

电解银离子对裸鼠肝癌细胞灭活的初步研究

王平康¹ 王瑞² 任军甫¹ 魏鑫³

1.河南科技大学, 河南 洛阳 471000

2.河南科技大学第一附属医院, 河南 洛阳 471000

3.河南农业大学, 河南 郑州 450002

摘要:目的 考察电解银离子对裸鼠荷 HepG2 肝癌细胞的杀灭作用。方法 选取 4~6 周龄的雄性裸鼠, 皮下荷肝癌模型 HepG2, 按高、低剂量腹腔注射电解银离子, 对照组裸鼠腹腔注射生理盐水, 50 天后处死动物进行全面检测。结果 从 2024 年 6 月 28 日开始到 7 月 23 日, 治疗组裸鼠的肿瘤全部消失, 共计 25 天, 此时对照组裸鼠的肿瘤体积为 319.99mm³, 尸体解剖发现: 治疗组的 4 只裸鼠身上未发现任何扩散和转移病灶, 肿瘤已经全部消失, 并且没有复发, 只有对照组仍然存在肿瘤组织块。结论 在本注射剂量下, 电解银离子对动物肝癌具有灭活癌灶和灭活扩散转移癌细胞的功能, 并且对动物肺肝肾无毒副作用。

关键词: 银离子; 电解; 电解银离子; 癌细胞; 裸鼠

癌症是严重威胁人类生命健康的常见病和多发病, 仅 2024 年全球新增癌症病例就达 1996 万例, 死亡人数 974 万例, 其中我国新增癌症病例达 482.47 万, 死亡人数达 257.42 万, 居全球第一。

我国现有的癌症治疗药物主要有 3 种: 常规化疗药物、靶向治疗药物和免疫治疗药物。以上现有药物虽然对治疗癌症有一定贡献, 但多数只能对癌细胞有抑制作用, 一旦停药多会在短时间内扩散、转移和复发, 不能彻底治愈癌症, 而且价格昂贵。所以, 研究和开发能彻底灭活癌细胞、对机体毒性轻微、价格低廉和使用简单方便的新型抗癌药是当务之急!

电解银离子的抗菌和抗病毒特性^[1-4]已在学术界获得了广泛的认可。然而, 关于电解银离子是否具有抗癌功效研究较少^[5-7], 目前科学界尚未定论。本文首次采用电解银离子对裸鼠荷人类肝癌细胞 HepG2 的灭活效果进行了初步研究。由于我们不清楚电解银离子对癌细胞是否有灭活作用, 所以为了避免风险, 首次实验选用的实验动物数量较少, 敬请读者谅解, 实验结果仅供参考。

1 实验材料

1.1 电解银离子

浓度 50ppm 的电解银离子, 无色透明液体, 亦称高化合价电解银离子溶液, 批号 221117-3, 中国洛阳冠银生物科技有限公司生产。

1.2 裸鼠

品系: BALB/c- μ 无胸腺裸鼠, 性别: 雄性, 周龄:

4~6 周, 来源: 上海昇敞生物科技股份有限公司提供, 数量: 5 只。

实验动物饲养在上海昇敞生物科技股份有限公司 SPF 屏障设施环境, 使用独立通风笼具 IVC。实验前, 实验动物经过 3~7 天的适应性饲养。屏障系统温度和湿度控制在如下范围: 温度 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 湿度 40~70%, 昼夜交替时间 12h/12h。

笼具: 由 PEI 制成, 体积为 $320\text{mm} \times 200\text{mm} \times 135\text{mm}$ 。刨花高压消毒清洁垫料, 每周更换 1~2 次。每只笼具具有笼具标签, 标明动物数量、性别、品系、接收时间、组别以及实验开始时间。

饲料和饮水: 小鼠正常饲养繁殖饲料(灭菌密封包装), 购自上海普路生物科技有限公司。饮用水为上海置华奎生物科技有限公司自制净化水, 经过灭菌处理。动物自由摄取无菌食物和饮水。

2 实验方法

取 4~6 周龄的雄性裸鼠 5 只, 皮下荷肝癌模型 HepG2。5 只裸鼠分为 3 组: 第一组 2 只, 为低剂量治疗组; 第二组 2 只, 为高剂量治疗组; 第三组 1 只, 为对照组。

