

文章编号:1005-6947(2007)02-0121-04

· 基础研究 ·

# 磁靶纳米化疗药物治疗胆管癌移植瘤的对比研究

唐滔<sup>1</sup>, 郑建伟<sup>1</sup>, 李宏<sup>1</sup>, 肖宝来<sup>1</sup>, 陈波<sup>1</sup>, 李高<sup>2</sup>, 许帅<sup>3</sup>, 邹声泉<sup>1</sup>, 艾星<sup>4</sup>, 李曦<sup>5</sup>

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 1. 普通外科 2. 药学院 4. 泌尿外科, 湖北 武汉 430030; 3. 武汉理工大学材料复合新技术国家重点实验室, 湖北 武汉 430070; 5. 武汉大学人民医院 消化内科, 湖北 武汉 430060)

**摘要:**目的 比较纳米磁靶向性药囊与其他化疗药物治疗裸鼠人胆管癌移植瘤的效果并探讨其机制。方法 以在体外培养的人胆管癌细胞 QBC939 接种裸鼠。20d 后将裸鼠随机分为 4 组(每组 8 只):生理盐水对照组(A 组), 5-FU 治疗组(B 组), 纳米磁靶向性药囊 + 内磁化支架治疗组(C 组), 健择治疗组(D 组)。记录各组各时段肿瘤体积变化和抑瘤率, 绘制肿瘤生长曲线。于治疗后 35d 处死裸鼠, 取肿瘤组织观察超微结构改变。结果 A, B, C, D 组于治疗后 35d 肿瘤体积分别为  $(2\ 256.1 \pm 267.1) \text{ mm}^3$ ,  $(2\ 096.5 \pm 237.9) \text{ mm}^3$ ,  $(1\ 392.2 \pm 189) \text{ mm}^3$ ,  $(1\ 534.9 \pm 115) \text{ mm}^3$ , 其中 C, D 组与 A, B 组之间的肿瘤体积比较有明显差异 ( $P < 0.05$ )。B, C, D 组抑瘤率为 7.4%, 39.6% 和 33%。电镜观察 C 组和 D 组均有凋亡细胞出现。结论 同等剂量下, 纳米磁靶向性药囊治疗效果优于 5-FU, 但与健择无明显差异。 [中国普通外科杂志, 2007, 16(2):121-124]

**关键词:** 胆管肿瘤/药物疗法; 肿瘤, 实验性; 肿瘤移植; 磁靶纳米化疗药物/治疗应用

**中图分类号:** R657.4 **文献标识码:** A

## A comparative study of targeting drug magnetic nanoparticles and other chemotherapy drugs on human cholangiocarcinoma xenografts

TANG Tao<sup>1</sup>, ZHENG Jian-wei<sup>1</sup>, LI Hong<sup>1</sup>, XIAO Bao-lai<sup>1</sup>, CHEN Bo<sup>1</sup>, LI Gao<sup>2</sup>, XU Shu-ai<sup>3</sup>, ZHOU Sheng-quan<sup>1</sup>, AI Xing<sup>4</sup>, LI Xi<sup>5</sup>

(1. Department of General Surgery, Tongji Hospital 2. College of Pharmacy 4. Department of Urology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 3. Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430070, China; 5. Department of Digestion, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

**Abstract: Objective** To study the effect of magnetic nanoparticles on human cholangiocarcinoma xenograft in nude mice, and compared with other chemotherapy drugs

**Methods** We established human cholangiocarcinoma xenograft in nude mice with QBC939 cell line. The nude mice were divided into 4 groups randomly. Saline, 5-FU, Gemcitabine and magnetic nanoparticles were given to nude mice through tail vein on 20d after implanting QBC939 cell line. Calculations were done at different time after treatment in order to compare tumor volume, inhibition ratio of tumor and tumor growth curve of each group. The nude mice were killed on 35d after treatment to harvest tissue for electron microscopic examination to observe ultra-structural changes. **Results** The tumor volume of control, 5-FU, magnetic nanoparticles and Gemcitabine groups was  $(2\ 256.1 \pm 267.1) \text{ mm}^3$ ,  $(2\ 096.5 \pm 237.9) \text{ mm}^3$ ,  $(1\ 392.2 \pm 189) \text{ mm}^3$ , and  $(1\ 534.9 \pm 115) \text{ mm}^3$  respectively. The last two groups have significant difference compared to the first two groups ( $P < 0.05$ ). The ratio of inhibition of tumor and apoptosis in the chemotherapy treated groups were 7.4%, 39.6%, and 33.0% respectively. **Conclusions** The effect of targeting drug magnetic nanoparticles was better than equivalent dosage of 5-FU, but as the same of Gemcitabine. [Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(2):121-124]

