



不同途径注射肿瘤RNA纳米脂质体疫苗对结肠癌生长的影响

卢光照, 张翮, 樊莉, 孙治国, 鲁莹

Effect of different injection approaches of tumor RNA nanoliposome vaccine on the growth of colon cancer

LU Guangzhao, ZHANG He, FAN Li, SUN Zhiguo, LU Ying

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.1006-0111.202108094>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

医用透明质酸钠凝胶对肿瘤生长和转移影响的实验研究

The effects of medical sodium hyaluronate gel on the tumor proliferation and metastasis

药学实践杂志. 2020, 38(2): 129-134 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.201911108

消癌平注射液联合紫杉醇对人卵巢癌SK-OV-3细胞增殖及裸鼠异位移植瘤生长的作用

Antitumor activity of Xiaoaiping injection combined with paclitaxel on ovarian cancer SK-OV-3 cells and nude mouse with ovarian cancer SK-OV-3 transplantation tumor

药学实践杂志. 2017, 35(6): 516-519,529 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.06.009

氟尿嘧啶对结直肠癌RKO细胞SHP2基因表达的影响

Effect of 5-FU on the expression of SHP2 gene in colorectal cancer cells RKO

药学实践杂志. 2017, 35(6): 512-515 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.06.008

缺失错配修复基因MLH1的结直肠癌HCT116细胞对氟尿嘧啶耐药机制的研究

The mechanism of 5-Fu-based drug resistance in DNA mismatch repair deficient colorectal cancer HCT-116 cells

药学实践杂志. 2017, 35(2): 121-125 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.02.006

肿瘤干细胞的治疗耐受机制研究进展

Advance in resistance mechanism of cancer stem cells therapy

药学实践杂志. 2017, 35(3): 193-196,247 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.03.001

增强紫杉醇对结直肠癌化疗疗效的研究进展

The research progress on the efficacy enhancement of paclitaxel in chemotherapy for colorectal cancer

药学实践杂志. 2020, 38(6): 501-505 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202007031



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

不同途径注射肿瘤 RNA 纳米脂质体疫苗对结肠癌生长的影响

卢光照, 张 翮, 樊 莉, 孙治国, 鲁 莹 (海军军医大学药理学系药剂学教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的 本研究旨在比较 CT26 肿瘤细胞 RNA 负载于纳米脂质体后, 使用不同途径注射所引起的生物体抗肿瘤生长的作用差异。方法 将提取的肿瘤 RNA 载入到纳米脂质体制成肿瘤 RNA 纳米脂质体疫苗, 然后进行脂质体疫苗表征。肿瘤 RNA 纳米脂质体疫苗粒径为 (120.0 ± 12.1) nm, 电位为 (3.39 ± 0.56) mV。最后在小鼠不同部位注射肿瘤 RNA 纳米脂质体疫苗, 检测分析不同部位注射对小鼠结肠癌移植瘤生长的影响。结果 通过肿瘤 RNA 纳米脂质体疫苗对移植瘤小鼠进行不同途径注射治疗, 结果显示, 相比皮下注射, 腹腔注射能够更加有效地增强生物体抗肿瘤免疫反应, 抑制移植瘤生长。最后, 比较小鼠重要脏器的 H&E 染色, 均未见脏器有明显的器质性病变。结论 通过腹腔注射肿瘤 RNA 纳米脂质体疫苗比皮下注射能够更加有效地增强机体抗肿瘤免疫反应。

[关键词] CT26 结肠癌细胞; 纳米脂质体; 疫苗; 肿瘤 RNA

[中图分类号] R965

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2021)06-0520-05

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202108094

Effect of different injection approaches of tumor RNA nanoliposome vaccine on the growth of colon cancer

