

卡纳琳肝癌热疗疗效的研究

曾广富^{1,2}, 唐小海^{1,2*}, 黄源芳², 张雪梅²

(1. 四川师范大学 生命科学学院, 四川 成都 610101; 2. 重庆莱美药业股份有限公司, 重庆 401336)

摘要: 探究 CNSI 对肝癌模型热疗的疗效, 分别从细胞层面和体层面研究 CNSI 的热疗疗效。细胞层面: 对照组无处理; CNSI 组加入 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 CNSI; NIR 组在 1 W/cm^2 的 NIR 条件下连续照射 3 d, 每天 3 min; 实验组(CNSI+NIR 0.2 W/cm^2 、CNSI+NIR 0.4 W/cm^2 、CNSI+NIR 0.6 W/cm^2 、CNSI+NIR 0.8 W/cm^2 、CNSI+NIR 1 W/cm^2) 加入 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 CNSI 连续照射 3 d, 每天 3 min。最后分别收集每组细胞, 计算抑制率。在体层面: 对照组无处理; CNSI 组在肿瘤部位注射 50 μL CNSI; NIR 组在 0.8 W/cm^2 的 NIR 条件下连续照射 3 d, 每天 3 min; CNSI+NIR 组在肿瘤部位注射 50 μL CNSI, NIR 为 0.8 W/cm^2 的条件下连续照射 3 d, 每天 3 min。比较 4 组的杀伤效果、肿瘤生长以及细胞死亡情况等。结果表明: 在细胞层面, CNSI+NIR 0.8 W/cm^2 、CNSI+NIR 1 W/cm^2 组对肿瘤生长均具有很好的抑制作用; 在体层面, CNSI+NIR 0.8 W/cm^2 组能够明显抑制肿瘤生长, 明显提高治愈率。结论: NIR+CNSI 组可以明显抑制肿瘤生长, 对肝癌模型小鼠具有显著的疗效。

关键词: 肝癌; 卡纳琳; 热疗

中图分类号: Q631 文献标志码: A 文章编号: 1001-8395(2018)02-0258-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-8395.2018.02.017

热疗是通过吸热材料吸收光能将其转换成热能, 利用局部升温杀死肿瘤达到治疗恶性肿瘤的新型方法^[1-2], 是肿瘤治疗中一种被广泛研究的技术^[3-5]。该方法是针对肿瘤部位的治疗, 可以避免对其他组织造成损伤^[6]。

近红外光(NIR)对生物组织无损害且具有一定的穿透力, 可以作为热疗的重要光源^[7], 但是单纯近红外光的热能远远不够达到治疗肿瘤的效果。因此各种光能的转换功能性材料应运而生, 例如金纳米颗粒^[8-10]、纳米碳管^[11-12]和磁性纳米粒子^[13]等。这些新颖的纳米材料因其独特的近红外光吸收性和光稳定性, 被迅速地开发和利用于热疗。纳米碳作为热疗材料用于肿瘤治疗得到较好的疗效且无毒副作用^[14]。

光吸收纳米材料卡纳琳(CNSI)是以纳米碳为原料制备的纳米碳混悬注射液, 颗粒直径约为 180 nm, 具有高度的淋巴系统趋向性。CNSI 作为中国唯一批准上市的淋巴结示踪剂, 在肿瘤研究应用以及

临床使用中^[15-17], 也有大量研究将其作为抗癌药物载体^[18-19]。本文研究 CNSI 对肝癌模型作为吸热材料的体外及体内的热疗疗效。

1 材料和方法

1.1 药品试剂、仪器与细胞株 药品试剂: DMEM 高糖培养基、青霉素链霉素溶液、PBS 缓冲液、新生小牛血清(赛默飞世尔生物化学制品北京有限公司)、CNSI(重庆莱美药业股份有限公司)。

仪器: 生物倒置显微镜(上海光学仪器厂)、培养箱(SANYO)、离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)、超净工作台(苏净安泰)、水浴锅(上海跃进医疗器械有限公司)、近红外激光热疗仪。细胞株与动物: HepG-2(四川大学生物治疗国家重点实验室惠赠)、KM 小鼠(成都达硕生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞计数法检测 CNSI 体外热疗抗肿瘤活

收稿日期: 2016-11-15 接受日期: 2017-06-01

基金项目: 国家科技重大专项“重大新药创制”(012ZX09102101-015)

