基础研究 文章编号:0253-3626(2010)02-0220-04

超声定位辐照载药微泡抑制卵巢癌裸鼠皮下移植瘤增殖的实验研究

李 蓉[1],周 琦[1],王志刚[2],伍 星[2]

(1.重庆市肿瘤研究所妇瘤科,重庆 400030;2.重庆医科大学超声影像学研究所,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨超声定位辐照载紫杉醇脂质微泡(Paclitaxel-carrying liposome microbubbles,PLM)的方法对裸鼠人卵巢癌移植瘤的抑瘤效应及可能的机制。方法:建立 20 只人卵巢癌裸鼠皮下移植瘤模型,随机分成 PLM 辐照组、紫杉醇药物组、PLM 组及生理盐水对照组,每组 5 只,分别给予不同处理,末次处理 24 h 后处死裸鼠,测量重量体积,计算抑瘤率;用免疫组织化学 SP 法检测肿瘤组织中细胞核相关抗原 Ki-67 并进行半定量分析;在透射电镜下对肿瘤细胞进行形态学观察。结果:与对照组比较,PLM 辐照组及紫杉醇药物组对移植瘤的生长有明显的抑制作用,以 PLM 辐照组的抑瘤率最高($P<0.01$);PLM 辐照组及紫杉醇药物组肿瘤组织中 Ki-67 的阳性表达量均下降,前者下降更为明显($P<0.01$)。透射电镜下观察到 PLM 辐照组肿瘤凋亡细胞出现较多。结论:与紫杉醇药物组相比,超声破坏 PLM 的方法对裸鼠 SKOV3 卵巢癌皮下移植瘤具有较强的体内抑瘤效应,可能是通过诱导细胞的凋亡,抑制肿瘤细胞的增殖活性而延缓肿瘤生长的。

【关键词】超声定位辐照;载紫杉醇脂质微泡;抑瘤效应

【中国图书分类法分类号】R73.36 【文献标识码】A 【收稿时间】2008-10-24

Experimental study on inhibitory effect of ultrasound fitted irradiation paclitaxel-carrying liposome microbubbles agent on ovarian carcinoma in nude mice

LI Rong, et al

(*Department of Gynecological Oncology, Chongqing Cancer Institute*)

【Abstract】*Objective*: To discuss the inhibitory effect of ultrasound fitted irrad-iation paclitaxel-carrying liposome microbubbles (PLM) agent on nude micetran-splanted human ovarian carcinoma and its possible mechanism of action. *Methods*: We established nude mice transplanted SKOV3 human ovarian carcinoma. Then mice were randomly divided into 4 groups (5 mice in each group). Each group was treated in a different way.The rate of tumor inhibition was calculatedafter sacrificing the animals at the end of experiment.The nuclear associated an-tigen Ki-67 was measured immunohistochemically and analyzed through comput-er.Tumor tissues were observed under the transmission electrion microscope (TEM). *Results*: Compared with control, the growth of tumor in PLM combined ultr-asound group and paclixtaxel chemotherapy group was slow and the inhibitory effect of tumor was significant ($P<0.01$).The Ki67 expression were all decreased($P<0.01$).But the former which inhibitory effect of tumor was much more signi-ficant ($P<0.01$).Apoptosisbodies were observed under transmission electron micr-oscope and the PLM combined ultrasound group was stronger than other groups.*Conclusion*:Ultrasound destructing PLM agent has good therapeutic effect in the treatment of nude mice transplanted human ovarian carcinoma.The mechanism of action may be its antiangiogenetic effect, interrupting, inhibiting proliferation and inducing apoptosis.

【Key words】Ultrasound fitted irradiation;PLM;Inhibition effect

卵巢癌是严重威胁妇女健康的常见恶性肿瘤之一,由于起病隐匿,早期缺乏特异性症状,多数患者就诊时病情晚,治疗效果差,尤其对晚期卵巢癌的治疗更是棘手,故其死亡率一直高居妇科恶性肿瘤之首。目前紫杉醇是公认临床治疗卵巢癌最有效的一线化疗药物,但因其溶媒中的聚氧乙基代蓖麻油在体内降解时能释放出组织胺,可引起包括严重过敏反应在内的毒性反应[1,2],限制了其临床应用的安全性和有效性。为了将其不良反应降至最低且最大限度的提高疗效,重庆医科大学超声影像研究所制备了载紫杉醇脂质微泡(Paclitaxel-carrying liposome microbubbles,PLM),改善了因由溶媒引起的超过敏反应,且具有一般载药脂质体的药动力学特

