

果胶阿霉素的抗肿瘤活性研究

张雪梅^{1,2}, 唐小海^{1,2}, 张光祥¹, 冉茂盛², 黄源芳², 彭琳^{1,2}

(1. 四川师范大学 生命科学学院, 四川 成都 610101; 2. 重庆莱美药业股份有限公司, 重庆 401336)

摘要: 探讨果胶阿霉素的抗肿瘤活性, 将果胶与阿霉素经过缩合反应生成果胶阿霉素轭合物(PAC); 通过高压均质和冷冻干燥的方法制备成 PAC 纳米混悬剂; 采用 CCK-8 方法考察 PAC 对 8 种人源性肿瘤细胞株的生长抑制作用; 以 KM 小鼠 H22 腹水为模型, 考察 PAC 对腹水瘤的抗肿瘤活性、对免疫器官的影响以及 H22 腹水小鼠生存期的影响; 初步考察 PAC 对 KM 小鼠的急性毒性, 并与阿霉素作对比. PAC 对 8 种人源性肿瘤细胞株均有抑制作用, 在阿霉素质量浓度为 4、8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 对各种肿瘤细胞的生长抑制率达到 50% 以上. PAC 能有效地抑制 H22 腹水的生长, 在阿霉素质量分数为 2.5、5、10 mg/kg 时产生的腹水量分别为 3.32 ± 0.41 、 0.96 ± 0.17 、 0 mL . 生存期方面, 从接种肿瘤后至 45 d 时, PAC 10 mg/kg 组未出现小鼠死亡, PAC 5 mg/kg 组和 2.5 mg/kg 组存活率分别为 75%、60%, 阿霉素组 2.5 mg/kg 存活率 80%, 而对照组在 25 d 以内全部死亡. PAC 对 KM 小鼠的 LD50 为 49.32 mg/kg , 而阿霉素对 KM 小鼠的 LD50 为 14.70 mg/kg . 结论: PAC 能有效地抑制细胞的生长, 有良好的抗肿瘤作用. PAC 能有效地抑制 H22 腹水的产生, 对免疫器官的影响小于阿霉素, 能明显延长腹水癌小鼠的生存期. PAC 的 LD50 较 ADM 提高了 2.36 倍, 毒性反应大大降低, 有望开发成一种高效低毒的高分子抗癌药物.

关键词: PAC; ADM; EPR 效应; 抗肿瘤; H22 腹水; LD50

中图分类号: R979.1 文献标志码: A 文章编号: 1001-8395(2016)06-0905-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-8395.2016.06.024

阿霉素(ADM)是从放线菌发酵液中提取的重要的氨基糖苷类抗生素,可抑制 DNA 和 RNA 的合成,抗瘤谱较广,用于治疗血液系统癌症、各种实体瘤和肉瘤.由于 ADM 是小分子,给药后分布到全身各部位,没有靶向性,在杀灭癌细胞的同时也危害正常细胞,在达到抗癌疗效的同时也产生严重的毒副作用,特别是有明显的心脏毒性和肾毒性^[1-3].此外,由于多药耐药性以及 ADM 在体内较短的半衰期,大大限制了该药的临床应用^[4-6].为了改变 ADM 进入体内后的分布情况,以及减小毒副作用,靶向给药系统应运而生,特别是近几十年得到快速发展.靶向给药系统(TDS)系利用载体负载药物,通过局部给药或全身血液循环选择性地使药物浓集于靶器官、靶组织、靶细胞以提高疗效、降低毒副作用的新型给药手段.将 ADM 与高分子聚合物果胶通过酰胺键反应相结合,由于增强通透和滞留效应(EPR 效应)以及肿瘤细胞较强的吞噬作用,该轭

合物在肿瘤细胞大量积累,在溶酶体的作用下释放出有效成分,用于定向治疗肿瘤,以提高其治疗效果和降低毒副作用^[7-8].该轭合物与传统的药物相比,使靶部位的药物质量浓度增加了数倍,有的甚至达到数十倍^[9-11],在肿瘤定向治疗领域具有很好的应用前景.