* 通信作者简介: 唐小海(1963—), 男, 教授, 主要从事靶向抗肿瘤药物的研究, E-mail: phammateceo@aliyun.com.cn

性 取对数生长期的 HepG-2 肝癌细胞制成单细胞悬液.根据细胞计数的结果调整细胞浓度,取 24 个玻璃培养皿,每瓶加入 1 mL(约 3×10^4 个细胞)放入 37 °C、体积分数为 5% 的 CO₂ 孵箱.隔日加入用培养基稀释的 CNSI 溶液(按培养基总体积将 CNSI 质量分数稀释至 50 μg/mL).

将实验分为 8 组,分别为:对照组无处理,CNSI 组加入 50 μg/mL 的 CNSI,NIR 组在 1 W/cm² 的 NIR 条件下连续照射 3 d,每次 3 min,实验组(CNSI+NIR 0.2 W/cm²、CNSI+NIR 0.4 W/cm²、CNSI+NIR 0.6 W/cm²、CNSI+NIR 0.8 W/cm²、CNSI+NIR 1 W/cm²)加入 50 μg/mL 的 CNSI,连续照射 3 d,每次 3 min.NIR 照射前加入 CNSI 溶液,实验完成后用红外热像仪测量温度.每次照射完成后更换培养基,最后一次照射后继续培养 2 d,用胰蛋白酶消化后计数,并计算

$$\text{抑制率} = \left(1 - \frac{\text{实验组细胞}}{\text{阴性组细胞}}\right) \times 100\%.$$

1.2.2 CNSI 体内热疗抗肿瘤活性 将 KM 小鼠 32 只随机分为 4 组,小鼠右前腿部接种 HepG-2 肝癌细胞(2×10^6 个/只),待肿瘤体积约 100 mm³ 时进行治疗.对照组无处理,CNSI 组在肿瘤部位注射 50 μL CNSI,NIR 组在 0.8 W/cm² 的 NIR 条件下连续照射 3 d,每次 3 min,CNSI+NIR 组在肿瘤部位注射 50 μL CNSI,NIR 为 0.8 W/cm² 的条件下连续照射 3 d,每次 3 min.

第一次治疗完成 24 h 后,每组取一只小鼠,将肿瘤部位取出做病理切片.观察、记录小鼠肿瘤生长情况,每 2~3 d 用游标卡尺测量一次肿瘤体积.测量方式为按直角测量肿瘤的长轴 a 和短轴 b ,计算肿瘤体积为

$$V = ab^2 / 2.$$

小鼠饲养条件均为温度 25 °C、湿度 60%、SPF 级(无特定病原体),实验过程均遵从实验动物饲养管理条例及使用指南.实验数据采用 SPSS 22 进行统计,以均数±标准差($\bar{X} \pm S$)表示.

2 结果与讨论

2.1 细胞层面的抑制作用 NIR 照射时细胞温度

上升不明显,对细胞生长几乎无影响.CNSI 组也对细胞生长无影响.实验组抑制率是随着功率的升高而升高,CNSI+NIR 0.2 W/cm² 抑制率为 25.45%,CNSI+NIR 0.4 W/cm² 抑制率为 46.72%,CNSI+NIR 0.6 W/cm² 抑制率为 76.43%,CNSI+NIR 0.8 W/cm² 抑制率为 99.02%,CNSI+NIR 1 W/cm² 抑制率为 99.75%(如图 1).由此可以看出实验组 NIR 条件为 0.8 W/cm² 时达到较为理想的治疗效果.

