

CNIC-01833

CAEP-0168

^{153}Sm -纳米羟基磷灰石的合成及生物行为初探

邵文增 罗顺忠 温广华 蒋树斌 熊晓玲 刘国平

(中国工程物理研究院核物理与化学研究所, 绵阳, 621900)

摘 要

合成了纳米羟基磷灰石, 制备的 ^{153}Sm -EDTMP-nanoHA 和 ^{153}Sm -citrate-nanoHA 体外稳定性良好。 ^{153}Sm -EDTMP-nanoHA 新西兰兔显像对比度较好, 骨骼系统显示清晰, 肝脾显影清晰, 肾脏显影, 血清除快; ^{153}Sm -citrate-nanoHA 新西兰兔显像, 肝脾显影清晰, 血清除快, 肾脏几乎不显影, 说明主要通过肝胆排泄。 ^{153}Sm -EDTMP-nanoHA 对肝癌 SMMC-7721 和乳腺癌 MCF-7 细胞的半抑制率浓度分别是 1.98 g/L 和 0.075 g/L, ^{153}Sm -citrate-nanoHA 则分别是 1.89 g/L 和 0.094 g/L。 ^{153}Sm -EDTMP-nanoHA 和 ^{153}Sm -citrate-nanoHA 较同等浓度下的单一 nanoHA 的半抑制率浓度低得多, 具有很高的深入研究价值。

关键词: ^{153}Sm 纳米 羟基磷灰石 生物行为

**Synthesis and Bio-evaluation of Nano-hydroxyapatite
Trapped by ^{153}Sm
(In Chinese)**

BING Wenzeng LUO Shunzhong WEN Guanghua
JIANG Shubin XIONG Xiaoling LIU Guoping
(Institute of Nuclear Physics and Chemistry, CAEP, Mianyang, 621900)

ABSTRACT

After nanoHA was synthesized, ^{153}Sm -EDTMP-nanoHA and ^{153}Sm -citrate-nanoHA were prepared and proved stable in vitro. ECT images of New Zealand rabbits injected with ^{153}Sm -EDTMP-nanoHA had better contrast, skeletal figure visible, liver and spleen clear. The images of ^{153}Sm -citrate-nanoHA showed a similar results but kidney invisible, which meant ^{153}Sm -citrate-nanoHA was mainly excreted through liver and gall. ^{153}Sm -EDTMP-nanoHA's half effective inhibition concentrations to SMMC-7721 and MCF-7 cells were 1.98 g/L and 0.075 g/L respectively and ^{153}Sm -citrate-nanoHA's were 1.89 g/L and 0.094 g/L proportionally. ^{153}Sm -EDTMP-nanoHA and ^{153}Sm -citrate-nanoHA were worthy of a further research because their half effective inhibition concentrations were much lower than ones of the single nanoHA.

Key words: ^{153}Sm , Nano, Hydroxyapatite, Biologic behavior

引言

近年来,纳米技术在医学领域的应用研究得到迅速发展,其中纳米羟基磷灰石对肿瘤抑制作用研究受到人们关注。1996年,李世普等发现HA纳米溶胶对恶性肿瘤细胞具有抑制作用,他先后对W-256癌肉瘤细胞、艾氏腹水瘤细胞和A-549肺癌细胞实验观察,发现纳米HA可以进入肿瘤细胞,对肿瘤细胞的增殖和集落形成均有抑制^[1]。另有研究则表明,HA超微粉可以使细胞内钙离子浓度在短期内升高,并导致细胞死亡。尽管机理尚不十分清楚,但类似的研究都表明,nanoHA(纳米羟基磷灰石)在体内具有一定的靶向性,对肿瘤细胞起到抑制乃至破坏作用。倘若结合放射性核素,发挥纳米抑癌和射线杀灭的双重作用,有望取得更加鼓舞人心的效果。此类研究,国内外未见报道。

本研究合成类骨的nanoHA,与¹⁵³Sm-EDTMP和¹⁵³Sm-citrate(柠檬酸钠)结合后,研究了结合体的理化性质、核医学显像,初步探明了其体内分布状况。开展了肿瘤细胞抑制实验,对它们的抗肿瘤作用进行了初步评价。

