

放射性¹³¹I 标记胶原-壳聚糖复合微球的制备及其 杀伤肝癌细胞的体内研究*

庞富文, 蔡华伟, 李玉豪, 张文杰, 李 林[△]

四川大学华西医院 核医学科(成都 610041)

【摘要】 目的 用壳聚糖及胶原这两种可降解生物材料,制备能用于¹³¹I 标记的放射性核素微球并探究其对肝癌的治疗效果。**方法** 以 I 型胶原蛋白和壳聚糖为主要材料,戊二醛为交联剂,利用乳化交联法制备胶原-壳聚糖复合微球。电镜下观察微球表征,测量并统计微球的粒径。通过氯胺 T 法对微球进行¹³¹I 标记,计算标记率。等量¹³¹I-微球分别置于 PBS 和人血清中 192 h,探究其体外稳定性。BALB/C 裸鼠皮下一次性注射人肝癌细胞 HepG2 约 10⁶ 个,构建裸鼠人肝癌细胞模型。28 d 后,¹³¹I-微球、空白微球、PBS 分别一次性注入荷人肝癌裸鼠模型的皮下瘤中(每组 5 只),治疗 7 d 后处死裸鼠。取血和心、肺、肝、脾、胃、小肠、肾、肌肉、脑、骨、甲状腺、皮下肝癌组织检测标记微球在裸鼠体内的分布,同时对皮下肝癌组织进行组织病理学 HE 染色,检测标记微球对肝癌细胞的杀伤效果。**结果** 本研究成功制得胶原-壳聚糖微球,电镜显示微球成球性好,表面光滑,粒径较均匀,平均粒径为(5.1±1.2) μm。其¹³¹I 标记率为 86.10%,置于 PBS 及血清 192 h 后,碘标记率分别为 92.00%、83.00%,¹³¹I-微球依然保持高稳定性。治疗 7 d 后裸鼠体内分布实验显示放射性主要集中在皮下肿瘤组织,其他组织几乎没有放射性计数。皮下肿瘤组织病理切片显示 PBS 组见大量肝癌细胞,标记微球后周围的肝癌细胞大量死亡,空白微球组中微球周围仅有少量的炎性细胞,未引起局部强烈的免疫反应。后两组微球均未见明显降解。**结论** 本研究制得的胶原-壳聚糖具有很高的¹³¹I 标记率、体内外稳定性及良好的肿瘤杀伤效果。

【关键词】 放射性碘 微球 胶原蛋白 壳聚糖 肝癌 放射性核素治疗

Preparation of ¹³¹I Labeled Collagen-Chitosan Microspheres and It's Antitumor Effect on Human Liver Cancer PANG Fu-wen, CAI Hua-wei, LI Yu-hao, ZHANG Wen-jie, LI Lin[△]. Department of Nuclear Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: lilinhuaxi@sina.com

【Abstract】 Objective To prepare iodine-131 (¹³¹I) labeled biodegradable microspheres with chitosan and collagen for treating liver cancer. **Methods** Collagen-chitosan microspheres (CCMSs) were prepared with type-I collagen and chitosan using emulsification-chemical cross-linking method. The size of the CCMSs were determined by electron microscope. ¹³¹I-CCMSs were achieved using Chloramine-T. The labelling rate of ¹³¹I was recorded. The stability of ¹³¹I-CCMSs *in vitro* were evaluated in PBS or human blood serum through 192 h incubation. The HepG2 model was established in nude mice 28 d after subcutaneous injection of 10⁶ HepG2 cells. The model mice were sacrificed 7 d after injection of ¹³¹I-CCMSs, blank microspheres, or PBS (five mice in each group) into the HepG2 tumor xenografts. Samples of various organs were collected to determine the distribution of ¹³¹I-CCMSs. The curative effect of ¹³¹I-CCMSs on liver cancer was assessed by staining with HE for histological analyses. **Results** CCMSs were synthesized with a smooth and spherical shape and an average diameter of (5.1±1.2) μm. A radiolabeling rate of 86.10% was achieved. ¹³¹I radio-loading remained stable; 92.00% in saline and 83.00% in human serum after 192 h incubation. ¹³¹I was mainly concentrated in the subcutaneous tumor tissues. Potent curative effects of ¹³¹I-CCMSs on subcutaneous tumor tissues were demonstrated. **Conclusion** Biodegradable CCMSs were successfully prepared and radiolabeled. The ¹³¹I-CCMSs exhibited potential curative effects on liver cancer, with high stability *in vitro* and *in vivo*.

