

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.07.015

纳米炭吸附多西紫杉醇在乳腺癌区域淋巴化疗中的临床研究*

李伟,曾晓华[△],徐发良,熊忠讯,罗杰
(重庆市肿瘤研究所乳腺外科 400030)

[摘要] **目的** 探讨纳米炭吸附多西紫杉醇(TAX-CNP)淋巴化疗药物的靶向性、合理注射时间及短期疗效。**方法** 淋巴靶向化疗试验组(A组):注射1 mL多西紫杉醇(TAX)加1 mL纳米炭(CNP),平均分4个小组(A1~4组),术前TAX-CNP分别在12、24、36及48 h行淋巴靶向化疗后再行手术;外周静脉化疗对照组(B组):静脉输注含1 mL TAX的0.9%氯化钠溶液100 mL,平均分4个小组(B1~4组),根据上述相同的时间点经外周静脉输注相同剂量的TAX。术毕取腋窝淋巴结,用高效液相色谱仪检测两组患者淋巴结TAX的含量;将两组患者有癌转移的淋巴结行原位末端标记法(TUNEL)及流式细胞仪检测细胞凋亡情况。**结果** (1)A组淋巴结TAX含量明显高于B组($P<0.05$);(2)A1组细胞凋亡指数(AI)及凋亡率均明显低于A2、A3、A4组($P<0.05$),A2、A3、A4组细胞AI及凋亡率比较差异均无统计学意义($P>0.05$);(3)A组细胞AI及凋亡率均明显高于B组($P<0.05$)。**结论** TAX-CNP可以显著提高淋巴结的药物浓度,具有较好的淋巴靶向性;术前24 h注射系较为理想的注射时间;TAX-CNP可以明显提高转移淋巴结细胞凋亡的发生,降低短期复发率。

[关键词] 乳腺肿瘤;淋巴化疗;纳米炭;多西紫杉醇**[中图分类号]** R737.9**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)07-0907-03

Nano carbon adsorption taxotere clinical research in regional lymphatic chemotherapy of breast cancer*

Li Wei, Zeng Xiaohua[△], Xu Faliang, Xiong Zhongxun, Luo Jie

(Department of Breast Surgery, Chongqing Cancer Institute, Chongqing 400030, China)

[Abstract] **Objective** To explore the nano carbon adsorption taxotere(TAX-CNP) of the lymph node chemotherapy drug targeting property. **Methods** The lymph node targeted chemotherapy experimental group(A group): Injection of 1 mL taxotere(TAX) plus 1 mL carbon nanoparticles(CNP), average four groups, preoperative on 12, 24, 36 and 48 h, the lymph node targeted chemotherapy of TAX-CNP before surgery; peripheral venous chemotherapy in the control group(B group): intravenous infusion with 1 mL TAX of 0.9% sodium chloride solution 100 mL, average four groups, according to the same point in time the peripheral intravenous doses of the same TAX. Gather the axillary lymph nodes after the surgery, used high performance liquid chromatograph tests the content of TAX in the two groups of lymph nodes; TUNEL method and flow cytometry instrument detect cell apoptosis, which are carcinoma metastasis lymph nodes of Two groups. **Results** (1)lymph node TAX level of group A was significant higher than group B($P<0.05$); (2)Cell apoptosis index(AI) and apoptosis rate of A1 group were lower than that in group A2, A3, A4($P<0.05$), in the cell AI and apoptosis rate of A2, A3, A4 group had no statistically significant difference($P<0.05$); (3)Cells AI and apoptosis rate of cancer metastasis lymph node of Group A were significant higher than group B($P<0.05$). **Conclusion** TAX-CNP can significantly increase the drug concentration of lymph nodes, which have better lymphatic targeting property; Preoperative 24 h injection is a more ideal injection time; TAX-CNP can obviously increase the metastasis lymph cell apoptosis, which can reduce short-term recurrence rate.