1 实验材料

1.1 主要试剂

(1)citrate,分析纯,成都市化学试剂厂。

(2)EDTMP,由本课题组合成。

(3)¹⁵²SmCl₃,由光谱纯Sm₂O₃在300号反应堆辐照制得。

(4)DMEM(Gibco),人血清蛋白,RPMI-1640培养基,MTT试剂均购于四川大学华西医院肿瘤中心。

(5)肿瘤细胞株,肝癌SMMC-7721和乳腺癌MCF-7细胞株均购于四川大学华西医院肿瘤中心。

1.2 主要仪器

(1)FH-463A自动定标器、FT-603井型γ闪烁探头,北京核仪器厂。

(2)FI-2021型γ放射免疫计数器,西安二六二厂。

(3)Helix Apex双探头SPECT显像仪,埃尔森公司(Elscent Company),以色列。

(4)KQ-250B型超声波清洗器(250 W,40 kHz),昆山市超声仪器有限公司。

(5)Bio-rad-680型测定仪,四川大学华西医院肿瘤中心。

(6)透射电镜、X线衍射仪为四川大学分析测试中心设备。

2 实验方法

2.1 纳米羟基磷灰石的制备

在一个带有冷凝和搅拌装置的三颈瓶中,加入一定体积的Ca(OH)₂饱和溶液,搅拌下滴加0.3 mol/L的H₃PO₄溶液,至pH7~8。继续搅拌2~3 h。洗涤抽滤后分散在蒸馏水中,超声处理2 h,浆液密封保存待用。纳米颗粒的表面活性很强,为防止团聚,新合成的浆液需尽快使用,并且在使用前超声预处理30 min。

2.2 ¹⁵³Sm标记 nanoHA

将标记率98%以上的¹⁵³Sm-EDTMP(或¹⁵³Sm-citrate)与nanoHA以不同比例混合。恒

温水浴振荡,离心分离后,测量清液放射性计数,计算结合率。静置若干时间或稀释若干倍,同样方法测试稳定性。

2.3 ECT 显像

经耳缘静脉将¹⁵³Sm-EDTMP-nanoHA 约 74 MBq/0.5 mL 注入新西兰兔体内,在给药后 2 h,6 h,10 h,24 h 进行前、后位平面骨显像。矩阵 256×256,放射性计数保持在 3×10^4 /帧~ 4×10^4 /帧。

2.4 体外肿瘤细胞抑制实验

2.4.1 细胞培养

分别将 SMMC-7721 细胞和 MCF-7 细胞培养于含 10% 小牛血清、 1×10^5 U/L 青霉素、链霉素的 RPMI-1640 培养液中,37℃,5% CO₂ 培养箱内常规传代培养。细胞贴壁生长 24 h,至 70%~80% 单层后更换含药培养基进行实验。

2.4.2 MTT 比色法

实验参考休森(Hussain)方法,取对数生长期的细胞,经胰酶消化后吹打成单细胞悬液,调整浓度为 5×10^3 个/孔,接种于 96 孔培养板中,24 h 后,弃原培养液,加含不同浓度药物的新培养液,各为 20 mg/L,4 mg/L,0.8 mg/L,0.16 mg/L,0.032 mg/L,0.0064 mg/L,0.00128 mg/L 及对照(0 mg/L),每浓度设三个复孔。作用 72 h 后,加入新配制的 MTT 液(浓度为 5 mg/mL)每孔 20 μL,继续培养作用 4 h,弃上清液,加入二甲亚砜(DMSO)150 μL,混匀后,用酶标仪于 570 nm 处测吸光度值(OD 值)。取 3 孔平均值,通过式(1)计算抑制率。

$$\text{细胞抑制率} = (1 - \text{实验组 OD 值} / \text{对照组 OD 值}) \times 100\% \quad (1)$$

根据抑制率绘制出浓度与抑制率的曲线,计算出有效半抑制浓度。

3 结果与讨论

3.1 NanoHA 分析鉴定

NanoHA 试样的 XRD 图(见图 1)显示,各衍射峰位置与标准值大体一致,且峰型尖锐清晰,说明产物是 HA,结晶度较好。TEM 对试样粒径分析(见图 2),结果表明 HA 为针状结晶,径向 10~30 nm,轴向 70~100 nm。