【Key words】 ¹³¹I Microsphere Collagen Chitosan Liver cancer Radionuclide therapy

放射性核素微球内照射是无法进行手术切除的

肝癌常用的治疗方法。目前已通过美国食品药品监督管理局(FDA)认证用于治疗肝癌的核素微球有⁹⁰Y-玻璃微球、⁹⁰Y-树脂微球。CHAN 等^[1]对 10 例混合型肝细胞癌胆管细胞癌患者进行⁹⁰Y 微球治疗,治疗过程

* 国家自然科学基金(No. 81371585、No. 81301250)和四川省科技厅国际合作计划(No. 2016HH0065)资助

[△] 通信作者, E-mail: lilinhuaxi@sina.com

中未观察到生物毒性,首次治疗及初次诊断后的总体中位生存期分别为 10.2 月及 17.7 月。在 CIANNI 等^[2]的研究中,52 例肝转移癌患者经 Y^{90} -树脂微球治疗 2 月后,部分反应率为 56%,平均生存时间为 11.5 月。

然而玻璃、树脂微球均不可生物降解,一旦注入将永远留在体内,限制再次介入治疗。可生物降解微球是解决此类问题的办法。胶原和壳聚糖均是可生物降解材料,已广泛用于临床。 ^{131}I 是临床上最常用的放射性核素。本研究以胶原、壳聚糖、 ^{131}I 为原料,制备 ^{131}I 标记胶原-壳聚糖微球,并探究其体内外稳定性及对荷人类肝癌(HepG2)模型鼠皮下瘤的治疗效果,为临床转化奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

BALB/C 裸鼠 25 只(雌性、4 周龄、体质量 16~18 g,由四川大学实验动物中心提供);HepG2 细胞株(上海细胞库);牛皮 I 型胶原(相对分子质量 300 000,四川大学生物材料中心);壳聚糖(相对分子质量 190 000~310 000,美国 Sigma-Aldrich 公司);液体石蜡(分析纯)、Span80(美国 Sigma 公司);乙酸(分析纯)、戊二醛(50%)、氯胺-T、偏重亚硫酸钠(成都科龙化工试剂厂); ^{131}I -NaI 溶液(四川大学华西医院核医学科提供);异丙醇(分析纯,广州金华大化学试剂有限公司);电子天平(ESJ120-4,沈阳龙腾电子有限公司);DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(90-2,上海沪西分析仪器有限公司);冷冻离心机(Eppendorf 5702R,德国基因有限公司); γ 放射免疫计数仪(FJ2021,中国西安二六二仪器厂);JSM-390LV 型扫描电镜(日本电子株式会社);C12000-02 NanoZoomer-XR 数字切片扫描仪(日本滨松光子学株式会社)。

1.2 方法

1.2.1 胶原-壳聚糖微球制备 称取 7.6 mg 胶原和 20 mg 壳聚糖于烧杯中,加入 15 mL 醋酸溶液(体积分数 2%),在磁力搅拌器中搅拌 1 h 使其溶解后得到透明、黏稠的溶液。将该溶液缓慢加入到 70 mL 含有 5.6 mL Span80 的液体石蜡中,室温下于磁力搅拌器中搅拌 1 h 得到乳状液体。在搅拌状态下(1 000 r/min)向所得乳液中缓慢滴加 600 μL 戊二醛溶液(体积分数 50%)交联 1 h,使乳液中的小液滴固化、成型。在产物中加入 200 mL 异丙醇洗涤,离心去上清,再加入足量离子水反复洗涤,经

100 μm 过滤器过滤、离心,最终浓缩成 1 mL 胶原-壳聚糖微球悬液。用扫描电镜(SEM)观察微球的形貌特征并通过 SemAfore 4 Demo 软件测量 SEM 照片上的微球直径,统计 500 个微球直径并计算平均粒径。

