

附子多糖与阿霉素蛋白磁微球靶向治疗的抗肿瘤协同作用

董兰凤¹, 刘京生², 宋淑霞¹, 王贺明¹, 吕占军^{1①}

(¹河北医科大学实验动物学部, 石家庄 050017; ²河北省医学科学院微生物室, 石家庄 050021)

【摘要】 目的: 观察附子多糖和阿霉素蛋白磁微球联合外磁场对S-180 荷瘤小鼠的抗肿瘤协同作用, 探讨其抗肿瘤机理。方法: 以荷瘤小鼠的瘤重为指标观察药物的抗肿瘤活性; 以乳酸脱氢酶释放法测定NK 细胞活性, MTT 法测定淋巴细胞转化率, 流式细胞术检测肿瘤细胞凋亡、肿瘤细胞的增殖指数及 p53、Fas、FasL 表达, RT-PCR 法测定 IL-2 及 IL-12 的表达, 探讨抗肿瘤机理。结果: 阿霉素蛋白磁微球靶向治疗或与附子多糖共同作用, 均可显著减小荷瘤小鼠的瘤重; 提高NK 细胞活性和淋巴细胞转化率, 减小肿瘤细胞的增殖指数, 提高肿瘤细胞凋亡率及FAS、FASL 的表达; 增加脾脏淋巴细胞 IL-2 及 IL-12 的表达。结论: 阿霉素蛋白磁微球联合磁场靶向治疗可以增强抗肿瘤作用, 降低副作用; 附子多糖能增强阿霉素蛋白磁微球靶向治疗的抗肿瘤作用, 其抗肿瘤协同作用主要是通过提高机体的免疫功能实现的。

【关键词】 附子多糖; 阿霉素蛋白磁微球; 抗肿瘤; 靶向治疗

【中图分类号】 R965 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-5048(2003)06-0549-05

阿霉素(adriamycin, ADM)是一种常用的抗肿瘤化疗药, 由于长期静脉注射会导致心血管系统损伤等严重副作用, 故其临床应用受到了限制。制备阿霉素蛋白磁微球联合磁场靶向治疗, 使药物在肿瘤局部浓集, 可以有效地减小副作用, 提高抑瘤效果^[1-3]。中药多糖的抗肿瘤作用已被广泛地报道和验证, 我们研究发现附子多糖具有良好的抑瘤作用^[4]。为了能达到更好的抗肿瘤效果, 最大限度地减小对机体正常组织的损伤, 本实验研究了附子多糖与阿霉素蛋白磁微球靶向治疗的抗肿瘤协同作用并探讨其抗肿瘤作用机制, 为临床更有效地控制和治疗肿瘤提供实验依据。

1 实验材料

1.1 动物

BALB/c 小鼠, 体重(18±2)g, 雄性。清洁动物, 由河北医科大学实验动物学部小动物室提供, 合格证号: 冀医动管字 04082。

1.2 细胞株

H22、YAC-I 由河北医科大学实验动物学部小动物室冻存。

1.3 药品与试剂

中药附子(黑附片)购于石家庄市乐仁堂; 阿霉

素(浙江海正药业股份有限公司); Fe₃O₄纳米磁粒(上海交大纳米中心馈赠); 钕铁硼磁体(直径 10 mm×3 mm, 4 T, 包头市磁性材料厂); 刀豆蛋白(ConA), MTT, RNasin, 琼脂糖(Sigma 公司); MAV 反转录酶, Random primer(Promega 公司分装); Taq DNA Polymerase(SABA 公司); dNTPs(BM 公司); 异硫氰酸胍(Serva 公司); DNA ladder 100, PCR 引物 GAPDH(325bp)(北京鼎国生物工程公司); PCR 引物 IL-2(167 bp), IL-12(309 bp)(华美生物工程公司)。

