

10 天较术前、术后第 3 天升高 ($P < 0.05$), 食管癌组 NK 水平低于对照组 ($P < 0.05$), 但 NK 水平与肿瘤 TNM 分期无明显相关性 ($P > 0.05$), 可能与 NK 在外周血淋巴细胞中所占比例小, 且肿瘤中后期以 T 细胞免疫为主有关^[9,10]。故 NK 不能作为预测肿瘤分期的指标, 但其在手术前后变化有明显差异, 说明 NK 与荷瘤状态密切相关, 可以作为评估患者免疫功能状态的指标之一。

综上所述, 本研究动态探索了食管癌患者术前到术后的免疫功能变化, 分析了影响免疫功能的相关因素, 结果表明: 食管癌患者免疫功能受到抑制, 食管癌术后生存率持续较低, 可能与机体癌基因激活, 多种原因导致免疫功能再次抑制有关。手术解除肿瘤负荷后患者免疫状态改善; T 淋巴细胞亚群可能与食管肿瘤进展程度有关; T 淋巴细胞亚群、NK 在食管癌患者免疫监测中具有一定价值, 可为食管癌免疫治疗提供依据。本研究尚不能确定食管癌术后长期免疫状态是否能恢复到正常水平, 需要长期随访以及扩大样本量开展进一步研究。

参考文献

1 Carotenuto P, Artsen A, Osterhaus AD, *et al.* Reciprocal changes of naïve and effector/memory CD8⁺ T lymphocytes in chronic hepatitis B virus infection[J]. *Viral Immunol*, 2011, 24(1): 27-33

2 Zou T, Satake A, Corbo - Rodgers E, *et al.* Cuttingedge: IL - 2 signals determine the degree of TCR signaling necessary to support regulatory T cell proliferation in vivo [J]. *Immunology*, 2012, 189 (1): 28 - 32

3 邵传森. 医学免疫学[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2003: 7

4 Thomas LJ, He LZ, Marsh H, *et al.* Targeting human CD27 with an agonist antibody stimulates T - cell activation and antitumor immunity [J]. *Oncoimmunology*, 2014, 3(1): 2725 - 2736

5 Andaluz - Ojeda D, Iglesias V, Bobillo F, *et al.* Early levels in blood of immunoglobulin M and natural killer cells predict outcome in non-septic critically ill patients [J]. *Crit Care*, 2013, 28(6): 1107 - 1110

6 张治, 张伟, 许林, 等. 食管癌、贲门癌患者 T 淋巴细胞亚群水平及临床意义[J]. *江苏医药*, 2007, 33(3): 231 - 232

7 Szczesny T, Slotwinski R, Szczesny G. Changes in humoral and cellular immunity in patients operated on due to esophageal cancer [J]. *Pol Merkur Lekarski*, 2005, 18 (106): 478 - 482

8 Iliopoulou EG, Kountourakis P, Karamouzis MV, *et al.* A phase I trial of adoptive transfer of allogeneic natural killer cells in patients with advanced non - small cell lung cancer [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2010, 59(12): 1781 - 1789

9 Fu B, Tian Z, Wei H. Subsets of human natural killer cells and their regulatory effects [J]. *Immunology*, 2013, 5: 1012 - 1021

10 Kerker SP, Muranski P, Kaiser A, *et al.* Tumor - specific CD8⁺ T cells expressing interleukin - 12 eradicate established cancers in lymphodepleted hosts [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(17): 6725 - 6734

(收稿日期: 2015 - 04 - 08)

(修回日期: 2016 - 10 - 25)

