

载吉西他滨磁性含铁纳米微球治疗胰腺癌细胞的体外研究^{*}

温苑章¹, 徐继威¹, 宋 越¹, 张贺云², 周嘉嘉², 陈汝福², 王 捷^{2△} (1. 广东省梅州市人民医院普外一科 514089; 2. 中山大学孙逸仙纪念医院肝胆外科, 广州 510120)

【摘要】 目的 制备载吉西他滨磁性含铁纳米微球(Gem-CCMN), 考察其协同恒定外磁场下对人胰腺癌细胞 CAPAN-2 的体外杀伤效应。**方法** 采用化学共价耦联法制备 Gem-CCMN, 扫描电子纤维镜(SEM)观察纳米粒形态, 紫外分光光度计法测定载药量及包封率, 体外考察 Gem-CCMN 在拟溶菌酶存在的不同 pH 值下药物累积释放率, MTT 法检测协同恒定外磁场下 Gem-CCMN 对 CAPAN-2 体外增殖的抑制效应, 流式细胞术(FCS)检测细胞凋亡。**结果** Gem-CCMN 呈球形, 平均粒径约为 50 nm, 载药量为 15%, 包封率为 45%, pH=7 时 48 h 累积释放量仅 25%, pH=2 时药物累积释放率可达 84%; Gem-CCMN 协同外磁场时可增强对肿瘤细胞增殖的抑制作用, 诱导细胞凋亡和坏死。**结论** Gem-CCMN 联合外磁场可有效抑制 CAPAN-2 细胞的生长。

【关键词】 吉西他滨; 纳米; 胰腺癌; CAPAN-2; 杀伤

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.14.003 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)14-1984-03

In vitro study on gemcitabine carrying iron-containing magnetic nanoparticles in treating pancreatic carcinoma cells^{*}

WEN Yuan-zhang¹, XU Ji-wei¹, SONG Yue¹, ZHANG He-yun², ZHOU Jia-jia², CHEN Ru-fu², WANG Jie^{2△} (First Department of General Surgery, Meizhou Municipal People's Hospital, Meizhou, Guangdong 514089, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

【Abstract】 Objective To prepare the gemcitabine carrying magnetic nanoparticles (Gem-CCMN) and to investigate their in vitro killing effects on pancreatic carcinoma cell line CAPAN-2 in collaboration of the constant external magnetic fields. **Methods** Gem-CCMN was prepared by the chemical covalent linkage coupling procedure. Its morphology was observed by scanning electron microscope(SEM). The drug loading amount and encapsulating ratio were determined by the ultraviolet spectrophotometry. The accumulating release rate of Gem-CCMN under different pH values in the existence of lysozyme was investigated in vitro. The in vitro growth inhibiting effect of Gem-CCMN on CAPAN-2 under the collaborative constant external magnetic field was detected by the MTT assay. The apoptosis of CAPAN-2 was detected by the flow cytometry. **Results** Gem-CCMN were spherical with average diameter of 50 nm, the drug loading amount was 15% and the encapsulating ratio was 45%. The 48 h cumulative drug release amount at pH=7 was only 25%, but which at pH=2 could reach 84%; Gem-CCMN collaborated with external magnetic fields could enhance the killing effect on CAPAN-2, also induced the cellular apoptosis and necrosis. **Conclusion** Gem-CCMN combined with external magnetic fields could effectively inhibit the growth of CAPAN-2 in vitro.

【Key words】 gemcitabine; nanoparticles; pancreatic carcinoma; CAPAN-2; killing

吉西他滨(Gem)是食品和药物管理局批准的用于治疗进展期胰腺癌的一线用药, 对胰腺癌单一或联合其他抗癌药物都取得很高的疗效^[1]。但 Gem 不良反应大, 体内代谢快, 血浆半衰期短, 仅 1.5 h。磁导向抗肿瘤靶向治疗是一种新兴的肿瘤靶向治疗方法, 将化疗药物、磁性内核包入高分子材料中制成的纳米微球中, 注入体内后, 在体外磁场的作用下滞留于靶区, 平稳释放药物杀伤肿瘤细胞, 同时降低药物不良反应^[2]。本实验以生物可降解材料羧甲基壳聚糖为原料, 包裹磁性纳米 Fe₃O₄, 采用化学共价耦联法制备吉西他滨-羧甲基壳聚糖氧化铁纳米微球(Gem-CCMN), 考察协同恒定外磁场条件下, 对人胰腺癌细胞 CAPAN-2 的体外杀伤效应。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 盐酸 Gem 购自上海英轩医药科技有限公司; 自制枸橼酸钠稳定的磁流体(30 mg/mL), 正硅酸乙酯

