

• 实验研究 •

吉非替尼时辰给药 Lewis 肺癌荷瘤小鼠的药效学研究

张彬¹, 李明春^{2*}, 刘姣¹, 王培培¹, 刘亮¹

1. 青岛大学 医学院, 山东 青岛 266072

2. 中国人民解放军第401医院 药剂科, 山东 青岛 266071

摘要: **目的** 探讨吉非替尼按时辰给药荷瘤小鼠的药效学特点。**方法** 利用 C57BL/6 小鼠建立 Lewis 肺癌小鼠模型, 将荷瘤小鼠随机分成 7 组, 每组 8 只, 分别为对照组, 8:00、12:00、16:00、20:00、24:00 和次日 4:00 时给药的实验组 (A、B、C、D、E、F 组)。ig 给药 50 mg/kg, 对照组给予相同剂量含有羧甲基纤维素钠的蒸馏水。每天观察小鼠的生存质量和肛周红肿的数量; 每 3 天测定小鼠肿瘤的直径, 计算小鼠的肿瘤体积。经过 3 周的给药, 小鼠进行眼眶取血, 处死小鼠并剥离肿瘤, 称定质量, 计算抑瘤率。取部分肿瘤组织做病理切片, 观察肿瘤组织坏死情况; 同时取小鼠皮肤组织进行扫描电镜观察。运用 ELISA 技术检测血液中 IL-6 的水平。**结果** 吉非替尼可以明显地抑制荷瘤小鼠肿瘤的生长。与其他实验组比较, A 组 (8:00 时给药) 小鼠肿瘤体积增长最缓慢, 其抑瘤率最高, F 组 (次日 4:00 给药) 次之。病理学分析显示 A 组 (8:00 时给药) 的肿瘤组织坏死情况最严重。通过扫描电镜观察上皮细胞发现, A 组 (8:00 时给药) 和 F 组 (次日 4:00 时给药) 的上皮细胞损伤较轻, 其肛周红肿发生率和 IL-6 水平较其他实验组低。**结论** 吉非替尼对荷瘤小鼠的抗肿瘤作用和毒副作用存在一定的时辰节律性, 8:00 和 4:00 时疗效较好。

关键词: 吉非替尼; 非小细胞肺癌; 表皮生长因子受体; 时辰节律性; 肿瘤**中图分类号:** R965.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2014)06-0583-06**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.06.001

Chronopharmacology of gefitinib in the mouse model of Lewis lung carcinoma

ZHANG Bin¹, LI Ming-chun², LIU Jiao¹, WANG Pei-pei¹, LIU Liang¹

1. Medical College of Qingdao University, Qingdao 266071, China

2. Department of Pharmacy, No.401 Hospital of Chinese People's Liberation Army, Qingdao 266071, China

Abstract: Objective To compare the efficacy and adverse effects of gefitinib administration at different time points during a day on Lewis lung carcinoma in tumor-bearing mice. **Methods** The Lewis lung carcinoma model was built in C57BL/6 mice. The animals were randomly divided into seven groups ($n=8$), including control and A — F six experimental groups which were treated at 8:00, 12:00, 16:00, 20:00, 24:00, and the next day 4:00. Mice in the six experimental groups were ig given a single dose of gefitinib (50 mg/kg), and those in the control group were provided with distilled water containing sodium carboxymethylcellulose daily. The quality of life and perianal swelling was recorded every day, and the tumor volume was determined every three days. After three weeks of the administration of gefitinib to the mice, the tumor inhibition rate was calculated and some tumors were used for pathological analysis. And some skin tissues were sent to inspect by scanning electron microscope (SEM). The blood samples were collected for ELISA. **Results** Gefitinib could significantly inhibit the growth of tumor in C57BL/6 mice. The tumor volume of group A (administrated at 8:00) increased more slowly ($P < 0.01$), with the maximum tumor inhibition rate. Group F (administrated at the next day 4:00) took the second place. Histological analysis showed that tumor tissue necrosis in A group (administered at 8:00) was the severest. And SEM analysis showed less injury to the skin tissue when gefitinib was administered at 8:00 and the next day 4:00. The perianal swelling rate and IL-6 levels in A and F groups were lower than others. **Conclusion** Both the anti-tumor effect and toxicities of gefitinib display circadian rhythm. Administration at 8:00 and 4:00 can improve its efficacy.

