对实体肿瘤的促进凋亡、杀伤作用。另一方面,本课题制备DHA柔性脂质体,体外模拟阿霉素皮肤给药与经皮吸收环境并结合小鼠透皮实验,发现DHA柔性脂质体能够有效提高阿霉素的经皮吸收效率。本论文的研究结果证实:DHA纳米制剂能够有效提高抗癌药物对肿瘤的杀伤作用,并提高细胞、皮肤等生理屏障对抗癌药物的摄取吸收效率,提示我们DHA纳米制剂可能成为一种潜在的肿瘤化疗辅助手段。

关键词: DHA纳米制剂; 多药耐药; 经皮吸收

厦门大学博硕士学位论文摘要库

ABSTRACT

Cancer is a major disease caused by normal cell mutations in the body and has become the most important threat to human health today. At present, the main means of cancer treatment is still dependent on chemical therapy, but the vast majority of chemotherapeutic drugs are less specific, difficult to overcome the complex physiological barrier in the body, and susceptible to induce cancer multidrug resistance which eventually make chemotherapy failing. In order to target the tumor and reduce the side effects of drugs to overcome the multidrug resistance (MDR) and achieve the maximum effect of cancer treatment, it has become a great potential research direction to rely on nano-drug delivery system. Docosahexaenoic acid (DHA) is a vital member of the omega-3 polyunsaturated fatty acid family and has significant anti-inflammatory and anti-tumor effects. The aim of this study is to explore the effect of DHA nanoparticles in tumor therapy, and provide a theoretical reference for the development this new anticancer therapy.

In this study, human hepatocellular carcinoma cell Bel7402 and its drug resistant cell Bel7402 / Fu in vitro were detected with MTT experiments, cell uptake experiments, apoptosis detection experiments and western blot experiments, which were performed by NLC-DOX-DHA. These results showed that NLC-DOX-DHA could enhance the sensitivity of drug-resistant cells to anti-cancer drug doxorubicin and promote drug-resistant cell apoptosis. Then, NLC-DOX-DHA was injected into the nude mice model of subcutaneously inoculated with human hepatocellular carcinoma cell line Bel7402 / Fu. The body weight, tumor volume and weight of nude mice were measured and analyzed statistically. These results showed that NLC-DOX-DHA prolonged the circulating time of doxorubicin in vivo and enhanced the effect of doxorubicin on the prophylactic and cytotoxic effect of doxorubicin on solid tumors. At the same time, DHA flexible liposomes were prepared in this study. We simulate the vitro environment of doxorubicin's skin administration and

percutaneous absorption in vivo. It was found that DHA flexible liposomes could effectively improve the transdermal absorption efficiency of doxorubicin. In conclusion, this study confirm that DHA contained nanoparticles can effectively improve the killing effect of anticancer drugs on tumors and improve the uptake efficiency of anticancer drugs towards cells and skin, suggesting that DHA contained nanoparticles may become a potential tumor chemotherapy aid.

Key Words: nanoparticles containing docosahexaenoic acid; multidrug resistance; percutaneous absorption

第一章 前言

癌症是体内正常细胞多原因、多阶段突变后所引发的一大类疾病，它已成为当今影响人类健康的最主要威胁。世界卫生组织和全球各国癌症研究机构近十年的调查报告指出，亚洲地区人口的患癌统计情况不容乐观，尤其中国已逐渐成为全球范围内癌症高发的国家之一^[1]。2015年，我国癌症新发病例492.2万例，死亡人数达281万人，这一数据意味着，我国每分钟就有8.3人患癌，5.2人死于癌症，癌症已经成为我国最主要的死亡原因之一^[2]。但是研究者指出，超过60%的癌症可以通过有效的临床诊断加以预防和治疗。几十年来，癌症治疗的主要手段是手术切除或放射治疗、化学药物治疗等方法的联合使用，对于病灶易转移扩散的癌症来说，手术切除方法难以奏效，而放射治疗对正常细胞与组织器官的杀伤性非常大，治疗与预后结果也不令人满意。

