

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.08.009 [http://www.crter.org]

路新丽, 王以薇, 张东生. 三氧化二砷/锰锌铁氧体复合纳米粒体外治疗食管癌[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(8):1378-1383.

三氧化二砷/锰锌铁氧体复合纳米粒体外治疗食管癌***

路新丽^{1,2}, 王以薇¹, 张东生²

1 江苏建康职业学院, 江苏省南京市 210029

2 东南大学医学院, 江苏省南京市 210009

文章亮点:

1 成功制备了 $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 复合纳米粒, 观察到其对食管癌 Eca109 细胞较强的增殖抑制作用。

2 $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 复合纳米粒热疗组食管癌 Eca109 细胞增殖率明显低于游离 As_2O_3 组和 $\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 磁流体热疗组; 其细胞凋亡率高于 $\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 磁流体热疗组及游离 As_2O_3 组。

3 探讨了 $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 复合纳米粒联合磁流体热疗对食管癌细胞的体外抑制作用, 尚缺乏分子机制及体外的动物实验研究。

关键词:

生物材料; 纳米生物材料; $\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ (锰锌铁氧体); $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 复合纳米粒; 磁感应加热; 联合治疗; 食管癌; 增殖; 凋亡; 国家自然科学基金; 生物材料图片文章

摘要

背景: 与传统的热疗方法相比, $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 复合纳米粒可以同时发挥 As_2O_3 的细胞毒性作用和磁感应加热的联合定向治疗作用, 效果优于单一治疗。

目的: 制备 $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 复合纳米粒, 观察其对食管癌 Eca109 细胞增殖的抑制作用。

方法: 采用浸渍法制备 $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 复合纳米粒, 含砷量 0.012%, 以透射电镜、能谱仪、原子分光光度计对其进行表征。向两块培养板的食管癌 Eca109 细胞中分别加入 DMEM 培养液(阴性对照)、 $\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 纳米材料、含 As_2O_3 终浓度 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 复合纳米粒、游离 As_2O_3 (终浓度 5 $\mu\text{mol/L}$), 其中一块培养板进行磁流体热疗, 另一块培养板正常培养。

结果与结论: $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 复合纳米粒近似球形, As_2O_3 成功浸渍在 $\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 纳米材料表面, 砷含量在 0.012%-0.066%之间。当 As_2O_3 浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 时, $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 复合纳米粒组细胞增殖率明显低于阴性对照组和 $\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 纳米材料组($P < 0.05$); 而在磁流体热疗中, $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 复合纳米粒组细胞增殖率明显低于游离 As_2O_3 组或 $\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 组($P < 0.05$); 在凋亡率检测中, $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 复合纳米粒联合磁流体热疗组细胞凋亡率明显高于 $\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 纳米材料联合磁流体热疗组或游离 As_2O_3 组($P < 0.05$)。表明 $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 复合纳米粒联合磁流体热疗可显著抑制食管癌细胞增殖。

路新丽★,女,1975年生,河南省淇县人,汉族,东南大学2011年国内访问学者,硕士,讲师,主要从事纳米药物治疗肿瘤方面的研究。

xllu_sky@163.com

通讯作者:张东生,教授,博士生导师,东南大学医学院,江苏省南京市210009

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2013)08-01378-06

收稿日期:2012-05-26

修回日期:2012-07-12

(2012050800/GW·W)

Nanosized $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ complex treats esophageal cancer *in vitro*

Lu Xin-li^{1,2}, Wang Yi-wei¹, Zhang Dong-sheng²

1 Jiangsu Jiankang Vocational College, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

2 School of Medicine, Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China

Abstract

BACKGROUND: Compared with traditional hyperthermia treatment, $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ complex may have both the cytotoxicity effects and the targeted heating effects resulting from the radiofrequency-induced hyperthermia.

Lu Xin-li★, Master, Lecturer,
the 2011 Domestic Visiting
Scholar of Southeast University,
Jiangsu Jiankang Vocational
College, Nanjing 210029,
Jiangsu Province, China
xllu_sky@163.com

Corresponding author: Zhang
Dong-sheng, Professor,
Doctoral supervisor, School of
Medicine, Southeast University,
Nanjing 210009, Jiangsu
Province, China
zdszds1222@163.com

Supported by: the National
Natural Science Foundation of
China, No. 81171452*; Health
Occupation Technology
Education Research of Jiangsu
Province, No. J201007*;
Practice and Innovation
Training Program of College
Students in Jiangsu Province,
No. 979*

Received: 2012-05-26
Accepted: 2012-07-12

OBJECTIVE: To prepare nanosized $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ complex and to observe its growth inhibition effects on esophageal cancer cells Eca109.