1.4 主要仪器

KQ118 型超声波处理仪(昆山市超声仪器有限公司); 酶联免疫分析仪(上海第三分析仪器厂); PCR 仪(英国 Hybaid 公司); 3K30 型低温高速离心机(德国 Sigma 公司); 电光分析天平(上海天平仪器厂); DYY-III8B 型稳压稳流电泳仪, WD-9403B 型紫外投射仪(北京六一仪器厂); 超低温冰箱(日本三洋); CO₂ 培养箱(德国 Heraeus); Q550IW 图象分析仪(Win 95Q win 图象分析软件)(德国 Leica); FACS 420 型流式细胞检测仪(美国 B. D 公司)。

2 实验方法

2.1 附子多糖(MPS)的提取

① **【收稿日期】** 2003-01-28 **【*通讯作者】** Tel: 0311-6266844 E-mail: LSLab@hebm. edu. cn

【基金项目】 河北省自然科学基金资助项目(No. 00276414D)

参照文献^[3]方法,采用热水抽提、Sevag 法脱蛋白、乙醇醇沉法得附子总多糖,以 α -萘酚法测定多糖。用蒸馏水溶解,浓度为 0.01 g/ml。

2.2 制备阿霉素蛋白 磁微球(Adriamycin magnetic microsphere, ADM-MAM)

参照文献^[4]方法,将 Fe_3O_4 纳米磁粉、阿霉素和入血清白蛋白按 5 :3 :14 比例混悬。加入到精制棉籽油 30 ml 中超声匀化,将匀化液在搅拌下逐滴加入到预热到 130 $^{\circ}\text{C}$ 棉籽油 100 ml 中,持续电搅拌(1 600 r/min)10 min,放冷后加入 2 滴 Tween-80 再次超声乳化,用乙醚 60 ml 清洗离心,反复清洗 3 次,置于暗处挥干乙醚,即得粉红色粉末状沉淀物,4 $^{\circ}\text{C}$ 存放。该沉淀物具有很强的磁反应性,测定其阿霉素的包封率为 50%。用灭菌生理盐水溶解后使用。

2.3 抑瘤实验及相关指标检测

2.3.1 荷瘤模型与给药途径 H22 肿瘤细胞株,小鼠腋下接种 0.2 ml/只 (5×10^6 个/ml),造成荷瘤小鼠模型。分组给药: MPS+ADM+CT 组:于荷瘤第 2 天开始,每天连续灌胃(ig) MPS (200 mg/kg),共 10 d。DW+ADM+CT 组:同法灌胃等量蒸馏水(DW)。此两组于荷瘤第 5 天均尾静脉注射(iv) ADM-MAM 0.4 ml (5 mg/kg 体重),注射后立即在肿瘤部位固定一块钕铁硼小磁铁(CT),两天后再注射 1 次,共 2 次; MPS+ADM-CT 组:同上灌胃 MPS。DW+ADM-CT 组:同上灌胃 DW。此两组同法注射 ADM-MAM 后,立即在肿瘤部位固定一块相同的非磁性铁片。对照组:灌胃 DW,尾静脉注射生理盐水(NS),肿瘤部位固定非磁性铁片。于荷瘤第 13 天摘眼球放血处死小鼠,观察和测定以下指标。

2.3.2 抑瘤率 剥离肿瘤称重,计算抑瘤率^[7]。

2.3.3 流式细胞术检测 取部分肿瘤组织剪碎,70%乙醇固定,流式细胞仪观察肿瘤细胞凋亡和增殖情况,测定 P53、FAS、FAS-L 等因子的表达。

2.3.4 乳酸脱氢酶(LDH)释放法测定自然杀伤(NK)细胞活性 小鼠脾细胞为效应细胞, YAC-I 为靶细胞,效靶比为 100 :1。测定在 570 nm 处的 OD 值,按下式计算 NK 细胞活性。NK=[(实验组 OD 值-自然释放组 OD 值)/(最大释放组 OD 值-

自然释放组 OD 值)] $\times 100\%$ 。
2.3.5 经典 MTT^[8] 法测定淋巴细胞转化率 实验组加 ConA (终浓度为 10 $\mu\text{g/ml}$),对照组不加 ConA,测定 570 nm 处 A 值。以刺激指数(SI)为指标判断淋巴细胞转化程度。

SI=实验孔 A 值/对照孔 A 值

2.3.6 RT-PCR 方法检测脾脏淋巴细胞 IL-2mRNA 及 IL-12mRNA 的表达

RNA 提取及鉴定 异硫氰酸胍一步法提取 RNA,1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

PCR 引物设计 IL-2(167 bp)