[Key words] breast tumor; lymphatic chemotherapy; nano-carbon; taxotere

目前,随着乳腺癌发病率的增加,在一些发达国家和地区成为了主要的恶性肿瘤^[1]。淋巴转移是造成乳腺癌患者术后复发及死亡的重要原因之一,是乳腺癌患者一项重要的临床预后因素^[2-3]。传统的静脉化疗由于在局部淋巴结中药物浓度很低,不能完全解决淋巴转移的问题,而且还可能出现严重的不良反应。因此,淋巴靶向化疗成了人们研究的热点。目前,国内外已有纳米炭(carbon nanoparticles, CNP)吸附化疗药物行淋巴靶向化疗的报道,但纳米炭吸附多西紫杉醇(nano-carbon adsorption taxotere, TAX-CNP)用于乳腺癌的报道较少,对其淋巴化疗的靶向性、合理注射时间及短期疗效报道甚少。

1 材料与与方法

1.1 资料与试剂

1.1.1 一般资料 选择2013年1~12月入住重庆市肿瘤研究所乳腺外科的原发性乳腺癌患者160例,均签署知情同意

书。根据患者意愿进行分组。A组:80例,注射1 mL多西紫杉醇(taxotere, TAX)加1 mL CNP。B组:80例,外周静脉输注含1 mL TAX的0.9%氯化钠溶液100 mL。所有患者经术前粗针活检病理学检验证实为乳腺癌,全身情况尚可(KPS评分大于80分),术前无化疗、放疗及生物治疗史。临床分期按国际抗癌联盟(UICC)TNM分期法;两组患者均为女性,在年龄、肿块大小、所属象限、临床分期及病理类型等方面比较差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。两组患者临床病理因素的关系见表1。

1.1.2 主要试剂与设备 TAX注射液购自江苏奥赛康药业有限公司。CNP混悬注射液购自重庆莱美药业有限公司。U3000型高效液相色谱仪购自美国戴安公司。原位末端标记(TUNEL)试剂盒购自美国Roch公司。Elite流式细胞仪购自美国Beckman Coulter公司。

* 基金项目:重庆市卫生局基金资助项目(2012-2-490)。 作者简介:李伟(1983—),主治医师,硕士,主要从事肿瘤淋巴靶向治疗的研究。

[△] 通讯作者, Tel:13983687701; E-mail:qq-zxh@126.com。

1.2 方法

1.2.1 术前化疗 A 组根据术前注射时间即 12、24、36 及 48 h 分为 A1、A2、A3 及 A4 共 4 个小组, B 组根据术前开始输注时间即 12、24、36 及 48 h 分为 B1、B2、B3 及 B4 共 4 个小组。A 组抽取 1 mL TAX 加入 1 mL CNP 中, 于 37 °C 以 120 r/min 的转速在液体混合器中振荡 15 min, 抽取 TAX-CNP 分别于术前 12、24、36 及 48 h 在肿瘤周缘 0.5~1.0 cm 平均分成 4~6 点皮下注射, 每个点注射 0.2~0.4 mL; B 组抽取 1 mL TAX 分别在上述 4 个不同时间点经外周静脉输注。

表 1 两组患者临床病理因素的关系

相关因素	A 组	B 组	P
年龄(岁)			
<50	47	51	0.674
≥50	33	29	
原发肿瘤位置			
外上象限	23	21	0.377
外下象限	19	20	
内上象限	21	18	
内下象限	17	21	
肿瘤直径(cm)			
>5	13	15	0.967
>2~5	52	49	
≤2	15	16	
临床分期			
I~II 期	65	64	1.000
III 期	15	16	
病理类型			
浸润性导管癌	69	70	0.834
黏液癌	3	4	
浸润性小叶癌	8	6	

1.2.2 取材 所有患者均行乳腺癌改良根治术, 摘取标本中全部淋巴结, 将每一淋巴结均匀分为 2 份, 1 份送作病理检查, 另 1 份置于 -70 °C 冰箱冷藏待测。

1.2.3 药物浓度检测 选取 A 组每小组黑染淋巴结与 B 组每小组的淋巴结各 20 枚。将每枚淋巴结切成肉糜, 称取 (0.25±0.05)g, 涡旋摇匀及离心, 分取上清液涡旋离心。提取上清液置 50 °C 恒温水浴箱中吹干, 残留物溶于 50 μL 流动相中, 取进样液 20 μL 注入高效液相色谱仪, 计算各图谱中的 TAX 峰面积, 按标准曲线方程换算检测样品的药物浓度。

