

[文章编号] 1007-385X(2006)03-0196-04

磁性聚乳酸羟基乙酸氧化酚砷纳米微粒对人肝癌细胞生长的抑制作用

董 勤, 蔡洪培, 张忠兵, 张兴荣, 谢渭芬(第二军医大学长征医院消化内科, 上海 200003)

[摘 要] **目的:** 研究磁性聚乳酸羟基乙酸氧化酚砷纳米微粒对人肝癌细胞生长的抑制作用。**方法:** 运用超声乳化-溶剂挥发法制备磁性聚乳酸羟基乙酸氧化酚砷纳米微粒; 透射电镜观察纳米微粒形态; MTT 法检测纳米微粒对肝癌细胞 SMMC-7721 生长的抑制作用; 流式细胞术检测细胞凋亡。**结果:** 磁性聚乳酸氧化酚砷纳米微粒外观呈规则球型, 其粒径尺寸平均为 290 nm。磁性纳米微粒抑制人肝癌细胞增殖, 且具有一定的时间和浓度依赖性。1.0 $\mu\text{mol/L}$ 纳米微粒组作用 24 h 肝癌细胞生长的抑制率为(4.6 \pm 0.9)%, 作用 48 h 抑制率为(11.4 \pm 1.2)%。流式细胞术检测可见肝癌细胞凋亡峰出现, 细胞周期阻滞在 S + G₂/M 期。**结论:** 磁性聚乳酸羟基乙酸氧化酚砷纳米微粒具有抑制肝癌细胞 SMMC-7721 增殖的作用, 处于 G₀/G₁ 期的 SMMC-7721 细胞可能为其药物作用的目标。

[关键词] 肝癌细胞; 氧化酚砷; 聚乳酸羟基乙酸; 纳米微粒; 细胞凋亡

[中图分类号] R735.7 **[文献标识码]** A

Magnetic poly *D, L*- lactide-co-glycolide phenylarsine oxide nano-particles inhibits hepatic carcinoma

DONG Qin, CAI Hong-pei, ZHANG Zhong-bing, ZHANG Xing-rong, XIE Wei-fen (Department of Gastroenterology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[Abstract] **Objective:** To study the inhibitory effects of magnetic poly *D, L*-lactide-co-glycolide phenylarsine oxide nanoparticles (M-PLGA-PAO-NS) on the growth of human hepatic carcinoma cells. **Methods:** The magnetic poly *D, L*-lactide-co-glycolide phenylarsine oxide nano-particles were prepared by emulsion-evaporation process. The growth inhibition of tumor cell was studied by the microscope observation and MTT method, and cell apoptosis was observed by FCM. **Results:** The prepared M-PLGA-PAO-NS had a regular spherical surface and a mean diameter of 290 nm. The magnetic nano-particles effectively inhibited the growth of carcinoma cells (SMMC-7721) in a time- and concentration-dependent manner [e. g. inhibitory rate of 1.0 $\mu\text{mol/L}$ nano-particles (4.6 \pm 0.9)% for 24 h versus (11.4 \pm 1.2)% for 48 h]. FCM assay indicated that most of the cells were arrested at S + G₂/M phase and there was apoptotic peak. **Conclusion:** The prepared M-PLGA-PAO-NS has high anti-hepatic carcinoma activity against SMMC-7721, and cells in the G₀/G₁ phase may be the target for drug action.

[Key words] hepatoma carcinoma cell; phenylarsine oxide; poly *D, L*- lactide- co-glycolide; nanoparticles; apoptosis
[Chin J Cancer Biother, 2006, 13(3): 196-199]

近年来,具有中国民族特色的三氧化二砷抗白血病治疗已被国内外广大学者认同,砷剂用于人体疾病治疗成为新的研究热点之一。最近国内外学者先后报道^[1-2],有机砷化合物美拉肿醇(melarsoprol)、氧化酚砷(phenylarsine oxide, PAO)对于人体肿瘤,尤其是血液系肿瘤具有明显的抑制作用,其效果为无机砷的 10 倍,但是体内实验证实其在杀伤肿瘤细胞的同时有严重的全身毒性作用,如中枢神经毒性,局部刺激反应、胃肠道反应等。本实验采用纳米技术,以聚乳酸羟基

乙酸(Poly *D, L*- lactide- co-glycolide)微粒包裹氧化酚砷,制备纳米级的磁性聚乳酸羟基乙酸氧化酚砷微粒(M-PLGA- PAO-NP),利用磁性微粒的体内靶向性和促进吞噬及缓释功能,进一步提高药物的杀伤作用,同