LU Guangzhao, ZHANG He, FAN Li, SUN Zhiguo, LU Ying (Department of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To compare the differences in the anti-tumor growth effects of organisms with different injections of CT26 tumor cell RNA loaded into nanoliposomes. **Methods** The extracted tumor RNA was loaded into nanoliposomes to prepare tumor RNA nanoliposome vaccines, and the related properties of nanoliposome vaccines were investigated. The particle size of nanoliposome vaccines was (120.0 ± 12.1) nm and zeta potential was (3.39 ± 0.56) mV. Tumor RNA nanoliposome vaccines were injected into different parts of the mice to test and analyze the influence of different injections on the growth of colon cancer transplanted tumors in mice. **Results** Tumor RNA nanoliposome vaccines were used to inject tumor-transplanted mice in different ways. Compared with underarm injection, intraperitoneal injection enhanced the organism's anti-tumor immune response and inhibited the growth of transplanted tumors more effectively. The H&E staining of important organs in mice was compared and no obvious organic lesions were found in the organs. **Conclusion** Intraperitoneal injections of nanoliposome loaded with tumor RNA can enhance the body's anti-tumor immune response more effectively than underarm injections.

[Key words] CT26 colon cancer cells; nanoliposomes; vaccine; tumor RNA

肿瘤 RNA 是目前已知肿瘤疫苗的来源之一^[1-2]。先前的研究表明, 从 CT26 结肠癌细胞提取的肿瘤 RNA 可以通过增强机体抗肿瘤免疫来抑制肿瘤生长^[3], 但由于肿瘤 RNA 易降解、不稳定等特性, 需要载体对其包裹后实施注射, 从而发挥其抗肿瘤作用^[4]。研究证实, 纳米脂质体载体具有较强的稳定性, 可有效地包裹 RNA, 并在体内和体外递送核酸, 发挥核酸诱导或抑制细胞表达的作用^[5-7]。然

而, 机体不同部位对药物的吸收情况不同, 因此, 导致药物吸收转化的效果产生差异。为了比较不同部位注射对药物治疗效果的影响, 本研究从 CT26 结肠癌细胞中提取肿瘤 RNA, 并使用纳米脂质体对其进行包裹制备成纳米脂质体疫苗, 分析了不同部位注射肿瘤 RNA 纳米脂质体疫苗所产生的增强机体抗肿瘤反应的情况。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器

R205B 旋转蒸发器(上海申科科技有限公司); 610000-1EA 型薄膜挤出器(美国 Avanti 公司); 必

[基金项目] 国家自然科学基金(81773278, 30801441)

[作者简介] 卢光照, 硕士, 助教, 研究方向: 药剂学, Email: lu5510647@163.com

[通信作者] 鲁 莹, 教授, 博士生导师, 研究方向: 药剂学, Email: acuace@163.com

能信 Sonifier®450D 超声波粉碎仪(美国必能信公司); 马尔文粒径仪(英国马尔文仪器公司); 透射电子显微镜 JEM2100F(日本 JEOL 公司); 染色封片工作一体机(胶带)Prisma+ Film(日本樱花公司)。

1.1.2 主要试剂

(2,3-二油酰基-丙基)-三甲胺硫酸盐 ((N-1-(2, 3-dioleoyloxy) propyl)-N,N,N-trimethylammoniummethyl sulfate, DOTAP)(美国 Avanti Polar Lipids 公司); 二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇-羧基 (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(carboxy(polyethylene glycol)-2000) (sodium salt), DSPE-PEG(2000) Carboxylic Acid)(美国 Avanti 公司); 鱼精蛋白、小牛胸腺 DNA(美国 Sigma 公司); 胆固醇(上海麦克林生化科技有限公司); 氯仿(中国医药集团有限公司); DEPC 水(碧云天生物技术有限公司); TRIzol RNA 分离试剂(美国 Thermo 公司); CT26 小鼠结肠癌细胞系(中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库), SPF 级 BALB/c 雄性小鼠(上海吉辉实验动物饲养有限公司), 饲养于屏障系统中。