1.2.4 TUNEL 法检测细胞凋亡指数 (apoptotic index, AI)

A 组每小组均选取黑染且有癌转移的淋巴结 20 枚, B 组每小组均选取有癌转移的淋巴结 20 枚, 以 TUNEL 法检测细胞 AI。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡率 选取 A 组每小组黑染且有癌转移淋巴结 20 枚, 选取 B 组每小组癌转移淋巴结 20 枚, 将其切成直径约 0.5 cm 左右的小块, 以 0.25% EDTA-胰蛋白酶消化, 经 400 目筛网滤过, 制成单细胞悬液。沉淀细胞用孵育缓冲液重悬, Annexin V-FITC 和 PI 避光染色, 采用流式细胞仪检测癌细胞的凋亡率。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件处理实验数据。AI、细胞凋亡率及药物浓度均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 t 检验; 采用 LSD 法进行各组之间的两两比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计

学意义。

2 结果

2.1 A 组与 B 组药物浓度比较 A 组每一小组淋巴结内 TAX 浓度均远高于 B 组每一小组淋巴结内 TAX 浓度, 同时 A 组 TAX 浓度高于 B 组, 两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 各组淋巴结的 TAX 浓度比较 ($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/g}$)

组别	淋巴结(枚)	TAX 浓度	t	P
A1	20	3.02±0.51	75.912	0.001
B1	20	0.22±0.03		
A2	20	6.54±1.07	55.640	0.000
B2	20	0.35±0.04		
A3	20	4.75±0.74	50.780	0.000
B3	20	0.26±0.03		
A4	20	2.87±0.46	59.910	0.000
B4	20	0.19±0.02		
A	80	4.30±0.70	23.580	0.000
B	80	0.25±0.03		

2.2 TUNEL 法检测的 A 组与 B 组细胞 AI 比较 凋亡细胞以细胞核呈现黄色为阳性细胞。AI 的判定在 400 倍高倍镜下选择视野, 每张切片计数 1 000~1 500 个细胞中阳性细胞标记数^[4], 见图 1~2。A1 组细胞 AI 明显低于 A2、A3、A4 组 ($P < 0.05$), A2、A3、A4 组间 AI 比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 3。A 组癌转移淋巴结细胞 AI 明显高于 B 组 ($P < 0.05$), 见表 5。

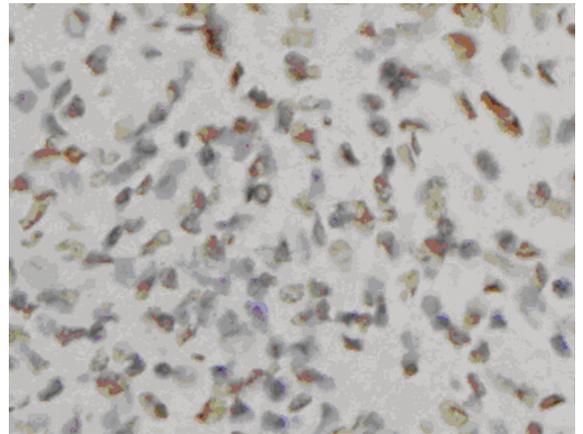


图 1 A2 组细胞凋亡的表达 (TUNEL, ×400)

表 3 各组转移淋巴结 AI 比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	淋巴结(枚)	转移淋巴结 AI	F	P
A1	20	15.6±1.7	459.848	0.000
A2	20	26.4±3.1		
A3	20	28.5±3.0		
A4	20	28.9±3.0		
B1	20	1.9±0.2	168.834	0.000
B2	20	2.9±0.4		
B3	20	3.1±0.3		
B4	20	3.2±0.3		

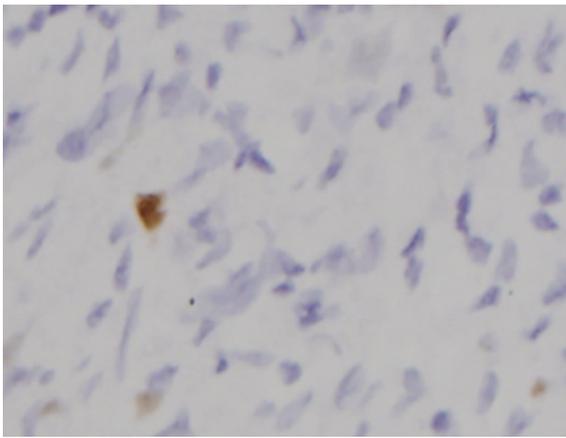


图 2 B2 组细胞凋亡的表达 (TUNEL, ×400)

