



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106924312 B

(45) 授权公告日 2021.04.27

(21) 申请号 201710248242.6

(56) 对比文件

(22) 申请日 2017.04.17

CN 103479682 A, 2014.01.01

(65) 同一申请的已公布的文献号

审查员 梁永焯

申请公布号 CN 106924312 A

(43) 申请公布日 2017.07.07

(73) 专利权人 江苏省中医药研究院

地址 210028 江苏省南京市栖霞区红山路
十字街100号

(72) 发明人 曹萌 曹鹏 颜怀江

(74) 专利代理机构 江苏圣典律师事务所 32237

代理人 胡建华

(51) Int. Cl.

A61K 9/14 (2006.01)

A61K 36/258 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

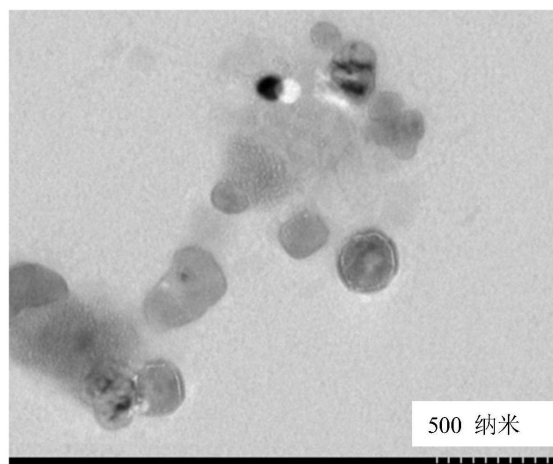
权利要求书1页 说明书7页 附图8页

(54) 发明名称

一种人参来源的纳米颗粒在制备治疗肿瘤的
药物中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种人参来源的纳米颗粒在制备治疗肿瘤的药物中的应用。所述人参来源的纳米颗粒具有膜结构,粒径范围为150~500nm,峰值粒径为280~350nm;所述人参来源的纳米颗粒通过多次离心、过滤除杂制备;所述人参来源的纳米颗粒能够有效地逆极化肿瘤微环境中的肿瘤相关巨噬细胞(Tumor-associated macrophages, TAM),使其由促进肿瘤侵袭和转移的M2型巨噬细胞向杀伤肿瘤的M1型巨噬细胞极化,从而改善肿瘤微环境,杀伤肿瘤。在开发用于制备天然抗肿瘤药物的药物方面有着良好的应用前景。



1. 一种人参来源的纳米颗粒在制备治疗肿瘤的药物中的应用;其中,所述的人参来源的纳米颗粒具有膜结构,峰值粒径为280-350nm ;其中,所述治疗肿瘤的方法为逆极化肿瘤相关的巨噬细胞;其中,所述逆极化肿瘤相关的巨噬细胞为下调M2型巨噬细胞的表面标志分子及上调M1型巨噬细胞的表面标志分子;

其中,所述人参来源的纳米颗粒通过如下步骤制备:

(1) 将新鲜、洗净的人参通过低速螺旋挤压榨出原浆;

(2) 将步骤(1)中所得原浆通过筛网过滤除杂,收集滤液;

(3) 将步骤(2)中得到的滤液依次进行低速、中速、高速和超速离心,每次离心后弃去沉淀,收集上清液进行下一次离心,其中最后一次离心,收集沉淀;

(4) 将步骤(3)中所述最后一次离心收集的沉淀用缓冲液重悬后超速离心1次,收集沉淀;所述沉淀用缓冲液再次重悬后高速离心,收集上清液;所述上清液通过除菌级滤膜即得;

步骤(3)中,所述低速离心的离心力为 $100\sim 500\times g$,离心时间为5~10分钟;所述中速离心的离心力为 $1000\sim 5000\times g$,离心时间为10~30分钟;所述高速离心的离心力为 $8000\sim 12000\times g$,离心时间为30~60分钟;所述超速离心的离心力为 $100000\sim 200000\times g$,离心时间为60~120分钟,所述低速、中速、高速和超速离心的次数为至少1次;

步骤(4)中,所述超速离心的离心力为 $100000\sim 200000\times g$,离心时间为60~120分钟;所述高速离心的离心力为 $8000\sim 12000\times g$,离心时间为30~60分钟;所述除菌级滤膜的孔径为 $0.45\mu m$ 。

2. 根据权利要求1所述应用,其特征在于,所述逆极化肿瘤相关的巨噬细胞的方法为:上调M1型巨噬细胞分泌的细胞因子,改变肿瘤微环境中M1/M2型巨噬细胞的比例,从而改善肿瘤微环境,杀伤肿瘤。

3. 根据权利要求1所述应用,其特征在于,所述M2型巨噬细胞相关的表面标志分子为白细胞分化抗原206;所述M1型巨噬细胞相关的表面标志分子为Toll样受体2/4、白细胞分化抗原80、白细胞分化抗原86、主要组织相容性复合体2中的一种或多种。

4. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,步骤(4)中,所述缓冲液为磷酸盐缓冲液,所述缓冲液的pH范围为pH7.2~7.4。

一种人参来源的纳米颗粒在制备治疗肿瘤的药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于抗肿瘤药物领域,具体涉及一种人参来源的纳米颗粒在制备治疗肿瘤的药物中的应用。

背景技术

[0002] 肿瘤微环境(tumor microenvironment)是指在肿瘤生长过程中,由肿瘤细胞、基质细胞(包括成纤维细胞、免疫和炎性细胞、脂肪细胞、胶质细胞、平滑肌细胞,以及一些血管内皮细胞等)和细胞外基质等共同构成的局部稳态环境,为肿瘤的发生、发展、侵袭、转移等提供了必要的物质基础。肿瘤微环境对肿瘤有着重要的支持和促进作用。如何能够干预、改善肿瘤微环境,是防止肿瘤发展、转移的核心问题。

[0003] 近年来研究表明,肿瘤微环境中生长的巨噬细胞——肿瘤相关巨噬细胞(Tumor-associated macrophages, TAM)是肿瘤微环境的重要组成成分,在肿瘤发展及转移的各个阶段中起关键作用。!

