

长春新碱载体红细胞对小鼠 S₁₈₀ 肿瘤生长的抑制作用

Inhibitory effect of vincristine-loaded erythrocytes on growth of S₁₈₀-tumor in mice

施莹, 钱宝华*, 郭峰, 文君慧, 查占山 (第二军医大学长海医院输血科, 上海 200433)

[摘要] **目的:**探讨长春新碱载体红细胞对昆明小鼠 S₁₈₀ 肿瘤的抑瘤作用。**方法:**用昆明种小鼠右侧腋窝皮下接种 S₁₈₀ 肉瘤细胞建立荷瘤小鼠模型, 将 48 只荷瘤小鼠随机分为长春新碱组、长春新碱载药红细胞组、未载药红细胞组和阴性对照组 4 组, 每组各 12 只。分别经尾静脉注射长春新碱、长春新碱载药红细胞、洗涤红细胞及生理盐水, 1 次/3 d, 共 5 次。所有治疗结束次日处死小鼠并称重, 称瘤质量, 计算各组瘤体平均质量及肿瘤抑瘤率。**结果:**长春新碱载药红细胞组的体质量增长幅度为 (36.31±1.51) g, 明显大于长春新碱组的 (31.32±3.55) g ($P<0.01$)。长春新碱载药红细胞组平均瘤质量最轻, 为 (0.33±0.05) g, 明显低于阴性对照组的 (0.57±0.05) g ($P<0.05$), 该组抑瘤率达 42.42%, 是长春新碱组 17.49% 的 2.43 倍; 未载药红细胞组瘤质量较阴性对照组大, 抑瘤率呈负值, 为 -13.76%。**结论:**长春新碱载体红细胞体内抗肿瘤活性显著, 有较强抑瘤作用, 为临床肿瘤治疗提供新思路 and 可行方法。

[关键词] 长春新碱; 红细胞; 药物载体; 骨肉瘤

[中图分类号] R 979.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2007)03-0339-02

长春新碱系由夹竹桃科植物长春花中分离得到、具有抗癌活性的生物碱, 它对小鼠 L1210、艾氏腹水瘤、S₁₈₀、C₃H 小鼠自发性及移植性乳腺癌均有显著的抗肿瘤活性。其抑瘤机制主要是其通过与微管蛋白结合, 使细胞分裂停止于有丝分裂中期; 同时它还可干扰肿瘤细胞的蛋白质代谢, 抑制 RNA 多聚酶活力以及细胞膜类脂质的合成和氨基酸在细胞膜上的转运, 从而诱导多种实体肿瘤细胞凋亡^[1-2]。长春新碱对肿瘤的疗效已被公认, 但与剂量累积高度相关的神经系统毒性以及局部组织刺激作用, 往往限制了其使用^[3]。如用红细胞作为长春新碱在体内转运的载体, 并给予导向控制, 不仅可减少药物用量、增强疗效, 而且能增加使用的安全性, 减轻全身毒副作用, 提高患者耐受^[4]。在临床肿瘤患者治疗, 尤其是联合化疗方面有很广阔的开发应用前景。本课题组已将健康人红细胞作为长春新碱的载体包载效果及其体外抑瘤作用作了初步研究^[2,5], 本实验拟在此基础上进一步验证载药红细胞在体内的抑瘤活性。

1 材料和方法

1.1 实验动物、S₁₈₀ 肉瘤和试剂 清洁级昆明种小鼠 70 只, 雄性, 6~8 周, 体质量 20~24 g, 由第二军医大学实验动物中心提供, 合格证号: SCXK(沪)2002-0006。S₁₈₀ 肉瘤由第二军医大学长海医院实验诊断科细胞培养室友情提供, 昆明种小鼠腹腔传代。注射用硫酸长春新碱粉剂 (国药准字 H31021704, 批号 050308B, 1 mg/支×50 支), 购自上海华联制药有限公司; 肝素钠注射液 (国药准字 H31022051, 批号 050613, 12 500 U/支×10 支), 购自上海生物化学制药厂。KCl、MgCl₂、MgSO₄、NaCl、NaHCO₃、KH₂PO₄、Na₂HPO₄·12H₂O、葡萄糖·H₂O 等购自中国医药上海化学试剂站。Hank 液 (pH 7.4) 由本实验室制备, 高压灭菌后 4℃ 保存; 等渗 A 溶液及其 10 倍高渗浓缩液由本实验室参照文献^[6] 制备, 高压灭菌后 4℃ 保存。