2.3 流式细胞仪检测的 A 组与 B 组细胞凋亡率比较 A1 组细胞凋亡率明显低于 A2、A3、A4 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); A2、A3、A4 组癌转移淋巴结细胞凋亡率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 4。A 组细胞凋亡率明显高于 B 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 5。

表 4 各组转移淋巴结细胞凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	淋巴结(枚)	细胞凋亡率	F	P
A1	20	10.005 ± 1.152	368.839	0.000
A2	20	19.769 ± 2.173		
A3	20	20.289 ± 2.235		
A4	20	20.467 ± 2.267		
B1	20	1.150 ± 0.173	111.071	0.000
B2	20	1.693 ± 0.216		
B3	20	1.764 ± 0.223		
B4	20	1.793 ± 0.258		

表 5 两组转移淋巴结 AI 及细胞凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

项目	组别	淋巴结(枚)	细胞凋亡率	t	P
AI	A	80	24.900 ± 2.700	35.037	0.000
	B	80	2.800 ± 0.300		
凋亡率	A	80	17.633 ± 1.957	31.012	0.000
	B	80	1.600 ± 0.218		

3 讨论

TAX 是一种新型抗肿瘤药物, 具有直接诱导肿瘤细胞凋亡的作用^[5]。近年来研究表明, TAX 对于乳腺癌、非小细胞肺癌、激素抵抗性前列腺癌、食管癌等具有显著疗效^[6]。作为单药治疗乳腺癌的有效率就已达 43.99%^[7], 主要是因为其在细胞内的浓度比紫杉醇高 2 倍, 而且在细胞内滞留时间长。

CNP 除了成为淋巴结示踪剂外, 因其有更多的比表面积, 还具有高吸附容量及缓释性等优点^[8-10]。区域淋巴化疗使用 CNP 作为载体提供抗癌药物, 可以提高淋巴结内的药物浓度及降低血浆药物浓度, 由此降低系统性毒性^[11]。而且, CNP 作为一种载体对机体无明显毒性及致畸作用, 在体内具有较高的安全性^[12-14]。本实验结果显示, A 组淋巴结药物浓度明显高于 B 组, 表明 TAX-CNP 靶向化疗药物具有较好的淋巴趋向性; 当然, 如果加大 TAX 的药物剂量, 淋巴结内药物浓度是否会随之升高, 目前, 还不明确, 需要进一步研究。

乳腺癌淋巴靶向化疗药物术前较为合理的注射时间目前并没有明确的定论。本实验研究显示, A 组术前 24、36 及 48 h 注射后癌转移淋巴结的 AI、细胞凋亡率均较术前 12 h 注射高, 虽然从数据上显示术前 24、36 及 48 h 随着时间的延长, AI 及细胞凋亡率均稍有所增高, 但 3 小组之间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 同时结合临床术前准备的实际, 术前 24 h 注射系较为合理的时间。

抗癌药物通过诱导肿瘤细胞凋亡是其主要治疗作用之一^[15]。凋亡检测方法众多, 原理各异, 每种凋亡检测方法各具特点, 但均有一定的局限性。流式细胞术检测早期凋亡更为灵敏, 既可定性又可定量, 且具有简单、快速的特点, 可进行多参数和活体细胞分析, 是目前较为理想的凋亡定量检测方法之一; TUNEL 法主要用于细胞凋亡的晚期检测, 可检测出尚未出现明显凋亡形态学特征但已发生 DNA 裂解的细胞核, 可结合细胞同期的分析, 可同时了解凋亡细胞 DNA 断裂和细胞周期分布之间的关系, 近来已成为鉴别和定量凋亡细胞的最常用方法之一。淋巴靶向化疗药物的短期疗效也一直是关注的焦点。本实验结果显示, A 组癌转移淋巴结 AI 及细胞凋亡率均明显高于 B 组, 表明 TAX-CNP 靶向化疗药物可以显著提高转移淋巴结细胞凋亡的发生, 降低局部短期复发率。对于 TAX-CNP 的长期疗效还有待进一步的临床观察。