上游引物: 5' TGA TGG ACC TAC AGG AGC TCC TGA G 3'

下游引物: 5' GAG TCA AAT CCA GAA CAT GCC GCA G 3'

IL-12(309 bp)

上游引物: 5' AAC CTC ACC TGT GAC ACG CC 3'

下游引物: 5' CAA GTC CAT GTT TCT TTG CAC C 3'

GAPDH(325bp)

上游引物: 5' GGT CGG AGT CAA CGG ATT TG 3'

下游引物: 5' ATG AGC CCC AGC CTT CTC CAT 3'

RT-PCR 反转录 逆转录产物 1/20 为模板进行 PCR。GAPDH: 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 共 30 个循环。IL-2: 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 62 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共 30 个循环。PCR 产物行 2% 琼脂糖凝胶电泳并照相。

3 实验结果

3.1 抑瘤率

各给药组均能显著减轻荷瘤小鼠的瘤重,与对照组比较差异显著 ($P<0.001$; 静脉注射 ADM-MAM 加磁场的同时,灌胃 MPS, 能显著提高抑瘤率 ($P<0.01$); 静脉注射 ADM-MAM 加磁场组与不加磁场组相比,抑瘤率显著提高 ($P<0.05$) (表 1)。

Tab 1. Weight and inhibitory of tumor (g) in different experimental groups of mice ($\bar{x}\pm s$)

Groups	n	Wt of tumor(g)	Inhibitory (%)
Control	8	2.48 \pm 0.31	—
MPS+ADM-MAM+CT	8	0.94 \pm 0.09 ^{*Δ#}	62.10
DW+ADM-MAM+CT	7	1.18 \pm 0.22 [*]	52.42
MPS+ADM-MAM	8	1.35 \pm 0.26 [*]	45.56
DW+ADM-MAM	8	1.76 \pm 0.21 [*]	29.03

^{*} $P<0.001$ vs control; $\Delta P<0.01$ vs MPS+ADM-MAM; [#] $P<0.05$ vs DW+ADM-MAM+CT

3.2 流式细胞术检测结果

注射 ADM-MAM 加磁场组肿瘤细胞的凋亡率明显提高, 细胞增殖指数明显降低, FAS 及 FASL 的表达明显升高 (与注射 ADM-MAM 不加磁场组相比, $P<0.001$ 或 $P<0.01$); 注射 ADM-MAM 加磁场的同时, 灌胃 MPS 组与灌胃 DW 组比较, 肿瘤细胞的增殖指数明显降低, FASL 的表达明显增高 (表 2, 图 1)。

3.3 LDH 法和 MTT 法测定结果

尾静脉注射 ADM-MAM 加磁场的同时, 灌胃 MPS 组与灌胃 DW 组比较, NK 细胞活性和淋巴细胞转化率均明显提高; 灌胃 MPS 的同时, 尾静脉注射 ADM-MAM 加磁场组与不加磁场组比较, NK 细胞活性和淋巴细胞转化率均明显提高 (见表 3)。

Tab 3 NK cells killer activity and the spleen lymphocyte proliferation of different groups ($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	NK(%)	SI
Control	8	7.86±3.01	1.26±0.09
MPS+ADM-MAM+CT	8	29.10±8.57***##	1.70±0.18***
DW+ADM-MAM+CT	7	11.53±5.44	1.30±0.06
MPS+ADM-MAM	7	10.56±5.08 Δ	1.42±0.08
DW+ADM-MAM	7	6.87±2.51	1.22±0.03

*** $P<0.001$, ** $P<0.01$ vs DW+ADM+CT; ## $P<0.001$, # $P<0.05$ vs MPS+ADM-MAM; $\Delta P<0.05$ vs DW+ADM-MAM

3.4 RT-PCR 检测结果

静脉注射 ADM-MAM 加磁场的同时, 灌胃 MPS 组与灌胃 DW 组比较, 显著提高脾脏淋巴细胞 IL-2 及 IL-12 的表达; 灌胃 MPS 的同时, 静脉注射 ADM-MAM 加磁场与不加磁场组比较, 显著提高脾淋巴细胞 IL-2 及 IL-12mRNA 的表达 (图 2)。

