

异长春花碱不同制剂的抗肿瘤作用比较研究

李学涛, 赵琳, 谭静净, 程岚*

辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600

摘要: 目的 比较异长春花碱 (VRB) 长循环脂质体、普通脂质体、重酒石酸盐注射液不同剂型的抗肿瘤作用。方法 建立 C57BL/6J 小鼠 Lewis 肺癌模型, 以肿瘤体积、小鼠生存时间、抑瘤率、组织病理切片为指标考察 VRB 不同制剂的抗肿瘤作用。结果 与模型组 (平均肿瘤体积为 $4\,980\text{ mm}^3$) 相比, VRB 长循环脂质体组、普通脂质体组和重酒石酸盐注射液组小鼠造模 30 d 后的平均肿瘤体积分别为 $1\,622$ 、 $2\,136$ 、 $3\,652\text{ mm}^3$ ($P < 0.05$ 、 0.01), 抑瘤率分别为 66.29%、49.44%、29.21% ($P < 0.01$); VRB 长循环脂质体组小鼠生存时间明显延长; 肿瘤组织病理切片观察可见各制剂组肿瘤细胞均出现不同程度的坏死, 其中 VRB 长循环脂质体组出现肿瘤细胞核凝固坏死、核破碎溶解现象。结论 在相同给药剂量下, VRB 长循环脂质体的抗肿瘤作用明显优于其重酒石酸盐注射液。

关键词: 异长春花碱; 长循环脂质体; 抗肿瘤; Lewis 肺癌; 脂质体

中图分类号: R979.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)09-1794-05

Comparison on antitumor effects of different vinorelbine preparations

LI Xue-tao, ZHAO Lin, TAN Jing-jing, CHENG Lan

School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

Abstract: **Objective** To compare the antitumor effects of vinorelbine (VRB) long-circulation liposome (VLCL), VRB conventional liposome (VCL), and VRB bitartrate injection (VBI). **Methods** Lewis lung carcinoma model (C57BL/6J) was established, and the antitumor effects of different VRB preparations were evaluated with the indexes of tumor volume, survival time, inhibitory rate, and pathological section. **Results** After 30 d of model establishment, the average tumor volumes of mice in VLCL, VCL, and VBI groups were $1\,622$, $2\,136$, and $3\,652\text{ mm}^3$, respectively ($P < 0.01$). The survival time of mice in VLCL group was obviously prolonged. The tumor inhibitory rate of mice in VLCL, VCL, and VBI groups were 66.29%, 49.44%, and 29.21%, respectively ($P < 0.05$, 0.01). The tumor cell necrosis in different degrees was found in various administrated groups by using pathological section. Coagulation necrosis, disintegration, and dissolution of tumor cell nucleus could be observed in VLCL group. **Conclusion** Compared with VBI, VLCL could increase the antitumor effects remarkably in the same doses.

Key words: vinorelbine (VRB); long-circulation liposomes (LCL); antitumor; pharmacodynamics; Lewis lung carcinoma; liposome

异长春花碱 (vinorelbine, VRB) 通过作用于肿瘤细胞微管蛋白而干扰肿瘤细胞代谢, 在临床上主要用于治疗非小细胞肺癌、急性淋巴细胞白血病、转移性乳腺癌, 也用于何杰金及非何杰金淋巴瘤、软组织肉瘤及神经母细胞瘤等的治疗^[1]。VRB 口服吸收差, 需静脉注射, 临床上使用的 VRB 重酒石酸盐注射液 (诺维本) 给药后能迅速分布全身, 但其对神经系统及注射局部正常组织的刺激性大, 表现出明显的不良反应^[2]。长循环脂质体通过表面结构修饰, 在脂质体表面形成厚的立体位阻层, 该结构可以阻碍 apoA-1 的结合和破坏, 延长脂质体在体

循环的时间, 延长药物半衰期, 从而提高抗肿瘤药物的抑瘤效果^[3]。本实验将 VRB 制备成普通脂质体、长循环脂质体, 观察这 2 种制剂以及 VRB 重酒石酸盐注射液给予 Lewis 肺癌小鼠后, 对小鼠肿瘤体积、生存时间、肿瘤生长等的影响, 同时结合肿瘤组织切片的病理学观察, 比较 VRB 不同制剂对荷瘤小鼠肿瘤的影响。