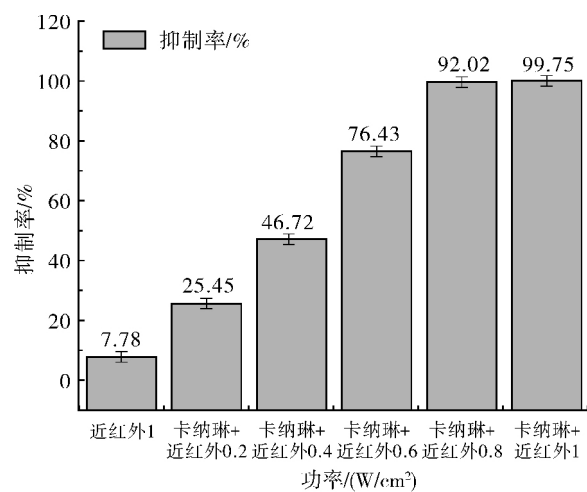


图 1 不同 NIR 功率细胞热疗结果

Fig. 1 Different NIR power cell hyperthermia results

2.2 体内抑制作用 从病例图片看出 CNSI+NIR 组肿瘤细胞大面积死亡达到预期治疗效果(图 2(a)),NIR 组对肿瘤细胞有一定的杀伤作用(图 2(b)),空白组与 CNSI 组肿瘤生长较好(图 2(c)和(d)).

CNSI 对小鼠肿瘤的生长无影响,NIR 组对肿瘤抑制作用不明显,而 CNSI+NIR 组对肿瘤生长有显著抑制效果.

3 次治疗完成后,从肿瘤生长体积曲线(图 3(a))可以看出空白对照与 CNSI 组肿瘤生长趋势基本一致,CNSI 对肿瘤的整个治疗过程均无影响;单 NIR 组前期有较小的抑制作用,但最后肿瘤仍然继续生长且与空白组几乎一致;CNSI+NIR 组照射后肿瘤停止生长且 30 d 后仍未复发.空白组、CNSI 组和 NIR 组小鼠肿瘤均无结痂,CNSI+NIR 组小鼠治疗 10 d 后肿瘤开始结痂,20 d 后结痂脱落(图

