

治疗原发性肺癌的共轭亚油酸粉雾剂研究

张国立^{1,2,3}, 肖志美^{1,2}, 王 秀³, 于 翔¹, 方荣震¹, 杜丽娜^{1*}, 金义光^{1,3*}

(1. 军事科学院军事医学研究院辐射医学研究所, 北京 100850; 2. 深圳善康医疗健康产业有限公司, 广东 深圳 518118; 3. 蚌埠医学院药学院, 安徽 蚌埠 233030)

摘要: 共轭亚油酸 (conjugated linoleic acid, CLA) 是存在于人和动物体内的营养物质, 具有抗肿瘤、抗动脉粥样硬化和调节免疫等功能, 但其口服生物利用度低。本文制备了 CLA 粉雾剂 (conjugated linoleic acid dry powder inhalers, CDPIs), 经大鼠气管给药后治疗大鼠原发性肺癌。首先, 制备 CLA 纳米乳, 加入 10% 甘露醇冻干后得到 CDPIs 疏松白色粉末, 其空气动力学粒径 (aerodynamic median diameter, D_a) 为 3.10 μm , 适合肺吸入给药。用 3-甲基胆蒽及 *N,N*-二甲基亚硝胺经气管喷入大鼠肺中, 45 天后得到原发性肺癌模型。所有动物实验经军事科学院军事医学研究院伦理委员会批准且实验均按照相关指导原则和规定进行。分别将 CDPIs、吉非替尼混悬液和空白粉雾剂经气管喷入肺癌大鼠肺中。与模型组比较, 吉非替尼混悬液组和 CDPIs 组的肿瘤结节和炎性细胞数量均明显减少, 其中 CDPIs 组的药效优于吉非替尼混悬液组。CDPIs 组 CD31 和 NF- κ B p65 表达明显减少, 优于吉非替尼混悬液组; CDPIs 组血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 水平明显降低, 与吉非替尼组治疗效果相当; CDPIs 组 Tunel 检测表明细胞凋亡明显增多, 明显优于吉非替尼混悬液组。CDPIs 能直接将具有优良药理活性的药物递送至肺部肿瘤, 是一种具有前景的用于肺癌治疗的肺吸入给药剂型。

关键词: 共轭亚油酸; 纳米乳; 粉雾剂; 肺癌; 吉非替尼

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2021)10-2650-08

Dry powder inhalers of conjugated linoleic acid for the treatment of primary lung cancer

ZHANG Guo-li^{1,2,3}, XIAO Zhi-mei^{1,2}, WANG Xiu³, YU Xiang¹, FANG Rong-zhen¹,
DU Li-na^{1*}, JIN Yi-guang^{1,3*}

(1. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medicine Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100850, China; 2. Shenzhen Sciencare Medical Industries Co., Ltd., Shenzhen 518118, China; 3. College of Pharmacy, Bengbu Medical University, Bengbu 233030, China)

Abstract: Conjugated linoleic acid (CLA) is a nutrient substance that exists in humans and animals. It has anti-tumor, anti-atherosclerosis, and immune-regulating functions, but its oral bioavailability is low. Conjugated linoleic acid dry powder inhalers (CDPIs) were prepared and intratracheally administered to the rats that suffered from primary lung cancer. Conjugated linoleic acid nanoemulsions were prepared first and CDPIs were with 10% mannitol after lyophilization. CDPIs are loose white powders with the aerodynamic median diameter (D_a) of 3.10 μm , which were suitable for pulmonary delivery. Rats lung cancer models were established after 45 days by instilling 3-methylcholanthrene (MCA) and *N,N*-dimethylnitrosamine (DEN) into the rats lung once. The animal experiments were approved by the Ethics Committee of Academy of Military Medical Sciences and conducted in

收稿日期: 2021-04-06; 修回日期: 2021-04-27.

基金项目: 十三五国家科技重大专项军特药专项 (2018ZX09J18104-001); 蚌埠医学院联合科技攻关项目 (BYLK201823).

*通讯作者 Tel: 86-10-66930216, E-mail: dulina@188.com;

Tel: 86-10-66931220, E-mail: jinyg@sina.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0492

accordance with the relevant guidelines and regulations. The CDPIs, gefitinib suspension and blank DPIs were sprayed into the lungs of rats with lung cancer through the trachea. Compared with the model group, both the gefitinib suspension group and the CDPIs group showed significantly fewer tumor nodules and inflammatory cells, and the CDPIs group was better than the gefitinib suspension group. The inhibition efficiency of CDPIs on CD31 and NF- κ B p65 was better than that of the gefitinib suspension group. The vascular endothelial growth factor (VEGF) level in the CDPIs group was significantly reduced, which was equivalent to that of the gefitinib suspension group. The apoptosis in the CDPIs group by Tunel tests showed a significant increase, which was significantly better than the gefitinib suspension group. Therefore, CDPIs had excellent pharmacological activity on lung cancer, which provided a model for the efficient delivery of oil therapeutic agents.

