

文章编号:1005-6947(2004)03-0179-06

· 实验研究 ·

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

何跃明¹, 吕新生¹, 艾中立², 刘志芬², 王平康³

(1. 中南大学湘雅医院 普外科, 湖南 长沙 410008; 2. 武汉大学中南医院 外科, 湖北 武汉 430071; 3. 河南科技大学医学院, 河南 洛阳 471003)

摘要:目的 探讨用纳米及微米氧化铁磁核合成的磁性顺铂微球对人肝癌细胞 BEL-7402 的影响及机理。方法 在肝癌细胞培养液中分别加入 0.04 ~ 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (按顺铂的含量计) 的顺铂 (CDDP) 及含相应 CDDP 剂量的纳米磁微粒磁性顺铂微球 (nCDDPmm) 和微米磁微粒磁性顺铂微球 (mCDDPmm), 并将 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CDDP 与未包裹 CDDP 的磁性微球作为对照, 采用 MTT 法、细胞计数法、流式细胞仪等观察肝癌细胞的活细胞数、杀伤率、生长曲线、细胞周期、增殖指数以及凋亡。结果 (1) 随药物的浓度增加, 肝癌细胞的活细胞数下降, 杀伤率增加, 呈明显的量效关系 (r 值分别是 0.95, 0.91, 0.89, $P < 0.01$); (2) 随药物的浓度增加, 时间延长, 肝癌细胞的生长曲线变低平, 6 ~ 24 h, $\leq 0.8 \mu\text{g}/\text{ml}$ 时, nCDDPmm 和 mCDDPmm 的细胞数高于 CDDP ($P < 0.05$), nCDDPmm 与 mCDDPmm 无明显差异 ($P > 0.05$); (3) 随药物的浓度增加, 肝癌细胞的凋亡率增加, nCDDPmm 组的凋亡率高于 mCDDPmm 和 CDDP 组 ($P < 0.01$); (4) CDDP, nCDDPmm, mCDDPmm 均使肝癌细胞 G_0/G_1 期增加, S 期及 PI 降低。结论 纳米及微米磁微粒磁性顺铂微球的抗肝癌细胞增殖作用取决于 CDDP 的浓度, 其机理主要是诱导肝癌细胞凋亡。纳米磁微粒与微米磁微粒均有微弱促肝癌细胞增殖作用, 但随作用时间延长, nCDDPmm 和 mCDDPmm 中的 CDDP 从微球中缓慢释放后就足以消除磁微粒的影响。

关键词: 癌, 肝细胞/药物疗法; 顺铂/治疗应用; 顺铂/投药和剂量; 纳米; 微球体; 肿瘤细胞, 培养的

中图分类号: R730.261; R979.19

文献标识码: A

Effects and mechanism of magnetic microsphere combination of cisplatin with micron ferric oxide particle on human hepatoma cell in vitro

HE Yue-ming¹, LU Xin-sheng¹, AI Zhong-li², LIU Zhi-su², WANG Ping-kang³

(1. Department of General Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 2. Department of General Surgery, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, China; 3. Henan Science and Technology University, Medical School, Luoyang 471003, China.)

Abstract: Objective To investigate the effects and mechanism of magnetic microsphere combination of cisplatin with nano or micron ferric oxide particle on human hepatoma cell (HHC). **Methods** A human hepatoma cell line BEL-7402 was used in this study, 0.04 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of cisplatin (CDDP), cisplatin nano-ferric oxide magnetic microsphere (nCDDPmm) and micro-ferric oxide magnetic microsphere (mCDDPmm) were administered to the culture solution for culturing the BEL-7402 cell as the experimental groups, and in the control groups were administered with cisplatin 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and magnetic microsphere without cisplatin respectively. The optic density of viable cell, cytotoxicity index, growth curve of cell, cell cycle, proliferation index and apoptosis were assayed by MTT method, cell count and flow cytometry respectively. **Results** (1) The viable cell's optic density decreased and the cytotoxicity index increased in human hepatoma cell following increasing dosages of CDDP, nCDDPmm and mCDDPmm in culture solution, presenting a dose-dependent manner (r value of three drugs were 0.95, 0.91 and