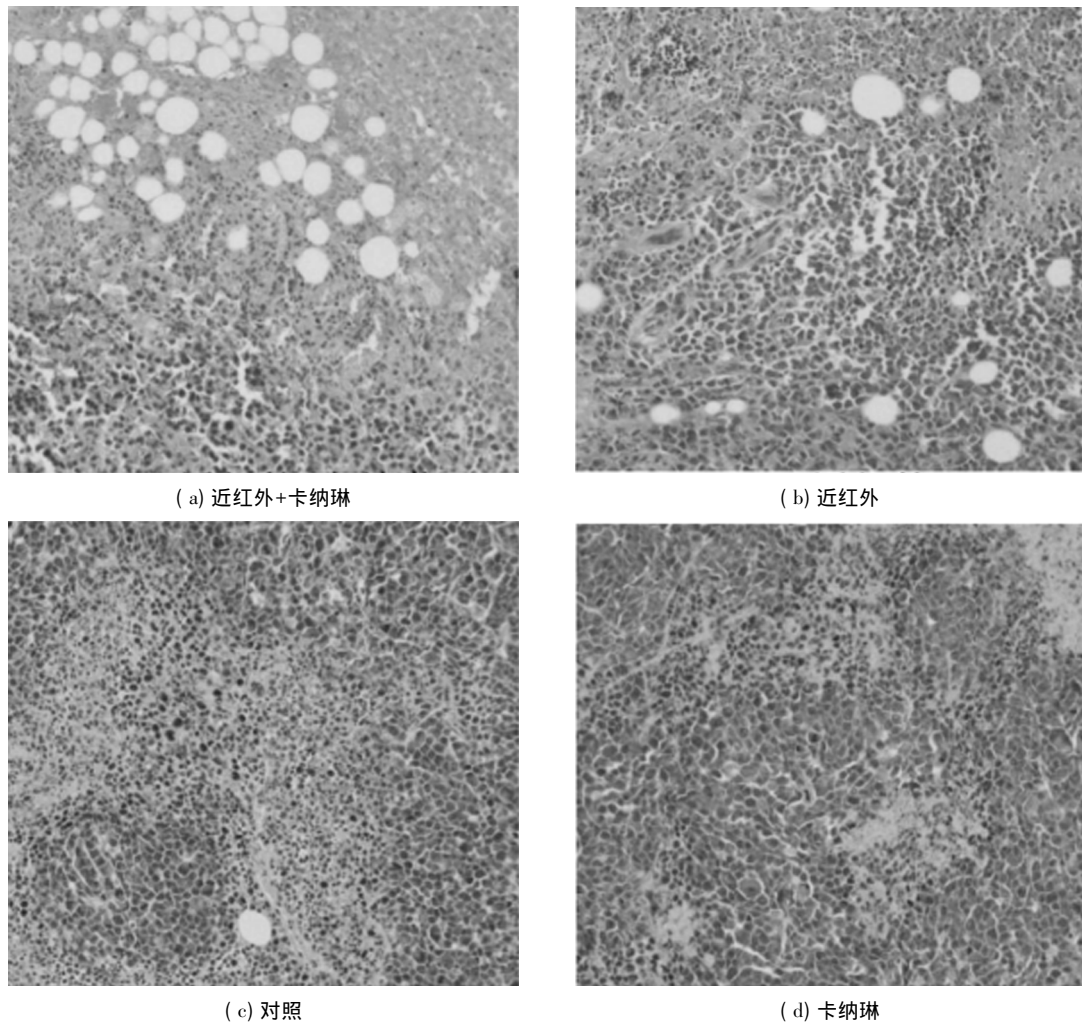


图 2 肿瘤组织病例切片图

Fig. 2 Tumor tissue case slice

3(b)) .

结痂证明了 CNSI 能够吸收光能并将其迅速转换为热能,达到局部升温的作用,从而杀死肿瘤细胞,而 CNSI 的示踪性将其分散于整个肿瘤,使得肿瘤被全方位治疗,肿瘤细胞死亡后形成结痂,然后逐渐脱落达到治疗的作用.

3 结论

研究表明恶性肿瘤比正常细胞更易受热刺激诱导细胞损伤和凋亡^[20].功能性纳米材料作为热疗的热能转换器备受广大研究者的关注^[14].

本研究选择的 CNSI 具有光稳定性、结构均一

以及良好的淋巴结示踪性,注射到组织内的 CNSI 不进入血管,可迅速进入淋巴管或被巨噬细胞吞噬后进入毛细淋巴管,滞留、聚集在淋巴结,使淋巴结黑染,因此 CNSI 能够有效聚集在肿瘤部位,其主要成分纳米炭是良好的吸热材料.

肿瘤部位注射 CNSI 后,在 NIR 为 0.8 W/cm^2 的条件下治疗小鼠肝癌模型,对各组的治疗效果进行统计,结果显示: CNSI+NIR(0.8 W/cm^2) 组具有显著的抗肿瘤效果,可以明显抑制肿瘤生长. CNSI 作为光吸收纳米材料,具有光稳定性强、近红外特征吸收等显著优点,可以有效地应用于肿瘤光热治疗方面.

