

长春碱亲水基修饰阳离子脂质体对荷瘤小鼠的抗肿瘤作用研究^Δ

李学涛*,程 岚,姜 英,俞荣平,贾连群(辽宁中医药大学药学院,辽宁大连 116600)

中图分类号 R965;R979.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)31-4339-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.31.07

摘要 目的:研究长春碱亲水基修饰阳离子脂质体对荷瘤小鼠的抗肿瘤作用。方法:腋下接种S180腹水瘤小鼠黄色腹水复制荷瘤模型。将荷瘤小鼠随机分为模型组、硫酸长春碱注射液组、长春碱普通脂质体组、长春碱亲水基修饰脂质体组、长春碱阳离子脂质体组和长春碱亲水基修饰阳离子脂质体组,分别记为A、B、C、D、E、F组,每组18只。A组小鼠尾iv生理盐水,其余各组小鼠尾iv长春碱(给药剂量为1.5 mg/kg),每隔1日给药1次,连续给药5次。以小鼠生存状态、生存时间、瘤体积、瘤质量及组织病理切片为指标比较长春碱不同制剂的抗肿瘤作用。结果:与A、B、C、D、E组比较,F组小鼠更活跃、生存时间更长、瘤体积更小、瘤质量更轻,差异具有统计学意义($P<0.05$);组织病理切片显示,F组小鼠肿瘤细胞核凝固坏死、核破碎溶解。结论:长春碱亲水基修饰阳离子脂质体有明显的抗肿瘤作用,且作用优于上述长春碱的其他制剂。

关键词 长春碱;亲水基修饰;阳离子脂质体;S180细胞;小鼠

Study on Anti-tumor Effects of Vinblastine Hydrophilic Group Modified Cationic Liposomes in Tumor-bearing Mice

LI Xue-tao, CHENG Lan, JIANG Ying, YU Rong-ping, JIA Lian-qun (School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Liaoning Dalian 116600, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the anti-tumor effects of Vinblastine (VLB) hydrophilic group modified cationic liposomes in tumor-bearing mice. METHODS: Tumor-bearing model were induced by inoculating yellow ascites of S180 ascites tumor mice. Tumor-bearing mice were randomly divided into model group, VLB sulfate injection group, VLB liposomes group, VLB hydrophilic group modified liposomes group, VLB cationic liposomes group and VLB hydrophilic group modified cationic liposomes group, i.e. group A, B, C, D, E and F, with 18 mice in each group. Group A was given normal saline intravenously via mice tail, other groups were given VLB 1.5 mg/kg every 2 days for consecutive 5 times. The anti-tumor effects of different VLB preparations were compared, using living conditions, survival time, tumor volume and weight, and tissue pathological section as indexes. RESULTS: Compared with group A, B, C, D and E, the mice of group F were more active, and had longer survival time, smaller tumor volume and lighter tumor weight, with statistical significance ($P<0.05$). The tissue pathological section of mice in group F indicated that coagulation necrosis, disintegration, and dissolution of tumor cell nucleus. CONCLUSIONS: VLB hydrophilic group modified cationic liposomes have obvious anti-tumor effect, which are better than other VLB preparations.

KEYWORDS Vinblastine; Hydrophilic group modified; Cationic liposomes; S180 cells; Mice

长春碱(Vinblastine)是从夹竹桃科长春花属植物长春花 *Catharathus roseus* (L.) G. Don 中提取出的一种具有药理活性的双吲哚型生物碱^[1],对多种肿瘤均有疗效。但目前临床常用的硫酸长春碱为其硫酸盐形式,iv给药,对神经系统和注射部位刺激性大且具有血液毒性^[2],限制了其应用。脂质体作为特殊包封载体,具有靶向缓释给药、组织相容性、增效减毒等优点^[3]。脂质体通过亲水基修饰后可以延长药物在体内的保留时间,从而可以更好地发挥载体的渗透与滞留效应(Enhanced permeability and retention, EPR),达到靶向治疗、降低毒性及提高疗效的作用^[4]。阳离子脂质体通过自身的正电性可与肿瘤组织中新生血管的负电性结合,达到靶向肿瘤新生血管的目的,从而实现主动靶向^[5]。尤其是对脂质体表面结构进行亲水基修饰并制备成阳离子脂质体的多功能复合型脂质体可使抗肿瘤药物更安全、疗效更好、靶向性更强^[6]。本实