1 材料

1.1 药品与试剂

VRB, 批号 20080512, 海南国栋药业有限公司提供; VRB 普通脂质体 (批号 091011)、VRB 长

收稿日期: 2011-11-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (1110172)

作者简介: 李学涛 (1979—), 男, 山东临沂人, 副教授, 研究方向为新型给药系统。Tel: (0411)87586010 E-mail: lixuetao1979@yahoo.cn

*通讯作者 程岚 Tel: (0411)87586010 E-mail: sychenglan@163.com

循环脂质体(批号 091011),均由辽宁中医药大学自制;VRB 重酒石酸盐注射液(诺维本注射液),法国皮尔法伯制药公司,批号 090802;DMEM 细胞培养基,宜兴市赛尔生物化工厂;新生牛血清,杭州四季青生物工程材料有限公司;C-0021 HE 染色试剂盒,上海研域化学试剂有限公司。

1.2 仪器

Biological Safety Cabinets 超净工作台,日本 Sanyo 公司;AY220 电子分析天平,日本岛津公司;KQ3200 超声波清洗器,江苏昆山市超声仪器有限公司;JY92—2D 超声波细胞捣碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;LRH—250—SII 恒温恒湿培养箱,广东省医疗器械厂;IX50—12 生物显微镜,日本奥林巴斯株式会社;可调式移液器(50、100、200、400 μL),上海求精生化公司;IP67 数显游标卡尺,大连志博贸易有限公司。

1.3 动物

C57BL/6J 小鼠,5~7 周龄,体质量(20 $\pm$ 2) g,雌雄各半,购于大连医科大学实验动物中心,合格证号 SCXK(辽)2008-0002。

2 方法

2.1 脂质体制备

2.1.1 VRB 长循环脂质体的制备 取 VRB 25 mg、卵磷脂 82.7 mg、胆固醇 40.5 mg、DSPE-PEG 2000 7.5 mg 溶于 10 mL 氯仿中,39.5 $^{\circ}\text{C}$ 下减压旋转蒸发 60 min 除去氯仿,保持水浴温度 39.5 $^{\circ}\text{C}$,向形成的均匀白色薄膜中加入磷酸盐缓冲液(pH 7.6)至 25 mL,水化 30 min,超声(50 kHz)20 min,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得。

2.1.2 VRB 普通脂质体的制备 取 VRB 25 mg、卵磷脂 82.7 mg、胆固醇 40.5 mg 溶于 10 mL 氯仿中,按“2.1.1”项下的方法制备即得^[4]。

2.1.3 脂质体中 VRB 的测定 按照预试验确定的方法对上述 2 种脂质体中 VRB 的量进行控制^[5],结果制备的 VRB 脂质体与 VRB 长循环脂质体中 VRB 质量浓度均为 1.0 mg/mL。

2.2 肿瘤模型制备

对数生长期 Lewis 肺癌细胞(来自中国科学院上海生命科学研究院细胞库,液氮长期保存,用前复苏),光学显微镜下计数,0.25%胰酶消化后 1 000 r/min 离心 10 min,0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液洗涤,用无血清的 DMEM 制成细胞悬液,细胞密度 6.0 $\times$ 10⁶/mL。小鼠右前肢消毒,取 Lewis 肺癌细胞悬液

0.2 mL 接种于皮下,待肿瘤长至 1 000 mm³ 时颈椎脱臼处死小鼠,在超净工作台上剥离瘤体,选择生长良好的瘤组织剪碎、称质量,置于玻璃组织匀浆器内,按瘤块(g)-生理盐水(mL)1:3 加入 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的生理盐水轻轻研磨,制成细胞悬液,过 300 目尼龙网,制成单细胞悬液,用生理盐水调整细胞密度至 1 $\times$ 10⁶/mL 用于实验^[6]。