(TEOS)、3-三乙氧基硅基甲基丙烯酸酯(MPS)、N-乙基-N'-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)均购自汕头市光华化学厂; RPMI 1640 为美国 Gibco 产品; 噻唑蓝(MTT)购自美国 Sigma 公司; Annexin-V/PI 双染试剂盒购于深圳晶美公司; 胰腺癌细胞 CAPAN-2 购于中科院上海细胞库。EQUI-NOX55 型傅立叶变换红外光谱仪(德国 Bruker 公司); 扫描电子纤维镜(SEM, QUANTA 400, UK); Spectrumlab52 型紫外分光光度计(上海棱光技术有限公司); Model-680 酶标仪购于北京金辉盛业科技有限公司; FACSCalibur 型流式细胞仪购于美国 BD 公司; 钕铁硼稀土永磁体购于广州钕磁铁厂。

1.2 方法

1.2.1 磁性马来酰化羧甲基壳聚糖微球(CCMN)的制备 取 2.0 mL 磁流体超声分散于 200 mL 含有 5.0 mL 氨水的醇/水(V/V=4:1)的混合液中, 机械搅拌下将混合体系升温至

^{*} 基金项目: 国家重大专项课题(2012ZX10002~016); 中山大学临床研究 5010 项目(2010009)。

作者简介: 温苑章, 男, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向为肝胆胰腺肿瘤的诊治。 △ 通讯作者, E-mail: wangjiesunyatsen@163.com。

40 ℃,并加入 TEOS 0.5 mL 反应 12 h,在外加磁场作用下(6 000 G)收集产物 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$,去离子水和乙醇反复洗涤后分散于含有 2.0 mL 氨水的乙醇中,加入过量的 MPS,室温下机械搅拌 48 h 后,外加磁场作用下(6 000 G)从反应液中分离产物 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{MPS}$,去离子水反复洗涤并分散于去离子水中,浓度为 20 mg/mL;取 2.0 mL 的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{MPS}$ 分散液,加入到含有 MCS 0.04 g 和 KPS 5 mg 的水溶液中,机械搅拌分散,通氮气 30 min 后,升温至 70 ℃ 反应 4 h 后于外加磁场作用收集产物 CCMN,并用去离子水多次洗涤,并重新分散于水中,浓度为 20 mg/mL。

1.2.2 Gem-CCMN 的制备 在室温下,取 Gem 盐酸盐(0.37 g,1.2 mmol)溶于 5 mL 含有 EDC 0.5 g 和 NHS 0.1 g 的水溶液中,并将该反应液滴加于 5 mL 上述 CCMN 的分散液中,避光机械搅拌反应 48 h,反应结束后,在外加磁场作用下得到产物,去离子水反复洗涤后,放入冷冻干燥机内在 -40 ℃ 下真空干燥,称质量,备用。

1.2.3 Gem-CCMN 纳米特征检测 将真空干燥后的 Gem-CCMN 微球与 KBr 研磨并压片,在傅立叶变换红外光谱(FT-IR,Nicolet,USA)测定红外透射谱图。将真空干燥后的 Gem-CCMN 微球滴在玻璃片上,自然干燥后表面喷金处理,用 SEM 观察形态、粒径及粒径分布。

1.2.4 Gem-CCMN 载药量及接枝率测定 取 2 mL 上述反应后的液体,离心,紫外分光光度计测定其在 267.6 nm 下的吸光度值,根据标准曲线计算残液中 Gem 的含量,根据公式计算 Gem-CCMN 的封装率及载药量,公式如下。公式:封装率=(Gem 总量-残液 Gem 含量)/Gem 总量 $\times$ 100%;载药量=(Gem 总量-残液 Gem 含量)/Gem-CCMN 重量 $\times$ 100%。