METHODS: The $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ complex was made using impregnation process. Its properties were described through transmission electron microscope, energy spectrometer, and atomic fluorescence spectrometer. In *in vitro* test, two plates of Eca109 cell lines were co-cultured with nanosized $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$, $\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ or aqueous of As_2O_3 , and then one of the plates was placed in an alternating magnetic field to rise to a therapeutic temperature, which is called magnetic fluid hyperthermia. The other plate of cells was cultured as usual.

RESULTS AND CONCLUSION: The nanosized $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ were approximately global examined by transmission electron microscope. The As content measured by atomic fluorescence spectrophotometer was 0.012% to 0.066%. The proliferation ratio of the cells exposed to $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ complex at the concentration of 5 $\mu\text{mol/L}$ was significantly lower than that exposed to $\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ alone or the negative control group ($P < 0.05$). The apoptosis rate of cells exposed to $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ complex combined with magnetic fluid hyperthermia was much higher than that exposed alone to $\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ with magnetic fluid hyperthermia or As_2O_3 ($P < 0.05$). These findings indicate that $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ complex combined with magnetic fluid hyperthermia can significantly inhibit the proliferation of esophageal cancer cells.

Key Words: biomaterials; nanobiomaterials; $\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$; $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ complex; magnetic fluid hyperthermia; combined therapy; esophageal cancer; proliferation; apoptosis; the National Natural Science Foundation of China; biomaterial photographs-containing paper

Lu XL, Wang YW, Zhang DS. Nanosized $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ complex treats esophageal cancer in vitro. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(8): 1378-1383.

0 引言

三氧化二砷(As_2O_3)系砒霜的主要成分,其药用历史悠久,1999年作为国家二类新药已经上市,美国食品和药品管理局(FDA)也正式批准用砒霜治疗急性早幼粒细胞白血病的方案。国内外研究也确认了其广谱抗癌性,有关 As_2O_3 对食管癌的作用,中国学者首次应用砒剂治疗急性早幼粒细胞白血病取得成功,并证实是通过诱导细胞凋亡而发挥作用的^[1]。 As_2O_3 可明显抑制肿瘤细胞的生长^[2-4],但对于实体瘤的治疗,如何提高肿瘤局部的药物浓度,同时尽量减少对正常组织的损害,仍然是有待解决的问题。出现于21世纪50年代的在AC磁场中使用磁性微球的人工高热研究,带来了癌症热疗法的复兴。此项技术利用磁性微粒在交变磁场作用下,能够大量吸收电磁波能量,并将其迅速转化为热能,当通过局部注射或动脉导管将其注入瘤体后,可使瘤区升温达所需的治疗温度(41-46 °C),从而杀死肿瘤细胞^[5-6],而不含磁性微粒的正常组织不受损。同时通过外加磁场可使药物滞留于靶区,有望实现肿瘤的靶向治疗。如果把抗肿瘤药物如 As_2O_3 和适当的磁感应物质制成复合材料,在交变磁场磁感应加热条件下,将药物对肿瘤的作用和热疗相结合,必将显著提高对肿瘤的杀伤作用。基于此,实验筛选出具有合适居里温度的纳米级锰锌铁氧体^[7]($\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$)作为磁流体热疗的磁感应物质,用浸渍法制备了 $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 复合纳米粒,观察其对食管癌Eca109细胞增殖抑制和凋亡诱导的作用。

1 材料和方法

设计: 析因设计及随机区组设计细胞实验。

时间及地点: 于2011年9月至2012年5月在东南大学电镜室、东南大学病理实验室完成。

材料:

三氧化二砷(As_2O_3): 购自Sigma公司,在90 °C水浴下用去离子水将 As_2O_3 溶解,去离子水稀释成浓度为1 mmol/L的溶液,临用前用DMEM培养液稀释成使用浓度为5 $\mu\text{mol/L}$ 的试剂备用。

$Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 磁性材料: 实验室自制^[7], 实验时将DMEM培养液配制成10 g/L的溶液备用; 根据 $As_2O_3=1.32 \times As$, 配制 As_2O_3 终浓度为5 $\mu mol/L$ 的 $As_2O_3/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 复合纳米粒试剂。

Eca109细胞株(人食管癌细胞): 本实验室冻存。

试剂与仪器:

Main experimental reagents and instruments:

试剂及仪器	来源
进口胎牛血清和 DMEM 培养基	南京维森特生物科技有限公司
四甲基偶氮唑蓝(MTT)	美国 AMRESCO
二甲基亚砜(DMSO): 分析纯	上海凌峰化学制品有限公司
H-600 型透射电镜、分光光度仪	Hitachi
倒置显微镜	Nikon
酶标仪	MK3-353 Multiskan
能谱仪	hermo NORAN, vantage

实验方法:

$As_2O_3/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 复合纳米粒的制备: 参照文献[8]称取 As_2O_3 30 mg, 在90 °C水浴下, 使其完全溶于5 mL去离子水中, 再分别加入适量去离子水使相应的 As_2O_3 溶液质量浓度为0.01, 0.02, 0.03, 0.04 g/L, 乙酸调节其酸度为pH值=5左右, 分别称取 $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 800 mg超声分散条件下加入其中, 后置入80 °C水浴中30 min使 $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 与 As_2O_3 溶液充分接触; 之后2 000 r/min离心10 min, 收集沉淀, 无水乙醇洗涤2次, 80 °C烘干, 即得 $As_2O_3/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 复合纳米粒, 取少量产物无水乙醇超声分散后制成电镜样品, 进行透射电镜及能谱仪检测, 另取适量备测含砷量。

MTT方法测定细胞增殖率: 将Eca109细胞接种于含体积分数10%胎牛血清的DMEM培养液中, 在37 °C, 饱和湿度、体积分数5%CO₂的培养箱中培养, 每二三天传代1次, 实验时取对数生长期细胞, 用0.25%胰酶消化并吹打成细胞悬液, 调整细胞浓度为 $4 \times 10^7 L^{-1}$, 取2块96孔板, 按每孔100 μL 接种, 分组相同, 分别为阴性对照组(DMEM培养液)、游离 As_2O_3 组(5 $\mu mol/L$)、单纯 $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 组(10 g/L)、含 As_2O_3 终浓度5 $\mu mol/L$ 的 $As_2O_3/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 复合纳米粒组, 每组复孔8个。两块板分别为联合磁流体热疗板及非热疗板, 细胞接种24 h后, 按分组情况分别加入DMEM培养液、游离 As_2O_3 、 $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 及 $As_2O_3/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 复合纳米粒, 其中联合磁感应加热板置于SP-04C高频加热器平板线圈上1 h, 给定交变磁场200 kHz、4 kW, 输出电流300 A, 两板置于37 °C, 体积分数5%CO₂的饱和湿度培养箱中继续培养48 h, 后加入MTT 20 μL /孔, 同前条件

继续培养4 h, 弃去液体, 每孔加入160 μL DMSO, 振荡混匀10 min置于酶标仪上读取493 nm处A值。

$$\text{细胞相对增殖率} = \frac{\text{实验组A值}}{\text{阴性对照组A值}} \times 100\%$$

流式细胞仪测定细胞DNA含量: 因MTT实验考虑因素较多, 磁场的因素、磁性材料的因素, 在MTT结果排除了对细胞生长无影响的因素后, 此处只进行了几个关键条件的实验对比。取对数生长期的Eca109细胞, 用0.25%胰酶消化并吹打成细胞悬液, 调整细胞浓度为 $3 \times 10^8 L^{-1}$ 接种于50 mL培养瓶, 每瓶接种2 mL, 24 h后加入 As_2O_3 终浓度为5 $\mu mol/L$ 的游离 As_2O_3 、 $As_2O_3/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 复合纳米粒、 $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ (10 g/L), 后两者置于SP-04C高频加热器平板线圈上1 h, 给定交变磁场200 kHz、4 kW, 输出电流300 A, 另两瓶为阴性对照组(加入DMEM培养液)及 $Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 未热疗组, 5瓶细胞置于37 °C, 饱和湿度、体积分数5%CO₂的培养箱中培养48 h, 倒置显微镜观察细胞生长情况并照相。收集细胞, PBS洗涤细胞2次, 体积分数70%乙醇4 °C固定细胞24 h以上。检测前用PBS洗涤细胞2次, 细胞重悬于0.5 mL PI染色液(20 mg/L, 含0.25 g/L RNase A)中, 室温避光染色30 min, 用300目丝网过滤后即可上机分析(所有资料经Lysis II软件收集、分析)。

