

学校编码: 10384
学号: 24520121153173

分类号____ 密级____
UDC____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

砷纳米药物在肝癌治疗中的作用研究

The role of arsenic nano-drug in the treatment of liver cancer

李辉

指导教师姓名: 王效民教授

专 业 名 称: 外科学

论文提交日期: 2015 年 4 月

论文答辩日期: 2015 年 5 月

学位授予日期 2015 年 6 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2015 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。
2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

目的: 三氧化二砷 (ATO) 是临床上能够有效治疗急性早幼粒细胞性白血病的药物。然而, 由于治疗剂量限制和药代动力学欠佳, 影响了它在抗肿瘤治疗中的运用。亲合体 (Affibody) 是一类新型独特的蛋白结合配体, 分子量小、亲和力强、稳定且可修饰, 比普通抗体具有更多优势。目前国内外尚无将亲合体用于肝癌靶向治疗的研究。为了更加有效地将 ATO 药物运输到肝癌细胞并产生更高的毒性, 我们前期已经合成了两种新型砷纳米药物: EGFR 靶向修饰的镍砷纳米药物 (Ni,As@SiO₂-Affibody)、锰砷纳米药物 (Mn,As@SiO₂)。本文在细胞、组织、小动物等水平上研究这两种纳米药物的细胞毒性、靶向效果和抑制肝癌生长等情况, 并探讨它们的主要作用机制, 为其进一步的临床转化研究奠定理论基础。

方法: 运用免疫组化检测肝癌组织标本中 EGFR 的表达情况; MTT 法测定纳米药物对肝癌细胞的半抑制浓度 (IC₅₀); 通过流式凋亡检测、细胞分化实验、划痕实验和 Transwell 实验检测纳米药物对肝癌细胞凋亡, 分化, 迁移和侵袭的影响; 动物活体实验评价新型纳米药物对肝癌的靶向和治疗效果; 组织切片免疫染色分析和血液生化分析, 研究新型纳米药物对各个正常组织和器官的损伤情况。

结果: 免疫组化实验显示肝癌标本中癌组织高表达 EGFR; MTT 细胞毒性试验证明了纳米药物对肝癌细胞 SMMC7721 的杀伤力在 ATO 的基础上进一步提高, Ni,As@SiO₂-Affibody 纳米药物的 IC₅₀ 为 2.0g/ml, Mn,As@SiO₂ 纳米药物的 IC₅₀ 为 2.8 g/ml。流式凋亡检测、细胞分化实验、划痕实验和侵袭实验显示其机制可能是靶向纳米药物增强了砷对癌细胞的凋亡、分化作用并且进一步抑制其迁移; 动物实验结果表明纳米药物对小鼠肝癌的生长有显著抑制作用; HE 染色结果和血液生化指标证明纳米药物对小鼠正常器官无损伤。纳米药物体内分布实验说明亲合体 Affibody 对肝癌组织具有特定靶向能力。更重要的是, 纳米药物 Mn,As@SiO₂ 在体内和体外均显著抑制肝癌细胞 SMCC7721 的侵袭和转移。

结论: 这新型砷纳米药物 Ni,As@SiO₂-Affibody、Mn,As@SiO₂ 对肝癌细胞具有明显的靶向效果,能够有效抑制肝癌的生长和转移,可以促进砷在肝癌化疗中的运用,并降低肝癌的复发和转移风险。

关键词: 纳米药物, 三氧化二砷, 亲合体, 肝癌治疗

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Background and objectives: Arsenic trioxide (ATO) is an effective clinical drug to treat acute promyelocytic leukemia. However, its application in oncotherapy is limited due to the dose-limiting toxicity and poor pharmacokinetics. Affibody is a special protein binding ligands and possesses many advantages, such as small molecular weight, strong affinity, special modification sites, and high stability, over ordinary antibody. So far, there is no report about Affibody applied to liver cancer targeted therapy. To improve the efficiency of ATO delivered into cancer cells and exhibit much higher cytotoxicity to liver cancer cells than conventional ATO. We have already synthesized two new multi-functional Arsenic nano-drugs, Ni,As@SiO₂-Affibody and Mn,As@SiO₂. In this article, we studied the cell toxicity, targeting therapeutic effect and the ability of inhibiting the growth of liver cancer of Arsenic nano-drugs at the level of cell, tissue and animal and discussed their main mechanism for the further clinical translational research.