许多恶性肿瘤,如胃癌、肝癌、卵巢癌易发生腹膜转移癌后形成癌性腹水.目前常用治疗腹膜转移癌的治疗方法为手术加全身化疗,但不能有效地提高患者的生存质量.腹腔注射高分子前药,一方面可以减少化疗药物本身对腹膜的刺激性,另一方面由于腹膜-血浆屏障的存在,可以防止腹膜对大分子药物的吸收,使腹腔内维持高质量浓度的药物质量浓度,外周血管则保持相对较低的药物质量浓度,因此增加了药物对游离癌细胞的细胞毒作用^[12],能有效改善患者的生存期和生活质量,是一种值得推荐的治疗方案.

收稿日期: 2015-11-17

基金项目: 科技部新药创制“科技重大专项”(2011ZX09102-001)

* 通信作者简介: 唐小海(1963—),男,教授,主要从事靶向抗肿瘤药物的研究, E-mail: pharmmateceo@aliyun.com.cn

1 材料和方法

1.1 药品试剂、仪器与细胞株 1) 药品试剂: DMEM 高糖培养基、青霉素链霉素溶液、PBS 缓冲液、新生小牛血清(赛默飞世尔生物化学制品北京有限公司); CCK-8 检测试剂(DOJINDO); 注射用盐酸 ADM(深圳万乐药业有限公司); PAC(实验室制备); 2) 仪器: 生物倒置显微镜(上海光学仪器厂); 培养箱(SANYO); 离心机(XiangYi); 超净工作台(苏静安泰); 水浴锅(上海跃进医疗器械有限公司); 酶标仪(Thermo FC); 3) 细胞株与动物: SMMC-7721; Bel-7402; MCF-7/ADR; HCT-116; HeLa; SiHa; SKOV3; HO-8910; K562; H22. 以上细胞由四川大学生物治疗国家重点实验室惠赠. KM 小鼠(成都达硕生物科技有限公司).

1.2 方法

1.2.1 PAC 纳米混悬剂的制备 将果胶与 ADM 通过缩合剂发生酰胺化反应生成 PAC 轭合物. 用紫外分光光度法测定其载药量为 15%. 再采用高压均质法制备 PAC 纳米混悬剂, 测得其粒径为 150 nm 左右, 通过冷冻干燥方法制备成制剂^[13].

1.2.2 CCK-8 方法检测 PAC 的体外抗肿瘤活性

取对数生长期的各种肿瘤细胞制成单细胞悬液, 计数并调整细胞体积浓度大约为 10^5 个/mL, 取 96 孔板, 每孔加入 100 μ L 的细胞悬液, 大约 5 000 个细胞, 放入 37 $^{\circ}$ C, 体积分数 5% CO_2 的孵箱, 12 h 后, 将细胞分成 3 组: ADM 组、PAC 组、阴性对照组. ADM 组加入质量浓度梯度的药物(8、4、2、1、0.5、0.25 μ g/mL). PAC 组根据载药量计算, 加入质量浓度梯度的 ADM 质量浓度(8、4、2、1、0.5、0.25 μ g/mL), 每个质量浓度设置 4 个复孔. 设置不加药物的阴性对照组以及不加细胞和不加药物的空白对照组. 放入 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO_2 孵箱, 孵育 48 h. 轻轻吸掉孔内的液体, 每孔加入 90 μ L 的新鲜培养基, 再加入 10 μ L 的 CCK-8 检测试剂, 放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 孵箱孵育 2 h 后, 在酶标仪 450 nm 处检测光密度(OD 值). 计算药物对细胞的抑制率为

$$\text{抑制率} = \frac{[(\text{OD}_0 - \text{OD}_{\text{空白}}) - (\text{OD}_{\text{实验}} - \text{OD}_{\text{空白}})]}{(\text{OD}_0 - \text{OD}_{\text{空白}})}$$