1.2.2 胶原-壳聚糖微球的 ^{131}I 标记 在室温下向试管中加入 1 mL 胶原-壳聚糖微球悬液,随后依次加入 ^{131}I -NaI(10 mCi)、氯胺-T 溶液 100 μL (20 g/L),震荡反应 5 min,室温下静置 25 min。加入偏重亚硫酸钠溶液 50 μL (15 g/L)终止反应。微球高速离心后,用生理盐水洗涤,离心、去上清,重复 7 次后得到 ^{131}I 标记的胶原-壳聚糖微球。用 γ 计数器测定试管的放射性计数,计算标记率。标记率为实际成功标记的 cpm/总加入量 cpm,其中 cpm 为每分钟的放射性计数。

1.2.3 ^{131}I -胶原-壳聚糖微球的体外稳定性实验

取 2 根试管,标记为 A、B。在两试管中分别加入 100 μL ^{131}I -胶原-壳聚糖微球,随后 A 管中加入 100 μL PBS,B 管中加入 100 μL 人体血清。于 1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、24 h、36 h、48 h、72 h、96 h、120 h、144 h、168 h、192 h 测定 A、B 管的放射性计数,计算标记率并绘制微球体外稳定性曲线。

1.2.4 裸鼠肝癌模型的建立 HepG2 细胞使用 DMEM 培养基,添加 10% 胎牛血清、100 U/mL 青-链霉素,于体积分数 5% CO_2 培养箱中培养。细胞培养至对数生长期时,使用体积分数 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化重悬至细胞密度为 $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 。于每只裸鼠同一侧腿皮下一次性注射入 HepG2 细胞悬液 100 μL (约 10^6 个细胞)。

1.2.5 ^{131}I -胶原-壳聚糖微球在裸鼠体内的分布及其对肝癌的治疗效果 接种 28 d 后选取肿瘤最大直径为 0.5 cm 左右的裸鼠 15 只,随机分为 3 组,每组 5 只。标记微球组:将标记微球制成 2.5 mCi/100 μL 悬液,置于 1 mL 空针后一次性将其注入裸鼠的皮下瘤,每只裸鼠 500 μCi (20 μL)。空白微球组:1 mL 空针抽取 100 μL 与标记微球组浓度一致的胶原-壳聚糖空白微球,一次性注入裸鼠的皮下瘤,每只裸鼠 20 μL 。PBS 组:每只裸鼠一次性注射等量的 PBS。注射后继续饲养 7 d,随后处死所有裸鼠,取血标本和心、肺、肝、脾、胃、小肠、肾、肌肉、脑、骨、甲状腺、皮下肝癌组织,测量所取组织的质量及 cpm,计算 %ID/g 值(每克组织中每分钟 cpm 值/总注入量 cpm 值),以此探究标记微球在裸鼠体内的分布。肝癌组织置于体积分数 4% 多聚甲醛固定

24 h,石蜡包埋、切片,HE 染色,用于病理学观察。

2 结果

2.1 胶原-壳聚糖微球的表征

微球 SEM 照片显示胶原-壳聚糖微球成球性好,表面光滑,粒径均匀,分散良好,平均粒径(5.1 ± 1.2) μm (图 1)。

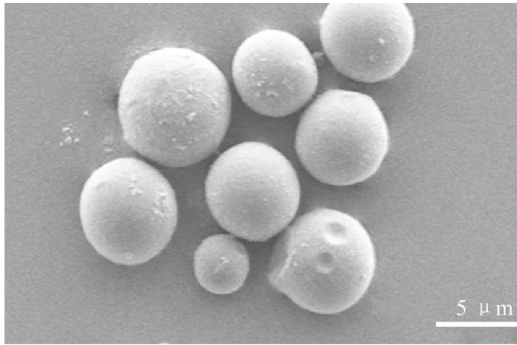


图 1 胶原-壳聚糖复合微球的 SEM 照片。 $\times 5\,000$
Fig 1 Scanning electron microscope image of CCMSs. $\times 5\,000$