Key words: conjugated linoleic acid; nanoemulsion; dry powder inhaler; lung cancer; gefitinib

肺癌在全世界所有恶性肿瘤中发病率和死亡率占主要地位,我国恶性肿瘤疾病中,肺癌的发病率和死亡率均排名第一。造成肺癌的主要致病原因包括烟雾、空气污染和电离辐射等^[1]。肺癌可分为小细胞肺癌(15%~20%)和非小细胞肺癌(80%~85%)^[2]。肺癌的临床治疗方法包括手术、放疗、化疗、分子靶向治疗和免疫治疗等,化疗通常与其他治疗手段联合使用。然而,目前临床上最常用的化疗是将抗癌药物通过口服或静脉注射给药,药物全身分布,肿瘤组织中的药物浓度相对较低,易产生严重的不良反应^[3]。因此,靶向或局部递送药物的方式受到重视,可增加肿瘤组织内药物浓度并减少正常组织中药物浓度,达到增效和减少不良反应的目的。

共轭亚油酸 (conjugated linoleic acid, CLA) 是一类含有顺式和反式共轭双键的十八碳二烯酸异构体的总称。CLA 异构体类型很多,已经发现有 25 种^[4],其中以异构体 *cis*-9, *trans*-11 CLA 和 *trans*-10, *cis*-12 CLA 的研究最多^[5]。*cis*-9, *trans*-11 CLA 是唯一能被动物细胞吸收进入磷脂层的异构体,也是与人类和动物营养最为相关、生物活性最强的 CLA (图 1)^[6]。CLA 具有清除自由基、抗肿瘤^[7]、抗动脉粥样硬化^[8]、抗糖尿病^[9]和免疫调节^[10]等作用,多作为保健品或功能食品,对其具体的生理功能及其抗病机制研究相对较少^[11]。

肺部给药系统能够将药物直接递送到肺的深部^[12]。与胃肠道和肝脏相比,肺中肺泡表面积巨大,毛细血管

丰富,酶促降解能力相对较弱^[13],因此肺吸入药物不仅可在肺部集中分布,减少了药物的全身暴露,而且可以迅速发挥药效,被 WHO 推荐为肺部疾病的首选疗法^[14],包括肺炎、肺癌、急性肺损伤和特发性肺纤维化等肺部疾病^[15]。基于 CLA 优良的抗肿瘤作用及肺部给药有利于肺癌治疗的特点,本文将 CLA 制备成适合肺部给药的共轭亚油酸粉雾剂,通过肺组织病理改变、相关蛋白通路和一系列炎症因子的测定,考察其对大鼠原发性肺癌的治疗效果和作用机制,为肺吸入挥发油类药物治疗肺癌提供了新的方法和思路。

材料与方法

药物与试剂 共轭亚油酸 (c9,t11-CLA, 批号: 20140606, 上海麦克林生物科技有限公司); 蛋黄卵磷脂 PL-100M (注射用, 批号: EK16068, 艾伟拓医药科技有限公司); 大豆磷脂 (批号: 20130801, 上海太伟药业有限公司); 泊洛沙姆 188 (型号: WPMD507C, 德国巴斯夫股份公司); 乳糖 (吸入级别, 批号: 101LX37, 粒径分布: $D_{10} = 0.8 \sim 1.6 \mu\text{m}$, $D_{50} = 4.0 \sim 11.0 \mu\text{m}$, $D_{90} = 15.0 \sim 35.0 \mu\text{m}$, DFE Pharma 公司); 甘露醇 (批号: 20170427)、碳酸氢铵 (批号: 20140109)、碳酸氢钠 (批号: 20150609) (国药集团化学试剂有限公司); 碘化油注射液 (13LU603A, 法国 Guerbet 公司); 3-甲基胆蒎 (3-methylcholanthrene, MCA, 227590, 加拿大 TRC 公司); *N,N*-二乙基亚硝酸胺 (DEN, 22VGQ-EC, 日本 Tokyo Chemical Industry 公司); 吉非替尼 (批号: 20160608, 北京伊诺凯科技有限公司); 大鼠肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-6 (interleukin-6, IL-6)、VEGF ELISA 检测试剂盒 (欣博盛生物科技有限公司); BCA (bicinchoninic acid) 蛋白浓度测定试剂盒 (批号: PC0020, 北京索莱宝科技有限公司)。

仪器 高压均质机 (型号: NanoDe Bee, 美国 Bee 公司); 纳米激光粒度仪 (型号: Zeta Size Nano ZS, 英国马尔文仪器有限公司); 冷冻干燥机 (型号: LGJ-30F,

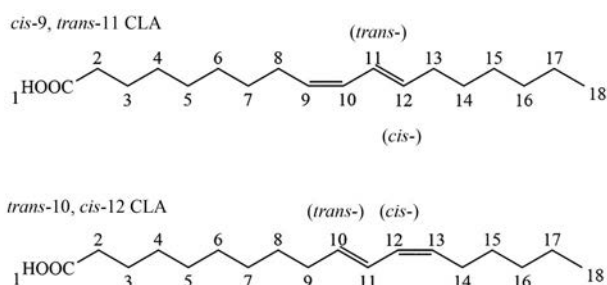


Figure 1 Structures of c9, t11-CLA and t10, c12-CLA. CLA: Conjugated linoleic acid

北京松源华兴科技发展有限公司); 紫外分光光度计 (型号: TU-1901, 北京普析通用仪器有限公司); 干法激光粒度仪 (型号: BT-2001, 丹东百特仪器有限公司); 倒置荧光显微镜 (型号: BDS200-FL, 重庆奥特光学仪器有限公司); 喉镜 (型号: MJ, 江苏迈骏医疗科技有限公司); 扫描电镜 (型号: S-4800, 日本 HITACHI 公司); 酶标仪 (型号: ELX800, 美国伯滕仪器有限公司); 高速组织研磨仪 (型号: KI-II, 武汉谷歌生物科技有限公司); 超低温冰箱 (型号: DW-86L828, 青岛海尔特种电器有限公司); 纯水仪 (型号: Heal Force Super NW, 上海康雷仪器有限公司)。

