

· 基础研究 ·

纳米 As_2O_3 磁性脂质体磁感应加热治疗裸鼠人宫颈癌移植瘤

张东生 唐秋莎 王子好 樊祥山

【摘要】目的 研究纳米 As_2O_3 磁性脂质体联合磁感应加热治疗异种移植性宫颈癌的作用及机制。**方法** 建立裸鼠人宫颈癌移植瘤模型,将纳米 As_2O_3 脂质体、纳米磁性脂质体和纳米 As_2O_3 磁性脂质体等分别局部注射到裸鼠人宫颈癌移植瘤中,交变磁场(AMF)作用 30 d 后检测抑瘤率、裸鼠移植瘤凋亡、增殖指数、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达及其对肝、肾功能的影响等。**结果** 在 AMF 作用下,各组移植瘤的质量抑制率分别为 57.06% ($P < 0.05$)、49.44% ($P < 0.05$) 和 80.84% ($P < 0.01$)。凋亡相关指标(AI、PI、Bcl-2、Bax)与对照组相比差异均有统计学意义($P < 0.05$);各组血清 AST、ALT、BUN 及 Cr 的均值之间相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。实验组肿瘤组织有明显坏死,而瘤旁和内脏组织均未见明显损伤。**结论** 纳米 As_2O_3 磁性脂质体是一种较理想的靶向治疗肿瘤的复合载体,可以同时发挥药物和磁感应加热的联合定向治疗作用,且对肝、肾功能没有明显的毒性,极可能成为一种宫颈癌治疗新途径。

【关键词】 异种移植性宫颈癌; 磁感应加热; 纳米 As_2O_3 磁性脂质体

Therapeutic effects of nano-magnetoliposomes containing As_2O_3 combined with magnetic fluid hyperthermia on xenograft cervical carcinoma ZHANG Dong-sheng*, TANG Qiu-sha, WANG Zi-yu, FAN Xiang-shan. * Department of Pathology and Pathophysiology, School of Basic Medical Science, Southeast University, Nanjing 210009, China

【Abstract】Objective To explore the inhibition effects and mechanics of nano-magnetoliposomes containing As_2O_3 (NMLA) combined with magnetic fluid hyperthermia on xenograft cervical carcinoma in nude mice. **Methods** After establishment of xenograft cervical carcinoma models in nude mice, nano-liposomes containing As_2O_3 (NLA group), nano-magnetoliposomes (NML group) and NMLA (NMLA group) were injected into the xenograft cervical carcinoma, respectively, and all nude mice were exposed to AMF for three times. The inhibitive ratios (IR) of the tumors, apoptosis index (AI), proliferation index (PI) and the expression of Bcl-2 and Bax proteins were measured, as well as the function of liver and kidney. **Results** IRs in NLA, NML and NMLA groups were 57.06% ($P < 0.05$), 49.44% ($P < 0.05$) and 80.84% ($P < 0.001$), respectively. Compared with those in the control group, AI and Bax protein expression in experimental groups were higher ($P < 0.05$), while PI and Bcl-2 protein expression were lower ($P < 0.05$). There was no distinct difference in the values of ALT, AST, Bun and Cr ($P > 0.05$). The obvious necrosis was observed in the tumor tissues in NLA, NML and NMLA groups, but not in the peripheral tissues of the tumors and the viscera. **Conclusion** NMLA, without toxicity of liver and kidney, might be a desirable composite carrier of targeted treatment with chemotherapy and thermotherapy simultaneously.

【Key words】 Xenograft cervical cancer; Radiofrequency-induced hyperthermia; Nano-magnetoliposomes with As_2O_3

近年来,我国学者将主要成分为三氧化二砷(As_2O_3)的中药砒霜用于治疗急性早幼粒细胞白血病,疗效良好,且毒副作用较低,引起了人们从肿瘤治疗学角度研究 As_2O_3 的极大兴趣^[1]。由于静脉全身使用该药副作用多,极大限制了其在实体瘤上的应用,因此,我们在看到 As_2O_3 的临床应用价值的同时,必须认

识到为进一步减少药量,提高疗效,积极深入开展对 As_2O_3 新剂型、靶向定位等方面的研究是非常迫切和必要的^[2,4]。我们在前期研究中,已成功制备了纳米 As_2O_3 磁性脂质体^[5],且经体外实验证明其不仅具有优良的磁响应性与缓释性,还具有化学毒性与热毒性双重杀伤作用^[6]。在本实验中,通过建立宫颈癌裸鼠移植瘤模型,利用本室自制的三种复合纳米脂质体,观察其联合磁感应加热对裸鼠人宫颈癌移植瘤模型的影响,探讨 As_2O_3 磁性脂质体对宫颈癌的作用及机制。