收稿日期: 2003-07-14; 修订日期: 2003-08-15。

作者简介: 何跃明 (1962-), 男, 浙江金华人, 中南大学湘雅医院博士研究生, 主要从事肝癌靶向治疗的研究。

0.89 respective, $P < 0.01$). (2) The growth curve of human hepatoma cell numbers developed smoothly, when the dosage of the drugs and timing increased. The cell numbers in nCDDPmm group and mCDDPmm group were higher than that in CDDP group, when dose $\leq 0.8 \mu\text{g}/\text{ml}$, and timing from 6h to 24h. The cell numbers was no significant difference ($P > 0.05$) between nCDDPmm and mCDDPmm. (3) Apoptosis rate of hepatoma cell increased ($P < 0.01$), when dose of CDDP, nCDDPmm and mCDDPmm increased. The apoptosis rate in nCDDPmm group was higher than that in mCDDPmm group ($P < 0.01$). (4) The G_0/G_1 phase increased, and S phase decreased, when human hepatoma cell was treated by CDDP, nCDDPmm and mCDDPmm. **Conclusions** The antineoplastic effects of nCDDPmm and mCDDPmm depend on the concentration of CDDP, the mechanism is mainly the apoptosis occurred in human hepatoma cell. Ferric oxide particles of nano and micron have faint stimulative proliferation of human hepatoma cell, however, it is enough to eliminate the influence of ferric oxide particle on hepatoma cell as the CDDP released slowly from nCDDPmm and mCDDPmm with time.

Key words: CARCINOMA, HEPATOCELLULAR/drug ther; CISPLATIN/ther use; CISPLATIN/admin; NANO; MICROSPHERE; TUMOR CELLS, CULTURED

CLC number: R730.261; R979.19

Document code: A

磁性药物微球,在体外强磁场的引导下,具有定向移动,定位集中的优点,适用于多种肿瘤的靶向治疗^[1,2],业已成为肿瘤导向治疗及药物新剂型研究的热点。磁性微球的磁核氧化铁微粒根据粒径的大小分纳米($< 100 \text{ nm}$)和微米($> 100 \text{ nm}$)磁粒,纳米磁粒具有超顺磁性,仅在外加磁场下才具有磁性,用于磁介导的肿瘤热疗时,磁场诱导纳米磁粒的产热效应比微米磁粒大1 000倍^[2],故磁性微球多采用纳米铁粒作为磁响应性材料。磁性微球也是一种良好的栓塞材料,随着介入医学的进步,同样引起广大学者的关注^[3,4],在保持微球磁性强度不变的情况下,微米磁粒磁性微球的栓塞作用优于纳米磁粒磁性微球。本研究采用体外细胞培养技术,比较纳米磁粒和微米磁粒磁性顺铂微球对人肝癌细胞 BEL-7402 增殖作用的影响,探讨其机理,同时观察氧化铁微粒对顺铂细胞毒作用的影响,探讨用不同粒径氧化铁微粒制备磁性药物微球载体的安全性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人肝癌细胞株 BEL-7402,中国科学院上海细胞生物所提供。用含 $4.5 \text{ g}/\text{ml}$ 葡萄糖的 DMEM 培养液, 37°C 5% 的 CO_2 培养。

1.1.2 药物 磁性顺铂微球 (Cis-Diammine-Dichloroplatinum magnetic microspheres, CDDPmm) 用磁材 Fe_3O_4 微粒、骨架材料纤维素和化疗药顺铂合成,

由河南科技大学医学院提供。按照 Fe_3O_4 微粒的大小将 CDDPmm 分为纳米 (nano) 磁粒磁性顺铂微球 (nCDDPmm), 微米 (micron) 磁粒磁性顺铂微球 (mCDDPmm)。每支 CDDPmm 20 mg, 含顺铂 8 mg, Fe_3O_4 微粒 8 mg, 纤维素 4 mg。微球的平均粒径 (50 ± 30) μm , 顺铂体外 $T_{1/2}$ 释放时间为 7 ~ 10 d。单纯磁性微球仅有磁核和纤维素, 磁核含量同 nCDDPmm 及 mCDDPmm。顺铂, 每支 10 mg, 山东齐鲁制药厂产品 (批号: 20011023)。

1.1.3 主要试剂与仪器 DMEM 培养液、胰酶 (美国 Gibco 公司), 胎牛血清 (天津生化厂), RNase 酶, 碘化丙啶 (PI), 四氮唑盐 (MTT), Hoechst 33 258 荧光染色剂 (美国 Sigama 公司产品)。