2.3 分组与给药

取 68 只 C57BL/6J 小鼠,雌雄各半,适应 24 h 后按“2.2”项下方法接种肿瘤细胞,接种 24 h 后随机分为 4 组,即模型组、VRB 重酒石酸盐注射液组、VRB 普通脂质体组、VRB 长循环脂质体组,每组 17 只。模型组小鼠尾 iv 生理盐水,VRB 3 个制剂组尾 iv 1.0 mg/mL(剂量为 10 mg/kg,根据临床使用剂量折算得出)相应药物各 0.2 mL。以癌细胞接种当天记为 0 天,2 d 后开始给药,每日同一时间给药 1 次,连续给药 80 d。

2.4 检测指标

2.4.1 一般状况 接种肿瘤细胞后每日于同一时间观察各组所有小鼠的身体状况和活动情况。

2.4.2 肿瘤体积 给药期间各组每天观察 5 只小鼠的肿瘤生长情况,并从第 5 天开始称小鼠体质量,采用数显游标卡尺对荷瘤小鼠的肿瘤长径和短径进行测量,计算肿瘤体积。

$$V = b^2 \times a \times 0.52$$

V 为肿瘤体积, a 为肿瘤长径, b 为肿瘤短径

2.4.3 生存时间 给药期间每组观察 8 只小鼠的生存情况,记录生存时间,结果采用 SPSS 16.0 统计软件进行 Survival analysis 分析,预测各组动物生存曲线。

2.4.4 抑瘤率 分别于给药后第 16 天每组处死小鼠 4 只,剥离瘤体,分析天平称质量。计算抑瘤率。

抑瘤率=(模型组平均瘤质量-给药组平均瘤质量)/模型组平均瘤质量

2.4.5 肿瘤组织病理观察 小鼠肿瘤组织经 10%福尔马林固定 24 h 后常规石蜡包埋,4 mm 厚连续切片,HE 法染色,普通显微镜下($\times 400$)观察肿瘤组织病理情况并摄片。

2.5 统计学处理

应用 SPSS 16.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析和 Survival analysis 检验。

3 结果

3.1 对小鼠一般状况的影响

接种 Lewis 肺癌细胞 5 d 后,各组小鼠右前肢

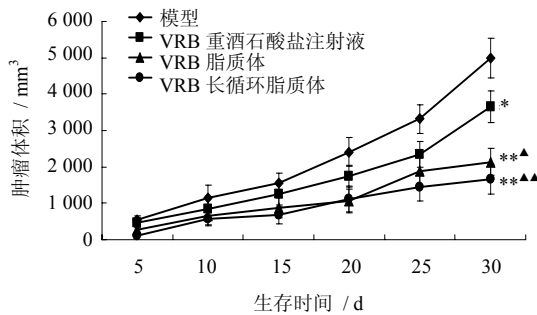
腋下均出现突起,触之有结节,提示有肿瘤出现;10 d 后各组小鼠肿瘤生长速度明显加快,小鼠出现活动减少、喜聚群、毛发缺少现象。VRB 各制剂组小鼠脱毛现象轻于模型组,活动力强于模型组,荷瘤小鼠的生存状况得到改善。

3.2 对小鼠肿瘤体积的影响

接种 Lewis 肺癌细胞后第 5 天,各组小鼠成瘤率均为 100%。接种 Lewis 肺癌细胞 30 d 后,模型组小鼠的肿瘤生长速度较快;VRB 重酒石酸盐注射液组、VRB 普通脂质体组、VRB 长循环脂质体组小鼠的肿瘤生长缓慢,肿瘤平均体积分别为 3 652、2 136、1 662 mm³,与模型组小鼠(4 980 mm³)相比差异显著($P<0.05$ 、 0.01)。VRB 普通脂质体和长循环脂质体明显抑制小鼠肿瘤生长,减小肿瘤体积,与 VRB 重酒石酸盐注射液组相比差异显著($P<0.05$ 、 0.01)。结果见图 1。

3.3 对小鼠生存时间的影响

模型组小鼠平均生存时间为 22.75 d;VRB 长



与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

与 VRB 重酒石酸盐注射液组比较: ▲ $P<0.05$ ▲▲ $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group

▲ $P<0.05$ ▲▲ $P<0.01$ vs VBI group

图 1 VRB 不同制剂对荷瘤小鼠肿瘤体积的影响
($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 1 Effects of different VRB preparations on tumor volume of tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

