

文章编号:1005-6947(2007)03-0213-05

· 肝癌专题研究 ·

纳米材料栓塞对肿瘤组织表达 CD147 影响的研究

徐涛, 陈孝平, 黄志勇, 李丹, 卢凌, 张万广

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 肝脏外科, 湖北 武汉 430030)

摘要:目的 探讨应用羟基磷灰石纳米材料和超液化碘油混悬液栓塞治疗,对肝癌组织表达 CD147 的影响。方法 30 只接种 VX2 肿瘤系的荷瘤兔随机分为 3 个治疗组:对照组;超液化碘油组;纳米材料和超液化碘油组。通过超选插管胃十二指肠动脉分别给予生理盐水(1 mL/只),超液化碘油(0.3 mL/kg),纳米材料和超液化碘油混悬液(0.3 mL/kg)。术后 3 d CT 检查确认插管成功。2 周后,应用免疫组织化学法(S-P)和 western blot 方法,来检测 3 组肿瘤组织 CD147 的表达。结果 免疫组化显示,CD147 在 3 组的肿瘤组织细胞膜均有表达,阳性率分别为(31.33 ± 5.88)%, (75.63 ± 4.44)%, (80.03 ± 5.59)%, 对照组与碘油组,纳米碘油组在 CD147 的表达差异有统计学意义($P < 0.01$),后两组差异则无统计学意义($P > 0.05$)。Western blot 半定量检测,碘油组和纳米碘油组 CD147 的表达量升高,与对照组对比有统计学意义($P < 0.05$)。结论 应用超液化碘油,或羟基磷灰石纳米材料和超液化碘油混悬液栓塞治疗后,肿瘤组织表达 CD147 有上升趋势,可能是造成栓塞治疗后肿瘤复发率高的因素之一。
[中国普通外科杂志,2007,16(3):213-217]

关键词: 肝肿瘤;羟基磷灰石纳米材料;化学栓塞,治疗性;CD147;复发

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A

Effect of expression of CD147 in rabbit VX2 tumor tissues after transarterial embolization with hydroxyapatite nanoparticles

XU Tao, CHEN Xiao-ping, HUANG Zhi-yong, LI Dan, LU Ling, ZHANG Wang-guang

(Department of Hepatic Surgery Center, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: **Objective** To study expression of CD147 in rabbit VX2 tumor tissues after transarterial embolization with hydroxyapatite nanoparticles loaded with lipiodol. **Methods** Thirty rabbits implanted with tumor tissue of cell line VX2 were divided into three groups: control group, lipiodol group, and hydroxyapatite nanoparticles loaded with lipiodol group. The transarterial embolization was performed superselectively via gastroduodenal artery of rabbits, and each rabbit in control group was infused with 1 ml normal saline, that in lipiodol group was infused with 0.3 ml lipiodol per kg, and 0.3 ml hydroxyapatite nanoparticles loaded with lipiodol per kg for that in the last group. Results of treatment were detected by using CT on day 3 after operation. After two weeks, three-step Immunohistochemical technique(S-P) and Western blot technique were used to investigate the expression of CD147 in tumor tissues of the 3 groups. **Results** Immunohistochemical results showed that CD147 was expressed on membrane of tumor cells in all three groups. The positive ratios of CD147 in three groups were (31.33 ± 5.88)%, (75.63 ± 4.44)%, and (80.03 ± 5.59)% respectively, while the expression of CD147 in tumor tissues in control group was significantly different from others ($P < 0.01$), but for the other two groups, there was no difference between them ($P > 0.05$). Protein half-quantitation detecting of CD147 with Western blot technique displayed that expression of CD147 in tumor tissues increased after embolization in last two groups as compared to that of control group ($P < 0.05$). **Conclusions** There was an increasing tendency expression of CD147 in tumor