超净工作台, Model 2 300 型 CO_2 培养箱 (为 Shel-lab 公司), 318MC 型全自动酶标仪 (上海三科仪器公司), BH-2 型荧光显微镜 (日本 Olympus 公司), FACSsort 流式细胞仪 (美国 Becton Dickinson 公司), H-600 透射电镜 (日本 Hitachi 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 采用嵌套式设计 (nested design), 亦称组内分组 (hierachical classification) 即实验分药物处理组及对照组, 处理组又分 nCDDPmm, mCDDPmm, CDDP 3 组, 药物的浓度经梯度稀释并根据 MTT 法实验结果而定。

1.2.2 药物稀释 CDDP 及 CDDPmm 均用含 1% 吐温 80 的生理盐水稀释, 加药浓度按 CDDP 的浓度计。对照组用单纯磁性微球, 稀释方法同上, 加入

量按磁核 Fe_3O_4 $2\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 培养液计。

1.2.3 MTT 法观察对肝癌活细胞的影响及杀伤作用 将 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 的 BEL-7402 肝癌细胞 $100\ \mu\text{l}$ 接种于 96 孔培养板中过夜后,弃原培养液,加入含不同浓度 CDDP 和 mCDDPmm 及 nCDDPmm 的培养液,即 $8\ \mu\text{g}/\text{ml}$, $4\ \mu\text{g}/\text{ml}$, $2\ \mu\text{g}/\text{ml}$, $0.8\ \mu\text{g}/\text{ml}$, $0.1\ \mu\text{g}/\text{ml}$, $0.04\ \mu\text{g}/\text{ml}$, $0\ \mu\text{g}/\text{ml}$ (对照),每药每浓度 6 孔。24 h 后加入含 $5\ \text{mg}/\text{ml}$ MTT 的 PBS 溶液 $20\ \mu\text{l}$, 4 h 后去上清,加二甲基亚砜 (DMSO) $150\ \mu\text{l}$, 震荡 5 min, 立即用酶标仪于 $490\ \text{nm}$ 处测吸光密度值 (OD), 取均值, 计算细胞杀伤率, 杀伤率 = $(1 - \text{OD}_{\text{处理}} / \text{OD}_{\text{对照}}) \times 100\%$ 。

1.2.4 细胞计数法观察对人肝癌细胞生长曲线的影响 $1.5 \times 10^5/\text{ml}$ 的细胞接种于 24 孔培养板中, 加入含 nCDDPmm, mCDDPmm, CDDP 液的培养液, 终浓度分别为 $2\ \mu\text{g}/\text{ml}$, $0.8\ \mu\text{g}/\text{ml}$, $0\ \mu\text{g}/\text{ml}$ (对照), 加药后的 0, 6, 12, 24, 48, 72 h 取细胞, 于倒置显微镜下用红血球计数台采用盲法计数, 重复 3 次, 取均值。以横坐标为时间、纵坐标为细胞数, 绘制时间生长曲线。

1.2.5 流式细胞仪观察对肝癌细胞周期及增殖指数的影响及凋亡率的检测 为排除其他因素的干扰, 将细胞接种过夜后, 用无 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 的 PBS 液洗 3 次, 换不含血清的培养液, 24 h 后绝大多数细胞处于 G_0/G_1 期达到同步周期化。然后加入含 nCDDPmm, mCDDPmm, CDDP ($4\ \mu\text{g}/\text{ml}$, $2\ \mu\text{g}/\text{ml}$, 0.8

$\mu\text{g}/\text{ml}$, $0\ \mu\text{g}/\text{ml}$) 的培养液培养 24 h, 加入 70% 冷乙醇 $4\ \text{C}$ 过夜, PBS 洗 2 次, 用 RNase 酶 ($100\ \mu\text{g}/\text{ml}$) 消化 RNA, PI ($50\ \mu\text{g}/\text{ml}$) 染色, 流式细胞仪上机测试, 用 Cell Quest 软件求出各周期的百分率及凋亡率。细胞增殖指数 (PI) = $(S + G_2M) / (G_0G_1 + S + G_2M) \times 100\%$ 。

