

二氢卟吩 e6 脂质体介导的光动力疗法治疗肺癌的动物实验研究

巨薇^{1,2} 龙景婷^{1,2} 王妮² 王晓旭² 冯玫^{2*} 张宽收^{1*}

摘要

目的 研究二氢卟吩 e6(chlorin e6, Ce6)及 Ce6 脂质体(Liposomes)对肺癌的光动力作用效果。

方法 采用薄膜蒸发法制备 Lip@Ce6, 检测其表征、形态、包封率。将 45 只实验裸鼠随机分为 9 组, 每组 5 只, 分别为空白对照组、模型对照组(A 组)、激光组(B 组)、Ce6-PDT 组根据光敏剂浓度 2.5 mg/kg、5 mg/kg、10 mg/kg 设置三组(C1 组、C2 组、C3 组)、Lip@Ce6-PDT 组根据光敏剂浓度 2.5 mg/kg、5 mg/kg、10 mg/kg 设置三组(D1 组、D2 组、D3 组)。给药 1 h 后经皮穿刺导入光纤行瘤内组织激光照射治疗, 激光波长 665 nm, 治疗 10 min/次, 每 3 d 治疗 1 次, 共治疗 5 次。通过绘制瘤体体积生长曲线、计算抑瘤率, 分析光动力疗法(Photodynamic therapy)对肺癌的抑制作用; 常规 HE 染色, 在光镜下观察肿瘤组织病理学的变化并对实验结果进行分析。

结果 (1)实验制得的 Lip@Ce6 的粒径为 196.3 nm 左右, 具有良好的分散性和稳定性, Ce6 的包封率为 94.2%。(2)肿瘤增长速率为 A 组>B 组>C1 组>D1 组>C2 组>D2 组>C3 组>D3 组; 前三次 PDT 治疗后差异无统计学意义($P>0.05$); 从第四次治疗后, 各组差异具有统计学意义($P<0.05$); 第五次治疗后, B 组、C1 组、C2 组、C3 组、D1 组、D2 组、D3 各组的抑瘤率分别为 15.3%、31.3%、40.3%、46.5%、35.9%、45.1%、53.9%。(3)组织病理学改变, 光镜下观察到各组呈现不同程度的坏死, 且 Lip@Ce6-PDT 各组比 Ce6-PDT 各组的坏死程度高。

结论 本研究成功制备了纳米光敏剂 Lip@Ce6, 相比于普通光敏剂 Ce6 可更有效的抑制瘤体的生长, 增强细胞坏死程度。

关键词 光动力疗法; 肺癌; 二氢卟吩 e6; 脂质体

中图分类号: R616.4;R739.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-9430(2021)04-0187-05

Photodynamic Therapy of Lung Cancer Mediated by Chlorin e6 Liposome: An Experimental Study

JU Wei^{1,2}, LONG Jing-Ting^{1,2}, WANG Ni², WANG Xiao-Xu², FENG Mei^{2*}, ZHANG Kuan-Shou^{1*}

1. State Key Laboratory of Quantum Optics and Quantum Optics Devices, Institute of Opto-Electronics, Taiyuan 030006, China 2. Department of General Medicine, Shanxi Bethune Hospital, Shanxi Academy of Medical Science

DOI: 10.13480/j.issn1003-9430.2021.0187

基金项目: 1. 国家自然科学基金资助项目(6187032150) 2. 量子光学与光量子器件国家重点实验室开放课题(KF2020002)

作者单位: 1. 量子光学与光量子器件国家重点实验室, 山西大学光电研究所(太原市, 030006) 2. 山西白求恩医院全科医学科

作者简介: 巨薇(1996~), 女, 山西临汾人, 在读硕士, 主要从事光动力疗法的研究。

* 通讯作者

ABSTRACT

Objective To study the photodynamic effects of Chlorin e6 (Ce6) and Ce6 liposomes on lung cancer.