实验动物 SD大鼠, SPF级, 雄性, 体重 200 ± 20 g, 许可证号: SCXK (京) 2016-0006, 北京维通利华实验动物科技有限公司。实验期间动物自由取食、饮水。所有动物实验经军事科学院军事医学研究院伦理委员会批准且实验均按照相关指导原则和规定进行。

CLA 纳米乳的制备 称取处方量的乳化剂 (蛋黄卵磷脂: 泊洛沙姆 188 为 2:1, w/w) 加入适量的超纯水, 于 50°C 水浴锅搅拌溶解, 待其溶解完全后在水浴条件下边搅拌边加入已预热至 50°C 的 CLA, 加完后加入剩余的超纯水, 继续搅拌 10 min, 即得初乳。将制备好的初乳过高压均质机 35 000 psi, 循环 3 次, 得到乳白色的乳剂。

CLA 粉雾剂的制备和含量测定 通过筛选选择甘露醇为冻干保护剂, 按照冻甘露醇: 乳剂为 1:10 (w/v), 加入到共轭亚油酸纳米乳中, 待甘露醇能完全溶解后, 置于 -35°C 冷冻干燥机中, 预冻 3 h, 然后梯度升温, 共计冷冻干燥 40 h, 冻干粉末过 180 目筛, 得到共轭亚油酸粉雾剂 (conjugated linoleic acid dry powder inhalers, CDPIs), 为白色疏松粉末。取适量 CDPIs 于量瓶中, 加入乙醇定容, 取适量乙醇溶液用 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤后, 在 230 nm 处测定吸收度值, 与共轭亚油酸对照溶液比较后得到 CDPIs 中药物含量。本研究发现共轭亚油酸乙醇溶液在 227 和 230 nm 处有两个吸收峰。在这两个波长下测定不同浓度共轭亚油酸乙醇溶液的吸光度值, 在 $1\sim6\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 之间线性关系良好, R 分别为 0.999 4 和 0.999 3。

粒径、zeta 电位测定和电镜观察 取少量共轭亚油酸粉雾剂用 pH 7.4 PBS 复溶, 在纳米激光粒度仪上测定粒径和电位 ($n=3$)。取 $5\ \mu\text{L}$ 复溶后的乳剂于铜网支持碳膜上, 用 2% 磷钨酸溶液 (pH 7.0) 负染, 室温下干燥, 用透射电镜 (transmission electron microscope, TEM) 观察粒子形态。取适量的共轭亚油酸粉雾剂置于双面胶上, 高压气体吹去未附着的粉末, 用 40 mA 电子束喷金 20 min, 在扫描电镜 (scanning electron micro-

scope, SEM) 下观察粒子形态。

CLA 粉雾剂粉体学考察 冻干后粉末过 180 目筛, 用激光粒度仪测定其几何粒径。粉末松密度和振实密度 ($n=3$) 测定方法: 将过筛后粉末 (约 1 g) 均匀转移至 10 mL 量筒中, 将量筒中粉末振实 100 次, 记录振实前后药物重量与体积, 并计算。按照公式 (1) 计算空气动力学中位粒径 (D_a)。

$$D_a = D_g \sqrt{\frac{\rho_p}{\rho_0 \chi}} \quad (1)$$

其中, D_g 为几何中位粒径 (geometric median diameter, D_g); ρ_p 为有效颗粒密度, 其数值为振实密度的 1.26 倍^[16]; ρ_0 为参照密度, 等于 $1\ \text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$; χ 为动态形态因子 (球形时 $\chi=1$, 本文采用 1)^[17]。 D_a 是影响药物沉积部位的最主要的因素, 一般认为 D_a 在 $1\sim5\ \mu\text{m}$ 内的粒子可以到达肺深部^[18]。

原发性肺癌大鼠模型的建立及给药 取适量的 MCA 和 DEN 加入碘化油注射液, 在 70°C 加热 20 h (每 3 h 振荡摇匀), 其中 MCA 为均匀混悬状态, DEN 为完全溶解状态, 得到含 $100\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ MCA 和 10% DEN 碘化油混悬液作为原发性肺癌的诱变剂。取 0.1 mL 上述肺癌诱变剂通过气管插管喷入大鼠肺中, 正常饲养条件下饲养 45 天既可得到原发性肺癌大鼠^[19]。

将 5 只健康大鼠作为正常组, 气管喷入生理盐水 0.2 mL; 将 20 只原发性肺癌大鼠随机分为 4 组, 每组 5 只, 即模型组、空白粉雾剂组、阳性对照组 (吉非替尼混悬液组 (粒径为 $559.2 \pm 36.1\ \text{nm}$) 和 CLA 粉雾剂组。肺部给药方案为每天同一时间进行大鼠气管插管给药, 每 3 天给 1 次药, 连续给 4 次, 每次用量: 模型组为生理盐水 0.2 mL; 空白粉雾剂组为等量的空白干粉; 阳性对照组为吉非替尼混悬液 0.2 mL ($10\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$); CLA 粉雾剂组为含 CLA 的干粉 2 mg。具体给药操作步骤: 用喉镜撑开大鼠喉部, 暴露气管, 用细的软管进行气管插管, 尾端用三通阀连接至预充生理盐水或吉非替尼混悬液的 1.0 mL 注射器, 打开三通阀, 将生理盐水或混悬液喷入肺部; 粉末给药则先将粉末放入三通阀内, 注射器先压缩空气, 打开三通阀后, 压缩空气将粉末喷入肺部。