1.3 统计学处理

所有数据均为 $\bar{x} \pm s$, 用 SSPS11.0 软件包进行 F 检验、 q 检验及相关性分析, 百分率用平方根反正弦转换。

2 结果

2.1 药物对人肝癌 BEL-7402 活细胞的影响及杀伤作用

随着各种药物的浓度增加, OD 值变小 (活细胞数下降), CI 值增大 (杀伤率增加), 呈明显的量效关系 (CDDP, nCDDPmm, mCDDPmm 的 r 值分别是 $0.95, 0.91, 0.89$, $P < 0.01$) (表 1, 图 1)。

中低浓度时 ($0.1 \sim 2.0\ \mu\text{g}/\text{ml}$) 时, nCDDPmm 和 mCDDPmm 对肝癌的杀伤率低于 CDDP ($P < 0.01$); 当药物浓度从 $0.8\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 增加到 $2.0\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 杀伤率增加的幅度最大, CDDP 达到 $2\ \mu\text{g}/\text{ml}$, 继续增加浓度, 杀伤率的增幅明显减小, 似乎进入了一个平台期, 而 nCDDPmm 和 mCDDPmm 达到 $4\ \mu\text{g}/\text{ml}$, 杀伤率才接近同浓度的 CDDP, 且 nCDDPmm 对肝癌细胞的杀伤率与 mCDDPmm 相似 (图 1)。

表 1 药物对肝癌 BEL-7402 活细胞 (OD , $\bar{x} \pm s$) 的影响及杀伤率 (CI, %, $\bar{x} \pm s$)

组别		药物剂量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)						
		0	0.04	0.1	0.8	2	4	8
CDDP	OD	0.727 ± 0.120	0.667 ± 0.066	0.542 ± 0.089	0.456 ± 0.055	0.240 ± 0.037	0.215 ± 0.026	0.185 ± 0.051
	CI	0	7.283 ± 17.025	23.227 ± 18.913	36.356 ± 14.991	66.369 ± 6.740	69.627 ± 6.310	73.788 ± 8.686
nCDDPmm	OD	0.761 ± 0.095	0.694 ± 0.092	0.614 ± 0.084	0.473 ± 0.055	0.347 ± 0.057	0.218 ± 0.025	0.206 ± 0.029
	CI	0	5.521 ± 18.237	18.202 ± 9.910	35.327 ± 12.547	53.691 ± 10.716	70.660 ± 5.658	72.389 ± 4.816
mCDDPmm	OD	0.729 ± 0.095	0.687 ± 0.059	0.597 ± 0.062	0.494 ± 0.038	0.318 ± 0.049	0.212 ± 0.015	0.198 ± 0.030
	CI	0	6.456 ± 14.49	18.823 ± 9.910	33.213 ± 10.744	55.340 ± 10.285	70.518 ± 3.702	72.345 ± 6.211

注: (1) 不同药物相同浓度杀伤率方差分析, $0.1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 和 $2\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 时, F 值分别是 $5.832, 9.644$, $P < 0.001$, 其组间比较, nCDDPmm 比 mCDDPmm, $P > 0.05$; nCDDPmm 比 CDDP 及 mCDDPmm 比 CDDP, $P < 0.01$ 。(2) 相同药物不同浓度杀伤率方差分析, 各组间比较 F 值分别是: $118.256, 145.555, 158.333$, $P < 0.001$; 两两比较: 各浓度与对照组比较, $P < 0.01$ 。其他组间比较, CDDP 组, $2\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 比 $4\ \mu\text{g}/\text{ml}$, $4\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 比 $8\ \mu\text{g}/\text{ml}$, $P > 0.05$; nCDDPmm 及 mCDDPmm 组, $4\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 比 $8\ \mu\text{g}/\text{ml}$, $P > 0.05$ 。其余各浓度组间比较, $P < 0.01$ 。

2.2 药物对人肝癌 BEL-7402 细胞生长曲线的影响

随着培养时间的延长,肝癌细胞数均有不同程度增加,但随着药物的浓度增加,细胞数增加的幅度变小(表2,图2)。

随着药物浓度增加,时间生长曲线明显变低

平;6h时 nCDDPmm 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 细胞数明显高于同浓度的 mCDDPmm 和 CDDP ($P < 0.05$),6~24h时,CD-DP 0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的细胞数低于同浓度的 nCDDPmm 和 mCDDPmm (6h 与 12h, $P < 0.05$; 与 24h, $P < 0.01$) (图2)。

图1 药物对人肝癌细胞的杀伤率(%)

图2 药物对人肝癌细胞生长曲线的影响

表2 药物对肝癌 BEL-7402 细胞总数的影响(个, $\times 10^5$)