材料与方法

一、实验材料

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30371830);江苏省自然科学基金资助项目(No. BK2001003);江苏省中医药、中西医结合重点资助项目(No. H027)

作者单位:210009 南京,东南大学医学院病理学与病理生理学系(张东生、唐秋莎);南京中医药大学基础医学院病理教研组(王子好);南京大学医学院附属鼓楼医院病理科(樊祥山)

纳米 As_2O_3 脂质体 (30 nm、圆形、单室)、纳米磁性脂质体、纳米 As_2O_3 磁性脂质体 (190 nm、球形或卵球形、单室) (均为本室自制); 细胞凋亡原位检测 (TUNEL) 试剂盒: 博士德公司; 小鼠抗 PCNA (增殖细胞核抗原)、Bax (Bcl-2 相关 X 蛋白)、Bcl-2 (B 细胞淋巴瘤/白血病基因) 单抗及免疫组化试剂: 北京中山公司; 人宫颈癌 HeLa 细胞: 中科院上海细胞研究所; Balb/c nu/nu 裸小鼠 24 只; 5~7 周龄, 雌性, 无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级, 中科院上海实验动物中心; 深圳产 SP-04C 高频感应加热设备。

二、实验方法

(一) 细胞培养及移植瘤建立

HeLa 细胞在 5% CO_2 、37℃ 饱和湿度的培养箱中培养, 胰酶和 EDTA 混合消化液消化, Hanks 和含小牛血清的 RPMI 1640 培养基终止消化, 吹打成细胞悬液, 用不含小牛血清的 RPMI 1640 培养基重悬, 无菌操作下种植到裸鼠背部右肩胛皮下, 注射时注意回抽以防止细胞被注射至血管内。观察移植瘤生长情况。

(二) 治疗方法

将已成瘤裸小鼠随机分成 4 组, PBS 对照组 ($n=6$)、纳米 As_2O_3 脂质体组 ($n=6$)、纳米磁性脂质体加热组 ($n=5$) 和纳米 As_2O_3 磁性脂质体加热组 ($n=7$)。4 组小鼠分别在肿瘤内及其周围注射无菌 PBS 液、 As_2O_3 脂质体、磁性脂质体及 As_2O_3 磁性脂质体各 0.2 ml (其中 As_2O_3 量为每只 50 μg , 磁性材料为每只 4 mg), 4 h 后, 纳米磁性脂质体加热组和 As_2O_3 磁性脂质体加热组裸鼠麻醉后置高频感应加热器中 (200 kHz, 4 kW, 输出电流 300 A), 使肿瘤部位位于线圈中央。交变磁场 (alternating magnetic field, AMF) 作用 30 min, 每 5 min 测温 1 次, 测温部位分别为肿瘤区、肿瘤周围区以及直肠。用同样方法治疗 3 次, 每两次间隔时间为 24 h。

(三) 治疗效果的观察

1. 计算肿瘤质量抑制率: 用脱臼法处死荷瘤鼠, 剥离肿瘤组织, 称瘤重, 根据公式计算肿瘤质量抑制率: 肿瘤质量抑制率 = $(1 - \text{实验组肿瘤质量} / \text{对照组肿瘤质量}) \times 100\%$ 。

2. 免疫组化法检测移植瘤细胞凋亡及增殖情况: 细胞凋亡检测采用 TUNEL 法, 按检测试剂盒说明书操

作; 增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、Bcl-2 和 Bax 表达的检测采用 S-P 法, 步骤按 S-P 即用型免疫组化试剂盒说明书进行。结果判定: 凋亡及 PCNA 阳性细胞染色均为棕黄色, 位于细胞核内。数 5 个以上高倍视野, 不少于 1 000 个细胞, 计数阳性细胞数并以百分数表示, 作为细胞凋亡指数 (apoptosis index, AI) 及细胞增殖指数 (proliferation cell nuclear antigen-positive nuclei cell index, PI)。Bax、Bcl-2 阳性细胞染色均为棕黄色, 位于细胞膜与胞浆内, 计数方法同前。

3. 三种复合型纳米脂质体对荷瘤鼠肝肾功能的影响: 30 d 后分别取各组裸鼠股动脉血, 37℃ 水浴静置 30 min, 离心, 取血清检测丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)、肌酐 (creatinine, Cr)。

4. 电镜观察: 肿瘤组织包埋, 超薄切片, 铅铀双染色, H-600 透射电镜下观察。

三、统计学分析

用 SPSS 10.0 统计软件包进行 One-Way ANOVA 分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、移植瘤肿瘤质量抑制率