肺部外观及病理检查 大鼠末次给药后 2 天, 用 10% 水合氯醛麻醉并处死大鼠, 取上叶组织后立即用生理盐水 (4°C) 洗净表面血迹及残留物, 用滤纸擦干后将其放入 10% 甲醛溶液中固定 24 h, 石蜡包埋, 切片, 脱蜡、酒精梯度复水, 苏木精-伊红 (hematoxylin and eosin, H&E) 染色后在显微镜下观察组织病理形态。

免疫组化检测 取组织石蜡切片依次经过二甲

苯、无水乙醇和纯化水洗涤后,置于pH 6.0柠檬酸抗原修复缓冲液的修复盒中于微波炉内进行抗原修复,洗涤3次,加入3%过氧化氢溶液,避光孵育25 min,加入PBS (pH 7.4)在摇床上晃动洗涤3次,每次5 min用以脱色。加入3% BSA均匀覆盖组织,室温封闭30 min,加入一抗试剂,湿盒内4 °C孵育过夜,加入二抗试剂,室温孵育50 min后同上操作。切片滴加DAB显色液,至棕黄色后终止,苏木精负染,水洗,分化、脱水等一系列处理后,中性树胶封片于显微镜下观察拍照。

上述组织切片按照Tunel检测过程处理并染色,在荧光显微镜下观察细胞凋亡。

TNF- α 、IL-6、VEGF和总蛋白含量测定 取右肺中叶,称重,加入9倍质量生理盐水(4 °C),于高速组织研磨仪中进行组织研磨,研磨条件为60 Hz, 4 min,研磨后在低温高速离心机于4 °C条件下,10 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清分装,在-80 °C冰箱保存。用ELISA试剂盒测定匀浆中TNF- α 、IL-6和VEGF;用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定匀浆中总蛋白的量。

Western blot测定 取总蛋白测定时的匀浆按照4:1的比例(v/v)加入蛋白上样缓冲液,沸水浴变性15 min,然后用SDS-PAGE电泳和一系列的免疫反应后,用Alpha软件处理系统分析凝胶图像的光密度值。

统计学分析 采用SPSS 18.0软件对数据进行统计学分析(单因素方差分析, one-way ANOVA),比较组间差异, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异。实验数据以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

结果

1 CLA纳米乳最优处方

本研究以磷脂和泊洛沙姆188为乳化剂^[20],以乳剂的外观、稳定性、粒径和分散系数(polydispersity index, PDI)为指标,分别考察了蛋黄卵磷脂、大豆磷脂分别与泊洛沙姆188联用的乳化能力及高压均质工艺的影响。蛋黄卵磷脂和大豆卵磷脂作为乳化剂时纳米乳粒径分别为136.36 $\pm$ 15.31 nm和217.30 $\pm$ 25.31 nm, PDI分别为0.30 $\pm$ 0.08和0.30 $\pm$ 0.05,且大豆卵磷脂作为乳化剂时乳剂不稳定。经高压均质后,以蛋黄卵磷脂和泊洛沙姆188为乳化剂制备的纳米乳粒径和PDI均减小,分别从239.10 $\pm$ 19.03 nm和0.69 $\pm$ 0.04降至136.7 $\pm$ 14.49 nm和0.31 $\pm$ 0.04,说明高压均质能减小粒径,使分散更均匀,稳定性增加。最终确定采用蛋黄卵磷脂和泊洛沙姆188为乳化剂;高压均质工艺为35 000 psi、循环3次。

固定乳化剂的比例和种类,以乳剂外观、稳定性、粒径、PDI和zeta电位为指标,考察了不同浓度CLA对

乳剂的影响,当CLA浓度分别为5%、10%和15%时,粒径分别为80.40 $\pm$ 13.85、90.84 $\pm$ 10.06和175.93 $\pm$ 20.30 nm; PDI分别为0.23 $\pm$ 0.02、0.27 $\pm$ 0.01和0.31 $\pm$ 0.02; zeta电位分别为-46.77 $\pm$ 2.47、-41.73 $\pm$ 2.85和-41.53 $\pm$ 1.96 mV。当CLA浓度为15%时,粒径明显增大;10%和5%浓度的乳剂粒径、PDI和电数值均没有很大区别,为了提高载药量,最终确定乳剂处方中CLA浓度为10%。

2 CLA粉雾剂处方和制备工艺的优化

实验中筛选了乳糖和甘露醇两种冻干保护剂,乳剂中的浓度分别为5%、10%和15% (w/v),以冻干粉松密度、振实密度、 D_{50} 和 D_a 为指标,筛选最优的冻干保护剂种类及其浓度(表1)。以 D_a 值在1~5 μ m之间适合肺部吸入为最终指标,筛选出CLA纳米乳冻干保护剂为10%甘露醇,其最优处方制得粉雾剂 D_a 值为3.10 $\pm$ 0.17 μ m。

Table 1 Effects of different kinds of lyophilized protective agents on the properties of lyophilized powders. D_{50} : Geometric median diameter; D_a : Aerodynamic median diameter. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

Group	Characterization of dry powder			
	Bulk density /g·cm ⁻³	Tapped density /g·cm ⁻³	D_{50} /μm	D_a /μm
Mannitol 5%	Unable to get powder			
10%	0.15 $\pm$ 0.02	0.30 $\pm$ 0.01	5.20 $\pm$ 0.37	3.10 $\pm$ 0.17
15%	0.19 $\pm$ 0.01	0.34 $\pm$ 0.01	10.56 $\pm$ 0.58	6.82 $\pm$ 0.19
Lactose 5%	Unable to get powder			
10%	0.18 $\pm$ 0.02	0.33 $\pm$ 0.01	16.62 $\pm$ 0.38	10.66 $\pm$ 0.16
15%	0.21 $\pm$ 0.03	0.34 $\pm$ 0.02	20.87 $\pm$ 0.82	13.52 $\pm$ 0.64