药物剂量 ($\mu\text{m}/\text{ml}$)	时间(h)						
	0	6	12	24	48	72	
CDDP	0	1.35	1.814 \pm 0.118	2.438 \pm 0.124	3.467 \pm 0.251	5.926 \pm 0.141	8.680 \pm 0.546
	0.8	1.35	1.529 \pm 0.109 ¹⁾	1.802 \pm 0.136 ¹⁾	2.231 \pm 0.199 ²⁾	3.604 \pm 0.276	5.242 \pm 0.397
	2	1.35	1.521 \pm 0.123	1.690 \pm 0.130	1.958 \pm 0.148	2.272 \pm 0.172	2.779 \pm 0.169
nCDDPmm	0	1.35	1.999 \pm 0.137 ¹⁾	2.486 \pm 0.122	3.691 \pm 0.148	6.097 \pm 0.390	9.289 \pm 0.323
	0.8	1.35	1.627 \pm 0.078	2.003 \pm 0.156	2.864 \pm 0.149	3.634 \pm 0.271	5.081 \pm 0.299
	2	1.35	1.572 \pm 0.120	1.749 \pm 0.117	2.106 \pm 0.172	2.230 \pm 0.154	2.564 \pm 0.123
mCDDPmm	0	1.35	1.866 \pm 0.105	2.348 \pm 0.099	3.455 \pm 0.135	5.662 \pm 0.163	8.859 \pm 0.432
	0.8	1.35	1.622 \pm 0.099	1.911 \pm 0.165	2.704 \pm 0.180	3.480 \pm 0.237	5.052 \pm 0.294
	2	1.35	1.550 \pm 0.047	1.727 \pm 0.114	1.967 \pm 0.099	2.189 \pm 0.127	2.448 \pm 0.083

注:(1)各药物分别与各自的对照组比较, $P < 0.01$; (2)同种药物及相同浓度、不同时间比较,组间 $P < 0.001$; 两两比较,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, nCDDPmm 24h 比 48h $P = 0.052$, mCDDPmm 24h 比 48h $P = 0.098$; 其余的两两比较, $P \leq 0.01$ 。(3)不同药物、相同的时间和浓度比较,组间 $P < 0.001$; 两两比较:6h, 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, nCDDPmm 比 CDDP 和 mCDDPmm, 6h 和 12h, 0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, CDDP 比 nCDDPmm 和 mCDDPmm, 1) $P < 0.05$; 24h, 0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, CDDP 比 nCDDPmm 和 mCDDPmm, 2) $P < 0.01$

2.3 药物对人肝癌 BEL-7402 细胞周期及增殖指数的影响

CDDP, nCDDPmm, mCDDPmm 均使肝癌细胞的

G_0/G_1 增加 ($P < 0.05$), S 期及 PI 降低。0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, nCDDPmm 和 mCDDPmm 的 G_0/G_1 低于 CDDP ($P < 0.05$), 而 S, G_2/M 和 PI 却与之相反 ($P <$

0.05)。4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, CDDP, nCDDPmm, mCDDPmm 的细胞各周期无明显差异(表3)。

2.4 流式细胞仪观察凋亡

随着药物的浓度增加,肝癌细胞的凋亡率明显增加,呈明显的量效关系(r 分别是0.90,0.93,0.88, $P < 0.01$)。各浓度点 nCDDPmm 均明显高

于 CDDP 和 mCDDPmm ($P < 0.01$), 而 CDDP 与 mCDDPmm 之间无差异 ($P > 0.05$)。在 nCDDPmm 和 mCDDPmm 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 虽微球中无 CDDP, 但含 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Fe_3O_4 , 所以其凋亡率与 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 CDDP 有差异(表4)。

