

甲氨蝶呤与长春新碱双载红细胞的体外抗肿瘤活性研究

王 宣¹, 钱宝华^{2*}, 查占山², 吴 江², 蔡志扬², 郭 峰²

(1. 济南军区医学科技情报研究中心, 济南 250022; 2. 第二军医大学长海医院输血科, 上海 200433)

[摘要] **目的:** 研究甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)与长春新碱(vincristine, VCR)双载红细胞体外抗肿瘤效果。**方法:** 改良低渗预膨胀技术制备 MTX+VCR 双载红细胞、MTX 单载红细胞和 VCR 单载红细胞。分别采用制备的载体红细胞、未载药红细胞、MTX+VCR 工作液及 RPMI 1640 培养液与 K562 细胞共培养。MTT 法检测 K562 细胞增殖, PI 染色流式细胞仪分析 K562 细胞周期, Annexin V-FITC/PI 染色流式细胞仪分析 K562 细胞凋亡情况。**结果:** 双载红细胞明显抑制 K562 细胞的增殖并促进其凋亡作用, 且随共培养时间的延长而作用增强, 效果优于 MTX 单载红细胞($P < 0.05$), 与未载药红细胞相比差异显著($P < 0.01$); 细胞周期结果显示, 双载红细胞组 G_0/G_1 期 K562 细胞明显减少, G_2/M 期细胞逐渐增多, S 期 K562 细胞在作用 12 h 后明显增多, 24 h 后略有减少, 与未载药红细胞的作用相比差异显著, 与 MTX+VCR 原药组的作用基本相同。**结论:** 与未载药红细胞和单载红细胞相比, MTX+VCR 双载红细胞杀伤肿瘤细胞作用更强。

[关键词] 红细胞; 药物载体; 甲氨蝶呤; 长春新碱; K562 细胞; 细胞周期; 细胞凋亡

[中图分类号] R 943 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)02-0158-04

In vitro antineoplastic effect of erythrocytes co-encapsulated with methotrexate and vincristine

WANG Xuan¹, QIAN Bao-hua^{2*}, ZHA Zhan-shan², WU Jiang², CAI Zhi-yang², GUO Feng² (1. Medical Information Center of PLA Jinan Military Area Command, Jinan 250022, China; 2. Department of Blood Transfusion, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the *in vitro* anti-tumor effect of methotrexate (MTX) and vincristine (VCR)-loaded erythrocytes. **Methods:** MTX + VCR-loaded, MTX-loaded, and VCR-loaded erythrocytes were prepared by modified hypo-osmotic swelling technique. K562 cells were treated with the prepared erythrocytes, pure erythrocytes, MTX+VCR solution, and RPMI 1640 medium. MTT assay was used to examine the proliferation of K562 cells. The cell cycle of K562 was observed by flow cytometer using PI dyeing. The apoptosis of co-cultured K562 cells was analyzed by flow cytometer with Annexin V-FITC/PI kit. **Results:** MTX + VCR-loaded erythrocytes efficiently inhibited the proliferation and induced apoptosis of co-cultured K562 cells in a time-dependent manner, and its effects were better than those mono-loaded ones ($P < 0.05$) and unloaded ones ($P < 0.01$). Cellular cycle analysis demonstrated that, compared with control groups, proportion of K562 cells at G_0/G_1 phase decreased whereas that at S phase increased 12 hours after co-cultured with MTX+VCR-loaded erythrocytes. 24 hours after co-cultured with MTX + VCR-loaded erythrocytes the cells at G_2/M phase increased and the cells in S phase decreased compared with those of 12 hours; there were significant difference between MTX+VCR group and unloaded group; and the MTX+VCR-loaded erythrocytes had a similar effect to that of MTX+VCR solution. **Conclusion:** Compared with pure erythrocytes and mono-loaded erythrocytes, MTX+VCR-loaded erythrocytes have more potent anti-tumor effect.