作者介绍:李 蓉(1972-),女,硕士,副主任医师,研究方向:妇科肿瘤。

通讯作者:周 琦,女,主任医师,E-mail:qizhou9128@163.com。

性,延长了药物代谢时间[3-5]。本研究以卵巢癌 SKOV3 裸鼠皮下移植瘤为研究对象,观察超声定位辐照 PLM 对荷瘤裸鼠的抑瘤效应,并探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人卵巢浆液性囊腺癌细胞株 SKOV3 购于重庆医科大学病理教研室;裸鼠(BALB/c-nu/nu)20 只,雌性,(购于上海斯莱克研究动物有限公司),4~5 周龄,体重 18~22 g,由重庆医科大学研究动物中心无特定病原菌(SPF)环境饲养;紫杉醇注射液 30 mg/5 ml (重庆太极制药有限公司),生产批号:33080003;PLM,由重庆医科大学超声影像研究所提供,直径范围 2~6 μm,浓度 2.3×10^9~3.5×10^9 个/ml,包封率为 92.8%±2.6%,载药量 26.8%±1.4%,分布均匀;CGZZ 型超声基因转染治疗仪,频率 300 KHz,声强范围 0.25 ~2.5 W/cm^2,由重庆医科大学超声影像学研究所研制。

1.2 方法

1.2.1 裸鼠皮下移植瘤模型的建立 将培养中的处于对数生长的 SKOV3 细胞经 0.25%胰蛋白酶消化后,以无血清 1640 液洗涤,调整活细胞浓度为 5×10^7 个/ml,于裸鼠背部皮下接种 0.2 ml/只,每只裸鼠皮下接种 1 点。次日记为接种第 1 d,待所有荷瘤鼠肿瘤长径超过 1 cm 时开始进行处理。

1.2.2 研究分组及处理 将成功建立裸鼠皮下移植瘤模型的 20 只裸鼠随机分成 4 组,即 PLM 辐照组:将 PLM 用生理盐水稀释,每只裸鼠经尾静脉注入 PLM 0.2 ml(实际载药量约 0.1 mg)后,予超声探头辐照瘤组织区,输出功率 0.5 W/cm^2,辐照 30 s,间隙 30 s,反复 3 次,共辐照 3 min;紫杉醇药物组:将紫杉醇注射液稀释为 0.5 mg/ml,于裸鼠尾静脉注入 0.2 ml(实际药量 0.1 mg),不予超声辐照;PLM 组:与 PLM 辐照组方法相同给予稀释 PLM,不予超声辐照;对照组,以生理盐水 0.2 ml 注入每只裸鼠尾静脉,不予超声辐照。各组上述处理每天 1 次,连续 7 d。

1.2.3 抑瘤效应检测 末次治疗后 24 h 颈椎脱位处死裸鼠,连同包膜完整剥离出肿瘤组织,用游标卡尺测量瘤结节长径(a),短径(b),用电子天平称取重量。

按以下公式计算出肿瘤体积[6]:

肿瘤体积=长径(a)×短径(b)^2×0.52

按体积计算肿瘤体积抑瘤率(Volume inhibition rate,VIR)和按重量计算肿瘤重量抑瘤率(Weight inhibition rate,WIR):

VIR=(1-研究组平均肿瘤体积/对照组平均肿瘤体积)×100%,

WIR=(1-研究组平均肿瘤重量/对照组平均肿瘤重量)×100%,

1.2.4 透射电镜观察 各研究组裸鼠立即处死后迅速切取大小约 1 mm^3 的肿瘤组织用 2.5%戊二醛固定,在透射电镜 H-600 型下观察肿瘤细胞形态学改变。

1.2.5 免疫组化检测 其余肿瘤组织以 10%福尔马林固定,石蜡包埋,制作常规 4 μm 切片,采用免疫组织化学 SP 法进行 Ki-67 的检测,结果判定:阳性细胞核呈棕黄色,采用北航 CM2000B 多功能真彩色病理图像分析系统对其进行半定量分析。在 20 倍物镜下,使肿瘤细胞充满测试域,提取出棕黄色的区域,从而计算出阳性区域的面积,以面密度反映 Ki-67 阳性表达的阳性率(面密度=阳性目标面积/统计场面积)。

1.2.6 统计学处理 所得数值以均数±标准差表示($\bar{x}\pm s$),用 SPSS11.5 统计软件包中的单因素方差分析法进行各研究组间均数的比较,用 SNK 法分别对研究组间均数的两两比较进行检验。以检验水准 $\alpha=0.05$,$P\leq0.05$ 有统计学意义。

