

· 生物磁学 ·

新型磁性纳米脂质复合物对肝癌细胞和肝细胞的作用研究 *

骆仁娜¹ 陶立坚^{1△} 何 斌² 陆苗苗¹ 府 晓¹ 周高峰³ 王小宜³

(1 中南大学湘雅医院内科 湖南 长沙 410008 2 四川大学生物材料工程研究中心 四川 成都 610000 ;

3 中南大学湘雅医院放射科 湖南 长沙 410008)

摘要 目的 研究新型磁性纳米脂质复合物对肝癌细胞和肝细胞的作用。方法 将肝癌细胞(Hep-G2)和肝细胞(L-02)根据加入的不同浓度新型纳米脂质复合物,各自分为空白对照组、不同浓度含铁脂质体组、空脂质体组,用MTT法观察各组细胞毒性,筛选出适合的浓度和时间;用普鲁士蓝染色、电镜检测观察各组细胞吞噬情况;用原子分光光度计观察各组细胞内铁含量;用细胞磁共振观察新型纳米脂质复合物体外显影效果。结果:新型磁性纳米脂质复合物含铁浓度在 $0.238\mu\text{g/ml}$ 以上时,24小时有较强的细胞毒性,对肝癌细胞和肝细胞的抑制率均超过40%,故以下实验选择含铁浓度在 $0.238\mu\text{g/ml}$ 以下,肝癌细胞和肝细胞与各浓度新型磁性纳米脂质复合物共同培养,24小时普鲁士蓝染色最高阳性率分别为5.5%和1.25%,24小时细胞内铁含量最高值分别为 0.675pg/cell 和 0.460pg/cell ,24小时电镜观察肝癌细胞和肝细胞空白对照组均未见颗粒样物质,各含铁脂质体组和空脂质体组均可见颗粒样物质,24小时肝癌细胞和肝细胞磁共振感兴趣区均未见明显信号表达。结论:新型磁性纳米脂质复合物含铁浓度在 $0.238\mu\text{g/ml}$ 以下时,24小时细胞毒性较小,肝癌细胞对新型磁性纳米脂质复合物的吞噬作用稍高于肝细胞对其的吞噬,进入细胞内的新型磁性纳米脂质复合物含铁量低,体外显影效果不佳。

关键词 磁性 纳米脂质复合物 肝癌细胞 肝细胞

中图分类号 R735.7 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2012)05-801-09

Study of New Magnetic Nanoliposomes for Hepatoma Carcinoma Cell and Hepatocyte*

LUO Ren-na¹, TAO Li-jian^{1△}, HE Bin², LU Miao-miao¹, FU Xiao¹, ZHOU Gao-feng³, WANG Xiao-yi³

(1 Department of internal medicine, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008 China ;

2 Engineering Research Center in Biomaterials, Sichuan University, Sichuan, 610000 China ;

3 Radiology department, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008 China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of new magnetic nanoliposomes for hepatoma carcinoma cell and hepatocyte.

Methods: Hepatoma carcinoma cell (Hep-G2) and hepatocyte (L-02) were respectively mixed with new magnetic nanoliposomes of different concentration. Hepatoma carcinoma cell(Hep-G2) and hepatocyte(L-02) were divided into several groups: blank control group, different iron concentration nanoliposome groups, without iron concentration nanoliposome group. Cell toxicity was detected by methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) method, screening suitable concentration and time. Cell phagocytosis was detected by Prussian blue stain and electron microscope. Cell iron content was detected by atomic absorption spectrophotometer. The developing effect of new magnetic nanoliposomes in vitro was detected by magnetic resonance imaging (MRI). **Results:** Iron content of new magnetic nanoliposomes above $0.238\mu\text{g/ml}$, 24 hours cell toxicity was obviously. Inhibition ratio of hepatoma carcinoma cell (Hep-G2) and hepatocyte (L-02) were surpassing 40%. The suitable concentration was below $0.238\mu\text{g/ml}$. The highest positive rate of 24 hours Prussian blue stain respectively were 5.5% and 1.25%. 24 hours the highest cell iron content respectively were 0.675pg/cell and 0.460pg/cell . There was no particle material in blank control group and without iron concentration nanoliposome group. There was a little particle material different iron concentration nanoliposome groups. There was no signal expression of hepatoma carcinoma cell (Hep-G2) and hepatocyte (L-02) in 24 hours MRI interesting area. **Conclusion:** Iron concentration of new magnetic nanoliposomes below $0.238\mu\text{g/ml}$, 24 hours cell toxicity was low; The rate of hepatoma carcinoma cell phagocytosis was higher than hepatocyte; Inside cell iron content of new magnetic nanoliposomes was low, and the developing effect in vitro with magnetic resonance imaging was not good.

Key words: Magnetism; Nanoliposomes; Hepatoma carcinoma cell; Hepatocyte

Chinese Library Classification(CLC): R735.7 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)05-801-09

前言

肝癌是消化系统恶性肿瘤的一种类型,是影响人类健康的

主要杀手之一。其患病率居高不下,排全球肿瘤患病率的第五位^[1]。80%的肝癌发生在发展中国家^[2]。中国是人口大国,亦是肝癌的好发国家,占发展中国家肝癌发生率的55%^[3]。目前临床上

* 基金项目 国家 863 计划项目资助(2007AA021801-8)

作者简介 骆仁娜(1984-),女,硕士研究生 E-mail: lucia233@163.com

△通讯作者 陶立坚 Email: taolj@xysm.net

(收稿日期 2011-08-23 接受日期 2011-09-18)

肝癌的诊断方法主要以病理诊断为金标准,但取材不易,尤其对于早期肝癌^[4]。肝癌定性诊断主要依赖于甲胎蛋白(α -fetoprotein, AFP)检查。但 30%-40%的肝癌病例 AFP 阴性,特异性不高。医学影像学恰好弥补了这一不足,其中磁共振检查无电离辐射,无需使用碘造影剂及可以三维成像,在肝癌诊断方面的价值比 CT 检查稍胜一筹。磁性纳米脂质复合物是将纳米脂质体与适当的磁活性成分配制形成的稳定系统,在足够强的外磁场作用下可使粒子向病变部位移动,逐渐地向靶点聚集,被磁共振所标记,达到诊断的目的。是一种高效、速效、低毒的新型制剂^[5]。

本实验磁性纳米脂质复合物以四氧化三铁纳米粒子为核(其制备方式已申请专利),外层用新型阳离子脂质包裹,具有被动靶向作用。本实验拟研究肝癌诊断磁性纳米脂质复合物的细胞吞噬行为、细胞毒性及其体外显影效果,为其进一步体内试验做前期准备。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