验通过制备长春碱的亲水基修饰阳离子脂质体,比较其与长春碱的不同制剂对S180荷瘤小鼠生存状态、生存时间、瘤体积、瘤质量等的影响,同时结合肿瘤组织切片的病理学观察,考察长春碱亲水基修饰阳离子脂质体对荷瘤小鼠的抗肿瘤作用。

1 材料

1.1 仪器

AY220型电子分析天平(日本岛津公司);DF2101S型恒温加热磁力搅拌器(河南巩义市予华仪器有限公司);PH100-DB500U-IPL型光学显微镜(江西凤凰光学仪器有限公司);WJ-80B-II型CO₂细胞培养箱(上海新苗医疗器械有限公司)。

1.2 药品与试剂

长春碱原料药(武汉金诺化工有限公司,批号:GPC-JN-HG20110921,纯度:98.2%);硫酸长春碱注射液(澳大利亚科鼎有限公司,批号:H20110228,规格:10 ml:10 mg); 3β -[N-(N',N'-二甲基胺乙基)胺基甲酰胺基]胆固醇(DC-Chol,上海艾韦特医药科技有限公司,批号:201923);二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二硬脂酰磷脂酰乙醇-聚乙二醇2000(DSPE-

^Δ基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81102822);辽宁省科学技术计划项目(No.2014020046)

* 副教授。研究方向:新型给药系统。电话:0411-85890145。E-mail: lixuetao1979@163.com

PEG,批号:B10206)均购自日本精化株式会社;胆固醇(Chol,北京双旋微生物培养基制品厂);DMEM高糖培养基(北京迈晨科技有限公司);胎牛血清(FBS,中美合资兰州民海生物工程有限公司);Penicillin-Streptomycin双抗(北京迈晨科技有限公司)。

1.3 细胞株与动物

S180细胞株(中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所);KM小鼠,♂,体质量为(20±2)g,由辽宁中医药大学实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(辽)2004-0018。

2 方法

2.1 长春碱脂质体的制备

2.1.1 长春碱亲水基修饰阳离子脂质体 取长春碱原料药3mg,加3ml甲醇溶解再加氯仿12ml混合,得长春碱氯仿溶液。取DPPC 38mg、DC-Chol 25mg、DSPE-PEG 1mg置于梨形瓶中,加入长春碱氯仿溶液溶解,旋转蒸发除去有机溶剂,加入pH4.0的柠檬酸缓冲液10ml,超声溶解,60℃水浴磁力搅拌30min,超声粉碎10min,依次过0.45、0.22μm的微孔滤膜,过100nm的脂质体挤出仪,制得长春碱亲水基修饰阳离子脂质体,置于-4℃冰箱中保存。

2.1.2 其他脂质体 按“2.1.1”项下方法分别制备以DPPC、Chol、DPPC、Chol、DSPE-PEG和DPPC、DC-Chol为膜材的长春碱普通脂质体、长春碱亲水基修饰脂质体和长春碱阳离子脂质体^[7]。

2.2 荷瘤小鼠模型的复制

取S180细胞置于DMEM高糖培养液(含10%胎牛血清、100u/ml青霉素和100μg/ml链霉素)中,37℃、5%CO₂条件下培养。取对数生长期的S180细胞,加空白血清培养基稀释至细胞密度为2×10⁷ml⁻¹,无菌条件下小鼠ip接种,每只0.3ml。约1周后,抽取荷瘤小鼠淡黄色腹水约0.3ml,小鼠腋窝处消毒后每只皮下进行接种,复制荷瘤小鼠模型。