1.2 方法

1.2.1 薄膜水化法 (lipid-film method) 制备 DOTAP/Chol 纳米脂质体

首先取胆固醇、DOTAP 两种材料的氯仿溶液, 将二者以 1 : 1 (*m* : *m*) 的比例加入到 250 ml 的茄型瓶中, 随后再加入 4 ml 氯仿溶液。在真空、45 °C 及 100 r/min 条件下旋转蒸发 45 min, 再加入 3 ml DEPC 水, 在 45 °C 及 100 r/min 条件下旋转蒸发 45 min, 获得脂质体混悬液。先进行超声 20 min, 再先后通过聚碳酸酯膜(100、50 nm), 反复挤出各 20 次, 即得 DOTAP/Chol 纳米脂质体。

1.2.2 CT26 肿瘤细胞 RNA 提取

取长满培养皿的 CT26 细胞, 倒去培养基, 加入 3 ml 无菌 PBS 溶液, 并轻晃几下进行清洗, 然后按照 TRIzol™ Reagent 操作说明提取 RNA。提取完成后, 将核酸溶液用 NanoDrop 2000 测 *A* 值、浓度和纯度。将检测完成后的核酸溶液分装至 1.5 ml EP 管中, 随后放入液氮中保存。

1.2.3 肿瘤 RNA 纳米脂质体疫苗的制备

准备 DOTAP/Chol 脂质体疫苗 63 μl, 鱼精蛋白 12 μl(2 μg/μl) 和 DEPC 水 10 μl, 将上述材料混合, 于室温放置 10 min, 得到 DOTAP/Chol 脂质体和鱼精蛋白的混合物, 在 45 ~ 50 °C 的范围内水浴加热 1 ~ 2 min。准备肿瘤 RNA 45 μl(0.5 μg/μl), 小牛胸腺 DNA 1.2 μl(10 μg/μl) 和 DEPC 处理水 30 μl,

将以上材料混合, 并室温放置 10 min, 得到肿瘤 RNA 与小牛胸腺 DNA 的核酸聚合物, 将 DSPE-PEG(2000) Carboxylic Acid 3.2 μl(10 μg/μl) 加入到 RNA/DNA 聚合物中, 在 45 ~ 50 °C 的范围内水浴加热 1 ~ 2 min, 得到 RNA/DNA/PEG 复合物。将纳米脂质体/鱼精蛋白复合物加入到 RNA/DNA/PEG 复合物中, 常温放置 10 min。最后将混合物放入 55 °C 的环境中静置 10 min, 然后在常温环境中静置 10 min, 即可得肿瘤 RNA 纳米脂质体疫苗。

1.2.4 马尔文激光粒径仪检测

稀释肿瘤 RNA 纳米脂质体疫苗至适当浓度, 取 1 ml 进行粒径检测。选择干净的样品池, 取肿瘤 RNA 纳米脂质体疫苗溶液小心加入, 在加入的同时避免气泡产生。把样品池放入进样样品槽中, 然后进行粒径检测。对于脂质体放置稳定性试验, 将脂质体放置于 4 °C, 在第 1、3、5、7 天取样测量粒径。

1.2.5 透射电镜检测

将 10 μl 的脂质体疫苗溶液缓慢滴加在铜网上, 在室温下彻底风干。随后滴加 2% 磷钨酸溶液, 并使用滤纸吸干多余液体, 后在室温下彻底干燥。之后将检测铜网放置在透射电镜下进行观察。

