

# 纳米羟基磷灰石抗肿瘤作用的研究进展

何佳颖 张雨淞 覃文聘 牛丽娜 焦 凯

**摘 要** 纳米羟基磷灰石具有生物相容性高、细胞毒性低等优点,其可通过改变肿瘤细胞超微结构和功能来杀伤肿瘤细胞,同时可以矿化肿瘤组织局部胶原纤维,防止肿瘤转移及侵袭,因此,在杀伤肿瘤细胞及预防肿瘤转移中显示出良好的应用潜力。然而,其与肿瘤细胞及胶原纤维相互作用亦可增强肿瘤恶性潜能。本文对近年纳米羟基磷灰石作为抗肿瘤药物的研究现状进行了回顾,并分析了其促肿瘤恶性潜能危险性的相关研究,以期将为纳米羟基磷灰石用于肿瘤治疗领域中的应用提供参考和借鉴。

**关键词** 羟基磷灰石 肿瘤 纳米颗粒

**中图分类号** R3

**文献标识码** A

**DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.11.004

癌症是威胁全球公共健康的主要原因之一,其发生率还在持续增加,每年新增病例超过 1000 万例<sup>[1]</sup>。目前,癌症的常规治疗仅限于化疗、放疗和手术。然而化疗和放疗往往对正常细胞有严重的不良反应。手术虽可以完全切除原发肿瘤和可见的转移,但肿瘤通过微转移侵袭邻近组织或扩散到远处组织往往限制了其疗效<sup>[2]</sup>。近年来,基于羟基磷灰石性质的研究飞速发展,人们发现羟基磷灰石纳米颗粒(hydroxyapatite nanoparticle, nHAP)可以负载基因、蛋白、药物等进入细胞内部,从而影响细胞的分化以及基因的表达<sup>[3]</sup>。此外, nHAP 本身也具有抑制肿瘤细胞增殖和转移的作用。与传统的化疗比较,使用 nHAP 治疗可以有效地抑制肿瘤的增殖和转移,而不会损伤正常细胞,为肿瘤治疗做出了巨大贡献。然而,亦有文献指出,一定浓度的 nHAP 可促进癌细胞转移并促进其恶性潜能<sup>[4]</sup>。

因此,本文从 nHAP 对肿瘤细胞超微结构和功能的影响、nHAP 形成矿化胶原纤维防止肿瘤侵袭展开综述,并对 nHAP 促进癌细胞转移及其恶性潜能的风险加以分析,为 nHAP 在肿瘤治疗领域中的应用提供参考和借鉴。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81671012, 81870787, 81722015, 81870805);中国人民解放军军队医学科技青年培育项目(16QNPI17)

作者单位:710032 西安,空军军医大学基础医学院(何佳颖、张雨淞、覃文聘);710032 西安,空军军医大学口腔医院修复科(牛丽娜),黏膜病科(焦凯)

通讯作者:焦凯,副教授,副主任医师,博士生导师,电子信箱:kjiao1@fmmu.edu.cn;牛丽娜,教授,博士生导师,电子信箱:niulina831013@126.com

## 一、nHAP

1. nHAP 概况:HAP 是一种天然的磷灰石矿物,其分子式为  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ ,主要存在于脊椎动物的骨、牙齿等硬组织中。HAP 属六方晶系,其结构为六角柱体,具有较好的稳定性。但是其本身容易团聚形成较大的晶体,使得其生物学性能下降<sup>[5]</sup>。合成纳米级 HAP,使其具有较大的比表面积,并且其生物相容性和生物活性均优于医用钛、硅及碳材料等植入医用材料,可作为一种骨骼或牙齿的诱导因子,应用于硬组织修复及骨填充<sup>[6]</sup>。此外, nHAP 对 DNA 和蛋白质具有高亲和力,常用于蛋白质层析实验<sup>[7]</sup>。

