

长春碱类抗肿瘤药的研究进展

习利平, 宋新波*, 张丽娟

天津中医药大学, 天津 300193

摘要: 长春碱类抗肿瘤药已广泛应用于临床并显示出很好的疗效。综述其发现、提取分离、药理作用以及在使用过程中对其进行的结构修饰和近年来出现的新剂型, 为进一步开发利用提供参考依据。

关键词: 长春碱; 抗肿瘤药物; 作用机制; 结构修饰

中图分类号: R979.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2011)01-0059-05

Advances in research on vinblastine case antineoplastic

XI Li-ping, SONG Xin-bo, ZHANG Li-juan

Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Key words: vinblastine; antineoplastic; mechanism; structure modification

长春花为夹竹桃科植物长春花 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. 的全草, 可用于止血、止痛、清洗伤口, 治疗坏血病和控制糖尿病。20 世纪 50 年代中晚期, Beer 等^[1]分别从长春花中提取并发现了长春碱(vinblastine)和长春新碱(vincristine), 它们是在从植物中寻找降血糖成分时偶然发现的; 与此同时还发现了 2 个具有抗癌活性的生物碱成分 vinleurosine 和 vinrosidine, 但最终没能成为抗癌药物。自证实此类化合物具有抗肿瘤活性以来, 现已正式用于临床的有长春碱、长春新碱、长春地辛(vindesine)及长春瑞宾(vinorelbine)。处于临床研究的还有长春氟宁(vinflunine)、长春甘酯(vinglycinat)及脱水长春碱(anhydrovinblastine)。到目前为止从长春花中已经分离得到的吲哚类生物碱有 70 余种。

1 提取分离

目前主要是从天然植物中提取长春碱, 虽然利用化学合成和半合成的方法可以得到长春碱及其衍生物, 也有人研究通过组织培养的途径获得, 但都不理想, 不适合生产。所以从天然植物中检测并分离提取长春碱的技术就显得相当重要。

1.1 溶剂提取

早期曾尝试用乙醇^[2]提取, 但发现长春碱在乙醇中溶解度小、提取率低。在研究柱色谱结合 pH 梯度分离技术^[3-4]时发现, 在 pH 4~5 时长春碱的量最高, 且以盐的形式存在; pH 8.5 时, 长春碱与一

些性质相近物质以弱碱的形式萃取出来, 这为以后研究酸碱水粗提提供了依据。但碱水浸润提取使生药中一些中等强度和强生物碱都以游离碱形式提取出来, 因此杂质较多, 纯化难度较大^[5-6]。后改用甲醇水溶液浸取全草, 硫酸酸化, 处理后得到总生物碱, 提取率 0.06%。得到的生物碱量比碱水浸取高 30~40 倍, 且甲醇价格低, 减少了提取步骤。但甲醇极性较大, 浸取液中所含杂质也相对较多, 选择性不够高。用含少量硫酸的 90% 甲醇水溶液提取长春花全草, 长春碱可转化成盐的形式, 更易用甲醇提取出来, 提取率也有所增加。Atta-ur-Rahman 等^[7]用一种较复杂的方法得到高纯度的长春碱产品: 将全草 20 kg 粉碎, 乙醇浸取, 旋转蒸发得到的浸膏用盐酸酸化, 碱化后用三氯甲烷萃取, 萃取液浓缩后再用三氯甲烷溶解, 用磷酸盐缓冲液萃取, 三氯甲烷层浓缩后加三氯甲烷-石油醚溶解, 滤过, 浓缩后用醋酸乙酯溶解, 磷酸盐缓冲液萃取, 缓冲液层碱化后用三氯甲烷萃取得长春碱粗品, 提取率 0.1%, 长春碱质量分数 3%。此法虽然提取率较高, 但步骤繁琐, 耗用溶剂量大, 不适合大生产, 也不符合环保的要求。Gunasekera 等^[8]将甲醇浸取改为用酸水浸取, 即长春花全草 2.2 kg 用乙酸水溶液浸取 2 次, 氨水碱化, 二氯甲烷萃取。得到总生物碱 7.9 g, 提取率 0.36%, 长春碱质量分数 8.3%。该法提取率高, 步骤简单, 有机溶剂用量少, 增强了操作安全性。但酸水选择性低, 提取物中杂质较多,