基金项目:国家“十五”科技攻关资助项目(2004BA714B08)。

收稿日期:2006-12-02; **修订日期:**2007-02-09。

作者简介:徐涛,男,山东济宁人,华中科技大学同济医学院附属同济医院肝脏外科中心博士研究生,主要从事肝脏肿瘤方面的研究。

通讯作者:陈孝平 E-mail:chenxp@medmail.com.cn。

tissues after transarterial embolization with hydroxyapatite nanoparticles loaded with lipiodol or only with lipiodol, and it may be one of the important factors for the high recurrence rate of hepatocellular carcinoma after embolization treatment.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16 (3) : 213 - 217]

Key words: Liver Neoplasms; hydroxyapatite nanoparticle; Chemoembolization, Therapeutic; CD147; recurrence

CLC number: R735.7

Document code: A

人工合成的羟基磷灰石纳米粒子(hydroxyapatite nanoparticle)具有组织相容性好,高比表面积,组织吸附好,以及多孔性和性质稳定等特点,作为药物及基因载体治疗恶性肿瘤方面有广泛的应用前景。并且,它本身对恶性肿瘤有一定的促凋亡作用^[1-2]。CD147是基质外金属蛋白酶刺激诱导因子(matrix metalloproteinases inducer),在体内,体外的恶性肿瘤有高表达,并对肿瘤的浸润,转移,肿瘤新生血管的形成起重要作用^[3]。本研究通过应用超液化碘油,碘油和羟基磷灰石纳米粒子混悬液栓塞治疗干预后,观察兔 VX2 肿瘤组织表达 CD147 的影响,以探讨栓塞后肿瘤复发,转移的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 新西兰大白兔 30 只,体重 2.0~2.5kg,雌雄不限。由华中科技大学同济医学院动物中心提供。

1.1.2 试剂和药物 羟基磷灰石纳米材料由武汉理工大学提供,超液化碘油购自法国 Guerbet 公司,超液化碘油羟基磷灰石纳米混悬液应用超声乳化法,略加改进制备^[4]。肝素钠注射液购自万邦药业,青霉素购自杭州民生药业。速眠新 II 注射液购自长春军事医学科学院兽医研究所。CD147 免疫组化检测一抗为小鼠抗人单克隆抗体,购自 Biologend 公司。Western blot 检测一抗为兔抗人多克隆抗体,分子量 58kD,内参 β -action 为小鼠抗人单克隆抗体,分子量 42kD,均购自博士德公司。兔肿瘤系 VX2 组织细胞原始由美国 ATCC 公司提供,本实验中心长期传代接种。

1.1.3 实验仪器 美国 GE prospeed 16 排螺旋 CT 机。免疫组化应用高清晰度彩色病理图象分析系统分析,型号为 Nikon TE2000-U (日本)。Western blot 检测仪器为 BIO-RAD 公司(美国)的 0.75mm 型号电泳仪。经兔胃十二指肠动脉插管

给药的工具,为应用硬膜外管自制的导管。

1.2 方法

1.2.1 兔 VX2 肿瘤模型的建立 取传代接种 2 周的种兔,通过兔耳缘静脉,推注 1% 的利多卡因 4mL,处死种兔。常规消毒后,开腹取出生长于肝脏的肿瘤组织。选取其中颜色呈灰白色,外观状,并质地柔软的肿瘤组织,修剪成 0.1cm×0.1cm 的组织块,浸泡在新鲜的胎牛血清培养基中待用。将正常大白兔,按 1kg/(0.1~0.2)mL 给予速眠新 II 注射液麻醉,参照 Prat 等^[5]的方法,加以改进,将瘤组织块,接种于兔的肝左中外叶。术后 2 周,行 CT 检测,确定接种瘤组织的生长情况。接种后生长的肿瘤平均直径 1.5~2.0cm。