2. nHAP 制备方法:nHAP 的制备方法众多,主要分为干法和湿法两类<sup>[8]</sup>。干法合成相对较少,主要采用固相法;湿法合成主要包括:水热合成法、化学沉淀法、微乳液法等。其中 nHAP 较为普遍的制备方法是水热合成法和化学沉淀法。水热合成法比较环保且成本较低,但对设备要求较高,需要耐高温、高压的密闭容器。该方法通常采用  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  和  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  作为原料,在一定的 pH 值和较高的温度与压力的条件,钙盐和磷酸盐在水溶液中反应将合成 nHAP,并可通过控制水热条件得到不同的纳米晶体物相。

化学沉淀法因其实验条件简单、成本较低,是合成纳米材料常用的方法之一。将不同的含 Ca 和 P 的化合物在水溶液中发生沉淀反应,即可得到 HA,但其颗粒尺寸分布范围广且颗粒分散度低。在此基础上使用添加剂改性或冷冻干燥可减小颗粒尺寸及改善颗粒分散度,得到 nHAP。

## 二、nHAP 对肿瘤细胞超微结构和功能的影响

Han 等<sup>[9]</sup>研究了 nHAP 对正常和肿瘤细胞生长的不同抑制作用及其机制。将 nHAP 直接注入裸鼠

移植瘤中,可使肿瘤体积缩小 50% 以上,感染裸鼠的存活时间也明显增长。研究表明,nHAP 的抗肿瘤作用主要是通过抑制细胞内蛋白质合成来实现的。由于其对核糖体的高亲和力,降低了 mRNA 与核糖体的结合,从而抑制蛋白质的合成,影响细胞增殖<sup>[10]</sup>。此外,相较其他纳米材料,nHAP 具有细胞毒性低的优点<sup>[11]</sup>。如碳纳米管和金属氧化物纳米材料可以从其表面释放活性氧(ROS),从而促进细胞死亡,然而这种疗法在杀伤癌细胞的同时对于正常细胞也有相同毒性。Han 等<sup>[12]</sup>研究显示,负责活性氧产生和清除的关键酶琥珀酸脱氢酶和超氧化物歧化酶的活性在 nHAP 处理后显著降低,因此 nHAP 对于正常细胞杀伤作用小,有望为癌症治疗提供安全有效的替代方案。

在 nHAP 的体外实验中,Yin 等<sup>[13]</sup>研究了以 Bel-7402 肝癌细胞作为单细胞悬液与 nHAP 的相互作用。其通过倒置显微镜观察到,nHAP 处理 Bel-7402 单细胞悬液 24h 后,Bel-7402 细胞在培养基中仍呈均匀分布,无细胞贴壁。相反,对照组的细胞都已黏附。这一结果表明,随着肿瘤细胞唾液酸残基对其表面糖蛋白酸化程度的增加,其表面的负电荷也随之增加,使表面带正电荷的 nHAP 更容易吸附肿瘤细胞。nHAP 包被 Bel-7402 细胞可显著影响其细胞膜的功能,从而减少 Bel-7402 细胞的黏附。

单纯疱疹病毒胸苷激酶(herpes simplex virus thymidine kinase,HSV-TK)基因可通过阻断 DNA 合成导致细胞死亡<sup>[14]</sup>,又称“自杀”基因治疗,在多种肿瘤模型中均有效。然而缺乏安全高效的基因递送系统已成为“自杀”基因治疗的一大障碍。Cheang 等<sup>[15]</sup>制备了氧化石墨烯-羟基磷灰石(graphene oxide-hydroxyapatite,GO-nHAP)复合体作为载体将 HSV-TK 基因导入乳腺细胞,并采用流式细胞仪检测 GO-nHAP 复合体的转染效率和细胞毒性。研究表明,nHAP 与 DNA 结合可保护 DNA 不受核酸酶的自发降解,同时石墨烯的掺入使 nHAP 的比表面积大幅增加,为 DNA 提供了大量的结合位点。此外,GO-nHAP 复合体对正常乳腺细胞的细胞毒作用尚可耐受,且具有高度稳定性。因此 GO-nHAP 复合体可作为一种新型高效的肿瘤治疗基因载体。

nHAP 除被用作药物、蛋白质和基因传递的载体,还对肿瘤细胞具有细胞毒性作用。Sun 等<sup>[16]</sup>比较了 nHAP 对肺癌细胞(A549)和正常支气管上皮细胞(16HBE)的细胞毒性作用。在 A549 细胞中,

