

基础研究

载多烯紫杉醇脂质微泡增强人胰腺癌 BxPC3 细胞的增殖抑制和凋亡诱导作用

杨健¹,康娟²,曾妍³,李奥⁴,吴小翎¹,王志刚⁴重庆医科大学附属第二医院¹消化内科,²肝病中心,³精神心理科,重庆 400010;⁴重庆医科大学超声影像学研究所,重庆 400010

摘要:目的 制备载多烯紫杉醇脂质超声微泡,并研究其联合超声靶向微泡破裂技术(UTMD)对人胰腺癌 BxPC3 细胞的增殖抑制和凋亡诱导作用。方法 采用机械振荡法制备载多烯紫杉醇的脂质超声微泡,检测其粒径、zeta 电位、载药量、封装率等性质,MTT 法检测 IC₅₀,CCK-8 法检测细胞毒性作用,流式细胞术检测细胞周期,Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率,TUNEL 法检测细胞凋亡情况,并与单纯多烯紫杉醇药物组、多烯紫杉醇药物+超声组等进行比较。结果 载多烯紫杉醇超声微泡平均粒径 1.6 μm,微泡的封装率为 64.2%,平均载药量为 16.1%;载多烯紫杉醇脂质微泡组的细胞毒性作用强于其他各组($P<0.01$),细胞凋亡率高于其他各组($P<0.01$);载多烯紫杉醇脂质微泡组 G₂/M 期细胞增多,与其他组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。结论 载多烯紫杉醇脂质微泡联合 UTMD 能够增加 G₂/M 期细胞阻滞,增强对 BxPC3 细胞的增殖抑制和凋亡诱导作用;载多烯紫杉醇脂质微泡有望成为一种治疗胰腺癌的新型药物载体。

关键词:多烯紫杉醇;凋亡;微泡;胰腺癌

中图分类号:R736.7 文献标志码:A 文章编号:1673-4254(2012)05-0618-04

doi: 10.3969/j.issn.1673-4254.2012.05.006

http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1627.R.20120426.1718.024.html

Enhanced proliferation inhibition and apoptosis-inducing effects of docetaxel-loaded lipid microbubble on human pancreatic cancer cells *in vitro*YANG Jian¹, KANG Juan², ZENG Yan³, LI Ao⁴, WU Xiaoling¹, WANG Zhigang⁴¹Departement of Gastroenterology, ²Liver Disease Center, ³Departement of Psychology, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; ⁴Institut of Ultrasound Imaging, Chongqing Medical University, 400010, China

Abstract: Objective To investigate the proliferation inhibition and apoptosis-inducing effect of docetaxel-loaded lipid microbubble (DLLM) combined with ultrasound targeted microbubble destruction (UTMD) on human pancreatic cancer cells *in vitro*. **Methods** DLLM was prepared by mechanical vibration, and its physical properties were characterized. The median inhibitory concentration (IC₅₀) of DLLM was determined with MTT assay, and its cytotoxicity evaluated with cell counting Kit-8 (CCK-8) assay. The effects of docetaxel, DLLM, and DLLM combined with UTMD on cell cycle and apoptosis of BxPC3 cells were tested with flow cytometry (FCM) and TUNEL assay, respectively. **Results** DLLM had an average size of 1.6 μm, and the average drug entrapment efficiency and drug-loaded amount was 64.2% and 16.1%, respectively. Compared with the control groups, DLLM had a significantly enhanced cytotoxic effect ($P<0.01$) and caused an increased apoptosis rate in BxPC3 cells ($P<0.01$). Cell cycle analysis showed that DLLM combined with UTMD resulted in a significantly higher percentage of cells with G₂/M phase arrest than the other treatments ($P<0.01$). **Conclusions** DLLM combined with UTMD can increase G₂/M phase arrest and enhance the proliferation inhibition and apoptosis-inducing effect on BxPC3 cells, and can serve as an effective drug delivery system for pancreatic cancer therapy.

Keywords: docetaxel; apoptosis; microbubbles; pancreatic cancer

胰腺癌是一种常见的恶性肿瘤,其发病隐匿、恶性程度高,易发生早期转移,患者5年生存率很低。随着世界人口总数的不断增长和老龄化问题的日益严重,胰腺癌的发病率不断升高,在中国胰腺癌造成的社会和经

收稿日期:2012-03-11

基金项目:国家自然科学基金(81130025);国家自然科学基金委员会科学部主任基金(81041064)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81130025; 81041064).