[0004] 巨噬细胞(macrophage, $M\phi$)是机体的重要的免疫细胞之一,在宿主的免疫防御及维护组织稳态方面发挥着重要作用。根据功能特征,巨噬细胞主要被活化为2个亚型:经典活化的M1型(classically activated macrophage)及替代活化的M2型(alternatively activated macrophage)。M1型受到Th1分泌的细胞因子,如干扰素- γ (interferon- γ , INF- γ)、细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)及Toll样受体(Toll-like receptor, TLR)的调控,其特征是可分泌包括IL-6、IL-12、IL-23及肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等在内的促炎性因子。此外, M1型巨噬细胞还高表达主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex) I类及II类分子进行有效地抗原提呈。因此, M1型巨噬细胞被认为是具有杀伤细菌及肿瘤细胞并可分泌多种促炎性细胞因子的细胞。而M2型巨噬细胞与M1型的作用截然相反,其被认识是一种具有促进肿瘤的生长、侵袭和转移作用的细胞。绝大多数的TAM都属于M2型巨噬细胞,是人和小鼠最主要的肿瘤浸润白细胞。在肿瘤早期侵袭、转移阶段,肿瘤细胞释放趋化因子招募巨噬细胞和其他炎性细胞到达肿瘤周围的基质区域,随后TAM可穿透基底膜,从而使肿瘤细胞逃脱基底膜的束缚到达周围正常组织基质,同时TAM和肿瘤细胞均可刺激血管生成,提高细胞的侵袭性和运动性^[11]。TAM还可以通过释放血管生成调节酶类,如基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase 2, MMP2)、MMP-9、MMP-12和,环氧合酶2(cyclooxygenase 2, COX2)等,促进血管生成,为肿瘤生长输送养分。此外, TAM还可释放一系列促进肿瘤细胞浸润和转移的细胞因子及生长因子,如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bEGF)等。

[0005] 基于TAM在肿瘤微环境中的重要作用,如何发挥巨噬细胞的异质性和可塑性,促使TAM向M1型极化,从而改善肿瘤微环境,可能成为肿瘤免疫治疗的重要靶点。

[0006] 人参是我国最重要的中药材之一,被誉为“百草之王”,有非常高的药用价值。人参所产生的纳米颗粒级微泡携带有多种人参的有效成分,可能是其发挥药效的重要途径之

一。基于人参开发有抗肿瘤功能的新型药物尚未得到有效的开发。

发明内容

[0007] 本发明要解决的技术问题是提供一种可量化生产的人参来源的纳米颗粒(英文名:Ginseng derived nano-particles,简称GDNPs),将之应用于制备治疗肿瘤的药物。

[0008] 为解决上述技术问题,本发明所采用的技术方案是:

[0009] 一种人参来源的纳米颗粒在制备治疗肿瘤的药物中的应用。

[0010] 所述治疗肿瘤的方法为逆极化肿瘤相关的巨噬细胞。

[0011] 所述逆极化肿瘤相关的巨噬细胞的方法为:下调M2型巨噬细胞的表面标志分子及上调M1型巨噬细胞的表面标志分子,上调M1型巨噬细胞分泌的细胞因子,改变肿瘤微环境中M1/M2型巨噬细胞的比例,从而改善肿瘤微环境,杀伤肿瘤。

[0012] 所述M2型巨噬细胞相关的表面标志分子为白细胞分化抗原206(CD206);所述M1型巨噬细胞相关的表面标志分子为Toll样受体2/4(TLR2/4)、白细胞分化抗原80(CD80)、白细胞分化抗原86(CD86)、主要组织复合体2(MHC-II)中的一种或多种;所述M2型巨噬细胞相关基因为精氨酸酶1(Arg-1)、白细胞分化抗原206又称巨噬细胞甘露糖受体(CD206)、白细胞介素10(IL-10)、类几丁质酶3样分子(CHI313)中的一种或多种;所述M1型巨噬细胞相关基因为白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞分化抗原80(CD80)、趋化因子9(CXCL9)、趋化因子3(CCL3)、诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)等中的一种或多种;所述M1型巨噬细胞相关的免疫活性细胞因子为肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)中的一种或多种。

[0013] 所述人参来源的纳米颗粒,具有膜结构,粒径范围为150-500nm,峰值粒径为280~350nm。

[0014] 所述人参来源的纳米颗粒通过如下步骤制备:

[0015] (1) 将新鲜、洗净的人参通过低速螺旋挤压榨出原浆;

[0016] (2) 将步骤(1)中所得原浆通过筛网过滤除杂,收集滤液;

[0017] (3) 将步骤(2)中得到的滤液依次进行低速、中速、高速和超速离心,每次离心后弃去沉淀,收集上清液进行下一次离心,其中最后一次离心,收集沉淀;

[0018] (4) 将步骤(3)中所述最后一次离心收集的沉淀用缓冲液重悬后超速离心1次,收集沉淀;所述沉淀用缓冲液再次重悬后高速离心,收集上清液;所述上清液通过除菌级滤膜即得人参来源的纳米颗粒。

[0019] 优选的,以上操作在4~25摄氏度环境中进行。

[0020] 步骤(1)中,所述低速螺旋挤压的转速为30~60转/分钟。

[0021] 步骤(2)中,所述筛网为200~2000目,优选为200~1000目。

[0022] 步骤(3)中,所述低速离心的离心力为100~500 $\times$ g,离心时间为5~10分钟;所述中速离心的离心力为1000~5000 $\times$ g,离心时间为10~30分钟;所述高速离心的离心力为8000~12000 $\times$ g,离心时间为30~60分钟;所述超速离心的离心力为100000~200000 $\times$ g,离心时间为60~120分钟,所述低速、中速、高速和超速离心的次数为至少1次。

[0023] 优选的,所述低速离心的离心力为200~500 $\times$ g;所述中速离心的离心力为2000~5000 $\times$ g;所述高速离心的离心力为100000~12000 $\times$ g;所述超速离心的离心力为100000~

120000×g。

[0024] 步骤(4)中,所述缓冲液为磷酸盐缓冲液,所述缓冲液的pH范围为pH7.2~7.4;所述超速离心的离心力为100000~200000×g,离心时间为60~120分钟;所述高速离心的离心力为8000~12000×g,离心时间为30~60分钟;所述除菌级滤膜的孔径为0.45μm。

[0025] 本发明所述的人参来源的纳米颗粒材料来源广泛,可以是人参、西洋参、三七、党参、太子参、丹参、玄参;本发明制备方法,具有易操作、耗时少等优点。本发明所述的人参来源的纳米颗粒材料制备方法参考申请号为2017100944577的专利中的方法制备。