Experimental methods: The immunohistochemistry was used to investigate the expression of EGFR in liver cancer tissue samples; The MTT assay was used to test the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of nano-drugs acting on liver cancer cells. We analyzed the effects of nano-drugs on the apoptosis, differentiation, migration and invasion of liver cancer cells; Animal experiments were used to evaluate the effects of nano-drugs on targeted and therapeutic effect. Biopsy immune staining analysis and blood biochemical analysis were applied to study the effects of nano-drugs on the damage of normal tissues and organs.

Results: The results of immunohistochemistry demonstrated the high expression of EGFR in cancerous tissues of the liver cancer specimens. The cell toxicity assays shows that the nano-drugs have much higher anticancer activity comparing with conventional ATO: the IC₅₀ of Ni,As@SiO₂-Affibody is 2.0μg/ml, the IC₅₀ of

Mn,As@SiO₂ is 2.8μg/ml. The mechanism may be that the nano-drugs can further induce the cell apoptosis, differentiation, and dramatically inhibit the migration of cancer cells investigated by apoptosis detection using flow cytometry, cell differentiation experiment, wound healing test and invasion experiment respectively. Moreover, the nano-drugs significantly potentiated the therapeutic efficacy effects of ATO in vivo by inhibiting the growth of liver tumor in an H22 tumor mice model. HE staining results and biochemistry indices also showed that this targeting nano-drug have no damage to the normal organs. The distributional experiments of nano-drugs in vivo illustrated that Affibody has the specifically targeted ability to liver cancer. More important, Mn,As@SiO₂ can significantly inhibit the invasion and metastasis of SMCC7721 cells in vitro and vivo.

Conclusions: The smart multifunctional Arsenic nano-drugs, Ni,As@SiO₂-Affibody and Mn,As@SiO₂, have the distinct targeting effects on liver cancer and strongly inhibited the growth and metastasis of liver cancer. These results indicated that intelligent nanoparticulate systems may promote the applications of ATO in liver cancer chemotherapy with low risk of recurrence and metastasis of liver cancer.

Keywords: Nanomedicine Arsenic trioxide Affibody Liver cancer therapy

摘 要.....	I
ABSTRACT.....	III
第一章 前言	1
1.1 肝癌的治疗现状.....	1
1.2 三氧化二砷.....	1
1.3 纳米载体	2
1.4 肝癌靶向分子	3
1.5 EGFR 亲合体 (AFFIBODY)	5
1.6 本文研究的目的和内容.....	7
第二章 材料与方法	9
2.1 实验材料	9
2.2 实验方法	14
第三章 结果与分析	22
3.1 肝癌组织中 EGFR 高表达	22
3.2 靶向镍砷纳米药物提高了对 SMMC7721 的细胞毒性.....	23
3.3 靶向镍砷纳米药物促进肝癌细胞分化和抑制其迁移侵袭能力	24
3.4 靶向镍砷纳米药物促进肝癌细胞凋亡	26
3.5 靶向镍砷纳米药物有效抑制小鼠肝癌生长	27
3.6 靶向镍砷纳米药物靶向性分析	29
3.7 靶向镍砷纳米药物毒性分析.....	30

3.8 锰砷纳米药物提高了对 SMMC7721 的细胞毒性.....	32
3.9 锰砷纳米药物抑制其迁移侵袭能力	33
3.10 锰砷纳米药物有效抑制小鼠肝癌生长	34
3.11 锰砷纳米药物抑制肝癌的转移.....	37
3.12 锰砷纳米药物通过杀伤血液中的肿瘤细胞抑制肝癌的转移	39
第四章 讨论	40
参考文献	43
缩略词表	51
致谢.....	52
硕士生期间发表的学术论文和申请的专利	53