作者简介:杨健,博士,E-mail: yj1984ren@126.com

通讯作者:吴小翎,教授,E-mail: cqwxiaoling@yahoo.cn;王志刚,教授,E-mail: wzg62942443@163.com

济负担不断加重,因此研究新型、有效的胰腺癌综合治疗方法迫在眉睫^[1-2]。近年来,超声分子影像学技术不断发展,为肿瘤诊断和治疗提供了新的研究思路^[3]。超声微泡造影剂作为一种新型的药物和基因载体,具有安全、疗效好、稳定性高等优势,且得到了多项研究证实^[4-6]。前期研究发现,载多烯紫杉醇脂质微泡(DLLM)物理性质较好,超声辐照能够促使微泡包裹的药物释放^[7]。本实验进一步研究DLLM联合超声靶向微泡破裂技术(UTMD)对人胰腺癌细胞株BxPC3的增殖抑制和凋亡诱导作用,为探讨DLLM联合UTMD在胰腺癌治疗方面的应用价值提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与主要仪器

1.1.1 实验材料 二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、磷脂酸(DSPA)购自Sigma;多烯紫杉醇(DTX)购自大连美仑有限公司;人胰腺癌 BxPC3 细胞购自中国科学院上海细胞库;胎牛血清购自 Gibco; Cell Counting Kit-8、TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒购自碧云天生物技术研究所;细胞周期检测试剂盒、Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物公司。

1.1.2 主要仪器 CGZZ 型超声基因转染治疗仪(重庆医科大学超声影像学研究所研制), YJT-银汞胶囊调压器(上海医疗器械股份有限公司), 倒置荧光显微镜(Leica), 酶标仪(BD), Zetasizer Nano ZS90(Malvern)。

1.2 实验方法

1.2.1 DLLM 的制备和性质测定 称取 DTX、DPPE、DPPC、DSPA 等材料与 PBS、甘油以适当比例混合, 在 40 °C 水浴中孵育 30 min, 抽去空气, 冲入全氟丙烷气体, 采用机械振荡法 45 s 后收集得到 DLLM。在显微镜下观察所制备的 DLLM 的分布、形态、大小等情况, 采用 Malvern Zetasizer Nano ZS90 测量微泡粒径、zeta 电位。用甲醇溶解 DTX, 用紫外分光光度法计算载药量和包封率^[7]。

1.2.2 MTT 法测定 DTX 对 BxPC3 细胞增殖的影响 取对数生长期 BxPC3 细胞, 消化后重悬, 以 1×10^4 /孔接种于 96 孔板, 每孔加入 180 μ l 细胞悬液, 细胞贴壁后加入不同浓度的 DTX 20 μ l, 使药物终浓度为 0.01、0.1、1、10、100 nmol/L, 每孔设置 6 个平行孔, 同时设置空白对照和溶剂对照组。分别培养 24、48、72 h 后用 MTT 法测定各孔在 570 nm 波长的吸光度值, 并用公示计算: 细胞生长抑制率 = $1 - (\text{处理组 } D_n \text{ 值} / \text{对照组 } D_n \text{ 值}) \times 100\%$, 再用 Bliss 法计算半数抑制浓度 (IC₅₀) 值。

1.2.3 细胞分组和处理 取对数生长期的 BxPC3 细胞, 消化重悬后接种于细胞培养板, 继续培养 24 h 待细胞贴壁, 实验分为 5 组: 空白对照组, DTX 组, DTX+超声组, DLLM 组, DLLM+超声组。每组设置 3 个平行孔; 药物和 DLLM 以 IC₅₀ 的药物浓度给药; DTX+超声组, DLLM+超声组以 0.5 W/cm² 的超声声强辐照 45 s。

1.2.4 CCK-8 法检测细胞毒性作用 按上述方法处理各组细胞后, 将细胞放入 5% CO₂ 培养箱继续培养 24 h, 每孔加入 10 μ l CCK-8 试剂, 37 °C 培养箱中培养继续 2 h, 用酶标仪检测在 450 nm 处的吸光度值。

1.2.5 流式细胞术检测细胞周期 处理各组细胞后, 继续培养 24 h, PBS 缓冲液洗涤 2 次, 消化离心, 收集每组细胞并调整浓度为 1×10^6 /ml, 用 4 °C 预冷的 70% 乙醇固定, 4 °C 过夜, PBS 缓冲液洗涤后加入 100 μ l RNase, 37 °C 水浴 30 min, 加入终浓度 50 μ g/ml 的 PI 染液混匀,