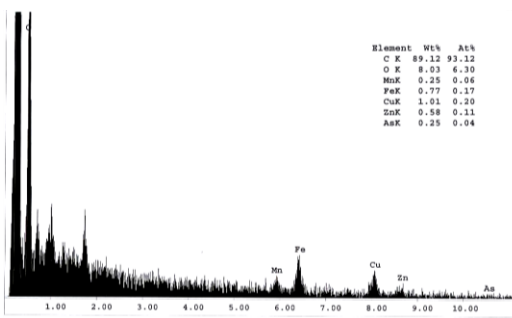
主要观察指标: 各组细胞增殖率及DNA含量。

统计学分析: 细胞增殖率用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对照组间差异显著性采用方差分析做组间均数比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义, 统计过程由SPSS 13.0统计软件完成。

2 结果

2.1 $As_2O_3/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 复合纳米粒电镜观察及能谱分析 取 $As_2O_3/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$ 复合纳米粒适量, 用无水乙醇超声分散, 滴有膜铜网。在JEM-2010高分辨电镜下观察, 见所制备的复合材料呈近似球形, 任选一视野进行能谱分析, 均能检测到锰、铁、锌、砷等材料成分, 见图1。

用原子荧光分光光度计测定的砷的标准工作曲线为: $I = 3.737 + 13.097C$, $r = 0.9995$, 其中I为分析信号峰面积, C为砷浓度, 经测定, 在最初配置的 As_2O_3 溶液质量浓度为0.01, 0.02, 0.03, 0.04 g/L时, 复合材料中含砷量(质量比)分别为0.012%, 0.035%, 0.059%, 0.066%。



注: 在 JEM-2010 高分辨电镜下观察, 见所制备的复合材料呈近似球形, 任选一视野进行能谱分析, 均能检测到锰、铁、锌、砷等材料成分。

图 1 $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 复合纳米粒的能谱分析检测结果

Figure 1 Composition test results of $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ complex by energy spectrometer

2.2 MTT实验检测各组细胞增殖结果 MTT实验观察细胞形态发现, 5 $\mu\text{mol/L}$ 的游离 As_2O_3 处理Eca109细胞 24 h, 即有少数细胞开始变圆, 48 h细胞染色质和细胞质浓缩, 并有部分从培养瓶壁脱落悬浮于培养基中; 在非热疗板中, 单纯 $\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 处理的细胞并未出现生长受抑制的表现, 其细胞增殖率与阴性对照组相比差异无显著性意义($P > 0.05$), 提示单纯 $\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 对细胞生长无影响; $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 复合纳米粒组细胞增殖率明显低于阴性对照组($P < 0.05$)。

在磁流体热疗板中, 单纯 $\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 纳米材料组细胞增殖率明显低于阴性对照组($P < 0.05$), 提示磁流体热疗对细胞增殖产生了抑制作用; 同时 $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 复合纳米粒组细胞增殖率明显低于游离 As_2O_3 组或单纯 $\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 纳米材料组($P < 0.05$), 提示 $\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 在磁场照射下加强了 As_2O_3 对细胞的毒性作用。阴性对照组(加入DMEM培养液)在两块板之间生长情况均较好, 细胞增殖率并无明显差别, 提示单纯磁场作用对细胞生长无影响。各处理组Eca109细胞相对增殖率的计算及MTT实验结果见表1。

2.3 各组细胞流式细胞仪检测结果 流式细胞仪分析细胞DNA含量, 结果显示: $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 复合纳米粒联合磁感应加热处理Eca109细胞48 h, 可出现DNA含量明显低于 G_1 期的亚 G_1 期细胞峰, 即凋亡峰, 凋亡率为34.16%, 游离 As_2O_3 组凋亡率为13.71%, $\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 材料热疗组为16.18%, 而 $\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 未热疗组凋亡率及阴性对照组的凋亡