第一章 前言

1.1 肝癌的治疗现状

肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一，发病率高，并且预后差^[1, 2]。治疗的首选方法为手术切除^[3]，但只有约 10% 的患者能够进行手术治疗。大部分患者就诊时常伴有癌细胞局部扩散和远处转移，缺少手术指征，疗效往往较差，因此药物治疗对肝癌仍是不可或缺的。在过去的半个多世纪里，化疗一直是非常重要的并且有效的治疗癌症的手段^[4]，目前研究中的肝癌治疗药物众多，临床应用于肝癌治疗的药物也较多，但大多数药物的疗效都难尽人意，其对目标的选择性不高，副作用大，在杀伤肿瘤细胞的同时，也会对体内其他正常组织和细胞造成损害，患者多不能耐受其严重的毒副作用，而且易产生多药耐药性^[5]。与此同时，目前大多数的化学治疗药物，如阿霉素^[6]和紫杉醇^[7]，虽然可以有效地杀伤原位肿瘤细胞，但是这些药物对于转移的肿瘤细胞和具有转移潜能的细胞的有效率很低。

1.2 三氧化二砷

三氧化二砷（ATO, As₂O₃）是中药砒霜的主要有效成分，其静脉滴注可有效治疗急性早幼粒细胞性白血病（APL），并可诱导 APL 细胞凋亡^[8]。ATO 在临床上用于治疗急性早幼粒细胞性白血病已经有几十年的历史^[9]，ATO 也是经过食品和药物管理局（Food and Drug Administration，FDA）批准的用于治疗急性早幼粒细胞性白血病的一线药物^[10]，治疗效果甚至可以达到完全缓解的程度。同时 ATO 通过诱导细胞凋亡^[11, 12]对不同类型的癌细胞都有很高的毒性^[13-17]，包括乳腺癌细胞^[18]，肝癌细胞^[19, 20]，前列腺癌细胞，肾癌，卵巢癌细胞和膀胱癌细胞^[21, 22]。ATO 还可以促进癌细胞的分化，抑制癌细胞的迁移和减少存活癌细胞的浸润^[11]。在化疗的过程中，ATO 这些独特的功能可以降低实体瘤存活癌细胞的恶性程度和转移的风险。As₂O₃ 对肝癌的抗肿瘤机制尚不明确，一般认为其主要作用途径包括：诱导肝癌细胞凋亡；影响癌细胞免疫功能；促癌细胞分化；抑制肿瘤转移；抑制肿瘤新生血管的生成；与化疗药联用起增效作用。相对于传统的抗癌药物（阿霉素和紫杉醇），ATO 在达到更好的治疗效果的同时，也更大程度地减

少了癌症复发和转移的风险。但是 ATO 在水溶液中的主要形式是亚砷酸 ($\text{As}(\text{OH})_3$)，这种形态会导致很低的生物利用度和不良的副反应，例如皮肤过敏和肝脏功能的损伤^[23]，这些副作用限制了 ATO 在实体瘤治疗中的运用。

1.3 纳米载体

有报道显示用脂质体包裹无机 ATO 可以克服这些不足^[24, 25]，由于 As_2O_3 的水溶性较低，Lee 等合成了具有 pH 响应的镍砷复合物 $\text{Ni}(\text{HAsO}_3)$ ，并其表面包裹脂质体或聚合物载体。这些纳米药物在 pH 值较低的环境下， $\text{Ni}(\text{HAsO}_3)$ 中的 As^{3+} 可被解离并释放到载体外，但实验结果反应这些载体包裹的纳米药物对 HeLa 细胞毒性没有常规的 As_2O_3 强，这可能是由于纳米药物表层的载体过于紧密，致使 As^{3+} 未能被完全释放出，进而降低了药效^[26]。同时脂质体与化学成分是不相容的，并且可能导致不稳定的装载和很低的抗癌效果。所以，我们急需一个可以提高 ATO 抗癌效率的载体。