2 结 果

2.1 荷瘤鼠人卵巢癌 SKOV3 皮下移植瘤模型的建立情况

20 只裸鼠在研究过程中均成活,各个细胞悬液接种点未见红肿破溃及出血表现。接种后 35 d,所有裸鼠背部均出现直径 >1 cm 的隆起性肿块,边缘不规则,侵及皮肤,肿块表面无明显破溃出血。肿瘤组织从裸鼠上剥离下来肉眼观察呈结节状灰白色,质地偏硬,表面有假包膜,容易和周围组织剥离。

2.2 肿瘤体积、重量的变化及抑瘤率

PLM 辐照组和紫杉醇药物组肿瘤重量和体积相对于对照组均有不同程度的减少,均值之间有统计学意义($P<0.01$),而 PLM 辐照组对肿瘤生长的抑制作用更明显($P<0.01$),PLM 组肿瘤重量和体积减少不明显($P>0.05$)(见表 1、表 2)。

2.3 透射电镜下超微结构的改变

电镜下可见,对照组和 PLM 组肿瘤细胞生长活跃,呈不规则形,核大深染,核异型性明显,可见异常的核分裂相,线粒体肿胀不明显,凋亡细胞比例低。而 PLM 辐照组、紫杉醇药物组肿瘤细胞超微结构的损害包括线粒体的肿胀变性,空泡化改变明显,细胞核的溶解、碎裂,胞浆的浓集,异染色质增加,染色质边集,并出现凋亡小体。PLM 辐照组凋亡细胞的数量明显多于紫杉醇药物组(图 1~4)。

2.4 Ki-67 免疫组化表达

Ki-67 以细胞核出现棕黄色颗粒为阳性。与对照组比较,PLM 辐照组和紫杉醇药物组肿瘤细胞中 Ki-67 阳性表达区域均有降低(图 5~8)。采用北航 CM2000B 真彩色病理图像分析系统对其进行半定量分析,经单因素方差分析,各组肿瘤细胞 Ki-67 阳性表达率均值的差异有统计学意义($F=80.352$,$P<0.000\ 1$)。经 SNK 检验,PLM 辐照组和紫杉醇药物组肿瘤细胞组织中 Ki-67 低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.01$)(表 3)。

3 讨 论

近年来,微泡造影剂在超声声场中的独特作用机制,在肿瘤的治疗中显示了良好的应用前景。已发现超声微泡造影

表 1 各组裸鼠肿瘤重量及重量抑瘤率的比较

组别	肿瘤瘤重(g)	重量抑瘤率(%)	
PLM 辐照组	0.737 ± 0.070*★	55.41	F=188.734
紫杉醇药物组	1.050 ± 0.084*	36.48	
PLM 组	1.563 ± 0.049#	5.45	P<0.000 1
对照组	1.653 ± 0.074	0	

与对照组比较，*P<0.01，#P=0.061；★与其它处理组两两比较，P<0.01

表 2 各组裸鼠肿瘤体积及体积抑瘤率的比较

组别	肿瘤体积(mm^3)	体积抑瘤率(%)	
PLM 辐照组	677.806 ± 85.149*★	52.77	F=136.595
紫杉醇药物组	992.518 ± 64.202*	28.06	
PLM 组	1 333.702 ± 62.703#	7.07	P<0.000 1
对照组	1 415.194 ± 77.648	0	

与对照组比较，*P<0.01，#P=0.097；★与其它处理组两两比较，P<0.01

表 3 各组裸鼠肿瘤组织 Ki-67 比较

分组	鼠数(n)	面密度
PLM 辐照组	5	0.156 99 ± 0.013 17*★
紫杉醇药物组	5	0.232 71 ± 0.014 24*
PLM 组	5	0.284 56 ± 0.015 88#
对照组	5	0.306 62 ± 0.020 32