1.2.6 荷瘤小鼠模型的建立、给药和分组

实验开始后, 取对数生长期的 CT26 细胞, 计数为 1×10^6 /ml, 在小鼠右侧背部近腋窝处接种, 每只小鼠皮下接种 CT26 细胞 100 μl(1×10^5 个/只), 构建小鼠结肠癌移植瘤模型。接种 1 周后按照实验方案接种相应脂质体疫苗溶液, 频率为每 7 天一次, 一共 3 次。其中, PBS 组(*n*=5)的小鼠进行常规饲养, 每只小鼠腹腔注射 200 μl 的 PBS 作为空白对照。肿瘤 RNA 纳米脂质体疫苗腹腔注射组(*n*=5)的小鼠进行常规饲养, 每只小鼠腹腔注射 200 μl 的肿瘤 RNA 纳米脂质体疫苗, 注射频率为每 7 天一次, 共注射 3 次; 肿瘤 RNA 纳米脂质体疫苗皮下注射组(*n*=5)的小鼠进行常规饲养, 每只小鼠左侧皮下注射 200 μl 的肿瘤 RNA 纳米脂质体疫苗, 频率为每 7 天一次, 共注射 3 次; 当肿瘤体积达到 2 000 mm³ 时处死小鼠, 并提取实验小鼠各项指标进行分析。

1.2.7 组织冰冻切片的制备

动物实验结束后, 将小鼠处死, 之后将移植瘤肿瘤团块完全剥离, 小心去除肿瘤周围的结缔组织和血管, 使用 PBS 浸泡清洗干净后, 使用干净滤纸将水吸干, 浸设置于 4% 多聚甲醛中以 4 °C 保持。同时, 将各组实验小鼠处死后, 将心、肝、脾、肺、

肾完整剥离,去除结缔组织和血管,使用PBS浸泡清洗干净后,使用干净滤纸将水吸干,浸没置于4%多聚甲醛中以4℃保持。将需要处理的组织块放入合适的耐液氮的冰冻小盒中,将冰冻小盒缓缓放入液氮中,使其彻底浸没在液氮中,浸没约20s左右,使组织块能够彻底冰冻成块。组织块冰冻成块后,取出冰冻块,快速使用已涂抹有冰冻包埋剂的塑料薄膜进行包封,然后将已经包封好的组织块和切片冻头放入冰箱进行保存备用,冰箱温度设置为-80℃。按照冰冻切片器操纵要求进行冰冻切片,切片厚度控制在20~30μm左右,然后将切片样品放入-20℃的冰箱进行保存。使用染色封片工作一体机(胶带)Prisma+ Film,按照操作说明进行染色及封片操作。使用数字切片扫描系统PRECICE 500进行图像采集分析。

1.2.8 统计学处理方法

所有数据均以($\bar{x} \pm s$)表示,统计分析软件使用GraphPad Prism Version 9 (GraphPad, La Jolla, CA,

USA),组间差异采用t检验, $P < 0.05$ 时表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肿瘤RNA纳米脂质体疫苗的表征

将从CT26细胞中提取的RNA使用NanoDrop 2000进行检测,OD260/OD280为2.04(图1A),OD260/OD230为1.96,符合RNA需达到OD260/OD280>2.0,1.8<OD260/OD230<2.2的要求,且浓度达到1762.1 ng/ml,满足后续实验需要。制备肿瘤RNA纳米脂质体疫苗,通过马尔文激光粒度测定仪对肿瘤RNA纳米脂质体疫苗进行了电位检测,结果显示其Zeta电位为(3.39±0.56)mV(图1B),可以降低脂质体疫苗的聚合从而增加其稳定性。通过透射电子显微镜检测发现,我们制备的肿瘤RNA纳米脂质体疫苗形态规则、呈球形、分布均匀,且粒径大小为(120.0±12.1)nm(图1C)。通过测量不同时间的脂质体疫苗的粒径大小,结果发现放

