

❖ 实验研究

Ultrasound irradiation for improvement of antitumor effects of docetaxel nanoparticles for human pancreatic cancer xenograft nude mouse models

YANG Jing¹, ZHANG Xiu-juan², LIN Li-wu², XUE En-sheng², CHEN Zhi-kui^{2*}

(1. Department of Pharmacy, 2. Department of Ultrasound, Fujian Medical University Union Hospital, Fuzhou 350001, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the influence of ultrasound irradiation on docetaxel nanoparticles inhibiting the growth of pancreatic cancer on xenograft nude mouse models. **Methods** Docetaxel nanoparticles were prepared with the method of emulsion-solvent evaporation, and the particle size, drug-loading rate and encapsulation efficiency were characterized. Color Doppler flow imaging was employed to observe the change of tumor hemoperfusion before and after ultrasound irradiation. After intravenous injection of docetaxel nanoparticles and the following ultrasound irradiation, the content of docetaxel accumulating in tumor tissue was detected with high-performance liquid chromatography. Twenty-eight days after management, the tumor growth inhibition rate was calculated. **Results** The prepared docetaxel nanoparticles had the mean size of 189.71 nm, the drug-loading rate of 4.28% and encapsulation efficiency of 85.62%. Under docetaxel nanoparticles combined with ultrasound irradiation, the ratio of blood flow distribution area in whole tumor accounted for (11.37±2.52)%, and the docetaxel accumulating in tumor tissue was detected as (3.73±0.76) μg/g protein, much higher than those given single docetaxel nanoparticles [(5.42±0.65)%, [1.87±0.35] μg/g protein, both $P < 0.01$]. The combination of docetaxel nanoparticles and ultrasound irradiation achieved the highest tumor growth inhibition rate (64.69%). **Conclusion** Therapeutic ultrasound irradiation can enhance docetaxel nanoparticles accumulating in pancreatic cancer tissue, and thus improve its antitumor effects on human pancreatic cancer xenograft nude mouse models.

[Key words] Ultrasonography; Pancreatic neoplasms; Docetaxel; Nanoparticles

超声辐照在增强多西他赛纳米粒抑制人胰腺癌裸鼠移植瘤增殖中的作用

杨菁¹, 张秀娟², 林礼务², 薛恩生², 陈志奎^{2*}

(1. 福建医科大学附属协和医院药学部, 2. 超声科, 福建福州 350001)

[摘要] **目的** 探讨超声辐照对多西他赛纳米粒抑制人胰腺癌裸鼠移植瘤增殖作用的影响。 **方法** 采用乳化-溶剂挥发法制备多西他赛纳米粒, 测定载药纳米粒的粒径、载药率、包封率; 以彩色多普勒超声检查超声辐照前后肿瘤血流丰富程度的变化, 高效液相色谱法测定超声辐照对肿瘤组织药物分布量的影响; 经荷瘤裸鼠尾静脉注射多西他赛纳米粒, 联合肿瘤局部超声辐照治疗, 28 天后剥离肿瘤, 计算抑瘤率。 **结果** 多西他赛纳米粒平均粒径为 189.71 nm, 包封率为 85.62%, 载药率为 4.28%; 超声辐照后, 肿瘤组织的血流分布面积占肿瘤面积比为 (11.37±2.52)%, 明显高于超声辐照前的 [(5.42±0.65)%, $P < 0.01$]; 多西他赛纳米粒联合超声辐照后的肿瘤组织内多西他赛药物量为 (3.73±0.76) μg/g 蛋白, 明显高于单纯多西他赛纳米粒注射的肿瘤组织 [(1.87±0.35) μg/g 蛋白 ($P < 0.01$)]; 联合静脉注射多西他赛纳米粒与超声辐照治疗的肿瘤生长抑制率达 64.69%。 **结论** 超声辐照具有增强多西他赛纳米粒抑制人胰腺癌裸鼠移植瘤增殖的作用。