Methods Lip@Ce6 were prepared via thin film evaporation, and its characterization, morphology and encapsulation rate were detected. Totally 45 experimental nude mice were randomly divided into 9 groups (5 mice in each group): the blank control group, model control group (group A), laser group (group B), 3 Ce6-PDT groups (group C1, C2 and C3), which were formed by photosensitizer concentrations (2.5 mg/kg, 5 mg/kg and 10 mg/kg) and 3 Lip@Ce6-PDT groups (group D1, D2 and D3), which were formed by photosensitizer concentrations (2.5 mg/kg, 5 mg/kg and 10 mg/kg). Upon the administration of the photosensitizer for an hour, 665 nm percutaneous fiber laser was introduced into the tumor for an irradiation of 10 min. The treatment was conducted 5 times in total at an interval of 2 days. The inhibition effect of photodynamic therapy on lung cancer was analyzed by drawing the tumor volume growth curve and calculating the tumor inhibition rate. Routine HE staining was performed to observe the morphological changes of tumor tissues under a light microscope and the experimental results were analyzed.

Results (1) Lip@Ce6 had a particle size of about 196.3 nm, with good dispersion and stability, and the encapsulation rate of Ce6 was about 94.2%. (2) The tumor growth rates declined in the following order: group A, group B, group C1, group D1, group C2, group D2, group C3 and group D3. There was no significant difference in tumor growth rate between different groups after the first three treatments ($P>0.05$), but remarkable differences appeared after the fourth treatment ($P<0.05$). The tumor inhibition rates of these groups were 15.3%, 31.3%, 40.3%, 46.5%, 35.9%, 45.1% and 53.9%. (3) Histopathological changes were observed. Different degrees of necrosis were observed under light microscope in each group, and the degree of necrosis in Lip@Ce6-PDT groups was higher than that of Ce6-PDT groups.

Conclusions Nano photosensitizer Lip@Ce6 was successfully prepared. Compared with ordinary photosensitizer Ce6, it inhibited the growth of the tumor more effectively, enhanced the degree of cell necrosis, and improved the efficacy of photodynamic therapy for lung cancer.

Key words Photodynamic therapy; Lung cancer; Chlorin e6; Liposomes

肺癌是全球范围内发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一,每年全球有 180 多万人死于肺癌^[1]。目前,常规的治疗肺癌的方法仍是手术切除、化疗和放疗。但是手术切除是一种侵入性的治疗方法且易复发;化疗不仅作用于肿瘤细胞,对正常细胞损害也较大;放疗有烧伤肿瘤区域的皮肤以及由于肺活量萎缩而出现的呼吸困难等不良反应^[2]。光动力疗法(photodynamic therapy, PDT)是一种现代的、非侵入性的治疗癌症的方法^[3],具有微创性、靶向性、不良反应少、可重复治疗、易恢复等优势,可作为肺癌早期的治疗及晚期的姑息治疗^[4]。PDT 主要导致肿瘤细胞直接死亡(即细胞坏死、细胞凋亡和自噬性相关细胞死亡);激活炎症、免疫反应;破坏肿瘤血管这三种途径使肿瘤细胞死亡^[5-7],经不同的损伤途径破坏肿瘤细胞及组织,从而达到治疗效果。但是目前大多数光敏剂都为疏水性光敏剂,具有容易在血管内聚集、靶向性弱等不足之处,所以脂质体、聚合物、金属纳米颗粒等纳米材料作为药物载体逐渐发展起来。其中脂质体是以磷脂和胆固醇为原料所形成的类脂质双分子层,具有良好的生物相容性、靶向性、缓释性等特性而应用于生物

医学各个领域^[8]。本实验设计合成了 Lip@Ce6 药物递送系统,以裸鼠为实验对象,通过观察瘤体大体和组织病理学变化、计算抑瘤率,比较其与普通光敏剂 Ce6 介导的 PDT 疗效。

