

# 吉西他滨纳米磁靶向药囊对肺鳞癌移植瘤抑制作用及癌基因 Ras 表达的影响

薛克营, 柯明耀, 吴雪梅, 赵年贵, 林岩, 沈杰芳

厦门医学院附属厦门市第二医院 厦门市呼吸中心, 福建 厦门 361021

**摘要:** **目的** 研究吉西他滨纳米磁靶向药囊对肺鳞癌 A2 细胞株体内移植瘤的抑制作用及对癌基因 Ras mRNA 及 Ras 蛋白表达的影响。**方法** 选择 SPF 级雄性裸鼠 60 只。取处于对数生长期的肺鳞癌细胞株 A2 细胞,用含有 EDTA 的胰酶消化后,悬液接种于在裸鼠右股外侧制作鳞癌移植瘤模型。20 d 后选取肿瘤体积约为  $72.5 \text{ mm}^3$  的裸鼠作为实验动物模型,并分为 5 组:(1)NiTi 合金支气管支架 + 吉西他滨纳米磁靶向药囊组;(2)NiTi 合金支气管支架 + 吉西他滨组;(3)吉西他滨纳米磁靶向药囊组;(4)吉西他滨组;(5)未干预组。NiTi 合金支气管支架于肿瘤中手术植入,纳米磁靶向药囊或化疗药物通过尾静脉注入,其中吉西他滨纳米磁靶向药囊为本研究自行制备,吉西他滨有效剂量均按  $45 \text{ mg/kg}$  给予。未干预组尾静脉注射同量的生理盐水处理。均连续给药 10 d。比较各组处理后的肿瘤生长情况。利用 Western Blot 和 RT-PCR 法分别检测治疗后癌组织中 Ras 蛋白及 Ras mRNA 的相对表达水平。**结果** 与未干预组相比,NiTi 合金支气管支架 + 吉西他滨纳米磁靶向药囊组、NiTi 合金支气管支架 + 吉西他滨组、吉西他滨纳米磁靶向药囊组、吉西他滨组的瘤重和体积均明显减少 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),其抑瘤率分别为 59.0%、38.0%、33.0%、28.0%。NiTi 合金支气管支架 + 纳米磁靶向药囊组 Ras 蛋白、Ras mRNA 相对表达水平最低 ( $P$  均  $< 0.01$ ),与未干预组比较,NiTi 合金支气管支架 + 化疗药物组、纳米磁靶向药囊组、化疗药物组 Ras 蛋白、Ras mRNA 相对表达水平均有所下降 ( $P$  均  $< 0.05$ ),但 3 组之间差异无统计学意义 ( $P$  均  $> 0.05$ )。**结论** 纳米磁靶向药囊合并 NiTi 合金支气管支架可以显著抑制肺鳞癌 A2 细胞移植瘤的生长,下调癌基因 Ras mRNA 和 Ras 蛋白的表达,诱导肿瘤细胞凋亡。

**关键词:** 吉西他滨; 肺鳞癌; NiTi 合金支气管支架; 纳米磁靶向药囊; Ras 基因; Ras 蛋白; 抑瘤率; 癌基因  
**中图分类号:** R 734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2016)12-1606-04

## Effect of gemcitabine magnetic targeted nanocapsule on inhibition of transplanted squamous cell lung carcinoma in nude mice and RAS oncogene expression

XUE Ke-ying, KE Ming-yao, WU Xue-mei, ZHAO Nian-gui, LIN Yan, SHEN Jie-fang

Xiamen Respiratory Center, The Second Affiliated Hospital of Xiamen Medical College, Xiamen, Fujian 361021, China