低剂量组: 第 1~4 天, 每天每次分别腹腔注射电解银离子 75 μl , 4 天为一疗程, 共计腹腔注射 300 μl , 相当于体重 60 公斤成年人每天静脉点滴电解银离子 180ml, 4 天共计 720ml。由于电解银离子在体内消除速度较慢, 约 16 天才能排空, 所以动物第 5~20 天休息。到第 21~24 天时再进行第二疗程治疗, 剂量仍为每天每次 75 μl , 第

表 1 电解银离子对裸鼠肿瘤大小的作用情况分析

	日期	2024.6.28	2024.7.2	2024.7.5	2024.7.9	2024.7.12	2024.7.16	2024.7.19
耳标	分组	V(mm ³)	V(mm ³)	V(mm ³)	V(mm ³)	V(mm ³)	V(mm ³)	V(mm ³)
1	低剂量组	69.073	99.994	125.132	32.275	/	/	/
2		110.628	/	/	/	/	/	/
3	高剂量组	114.096	179.184	205.015	193.283	153.159	138.484	26.492
4		71.298	124.345	/	/	/	/	/
5	对照组	85.849	283.454	372.659	319.994	319.994	319.994	319.994
	日期	2024.7.23	2024.7.26	2024.7.30	2024.8.6	2024.8.9	2024.8.13	
耳标	分组	V(mm ³)	V(mm ³)	V(mm ³)	V(mm ³)	V(mm ³)	V(mm ³)	
1	低剂量组	/	/	/	/	/	/	
2		/	/	/	/	/	/	
3	高剂量组	/	/	/	/	/	/	
4		/	/	/	/	/	/	
5	对照组	319.994	243.553	210.418	175.737	99.521	50.051	

表 2 动物肝肾功能检查结果

称号	ALB (g/L)	ALP (U/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)	CREA (μmol/L)	DB (μmol/L)	ggT (U/L)	TBA (μmol/L)	TB (μmol/L)	UA (μmol/L)	UREA (mmol/L)
1	21.85	60.048	21.636	98.74	31.444	2.514	6.976	9.562	12.14	98.206	3.834
3	30.772	90.358	39.606	83.554	21.31	2.988	5.3	8.762	13.42	133.446	3.262
5	30.422	94.52	31.938	93.232	27.768	4.532	4.082	7.92	16.12	124.81	5.558
正常	20.082	131.288	25.298	71.362	21.124	2.232	2.42	8.238	14.26	78.566	3.078

25~50 天休息，休息 25 天是为了观察停止给药后癌灶有无复发和癌细胞有无全身扩散转移，到第 50 天处死动物作全面尸检，随机从 2 只裸鼠中选取 1 只，杀死后先收集足够量的血液备用，供作肝功能和肾功能检测，再取下肺、肝、肾组织器官，作病理切片检测。

高剂量组：给药方法同低剂量组，仅给药剂量不同。第 1~4 天，每天每次分别腹腔注射电解银离子 110μl，4 天共计 440μl，相当于体重 60 公斤成年人每天静脉点滴电解银离子 264ml，4 天共计 1056ml。第二疗程剂量同第一疗程，到第 50 天杀死动物，检测方法等同低剂量组。

对照组：用生理盐水代替电解银离子，用法用量及其他程序同低剂量组。

3 实验结果与分析

3.1 实验期间小鼠肿瘤大小变化情况见表 1

从表 1 肿瘤测量数据来看，截至到 day14，低浓度组的肿瘤已经全部消失，Day23 时高浓度给药组的肿瘤也已经全部消失，从给药到肿瘤全部消失共计 25 天，治疗组肿瘤消失率为 100%，此时对照组肿瘤体积为 319.994mm³。在整个实验周期中对小鼠生存状态进行观察，并未发现有任何异常状态，推测无论是高浓度还是低浓度电解银离子药品，均未对小鼠生存状态造成影响。

3.2 电解银离子的毒性观察

3.2.1 动物肝肾功能检查结果见表 2

3.2.2 肝肾功能常见的指标分析：

谷丙转氨酶(ALT):正常范围一般在 10~100U/L 左右；

谷草转氨酶(AST):正常范围通常在 20~100U/L 左右；总胆红素(TB)：正常范围一般在 5.0~16μmol/L。由表 2 实验结果可知本检测的各组小鼠指标均在正常范围内。从血清检测结果来看，给药后并未对小鼠产生肝肾功能损伤。