人肝癌细胞株(Hep-G2),由卫生部肝胆肠外科研究中心惠赠,人肝细胞株(L-02),由中南大学湘雅医学院中心实验室惠赠。磁性纳米脂质复合物、空脂质体,来自四川大学生物材料工程研究中心。RPMI1640 培养基,购于美国 Gibco 公司。DMEM 培养基,购于美国 Hyclone 公司。普鲁士蓝染色 HT-20 试剂盒,购于美国 Sigma 公司。原子吸收分光光度计,购于北京普析通用仪器有限责任公司。倒置显微镜、透射电镜,购于日本 Olympus 公司。SONATA 1.5T 磁共振扫描仪,购于德国 SIMENS 公司。

1.2 不同浓度磁性纳米脂质复合物及空脂质体的配制

磁性纳米脂质复合物含铁量为 $9.500\mu\text{g/ml}$ 。使用时分别用 DMEM/RPMI1640 培养基按 9:1 的比例稀释 10 倍,浓度为 $0.950\mu\text{g/ml}$ 。接着对半稀释,最低浓度稀释至 $0.030\mu\text{g/ml}$ 。空脂质体亦按上述方法用相应培养基稀释 10 倍。 $0.22\mu\text{m}$ 针式滤器过滤除菌, 4°C 保存备用。

1.3 MTT 实验

取处于对数生长期的细胞接种于 96 孔板中,每孔加入细胞悬液 $100\mu\text{l}$,接种密度为 $2 \times 10^4/\text{ml}$ 个, 37°C 、5% CO_2 孵箱中培养,待细胞贴壁后弃上清,各干预组分别加入用无血清的培养基配制的不同浓度的新型磁性纳米脂质复合物,空脂质体组加入用无血清的培养基稀释 10 倍的空脂质体。空白对照组只加含无血清的 DMEM/RPMI1640 培养基,每一浓度设 5 个复孔,于 37°C 、5%的 CO_2 孵箱中培养,分别培养 8、12、24h 后每孔加入 MTT $20\mu\text{l}$,再置孵箱中 4h 后取出培养板,弃上清,每孔加 DMSO $150\mu\text{l}$,用酶标仪上 570nm 处,测定各孔吸光度值(optical density, OD),吸光度值与细胞增殖程度成正比。

1.4 普鲁士蓝染色

取处于对数生长期的细胞接种于 24 孔细胞培养板中,培养孔内放置玻片。每孔加入细胞悬液 $500\mu\text{l}$,接种密度为 $1 \times 10^5/\text{ml}$, 37°C 、5% CO_2 孵箱中培养,待细胞贴壁后弃上清,将细胞分为空白对照组、不同浓度新型磁性纳米脂质复合物组、空脂质体组。分别于加药后 8、12、24 小时倒去培养基, D-Hanks 润

洗 3 次,每次 5 min, 4%多聚甲醛室温固定 30min,加入 2%等量亚铁氰化钾和 6%盐酸混合液 10 分钟,去离子水洗 3 次;品红复染核 1 分钟,再用去离子水洗 3 次;自然风干后甘油封片;于倒置显微镜 200 倍视野下观察细胞颜色和细胞形态,计数阳性率。

1.5 细胞内铁含量检测

取处于对数生长期的细胞接种于 6 孔细胞培养板中,每孔加入细胞悬液 2ml,接种密度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 37°C 、5% CO_2 孵箱中培养,待细胞贴壁后弃上清,将细胞分为空白对照组、不同浓度新型磁性纳米脂质复合物组、空脂质体组。于加药 24 小时后倒掉孔中液体, D-Hanks 液洗 3 次;加入 0.05%胰酶-EDTA 消化细胞,将细胞转移至离心管中, 800 转离心后倒上清,按体积比 3:1 加入高氯酸硝酸混合液,置于 60°C 温箱 3 小时;定容后原子吸收分光光度计测定读数。

1.6 电镜检测

取处于对数生长期的细胞接种于 6 孔细胞培养板中,每孔加入细胞悬液 2ml,接种密度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 37°C 、5% CO_2 孵箱中培养,待细胞贴壁后弃上清,将细胞分为空白对照组、不同浓度新型磁性纳米脂质复合物组、空脂质体组。于加药 24 小时后倒掉孔中液体, D-Hanks 液洗 3 次;加入 0.05%胰酶-EDTA 消化细胞,将细胞转移至 EP 管中, 800 转离心后倒上清,缓慢倒入 2.5%戊二醛固定 24 小时, 2%锇酸固定 2 小时;梯度脱水后浸泡、包埋、切片,醋酸铀、硝酸铅双重染色,透射电镜观察细胞形态。

1.7 细胞磁共振检测

取处于对数生长期的细胞接种于 6 孔细胞培养板中,每孔加入细胞悬液 2ml,接种密度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 37°C 、5% CO_2 孵箱中培养,待细胞贴壁后弃上清,将细胞分为空白对照组、不同浓度新型磁性纳米脂质复合物组、空脂质体组。于加药 24 小时后倒掉孔中液体, D-Hanks 液洗 3 次;加入 0.05%胰酶-EDTA 消化细胞,将细胞转移至 EP 管中, 800 转离心后倒上清,培养基重悬细胞后进行细胞磁共振扫描。参数设定:成像序列为梯度回波 T2 加权 (GRE T2*WI)。参数:TR 800ms, TE 26ms, SL: 3mm, FOV 230×230 , 翻转角 20° , 矩阵 $256 \times 256 \times 75\%$ 。

1.8 统计学分析

所有实验数据以 $\bar{X} \pm S$ 表示,数据分析采用 SPSS 16.0 统计软件,组间比较采用单因素方差分析,方差不齐时应用秩转换后非参数检验的 Kruskal-Wallis 检验,认为 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 实验

新型磁性纳米脂质复合物含铁浓度为 $0.950\mu\text{g/ml}$ 和 $0.475\mu\text{g/ml}$ 时,24 小时对肝细胞及肝癌细胞均有较高的抑制率,细胞毒性较强。故下一步实验选取的浓度为 $0.238\mu\text{g/ml}$ 、 $0.119\mu\text{g/ml}$ 、 $0.059\mu\text{g/ml}$ 、 $0.030\mu\text{g/ml}$ 。新型磁性纳米脂质复合物含铁各浓度组 12 小时、8 小时对肝细胞及肝癌细胞的毒性不大。见表 1-3,图 1-3。

表 1 新型纳米脂质复合物抑制肝癌细胞和肝细胞增殖的 MTT 结果(24 小时)

Tabel 1 MTT result of new magnetic nanoliposomes's inhibition for proliferation of hepatoma carcinoma cell and hepatocyte(24 hours)