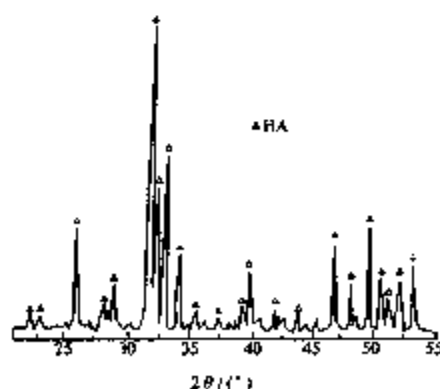


图 1 纳米 HA 的 XRD 图谱



图 2 纳米 HA 的 TEM 照片

3.2 配合物-nanoHA 的稳定性

3.2.1 配合物-nanoHA 的稀释稳定性

配合物静脉注射进入体内后,将被血液大量稀释,因分解等原因造成化学形式改变,从而影响了配合物的体内分布和代谢。用生理盐水将放射化学纯度大于 98% 的 ^{153}Sm -EDTMP-nanoHA 和 ^{153}Sm -citrate-nanoHA 分别稀释 2, 10, 100 倍时,配合物放化纯均不低于 95%。高的稀释稳定性一定程度上保证了 ^{153}Sm -EDTMP-nanoHA 和 ^{153}Sm -citrate-nanoHA 在生物体内的稳定性。

3.2.2 配合物-nanoHA 的时间稳定性

考虑到人体正常体温为 37 °C 左右,我们将放射化学纯度大于 98% 的 ^{153}Sm -EDTMP-nanoHA 和 ^{153}Sm -citrate-nanoHA 分别置于 37 °C 的恒温水浴槽中,10 h 和 48 h 后测得放化纯均大于 95%,表现了良好的体外稳定性。对于浓集于靶位置的配合物,良好的时间稳定性代表强的抗分解力,可以保证药效的充分发挥。

3.3 ^{153}Sm 标记 nanoHA 的 ECT 显像

3.3.1 ^{153}Sm -EDTMP-nanoHA 的 ECT 显像

^{153}Sm -EDTMP-nanoHA 新西兰兔显像见图 3 至图 6。 ^{153}Sm -EDTMP-nanoHA 正常新西兰兔显像显示:显像对比度较好,骨骼系统显示清晰,肝脾显影较清晰,肾脏显影;动态观察发现,血清中放射性下降较快,肝肾持续显影,说明其主要通过肝胆和肾排泄。肝脾的大量摄取,与巨噬细胞的吞噬作用有密切关系。

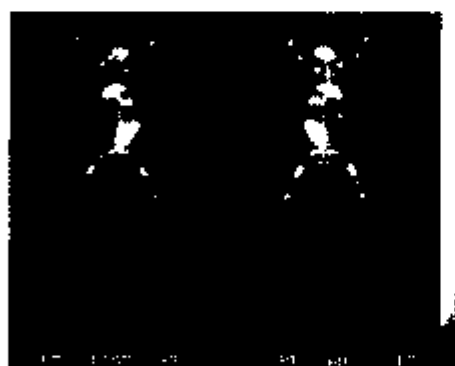


图 3 ^{153}Sm -EDTMP-nanoHA ECT 图像(2 h)

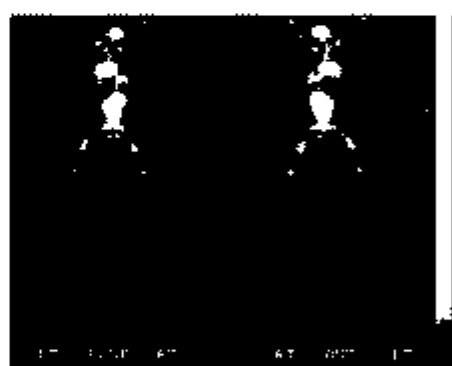


图 4 ^{153}Sm -EDTMP-nanoHA ECT 图像(6 h)

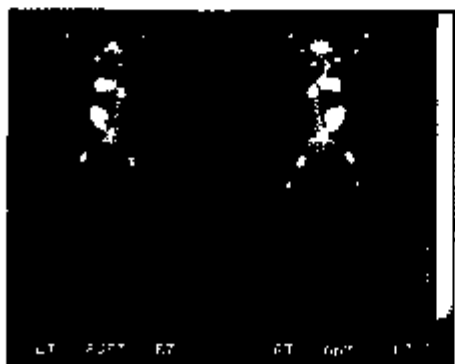


图 5 ^{153}Sm -EDTMP-nanoHA ECT 图像(10 h)

