

· 论 著 ·

单壁纳米碳管联合吡柔比星对膀胱肿瘤抑制效应研究*

易正金¹, 陈刚², 张尧², Shiv Kumar Yadav³, 何云锋^{2△}

(1. 攀枝花钢铁公司职工总医院泌尿外科, 四川攀枝花 617023; 2. 重庆医科大学附属第一医院泌尿外科 400016; 3. 重庆医科大学 400016)

摘要:目的 探讨修饰的单壁纳米碳管联合吡柔比星(SWNT-THP)复合物对膀胱肿瘤抑制效应。方法 用磷酸支链乙二醇修饰单壁纳米碳管, 构建 SWNT-THP 复合物。通过流式细胞术探讨 SWNT-THP 复合物对膀胱癌细胞株(BIU-87 细胞)抑制作用, 同时研究该复合物对膀胱肿瘤的治疗效果及不良反应。结果 SWNT-THP 复合物能够有效地增强 THP 的抗肿瘤效应($P < 0.05$)。同时能有效减少 THP 的不良反应。结论 SWNT 为基础的载体能够有效提高化疗药物的治疗效果, 减少不良反应。在膀胱肿瘤靶向药物输送中将发挥重要的作用。

关键词:单壁纳米碳管; 吡柔比星; 膀胱肿瘤; 肿瘤抑制

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2012.21.004

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)21-2134-02

The depression effects of SWNT-THP conjugation for bladder tumor*

Yi Zhengjin¹, Chen Gang², Zhang Yao², Shiv Kumar Yadav³, He Yunfeng^{2△}

(1. Department of Urology, Staffs' General Hospital of Panzhihua Iron and Steel Ltd. Co., Panzhihua, Sichuan 617023, China; 2. Department of Urology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 3. Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective Functional single-walled carbon nanotubes(SWNT) have shown promise to tumor-targeted accumulation and little toxicity. We investigated in vivo and in vitro whether SWNT based drug delivery could induce high tumor depression in rats bladder cancer and whether SWNT based intravesical chemotherapy could decrease the side effects of common medicine used for intravesical chemotherapy. **Methods** We functionalized SWNT with phospholipid-branched polyethylene glycol and constructed a SWNT-pirarubicin(THP) conjugation via a cleavable ester bond, evaluated the cytotoxicity of SWNT-THP against human bladder cancer cell lines BIU-87 in vitro. Rats bladder cancer in situ model were constructed with MNU, the cytotoxicity of SWNT, SWNT-THP in vivo were evaluated and the side effects observed. **Results** The results showed SWNT only did not show obvious tumor depression in vitro. However, the SWNT induced tumor depression in vivo by activated T lymphocytes. SWNT-THP showed higher tumor depression than THP only in vitro and in vivo($P < 0.05$), and the SWNT-THP based intravesical chemotherapy was hardly observed obvious side effects. **Conclusion** These results indicated that SWNT based bladder cancer targeted drug delivery is toxic free and is showing promise to maximum treatment effects and minimum side effects in cancer chemotherapy which will play a crucial role in bladder-target drug delivery.

Key words: single-walled carbon nanotubes; pirarubicin; bladder cancer; tumor depression

膀胱癌是中国泌尿外科最常见的恶性肿瘤, 膀胱癌的治疗包括可见肿瘤的切除以及后续的膀胱灌注化疗。但在经综合治疗的患者中, 45% 的患者会再发, 再发患者中 20%~30% 的患者肿瘤会发展成为浸润性膀胱癌^[1]。而且, 部分患者因不能够耐受化疗药物的不良反应而不能完成膀胱灌注化疗。因此寻找一种安全、有效的, 且能有效降低化疗药物不良反应的药物载体成为泌尿外科工作者亟待解决的课题。