Group	24h optical density($\bar{X} \pm S$)	
	Hepatocyte(L-02)	Hepatoma carci noma cell(Hep-G2)
Blank control group	0.692± 0.011	0.727± 0.015
0.950μg/ml group	0.294± 0.009 ^{☆☆}	0.322± 0.009 ^{☆☆}
0.475μg/ml group	0.393± 0.010 ^{☆☆}	0.457± 0.012 ^{☆☆}
0.238μg/ml group	0.563± 0.014 ^{☆☆}	0.557± 0.011 ^{☆☆}
0.119μg/ml group	0.611± 0.008 ^{☆☆}	0.604± 0.005 ^{☆☆}
0.059μg/ml group	0.620± 0.012 ^{☆☆}	0.642± 0.013 ^{☆☆}
0.030μg/ml group	0.655± 0.013 ^{☆☆}	0.665± 0.010 ^{☆☆}
Without iron concentration nanoliposome group	0.683± 0.017	0.698± 0.012 ^{☆☆}

Note:Compared with blank control group ,^{*}P<0.05 ,^{**}P<0.01 ,^{***}P<0.001

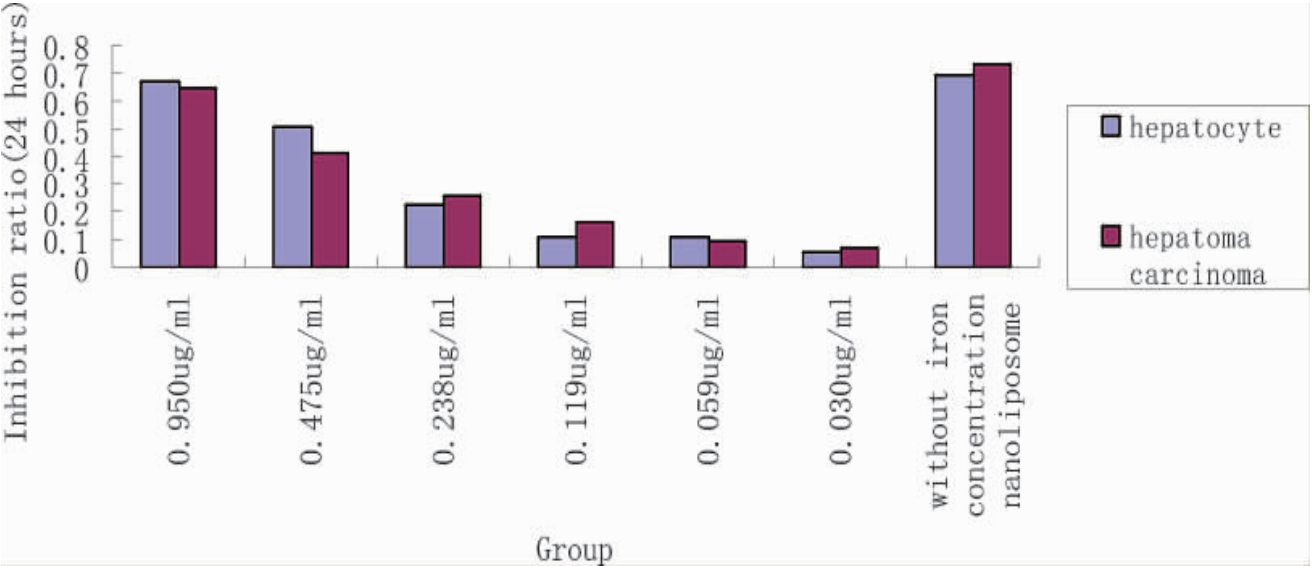


图 1 新型磁性纳米脂质复合物对肝癌细胞和肝细胞增殖的抑制率(24 小时)

Figure1 New magnetic nanoliposomes's inhibition ratio for proliferation of hepatoma carcinoma cell and hepatocyte(24 hours)

表 2 新型磁性纳米脂质复合物抑制肝癌细胞和肝细胞增殖的 MTT 结果(12 小时)

Tabel 2 MTT result of new magnetic nanoliposomes's inhibition for proliferation of hepatoma carcinoma cell and hepatocyte(12 hours)

Group	12h optical density($\bar{X} \pm S$)	
	Hepatocyte(L-02)	Hepatoma carcinoma cell(Hep-G2)
Blank control group	0.385± 0.024	1.047± 0.023
0.238μg/ml group	0.359± 0.010	0.760± 0.031 ^{☆☆}
0.119μg/ml group	0.352± 0.008 [*]	0.737± 0.029 ^{☆☆}
0.059μg/ml group	0.435± 0.005 [*]	0.737± 0.029
0.030μg/ml group	0.444± 0.039 [*]	1.026± 0.045
Without iron concentration nanoliposome group	0.426± 0.021 [*]	0.808± 0.140 ^{☆☆}

Note:Compared with blank control group ,^{*}P<0.05 ,^{**}P<0.01 ,^{***}P<0.001

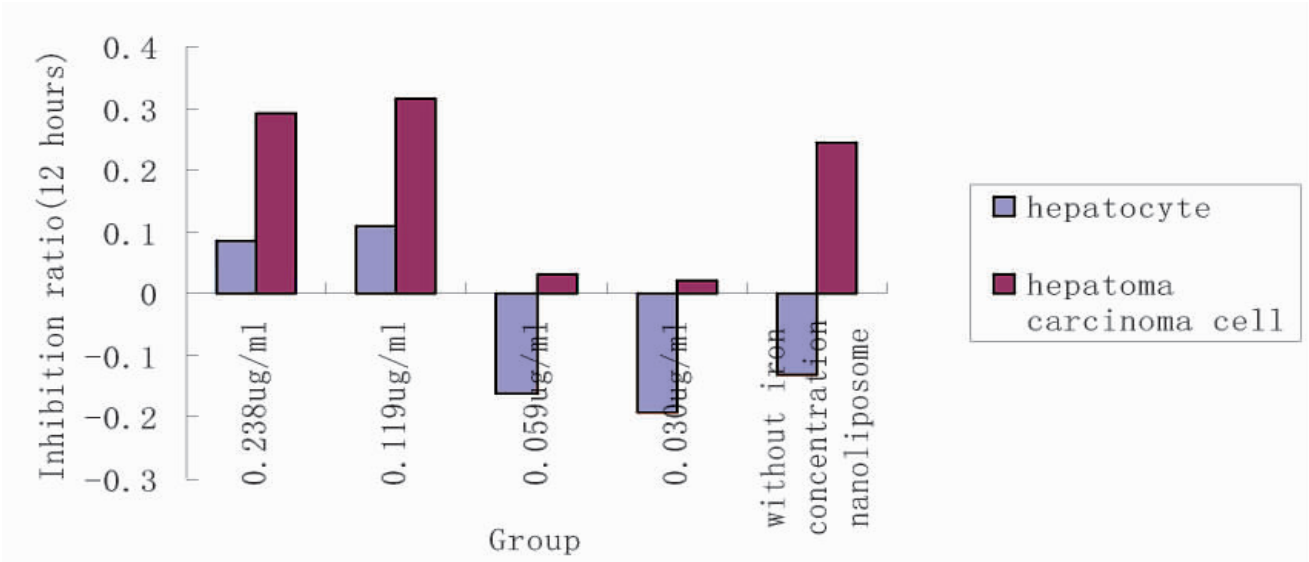


图 2 新型磁性纳米脂质复合物对肝癌细胞和肝细胞增殖的抑制率(12 小时)