4 °C 避光 30 min 后上流式细胞仪检测, 激发波长 488 nm, 用 Modifit 软件分析细胞周期。

1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡 按分组情况处理各组细胞后, 继续培养 24 h, 用 4 °C 预冷的 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 消化离心, 用 250 μ l 结合缓冲液重悬细胞, 调节各组细胞浓度为 1×10^6 /ml, 取 100 μ l 细胞悬液于 5 ml 流式管中, 加入 5 μ l Annexin V-FITC 和 10 μ l, 20 μ g/ml 的 PI 溶液, 混匀后避光室温孵育 15 min, 在反应管中加入 400 μ l PBS 缓冲液, 然后用流式细胞仪分析, 并计算 S 期细胞比例 (SPF), $SPF = S / (G_0/G_1 + S + G_2/M) \times 100\%$; 细胞增殖指数 (PI) = $(S + G_2/M) / (G_0/G_1 + S + G_2/M) \times 100\%$ 。

1.2.7 TUNEL 检测细胞凋亡 BxPC3 细胞按分组情况处理后, 培养 24 h, 室温下用 4% 多聚甲醛固定细胞 1 h。然后 PBS 浸洗两次, 5 min/次。0.1% Triton X-100 处理细胞 5 min。PBS 浸洗两次, 每次 5 min。各孔滴加 50 μ l 的 TUNEL 反应液, 于 37 °C、潮湿、黑暗的环境孵育 1 h。用 PBS 清洗 3 次, 然后每孔加入 0.01 mg/ml DAPI 缓冲液 50 μ l, 室温黑暗环境中作用 5 min。用 PBS 清洗 5 次, 在荧光显微镜下拍照。

1.3 统计学处理

计量资料以均数±标准差表示, 应用 SPSS18.0 统计软件和 Microsoft Excel 2003 等进行统计分析, 计量资料组间比较用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DLLM 的性质和参数

光镜下观察制备的 DLLM 药物微泡形态规则, 呈球形, 粒径均匀, 表面光滑, 分散情况好, 未见明显的微泡黏连或成团现象(图 1), DLLM 平均粒径为 1.6 μ m, Zeta 电位 -5.6 mV。采用紫外分光光度法测得其包封率为 64.2%, 平均载药量为 16.1%。

2.2 MTT 法测定 DTX 对 BxPC3 细胞增殖的影响

MTT 法检测不同浓度的 DTX 作用于 BxPC3 细胞 24、48、72 h 的结果表明, DTX 能显著抑制人胰腺癌 BxPC3 细胞的增殖, 24 h 的 IC₅₀ 为 1 nmol/L, 其抑制作

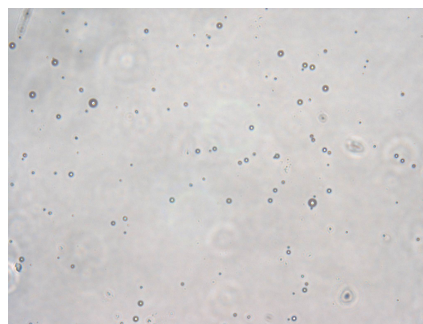


图1 载药微泡光镜观察

Fig.1 Morphology of DLLM under microscope (Original magnification: $\times 200$).

用有较明显的剂量效应及时间效应关系。

2.3 CCK-8法细胞毒性检测结果

分组处理24 h后的CCK-8检测结果如图2所示,结果表明 DTX 组, DTX+超声组, DLLM+超声组对 BxPC3 细胞均有细胞毒性作用, DLLM+超声组的细胞毒性作用明显强于单纯的 DTX 组以及 DTX+超声组 ($P<0.01$)。单纯 DLLM 组与对照组比较, 以及 DTX 组与 DTX+超声组比较, 无显著性差异 ($P>0.05$)。

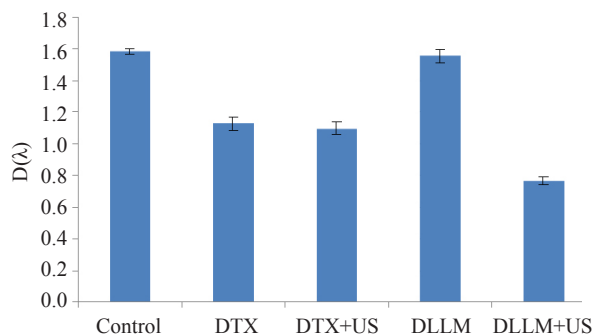


图2 CCK-8结果显示DLLM增强BxPC3细胞毒性作用
Fig.2 Cytotoxic effect of DLLM on BxPC3 cells detected by CCK-8 assay.