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30370644);上海市科委纳米研究专项基金(0352nm107)

[作者简介] 董勤(1978-), 男, 博士生, 浙江省绍兴市人, 主要从事消化系肿瘤防治方面的研究。

时减轻其不良反应。

1 材料与方法

1.1 试剂

PAO 粉剂(Sigma 公司)用二甲基亚砜(DMSO)配置成 0.1 mol/L 的储存液, -20℃ 冻存, 临用时稀释至工作浓度, DMSO 使用浓度低于 1%; 聚乳酸-羟基乙酸(poly D, L-lactic-co-glycolic acid, 山东医疗器械研究所); 四氧化三铁(纳米级, 美国 Sigma 公司); 二氯甲烷等其它试剂均为分析纯, 购于上海市国药集团化学试剂有限公司。

1.2 细胞株

人肝癌细胞株 SMMC-7721(第二军医大学国际肿瘤研究所赠送)用完全 RPMI 1640 培养液(内含 10% 小牛血清)在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 3~4 d 传代 1 次, 细胞对数生长期时进行实验。

1.3 磁性聚乳酸羟基乙酸氧化酚砷纳米微粒制备^[3]

采用超声乳化-溶剂挥发法制备, 将氧化酚砷和聚乳酸-羟基乙酸共聚物按一定重量比完全溶解在 2 ml 二氯甲烷中, 再加入磁性四氧化三铁纳米颗粒, 超声分散形成油相。将油相滴入 3% PVA 水溶液 4 ml 中, 超声乳化 5 min 后呈现均匀乳状。在搅拌条件下, 将上述乳液缓缓滴加到 50 ml 0.3% PVA 水溶液中, 持续搅拌 5 h, 整个搅拌过程在 37℃ 水浴下进行。搅拌结束后, 将所得混悬液置于磁铁上, 除去上清液, 再用蒸馏水洗涤, 高速离心, 反复 3 次。将所得沉淀物冷冻干燥、真空干燥、灭菌, 即得磁性聚乳酸-羟基乙酸氧化酚砷纳米微粒, 用同样的方法制备不含氧化酚砷的空白微粒, 通过透射电镜观察微粒形态。以标准氧化酚砷溶液作出氧化酚砷浓度标准曲线, 取 M-PLGA-PAO-NP 20 mg 溶解于 10 ml DMSO 中, 通过高效液相法测量其峰面积, 进而得出 M-PLGA-PAO-NP 的载药量。

1.4 SMMC-7721 细胞形态观察

将 SMMC-7721 细胞接种于 6 孔板上(1 × 10⁶/孔), 待细胞进入指数增长后期后加入氧化酚砷和终浓度为 0.1、1.0、10.0、100.0 μmol/L 的 M-PLGA-PAO 纳米微粒, 逐日观察加药组和未加药组细胞形态变化情况。

1.5 MTT 实验

用 MTT 法测量细胞增殖抑制情况: SMMC-7721 细胞处于对数增长后期时, 将细胞悬液接种在 96 孔细胞培养板(5 × 10⁴/孔)中, 每孔加入 200 μl 含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 液, 待细胞贴壁后分 3 组, 第 1 组依次加入浓度为 0.1、1.0、10.0、100.0 μmol/L 的纯 PAO 溶液, 第 2 组对应加入实际氧化酚砷浓度与第 1 组相同的 M-PLGA-PAO-NP 溶液, 第 3 组为磁性聚乳酸羟基乙

酸空白微粒(M-PLGA-NP), 其质量与 M-PLGA-PAO-NP 对应相同, 每组设 5 复孔, 空白对照组不加药物。加药后分别于 24 h、48 h、72 h 加 MTT 溶液 20 μl/孔继续培养 4 h, 小心吸去上清液后, 加入 DMSO 150 μl/孔, 震荡, 溶解为颗粒, 立即于酶标仪下 570 nm 波长处测定吸光度值(D₅₇₀)。按下列公式计算抑制率: 抑制率 = (1 - 实验组平均 D₅₇₀/对照组平均 D₅₇₀) × 100%。