收稿日期: 2010-06-25

作者简介: 习利平(1983—), 女, 河北石家庄人, 硕士, 中药学, 主要从事天然药物的分离与工艺。Tel: 15822750706

E-mail: yixinxiaozhu1002@163.com

*通讯作者 宋新波 Tel: 13302121899 E-mail: songxinbo@tjutcm.edu.cn

需要成熟高效的柱色谱方法作为后续步骤,才能得到高质量的产品。

1.2 超临界萃取法

这方面的研究较少。Stahl 等^[9]初步研究了长春碱的超临界流体微量萃取,结果表明在压力 8~20 MPa、提取温度 40 °C 下的萃取效果不佳, N₂O 萃取效果比 CO₂ 稍好。Choi 等^[10]研究表明,二氧化碳-甲醇-三乙胺(80:18:2)超临界萃取能有效提取长春花全草中的长春碱。在 80 °C、34 MPa 下的萃取率是甲醇萃取的 76.4%,而在不加夹带剂或改用其他夹带剂的条件下萃取率不及甲醇萃取的 25%。超临界萃取无毒、无污染,萃取时间短、能耗低;但需要耐高压设备,成本较高,进行大规模原料萃取的生产条件还不成熟。

天然产物的提取方法正向着有机溶剂用量小、对人体毒害小、环境污染小的方向发展。尽管进行了一些其他提取分离方法研究,如超临界萃取,但尚处于实验阶段。

纯化的主要目的是将粗提的总生物碱中的长春碱、长春新碱、异长春碱以及一些结构相近的生物碱分开,得到纯度更高的目标产品。长春碱的纯化方法主要有制备型薄层色谱法、柱色谱法、制备型 HPLC 法和高效逆流色谱(CPC)法等。目前工业生产中柱色谱法还是主要纯化方法,固定相和流动相的选择得当与否是生产中能否得到高收率、高纯度产品的决定因素,而长春碱柱色谱分离中存在的一个较大问题是粗品纯化过程中的损失较大,经济效益无法提高,需进一步寻找更有效的分离系统。

2 药理作用

长春碱在消化道内吸收不规律,故一般不采用 *po* 给药,而采用 *iv* 给药。*iv* 给药后数分钟即离开血液,在 1 h 内绝大部分集中于肝脏;长春花生物碱主要由肝脏排至胆道系统而进入肠道,只有 5% 出现在尿中。

2.1 抗肿瘤

从长春花植物中分离出的生物碱,多具抗肿瘤作用,其中以长春碱、长春新碱最有价值,已应用于临床。两者化学结构极相似,但抗癌谱不尽相同,两药间无交叉抗药性。长春碱主要用于何杰金氏病、绒毛膜癌^[11],对淋巴肉瘤、蕈样霉菌病、白血病、横纹肌软骨肉瘤、黑色素瘤、精母细胞瘤、畸胎瘤、星形细胞瘤、网织细胞肉瘤、一些部位癌(胸、肺、口腔、胃、结肠、直肠、卵巢、颈部、子宫、膀胱、肾等)等的抗肿瘤作用还需进一步印证。

有学者认为这些生物碱能降低脱氧核糖核酸与核糖核酸及蛋白质的合成,抑制细胞有丝分裂,使其终止于中期,表现为细胞毒作用(对正常骨髓、毛囊上皮均有抑制作用,使白细胞降低,脱发;但对红细胞、口腔和胃肠道黏膜、部分肝切除大鼠的肝再生则无影响)。

最近有学者认为长春碱的作用如同一个阳离子,能与多种蛋白产生沉淀,与 Ca²⁺ 相似。20~40 mg/kg 长春花总碱对小鼠艾氏腹水癌及腹水型肝癌均有明显抑制作用,10 mg/kg 对大鼠腹水型吉田肉瘤也有较好的疗效。长春碱对艾氏腹水癌细胞本身无破坏作用,但能延长小鼠寿命。

2.2 降血糖

国外民间用长春花叶及全植物治疗糖尿病,从长春花中分离出 vindoline、leurosine、lochnerine、catharanthine、tetrahydroalstonine、vindolinine 均有不同程度的降血糖作用,作用开始较缓慢,但较持久。叶的水提取物对正常及四氧嘧啶致糖尿病的兔、狗亦有降血糖作用。