Key words: gefitinib; nonsmall-cell lung cancer; epidermal growth factor receptor (EGFR); circadian rhythm; tumor

收稿日期: 2014-03-19

作者简介: 张彬 (1986—), 男, 硕士, 研究方向: 临床药理学。Tel/Fax: (0532)51872904 E-mail: zhangbin7@126.com

*通信作者 李明春 (1965—), 男, 主任药师, 研究方向: 临床药理学。Tel/Fax: (0532)51872904 E-mail: Lmc401y@163.com

肺癌是世界上高死亡率的恶性肿瘤之一,每年死于肺癌的病人约有 138 万人^[1]。在所有的肺癌患者中非小细胞肺癌约占 80%,其中有 1/3 的非小细胞肺癌患者被诊断出疾病时已经是肺癌晚期,并伴有转移^[2];伴有转移的患者生存期很短,一般低于 2 年。近年来,随着人们对肺癌的病理和生化特点的深入研究,分子靶向治疗非小细胞肺癌已经成为一个热门的研究领域。表皮生长因子受体(EGFR)信号转导通路及其酪氨酸激酶(TK)已经成为一个重要的靶点来治疗非小细胞肺癌。很多肿瘤细胞,包括非小细胞肺癌被检测出表皮生长因子酪氨酸激酶受体高表达,这种高表达的 TK 在肿瘤细胞的增殖、分化、侵袭和转移过程起着非常关键的作用^[3]。吉非替尼是一种口服的小分子靶向药物,在临床上已经得到了广泛的应用,用于治疗曾接受过铂类化疗药物的晚期非小细胞肺癌^[4]。

从单细胞生物到复杂的哺乳动物,生物节律性是广泛存在的^[5]。在哺乳动物中,生物钟的调节中心位于下丘脑前部的视交叉上核^[6-7]。有研究发现癌症的发生与生理节律性失调有密切关系^[8]。Filipski 等^[9]发现机体的生物钟在控制肿瘤生长方面起着关键的作用。目前发现很多化疗药物的疗效存在节律性,如 5-氟尿嘧啶、柔比多星和奥沙利铂等^[10-12]。但是未见关于吉非替尼在时辰药理学方面的相关报道,临床用药也没有规定具体的给药时间。因此,本文旨在研究吉非替尼时辰给药荷瘤小鼠的药效学特点,为进一步临床研究提供参考依据。

1 实验材料

1.1 仪器

DW—86WHO 型—86 °C 低温保存箱(澳柯玛公司);AE240 型电子天平(美国 Mettler 公司);JM—A 型电子天平(余姚市纪铭校验设备有限公司);光学显微镜(上海光学仪器厂);TGL16 型台式高速冷冻离心机(长沙英泰仪器有限公司);CB150 型 CO₂ 培养箱(德国 Binder 公司);S—4800 型扫描电子显微镜(日本日立公司);ELX—800 型全自动酶标仪(美国 BIO-TEK 公司)。

1.2 动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠,雌性,5 周龄,体质量 18~20 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物合格证号:SCXK(京)2012-0001。每个笼子 4 只小鼠,置于标准的明/暗周期饲养(明期:7:00—19:00,暗期:19:00—7:00),自由进水进食,

室内温度为(24±1)°C,湿度(60±10)%。

1.3 细胞

Lewis 肺癌细胞购于北京北纳创联生物技术有限公司,货号 ATCC CRL-1642。

1.4 药品和试剂

吉非替尼片(商品名易瑞沙,生产批号 JT926,规格 250 mg/片,阿斯利康制药有限公司)。高糖培养基(货号 SH30002.02,规格 500 mL/瓶)、胰蛋白酶(批号 NWK0489,规格 500 mL/瓶)、胎牛血清(批号 10132222,规格 500 mL/瓶)、青霉素/链霉素双抗(货号 SV30082.01,规格 100 mL/瓶)均购于美国 HyClone 公司。小鼠 IL-6 ELISA 试剂(货号 431307,美国 Biolegend 公司)。