1.2 肿瘤模型建立 于超净工作台中, 取 S₁₈₀ 肉瘤瘤液 0.1

ml, 用生理盐水稀释 20 倍, 光学显微镜下计算 1 ml 瘤液中活体瘤细胞数, 以计算瘤液的稀释倍数, 用生理盐水稀释到细胞密度为 2×10^6 /ml, 皮肤消毒后按每鼠 0.2 ml 接种于小鼠右前肢腋窝皮下。

1.3 长春新碱载药红细胞的制备 于超净工作台中取健康昆明小鼠全血, 肝素抗凝。实验步骤及方法基本同健康人红细胞, 参照文献^[5] 制备。相关计算公式: 单位数量红细胞 (1×10^9 /ml) 的载药量计算: $x = [0.5 \times C_0 - (1 - Nc \times MCV) \times C_1] / Nc$, C_0 为长春新碱工作液的实测浓度, C_1 为上清液中长春新碱的测定浓度, Nc 为载体红细胞数量, MCV 为载体红细胞平均容积。红细胞的总载药率计算: $x\% = [(0.5 \times C_0) - (1 - Nc \times MCV) \times C_1] / (0.5 \times C_0) \times 100\%$ 。

1.4 动物分组和处理 瘤细胞接种 24 h 后称体质量, 随机分为长春新碱组、长春新碱载药红细胞组、未载药红细胞组和阴性对照组 4 组, 每组小鼠 12 只。于分组当日开始尾静脉给药, 长春新碱剂量为 0.5 mg/kg 体质量; 长春新碱载药红细胞组药物总量与长春新碱组相等; 未载药红细胞组和阴性对照组分别注射与长春新碱载药红细胞组等量的小鼠洗涤红细胞和生理盐水。1 次/3 d, 共 5 次。所有治疗结束次日处死小鼠并称体质量, 随机严格标准剥离皮下肿瘤组织, 称瘤质量, 计算各组瘤体平均质量及肿瘤抑瘤率。肿瘤抑制率计算公式如下: 肿瘤抑制率 (%) = (阴性对照组平均瘤质量 - 实验组平均瘤质量) / 阴性对照组平均瘤质量 × 100%。

1.5 统计学处理 采用样本均数差别 t 检验。

2 结果

实验结束时小鼠体质量、肿瘤生长情况等结果见表 1。治疗结束时长春新碱组与长春新碱载药红细胞组小鼠平均

[作者简介] 施莹, 硕士生, 技师。

E-mail: snilebread@hotmail.com

* Corresponding author. E-mail: qianbh1963@21cn.com

体质量均明显低于阴性对照组($P < 0.01$);长春新碱载药红细胞组的体质量增长幅度较长春新碱组大,两者统计学也有显著差异($P < 0.01$);未载药红细胞组平均体质量与阴性对照组间无明显差异。长春新碱载药红细胞组平均瘤质量最轻,与阴性对照组之间差异显著($P < 0.05$);长春新碱组及未

载药红细胞组平均瘤质量与阴性对照组无明显差异。长春新碱载药红细胞组肿瘤抑制率达42.42%,是单用长春新碱(17.49%)的2.43倍;未载药红细胞组平均瘤质量超过阴性对照组,其抑瘤率呈负值,为-13.76%。

表1 实验结束各组小鼠体质量变化及抑瘤作用

组别	体质量(m/g, n=12)		瘤质量(m/g, n=12)	肿瘤抑制率(%)
	实验开始	实验结束		
长春新碱组	21.73±1.23	31.32±3.55**	0.47±0.06	17.49
长春新碱载药红细胞组	22.01±1.42	36.31±1.51**△△	0.33±0.05*	42.42
未载药红细胞组	21.95±1.91	38.05±2.37△△	0.65±0.34	-13.76
阴性对照组	22.33±2.63	38.38±2.44△△	0.57±0.05	未计算

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与阴性对照组比较; △△ $P < 0.01$ 与长春新碱组比较