Tab 4. Apoptosis and proliferation index and p53, Fas and FasL expressions of tumor cells in different experimental groups ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Groups	Apoptosis (%)	PI	P53	FAS	FAS-L
MPS +ADM-MAM+ CT	8.13±0.11**	0.21±0.03***##	55.00±4.58	71.00±6.24**	60.33±5.03***
DW+ADM-MAM+CT	6.96±0.64	0.32±0.02	54.00±4.36	70.33±4.04	56.67±5.23
MPS +ADM-MAM	4.97±0.06	0.31±0.01	56.85±2.18	64.67±5.68	54.55±5.77
DW+ADM-MAM	5.17±1.37	0.42±0.02	50.67±4.04	63.32±4.73	53.33±4.04

*** $P<0.001$, ** $P<0.01$ vs MPS +ADM-CT; ## $P<0.001$, # $P<0.05$ vs DW+ADM+CT

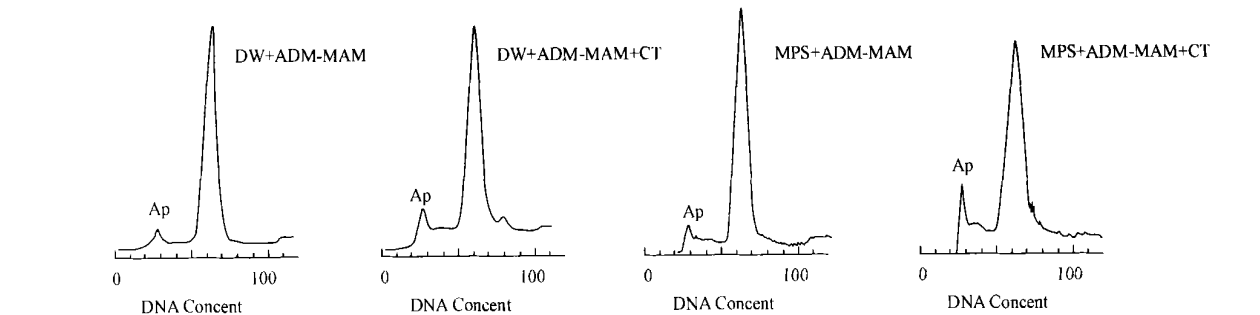


Fig 1. Analysis of sub-G₁ peak (Ap) of tumor cells by flow cytometry

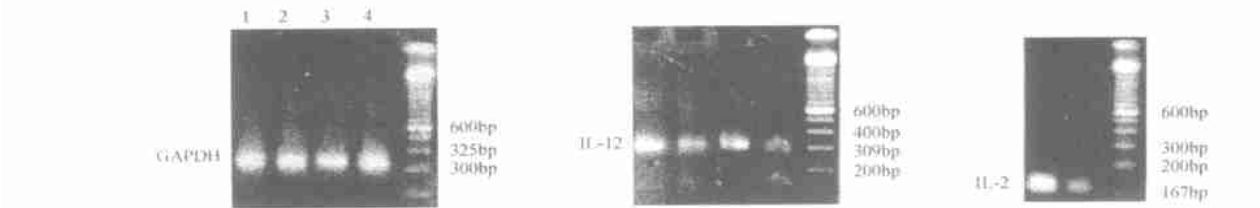


Fig 2 Expressions of IL-2 and IL-12mRNA in splenocyte from different experimental groups of mice
1 MPS+ADM-MAM+CT; 2 DW+ADM-MAM+CT; 3. MPS+ADM-MAM; 4 DW+ADM-MAM