三种复合型纳米脂质体在 AMF 作用下对裸鼠人宫颈癌移植瘤的质量抑制率见表 1。

二、移植瘤细胞凋亡及免疫组化的检测结果

三种复合型纳米脂质体在 AMF 作用下对荷瘤裸鼠 AI、PI、Bax 及 Bcl-2 的影响见表 2。

三、三种复合型纳米脂质体对裸鼠肝、肾功能的毒性作用

三种复合型纳米脂质体在 AMF 作用下对荷瘤裸鼠肝、肾功能的影响见表 3。

四、超微结构观察

电镜下 PBS 对照组和 3 个实验组瘤细胞均有空泡和脂肪变性; 在实验组, 可见大量瘤细胞坏死和崩解, 同时还发现较多凋亡的肿瘤细胞, 瘤细胞体积变小, 细胞膜有发泡现象, 细胞核异染色质浓染, 边集于核膜; 并可见核固缩。

表 1 三种复合型纳米脂质体在 AMF 作用下对裸鼠人宫颈癌移植瘤的质量抑制率 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	平均体重 (g)		肿瘤质量 (g)	抑瘤率 (%)
		治疗前	治疗后		
PBS 对照组	6	24.07 $\pm$ 1.62	24.43 $\pm$ 3.35	3.28 $\pm$ 1.13	
纳米 As_2O_3 脂质体组	6	24.45 $\pm$ 0.72	24.4 $\pm$ 0.58	1.41 $\pm$ 0.65	57.06 *
纳米磁性脂质体加热组	5	23.98 $\pm$ 1.05	24.62 $\pm$ 1.31	1.66 $\pm$ 0.80	49.44 *
纳米 As_2O_3 磁性脂质体加热组	7	23.80 $\pm$ 0.86	23.83 $\pm$ 1.63	0.63 $\pm$ 0.53	80.84 $^{\# \Delta}$

注: 与 PBS 对照组比较, * $P < 0.05$, $^{\#} P < 0.01$; 与纳米 As_2O_3 脂质体组和纳米磁性脂质体加热组比较, $^{\Delta} P < 0.05$

表 2 三种复合型纳米脂质体在 AMF 作用下对荷瘤裸鼠 AI、PI、Bax 及 Bcl-2 的影响(%, $\bar{x} \pm s$)

组 别	n	AI	PI	Bax	Bcl-2
PBS 对照组	6	0.34 ± 0.36	88.57 ± 8.82	21.65 ± 7.34	77.65 ± 6.78
纳米 As ₂ O ₃ 脂质体组	6	2.12 ± 1.57 *	60.87 ± 10.51 *	40.78 ± 6.52 [#]	30.76 ± 14.86 *
纳米磁性脂质体加热组	5	2.27 ± 1.41 *	67.80 ± 7.13 *	47.43 ± 10.28 [#]	36.34 ± 6.84 *
纳米 As ₂ O ₃ 磁性脂质体加热组	7	4.98 ± 1.04 * [△]	60.24 ± 11.14 *	58.91 ± 5.12 *	29.87 ± 7.83 *

注:与 PBS 对照组相比,* $P < 0.01$,[#] $P < 0.05$;与纳米 As₂O₃ 脂质体组和纳米磁性脂质体加热组比较,[△] $P < 0.05$

表 3 三种复合型纳米脂质体在 AMF 作用下对荷瘤裸鼠肝、肾功能的影响($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	ALT	AST	BUN	Cr
PBS 对照组	6	28.33 ± 3.37	106.67 ± 13.2	5.92 ± 0.66	56.83 ± 3.00
纳米 As ₂ O ₃ 脂质体组	6	27.50 ± 4.23	89.50 ± 27.65	5.83 ± 0.94	52.86 ± 2.04
纳米磁性脂质体加热组	5	27.50 ± 1.73	122.00 ± 18.42	5.34 ± 0.38	51.20 ± 5.93
纳米 As ₂ O ₃ 磁性脂质体加热组	7	29.67 ± 3.14	100.71 ± 17.21	5.81 ± 0.82	53.57 ± 2.51

注:各组裸鼠血清中的 ALT、AST、Bun 及 Cr 的平均值比较, $P > 0.05$

讨 论

磁性脂质体(magnetic liposomes)是近年来发展起来的一种重要的靶向新型制剂^[7],它是在脂质体中掺入磁性物质而制成。除了具备脂质体的特点,它可以在体外磁场的作用下,把抗癌药物选择性地输送和定位于靶区,从而降低药量,减小毒性,提高疗效。而且在交变磁场作用下,到达靶区的磁性粒子能迅速吸收电磁波能量而升温至有效肿瘤治疗温度,导致肿瘤组织坏死,而无磁性脂质体的正常组织则不受损伤,起到了细胞内定向热疗的作用。传统中药砒霜的纳米磁性脂质体的研究国内外未见报道。

