

磁性吉西他滨隐形纳米脂质体对MCF-7 细胞生物学特性的影响

童 强^{1*}, 舒晓刚¹, 卢晓明¹, 黎维勇², 陶凯雄³, 陈道达¹, 王国斌^{1,3}

(华中科技大学同济医学院附属协和医院 1. 胃肠外科, 2. 药剂科, 3. 腔镜外科, 湖北 武汉 430022)

摘要: 研究磁性吉西他滨隐形纳米脂质体 (magnetic gemcitabine stealth nano-liposomes, MGSL) 的体内磁响应性及对 MCF-7 细胞生物学特性的影响。对小鼠头颅部施加磁场, 并静脉注射 MGSL, 通过对脑组织药物含量的分析, 研究 MGSL 在体内的磁响应性; 然后在有磁场和无磁场的不同情况下, 静脉给予小鼠 MGSL, 通过对小鼠脑、心、肝、脾、肺及肾等组织的药物含量分析, 考察吉西他滨在体内的分布差异, 比较磁性靶向作用和单纯给药在组织分布的不同。在体外, 观察了 MGSL 诱导的 MCF-7 细胞凋亡过程中的细胞形态学改变、MTT 法获得 MGSL 作用乳腺癌细胞生长抑制率、流式细胞仪分析 MGSL 引起的细胞凋亡率和细胞周期分布。最后制成裸鼠乳腺癌皮下移植瘤模型, 通过在移植瘤表面定时给予三维立体梯度磁场作用, 观察 MGSL 靶向治疗裸鼠乳腺癌的效果。低强度磁场组的吉西他滨血药浓度显著高于无磁场组 ($P < 0.01$), 而高强度磁场组吉西他滨的含量较低强度磁场组显著升高 ($P < 0.01$), 且当磁场强度达到 5 000 高斯时, 吉西他滨含量可达无磁场组的 8.5 倍。另外应用外加磁场, 吉西他滨可以有效聚集到靶部位, 显著提高病灶部位吉西他滨的浓度, 降低心脏、肾脏等器官的药物浓度。MGSL 对人乳腺癌细胞在体外有明显的杀伤作用, 其杀伤作用随浓度升高有上升趋势; 结果还显示 MGSL 是主要作用于 S 期的细胞周期药物; 采用流式细胞术证实了 MGSL 还有促乳腺癌细胞凋亡的作用, 其诱导凋亡率达到 51.62%。MGSL 可以显著抑制裸鼠皮下移植瘤的生长, 与其他组别相比均有显著差异 ($P < 0.05$)。本法制备的 MGSL 符合作为纳米磁靶向给药系统的条件, 同时它具备较好的磁响应性, 在外磁场的作用下可以有效增加肿瘤组织内的药物浓度, 而降低正常组织的药物含量, 达到靶向化疗的目的, 且在体内外显示了较好的抑瘤效应, 可望成为一种有效的抗肿瘤制剂。

关键词: 吉西他滨; 隐形纳米脂质体; 磁响应性; 组织分布; 抑瘤作用; 乳腺癌

中图分类号: R944.9

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 02-0181-07

Effects of magnetic gemcitabine stealth nano-liposomes on the characteristics of breast cancer cell line MCF-7

TONG Qiang^{1*}, SHU Xiao-gang¹, LU Xiao-ming¹, LI Wei-yong², TAO Kai-xiong³,
CHEN Dao-da¹, WANG Guo-bin^{1,3}

(1. Department of Gastrointestinal Surgery, 2. Department of Pharmacy, 3. Department of Laparoscope Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract: The magnetic responsibility and antitumor effect of magnetic gemcitabine stealth nano-liposomes (MGSL) on breast cancer cell line MCF-7 *in vitro* and *in vivo* was evaluated. The magnetic response and targeting effect of MGSL *in vivo* were investigated. Morphological feature and ultrastructure changes of apoptosis of MCF-7 cells were observed. The effect of MGSL on proliferation inhibitory rate of MCF-7 cells was measured with MTT method. The FCM analysis was carried out to examine the cell cycle distribution and

收稿日期: 2008-07-15.

基金项目: “十五”期间国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目 (2001AA218051).

*通讯作者 Tel: 86-25-83271038, E-mail: liuwenyuan8506@163.com

cell apoptotic rate. The antitumor effect on human breast cancer xenografts in nude mice was also studied. MGSL was able to converge at the targeting tissue under tridimensional magnetic field and the gemcitabine concentration around it increased, while the amount of gemcitabine in other organs decreased, such as in kidneys and heart. MCF-7 cell line was sensitive to MGSL and the cytotoxicity was correlated with the loaded drug dose. The effect of MGSL on apoptosis of MCF-7 was obvious and the rate of apoptosis was 51.62%. The growth speed of tumor in the group of MGSL (+) significantly slowed down than that of other groups. MGSL prepared by reverse-phase evaporation method met with the demand of targeted delivery system, and it might be an effective antitumor agent.