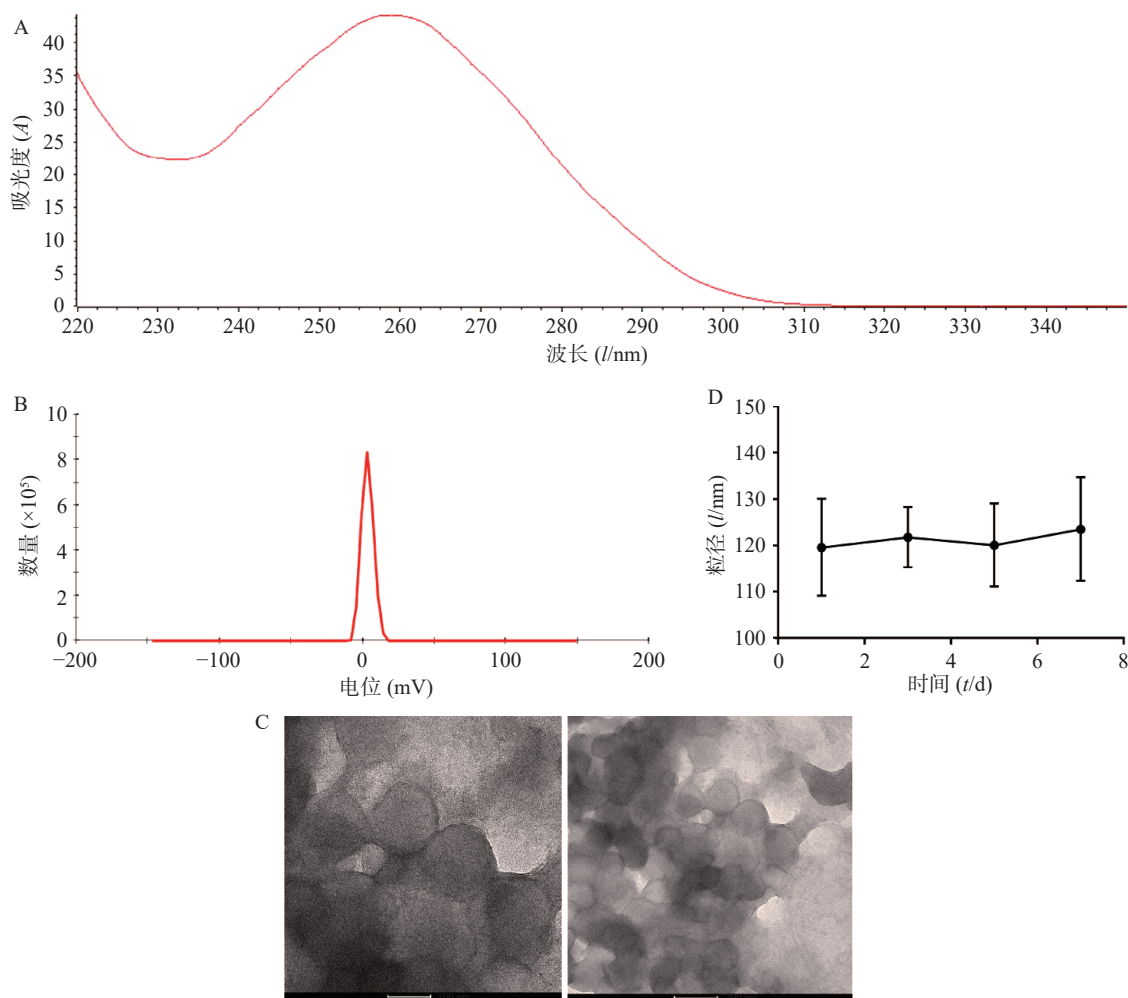


图1 肿瘤RNA纳米脂质体疫苗的表征

A. CT26 肿瘤 RNA 的测定; B. 肿瘤 RNA 纳米脂质体疫苗的电位测定; C. 肿瘤 RNA 纳米脂质体疫苗在不同放大倍数下的透射电镜图; D. 肿瘤 RNA 纳米脂质体疫苗在 4℃ 冰箱放置 1、3、5、7 d 的粒径变化情况 (n=5)