1.6 流式细胞仪检测细胞凋亡

将 SMMC-7721 细胞悬液按 10⁶/瓶细胞接种于培养瓶, 24 h 后换加有 PAO(终浓度为 1.0 μmol/L、10.0 μmol/L)的 M-PLGA-PAO-NP 药液的完全培养液, 24 h、48 h 后收集培养瓶内悬浮及贴壁细胞(0.25% 胰酶消化), PI 染色, 流式细胞仪测定 DNA 含量, 进行细胞周期分析。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验, 应用 SAS 统计软件包进行统计学分析。

2 结果

2.1 纳米微粒的形态、粒径和药物含量

结果表明, 磁性聚乳酸-羟基乙酸氧化酚砷纳米微粒的载药量为 3.2%。微粒外观呈圆形, 表面光滑, 分布均匀, 不粘连。磁性微粒中可见非均匀分散的黑色不透光区, 为四氧化三铁微粒(图 1)。激光粒度分析仪测定粒径分布范围, 粒度集中分布在 140~500 nm, 平均粒径为 290 nm(图 2)。

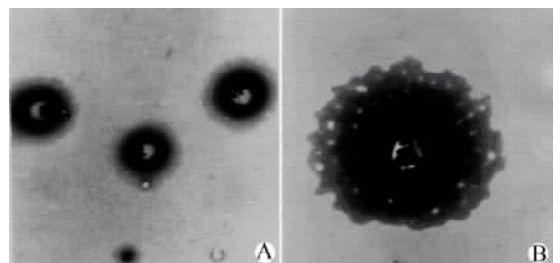


图 1 M-PLGA-PAO-NP 透射电镜照片
Fig. 1 Transmission electron-microscopic image of M-PLGA-PAO-NP
A: ×40 000; B: ×100 000

2.2 M-PLGA-PAO-NP 致肝癌细胞形态的改变

形态学观察可见, 在 M-PLGA-PAO-NP 作用下, SMMC-7721 细胞生长随时间延长和药物浓度增加而逐渐受到抑制, 药物浓度越高细胞死亡越快; 时间越长, 细胞增殖抑制越明显。具体表现为细胞不贴壁、逐渐变为圆形、细胞膜破裂、细胞固缩, 呈凋亡征象(图 3)。

2.3 PAOM-PLGA-PAO-NP 对肝癌细胞增殖的影响

M-PLGA-PAO-NP 对 SMMC-7721 细胞具有明显抑制作用,且随着时间的延长和浓度的增加抑制作用更明显(表 1)。在作用初期,在相同浓度及相同作用时间下,纯氧化酚砷组的抑制效果要优于 M-PLGA-PAO-NP 组($P < 0.05$);但随着时间延长,两者抑制效果逐步接近。而 M-PLGA-PAO-NP 与对照组相比,其抑制细胞增殖作用仍较为明显。此外,磁性 PLGA 空白微球对于肝癌细胞增殖无抑制作用,其效果与对照组无差异($P > 0.05$)。

2.4 流式细胞检测各组细胞的凋亡

1.0 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 M-PLGA-PAO-NP 分别作用 24 h,48 h 后,SMMC-7721 细胞均可出现凋亡峰,1.0 $\mu\text{mol/L}$ 组凋亡率分别为 7.12%、9.61%,10.0 $\mu\text{mol/L}$ 组凋亡率分别为 8.06%、11.71%。 G_0/G_1 期细胞含量