Key words: gemcitabine; stealth nano-liposome; magnetic responsibility; directional distribution; antitumor effect; breast cancer

脂质体 (liposome) 属于靶向给药传递系统的一种新剂型, 被认为是较理想的载体。但传统脂质体在体内多被网状内皮系统 (reticuloendothelial system, RES) 吞噬, 在血液循环中驻留时间较短。1995 年有学者^[1]对脂质体膜进行改性修饰, 研制出一种长循环脂质体, 不但提高了对靶组织的选择性, 而且还能逃避网状内皮系统的捕获, 被称为隐形脂质体。本课题在前期工作中采用逆相蒸发法, 合成了以 Fe_3O_4 为核心、包封有吉西他滨、外周以聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 修饰的磁性吉西他滨隐形纳米脂质体 (MGSL), 并且证实制备的 MGSL 粒径小、大小均匀; 具有较高的载药量和包封率; 且在一定时间内性质稳定^[2]。基于以上研究, 本实验测定了 MGSL 在体内的磁响应性, 并考察不同的磁场状态下吉西他滨在小鼠体内的分布差异, 比较磁性靶向作用和单纯给药在组织分布的不同, 并且考察 MGSL 在体内外的抑瘤效应, 为其作为化疗药物载体进一步应用于临床奠定理论和实践基础。

材料与方 法

试剂和仪器 磁性吉西他滨隐形纳米脂质体 (MGSL) 及普通磁性吉西他滨纳米脂质体 (MGL), 自制, MGL 的制备同 MGSL, 仅在膜材中不加聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (PEG-DSPE); 高梯度立体靶向磁场, 本课题组自行设计, 立体定向磁场强度可高达 5 000 高斯; 二甲基亚砷 (dimethyl sulphoxide, DMSO), Sigma 公司; 吉西他滨 (gemcitabine, Gem), Lilly 公司; 3257-35 DC 磁性测试仪, 日本横河电机株式会社; FACSCalibur 型流式细胞仪, 美国 BD 公司; 乳腺癌细胞株 MCF-7, 购自武汉大学中国典型培养物保藏中心; BALB/c 裸鼠, 由华中科技大学同济医学院动物实验中心提供。

MGSL 体内磁响应性测定 取昆明小鼠 15 只 (18~22 g, 雌雄兼用, 由华中科技大学同济医学院实

验动物中心提供) 随机分为 3 组: A 组, 对照组, 不予磁场作用; B 组, 低强度磁场组 (2 000 高斯); C 组, 高强度磁场组 (5 000 高斯)。常规饲养 3 d 后禁食 12 h, 给予氯胺酮腹腔内注射麻醉, 氯胺酮浓度为 $0.005 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 每只小鼠约注射 0.5 mL。麻醉成功后从尾静脉单次注射磁性吉西他滨隐形纳米脂质体混悬液 (含有效吉西他滨剂量为 $45 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 然后将小鼠头颅置于磁场中央, 设定不同的磁场强度, 维持磁场 30 min。最后移去磁场, 拉颈椎处死小鼠, 取出脑组织, 用双蒸去离子水将取出的脑组织洗净残血, 滤纸擦干, 准确称量 0.1 g 并加入 PBS 溶液后匀浆, 超声粉碎, 加甲醇-乙腈 (1:9) 3 mL, 涡旋 1 min 后放置 5 min, 于 $3\,500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液于 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴放置, 氮气吹干。残留物用 0.5 mL 流动相溶解, $15\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液 50 μL 进样。对比各组小鼠脑组织的吉西他滨含量, 以评价 MGSL 在体内磁响应性能。