[KEY WORDS] erythrocytes; drug carriers; methotrexate; vincristine; K562 cell; cell cycle; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(2): 158-161]

本课题组在前期实验研究中已经证明^[1], 通过改良的低渗预膨胀-等渗重封闭技术, 红细胞可以作为甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)和长春新碱(vincristine, VCR)双药载体, 并且具有良好的载药效果和较高的载体红细胞回收率, 载入红细胞的 MTX、VCR 体外释放缓慢、稳定。经红细胞载药并释放出来的 MTX、VCR 可经高效液相色谱法(HPLC)测定, 提示其与原 MTX、VCR 的化学结构相同, 但其是否保持了包载处理前所具有的抗肿瘤生物学活性还需要进一步的体外实验验证。本研究将 MTX+VCR 双载红细

胞与 K562 细胞共培养, 通过分析 K562 细胞增殖、细胞周期和细胞凋亡情况, 对双载红细胞释放 MTX 和 VCR 的抗肿瘤活性进行了观察。

1 材料和方法

1.1 实验对象和材料 K562 细胞株由长海医院细

[作者简介] 王 宣, 硕士, 实习研究员。

E-mail: xuan075@sohu.com

* Corresponding author. E-mail: qianbh1963@21cn.com

胞培养室惠赠。健康成人红细胞由中国人民解放军上海血站提供。注射用 MTX、硫酸长春新碱粉针剂购自上海华联制药有限公司。Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒购于晶美生物工程有限公司。碘化丙啶(propidium iodide, PI)、四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、二甲基亚砷(dimethyl sulfoxid, DMSO)、RNase A 酶等购自美国 Sigma 公司, RPMI 1640 完全培养基购自美国 Hyclone 公司。Triton X-100 购自上海华舜生物制品有限公司, 用 PBS 调节浓度至 0.1%, 置 4℃ 保存。

1.2 MTX+VCR 双载红细胞制备 取浓度为 5 mg/ml MTX 工作液和 0.5 mg/ml VCR 工作液, 改良低渗预膨胀法制备 MTX+VCR 双载红细胞^[1]、MTX 单载红细胞^[2]和 VCR 单载红细胞^[3]。载体红细胞室温下 PBS 洗涤离心(850×g, 5 min)3 次, 分别用 RPMI 1640 培养液调整细胞密度至 3×10⁶/ml 备用, MTX 工作液用 RPMI 1640 培养液调至 50 ng/ml, VCR 工作液用 RPMI 1640 培养液调至 30 ng/ml 备用。取指数生长期 K562 细胞用 RPMI 1640 培养液调整细胞密度至 1×10⁵/ml 备用。

1.3 MTT 法检测 K562 细胞增殖 取 K562 细胞悬液每孔 0.1 ml 接种于 96 孔板, 分别加入 MTX+VCR 双载红细胞、MTX 单载红细胞、VCR 单载红细胞、未载药红细胞、MTX+VCR 工作液以及空白对照 RPMI 1640 培养液各 0.1 ml, 每组设置 3 个平行复孔。充分混匀后, 置于细胞培养箱中, 37℃、5% CO₂、饱和湿度培养并于 1、4、12、24 及 48 h 后分别取出, 参考文献[4]方法以酶联免疫检测仪选取室温

条件下, 单波长、570 nm 滤光片测定每孔的光密度值(D)。抑制率(%)=[(1-实验组 D₅₇₀)/空白对照组 D₅₇₀]×100%。

1.4 Annexin V-FITC/PI 染色 K562 细胞凋亡分析 取 K562 细胞悬液每孔 1 ml 分别接种于 24 孔板, 再加入 MTX+VCR 双载红细胞、MTX 单载红细胞、VCR 单载红细胞、未载药红细胞悬液, MTX+VCR 工作液以及 RPMI 1640 各 1 ml, 充分混匀后置于细胞培养箱 37℃、5% CO₂、饱和湿度培养。12、24 h 后, 分别提取 1 ml 混合培养的细胞悬液, 按试剂盒说明操作, 流式细胞仪检测 K562 细胞凋亡情况, 分析软件为 Cell Quest。

1.5 PI 染色 K562 细胞周期分析 上述组别培养 12、24 h 后, 分别提取 1 ml 混合培养的细胞悬液, 参考文献[4]方法进行 PI 染色, 流式细胞仪分析 K562 细胞周期变化, 分析软件为 Cell Quest。

1.6 统计学处理 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用重复测量的方差分析, 统计软件为 SAS 8.2。