2.2 胶原-壳聚糖微球的¹³¹I 标记及体外稳定性

胶原-壳聚糖微球的¹³¹I 标记率为 92.82%。洗

涤 3 次后,碘的标记率轻微降低,由 92.82%降至 86.10%,随后碘标记率保持平衡,不随清洗次数增加而降低(图 2)。通过¹³¹I-胶原-壳聚糖体外稳定性曲线显示血清组碘标记量呈现缓慢下降趋势,碘标记率 1 个半衰期后(192 h)从 94.00%降至 83.00%,脱标率为 11.00%。而 PBS 组的碘标记率从 94.00%降至 92.00%,脱标率仅有 2.00%(图 3)。

2.3 ¹³¹I-胶原-壳聚糖微球在裸鼠体内的分布及对肝癌细胞的杀伤效果

选用的裸鼠治疗期间未发生死亡,全部进入结果分析。¹³¹I-微球体内分布实验显示裸鼠注射标记微球 7 d 后放射性主要集中于皮下肿瘤组织,而血和心、肺、肝、脾、胃、小肠、肾、肌肉、脑、骨、甲状腺中仅有极低的放射性计数(图 4)。

HE 染色可见 7 d 后 PBS 组皮下肝癌细胞多为圆形或梭形,核大而深染,间质较少,细胞异型明显,病理性核分裂多见(图 5A)。7 d 后空白微球组病理切片仅见少量癌细胞坏死,微球周围可见少量炎

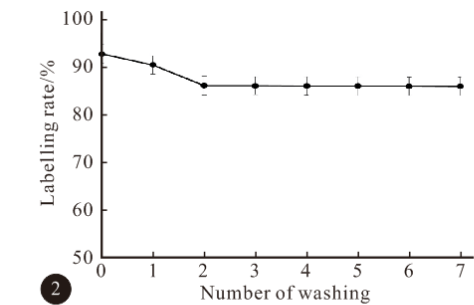


图 2 ¹³¹I-微球洗涤次数与碘标记率的关系($n=4$)

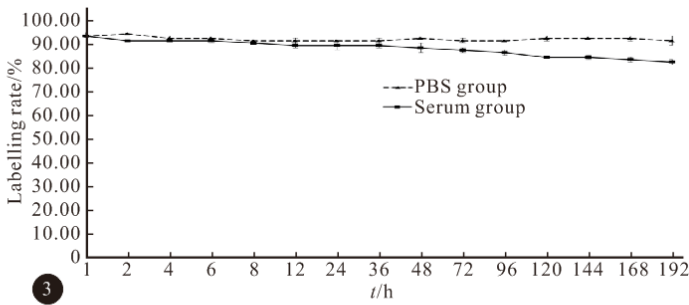


图 3 ¹³¹I-微球的体外稳定性曲线($n=4$)

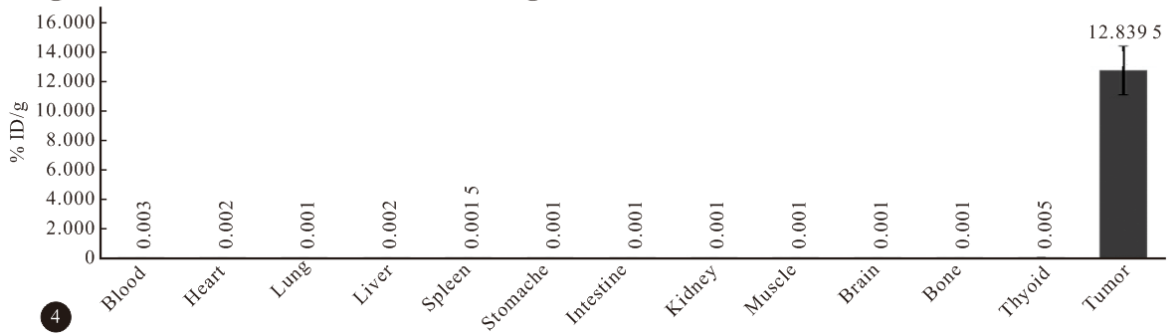


图 4 7 d¹³¹I-胶原-壳聚糖微球在裸鼠体内的分布($n=5$)

Fig 2 Effect of washing on labeling rate ($n=4$)

Fig 3 Stability of CCMSs *in vitro* ($n=4$)