MGSL 在小鼠体内靶向分布试验 昆明小鼠 30 只随机分为 3 组, 每组 10 只。禁食 12 h, 采用上述方法以氯胺酮腹腔内注射麻醉后给予不同处理。实验分为 3 组: A 组, 游离吉西他滨组 (吉西他滨), 小鼠尾静脉单次注射游离吉西他滨; B 组, 磁性吉西他滨隐形纳米脂质体不加磁场组 [MGSL (-)], 尾静脉单次注射 MGSL 混悬液 0.5 mL; C 组, 磁性吉西他滨隐形纳米脂质体加磁场组 [MGSL (+)], 尾静脉单次注射 MGSL 混悬液 0.5 mL, 动物头颅施加磁场。3 组动物分别自尾静脉注射游离吉西他滨 (Gem) 和 MGSL 后, 其中第 3 组以小鼠头部为靶部位, 表面施加 5 000 高斯的梯度磁场 30 min、作用完毕后拉脱颈椎处死小鼠, 采集相关脏器包括脑、心、肺、肝、脾和肾等组织称重, 取其中 0.1 g 组织按前述方法分别测定各组织器官中吉西他滨的浓度。

MGSL 工作液的配制 取 RPMI-1640 培养液若干, 分别加入适量的 MGSL, 根据载药率配制成

不同浓度的 MGSL-RPMI-1640 培养液, 其中含有效吉西他滨质量浓度分别设为 0.5、1、2、4、8、16 和 32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 另外分别制备含相应浓度的原药培养液、MGL-RPMI-1640 培养液, 同量空载磁性脂质体制成空白对照液, 备用。

细胞增殖抑制 MTT 法测定 MGSL 对乳腺癌细胞的生长抑制率: 细胞培养至对数生长, 调整细胞浓度为 $1\times 10^5/\text{mL}$, 接种于 96 孔培养板中, 每孔加入 100 μL , 培养 24 h 后加入预先配制好的无菌 MGSL-RPMI-1640 培养液进行培养。并另设原药组 (加入原药培养液)、MGL-RPMI-1640 组、空白对照组 (空载磁性脂质体对照液) 和阴性对照组 (单纯 RPMI-1640 培养液), 每组设 3 个复孔。继续培养 2 h 和 48 h, 实验终止前 4 h 每孔加入 MTT ($5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 20 μL 。测试前弃去上清液, 每孔加入 DMSO 液 200 μL , 在 490 nm 下测定吸收度 (A)。MGSL 及 MGL 组细胞生长抑制率 (IR) = $(1 - \text{实验组细胞 A 值} / \text{空白组细胞 A 值}) \times 100\%$; 原药组细胞生长抑制率 (IR) = $(1 - \text{实验组细胞 A 值} / \text{阴性对照组细胞 A 值}) \times 100\%$ 。

细胞形态学改变 HE 染色观察: MCF-7 细胞培养至对数生长期, 调整细胞浓度为 $1\times 10^5/\text{mL}$, 接种于 6 孔培养板中, 24 h 后加入 MGSL-RPMI-1640 培养液, 并另设原药组、MGL-RPMI-1640 组、空白对照组和阴性对照组。作用 24 h, 95%乙醇固定后 HE 染色, 光镜下观察细胞形态学的改变。

电镜观察: 细胞处理同 Gemsa 染色, 取对数生长期的肿瘤细胞, 调整细胞浓度为 $1\times 10^5/\text{mL}$, 移至无菌细胞培养瓶培养 24 h 后收集细胞, 经 2.5%戊二醛前固定, 1%锇酸后固定, 逐级酒精脱水, 树脂包埋, 超薄切片, 经过醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色, 于透射电镜下观察乳腺癌细胞 MCF-7 凋亡的超微结构。

流式细胞仪分析凋亡率和细胞周期 细胞培养方法同上。设 MGSL-RPMI-1640 组、原药组、MGL-RPMI-1640 组、空白对照组和阴性对照组。各组细胞在药物处理后培养 48 h 收获细胞, 加入预冷的 70%乙醇 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 24 h, 制成单细胞悬液 (调整细胞浓度为 $1\times 10^5/\text{mL}$), 固定好的细胞用碘化丙啶溶液避光染色 30 min 后, 用流式细胞仪分析各组细胞凋亡和细胞周期。细胞凋亡指数 (AI) = $(\text{亚二倍峰细胞数} / \text{总细胞数}) \times 100\%$ 。