置于 4 °C 冰箱的脂质体在 7 d 内粒径基本维持在 120 nm, 脂质体放置稳定性良好(图 1D)。

2.2 肿瘤 RNA 纳米脂质体疫苗不同途径注射对小鼠结肠癌生长的影响

通过完整剥离各组织移植瘤, 我们可以直观看到, 腹腔注射组比 PBS 空白对照组、皮下注射组其肿瘤体积更小(图 2A)。同时, 对各组移植瘤进行

称重测量比较 ($P < 0.01$, 图 2B), 腹腔注射组比 PBS 组及皮下注射组平均移植瘤重量更小, 肿瘤生长抑制更加明显。由于结肠癌的大小与肿瘤微血管密度呈正相关性, 通过对各组移植瘤 H&E 染色(图 2C), 发现与 PBS 组相比, 腹腔注射组和皮下注射组在同一视野下肿瘤微血管密度更小, 其中, 腹腔注射组微血管密度最小。

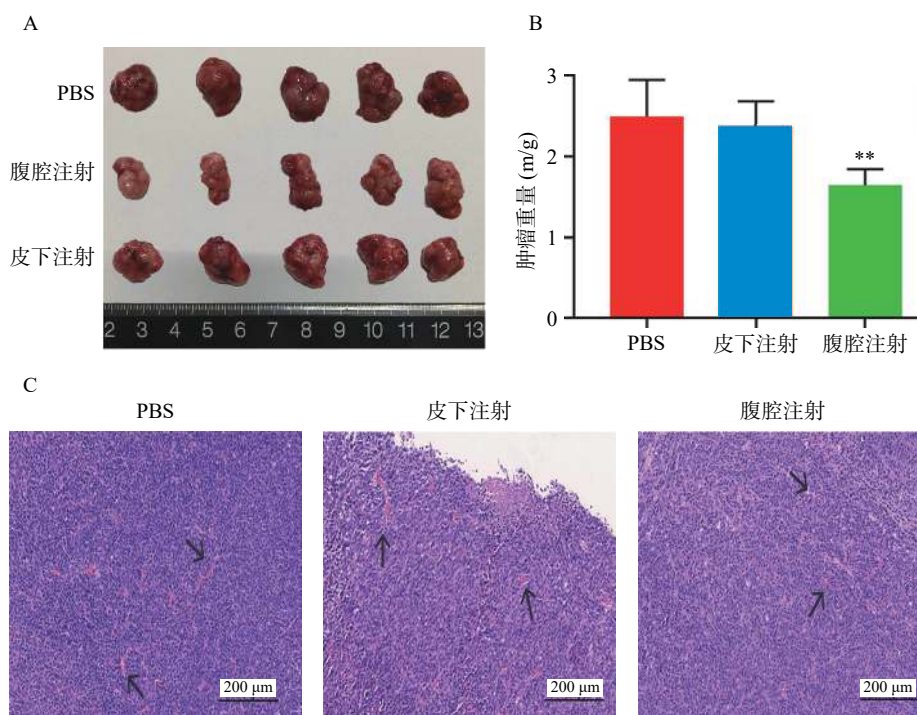


图 2 肿瘤 RNA 纳米脂质体疫苗不同途径注射对小鼠结肠癌生长的影响

A. 不同注射途径下完整剥离的小鼠结肠癌移植瘤结果 ($n=5$); B. 不同注射途径注射肿瘤 RNA 脂质体疫苗小鼠肿瘤重量结果 ($n=5$), ** $P < 0.05$, 与 PBS 组比较; C. 不同注射途径下肿瘤微血管的 H&E 染色 ($10\times$)

2.3 肿瘤 RNA 纳米脂质体疫苗不同部位注射对小鼠免疫情况影响

通过完整剥离各组脾脏, 我们发现腹腔注射组小鼠的脾脏大于 PBS 组和皮下注射组(图 3)。脾脏是机体重要的免疫器官, 在机体抗肿瘤免疫反应中, 其大小在一定程度上反应了机体抗肿瘤免疫反应应答强度和免疫水平。因此腹腔注射增强肿瘤