3 CLA纳米乳的理化性质

CLA为白色液体,制备成乳剂后为O/W白色乳剂。乳剂粒径为90.84 $\pm$ 10.06 nm, PDI为0.27 $\pm$ 0.017, zeta电位为-41.73 $\pm$ 2.85 mV。CDPIs复溶后乳剂粒径为88.56 $\pm$ 9.08 nm, PDI为0.22 $\pm$ 0.015, zeta电位为-44.73 $\pm$ 3.85 mV。TEM显示,CLA纳米乳和CDPIs复溶后的乳剂均为球形乳滴,其粒径接近(图2)。

4 CLA粉雾剂的理化性质

CDPIs为白色疏松状粉末,可全部通过180目筛,松密度为0.15 $\pm$ 0.02 g·cm⁻³,振实密度为0.30 $\pm$ 0.01 g·cm⁻³,

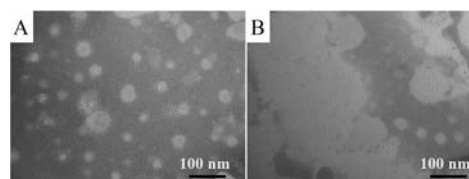


Figure 2 Transmission electron microscope (TEM) images of conjugated linoleic acid nanoemulsions (A) and re-dissolved conjugated linoleic acid dry powder inhalers (CDPIs) (B)

D_a 值为 $3.10 \pm 0.17 \mu\text{m}$, 在 $1 \sim 5 \mu\text{m}$ 之间, 适合肺部吸入给药。

扫描电镜 (scanning electron microscope, SEM) 观察空白辅料为片状颗粒形态, 表面有大量孔洞形成; CDPIs 为类球形颗粒, 表面没有孔洞, 考虑可能是共轭亚油酸吸附或嵌入在孔洞中 (图3)。

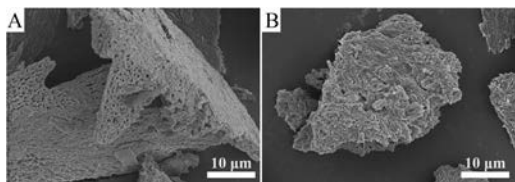


Figure 3 Scanning electron microscope (SEM) images of blank dry powder inhalers (DPIs) (A) and CDPIs (B)

5 CLA 粉雾剂治疗肺癌的药效学评价

与正常肺组织比较, 肺癌模型组和空白粉雾剂组的大鼠肺组织有大量肺癌白色结节 (图4), 而各治疗组的肺组织外观结节较少。H&E 染色表明正常大鼠肺泡结构清晰完整, 肺癌模型组和空白粉雾剂组有大量细胞增生和炎性细胞浸润, 而各治疗组病理状态明显减轻, 其中肺癌结节显著减少, 细胞增生与炎性细胞浸润现象也显著减轻, CDPIs 组效果最好 (图4)。

CD31 是表明血管形成的重要标记, 其增加表明肿瘤增殖活跃^[21]。肺癌模型组大鼠的 CD31 表达高于正常组大鼠, 各治疗组 CD31 的表达均减少, 其中 CDPIs 组表达最少 (图4)。

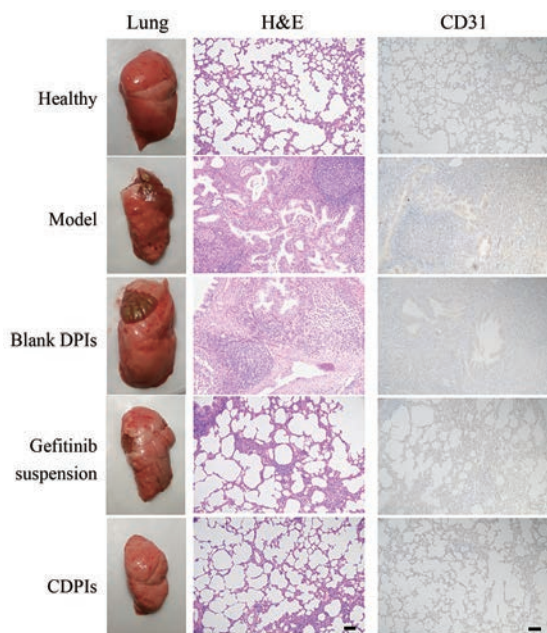


Figure 4 Appearance of lung tissues, the images of H&E (hematoxylin and eosin) ($\times 100$) and the expression of CD31 ($\times 100$). The scale bars indicate $100 \mu\text{m}$

VEGF 诱导血管生成, 促进肿瘤组织生长和高密度血管化^[22]。本研究中模型组的 VEGF 高度表达, 药物治疗后 VEGF 表达显著下降, 其中 CDPIs 组下降明显, 接近于正常组水平 (图5)。

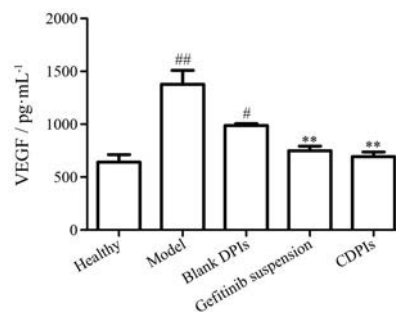


Figure 5 Levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) in rat lung tissues. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs healthy group; ** $P < 0.01$ vs model group

