

马钱子总生物碱复合磷脂脂质体的抗肿瘤作用研究

瞿叶清¹,陈军^{2*},林爱华³,侯婷²,蔡宝昌^{2*}

- (1. 南京大学医学院附属鼓楼医院动物实验中心,南京 210008;
2. 南京中医药大学江苏省中药炮制重点实验室,南京 210029;
3. 广州中医药大学第二临床医学院,广州 510120)

[摘要] 目的:通过比较马钱子总生物碱溶液和 3 种不同磷脂组成的马钱子总生物碱脂质体对 H22 荷瘤小鼠的抑瘤率,评价马钱子总生物碱复合磷脂脂质体的抗肿瘤作用。方法:采用硫酸铵梯度法和隐形脂质体技术制备了 3 种不同磷脂组成的马钱子总生物碱脂质体。ICR 小鼠接种 H22 肝癌瘤株造成移植性肝癌 H22 小鼠模型,测定马钱子总生物碱溶液、马钱子总生物碱大豆磷脂(SPC)脂质体、氢化大豆磷脂(HSPC)脂质体和复合磷脂脂质体各 ip 1 mg·kg⁻¹,连续 10 d,观察对 H22 肝癌小鼠的抑瘤效果,比较给药后各组 H22 荷瘤小鼠的体重、免疫器官(脾和胸腺)指数和生命延长率。结果:1 mg·kg⁻¹剂量下的马钱子总生物碱溶液、SPC 脂质体、HSPC 脂质体和复合磷脂脂质体的抑瘤率分别为 29.05% ,29.29% ,45.11% ,37.23% ;3 种马钱子总生物碱脂质体未发现对免疫器官有明显的抑制作用;与对照组相比体重也无明显变化。结论:复合磷脂脂质体是抗肿瘤中药有效部位马钱子总生物碱具有开发前景的新型载体。

[关键词] 马钱子;总生物碱;脂质体;抗肿瘤;大豆磷脂;氢化大豆磷脂

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)03-0143-03

Study on Antitumor Activity of Novel Liposomes Containing Total Alkaloids from Seed of *Strychnos nux-vomica*

QU Ye-qing¹, CHEN Jun^{2*}, LIN Ai-hua³, HOU Ting², CAI Bao-chang^{2*}

- (1. Animal Laboratory Center of the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Chinese Medicine Processing, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 3. The Second Clinical Medical College, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China)

[Abstract] Objective: Novel liposomes composed of hydrogenated soybean phosphatidylcholine (HSPC) and soybean phosphatidylcholine (SPC) was prepared to encapsulate total alkaloids from seed of *Strychnos nux-vomica* L. The antitumor activity of the novel liposomes was compared with corresponding HSPC or SPC liposomes. Method: Liposomes containing the total alkaloids were prepared by ammonium sulfate transmembrane gradients and stealth liposome technique. The total alkaloids liposomes with different lipid composition were administrated to H22 tumor-bearing mice. The parameters such as inhibition of tumor were calculated and compared. Result: The inhibition rate of tumor was 29.05% , 29.29% , 45.11% , 37.23% for total alkaloids solution, SPC liposomes, HSPC liposomes and novel liposomes, respectively. Results of comparison of mice weight and immune organ index revealed that no toxic effect was found as to liposomes containing total alkaloids. Conclusion: Taken together, improved antitumor activity and the reduced price of phospholipids indicate that the novel liposomes may act as

[收稿日期] 20110719(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30701111,81001644);广东省自然科学基金项目(10451040701004643)

[第一作者] 瞿叶清,硕士,兽医师,从事动物模型的构建与药理学研究, Tel:025-83105986, E-mail: quyeqing1980@163.com

[通讯作者] * 陈军,博士,副教授,硕士生导师,从事中药新型给药系统研究, Tel:025-85811050, E-mail: chenjun75@163.com

* 蔡宝昌,博士,教授,博士生导师,从事中药学研究, Tel:025-85811112, E-mail: becai@126.com

promising carriers for total alkaloids extracted from seed of *S. nux-vomica*.

[**Key words**] *Strychnos nux-vomica*; total alkaloids; liposomes; antitumor; HSPC; SPC

马钱子又名番木鳖,始载于《本草纲目·卷十八》,是马钱科植物马钱的干燥成熟种子。马钱子具有确切的抗肿瘤作用,其主要有效部位为总生物碱,采用脂质体作为载体能够显著提高马钱子生物碱的抗肿瘤效果^[1]。复合磷脂脂质体技术是一种新型的脂质体技术,其特征不在于采用两种不同相变温度的磷脂材料作为膜材,其中一种磷脂(主要为饱和磷脂)的相变温度在 37 ℃ 以上,而另一种磷脂(主要为不饱和磷脂)的相变温度在 4 ℃ 以下。作者在前期研究中发现,采用复合磷脂脂质体技术能够改善马钱子碱脂质体和马钱子总生物碱脂质体的药剂学性质^[2-3],改善体内的药物动力学行为^[4]。本文在前期研究的基础上,进一步比较了马钱子总生物碱复合磷脂脂质体与单一磷脂脂质体的抗肿瘤药效,以考察药剂学性质与药物动力学性质的改善是否对最终的治疗作用产生显著影响。