与对照组比较，*P<0.01；#P=0.135；★与其它处理组两两比较，P<0.01

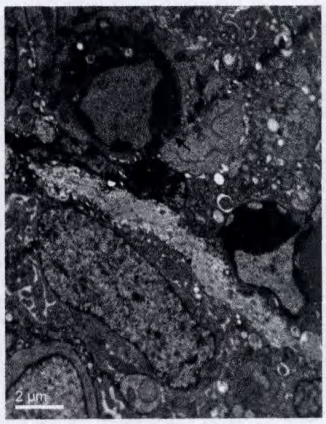


图 1 PLM 辐照组透射电镜结果(TEM ×6 000) 箭头所示为凋亡细胞

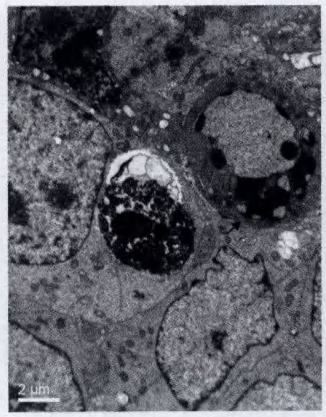


图 2 紫杉醇药物组透射电镜结果(TEM×6 000) 箭头所示为凋亡细胞

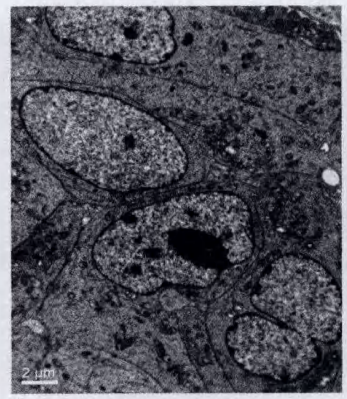


图 3 PLM 组透射电镜结果(TEM×6 000)

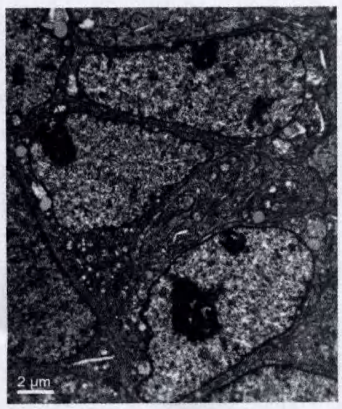


图 4 对照组透射电镜结果(TEM×6 000)

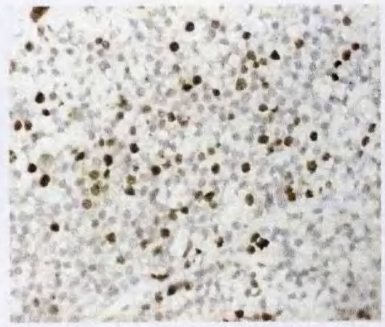


图 5 PLM 辐照组 Ki-67 免疫组化(×200)

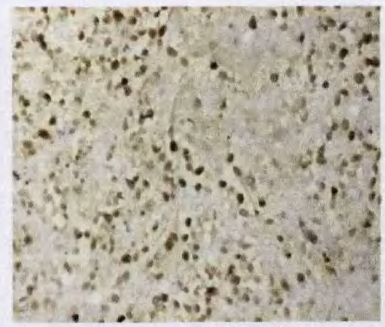


图 6 紫杉醇药物组 Ki-67 免疫组化(×200)

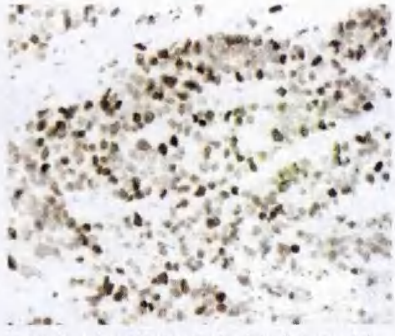


图 7 PLM 组 Ki-67 免疫组化（×200）

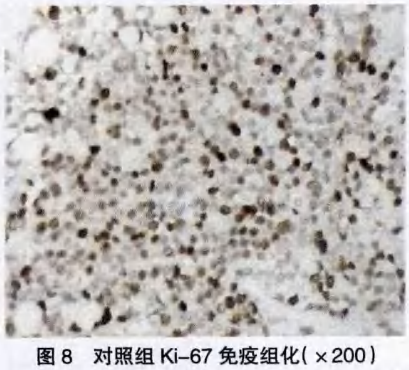


图 8 对照组 Ki-67 免疫组化（×200）

剂作为一种新型的药物载体，具有靶向传输药物及局部靶向释药达到治疗疾病的目的[7,8]。研究表明[5]，当自制的 PLM 到达靶组织或器官时，用一定能量超声定位辐照该部位，可引起载药微泡的破坏，紫杉醇即可释放，使辐照局部药物分布增多，客观上实现了其靶向治疗的作用；并且由于微气泡在血循环中的稳定性好，可减少药物到达靶器官前在体内的破坏，提高了靶组织的药物浓度，增强了治疗的靶向性。同时因具有较大副作用的抗癌药物被置于微气泡内，延缓了药物的释放，也大大降低了化疗药物对其他组织或器官的损害，从而降低了化疗药物全身的毒副反应。