NF- κ B 具有明显的抑制细胞凋亡的功能, 与肿瘤的发生、生长和转移等多个过程密切相关。NF- κ B 持续激活会刺激细胞生长, 导致细胞增殖失控^[23]。NF- κ B 对肿瘤转移具有明显的促进作用, 能促进肿瘤转移相关基因细胞黏附因子-1 (ICAM-1)、血管内皮黏附因子-1 (VCAM-1) 和基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 等表达^[24]。CLA 可以通过抑制肿瘤细胞 NF- κ B p65 的表达, 发挥抗肿瘤作用^[25]。本研究中肺癌模型组 NF- κ B p65 表达明显升高, 与正常组有明显区别 ($P < 0.001$); 各治疗组 NF- κ B p65 表达明显降低, 其中 CDPIs 组相较于阳性药组更显著, 证明 CLA 可明显下调 NF- κ B p65 表达, 发挥抗肿瘤作用 (图6)。

6 CLA 粉雾剂具有抗炎作用

肿瘤往往表现为炎症反应水平增加, 炎症因子 IL-6 和 TNF- α 是典型炎症指标^[26], 总蛋白量的明显增多是炎症反应的直接标志^[27]。本研究中大鼠肺癌模型组肺组织中炎症因子 IL-6、TNF- α 和总蛋白量明显增多 (与正常组相比, 均 $P < 0.01$), CDPIs 组大鼠肺组织中 TNF- α 、IL-6 和总蛋白含量比模型组低, 且存在显著差异 ($P < 0.01$); 与正常组比较, 无显著差异 ($P > 0.05$)。吉非替尼组可显著降低大鼠肺组织中 TNF- α 和 IL-6 的含量 (与模型组相比 $P < 0.01$), 与 CDPIs 组相当; 总蛋白含量与正常组相比显著增高, 与模型组相比显著降低, 但不如 CDPIs (图6)。

7 CLA 粉雾剂可促进肿瘤细胞凋亡作用

Tunel 是检测细胞凋亡的常用方法^[22]。正常组、模型组和空白粉雾剂组中细胞凋亡发生较少, 而阳性药组和 CDPIs 组细胞凋亡较明显, 其中 CDPIs 组的细胞凋亡明显增多, 说明 CLA 通过促进肿瘤细胞凋亡发挥

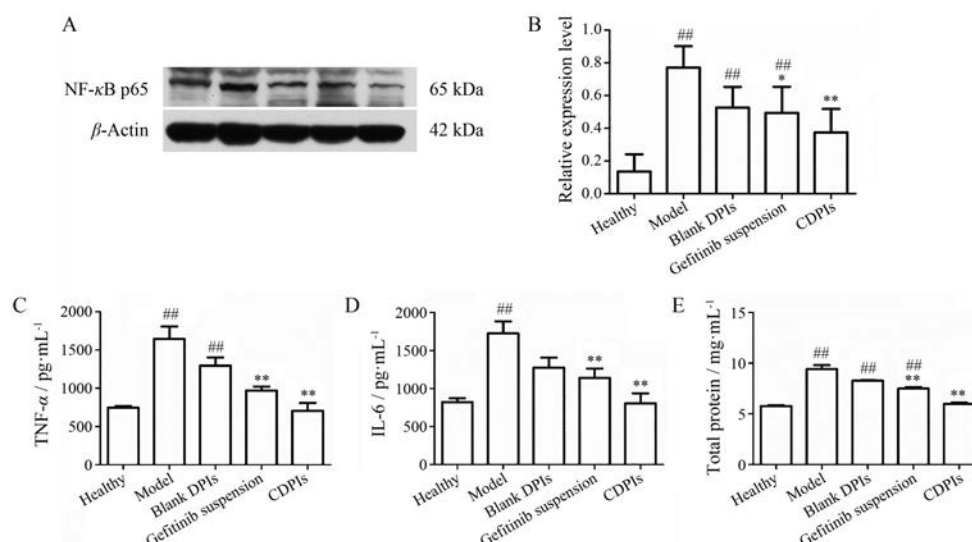


Figure 6 Levels of NF-κB p65 (A, B), tumor necrosis factor-α (TNF-α, C), interleukin-6 (IL-6, D), and total protein (E) in rat lung tissues. $n = 3, \bar{x} \pm s$. ^{##} $P < 0.01$ vs healthy group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs model group

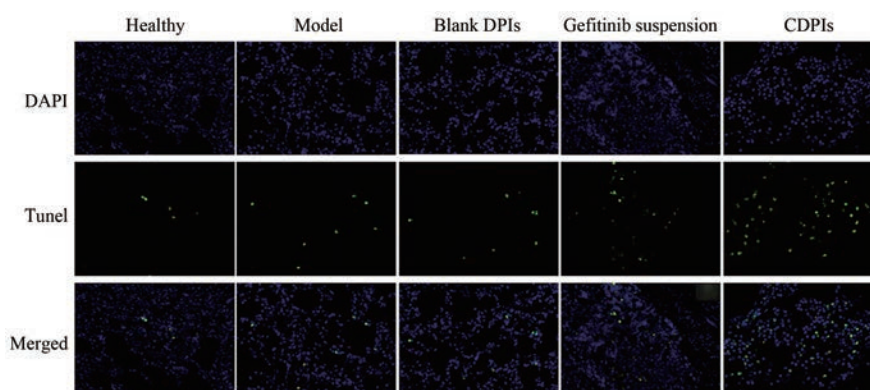


Figure 7 Apoptosis indicated by TUNEL staining (200×). The nuclei are shown by 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining (200×). The merged images of TUNEL and DAPI staining showed the apoptosis of the lung cells