**基金项目:** 国家 863 高技术研究发展计划资助项目(2002AA214061)。

**收稿日期:** 2006-02-28; **修订日期:** 2006-06-28。

**作者简介:** 唐滔, 男, 湖北武汉人, 华中科技大学同济医学院附属同济医院博士研究生, 主要从事肝胆胰肿瘤外科方面的研究。

**通讯作者:** 邹声泉 E-mail: sqzou@tjmu.edu.cn。

**Key words:** Bile Duct Neoplasms/drug ther; Neoplasms, Experimental; Neoplasm Transplantation; Targeting

Drug Magnitic Nanopaticles/ther use

**CLC number:** R657.4

**Document code:** A

据报道以5-氟尿嘧啶为主的单药或联合化疗治疗胆管癌的有效率为14%~18%<sup>[1]</sup>。健择系一种新的核苷类化合物,对多种肿瘤有较高的临床疗效<sup>[2]</sup>。本研究采用纳米磁靶向性药囊结合内磁支架的方法治疗胆管癌荷瘤裸鼠,并与同等治疗剂量的5-FU和健择进行比较,旨在评估纳米磁药囊的疗效并探讨其作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 建立人胆管癌荷瘤裸鼠模型

人胆管癌细胞株QBC939,由第三军医大学王曙光教授惠赠。常规培养细胞(5% CO<sub>2</sub>, 37℃)。BALB/C裸鼠4周龄,19~21g,由华中科技大学同济医学院动物实验中心提供。于无特定病原菌(SPF)环境下饲养。喂养符合卫生部颁布的《医学实验动物全价营养饲料标准》。取对数生长期的QBC939细胞,离心后调节细胞浓度为 $2 \times 10^7$ 个/mL。取0.2mL上述细胞悬液接种于裸鼠背部皮下,共接种56只。移植后20d,挑选肿瘤体积均约在72.5mm<sup>3</sup>左右的裸鼠32只,作为实验动物模型。

### 1.2 纳米磁靶向性药囊

由华中科技大学药学院提供。药囊中纳米磁性材料为Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>,粒径30~40nm,磁响应强度为300GS;药囊平均粒径为(268±50)nm,平均载5-FU药量为(10.1±1.2)%,平均包封率为(67.6±4.7)%,磁性颗粒含量为9%(V/V)。药囊经0.2%吐温生理盐水溶液超声配制成250mg/mL浓度乳剂。

### 1.3 建立肿瘤局部内磁场

将磁场强度为300GS的磁化支架丝(由武汉理工大学提供)。植入肿瘤组织,在肿瘤内部建立磁场。支架丝为直径0.03cm的Ni-Ti形状记忆合金,丝表面通过化学镀包覆一层CoNiWP磁性合金薄膜,镀层厚度约为2.5μm。镀膜后支架的静磁性能通过Model4HFVSM(振动样品磁强计)测试可以达到以下参数: H<sub>c</sub> = 1235.97Oe(矫顽力), M<sub>s</sub> = 42.02emu/g(比饱和磁化强度), M<sub>r</sub> = 22.12emu/g(剩磁), S = M<sub>r</sub>/M<sub>s</sub> = 0.53(矩形

比)。该支架在17000Oe恒定磁场下磁化1s后表面场可以达到300GS。

### 1.4 实验动物分组

取上述方法制成肿瘤大小一致(直径约为5.3mm)的胆管癌裸鼠模型32只,随机分为4组,每组8只。分别为生理盐水对照组(A组);5-FU组(B组);纳米磁药囊+内磁化支架组(C组);健择组(D组)。5-FU和健择的药物浓度为25mg/kg,纳米药囊因其平均载5-FU药量约为10%,故配成药物浓度为250mg/kg。A,B,C组由尾静脉分别注射生理盐水,5-FU,纳米磁靶向性药囊0.2mL,连续给药5d。D组于第1和第5天由尾静脉注射健择各1次,每次0.2mL,共2次。