[0026] 有益效果:本发明的人参来源的纳米颗粒在制备治疗肿瘤的药物中的应用能够有效地使肿瘤相关巨噬细胞从促进肿瘤生长的M2型向抗肿瘤的M1型极化,同时上调M1型相关的TLR2/4、CD80等多种表面活性分子,并分泌TNF-α、IL-6等细胞因子,从而改善肿瘤微环境,在开发用于制备天然抗肿瘤药物方面有着良好的应用前景。

附图说明

[0027] 图1为电镜观察GDNPs的形态;

[0028] 图2为马尔文粒径仪分析的人参来源的纳米颗粒的粒径大小及分布;

[0029] 图3为单核-巨噬细胞吞噬GDNPs;

[0030] 图4为GDNPs体外下调M2型巨噬细胞相关表面标志分子,同时上调M1型相关表面标志分子;

[0031] 图5为GDNPs体外下调M2型巨噬细胞相关基因的转录,同时上调M1型相关基因的转录;

[0032] 图6为GDNPs体外促使M2型巨噬细胞分泌TNF-α、IL-6等M1型细胞因子;

[0033] 图7为GDNPs治疗黑色素瘤在体实验示意图;

[0034] 图8为各组小鼠实验期间肿瘤生长曲线;

[0035] 图9为各组小鼠肿瘤最终体积;

[0036] 图10为各组小鼠肿瘤最终重量;

[0037] 图11为各组小鼠肿瘤最终大小;

[0038] 图12为各组小鼠肿瘤组织中巨噬细胞占淋巴细胞的比例;

[0039] 图13各组小鼠肿瘤组织中M1/M2型巨噬细胞数量的变化。

具体实施方式

[0040] 根据下述实施例,可以更好地理解本发明。然而,本领域的技术人员容易理解,实施例所描述的内容仅用于说明本发明,而不应当也不会限制权利要求书中所详细描述的本发明。

[0041] 实施例1:人参来源的纳米颗粒的制备

[0042] (1) 将新鲜人参用清水洗净,在20℃环境中通过低速螺旋挤压技术榨出原浆;

[0043] (2) 将榨出的原浆在20℃环境中经500目筛网过滤除杂,收集滤液;

[0044] (3) 将收集的滤液先以200×g,离心10分钟,弃沉淀,收集上清;再将上清液以2000×g,离心30分钟,弃沉淀,收集上清;再将上清液以10000×g,离心60分钟,弃沉淀,收集上清;最后将上清液以120000×g,离心60分钟,收集沉淀;

[0045] (4) 将沉淀用pH7.2的磷酸盐缓冲液重悬后,以 $120000\times g$,离心60分钟,收集沉淀;将沉淀再次用pH7.2的磷酸盐缓冲液重悬后,以 $10000\times g$,离心60分钟,收集上清液;最后通过孔径为 $0.45\mu m$ 的除菌级滤膜后即获得纳米级颗粒。保存于 $-20^{\circ}C\sim -80^{\circ}C$ 中。

[0046] 实施例2:电镜观察GDNP的形态

[0047] 将提取好的GDNP $120000\times g$,60分钟超速离心后使其沉淀并压缩紧密,弃上清,沉淀用2.5% (v/v) 戊二醛固定,送电镜室进行处理,上镜观察GDNP的形态。如图1所示:电镜下可见GDNP为具有膜结构的纳米颗粒,大小在150-500nm之间,证实有效募集了人来源的纳米级微体。

[0048] 实施例3:马尔文粒径仪分析的人参来源的纳米颗粒的粒径大小及分布

[0049] 将提取好的GDNP通过马尔文粒径仪进行粒径检测,如图2所示,GDNP的峰值均一性较好。

[0050] 实施例4:GDNP体外促进单核-巨噬细胞集落的形成以及增殖

[0051] 1.骨髓来源的单核-巨噬细胞 (Bone marrow derived macrophages,BMDM) 的获取

[0052] ①脱颈处死C57/BL6小鼠,酒精浸泡5分钟,固定小鼠后将小鼠后肢前部的皮毛剥置足部,钝性分离肌肉剪下大腿,放入盛有无菌PBS的培养皿中。

[0053] ②镊子夹住腿骨,用剪刀剔除其余肌肉,在关节处剪断腿骨。

[0054] ③用1mL注射器吸取培养皿中的PBS,将针头刺入骨髓腔,反复冲洗骨髓至骨髓变白,将骨髓冲洗液过滤筛网。

[0055] ④取小鼠骨髓,裂解红细胞,调整细胞浓度至 1×10^6 个/ml,培养基:DMEM (Gibco)+10%FBS (Gibco)+20ng/ml M-CSF (Peprotech)。

[0056] ⑤算第0天取骨髓,第3天,每皿添含20ng/ml M-CSF的完全培养基。

[0057] ⑥5天后,每皿添加20ng/ml M-CSF的完全培养基。

[0058] ⑦7天后,胰酶消化BMDM,加入6孔细胞培养板中,每孔 2×10^6 个细胞,加入1ml或2ml培养基。

[0059] 2.BMDM对GDNP的摄取

[0060] ①于前一天通过FITC标记的Anti-mouseF4/80antibody将BMDM染色,并加入带有爬片的培养皿中,使其贴壁生长。

[0061] ②将100ul GDNP用稀释液稀释至250ul。

[0062] ③将1ul PKH26加入250ul稀释液中,作为染料。

[0063] ④将稀释的GDNP加入到染料中,快速混合。

[0064] ⑤ $25^{\circ}C$ 孵育的2-5分钟,定时轻轻颠倒离心管保证在 $25^{\circ}C$ 充分混匀。

[0065] ⑥加入等量血清中止染色反应孵育1分钟。

[0066] ⑦ $120000\times g$,60分钟超速离心。

[0067] ⑧吸弃上清,将染色的GDNP用100ul PBS重悬。

[0068] ⑨以20ug/ml的浓度将GDNP加入培养的BMDM中,培养24小时。

[0069] ⑩取出爬片,激光共聚焦观察单核-巨噬细胞对GDNP的吞噬。

[0070] 如图3所示:F4/80是小鼠单核-巨噬细胞的特异性表面标志分子,通过FITC标记的Anti-mouseF4/80antibody使小鼠BMDM带有绿色荧光,而PKH26是一种红色的膜染料,能够与GDNP表面的膜结合。在激光共聚焦显微镜下,可以明显的观察到单核-巨噬细胞胞内出