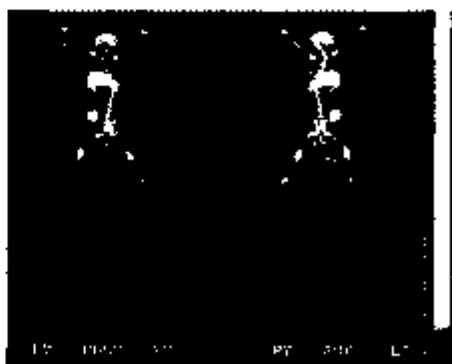


图 6 ^{153}Sm -EDTMP-nanoHA ECT 图像(24 h)

3.3.2 ^{153}Sm -citrate-nanoHA 的 ECT 显像

^{153}Sm -citrate-nanoHA 新西兰兔显像(分别为 2 h、6 h、10 h、24 h)见图 7 至图 10。 ^{153}Sm -citrate-nanoHA 正常新西兰兔显像显示,显像对比度较好,骨骼系统显示尚清晰,肝脾显影清晰;动态观察发现,血清中放射性下降较快,肝持续显影,肾脏几乎不显影,说明标记物主要通过肝胆排泄。不经过肾代谢,对肾及膀胱的损伤很小,很适合于那些肾脏损害明显、肾功能较差的骨肿瘤和骨转移患者使用。



图 7 ^{153}Sm -citrate-nanoHA ECT 图像(2 h)

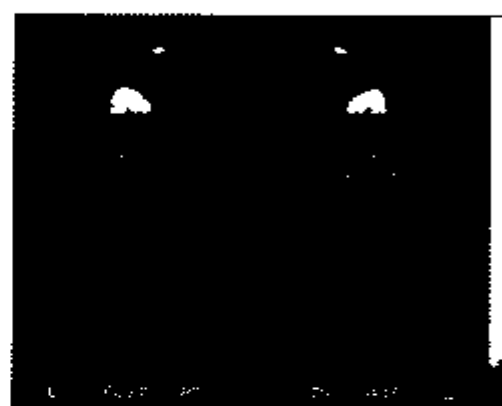


图 8 ^{153}Sm -citrate-nanoHA ECT 图像(6 h)

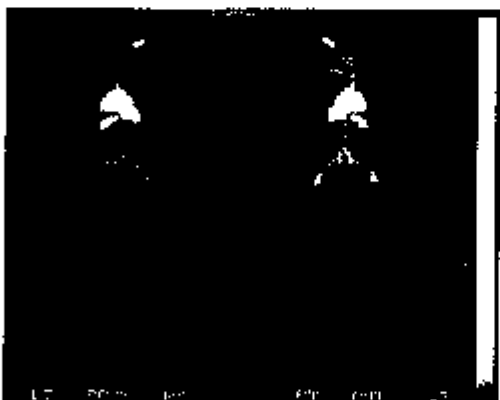


图 9 ^{153}Sm -citrate-nanoHA ECT 图像(10 h)

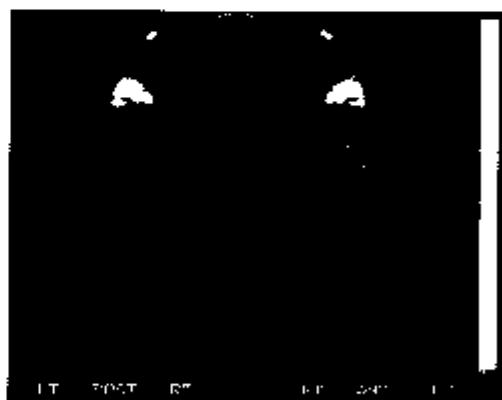


图 10 ^{153}Sm -citrate-nanoHA ECT 图像(24 h)

3.4 ^{153}Sm 标记的 nanoHA 对肿瘤细胞的抑制

3.4.1 NanoHA 对肿瘤细胞的抑制

NanoHA 对肝癌 SMMC-7721 和乳腺癌 MCF-7 的体外抑制实验结果见图 11 和图 12。nanoHA 对肝癌 SMMC-7721 和乳腺癌 MCF-7 细胞的半抑制率浓度分别是 3.31 g/L 和 0.52 g/L。对 nanoHA 的抗肿瘤机理,有诸多猜测:对肿瘤的乏氧细胞群作用、影响细胞膜的纤维粘连蛋白的合成和分泌、抑制癌细胞的 DNA 合成和造成细胞内 Ca^{2+} 离子失调等等^[1~3]。亦有研究表明,nanoHA 对正常细胞影响很小^[4]。