目前, 只有少数使用 CNP 研究区域淋巴化疗, 非常需要一些额外的信息。例如, 靶向化疗药物在淋巴系统的疗效评估, 淋巴结的区域复发率, 靶向化疗在乳腺癌患者手术后的效果、长期存活率及安全性问题等, 这些都需要进一步的研究。此外, 由于 CNP 颗粒不是一个可生物降解的材料, 可以退化在体内, 还需要更多的研究来确定长期的毒副作用是否会发生。

局部注射后靶向化疗药物随淋巴循环分布, 对于不能手术清除的淋巴结如内乳区淋巴结、部分跳跃转移的淋巴结也有较好的作用, 而且用量少, 不良反应轻, 是一种较为理想的化疗方法。本研究结果积累了 TAX 在乳腺癌淋巴靶向化疗中比较合理的注射时间、短期疗效和靶向性等经验。本研究为淋巴靶向化疗药物在乳腺癌中的应用提供了理论依据, 为乳腺癌患者的治疗开辟了一条新的路径, 同时对指导其他淋巴靶向化疗药物的研究也有一定帮助。新型靶向化疗药物的应用, 减少了患者术后复发及转移的机会, 极大地提高了生存率, 为患者节省了一定的医疗费用; 为将来使用淋巴靶向化疗制剂部分替代价格昂贵、不良反应明显的静脉化疗药物提供了可能。但对如何联合用药、多途径用药和规范乳腺癌淋巴化疗的标准以及如何开展个体化治疗有待深入探索。

参考文献

- [1] Papademetriou K, Ardavanis A, Kountourakis P. Neoadjuvant therapy for locally advanced breast cancer: focus on chemotherapy and biological targeted treatments' armamentarium[J]. J Thorac Dis, 2010, 2(3): 160-170.
- [2] Bernet L, Cano R. Metastatic sentinel node and axillary lymphadenectomy revisited[J]. Gland Surg, 2012, 1(1): 7-8.
- [3] Wheeler SB, Reeder-hapes K, Meyer AM. A balancing act for breast cancer? Everolimus for hormone receptor positive patients[J]. Transl Cancer Res, 2012, 1(2): 109-112.
- [4] 赵文和, 王世夫, 丁伟, 等. 脱氧氟尿苷诱导胃腺癌细胞凋亡的临床研究[J]. 中华普通外科杂志, 2005, 20(3): 184-186.

血后病死率的独立预测因子。这与作者所做的研究一致,通过检测和肽素水平早期识别急性脑出血高危患者,对急性脑出血患者进行病情评估和预后判断具有重要临床意义。

参考文献

- [1] Shibazaki K, Kimura K, Iguchi Y, et al. Plasma brain natriuretic peptide can be a biological marker to distinguish cardioembolic stroke from other stroke types in acute ischemic stroke[J]. *Int Med*, 2009, 48(5): 259-264.
- [2] Modrego PJ, Boned B, Berlanga JJ, et al. Plasmatic B-type natriuretic peptide and C-reactive protein in hyperacute stroke as markers of CT-evidence of brain edema[J]. *Int J Med Sci*, 2008, 5(1): 18-23.
- [3] James ML, Blessing R, Phillips-Bute BG, et al. S100B and brain natriuretic peptide predict functional neurological outcome after intracerebral haemorrhage[J]. *Biomarkers*, 2009, 14(6): 388-394.
- [4] Katan M, Nigro N, Fluri F, et al. Stress hormones predict cerebrovascular e-events after transient ischemic attacks [J]. *Neurology*, 2011, 76(6): 563-566.
- [5] Katan M, Fluri F, Morgenthaler NG, et al. Copeptin; a novel, independent prognostic marker in patients with ischemic stroke[J]. *Ann Neurol*, 2009, 66(6): 799-808.
- [6] Urwyler SA, Schuetz P, Fluri F, et al. Prognostic value of copeptin; one-year outcome in patients with acute stroke [J]. *Stroke*, 2010, 41(7): 1564-1567.
- [7] Zweifel C, Katan M, Schuetz P, et al. Copeptin is associated with mortality and outcome in patients with acute intracerebral hemorrhage [J]. *BMC Neurology*, 2010, 26(10): 1186-1188.