**Abstract: Objective** To study the inhibition effect of magnetic targeted nanocapsule containing gemcitabine on in vivo transplanted tumor of lung squamous carcinoma A2 cell lines and the influence on oncogene Ras mRNA and Ras protein expressions in nude mice. **Methods** Sixty SPF grade male nude mice were selected. Transplantation tumor model of squamous cell carcinoma was established by vaccinating the suspension of lung squamous cell carcinoma cell line A2 in logarithmic growth phase after digestion with trypsin containing EDTA into right lateral femoral of nude mice. The nude mice with tumor of volume about  $72.5 \text{ mm}^3$  after 20 days were served as experiment animal models and were divided into five groups: NiTi alloy bronchial stent + gemcitabine magnetic targeted nanocapsule group, NiTi alloy bronchial stent + gemcitabine group, gemcitabine magnetic targeted nanocapsule group, gemcitabine group and no intervention group. NiTi alloy stent was implanted into tumor by surgery. Targeted magnetic nanoparticles or chemotherapeutic drugs were administered by tail vein injection. Targeted gemcitabine magnetic nanoparticles were self-prepared for present study. Gemcitabine was given with the effective dose of  $45 \text{ mg/kg}$ . The mice in no intervention group was treated by tail vein injection of same amount of saline. Continuous administration was given 10 days in all group. The growth situation of tumor after treatment was compared in all group. Western Blot and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) methods were used to respectively de-

fect the relative expression levels of Ras protein and Ras mRNA in cancer tissues after treatment. **Results** Compared with no intervention group, tumor weight and volume in NiTi alloy bronchial stent + gemcitabine magnetic targeted nanocapsule group, NiTi alloy bronchial stent + gemcitabine group, gemcitabine magnetic targeted nanocapsule group, gemcitabine group were all significantly decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and their tumor inhibitory rate were 59.0%, 38.0%, 33.0% and 28.0%, respectively. The relative expression levels of Ras protein and Ras mRNA in cancer tissues were all the lowest in NiTi alloy bronchial stent + gemcitabine magnetic targeted nanocapsule group (all  $P < 0.01$ ) and decreased same in NiTi alloy bronchial stent + gemcitabine group, gemcitabine magnetic targeted nanocapsule group, gemcitabine group compared with no intervention group (all  $P < 0.05$ ), while there were no significant differences in these 3 groups (all  $P > 0.05$ ). **Conclusions** The magnetic targeted nanocapsule group combined with NiTi alloy bronchial stent can significantly inhibit the growth of transplanted tumor of lung squamous carcinoma A2 cells, down-regulate the expressions of oncogene Ras mRNA and Ras protein and induce apoptosis of tumor cells.

**Key words:** Gemcitabine; Lung squamous carcinoma; NiTi alloy bronchial stents; Magnetic targeted nanocapsule; Ras gene; Ras protein; Tumor inhibitory rate; Oncogene

肺癌是严重威胁人类生命和健康的恶性肿瘤,近 50 年来肺癌的发病率和病死率明显增高,发达国家更为明显<sup>[1-2]</sup>。我国肺癌发病也呈增长趋势,近 20 年来每年肺癌新发病例以约 0.5% 的速度增长,病死率增加了近 1.5 倍,是病死率增长最快的恶性肿瘤。目前,肺癌的治疗仍采取以外科手术为主的综合治疗,但许多患者确诊时已是中晚期,手术切除率低,预后差<sup>[3-4]</sup>。纳米磁性药囊由适当的磁性成分包封一定量的抗癌药物构成,在足够强的磁场作用下,能够把药物定向于靶向器官,使其所含药物能集中在病变部位从而达到提高疗效,降低毒副作用的效果<sup>[5]</sup>。

本研究制备裸鼠肺癌模型,观察吉西他滨纳米磁靶向药囊对肺鳞癌 A2 细胞体内移植瘤的抑制作用及对癌基因 Ras 及其蛋白表达的影响。现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物及细胞系来源 SPF 级雄性裸鼠 60 只,体重 18 ~ 20 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,许可证号:SCXK(沪)2015-0006;人肺鳞癌 A2 细胞株购自中国科学院细胞库(上海)。

1.1.2 药物与试剂 吉西他滨(江苏豪森药业公司,批号:H32020964),NiTi 合金支气管支架(南京微创),RMPI-1640(GIBCO,美国),胎牛血清(GIBCO,美国),胰蛋白酶(AMRESCO,美国);Trizol 试剂(Invitrogen),溴化乙锭(Ethidium Bromide,EB,华美生物工程公司),反转录试剂盒 Revertaid™ First Strand cDNA Synthesis(罗氏),RNase Inhibitor(Epicentre),RIPA 细胞裂解液(P0013B,碧云天生物研究所),Anti-actin Antibody(SC-47778,Santa Cruz,美国)、Anti-Ras Antibody(Cell Signaling Technology,美国),Anti-Rabbit IgG,HRP-linked Antibody(Cell Signaling Technology,