本实验中,我们分别将纳米 As₂O₃ 脂质体、纳米磁性脂质体和纳米 As₂O₃ 磁性脂质体局部注射到裸鼠肩胛部皮下的宫颈癌移植瘤内,再将移植瘤置于 AMF 中。结果发现三个实验组与 PBS 对照组相比,肿瘤平均质量皆有明显减小。从抑瘤率来看,纳米 As₂O₃ 磁性脂质体加热组的肿瘤体积和质量不但与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),而且与纳米 As₂O₃ 脂质体组以及纳米磁性脂质体加热组比较差异也有统计学意义($P < 0.05$)。这就说明:在 AMF 作用下,As₂O₃ 和磁感应加热联合治疗比单纯的 As₂O₃ 治疗或单纯的磁感应加热治疗的效果都要显著。

大量研究表明,无论是 As₂O₃ 还是热疗都是通过诱导细胞凋亡与抑制增殖两方面来发挥其抗肿瘤的作用^[8,9]。本实验结果也验证了这一点。首先三个实验组均可诱导宫颈癌裸鼠移植瘤细胞的凋亡率增加。其 AI 与对照组相比均增高($P < 0.05$)。凋亡是由多基因参与的复杂过程,如 bcl-2 是一种凋亡抑制基因,而 bax 能抵消 bcl-2 的作用,促使癌细胞凋亡。本实验通过免疫组化检测 bcl-2 及 bax 基因的表达,发现与 PBS 对照组相比,其它三组 bcl-2 的表达均明显降低,bax 的表达均显著增加。结果表明:As₂O₃ 下调 bcl-2 蛋白所产生的抗凋亡作用,相应地上调了 bax 表达,最终诱导细胞凋亡。也即 As₂O₃ 诱导凋亡与 bcl-2 明显下调及 bax 显著上调相吻合。其次,本研究中三个实验组的 PI 均较 PBS 对照组低($P < 0.01$),但三个实

验组之间差异无统计学意义。因 PCNA 免疫组化染色可作为估计细胞增殖活性的指标^[10],故推测,As₂O₃ 与热疗对裸鼠肿瘤细胞生长的抑制作用也可能是通过抑制 PCNA 蛋白的表达,从而降低 DNA 多聚酶 δ 的活性,干扰肿瘤细胞 DNA 的合成,阻断细胞进入 S 期而停止增殖。

考虑到砒剂治疗肿瘤的安全性,本研究还检验了三种治疗材料对裸鼠肝、肾功能的毒性作用。结果显示三个治疗组的 AST、ALT、BUN 和 Cr 的均值与 PBS 对照组比较,差异均无统计学意义,心、肝、脾、肺、肾、脑、皮肤等重要脏器的组织学亦未见改变,说明其具有较好的生物相容性。

参 考 文 献

- 1 赵维莅,陈赛娟. 砒剂治疗白血病人肿瘤靶向治疗的新模式. 中华医学杂志,2005,85:439-440.
- 2 Gortzi O, Antimisiaris SG, Klepetsanis P, et al. rsonoliposomes: effect of arsonolipid acyl chain length and vesicle composition on their toxicity towards cancer and normal cells in culture. Eur J Pharm Sci,2003,18:175-183.
- 3 王子好,张东生. 纳米药物的研究进展. 东南大学学报(医学版),2004,23:131-135.
- 4 徐辉碧,杨祥良,谢长生,等. 纳米技术在中药研究中的应用. 中国药科大学学报,2001,32:161-165.
- 5 樊祥山,张东生. 具有磁感应定向加热肿瘤治疗作用的纳米 As₂O₃ 磁性脂质体的制备和表征. 东南大学学报(自然科学版),2004,34:500-504.
- 6 邢宝玲,张东生. 纳米 As₂O₃ 磁性脂质体的制备和表征. 南京医科大学学报(自然科学版),2005,25:9-13.
- 7 樊祥山,张东生,郑杰. 磁性脂质体在肿瘤治疗研究中的应用. 国外医学肿瘤学分册,2003,30:147-149.
- 8 Yan SY, Zhang DS, Gu N, et al. Therapeutic effect of Fe₂O₃ nanoparticles combined with magnetic fluid hyperthermia on the cultured human liver cancer cells and xenograft liver cancer. J Nanosci Nanotechnol, 2005,5:1-8.
- 9 Wang ZY, Zhang DS, Gu N, et al. Preparation and evaluation of arsenic trioxide nanoparticles for the treatment of SMMC-7721 cells in vitro. J Southeast Univ (Engl ed),2005,21:58-62.
- 10 Okuno Y, Nishimura Y, Kashu I, et al. Prognostic values of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and ki-67 for radiotherapy of oesophageal squamous cell carcinomas. Br J Cancer, 1999,80:387-395.

(修回日期:2005-12-30)

(本文编辑:阮仕衡)