动物分组及肿瘤抑制效应观察 取对数生长期 MCF-7 细胞接种至裸鼠腋部皮下。2 周后处死动物,

取出实体瘤, 将剪碎的瘤块移植至另外的裸鼠腋部皮下, 肿瘤移植后第 10 天选择肿瘤生长良好、直径约 0.8 cm 左右的裸鼠, 作为本实验动物模型。乳腺癌模型裸鼠 36 只, 待肿瘤直径长至 0.8~1.0 cm, 随机分为 6 组, 分别为: NS 组, 尾静脉注射生理盐水; Gem 组, 尾静脉单次注射游离吉西他滨; MGL (-) 组, 尾静脉单次注射普通载药磁性脂质体组, 无磁场作用; MGL (+) 组, 尾静脉单次注射普通载药磁性脂质体组, 有磁场作用, 磁场强度 5 000 高斯; MGSL (-) 组, 尾静脉单次注射 MGSL, 无磁场作用; MGSL (+) 组, 尾静脉单次注射 MGSL, 有磁场作用, 5 000 高斯。在以上各组中, 裸鼠注射剂量为 0.5 mL, 其中吉西他滨有效剂量均按 $45\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给予。于实验首日, 记录裸鼠肿瘤最长径 (D_{max}) 和于最长径垂直的短径 (D_{min})。然后按以上实验方法分组进行尾静脉给药, 对需要进行体外磁场干扰的模型组, 除第 1 d 给药后立即磁场作用于腋部皮下肿瘤表面 30 min 外, 于第 2、3、5、7 和 9 d 均给予相同磁场强度作用 30 min, 并观察测量肿瘤 D_{max} 和 D_{min} 。肿瘤体积 $V = D_{\text{max}} \times (D_{\text{min}})^2 \times 0.5$, 计算各组肿瘤不同时间的体积。在第 11 d 处死裸鼠, 剥离瘤体称重并计算瘤重抑制率。

统计学分析 采用 SPSS 12.0 软件包对数据进行分析处理, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 MGSL 在小鼠体内磁响应性

不同磁场强度下, 小鼠脑组织内吉西他滨浓度见表 1。按吉西他滨有效剂量 $45\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 计算, 尾静脉单次注射 MGSL 30 min 后, 测得低强度磁场组的吉西他滨脑组织中的浓度显著高于无磁场组 ($P < 0.01$), 而高强度磁场组吉西他滨的含量较低强度磁场组显著升高 ($P < 0.01$), 且当磁场强度达到 5 000 高斯时, 吉西他滨含量可达无磁场组的 8.5 倍。脑组织吉西他滨含量与体外磁场的变化关系, 说明磁性隐形纳米脂质体作为抗癌载体, 在体内具有明显的磁响应效应。在外界磁场作用下, 可以有效运载吉西他滨至靶

Table 1 Gemcitabine content of mice brain tissue in different magnetic fields ($n = 5$, $\bar{x} \pm s$)

Group	Gemcitabine/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
Non	60.72 \pm 3.24
2 000 Gs	231.80 \pm 8.71**
5 000 Gs	518.20 \pm 12.33***

** $P < 0.01$ vs Non group; *** $P < 0.01$ vs 2000Gs group

部位,且靶组织内药物浓度与施加磁场的强度呈正相关。这为进一步研究 MGSL 的治疗作用提供了主动靶向效应的动力保证。

2 MGSL 在小鼠体内靶向分布

尾静脉注射给药 30 min 后,各组小鼠器官组织中吉西他滨含量见表 2。当以小鼠脑组织作为磁场靶区施加 5 000 高斯的场强时,其吉西他滨含量可高达 494.32 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (湿重组织);而无磁场作用下分别给予 MGSL 和游离吉西他滨,脑组织平均药物含量仅为 110.34 和 60.73 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,磁场组分别是后两者的 4.5 倍和 8.1 倍 ($P < 0.01$)。结果表明,通过磁性载药纳米球体外加磁场的方式给予吉西他滨,可以显著提高靶部位中吉西他滨含量。与 Gem 组比较, MGSL 加磁场组小鼠肾脏中的吉西他滨浓度明显减少,即由平均 160.75 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 降至 51.35 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,仅为原浓度的 32.0%,两者间有明显差异 ($P < 0.01$);分布到心脏的吉西他滨也由 96.24 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 降至 24.96 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,是原来的 26.0%。结果表明,磁性隐形纳米脂质体作为吉西他滨输送载体可以显著降低心、肾组织中药物浓度;作为一种优良的剂型, MGSL 加磁场作用在多方面克服以往化疗药物的缺陷,并发挥其复合优势,从而有望成为临床肿瘤治疗的有效

手段。

Table 2 Gemcitabine content of different mice tissues in different magnetic fields ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, $n = 10$, $\bar{x} \pm s$)

Tissue	Gem	MGSL (-)	MGSL (+)
Brain	60.73 \pm 3.08	110.34 \pm 4.06	494.32 \pm 8.15**
Lung	105.64 \pm 5.10	55.28 \pm 3.11	38.80 \pm 2.07
Liver	86.76 \pm 3.06	153.92 \pm 6.10	112.72 \pm 3.08
Spleen	112.24 \pm 4.09	186.04 \pm 6.59	125.68 \pm 3.10
Heart	96.24 \pm 3.54	52.80 \pm 3.03	24.96 \pm 1.03**
Kidney	160.75 \pm 5.09	105.28 \pm 3.04	51.35 \pm 2.04**