材料与方法

一、材料

1. 实验对象 裸鼠 Balb/c-nu 45 只,雌性,7~8 周龄,体质量 16~20 g,饲养于中国辐射防护研究院药物安全评价中心。肺癌 A549 细胞购于丰辉生物科技有限公司。

2. 主要材料 二氢卟吩 e6(Ce6)购于北京百灵威科技有限公司, F12K 培养基购买于博士德生物工程有限公司,胎牛血清购于杭州四季青生物材料科技有限公司, HE 染色试剂盒购于 Sigma 公司,水合氯醛购于上海酶联生物科技有限公司。

3. 仪器 FC-665-500-MM 型温控型多模光纤耦合激光器,波长 665 nm,输出功率 0~500 mW,连续可调,购于上海熙隆光电科技有限公司。透射电子显微镜,日本 JEOL 公司产。紫外分光光度计,美国 Agilent 公司产。Mastersizer3000 型马尔文激光粒度

仪,马尔文帕纳科公司产。

二、方法

1. Lip@Ce6 的制备与形态学观察 Lip@Ce6 采用薄膜蒸发法制备所得^[9]。精密称取磷脂 HSPC、胆固醇和二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇(DSPE-PEG2000)与 Ce6 溶解于无水甲醇中,振荡使完全溶解。再将溶液加入至 250 ml 茄形瓶中,将茄形瓶置旋转蒸发器上,于 45℃ 减压旋蒸溶剂使类脂溶液形成一层均匀薄膜。向薄膜中加入磷酸盐缓冲液(PBS 溶液)(pH=7.4),轻摇水化获得载药脂质体,再经过 400 nm、200 nm、100 nm、80 nm 滤膜过滤,过 Sephadex G75 凝胶柱除去游离状态药物,获得 Lip@Ce6,置于冰箱 4℃ 保存备用。

激光粒度仪检测样品在纯水中的粒径大小;铜网蘸取少量的 Lip@Ce6,以 2% 磷钨酸负染,干燥后透射电子显微镜观测。紫外分光光度计测定 Ce6 的标准曲线,从而计算其包封率。

2. 实验分组 除空白对照组的 5 只裸鼠,将剩余 40 只裸鼠随机分组,分为模型对照组(A组),激光对照组(B组),Ce6-PDT 组根据药物浓度分为 2.5 mg/kg 低剂量组(C1组)、5 mg/kg 中剂量组(C2组)、10 mg/kg 高剂量组(C3组),Lip@Ce6-PDT 组根据药物浓度分为 2.5 mg/kg 低剂量组(D1组)、5 mg/kg 中剂量组(D2组)、10 mg/kg 高剂量组(D3组),每组各 5 只。

3. 建立动物模型 肺癌 A549 细胞在含有 10% 胎牛血清的 F12K 培养基中培养,置于 37℃、5% CO₂ 的恒温培养箱中。常规细胞传代培养,待细胞生长到对数生长期时进行实验。用灭菌的生理盐水将细胞个数调整为 2×10⁶ 个/mL 的细胞悬液,取 0.1 mL 细胞悬液注射在裸鼠的右前肢下方。经过 1 周的潜伏期,可见裸鼠皮下有圆形或椭圆形的移植瘤出现,表明裸鼠肺癌模型造模成功,可进行实验。待移植瘤体积长至 280 mm³ 左右,开始进行实验。

4. PDT 治疗方法 研究表明,在肿瘤组织中 Lip@Ce6 的浓度在给药 1 h 后达到最高^[10]。根据裸鼠体重,按照不同给药剂量 2.5 mg/Kg、5 mg/Kg、10 mg/Kg 计算出相应的药量,经尾部静脉注射,1 h 后进行 PDT 处理。