3.2.3 小鼠肺肝肾病理切片检测结果见图 1

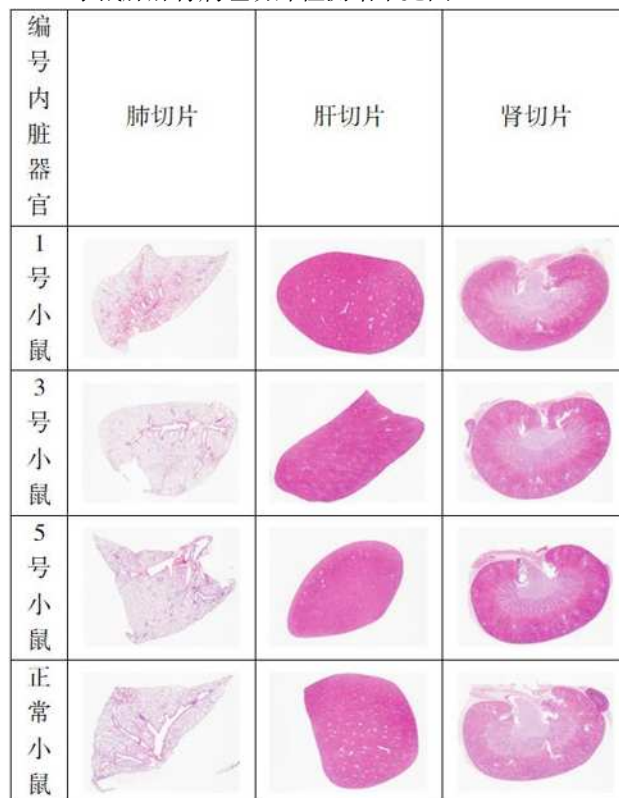


图 1 小鼠肺肝肾病理检测结果

3.2.4 小鼠肺肝肾病理切片检测结果与分析

1、3、5号小鼠肺部HE结果、肝脏HE结果以及肾HE染色结果与正常小鼠HE染色结果比较,在细胞组织水平进行了仔细观察,并未发现异常或坏死区域,电解银离子药物并未对小鼠肺脏、肝脏和肾脏产生毒副作用。

3.3 尸体解剖见图2

取样时对小鼠皮下进行全剥离,在给药电解银离子的4只小鼠身上并未发现任何扩散转移病灶,肿瘤已经全部消失且未复发,只有对照组仍然存在肿瘤组织块,进一步证明了电解银离子对动物癌细胞具有彻底全面的灭活作用。



图2 尸体解剖图

3.4 小鼠肿瘤癌灶治疗前后变化结果与分析见图3

从2024年6月28日开始裸鼠腹腔注射电解银离子,到7月23日,治疗组4只裸鼠的肿瘤全部消失,中间共计25天,此时对照组裸鼠的肿瘤体积为 319.99mm^3 。此结果直观的证明了电解银离子对小鼠肝癌的癌灶具有明显的灭活作用。

治疗前肿瘤照片	
治疗后肿瘤照片	
对照组照片	

注:本实验所有检测数据和图片均由上海置华奎生物科技有限公司提供
检测编号 JS2024051501 地址:上海市浦东新区古博路51号 项目负责人:邵伟国 花雪娇

图3 小鼠肿瘤癌灶治疗前后变化结果

4 讨论

根据以上实验结果可以看出电解银离子对裸鼠肝癌细胞存在显著的灭活作用,并且对动物肺肝肾无毒副作用,本实验结果的机理可能与下述原因有关:

(1) 电解银离子具有体外灭活癌细胞的基本功能:2021年5月河南科技大学医学院用电解银离子对食管癌

细胞KY-30作了杀灭实验,为电解银离子在抗肿瘤方面的试用提供了依据,结果如图4所示:

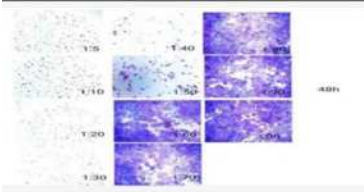


图4 电解银离子杀灭食管癌细胞的体外实验结果

结论:电解银离子与KY-30食管癌细胞接触48h后,当浓度为 $1\sim 10\text{mg/L}$ (稀释 $1:5\sim 1:50$)时,对癌细胞有致死作用。(电解银离子原浓度为 50ppm)