** $P < 0.01$ vs other groups. Gem: Gemcitabine; MGSL (-): Magnetic gemcitabine stealth nano-liposomes (without magnetic field); MGSL (+): Magnetic gemcitabine stealth nano-liposomes (with magnetic field)

3 MGSL 作用乳腺癌细胞生长的抑制作用

MTT 法测定细胞生长抑制结果见表 3。结果显示: MGSL 在体外对人乳腺癌细胞的杀伤作用随浓度升高有上升趋势; MGSL 组作用 2 h 时在相同的浓度下较原药组的抑瘤作用低 ($P < 0.05$),但作用 48 h 后两组的抑制率无差别; MGSL 比 MGL 的抑制率略低,但无统计学差异。MGSL 抑制乳腺癌细胞呈剂量-时间依赖性。

Table 3 The effect of different groups on proliferation inhibitory rate of MCF-7 cells detected with MTT method ($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

Group	Dosage / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	2 h		48 h	
		A	Inhibition ratio/%	A	Inhibition ratio/%
MGL	0.5	0.694 \pm 0.065	6.49	0.612 \pm 0.037	17.61
	1.0	0.668 \pm 0.085	8.11	0.540 \pm 0.078	29.86
	2.0	0.640 \pm 0.051	10.19	0.478 \pm 0.081	39.66
	4.0	0.562 \pm 0.073	23.82	0.435 \pm 0.043	50.31
	8.0	0.555 \pm 0.049	25.05	0.413 \pm 0.055	60.10
	16.0	0.521 \pm 0.047	30.48	0.234 \pm 0.057	79.79
	32.0	0.457 \pm 0.064	38.92	0.114 \pm 0.027	90.11
MGSL	0.5	0.699 \pm 0.065	6.45	0.615 \pm 0.051	17.57
	1.0	0.664 \pm 0.057	8.13	0.544 \pm 0.078	29.84
	2.0	0.640 \pm 0.044	10.20	0.480 \pm 0.084	39.64
	4.0	0.562 \pm 0.067	23.83	0.436 \pm 0.043	50.29
	8.0	0.553 \pm 0.054	25.10	0.411 \pm 0.094	60.14
	16.0	0.525 \pm 0.050	30.46	0.234 \pm 0.049	79.80
	32.0	0.458 \pm 0.058	38.88	0.114 \pm 0.018	90.08
Gemcitabine	0.5	0.671 \pm 0.068	7.52*	0.617 \pm 0.065	17.58
	1.0	0.652 \pm 0.095	10.15*	0.536 \pm 0.083	30.05
	2.0	0.637 \pm 0.063	12.46*	0.472 \pm 0.084	39.78
	4.0	0.557 \pm 0.080	24.08*	0.442 \pm 0.047	50.20
	8.0	0.523 \pm 0.043	27.27*	0.406 \pm 0.060	61.16
	16.0	0.493 \pm 0.040	33.32*	0.235 \pm 0.051	79.75
	32.0	0.411 \pm 0.052	43.65*	0.114 \pm 0.046	90.17

* $P < 0.05$ vs MGSL group. MGL: Magnetic gemcitabine nano-liposomes

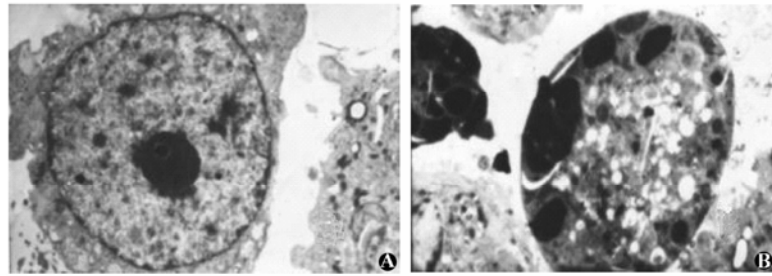


Figure 1 Ultra structure of MCF-7 cell under the electron microscope ($\times 3\ 800$). A: Before the MGSL treatment; B: After the MGSL treatment