靶向壳聚糖新型纳米药物体外抗胰腺癌细胞的实验研究

俞海波 陈海川 王哲近 麻忠武 肖竣 贺亚东

摘要 **目的** 合成靶向表皮生长因子受体 (EGFR) 壳聚糖吉西他滨纳米粒, 研究其在体外胰腺癌细胞的靶向性及对细胞增殖的影响。**方法** 采用壳聚糖制备 EGFR - 吉西他滨 - 壳聚糖纳米粒 (G - GC - Dox)、吉西他滨 - 壳聚糖纳米粒 (GC - Dox)。在体外实验研究中将药物作用于 EGFR + 胰腺癌细胞系 SW1990 细胞, 研究胰腺癌细胞体外摄取实验, 并采用四甲基偶氮唑蓝法 (MTT) 法观察该体系对胰腺癌 SW1990 细胞生长增殖的影响。**结果** EGFR - 吉西他滨 - 壳聚糖纳米粒组体外 SW1990 胰腺癌细胞平均摄取纳米药物的量明显强于同一时间点吉西他滨 - 壳聚糖纳米粒组平均摄取纳米药物的量。G - GC - Dox 组处理 12、24、48h 后细胞存活率 (43.14% ± 2.51%、31.21% ± 2.37%、18.26% ± 2.75%) 对比 GC - Dox 组 (64.22% ± 3.11%、45.43% ± 3.04%、35.23% ± 3.15%) 对肿瘤细胞具有更好的抑制作用 ($P < 0.05$)。**结论** 本实验成功研制了靶向 EGFR 壳聚糖吉西他滨纳米粒, 并证实了该纳米粒能提高药物在体外胰腺癌细胞的靶向性, 同时对胰腺癌 SW1990 细胞增殖具有明显抑制作用, 可能为

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划项目 (2013KYB248); 浙江省温州市医药卫生科研项目 (2016A02); 浙江省温州市公益性科技计划项目 (Y20160527)

作者单位: 325000 温州市中心医院肝胆外科

通讯作者: 俞海波, 副主任医师, 电子信箱: zjuboby@163.com

将来靶向治疗胰腺癌提供新的研究思路。

关键词 胰腺肿瘤 增殖 吉西他滨 壳聚糖

中图分类号 R3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.06.022

Experimental Study on Anti-pancreatic Cancer Cells Treated with Chitosan Targeted Nano Drugs. Yu Haibo, Chen Haichuan, Wang Zhejin, et al. Department of Hepatobiliary Surgery, Wenzhou Central Hospital, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective Synthesis of epidermal growth factor receptor (EGFR) gemcitabine chitosan nanoparticles. To study the targeting effect of pancreatic cancer cells in vitro and cell proliferation. **Methods** EGFR-gemcitabine-chitosan nanoparticles (G-GC-Dox) and gemcitabine-chitosan nanoparticles (GC-Dox) were prepared by emulsion polymerization method. In vitro immunofluorescence was used to study the intake test of EGFR⁺ carried SW1990 cells in G-GC-Dox and GC-Dox. Their ability to inhibit the proliferation of SW1990 cell lines by methylthiazolyl tetrazolium (MTT) were also tested. **Results** Compared to GC-Dox, G-GC-Dox had a better drug concentration in SW1990 cell. The survival rates of SW1990 cells were (43.14% ± 2.51%, 31.21% ± 2.37%, 18.26% ± 2.75%) when treated with G-GC-Dox after 12h, 24h, 48h, the survival rate of SW1990 cells were (64.22% ± 3.11%, 45.43% ± 3.04%, 35.23% ± 3.15%) when treated with GC-Dox. The differences had statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion** G-GC-Dox was successfully developed. The nanoparticles could improve drug targeting of pancreatic cancer cells in vitro and enhance the antitumor of pancreatic cancer. In future, it May provide a new train of thought for the treatment of pancreatic cancer.