2.3 分组与给药

复制模型10d后,将荷瘤小鼠随机分为模型组、硫酸长春碱注射液组、长春碱普通脂质体组、长春碱亲水基修饰脂质体组、长春碱阳离子脂质体组、长春碱亲水基修饰阳离子脂质体组,分别记为A、B、C、D、E、F组,每组18只。A组小鼠尾iv生理盐水,其余各组小鼠尾iv长春碱相应制剂(以长春碱给药剂量为1.5mg/kg),每隔1日给药1次,连续给药5次。

2.4 指标检测

2.4.1 生存情况及生存时间考察 首次给药后,每组选取6只小鼠,每天观察其生存状况及自发活动,记录小鼠生存时间并绘制生存曲线。

2.4.2 瘤体积及肿瘤抑制率考察 首次给药后,每组选取6只小鼠,每天观察其肿瘤的生长情况,并测量肿瘤的长径(a)和短径(b),计算瘤体积,瘤体积=b²×a×0.52;再计算肿瘤抑制率,抑制率=(1-给药组肿瘤体积/模型组肿瘤体积)×100%。

2.4.3 瘤质量考察 首次给药25d后,每组处死小鼠4只,解剖剥离瘤体,称瘤质量,比较各组瘤质量的差异。

2.4.4 组织病理切片观察 首次给药25d后,每组处死小鼠2只,以最快速度取出各组小鼠的肿瘤组织,立即放入10%福尔马林液中。固定24h后,常规石蜡包埋,4mm厚连续切片,苏

木精-伊红(HE)染色,光学显微镜观察病理情况。

2.5 统计学方法

采用SPSS 11.0软件进行统计学分析。数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 S180细胞培养及荷瘤小鼠模型的复制

传代后的S180细胞生长旺盛,呈圆形状态。采用腋下接种S180细胞后的小鼠在接种后2周可见明显的肿块,表明已经成功复制S180荷瘤小鼠模型,成瘤率为100%。

3.2 生存情况及生存时间

实验后期,A组小鼠出现目光呆滞、步履蹒跚、形体急剧消瘦、毛发蓬松脱落无光泽、排泄物异常的现象。B、C、D、E、F组小鼠的毛发、活动、进食和排泄均未有明显异常,其中F组小鼠较其他组小鼠更为活跃且生存时间更长。各组荷瘤小鼠的生存曲线见图1。

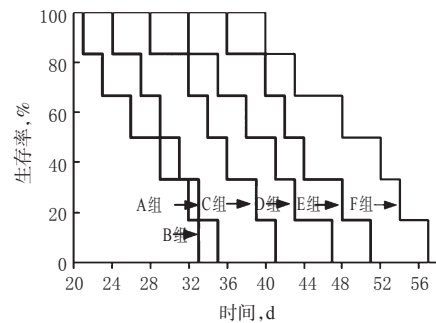


图1 各组荷瘤小鼠的生存曲线

Fig 1 Survival curves of tumor-bearing mice in each group

3.3 瘤体积及肿瘤抑制率

荷瘤小鼠模型复制第10天后,A组小鼠的肿瘤生长速度较快。与B、C、D、E组比较,F组小鼠的瘤体积减小和肿瘤抑制率增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。各组荷瘤小鼠的瘤体积变化见图2,肿瘤抑制率结果见表1。

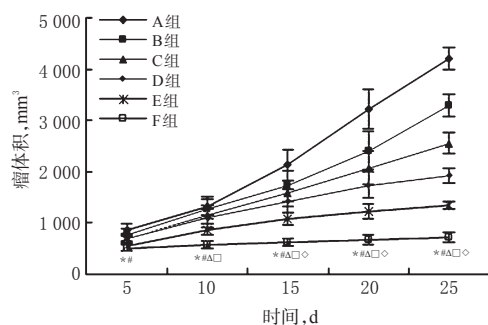


图2 各组荷瘤小鼠的瘤体积变化

注:与A组比较,* $P < 0.05$;与B组比较,# $P < 0.05$;与C组比较,[^] $P < 0.05$;与D组比较,□ $P < 0.05$;与E组比较,◇ $P < 0.05$