1 材料与方

1.1 材料 修饰的单壁纳米碳管(SWNT)-吡柔比星(THP)复合物的制备: 将 SWNT 和 0.2 mmol/L 的磷酸支链乙二醇混合, 在超声碎化的条件下反应 30 min, 然后反复过滤、冲洗、制备出活化的 SWNT。在超声碎化的条件下根据说明书将琥珀酰酐和 THP 反应, 使琥珀酰酐中的羧基结合在 THP 上; 将修饰的 SWNT 在 8 mmol/L N-羟基丁二酰亚胺和 8 mmol/L 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐条件

下在摇床上反应 6 h。用 pH 为 7.4 的 PBS 将 ACNP-THP 混合溶液同比例稀释。多余的没有反应的 THP 分子通过过滤器和反复 PBS 冲洗清除掉。SWNT 的长度在 100~150 nm 之间。SWNT 的载药量为每毫升 SWNT 含 THP 10 mg。

1.2 SWNT-THP 对人膀胱癌 BIU-87 细胞抑制作用研究

BIU-87 细胞(购自上海细胞库)在含 10% 胎牛血清(Hyclone 公司)的 1640 培养基中培养(Hyclone 公司)。胰蛋白酶消化后将细胞制悬, 接种在 6 孔板中, 分别加入 SWNT、THP 和 SWNT-THP 复合物共培养 8 h。CSFE 增值试剂盒(白云山公司)用于检测细胞活性。CSFE 加入细胞悬液在黑暗中反应 10 min, 然后通过加入等体积的含血清细胞培养液终止染色, 同时用无菌水冲洗。荧光强度通过倒置显微镜以及流式细胞仪检测。

1.3 大鼠原位膀胱癌模型的建立 60 只 8 周龄的 SD 大鼠用 N-甲基-N-亚硝基脲(MNU)行膀胱灌注, 每次每只大鼠注射

* 基金项目: 教育部博士点基金资助项目(20115503120012), 重庆市卫生局基金资助项目(2011-2-103)。△ 通讯作者, Tel: (023) 89011122; E-mail: hyf028@163.com。

0.2 mg, 每两周 1 次, 一共 4 次。第 9 周末取大鼠膀胱行病理学检查。建模成功的 42 只大鼠被随机分成 4 组 (SWNT 组 6 只, THP 组 15 只, SWNT-THP 复合物组 15 只, 生理盐水组 6 只), 分别用 SWNT、THP、SWNT-THP 复合物以及生理盐水行膀胱灌注治疗。THP 的用量标准化到 5 mg/kg。

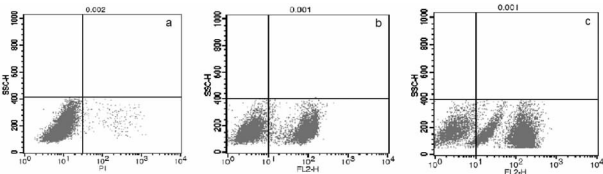
1.4 THP 释放检测 灌注治疗后 0、1、2、4 h, 通过膀胱穿刺取大鼠尿液, 用分光光度计研究大鼠尿液 THP 浓度。标准浓度曲线用万乐公司提供的 THP 标准品建立。

1.5 体内肿瘤抑制作用检测 灌注化疗后 2 d, 从每组中随机选取 2 只大鼠, 取大鼠膀胱肿瘤组织。将肿瘤组织通过剪碎、研磨制备成肿瘤细胞悬液。肿瘤细胞通过 PI 染色行流式细胞检查调亡率。

1.6 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 ANOVA 或者 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 种材料对 BIU-87 细胞抑制作用 SWNT 对 BIU-87 细胞无明显抑制效应; THP 和 SWNT-THP 可明显抑制 BIU-87 细胞增殖, 其中 SWNT-THP 作用更明显。SWNT、THP 和 SWNT-THP 对 BIU-87 细胞的抑制率分别为 $(1.74 \pm 0.56)\%$ 、 $(51.24 \pm 1.45)\%$ 和 $(74.35 \pm 2.56)\%$ 。



A: SWNT, B: THP, C: SWNT-THP.