1.2.3 PAC 对 H22 腹水瘤的抗肿瘤活性 取液氮保存的 H22 细胞株一支, 放入 37 $^{\circ}$ C 的水浴锅, 使其

快速融化, 加入生理盐水重悬, 离心 1 000 r/min, 3 min. 弃掉上层液体, 细胞加入 1 mL 的生理盐水重悬. 取正常的雌性 KM 小鼠, 腹腔注射 0.2 mL 的细胞悬液, 待小鼠长出腹水后, 传 1~2 代后, 在无菌条件下取腹水, 离心 1 000 r/min, 3 min, 弃掉上层液体, 沉淀的细胞用生理盐水重悬, 混匀后用台盼蓝进行细胞计数, 确认活细胞数大于 95%. 根据计数结果调整细胞浓度为 1×10^7 个/mL. 取 100 只体重在 18~22 g 的正常雌性小鼠, 每只腹腔接种 0.1 mL 的细胞悬液. 3 d 后, 称取小鼠体重, 将小鼠分成 5 组: PAC 10 mg/kg 组、PAC 5 mg/kg 组、PAC 2.5 mg/kg 组、ADM 2.5 mg/kg 组和阴性对照组(相同体积的生理盐水). 按照体重腹腔给药, 间隔 3 d 第二次按照上述方法给药. 给药期间, 观察小鼠的毛发、食欲、精神状态等情况. 第二次给药 3 d 后, 每组小鼠随机取 10 只小鼠称体重后全部脱颈椎处死, 无菌条件下收取腹水, 计算腹水的重量. 解剖取小鼠的胸腺、脾脏称重, 计算小鼠的胸腺、脾脏指数. 每组剩余 10 只饲养, 考察动物的生存期. 动物的饲养条件: 温度 25 $^{\circ}$ C, 湿度 60%. 饲养条件为 SPF 级(无特定病原体), 整个实验研究过程遵从实验动物饲养管理和使用指南.

1.2.4 PAC 的急性毒性 将 120 只 KM 小鼠随机分成 12 组, 每组 10 只, 腹腔注射 PAC 混悬液, 给药剂量分别为 ADM 质量分数 19.69、26.25、35.00、46.67、62.22、82.96 mg/kg, 剂间比为 0.75. 腹腔注射 ADM 溶液, 给药剂量分别为 8.00、10.00、12.50、15.63、19.53、24.41 mg/kg, 剂间比为 0.8. 给药后观察 14 d, 记录各组动物食欲、精神状态以及死亡数, 计算 LD50(半数致死量, 简称 LD50).

2 结果

2.1 PAC 对 8 种人源性肿瘤细胞的抑制作用

PAC 对 8 种人源性肿瘤细胞均有较好的抑制作用, 并与质量浓度呈正相关. 对 SMMC-7721、Bel-7402、HCT-116、SiHa、SKOV3、K562、HO-8910 的生长抑制作用与 ADM 相当($P > 0.05$), 在质量浓度为 ADM 质量浓度 8.4 μ g/mL 时, 对肿瘤细胞的生长抑制率达到 50% 以上. 对耐 ADM 细胞株 MCF-7/ADR 的生长抑制作用好于 ADM($P < 0.05$). 各种药物质量浓度-抑制率曲线见图 1.