Figure2 New magnetic nanoliposomes's inhibition ratio for proliferation of hepatoma carcinoma cell and hepatocyte(12 hours)

表 3 新型磁性纳米脂质复合物抑制肝癌细胞和肝细胞增殖的 MTT 结果(8 小时)

Tabel 3 MTT result of new magnetic nanoliposomes'sinhibition for proliferation of hepatoma carcinoma cell and hepatocyte(8 hours)

Group	8h optical density($\bar{X} \pm S$)	
	Hepatocyte(L-02)	Hepatoma carcinoma cell(Hep-G2)
Blank control group	0.448± 0.011	1.076± 0.008
0.238μg/ml group	0.441± 0.015	0.872± 0.014 ^{☆☆}
0.119μg/ml group	0.433± 0.006	0.889± 0.028 [*]
0.059μg/ml group	0.502± 0.049	1.006± 0.142 [*]
0.030μg/ml group	0.440± 0.013	1.027± 0.028
Without iron concentration nanoliposome group	0.491± 0.006	0.901± 0.028 [*]

Note:Compared with blank control group ,^{*}P<0.05 ,^{☆☆}P<0.01 ,^{☆☆☆}P<0.001

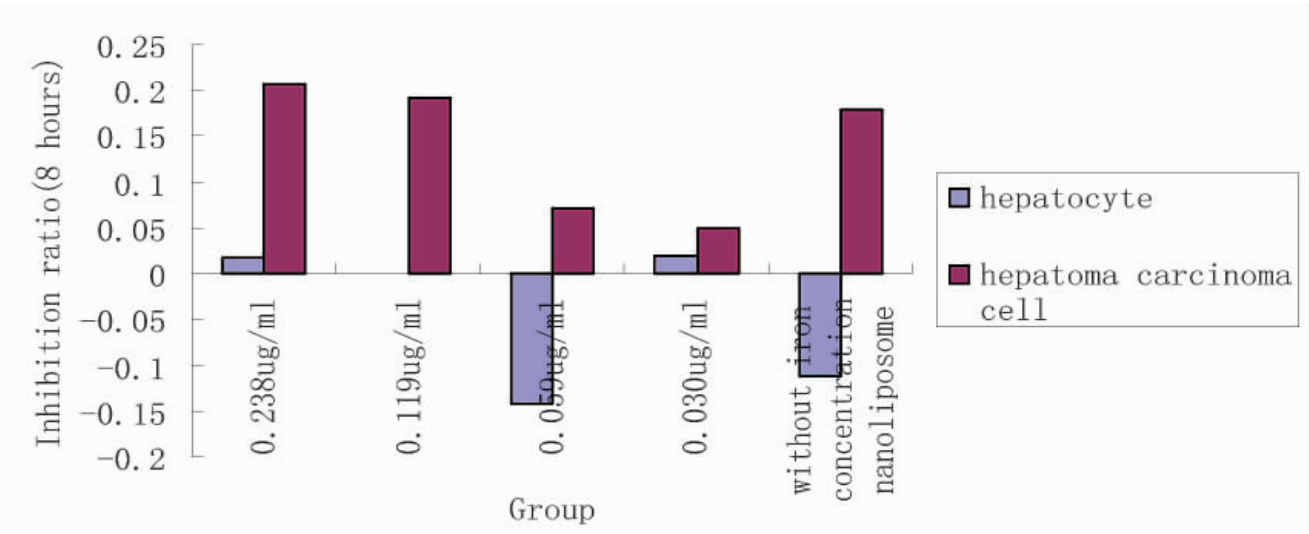


图 3 新型磁性纳米脂质复合物对肝癌细胞和肝细胞增殖的抑制率(8 小时)

Figure3 New magnetic nanoliposomes'sinhibition ratio for proliferation of hepatoma carcinoma cell and hepatocyte(8 hours)

2.2 普鲁士蓝染色

显示胞质内存在的散在的蓝色铁颗粒。肝癌细胞 24h 普鲁士蓝染色可见少量蓝染的阳性细胞 ,呈浓度依赖 ;肝细胞 24h

普鲁士蓝染色几乎未见阳性细胞。8h 及 12h 肝癌细胞及肝细胞普鲁士蓝染色均几乎未见阳性细胞。故下一步实验选取的时间点为 24 小时。见表 4 图 4、5。

表 4 普鲁士蓝染色阳性率(24 小时)
Table 4 Positive ratio of Prussian blue stain(24 hours)

Group	Hepatocyte(L-02)			Hepatoma carcinoma cell(Hep-G2)		
	Positive	Total	Positive	Positive	Total	Positive
	cells	cells	ratio	cells	cells	ratio
blank control group	0	400	0.00%	0	400	0.00%
0.238μg/ml	4	400	1.00%	22	400	5.50%
0.119μg/ml	5	400	1.25%	16	400	4.00%
0.059μg/ml	0	400	0.00%	10	400	2.50%
0.030μg/ml	0	400	0.00%	1	400	0.25%
Without iron concentration nanoliposome group	0	400	0.00%	3	400	0.75%