美国),Anti-Mouse IgG,HRP-linked Antibody(Cell Signaling Technology,美国)。Ras 引物(华大基因):F:5'-AGATGTCCACGACTTTGCAG-3',R:5'-CGATGTGTGCATCCACAGAG-3'; $\beta$ -actin 引物(华大基因):F:5'-TACAATGAGCACCACTTTC-3',R:5'-GCCGATAGTGAACCGCTCATT-3'。

1.1.3 主要仪器 光学显微镜(CKX31,Olympus 公司),二氧化碳培养箱(Thermo Forma 公司),台式高速冰冻离心机(德国 HERAEUS),PCR 扩增仪(美国 PE 公司 9600 型),Gel-Doc 1000 成像定量分析仪(美国 Bio-Rad)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 制备裸鼠肺癌模型 采用培养肺癌细胞株注射法制备裸鼠肺癌模型。取处于对数生长期的生长状态良好的肺鳞癌细胞株 A2 细胞,用含有 EDTA 的胰酶消化 A2 细胞,在显微镜下观察到细胞变圆,且细胞间隙变大时加入新鲜培养基停止消化,将细胞悬液转移至 15 ml 无菌离心管,1 000 rpm,离心 10 min。取 10  $\mu$ l 细胞用计数器对细胞计数,加培养基调节细胞终浓度为  $1 \times 10^7$  个/ml。取 0.2 ml 浓度为  $1 \times 10^7$  个/ml 的细胞悬液接种于实验裸鼠右股外侧皮下<sup>[6]</sup>。移植后 20 d,挑选肿瘤体积约为 72.5 mm<sup>3</sup> 的裸鼠作为实验动物模型。

1.2.2 治疗并定期观察原位肿瘤变化 将肺癌模型裸鼠分成 5 组:(1)NiTi 合金支气管支架 + 吉西他滨纳米磁靶向药囊组;(2)NiTi 合金支气管支架 + 吉西他滨组;(3)吉西他滨纳米磁靶向药囊组;(4)吉西他滨组;(5)未干预组。手术植入 NiTi 合金支气管支架于肿瘤中,通过尾静脉注入纳米磁靶向药囊或化疗药物。吉西他滨纳米磁靶向药囊为本研究自行制备,吉西他滨有效剂量均按 45 mg/kg 给予<sup>[6]</sup>。对照组尾静脉注射同量的生理盐水处理。连续给药 10 d。裸鼠

自接种后每天观察荷瘤鼠存活和精神状况,以游标卡尺测量肿瘤最长径(a)和最短径(b)计算肿瘤体积(V), $V=0.52ab^2$ ,绘制肿瘤生长曲线。给药第 11 天脱颈处死小鼠,分离移植瘤并计算抑瘤率,抑瘤率=(对照组-治疗组)/对照组×100%。

1.2.3 Western-blot 检测 Ras 蛋白表达水平 将存放于超低温冰箱中的肿瘤组织取出切成细小的碎片,用含有 1 mM 蛋白酶抑制剂 PMSF 的 RIPA 裂解液提取组织蛋白,并用 BCA 法进行蛋白定量,根据标准曲线计算出蛋白浓度,然后取 100  $\mu$ g 蛋白样品,加蛋白体积 1/4 的 5 × loading buffer,在 100 °C 金属浴中变性蛋白 5 min。用 SDS-PAGE 分离目的蛋白,恒流 300 mA 湿转 1 h 将目的蛋白转印至 NC 膜上, TBST 洗 5 min, 10% 脱脂奶粉在摇床上以 80 r/min 室温封闭 2 h, 分别加入 Ras 抗体和  $\beta$ -actin 抗体, 4 °C 孵育过夜。TBST 洗膜, 15 min/次, 洗 4 遍。然后用 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜, 15 min/次, 洗 3 遍, TBS 洗 2 次, 每次 5 min。将保鲜膜铺于暗盒中, 膜放于保鲜膜上。ECL 化学发光试剂盒中的 A 和 B 试剂等体积混合, 现配现用制成工作液。在膜上均匀滴加工作液, NO LIGHT 状态下曝光 10 s。保存 Sgd 格式图片并用软件对扫描蛋白的灰度值进行分析。