为了有效的转运和增强抗癌效果，同时考虑到 ATO 的无机本质特性，也许无机材料才是 ATO 最合适的载体。与传统的药物载体如脂质体、聚合物等相比，无机载体具有以下优势：单分散性好，物理稳定性好，比表面积大，易于修饰，粒径及形态控制简单，具有的独特的光学、磁学、电学或物理学性能，这些特征使其在药物输送领域具有广阔的应用前景^[27]。最近，很多的无机材料，如金纳米材料^[28-30]，硅纳米材料^[31-34]，磁性纳米材料^[35-38]，量子点和二氧化硅等^[39-43] 都被运用到生物医学领域，尤其是药物运输领域^[44, 45]。这些成功的无机纳米材料都展现了很高的稳定性和生物生物相容性，较好的抗癌药物药物代谢动力学和生物分布，以及可控的药物释放功能^[46-48]。纳米颗粒载体的优势还在于它们可以提高药物的生物有效利用率，例如，小尺寸的纳米载体(10~100 nm)可以通过内吞作用和通透性增强和停滞 (enhanced permeability and retention, EPR) 效应帮助药物在肿瘤细胞内聚集^[49-52]。由于肿瘤微环境及胞内溶酶体的 pH 值较低^[53, 54]，经过设计的并且具有环境响应的纳米载体可以控制药物在靶向位点的释放^[55]，从而达到提高疗效的效果^[56]。因此通过酸响应的化学键构建的纳米药物越来越引人关注^[57-59]。另外，靶向分子的存在可以增加药物载体和特定肿瘤细胞的特异性结合，从而通过受体介导的内吞作用增加细胞的药物吸收^[60]。这些优势使得

纳米药物可以通过增加药物生物利用度和降低不良的药物副作用来提高药物的治疗效果。

纳米多孔二氧化硅材料由于其拥有良好的生物相容性、可修饰的表面、较大的比表面积、较高的孔隙率、可调节的孔洞大小及较好的稳定性,其作为药物载体的相关研究成为近几年的热点^[61-65]。例如 Lee 等利用多孔二氧化硅纳米颗粒 (mesoporous silica nanoparticles, MSN) 作为载体连接抗癌药物阿霉素 DOX, 发现其对 HepG2 细胞具有很高的杀伤力^[66]。中空介孔二氧化硅(hollow mesoporous silica, HMS)球是一种重要的介孔结构材料, 由于其独特的本质特征, 如无机成分, 高稳定性, 良好的生物相容性, 可调控的尺寸大小和容易靶向修饰的表面结构^[67, 68], 使得它在物质扩散和运输方面更具优势。中空介孔二氧化硅纳米材料 (Hollow porous silica nanoparticles, HSNs) 的中空结构允许其内部区域携带药物分子, 而外部结构可以用靶向分子修饰。这种独特的特性使其非常适用于药物的缓释传递, 并且可以有效地增加药物的装载量, 保护药物不受酶和环境的降解, 同时保证其可以被进一步地靶向修饰^[69, 70]。经过表面修饰的纳米药物可以降低蛋白的吸收和增加纳米药物在活体内的循环时间。这些表面修饰可以依靠提高 EPR 效应^[71-73], 提升抗肿瘤药物杀伤肿瘤的效果。因此, 中空介孔二氧化硅纳米材料 (Hollow porous silica nanoparticles, HSNs) 正在成为一个有效输送 ATO 的纳米材料。

1.4 肝癌靶向分子

纳米技术在肝癌的靶向治疗中的运用也为肝癌的有效治疗带来了新的希望。特别是利用纳米颗粒本身的多功能性, 将其用于肝癌的靶向治疗, 可有效提高药物的生物利用率和疗效, 在杀死癌细胞的同时, 减轻或避免对正常组织的毒副作用^[1]。纳米药物对于肝癌的靶向治疗主要有两种形式: 被动靶向和主动靶向。被动靶向是指通过对纳米粒子的理化性质(大小、形状、孔洞大小和表面电荷等)进行控制和修饰, 可调控其在体内的分布和药物释放特性进而达到靶向的目的。例如, 大小在 10~100 nm 的纳米粒子可通过肿瘤血管壁的 EPR 效应聚集在肿瘤组织部位^[47, 74]。目前已有很多研究是运用纳米载体的被动靶向实现肝癌治疗效果的提高^[75-77]。如南京大学 Liu Baorui 等制备了装载有 docetaxel 的 mPEG-PCL 纳