3 讨论

本研究结果显示,长春新碱与长春新碱载药红细胞对S₁₈₀肿瘤生长均有抑制作用。在相同给药方法及剂量的情况下,长春新碱载药红细胞的抑瘤作用明显大于单用长春新碱治疗,其抑瘤率是后者的2.43倍。说明载药红细胞能识别黏附和递呈肿瘤抗原,从而起到类似抗原递呈细胞样的作用,促进吞噬和杀伤肿瘤细胞;同时因其体内的缓释作用,大大延长了长春新碱的药效时间,增加了药物作用于肿瘤的机会,使其可以杀伤处于不同时期的肿瘤细胞,抑制肿瘤细胞生长的效果就更加显著。与单用长春新碱治疗相比,载药红细胞杀伤肿瘤细胞的作用更强,更持久。载药红细胞的体内清除呈现双峰性,小部分在载药过程中严重受损的红细胞迅速被机体清除,大部分细胞的存活与正常红细胞相似,这样便可将包载的药物带至全身各处。有研究表明,载药红细胞在体外能明显减慢抗肿瘤药的释放,在体内则表现出对肝、脾等组织的高度选择性,药物半衰期及生物有效率显著延长^[7-8]。红细胞作为一种无毒、无不良反应并具有高度生物相容性和可降解性的药物载体,值得继续深入研究^[9],为临床肿瘤治疗提供一种新的可行方法。

体质量与饮食量息息相关,是反映化疗药毒性大小的重要指标之一。用长春新碱及长春新碱载药红细胞治疗的小鼠体质量增幅相对阴性对照组和未载药红细胞组均减小较多,说明化疗药毒副作用影响了小鼠正常的饮食及活动,对机体产生较大毒性。而长春新碱载药红细胞组体质量增幅较长春新碱组明显增加,说明载药红细胞在体内对药物有缓释作用,同时也增强了其组织器官靶向性,从而减低了游离药物对机体正常细胞产生的不良影响,在一定程度上减轻了抗肿瘤药的毒性作用。

实验结果还得出,小鼠在输入异体红细胞后对肿瘤生长似有激发作用,这可能与输入大量异体血引起机体免疫功能抑制有关。异体血可引起特异及非特异性免疫功能抑制,T细胞活性下降,对肿瘤细胞的识别杀伤能力下降,导致肿瘤生长速度加快、转移及复发率增高,因此临床肿瘤患者不提

倡输注异体血^[10-11]。此结果提示在治疗中应尽量运用患者自身的红细胞做药物载体,以消除或减少不必要的不良反应,影响药物疗效。

总之,载药红细胞能延缓药物释放,维持稳定的血药浓度,并能增强药物的组织器官靶向性,从而提高药物疗效,减轻毒副作用。从上述实验结果可看出,长春新碱载药红细胞的抑瘤效果明显优于单用长春新碱治疗,药物毒副作用也减小。红细胞作为各种药物尤其是抗肿瘤药的载体有很大开发应用前景,值得进行更深入的动物及临床实验研究。

【参考文献】

- [1] 黄伟,张瑶珍,周剑锋,等. 长春新碱对K562细胞 p1k1 和 γ -微管蛋白表达影响的研究[J]. 中国药理学通报,2005,21:295-298.
- [2] 吴江,钱宝华,刘书逊,等. 长春新碱载体红细胞的体外抗肿瘤作用[J]. 解放军医学杂志,2005,30:593-595.
- [3] 韩锐主编. 肿瘤化学预防及药物治疗[M]. 北京:北京医科大学和中国协和医科大学联合出版社,1991:273-286.
- [4] Sprandel U. Temperature-induced shape transformation of carrier erythrocytes[J]. Res Exp Med, 1990,190:267-275.
- [5] 吴江,钱宝华,王卓,等. 长春新碱载药红细胞制备及其生物学特性研究[J]. 第二军医大学学报,2005,26:551-554.
- [6] 符乃阳,马靖,张尔贤. 红细胞用作新型药物载体的研究进展[J]. 药物生物技术,1997,4:251-256.
- [7] Mishra P R, Jain N K. Reverse biomembrane vesicles for effective controlled delivery of doxorubicin HCl[J]. Drug Delivery, 2000,7: 155-159.
- [8] Mishra P R, Jain N K. Folate conjugated doxorubicin-loaded membrane vesicles for improved cancer therapy[J]. Drug Delivery, 2003,10:277-282.
- [9] 余华,简家荣,李萍,等. 红细胞载体一种新颖的药物传输系统[J]. 中华临床医药,2004,5:3-6.
- [10] 袁晓军,罗春华. 异体血输注所致免疫抑制[J]. 国外医学·输血及血液学分册,2000,23:33-35.
- [11] 郭峰,钱宝华,许育,等. 自身与异体输血对机体免疫功能的影响及临床意义[J]. 深圳中西医结合杂志,2002,12:4-5.

【收稿日期】 2006-09-30

【修回日期】 2007-02-05

【本文编辑】 曹静