### 1.5 裸鼠肿瘤治疗方法和抑制效果观察

各组于治疗前及治疗后8,11,14,20,35d用游标卡尺测量肿瘤大小。肿瘤体积 = D<sub>max</sub> × (D<sub>min</sub>)<sup>2</sup>/2。抑瘤率 = 1 - (治疗开始平均瘤体积 - 治疗结束平均瘤体积)/(对照组开始平均瘤体积 - 对照组结束平均瘤体积) × 100%。按公式在治疗后8,11,14,20,35d各计算抑瘤率1次。用SPSS13.0统计软件包描绘肿瘤生长曲线。生长曲线拟和公式  $Y = eb_0 b_1 * \ln(X)$ 。

### 1.6 肿瘤组织超微结构的观察

在治疗后第35天处死裸鼠,取各组裸鼠的小块实体肿瘤组织各6份,剪碎成1mm×1mm×1mm大小的组织碎块,用生理盐水洗涤2次,4%戊二醛前固定,1%饿酸固定后,逐级丙酮脱水,EPON812包埋,超微切片用枸橼酸铅和醋酸双氧铀染色,透射电镜观察。

### 1.7 统计学处理

将所有原始数据整理后,用SPSS13.0统计软件进行统计分析。用重复测量方差分析,取P<0.05有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组裸鼠胆管癌移植瘤生长指标的比较

32只裸鼠接种肿瘤细胞悬液后约20d,于接种部位皮下均可触及直径约5.3mm的瘤块,致瘤

率为100%。其后肿瘤逐渐长大。用药35d后,A,B两组各死亡2只,C,D组无死亡。除少部分裸鼠肿瘤表面有溃烂结痂外,其余裸鼠肿瘤包膜完整,肿瘤均可推动。(1)各组裸鼠肿瘤体积分析:C组肿瘤体积与A,B组和D组肿瘤体积与A,B组比较有统计学差异( $P < 0.05$ )。而A组

和B组之间以及C组和D组之间的比较无统计学差异( $P > 0.05$ ) (表1)。(2)各干预组各时间点的抑瘤率为:B,C,D组在治疗后第11,20,11d达到最高抑瘤率为:50.2%,61.5%和60.4%。治疗后第35天的抑瘤率最终降为7.4%,39.6%和33.0%。(表2)。

表1 各组裸鼠肿瘤体积变化( $\text{mm}^3, \bar{x} \pm s$ )

组别	治疗前	治疗后8d		11d		14d		20d		35d	
		体积	n	体积	n	体积	n	体积	n	体积	n
A	73.1 ± 13.1	208.9 ± 39.6	8	392.5 ± 77.9	8	684.1 ± 75.4	8	1197.5 ± 110.3	8	2256.1 ± 267.1	6
B	73.6 ± 8.8	169.7 ± 23.7	8	232.8 ± 40.5	8	442.5 ± 48.5	8	875.6 ± 132.5	8	2096.5 ± 237.9	6
C	73.8 ± 9.6	181.6 ± 25	8	283.3 ± 35.9	8	372.4 ± 59.1	8	695 ± 90.3	8	1392.2 ± 189.4 <sup>1),2)</sup>	8
D	70.2 ± 5.3	171.9 ± 26.4	8	213.7 ± 20.4	8	397.9 ± 80.9	8	795.3 ± 134.9	8	1534.9 ± 115.5 <sup>1),2)</sup>	8

注:1)与A组比较, $P < 0.05$ ; 2)与B组比较, $P < 0.05$  上述统计为综合考虑各组在整个治疗过程中肿瘤体积的变化而用重复测量方差分析 计算的结果

表2 各组裸鼠肿瘤在治疗后各时间点的抑瘤率(%)

组别	治疗后天数				
	8d	11d	14d	20d	35d
A	0	0	0	0	0
B	29.2	50.2	40.5	28.7	7.4
C	20.7	34.4	51.2	61.5	39.6
D	25.1	60.4	47.2	35.1	33.0