抗肿瘤作用 (图7)。

讨论

肺癌目前仍是我国恶性肿瘤发病率和死亡率最高的癌症,临床上针对肺癌的化疗药物主要是全身给药,带来大量的不良反应^[28]。CLA具有优良的药理活性,在北美和欧洲等国家已被批准添加到多种食物中,被认为是一种天然来源的、非刺激的成分^[29]。CLA已被证实具有抗肿瘤作用,但其作为一种油类药物,口服生物利用度较低,影响了其肿瘤疾病的治疗效果^[30]。为了提高CLA生物利用度,本文选择安全性好的注射级蛋黄卵磷脂和泊洛沙姆188作为乳化剂,制备了分散均匀、稳定性好的O/W型纳米乳剂,使CLA能以纳米乳形态稳定、均匀地分散在水中。固定乳化剂比例和种类,以乳剂外观、稳定性、粒径和分散系数和zeta电位为指标,筛选了CLA浓度;虽然5%和10% CLA

均能很好地被乳化形成稳定乳剂,但为了保证高载药量,确定CLA浓度为10%。

纳米乳剂是一种热力学不稳定体系^[31],在存放过程中可能发生粒径增大和药物沉淀析出,为了提高其理化稳定性,加入10% (w/v) 甘露醇作为冻干保护剂,进一步制备成可吸入、适合携带和稳定性更好的粉雾剂,通过肺部给药使药物靶向到肺部,提高了药物溶解度和生物利用度,并减轻局部刺激和不良反应^[32]。以 D_a 为指标,对肺吸入给药的辅料乳糖和甘露醇进行筛选,确定10% (w/v) 甘露醇作为冻干保护剂,此时粉末 D_a 值为 $3.10 \pm 0.17 \mu\text{m}$,符合吸入要求(1~5 μm)。共轭亚油酸乙醇或正己烷溶液的最大吸收波长在230 nm左右,而非共轭亚油酸在203 nm处有最大紫外吸收^[33]。本研究选择了230 nm波长用于含量测定。

本文对CLA体内抗肺癌效果和作用机制进行了详细考察。NF-κB具有明显抑制细胞凋亡的功能,与肿瘤

的发生、生长和转移等多个过程密切相关。NF- κ B持续激活会刺激细胞生长,导致细胞增殖失控^[34]。NF- κ B对肿瘤转移具有明显的促进作用,能促进肿瘤转移相关基因 ICAM-1、VCAM-1 和 MMP-9 等表达。在肺部给药后,CLA 可通过 NF- κ B p65 通路调节大鼠体内的肿瘤细胞的发生、生长和转移,发挥抗癌作用^[35];CLA 还可减少 CD31 和 VEGF 的表达,抑制血管生成,降低肿瘤组织生长和高密度血管化速度;CLA 可通过调节肿瘤细胞的凋亡,发挥抗肿瘤作用。

本研究基于 CLA 的性质和肺部给药的特点,将油类药物 CLA 固体化,制备成适合肺部吸入的粉雾剂,通过肺部给药,将药物直接递送至肺癌组织,增加了其对肺癌的局部治疗效果。CLA 粉雾剂有望成为肺癌治疗的新选择。

作者贡献: 张国立和肖志美负责实验设计、实验操作、数据分析和论文初稿撰写;于翔负责实验设计和结果分析;方荣震负责实验操作;王秀负责论文写作与修改;杜丽娜负责实验指导、数据分析和论文修改;金义光负责课题设计、实验指导、数据分析、论文写作与修改。