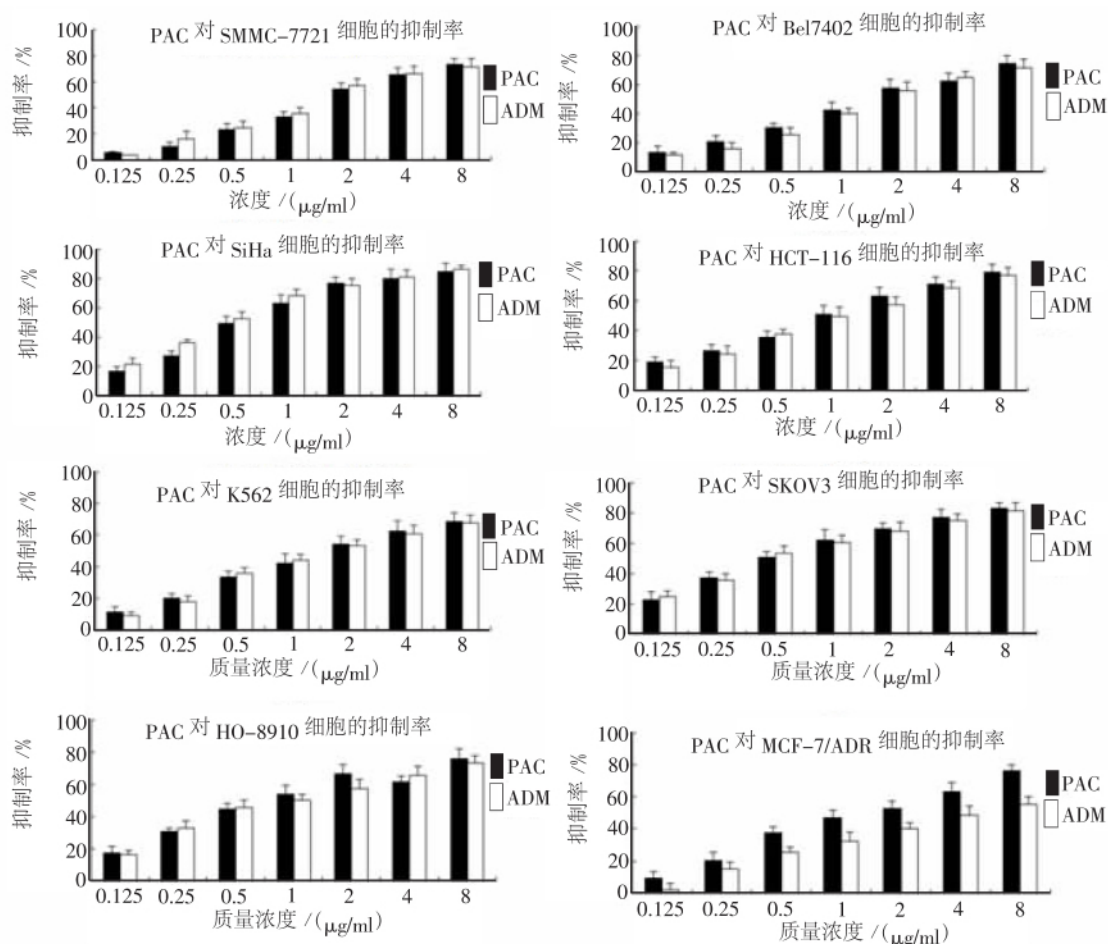


图 1 PAC 对不同肿瘤细胞的生长抑制率

Fig. 1 The proliferation inhibition rates of PAC on various tumor cells

2.2 PAC 对 H22 腹水癌细胞的抑制作用

PAC10、5、2.5 mg/kg 3 个剂量组产生的腹水量分别为 0.096 ± 0.17、3.32 ± 0.41, ADM 2.5 mg/kg 产生的腹水为 0.86 ± 0.41 mL, 而阴性组产生的腹水量为 9.82 ± 2.34 mL, 3 个剂量组均能有效的抑制腹水的产生, 且呈现出量效关系. PAC 10 mg/kg 组、PAC 5 mg/kg 组和 PAC 2.5 mg/kg 与对照组相比腹水的重量明显减少, 3 个剂量组与对照组相比有明显差别 (P < 0.05), ADM 2.5 mg/kg 组与 PAC 5 mg/kg 组效果相当 (P > 0.05). 3 个剂量组中, PAC 2.5 mg/kg 和 PAC 5 mg/kg 组对免疫器官的影响小于 ADM 2.5 mg/kg (P < 0.05). 从腹水瘤小鼠的生存期方面看, PAC 能明显延长荷 H22 小鼠的生存期. 阴性组小鼠在肿瘤接种 15 d 后由于腹水逐渐增多开始出现死亡, 且在 25 d 内已经全部死亡. PAC 10 mg/kg 组未出现小鼠死亡, PAC 5 mg/kg、PAC 2.5 mg/kg、ADM 2.5 mg/kg 组中有个别小鼠由于

腹水量较大无法承受而死亡, 分别死亡 3、4、2 只, 记录各组小鼠死亡时间作生存时间曲线. 实验结果见图 2 和表 1.