2 方法

2.1 建立 Lewis 肺癌小鼠模型

Lewis 肺癌细胞培养在含 10%胎牛血清和双抗的高糖培养基中,并在 37 °C、5% CO₂ 条件下进行传代,收集对数期的肺癌细胞,调整细胞悬液浓度至 1×10⁶/mL,与小鼠右后肢内侧 sc 0.2 mL 该细胞悬液,接种 7 d 后肉眼可见肿瘤,即为肺癌小鼠模型构建成功^[13]。肿瘤直径生长至 5 mm 左右时即可进行分组。分组时肿瘤直径大于 8 mm 和小于 3 mm 的荷瘤小鼠均被排除。

2.2 分组和给药

取 56 只建立模型成功的荷瘤小鼠,将其随机分成 7 组,每组 8 只,分别为对照组,8:00、12:00、16:00、20:00、24:00 和次日 4:00 时给药的实验组(A、B、C、D、E、F 组)。实验组 ig 给予吉非替尼混悬液(5%羧甲基纤维素钠助悬剂),剂量为 50 mg/kg。对照组给予相同体积含 5%羧甲基纤维素钠的蒸馏水。

2.3 时辰给药对其抗肿瘤活性的影响

2.3.1 荷瘤小鼠生存质量和肿瘤体积的记录 每天观察并记录荷瘤小鼠的生存质量和毛的颜色,每 3 天用游标卡尺测定小鼠肿瘤的长径和短径。计算肿瘤的体积(体积=长径×短径²/2)。

2.3.2 肿瘤质量和抑瘤率的计算 经 3 周给药后,第 22 天在相应给药时间点以颈椎脱臼法处死小鼠,剥离肿瘤并测定肿瘤的质量,计算吉非替尼的抑瘤率^[13]。

抑瘤率=(对照组平均肿瘤质量-实验组平均肿瘤质量)/对照组平均肿瘤质量

2.3.3 组织病理学检查 将剥离的的肿瘤组织固定

于中性的福尔马林 48 h, 用乙醇脱水后石蜡包埋, 连续 5 μm 切片, HE 染色, 光镜观察。

2.4 时辰给药对其毒性作用的影响

2.4.1 皮肤细胞形态学观察 取各组小鼠的皮肤组织, 固定于含有 2.5% 戊二醛的磷酸盐缓冲液 (pH 7.2) 1 h, 然后固定于含有 1% 的锇酸 1 h, 用不同体积分数乙醇进行脱水, 用临界点干燥法干燥后镀膜进行扫描, 电子显微镜观察。

2.4.2 荷瘤小鼠肛周红肿的测定 时辰给药期间, 每天记录出现肛周红肿的荷瘤小鼠的数量, 用于衡量不同给药时间对吉非替尼所致腹泻的影响。

肛周红肿率=肛周红肿小鼠只数/每组小鼠的样本量

2.4.3 荷瘤小鼠血清中 IL-6 水平的测定 在处死小鼠以前对其进行眼眶静脉取血, 每只小鼠取 0.5 mL 血液标本, 12 000 r/min 离心 10 min 分离出血清, 用 IL-6 试剂盒按着说明书要求进行操作, 用酶标仪在 450 nm 处测定每个标本的吸光度值。

2.5 统计学方法

所有的数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 19.0 进行统计学分析, 组间比较选用单因素方差分析, 率的比较采用 χ^2 检验。

3 结果

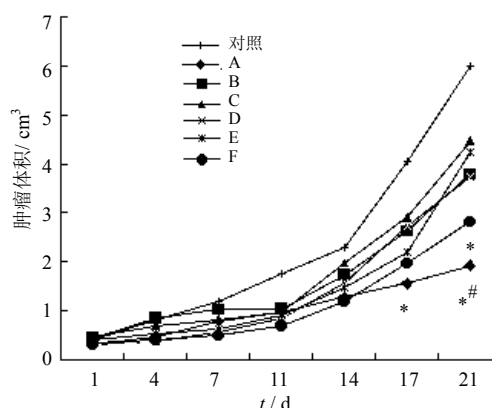
3.1 时辰给药对其抗肿瘤活性的影响

3.1.1 荷瘤小鼠的生存质量和肿瘤体积 给药 1 周后, 与对照组相比, A、B、F 组的小鼠行动比较活跃, 反应较为灵敏, 毛色也鲜亮; C、D、E 组的小鼠运动较为迟缓、反应迟钝、毛色暗淡。