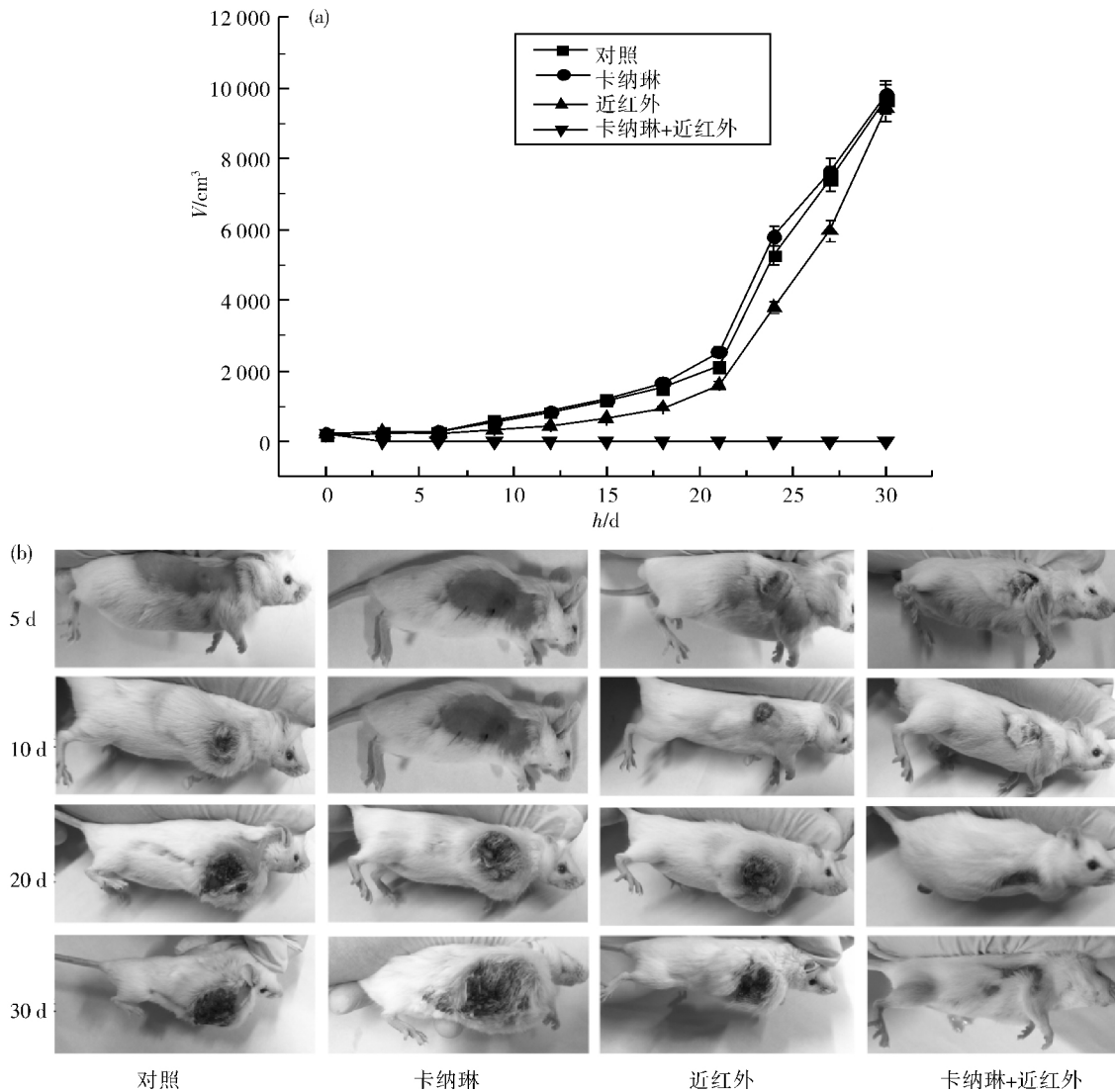


图3 CNSI 体内热疗示意图

Fig. 3 Schematic diagram of CNSI in vivo hyperthermia

参考文献

- [1] NICOLE H L, ERIC J M. Rapid photothermal intracellular drug delivery using multi-walled carbon nanotubes [J]. Molecular Pharmaceutics 2009 6(4): 1092-1099.
- [2] CORNEL I, LUCIAN M, CONSTANTIN B. Enhanced laser thermal ablation for the in vitro treatment of liver cancer by specific delivery of multi-walled carbon nanotubes functionalized with human serum albumin [J]. Int J Nanomedicine 2011 6: 129-141.
- [3] HO S J, WON H K, DONG K S. Nanographene oxide-hyaluronic acid conjugate for photothermal ablation therapy of skin cancer [J]. ACS 2014 8(1): 260-268.
- [4] ZHANG T, LAN R F, CHAN C F. In vivo selective cancer-tracking gadolinium eradicant as new-generation photodynamic therapy agent [J]. PNAS 2014 111(51): 5492-5497.
- [5] CHU M Q, PENG J L, ZHAO J J. Laser light triggered-activated carbon nanosystem for cancer therapy [J]. Biomaterials 2013, 34(7): 1820-1832.
- [6] HYE K M, SANG H L, HEE C C. In vivo near-infrared mediated tumor destruction by photothermal effect of carbon nanotubes [J]. ACS 2009 3(11): 3707-3713.
- [7] CHEN W R, ADAMS R L, BART K E. Photothermal effects on murine mammary tumors using indocyanine green and an 808-nm diode laser: an in vivo efficacy study [J]. Cancer Lett 1996 98(2): 169-173.