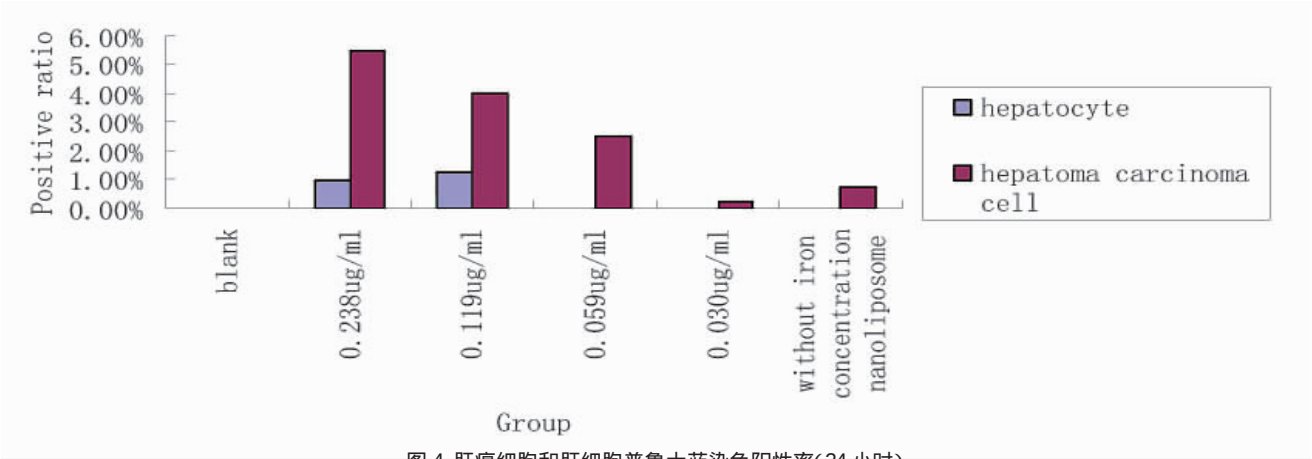


图 4 肝癌细胞和肝细胞普鲁士蓝染色阳性率(24 小时)
Figure 4 Positive ratio of Prussian blue stain for hepatoma carcinoma cell and hepatocyte(24 hours)

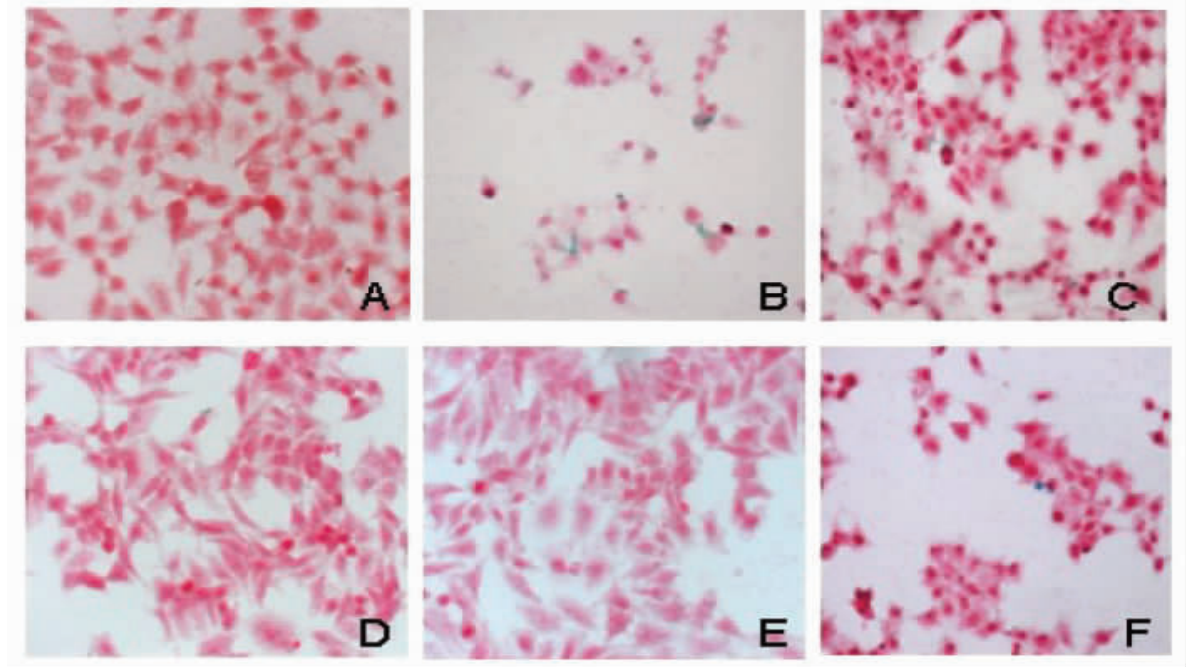


图 5 肝癌细胞普鲁士蓝染色图片(24 小时 200×) :A 空白对照组 ;B 含铁脂质体组(0.238μg/ml) ;C 含铁脂质体组(0.119μg/ml) ;D 含铁脂质体组(0.059μg/ml) ;E 含铁脂质体组(0.030μg/ml) ;F 空脂质体组
Figure 5 Pictures of Prussian blue stain for hepatoma carcinoma cell(24 hours 200×) :A Blank control group ;B Iron concentration nanoliposome group(0.238μg/ml) ;C Iron concentration nanoliposome group(0.119μg/ml) ;D Iron concentration nanoliposome group (0.059μg/ml) ;E Iron concentration nanoliposome group (0.030μg/ml) ;F Without iron concentration nanoliposome group

2.3 细胞内铁含量检测 及肝细胞内均可检测到铁；肝癌细胞含铁量略多于肝细胞，呈在 24h 时，空白对照组细胞内可检测到少量铁；肝癌细胞 浓度依赖性。见表 5，图 6。

表 5 肝癌细胞和肝细胞含铁量(24 小时)
Table 5 Iron content for hepatoma carcinoma cell and hepatocyte(24 hours)

Group	Hepatocyte(L-02)		Hepatoma carcinoma cell(Hep-G2)	
	Actuality	Iron content of each	Actuality	Iron content of each
	concentration(ug/ml)	cell(pg/cell)	concentration(ug/ml)	cell(pg/cell)
Blank control group	0.188	0.303	0.111	0.277
0.238μg/ml	0.286	0.460	0.270	0.675
0.119μg/ml	0.187	0.301	0.170	0.425
0.059μg/ml	0.159	0.255	0.150	0.376
0.030μg/ml	0.146	0.236	0.147	0.367
Without iron concentration nanoliposome group	0.130	0.210	0.120	0.301

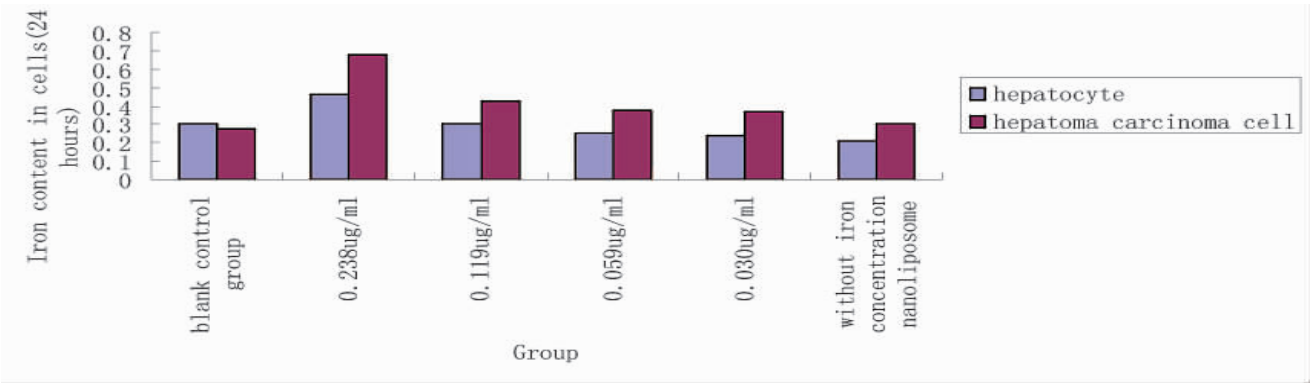


图 6 细胞内铁含量示意图(24 小时)
Figure 6 Picture of iron content in cells(24 hours)