2 结果

2.1 MTX+VCR 双载红细胞对 K562 细胞增殖的影响 MTX+VCR 双载红细胞对 K562 细胞增殖具有显著的抑制作用, 且其抑制作用随共培养时间的延长而逐渐增强, 效果优于 MTX 或 VCR 单载红细胞($P < 0.05$), 与未载药红细胞相比差异更为显著($P < 0.01$), 与原始 MTX、VCR 浓度的混合工作液的作用基本相同(表 1)。

表 1 药物载体红细胞对 K562 细胞增殖的影响

Tab 1 Effect of erythrocytes on proliferation of K562 cells

(n=3, $\bar{x} \pm s$)

Group	Inhibitory rate(%)				
	1 h	4 h	12 h	24 h	48 h
Unloaded erythrocytes	14.48±2.66	14.21±1.78	14.99±2.20	15.58±2.36	16.39±1.50
MTX+VCR	35.03±2.26**	51.94±1.68**	53.23±3.08**	54.69±2.80**	56.55±2.06**
MTX-loaded erythrocytes	27.82±1.23**△	34.81±3.34**△	38.71±1.88**△	43.99±1.75**△	44.18±1.33**△
VCR-loaded erythrocytes	30.26±3.26**△	41.22±2.97**△	43.20±0.95**△	47.62±2.76**△	50.56±1.12**△
MTX+VCR-loaded erythrocytes	32.17±3.35**	45.49±2.03**	46.67±2.82**	49.19±1.89**	52.63±0.76**

** $P < 0.01$ vs unloaded erythrocytes; △ $P < 0.05$ vs MTX+VCR-loaded erythrocytes group

2.2 MTX+VCR 双载红细胞诱导的 K562 细胞凋亡 MTX+VCR 双载红细胞可以诱导 K562 细胞的凋亡, 共培养 24 h 后, MTX+VCR 双载红细胞诱导的早期凋亡 K562 细胞, 以及死亡/晚期凋亡的

K562 细胞, 与 12 h 相比显著增多, 具有明显随共培养时间延长而诱导凋亡作用增强的效应。与未载药红细胞的作用相比均差异显著, 与 MTX+VCR 工作液给药组的表现相似(表 2)。

表 2 共培养 12 h 和 24 h 后的 K562 细胞状态分布

Tab 2 Proportion of K562 cells at different phases after co-cultured for 12 h and 24 h

(%)

Group	Apoptosis rate		Dead rate		Survival rate	
	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h
Control	2.18	2.54	1.85	2.87	95.97	94.58
Unloaded erythrocytes	4.94	4.78	5.57	5.92	89.49	89.25
MTX+VCR	9.12	17.57	11.95	14.37	78.93	67.96
MTX-loaded erythrocytes	4.93	12.41	2.18	37.94	92.89	49.65
VCR-loaded erythrocytes	5.34	10.11	4.95	12.79	89.65	77.04
MTX+VCR-loaded erythrocytes	4.89	15.23	7.76	18.73	87.32	65.79

2.3 MTX+VCR 双载红细胞对 K562 细胞周期变化的影响 MTX+VCR 双载红细胞与 K562 细胞混合培养 12 h、24 h 后, G₀/G₁ 期 K562 细胞明显减少, 分别为 19.81%、15.01%, G₀/G₁ 期之前出现明显的亚二倍体峰。S 期细胞 12 h 明显增多, 24 h 有

所下降, 分别为 50.14%、41.38%。G₂/M 期细胞 12 h 略有增多, 24 h 则明显增多, 分别为 30.05%、43.61%。与空白对照组及未载药红细胞组相比差异显著, 与 MTX+VCR 工作液组的表现相近(表 3)。

表 3 共培养 12 h 和 24 h 后的 K562 细胞周期分布

Tab 3 Proportions of K562 cells at different cellular cycles after co-cultured with erythrocytes for 12 h and 24 h

(%)