将光纤前端剥离露出 8 cm 左右的裸光纤,插入 10 ml 注射器针芯内,构成照射所用的经皮穿刺针^[11]。治疗前用 4% 的水合氯醛(10 ml/kg)腹腔注射麻醉裸鼠,防止治疗过程中裸鼠活动导致光纤断

裂或滑出瘤体。照射光剂量为:功率 108 mW,功率密度 137.5 mW/cm²,照射时间 10 min;治疗完成后,将裸鼠放回饲养笼中。每 3 d 治疗 1 次,共治疗 5 次。

各组处理后观察,每组处理后 3 d,经颈椎脱臼法处死所有裸鼠并取其瘤体组织,固定于 10% 的中性福尔马林溶液中。固定 24 h 后,进行常规 HE 染色,通过在光镜下观察细胞坏死情况来评价瘤体组织的损伤程度。

三、观察指标

每次治疗前后,用数显游标卡尺测量瘤体的长径(a)和短径(b),计算瘤体体积(V)和抑瘤率。

$$V = \frac{ab^2}{2}$$

$$\text{抑瘤率} = \frac{\text{模型组瘤体体积} - \text{治疗组瘤体体积}}{\text{模型组瘤体体积}} \times 100\%$$

四、统计学方法

采用 SPSS23.0 来分析实验结果,瘤体体积以及抑瘤率的实验结果用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)来表示。用单因素分析法处理实验结果,多组均数多重比较方差齐时采用 SNK 法,方差不齐时采用 Dunnett T3 法, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、Lip@Ce6 的表征。

1. Lip@Ce6 的粒径和形态 使用粒径仪检测合成的 Lip@Ce6 的粒径大小,结果显示测得的粒径比较均一,平均粒径为 196.3 nm。透射电镜观察到 Lip@Ce6 的形态为大小均一的球状物,且均匀分布在溶液中。

2. Lip@Ce6 的包封率 精密称取 Ce6 约 1 mg,用甲醇配制成 100 mg·L 的对照品储备液。用流动相稀释成浓度 0.2、0.4、0.8、1.6、3.6 mg/L 的系列对照品溶液,各取 20 L 进样,以峰面积对质量浓度进行线性回归,得回归方程 $y = 71.545x - 2.4902$ ($r^2 = 0.9989$),表明 Ce6 药物浓度在 0.2~3 mg/L 与峰面积呈良好的线性关系。本研究计算得出 Lip@Ce6 的包封率为 94.2%。

3. 紫外分光光度计表征 分别将 Ce6 溶液和 Lip@Ce6 溶液分散于超纯水中,用紫外分光光度计测定其吸收光谱(图 1 见第 238 页),Ce6 溶液和 Lip@Ce6 溶液均在波长 403 nm 处和 665 nm 处有吸收峰,说明 Ce6 已经包裹在脂质体内。考虑到波长

665 nm 的穿透深度比 403 nm 的穿透深度深,所以选用波长 665 nm 激光仪进行 PDT 治疗实验。

二、瘤体体积变化。

C3 组在第一次治疗后,瘤体无明显变化,第二次治疗后瘤体处皮肤变黑,且每次治疗后皮肤变黑范围越来越大,瘤体缩小不明显(图 2 见第 238 页)。D3 组在第一次治疗后,瘤体处开始皮肤变黑;第二次治疗后开始结痂且瘤体缩小(图 2 见第 238 页)。前 3 次光动力治疗后,模型组与各治疗组间瘤体体积进行比较,差异无统计学意义($P>0.05$);第 4 次治疗后,各组间比较差异均具有统计学意义($P<0.05$)。PDT 治疗期间裸鼠瘤体生长曲线,瘤体变化为 A 组>B 组>C1 组>D1 组>C2 组>D2 组>C3 组>D3 组(图 3 见第 238 页)。

三、抑瘤率。

第五次治疗后 B 组、C1 组、C2 组、C3 组、D1 组、D2 组、D3 各组的抑瘤率分别为 15.3%、31.3%、40.3%、46.5%、35.9%、45.1%、53.9%(图 4 见第 238 页)。