Fig 2 Tumor volume of tumor-bearing mice in each group

Note: vs. group A, * $P < 0.05$; vs. group B, # $P < 0.05$; vs. group C, [^] $P < 0.05$; vs. group D, □ $P < 0.05$; vs. group E, ◇ $P < 0.05$

3.4 瘤质量

与A、B、C、D、E组比较,F组小鼠的瘤质量减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。F组小鼠的瘤质量为(0.30±0.03)g。各组荷瘤小鼠的瘤质量变化见图3。

表1 各组荷瘤小鼠的肿瘤抑制率结果($\bar{x} \pm s, n=6, \%$)

Tab 1 Tumor inhibitory rate of tumor-bearing mice in each group($\bar{x} \pm s, n=6, \%$)

组别	第1次给药后的时间,d				
	5	10	15	20	25
B组	11.67±1.34	20.95±2.32	21.5±2.34	36.87±3.65	41.39±1.45
C组	13.79±2.24	12.31±1.64	17.37±1.87	34.20±2.56	56.14±3.86
D组	19.31±1.65	26.06±2.45	32.94±1.67	49.08±3.86	70.75±6.34
E组	25.05±3.65	35.50±4.23	45.80±5.43	61.84±4.67	79.08±5.57
F组	21.84±4.24*	39.36±1.64** [△]	54.07±4.76** ^{△□}	68.11±5.55** ^{△□}	82.93±6.34** ^{△□}

注:与B组比较,* $P<0.05$;与C组比较,[△] $P<0.05$;与D组比较,[△] $P<0.05$;与E组比较,[□] $P<0.05$

Note: vs. group B, * $P<0.05$; vs. group C, [△] $P<0.05$; vs. group D, [△] $P<0.05$; vs. group E, [□] $P<0.05$

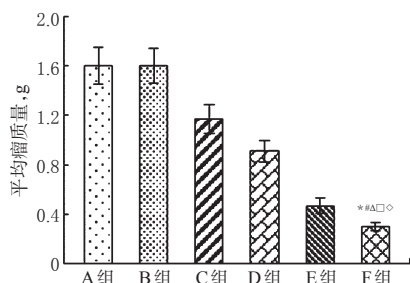


图3 各组荷瘤小鼠的瘤质量

注:与A组比较,* $P<0.05$;与B组比较,[#] $P<0.05$;与C组比较,[△] $P<0.05$;与D组比较,[□] $P<0.05$;与E组比较,[◇] $P<0.05$

Fig 3 Tumor weight of tumor-bearing mice in each group

Note: vs. group A, * $P<0.05$; vs. group B, [#] $P<0.05$; vs. group C, [△] $P<0.05$; vs. group D, [□] $P<0.05$; vs. group E, [◇] $P<0.05$

3.5 组织病理切片

A组小鼠肿瘤细胞排列紧密,细胞生长旺盛,核分裂明显。其余各组小鼠肿瘤细胞均出现不同程度的细胞坏死、细胞较为稀疏等现象,其中F组小鼠肿瘤细胞可见明显的细胞核凝固坏死、核破碎溶解现象。各组荷瘤小鼠的肿瘤组织病理切片图见图4。

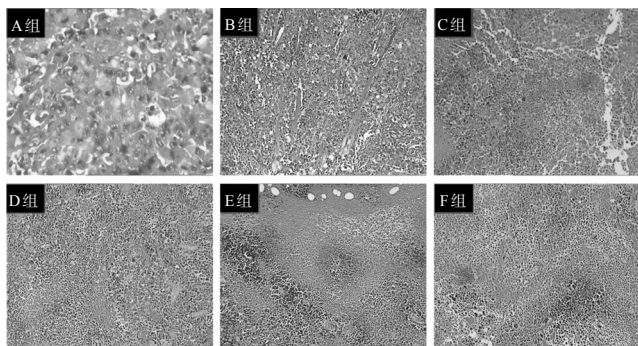


图4 各组荷瘤小鼠的肿瘤组织病理切片图($\times 100$)