Key words Pancreatic neoplasms; Proliferation; Gemcitabine; Chitosan

胰腺癌由于恶性程度高,预后差,在临床上存在较大的困难,研究表明其手术切除率 < 20%,术后5年生存率仅为 15% ~ 20%^[1-3]。大部分的胰腺癌患者由于发现时处于中后期,治疗以化疗为主。但是当前应用于临床的化疗药物,对胰腺癌效果普遍不佳,且对正常的组织产生严重的毒性不良反应。因此目前研制新型的靶向型药物已成为基础研究的一个热点,本实验通过研制新型的靶向型表皮生长因子受体(EGFR)壳聚糖吉西他滨纳米药物,探讨其体外对胰腺癌 SW1990 细胞的靶向治疗作用,为以后新型靶向纳米药物在胰腺癌治疗中应用奠定一定的基础。

材料与方 法

1. 材料:(1)主要试剂:吉西他滨(美国礼来公司)、噻唑蓝(MTT)、胎牛血清、二甲基亚砷(DMSO)(美国Sigma公司)、N-羟基琥珀酰亚胺乙二醇壳聚糖、透析膜、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺、抗壳聚糖抗体(Santa Cruz公司,上海起发生物有限公司)与抗EGFR抗体(美国Hyclone公司)、细胞培养基(美国Hyclone公司)。(2)实验仪器:超净工作台(VS-1300)、低温高速离心机(Beckman GS-15R)、聚焦显微镜(日本Olympus公司)、酶标仪、酶联免疫检测仪(美国Bio-tek公司)、自动温控细胞培养箱(Thermo Scientific Form)、细胞计数板(上海医用仪器厂)。(3)实验细胞:所需细胞系为人胰腺癌细胞系SW1990(中国科学院上海细胞生物研究所细胞库),在RPMI 1640培养液中进行常规培养,同时置于湿度为95%、温度为37℃的恒温培养箱中

培养,一般每2天传代1次,培养完成的人胰腺癌细胞系SW1990用于体外胰腺癌细胞摄取及体外胰腺癌细胞的抑制实验。

2. 方法:(1)乙二醇壳聚糖纳米粒的制备:取乙二醇壳聚糖溶于蒸馏水中,进行充分的搅拌,时间约为3h,用功率为60W的超声处理器对溶于蒸馏水的乙二醇壳聚糖进行短暂超声,时间约为2min,超声脉冲的形式:开5s,关1s,处理5次总共约10min。纳米粒子悬浮液的制备,加入不同浓度的三聚磷酸钠水溶液,量约10ml,观察到明显的乳光,维持反应时间约30min即可完成^[4]。(2)吉西他滨包埋的壳聚糖纳米粒制备(GC-Dox):①顺式乌头酰基的合成:首先用乌头酸酐合成乌头酸酐溶液,再用顺式乌头酰基溶于吡啶中,进行充分搅拌后过夜。制成1%乙二醇壳聚糖溶液,用甲醇稀释。最后将顺式乌头酰基溶液加入乙二醇壳聚糖溶液中,进行搅拌,切勿快速的搅拌,均匀后等待过夜,产物需隔日用透析膜进行透析(截留分子质量为12kDa),最后冷冻后进行干燥保存,以备。②抗EGFR吉西他滨包埋的壳聚糖纳米粒制备(G-GC-Dox):冷冻干燥保存的GC-Dox纳米粒,溶于蒸馏水中,将抗EGFR抗体与抗壳聚糖抗体结合后,制成抗EGFR吉西他滨包埋的壳聚糖纳米粒(G-GC-Dox)。(4)胰腺癌SW1990细胞体外摄取实验:将G-GC-Dox组作为实验组,而相应的GC-Dox组作为对照组。选用胰腺癌SW1990细胞(EGFR⁺)作为实验细胞株,将细胞培养后备用。分别将相应的药物添加进培养板,分别于1、4、12h进行免疫

荧光观测,记录强度并进行相应时段图片采集,并进一步进行对比分析。(5) MTT 检测细胞增殖的影响:实验分组:GC - Dox 组,G - GC - Dox 组。MTT 法检测操作步骤:①计数调整不同方式处理的细胞,将浓度调整至 $1 \times 10^5/\text{ml}$;②分别将实验细胞接种于 96 孔板中,每孔量约 $100\mu\text{l}$,每组设 3 个复孔用于实验;③将接种有实验细胞的 96 孔板移入培养箱 (37°C , $5\% \text{CO}_2$) 进行培养;④培养 12h,向每孔加入 $20\mu\text{l}$ MTT ($5\text{mg}/\text{ml}$) 溶液,在培养箱内进行孵育 6h;⑤培养完成后,去除孔内培养液;⑥加入二甲基亚砜,溶解后测量吸光度值;⑦同时需设置好调零孔及对照孔,每组设 6 个复孔。