米药物 (DOC-NPs), 并将其通过静脉注射到 H22 肿瘤模型小鼠体内, 结果显示 DOC-NPs 不但进入了肿瘤血管中, 还到达了肿瘤组织内部, 显示出很好的抑癌效果。但是, 运用被动靶向实现肝癌的靶向治疗目前仍受到很多因素的局限, 如肝脏特殊的生理屏障使得纳米药物不能有效扩散; 缺少对药物的控释能力, 易引起多药耐药反应^[27]。因此, 需对纳米粒子进行表面修饰, 提高靶部位药物浓度, 降低药物对正常组织的毒性和副作用, 实现主动靶向作用。

纳米粒子的主动靶向是指将配体或抗体等特异性的靶向分子偶联至纳米粒子表面, 使其定向分布到靶组织。由于纳米颗粒比表面积高, 因此很容易进行表面功能化修饰, 修饰特定的靶向分子, 实现纳米药物的主动运输。纳米粒子对肝癌的主动靶向途径有: (1) 受体介导的靶向途径, 如去唾液酸糖蛋白受体介导系统和叶酸受体介导系统; (2) 免疫分子介导的靶向途径, 即通过抗原抗体结合的特异性相互作用, 实现药物的靶向传递, 如抗体介导的靶向药物; (3) 磁靶向途径; (4) pH 响应途径; (5) 基因介导靶向途径等。

目前已有的研究中用于纳米颗粒主动靶向肝癌细胞的受体有: 转铁蛋白受体 (transferrin receptors, TfRs)^[78, 79]、叶酸受体 (folate receptors, FRs)、去唾液酸糖蛋白受体 (asialoglycoprotein receptor, ASGPR) 等。由于癌细胞代谢增强, TfRs 在多种肿瘤细胞表面高表达, 如肝癌、胰腺癌、肺癌、结肠癌、膀胱癌等^[80, 81]。在纳米粒子表面偶联转铁蛋白 (Transferrin, Tf), 可通过受体介导的细胞内吞作用实现纳米粒子在肿瘤部位的靶向运输。如 Wei 等用 lactoferrin (Lf, Tf 的类似物) 作为靶向分子提高了 PEGylated 脂质体对肝癌细胞的靶向能力^[78]。Krishna 等则以 apotransferrin 作为靶向分子实现药物在肿瘤组织的特定运输, 而对心、肾、肝脏正常部位等组织毒性较小^[79]。叶酸受体在卵巢癌、肾和肝癌中大量表达^[82], 2008 年 Hong 等合成了一种表面连接叶酸磁性纳米胶束: Folate-SPIO-DOX-Micelles^[83], 体外结果显示这种纳米颗粒对肝癌细胞 Bel 7402 具有很好的靶向能力且有效抑制了肝癌细胞的生长。

肝癌细胞膜上高表达 ASGPR^[84], 药物或载体上面用于修饰的配体与 ASGPR 具有很强的亲合力, 即使连接有纳米颗粒, 细胞也能通过内吞作用迅速将这些纳米粒子吞入胞内^[85, 86]。目前已有较多的研究利用半乳糖作为靶向分子用于肝癌的靶向治疗研究^[77, 86-88]。Medina 等将 N-acetylgalactosamine (NAcGal) 连接在

poly(amidoamine) (PAMAM-NH₂) dendrimers 表面, 实现其对肝癌细胞的特定靶向运输^[88]。将半乳糖连接在包裹有米托蒽酮的脂质体上也可实现药物在小鼠原位 Huh-7 肝癌模型上的肿瘤靶向输送^[86]。这些结果均显示半乳糖是一个很好的肝癌靶向配体, 它具有很强的特异结合力和胞内吸收力。