2.3 PAC 的急性毒性

在给药后 5 ~ 6 d, ADM 组小鼠出现嗜睡、慵懒、立毛、体重减轻的现象, 个别小鼠出现粘液便. 随着 ADM 剂量的加重动物死亡数也逐渐增加. 采用 bliss 法计算 LD50 为 14.70 mg/kg (95% 可信限为 12.17 ~ 116.99 mg/kg). PAC 组仅在 46.67、62.22、82.96 mg/kg 3 个剂量组出现立毛、嗜睡、体重减轻现象. 采用 bliss 法计算 LD50 为 49.23 mg/kg (95% 可信限为 42.17 ~ 57.94 mg/kg). 病理结果可见: ADM 组 12.5 mg/kg 及其以上组出现胃肠粘膜损坏、局部有炎细胞浸润. 心肌细胞的细胞核消失、呈片状坏死. 而 PAC 组在 46.67 mg/kg 及其以上组出现胃肠有轻度病理损害、心肌细胞有点状坏死, 病理损害明显减轻. PAC 将 ADM 的 LD50 提高了大约 2.36 倍. 而 CCK-8 的检测结果显示, PAC 在降低

了药物毒性后,同时保持了其抗肿瘤活性.各实验小组小鼠的死亡情况见表 2 和 3.

表 1 PAC 对 H22 腹水以及免疫器官的影响($\bar{X} \pm s, \%$)

Table 1 Effect of PAC on immune organs of H22 ascites mice($\bar{X} \pm s, \%$)

组别	剂量/(mg/kg)	平均体重/g	胸腺指数/%	脾脏指数/%
NS	/	34.14 ± 1.47	0.003 5 ± 0.001 5	0.130 ± 0.026
PAC	10	25.55 ± 1.30*	0.001 8 ± 0.000 6*	0.052 ± 0.014*
	5	26.18 ± 0.96*	0.002 9 ± 0.0014#	0.084 ± 0.025#
	2.5	30.94 ± 1.81#	0.003 1 ± 0.001 6##	0.092 ± 0.031#
ADM	2.5	25.74 ± 0.96*	0.001 3 ± 0.000 8**	0.041 ± 0.024**

注:和 NS 比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;和 ADM 比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$.

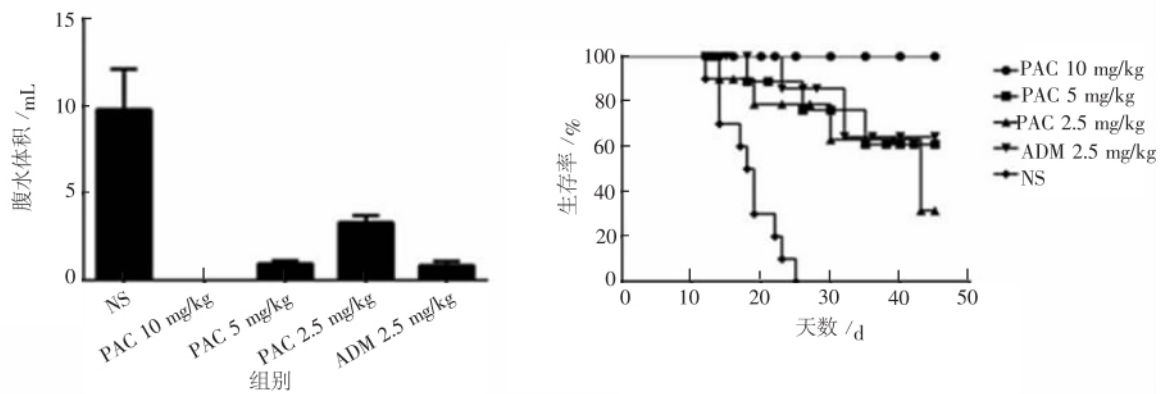


图 2 PAC 对 H22 腹水以及小鼠生存期的影响($\bar{X} \pm s, \%$)

Fig. 2 Effect of PAC on H22 ascites and survival time($\bar{X} \pm s, \%$)

表 2 PAC 各组给药剂量以及小鼠死亡数

Table 2 The dosage of PAC and the number of death mice

剂量/(mg/kg)	动物总数/只	死亡动物数/只
10.69	10	0
26.25	10	0
35.00	10	0
46.67	10	4
62.22	10	4
82.96	10	10

表 3 ADM 各组给药剂量以及小鼠死亡数

Table 3 The dosage of ADM and the number of death mice

剂量/(mg/kg)	动物总数/只	死亡动物数/只
8.00	10	0
10.00	10	0
12.50	10	3
15.63	10	7
19.53	10	9
24.41	10	10