图 1 3 种材料对 BIU-87 细胞抑制作用

2.2 各种材料对体内肿瘤的抑制作用 SWNT、THP 和 SWNT-THP 体内肿瘤抑制率分别为 $(7.42 \pm 1.85)\%$ 、 $(52.46 \pm 2.41)\%$ 和 $(96.85 \pm 0.85)\%$ 。组间两两比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 THP 缓释效应研究结果 SWNT-THP 和 THP 灌注后, 大鼠尿液中 THP 浓度变化曲线见图 2。在灌注 1 h 后 THP 灌注大鼠尿液中几乎不能够检测到 THP。

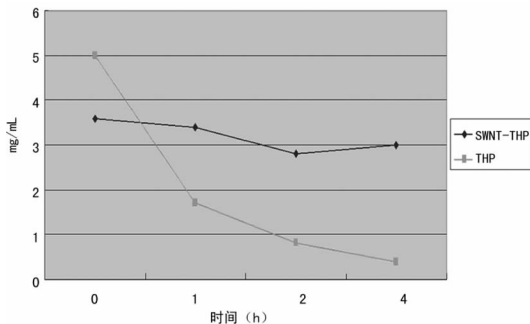


图 2 THP 在尿液中释放曲线图

2.4 不良反应观察结果 在 THP 灌注的 15 只大鼠中, 12 只出现尿频, 7 只出现血尿。在 SWNT-THP 灌注大鼠中没有出现尿频或者血尿。两组大鼠在实验前后肝、肾功能检查未发现明显的变化。

3 讨 论

THP 是中国泌尿外科常用的一种膀胱内化疗药物, 但是

由于其溶解度较低, 部分患者不能够耐受其不良反应, 因此其在临床的应用受到极大的限制。如何提高其治疗作用以及降低其不良反应成为亟待解决的难题。国外一项针对丝裂霉素 C 的三期临床研究认为提高药物的靶向输送可有效提高其对表浅性膀胱肿瘤的治疗效果^[2]。因此, 新型的针对膀胱灌注化疗的药物载体的研究为解决该问题提供了一个思路。

SWNT 由于其超大的比表面积以及在组织渗透性和组织存留方面的特点成为一种新型的肿瘤靶向的药物载体^[3-4]。目前的研究认为纳米活性炭可将大量的生物活性分子, 包括药物、多肽、DNA 等输送至细胞内^[5-8]; 其进入细胞的方式包括胞吞以及自由扩散^[9]; 血液中的单壁纳米碳管可通过胆道系统自粪便中排泄出体外^[10]; 同时研究还认为长期的纳米暴露对机体不会造成伤害^[11]。因此, 本研究选择 SWNT-THP 复合物膀胱灌注, 同时观察其对 BIU-87 细胞的抑制效应及对大鼠原位膀胱癌的治疗效果及不良反应。

本研究结果显示, SWNT-THP 复合物能够有效抑制 BIU-87 细胞增殖; 同时在体内能有效地引起膀胱癌组织坏死, 而不会引起正常组织的坏死; 且无明显不良反应。SWNT-THP 复合物能够有效抑制 BIU-87 细胞增殖的原因在于: SWNT 有效地提高了 THP 的溶解度。在本研究中作者将 SWNT 与磷酸支链乙二醇反应, 运用化学加成的方法将磷酸支链 (PEG) 结合在单壁纳米碳管上, 其次运用琥珀酰酐将一个羧基连接在 THP 分子上, 将活化的 THP 分子与 SWNT-PEG 作用。通过一个可断裂的键将吡柔比星以及单壁纳米碳管结合在一起。因此, 可有效地增强吡柔比星的水溶性。使药物能够达到对肿瘤细胞发挥杀伤作用的浓度。