循环脂质体组和普通脂质体组小鼠平均生存时间分别为 65.88、42.63 d。与模型组相比,生命延长率分别为 189.58%、87.38%,其中 VRB 长循环脂质体的作用更明显。结果见图 2、表 1。

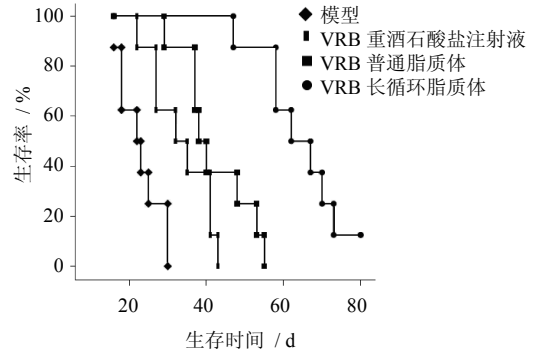


图 2 VRB 不同制剂对荷瘤小鼠生存曲线的影响 ($n=8$)

Fig. 2 Effects of different VRB preparations on survival rate of tumor-bearing mice ($n=8$)

3.4 抑瘤率考察

VRB 重酒石酸盐注射液组小鼠瘤质量约 0.63 g,抑瘤率为 29.21%,瘤质量与模型组(0.89 g)相比无显著差异($P>0.05$)。VRB 普通脂质体、VRB 长循环脂质体组的瘤质量分别为 0.45、0.30 g,抑瘤率分别为 49.44%、66.29%,瘤质量与模型组相比差异显著($P<0.05$ 、 0.01)。与 VRB 重酒石酸盐注射液组相比,VRB 脂质体组抑瘤率无显著差异($P>0.05$),而 VRB 长循环脂质体组则有显著差异($P<0.05$);VRB 脂质体组与长循环脂质体组间无显著差异($P>0.05$)。结果见表 2。

3.5 肿瘤组织病理观察

模型组肿瘤细胞排列密集,细胞生长旺盛,呈腺样增生,核不对称分裂明显。VRB 各制剂组出现不同程度的肿瘤细胞坏死,细胞较为稀疏,腺样增生不明显,其中长循环脂质体组可见明显的肿瘤细胞核凝固坏死、核破碎溶解的现象。结果见图 3。

表 1 VRB 不同制剂对荷瘤小鼠生存时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Effects of different VRB preparations on survival time of tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	生存时间 / d	生命延长率 / %	95%置信区间
模型	22.75 ± 1.77	—	19.28~26.22
VRB 重酒石酸盐注射液	33.88 ± 2.59**	48.92	28.79~38.96
VRB 脂质体	42.63 ± 3.13▲▲	87.38	36.48~48.77
VRB 长循环脂质体	65.88 ± 4.35▲▲	189.58	57.34~74.41

与模型组比较: ** $P<0.01$; 与 VRB 重酒石酸盐注射液组比较: ▲▲ $P<0.01$

** $P<0.01$ vs model group; ▲▲ $P<0.01$ vs VBI group

表2 VRB制剂对荷瘤小鼠肿瘤质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 2 Effects of different VRB preparations on tumor weight of tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	肿瘤质量 / g	抑瘤率 / %
模型	0.89±0.19	—
VRB 重酒石酸盐注射液	0.63±0.12	29.21
VRB 脂质体	0.45±0.11*	49.44
VRB 长循环脂质体	0.30±0.08**▲	66.29

与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

与 VRB 重酒石酸盐注射液组比较: ▲ $P<0.05$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group