2.4 流式细胞术检测细胞周期和凋亡率

FCM检测细胞周期结果显示:与对照组细胞比较, 单纯 DTX 组、DTX+超声组、DLLM+超声组 G_2/M 期细胞比例升高, 分别为 $(17.23\pm 1.26)\%$ 、 $(17.95\pm 0.64)\%$ 和 $(25.44\pm 1.86)\%$, 其中 DLLM+超声组 G_2/M 期阻滞作用更强, 与其他组比较差异有统计学意义 ($P<0.01$)。DLLM+超声组 SPF 和 PI 明显降低, 分别为 $(5.41\pm 0.70)\%$ 和 $(30.85\pm 1.79)\%$, 与其他组相比差异有显著性

($P<0.01$)。

Annexin V-FITC/PI 双染凋亡检测结果显示:各处理组 BxPC3 细胞在处理 24 h 后均有不同程度凋亡(图 3), 其中 DLLM+超声组凋亡率最高, 为 $(12.23\pm 1.73)\%$; DTX +超声组、单纯 DTX 组次之, 分别为 $(7.94\pm 1.71)\%$ 和 $(7.39\pm 0.92)\%$; 单纯 BxPC3 细胞组和单纯 DLLM 组凋亡率分别为 $(0.45\pm 0.35)\%$ 和 $(0.96\pm 0.45)\%$ 。单纯 BxPC3 细胞组和单纯多烯紫杉醇微泡组无显著性差异 ($P>0.05$), 其余各组两两差别均有统计学意义 ($P<0.01$)。

2.5 TUNEL 检测细胞凋亡结果

凋亡的 BxPC3 细胞经过标记后, 在相应激发光下呈绿色, 未发生凋亡的细胞呈蓝色。根据发出绿色荧光的细胞核占有细胞核的比例衡量细胞凋亡情况, 发现 DLLM+超声组的凋亡细胞率明显高于单纯 DTX 组以及 DTX+超声组(图 4), 差异有显著性 ($P<0.01$)。

3 讨论

超声微泡造影剂是一种新型的肿瘤诊断和治疗手段, 利用脂质超声微泡能够包载药物或基因的特性, 可以在联合超声靶向微泡破裂技术的基础上, 通过在特定区域击碎微泡, 释放药物, 使化疗药物靶向性地作用于肿瘤组织, 既可避免损伤正常组织, 还可以通过超声空化效应使血管内皮细胞间隙增宽、血管壁通透性增大、提高肿瘤细胞膜通透性, 从而促进药物或基因进入细胞, 提高作用于靶细胞的有效药物浓度, 增强疗效^[8-9]。因此超声微泡造影剂技术为肿瘤综合治疗提供了颇具优势和吸引力的新研究途径。