[基金项目] 福建医科大学青年骨干教师基金(2010-7)。

[作者简介] 杨菁(1977—), 女, 福建福州人, 硕士, 主管药师。研究方向: 肿瘤药学。E-mail: 825580125@qq.com

[通讯作者] 陈志奎, 福建医科大学附属协和医院超声科, 350001。E-mail: jimchen2003@163.com

[收稿日期] 2012-06-13 [修回日期] 2012-09-24

[关键词] 超声检查;胰腺肿瘤;多西他赛;纳米粒

[中图分类号] R445.2; R-332 [文献标识码] A [文章编号] 1003-3289(2012)11-1949-04

胰腺癌是高度恶性的消化道肿瘤,化疗是治疗胰腺癌的重要手段^[1-2],但普通化疗药经静脉注射后血浆半衰期较短,肿瘤局部药物浓度较低,使其抗肿瘤疗效受限。本研究制备粒径大于正常组织血管间隙的多西他赛纳米粒,施加一定能量的超声波辐照,探讨超声波辐照与多西他赛纳米粒联合治疗对人胰腺癌裸鼠移植瘤增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂 多西他赛原料药购于湖北宏中药业有限公司,多帕菲(多西他赛注射液)购于齐鲁制药有限公司,MePEG-PLGA 购于山东岱罡生物科技有限公司。

1.2 细胞与动物 人胰腺癌细胞 CFPAC-1 由中科院上海细胞库提供,细胞在含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养。BALB/C-nu/nu 裸小鼠 50 只,雄性,体质量 16~18 g,购于上海斯莱克实验动物中心,饲养于福建医科大学实验动物中心 SPF 级实验室。

1.3 多西他赛纳米粒的制备与表征 称量 100 mg MePEG-PLGA、5 mg 多西他赛,加入 1 ml 二氯甲烷,完全溶解后注入 3 ml 3% 聚乙烯醇水溶液,50 W 超声乳化 30 s,间歇 5 s,重复 5 次;加入 10 ml 双蒸水,低速磁力搅拌 3 h,离心水洗后真空冷冻干燥,以⁶⁰Co 灭菌备用。取适量多西他赛纳米粒,充分分散后,以激光粒径仪测量平均粒径及分布情况,以扫描电镜观察纳米粒表面形态,采用高效液相色谱法测定载药纳米粒的包封率与载药率。

1.4 动物模型的建立 大量扩增 CFPAC-1 细胞,于裸小鼠右前肢根部皮下接种细胞悬液,建立荷人胰腺癌裸鼠皮下移植瘤模型。

1.5 彩色多普勒超声观察肿瘤血流变化 选取荷瘤裸鼠 6 只,肿瘤最大径约 2.0 cm。采用 Siemens Sequoia 512 行彩色多普勒超声,检查肿瘤血流丰富程度。超声辐照(深圳圣祥高科技多功能超声波治疗仪,频率 840 kHz、声强 0.75 W/cm²)肿瘤 3 min 后,即刻行彩色多普勒超声检查。采用 Image-Pro Plus 7.0 软件分析超声辐照前后肿瘤血流丰富程度的变化。

1.6 肿瘤药物分布量变化 选取荷瘤裸鼠 12 只,肿瘤最大径约 1.0 cm,将其随机分成 2 组,每组 6 只。

对单纯多西他赛纳米粒组仅于裸鼠尾静脉注射多西他赛纳米粒(剂量为 15 mg/kg 体质量);对多西他赛纳米粒+超声辐照组则于注射多西他赛纳米粒后施加超声辐照。多西他赛纳米粒剂量为 15 mg/kg 体质量;超声辐照肿瘤局部 3 min,每 2 h 1 次,重复 3 次后处死裸鼠,剥离肿瘤,抽提多西他赛,以高效液相色谱法检测肿瘤内的药物含量及分布。

