

MDP-阿霉素脂质体交联物治疗大鼠成骨肉瘤的药效学研究

吴道澄 马保安¹ 万明习 范清宇¹ (西安 710038 西安交通大学生物医学工程系; ¹ 西安 710049 第四军医大学唐都医院全军骨肿瘤研究所)

摘要 目的: 制备出 MDP-阿霉素脂质体交联物(MDP-LADM), 观察 MDP- LADM 治疗大鼠成骨肉瘤 UMR106 模型的疗效, 并与游离阿霉素(ADM)及阿霉素脂质体(LADM)作比较。方法: 建立 SD 大鼠 UMR106 成骨肉瘤模型, 将磷脂修饰后用 1, 4-二异氰基甲苯酯(TDI)与 MDP 交联, 用改良的逆向蒸发法将其制备成阿霉素脂质体-MDP 交联物。将荷瘤大鼠随机分为五组, 即生理盐水组、ADM 组、游离 ADM+ 空白脂质体组、LADM 组及 MDP-LADM 组, 观察它们对大鼠的抑瘤作用。用高效液相色谱测定阿霉素在骨组织及其它器官中的含量。结果: MDP-阿霉素脂质体交联物对阿霉素包裹率为 92. 3%, MDP 交联率为 70. 2%, 对 SD 大鼠 UMR106 成骨肉瘤模型的抑瘤作用明显高于阿霉素($P < 0. 01$)和阿霉素脂质体($P < 0. 05$), 治疗后大鼠生存期明显延长($P < 0. 01$), 阿霉素在骨组织中的含量明显增加。结论: MDP-阿霉素脂质体交联物可明显提高阿霉素脂质体对骨肿瘤的治疗作用, 降低其不良反应。

关键词 阿霉素脂质体; 药效学; 成骨肉瘤; 亚锡亚甲基二膦酸; 高效液相色谱

Study on the pharmacodynamics of the adriamycin liposome conjugated MDP on UMR 106 osteosarcoma tumor model

Wu Daocheng(Wu DC), Ma Baoan¹(Ma BA), Wan Mingxi(Wan MX), Fan Qingyu¹(Fan QY)(Dept of Biomedical Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710038; ¹Dept of Orthopedics Oncology Institute of Chinese PLA, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710049)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To prepare adriamycin liposome conjugated with MDP (Methylenediphonate, MDP-LADM) and observe its therapeutic effect on UMR106 osteosarcoma tumor model in rat, as well as comparing it with adriamycin liposome (LADM) and free adriamycin(ADM). **METHOD:** The MDP was conjugated to the membrane of adriamycin liposome with tolylendiiisocyanate(TDI). The model of UMR106 osteosarcoma tumor model in SD rat has been established. Normal saline, The osteosarcoma tumor rats were divided into five groups at random so as to be injected with LADM, Lip+ ADM, ADM and MDP-ADM and observe the inhibitory effect. The concentration of ADM dispensed in relative organs was measured by HPLC method. **RESULTS:** The average encapsulation rate of adriamycin was 92. 3% and conjugation rate of MDP was 70. 2%. Compared with the ADM group, Lip+ ADM group and LADM group, the survival time in MDP-LADM group was prolonged significantly, respectively ($P < 0. 01$). The inhibition of tumor growth was increased significantly ($P < 0. 01$, $P < 0. 01$ and $P < 0. 05$). **CONCLUSION:** The adriamycin liposome conjugated with MDP not only lower the side-effect, but also improved therapeutic effect significantly than ADM, Lip+ ADM and LADM in the treatment of osteosarcoma tumor.

KEY WORDS adriamycin liposome, pharmacodynamics, osteosarcoma tumor, MDP, HPLC

阿霉素(adriamycin, ADM)具有抗肿瘤活性高, 抗肿瘤谱广泛的特点而广泛应用于肿瘤化疗, 但具有心脏毒性及骨髓抑制等不良反应, 使其应用受到了限制^[1], 将 ADM 包于脂质体中可降低心脏毒性, 延长体内滞留时间而提高疗效^[2, 3]。恶性骨肿瘤为临床常见的恶性肿瘤之一, 由于阿霉素脂质体与骨组织没有亲和性, 难以用于骨肿瘤的治疗。亚锡亚甲基二膦酸盐(Methylene diphosphonate, and stannous chloride, MDP)是临床常用的亲骨恶性肿瘤的检索扫描剂载体, 具有

天然的亲骨性, 可用于骨肿瘤的 ECT 显像诊断检查^[4]。本实验将 MDP 与阿霉素脂质体外层磷脂交联后制成 MDP-阿霉素脂质体交联物, 利用 MDP 特殊的亲骨肿瘤性使阿霉素脂质体集中于骨肿瘤部位, 达到提高疗效, 降低不良反应的目的。