现了多个红色颗粒,表明单核-巨噬细胞能够有效的吞噬GDNPs。

[0071] 实施例5:GDNPs体外下调M2型巨噬细胞表面标志分子,同时上调M1型相关表面标志分子

[0072] ①通过M-CSF (20ng/ml) 诱导获得C57/BL6小鼠的BMDM,添加IL-4 (20ng/ml) 和IL-13 (20ng/ml) 使其分化为M2型巨噬细胞。

[0073] ②加入GDNPs (20ug/ml) ,72小时后,吸去培养上清,PBS清洗一遍后胰酶消化细胞。

[0074] ③添加培养液终止消化,1200rpm离心收集巨噬细胞,Fc阻断剂封闭(室温,20分钟)。

[0075] ④分别加入anti-mouse CD206、CD80、CD86、TLR2、TLR4、MHC-II等单克隆抗体染色(室温,30分钟),PBS洗2次。流式细胞仪鉴定上述分子的表达情况。

[0076] 如图4所示:GDNPs能够显著的下调M2型巨噬细胞的表面标志分子CD206,同时上调M1型巨噬细胞的表面标志分子(CD80、CD86、TLR2、TLR4、MHC-II等)。从表面分子标志的结果证实GDNPs能够使M2型巨噬细胞向M1型极化。

[0077] 实施例6:GDNPs体外下调M2型巨噬细胞相关基因的转录,同时上调M1型相关基因的转录

[0078] 1.巨噬细胞总RNA的提取

[0079] ①实施例3中的部分细胞,加入1ml Trizol,吸入1.5ml EP管中,吹打至液体澄清无细胞团块,颠倒混匀10下,室温放置5分钟。

[0080] ②加入200ul氯仿,剧烈震荡15秒,进行RNA抽提,室温放置3分钟。

[0081] ③4℃,12000 RPM,15分钟离心。

[0082] ④吸取上层水相至新的1.5ml EP管中,加入等体积异丙醇,颠倒混匀,室温放置10分钟。

[0083] ⑤4℃,12000 RPM,10分钟离心。

[0084] ⑥弃上清,加入预冷的0.5ml的75%乙醇(DEPC水配)洗涤沉淀,混匀后,4℃,7500 RPM,5分钟离心。

[0085] ⑦弃上清,室温下干燥5-10分钟。

[0086] ⑧加入20-60ul去离子水溶解RNA,吹打混匀,置于56℃水浴锅中10分钟。

[0087] ⑨快速震荡离心后于酶标仪检测RNA浓度。

[0088] 2.cDNA的合成

[0089] ①根据Rever Tra Ace qPCR RT Kit说明书进行

[0090] ②根据RNA浓度调整,取1ng-5μg总RNA作为模板。反应体系如下:

	去离子水	至 to 20μl
	5×RT Buffer	4μl
	RT Enzyme Mix	1μl
[0091]	Primer Mix	1ul
	Template RNA	0.5pg-1μg
共		20μl

[0092] ③将以上加入无核酸酶的PCR管中,加入总RNA模板适量体积后,剩余加去离子水补足至20 μ l,所有操作均在冰上进行。

[0093] ④反应条件:42 $^{\circ}$ C,15分钟 $\rightarrow$ 85 $^{\circ}$ C,5秒 $\rightarrow$ 4 $^{\circ}$ C, ∞ ,反应后获得cDNA,-20 $^{\circ}$ C保存备用。

[0094] 3. 荧光定量PCR反应

[0095] ①以上述cDNA为模板,GAPDH为内参,参照SYBR Green Realtime PCR MasterMIX说明书操作测定M1/M2巨噬细胞相关基因IL-6、TNF- α 、CD80、CXCL9、CCL3、iNOS/Arg-1、CD206、IL-10、CHI313等的mRNA的表达。

[0096] ②根据Real-Time PCR试剂盒的说明配制反应液:

	SYBR Green qPCR Master Mix	10 μ l
[0097] 上游引物	0.8 μ l	
下游引物	0.8 μ l	
cDNA	2 μ l	
[0098] 蒸馏水	6.4 μ l	

共 20 μ l

[0099] ③反应条件:95 $^{\circ}$ C 30秒 $\rightarrow$ PCR循环(X40循环):95 $^{\circ}$ C,5秒;55 $^{\circ}$ C,10秒退火;72 $^{\circ}$ C,15秒延伸 $\rightarrow$ 制备熔解曲线统计分析

[0100] ④以GAPDH作为内参,反应完毕后确认Real-time PCR的扩增曲线和熔解曲线,检测各模板的Ct值,所有样品重复3次,用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算细胞中mRNA水平的相对表达量。

[0101] 如图5.所示,GDNPs能够降低M2型巨噬细胞相关基因的转录水平,同时上调M1型细胞相关基因的转录水平,从M1/M2相关基因的转录水平的结果证实GDNPs使M2型巨噬细胞向M1型极化。

[0102] 实施例7:GDNPs体外促使M2型巨噬细胞分泌TNF- α 、IL-6等细胞因子

[0103] 实施例3的培养上清中TNF- α 、IL-6检测(ELISA法)

[0104] ①按说明书要求稀释捕获抗体(anti-mouse TNF- α 或IL-6),以100 μ l/孔量包被于96孔板,4 $^{\circ}$ C过夜。

[0105] ②用PBST(含0.5%吐温的PBS)洗板3次,每次3分钟。之后用2%的羊血清封闭液封闭,37 $^{\circ}$ C,2小时。

[0106] ③PBST洗板3次。将培养上清样本及标准品稀释液按顺序加入封闭好的96孔板内,37 $^{\circ}$ C孵育1小时。

[0107] ④PBST洗板5次,加入HRP-antimouse-TNF- α 或IL-6(1:10000),37 $^{\circ}$ C孵育1小时。

[0108] ⑤PBST洗板5次,加入TMB显色液,37 $^{\circ}$ C孵育15分钟。

[0109] ⑥加入H₂SO₄终止液,450nm测定OD值。

[0110] ⑦根据OD值计算TNF- α 或IL-6的浓度。

[0111] 如图6.所示,GDNPs能够促使M2型巨噬细胞分泌M1型相关的细胞因子(TNF- α 和IL-6),从分泌的细胞因子角度证实GDNPs能够使M2型巨噬细胞向M1型极化。