nHAP 可有效靶向线粒体,导致线粒体膜电位降低,caspase-3 和 caspase-9 酶活性升高,从而诱导线粒体介导的细胞凋亡。此外,nHAP 引起肿瘤细胞内钙离子浓度持续升高,而正常对照组细胞内钙离子浓度仅有一过性升高。其原因可能是 nHAP 在含有多种水解酶的内体中迅速降解,从而引起细胞钙超载,导致细胞坏死、凋亡或自噬。nHAP 的线粒体靶向性增强以及 A549 细胞内钙离子浓度的持续升高,导致 nHAP 的肿瘤特异性细胞毒性作用。

Nasser 等<sup>[17]</sup>制备了 nHAP/MgO 复合体并测试其抗癌活性。研究发现,MgO 具有双层疏水外膜,其疏水特征与细胞膜类似,使细胞易于通过内吞作用摄取 MgO。nHAP 在胞内通过诱导肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor,TNF)产生从而激活凋亡途径,使肿瘤细胞坏死。磺酰罗丹明 B(sulforhodamine B,SRB)染色结果表明,由介孔氧化镁作为载体包裹 nHAP 形成的复合体,其抗癌活性比单独使用 MgO 和 nHAP 提高了 3 倍,nHAP/MgO 复合体作为靶向肿瘤组织和细胞的药物显示出良好的潜力。

### 三、nHAP 形成矿化胶原纤维防止肿瘤侵袭

骨是多发性骨髓瘤、前列腺癌及乳腺癌等癌症转移的首选部位。转移性癌细胞与骨细胞相互作用,促进癌细胞扩增,同时破坏体内骨重建平衡。nHAP 作为骨细胞外基质的重要成分在癌细胞黏附和迁移中发挥重要作用。因此了解骨细胞外基质与骨转移癌细胞之间的相互作用对于调控和预防骨转移癌细胞生长是必要的<sup>[18]</sup>。

He 等<sup>[19]</sup>通过 X 射线散射和拉曼成像在小鼠乳腺癌模型中表征 nHAP 结构。研究表明,容易发生肿瘤细胞转移的骨骼部位包含较不成熟的 nHAP,并且在继发肿瘤形成前,原发肿瘤可以进一步促进 nHAP 不成熟化。这是由于乳腺肿瘤可以通过刺激成骨细胞增加其新骨生成或分泌可溶性因子从而直接抑制骨矿物质的生理性成熟。Choi 等<sup>[20]</sup>通过聚合物诱导的液体前驱体(polymer-induced liquid-precursor,PILP)技术在体外促进胶原的纤维内矿化,并促进成熟 nHAP 晶体的形成,随后采用扫描电子显微镜观察矿化胶原对肿瘤细胞黏附及侵袭能力的影响。结果表明胶原纤维的生理性矿化可减少肿瘤细胞的黏附,经细胞核和丝状肌动蛋白(filamentous actin,F-actin)染色的细胞的共聚焦图像分析证实,与矿化胶原相互作用的乳腺癌细胞扩散及侵袭均显著降低<sup>[21]</sup>。

Ahn 等<sup>[22]</sup>使用 nHAP 和纤维蛋白的三维仿骨复

合材料模拟骨的微环境,来研究肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)和 nHAP 之间的相互作用,建立了胃癌细胞(MKN74)的 TME 骨转移模型。其通过 F-actin 染色检测细胞增殖并分析细胞形态。结果显示,MKN74 细胞在较高的 nHAP 浓度下表现出显著的迁移减少和胞质体积减小,表明 nHAP 对癌细胞的转移和增殖具有抑制作用。此外,nHAP 同时具有显著抑制肿瘤相关的血管生成的功能,从而阻断了肿瘤生长、转移、代谢的营养需求,起到抑制肿瘤生长及转移的目的。