Fig 4 Distribution of ¹³¹I in nude mice bearing tumor at 7 d ($n=5$)

细胞浸润(图 5B)。7 d 后标记微球组病理切片见肿瘤细胞呈大片状凝固性坏死,周边仅残留少量癌细胞。7 d 后肿瘤坏死区域内可见大量微球,微球未见明显降解(图 5C~5D)。

3 讨论

肝癌是目前中国常见肿瘤之一,其致死率高居恶性肿瘤的第 4 位^[3]。肝癌的治疗方法主要包括手

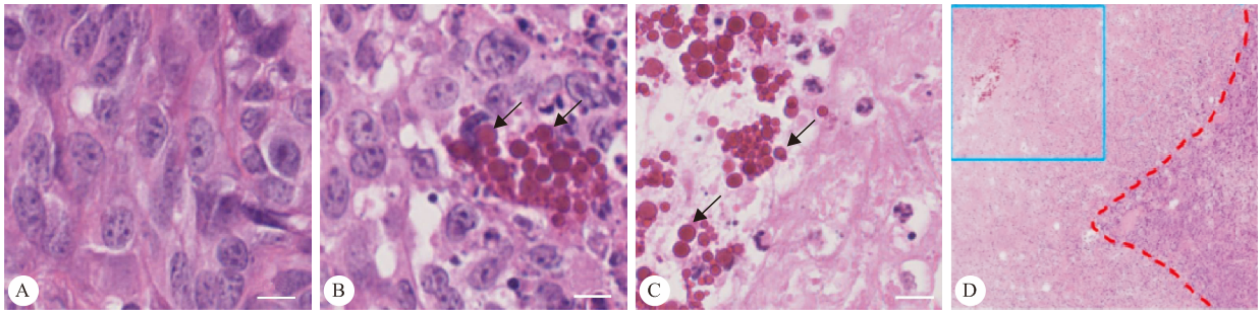


图 5 7 d 后裸鼠皮下肝癌组织 HE 染色图

Fig 5 Pathological examination of subcutaneous HepG2 cells at 7 d. HE staining

A: PBS group ($\times 80$); B: Blank CCMSs group ($\times 80$); C, D: ^{131}I labeled collagen-chitosan microspheres group (C, $\times 80$; D, $\times 10$). The arrows indicate the collagen-chitosan microsphere; The red dashed line separates the tumor lesion (right area) and the necrosis of HepG2 cells (left area); The area in blue box is zoomed in to fig C

术切除、化疗、放疗和各种综合治疗方法,其中手术切除为首选的治疗方法,但大多数患者就诊时已是中晚期,因而丧失了手术机会。肝脏位置较深,外照射治疗在杀伤肿瘤细胞的同时也会造成正常肝细胞大量死亡,因此外照射的临床应用价值有限。肝动脉灌注化疗栓塞术(transcatheter hepatic artery chemoembolization, TACE)通过栓塞肿瘤供血动脉而使肿瘤缺血坏死,是无法进行手术切除的原发性肝癌最常用的治疗方法。但 TACE 对肝功能的损害限制了其疗效,而肿瘤血管侧支循环的形成,也增加了 TACE 再次治疗的难度^[4]。此外有研究表明 TACE 对于肝癌没有显著的治疗效果^[5]。肝癌病灶常常局限在肝脏,远处转移较晚,放射性核素微球可使肿瘤区域获得较高的放射剂量的同时,正常组织的放射剂量相对较低,因此放射性核素微球内照射成为治疗肝癌理想的选择之一。过往研究表明,相比 TACE,放射性核素微球疗效的完全响应率、部分响应率及远期生存率较高^[6]。

放射性微球的优劣势主要由微球本身的材料和放射性同位素决定。常见的放射性核素有⁹⁰Y、³²P 等。⁹⁰Y 半衰期短(64.1 h),体内辐射半径为 1.1 mm,发射纯 β 射线(最大能量 546 keV),不发射 γ 射线,因此无法显像。此外⁹⁰Y 在国内生产困难,成本较高。³²P 也无法显像,一旦释放入血将被机体大部分组织吸收,造成广泛的辐射损伤。¹³¹I 物理半衰期为 8.04 d,发射的 β 射线最大能量为 606 keV,体内辐射半径仅有 0.9 mm,其 β 射线能量及辐射半径接近于⁹⁰Y,因此¹³¹I 与⁹⁰Y 具有相似的生物辐射效应。但¹³¹I 可发射 γ 射线用于显像。目前¹³¹I 已被广泛用于治疗 Graves 病、分化型甲状