利益冲突: 本文不与任何个人或集体存在利益冲突。

References

- [1] Liu R, Wei S, Chen J, et al. Mesenchymal stem cells in lung cancer tumor microenvironment: their biological properties, influence on tumor growth and therapeutic implications [J]. *Cancer Lett*, 2014, 353: 145-152.
- [2] Chen Y, Li J, Chen S, et al. Nab-paclitaxel in combination with cisplatin versus docetaxel plus cisplatin as first-line therapy in non-small cell lung cancer [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 10760-10767.
- [3] Zhang T, Wang R, Li M, et al. Comparative study of intratracheal and oral gefitinib for the treatment of primary lung cancer [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2020, 18: 105352-105361.
- [4] Hunt WT, Kamboj A, Anderson HD, et al. Protection of cortical neurons from excitotoxicity by conjugated linoleic acid [J]. *J Neurochem*, 2010, 115: 123-130.
- [5] Yuan G, Chen X, Li D. Conjugated linolenic acids and their bioactivities: a review [J]. *Food Funct*, 2014, 5: 1360-1368.
- [6] Fuke G, Nornberg JL. Systematic evaluation on the effectiveness of conjugated linoleic acid in human health [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2017, 57: 1-7.
- [7] Dubey KK, Sharma G, Kumar A. Conjugated linolenic acids: implication in cancer [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67: 6091-6101.
- [8] Bruen R, Fitzsimons S, Belton O. Atheroprotective effects of conjugated linoleic acid [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2017, 83: 46-53.
- [9] Wang W, Li Q, Pan J. Inhibitory effect of conjugated linoleic acid on obesity of mice [J]. *Food Sci (食品科学)*, 2016, 37: 211-216.
- [10] Villacorta L, Minarrieta L, Salvatore SR, et al. *In situ* generation, metabolism and immunomodulatory signaling actions of nitro-conjugated linoleic acid in a murine model of inflammation [J]. *Redox Biol*, 2018, 15: 522-531.
- [11] Liu L, Miao J, Zheng Z. Review on the physiological function of conjugated linoleic acid [J]. *J Food Safe Qual (食品安全质量检测学报)*, 2020, 11: 2552-2556.
- [12] Yang MY, Chan JGY, Chan HK. Pulmonary drug delivery by powder aerosols [J]. *J Control Release*, 2014, 193: 228-240.
- [13] Li M, Zhu L, Liu B, et al. Tea tree oil nanoemulsions for inhalation therapies of bacterial and fungal pneumonia [J]. *Colloids Surf B Biointerf*, 2016, 141: 408-416.
- [14] Kuzmov A, Minko T. Nanotechnology approaches for inhalation treatment of lung diseases [J]. *J Control Release*, 2015, 219: 500-518.
- [15] Zhang G, Xiao Z, Yu X, et al. Comparative study of zedoary turmeric oil and curcumin dry powder inhalers for treatment of acute lung injury [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 1312-1319.
- [16] Xu C, Wang Y, Guo Z, et al. Pulmonary delivery by exploiting doxorubicin and cisplatin co-loaded nanoparticles for metastatic lung cancer therapy [J]. *J Control Release*, 2019, 10: 153-163.
- [17] Cheng S, Kourmatzis A, Mekonnen T, et al. Does upper airway deformation affect drug deposition? [J]. *Int J Pharm*, 2019, 572: 118773-118782.
- [18] Jin Y, Li M. Pulmonary drugs delivery systems and progress in their applications to lung disease treatment [J]. *J Int Pharm Res (国际药学研究杂志)*, 2015, 42: 289-322.
- [19] Zhang T, Chen Y, Ge Y, et al. Inhalation treatment of primary lung cancer using liposomal curcumin dry powder inhalers [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2018, 8: 440-448.
- [20] Huang C, Wu Y, Huang B, et al. Formulation design, absorption mechanism and bioavailability of nanoemulsions for enhancing oral absorption of raloxifene [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 1726-1735.
- [21] Zeng Y, Liu P, Yang X, et al. The dietary c9,t11-conjugated linoleic acid enriched from butter reduces breast cancer progression *in vivo* [J]. *J Food Biochem*, 2020, 44: 13163-13173.
- [22] Zhang M, Li M, Ge Y, et al. Liposomal melatonin dry powder inhalers for the treatment of primary lung cancer [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 555-564.
- [23] Kadirareddy RH, GhantaVemuri S, Palempalli UMD. Probiotic conjugated linoleic acid mediated apoptosis in breast cancer cells by downregulation of NF- κ B [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2016, 17: 3395-3403.
- [24] Ricci M, Miola M, Multari C, et al. PPARs are mediators of anti-cancer properties of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) functionalized with conjugated linoleic acid [J]. *Chem*

- Biol Interact, 2018, 25: 9-14.
- [25] Ma N, Chang G, Huang J, et al. *cis*-9, *trans*-11-Conjugated linoleic acid exerts an anti-inflammatory effect in bovine mammary epithelial cells after *Escherichia. coli* stimulation through NF- κ B signaling pathway [J]. J Agric Food Chem, 2018, 67: 193-200.
- [26] Queiroz MP, Lima MDS, Barbosa MQ, et al. Effect of conjugated linoleic acid on memory and reflex maturation in rats treated during early life [J]. Front Neurosci, 2019, 13: 1-12.
- [27] Haghighatdoost F, Gh BFN. Effect of conjugated linoleic acid on blood inflammatory markers: a systematic review and meta-analysis on randomized controlled trials [J]. Eur J Clin Nutr, 2018, 72: 1071-1082.
- [28] Moon HS. Biological effects of conjugated linoleic acid on obesity-related cancers [J]. Chem Biol Interact, 2014, 5: 189-195.
- [29] Hartigh LJD. Conjugated linoleic acid effects on cancer, obesity, and atherosclerosis: a review of pre-clinical and human trials with current perspectives [J]. Nutrients, 2019, 11: 370-398.
- [30] Li Q, Xue F, Qu J, et al. Nano-in-micro delivery system prepared by co-axial air flow for oral delivery of conjugated linoleic acid [J]. Mar Drugs, 2018, 17: 15-25.
- [31] Li M, Zhang T, Zhu L, et al. Liposomal andrographolide dry powder inhalers for treatment of bacterial pneumonia via anti-inflammatory pathway [J]. Int J Pharm, 2017, 528: 163-171.
- [32] Hu Y, Li M, Zhang M, et al. Inhalation treatment of idiopathic pulmonary fibrosis with curcumin large porous microparticles [J]. Int J Pharm, 2018, 551: 212-222.
- [33] Chen H, Qi H, Shi Y. Research process on analytical methods of conjugated linoleic acids [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2014, 34: 1519-1523.
- [34] Tan J, Wan L, Chen X, et al. Conjugated linoleic acid ameliorates high fructose-induced hyperuricemia and renal inflammation in rats via NLRP3 inflammasome and TLR4 signaling pathway [J]. Mol Nutr Food Res, 2019, 63: e1801402.
- [35] Olson JM, Haas AW, Lor J, et al. A comparison of the anti-inflammatory effects of *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid to celecoxib in the collagen-induced arthritis model [J]. Lipids, 2017, 52: 151-159.