3.4.2 ^{153}Sm -EDTMP-nanoHA 对肿瘤细胞的抑制

^{153}Sm -EDTMP-nanoHA 对肝癌 SMMC-7721 细胞和乳腺癌 MCF-7 细胞的体外抑制实验结果见图 13 和图 14。 ^{153}Sm -EDTMP-nanoHA 浓度大对癌细胞的杀伤作用强,抑制作用显著。 ^{153}Sm -EDTMP-nanoHA 对肝癌 SMMC-7721 细胞和乳腺癌 MCF-7 细胞的半抑制率浓度分别是 1.98 g/L 和 0.075 g/L。对肝癌 SMMC-7721 细胞的半抑制率, ^{153}Sm -EDTMP-nanoHA 是单纯 nanoHA 的 60%,对乳腺癌 MCF-7 细胞,这一比例更是高到了 14.4%。

^{153}Sm -EDTMP-nanoHA 具有较高骨组织摄取和较好生物学性能,较之单一的 nanoHA,体外抑制肿瘤能力明显增强,有希望成为新型的、有广阔应用前景的放射性骨治疗剂,值得进一步深入研究。

3.4.3 ^{153}Sm -citrate-nanoHA 对肿瘤细胞的抑制

^{153}Sm -citrate-nanoHA 对肝癌 SMMC-7721 和乳腺癌 MCF-7 的体外抑制实验结果见图 15 和图 16。 ^{153}Sm -citrate-nanoHA 对肝癌 SMMC-7721 和乳腺癌 MCF-7 细胞的半抑制率浓度分别是 1.89 g/L 和 0.094 g/L,与 ^{153}Sm -EDTMP-nanoHA 相近。结合 ECT 显像结果看, ^{153}Sm -citrate-nanoHA 更多浓集于肝脾,而 ^{153}Sm -EDTMP-nanoHA 发展为骨治疗剂更有希望。

从两种半抑制率实验结果看,肝癌 SMMC-7 细胞不如乳腺癌 MCF-7 细胞敏感,可能是由于不同肿瘤细胞对纳米粒子或对射线有不同的敏感性,或者是使用的两种细胞株恶性程度不同,对射线敏感度也就不同。