Group	G ₀ /G ₁		G ₂ /M		S	
	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h
Control	45.78	44.05	12.31	12.12	41.91	43.83
Unloaded erythrocytes	39.15	34.19	22.63	26.88	38.23	38.94
MTX+VCR	34.01	29.50	21.59	10.97	44.40	59.53
MTX-loaded erythrocytes	13.83	13.31	40.55	54.84	45.62	31.85
VCR-loaded erythrocytes	37.48	30.86	12.38	13.90	50.13	55.25
MTX+VCR-loaded erythrocytes	19.81	15.01	30.05	43.61	50.14	41.38

3 讨论

MTX 和 VCR 是临床常用的抗肿瘤药物, 抗肿瘤谱广。它们分别作用于细胞周期的 S 期和 M 期, 可以杀灭处于不同生长周期的细胞。在体内, MTX 和 VCR 没有交叉抗药性^[5], 且有增效作用^[6]。K562 细胞是一种建株于慢性髓细胞白血病急性变患者骨髓细胞的细胞株, 常用于体外研究, 已有文献报道^[7-9] MTX、VCR 均可以抑制 K562 细胞的增殖并诱导其凋亡。

实验中我们发现, MTX+VCR 双载红细胞对 K562 细胞增殖具有显著的抑制作用, 且随共培养时间的延长而增强。与未载药红细胞的作用相比差异显著不同, 与 MTX+VCR 工作液给药组抑制 K562 细胞增殖的效果同步, 说明 MTX+VCR 双载红细胞具有良好的抗肿瘤活性, 并且这种活性可能是来源于其所释放出来 MTX、VCR 的作用。细胞凋亡的流式分析结果显示, MTX+VCR 双载红细胞诱导 K562 细胞凋亡的作用有明显的时间依赖关系。

共培养 24 h 后, MTX+VCR 双载红细胞诱导的早期凋亡 K562 细胞, 以及死亡/晚期凋亡的 K562 细胞, 与 12 h 相比显著上升约 3 倍。与未载药红细胞相比差异非常显著, 诱导凋亡的作用优于单载 MTX 或单载 VCR, 与 MTX+VCR 工作液给药组的表现非常一致, 证明双载红细胞所诱导的 K562 细胞凋亡是由其携带并释放出来的 MTX、VCR 所致。细胞周期分析中 MTX+VCR 载体红细胞与 K562 细胞混合培养 12、24 h 后, G₀/G₁ 期 K562 细胞明显减少, S 期细胞、G₂/M 期细胞变化明显, 具有显著的时间依赖性。12 h 后, S 期细胞明显增多, 而 24 h 有所下降, G₂/M 期细胞 12 h 略有增多, 24 h 则明显增多。说明 MTX 首先从 MTX+VCR 载体红细胞中释放出来并发挥药效, 主要杀伤处于 S 期的 K562 细胞, 同时, 少量 VCR 也释放出来发挥杀伤 G₂/M 期 K562 细胞的作用; 随着时间的延长, 大量 VCR 释放出来, 将未被杀死的 K562 细胞清除在 G₂/M 期。这种作用效果与未载药红细胞相比差异非常显著, 与 MTX 载体红细胞、VCR 载体红细胞或

MTX+VCR工作液给药组的表现也不尽相同。这说明两药都起到杀伤 K562 细胞的作用,并且诱导 K562 细胞凋亡具有时间依赖性。这一结果提示,我们可以具体到某种肿瘤的临床用药,通过膜共价修饰等方式,控制两种甚至多种药物的释放,达到杀伤肿瘤细胞的最佳效果。另外,我们在 G_0/G_1 期前发现有一个明显的亚二倍体小峰,此即凋亡的 K562 细胞,进一步证明了 MTX+VCR 载体红细胞具有诱导 K562 细胞凋亡的作用,这与 MTX+VCR 工作液组的作用相近,而与未载药红细胞对 K562 细胞周期的影响差异显著。通过以上实验结果的分析,我们认为载体红细胞所释放的 MTX、VCR 不但具有与原 MTX、VCR 相同的化学结构,更重要的是保留了原 MTX、VCR 的抗肿瘤活性,并且因其缓释作用,大大延长了 MTX、VCR 的药效时间,杀伤处于不同时期的肿瘤细胞,抑制肿瘤细胞生长、诱导肿瘤细胞凋亡的效果也更加显著。体外抗肿瘤实验证明,与单载红细胞相比,双载红细胞杀伤肿瘤细胞作用更强,更持久。因此可以预见,MTX+VCR 载体红细胞的研制成功,为进一步多药联合包载载药平台的建立提供了理论和实验依据,并为临床肿瘤化疗方案的选择提供一种新的思路和策略,在未来的