免疫分子导向的纳米药物是将抗体通过共价交联或吸附到纳米药物载体(如脂质体、毫微粒、微球、磁性载体等), 这种抗体可与癌细胞特异性结合, 避免其对正常组织毒性, 选择性发挥抗肿瘤作用。C225 抗体是可特异性结合 EGFR 抗体的 Fc 部分的糖基化残基, Raof 等利用它连接金纳米颗粒^[89], 可实现金纳米颗粒在 SNU449 肝癌细胞中的靶向运输。磁性纳米粒肝靶向治疗也是近年来主动靶向的研究热点之一。磁性纳米颗粒可在外界磁场的导向下, 将抗癌药物输送到肝癌细胞附近, 提高药物的生物利用率, 增强疗效; 同时可利用 MRI 对肿瘤部位进行实时成像诊断, 评价其疗效^[90]。Sun 等用细菌微磁体作为药物载体装载阿霉素分子 (DOX), 实验证明在外界磁场的引导下, 其可有效聚集到肿瘤部位, 抑制 H22 肿瘤的生长^[91]。由于肿瘤微环境及胞内容酶体的 pH 值较低^[92, 93], 利用 pH 响应的纳米颗粒可以进一步将药物释放在特定肿瘤部位, 在正常生理环境中释放药物较少, 实现可控释药并提高药物疗效^[94]。因此通过酸响应构建纳米药物越来越引人注目^[95-97]。Tian 等用壳聚糖聚乙二醇装载 DOX, 这种纳米药物在 pH 5.8 的环境中释放的药物比在 pH 7.4 的环境中多, 这可能是由于 DOX 在酸性环境中水溶性较好且壳聚糖对酸敏感^[4]。但目前已报道的用于药物运输的智能纳米载体都很复杂, 使得药物的生物可利用率不高, 缺少实用性^[98-101]。

1.5 EGFR 亲合体 (Affibody)

分子靶向治疗主要是以肿瘤细胞中过度表达的某些标志性分子为靶标, 针对性地阻断和干预受该标志性分子调控或密切相关的信号通路, 从而达到抑制肿瘤生长、转移并减少对正常组织损伤的效果^[102, 103]。肿瘤分子靶向治疗具有较好的分子选择性并能够高效杀死癌症细胞, 分子靶向药物酪氨酸激酶抑制剂索拉非尼的出现开创了肿瘤治疗新领域, 也使得分子靶向治疗成为当今肿瘤治疗的热点之一。有文献报道, 在动物移植瘤模型中, 术后服用分子靶向药物酪氨酸激酶抑制剂索拉非尼可以抑制术后肝癌的复发和肝癌转移^[104], 索拉菲尼还可以通过阻断

STAT3 来抑制肝癌的生长和转移^[105]。肝癌的分子靶向药物主要包括表皮生长因子及其受体 (EGF/EGFR) 抑制剂、抗血管生成药物和多激酶抑制剂^[106, 107]。EGFR 属于 ErbB 家族中的酪氨酸激酶受体, 与肿瘤增殖、血管生成、肿瘤转移和抗凋亡密切相关。Thomas 等应用 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂药物埃罗替尼治疗晚期肝癌患者, 结果证实了埃罗替尼对肝癌患者治疗的有效性^[106]。肝癌中 EGFR 高表达, 与癌组织的形成、发生和发展有密切关系, 因此 EGFR 有望成为肝癌治疗的靶点之一。