四、光镜下瘤体组织形态变化。

从光镜下观察 HE 染色结果,A 组肿瘤细胞分布较为密集,几乎没有坏死;B 组呈小灶状坏死;C1 组、C2 组、C3 组以及 D1 组、D2 组、D3 组呈不同程度的坏死,随着药物浓度的增加,坏死程度增加,呈现大片灶坏死,伴有炎症反应且向组织浸润性生长,并且 Lip@Ce6-PDT 各组比 Ce6-PDT 各组的坏死程度高(图 5 见第 239 页)。

讨 论

在 PDT 治疗的发展过程,光敏剂经历了三代,第一代多为血卟啉衍生物类,第二代多为卟吩、卟啉等以及在第二代的基础上进行化学修饰的第三代合成化合物类。目前,应用于临床的大部分为二代光敏剂,二氢卟吩类光敏剂作为第二代光敏剂代表,其中 Ce6 应用较为广泛。Ce6 是植物提取物,其优点为在正常组织中代谢快,在红光区 665 nm 处有吸收峰、对组织的穿透力强、光照下的量子产率高等,但是存在靶向性弱等缺点。为了解决光敏剂靶向性弱这一问题,故将纳米材料作为靶向递送药物载体。由于肿瘤组织特有的高渗透高滞留效应(enhanced permeability and retention effect, EPR),负载光敏剂的纳米药物可被动的到达肿瘤组织,将光敏剂递送至肿瘤处,提高了光敏剂的被动靶向性^[12]。

本实验选用 Ce6 为光敏剂,脂质体为药物载体,采用薄膜蒸发法合成 Lip@Ce6。根据粒径仪测量实验制备的 Lip@Ce6 粒径在 196 nm 左右,从透射电镜中可以看出制备的 Lip@Ce6 大小均一、分散性好,且计算其工艺包封率达 94.2%。根据紫外分光光度计检测 Ce6 和 Lip@Ce6 吸收峰的结果可以看出,Ce6 脂质体在 403 nm 和 665 nm 处有明显的吸收峰,说明 Ce6 已成功负载到脂质体上,可进行下一步的实验研究。

为了比较 Ce6 与 Lip@Ce6 的 PDT 治疗效果,本实验构建了皮下接种肺癌 A549 细胞的动物模型,将动物模型分为模型对照组(A 组)、激光治疗组(B 组)、Ce6-PDT 组(C1 组、C2 组、C3 组)、Lip@Ce6-PDT 组(D1 组、D2 组、D3 组)。其中 Ce6-PDT 组和 Lip@Ce6-PDT 组按照浓度分为低剂量(2.5 mg/kg)、中剂量(5 mg/kg)、高剂量(10 mg/kg)三组进行实验研究。采用尾静脉注射的方法注射药物,注射药物 1 h 后通过经皮穿刺光纤导入瘤内的方法进行激光照射。实验结果表明,Ce6-PDT 组和 Lip@Ce6-PDT 组均有较好的 PDT 治疗效果,在一定程度上抑制了瘤体的生长,随着药物剂量的增加抑瘤率增加,且 Lip@Ce6-PDT 各剂量组均比 Ce6-PDT 各剂量组的疗效好,即 C1 组>D1 组>C2 组>D2 组>C3 组>D3 组。Lip@Ce6-PDT 组中的 D3 组在第一次治疗完成后,瘤体处皮肤变黑,且两次治疗后开始结痂。从组织病理学变化可以看出随着药物剂量的增加坏死程度亦增加且 Lip@Ce6-PDT 各组效果均优于 Ce6-PDT 各组,结果表明 Lip@Ce6 的靶向性更强,富集在肿瘤组织中的药物更多,PDT 效果更好。但是在每次治疗后裸鼠的体重有所下降且随着药物剂量的增加体重下降更为明显。且实验显示,C3 组注射药物一段时间后,裸鼠在 10 mg/kg 的浓度设置下皮肤表面有轻微的脱皮;而浓度设置在 2.5 和 5 mg/kg 时皮肤无明显改变。说明 10 mg/kg 的药物浓度可能过高,需进一步进行实验观察最佳光敏剂浓度以提高疗效,从而减少不良反应的发生率。