注:抑瘤率因为是以A组为参照所以抑瘤率为0,每组的抑瘤率是从每组平均体积换算而来故每组每各时间点只有一个抑瘤率

### 2.2 各组肿瘤生长曲线

C组肿瘤生长较A,B,D组肿瘤生长缓慢。D肿瘤生长速度快于C组而较A,B组缓慢。与抑瘤率的变化基本相符(图1)。

### 2.3 肿瘤组织超微结构改变

电子显微镜下见对照组肿瘤细胞结构形态不规则,胞核大而胞浆较少,胞核呈椭圆形,核仁易见,染色质分布均匀,并可见胆管癌的腺腔样结构。

5-FU组肿瘤细胞可见明显坏死细胞器消失。而纳米药囊和健择组可见数目不等的凋亡细胞,凋亡细胞间连接疏松,间隙增宽,细胞皱缩,胞膜保持完整,可见染色质边集,核浓缩和凋亡小体等结构(图2)。

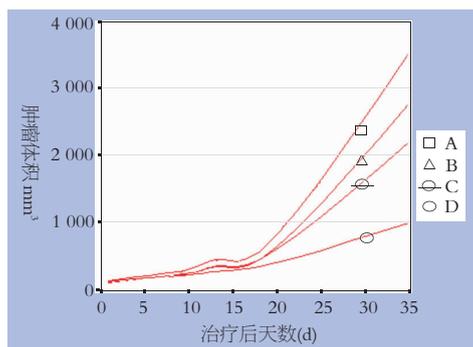


图1 各组肿瘤生长曲线

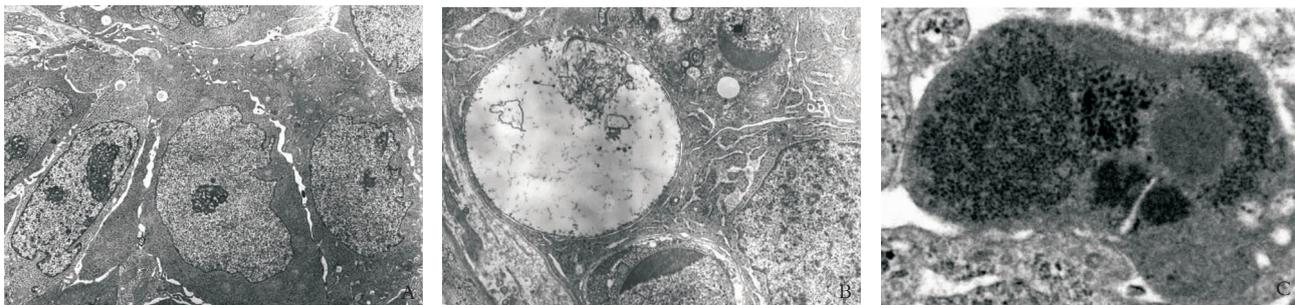


图2 组织肿瘤组织超微结构的变化 A:图为正常组及其他治疗无效组的正常QBC细胞电镜图;B,C:为纳米药囊和健择组电镜下的数个星期及晚期凋亡细胞图

### 3 讨论

运用纳米技术和化疗药物相结合的方法,在磁导向的作用下靶向性治疗恶性肿瘤是近年来兴起的一种新的治疗手段。载药的纳米微粒是纳米技术和化疗药物结合的产品,通过磁导向作用聚集在肿瘤部位,这不仅提高了肿瘤局部的药物浓度,而且纳米颗粒的可控制性降解可使载体内的药物进行持续性释放,使药物在血液中循环时间延长并维持有效的血药浓度。且致代谢产物减少,易于清除,副作用少<sup>[3-6]</sup>。

本研究不同于目前国内外普遍应用的外磁场作为磁导向<sup>[7-9]</sup>,而是采用内置300高斯的磁性支架作为磁导向源,结合包裹有5-FU的纳米磁药囊治疗胆管癌荷瘤裸鼠。在治疗后35d肿瘤体积为 $(1\,392.2 \pm 189.4)\text{ mm}^3$ ,明显小于给予同等剂量的5-FU组( $P < 0.05$ ),也小于健择组的肿瘤体积 $(1\,534.9 \pm 115.5)\text{ mm}^3$ ,但无统计学意义( $P > 0.05$ )。说明在同等药物剂量下,纳米药囊能比单纯使用5-FU达到更好的治疗效果,跟健择相似。