亲合体 (Affibody) 是通过定向分子进化技术筛选获得的一类独特的蛋白结合配体, 其作用与抗体相似, 但亲合体却拥有比抗体更加卓越的性质: 亲合体的结合位点与抗体相似, 但亲和力更强 (图 1.1); 分子量小, 不易在体内诱发免疫应答; 组织穿透性好; 容易合成, 生产成本低; 性质十分稳定; 具有比较特定的修饰位点。现已有文献报道利用 Z_{HER2} 亲合体作为 HER2 高表达的肿瘤疾病 (如卵巢癌、宫颈癌、乳腺癌等) 的特定靶向配体并开展了较多的研究, 探索其各种潜在的应用, 其中包括肿瘤靶向成像和靶向治疗^[108, 109]。厦门大学高锦豪团队将 Z_{HER2:342} 亲合体与磁性氧化铁纳米颗粒和量子点分别进行连接, 在卵巢癌中实现了很好的特定靶向能力^[110]; Miao 等利用 EGFR 亲合体 Affibody 与 ⁶⁴Cu 相偶联制成 PET 造影剂, 发现其在人皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞株中具有很强的对比增强作用^[111]; Tolmachev 等发现 Affibody 对高表达表皮生长因子受体 EGFR 的恶性肿瘤具有很高的亲和力^[112]; 肝癌细胞中高表达 EGFR, 其与肝癌的形成、发生和发展有非常密切关系。EGFR 亲合体可以与肝癌细胞表面高表达的 EGFR 特异性结合, 将靶向抗癌药物输送到肿瘤细胞, 快速生长的肿瘤细胞通过胞吞作用将纳米药物摄入胞内并进入溶酶体, 由于溶酶体的 pH 值偏低, 纳米药物中的有效成分可以在酸性环境中解离出来并缓慢释放到细胞质或细胞核中, 从而发挥抗癌作用。但目前国内外尚无将 EGFR 亲合体用于肝癌靶向治疗的研究。

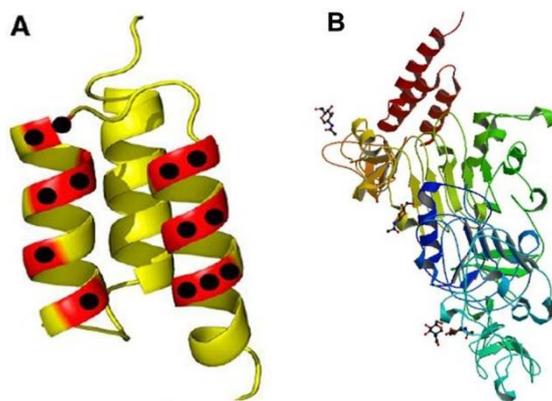


图 1.1 Affibody 特异性识别细胞表面受体^[111, 113]。 A: Affibody 的螺旋立体结构, 黑点及红色区域代表 Affibody 上与受体结合的氨基酸残基; B: Affibody 与细胞表面受体特异性结合示意图。

1.6 本文研究的目的和内容

本研究深入探讨了 $\text{Ni,As@SiO}_2\text{-Affibody}$ (图 1.3)、 Mn,As@SiO_2 这两种新型砷纳米药物对肝癌的作用机制和靶向治疗效果。期望为其进一步的临床转化研究奠定理论基础。

MTT 细胞毒性试验证明了纳米药物提高了砷对肝癌细胞的毒性。靶向纳米药物 $\text{Ni,As@SiO}_2\text{-Affibody}$ 对肝癌细胞 SMMC7721 的杀伤力在 Ni,As@SiO_2 的基础上进一步提高, 其机制可能是靶向纳米药物增强了砷对癌细胞的凋亡、分化作用并且进一步抑制其迁移; 动物实验结果表明靶向纳米药物可以显著抑制了小鼠肝癌的生长, 其机制主要是通过诱导肝癌细胞凋亡和促进肝癌细胞坏死; HE 染色结果和血液生化指标证明了纳米药物对小鼠正常器官无明显损伤; 同时, 纳米药物体内分布实验说明亲合体 Affibody 对肝癌组织具有特定靶向能力。另一种砷纳米药物 Mn,As@SiO_2 经过了表面修饰, 可以增加纳米药物在活体内的循环时间, 提高 EPR 效应, 进而提升抗肿瘤药物的肿瘤杀伤力, 降低毒副作用。另外, 纳米药物 Mn,As@SiO_2 还可以在体内和体外有效抑制肝癌细胞 SMC7721 的侵袭和转移。

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.