大多数研究将促进骨中转移性肿瘤的形成归因于生长因子和其他可溶性信号的释放。Siddharth 等<sup>[23]</sup>研究证明,骨转移的恶性潜能不仅由骨微环境中的生长因子介导,而且还受到 nHAP 材料特性的影响,通过溶液沉淀反应、水热合成法制备出粒径分布和结晶度均不同的 nHAP,并在含血清的培养基中孵育。经比色法测定,与较大、结晶较多的 nHAP 比较,较小、结晶较少的 nHAP 吸附了更多的血清蛋白。蛋白质吸附的改变将影响纤维连接蛋白等生物分子调节细胞附着、局部黏附形成和增殖信号通路,从而影响乳腺肿瘤细胞的黏附和生长。因此,调控肿瘤患者骨组织局部 nHAP 的晶体结构及比表面积等理化特性,可能通过阻断蛋白吸附作用,来抑制侵袭的肿瘤细胞的黏附和生长,从而阻断其高亲和力,抑制肿瘤的侵袭和增殖潜能。

#### 四、nHAP 促进肿瘤细胞转移

尽管上述研究展示出 nHAP 良好的抗肿瘤生长及转移效果,但亦有研究显示 nHAP 可促进肿瘤细胞转移。Pathi 等<sup>[24]</sup>开发了一种矿化三维肿瘤模型,利用该培养系统在体外研究了 nHAP 在病理相关条件下的促转移作用。与非矿化肿瘤模型比较,矿化肿瘤模型中肿瘤细胞黏附、增殖现象显著增加。这一结果表明,nHAP 促进了癌细胞的增殖及骨转移,白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)可能在这一过程中发挥重要作用。IL-8 具有促血管及破骨细胞生成的作用,可导致病理性骨吸收,加剧骨形成与吸收的失衡,从而进一步刺激转移性肿瘤生长。而 nHAP 介导的  $\alpha v \beta 3$  整合素可使 IL-8 分泌增加,促进继发性肿瘤生长和骨破坏。整合素是控制细胞内信号通路的细胞黏附受体,可以调节癌细胞的转移表型。研究结果表明,癌细胞具有高水平的磷酸化形式的细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)和蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB),其作为

整合素介导的信号转导的关键,可以刺激 IL-8 等趋化因子的表达。这一研究为骨微环境中的矿物质基质调节肿瘤骨转移相关的病理性骨重建提供了分子机制。

导管原位癌(ductal carcinoma in situ, DCIS)是大多数浸润性乳腺癌(invasive breast carcinomas, IBC)的癌前病变。DCIS 的典型诊断是通过乳房 X 光检查微钙化(microcalcifications, MC)现象,即微钙化点越多,提示 DCIS 恶性程度越高。而与恶性乳腺病变相关的微钙化主要由 nHAP 和相关的磷酸钙矿物组成。Frank 等<sup>[25]</sup>在空白对照及含有 HA 的聚丙交酯-乙交酯(poly lactide-co-glycolide, PLG)支架中分别培养乳腺癌细胞,评价 nHAP 对恶性肿瘤进展的影响。在 HA 支架中培养的 DCIS 细胞发生了与侵袭性增加相关的变化,如增殖失调、失去细胞间的接触及细胞的运动性增加。结果表明,nHAP 可以刺激癌前 DCIS 细胞表现侵袭性,其机制可能依赖于 IL-8 信号转导。其通过 DNA 分析来测定细胞生长,并用实时定量 PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)测定 IL-8 基因的表达,观察到 nHAP 在正常和 DCIS 细胞系中有抑制增殖作用,但在 IBC 细胞系中无此作用;相反,nHAP 在 DCIS 和 IBC 细胞系中上调 IL-8 基因表达和可溶性因子分泌,但在正常细胞中不上调。这一数据表明,nHAP 会导致乳腺癌细胞的增殖和 IL-8 分泌上调,促进其恶性程度。此外,在 nHAP 支架中培养的 DCIS 细胞,其间充质形状发生改变并且细胞间的接触减少,表现出更强的运动性。综上所述,nHAP 在一定情况下存在促进肿瘤恶变,并增强其侵袭性的风险,主要可能与肿瘤局部区域 nHAP 的晶体结构及比表面积等理化特性相关<sup>[22]</sup>。