1.2.5 Gem-CCMN 的体外药物释放 取 Gem-CCMN 0.5 mg 加入 5 mL 浓度为 0.1 mg/mL 的胰蛋白酶的磷酸盐缓冲液(PBS)溶液中,并在 37 ℃ 的恒温水浴中振荡,分别加入 1.0 mol/L 的 HCl 或 1.0 mol/L 的 NaOH 调节溶液的 pH 至 2、3、4、5、7.4,培育不同时间后,用 6 000 G 磁场及 2 000 r/min 离心分离出上层悬浮液,测定其在 267.6 nm 下的吸收度值,取 3 次实验平均值,根据标准曲线计算出悬浮液中 Gem 的累积释放量。

1.2.6 MTT 法测定 Gem-CCMN 对胰腺癌细胞 CAPAN-2 的增殖抑制率 取对数生长期的 CAPAN-2 细胞,用 0.25% 的胰蛋白酶消化后制成 1×10^4 /mL 的细胞悬液,接种于 96 孔培养板中,200 微升/孔,37 ℃、5% CO_2 条件下培养 24 h。实验分为 a:NS 阴性对照组;b:CCMN 空载对照组;c:单纯磁场组;d:Gem 阳性对照组;e:Gem-CCMN 治疗组;f:Gem-CCMN 联合磁场治疗组,同时设空白对照组,每个亚组设 5 个平行孔。磁场强度为 6 000 G,药物组含 Gem 量为 16 μg /mL。培养 48 h 后,加 MTT(5 mg/mL)20 微升/孔,继续培养 4 h;吸除各孔原液,加入二甲基亚砜(DMSO)150 微升/孔,振荡混匀 10 min,酶联免疫监测仪测定 492 nm 各孔 A 值。计算各组的增殖抑制率。抑制率=1-实验组平均 A 值/阴性对照组平均 A 值 $\times$ 100%。

1.2.7 流式细胞术检测 CAPAN-2 凋亡 CAPAN-2 细胞以 1×10^5 /mL 细胞悬液孔接种于 6 孔板内,无血清培养液培养 24 h 使绝大多数细胞处于 G0/G1 期同步化。每孔分别加入含 Gem(16 μg /mL)的培养液,以 NS 为空白对照(A),分为单纯 Gem 治疗组(B)、Gem-CCMN 组(C)以及 Gem-CCMN 联合磁场治疗组(6 000 G)(D)。培养 48 h 后胰酶消化收集细胞,PBS

吸两遍,结合缓冲液悬浮细胞,调整细胞浓度为 1×10^6 /mL,取 195 μL 的细胞悬液加入 5 μL Annexin V/FITC,室温避光孵育 10 min,190 μL 结合缓冲液洗涤并重新悬浮细胞后,加入 10 μL 、20 μg /mL 的 PI,每组重复 3 次,1 h 内检测凋亡和坏死细胞。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Gem-CCMN 的红外光谱图 从红外光谱中看到在 1 621 cm^{-1} 和 1 529 cm^{-1} 处出现了两个尖锐的峰是-CONH-的特征吸收峰,提示 Gem 在 EDC 的作用下其氨基和磁性粒子表面的羧基进行了反应。591 cm^{-1} 处为 Fe 的特征吸收峰。见图 1。

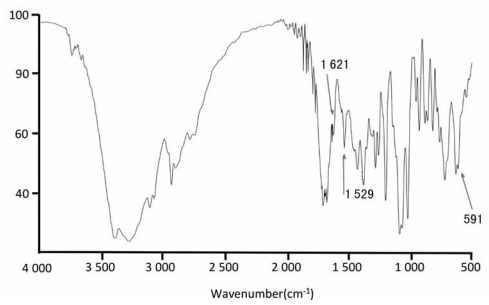


图 1 Gem-CCMN 的红外光谱图

2.2 Gem-CCMN 载药量及接枝率测定 经紫外分光光度计测定 Gem-CCMN 载药量约为 15%,接枝率约为 45%。

2.3 Gem-CCMN 的 SEM 形态 从 SEM 照片中可以看出制备 Gem-CCMN 为球形或近似球形纳米粒子,粒径较均匀,平均直径约为 50 nm。

2.4 Gem-CCMN 体外药物释放 各组的累积药物释放率见图 2。从图中可见微球 12 h 就能达到药物的最大释放率,pH=2 时药物 48 h 最大的累积释放率达 84%,而 pH=7.4 时仅为 25%。表明 Gem-CCMN 在 pH=7.4 时较为稳定,而 pH=2 时溶菌酶活性高,可充分水解 Gem-CCMN 的肽键(-CONH-)释放 Gem。