临床治疗中将具有广阔的应用前景。

[参考文献]

- [1] 王 宣,钱宝华,查占山,等. 甲氨蝶呤与长春新碱双载红细胞的制备及其生物学特性[J]. 解放军医学杂志,2006,31:667-670.
 - [2] 王 宣,钱宝华,郭 峰,等. 脐血红细胞包载甲氨蝶呤的可行性研究[J]. 深圳中西医结合杂志,2005,15:31-33.
 - [3] 吴 江,钱宝华,王 卓,等. 长春新碱载药红细胞制备及其生物学特性研究[J]. 第二军医大学学报,2005,26:551-554.
 - [4] 董庆华,郑 树,徐荣臻,等. 黄芩苷元选择性诱导人白血病 K562 细胞凋亡[J]. 药学报,2003,38:817.
 - [5] 潘启超,胥 彬 主编. 肿瘤药理学与化学治疗学[M]. 郑州:河南医科大学出版社,2000:442.
 - [6] 廖子君,南克俊,韩 军 主编. 现代肿瘤治疗药物学[M]. 西安:世界图书出版公司,2002:48.
 - [7] 严忠勤,钟裕国,魏于全. MTX-右旋糖酐偶联物的合成及其对 K562 细胞的敏感性初探[J]. 华西药理学杂志,1999,14(5-6):302-305.
 - [8] 袁弥满,谢星辉. 脂质体 MTX 和 MTX 对人白血病细胞株 K562 的作用研究[J]. 临床,1994,10:108-110.
 - [9] 朱玉胜,吕 元,林果为,等. ELISA 法定量检测长春新碱诱导的 K562 及 K562/VCR 凋亡[J]. 上海医学,1999,22:122-123.
- [收稿日期] 2006-09-29 [修回日期] 2006-11-27
[本文编辑] 曹 静

• 读者 作者 编者 •

《第二军医大学学报》对一稿两投问题处理的声明

为维护学术研究的纯洁性和严肃性,同时也为了维护《第二军医大学学报》的声誉和广大读者的利益,现将本刊对一稿两投(包括一稿多投)问题的处理原则声明如下:

(1)本声明中的“一稿两投”主要指所涉及到的两篇论文尽管在文字的表达或讨论的阐述上可能存在某些不同之处,但其涉及的理论、主要实验数据和图表是相同的,或文中核心内容相同。所指文稿不包括重要会议的纪要、疾病诊断标准和防治指南、有关组织达成的共识性文件、新闻报道类文稿以及在一种刊物上发表过摘要(简报)或初步报道而将进一步研究的全文投向另一种期刊的文稿。上述各类文稿如作者要重复投稿,应向有关期刊编辑部作出说明。

(2)凡来稿在接到编辑部回执后满3个月未接到退稿通知,则表明该稿件仍在处理过程中,作者如欲转投他刊,应事先与本刊编辑部联系并提出理由。

(3)编辑部认为文稿有一稿两投嫌疑时,将认真收集有关资料并仔细核对后再通知作者,在作出处理决定前请作者就相关问题作出解释。编辑部与作者双方意见发生分歧时应由上级主管部门或有关权威机构进行最后仲裁。

(4)一稿两投一经证实,将择期在本刊刊出其作者单位和姓名以及撤消该论文的通告;2年内,《第二军医大学学报》将拒绝发表该文第一作者所撰写的一切文稿;并将就此事件向作者所在单位和该领域内的其他科技期刊进行通报。

《第二军医大学学报》编辑部