[0112] 实施例8:GDNPs体内使肿瘤微环境中的M2型巨噬细胞极化为M1型,从而抑制肿瘤的生长

[0113] ①雄性C57/BL6小鼠,体重18-20克,购于扬州大学动物实验中心。适应性生长1周。

[0114] ②小鼠右侧腋下皮下接种小鼠黑色素瘤细胞-B16F10 (2.5×10^5 个/只),逐日观察。

[0115] ③肿瘤7天后,小鼠移植瘤大小平均值达到50-120mm³,将荷瘤小鼠随机分为3组:荷瘤模型组(腹腔注射PBS)、灌胃治疗组(GDNPs 150ug/只)、腹腔注射治疗组(GDNPs 100ug/只),治疗间隔时间为3天(图7)。

[0116] ④逐日观察各组小鼠生长状态,每2天测小鼠体重及肿瘤体积(肿瘤体积计算=长 $\times$ 宽²/2)

[0117] ⑤治疗11天后,测体重后眼眶采血,引颈处死小鼠,剥离肿瘤组织测量体积并称重,其余主要脏器分离后甲醛固定。

[0118] ⑥取部分小鼠肿瘤组织,胶原酶消化30分钟后研磨,过200目滤网获得肿瘤组织单细胞悬液,Fc阻断剂封闭(室温,20分钟)。

[0119] ⑦分别加入anti-mouse CD45、CD11b、CD206、CD80等单克隆抗体染色(室温,30分钟),PBS洗2次。流式细胞仪鉴定上述分子的表达情况。

[0120] 结果显示:GDNPs的灌胃治疗及腹腔注射治疗皆能抑制小鼠黑色素瘤的生长(图8~11);通过对各组小鼠肿瘤组织淋巴细胞比例的分析,发现GDNPs的灌胃治疗及腹腔注射治疗组小鼠的肿瘤组织中,巨噬细胞在淋巴细胞中的比例要显著高于荷瘤模型组(图12);同时,灌胃治疗及腹腔注射治疗组小鼠的肿瘤组织中M1/M2巨噬细胞的比例要显著高于(图13)。这些结果提示我们:GDNPs在体内能够有效地将肿瘤组织中的M2型巨噬细胞向M1型极化,改善肿瘤微环境,抑制肿瘤的生长。