4 讨论

如何能使药物选择性地浓集于肿瘤部位而不增加其在正常组织中的浓度,是目前抗肿瘤药应用的技术关键^[9]。磁性药物载体联合外磁场靶向给药,能使药物在靶部位浓集,提高疗效^[10]。制备阿霉素蛋白磁微球并使其粒度控制在 1 μm 左右,适合于静脉注射给药。微球作为载体,可以延缓药物的释放,防止阿霉素在转运过程中过早地失活。肿瘤部位外加磁场,能够使药物在肿瘤部位浓集,增强对肿瘤组织的杀伤而减小对正常组织的损伤^[11]。本研究结果表明:尾静脉注射阿霉素蛋白磁微球,肿瘤部位联合外磁场与不加磁场比较,能显著增强对 H22 荷瘤小鼠的抑瘤作用。作用机理是降低肿瘤细胞增殖指数并通过上调 FAS 及 FASL 的表达而诱导肿瘤细胞凋亡;同时又明显增加荷瘤小鼠的 NK 细胞活性和脾淋巴细胞转化率,上调脾淋巴细胞 IL-2、IL-12 的表达(与非磁场组相比差异显著, $P < 0.01$),从而相对提高了机体的免疫功能。提示阿霉素蛋白磁微球外加磁场靶向治疗,能使阿霉素在肿瘤部位的浓度增加,减少了其在其它正常组织中的分布,选择性地对肿瘤组织进行杀伤,减小了对正常组织的损伤,保护了机体的免疫功能。这与在磁导向下磁性药物载体可以定向分布于靶区,而在肝、肾、骨髓等的积蓄明显减小,显著减轻对肝、肾、骨髓的损害作用的报道^[9]是一致的。

中药多糖与细胞毒类化疗药合用可明显增强其对肿瘤的抑瘤作用,减少化疗药的用量,降低毒性^[12]。但未见有关中药多糖与化疗药靶向治疗共同作用的研究报道。我们对附子多糖已经进行了抗肿瘤实验研究,表明其有较好的抗肿瘤作用并能提高机体的免疫功能^[4]。本实验在阿霉素靶向治疗的同时给予附子多糖,旨在用不同的途径综合治疗,以期达到更好的抗肿瘤效果。实验结果表明,灌胃附子多糖加阿霉素磁靶向治疗与单纯阿霉素磁微球外加磁场靶向治疗相比,抑瘤效果显著提高($P < 0.01$),抑瘤率高达 62.1%。同时显著提高了

荷瘤小鼠的 NK 细胞活性、脾淋巴细胞转化率及 IL-2 和 IL-12 的表达。表明附子多糖与阿霉素蛋白磁微球靶向治疗共同作用对 H22 荷瘤小鼠具有抗肿瘤协同作用。

参考文献

- [1] JM Gallo, PK Gupta, C T Hung, *et al.* Evaluation of drug delivery following the administration of magnetic albumin microspheres containing adriamycin to the rat [J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1989, **78**(3): 190-194
- [2] Christoph A, Wolfgang A, Roswitha JK, *et al.* Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting [J]. *Cancer Res*, 2000, **60**: 6641-6648.
- [3] Lübbe AS, Bergemann C. Magnetically-controlled drug targeting [J]. *Cancer J*, 1998, **11**(3): 104-106.
- [4] 董兰凤,刘京生,苗智慧,等. 附子多糖对 H22 和 S-180 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用研究 [C]. 中国免疫学会第四届学术大会会议议程及论文摘要, 2002, **12**: 267-268
- [5] 阮期平(Yuan QP), 周立(Zhou L), 赵莉(Zhao L), 黄附子中性多糖和酸性多糖的分离、纯化与鉴定. 中国生化药物杂志(*Chin J Biochem Pharm*), 2000, **21**(1): 20-22
- [6] 马建华(Ma JH), 陈道达(Chen DD), 田源(Tian Y), 等. 阿霉素磁性蛋白微球的改良法制备 [J]. 中华实验外科杂志(*Chin J Exp Surg*), 2002, **19**(3): 272-273.
- [7] 马占好(Ma ZH), 张春艳(Zhang CY), 刘旭(Liu X), 等. 黄芪多糖对小鼠体内六种细胞系瘤株抑瘤作用的实验研究 [J]. 中医药学报(*J Chin Med Pharmacol*), 1996 **4**: 55-56.
- [8] FANG Zheng, YU Xinbing, LIU yanwen, *et al.* Immune responses to the products of the CSP antigen expressed gene of plasmodium falciparum southern China isolate FCC1/HN in Hela cell [J]. *Chinese Medical Journal*, 2001, **114**(8): 844-847.
- [9] Lübbe AS, Alexiou C, Bergemann C. Clinical applications of magnetic targeting [J]. *Journal of Surgical Research*, 2001, **95**: 200-206
- [10] Devineni D, Gallo JM, Szanto A. Tissue distribution of methotrexate following administration as a solution and as a magnetic microsphere conjugate in rats bearing brain tumors [J]. *J Neurooncol*, 1995, **24**: 143-152.
- [11] 于耀宇(Yu YY), 李安民(Li AM), 章翔(Zhang X), 等. 磁性药物载体脑定向分布对肝肾及骨髓的影响 [J]. 中华实验外科杂志(*Chin J Exp Surg*), 2000, **17**(4): 350-351
- [12] 左增艳(Zuo ZY), 柳钟勋(Liu ZX), 李健蕊(Li JR), 等. 新型生物反应调节剂、当归多糖(ASDP)抗肿瘤作用及对荷瘤小鼠免疫功能的影响 [J]. 中国免疫学杂志(*Chin J Immunol*), 2000, **16**(10): 545-546.