腺癌,证明¹³¹I 具备良好的生物安全性及生产成本低等优点。玻璃、树脂均是不可降解材料,既影响再次灌注治疗,也容易引发远期的组织损伤效应。本研究研制的胶原-壳聚糖复合微球的优点在于利用了胶原和壳聚糖这两种可降解生物材料。胶原和壳聚糖均具有良好的生物相容性和可降解性^[7-8]。胶原被用于合成药物载体、医用涂层、胶片、水凝胶和海绵等^[7],而壳聚糖则被用于合成纳米纤维、海绵、纳米微粒、凝胶、支架、生物膜等^[8]。胶原含有大量酪氨酸残基,易于进行¹³¹I 标记,但其体内稳定性差,可被胶原酶降解^[9]。壳聚糖成球性好^[10],可被多种蛋白酶降解,同时受多种酶及其他因素的影响抑制其降解,体内降解速度远小于胶原。但壳聚糖缺少酪氨酸残基^[8],因此不易进行¹³¹I 标记。壳聚糖和胶原成球的原理为:戊二醛分子末端的 2 个醛基(-CHO)会与胶原以及壳聚糖大分子链上的氨基(-NH₂)发生缩合反应,脱水生成含碳氮双键(C=N)的亚胺,从而通过化学键将胶原、壳聚糖大分子链紧密连接到一起^[11]。本研究制得的复合微球具有良好的表征,¹³¹I 标记率为 86.10%,说明该微球融合了壳聚糖成球性好、胶原易于标记¹³¹I 的优点,间接证明了该微球确实为胶原-壳聚糖复合微球。

CHI 等^[12]通过氯胺 T 法对明胶微球进行¹³¹I 标记,标记率为 67.27%,洗涤 7 次后降为 45.99%。本课题组此前也利用氯胺 T 法对明胶微球进行¹³¹I 标记,标记率为 68.01%,洗涤 7 次后降为 41.00%^[13]。本次研究中,复合微球利用氯胺 T 法获得了 92.82% 的高标记率,洗涤 3 次后降为 86.10%,标记率比 CHI 等的微球分别提高了 25.55%、40.11%,比本课题的明胶微球分别提高了

24.81%、45.10%。胶原-壳聚糖复合微球显示出了更好的¹³¹I结合能力。胶原-壳聚糖微球碘结合能力高于明胶微球可能的机制在于胶原的稳定性依靠其三螺旋结构来维持^[7],而明胶作为胶原热变性的产物,失去三螺旋结构,因此明胶微球的稳定性较胶原-壳聚糖微球差。其与¹³¹I结合的稳定性也较胶原-壳聚糖微球差。过去认为通过氯胺 T 法进行¹³¹I标记容易发生碘脱标而造成核素大量释放,而本研究制备的¹³¹I标记微球经过¹³¹I的一个半衰期的体外稳定性探究后,血清组碘标记率仅下降 9.00%,且 PBS 组几乎没有下降。治疗 7 d 后,体内分布实验发现放射性主要集中在皮下肿瘤组织,其他组织中几乎没有放射性,说明¹³¹I-胶原-壳聚糖微球的体内外稳定性高,不易出现核素大量脱落造成其他组织的辐射损伤。壳聚糖对胶原的保护及胶原本身的三螺旋结构的维持,两者共同作用使得胶原被降解的速度减慢,这可能是其体内外稳定性高的原因所在。

本研究中,核素微球附近的癌细胞大量死亡,可以看到明显的药物杀伤边界,周边的肝癌细胞受损较轻微,说明该核素微球具有良好的肿瘤杀伤效果。由于微球属于外来异物,空白微球周围出现轻微的炎细胞浸润是正常的免疫反应,间接说明微球安全性高,不会引起强烈的局部炎症反应。