1.2.2 实验分组和药物干预 选取 30 只生存状态良好的荷瘤兔,随机分为 3 组:(1)对照组,注射生理盐水;(2)碘油组,注射超液化碘油栓塞;(3)碘油和纳米组,注射超液化碘油和纳米粒子混悬液栓塞。手术步骤:根据兔的体重,按 0.1~0.2mL/kg 予以速眠新 II 注射液麻醉,约 20min 后,将麻醉的兔固定在自制的手术台上,去除腹部的毛发,以剑突为标志,取腹部正中切口,长约 5cm。进腹后,先探查肿瘤接种生长情况,选取肿瘤直径在 1.5~2.0cm 作为实验动物。以兔胃十二指肠交界处的幽门上淋巴结为标志,在其右上找到胃十二指肠动脉,游离出约 2.0~4.0cm 的一段,并确认与肝固有动脉和肝总动脉的解剖关系后,两端用丝线提起,在中间侧方剪开动脉壁,将自制的导管插入,并用 1% 的肝素液冲洗防凝后,按实验分组的不同,分别注入碘油,碘油纳米混悬液(均按 0.3ml/kg 给予),生理盐水(按 1mL/只给予)。注射完毕后,再次用肝素液冲洗。将胃十二指肠动脉结扎。仔细止血后关腹。术前及术后第一天禁食,术中输液,手术当天及术后 3d 肌注注射青霉素。术后 3d 行 CT 检查,观察碘油在肿瘤组织的沉积情况,确认插管效率,并最终确定进入实验组的动物。

1.2.3 标本制备 术后2周,将所有实验动物处死,立即取出肝脏,取部分肿瘤组织应用福尔马林液浸泡后,送同济医院病理科切片,石蜡包埋,做免疫组织化学检测;部分肿瘤组织应用液氮法提取肿瘤组织的总蛋白,加入三去污裂解液后,4℃下离心15 min,取上清后,分装,保存在-70℃备用。

1.2.4 免疫组织化学检测 将3组实验动物的石蜡标本,分别做厚4 μm连续切片。应用免疫组织化学S-P法检测,一抗为抗CD147单克隆抗体,工作浓度1:50。应用磷酸盐水缓冲液(PBS)代替一抗作阴性对照。严格按照试剂盒操作步骤进行。结果应用高清晰度彩色病理图象分析系统分析,CD147阳性结果为胞膜染成棕黄色,每份标本选取5个高倍镜视野(×400)进行阳性细胞计数,按阳性细胞所占比例数分为:阴性,阳性细胞数≤5%,弱阳性,阳性细胞数>5%且≤25%,阳性,阳性细胞数>25%且≤50%,强阳性,阳性细胞数>50%。

1.2.5 蛋白质免疫印迹(Western blot)检测 制备10%的SDS-聚丙烯酰胺分离胶,4%的积层胶。将对照组,碘油组和碘油及纳米组兔VX2肿瘤组织蛋白标本,在室温下解冻后,应用考马氏亮兰250法测定蛋白浓度。以每泳道加入20~25 μg蛋白量计算出上样量,在其内加入5×上样缓冲液(loading buffer),沸水浸煮5 min变性后,加样。垂直电泳条件:60V 30 min,积层胶,120V 2h,分离胶,确定溴酚兰到达凝胶的底部。然后,将目的

蛋白转至PVDF膜上。转膜工作条件:恒压电流200 mA 1h。丽春红染膜,确认转膜效果后,5%的脱脂奶粉室温下封闭8h,加入兔抗人CD147多克隆抗体,工作浓度1:400,4℃孵育过夜。洗膜3次后,加入HRP标记的羊抗兔二抗,浓度1:4 000,室温孵育2h后,洗脱二抗。内参β-action的转膜工作条件:恒压电流200 mA,40 min。一抗工作浓度1:400,二抗为HRP标记的羊抗小鼠抗体,浓度1:5 000。应用化学发光法显影。胶片去除伪影后,应用Western blot图象分析软件,结果以测定的CD147蛋白条带的积分光密度(IOD)与内参蛋白条带的光密度对比来表示组织CD147蛋白量的相对表达水平。