Cooperative Effects of Monkshood Polysaccharide with Adriamycin Magnetic Albumin Microsphere Targeting Therapy on Tumor

DONG Lan-Feng, LIU Jing-Sheng, SONG Shu-Xia, WANG He-Ming, LU Zhan-Jun

Experiment Animal Department, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China

【ABSTRACT】 AIM: To observe the cooperative inhibitory effects of monkshood polysaccharide (MPS) with adriamycin magnetic albumin microsphere (ADM-MAM) targeting therapy on tumor and to study the antitumor mechanism.

METHOD: The antitumor activity was observed using the tumor weight as index, the antitumor mechanism was studied as follows: the activity of natural killer cells and the lymphocyte transformation capacity were examined by the LDH and MTT method respectively, the apoptosis of tumor cell and the expressions of p53, FAS, FASL were examined by flow cytometry and the expressions of IL-2 and IL-12 were determined by RT-PCR. **RESULT:** The tumor weight of the mice was significantly reduced by ADM-MAM targeting therapy or cooperated with MPS compared with the control group. The activity of natural killer cells and the lymphocyte transformation capacity were obviously increased. The PI index of tumor cell was obviously decreased and the expressions of FAS and FASL were obviously increased. The expressions of IL-2 and IL-12 were significantly increased. **CONCLUSION:** The antitumor activity can be enhanced and the side effect can be reduced by ADM-MAM together with external magnetic field targeting therapy, and the effect was even better cooperated with MPS. The cooperative antitumor effect was fulfilled by enhancing the cellular immunologic function.

【KEY WORDS】 Monkshood polysaccharide; Adriamycin magnetic albumin microsphere; Antitumor; Targeting therapy

。学术活动。

第七届全国药物与化学异物代谢学术会议在宁召开

2003年10月24日至29日,由中国药理学会药物代谢动力学专业委员会主办、中国药科大学承办、日本岛津公司协办的“第七届全国药物与化学异物代谢学术会议”在南京召开。出席会议的有来自美国等国家及全国各省市药理学和药物代谢动力学研究领域的研究人员共311人。

此次大会围绕“药物和化学异物代谢和动力学研究的进展思路与方法”、“中药与天然药物代谢动力学研究”等主题安排了19场精彩的大会报告。为发挥行业学会对专业技术政策的影响作用,会议专门安排了一场以“新药药代动力学研究指导原则”为主题的专家和药审中心代表的研究技术研讨会,就国家药品审评中心药代动力学研究指南的修改和制订提出宝贵了意见和建议。

在分组学术交流报告会上,近50位青年研究人员报告了近年来在药物代谢动力学研究模型、理论、代谢酶和多态性、生物分析方法和新技术应用、临床前和临床药代动力学研究等方面的研究成果,反映了我国在此领域中的研究水平。

会议期间选举产生了新一届专业委员会,我校王广基副校长当选为第一副主任委员,药学院刘晓东副院长当选为秘书长。