进行相关细胞存活率的计算,计算公式:细胞存活率 (%) = (G - GC - Dox 组值 - GC - Dox 组值) ÷ (G - GC - Dox 组值 - GC - Dox 组值) × 100%。

3. 统计学方法:采用统计软件 SPSS 17.0 进行统

计学分析。连续性数据变量用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两独立样本均数比较分别采用 t 检验,计数资料的比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 胰腺癌 SW1990 细胞体外摄取实验,胰腺癌 SW1990 细胞纳米粒平均摄取量测定:实验在免疫荧光实验显微镜下进行观察,结果显示 G - GC - Dox 组胰腺癌 SW1990 细胞摄取纳米粒的量随着时间的增加而增多。对比 GC - Dox 组,G - GC - Dox 组明显强于同一时间点胰腺癌 SW1990 细胞对纳米粒摄取量 (图 1)。使用 IPP6.0 图片处理软件对图 1 的图片进行平均吸光度测定及分析,实验分析的结果表明:G - GC - Dox 组 SW1990 胰腺癌细胞摄取平均纳米粒药物的量明显强于同一时间点 GC - Dox 组摄取纳米粒的量 (图 2)。

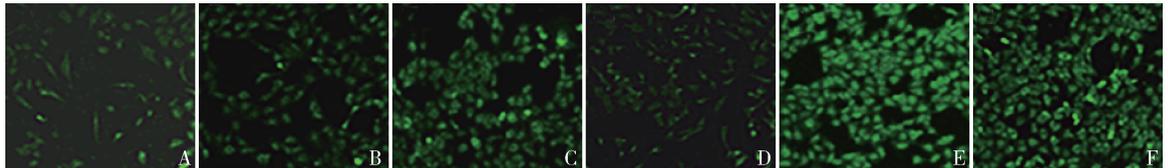


图 1 胰腺癌 SW1990 细胞不同时间体外摄取实验荧光图

A. 摄取 GC - Dox 荧光图 (1h); B. 摄取 GC - Dox 荧光图 (4h); C. 摄取 GC - Dox 荧光图 (12h); D. 摄取 G - GC - Dox 免疫荧光图 (1h); E. 摄取 G - GC - Dox 荧光图 (4h); F. 摄取 G - GC - Dox 荧光图 (12h)

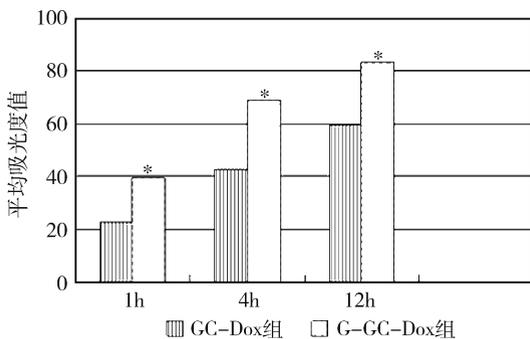


图 2 G - GC - Dox 组与 GC - Dox 组细胞的平均纳米药物摄取量

与 GC - Dox 组比较, * $P < 0.05$

2. MTT 检测对细胞的增殖影响:对照组的细胞存活率为 100%, 对照组与 GC - Dox 组以及 G - GC - Dox 组比较 (表 1)。检测结果显示,GC - Dox 组和 G - GC - Dox 组处理 12、24、48h 后,对细胞的增殖具有抑制作用,且 G - GC - Dox 组 ($43.14\% \pm 2.51\%$ 、 $31.21\% \pm 2.37\%$ 、 $18.26\% \pm 2.75\%$) 对比 GC - Dox 组 ($64.22\% \pm 3.11\%$ 、 $45.43\% \pm 3.04\%$ 、