率分别为2.06%, 2.14%, 见图2。

表 1 各组 Eca109 细胞相对生存率 MTT 实验结果

Table 1 Relative growth rate of Eca109 cells in MTT test

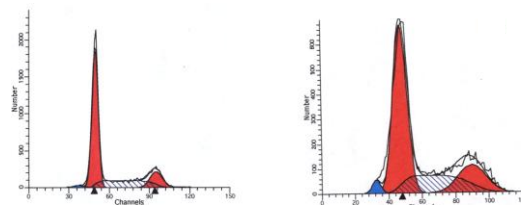
($\bar{x} \pm s, n=8, \%$)

组别	未施加磁流体热疗	施加磁流体热疗
阴性对照组	100	100.35 \pm 3.57
5 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 组	58.62 \pm 1.61 ^a	60.17 \pm 1.20 ^a
$\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 组	98.08 \pm 1.14	73.16 \pm 2.14 ^{ab}
$\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 组	50.88 \pm 1.86 ^a	32.93 \pm 1.63 ^{abc}

与阴性对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与施加磁流体热疗前比较, ^b $P < 0.05$; 与 As_2O_3 组施加或未施加磁流体热疗比较, ^c $P < 0.05$ 。

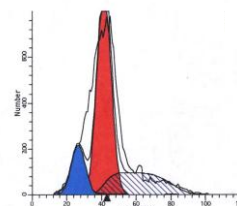
注: 向两块培养板的食管癌 Eca109 细胞中分别加入 DMEM 培养液(阴性对照)、 $\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 纳米材料、含 As_2O_3 终浓度 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 复合纳米粒、游离 As_2O_3 (终浓度 5 $\mu\text{mol/L}$), 其中一块培养板进行磁流体热疗, 另一块培养板正常培养。

结果表明在非磁流体热疗板中, 单纯 $\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 对细胞生长无明显影响, As_2O_3 、 $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 复合纳米粒可抑制细胞生长; 在磁流体热疗板中, $\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 纳米、 As_2O_3 、 $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 复合纳米粒抑制细胞生长的作用明显增强, 以 $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 复合纳米粒作用最明显。

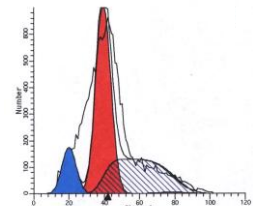


A: 阴性对照组凋亡率 2.14%

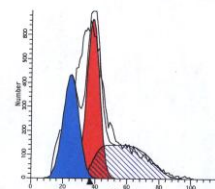
B: $\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 未联合磁流体热疗组凋亡率 2.06%



C: $\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 联合磁流体热疗组凋亡率 15.23%



D: 5 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 组凋亡率 13.71%



E: $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 复合纳米粒联合磁流体热疗组凋亡率 34.16%

注: 将 Eca109 细胞分别接种于含 As_2O_3 终浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 的游离 As_2O_3 、 $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 复合纳米粒、 $\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 纳米的培养瓶中, 后两者再施加磁流体热疗, 另设置阴性对照组(加入 DMEM 培养液)及 $\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 纳米组。

图 2 各组 Eca109 细胞 DNA 含量流式细胞仪检测结果

Figure 2 Flow cytometry results of Eca109 cells

3 讨论

实验中使用的 $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 纳米粒采用超微粒子催化剂的制备方法——浸渍法制备,这是一种无污染的制备催化剂的物理方法^[9]。此方法的最终目的是以最有效的方式把活性组分分散到载体上,得到大的比表面积和最大催化活性。加载过程实际是活性前驱体在载体表面上的吸附过程,相对于实验来说,活性组分即是 As_2O_3 溶液,载体是纳米级 $\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 体粉末,使用过量浸渍法将活性成分 As_2O_3 加到载体上。所不同的是,由于是实验室制备而非工业化生产,制备量较少故而以离心步骤取代过滤步骤收集载体,浸渍法制备负载型催化剂时,活性前驱体溶液的浓度、浸渍时间和条件均影响负载催化剂的性能,从实验结果来看,当 As_2O_3 溶液浓度很低时,随 As_2O_3 溶液质量浓度的增加,用原子荧光光谱仪(氢化物发生法)所测得的复合材料中含砷量也随之增加,但在 As_2O_3 溶液质量浓度很大时,如预实验时曾将载体浸渍于6 g/L As_2O_3 溶液中,经测定砷含量达到0.885%,由于治疗浓度的 As_2O_3 均较低,如此大的载药量根本无法应用于治疗中,因此只探讨了较低浓度时浸渍浓度与载药量的关系。结果显示当 As_2O_3 浓度为0.01 g/L时,所制备得复合材料含砷量为0.012%(质量比),较适宜进一步进行实验。实验中由于作为载体的 $\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 粒径很小,比表面积大,吸附性能优良,能使被吸附的药物与载体周围的药物之间始终保持着一种动态平衡,当游离的药物被体液稀释或被机体代谢浓度下降时,根据吸附等温曲线的平衡曲线,制剂马上释放等量的药物来补足被消耗的量。由此可推测,载药的纳米粒子并非是单纯地缓慢释放药物,而是具有使周围游离药物维持一定浓度的功能。