1.7 体内抗肿瘤作用 选取 25 只裸鼠,肿瘤最大径约 1.0~1.2 cm,将其随机分成 5 组,每组 5 只,施加乙醚吸入麻醉后进行相应处理。①模型组:未经处理;②多帕菲组:经裸鼠尾静脉注射多帕菲(多西他赛剂量为 15 mg/kg 体质量);③多西他赛纳米粒组:经裸鼠尾静脉注射多西他赛纳米粒(剂量为 15 mg/kg 体质量);④多帕菲联合超声辐照组:经裸鼠尾静脉注射多帕菲(15 mg/kg 体质量)后,超声辐照肿瘤局部 3 min,每 2 h 1 次,重复 3 次;⑤多西他赛纳米粒联合超声辐照组:经裸鼠尾静脉注射多西他赛纳米粒(剂量 15 mg/kg 体质量)后行超声辐照。

以上处理每周 1 次,连续 4 周后处死裸鼠,剥离肿瘤称质量,计算肿瘤生长抑制率(inhibition rate, IR): $IR(\%) = (1 - \text{治疗组平均瘤质量} / \text{模型组平均瘤质量}) \times 100\%$ 。

1.8 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件包,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析及多组均数间的多重比较(LSD-*t* 检验)对计量资料进行比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 制备的多西他赛纳米粒呈类球形(图 1),粒径平均为 189.71 nm,多元分散系数为 0.37,包封率为 85.62%,载药率为 4.28%。

2.2 超声辐照前,肿瘤血流呈点状或细条状;超声辐照后,肿瘤血供增多,呈片状或粗条状(图 2),血流分布面积/肿瘤面积比值为 $(11.37 \pm 2.52)\%$,明显高于超声辐照前的 $[(5.42 \pm 0.65)\%, P < 0.01]$ 。

2.3 单纯多西他赛纳米粒组肿瘤组织药物量为 $(1.87 \pm 0.35) \mu\text{g/g}$ 蛋白,而多西他赛纳米粒+超声辐照组肿瘤组织药物量明显提高,达 $(3.73 \pm 0.76) \mu\text{g/g}$ 蛋白($P < 0.01$)。

2.4 治疗 28 天后,多西他赛纳米粒联合超声辐照组肿瘤质量明显小于模型组($P < 0.01$),抑瘤率达

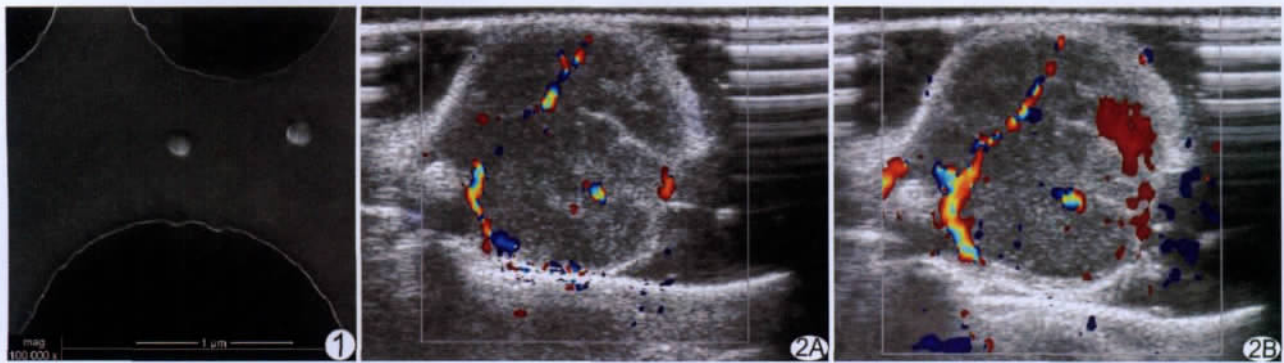


图 1 多西他赛纳米粒扫描电镜图($\times 100\ 000$) 图 2 超声辐照前后肿瘤血流丰富程度比较 A. 辐照前; B. 辐照后

64.69%，明显高于其他各治疗组(表 1)。

表 1 不同治疗方法组的抗肿瘤作用($\bar{x} \pm s$)