2.4 电镜检测 可见高密度颗粒样物质；肝癌细胞及肝细胞空脂质体组：细胞内可见高密度颗粒样物质；肝癌细胞及肝细胞空白对照组：细胞内未见颗粒样物质；内可见高密度颗粒样物质。见图 7、8。

肝癌细胞及肝细胞含铁脂质体组(含铁量 0.119μg/ml)：细胞内

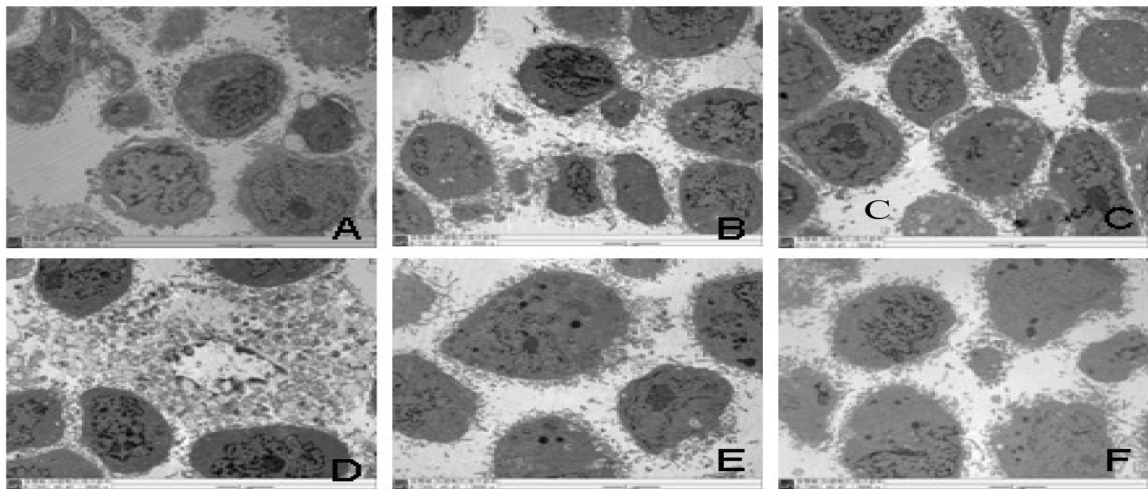
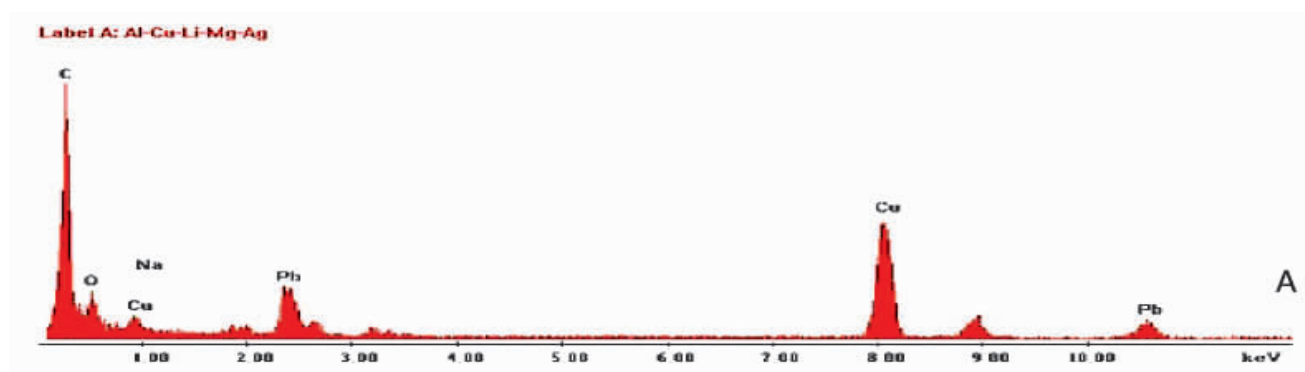


图 7 肝癌细胞和肝细胞电镜图片(24 小时,5000×) :A 肝癌细胞空白对照组 ;B 肝癌细胞含铁脂质体组(0.119μg/ml) ;C 肝癌细胞空脂质体组 ;D 肝细胞空白对照组 ;E 肝细胞含铁脂质体组(0.119μg/ml) ;F 肝细胞空脂质体组

Figure 7 Picture of electron microscope for hepatoma carcinoma cell and hepatocyte(24 hours,5000×) :A blank control group of hepatoma carcinoma cell ;B iron concentration nanoliposome group of hepatoma carcinoma cell(0.119μg/ml) ;C without iron concentration nanoliposome group of hepatoma carcinoma cell ;D blank control group of hepatocyte ;E iron concentration nanoliposome group of hepatocyte(0.119μg/ml) ;F without iron concentration nanoliposome group of hepatocyte



注:在 6-7KeV 之间未见 Fe 峰,扫描位置见下图:

Note: Fe peak was not seen between 6-7KeV. Scanning positions are as follows:

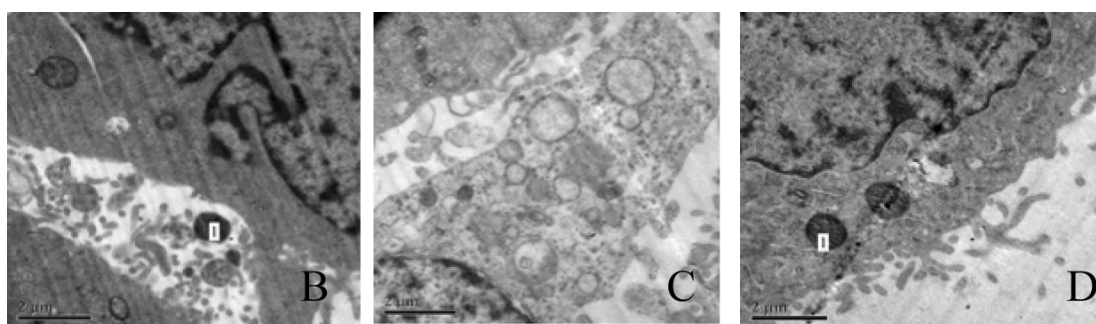


图 8 肝癌细胞和肝细胞扫描电镜能谱分析图片(24 小时) :A 扫描电镜能谱分析图 ;B 肝癌细胞含铁脂质体组(0.119 μ g/ml) ;C 肝癌细胞空脂质体组 ;D 肝细胞含铁脂质体组(0.119 μ g/ml)