治疗期间纳米药囊组不仅显示出最高的抑瘤率,达到61.5%,而且长期保持了较高的抑瘤率,治疗后35d仍可达到39.6%。5-FU组和健择组虽然在治疗初期显示了较高的抑瘤率,分别达到50.2%和60.4%,但从远期的抑瘤率效果来看却明显低于纳米药囊组,尤其是5-FU组在治疗后35d抑瘤率仅为7.4%。说明纳米药囊不仅能通过内置磁场的磁导向作用,在肿瘤局部达到较高的浓度因而达到较高的抑瘤率,而且通过纳米药囊本身的缓释效应,明显延长了药物作用的时间及维持肿瘤组织中药物浓度,致使纳米药囊获得了普通化疗药物无法达到的治疗效果。

诱导肿瘤细胞凋亡是5-FU治疗恶性肿瘤的主要机制<sup>[10]</sup>。本研究的电镜显示,纳米药囊组有不同的肿瘤细胞凋亡现象,而5-FU组仅可见坏死。导致这样现象的原因可能是纳米药囊在内置支架丝的导向作用下比单纯注射5-FU能更加有效的聚集在肿瘤部位从而使肿瘤细胞发生凋亡。

本研究中纳米磁药囊在肿瘤的生长速度、抑瘤率和致肿瘤细胞凋亡方面都优于单独使用同等剂量的5-FU,表现出良好的抗肿瘤效果,分析其作用机制,主要有三方面:(1)纳米磁药囊具有较好的磁靶向性,通过内置磁性支架丝在肿瘤局部

形成了较高的磁场,在磁场的导向作用下纳米药囊选择性地聚集于肿瘤组织,有效地提高肿瘤组织化疗药物的浓度而发挥高效的作用;同时减少药物在其他组织和部位的聚集,降低药物的副作用。(2)聚集在肿瘤组织的纳米药囊释放化疗剂是一个缓释的过程,故可使肿瘤组织中的化疗药物浓度能长时间地维持在治疗剂量范围内,从而起到长期的效果。(3)部分粒径合适的纳米药囊能进入毛细血管内,通过毛细血管内皮细胞进入肿瘤组织间隙或肿瘤细胞内,在细胞间隙或肿瘤细胞内释放化疗药物达到治疗目的。

本研究所采用的纳米磁靶向性药囊是一种新型的肿瘤靶向治疗制剂,综合了纳米载药系统和物理磁定向的双重特点。采用内置磁场的方法有效地提高了纳米磁药囊针对肿瘤组织的靶向性。证实了所采用的纳米磁靶向性药囊结合内磁支架对胆管癌荷瘤裸鼠的治疗效果优于同等剂量的5-FU,与细胞毒性药物健择效果相当。本结果为进一步临床研究提供了实验依据。

#### 参考文献:

- [1] Harder J, Blum HE. Cholangiocarcinoma [J]. Schweiz Rundsch Med Prax, 2002, 91 (34): 1352 - 1356.
- [2] Barton BM. Gemcitabine: a pharmacologic and clinical overview [J]. Cancer Nurs, 1999, 22 (2): 176 - 183.
- [3] Roco MC. Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine [J]. Curr Opin Biotechnol, 2003, 14 (3): 337 - 346.
- [4] Majeti VJ. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices [J]. Pharm Pharmaceut Sci, 2000, 3 (2): 234 - 258.
- [5] Sahoo SK, Labhasetwar V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging [J]. Drug Discov Today, 2003, 8 (24): 1112 - 1120.
- [6] 何跃明, 吕新生, 艾中立, 等. 纳米及微米磁微粒磁性顺铂微球对肝癌细胞的影响及机理 [J]. 中国普通外科杂志, 2004, 13 (3): 179 - 184.
- [7] 吴远, 王家陇, 叶红军, 等. 丝裂霉素 C 聚碳酸酯磁性微球的缓释功能及对移植性肝癌的靶向治疗作用 [J]. 中华消化杂志, 2001, 21 (11): 691 - 693.
- [8] Chen DH, Liao MH. Preparation and characterization of YADH-bound magnetic nanoparticles [J]. J Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2002, 16 (2): 283 - 291.
- [9] Deng JG, Ding XB, Zhang WC, et al. Magnetic and conducting Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-cross-linked polyaniline nanoparticles with core-shell structure [J]. Polymer, 2002, 43 (8): 2179 - 2184.
- [10] Yamane N, Makino M, Kaihara N. S-phase accumulation precedes apoptosis induced by preoperative treatment with 5-fluorouracil in human colorectal carcinoma cells [J]. Cancer, 1999, 85 (2): 309 - 317.