2.3 其他作用

长春花总碱对离体子宫与肠管无兴奋作用,大剂量对离体心脏有抑制作用,在子宫出血时可作止血剂,其根可作流产用。其所有生物碱部分均有不同程度的抗菌作用^[11]。

3 作用机制

长春花生物碱的抗肿瘤机制至今尚未完全弄清。已经清楚的是,它们的抗肿瘤活性与细胞微管蛋白(微管的基本蛋白亚单位)结合的高亲和力有关^[12]。一般认为,这些药物阻滞微管蛋白聚集成微管,并使细胞内微管迅速解体,使细胞有丝分裂阻止在中期,因此它们是细胞周期依赖性抗有丝分裂药物。长春新碱、长春碱、长春地辛对微管蛋白的结合量分别为 8.0×10^6 、 6.0×10^6 、 8.3×10^6 mol/L。这些药物的抗癌活性不同与它们在肿瘤组织中的滞留有关。它们的治疗选择性与三磷酸鸟苷(GTP)有关。临床前和临床研究表明长春瑞宾与长春碱、长春新碱和长春地辛相比,抗癌谱广、毒副作用小。这是因为长春瑞宾对微管作用的结果。Binet 等^[13]用神经细胞分化早期的鼠胚组织原基证明长春碱、长春新碱和长春瑞宾可使极间解体,有丝分裂微管和中期细胞阻滞。提高药物浓度可使着丝点微管进行性解体,但只有长春瑞宾可使这些微管发生完全解体,使有丝分裂前期细胞停止。长春碱、长春新碱和长春瑞宾对轴索微管的活性相同,与药物剂量

呈正相关。由于药物的神经毒性是经轴索微管的螺旋化介导的,因此,长春瑞滨的治疗指数较高、神经毒性较低。很多用动物或肿瘤细胞进行的体外研究表明,不管用什么模型,长春花生物碱很快被大量摄入细胞,但它们之间有很大差别。用新鲜分离的大鼠肝细胞悬液进行的实验表明,长春碱在细胞内的积聚比长春新碱或长春地辛量大。用人肝细胞研究也得到相似的结果,而且细胞内的药物浓度明显高于细胞外的药物浓度。长春花生物碱的转运通道有多种机制。有些研究报道它们的通过是依赖于能量和温度的主动转运过程。用新鲜分离的人和动物肝细胞悬液研究长春花生物碱的代谢表明,它们的生物转化涉及人肝 P-45011A 细胞色素。很多研究结果表明,某些药物(如鬼臼毒素类药物)可明显抑制长春花生物碱的代谢,临床使用长春花生物碱可引起肿瘤细胞耐药,还发现同时对长春花生物碱和其他结构抗肿瘤药耐药的肿瘤细胞,这种现象称为多药耐药性(MDR)。MDR是由于细胞内药物溢出增加,药物在细胞内滞留减少而引起的。在一定的细胞外药物浓度下,MDR 细胞比敏感细胞的细胞内药物浓度低。钙拮抗剂、利血平等药物可逆转长春花生物碱的多药耐药性,因为它们能使细胞内长春花生物碱的积聚增加^[1]。

4 结构修饰

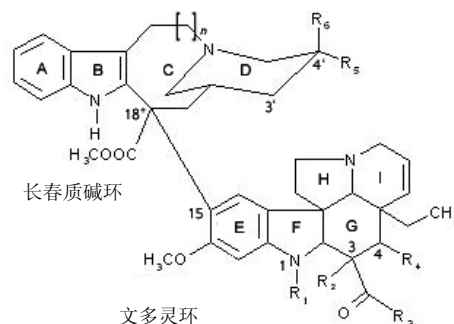
长春碱类化合物的结构中包含 2 个基本结构单位,长春质碱环和文多灵环,目前对其结构修饰主要体现在这 2 个部分,见图 1。

4.1 长春质碱环的修饰

在长春质碱环的 C 环和 D 环适当修饰可表现出明显的抗肿瘤活性^[14]。化合物 4 和 5 是典型代表。化合物 4 和 1 的文多灵环结构相同,但长春质碱环却有很大不同:化合物 4 的 C 环中以八元环取代了原有的九元环,同时在 D 环的 3' 和 4' 之间形成双键。这种结构使 4 具有更强的亲脂性,更高的组织保持力,对有丝分裂微管亲和力更大^[15]。化合物 4 是美国 FDA 批准的用于治疗非小细胞肺癌的一线药物。

4.2 文多灵环的修饰

对文多灵环的结构修饰主要集中在 G 环。大多数 C-3 酰胺和 C-3 联胺衍生物具有药理活性^[16],与此相连的官能团常含有亲水基团或能提供与某一特定肿瘤组织作用的官能团。也有很多长春碱类衍生物在 C-4 位进行化学修饰,包括水解乙酰基形成 4-去乙酰衍生物,如化合物 3。Wright 等^[17]将 4-去乙酰衍生物的 4-羟基氧化为 4-酮基,也具有一定药理