Figure 8 Spectrum analysis pictures of scanning electron microscope for hepatoma carcinoma cell and hepatocyte(24 hours) :A :Spectrum analysis picture of scanning electron microscope ;B :Iron concentration nanoliposome group of hepatoma carcinoma cell(0.119 μ g/ml) ;C :without iron concentration nanoliposome group of hepatoma carcinoma cell ;D :Iron concentration nanoliposome group of hepatocyte(0.119 μ g/ml)

2.5 细胞磁共振检测

肝癌细胞空白对照组、肝癌细胞含铁脂质体组 (含铁量 0.119 μ g/ml)、肝癌细胞空脂质体组各组感兴趣区未见明显差

别;肝细胞空白对照组、肝细胞含铁脂质体组 (含铁量 0.119 μ g/ml)、肝细胞空脂质体组各组感兴趣区亦未见明显信号差别。见图 9。

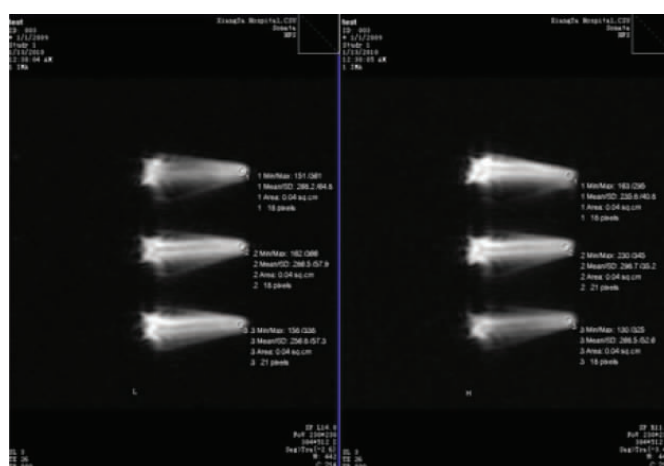


图 9 肝癌和肝细胞磁共振图片(24 小时) 左 1 为 肝癌细胞空白对照组 ;左 2 为 肝癌细胞含铁脂质体组(含铁量 0.119 μ g/ml) ;左 3 为 肝癌细胞空脂质体组 ;右 1 为 肝细胞空白对照组 ;右 2 为 肝细胞含铁脂质体组(含铁量 0.119 μ g/ml) ;右 3 为 肝细胞空脂质体组

Figure 9 MRI pictures of hepatoma carcinoma cell and hepatocyte(24 hours) :

Left1 :blank control group of hepatoma carcinoma cell ;Left2 :iron content nanoliposome group of hepatoma carcinoma cell(0.119 μ g/ml) ;Left3 :without iron concentration nanoliposome group of hepatoma carcinoma cell ;Right1 :blank control group of hepatocyte ;Right2 :iron content nanoliposome group of hepatocyte(0.119 μ g/ml) ;Right3 :without iron concentration nanoliposome group of hepatocyte

3 讨论

随着社会的进步和科技的发展,纳米技术受到越来越多的关注。目前已成功应用于材料制备、医药健康、航空航天、环境和能源、生物技术等各个领域^[9]。肝癌是威胁人类健康的恶性肿瘤之一,发病率和死亡率均居恶性肿瘤前几位,有效地诊断和治疗及时可大大减少肝癌的死亡率。磁共振成像对比剂能够改变病灶的信号强度,但对于微小病变的检测方面仍存在一定困难。理想对比剂应能够对靶器官或组织有高度的特异性和选择性,并且具有低毒性和长循环的特点。超顺磁性氧化铁(Superparamagnetic Iron Oxide, SPIOs)颗粒是一种新型磁共振成像对比剂,可用于选择性增强网状内皮系统的磁共振成像,对肝、脾、淋巴结病变的成像效果好,灵敏性强,安全性高,能够显著提高小肝癌的检出率^[7]。

纳米材料主要通过细胞的内吞作用被细胞所摄取,有胞饮、非特异性内吞、受体介导的内吞、吞噬等多种形式^[8,9]。本实验发现肝癌细胞对新型磁性纳米脂质复合物的内吞作用稍强于肝细胞。肝癌细胞中SPIOs较多可能与肿瘤细胞新陈代谢旺盛,细胞吞噬摄取能力增强有关。进入细胞内的SPIOs主要分布在细胞溶酶体和吞噬小泡中,与Sun R等的研究结果相一致^[9]。两种细胞核内均未发现SPIOs,说明该浓度下磁性纳米脂质复合物不影响两种细胞DNA的合成。在安全范围内,如果SPIOs粒子增多超出溶酶体和吞噬小泡的吞噬能力,可能会使溶酶体破裂,释放大量的水解酶,引起细胞损伤凋亡,从而达到靶向杀伤肿瘤细胞的目的。

超顺磁性氧化铁纳米微粒的毒副作用主要来自于铁含量。从本实验也可看出,铁浓度大时,进入细胞内的磁性纳米脂质复合物对肝癌细胞和肝细胞的抑制率增高,对细胞的杀伤能力强。可能与其能够诱导活性氧簇的形成,瓦解细胞骨架,改变内皮细胞形态等有关^[10]。培养基中残余的细胞外铁可能会引起细胞渗透压的改变,从而引起细胞皱缩。同时毒性大小还与接触时间有关,实验中高浓度组24小时肝癌细胞和肝细胞即出现明显抑制。出现这种情况的原因可能与随着时间延长,细胞吞噬纳米粒子增多,细胞比重增大,影响其分裂增殖有关。

近年来,关于SPIOs诊治恶性肿瘤方面的研究不断发展。SPIOs对肿瘤的作用分为被动靶向作用和主动靶向作用。被动靶向是将SPIOs或其载体表面修饰、涂层,因肿瘤部位存在有缺陷的新生血管,血管通透性更强,血中的SPIOs渗出到肿瘤组织,再加上无效的淋巴引流,最终使SPIOs在肿瘤处积聚。对比剂在体内的分布情况取决于微粒的粒径大小和表面性质^[5,11]。主动靶向是指在表面修饰、涂层的基础上加入靶抗原,或连接相应受体的配体等,使表面标记过表达,通过抗原抗体反应、受体配体结合将对比剂送至靶位点,脂质体、多聚糖、多肽RGD、单克隆抗体、受体蛋白等均可作为运送SPIOs的载体^[12,13]。不仅可以标记肿瘤表面,还可以靶向新生淋巴管标记物^[14]、代谢产物表面受体^[15]、细胞外基质成分受体^[16]、肽激素受体^[17]、血脑屏障^[18]等等。靶向作用一方面可以提高组织对其的聚集能力,使磁共振显影增强,有助于诊断恶性肿瘤,尤其对诊断体积较小的肿瘤意义更大;另一方面可以运载抗肿瘤的药品到达靶位,极大提高组织的敏感性,增强药物选择性,治疗恶性肿瘤。