除水溶性增强外, SWNT 能够特异性杀伤对肿瘤组织, 可能与 SWNT 的缓释性及能够穿过肿瘤组织破坏血管有关。前期研究发现在血液中, 以 SWNT 为载体的药物承载系统能够缓慢的释放药物^[12-14]。本研究也发现负载在 SWNT 上面的 THP 能够缓慢的释放。甚至在大鼠首次排尿 4 h 后, 还能够检测到 THP 分子; 而单纯用 THP 灌注, 在大鼠第 1 次排尿后几乎不能够检测到 THP 在膀胱内存在。SWNT-THP 复合物的缓释性保证了 THP 与肿瘤细胞的充分接触, 因此, 可增强 THP 的肿瘤组织杀作用。SWNT 可以使得淋巴细胞在肿瘤组织聚集, 且能够增强淋巴细胞功能, 而 SWNT 可被内皮细胞吞噬系统吸收。因此, 肿瘤组织对 SWNT 的吸收增强, 同时由于肿瘤组织内存在大量的生物活性物质, 使非共价结合的 SWNT-THP 复合物在与肿瘤接触后能够迅速水解, 从而特异性杀伤肿瘤组织。

THP 用于膀胱灌注主要的不良反应有尿痛, 尿频, 尿急, 血尿和肾脏毒性等^[15]。在本研究中, SWNT-THP 复合物灌注大鼠没有出现尿痛、尿频、尿急、血尿和肝、肾脏毒性等不良反应。

总之, SWNT 显示了较好的膀胱内灌注化疗的应用前景, 拥有 PEG 尾的单壁纳米碳管能够有效改善化疗药物的水溶性; 其次, SWNT 能够增强肿瘤组织对于化疗药物的吸收, 这种吸收具有一定的特异性; 再次, SWNT 对于组织基本没有毒性。本研究报道了 SWNT 再膀胱内灌注化疗中的应用, 这将为膀胱癌的治疗提供一种新的生物材料选择, 促进膀胱肿瘤的治疗研究。

参考文献:

[1] Williams SK, Hoening DM, Ghavamian R, (下转第 2138 页)

- genes to tumor sites using adoptively transferred A-NK and T-LAK cells[J]. *Cancer Gene Ther*, 2007, 14(5): 441-450.
- [2] Aptsiauri N, Cabrera T, Mendez R, et al. Role of altered expression of HLA class I molecules in cancer progression [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2007, 601:123-131.
- [3] Mendez R, Rodriguez T, Del CA, et al. Characterization of HLA class I altered phenotypes in a panel of human melanoma cell lines[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2008, 57(5): 719-729.
- [4] Rodriguez T, Méndez R, Roberts CH, et al. High frequency of homozygosity of the HLA region in melanoma cell lines reveals a pattern compatible with extensive loss of heterozygosity[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2005, 54(2): 141-148.
- [5] Basse P, Goldfarb RH. Localization of immune effector cells to tumor metastases[J]. *Immunol Ser*, 1994, 61: 149-158.
- [6] Basse P, Goldfarb RH, Herberman RB, et al. Accumulation of adoptively transferred A-NK cells in murine metastases: kinetics and role of interleukin-2 [J]. *In Vivo*, 1994, 8(1): 17-24.
- [7] Yang Q, Hokland ME, Bryant JL, et al. Tumor-localization by adoptively transferred, interleukin-2-activated NK cells leads to destruction of well-established lung metastases[J]. *Int J Cancer*, 2003, 105(4): 512-519.
- [8] Kjaergaard J, Hokland M, Nannmark U, et al. Infiltration patterns of short- and long-term cultured A-NK and T-LAK cells following adoptive immunotherapy[J]. *Scand J Immunol*, 1998, 47(6): 532-540.
- [9] Lauwerys BR, Garot N, Renaud JC, et al. Cytokine production and killer activity of NK/T-cells derived with IL-2, IL-15, or the combination of IL-12 and IL-18[J]. *J Immunol*, 2000, 165(4): 1847-1853.
- [10] Tsai L, Ljunggren HG, Hansson M, et al. Effect of IFN-gamma treatment and in vivo passage of murine tumor cell lines on their sensitivity to lymphokine-activated killer(LAK) cell lysis in vitro; association with H-2 expression on the target cells[J]. *Int J Cancer*, 1989, 44(4): 669-674.
- [11] Timothy NJ, Bullock, David W, et al. Manipulation of avidity to improve effectiveness of adoptively transferred CD8(+) T cells for melanoma immunotherapy in human MHC class I-transgenic mice[J]. *Immunology*, 2001, 167(10): 5824-5831.
- [12] 余少鸿, 汤荣春, 温小明. 不同细胞因子活化的 NK 细胞形态及功能的研究[J]. *重庆医学*, 2011, 40(21): 2099-2101.
- [13] 余少鸿, 汤荣春, Per H Basse. 联合应用 NK 细胞及 CTL 对黑色素瘤 B16 细胞的影响[J]. *重庆医学*, 2012; 41(9): 878-880.