实验中探讨了将 As_2O_3 的细胞毒作用同磁感应加热相结合,以期寻求一个更有效杀伤恶性肿瘤细胞的方法。MTT实验结果显示, $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 复合纳米粒联合磁流体热疗对于人食管癌细胞具有强烈的细胞毒性, As_2O_3 联合磁感应加热组的细胞生存率明显低于游离 As_2O_3 组;在 As_2O_3 浓度为5 $\mu\text{mol/L}$ 时,游离 As_2O_3 组的细胞生存率为(58.62±1.61)%, $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 复合纳米粒磁场照射组的细胞生存率为(32.93±1.63)%,由此可以看出,热疗能够加强 As_2O_3 对细胞的增殖抑制作用^[10-11];同时,为了探讨磁场本身对细胞增殖有无影响,实验还设立了未经磁场照射组,通过对比发现,凡

不含磁性材料的组中,照射组与未照射组相比细胞增殖率差异无显著性意义,说明磁场对于不含磁响应物质的细胞生长是没有影响的(P 均>0.05);而含有磁性材料的组中,经磁场照射组的细胞生存率明显低于未照射组(P 均<0.05),证明了复合材料吸收电磁波产生热量并对细胞产生作用的事实。Brusentsov等^[12]研究了水基右旋糖苷铁氧体在交变电磁场中对腹膜恶性肿瘤细胞MX11的生长抑制作用,发现若不置于磁场中,水基右旋糖苷铁氧体对MX11无毒性作用;其细胞生存率与阴性对照组无差异;同样不加水基右旋糖苷铁氧体的细胞置于磁场中照射后,细胞生长亦不受影响;而与水基右旋糖苷铁氧体一起培养的细胞在磁场照射后生存率明显下降,得出结论:水基右旋糖苷铁氧体对细胞的毒性作用完全是由于磁性离子与交变磁场相互作用即吸收电磁波转化为热量对细胞加热所致,本实验结果与其一致。

细胞凋亡率的测定结果表明, $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 复合纳米粒联合磁感应加热处理Eca109细胞48 h,可出现DNA含量明显低于 G_1 期的亚 G_1 期细胞峰,既凋亡峰,凋亡率为34.16%,明显高于单纯 As_2O_3 处理组(13.71%)及单纯热疗组(15.23%),且高于两组之和,提示可能存在增敏作用。 As_2O_3 已被证明具有多种抗肿瘤功能,如亲氧化剂、血管生成抑制、血流抑制及放射增敏等。Griffin等在2000年的体外实验研究表明 As_2O_3 能显著提高肿瘤细胞对热疗的敏感性,这一点与本实验一致。不仅如此,Griffin等^[13]还进一步研究了 As_2O_3 增强肿瘤细胞热敏性的机制,可能与黏附分子的表达增强及抑制血管的生成有关。日本学者在研究具有低居里温度的铁磁体介导的热疗对黑色素瘤细胞的抑制作用中也发现,细胞对热疗的敏感性可通过抑制热休克蛋白90的表达而提高^[14]。这些增敏机制是否同样适用于人食管癌Eca109细胞,有待进一步实验证明。

文章研究了 $\text{As}_2\text{O}_3/\text{Mn}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 复合纳米粒的制备及联合或不联合磁感应加热对食管癌细胞的作用,通过加热和 As_2O_3 的联合作用,来“烧死”和“毒死”肿瘤细胞,取得较显著的疗效,并且利用磁性材料的居里温度达到自动控温、恒温热疗,有望成为食管癌联合治疗的新途径。