本研究的不足之处在于受样本量不足和饲养条件限制,没有进行更长期的肝癌细胞杀伤效果的探究。针对本次研究的不足之处,未来我们将扩大样本量,进一步探究该放射性微球的性能及肝癌的治疗效果。此外因小鼠体型受限,难以建立原位肝癌模型,后续考虑更换成体型更大的动物模型如兔或犬类来建立原位的肝癌肿瘤模型,利用介入栓塞的方法取代瘤内注射,探究该放射性微球肝癌治疗效果的同时评价其血管栓塞效果。

本研究利用乳化交联法成功制得可生物降解的胶原-壳聚糖复合微球,具有 86.10%的¹³¹I标记率。通过探究¹³¹I标记的胶原-壳聚糖微球体外稳定性、裸鼠体内分布及对肝癌的治疗效果表明其具有较高的体内外稳定性及良好的肝癌治疗效果。本研究的成果可用于后续¹³¹I标记胶原-壳聚糖微球在肝癌放射性核素介入栓塞疗效的探究中。

参 考 文 献

[1] CHAN LS, SZE DY, POULTSIDES GA, *et al.* Yttrium-90

radioembolization for unresectable combined hepatocellular-cholangiocarcinoma. *Cardio Vasc Inter Rad*, 2017, 40(9): 1383-1391.

- [2] CIANNI R, PELLE G, NOTARIANNI E, *et al.* Radioembolisation with 90Y-labelled resin microspheres in the treatment of liver metastasis from breast cancer. *Eur Radiol*, 2013, 23(1):182-189.
- [3] CHEN W, ZHENG R, BAADE PD, *et al.* Cancer statistics in China, 2015. *Ca Cancer J Clin*, 2016, 66(2):115-132.
- [4] BROWN DB, NIKOLIC B, COVEY AM, *et al.* Quality improvement guidelines for transhepatic arterial chemoembolization, embolization, and chemotherapeutic infusion for hepatic malignancy. *J Vasc Interv Radiol*, 2012, 23(3):287-294.
- [5] ROCCARINA D, MAJUMDAR A, THORBURN D, *et al.* Management of people with intermediate-stage hepatocellular carcinoma: an attempted network meta-analysis. *Cochrane Db Syst Rev*, 2017, 3:D11649.
- [6] XIE F, ZANG J, GUO X, *et al.* Comparison of transcatheter arterial chemoembolization and microsphere embolization for treatment of unresectable hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2012, 138(3):455-462.
- [7] AN B, LIN Y S, BRODSKY B. Collagen interactions: drug design and delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 97: 69-84 [2017-02-14]. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.013>.
- [8] H P S A K, SAURABH CK, A S A, *et al.* A review on chitosan-cellulose blends and nanocellulose reinforced chitosan biocomposites: Properties and their applications. *Carbohydr Polym*, 2016, 150: 216-226 [2017-02-18]. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.028>.
- [9] FERREIRA AM, GENTILE P, CHIONO V, *et al.* Collagen for bone tissue regeneration. *Acta Biomater*, 2012, 8(9):3191-3200.
- [10] TOLESSA T, ZHOU XX, AMDE M, *et al.* Development of reusable magnetic chitosan microspheres adsorbent for selective extraction of trace level silver nanoparticles in environmental waters prior to ICP-MS analysis. *Talanta*, 2017, 169: 91-97 [2017-05-19]. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.03.064>.
- [11] LI Y, LIU T, ZHENG J, *et al.* Glutaraldehyde-crosslinked chitosan/hydroxyapatite bone repair scaffold and its application as drug carrier for icariin. *J Appl Polym Sci*, 2013, 130(3):1539-1547.
- [12] CHI JL, LI CC, XIA CQ, *et al.* Effect of (131)I gelatin microspheres on hepatocellular carcinoma in nude mice and its distribution after intratumoral injection. *Radiat Res*, 2014, 181(4):416-424.
- [13] MA Y, WAN Y, LUO DH, *et al.* Direct *in vivo* injection of 131I-GMS and its distribution and excretion in rabbit. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(17):2120-2128.

(2017-09-19 收稿, 2017-12-11 修回)

编辑 吕 熙