▲ $P<0.05$ vs VBI group

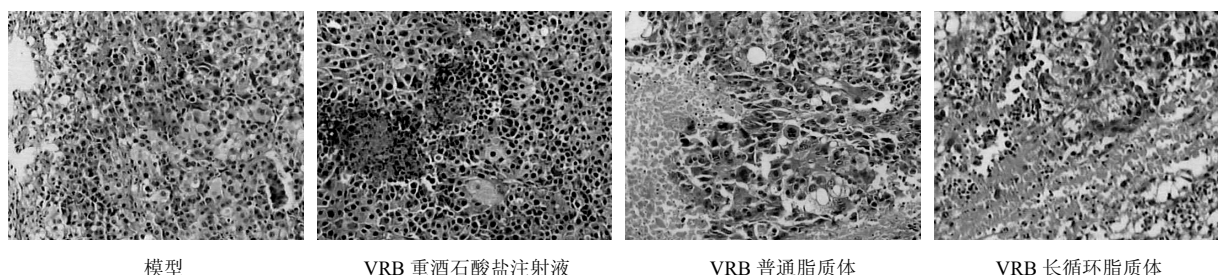


图3 各组小鼠肿瘤组织病理学观察

Fig. 3 Pathological observation in tumor tissues of mice in each group

目前临床上常用的抗肿瘤药物缺乏对肿瘤部位的特异亲和性而导致药物全身广泛分布, 很大剂量的药物才能在肿瘤部位产生较满意的治疗剂量, 因此抗肿瘤药物对正常组织常常产生明显的不良反应。脂质体特别是长循环脂质体作为药物的载体可以较好地解决上述问题。表面经聚乙二醇等亲水基团修饰后的长循环脂质体或空间稳定脂质体, 在血液循环中更稳定, 血液循环时间明显延长, 从而增加了药物对靶器官的标记率, 达到降低药物不良反应的目的^[9-10]。

肿瘤细胞分泌大量血管生长因子, 使肿瘤组织附近形成丰富的血管网。由于肿瘤新生微血管形状构造不规则、膨胀、管壁缺失、内皮细胞排列疏松, 增加了血管壁的渗漏性和通透性。长循环脂质体中聚乙二醇在脂质体表面交错覆盖, 形成有效的空间位阻和血流屏障, 这种厚的立体位阻层阻碍了 apoA-1 的结合和破坏, 从而延长了其在体循环中的时间, 使脂质体有充足时间能够被肿瘤组织和炎症部位所充分吸收, 减少了被网状内皮系统摄取的速率和程度。因此 VRB 长循环脂质体微粒较易渗入肿瘤部位, 作用于实体瘤, 使肿瘤体积减小、质量减轻、生长速度趋缓^[11]。

4 讨论

VRB 通过作用于肿瘤细胞微管蛋白而干扰肿瘤细胞代谢, 游离的 VRB 在体内主要与机体的血液细胞结合 (78% 药物与血小板结合)^[7]。不同剂型的 VRB 在体内的生物半衰期均大于 30 h^[8]。VRB 重酒石酸盐注射液的临床剂量为 30 mg/m², 1 次/周, 其输注后沿此静脉再输入 250 mL 等渗盐水冲洗以降低药物对注射部位血管的刺激性。本课题研究的目的在于借助长循环脂质体的靶向作用, 提高 VRB 对肿瘤组织的抑瘤效果, 降低其对正常组织的损伤和注射部位血管的刺激性。

本实验结果显示, 与 VRB 普通脂质体、长循环脂质体相比, 其重酒石酸盐注射液的抗肿瘤活性较低, 原因在于重酒石酸盐注射液在荷瘤小鼠体内分布较广泛, 对肿瘤组织缺乏靶向性^[12]。VRB 长循环脂质体良好的抗肿瘤作用为其进一步开发提供了实验依据。

参考文献

- [1] 祖元刚, 罗 猛. 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): 325-329.
- [2] Aapro M S, Harper P, Johnson S A, *et al.* Developments in cytotoxic chemotherapy: Advances in treatment utilizing vinorelbine [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2001, 40(3): 251-263.
- [3] Takeuchi H, Kojima H, Yamamoto H, *et al.* Evaluation of circulation profiles of liposomes coated with hydrophilic polymers having different molecular weights in rats [J]. *Controlled Release*, 2001, 75(1): 83-91.
- [4] 李学涛, 程 岚, 贾天柱, 等. 星点设计优选异长春花碱脂质体的处方 [J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27(8): 605-609.
- [5] 李学涛, 赵 琳, 程 岚, 等. HPLC 法测定异长春花碱脂质体中药物的含量 [J]. 世界科学技术, 2011, 13(6): 1070-1073.