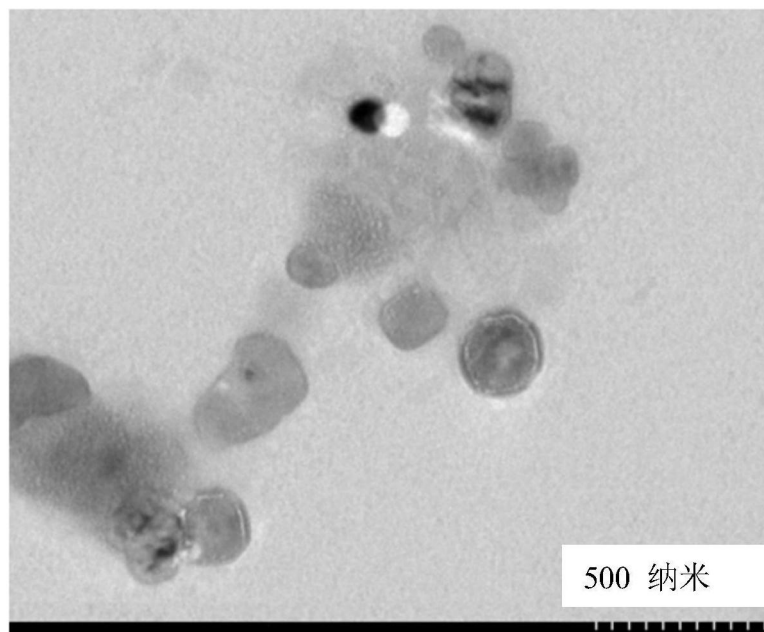


图1

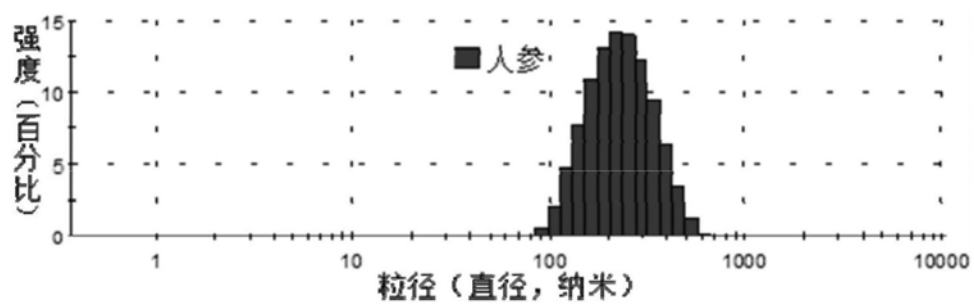


图2

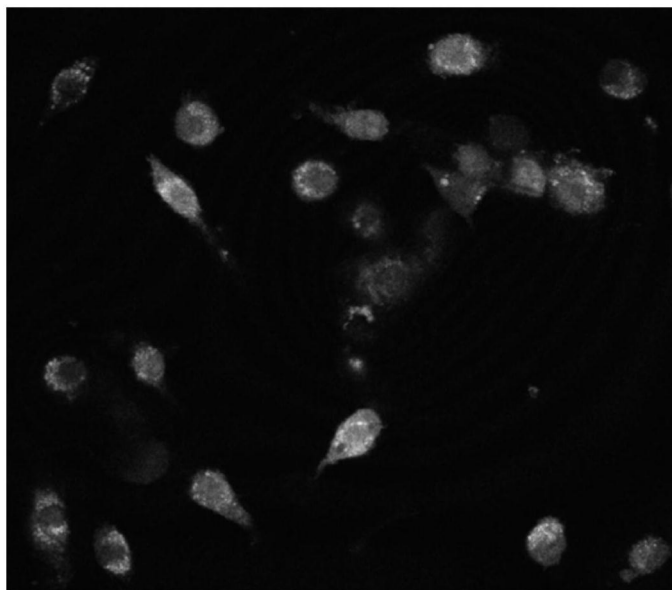


图3

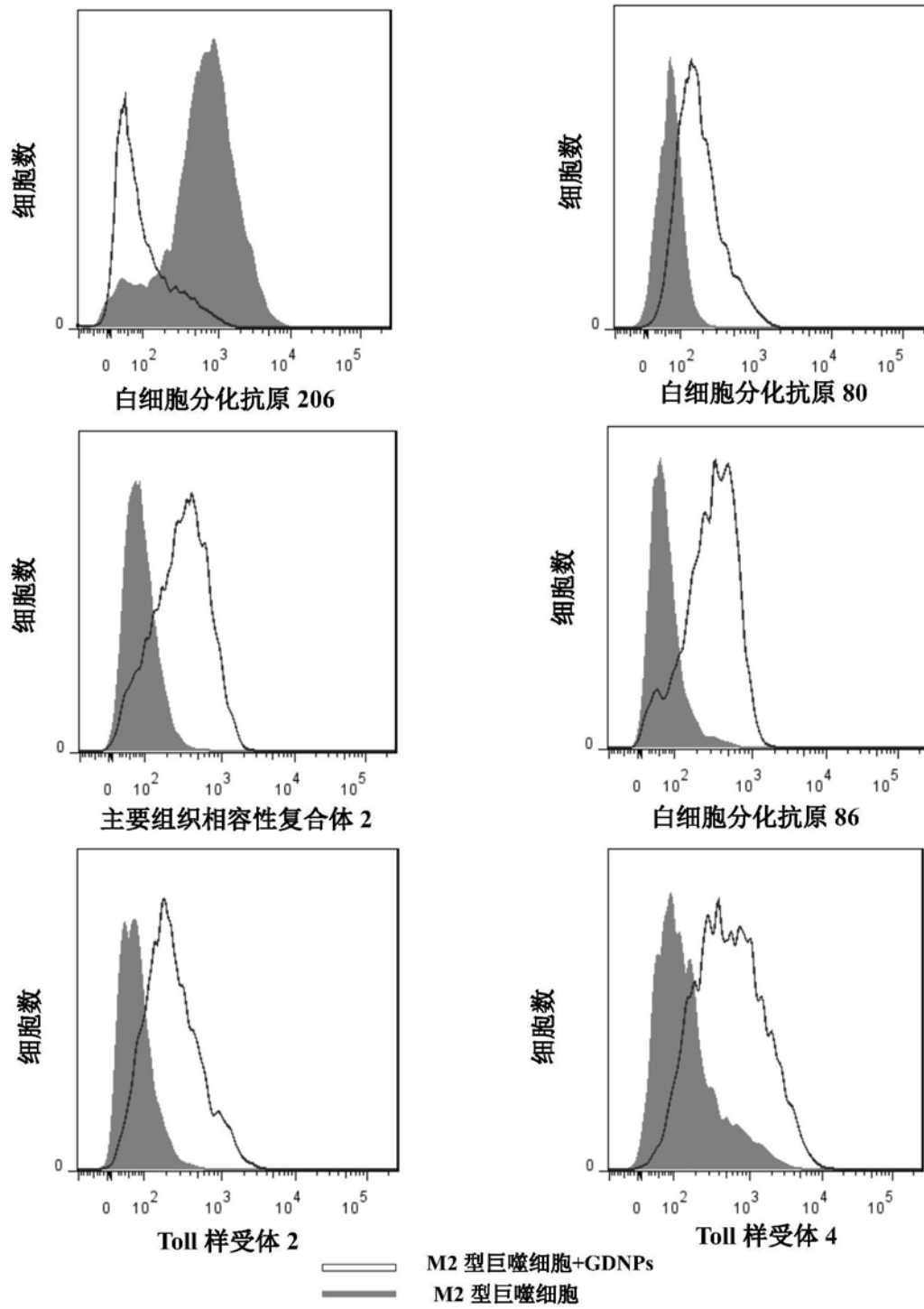


图4