4 MGSL 作用乳腺癌细胞形态学改变

在显微镜下可以看到空载磁性脂质体对照组细胞形态无明显变化; MGSL 组和 MGL 组作用类似, 均有大部分的细胞脱壁; 而原药组几乎所有的细胞都脱壁; HE 染色可以看到不同含药浓度的 MGSL 组和 MGL 组处理乳腺癌细胞 24 h 后, 随着浓度的升高, 乳腺癌细胞部分体积明显缩小, 细胞膜上出现空泡及胞膜皱缩, 胞浆变少, 细胞核明显固缩, 染色质浓染, 原药组上述改变更明显。空载磁性脂质体组细胞改变不明显; 透射电子显微镜下观察, MGSL 处理前细胞较大, 结构正常, 未见凋亡形态学改变 (图 1A)。经 MGSL 处理后的细胞, 培养 24 h 后可明显观察到细胞体变小, 变圆。线粒体肿胀, 大量空泡形成, 胞质浓缩, 胞核局部向外突起成角, 核仁浓缩或碎裂, 核染色质呈半月形帽状结构, 凋亡小体以出芽方式脱离细胞体 (图 1B)。

5 MGSL 对乳腺癌细胞凋亡的影响

结果显示, MGSL 组、MGL 组和原药组细胞 G₀/G₁ 期前有明显的凋亡峰 (亚 G₁ 峰) 出现, 三者凋亡率分别达到 51.62%、54.21% 和 61.55%, 而空白组和对照组凋亡率仅为 1.44% 和 1.25%, 差异具有显著性 ($P < 0.05$) (图 2)。

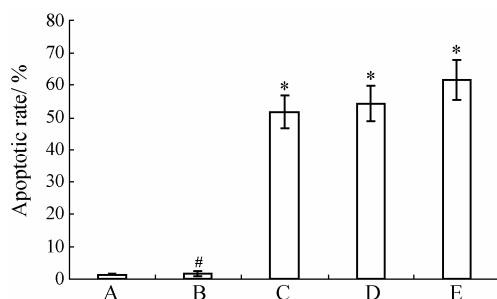


Figure 2 Apoptosis of MCF-7 cell lines induced in different groups. A: Control group (1.25%); B: Blank group (1.44%); C: MGSL group (51.62%); D: MGL group (54.21%); E: Gemcitabine group (61.55%). * $P < 0.05$ vs control

6 MGSL 对乳腺癌细胞周期分布的影响

测定结果显示: MGSL 组、MGL 组和原药组细胞 S 期细胞比例增加, 分别达到 43.01%、49.28% 和 65.82%, G₂/M 期和 G₀/G₁ 期比例减少。不同组别对乳腺癌细胞细胞周期的影响见表 4。

Table 4 The effect on cell cycle of MCF-7 cells in different groups ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Group	G ₀ /G ₁ stage/%	G ₂ /M stage/%	S stage/%
Negative control	61.09 ± 0.35	13.74 ± 0.76	25.15 ± 0.97
Blank control	62.67 ± 0.42	11.15 ± 0.30	25.40 ± 0.22
MGSL group	52.08 ± 0.37*	5.09 ± 0.09	43.01 ± 0.37*
MGL group	39.84 ± 0.34*	11.18 ± 0.14	49.28 ± 0.30*
Gemcitabine group	27.41 ± 0.22*	6.83 ± 0.37	65.82 ± 0.64*

* $P < 0.05$ vs control

7 MGSL 的体内抑瘤效果

分别于第 1、2、3、5、7 和 9 d 测量肿瘤直径得到各组肿瘤大小 (表 5)。结果显示, 在应用 MGSL 联合磁场治疗裸鼠移植瘤的过程中, 从第 2 d 开始, 所有组间均有显著差异 ($P < 0.05$), MGSL 联合磁场组肿瘤生长速度较其他各组明显降低。第 11 d 处死动物后剥离瘤体称重并计算瘤重抑制率, 各组肿瘤平均重量见表 6。可以看出, MGSL 加磁场组瘤重明显低于其他各组 ($P < 0.05$), 抑瘤率最高, 可达 87.3%。

Table 6 The cancer weight and the inhibition ratio in different groups

Group	Weight / g	Inhibition ratio/%
NS	1.42 ± 0.15	
Gem	1.03 ± 0.11	27.5
MGL (-)	0.91 ± 0.10	35.9
MGL (+)	0.55 ± 0.08	61.3
MGSL (-)	0.57 ± 0.08	59.9
MGSL (+)	0.18 ± 0.03*	87.3

* $P < 0.05$ vs other groups

Table 5 The cancer volume in different groups ($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