- [6] 梁朝霞, 谢 幸, 叶大风. 小鼠肿瘤模型的研究进展 [J]. 国外医学: 卫生学分册, 2004, 31(4): 212-216.
- [7] Gauvin A, Pinguet F, Poujol S, *et al.* High performance liquid chromatographic determination of vinorelbine in human plasma and blood: Application to a pharmacokinetic study [J]. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2000, 748(2): 389-399.
- [8] Zhang H Y, Tang X, Li H Y, *et al.* A lipid microsphere vehicle for vinorelbine: Stability, safety and pharmacokinetics [J]. *Int J Pharm*, 2008, 348(1/2): 70-79.
- [9] Junga S H, Jung S H, Seong H, *et al.* Polyethylene glycol-complexed cationic liposome for enhanced cellular uptake and anticancer activity [J]. *Int J Pharm*, 2009, 382(1/2): 254-261.
- [10] Awasthi V D, Garcia D, Coins B A, *et al.* Circulation and biodistribution profiles of long-circulating PEG-liposomes of various sizes in rabbits [J]. *Int J Pharm*, 2003, 253(12): 121-132.
- [11] 时 军, 程 怡, 陈伟鸿, 等. 足叶乙苷长循环脂质体的抑瘤性作用 [J]. 中国新药杂志, 2010, 19(20): 1881-1884.
- [12] 李学涛, 赵 琳, 程 岚, 等. 异长春花碱脂质体的制备及其在小鼠体内的组织分布 [J]. 中国药房, 2012, 23(9): 788-790.



analytica China

慕尼黑上海分析生化展

第六届中国国际分析、生化技术、诊断和实验室技术博览会暨 analytica China 国际研讨会

2002-2012 服务行业十周年 10TH ANNIVERSARY2012年10月16-18日
上海新国际博览中心

www.a-c.cn

行业巨头齐聚申城，展示全球领先生化分析技术——“analytica China 2012”十月上海揭幕

2012年10月16~18日，世界分析、实验室技术和生化技术领域的顶级盛会 analytica 在华子展—慕尼黑上海分析生化展 (analytica China) 将在上海新国际博览中心 N1、N2 馆隆重揭幕。展会将积极配合全球生物技术领域的发展，云集国内外行业领军企业，集中展示最新科学仪器、尖端分析测试技术，提供全方位的实验室技术解决方案，以满足不同行业买家的采购需求。此外，展会同期举办的 analytica China 国际研讨会也将是业内人士关注的焦点，其聚集了整个行业的热点及发展，是科学技术和行业技术相互传递技术信息的理想场所。

Analytica China 自 2002 年首度进入中国以来，已经走过了 10 个年头。10 年中有超过 10 万名来自全球各个行业的科研人员、仪器用户、实验室工作人员、设备厂商等参与了历届展会，共同见证了 analytica China 的成长与辉煌。2012 年 10 月，在主办方庆祝 analytica China 第 1 个 10 岁生日的同时，也将迎来有史以来规模最大的一届展会！

Analytica China 2012 展示面积将达 2.5 万平方米，较 2010 年展会增加了 20%，规模再攀新高。为期 3 天的展会将吸引来自 22 个国家及地区的近 600 家国内外知名企业踊跃参与，其中国际展商比例超过了 40%，充分显示了 analytica China 的国际影响力。与此同时，日本、德国、英国和韩国将组织大规模国家展团集体亮相 analytica China，力求为观众带来更多元化的解决方案。

已确认参展的企业包括：Agilent、Waters、岛津、HORIBA、耶拿、美诺、东西、Jasco、Bruker、赛默飞世尔、日立、梅特勒托利多、瑞士万通、天地、天瑞、东西仪器、海光等等。此外，作为 analytica China 2012 重要展区之一的“生物技术与生命科学展区”吸引了包括 Life technologies、Eppendorf、Tecan、罗氏、蔡司、博奥、哈美顿、康宁、普兰德、仪科等行业龙头的加盟。众多国内外行业知名企业的纷纷进驻，再次验证了 analytica China 在中国乃至亚洲的领先地位。

2012 慕尼黑上海分析生化展网上观众预登记现已开通，立即登陆 <http://www.a-c.cn> 在线进行观众预登记，即可获取免费入场、展会会刊、欢迎礼包等多项优惠。如于 2012 年 9 月 28 日或之前成功登记，更可以于开展前收到观众胸牌，提前入场。