目前胰腺癌早期诊断率和手术切除率较低, 现有的

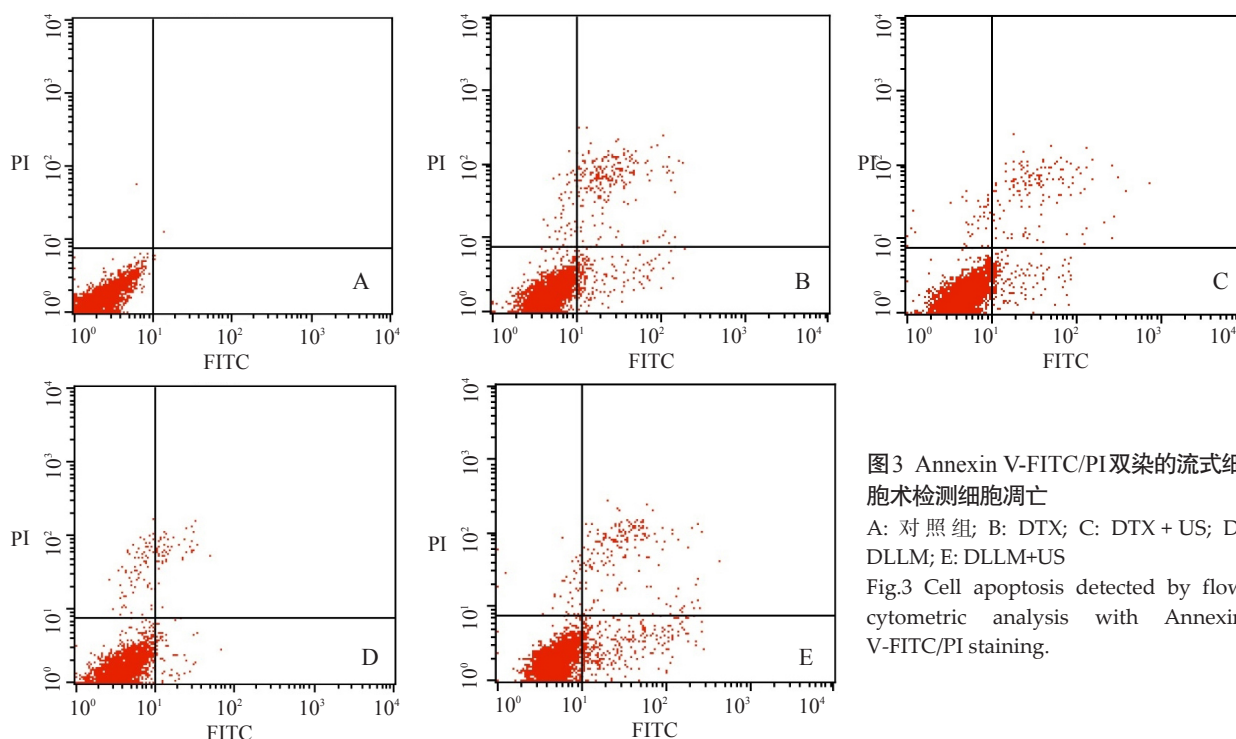


图3 Annexin V-FITC/PI 双染的流式细胞术检测细胞凋亡
A: 对照组; B: DTX; C: DTX + US; D: DLLM; E: DLLM+US
Fig.3 Cell apoptosis detected by flow cytometric analysis with Annexin V-FITC/PI staining.

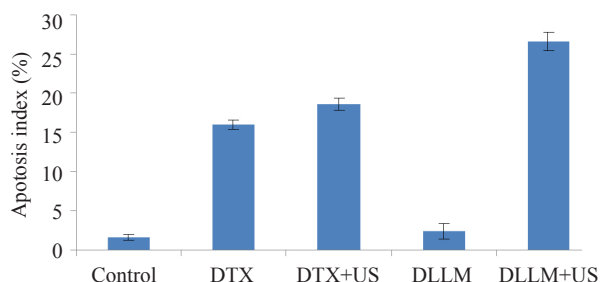


图4 TUNEL检测细胞凋亡情况

Fig.4 Apoptosis index of the 5 groups detected by TUNEL assay.

化疗和放疗效果欠佳^[2],急需新方法以提高早期诊断率和疗效。近期研究发现,多烯紫杉醇用于胰腺癌联合化疗可以提高患者的耐受性和生存质量^[10-11]。多烯紫杉醇是紫杉烷类新型抗肿瘤药物,其作用机制是增强微管蛋白聚合作用,且抑制微管解聚,破坏肿瘤细胞的有丝分裂,因而具有良好的抗肿瘤活性;多烯紫杉醇的细胞内浓度是紫杉醇的3倍,在细胞内滞留时间更长,且多烯紫杉醇对顺铂、5Fu或紫杉醇耐药的细胞株,不产生交叉耐药^[12]。虽然DTX应用于胰腺癌化疗具有上述许多优势,我们也注意到多烯紫杉醇的水溶性较差,限制了其临床应用,而且多烯紫杉醇在肿瘤治疗中有肺毒性等潜在危险^[13-14],故本实验结合DTX脂溶性强的特点,通过磷脂材料制备包载有DTX的脂质微泡,利用UTMD的靶向控释作用提高有效药物浓度,探讨了DLLM联合超声辐照对胰腺癌细胞增殖和凋亡的作用。

本实验发现DTX对人胰腺癌BxPC3细胞有明显的细胞毒性作用;DLLM联合UTMD能够明显降低BxPC3细胞的SPF和PI,使肿瘤细胞活性显著降低,同时能增强对BxPC3细胞的G₂/M期阻滞作用,提高BxPC3细胞凋亡率,具有增强对BxPC3细胞的增殖抑制和凋亡诱导作用;且在同样的药物剂量下,DLLM联合UTMD作用强于单纯使用DTX以及DTX联合超声,同时DTX与DTX联合超声两种处理的差异无显著性,考虑其原因可能与超声靶向微泡破裂技术使载药微泡发生空化效应有关,适当强度和持续时间的超声辐照可在短时间内提高靶细胞膜的通透性,同时不会过度损伤细胞,有利于提高有效药物浓度,从而增强药物的细胞毒性和凋亡诱导作用。