1.2.4 逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)法检测肺癌 Ras 基因的表达 检测肺癌基因 Ras mRNA 表达水平。用 1 ml Trizol 提取细胞总 RNA, 使用核酸蛋白定量仪定量样品, 然后将总 RNA 进行逆转录反应生成 cDNA, 按照 Thermo Fisher 的 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒说明书进行逆转录。(1) 加入 2  $\mu$ g 的 RNA, 1  $\mu$ l Oligo(dT)18, 并用 DEPC 处理的水补齐至 12  $\mu$ l, 混匀并瞬时离心。于 PCR 仪上 65 °C 孵育 5 min 后, 立即放置到冰上。(2) 在冰上依次加入试剂盒中的 2  $\mu$ l dNTPmix, 4  $\mu$ l 5 × buffer, 1  $\mu$ l RiboLock™ Rionuclease inhibitor, 1  $\mu$ l RevertAid™ M-MLV Reverse Transcriptase, 并于 PCR 仪上 42 °C 孵育 1 h 后 70 °C 10 min 终止反应。(3) 将 cDNA 保存于 -20 °C 备用。然后将 cDNA 进行 PCR 扩增。cDNA 1  $\mu$ l, Primer Star (Takara) 1  $\mu$ l, Ras F、Ras R、 $\beta$ -actin F、 $\beta$ -actin R 各 1  $\mu$ l (浓度均为 20 nM), 无菌水 21  $\mu$ l。反应条件: 95 °C 3 min, 95 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环, 72 °C 10 min, 4 °C 5 min。取 PCR 产物用 1% 琼脂糖胶进行电泳, 同时用  $\beta$ -actin 作为内参, 电泳结果经 Genesnap 成像后用 GeneTools 进行半定量分析。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 11.0 统计软件将实验所得数据进行统计分析。实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。组

间比较采用 Mann-Whitney 非参数检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 成功建立裸鼠肺癌模型 将肺鳞癌细胞株 A2 细胞注射接种于裸鼠右股外侧皮下, 将移植后裸鼠正常培养 20 d 长出肿瘤, 挑选肿瘤体积约为 72.5 mm<sup>3</sup> 的裸鼠, 作为实验动物模型。见图 1。

2.2 干预后各组裸鼠肿瘤体积及瘤重变化比较 各给药组小鼠状态良好, 注射局部正常。由肿瘤生长曲线可见各处理组的肿瘤生长均受到不同程度抑制, 以 NiTi 合金支气管支架 + 纳米磁靶向药囊组生长最为缓慢, 化疗药物组、纳米磁靶向药囊组和 NiTi 合金支气管支架 + 化疗药物组相当(图 2)。各处理组均能显著降低肿瘤质量和体积, 与未干预组相比差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见表 1。

2.3 各组肺癌组织 Ras 蛋白表达比较 Western Blot 结果显示:(1) NiTi 合金支气管支架 + 纳米磁靶向药囊组 Ras 蛋白相对表达水平最低, 与未干预组相比差异有统计学意义( $P < 0.01$ ); (2) NiTi 合金支气管支架 + 化疗药物组、纳米磁靶向药囊组、化疗药物组 Ras 蛋白相对表达水平较未干预组均有所下降( $P$  均  $< 0.05$ ), 而这 3 组之间无明显差异( $P > 0.05$ )。见图 4。将 Western blot 的蛋白图用 genetool 进行灰度扫描, 结果见图 3。