- [8] AYALAOROZCO C, URBAN C, KNIGHT M W, et al. Au nanomaterials as efficient near-infrared photothermal transducers for cancer treatment: benchmarking against nanoshells [J]. ACS 2014, 8(6): 6372-6381.
- [9] MENG L J, XIA W J, LIU L. Golden single-walled carbon nanotubes prepared using double layer polysaccharides bridge for photothermal therapy [J]. ACS 2014, 6(7): 4989-4996.
- [10] XU C, YANG D R, MEI L. Targeting chemophotothermal therapy of hepatoma by gold nanorods/graphene oxide core/shell nanocomposites [J]. ACS 2013, 5(23): 12911-12920.
- [11] WANG L, SHI J J, JIA X. NIR-/pH-responsive drug delivery of functionalized single-walled carbon nanotubes for potential application in cancer chemo-photothermal therapy [J]. Pharm Res 2013, 30(11): 2757-2771.
- [12] MARCHES R, MIKORYAK C, WANG R H. The importance of cellular internalization of antibody-targeted carbon nanotubes in the photothermal ablation of breast cancer cells [J]. Nanotechnology 2011, 22(9): 095101.
- [13] SHI X Z, GONG H, LI Y J, WANG C. Graphene-based magnetic plasmonic nanocomposite for dual bioimaging and photothermal therapy [J]. Biomaterials 2013, 34(20): 4786-4793.
- [14] CHENG L, WANG C, FENG L Z. Functional nanomaterials for phototherapies of cancer [J]. Chem Rev 2014, 114(21): 10869-10939.
- [15] 郑跃南, 刘文志, 柳仲林. 卡纳琳在结肠癌中清除淋巴结的应用 [J]. 临床研究 2015, 13(1): 128.
- [16] 瞿欢, 张亚男, 陈卫东. 纳米炭在乳腺癌前哨淋巴结示踪的实验研究 [J]. 中国普通外科杂志 2010, 19(5): 489-492.
- [17] 朱精强, 汪洵理, 魏涛, 等. 纳米炭甲状旁腺负显影辨认保护技术在甲状腺癌手术中的应用 [J]. 中国普外基础与临床杂志 2013, 20(9): 992-994.
- [18] 周毅, 李俊达, 林启谋, 等. 纳米炭提高化疗药物对乳腺癌淋巴结转移灶的作用 [J]. 岭南现代临床外科 2015, 15(5): 566-570.
- [19] 毕红, 余乐乐, 宋梦梦. 无载体纳米载体在靶向药物输送中的应用研究进展 [J]. 安徽大学学报(自科版) 2011, 35(3): 1-8.
- [20] KAMPINGA H H. Cell biological effects of hyperthermia alone or combined with radiation or drugs: a short introduction to newcomers in the field [J]. Int Hyperthermia 2006, 22(3): 191-196.

The Rapeutic Effect of Carbon Nanoparticle Suspension Injection for Liver Cancer Hyperthermia

ZENG Guangfu^{1, 2}, TANG Xiaohai^{1, 2}, HUANG Yuanfang², ZHANG Xuemei²

(1. College of Life Science, Sichuan Normal University, Chengdu 610101, Sichuan;

2. China Chongqing Lummy Pharmaceutical Co. Ltd, Chongqing 401336)

Abstract: To explore the effect of Carbon Nanoparticle Suspension Injection (CNSI) for hyperthermia of liver cancer model. To study the efficacy of CNSI's hyperthermia from in vitro and in vivo. For in vitro study, the control group was not treated, the CNSI group was added with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CNSI, the NIR group was irradiated three minutes one day with 1 W/cm^2 laser for three days, the experimental group (CNSI+NIR 0.2 W/cm^2 , CNSI+NIR 0.4 W/cm^2 , CNSI+NIR 0.6 W/cm^2 , CNSI+NIR 0.8 W/cm^2 , CNSI+NIR 1 W/cm^2) was added with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CNSI and was irradiated three days and 3 min a day. Finally, cells of each group was collected respectively and the inhibition rate of every group was calculated. For in vivo study, the control group was not treated, the CNSI group of the tumor was injected with 50 μL CNSI, the NIR group was irradiated three minutes one day with 0.8 W/cm^2 laser for three days, the CNSI+NIR group of the tumor was injected with 50 μL CNSI and was irradiated three minutes one day with 0.8 W/cm^2 laser for three days. The destroy effects, tumor growth, cells death between four groups were compared. The experimental group (CNSI+NIR 0.8 W/cm^2 , CNSI+NIR 1 W/cm^2) could destruct the tumors significantly inhibit tumor growth effectively in vitro. The CNSI+NIR (0.8 W/cm^2) group could destruct the tumors significantly inhibit tumor growth effectively and improve survival rate of mice in vivo. The NIR + CNSI group could significantly inhibit tumor growth effectively and had a significant effect for mouse model of liver cancer.

Keywords: liver cancer; CNSI; hyperthermia

(编辑 郑月蓉)