$35.23\% \pm 3.15\%$) 对肿瘤细胞具有更好的抑制作用 ($P < 0.05$, 表 1), 而且随着时间的延长,纳米粒对胰腺癌 SW1990 细胞增殖的抑制作用亦是依次增加。从以上结果可以表明,G - GC - Dox 组相对于 GC - Dox 组以及对照组对人胰腺癌 SW1990 细胞增殖具有更好的抑制作用,并且这种抑制作用跟时间有相关性。

表 1 不同时间对照组,GC - Dox 组,G - GC - Dox 组细胞存活率对比 (%)

组别	12h	24h	48h
对照组	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
GC - Dox 组	64.22 ± 3.11	45.43 ± 3.04	35.23 ± 3.15
G - GC - Dox 组	43.14 ± 2.51*	31.21 ± 2.37*	18.26 ± 2.75*

与 GC - Dox 组比较, * $P < 0.05$

讨 论

吉西他滨的结构是一种嘧啶类似物,它的活性代谢产物主要为三磷酸双氟胞苷和二磷酸,目前研究已表明其具有抑制细胞 DNA 的合成,达到杀伤肿瘤的

目的,是胰腺癌一线的化疗药物^[5-7]。但与此同时,因吉西他滨缺乏药物靶向性和特异性,在治疗杀死肿瘤细胞的同时,对正常的细胞也产生严重的毒性不良反应,因此笔者设计研制一种新型抗体联合体技术,将抗纳米药物抗体与抗胰腺癌抗体做成双抗体联合体,靶向作用于胰腺癌肿瘤细胞,以增加药物的抗肿瘤性能,减轻药物对正常组织的不良反应。

壳聚糖作为一种天然生物降解的高分子阳离子聚合物材料,近年来广泛应用于生物医学领域及临床医学、药学领域,作为药物、基因载体的重要材料之一,它在药物控制性释放、基因靶向药物研制等方面应用广泛,目前是药物领域研究的热点之一^[8-11]。本实验研究选择以壳聚糖为基质,利用膜透析技术,将抗壳聚糖抗体与抗 EGFR 抗体做成抗体联合体,通过抗原抗体特异性结合,将壳聚糖负载吉西他滨纳米微球靶向输送至胰腺癌细胞。

本实验的结果验证了笔者的预期,实验的成功与胰腺癌的靶点选择密切相关。本研究选择的靶点是 EGFR 蛋白,EGFR 蛋白作为 ErbB 家族成员之一,具有酪氨酸激酶活性,可以与相应的配体结合,进而启动胞内信号转导,激活下游多种信号转导途径,产生相应的生物效应,目前 EGFR 蛋白已经被证实是细胞存活、凋亡的重要影响因子^[12]。已有的文献研究表明,EGFR 蛋白在许多肿瘤中呈现阳性表达,如肺癌、胰腺癌、结直肠癌、子宫内膜癌、头面部肿瘤、胃癌等,并且与肿瘤的临床分期、病理分级、肿瘤直径、年龄及预后相关^[13-15]。在胰腺癌中,目前的研究表明,EGFR 蛋白的表达率约为 60%^[16]。因此本实验中笔者把 EGFR 蛋白作为胰腺癌治疗的 1 个特殊靶点,研究证实了通过将抗 EGFR 抗体与 EGFR 蛋白进行相应的结合,可以显著提高纳米粒抗胰腺癌细胞的有效性和特异性。同时,实验的研究结果也表明,由于靶向性药物的靶向治疗作用,因此其药物对于抗胰腺癌细胞的作用要明显优于非靶向性药物。但实验同时也存在的不足,胰腺癌靶向因子还有 HER-2、CA199 等,需要进一步研究不同靶向药物的靶向性强弱,为后续选择最优的靶向药物提供依据。

