

温敏型壳聚糖介入核素¹⁸⁸Re 内 照射抗小鼠移植性肝癌(H₂₂)

董峰¹ 郭红云² 张永东² 梅澍¹

(1. 甘肃省肿瘤医院核医学科,兰州 730050; 2 甘肃省医学科学研究院药理毒理研究中心,兰州 730050)

【摘要】 目的 研究温敏型壳聚糖(chitosan CS)介入核素¹⁸⁸Re 内照射对小鼠移植性肝癌(H₂₂)的抑制作用。方法 建立小鼠肝癌(H₂₂)模型后随机分成7组,即模型对照组、¹⁸⁸Re(0.1mCi)组、¹⁸⁸Re-S(0.1mCi)组、¹⁸⁸Re + CS(0.1mCi)组、¹⁸⁸Re + CS(0.2mCi)组、¹⁸⁸Re + 硫胶体 + 壳聚糖(¹⁸⁸Re-S + CS 0.1mCi)组和¹⁸⁸Re-S + CS(0.2mCi)组。各组动物瘤内分别注射相应试药,测定肿瘤抑制率。结果 ¹⁸⁸Re + CS组和¹⁸⁸Re-S + CS组肿瘤生长速度减慢,肿瘤生长延迟,肿瘤抑制率在治疗后6d最高,抑制率分别为67.35%和67.81%。结论 温敏型壳聚糖介入核素¹⁸⁸Re 内照射对小鼠肝癌(H₂₂)具有一定的抑制作用。

【关键词】 ¹⁸⁸Re; 温敏型壳聚糖; 内照射; H₂₂; 抗肿瘤

【中图分类号】 R817.91 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)03-0014-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.03.004

Investigation of antitumor effect of internal Irradiation of Interventional Radionuclide ¹⁸⁸Re in Thermosensitive Chitosan on Mouse Transplanted Tumor H₂₂

DONG Feng¹, GUO Hong-yun², ZHANG Yong-dong², MEI Shu¹

(1. Department of Nuclear Medicine, Gansu Academy of Medical Sciences, Lanzhou 730050, China

2. China Pharmacology & Toxicology Experiment Center, Gansu Academy of Medical Sciences, Lanzhou 730050, China)

【Abstract】 Objectives To study the inhibitory activity of internal irradiation of interventional radionuclide ¹⁸⁸Re in thermosensitive chitosan on mouse transplanted tumor H₂₂ (liver cancer). **Method** The tumor-bearing mice were divided into 7 groups randomly, including model control, ¹⁸⁸Re (0.1mCi) group, ¹⁸⁸Re-S (0.1mCi) group, ¹⁸⁸Re + CS (0.1mCi) group, ¹⁸⁸Re + CS (0.2mCi) group, ¹⁸⁸Re-S + CS 0.1mCi and ¹⁸⁸Re-S + CS (0.2mCi) group. The mice tumor was injected with corresponding reagent respectively, and the inhibitory rate of tumor was observed after administrated. **Results** The growth of tumors in ¹⁸⁸Re + CS group and ¹⁸⁸Re-S + CS group was slowed. the tumor inhibitory rate reached the highest level after 6 days therapy, which respectively was 67.35% and 67.81%. **Conclusions** Internal irradiation of interventional radionuclide ¹⁸⁸Re in thermosensitive chitosan had the effect of inhibitory mice liver cancer.

【Key words】 ¹⁸⁸Re; Thermosensitive Chitosan; Internal irradiation; H₂₂; Antitumor

核医学可以利用某些放射性药物中标记核素的特殊物理性质,在对多种肿瘤及其转移病灶进行显像的同时实施内照射治疗,这一独特的肿瘤诊疗

方法在临床中已日益受到人们的重视。¹⁸⁸Re(铼, rhenium)是一种新型理想的治疗用放射性核素药物,半衰期为16.9h,能发射最大能量2.12MeV的

[基金项目] 2004年度《西部之光》资助项目;甘肃省科学事业项目(QS-041-C33-37)。

[作者简介] 董峰(1957-)男,主任医师,研究方向:肿瘤分子核医学。E-mail: donfeng@hotmail.com。

β 射线,其辐射作用一方面可直接引起生物大分子的损伤导致细胞凋亡,另一方面还可电离水分子,产生过氧化氢等氧自由基,间接加速细胞凋亡^[1-3]。应用¹⁸⁸Re 标记物进行肿瘤介入治疗,可以通过肿瘤供血动脉进行阻塞血管和核素内照射的双重作用达到治疗的目的。因而,¹⁸⁸Re 优良的理化性质在肿瘤的诊断和治疗领域倍受关注。如何提高放射性核素在肿瘤体内的滞留率,降低体内的分布是肿瘤核医学的重点研究课题之一。