随着实验的进展, 各组肿瘤体积逐渐增大, 其中对照组的小鼠肿瘤增长最为迅速, 尤其是实验后期; 与对照组比较, A~F 组的肿瘤生长较为缓慢, 与其他实验组相比, A 组的平均肿瘤体积最小, F 组次之, 在所有的实验组中 C 组的肿瘤长得最快 ($P < 0.05$)。见图 1。

3.1.2 荷瘤小鼠的肿瘤质量和抑瘤率 时辰给药吉非替尼对瘤质量和抑瘤率有明显的影响。A 组的瘤质量最小而抑瘤率最高 ($P < 0.05$), 而 C 组的瘤质量最大且抑瘤最低, F 组的抑瘤率比 A 组稍小, 差异无统计学意义。见表 1。

3.1.3 肿瘤组织病理学分析 对照组的肿瘤细胞排列紧密, 为低分化腺癌, 边界比较清晰; A 组和 F 组的肿瘤组织出现大量的灶型坏死, 细胞排列较稀疏, 纤维间质较少; 尽管 B、C、D、E 组肿瘤也出现了坏死, 但是与 A 组相比肿瘤组织坏死程度明显



与对照组或 C 组比较: * $P < 0.05$; 与 B、D 或 E 组比较: # $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs control or C group; # $P < 0.05$ vs B, D, or E group

图 1 各组肿瘤体积增长曲线 ($n=8$)

Fig. 1 Growth curves of tumor volume from each group ($n=8$)

表 1 各组的肿瘤质量和抑瘤率 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 1 Tumor weight and tumor inhibition rate in mice from each group ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组 别	肿瘤质量/g	抑瘤率/%
A	2.23 ± 0.62	59.01*
B	3.57 ± 1.74	34.38
C	3.62 ± 2.04	33.46
D	3.03 ± 1.17	44.30
E	3.43 ± 1.02	36.95
F	2.75 ± 1.37	49.45
对照	5.44 ± 1.57	

与 B、C 或 E 组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs B, C or E group

降低, C 组肿瘤组织坏死最少, 细胞的分化程度较低。见图 2。

3.2 时辰给药对其毒性作用的影响

3.2.1 皮肤组织细胞的形态学观察 对照组的皮肤组织细胞正常, 由于吉非替尼的影响实验组和对照组皮肤组织细胞明显不同, 对照组的细胞表面光滑, 细胞形状规则, 表面无纤维化物质, 不同实验组受吉非替尼影响不同, 以 A 组影响最轻, 细胞表面出现了少许纤维化物质; B、C、D、E 组皮肤损伤, 失水较为严重, 大量的纤维化物质覆盖于细胞表面, 以 C 组最为严重, F 组的纤维化程度位于 A 组和其他实验组之间。见图 3。

3.2.2 荷瘤小鼠肛门红肿比率和血清中 IL-6 水平 为了对比吉非替尼按时辰给药对荷瘤小鼠腹泻的影响, 以小鼠的肛周红肿和血清中 IL-6 水平为指标, 见表 2。