美国FDA资料显示,许多新药由于药物毒性和体内分布等原因,没能通过III期临床试验而被淘汰;而DLLM性质比较稳定,在没有施加适当超声辐照时,单纯的DLLM组与对照组细胞在细胞活性、细胞周期和细胞凋亡率等检测结果方面没有显著性差异;同时,DLLM作为一种超声造影剂,可以在谐波状态下观察肿瘤的显影情况,上述结果均支持DLLM联合UTMD可以较好的实现化疗药物的靶向控释,有利于减少药物毒副作用。另一方面,我们认识到需要不断研发新的微泡

成膜材料,从而进一步提高化疗药物的包封率,同时,微泡辐照参数的优化也有待于更深入的研究。

综上所述,DLLM联合UTMD能够明显抑制人胰腺癌BxPC3细胞增殖并促进细胞凋亡,在等量药物剂量下达到药物有效浓度更高,有利于减少化疗药物的毒副作用,有望成为一种用于胰腺癌综合治疗的新型药物载体,值得进一步研究开发。

参考文献:

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] Chen X, Ma S, Zhang Z. Analysis of clinical characteristics of pancreatic carcinoma in northern China[J]. Pancreas, 2010, 39(7): 1116-8.
- [3] Hauff P, Reinhardt M, Foster S. Ultrasound contrast agents for molecular imaging[J]. Hand Exp Pharmacol, 2008, 185(1): 223-45.
- [4] Mannaris C, Averkiou MA. Investigation of microbubble response to long pulses used in ultrasound-enhanced drug delivery [J]. Ultrasound Med Biol, 2012, 38(4): 681-91.
- [5] Chen S, Shimoda M, Wang MY, et al. Regeneration of pancreatic islets *in vivo* by ultrasound-targeted gene therapy [J]. Gene Ther, 2010, 17(11): 1411-20.
- [6] Tinkov S, Coester C, Serba S, et al. New doxorubicin-loaded phospholipid microbubbles for targeted tumor therapy: in-vivo characterization[J]. J Controlled Release, 2010, 148(3): 368-72.
- [7] Kang J, Wu X, Wang Z, et al. Antitumor effect of docetaxel-loaded lipid microbubbles combined with ultrasound-targeted microbubble activation on VX2 rabbit liver tumors[J]. J Ultrasound Med, 2010, 29(1): 61-70.
- [8] Klivanov AL, Shevchenko TI, Raju BI, et al. Ultrasound-triggered release of materials entrapped in microbubble-liposome constructs: a tool for targeted drug delivery[J]. J Controlled Release, 2010, 148(1): 13-7.
- [9] Fang JY, Hung CF, Hua SC, et al. Acoustically active perfluorocarbon nanoemulsions as drug delivery carriers for camptothecin: drug release and cytotoxicity against cancer cells[J]. Ultrasonics, 2009, 49(1): 39-46.
- [10] Katopodis O, Polyzos A, Kentepozidis N, et al. Second-line chemotherapy with capecitabine (Xeloda) and docetaxel (Taxotere) in previously treated, unresectable adenocarcinoma of pancreas: the final results of a phase II trial[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2011, 67(2): 361-8.
- [11] Blanke CD, Beer TM, Todd K, et al. Phase II study of calcitriol-enhanced docetaxel in patients with previously untreated metastatic or locally advanced pancreatic cancer[J]. Invest New Drugs, 2009, 27(4): 374-8.
- [12] Herbst RS, Khuri FR. Mode of action of docetaxel - a basis for combination with novel anticancer agents [J]. Cancer Treat Rev, 2003, 29(5): 407-15.
- [13] Alsamrai S, Charpidou AG, Matthay RA, et al. Pneumonitis related to docetaxel: case report and review of the literature[J]. *In vivo*, 2009, 23(4): 635-7.
- [14] Nagata S, Ueda N, Yoshida Y, et al. Severe interstitial pneumonitis associated with the administration of taxanes [J]. J Infect Chemother, 2010, 16(5): 340-4.

(编辑:黄开颜)