Group	Cancer volume / cm ³					
	D1	D2	D3	D5	D7	D9
NS	0.18 ± 0.04	0.46 ± 0.11	0.66 ± 0.12	0.94 ± 0.14	1.36 ± 0.20	1.69 ± 0.23
Gem	0.17 ± 0.05	0.42 ± 0.07	0.64 ± 0.10	0.85 ± 0.17	1.05 ± 0.16	1.23 ± 0.21
MGL (-)	0.17 ± 0.04	0.38 ± 0.06	0.56 ± 0.12	0.75 ± 0.15	0.95 ± 0.16	1.08 ± 0.13
MGL (+)	0.16 ± 0.07	0.29 ± 0.07	0.40 ± 0.09	0.51 ± 0.11	0.59 ± 0.13	0.65 ± 0.12
MGSL (-)	0.17 ± 0.04	0.31 ± 0.05	0.42 ± 0.10	0.52 ± 0.11	0.60 ± 0.14	0.68 ± 0.10
MGSL (+)	0.17 ± 0.04	0.19 ± 0.02*	0.20 ± 0.02*	0.22 ± 0.03*	0.23 ± 0.02*	0.24 ± 0.02*

* $P < 0.05$ vs other groups

讨论

化疗是治疗肿瘤的主要方式^[3]。吉西他滨是一种新型嘧啶类脱氧核苷类似物,可用于非小细胞肺癌、胰腺癌、乳腺癌等的治疗。吉西他滨在细胞内的半衰期较短,必须持续静脉给药来维持其对癌细胞的毒性,这种毒性同时也对正常组织起作用,最常见的不良反应包括骨髓抑制、胃肠道反应、脱发、神经毒性和肾毒性等,这种剂量限制性毒性影响临床疗效^[4]。近年研究发现,药物靶向化疗可以有效解决这些问题^[5]。将隐形脂质体和磁靶向两者优点结合起来的磁性隐形脂质体属于第4代靶向给药系统,作为化疗药物的载体治疗恶性肿瘤,除具有一般脂质体的优点外,还可通过磁场作用使载体的靶向作用进一步提高^[6]。Kubo等^[7,8]报道应用磁性阿霉素脂质体定向治疗仓鼠骨肉瘤。结果显示,应用磁性阿霉素脂质体磁导向治疗与单纯静脉滴注阿霉素溶液或应用磁性阿霉素脂质体及不加磁场治疗相比较具有明显的抗肿瘤活性^[9]。

利用磁性隐形纳米脂质体作为吉西他滨的靶向输送载体,可以改变吉西他滨在体内的生物分布,提高肿瘤组织内的药物浓度,最大限度的降低正常组织的药物浓度。而这种独特的载药系统主要依靠体外磁场的导向来达到靶向定位的效果,因此载药系统的磁响应性尤为关键。在体外已通过磁性测试仪对MGSL的磁响应性进行了评价^[2],为了使该类新剂型能够进入临床应用,必须首先通过动物实验测定其在体内的磁响应性。实验结果表明,当小鼠头部一端施加2 000高斯的磁场30 min后,脑组织内的吉西他滨浓度高于无磁场作用组。磁场强度提高为5 000高斯后,浓度更高。充分说明在外界磁场作用下,该磁性纳米载药系统具有良好的磁响应性,靶组织内吉西他滨浓度的高低与磁场强度密切相关;与2 000高斯磁场强度组相比,5 000高斯磁场强度组小鼠脑组织内吉西他滨浓度提高2.2倍。由于两组均只作用

30 min,大样本下可排除小鼠个体差异,尾静脉给予同样数量、大小级别一致的磁性纳米粒,因此磁性脂质体在靶组织的聚集效应是磁场本身的作用引起。

使用磁性纳米脂质体作为靶向输送系统可有效改变化疗药物在体内的生物分布,增加肿瘤组织内的药物浓度,而降低正常组织的药物含量,达到靶向化疗的目的。本实验证明,吉西他滨的体内分布可以通过MGSL加磁场的给药方式而改变:采用磁性脂质体携带药物并制备成纳米级制剂后,通过外界磁场的导向作用,靶组织药物分布较单纯吉西他滨组增加8.1倍,这使大部分化疗药物到达肿瘤组织,增强了抑瘤效果;而分布到肾脏及心脏的药物相对明显减少,分布到肾脏和心脏的药量为给予游离吉西他滨组的32%和26%,从而显著降低心、肾等内脏器官对化疗药物的相对暴露值,使得引起这些器官毒性反应的潜在危险性大大降低。自制的MGSL平均直径为206 nm,虽然在制备过程中已经加入了能减少网状内皮系统摄取的成分PEG,但仍有相当部分吉西他滨沉积于肝、脾、肺等网状内皮系统,这可能与测定吉西他滨的时限较短有关,随着时间的延长,磁性纳米粒可能在体内进行重新分布,有关磁性纳米粒的体内分布研究有待进一步深入。