RNA 的机体抗肿瘤免疫反应的效果更加明显。

2.4 肿瘤 RNA 纳米脂质体疫苗对各脏器毒性影响的变化情况

实验结束后, 完整剥离小鼠的心、肝、脾、肺、肾等主要脏器并进行 H&E 染色(图 4), 结果显示, 各组的主要脏器中没有出现异常的组织学改变, 肿瘤 RNA 对机体毒性影响很小, 安全性较高。

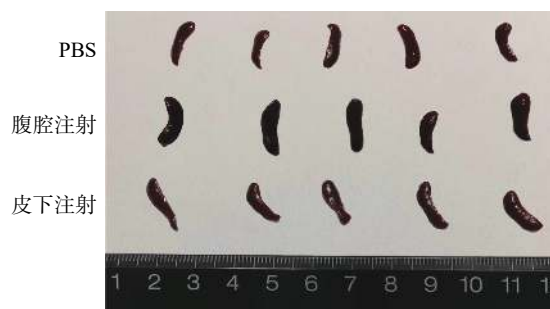


图 3 肿瘤 RNA 纳米脂质体疫苗不同部位注射对小鼠脾脏大小的影响 ($n=5$)

3 讨论

根据 2020 年全球统计的数据, 1930 万新增癌症病例中, 结肠直肠癌占 10.0%, 位居第三。在近 1000 万癌症死亡相关病例中, 结肠直肠癌占了 9.4%, 排在第二位^[8]。同时, 近 10 年间, 结直肠癌的发病率在我国呈直线上升趋势。因此, 我们迫切需要制订新的策略以治疗结直肠癌^[9]。研究表明, 肿瘤 RNA 携带有特异性肿瘤抗原, 其肿瘤抗原无需检查, 并且 RNA 序列进入宿主基因组内的危险性很小, 是

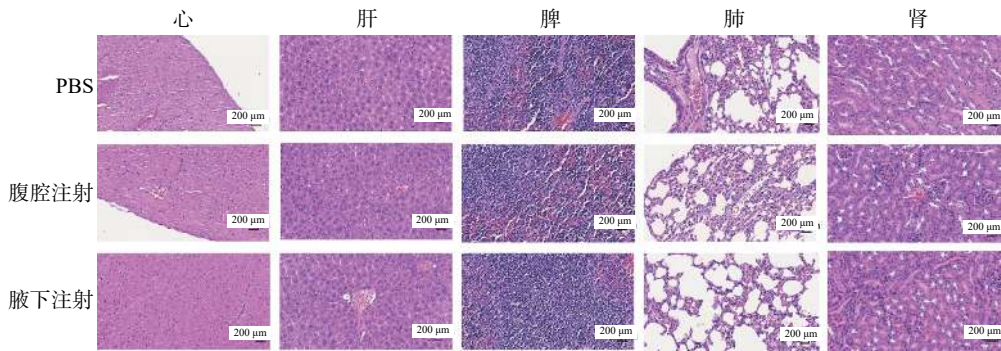


图4 肿瘤 RNA 纳米脂质体疫苗注射后小鼠各脏器的 H&E 染色 (10×)

优质的肿瘤疫苗来源。此外,有进一步的研究证明,从 CT26 结肠癌细胞提取的肿瘤 RNA 可通过增强生物体抗肿瘤免疫来抑制结肠癌生长^[1-3]。因此,不同部位注射负载肿瘤 RNA 的纳米脂质体疫苗的抗肿瘤效果值得进一步探讨,为其后续的一步应用提供理论基础。