1.3 统计学处理

所有数据应用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,SPSS13.0统计软件包处理, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 CT检查结果

接种2周后,肿瘤中央呈低密度为坏死区,边缘影象增强区为瘤实质(图1A)。经胃十二指肠动脉插管注入超液化碘油3d后,增强CT影象见肿瘤实质有碘油大量沉积(图1B)。注入纳米和碘油混悬液3d后,增强CT影象见肿瘤实质的碘油沉积比单纯用碘油少,羟基磷灰石纳米材料未显特殊影象(图1C)。

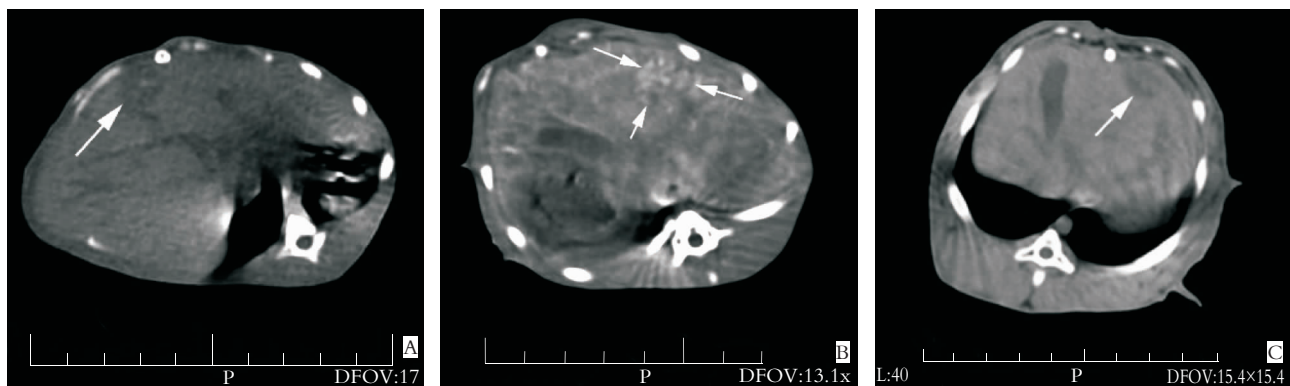


图1 3组的CT检查结果

2.2 免疫组织化学检测 CD147 的结果

对照组肿瘤细胞膜染色,阳性率为(31.33±5.88)% (图2A)。碘油栓塞后,肿瘤组织细胞膜染色比较清晰,阳性率为(75.63±4.44)% (图2B)。纳米碘油混悬液栓塞后,肿瘤细胞膜染色清晰,完整,被染色的细胞密

度大,阳性率为(80.03±5.59)% (图2C)。CD147表达量的对比(LSD法, $F = 261.49$),在对照组与碘油组($P = 0.00$),对照组与纳米碘油混悬组($P = 0.00$)间,差异均有显著性,而碘油组与纳米碘油混悬组差异无显著性($P = 0.076$)。

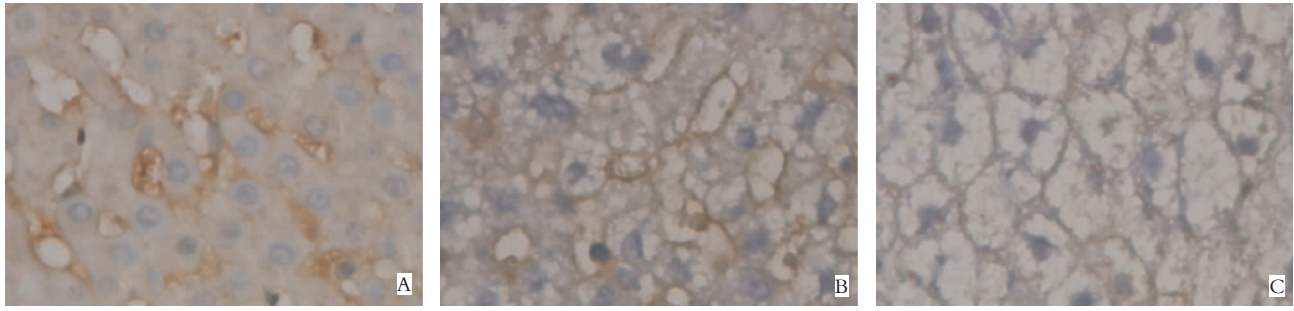


图2 免疫组化检测 CD147(S-P×400)