表3 药物对人肝癌 BEL-7402 细胞周期及增殖指数(PI)的影响

Group	Cell Cycle($\bar{x} \pm s, \%$)			
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	PI($\%, \bar{x} \pm s$)
CDDP(0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	70.28 \pm 4.76	22.99 \pm 2.68	7.43 \pm 1.57	29.71 \pm 2.54
CDDP(4 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	76.23 \pm 3.27 ¹⁾	15.90 \pm 2.69 ²⁾	7.87 \pm 1.62	23.77 \pm 3.27 ¹⁾
nCDDPmm(0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	62.87 \pm 2.03	26.02 \pm 2.73	11.13 \pm 1.67	37.13 \pm 2.03
nCDDPmm(4 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	75.57 \pm 3.07 ¹⁾	16.58 \pm 4.31 ²⁾	7.85 \pm 1.81 ¹⁾	24.52 \pm 3.06 ²⁾
mCDDPmm(0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	61.81 \pm 3.47	27.88 \pm 1.82	10.27 \pm 1.75	37.19 \pm 2.49
mCDDPmm(4 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	73.12 \pm 2.88 ¹⁾	16.95 \pm 1.83 ²⁾	8.93 \pm 2.34 ¹⁾	26.78 \pm 2.88 ²⁾

注:(1)G₀/G₁, S, G₂/M, PI 组间, F 值分别是 28.038, 21.044, 5.65, 28.038, $P < 0.001$ 。(2)两两比较:与对照组比较, 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$

表4 肝癌细胞的凋亡率($\bar{x} \pm s, \%$)

药物	浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$)			
	0	0.8	2	4
CDDP	1.85 \pm 0.67	4.36 \pm 1.05	10.53 \pm 2.89	24.66 \pm 5.32
nCDDPmm	3.44 \pm 0.98 [†]	6.25 \pm 2.33 [†]	15.14 \pm 4.28 [†]	30.17 \pm 5.62 [†]
mCDDPmm	2.23 \pm 1.16	5.09 \pm 1.54	12.38 \pm 3.69	26.57 \pm 5.52

注:(1)不同药物相同溶度比较,组间 F 值分别是 36.563, 18.992, 28.573, $P < 0.01$; 两两比较, nCDDPmm 与 CDDP 及 mCDDPmm 比较, $\dagger P < 0.01$;(2)相同药物不同浓度比较,组间 F 值分别是 126.334, 115.380, 57.876, 88.211, $P < 0.01$; 两两比较,各浓度组间均 $P < 0.01$

3 讨论

本实验证实,磁性顺铂微球不管其磁微粒是纳米级还是微米级,均与 CDDP 一样,具有明显的抗肝癌细胞增殖作用,并呈现出明显的量效效应,但磁性顺铂微球在低浓度时其作用逊于 CDDP,可能与微球将 CDDP 包裹, CDDP 不能即时全部释放到培养液中有关(因本实验用的磁性顺铂微球中药物的 $T_{1/2}$ 释放时间达 7 ~ 10 d^[3])。当 nCDDPmm 和 mCDDPmm 的浓度增加到 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及以上(3 ~ 9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度相当于临床化疗体内的药物浓度峰

值^[5])后,微球表面的 CDDP 含量就可以达到明显的抗肝癌细胞增殖作用,其效应与 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 CDDP 相似,因 CDDP 浓度在达到 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上后,抗增殖作用的增幅变得明显平缓。nCDDPmm 和 mCDDPmm 对肝癌细胞的杀伤率无明显差异。

铁是机体必须的微量元素,铁超载可能有促癌增殖作用^[6~8],肝癌细胞生长曲线也显示磁微粒似乎有微弱的促肝癌细胞增殖作用,特别是 nCDDPmm,其在 6 h 时,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 nCDDPmm(不含 CDDP,但含纳米磁微粒 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)作用后的细胞数高于同浓度的 mCDDPmm(不含 CDDP,但含微米磁微粒 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)及 CDDP,在 6 ~ 24 h,低浓度药物(0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$)时, nCDDPmm 和 mCDDPmm 的细胞数高于 CDDP。本结果与向娟娟^[9]等和萧萍^[10]等的报道不一致。随药物的浓度增加,时间的延长, nCDDPmm, mCDDPmm, CDDP 的作用无明显差异,说明体外实验中磁性顺铂微球的抗肝癌细胞增殖作用,取决于微球中的 CDDP。随时间延长,小剂量的 CDDP 从微球中缓慢释放就足以消除磁微粒微弱的促癌细胞增殖作用,本实验在 48 h 及以上时间,未发现 CDDP, nCDDPmm, mCDDPmm 三者对肝癌细胞的抑制作用