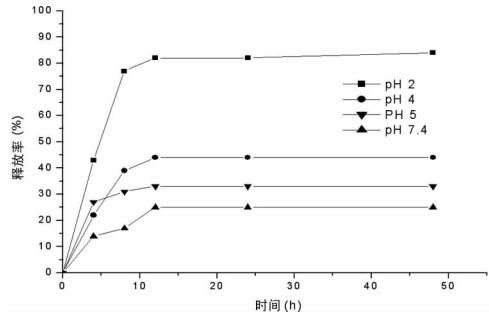


图 2 各组的累积药物释放率

2.5 MTT 法测定 Gem-CCMN 对胰腺癌细胞 CAPAN-2 的增殖抑制率 各组的 CAPAN-2 增殖抑制率见表 1。通过单因素方差分析,结果表明 Gem 及 Gem-CCMN 均明显抑制 CAPAN-2 细胞的生长,但差异无统计学意义($P>0.05$)。而 Gem-CCMN 联合磁场对 CAPAN-2 的抑制作用明显高于其他治疗组,差异有统计学意义($P<0.05$)。但 CCMN 空载治疗组与 NS 治疗组差异无统计学意义($P>0.05$),提示 CCMN 作为药物载体具有良好的生物相容性。各组 CAPAN-2 细胞活力,Gem-

CCMN 联合磁场处理 CAPAN-2 细胞活力明显高于其他治疗组,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 CAPAN-2 增殖抑制率 MTT 分析

组别	A 值($\bar{x}\pm s$)	增殖抑制率(%)
NS 阴性对照组(a)	0.848 4 $\pm$ 0.04	—
CCMN 空载对照组(b)	0.834 0 $\pm$ 0.04	1.70
单纯磁场组(c)	0.797 9 $\pm$ 0.03	5.95
Gem 阳性对照组(d)	0.541 7 $\pm$ 0.05	36.15
Gem-CCMN 治疗组(e)	0.525 0 $\pm$ 0.05	38.12
Gem-CCMN 联合磁场组(f)	0.438 2 $\pm$ 0.02	48.35

注:f 组与其他组比较, $P<0.05$;d 组和 e 组比较, $P>0.05$;a 组和 b 组比较, $P>0.05$ 。—表示无数据。

2.6 流式细胞术检测 CAPAN-2 凋亡 各组的 CAPAN-2 的凋亡坏死率见表 2。从表 2 中可以看出,B、C、D 组细胞凋亡、坏死率均高于 A 组($P<0.05$),B 组与 C 组差异无统计学意义($P>0.05$),而 D 组凋亡、坏死率均高于其他治疗组,差异有统计学意义($P<0.05$)。提示 Gem-CCMN 联合磁场可明显诱导 CAPAN-2 细胞发生凋亡及坏死。

表 2 CAPAN-2 凋亡率和坏死率流式细胞术分析($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	凋亡率	坏死率
NS 阴性对照组(A)	0.73 $\pm$ 0.12	0.79 $\pm$ 0.10
Gem 阳性对照组(B)	9.32 $\pm$ 1.14	5.27 $\pm$ 0.95
Gem-CCMN 治疗组(C)	8.92 $\pm$ 1.32	5.74 $\pm$ 1.20
Gem-CCMN 联合磁场组(D)	14.31 $\pm$ 3.16	9.83 $\pm$ 2.28

3 讨 论

3.1 Widder 早在 1978 年就提出“磁控纳米靶向载药系统”的概念^[3]。近几十年来随着生物技术以及纳米技术的飞速发展,磁控纳米载药系统的研究发展到了一个新的高度,但良好的生物相容性仍是纳米医用材料的首要必备条件^[4]。本实验采用壳聚糖是天然碱性多糖,是甲壳素脱乙酰基的产物,具有良好的生物相容性和生物可降解性,在体内能被溶菌酶等降解,降解产物能完全被人体吸收,无不良反应^[5]。而选用的铁磁流体乃人体必需元素,少量应用对人体无不良反应^[6]。而 MTT 结果也显示:单纯的 CCMN 纳米微球对 CAPAN-2 细胞生长无明显抑制作用,提示 CCMN 可作为良好的靶向给药载体。