#### 五、展 望

nHAP 通过改变肿瘤细胞超微结构和功能,可有效抑制癌细胞的增殖并减少其黏附作用。同时其对于正常细胞和癌细胞具有不同作用机制,表现出无毒性的优点。此外,nHAP 还可以矿化肿瘤组织局部胶原纤维,抑制肿瘤转移及侵袭,提高患者生存率。综上所述,nHAP 与癌细胞及胶原纤维相互作用分子机制的发现为转移性肿瘤的治疗开辟了新的应用前景。然而,需要注意的是,nHAP 亦可在特定环境中促进生长因子和其他可溶性信号的释放,从而增强肿瘤恶性潜能,并刺激其发生增殖和黏附,这可能受到 nHAP 晶体结构及比表面积等理化特性的调控。因此,仍需通过技术手段进一步探究 nHAP 理化特性与

肿瘤微环境之间的相互作用机制,以推进 nHAP 在转移性肿瘤预防及治疗领域中的作用。

# 参考文献

- 1 Fidler MM, Bray F, Soerjomataram I. The global cancer burden and human development: a review[J]. Scand J Public Health, 2018, 46(2): 27 – 36
- 2 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018[J]. Ca A Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7 – 11
- 3 Lelli M, Roveri N, Marzano C, *et al.* Hydroxyapatite nanocrystals as a smart, pH sensitive, delivery system for kiteplatin [J]. Dalton Trans, 2016, 45(33): 13187 – 13195
- 4 Morgan MP, Cooke MM, Christopherson PA, *et al.* Calcium hydroxyapatite promotes mitogenesis and matrix metalloproteinase expression in human breast cancer cell lines [J]. Mol Carcinogen, 2015, 32(3): 111 – 117
- 5 Fang CH, Lin YW, Lin FH, *et al.* Biomimetic synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite composites; therapeutic potential and effects on bone regeneration[J]. Int J Mol Ences, 2019, 20(23): 6002 – 6008
- 6 Zhang K, Zhou Y, Xiao C, *et al.* Application of hydroxyapatite nanoparticles in tumor – associated bone segmental defect[J]. Sci Adv, 2019, 5(8): 694 – 697
- 7 Benedetti M, Anonucci D, Castro FD, *et al.* Metalated nucleotide chemisorption on hydroxyapatite[J]. J Inorganic Biochem, 2015, 12(153): 279 – 283
- 8 Wang ZJ, Sun KQ, He YF, *et al.* Preparation of hydroxyapatite – based porous materials for absorption of lead ions [J]. Water Sci Technol, 2019, 80(7): 1266 – 1275
- 9 Han Y, Li S, Cao X, *et al.* Different inhibitory effect and mechanism of Hydroxyapatite nanoparticles on normal cells and cancer cells in vitro and in vivo[J]. Sci Rep, 2014, 4(2): 7134 – 7136
- 10 Benedetti M, Antonucci D, Castro FD, *et al.* Metalated nucleotide chemisorption on hydroxyapatite[J]. J Inorganic Biochem, 2015, 153(2): 279 – 283
- 11 Oberbek P, Bolek T, Chlanda A, *et al.* Characterization and influence of hydroxyapatite nanopowders on living cells [J]. Beilstein J Nanotechnol, 2018, 9(26): 3079 – 3094
- 12 Barbanente A, Nadar RA, Esposti LD, *et al.* Platinum – loaded, selenium – doped hydroxyapatite nanoparticles selectively reduce proliferation of prostate and breast cancer cells co – cultured in the presence of stem cells[J]. J Mater Chemi B, 2020, 8(4): 783 – 787
- 13 Yin MZ, Han YC, Bauer IW, *et al.* Effect of hydroxyapatite nanoparticles on the ultrastructure and function of hepatocellular carcinoma cells in vitro[J]. Biomed Mater, 2016, 1(1): 38 – 41

(接第 163 页)

- 16 Raquel García – García, Alvaro Javier Cruz – Gómez, Mangas – Losada A, *et al.* Reduced resting state connectivity and gray matter volume correlate with cognitive impairment in minimal hepatic encephalopathy[J]. PLoS One, 2017, 12(10): e0186463
- 17 Yang ZT, Chen HJ, Chen QF, *et al.* Disrupted brain intrinsic networks and executive dysfunction in cirrhotic patients without overt hepatic encephalopathy[J]. Front Neurol, 2018, 9: 14 – 24
- 18 Lin W, Chen X, Gao Y, *et al.* Hippocampal atrophy and functional connectivity disruption in cirrhotic patients with minimal hepatic en-