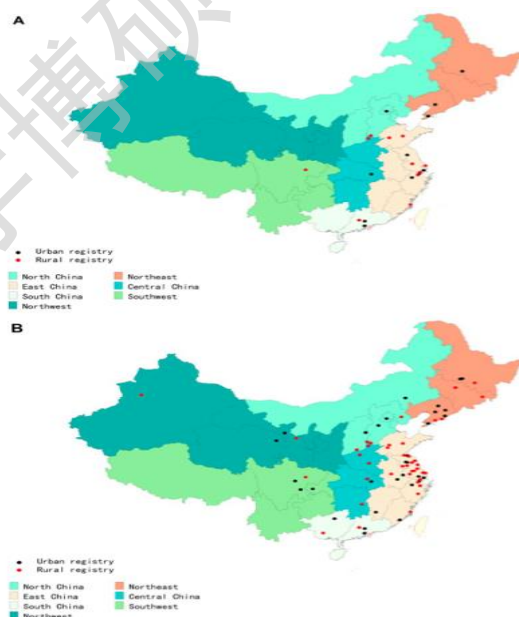


图1-1. 2000-2015年中国各地区城乡癌症种类调查对比统计图

(A. 2000-2010年城乡癌症调查统计图, B. 2011-2015年城乡癌症调查统计图)

Fig1-1. Cancer Registries and Geographic Regions in China from 2000 to 2015.

From Chen, W., et al. "Cancer statistics in China, 2015." (2016)

随着科学技术的进步,抗癌药物的不断研发、更新换代,科研人员研究了肿瘤细胞的基本功能与特性,通过使用抗癌药物抑制癌细胞的分化与代谢^[3],阻断其过度激活的信号通路来达到消除肿瘤的目的,然而抗癌药物广泛的临床应用也逐渐暴露出一些问题^[4]。抗癌药物进入患者体内后,需要克服体内复杂的生物屏障,躲避人体免疫系统的清除机制,最终才能到达病灶部位。它面临的最主要挑战是能否以足量的药效浓度作用于病灶部位,精确靶向于作用位点,最终引发癌细胞凋亡,达到消除癌细胞的目的。此外,抗癌药物的生物利用度是十分有限的,随着治疗进程的深入,大剂量持续给药极易对正常细胞产生毒性作用,并增加肿瘤多药耐药的发生几率。因此,如何靶向治疗肿瘤,减少药物毒副作用,克服肿瘤多药耐药以达到治疗效果的最大化,是癌症治疗研究人员最为关注的问题。

近年来,纳米药物传递系统的研究取得了一定的突破,为癌症治疗提供了新思路^[5]。一些大小约在 10-100nm 之间的纳米载药颗粒能够被动或主动地将其负载的药物靶向肿瘤细胞,是一种理想的特异性药物运载系统。此外,相比常规治疗方法,纳米载药系统具有显著优势,有着克服化疗药物局限性的巨大潜力,使其成为肿瘤靶向药物传递的一个极好的选择。纳米载药系统通过调控药物靶向释放,有效减少了药物运输传递过程中的非必要损失,延长了抗癌药物在体内的循环作用时间,减少抗癌药物毒副作用的同时显著地提高了药物的治疗效率。纳米载药系统已经逐渐成为癌症化疗的重要助力^[6,7]。

1.1 化学药物与肿瘤治疗

化学药物治疗肿瘤的历史十分悠久。早在 19 世纪中叶,研究人员致力于从数十种化学单体和化合物中寻找足以杀死癌细胞而不伤害正常细胞的药物^[8]。1947 年,病理学家首次运用叶酸类似物甲胺蝶呤缓解了儿童急性淋巴细胞白血病,确立了化学药物全身性治疗肿瘤这一理论。

1.1.1 抗癌药物阿霉素及其应用

阿霉素 (doxorubicin, DOX) 又称多柔比星,分子式为 $C_{27}H_{29}NO_{11}$, 易溶于水,是一种橘红色粉末,结构如图所示。阿霉素单独给药或与其他抗肿瘤药物联用是治疗实体肿瘤,如乳腺癌、肝癌、肺癌、卵巢癌等的首选方案。其抗癌机制

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts 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.

厦门大学博硕士学位论文摘要库