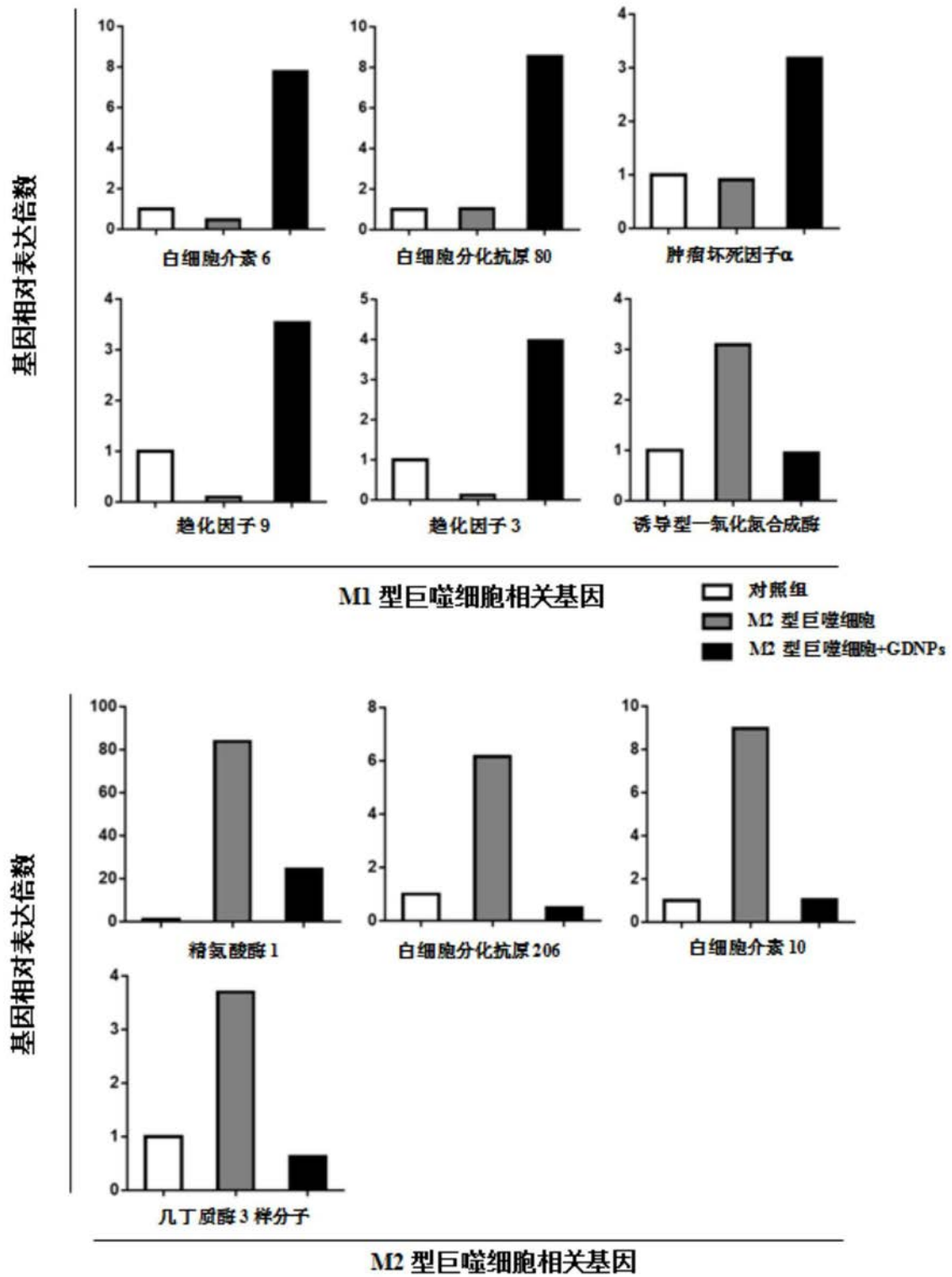


图5

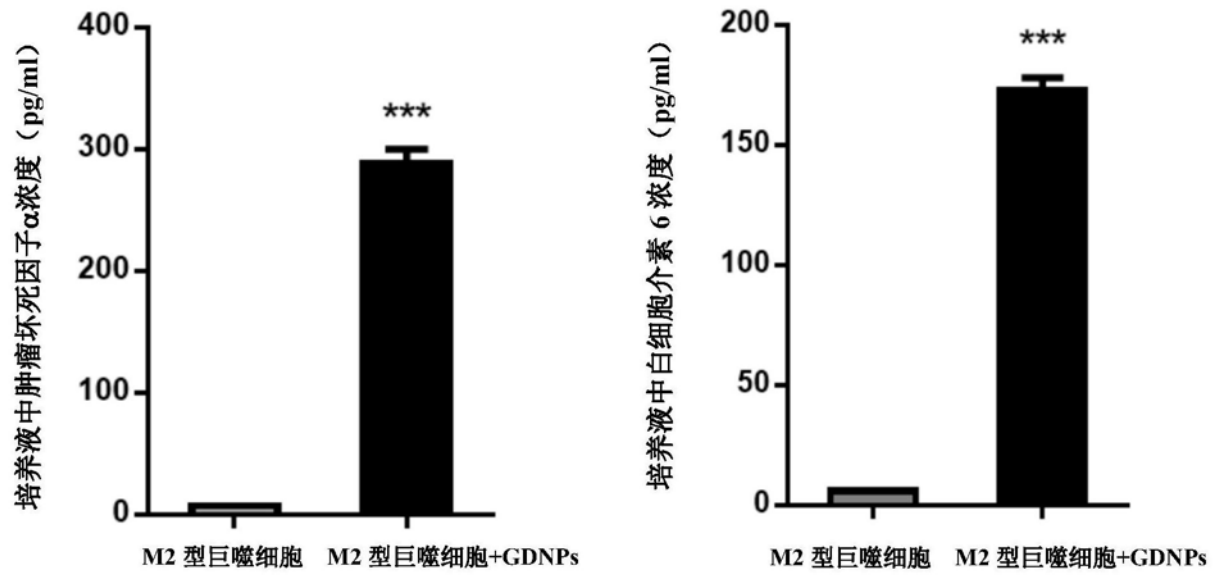


图6

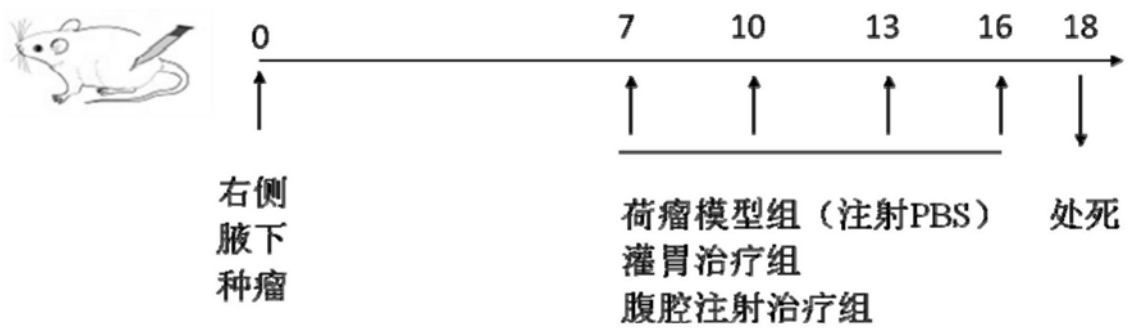


图7

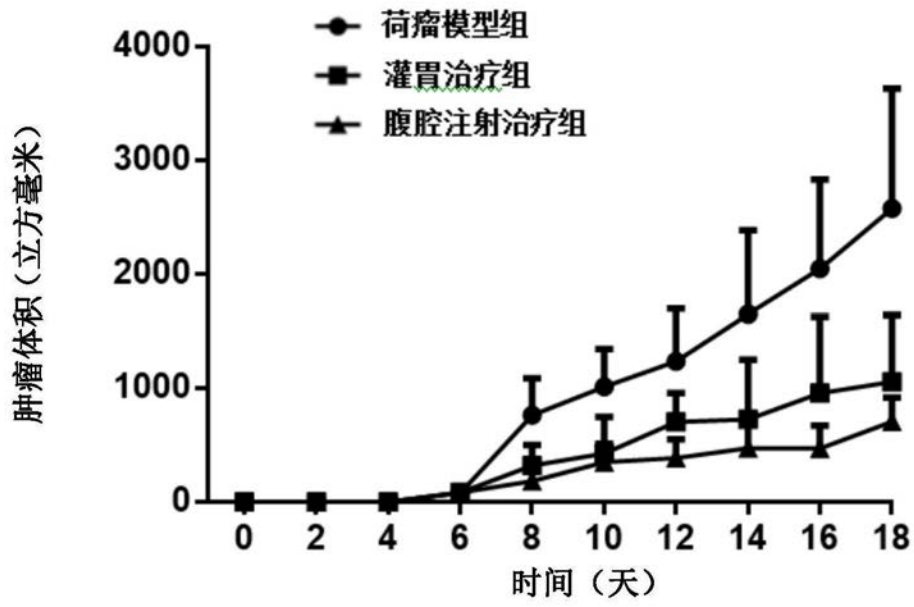


图8