组别	肿瘤质量(g)	抑瘤率(%)
模型组	2.86 \pm 0.61 ^{##}	—
多帕菲组	1.81 \pm 0.54 ^{*##}	36.71
多西他赛纳米粒组	1.55 \pm 0.37 ^{*#}	45.80
多帕菲联合超声辐照组	1.41 \pm 0.29 ^{*#}	50.70
多西他赛纳米粒联合超声辐照组	1.01 \pm 0.23 [*]	64.69

注: * : 与模型组比较, $P < 0.01$; 与多西他赛纳米粒联合超声辐照组比较, # : $P < 0.05$, ## : $P < 0.01$

3 讨论

多西他赛是一种半合成的紫杉醇类药物,已被广泛应用于乳腺癌、卵巢癌、非小细胞肺癌、胰腺癌等肿瘤的化疗^[3-4]。但多西他赛难溶于水,临床上使用的制剂多采用吐温 80 助溶,易引起过敏反应。本研究以两亲性聚合物 MePEG-PLGA 为载体,采用乳化-溶剂挥发法,成功制备了载多西他赛纳米粒,具有较高包封率与载药率。高分子聚合物 MePEG-PLGA 生物相容性好,可生物降解,包载多西他赛制备纳米粒,随着材料降解而逐步释放药物,具有一定缓释效果,并可避免使用吐温等助溶剂,无不良反应。

正常组织血管内皮间隙多小于 100 nm,而恶性肿瘤组织血管壁结构多不完整,内皮间隙增大,可达 380~780 nm^[5]。本研究制备的多西他赛纳米粒平均粒径 189.71 nm,理论上较易透过肿瘤血管壁间隙到达肿瘤细胞间隙。然而,研究表明,多西他赛脂质体静脉注射后在裸鼠皮下移植肝癌的药物分布量明显低于正常肝脏组织^[6],这与肿瘤血供丰富程度、血流速度、血管壁通透性等多种因素有关。

超声波在生物组织传播时会产生热效应、机械效应、空化效应等,使局部血管扩张,血流增多,血管壁通透性增大,导致组织细胞功能发生障碍^[7-8]。超声的生

物效应已被广泛应用于疾病的诊断与治疗研究^[9-10]。本研究采用 840 kHz、声强 0.75 W/cm² 超声辐照肿瘤,肿瘤血供明显增多,肿瘤局部药物分布量明显提高,原因可能是超声辐照产生的生物效应可增加肿瘤血供、扩张肿瘤血管壁间隙,促进更多药物透过血管壁分布到肿瘤组织。

本研究结果表明,多西他赛纳米粒静脉注射联合超声辐照肿瘤组织可明显提高抗肿瘤效应,肿瘤质量较模型组显著减小,抑瘤率达 64.69%。多西他赛纳米粒的血循环半衰期较单纯多西他赛明显延长,同时,由于其粒径介于正常组织与肿瘤组织血管间隙之间,尤其在超声生物效应的辅助下可使更多的药物分布到肿瘤组织,而使其他正常组织的药物量减少,进而可提高抗肿瘤效应,并且可减轻全身不良反应。

综上所述,超声波辐照肿瘤组织产生的生物效应可使肿瘤血供增多,使更多的多西他赛纳米粒分布于肿瘤局部,增强多西他赛纳米粒抑制荷人胰腺癌裸鼠移植瘤增殖的作用。

[参考文献]