2.4 各组肺癌组织 Ras 基因表达变化比较 RT-PCR 检测 Ras 基因表达结果与 Ras 蛋白表达一致, NiTi 合金支气管支架 + 纳米磁靶向药囊组 Ras 基因水平最低( $P < 0.01$ ); NiTi 合金支气管支架 + 化疗药物组、纳米磁靶向药囊组、化疗药物组 Ras 基因水平次之, 3 组之间无明显差异( $P > 0.05$ ); 未干预组 Ras 基因水平最高。表明 NiTi 合金支气管支架 + 纳米磁靶向药囊组有最好的抑癌治疗效果。见图 5、6。

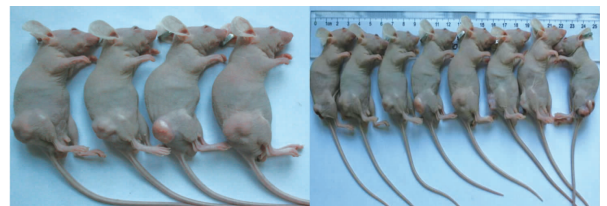


图 1 裸鼠肺癌模型

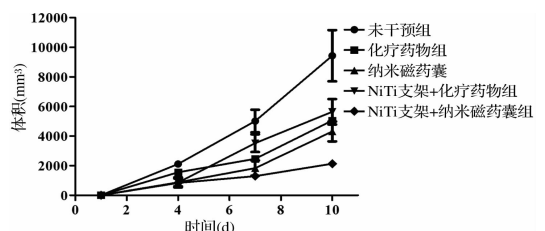
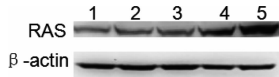


图 2 不同药物处理组对小鼠肿瘤生长的影响

表 1 不同方法处理对小鼠肿瘤生长的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

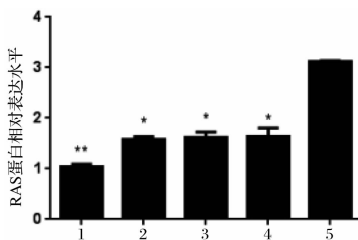
| 组别              | 只数 | 肿瘤体积<br>( $\text{cm}^3$ ) | 瘤重<br>(g)            | 抑瘤率<br>(%) |
|-----------------|----|---------------------------|----------------------|------------|
| 未干预组            | 10 | $9.05 \pm 1.81$           | $1.41 \pm 0.67$      | -          |
| 化疗药物组           | 10 | $4.35 \pm 0.98^*$         | $1.02 \pm 0.18^*$    | 28.0       |
| 纳米磁药囊           | 10 | $4.01 \pm 1.79^*$         | $0.94 \pm 0.36^*$    | 33.0       |
| NiTi 支架 + 化疗药物  | 10 | $3.88 \pm 1.04^*$         | $0.88 \pm 0.63^*$    | 38.0       |
| NiTi 支架 + 纳米磁药囊 | 10 | $2.04 \pm 0.28^{**}$      | $0.58 \pm 0.20^{**}$ | 59.0       |

注:与未干预组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。



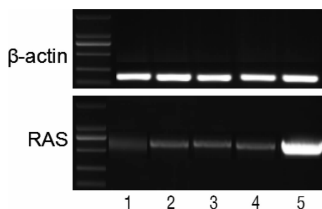
注:1: NiTi 支架 + 纳米磁药囊组; 2: 化疗药物组; 3: 纳米磁药囊组; 4: NiTi 支架 + 化疗药物组; 5: 未干预组。

图 3 各组肺癌组织 Ras 蛋白相对表达水平比较



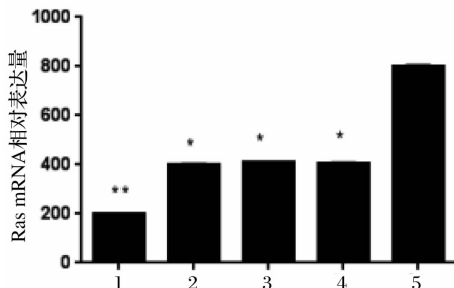
注:1: NiTi 支架 + 纳米磁药囊组; 2: 化疗药物组; 3: 纳米磁药囊组; 4: NiTi 支架 + 化疗药物组; 5: 未干预组。与未干预组比较, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ 。