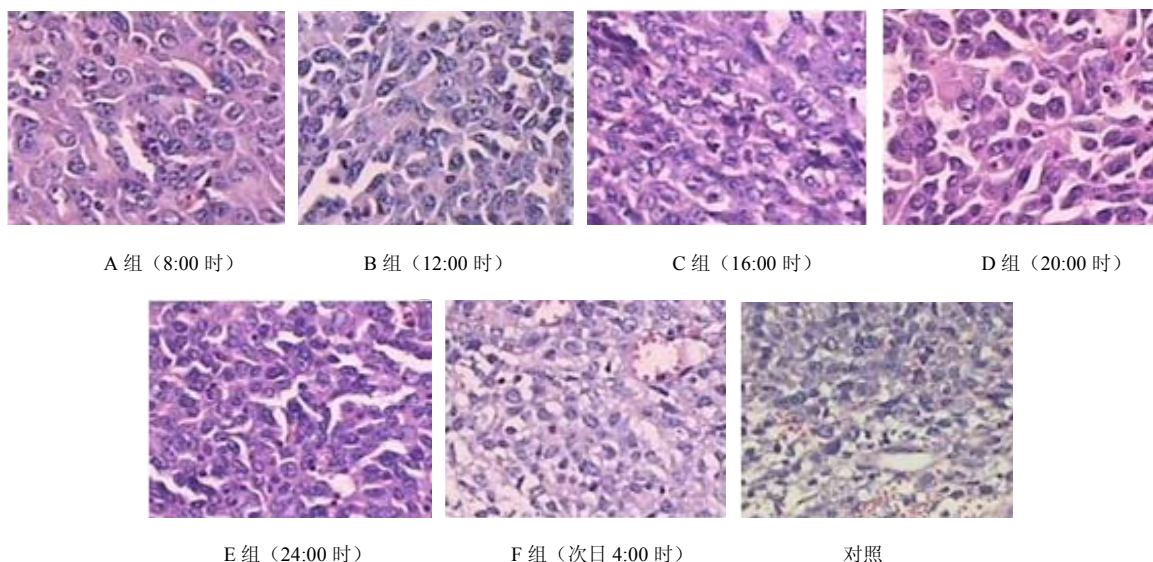


图 2 C57BL/6 荷瘤小鼠肿瘤组织病理切片图 (HE 染色×400)

Fig. 2 Histopathological observation of tumor in C57BL/6 mice (HE staining, ×400)

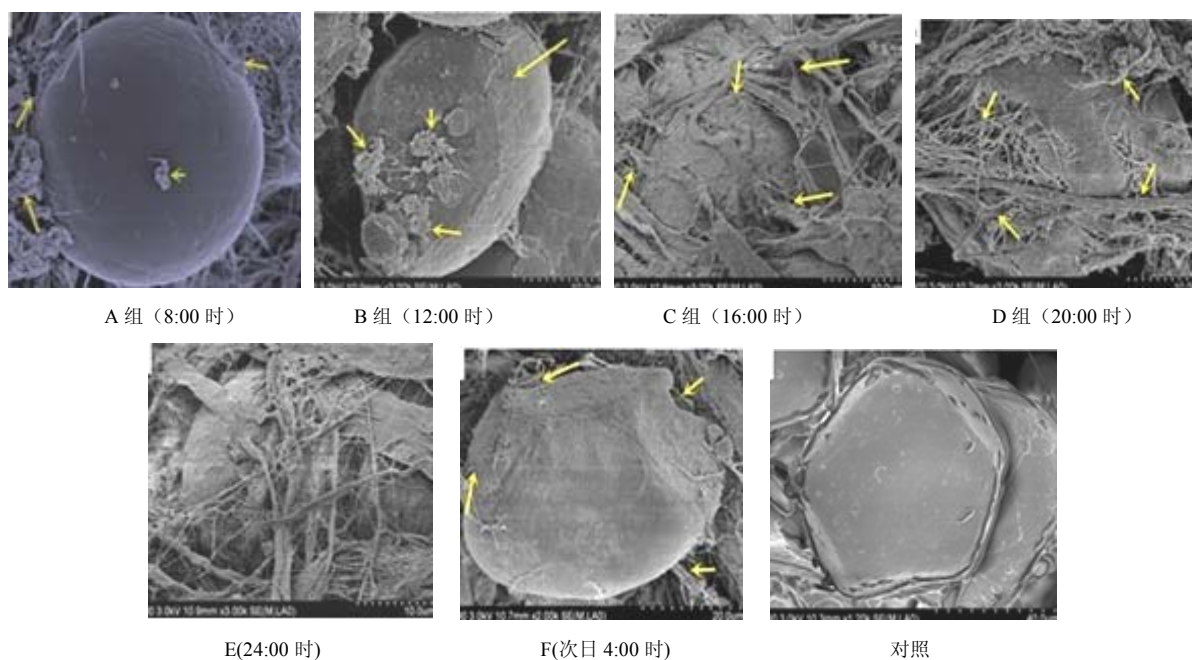


图 3 扫描电镜观察荷瘤小鼠的皮肤细胞

Fig. 3 Observation of skin cells in tumor bearing mice by SEM

不同实验组肛周红肿的比率有一定的差异,以 A 组的最低 (25%), D 组的比率最高 (62.5%)。IL-6 水平与小鼠肛周红肿的比例基本一致,对照组的分泌较少,与其他实验组相比, A 组血清中 IL-6 的含量最低 ($P < 0.05$)。