(收稿日期: 2012-01-09 修回日期: 2012-03-06)

(上接第 2135 页)

- et al. Ntravesical therapy for bladder Cancer[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2010, 11(6): 947-958.
- [2] Au JL, Badalament RA, Wientjes MG. Methods to improve efficacy of intravesical mitomycin C: results of a randomized phase III trial[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93(1): 597-604.
- [3] Liu Z, Sun XM, Nakayama-Ratchford N, et al. Supramolecular chemistry on water-Soluble Carbon nanotubes for drug loading and delivery[J]. *ACS Nano*, 2007, 1(1): 50-56.
- [4] Feazell RP, Nakayama-Ratchford N, Dai HJ, et al. Soluble single-walled Carbon nanotubes as longboat delivery systems for Platinum(IV) anticancer drug design[J]. *J Am Chem Soc*, 2007, 129(27): 8438-8439.
- [5] Liu HT, He J, Jy T, et al. Translocation of Single-Stranded DNA through Single-Walled Carbon nanotubes[J]. *Science*, 2010, 327(2): 64-67.
- [6] Shawn MC, William M. Shih; from the cover: DNA-nanotube-induced alignment of membrane proteins for NMR structure determination[J]. *PNAS*, 2007, 104(6): 6644-6648.
- [7] Jy C, Chen SY, Zhao XR, et al. Unfunctionalized single-walled Carbon nanotubes as rationally designed vehicles for tumor-targeted drug delivery [J]. *JACS*, 2008, 130(6): 16778-16785.
- [8] Muller J, Delos M, Panin N, et al. Absence of carcinogenic response to multiwall Carbon nanotubes in a 2-Year bioassay in the peritoneal cavity of the rat[J]. *Toxicol Sci*, 2009, 110(7): 442-448.
- [9] Liu Z, Cai W, He L. In vivo biodistribution and highly efficient tumor targeting of Carbon nanotubes in mice[J]. *Nat Nanotechnol*, 2007, 2(5): 47-52.
- [10] Liu Z, Chen K, Davis C, et al. Drug delivery with Carbon nanotubes for in vivo Cancer treatment[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(16): 6652-6660.
- [11] Liu Z, Davis C, Cai W, et al. Circulation and long-term fate of functionalized, biocompatible single-walled Carbon nanotubes in mice probed by raman spectroscopy[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(93): 1410-1415.
- [12] 张兴源, 蔡元坤. 纳米载体在胃癌淋巴靶向化疗中的应用研究[J]. *国际外科学杂志*, 2010, 8(6): 862-866.
- [13] 华正豪, 蔡松晏, 黄广建. 载阿霉素纳米活性炭行淋巴化治疗的实验观察[J]. *中华医学杂志*, 2008, 32(16): 325-329.
- [14] 张李. 纳米活性炭的特性及其在胃癌治疗中的应用[J]. *国际肿瘤学杂志*, 2007, 34(1): 52-55.
- [15] Miyawaki J, Masako Y, Takeshi A, et al. Toxicity of single-walled Carbon nanohorns[J]. *ACS Nano*, 2008, 2(2): 213-226.

(收稿日期: 2012-02-20 修回日期: 2012-04-26)