1 材料

1.1 动物 ICR 小鼠,18 ~ 22 g,雌雄各半,上海斯莱克实验动物有限公司提供,许可证号 SCXK(沪)2007-0005。

1.2 药物和试剂 马钱子购于南京药业股份有限公司,经南京中医药大学蔡宝昌教授鉴定为马钱科植物马钱 *Strychnos nux-vomica* L. 的干燥成熟种子;马钱子碱对照品(批号 110706-200505),士的宁对照品(批号 110705-200306 中国药品生物制品检定所);大豆磷脂(SPC)(德国 Lipoid 公司,批号 790627-6);胆固醇(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);氢化大豆磷脂(HSPC)(德国 Lipoid 公司,批号 256257-1);二硬脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000(DSPE-PEG2000,纯度 > 98%,德国 Lipoid 公司,批号 256310-1);透析袋(USA 进口分装,MW8 000 ~ 14 000);葡聚糖凝胶 G-50(Sephadex G-50)(Pharmacia 公司);乙腈(色谱纯,美国 TEDIA 公司);5-氟尿嘧啶(5-FU)注射液(上海旭东海普药业有限公司,批号 091205)。

1.3 仪器 752 型紫外分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司),HL-2S 恒流泵(上海沪西分析仪器厂有限公司),DF-101SA 集热式恒温加热磁力搅拌器(南京科尔仪器设备有限公司)THZ-82 水浴恒温振荡器(江苏金坛亿通电子有限公司),BS124S 电子天平(德国赛多利斯公司),JY92-II 超声波细

胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司),TP-5 型智能透皮扩散仪(南京新联电子有限公司)。

1.4 瘤株 肝癌细胞株 H22,由南京市鼓楼医院提供,由本研究室定期腹腔接种传代保种。

2 方法

2.1 马钱子总生物碱复合磷脂脂质体的制备 按一定质量比称取磷脂(HSPC:SPC 1:3,质量比)、胆固醇、隐形材料 DSPE-PEG2000,加入无水乙醇,适当超声使其溶解,注入 0.2 mol·L⁻¹ 硫酸铵溶液中,60 ℃ 磁力搅拌 45 min 除去乙醇,探头超声匀化后,用 pH 7.4 PBS 溶液(10 倍体积,透析 4 次,每次 2 h)透析除去外水相硫酸铵,制得空白复合磷脂脂质体。取适量马钱子总生物碱与空白复合磷脂脂质体混匀,恒温水浴振荡载药,即得马钱子总生物碱复合磷脂脂质体。

除了磷脂组成为单一的 HSPC 或 SPC 外,其他处方与工艺不变,同法制备了马钱子总生物碱 HSPC 或 SPC 脂质体。

2.2 脂质体的分离与含量测定 分别精密吸取以上 3 种马钱子总生物碱脂质体适量上 Sephadex G-50 柱(1 cm×27 cm)用 pH 7.4 PBS 洗脱,分离脂质体部分和未包封的游离药物,收集脂质体部分,用 PBS 稀释到适宜浓度,测定马钱子总生物碱含量后^[5]用 pH 7.4 PBS 稀释到 250 mg·L⁻¹。

2.3 不同磷脂组成马钱子总生物碱脂质体的抗肿瘤作用比较

2.3.1 接种 抑瘤率实验:取小鼠常规饲养,另取传代 7 或 8 d 生长旺盛无溃破的 H22 荷瘤小鼠,从腹腔抽取乳黄色的瘤液,用无菌生理氯化钠溶液(NS)按一定体积比制成肿瘤细胞悬液,计数,在右前肢腋窝皮下注射接种,每只小鼠接种 0.2 mL,以调节其接种细胞数为 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个/mL。

生命延长率实验:取小鼠常规饲养,取传代 7 ~ 8 d 生长旺盛无溃破的 H22 荷瘤小鼠,从腹腔抽取乳黄色的瘤液,用无菌 NS 按一定体积比制成肿瘤细胞悬液,计数,ip 等量瘤细胞悬液 1×10^6 个/只。

2.3.2 分组及给药 随机分为 6 组,每组 10 只。其中 4 组分别 ip 给予马钱子总生物碱复合磷脂脂质体、马钱子总生物碱 HSPC 脂质体、马钱子总生物碱 SPC 脂质体,马钱子总生物碱溶液,剂量均为 1.0 mg·kg⁻¹·d⁻¹,另设模型对照组(NS,0.2 mL·d⁻¹)和

阳性对照组(5-FU,25 mg·kg⁻¹·d⁻¹),接种 24 h 后每日 ip 给药 1 次,连续 10 d。每天观察记录各组小鼠生存状况并称重。

2.3.3 观测指标^[1] 抑瘤率实验:小鼠于末次给药后次日称重后颈椎脱臼处死,剥离瘤块、脾脏和胸腺,分别称质量,并计算胸腺指数和脾脏指数。

抑瘤率=(模型组瘤质量-给药组瘤质量)/模型组瘤质量×100%

脏器指数=脏器质量(mg)/实验后体重(g)