3.2 Gem 又名 2'-脱氧-2',2'-二氟胞苷,是一种具有抗癌活性的脱氧胞苷酸类似物,属细胞周期特异性抗肿瘤药,是临床治疗胰腺癌的有效药物之一^[7-9]。Gem 在进入细胞之前通常以无活性的形式存在,在细胞内由核苷激酶代谢成有活性的二磷酸核苷(dFdCDP)和三磷酸核苷(dFdCTP),联合抑制细胞 DNA 的合成^[10]。本实验采用化学共价耦联的方法,通过肽键(CONH)将 Gem 共价耦联于 CCMN 微球上,制备出 Gem-CCMN 纳米微球,其平均粒径约为 50 nm,载药量达 15%,具有磁响应性强以及长时间药物缓释的优点;体外释放实验证实 Gem-CCMN 可避免在生理 pH=7.4 条件下被降解,可保证 Gem-CCMN 以有活性形式释放于细胞内,达到细胞内靶向给药的目的,提高细胞内药物浓度,增加疗效。同时该纳米微球

保持 Gem 抗癌活性,MTT 结果显示 Gem-CCMN 对 CAPAN-2 的增殖有明显的抑制作用,和相同浓度的 Gem 治疗组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。流式细胞术结果也证实 Gem-CCMN 具有良好的抑瘤作用,联合磁场可明显增加 Gem-CCMN 的抑瘤作用($P<0.05$),除 Gem-CCMN 具有缓释效果外,磁场还可通过影响细胞生物膜的电位、通透性以及酶活性的改变,以增加药物对肿瘤细胞的杀伤效应。

3.3 本实验制备了一种新的磁纳米载药体系 Gem-CCMN,体外实验证实其具有良好的安全、缓释、磁响应性,能有效抑制肿瘤细胞生长,诱导细胞凋亡及坏死,为进一步的体内磁靶向治疗提供了实验依据。

参考文献

[1] Moore MJ, Hamm J, Dancey J, et al. Comparison of gemcitabine versus the matrix metalloproteinase inhibitor BAY-12-9566 in patients with advanced or metastatic adenocarcinoma of the pancreas; a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group [J]. J Clin Oncol, 2003, 21(17): 3296-3300.

[2] Reddy LH. Drug delivery to tumours; recent strategies [J]. J Pharm acol, 2005, 57(10): 123-124.

[3] Widder KJ, Morris RM, Poore G, et al. Tumor remission in Yoshida sarcoma-bearing rats by selective targeting of magnetic albumin microspheres containing doxorubicin [J]. Proc Natl Acad Sci, 1981, 78(20): 579-581.

[4] Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2003, 55(3): 329-347.

[5] Sunil AA, Nadagouda NM, Tejraj MA. Recent advances on chitosan 2 based micro 2 and nanoparticles in drug delivery [J]. J Control Rel, 2004, 100(1): 5-28.

[6] 荣向辉, 吕霁, 吕盈. 顺磁性紫杉醇纳米微粒对中枢神经系统肿瘤磁靶向药物化疗的实验分析 [J]. 医学信息, 2013, 26(6): 126-130.

[7] Diaz-Rubio E. New chemotherapeutic advances in pancreatic, colorectal, and gastric cancers [J]. Oncologist, 2004, 9(10): 282-294.

[8] Yalcin S, Erkan M, ünsoy G, et al. Effect of gemcitabine and retinoic acid loaded PAMAM dendrimer-coated magnetic nanoparticles on pancreatic cancer and stellate cell lines [J]. Biomed Pharmacother, 2014, 68(6): 737-743.

[9] Wang Y, Zhou Y, Jia G, et al. Shikonin suppresses tumor growth and synergizes with gemcitabine in a pancreatic cancer xenograft model: involvement of NF-κB signaling pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2014, 88(3): 322-333.

[10] Smith JA, Brown J, Martin MC, et al. An in vitro study of the inhibitory activity of gemcitabine and platinum agents in human endometrial carcinoma cell lines [J]. Gynecol Oncol, 2004, 92(10): 314-319.