(2) 电解银离子具有良好的理化性能:电解银离子是络合物,与广谱抗癌药顺铂相似,与生理盐水相容性良好,即使加入到1%的强碱 NaOH ^[3]进行化合价鉴别时也不产生白色沉淀。本动物实验证明了电解银离子具有与顺铂相似的良好抗癌性能,当治疗浓度在 10mg/L 以下时无细胞毒性,这与2017年山东药学院孙建斐教授在“药学研究”上报道的实验结论相吻合:银离子浓度小于 12.5mg/L 时无细胞毒性^[8]。

电解银离子在杀灭癌细胞的同时对正常细胞无毒性的机理是:癌细胞的增殖不受控制,可以无限制的生长,增殖速度达每天 $1.6\sim 2.2$ 倍,新陈代谢旺盛,血供丰富,所以在相同的时间内,癌细胞吸取的银离子数量要远远大于正常细胞,当癌细胞中银离子的浓度达到 25mg/L 以上时,就会凝固、变性、裂解死亡,而正常细胞由于新陈代谢正常,吸取的银离子浓度在 10mg/L 以下,所以无细胞毒性。

(3) 银离子在机体内具有自动代谢不在体内积累的功能:2004年温州医学院陈炯教授在《中华烧伤杂志》上报道^[9],通过载银辅料进入到II度烧伤患者血液中的银离子可在14天之内经尿液安全地排出到体外,并恢复到治疗前的水平,人体内的银代谢属安全范围,人类机体对银离子具有自动代谢和不在体内积累的功能^[10-11]。电解银离子也是银离子的一种,本身是离子状态,并带有正电荷,其银离子所带正电的强度大于其本身的重量,因此,银离子不会沉淀积累,本动物实验的尸检和动物肺、肝、肾组织细胞病理切片检测也证明了这一点。

(4) 本动物实验选用的是荷人类癌细胞的裸鼠模型:本实验研究选用的动物为裸鼠,并且是人类癌细胞模型HepG2,所以具有较高的现实价值和实用性。但由于实验动物数量较少,癌细胞模型也少,所以还要扩大实验规模,

并需通过临床验证取得更多的数据才能充分证明电解银离子确切的抗癌性能。

参考文献:

- [1]王平康,张克勋,李治通.电解银离子溶液研制[J]. 中国科技信息,2017,568(19)34-35.
- [2]王平康,李治通,王瑞,等.,一种抗菌抗病毒的高化合价电解银离子溶液及其制备方[P],发明专利,专利号 ZL202010395234.6
- [3]王平康,王瑞,王安亭,等. 高化合价电解银离子溶液的基础研究[J]. 中文科技期刊数据库(全文版)医药卫生,2021,11(14):435.
- [4]王平康,王瑞. 电解银离子杀灭艾滋病毒的实验研究[J]. 河南医学研究,2024,33(18)3281-3284
- [5]胡冠松. 纳米银的制备及其体外抗菌和抗肿瘤活性研究[D].南方医科大学,2013年硕士学位论文.
- [6]Arakawa H,Neault JF. Silver(I) complexes with DNA and RNA studied by Fourier transform Infrared spectroscopy and capillary electrophoresis[J].Biophys.2001,

81,1580-7.

- [7]Singh R P,Ramarao P.Cellular uptake intracellular trafficking and cytotoxicity of silver nanoparticles[J]. Toxicol Latt. 2012,213,249-259.
- [8]孙建斐,黄思玲,郭学平.银离子在抗菌制剂中的合理浓度探讨[J],药学研究,2017,36(9) 516-518.
- [9]陈炯,韩春茂,余朝恒. 纳米银用于烧伤患者创面后银代谢的变化[J].中华烧伤杂志,2004,3:161-163.
- [10]Coombs C J,Wan A T,Masterton J P,et al.Do burns patients have a silver Lining[J]. Burns,1992,18(3) :179-184.
- [11]周泓宇,何瑾,黎立,等. 三黄汤洗剂联合湿性换药在 Wagner 2~3 期糖尿病足中的应用[J]. 新疆中医药,2019,37(3):10-12.

作者简介: 王平康(1947-),男,汉族,大学,正高级工程师,主攻生物制剂。

项目备案代码: 电解银离子项目备案代码: 洛阳市科学技术局备案代码:91410307MA46BJGJ93。