减少, $S + G_2/M$ 期细胞含量增多(图 4)。

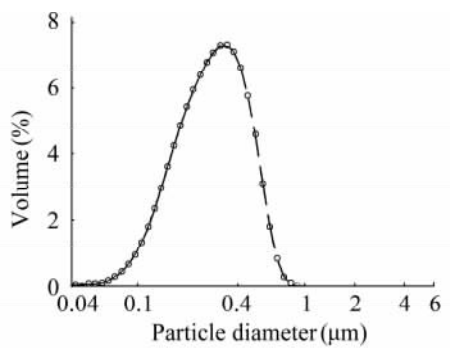


图 2 激光粒度分析 M-PLGA-PAO-NP 粒径分布

Fig. 2 Distribution of M-PLGA-PAO-NP diameter by laser analysis

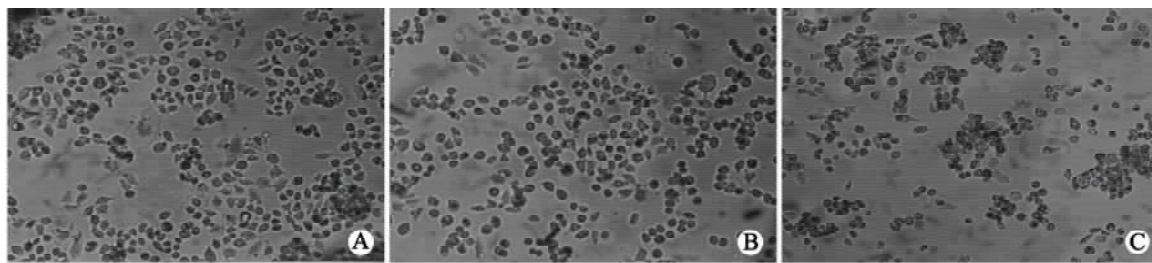


图 3 1.0 $\mu\text{mol/L}$ M-PLGA-PAO-NP 作用下细胞形态变化(×200)

Fig. 3 Morphological changes of cells after treated with 1.0 $\mu\text{mol/L}$ M-PLGA-PAO-NP

(A: Treated for 1 day; B: Treated for 3 days; C: Treated for 5 days)

表 1 不同浓度的 PAO 及 M-PLGA-PAO-NP 对 SMMC-7721 细胞增殖的抑制率

Tab. 1 Effect of different concentrations of PAO and M-PLGA-PAO-NP on growth of SMMC-7721 cells[$(\bar{x} \pm s)\%$]

Drugs	Concentration ($\mu\text{mol/L}$)	1 d	2 d	3 d
PAO	0.1	3.8 \pm 0.5 ^{△*}	12.4 \pm 1.7 [*]	18.4 \pm 1.5 [*]
	1.0	10.4 \pm 2.3 [△]	22.5 \pm 1.9	36.8 \pm 0.6
	10.0	21.7 \pm 1.8 [△]	37.5 \pm 0.7	51.6 \pm 2.2
	100.0	35.6 \pm 0.8 [△]	50.3 \pm 1.6	71.4 \pm 1.9
M-PLGA-PAO-NP	0.1	1.3 \pm 0.7 [△]	5.6 \pm 1.1	9.3 \pm 1.5
	1.0	4.6 \pm 0.9 [△]	11.4 \pm 1.2	19.2 \pm 1.8
	10.0	10.6 \pm 2.4 [△]	21.1 \pm 2.8	33.1 \pm 3.1
	100.0	25.4 \pm 2.7 [△]	38.5 \pm 4.1	49.9 \pm 3.2

* $P < 0.05$ vs M-PLGA-PAO-NP; [△] $P < 0.05$ vs 2 d or 3 d

3 讨论

PAO 最早用于抑制白血病肿瘤细胞的凋亡研究,发现其在诱导抑制和生长凋亡方面,效果优于 As_2O_3 。

但实体肿瘤的 PAO 治疗还存在部分问题,其对于实体瘤的抑制效果弱于血液肿瘤,如全身给药,则所用剂量较大,全身不良反应明显;剂量太小,则达不到治疗效果,极大地限制了在临床中的应用^[1-3]。