智能水凝胶作为一种智能材料在生物化学和生物医学领域吸引了相当的关注,它能感应环境的变化同时本身会从收缩状态变为溶胀状态,具备了感应功能和受动功能^[4]。在智能水凝胶的系列中,壳聚糖作为温敏在体凝胶,在生物给药系统中的应用近年来日益受到药剂学研究者的重视。壳聚糖是甲壳素的脱乙酰衍生物,是一种生物相容的 pH 敏感型阳离子聚合物,在 pH6.2 以下能溶解于水, pH6.2 以上会形成凝胶^[5]。为防止肿瘤手术切除部位复发,Gariépy 等^[6]用壳聚糖作为载体,将疏水性抗癌药物紫杉醇进行局部输送,结果显示,对于抑制小鼠 EMT-6 癌细胞的生长,注射 1 次温敏性凝胶制剂与 4 次静脉注射商品注射剂 Taxol 产生的效果一样,且毒副作用更小。本课题利用医用智能水凝胶温敏型壳聚糖作为载体介入核素¹⁸⁸Re,置入肿瘤部位,在局部形成高活度放射性聚集区,起到靶向治疗肿瘤的效果,放射性衰变的同时作为载体的智能水凝胶温敏型壳聚糖在人体内定时降解,可减少全身用量,降低毒副作用。

1 材料和方法

1.1 试剂

硫酸铈(S)、放射性核素¹⁸⁸Re 由中国科学院上海应用物理研究院提供钨-铼发生器,¹⁸⁸Re-硫酸铈(¹⁸⁸Re-S)按照使用操作说明书由本院核医学制备。壳聚糖(CS):脱乙酰度为 95.9%,由浙江金壳生物化学有限公司生产。批号:20060214。 β -甘油磷酸钠(β -GP),Fluka 公司生产。盐酸:白银良友化学试剂有限公司生产,批号:051130。

1.2 仪器

GC-1200 γ 放免仪器,CRC-15R 放射性活度测量仪、202-2 电热干燥箱,JA-2003 型电子天平,PYX-DHS 隔水式电热恒温培养箱,SHZ-82 气浴恒温振荡器。

1.3 动物

昆明种小鼠,购自甘肃省医学科学研究院实验动物中心,体重 20 ± 2 g,雌雄兼有[SCXK(甘)2006-0010]。

1.4 瘤株

小鼠肝癌 H₂₂,由中国科学院北京药物研究所购买,本所药理毒理实验中心传代保种。

1.5 壳聚糖介入核素¹⁸⁸Re 凝胶的制备

将壳聚糖 800 mg 溶于 18 mL 0.2 mol/L 盐酸中充分搅拌。取所需放射性活度的¹⁸⁸Re 或¹⁸⁸Re-S 溶液与等体积壳聚糖溶液充分搅拌。称取 β -GP 1500 mg 溶于 2 mL 去离子水中充分溶解,将 β -GP 溶液滴加至所得壳聚糖溶液中,置 4℃ 冰箱中 15 min,备用。

1.6 肿瘤接种和分组及给药方法

无菌条件下抽取小鼠腹水瘤液,用生理盐水稀释成 1×10^7 / mL 的瘤细胞悬液,于每只小鼠右前肢皮下接种 0.2 mL。接种 7~8 d 时选瘤体生长良好、瘤体平均直径为 1.0~1.5 cm 的小鼠 70 只,随机分为 7 组,每组 10 只,分别为模型对照组 A 及¹⁸⁸Re (0.1mCi) B 组、¹⁸⁸Re-S (0.1mCi) C 组、¹⁸⁸Re + CS (0.1mCi) D 组(¹⁸⁸Re + 壳聚糖)、¹⁸⁸Re + CS (0.2mCi) E 组、¹⁸⁸Re-S + CS (0.1mCi) F 组(¹⁸⁸Re + 硫酸铈 + 壳聚糖)、¹⁸⁸Re-S + CS (0.2mCi) G 组。将 B、C 组小鼠瘤内中心分别注射 0.2 mL¹⁸⁸Re 或¹⁸⁸Re-S 溶液;D、E、F、G 组小鼠瘤内中心分别注射 0.2 mL 的壳聚糖介入核素¹⁸⁸Re 凝胶;模型组注射等容积生理盐水。