2.3 蛋白质免疫印迹(Western blot)检测

图3显示,上方条带为CD147,分子量58kD。1-3泳道为对照组CD147蛋白表达量,4-6为碘油组的表达,7-9为纳米和碘油组的表达。下方的条带为 β -actin,分子量42kD。应用Western blot分析软件,将CD147目的条带的积分光密度(IOD = 286.04, 271.34, 288.65, 561.04, 431.03, 575.02, 442.08, 443.51, 437.45)与相应的内参光密度(IOD = 464.54, 490.03, 439.41, 463.20, 409.29, 412.29, 365.75, 378.11, 430.19)对比后,进行组间蛋白表达量比较(SNK法, $F = 23.258$),对照组与碘油组,纳米及碘油组表达CD147的量有统计学意义($P < 0.05$),而碘油组和纳米加碘油组间则无统计学意义($P > 0.05$)。

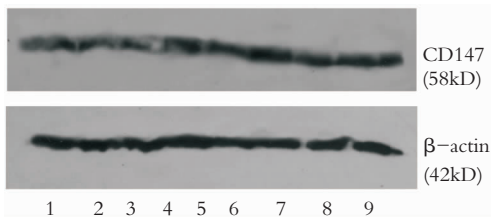


图3 Western blot 检测结果

3 讨论

原发性肝癌(HCC)在我国是最常见的恶性肿瘤之一,由于临床早期症状及体征无特异性,就诊时,疾病往往已到了中、晚期。虽然手术仍然是肝癌首选的治疗方式,但在我国肝癌的根治性切除率维持在30%~40%,而对不能切除病灶的患者,中位生存时间只有6个月。对无法手术的患者,在众多非手术治疗方式的选择中,经肝动脉导管栓塞化疗术(TACE)是创伤较小,重复性好,疗效确定,预后肯定的首选治疗方案。近来,纳米载药系统的开发为HCC治疗开辟了新思

路。由于纳米粒子比表面积大,高的表面能和表面张力,以及强的吸附性和生物活性,作为药物载体,它可以控释抗肿瘤药物释放时间,使药物发挥作用的时间延长,并且,在体内纳米粒子通过巨噬细胞的吞噬作用,而引流至区域淋巴结,乃至淋巴器官肝,肺,骨髓等处,既可对原发病灶发挥作用,也能遏制淋巴结的转移^[6]。国内外的研究^[7-9]证明,羟基磷灰石纳米粒子可以通过调节细胞内 Ca^{2+}/Mg^{2+} 依赖性核酸内切酶的活性,促进细胞的凋亡,对肝癌细胞有抑制生长的作用。将羟基磷灰石纳米粒子和碘油结合应用于肝癌的栓塞治疗,不但可以提高对肿瘤的治疗效果,而且,可以提高对肿瘤的靶向性。但TACE术后癌复发率及转移率高,一直是困扰临床的难题。CD147在体内外恶性肿瘤有高表达,并且,它通过自身的表达,与周围正常的纤维母细胞作用,来调控纤维母细胞对基质外金属蛋白酶(MMP)的分泌,引起恶性肿瘤细胞的浸润和转移。同时,通过对血管内皮因子(VEGF)分泌的影响,促进肿瘤新生血管的形成。体外实验已证明它们之间的相互关联,并可以通过抑制肿瘤细胞CD147的表达,来降低瘤细胞的转移和新生血管的形成,但具体的分子机制还不清楚^[10-11]。