综上所述,新型磁性纳米脂质复合物含铁浓度在0.238 μ g/ml以下时,24小时细胞毒性较小,肝癌细胞对新型磁性纳米脂质复合物的内吞作用稍高于肝细胞,进入细胞内的新型磁性纳米脂质复合物含铁量低,体外显影效果不佳。进一步改进:在纳米脂质体外膜上加入靶抗原,或连接相应受体的配体,如叶酸、多肽RGD、单克隆抗体、受体蛋白等,提高靶向性及诊断敏感性。

致谢:

感谢医学遗传学国家重点实验室、卫生部肝胆肠外科研究中心及中南大学湘雅医学院中心实验室。

参考文献(References)

- [1] Flecken T, Spangenberg HC, Thimme R. Immunobiology of hepatocellular carcinoma[J/OL]. <http://www.springerlink.com/content/q8072w7957872678>, 2011-04-09/2011-05-12
- [2] Yang JD, Roberts LR. Hepatocellular carcinoma: A global view[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2010, 7(8): 448-458
- [3] Venook AP, Papandreou C, Furuse J, et al. The incidence and epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global and regional perspective[J]. *Oncologist*, 2010, 15 Suppl 4: 5-13
- [4] Kudo M, Han KH, Kokudo N, et al. Liver Cancer Working Group report[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2010, 40 (1): 19-27
- [5] Lin MM, Kim HH, Kim H, et al. Surface activation and targeting strategies of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in cancer-oriented diagnosis and therapy[J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2010, 5(1): 109-133
- [6] Khosravi DK, Pardakhty A, Honaripisheh H, et al. The role of high-resolution imaging in the evaluation of nanosystems for bioactive encapsulation and targeted nanotherapy[J]. *Micron*, 2007, 38(8): 804-818
- [7] Halavaara J, Tervahartiala P, Isoniemi H, et al. Efficacy of sequential use of superparamagnetic iron oxide and gadolinium in liver MR imaging[J]. *Acta Radiol*, 2002, 43(2): 180-185
- [8] Xu H, Dai W, Han Y, et al. Differential internalization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in different types of cells[J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2010, 10(11): 7406-7410
- [9] Sun R, Dittich J, Le-Huu M, et al. Physical and biological characterization of superparamagnetic iron oxide and ultrasmall superparamagnetic iron oxide-labeled cells: a comparison[J]. *Invest Radiol*, 2005, 40(8): 504-513
- [10] Buyukhatipoglu K, Clyne AM. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles change endothelial cell morphology and mechanics via reactive oxygen species formation[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2011, 96(1): 186-195
- [11] Verma A, Uzun O, Hu Y, et al. Surface-structure-regulated cell-membrane penetration by monolayer-protected nanoparticles[J]. *Nat Mater*, 2008, 7(7): 588-595
- [12] Delikatny EJ, Poptani H. MR techniques for in vivo molecular and cellular imaging[J]. *Radiol Clin North Am*, 2005, 43(1): 205-220
- [13] Neumaier CE, Baio G, Ferrini S, et al. MR and iron magnetic nanoparticles. Imaging opportunities in preclinical and translational research[J]. *Tumori*, 2008, 94(2): 226-233
- [14] Yang J, Eom K, Lim EK, et al. In situ detection of live cancer cells by using bioprobes based on Au nanoparticles [J]. *Langmuir*, 2008, 24 (21): 12112-12115
- [15] Wang SH, Van Antwerp M. Dendrimer-functionalized iron oxide

- nanoparticles for specific targeting and imaging of cancer cells[J]. Adv Func Mater, 2007, 17: 3043-3050
- [16] Lee JH, Lee K, Moon SH, et al. All-in-one target-cell-specific magnetic nanoparticles for simultaneous molecular imaging and siRNA delivery[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2009, 48(23): 4174-4179
- [17] Kostenich G, Oron-Herman M, Kimel S, et al. Diagnostic targeting of colon cancer using a novel fluorescent somatostatin conjugate in a mouse xenograft model[J]. Int J Cancer, 2008, 122(9): 2044-2049
- [18] Zhang Y, Zhang YF, Bryant J, et al. Intravenous RNA interference gene therapy targeting the human epidermal growth factor receptor prolongs survival in intracranial brain cancer [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(11): 3667-3677

·重要信息·

《分子影像学》第二版已正式出版发行

卜丽红¹ 戴薇薇²

(1 哈尔滨医科大学附属第四医院医学影像科 150001 2 人民卫生出版社医药教育出版中心第四编辑室)

由哈尔滨医科大学附属第四医院申宝忠教授主编的《分子影像学》第二版(ISBN 978-7-117-13344-9/R·13345) 一书已于 2010 年 9 月 14 日由人民卫生出版社出版发行。《分子影像学》是国内第一分子影像学大型专著。对于分子影像学的基本概念、基本原理、基本方法 and 应用概况都有精彩而详细的论述,充分体现了国际分子影像学的最新进展。

《分子影像学》第二版由著名医学影像学家、中国工程院院士刘玉清教授和美国分子影像学专家、美国医学科学院院士 Sanjiv Sam Gambhir 教授亲自作序。编委会包括美国哈佛大学、斯坦福大学等国外知名院校 7 名专家作为国外编委,国内多家知名大学、研究中心学术带头人 13 名作为国内编委,还包括国内外共 40 名专家参与编写。

全书共计 130 余万字,收录图片 378 幅,共分基础篇和应用篇。

基础篇共分 10 章,主要介绍了分子影像学的发展简史,分子成像的相关概念、基本原理、基本技术和设备等,内容较第一版更为精准、完善,覆盖面更加宽泛。着重针对探针合成这一当前分子成像研究的技术瓶颈,纳入了材料学、生物学和化学等相关技术内容。

应用篇共分 7 章,着重介绍了分子影像学技术的最新进展和应用情况,并详细介绍了分子成像在肿瘤、中枢神经系统和心血管系统疾病诊断中的应用情况,重点阐述了分子成像在监测基因治疗、活体细胞示踪以及新药研发等方面的最新研究进展,并就分子影像学向临床转化所面临的问题进行了深入剖析。

本书内容系统详实,深入浅出,图文并茂,可读性强。可供医学影像学专业、临床专业学生使用,并可为临床各学科研究生、临床医师及其他相关生命科学的研究人员提供参考。

《分子影像学》精装本定价 260 元,全国各大书店有售。