存在差异。所以,笔者与 Häfeli 等^[11]的观点一致,纳米磁微粒及微米磁微粒均可用来作为磁性微球的磁核。

顺铂是一种铂类抗癌剂,主要通过与其与癌细胞 DNA 的碱基作用变构 DNA 形成数种加合物(Cisplatin-DNA adducts),改变其作为正常复制模板的功能,引起 DNA 复制障碍,导致癌细胞分裂障碍而死亡,为一种周期非特异性化疗药。本研究发现:顺铂作用 24h 后可见到明显的细胞死亡现象,细胞由贴壁的多边形转变成圆形、不规则形,细胞皱缩扭曲,呈出芽状。有人^[12]认为抗癌药在低浓度引起凋亡,高浓度可导致坏死,但笔者却发现,随着药物浓度的增加,凋亡率逐渐增加,在 $0.8 \mu\text{g/ml}$ 的低浓度时,有凋亡伴少量的坏死出现,而大剂量时以凋亡为主,说明抗癌药物的作用具有多样性。nCD-DPmm 组的凋亡率最高,可能与纳米磁微粒引起的氧化应激反应有关^[8],而微米磁微粒可能因颗粒较大,性质比纳米磁微粒更稳定,确切的机理有待进一步研究。有人^[13]发现顺铂作用后的细胞多数停滞于 G_2/M 期,而本实验却发现肝癌细胞主要滞留在 G_0/G_1 阶段,S 期下降,说明有 S 期阻滞,与徐三荣等^[14]报道的结果相似。没有包裹顺铂的磁性微球使肝癌细胞的 S 期, G_2/M 期增加,所以其增殖指数明显高于无顺铂作用组,但包裹 CDDP 后,CD-DP, nCDDPmm, mCDDPmm 对肝癌细胞周期的影响无明显区别,也就是说,当磁性微球包裹化疗药顺铂后,其对肝癌细胞的影响主要取决于化疗药的作用。而磁性顺铂微球在外加磁场的作用下对肝癌细胞将产生怎样的细胞毒作用则是笔者进一步研究的课题。

参考文献:

- [1] 宋海峰,马洁,林晨. 磁性药物靶向治疗肿瘤[J]. 国外医学肿瘤学分册,2002,29(3):183-186.
- [2] 何跃明,吕新生,艾中立. 恶性肿瘤的磁靶向热疗[J]. 国外医学物理医学与康复学分册,2003,23(2):96-100.
- [3] 何跃明,艾中立,周亚魁,等. 磁性化疗栓塞微球在大鼠肝癌中的导向治疗作用[J]. 癌症,1997,16(6):411-413.
- [4] 杨正强,王建华. 铁磁微球栓塞温热疗法治疗肝癌的研究进展[J]. 临床放射学杂志,2003,22(2):161-163.
- [5] Ormerod MG, O'Neill CF, Robertson D, et al. Cisplatin induces apoptosis in a human ovarian carcinoma cell line without concomitant internucleosomal degradation of DNA [J]. Exp Cell Res 1994, 211(2):231-237.
- [6] 黄源. 机体铁超载与肿瘤[J]. 癌症,1994,13(4):368-370.
- [7] Toyokuni S. Iron and carcinogenesis: from Fenton reaction to target genes [J]. Redox Rep, 2002,7(4):189-197.
- [8] Toyokuni S. Iron-induced carcinogenesis: the role of redox regulation [J]. Free Radic Bio Med, 1996, 20(4):553-566.
- [9] 向娟娟,朱诗国,吕红斌,等. 用氧化铁磁性纳米颗粒作为基因载体的研究[J]. 癌症,2001,20(10):1009-1014.
- [10] 萧萍,潘玉芝,谭红,等. 磁性液体对肿瘤影响的实验观察[J]. 中华物理医学杂志,1986,8(3):159-163.
- [11] Häfeli UO, Pauer GJ. In vitro and in vivo toxicity of magnetic microspheres [J]. J Magn and Magn Mat, 1999,194(1-3):76-82.
- [12] Lenon SV, Martin SJ, Cotter TG. Does-dependent induction of apoptosis in human tumor cell lines by widely diverging stimuli [J]. Cell Prolif, 1991,24(2):203-214.
- [13] Sekiguchi I, Suzuki M, Tamada T, et al. Effects of cisplatin on cell cycle kinetics, morphological change, and cleavage pattern of DNA in two human ovarian carcinoma cell lines [J]. Oncology, 1996,53(1):19-26.
- [14] 徐三荣,王学浩,赵中辛,等. 顺铂诱导肝细胞性肝癌细胞凋亡及其临床意义[J]. 镇江医学院学报,2000,10(1):15-17.