Fig 4 Tissue pathological section of tumor tissue in tumor-bearing mice in each group($\times 100$)

4 讨论

经PEG修饰后的脂质体表面具有了脂质体的隐形性质,很大程度上降低了脂质体被网状内皮系统(RES)清除的概率,

提高了脂质体在血液系统停留时间;由于表面膜修饰物DSPE-PEG在脂质体表面呈部分延展的构象,形成立体位阻层,犹如一把“刷子”,可显著减弱巨噬细胞(MPS)摄取作用,从而降低脂质体的MPS亲和作用;同时DSPE-PEG可以提高脂质体表面的亲水性,降低脂质体与MPS的亲合力,从而使更多的封装于脂质体内部的长春碱药物通过EPR作用而到达肿瘤组织^[8]。此外,阳离子脂质体表面带有的正电荷可以与肿瘤新生血管内皮细胞上带负电荷的磷脂、蛋白聚糖、过糖基化的膜蛋白等发生静电作用^[9-10],通过细胞内吞或膜融合方式,将药物导入细胞而发挥作用,具有主动靶向作用。亲水基的修饰和阳离子脂质体的协同靶向作用大大增加了药物的抗肿瘤效果。

长春碱对S180肿瘤细胞有抑制生长的作用。S180细胞是增殖较快的细胞,建立S180荷瘤小鼠模型所需时间短且易于成功。实验通过研究S180荷瘤小鼠在注射长春碱的不同制剂后的生存状况、肿瘤抑制率、组织病理切片等方面发现,长春碱亲水基修饰阳离子脂质体的抗肿瘤作用最显著,证明了亲水基修饰阳离子脂质体具有协同增效作用。

参考文献

- [1] 邱娟,章娟,伍人瞰.高效液相色谱法测定硫酸长春碱有关物质的含量[J].临床合理用药,2011,4(7A):108.
- [2] 祖元刚,罗猛,牟松,等.长春花生物碱成分及其药理作用研究进展[J].天然产物研究与开发,2006,18(2):325.
- [3] 张跃珍,林军.天然药物脂质体制备研究进展[J].中国药房,2007,18(21):1671.
- [4] Li XY, Zhao Y, Sun MG, et al. Multifunctional liposomes loaded with paclitaxel and artemether for treatment of invasive brain glioma[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(21):5591.
- [5] Li XT, Zhou ZY, Jiang Y, et al. PEGylated VRB plus quinacrine cationic liposomes for treating non-small cell lung cancer[J]. *J Drug Target*, 2015, 23(3):232.
- [6] 张冬青,程怡.脂质体的研究概况[J].中药新药与临床药理,2002,13(2):125.
- [7] 谭静净,程岚,李学涛.中心组合设计-效应面法优化长春碱亲水基修饰阳离子脂质体的处方[J].中草药,2012,43(9):1742.
- [8] Li XT, Ju RJ, Li XY, et al. Multifunctional targeting daunorubicin plus quinacrine liposomes, modified by wheat germ agglutinin and tamoxifen, for treating brain glioma and glioma stem cells[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(15):6497.
- [9] Ju RJ, Li XT, Shi JF, et al. Liposomes, modified with PTD_{HIV-1} peptide, containing epirubicin and celecoxib, to target vasculogenic mimicry channels in invasive breast cancer[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(26):7610.
- [10] 毛世瑞,毕殿洲.固脂纳米粒(SLN)药物释放系统的研究进展[J].沈阳药科大学学报,2002,19(6):455.

(收稿日期:2014-12-13 修回日期:2015-01-18)

(编辑:邹丽娟)