3 讨论

肿瘤一直以来都威胁着人类的身体健康,恶性肿瘤居全球死亡原因的第二位^[14].目前治疗肿瘤的方法常为手术加化疗,而传统的化疗药物常常都不具备选择性,在杀灭肿瘤细胞的同时,引起大量正常组织和细胞的死亡.临床上,为了更好地控制肿瘤,往往需要多次化疗,因此大多数癌细胞会对药物产生多药耐药性.许多体外显示有良好抗肿瘤活性的化疗药物,由于多药耐药性的产生,治疗效果大大降低,影响化疗效果^[15].为了提高疗效,加大化疗药物的用药,又会引起严重的副反应,如骨髓移植、免疫力下降、恶心呕吐等^[16].

为了改善传统化疗药物的不足,医学研究者一直在寻找合适的治疗方法,高效低毒的靶向化疗药物是抗癌药物发展的方向和热点.研究发现肿瘤新生血管生成的速度很快,血管壁结构存在缺陷,还伴有淋巴引流系统不完善,对高分子颗粒有较强的通透性和滞留效应^[17].将果胶与 ADM 制成一种抗肿瘤的高分子前药,由于通透性、滞留效应以及肿

瘤细胞的吞噬作用,使 ADM 的质量浓度在靶器官富集,减少用药剂量,大大降低了 ADM 的毒副作用. PAC 注射到体内后,改变了药物在体内的分布,主要分布在网状内皮系统器官如肝脏、肺、脾,使心脏的药物质量浓度明显降低,减少了药物对实质性器官的损害^[13]. 由于 PAC 的 LD50 较 ADM 大大提高,临床上有望增加药物用量,提高抗肿瘤效果. 体外实验显示 PAC 能有效抑制肿瘤细胞的生长,对

耐药株细胞的抑制作用要好于 ADM,提示高分子药物由于进入细胞方式的改变,可以克服由于多次化疗而引起的部分多药耐药性,为临床对化疗药物耐药的患者的研究提供了重要的意义. PAC 能有效地抑制 H22 癌腹水的产生,延长腹水癌小鼠的生存期,为临床上癌性腹水的治疗提供了一条新路径.

参考文献

- [1] LOPEZTARRUELLA S, MARTIN M. Recent advances in systemic therapy: advances in adjuvant systemic chemotherapy of early breast cancer[J]. *Breast Cancer Research Ber* 2009, 11(2): 204.
- [2] BORGHOOTS C, KUNZ C, GRONER B. Peptide aptamers: recent developments for cancer therapy[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2005, 5(6): 783 - 797.
- [3] EWER M S, EWES S M. Cardiotoxicity of anticancer treatments: what the cardiologist needs to know[J]. *Nat Rev Cardiol* 2010, 7(10): 564 - 57.
- [4] ZORDOKY B N M, ANWAR - MOHAMED A, EL - KADI A O S, et al. Acutedoxorubicin toxicity differentially alters cytochrome P450 expression and arachidonic acid metabolism in rat kidney and liver[J]. *Drug Metab Dispos* 2011, 39(8): 1440 - 1450.
- [5] BEER E L D, BOTTONE A E, VOEST E E. Doxorubicin and mechanical performance of cardiac trabeculae after acute and chronic treatment: a review[J]. *European J Pharmacology* 2001, 415(1): 1 - 11.
- [6] MAEDA H, FANG J, INUZUKA T, et al. Vascular permeability enhancement in solid tumors: various factors, mechanisms involved and its implications[J]. *Int Immunopharmacol* 2003, 3(3): 319.
- [7] ZHANG Y, CHAN H F, LONG K W, et al. Advanced materials and processing for drug delivery: the past and the future[J]. *Adv Drug Deliv Rev* 2013, 65(1): 104 - 120.
- [8] GREISH K. Enhanced permeability and retention of macromolecular drugs in solid tumors: a royal gate for targeted anticancer nanomedicines[J]. *J Drug Targeting* 2007, 15(7/8): 457.
- [9] TANAKA S, AKAIKE T, WU J, et al. Tumor selective vascular blood flow modulation accompanying extravasation induced by stable prostaglandin I₂ analogue, beraprost sodium[J]. *Drug Target* 2003, 11(1): 45.
- [10] GREISH K, FANG J, INUTSUKA T, et al. Macromolecular therapeutics, Advantages and prospects with special emphasis on solid tumor targeting[J]. *Clin Pharmacokinet* 2003, 42(13): 1089.
- [11] HASHIZUME H, BALUK P, MORIKAWA S, et al. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness[J]. *Am J Pathol* 2000, 156(4): 1363 - 1380.
- [12] RODRIGUEZ P L, HARADA T, CHRISTIAN D A, et al. Minimal 'Self' peptides that inhibit phagocytic clearance and enhance delivery of nanoparticles[J]. *Science* 2013, 339(6122): 971 - 975.
- [13] TANG X H, XIE P, DING Y, et al. Synthesis, characterization and in vitro and in vivo evaluation of a novel pectin - adriamycin conjugate[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2010, 18(4): 1599 - 609.
- [14] 张伶, 陈柳, 胡德凤, 等. 合成的西红花糖苷体外抗肿瘤活性研究[J]. *四川师范大学学报(自然科学版)* 2014, 37(6): 905 - 910.
- [15] DUNCAN R. Polymer conjugates for tumour targeting and intracytoplasmic delivery. The EPR effect as a common gateway? [J]. *Pharmaceutical Science & Technology Today* 1999, 2(11): 441 - 449.
- [16] ZORDOKY B N M, ANWAR - MOHAMED A, EL - KADI A O S, et al. Acute doxorubicin toxicity differentially alters cytochrome P450 expression and arachidonic acid metabolism in rat kidney and liver[J]. *Drug Metab Dispos* 2011, 39(8): 1440 - 1450.
- [17] MAEDA H. SMANCS and polymer - conjugated macromolecular drugs: advantages in cancer chemotherapy[J]. *Adv Drug Delivery Rev* 2001, 46: 169 - 185.