1.7 观察指标

给药后每隔 1 天用游标卡尺测量瘤长径和短径,计算肿瘤体积 = $0.5 \times$ 长径 \times 短径。肿瘤抑制率: (对照组肿瘤体积 - 治疗组肿瘤体积) / 对照组肿瘤体积 $\times 100\%$ 。当治疗后肿瘤体积与治疗前肿瘤体积为某一值时,治疗组所需天数与对照组所需天数的差值为肿瘤生长延迟 (tumour growth delay) 时间。本研究观察肿瘤体积达治疗前体积 5 倍和 8 倍时的延迟天数。对肿瘤生长曲线进行拟合后,求出肿瘤体积达到治疗前体积的 5 倍和 8 倍时所需的生长时间,治疗组与对照组生长时间的差值为肿瘤生长延迟时间。分别于给药后 7 d、14 d 取各组动物肿瘤用 2% 戊二醛固定,树脂包埋,超薄切片,柠檬酸铅染色,电子显微镜观察。用 8% 甲醛中固定,常规制片,进行病理组织学检查。

1.8 所有实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用 SPSS 10.0 统计学软件进行数据统计, 多组均数比较用单因素方差分析。P < 0.05 有统计学意义。

2 结果

2.1 壳聚糖介入核素¹⁸⁸Re 对 H₂₂ 肿瘤生长的延迟效应

表 1 可见, 各治疗组治疗后肿瘤体积达到治疗前 5 倍, 较模型组均可使肿瘤生长延迟, 其中¹⁸⁸Re + CS(0.1mCi) 组和¹⁸⁸Re + CS(0.2mCi) 组分别为 3.03 d 和 3.13 d; ¹⁸⁸Re-S + CS(0.1mCi) 组和¹⁸⁸Re-S + CS(0.2mCi) 组分别为 3.08 d 和 3.31 d, 单用¹⁸⁸Re 和¹⁸⁸Re-S 组肿瘤生长延迟较短, 分别为 1.09 d 和 1.57 d。各治疗组治疗后肿瘤体积达到治疗前 8 倍时, 肿瘤生长延迟分别为: ¹⁸⁸Re + CS(0.1mCi) 组和¹⁸⁸Re + CS(0.2mCi) 组为 2.08 d 和 2.20 d; ¹⁸⁸Re-S + CS(0.1mCi) 组和¹⁸⁸Re-S + CS(0.2mCi) 组为 2.26 d 和 2.73 d, 单用¹⁸⁸Re 和¹⁸⁸Re-S 组肿瘤生长延迟较短, 分别为 0.73 d 和 1.06 d。

表 1 壳聚糖介入核素¹⁸⁸Re 治疗 H₂₂ 肝癌后各组肿瘤生长延迟时间 (d)

Tab.1 The delay time of tumor growth after therapy of interventional radionuclide ¹⁸⁸Re in thermosensitive chitosan on H₂₂ cancer (d)

放射性活度 Radionuclide dose (mCi)	肿瘤体积达治疗前 5 倍 2.256cm ³ The tumor volume reached 5 times of the original volume (2.256cm ³)		肿瘤体积达治疗前 8 倍 4.511cm ³ The tumor volume reached 8 times of the original volume (4.511 cm ³)	
	Growth time 生长时间	Prolonged growth time 生长延迟时间	Growth time 生长时间	Prolonged growth time 生长延迟时间
对照组 Control group	3.30	-	5.35	-
模型组 Model group				
¹⁸⁸ Re(0.1 mCi)	4.51	1.09	6.08	0.73
¹⁸⁸ Re + CS(0.1 mCi)	6.45	3.03	7.43	2.08
¹⁸⁸ Re + CS (0.2 mCi)	6.55	3.13	7.55	2.20
¹⁸⁸ Re-S(0.1 mCi)	4.99	1.57	6.41	1.06
¹⁸⁸ Re-S + CS(0.1 mCi)	6.50	3.05	7.61	2.26
¹⁸⁸ Re-S + CS(0.2 mCi)	6.73	3.31	8.08	2.73