致谢:对文章提供帮助的东南大学医学院病理实验室各位老师表示感谢,感谢张东生教授在实验设计及成文修改等方面给予宝贵意见,感谢安艳丽、侯欣欣在细胞培养等方面给予的

帮助。

基金资助: 国家自然科学基金项目(81171452); 江苏省卫生职业教育课题项目(J201007); 江苏省高等学校大学生实践创新训练计划项目(979)。

作者贡献: 通讯作者进行实验设计, 实验实施为第一作者, 实验评估、成文、审校为通讯作者, 第一作者对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 未涉及与伦理相冲突的内容。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献

- [1] Deng YP,Lin C,Chen JP,et al.Zhongguo Yaolixue yu Dulixue Zazhi. 1999;13(4): 288-293.
邓友平,林晨,陈洁平,等.三氧化二砷诱导人宫颈癌细胞凋亡及 bcl-2高表达对其影响[J].中国药理学与毒理学杂志,1999,13(4): 288-293.
- [2] Ai Z,Lu W,Ton S,et al.Arsenic trioxide-mediated growth inhibition in gallbladder carcinoma cells via down-regulation of Cyclin D1 transcription mediated by Sp1 transcription factor. Biochem Biophys Res Commun. 2007;360(3): 684-689.
- [3] Ma XD,Qiao DF,Tian XM,et al.Aizheng. 2006;25(1):17-21.
马晓冬,乔东访,田雪梅,等.三氧化二砷诱导线粒体通透性转变孔道开放的机制研究[J].癌症,2006,25(1):17-21.
- [4] Wetzler M,Brady MT,Tracy E,et al.Arsenic trioxide affects signal transducer and activator of transcription proteins through alteration of protein tyrosine kinase phosphorylation. Clin Cancer Res.2006;12(22):6817-6825.
- [5] Jordan A,Wust P,Scholz R,et al.Cellular uptake of magnetic fluid particles and their effects on human adenocarcinoma cells exposed to AC magnetic fields in vitro.Int J Hyperthermia.1996;12(6):705-722.
- [6] Babincová M,Leszczynska D,Sourivong P,et al. Superparamagnetic gel as a novel material for electromagnetically induced hyperthermia. J Magn Magn Mater.2001;225(1-2):109-112.
- [7] Lu XL,Zhang DS,Gu N,et al.Nanjing Yike Daxue Xuebao. 2004;24(6):582-585.
路新丽,张东生,顾宁,等.纳米锰锌铁氧体的生物相容性研究[J].南京医科大学学报,2004,24(6):582-585.
- [8] Du Y,Zhang D,Liu H,et al. Thermochemotherapy effect of nanosized As₂O₃/Fe₃O₄ complex on experimental mouse tumors and its influence on the expression of CD44v6, VEGF-C and MMP-9.BMC Biotechnol.2009;9(84):1472-1483.
- [9] Jin MS,Xu XF,Weng YG,et al.Yantai Daxue Xuebao. 2003; 16(1):49-53.
金明善,徐秀峰,翁永根,等.CeO₂在Al₂O₃及TiO₂载体上的分散[J].烟台大学学报:自然科学与工程版,2003,16(1):49-53.
- [10] Wang L, Zhang J, An Y, et al.A study on the thermochemotherapy effect of nanosized As₂O₃/MZFTermosensitive magnetoliposomes on experimental hepatoma in vitro and in vivo.Nanotechnology. 2011;22(31): 315102.
- [11] Wang L,Wang Z,Liu J,et al.Preparation of a new nanosized As₂O₃/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe₂O₄ thermosensitive magnetoliposome and its antitumor effect on MDA_MB_231 cells. J Nanosci Nanotechnol.2011;11(12):10755-10759.
- [12] Brusentsov NA,Gogosov VV,Brusentsova TN,et al.Evaluation of ferromagnetic fluids and suspensions for the site-specific radiofrequency-induced hyperthermia of MX11 sarcoma cells in vitro.J Magn Magn Mater.2001;225(1-2):113-117.
- [13] Griffin RJ,Monzen H,Williams BW,et al.Arsenic trioxide induces selective tumour vascular damage via oxidative stress and increases thermosensitivity of tumours.Int J Hyperthermia.2003;19(6):575-589.
- [14] Ito A,Saito H,Mitobe K,et al.Inhibition of heat shock protein 90 sensitizes melanoma cells to thermosensitive ferromagnetic particle-mediated hyperthermia with low Curie temperature. Cancer Sci.2009;100(3):558-564.