Study on Anti-tumor Activity of Pectin-adriamycin Conjugate

ZHANG Xuemei^{1 2}, TANG Xiaohai^{1 2}, ZHANG Guangxiang¹,
RAN Maosheng², HUANG Yuanfang², PENG Lin^{1 2}

(1. College of Life Science, Sichuan Normal University, Chengdu 610101, Sichuan;

2. China Chongqing Lummy Pharmaceutical Co., Ltd., Chongqing 401336)

Abstract: Pectin-adriamycin conjugate (PAC), was made by amidation condensation between pectin and adriamycin, and its anti-tumor activity was studied. PAC nano suspension was made by high pressure homogenization and freeze drying. The in vitro antitumor effect of PAC against eight kinds of tumor cells were evaluated by CCK-8 method. H22 ascitic tumor bearing mice were used to investigate the effects of PAC on tumor, ascites, thymus, spleen and survival rate. Then the acute toxicity of PAC was detected, using adriamycin as comparison. PAC could effectively inhibit the growth of eight tumor cell lines. The growth inhibition rates of PAC on these tumor cells reached more than 50% when adriamycin equivalent concentration of PAC between 4–8 $\mu\text{g/mL}$. H22 ascites tumor was significantly inhibited by PAC. As the adriamycin equivalent doses were 2.5, 5 and 10 mg/kg, the volumes of the ascites were 3.32 ± 0.41 , 0.96 ± 0.17 and 0 mL respectively. The negative effects of PAC on the immune organs was obviously smaller than adriamycin. After 45 d observation, the survival time of the mice from each groups was different. The survival rates were 60%, 75% and 100% at 2.5, 5 and 10 mg/kg of adriamycin equivalent dose while none of the mice in the untreated group were alive in 25 d. The LD50 of PAC on KM mice was 49.32 mg/kg, while the LD50 of adriamycin was 14.70 mg/kg. Therefore, PAC could effectively inhibit the cells growth and H22 ascites, and prolong the survival time of mice with ascites carcinoma, showing a good antitumor activity. The LD50 of PAC was increased 2.36 times compared to adriamycin and the toxicity was greatly reduced. The PAC could be expected to be developed into polymeric prodrug with high efficiency and low toxicity.

Key words: PAC; adriamycin; anti-tumor; EPR effect; H22 ascites mice; LD50

(编辑 郑月蓉)