2.2 壳聚糖介入核素¹⁸⁸Re 对 H₂₂ 肿瘤生长的抑制作用

给药 9 d 后各组动物因有死亡, 肿瘤体积不能进行统计。模型组瘤体积起始为 (0.453 ± 0.064)

cm³, 给药 2 d、4 d、6 d、8 d 分别为 (1.045 ± 0.322) cm³、(2.818 ± 0.898) cm³、(4.704 ± 1.036) cm³, 而¹⁸⁸Re, ¹⁸⁸Re + CS 小剂量组, ¹⁸⁸Re + CS 大剂量组, ¹⁸⁸Re-S, ¹⁸⁸Re-S + CS 小剂量组, ¹⁸⁸Re-S + CS 大剂量组各给药组肿瘤体积在 2 d 分别为 (0.633 ± 0.102) ~ (0.882 ± 0.178) cm³ 之间, 4 d 分别为 (1.172 ± 0.461) ~ (1.842 ± 0.386) cm³ 之间, 6 d 分别为 (1.514 ± 0.634) ~ 3.537 ± 1.935) cm³ 之间; 8 d 分别为 (3.500 ± 0.857) ~ 6.892 ± 2.820) cm³ 之间, 各组 2 d、4 d、6 d、8 d 肿瘤抑制率见表 2:

表 2 壳聚糖介入核素¹⁸⁸Re 对 H₂₂ 肿瘤生长的抑制率
Tab.2 The tumor inhibitory rate of interventional radionuclide ¹⁸⁸Re in thermosensitive chitosan on H22 cancer

分组及核素剂量 Group and radionuclide dose	肿瘤生长抑制率 (%) The tumor inhibitory rate (%)				
	2 d	4 d	6 d	8 d	
¹⁸⁸ Re	0.1 mCi	15.60	34.63	24.81	20.98
¹⁸⁸ Re + CS	0.1 mCi	31.96	55.61	64.71	49.23
¹⁸⁸ Re + CS	0.2 mCi	34.55	57.77	67.35	51.90
¹⁸⁸ Re + S	0.1 mCi	23.06	42.80	35.74	28.47
¹⁸⁸ Re + S + CS	0.1 mCi	34.35	58.34	66.18	52.58
¹⁸⁸ Re + S + CS	0.2 mCi	39.43	58.41	67.81	59.87

壳聚糖介入¹⁸⁸Re 或¹⁸⁸Re-S 组瘤体积与模型组比较有统计学意义 (P < 0.05); ¹⁸⁸Re + CS 大、小剂量组瘤体积与¹⁸⁸Re 组比较有统计学意义 (P < 0.05); ¹⁸⁸Re-S + CS 大、小剂量组瘤体积与¹⁸⁸Re-S 组比较, 也有统计学意义 (P < 0.05)。表明¹⁸⁸Re 壳聚糖药物载体凝胶对动物移植性肿瘤肝癌 H₂₂ 具有明显的抑制作用。

2.3 HE 染色后光镜观察

模型组: 瘤细胞生长旺盛, 细胞体积, 核染色深大小不一, 病理核分裂相较多, 脂肪和横纹肌组织内有很多浸润生长的肿瘤细胞。肿瘤内新生微血管丰富 (彩插 2 图 1~2)。

治疗组: 瘤组织生长局限, 瘤细胞体积变小, 瘤细胞排列规则, 生长稀疏, 微血管较少, 坏死区由瘤组织外周向中心渐进。其内见脂肪组织, 瘤细胞巢及巢间有坏死, 间质内和瘤周有较多淋巴细胞。瘤周和间质内有许多淋巴细胞浸润 (彩插 2 图 3~4)。

2.4 电镜观察

给予放射性核素¹⁸⁸Re-S + CS 小剂量组通过电镜扫描结果均可见肿瘤组织细胞凋亡小体, 见核染色质固缩凝集, 形成高电子密度的斑块, 呈新月形积聚在核膜周边 (彩插 2 图 5~6)。