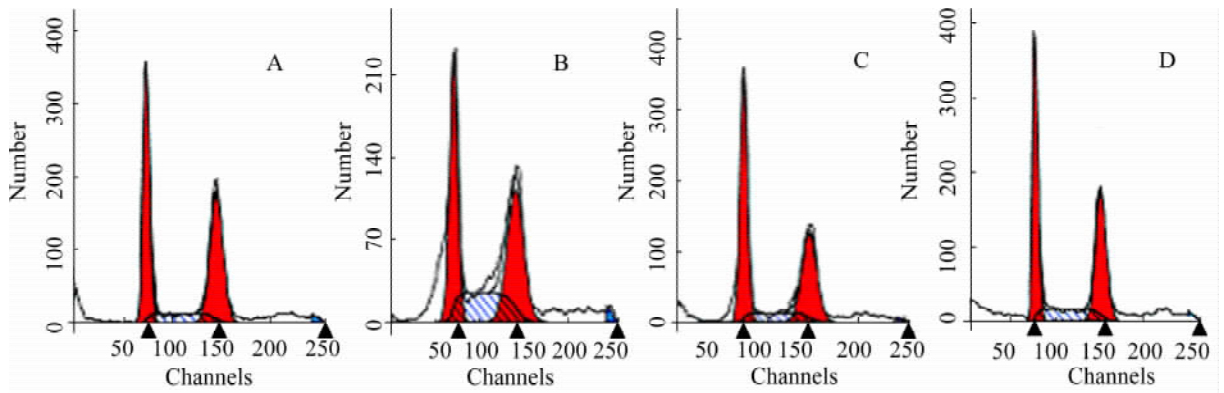


图4 M-PLGA-PAO-NP引起肝癌细胞凋亡的流式细胞仪检测

Fig. 4 Flow cytometry results of cells after M-PLGA-PAO-NP treatment

A: 1.0 $\mu\text{mol/L}$ for 24 h; B: 1.0 $\mu\text{mol/L}$ for 48 h; C: 10 $\mu\text{mol/L}$ for 24 h; D: 10 $\mu\text{mol/L}$ for 48 h

近年来研究发现,磁性药物微球是一种新的靶向给药系统,它是把药物和铁磁性物质共同包藏于载体中所制成的稳定剂,注入人体内后在足够强的外磁场作用下可逐渐集中于肿瘤部位,缓慢释放化疗药物,相应减少了全身药物水平,从而起到高效、缓释、低毒的作用^[4]。在各种载体中,PLGA是一种无毒可生物降解的聚合物,具有可控制生物降解、原料易得、生物相容性较好等优点^[5-6],已经FDA批准,可用作医用手术缝合线和注射用微胶囊、微球及埋植剂等制剂的材料。纳米药物已被证明具有较好的肝靶向性,加入磁性物质后,在肝区外加一磁场则能进一步提高其肝靶向效应,增加病灶局部的药物溶度,减少全身毒副作用。

本次实验使用PLGA包裹氧化酚砷,并进行了体外细胞抑制作用的研究。结果发现M-PLGA-PAO-NP同PAO一样,均有抑制SMMC-7721细胞增殖的作用,且有一定的时间和药物浓度的量效关系。肿瘤细胞凋亡率随时间延长和药物浓度增高而增高,细胞多阻滞于S+G₂/M期。MTT实验中发现,纯PAO溶液对于SMMC-7721细胞的抑制作用要强于同溶度的M-PLGA-PAO-NP溶液,但随时间延长其抑制效果逐步接近。这主要是由于纳米微球具有缓释性,短时间内药物多包裹于PLGA骨架中尚未释放出来,故抑制作用相对较弱,但随时间延长,药物释放量逐步加大,其抑制效果增强。这说明磁性聚乳酸羟基乙酸氧化酚砷微球制剂不但能够发挥氧化酚砷抑制和杀伤肝癌细胞的特性,而且有可能在一定程度上避免氧化酚砷快速吸收造成的全身损害。这为强毒性药物的临床应用研究奠定了基础,为肿瘤的靶向治疗提供了一种新的思路。

[参考文献]

- [1] Sahara N, Takeshita A, Kobayashi M, *et al.* Phenylarsine oxide (PAO) more intensely induces apoptosis in acute promyelocytic leukemia and AS₂O₃-resistant APL cell lines than AS₂O₃ by activating the mitochondrial pathway[J]. *Leuk Lymphoma*, 2004, 45(5): 987-995.
- [2] Koshiuka K, Elstner E, Williamson E, *et al.* Novel therapeutic approach: Organic arsenical (melarsoprol) alone or with all-trans-retinoic acid markedly inhibit growth of human breast and prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Br J Cancer*, 2000, 82(2): 452-458.
- [3] Ngaboni Okassa L, Marchais H, Douziech-Eyrolles L, *et al.* Development and characterization of sub-micron poly(D, L-lactide-co-glycolide) particles loaded with magnetite/maghemite nanoparticles [J]. *Int J Pharm*, 2005, (302): 187-196.
- [4] Brillet PY, Gazeau F, Luciani A, *et al.* Evaluation of tumoral enhancement by superparamagnetic iron oxide particles: comparative studies with ferumoxtran and anionic iron oxide nanoparticles [J]. *Eur Radiol*, 2005, 5(7): 1369-1377.
- [5] Sander EA, Alb AM, Nauman EA, *et al.* Solvent effects on the microstructure and properties of 75/25 poly(D, L-lactide-co-glycolide) tissue scaffolds [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2004, 70(3): 506-513.
- [6] Massey BL, Wen X, Rohr LR, *et al.* Resorption rate and biocompatibility characteristics of two polyester ventilation tubes in a guinea pig model [J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2004, 131(6): 921-925.

[收稿日期] 2006-03-10

[修回日期] 2006-05-18

[本文编辑] 韩丹