纳米脂质体疫苗注射途径种类较多,如静脉注射、动脉注射、肌肉注射、皮下注射、腹腔注射等方式^[10-13],研究证明,通过不同部位注射药物,其生物利用度也不同。本研究对移植瘤小鼠进行了不同部位肿瘤 RNA 纳米脂质体疫苗注射,并分析比较不同部位注射所产生的影响,结果显示,腹腔注射可以抑制肿瘤生长,值得注意的是,腹腔注射后的肿瘤更小、肿瘤微血管密度最低^[14-15],因此,腹腔注射抑制肿瘤生长的效果更加显著。根据相关研究,如果药物注射部位周围血液循环及淋巴液循环丰富,那么药物吸收路径较短,较少受到各种影响因素的干扰,会表现出更好的治疗效果,而腹腔中血液循环和淋巴循环分布较皮下更为丰富,因此腹腔注射表现出更好的治疗效果^[16-18]。

此外,在本研究中,负载肿瘤 RNA 的纳米脂质体疫苗的形状为球形体,粒径大小为 (120.0 ± 12.1) nm, Zeta 电位为 (3.39 ± 0.36) mV。实验提示,肿瘤 RNA 纳米脂质体疫苗组能够引起机体免疫器官脾脏增大^[19],并和治疗效果呈正相关。同时在各治疗组及对照组的实验结束后,小鼠各个重要脏器未发生病理改变。所以腹腔注射是更适合肿瘤 RNA 纳米脂质体疫苗药物注射的途径,这与腹腔血液循环和淋巴循环更加丰富有关,使纳米级的肿瘤 RNA 纳米脂质体疫苗能够更好更高效地被机体自身吸收利用,进而能够更有效地增强机体自身抗肿瘤免疫反应,并更有力地抑制肿瘤生长及发展。

综上,本研究对同等大小移植瘤小鼠进行了不同部位负载肿瘤 RNA 的纳米脂质体疫苗注射的动物治疗实验。实验结果显示,相较于皮下注射,腹

腔注射能够更加有效地提高机体抗肿瘤免疫反应并抑制肿瘤生长。

【参考文献】

- [1] SAYOUR E J, MENDEZ-GOMEZ H R, MITCHELL D A. Cancer vaccine immunotherapy with RNA-loaded liposomes[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(10). DOI:10.3390/ijms19102890.
- [2] NAIR S K, MORSE M, BOCZKOWSKI D, et al. Induction of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in cancer patients by autologous tumor RNA-transfected dendritic cells[J]. *Ann Surg*, 2002, 235(4): 540-549.
- [3] NAKA T, IWAHASHI M, NAKAMURA M, et al. Tumor vaccine therapy against recrudescing tumor using dendritic cells simultaneously transfected with tumor RNA and granulocyte macrophage colony-stimulating factor RNA[J]. *Cancer Sci*, 2008, 99(2): 407-413.
- [4] MITCHELL D A, NAIR S K. RNA-transfected dendritic cells in cancer immunotherapy[J]. *J Clin Invest*, 2000, 106(9): 1065-1069.
- [5] POWELL D, CHANDRA S, DODSON K, et al. Aptamer-functionalized hybrid nanoparticle for the treatment of breast cancer[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2017, 114: 108-118.
- [6] LI S D, HUANG L. Targeted delivery of antisense oligodeoxynucleotide and small interference RNA into lung cancer cells[J]. *Mol Pharm*, 2006, 3(5): 579-588.
- [7] VEMANA H P, SARASWAT A, BHUTKAR S, et al. A novel gene therapy for neurodegenerative Lafora disease via *EPM2A*-loaded DLinDMA lipoplexes[J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2021, 16(13): 1081-1095.
- [8] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [9] XIE Y, SHI L, HE X, et al. Gastrointestinal cancers in China, the USA, and Europe[J]. *Gastroenterol Rep (Oxf)*, 2021, 9(2): 91-104.
- [10] MEI K C, LIAO Y P, JIANG J, et al. Liposomal delivery of mitoxantrone and a cholesteryl indoximod prodrug provides effective chemo-immunotherapy in multiple solid tumors[J]. *ACS Nano*, 2020, 14(10): 13343-13366.