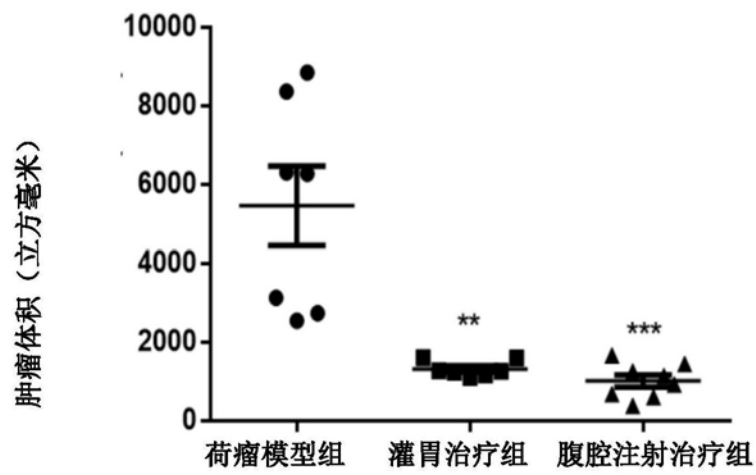


图9

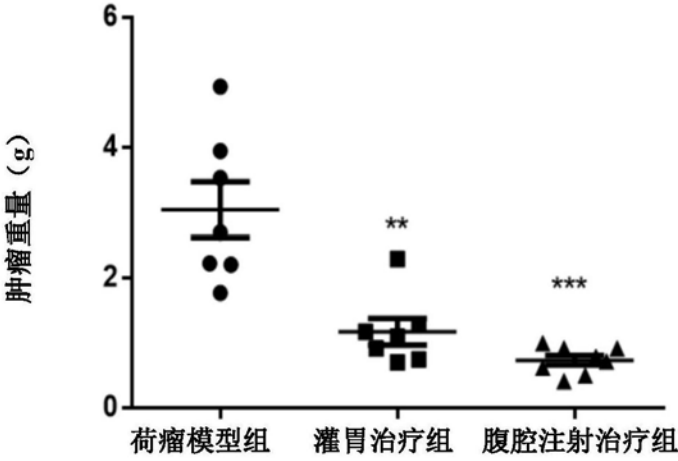


图10



图11

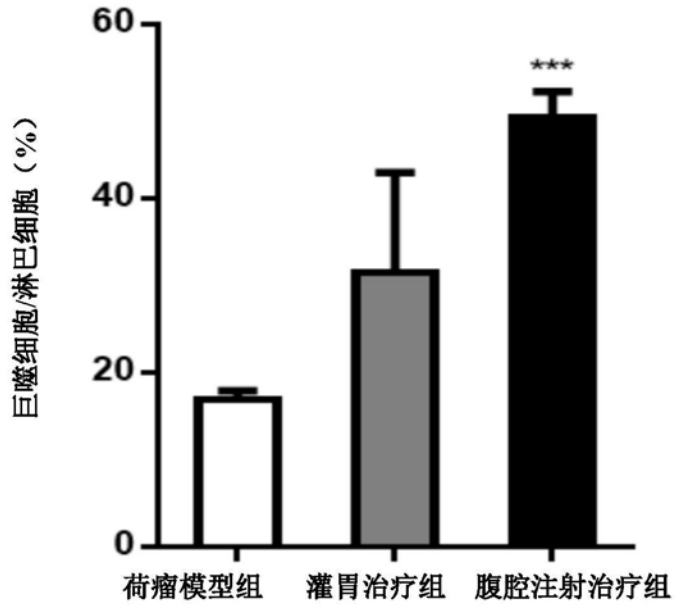


图12

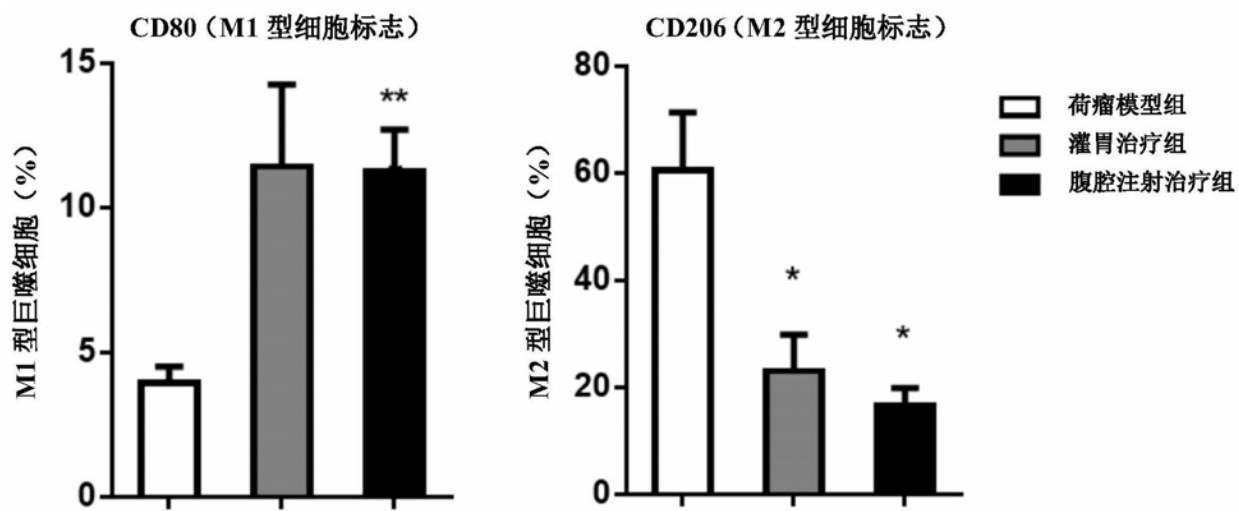


图13