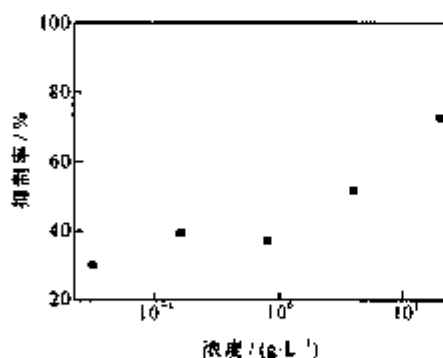


图 11 nanoHA 对肝癌细胞的抑制

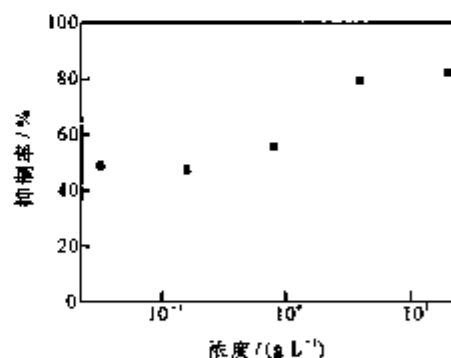


图 12 nanoHA 对乳腺癌细胞的抑制

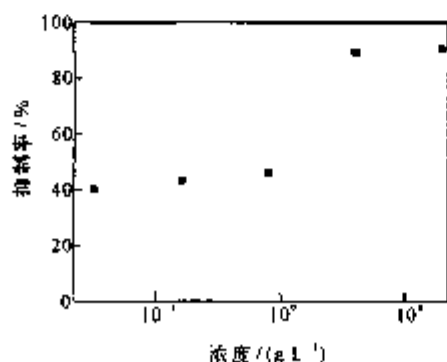


图 13 ^{153}Sm -EDTMP-nanoHA 对肝癌细胞的抑制

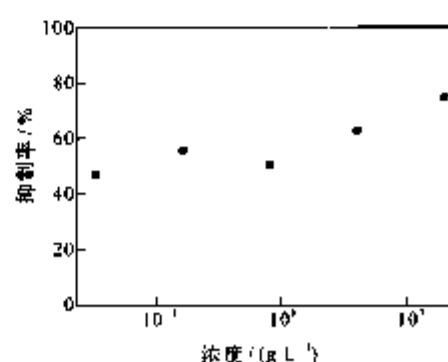


图 14 ^{153}Sm -EDTMP-nanoHA 对乳腺癌细胞的抑制

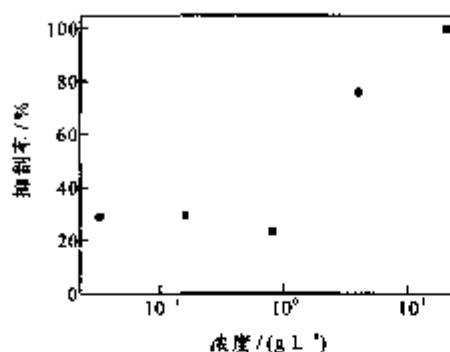


图 15 $^{153}\text{Sm-citrate-nanoHA}$ 对肝癌细胞的抑制

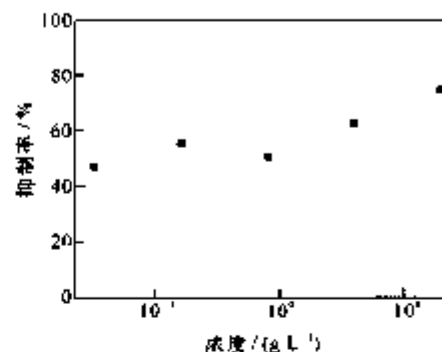


图 16 $^{153}\text{Sm-citrate-nanoHA}$ 对乳腺癌细胞的抑制

4 结 论

$^{153}\text{Sm-EDTMP-nanoHA}$ 和 $^{153}\text{Sm-citrate-nanoHA}$ 体外稳定性良好, 分别稀释 100 倍和放置 48 h 后, 放化纯度均不低于 95%。 $^{153}\text{Sm-EDTMP-nanoHA}$ 新西兰兔显像对比度较好, 骨骼系统显示清晰, 肝脾显影清晰, 肾脏显影, 血清除快; $^{153}\text{Sm-citrate-nanoHA}$ 新西兰兔显像, 肝脾显影清晰, 血清除快, 肝持续显影, 肾脏几乎不显影, 说明主要通过肝胆排泄。 $^{153}\text{Sm-EDTMP-nanoHA}$ 对肝癌 SMMC-7721 和乳腺癌 MCF-7 细胞的半抑制率浓度分别是 1.98 g/L 和 0.075 g/L。 $^{153}\text{Sm-citrate-nanoHA}$ 对肝癌 SMMC-7721 和乳腺癌 MCF-7 细胞的半抑制率浓度分别是 1.89 g/L 和 0.094 g/L。 $^{153}\text{Sm-EDTMP-nanoHA}$ 和 $^{153}\text{Sm-citrate-nanoHA}$ 较同等浓度下的单一 nanoHA 的半抑制率浓度低得多, 特别是对于乳腺癌 MCF-7 细胞, 具有很高的深入研究价值。

致 谢

感谢四川大学华西医院邓侯富教授给予的指导和帮助。

参 考 文 献

- 1 李世普, 冯凌云, 曹献英等. 无机纳米粒子抑制癌细胞的机理. 稀有金属材料与工程, 2001, 30
- 2 唐胜利, 袁捷, 刘志苏等. 磷灰石纳米粒子对人肝癌 BEL-7402 细胞毒性的评价. 肝脏, 2003, 8
- 3 薛沿宁, 周廷冲. Ca^{2+} 与细胞功能调节. 生理科学进展, 1988, 19
- 4 夏东, 刁路明, 杨飞等. 无机纳米粒子对人肺癌细胞 A549 和小鼠成纤维细胞 L929 生物学特性研究. 湖北医科大学学报, 2000, 21