- 14 Dührsen L, Hartfuß S, Hirsch D, *et al.* Preclinical analysis of human mesenchymal stem cells: tumor tropism and therapeutic efficiency of local HSV – TK suicide gene therapy in glioblastoma[J]. Oncotarget, 2019, 10(58): 6049 – 6061
- 15 Cheang TY, Lei YY, Zhang ZQ, *et al.* Graphene oxide – hydroxyapatite nanocomposites effectively deliver HSV – TK suicide gene to inhibit human breast cancer growth[J]. Journal of Biomaterials Applications, 2018, 33(2): 216 – 226
- 16 Sun Y, Chen Y, Ma X, *et al.* Mitochondria – Targeted Hydroxyapatite Nanoparticles for Selective Growth Inhibition of Lung Cancer in Vitro and in Vivo[J]. Acs Appl Mater Interfaces, 2016, 8(39): 1364 – 1367
- 17 Nasser A, Ali A, Kamel S, *et al.* A novel method to improve the anticancer activity of natural – based hydroxyapatite against the liver cancer cell line HepG2 using mesoporous magnesia as a micro – Carrier [J]. Molecules, 2017, 22(12): 1947 – 1952
- 18 Kolb AD, Bussard KM. The bone extracellular matrix as an ideal milieu for cancer cell metastases[J]. Cancers, 2019, 11(7): 1020 – 1024
- 19 He F, Chiou AE, Loh HC, *et al.* Multiscale characterization of the mineral phase at skeletal sites of breast cancer metastasis[J]. Proceed Nat Acad Ences, 2017, 114(40): 10542 – 10547
- 20 Choi S, Friedrichs J, Song YH, *et al.* Intrafibrillar, bone – mimetic collagen mineralization regulates breast cancer cell adhesion and migration[J]. Biomaterials, 2018, 4(198): 95 – 106
- 21 Guzman A, Ziperstein MJ, Kaufman LJ. The effect of fibrillar matrix architecture on tumor cell invasion of physically challenging environments[J]. Biomaterials, 2014, 35(25): 6954 – 6963
- 22 Ahn JH, Lim J, Jusoh NH, *et al.* 3D microfluidic bone tumor microenvironment comprised of hydroxyapatite/fibrin composite [J]. Front Bioengineer Biotechnol, 2019, 7(3): 168 – 171
- 23 Pathi SP, Lin DW, Dorvee JR, *et al.* Hydroxyapatite nanoparticle – containing scaffolds for the study of breast cancer bone metastasis[J]. Biomaterials, 2011, 32(22): 5112 – 5122
- 24 Pathi SP, Kowalczewski C, Tadipatri R, *et al.* A novel 3 – D mineralized tumor model to study breast cancer bone metastasis[J]. PLoS One, 2010, 5(1): 1371 – 1376
- 25 He F, Springer NL, Whitman MA, *et al.* Hydroxyapatite mineral enhances malignant potential in a tissue – engineered model of ductal carcinoma in situ (DCIS) [J]. Biomaterials, 2019, 224(12): 119 – 124

(收稿日期: 2020 – 05 – 13)

(修回日期: 2020 – 05 – 22)

cephalopathy[J]. Metab Brain Dis, 2019, 34(6): 1519 – 1529

- 19 Gou L, Zhang W, Guo D, *et al.* Aberrant brain structural network and altered topological organization in minimal hepatic encephalopathy [J]. Diagnost Interv Radiol, 2020, 26(3): 255 – 261
- 20 Chen H, Chen Q, Yang Z, *et al.* Aberrant topological organization of the functional brain network associated with prior overt hepatic encephalopathy in cirrhotic patients[J]. Brain Imaging Behav, 2019, 13(3): 771 – 780

(收稿日期: 2020 – 05 – 30)

(修回日期: 2020 – 06 – 08)