综上所述,本实验制备的纳米光敏剂 Lip@Ce6 相比于普通光敏剂 Ce6,可有效增强了 PDT 治疗肺癌的疗效,实现了药物递送与治疗。

参 考 文 献

- [1] Woodman C, Vundu G, George A, et al. Applications and strategies in nanodiagnosis and nanotherapy in lung cancer[J]. Semin Cancer Biol. 2021, 69:349-364.

- [2] Chen J, Fan T, Xie Z, *et al.* Advances in nanomaterials for photodynamic therapy applications: status and challenges[J]. *Biomaterials*, 2020, 237:1-27.
- [3] Usuda J, Kato H, Okunaka T, *et al.* Photodynamic therapy (PDT) for lung cancers[J]. *J Thorac Oncol*, 2006, 1: 489-493.
- [4] 王国安, 吴宏成. 光动力治疗在呼吸道肿瘤中的临床应用[J]. *现代实用医学*, 2020, 32: 7-8.
- [5] Robertson CA, Evans DH, Abrahamse H. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2009, 96:1-8.
- [6] Buytaert E, Dewaele M, Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1776:86-107.
- [7] Allison R, Moghissi K. Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanisms[J]. *Clin Endosc*, 2013, 46: 24-29.
- [8] 刘颖. 基于脂质的纳米载体在药物递送和诊断中的应用[M]. 北京: 科学出版社, 2019. 187-191.
- [9] 王安元, 凌家俊, 徐月圆, 等. 二氢卟吩 e6 脂质体的制备及影响因素考察[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19: 36-39.
- [10] 张祚德, 王安元, 郝建冬, 等. 二氢卟吩 e6 脂质体在荷瘤小鼠体内的药动学及靶向性分析[J]. *中国实验方剂学*, 2018, 24: 71-77.
- [11] 刘彩平, 李怡, 乔文文, 等. 经皮穿刺光纤导入瘤内光动力疗法治疗肺癌的实验研究[J]. *中国激光医学杂志*, 2018, 27: 248-252.
- [12] Jun F, Waliul I, Hiroshi M. Exploiting the dynamics of the EPR effect and strategies to improve the therapeutic effects of nanomedicines by using EPR effect enhancers [J]. *Adv Drug Delivery Rev*, 2020, 157: 142-160.

(收稿日期:2020-12-04)

· 消息 ·

欢 迎 订 阅 《中国激光医学杂志》合订本

《中国激光医学杂志》1992年创刊,为中国科技论文统计源“核心期刊”。2004年已被国际检索系统俄罗斯《文摘杂志》收录,2007年被美国《化学文摘》收录。

为满足广大读者的需求本刊编辑部现出版 1992~2014年《中国激光医学杂志》合订本, 1992~2010年每册定价 100元;2011~2019年每册定价 175元。本刊编辑部可随时为广大读者代办邮购,免费邮寄,经邮局汇款至本刊编辑部,款到即寄。如需挂号邮寄,每册增加 3元挂号费。

本刊地址:北京市海淀区学院南路 86 号 201 室 邮政编码:100081
电 话:010-66937194 传 真:010-68222584

巨薇等 二氢卟吩e6脂质体介导的光动力疗法治疗肺癌的动物实验研究(见正文第 181 页)