4 讨论

在过去的十几年中,吉非替尼作为第 1 个上市的小分子靶向药物一直用于晚期非小细胞肺癌的治

疗,随着对该肿瘤的相关基因蛋白的研究,该药的疗效逐渐得到了改善。该药治疗非小细胞肺癌的机制主要为竞争性结合 EGFR-TK 催化区域的镁-三磷酸腺苷 (Mg-ATP) 结合位点,阻断蛋白激酶的自身磷酸化和底物的磷酸化,进而阻断 EGFR 信号转导通路,最终导致肿瘤细胞死亡。

时辰药理学是近年来新兴的学科,其研究基础是生物节律性,为临床使用高效低毒的给药方案提

表 2 荷瘤小鼠的肛周红肿率和血液中 IL-6 水平比较
($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 2 Comparison on perianal swelling and IL-6 levels
in blood of tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组 别	肛周红肿率/%	IL-6/(pg·mL ⁻¹)
A	25.00	38.24±3.57 ^{*#}
B	37.50	64.15±5.79
C	50.00	96.64±6.32 [△]
D	62.50	196.18±4.88 [△]
E	50.00	48.47±4.92
F	37.50	61.61±6.55
对照	0	28.09±2.54

与 B 组比较: ^{*} $P<0.05$; 与 C 或 D 组比较: [#] $P<0.05$; 与对照
组比较: [△] $P<0.05$

^{*} $P<0.05$ vs B group; [#] $P<0.05$ vs C or D group, [△] $P<0.05$ vs control
group

供了广阔的平台。个体化用药和联合用药是以后肿瘤治疗的发展趋势, 时辰化疗在肿瘤的临床治疗中受到越来越多的重视, 其目标为提高肿瘤患者对化疗药物的耐受性, 提高抗肿瘤疗效。时辰给药方法的建立主要基于以下两点: 首先, 宿主敏感性最高时应当尽量减少或避免抗肿瘤药物的摄入; 其次, 宿主敏感性最低时且肿瘤细胞作用靶点活性最高时给药。本研究为吉非替尼在时辰药理学领域的探讨, 给药时间设计为 8:00、12:00、16:00、20:00、24:00 以及次日凌晨 4:00 时。不同时间给药后, 记录荷瘤小鼠的生活状态和肿瘤体积。结果表明吉非替尼对肺癌小鼠的抗肿瘤作用存在一定的节律性, 以 8:00 最优, 次日凌晨 4:00 时次之, 16:00—20:00 疗效相近, 以 16:00 时相对较差。

长期给药吉非替尼对模型小鼠的生存质量也有一定的影响, 以 A 组和 F 组的小鼠行动相对活跃, 反应灵敏, 毛色也较为鲜亮, 说明对小鼠的生存质量影响较小。尽管吉非替尼没有常见化疗药所导致的不良反应, 如细胞毒性、血液毒性等, 但是该药所导致的皮肤毒性在临床上发生率极高, 直接影响了患者的依从性和生存质量^[14]。实验采用扫描电镜观察不同时间给药对皮肤组织的损伤, 结果 A 组的皮肤损伤相对较轻, 与其他实验组比较, 该组皮肤细胞形状规则、失水少、细胞表面光滑、纤维化物质也较少, 从 F 组到 B、D、E、C 组损伤情况依次加重。

腹泻也是吉非替尼常见不良反应之一^[15], 通过记录实验组小鼠的肛周红肿发生率和细胞因子 IL-6

衡量不同组给药对腹泻的影响。有研究发现, IL-6 在胃肠道中起着非常重要的作用^[16]。当胃肠道失衡时, 尤其是腹内的 IL-6 明显升高, 调节对疾病的生理反应^[17]。A 组小鼠发生肛周红肿的比率很低 (25%), 而 IL-6 的分泌也最接近对照组 (38.24 pg/mL), D 组的最高 (196.18 pg/mL)。说明与其他实验组相比, A 组和 F 组对小鼠胃肠道毒性作用较小。