本研究数据证实在两组动物体内的总药量相同时，超声破坏 PLM 对移植瘤的抑制作用优于单纯紫杉醇药物抗肿瘤的效果。表明超声定位辐照能使 PLM 集中到肿瘤区域破坏并释放出所携带的紫杉醇，紫杉醇在肿瘤组织内高浓度聚集，实现了化疗的靶向性，加之超声空化所致的生物学效应作用于肿瘤组织，共同抑制了肿瘤的生长，增强了疗效。而单纯静脉给药使药物在动物体内均匀分布，肿瘤局部并无特异性药物的聚集，故抑瘤作用弱于前者。在本研究中 PLM 组抑瘤效应与对照组比较并无统计学意义（$P>0.05$），与微气泡的性质比较稳定有关。体外实验证实[9]，没有被辐照过的微气泡相对较稳定，对卵巢癌细胞 48 h 的抑制率仅为 13.18%。以上研究表明超声联合 PLM 具有协同抗肿瘤作用，并且在超声辐照下载药微气泡能实现定位给药的靶向治疗作用。

细胞核相关抗原 Ki-67 是增殖性细胞核的标记物，被用以估计肿瘤细胞的增殖能力。本研究显示除 PLM 组外，各治疗组均能抑制肿瘤细胞增殖，PLM 辐照组抑制肿瘤细胞增殖能力强于紫杉醇药物组。研究还显示在电镜下观察可见 PLM 辐照组肿瘤组织中出现了较多的凋亡细胞，表明其抑制卵巢癌细胞生长的机制之一可能是通过诱导肿瘤细胞凋亡来发挥作用的。现有的研究已证实，超声空化过程可把声场能量高度集中于极小的空化泡内，并在空化泡破裂瞬间将其释放，形成局部高温、高压、强冲击波射流等极端物理条件，使其周围的组织细胞遭到破坏，引起细胞凋亡；同时紫杉醇药物也可通过细胞毒作用诱导细胞凋亡，共同达到抑制细胞增殖的目的。

综上所述，本研究在裸鼠移植瘤模型上证实了超声定位破坏 PLM 的方法对卵巢癌的生长有较强的体内抑瘤效应，可通过诱导卵巢癌细胞的凋亡，直接或间接抑制卵巢癌细胞的增殖，并且能实现定位给药的靶向治疗作用，显示了良好的临床应用前景。

参 考 文 献

[1] Gelderblom H, Verweij J, Nooter K, et al. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation[J]. Eur J Cancer, 2001, 37(13): 1590-1598.

[2] Klooer J S, den Bakker M A, Gelderbolm H, et al. Fatal outcome of a hypersensitity reactions to paclitaxel: a critical review of premedication regimens[J]. Br J Cancer, 2004, 90(2): 304-305.

[3] 杨春江，王志刚，李兴升，等. 载药脂质微气泡的制备及应用[J]. 中华超声影像学杂志，2006，15(7)：535-538.

[4] 杨春江，王志刚，赖天霞，等. 载紫杉醇脂质微气泡体内外毒性研究研究[J]. 中国超声医学杂志，2006，22(7)：481-483.

[5] 杨春江，王志刚，李 攀，等. 载药脂质微泡造影剂在小鼠体内的药代动力学及定位释放实验研究[J]. 临床超声医学杂志，2006，8(9)：513-516.

[6] Sawaoka H, Tsuji S, Tsujii M, et al. Cyclooxygenase inhibitors suppress angiogenesis and reduce tumor growth in vivo[J]. Lab Invest, 1999, 79(12): 1469-1477.

[7] 费小非，曹心珂，汤致强，等，超声微泡造影剂在肿瘤治疗方面的研究进展[J]. 中国新药杂志，2006，15(13)：1057-1060.

[8] 汪朝霞，王志刚. 超声微泡造影剂携基因或药物治疗研究[J]. 中国介入影像与治疗学，2006，3(4)：306-308.

[9] 刘亚敏，孙江川，王志刚，等，超声破坏载紫杉醇微泡对卵巢癌细胞株 SKOV3 的抑制增殖及诱导凋亡作用[J]. 中国超声医学杂志，2007，5(23)：340-342.

（责任编辑：关蕴良）