- [1] Sato S, Yanagimoto H, Toyokawa H, et al. Long-term results of surgical resection after preoperative chemoradiation in patients with pancreatic cancer. *Pancreas*, 2012, 41(2):333-335.
- [2] Matsuoka L, Selby R, Genyk Y. The surgical management of pancreatic cancer. *Gastroenterol Clin North Am*, 2012, 41(1): 211-221.
- [3] Yata Y, Xue F, Takahara T, et al. Docetaxel inhibits progression of human hepatoma cell line in vitro and is effective in advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*, 2010, 40(4):304-310.
- [4] Li L, Tang F, Liu H, et al. In vivo delivery of silica nanorattle encapsulated docetaxel for liver cancer therapy with low toxicity and high efficacy. *Nano*, 2010, 4(11):6874-6882.
- [5] Oeffinger BE, Wheatley MA. Development and characterization of a nano-scale contrast agent. *Ultrasonics*, 2004, 42(1-9):343-347.
- [6] Xu Z, Chen L, Gu W, et al. The performance of docetaxel-loaded solid lipid nanoparticles targeted to hepatocellular carcinoma. *Bio-*

materials, 2009, 30(2): 226-232.

[7] Cancelos S, Moraga FJ, Lahey RT, et al. The effect of acoustically-induced cavitation on the permeance of a bullfrog urinary bladder. *J Acoust Soc Am*, 2010, 128(5): 2726-2738.

[8] Pozzi D, Fattibene P, Viscomi D, et al. Use of EPR and FTIR to detect biological effects of ultrasound and microbubbles on a fibro-

blast cell line. *Eur Biophys J*, 2011, 40(10): 1115-1120.

[9] 陈杰, 易华容, 王彬, 等. 高强度聚焦超声治疗中的空化及其与回声、热效应之间的关系. *中国医学影像技术*, 2009, 25(10): 1896-1898.

[10] 钟世根, 王志刚, 凌智瑜, 等. 不同强度超声破坏微泡对犬心肌组织的生物学效应. *中国医学影像技术*, 2009, 25(10): 1738-1740.

Primary hepatic lymphoma: Case report 原发性肝脏淋巴瘤 1 例

高建津¹, 刘洁华¹, 侯雷², 沈静³

(1. 承德医学院附属医院影像科, 2. 肿瘤科, 河北承德 067000;
3. 宽城满族自治县医院超声科, 河北承德 067600)