本研究结果显示,碘油对兔VX2肿瘤组织的靶向作用好。但对于纳米和超液化碘油混悬液,由于纳米粒子的存在,而影响了碘油在瘤体的沉积密度,所以从CT图像看,碘油沉积的程度比单纯应用碘油时低。免疫组织化学的结果表明,CD147在恶性肿瘤组织细胞都有表达,定位于肿瘤细胞表面。在应用超液化碘油或纳米及超液化碘油混悬液栓塞后,CD147在肿瘤组织的表达量明显升高,应用Western blot方法检测的结果,也证实了同样的结果。说明:应用羟基磷灰石纳

米粒子和超液化碘油进行栓塞治疗后,不能抑制肿瘤组织 CD147 的表达下调,而有促使其升高的趋势,这可能与在应用碘油和/或化疗药物进行栓塞化疗后,肿瘤组织转移复发率升高的机制相同。下一步,可以通过超选插管的途径,给予针对抑制肿瘤组织表达 CD147 治疗措施,通过对 CD147 的表达调控,来观察肿瘤转移,复发趋势的改变,揭示肿瘤组织转移,浸润的可能分子机制和调控通路。

参考文献:

- [1] Itokazu M, Sugiyama T, Ohno T, *et al.* Development of porous apatite ceramic for local delivery of chemotherapeutic agents [J]. *Journal of Biomedical Materials research*, 1998, 39(4): 536 - 538.
- [2] Li SP, Zhang SC, Chen WJ, *et al.* Effects of hydroxyapatite ultrafine powder on colony formation and cytoskeletons of MGC80-3 cell [J]. *Bioceramics*, 1998, 9(2): 225 - 0227.
- [3] Guo H, Li R, Zucker S, *et al.* EMMPRIN (CD147), and inducer of matrix metalloproteinase synthesis, also binds interstitial collagenase to the tumor cell surface [J]. *Cancer research*. 2000, 60(4): 88 - 91.
- [4] Hodoshima N, Udagawa C, Ando H, *et al.* Lipid nanoparticles for antitumor drugs [J]. *International journal of Pharmaceutics*, 1997, 146(1): 81 - 92.
- [5] Prat F, Centarti M, Sibille A, *et al.* Extracorporeal high2 intensity focused ultrasound for VX2 liver tumors in the rabbit [J]. *Hepatology*, 1995, 21(3): 832 - 836.
- [6] Barroug A, Glimcher MJ. Hydroxyapatite crystals as a local delivery system for cisplatin: adsorption and release of cisplatin in vitro [J]. *J Orthop Res*, 2002, 20(2): 274 - 280.
- [7] Kunieda K, SeKi T, Na Katani, *et al.* Implantation treatment method of slow release anticancer doxorubicin containing hydroxyapatite (DOX2HAPA) complex. A basic study of a new treatment for hepatic cancer [J]. *Br J Cancer*, 1993, 67(4): 668 - 673.
- [8] 唐胜利,刘志苏,艾中立,等. 羟基磷灰石纳米粒子诱导人肝癌细胞凋亡的研究 [J]. *中华实验外科杂志*, 2004, 21(10): 1269 - 1269.
- [9] 杨国华,陈孝平,孙振刚,等. 羟基磷灰石纳米材料碘油混合物介入治疗兔 VX2 肝肿瘤的实验研究 [J]. *中华实验外科杂志*, 2007, 24(3): 288 - 289.
- [10] Tang Y, Nakada MT, Kesavan P, *et al.* Extracellular matrix metalloproteinase inducer stimulates tumor angiogenesis by elevating vascular endothelial cell growth factor and matrix metalloproteinases [J]. *Cancer research*, 2005 65(8): 3193 - 3199.
- [11] Gabison EE, Hoang-Xuan T, Mauvie A, *et al.* EMMPRIN/CD147, an MMP modulator in cancer, development and tissue repair [J]. *Biochimie*, 2005, 87(3-4): 361 - 368.