化合物	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆ ¹⁾	n ²⁾
1	CH ₃	OH	OCH ₃	OCOCH ₃	CH ₂ CH ₃	OH	1
2	CHO	OH	OCH ₃	OCOCH ₃	CH ₂ CH ₃	OH	1
3	CH ₃	OH	NH ₂	OH	CH ₂ CH ₃	OH	1
4	CH ₃	OH	OCH ₃	OCOCH ₃	CH ₂ CH ₃	=	0
5	CH ₃	OH	OCH ₃	OCOCH ₃	CF ₂ CH ₃	=	0
6	CH ₃	OH	OCH ₃	OCOCH ₃	CH ₂ CH ₃	OH	1
7	CH ₃	OH	OCH ₃	OCOCH ₃	CH ₂ CH ₃	=	1

1) “=” 表示 C-3' 和 C-4' 间为双键; 2) n=0 表示此处的碳原子被脱去

图 1 长春碱类化合物的结构修饰

Fig. 1 Structure modification of vinblastine

活性。F 环上的 N-1 位是一个新的活性修饰中心。化合物 1 与 2 的结构在 N-1 位存在细微不同,但其药理活性差异很大^[18]。

4.3 长春碱类药物的活性中心

长春碱类药物所有的活性修饰中心都不是孤立的,进行结构修饰需要全面细致的考虑。结构中活性较强的作用点如长春质碱环 D 环的 3' 位和 4' 位,文多灵环的 G 环的 3 位和 4 位等是可以优先考虑的反应位点。在保证药理活性的前提下,还可以在一些非活性位点接入一些可增加药物水溶性的基团(如磷酸基、糖基等),或可提高药物靶向性的基团(如天然氨基酸、胆酸及某些单克隆抗体等)。目前,此种结构修饰已用于其他抗癌药物,如美法仑(melphalan)、雌莫司汀(estramustine)、卡莫司汀(carmustine)等。而长春碱类药物非活性位点的修饰还未见报道。

5 不良反应

应用长春碱后,多有不同程度的白细胞下降,部分病例下降较显著,停药后 1~2 周后才恢复正常,因此每次注射前应检查白细胞数,如低于 4 000,即使间隔已达 1 周仍不宜进行注射,须待恢复到 4 000 以上再注射;对红细胞、血小板影响较少。少数病人用药后可有食欲轻度下降及其他胃肠道反应(恶心、呕吐、便秘等),部分病人出现神经系统症状,如失眠、头晕、暂时性精神抑制、感觉异常、深部腱反射消失。此外,尚有口腔黏膜炎、尿潴留、窦性心动过速等;对动物骨髓及淋巴组织有明显抑制作用、精子形成障碍、肠黏膜浮肿、肠上皮细胞

变性坏死等,大量长期应用尚可出现肝细胞萎缩。对静脉有一定的刺激性,注射部位可有暂时疼痛,如漏出皮下,可引起局部坏死^[19]。

6 新剂型

6.1 长春新碱-IgG 结合物

余竹元等^[20]采用活性酯方法合成了长春新碱-IgG 结合物,即通过长春新碱的酯基与 *N*-羟基琥珀酰亚胺发生酯交换生成活性酯,再与 IgG 硼酸钠溶液反应生成长春新碱-IgG 结合物。但由于只有游离物才能发挥作用,结合物需在溶酶体内代谢成小分子游离物,因此结合物作用较迟缓。

6.2 控释膜

孙勇等^[21]以胶原作为释药载体制备硫酸长春新碱控释膜,然后植入动物体内,可使长春新碱在病灶局部达到控制释放、提高局部药物浓度、增强药物疗效;同时,由于药物能够缓慢释放,故可以减轻全身的毒副作用。

6.3 脂质体

赵妍等^[22]采用 pH 梯度法制备硫酸长春新碱脂质体,以阳离子交换树脂分离脂质体和游离药物,用 RP-HPLC 法测定脂质体的包封率,从而为制剂的质量评价与控制提供了可靠的依据。

6.4 传递体

卢懿等^[23]采用干膜超声法,通过正交试验优化了长春新碱传递体的制备工艺,以激光散射粒径分析仪测量粒径及其分布,透射电镜观察形态,HPLC 法测定包封率,用改良的 Franz 扩散池进行体外透皮试验。传递体是在普通脂质体磷脂双分子层中加入了表面活性剂,如胆酸钠等,除具有与皮肤亲和力好、安全无毒等普通脂质体的优点外,还具有高度柔韧性及高效渗透性,故药物能大量透过皮肤角质层到达深部真皮,进入淋巴管发挥治疗作用^[24]。