[Key words] Lymphoma; Liver; Tomography, X-ray computed; Ultrasonography

[关键词] 淋巴瘤; 肝; 体层摄影术, X 线计算机; 超声检查

[中图分类号] R735.7; R814.42; R445.1 [文献标识码] B [文章编号] 1003-3289(2012)11-1952-01

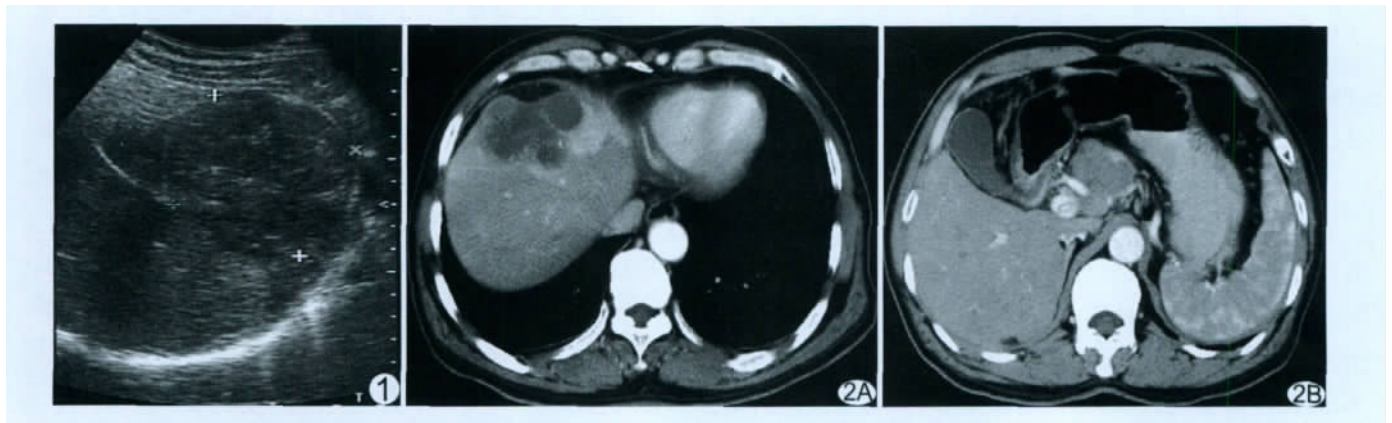


图 1 原发性肝脏淋巴瘤声像图 图 2 增强 CT 图像 左肝病灶内部可见多发不规则囊变区, 无强化, 病灶周围肝实质强化明显(A); 肝门区肿大淋巴结互相融合成团(B)

患者男, 62 岁, 主因“腹胀、右上腹痛 2 周”就诊。近 1 年体质量减少 10 公斤。20 余年前患黄疸性肝炎, 经治疗后好转。查体: 右上腹轻压痛。实验室检查未见异常。HBsAg 阴性。超声示肝实质回声均匀, 左肝内叶可见 7.8 cm × 7.2 cm 不均匀低回声区, 边界尚清晰(图 1)。上腹部可见 4.8 cm × 3.6 cm 边界清楚、形态不规则的低回声团块。CT: 平扫左肝内叶多结节互相融合状不规则肿块呈稍低密度, 范围约 6.5 cm × 7.5 cm × 8.0 cm。增强后动脉期病灶周围肝实质强化明显, 门脉期消退。病灶内部可见多发不规则囊变区, 无强化; 病灶部分区域与胆囊密切相邻; 胃左、第二肝门区、肝十二指肠韧带周围多发淋巴结, 部分互相融合成团, 大者直径约 4 cm(图 2)。诊断为左肝内叶占位性病变(怀疑恶性)。胃左、第二肝门区、肝十二指肠韧带周围多发肿大淋巴结转移可能。后在外院行肝左叶加胆囊切除、腹膜后肿大淋巴结切除术。病理诊断: 肝脏弥漫性

大 B 细胞淋巴瘤, 淋巴结受累。

讨论 原发性肝脏淋巴瘤(primary hepatic lymphoma, PHL)罕见, 分别占有非霍奇金淋巴瘤和原发性结外非霍奇金淋巴瘤的 0.016% 和 0.4%。PHL 临床症状与体征、影像学及实验室检查均无特异性, 常被误诊。PHL 多于 55 岁左右发病, 男性患者多于女性, 最常见的症状为上腹胀痛或不适, 约 1/3 的患者有发热、盗汗及体质量下降。实验室检查无特异性, 各种免疫抑制使得患本病的风险增加。PHL 常合并丙型或乙型肝炎。PHL 起源于肝脏间质, 是以单一细胞为主的典型少血供肿瘤, 超声多表现为肝内低回声型肿块。CT 强化为低衰减, 少有钙化。动态增强病灶多呈进行性轻至中度延迟强化, 动脉期强化轻微, 门静脉期呈轻至中度强化, 强化相对均匀。部分病灶周边肝实质可见较薄的边缘强化, 或一过性边界模糊的病灶周边淡片状强化。部分肿瘤内可见肝脏固有血管, 但血管形态相对正常, 形成所谓“血管漂浮征”, 对肝脏淋巴瘤的诊断有重要意义。PHL 需与原发性和继发性肝癌、肝内胆管细胞癌以及转移性肝癌进行鉴别。

[作者简介] 高建津(1953—), 男, 天津人, 大专, 副主任医师。

E-mail: gjj6013@126.com

[收稿日期] 2012-07-02 [修回日期] 2012-07-20