- [8] Dong XQ, Huang M, Yu WH, et al. Change in plasma copeptin level after acute spontaneous basal ganglia hemorrhage[J]. *Peptides*, 2011, 32(2): 253-257.
- [9] 陈礼刚, 孙晓川. 神经外科学教程[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 237.
- [10] Januzzi JL Jr, Camargo CA, Anwaruddin S, et al. The N-terminal Pro-BNP investigation of dyspnea in the emergency department (PRIDE) study[J]. *Am J Cardiol*, 2005, 95(8): 948-954.
- [11] 张文英, 张翠英, 李莹, 等. 脑出血患者血浆中脑钠尿肽和内皮素关系的研究[J]. *临床荟萃*, 2007, 22(23): 1713-1714.
- [12] 陈娜, 杨琴, 吴兆敏, 等. 脑出血急性期血浆 N 端脑钠肽前体浓度变化与预后的关系[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2012, 29(1): 35-37.
- [13] James ML, Wang H, Venkatraman T, et al. Brain natriuretic peptide improves long-term functional recovery after acute CNS injury in mice[J]. *J Neurotrauma*, 2010, 27(1): 217-228.
- [14] Katan M, Morgenthaler NG, Dixit KC, et al. Anterior and posterior pituitary function testing with simultaneous insulin tolerance test and a novel copeptin assay[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92(7): 2640-2643.
- [15] Szinnai G, Morgenthaler NG, Berneis K, et al. Changes in plasma copeptin, the cterminal portion of arginine vasopressin during water deprivation and excess in healthy subjects[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92(10): 3973-3978.

(收稿日期: 2014-10-19 修回日期: 2014-12-19)

(上接第 909 页)

- [5] Rahman KM, Banerjee S, Ail S, et al. 3, 3-Diindolylmethane enhances taxotere-induced apoptosis in hormone-refractory prostate cancer cells through surviving down-regulation[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(10): 4468-4475.
- [6] Minabamide J, Aoyama N, Takada K, et al. Evaluation of docetaxel, CDDP and 5-FU combined therapy as second-line chemotherapy for esophagus caucer[J]. *Gan To Kagaku Ryo-ho*, 2007, 34(1): 49-52.
- [7] 王子平, 孙燕, 张湘茹, 等. 多西他赛治疗晚期乳腺癌的临床研究[J]. *中华肿瘤杂志*, 2006, 28(6): 468-470.
- [8] Kegel FS, Rietman BM, Verliefe AR. Reverse osmosis followed by activated carbon filtration for efficient removal of organic micropollutants from river bank filtrate [J]. *Water Sci Technol*, 2010, 61(10): 2603-2610.
- [9] Sze MF, Mckay G. An adsorption diffusion model for removal of para-chlorophenol by activated carbon derived from bituminous coal[J]. *Environ Pollut*, 2010, 158(5): 1669-1674.
- [10] Bu L, Wang K, Zhao QL, et al. Characterization of dissolved organic matter during landfill leachate treatment

by sequencing batch reactor, aeration corrosive cell-Fenton, and granular activated carbon in series[J]. *J Hazard Mater*, 2010, 179(1-3): 1096-1105.

- [11] Chen J, Wang L, Yao Q, et al. Drug concentrations in axillary lymph nodes after lymphatic chemotherapy on patients with breast cancer[J]. *Breast Cancer Res*, 2004, 6(4): R474-477.
- [12] Magrez A, Kasas S, Salicio V, et al. Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials[J]. *Nano Lett*, 2006, 6(6): 1121-1125.
- [13] 范林军, 钟玲, 郭德玉, 等. 纳米炭对乳腺癌腋窝淋巴结示踪效果及安全性的研究[J]. *中华乳腺病杂志*, 2010, 6(4): 47-50.
- [14] 孙明磊, 谢卫红, 王昌美, 等. 平阳霉素-活性炭纳米微粒行口腔癌淋巴化疗的靶向性评价[J]. *华西口腔医学杂志*, 2011, 29(3): 253-263.
- [15] 姚静, 谢大兴, 吴剑宏, 等. 流式细胞术的凋亡检测技术在人胃肠实体瘤药敏试验中的应用[J]. *中华实验外科杂志*, 2007, 24(10): 1204-1206.

(收稿日期: 2014-10-08 修回日期: 2014-12-20)