图 4 各组肺癌组织 Ras 蛋白相对表达水平比较



注:1: NiTi 支架 + 纳米磁药囊组; 2: 化疗药物组; 3: 纳米磁药囊组; 4: NiTi 支架 + 化疗药物组; 5: 未干预组。

图 5 各组肺癌组织 Ras 基因相对表达水平比较



注:1: NiTi 支架 + 纳米磁药囊组; 2: 化疗药物组; 3: 纳米磁药囊组; 4: NiTi 支架 + 化疗药物组; 5: 未干预组。与未干预组比较, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ 。

图 6 各组肺癌组织中 Ras 基因检测比较

### 3 讨论

Ras 癌基因家族由 3 个成员组成,分别为 K-Ras、H-Ras 和 R-Ras,其中 K-Ras 基因是关键性的致癌基因,在肺癌中发挥着重要作用,其编码的蛋白又称 K-Ras

蛋白,原癌基因 K-Ras 突变后可以激活包括肺癌在内的许多肿瘤细胞内癌基因的表达,进而引发肿瘤<sup>[7-8]</sup>。

运用纳米技术和传统化疗药物相结合的靶向治疗是近年来兴起的一种新的治疗手段。原理是通过应用对肿瘤组织具有亲和力的载体携带药物从而特异性的到达病变部位而达到治疗目的。我国是肺癌的高发区,但由于缺乏早期诊断手段,因而大多数肺癌患者确诊时已是中晚期,往往失去手术治疗的最佳时机,而传统的放化疗又不能取得令人满意的效果。因此,有必要寻找一条有效治疗肺癌的新途径,而纳米载体结合抗癌药物制成具有靶向性的药物为我们提供了一条新途径。目前,运用纳米靶向性药囊治疗肺癌的动物和临床研究在国内外开展较少,多采用外磁场进行磁导向。可磁化的 NiTi 合金支气管支架具有较好的磁性,可通过纤支镜植入到肺癌病灶处,纳米磁小体靶向药囊可以附着在支架上,联合应用可以实施靶向局部给药,达到减小药物副作用、提高疗效的目的。这种内置磁场的方法很好地解决了纳米磁小体靶向药囊的靶向性问题。本研究的目的就是建立裸鼠肺癌模型,并检测在不同干预情况下的癌基因 Ras 及其蛋白的表达情况,为纳米磁靶向性药物治疗能够尽快进入临床应用积累经验。本研究结果表明, NiTi 合金支气管支架 + 纳米磁靶向药囊有较好的抑癌治疗效果。

### 参考文献

- [1] Tamiya M, Kobayashi M, Morimura O, et al. Clinical significance of the serum crosslinked N-telopeptide of type I collagen as a prognostic marker for non-small-cell lung cancer[J]. Clin Lung Cancer, 2013, 14(1): 50-54.
- [2] Jemal A, Thomas A, Murray T, et al. Cancer statistics, 2002[J]. CA Cancer J Clin, 2002, 52(1): 23-47.
- [3] 傅小龙. 放疗在非小细胞肺癌治疗中地位和研究进展[J]. 中国癌症杂志, 2005, 15(3): 217-223.
- [4] 殷柳, 刘基巍, 郭英昌, 等. 非小细胞肺癌治疗现状[J]. 现代肿瘤医学, 2010, 18(1): 185-187.
- [5] 许剑, 马净植. 磁控纳米载药系统在肿瘤治疗领域中的应用[J]. 临床口腔医学杂志, 2004, 20(10): 638-639.
- [6] 刘卫, 薛克营, 柯明耀 等. 液相共沉淀法制备吉西他滨磁靶向纳米粒[J]. 国际药学研究杂志, 2016, 43(4): 727-730.
- [7] Asati V, Mahapatra DK, Bharti SK. K-Ras and its inhibitors towards personalized cancer treatment: Pharmacological and structural perspectives[J]. Eur J Med Chem, 2016, 125: 299-314.
- [8] Lee YS, Bae SC. How do K-RAS-activated cells evade cellular defense mechanisms? [J]. Oncogene, 2016, 35(7): 827-832.

收稿日期: 2016-06-10 修回日期: 2016-07-06 编辑: 王国品