目前时辰化疗药物研究多集中于高细胞毒性抗肿瘤药, 吉非替尼的时辰药理学研究很少。其机制有待深入研究, 疗效呈现出节律性可能有两个原因, 一方面可能是由于信号转导通路中表皮生长因子酪氨酸激酶 (EGFR-TK) 呈节律性表达, 另一方面可能是由于睡眠早期 (上午) 和活动晚期 (凌晨) 其代谢酶 *cyp3a11*、*cyp3a13* 和 *cyp1a2* 的活性减弱, 睡眠晚期和活动早期, 其代谢酶活性增强, 使药物代谢加快、作用时间减少, 进而影响了其抗肿瘤作用。

总之, 吉非替尼在肺癌小鼠模型上的抗肿瘤作用和毒副作用存在一定的节律性, 本研究结果将有利于优化吉非替尼的给药模式, 并为进一步的临床试验提供参考依据。

参考文献

- [1] Parkin D M, Bray F, Ferlay J. Global cancer statistics, 2002 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2005, 55(2): 74-108.
- [2] Gandara D, Narayan S, Lara PN Jr, *et al*. Integration of novel therapeutics into combined modality therapy of locally advanced non-small cell lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(13): 5057-5062.
- [3] Jorissen R N, Walker F, Pouliot N, *et al*. Epidermal growth factor receptor mechanisms of activation and signaling [J]. *Exp Cell Res*, 2003, 284(1): 31-53.
- [4] Kim E S, Hirsh V, Mok T, *et al*. Gefitinib versus docetaxel in previously treated non-small-cell lung cancer (INTEREST): a randomized phase III trial [J]. *Lancet*, 2008, 372(9652): 1809-18.
- [5] Okamura H. clock genes in cell clocks:roles, actions, and mysteries [J]. *J Biol Rhythms*, 2004, 19(5): 388-399.
- [6] Bartness T J, Song C K, Demas G E, *et al*. SCN efferents to peripheral tissues: implications for biological rhythms [J]. *J Biol Rhythms*, 2001, 16(3): 196-204.
- [7] Panda S, Hogenesch J B. It is all in the timing many clocks many outputs [J]. *J Biol Rhythms*, 2004, 19(5): 374-387.
- [8] Sahar S, Sassone-Corsi P. Metabolism and cancer: the

- circadian clock connection [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(12): 886-896.
- [9] Filipski E, Lévi F. Circadian disruption in experimental cancer processes [J]. *Integr Cancer Ther*, 2009, 8(4): 298-302.
- [10] Abolmaali K, Balakrishnan A. Circadian variation in intestinal dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) expression: a potential mechanism for benefits of 5FU chrono-chemotherapy [J]. *Surgery*, 2009, 146(2): 269-273.
- [11] Arif I S, Hooper C L, Greco F, *et al.* Increasing doxorubicin activity against breast cancer cells using PPAR γ -ligands and by exploiting circadian rhythms [J]. *Br J Pharmacol*, 2013, 169(5): 1178-1188.
- [12] Yang K, Zhao N, Zhao D, *et al.* The drug efficacy and adverse reactions in a mouse model of oral squamous cell carcinoma treated with oxaliplatin at different time points during a day [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2013, 7: 511-517.
- [13] Chen S C, Chien Y C, Pan C H, *et al.* Inhibitory effect of dihydroausttrasulfone alcohol on the migration of human non-small cell lung carcinoma A549 cells and the antitumor effect on a Lewis lung carcinoma-bearing tumor model in C57BL/6J mice [J]. *Mar Drugs*, 2014, 12(1): 196-213.
- [14] Lee K H, Lee K Y, Jeon Y J, *et al.* Gefitinib in Selected Patients with Pre-Treated Non-Small-Cell Lung Cancer: Results from a Phase IV, Multicenter, Non-Randomized Study (SELINe) [J]. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*, 2012, 73(6): 303-311.
- [15] Cohen M H, Williams G A, Sridhara R, *et al.* United States Food and Drug Administration Drug Approval summary: Gefitinib (ZD1839; Iressa) tablets [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(4): 1212-1218.
- [16] Groblewska M, Mroczko B, Wereszczyńska-Siemiatkowska U, *et al.* Serum interleukin 6 (IL-6) and C-reactive protein (CRP) levels in colorectal adenoma and cancer patients [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2008, 46(10): 1423-1428.
- [17] O'Malley D, Dinan T G, Cryan J F. Interleukin-6 modulates colonic transepithelial ion transport in the stress-sensitive wistar kyoto rat [J]. *Front Pharmacol*, 2012, 3: 190.