从不同组别对于乳腺癌细胞MCF-7的杀伤结果可见,MGSL作用2 h时比原药组的抑瘤作用低,但48 h后MGSL和原药组的作用无显著性差异。短时间内MGSL比MGL的作用略低,可能由于PEG-DSPE的加入,MGSL较MGL有较好的稳定性和缓释作用,因而在短时间内只释放了较少的药物。说明MGSL不是通过短时的高剂量浓度起作用,而是通过持续释放有效浓度而杀死肿瘤细胞。因而MGSL的使用可以在减少抗癌药物的毒副作用的基础上达到与单纯药物基本相同的效果。当然,由于磁性材料本身还是一种无机物,尽管已经证明其生物毒性很低,但对于体外培养的细胞生长还是有些影

响^[10], 因此在实验中采用空载磁性脂质体组作为对照, 排除了载体对细胞的作用, 客观地反映 MGSL 的抑瘤效果。从实验结果可以看出, 空载磁性脂质体组与对照组细胞凋亡无显著性差异, 细胞周期无明显变化, 则说明磁性脂质体对细胞生长无明显影响, 非特异性损伤小, 利用其作为抗癌药物载体进入体内毒性小, 是一种非常有前途的载药系统。

本实验通过尾静脉注射 MGSL, 并以荷人乳腺癌裸鼠作为动物模型, 在外加磁场的作用下 MGSL (+) 组肿瘤生长速度较其他各组明显减慢, 瘤重抑瘤率高达 87.3%。MGSL (+) 组体重与其他各组比较相对平稳增加, 且饮食、活动较正常状态下未见明显变化, 而原药组体重一直未见增加, 可见经改变吉西他滨剂型, 其药物毒性明显降低。其机制可能在外加磁场作用下将 MGSL 靶向给予病灶部位, 而对非靶组织、器官和细胞影响很小, 从而提高疗效和减少药物的毒副作用。同时, 发现在无外加磁场的作用下, MGSL 组的瘤重抑制率比 MGL 组和原药组的瘤重抑制率高, 此结果证实了 MGSL 可延长药物体内循环时间^[11]。

References

- [1] Viroonchatapan E, Ueno M, Sato H, et al. Preparation and characterization of dextran magnetite-incorporated thermosensitive liposomes: an on-line flow system for quantifying magnetic responsiveness [J]. *Pharm Res*, 1995, 12: 1176–1183.
- [2] Tong Q, Shu XG, Lu XM, et al. The antitumor effects of magnetic gemcitabine stealth nano-liposomes on human breast cancer xenografts in nude mice [J]. *Acta Med Univ Sci Technol Huazhong [华中科技大学学报 (医学版)]*. 2008, 3: 390–394.
- [3] Devita VT. Dose-response in alive and well [J]. *J Clin Oncol*, 1986, 4: 1157–1159.
- [4] Wu HB, Pan LQ, Liu JW. The adverse effect of gemcitabine and its prevention [J]. *Adverse Drug React J (药物不良反应杂志)*, 2003, 3: 176–177.
- [5] Wadler S. Targeted therapy in colorectal cancer [J]. *Clin Colorectal Cancer*, 2007, 6: 357–361.
- [6] Kiwada H, Sato J, Yamada S, et al. Feasibility of magnetic liposomes as a targeting device for drug [J]. *Chem Pharm Bull*, 1986, 34: 4253–4258.
- [7] Kubo T, Sugita T, Shimose S, et al. Targeted systemic chemotherapy using magnetic liposomes with incorporated adriamycin for osteosarcoma in hamsters [J]. *Int J Oncol*, 2001, 18: 121–125.
- [8] Kubo T, Sugita T, Shimose S, et al. Targeted delivery of anticancer drugs with intravenously administered magnetic liposomes in osteosarcoma-bearing hamsters [J]. *Int J Oncol*, 2000, 17: 309–315.
- [9] Ishida O, Maruyama K, Tanahashi H, et al. Liposomes bearing polyethyleneglycol-coupled transferrin with intracellular targeting property to the solid tumors *in vivo* [J]. *Pharm Res*, 2001, 18: 1042–1048.
- [10] Jhunu CJ, Yousef H, Ching JC. Size dependent magnetic properties of iron oxide nanoparticles [J]. *J Magnet Magnetic Material*, 2003, 257: 113–118.
- [11] Maruyama K. PEG-immunoliposome [J]. *Biosci Rep*, 2002, 22: 251–266.