综上所述,笔者所使用的抗 EGFR 壳聚糖靶向纳米药物不仅制备过程简单,而且具有较强的特异性靶向作用及体外抗胰腺癌肿瘤的作用。它的这些特性可能对将来胰腺癌的靶向治疗提供了一个新的发展方向。今后笔者将继续进行纳米粒药物的体内研究,开展相关的裸鼠负瘤实验。

参考文献

- 1 Nakata B, Amano R, Kimura K, *et al.* Comparison of prognosis between patients of pancreatic head cancer with and without obstructive jaundice at diagnosis [J]. *Int J Surg*,2013, 11(4):344-349
- 2 Kato K,Yamada S,Sugimoto H, *et al.* Prognostic factors for survival after extended pancreatectomy for pancreatic head cancer: influence of resection margin status on survival [J]. *Pancreas*, 2009, 38(6):605-612
- 3 金克敏,王立军,刘伟,等. 转移淋巴结数目对胰腺癌患者预后的意义[J]. *中华普通外科杂志*,2016, 31(1):17-22
- 4 Park JH,Kwon S,Lee M, *et al.* Self-assembled nanoparticles based on glycol chitosan bearing hydrophobic moieties as carriers for doxorubicin: In vivo biodistribution and anti-tumor activity[J]. *Biomaterials*, 2006, 27(1):119-126
- 5 Shewach DS, Lawrence TS. Antimetabolite radiosensitizers[J]. *J Clin Oncol*,2007, 25(26):4043-4050
- 6 Rd BH, Moore MJ, Andersen J, *et al.* Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial [J]. *J Clin Oncol*, 1997, 15(6):2403-2413
- 7 中华医学会外科学分会胰腺外科学组. 胰腺癌诊治指南(2014)[J]. *中华普通外科杂志*,2015,30(1):73-79
- 8 孙晋敏,夏正东,周士东,等. 负载 As₂O₃ 壳聚糖纳米粒的药代动力学及其毒性观察[J]. *中国组织工程研究*,2011,15(12):2166-2170
- 9 Veisheh O, Kievit FM, Fang C, *et al.* Chlorotoxin bound magnetic nanovector tailored for cancer cell targeting, imaging, and siRNA delivery[J]. *Biomaterials*,2010,31(31):8032-8042
- 10 Del Bufalo D, Biroccio A, Trisciuoglio D, *et al.* Bcl22 has differing effects on the sensitivity of breast cancer cells depending on the anti-neoplastic drug used[J]. *Eur J Cancer*,2002,38(18):2455-2262
- 11 Zhang J, Xia W, Liu P, *et al.* Chitosan modification and pharmaceutical/biomedical applications[J]. *Mar Drugs*,2010,8(7):1962-1987
- 12 Mero J. The role of VEGF and EGFR inhibition; implications for combining anti-VEGF and antiEGFR agents[J]. *Mol Cancer Res*,2007, 5(3):203-205
- 13 陈重,魏立,务森,等. 表皮生长因子受体和鼠类肉瘤病毒癌基因在非小细胞肺癌淋巴结转移中的表达及临床意义[J]. *中华实验外科杂志*, 2015, 32(6):1439-1442
- 14 Hamilton SR. Targeted therapy of cancer: new roles for pathologists in colorectal cancer [J]. *Mod Pathol*, 2009, 2(5):S23-30
- 15 Shen L, Shui Y, Wang X, *et al.* EGFR and HER2 expression in primary cervical cancers and corresponding lymph node metastases: Implications for targeted radiotherapy[J]. *Bmc Cancer*,2008,8(1):1-7
- 16 Jimeno A, Rubio Viqueira B, mador ML, *et al.* Dual mitogenactivated protein kinase and epidermal growth factor receptor inhibition in biliary and pancreatic cancer[J]. *Mol Cancer Ther*,2007,6:1079-1088

(收稿日期:2016-10-13)

(修回日期:2016-10-31)