3 讨论

本实验通过医用高分子材料-壳聚糖介入放射性核素¹⁸⁸Re 在肿瘤局部注射,以达到提高核素在肿瘤病灶内局部有效滞留之目的。¹⁸⁸Re 是近年来推出的新的用于肿瘤治疗放射性核素药物,其半衰期为 16.9 h,通过 β 衰变到稳定的¹⁸⁸Os,分别以 79% 和 20% 的几率发射最大能量为 2.12 MeV 和 1.97 MeV 的 β 射线^[7]。¹⁸⁸Re-硫化铼胶体 (sulphur colloid) 最早被用于关节增生滑膜的切除治疗。实验证实,肿瘤内注射大颗粒放射性物质可直接并最大限度地对靶器官产生电离辐射,减少对正常组织的辐射^[8]。温敏型壳聚糖是一种聚阳离子的生物二聚体,主要通过几丁质脱乙酰基获得。而几丁质则主要来自虾、蟹的外壳^[9]。在室温和低于室温时可长期保持液体状态,具有很高的流动性。注入体内后,在体温下发生凝胶化,具有良好的组织相容性、生物可降解性和黏附性,可使药物驻留于病灶,随着凝胶的降解而缓慢释放,很适合在医学、生物学领域得到了深入的研究和广泛的应用^[10]。

本研究结果表明:¹⁸⁸Re 及其壳聚糖药物载体凝胶对动物移植性肿瘤肝癌 H₂₂ 均具有一定的抑制作用。壳聚糖介入核素¹⁸⁸Re 或¹⁸⁸Re-S 作用较单用¹⁸⁸Re 或¹⁸⁸Re-S 作用显著,表明糖介入核素¹⁸⁸Re 或¹⁸⁸Re-S,当注射至肿瘤内后,即在短时间内发生凝胶化,使¹⁸⁸Re 固定在肿瘤内部,直接作用于肿瘤细胞,增强了抗肿瘤效果。其中¹⁸⁸Re-S + CS 大剂量组抑制率最高,抑制率达 67.81%。¹⁸⁸Re 壳聚糖药物载体凝胶瘤内注射后,观察肿瘤的治疗效应。在处理后的 8 d 内,各治疗组肿瘤生长速度减慢,肿瘤生长延迟,肿瘤抑制率在治疗后 6 d 最高,8 d 时肿瘤生长速度加快,提示核素治疗的次数还应增加。

以放射免疫治疗 (RIT) 为代表放射性核素内照射治疗肿瘤的研究是近年来关注热点,国内外学者研究表明,大剂量的 RIT 实体瘤疗效并不理想,将 RIT 用于小病灶实体瘤或实体瘤的微小转移灶^[11]。

多次小剂量给药能增加肿瘤部位放射性摄取、机体的免疫兴奋效应,诱导肿瘤凋亡与老化^[12]。¹⁸⁸Re 壳聚糖药物载体凝胶能够延长荷 H₂₂ 肿瘤小鼠生存时间,提高生命延长率。其中小剂量组¹⁸⁸Re + CS 小鼠生存时间最长,为 33.4 ± 11.4 d,生命延长率达 108.00%。关于低剂量核素内照射治疗的机体免疫兴奋效应的作用和机理有待于进一步的探索研究。

参考文献:

- [1] 于俊峰,尹瑞沚,闵小峰,等.可能的肿瘤治疗剂——¹⁸⁸Re-硫化铼混悬液初步研究[J].同位素,1999,12(2):74-77.
- [2] 尹瑞沚,闵小峰,汪勇先.¹⁸⁸Re-一个有希望的治疗用放射性核素[J].核技术,2000,23(5):347-352.
- [3] 赵燕凌,陈跃.¹⁸⁸Re 标记放射性药物研究进展[J].医学综述,2006,12(14):879-881.
- [4] 郭锦棠,李雄勇,李伶.水凝胶及其在药物控释体系上的应用[J].化学通报,2004,3:198-199.
- [5] 胡雄林,周建平.温敏在体凝胶给药系统的研究与应用[J].药学研究,2005,29(12):538-539.
- [6] Gariépy ER, Shive M, Bichara A, et al. A thermosensitive chitosan based hydrogel for the local delivery of paclitaxel [J]. *Eur J Pharm Biopharm* 2004, 57(1):53-63.
- [7] Knapp F Jr. Rhenium-188 a generator-derived radioisotope for cancer therapy [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 1998, 13(5):337-349.
- [8] 孙逊.¹⁸⁸Re 在肿瘤治疗中的应用[J].放射医学核医学分册,国外医学,2003,27(4):151-153.
- [9] Mnzarelli R. Chitosan [M]. In: Mnzarelli R. *Natural Chelating Polymers*. Oxford: Pergamon Press, 1973:144-176.
- [10] 井波,王志强.温敏性壳聚糖水凝胶研究进展[J].国际骨科学杂志,2006,27(3):115-116.
- [11] Wong JYC, Chu DJ, Yamauchi D, et al. Dose escalation trial of indium-111 labeled anti-CEA antigenchimeric monoclonal antibody chimeric T84, 66 in presurgical colorectal cancer patients [J]. *Nucl Med*, 1998, 39:2097-2014.
- [12] 丁勇,田嘉禾,杨武威,等.多次小剂量¹⁸⁸Re-CL58 放射免疫治疗的临床研究[J].同位素,2003,16(1):1-5.

修回日期)2010-08-04



图 1 Swivel 旋转轴装 1 置

Fig. 1 Swive axis of rotation device

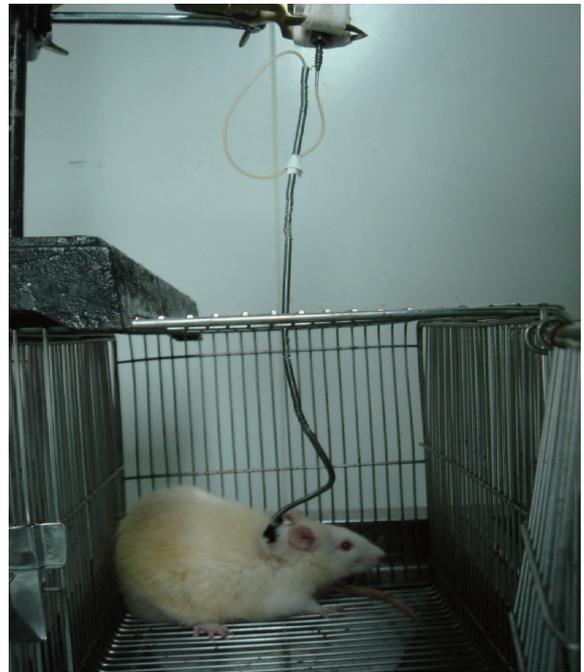


图 2 肠内营养

Fig. 2 Enteral nutrition

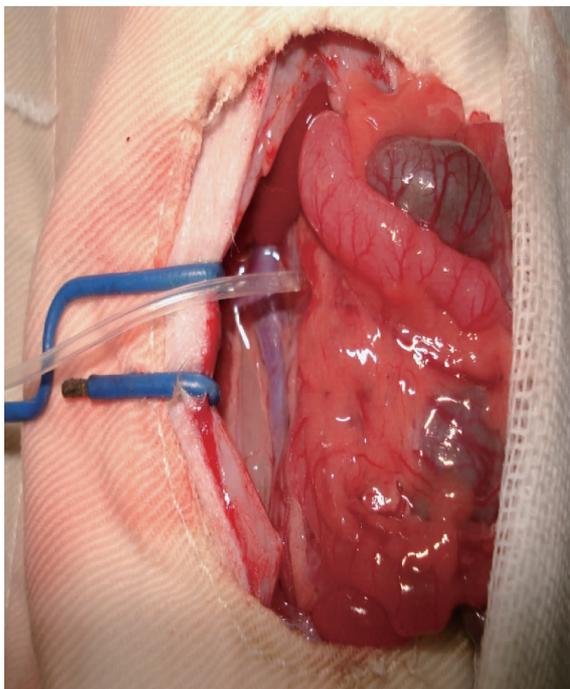


图 3 淋巴引流

Fig. 3 Lymphatic drainage



图 4 淋巴引流

Fig. 4 Lymphatic drainage