生命延长率实验:ip 瘤细胞后称体重测量腹围,给药 10 d 后称体重并测量腹围,观察小鼠每天的存活率,计算生命延长率。

生命延长率=(给药组的生存时间-模型组的生存时间)/模型组的生存时间×100%

2.3.4 数据分析 数据以 EXCEL2007 统计软件处理,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 作为显著性检验水准。

3 结果

3.1 抑瘤实验 结果见表 1。马钱子总生物碱 HSPC 脂质体的抗肿瘤作用最强,马钱子总生物碱复合磷脂脂质体的抑瘤效果优于 SPC 脂质体;3 种马钱子总生物碱脂质体和溶液组对免疫器官无明显的抑制作用;与对照组相比,体重也无明显变化。

表 1 不同磷脂组成的马钱子总生物碱脂质体对 H22 荷瘤小鼠的肿瘤抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量	瘤重	抑瘤率
	/mg·kg ⁻¹	/g	/%
模型	-	1.22 ± 0.56	-
马钱子总生物碱溶液	1.00	0.86 ± 0.57	29.05
马钱子总生物碱 SPC 脂质体	1.00	0.86 ± 0.66	29.29
马钱子总生物碱复合磷脂脂质体	1.00	0.77 ± 0.40 ¹⁾	37.23
马钱子总生物碱 HSPC 脂质体	1.00	0.67 ± 0.31 ²⁾	45.11
5-FU	25.00	0.23 ± 0.77 ³⁾	80.90

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$,³⁾ $P < 0.001$ (表 2 同)。

3.2 生命延长率实验 结果见表 2。马钱冯总生物碱 HSPC 脂质体可显著延长荷 H22 肿瘤小鼠的生存时间($P < 0.05$),其他两组脂质体的生命延长率无明显差别。

4 讨论

复合磷脂脂质体中同时采用 HSPC 和 SPC 两种磷脂材料作为膜材,改变了脂质体表面的刚性(rigidity),从而能够改变脂质体的某些理化性质,例如能够显著提高脂质体在体内外的稳定性,减少在药物传递过程中的泄漏,同时提高载药量^[3]。作者前期还证明与普通的 SPC 脂质体相比,能够显著提高士的宁的血药浓度,改善体内的药物动力学性

表 2 不同磷脂组成的马钱子总生物碱脂质体对 H22 肝癌小鼠生命延长率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量	生存时间	生命延长率
	/mg·kg ⁻¹	/d	/%
模型	-	13.00 ± 2.57	-
5-FU	25.00	24.40 ± 15.39 ¹⁾	87.69
马钱子总生物碱 SPC 脂质体	1.00	21.92 ± 17.56	68.59
马钱子总生物碱 HSPC 脂质体	1.00	24.40 ± 13.34 ¹⁾	87.69
马钱子总生物碱复合磷脂脂质体	1.00	20.88 ± 12.15	60.58
马钱子总生物碱溶液	1.00	17.60 ± 15.75	35.38

质^[4]。本文的结果表明,马钱子总生物碱复合磷脂脂质体的抗肿瘤药效与 SPC 脂质体相比也有了显著提高。

此外,作者在前期研究中还发现,不同磷脂组成的马钱子总生物碱脂质体中马钱子碱、士的宁的组成没有明显差别^[4],因此就排除了由于化学成分组成不同对马钱子总生物碱脂质体抗肿瘤药效影响的可能性。为了排除包封率不同对药效的可能影响,本实验中应用的马钱子总生物碱脂质体均除去游离药物后再调整到同一浓度后给药。

与马钱子总生物碱复合磷脂脂质体相比,HSPC 脂质体的抗肿瘤药效更高,但是,考虑到 HSPC 的价格是 SPC 的 10 倍,在 SPC 中添加 25% 的 HSPC 制成复合磷脂脂质体仍然具有广阔的应用前景。并且前期研究已经证明,与 HSPC 脂质体相比,马钱子总生物碱复合磷脂脂质体的载药效果明显得到改善。

[参考文献]

[1] 邓旭坤,蔡宝昌,吕晓宇,等. 马钱子碱及其脂质体对移植性荷瘤小鼠抗肿瘤作用的对比研究[J]. 中草药, 2006,27(3):389.

[2] Chen J, Lin A H, Chen Z P, et al. Ammonium sulfate gradient loading of brucine in to liposomes; Effect of phospholipid composition on entrapment efficiency and physicochemical properties *in vitro* [J]. Drug Dev Ind Pharm, 2010, 36(3): 245.

[3] 陈军,张婷,蔡宝昌,等. 马钱子总生物碱复合磷脂脂质体的药剂学性质研究[J]. 中国中药杂志,2010,35(1):32.

[4] 陈军,肖寒露,蔡宝昌,等. 磷脂组成对马钱子总生物碱脂质体药动学的影响[J]. 中国药学杂志,2010,45(24):1944.

[5] 陈军,苏璇,蔡宝昌,等. 马钱子总生物碱脂质体的含量与包封率测定[J]. 中药新药与临床药理,2009,20(3):249.

[责任编辑 聂淑琴]