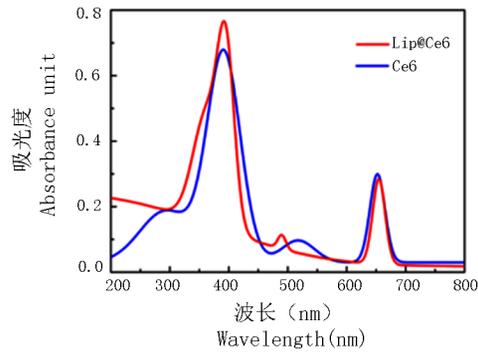


图1 Ce6溶液及Ce6脂质体紫外可见吸收光谱

Fig. 1 UV-Vis spectrophotometry of Ce6 solution and Ce6 liposome

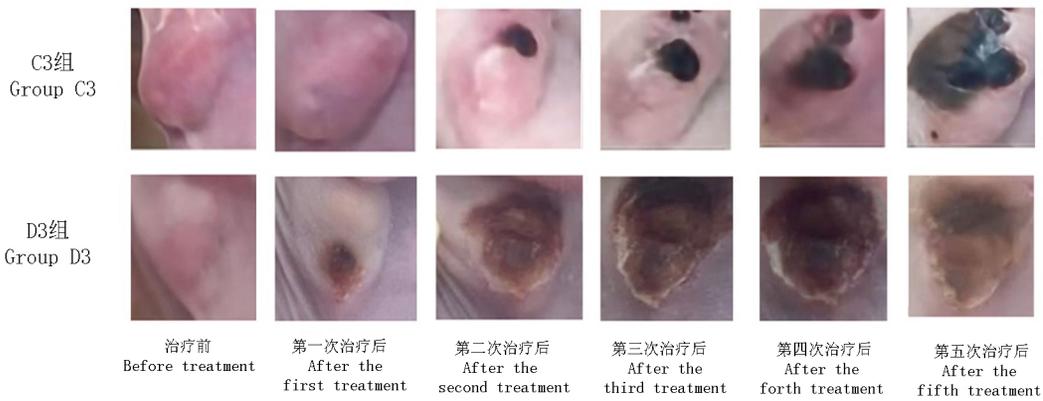


图2 治疗C3和D3组的瘤体变化

Fig. 2 Tumor changes in C3 ,D3 group the PDT

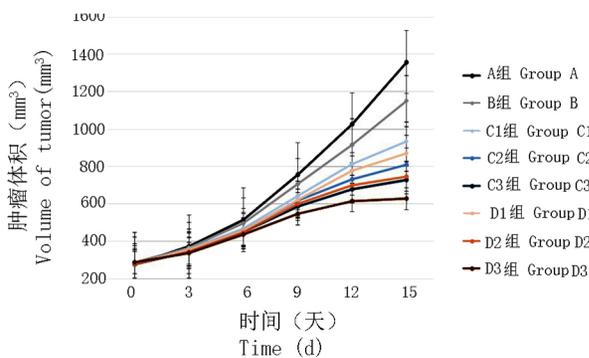


图3 各组裸鼠瘤体生长曲线