7 结语

长春花碱已广泛应用于癌症的治疗,但由于神经系统毒性和局部刺激性较大限制了其使用。科学工作者应加快对长春生物碱进行深层次的研究、开发和利用,以便制成高效、低毒的新剂型,并结合临床实际开发出更多更好的制剂,服务于患者。

参考文献

- [1] Beer C T, Cutts J H, Nobel R L. Vincalukoblastine and salts thereof [P]. Can: 653005, 1962-11-27.
- [2] 徐积恩. 抗肿瘤药长春花生物碱的研究 [J]. 药学进展, 1993, 17(2): 69-73.
- [3] Svoboda G H. The methodology of selective extraction and gradient pH extraction techniques [J]. *Lloydia*, 1964,

- 27(4):299-301.
- [4] Rao A V R, Venkatswamy G, Sathaye K M, *et al.* Selective isolation of vinblastine sulfate from *Vinca rosea* plants [P]. IN: 154331, 1984-10-20.
- [5] Kalman S, Janos E, Emil B, *et al.* Process for the selective separation of vinblastine, vinleurosine and vincristine or the salts thereof [P]. Can: 948625, 1974-06-04.
- [6] Jovanovics K, Szasz K. Isolation of vinblastine and leurosine [P]. Hung: 154715, 1968-04-30.
- [7] Atta-ur-Rahman, Bashir M, Hafeez M, *et al.* A rapid procedure for the isolation of catharanthine, vindoline and vinblastine [J]. *Planta Med*, 1983, 47(4):246-247.
- [8] Gunasekera S P. Method of isolating vinblastine [P]. WO: 8803135, 1988-05-05.
- [9] Stahl E, Willing E. Extraction of alkaloids with supercritical gases in direct coupling with thin-layer chromatography [J]. *Planta Med*, 1978, 34(2):192-202.
- [10] Choi Y H, Yoo K P, Kim J. Supercritical fluid extraction and liquid chromatography-electrospray mass analysis of vinblastine from *Catharanthus roseus* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2002, 50(9): 1294-1296.
- [11] Neuss N, Neuss M N. *The therapeutic use of bisindole alkaloids from Catharanthus roseus* [B]. In *The Alkaloids*. New York: Academic Press, 1990.
- [12] 崔 萍, 霍长虹, 李力更, 等. 作用于微管的天然产物 [J]. 中草药, 2010, 41(1): 139-147.
- [13] Binet S, Chaineau E, Fellous A, *et al.* Immunofluorescence study of the action of navelbine, vincristine and vinblastine on mitotic and axonal microtubules [J]. *Intern J Cancer*, 1990, 46: 262-266.
- [14] Fahy J. Modifications in the upper or velbenamine part of the vinca alkaloids have major implications for tubulin interacting activities [J]. *Curr Pharm Des*, 2001, 7(13): 1181-1197.
- [15] Lobert S, Ingram J W, Hill B T, *et al.* A comparison of thermodynamic parameters for vinorelbine and vinflunine induced tubulin self-association by sedimentation velocity [J]. *Mol Pharmacol*, 1998, 53(5): 908-915.
- [16] Cullinan G J, Gerzon K. Derivatives of 4-desacetyl vinblastine C-3 carboxyhydrazide [P]. US: 4166810, 1979- 09-04.
- [17] Wright I G, Neuss N. 4-Desacetoxo-4-oxovinblastine [P]. US: 4122082, 1978-10-24.
- [18] Verdier Pinard P, Gares M, Wright M. Differential *in vitro* association of vinca alkaloid induced tubulin spiral filaments into aggregated spirals [J]. *Biochem Pharmacol*, 1999, 58(6):959-971.
- [19] 周韵丽, 杨庆尧, 杨晓彤, 等. 从长春花中提取抗癌活性成分的新工艺[P]. 中国专利:1365978A, 2002- 08-28.
- [20] 余竹元, 马瑾瑜. 长春新碱-抗体结合物的抗肝癌作用 [J]. 肿瘤, 1989, 9(4):154.
- [21] 孙 勇, 周海英. 硫酸长春新碱控释膜药效学实验研究 [J]. 中国药房, 2000, 11(2):59.
- [22] 赵 妍, 于 彬, 邓意辉, 等. 主动载药法制备硫酸长春新碱脂质体及其包封率的测定 [J]. 中国药学杂志, 2005, 40(20):1559-1562.
- [23] 卢 懿, 侯世祥, 陈 彤, 等. 硫酸长春新碱传递体的制备及其离体透皮研究 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(12): 900-903.
- [24] 于兆海, 陈 刚. 长春花生物碱的提取、分离、鉴定、制剂研究概述 [J]. 中国药业, 2009, 18(14):85-86.