Fig. 3 Tumor growth curve of nude mice in each group

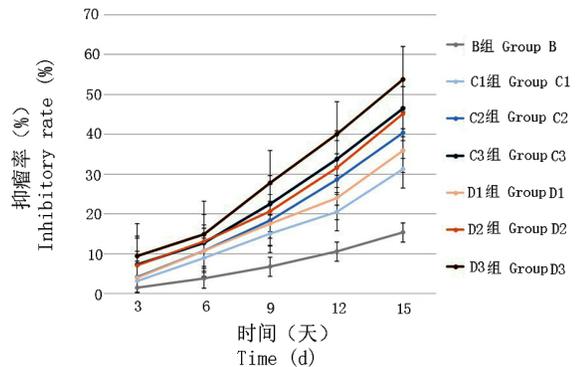


图4 各组裸鼠瘤体抑瘤率曲线

Fig. 4 Tumor inhibition rate curve of nude mice in each group

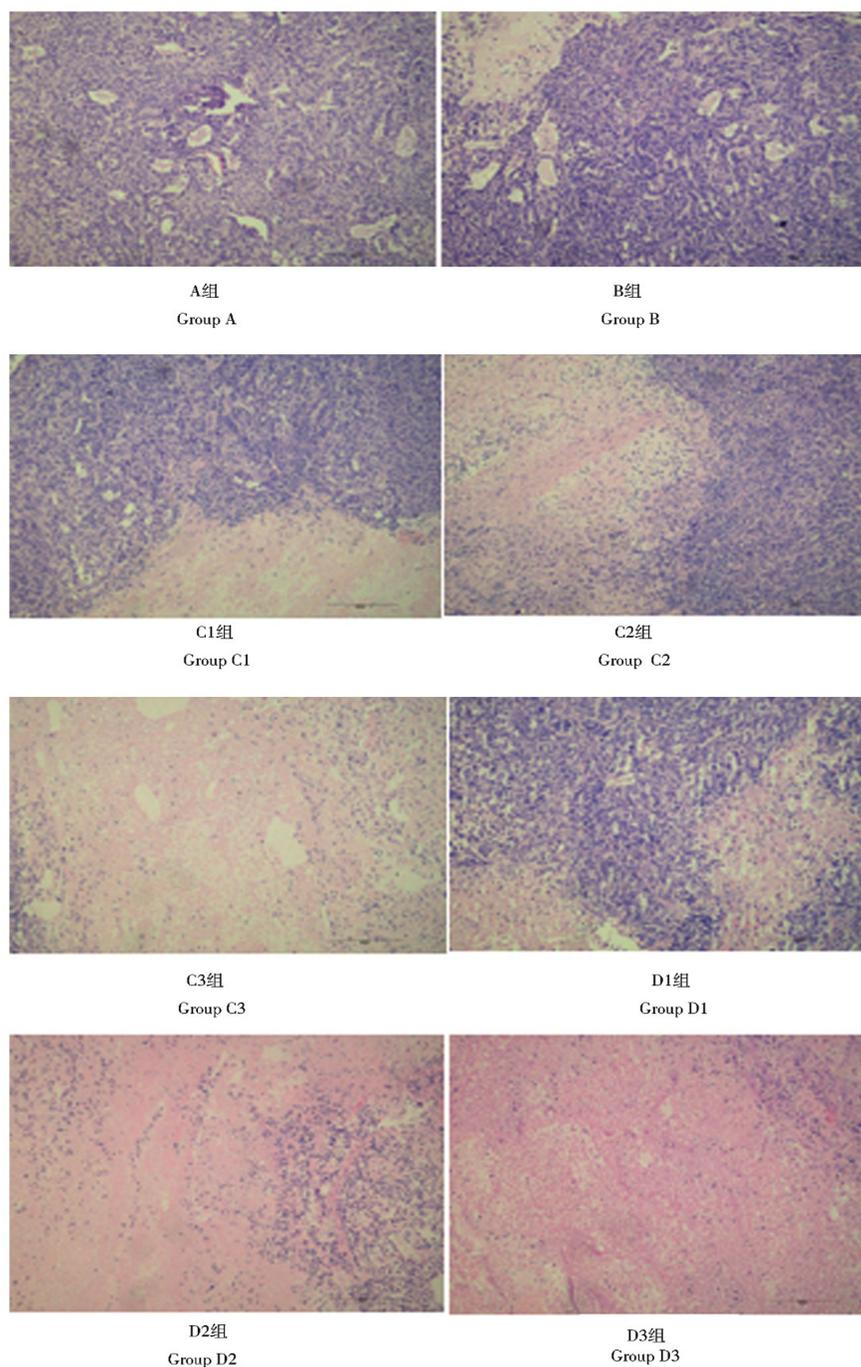


图5 各组瘤体组织学变化 HE × 40

Fig. 5 The histological changes of tumors in each group HE × 40