1 材料和方法

1. 1 材料: 盐酸阿霉素对照品(上海医药工业研究院); 盐酸阿霉素(浙江海门制药厂); 盐酸正定霉素(意大利爱宝药

作者简介: 吴道澄, 现在第四军医大学药物化学教研室, 在职攻读西安交通大学生物医学工程系博士生

厂),注射用大豆磷脂(上海浦江磷脂有限公司);MDP(江苏原子医学研究所)。1,4-二异氰酸甲苯酯(TDI,AR级,北京化学试剂厂)。盐酸阿霉素脂质体 参考文献[5]方法自行制备,其阿霉素含量 $2.0\text{mg}\cdot\text{m}^{-1}$,磷脂含量 $50\sim 70\text{mg}\cdot\text{m}^{-1}$,平均粒径(196 ± 18.2)nm,阿霉素包裹率92.3%,其它试剂均为分析纯。日本岛津 Shimadzu LC-6A 高效液相色谱仪(HPLC),RT-530 荧光检测器,C-3A 数据处理仪 YWG-G18 H_{3T}柱(300mm $\times$ 5mm)。

1.2 MDP-阿霉素脂质体的制备及其特性 利用TDI与MDP中的-OH基结合,再将其与磷脂在氯仿中搅拌8~12h后即可得到MDP-磷脂交联物,将此交联物按10%~50%的比例与磷脂在氯仿中混合均匀,按文献[3]方法用改进的逆向蒸发法制备阿霉素脂质体,即得到MDP-阿霉素脂质体磷脂交联物,透析除去游离的MDP并用磷酸铵紫外分光光度法测定其含量^[7],从而可计算出MDP的交联率。

1.3 动物模型的建立及给药方案:成骨肉瘤UMR106细胞系购自美国ATCC。SD大鼠,200~250g雌雄兼有(本校实验动物中心),采用组织培养技术^[8],取对数生长期增殖旺盛的成骨肉瘤UMR106细胞配制成悬液,细胞数为 $3\times 10^5/\text{ml}$,取0.2ml接种于SD大鼠胸前壁皮下,接种后第14日即可长成1.0cm $\times$ 1.5cm大小的皮下肿瘤,出瘤率75%~80%,选择接种后第14日的荷瘤鼠60只,按阿霉素5mg/kg体重经尾部静脉给药,每72h给药1次,连续3次。将荷瘤鼠随机分为五组,I组生理盐水组(NS);II组游离阿霉素(ADM);III组游离阿霉素+空白脂质体(Lip+ADM)。IV组阿霉素脂质体组(LADM),V组MDP-阿霉素脂质体组(MDP-LADM)。给药第8日断颈处死大鼠,称瘤重量,计算抑瘤率。

1.4 液相色谱测定法 色谱条件:流动相:甲醇-0.01mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸二氢铵-冰乙醇(7:30:0.5),流速1.0ml $\cdot\text{min}^{-1}$,激发波长450nm,发射波长530nm,20 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.5 药效学判断指标:根据卫生部药政局编《新药临床前指导原则汇编》1993年版制定如下标准:

①抑瘤率 $G\% = \left| \frac{\text{治疗组平均瘤重}}{\text{对照组平均瘤重}} \right| \times 100$;②生命延长率:记录对照组及治疗组存活天数,生命延长率 $IS\% = \left| \frac{\text{治疗组平均存活天数}}{\text{对照组平均存活天数}} - 1 \right| \times 100$;③肿瘤坏死程度:完整切除瘤块及周围组织,置于10%的福尔马林液中固定,取肿瘤体最大面处作2~3处病理切片,HE染色在光镜下观察组织的坏死,分为轻度(0%~30%),中度(30%~70%)和重度(70%~100%),取给药后8h的荷瘤大鼠断颈处死后取肿瘤组织,按文献^[5]方法测定其阿霉素含量。

2 结 果

2.1 从表1可以看出,ADM组、Lip+ADM组、LADM组及MDP-LADM组对肿瘤的生长均有明显的抑制作用,它们的肿瘤生长率与生理盐水相比均有显著性差异($P < 0.01$),四组之间MDP-LADM组效果最好,与其他组均有显著性差异($P < 0.05$)。另外,LADM组也有较好的疗效,与Lip+

ADM及ADM组也有显著性差异。说明用阿霉素脂质体治疗成骨肉瘤的疗效高于阿霉素,而MDP-LADM组与LADM组相比也有显著性差异($P < 0.05$),这可能是由于MDP对骨肿瘤具有一定的组织靶向性,使阿霉素脂质体在成骨肉瘤中的浓度大于LADM组所致,也就说明了MDP对骨肿瘤的导向作用。

表1 五组大鼠治疗前后肿瘤生长率($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	肿瘤重量(g) ($\bar{x} \pm s$)	肿瘤抑制率	P*
NS	10.32 $\pm$ 2.87		
ADM	7.80 $\pm$ 2.14	24.43	$P < 0.05$
Lip+ADM	6.98 $\pm$ 2.92	32.4	$P < 0.05$
LADM	6.03 $\pm$ 2.78	41.6	$P < 0.01$
MDP-LADM	3.13 $\pm$ 2.53	59.68	$P < 0.01$

*与生理盐水比较,MDP-LADM与LADM比较 $P < 0.05$

2.2 从表2中可以看出,ADM组、Lip+ADM组、LADM组及MDP-LADM组的生命延长率与生理盐水组相比均有显著性差异($P < 0.001$),以LADM及MDP-LADM组最高,它们的平均生存期与ADM及Lip+ADM组相比也有显著性差异($P < 0.05$),但两者之间差异性不大。说明LADM及MDP-LADM具有比ADM更好的疗效与更低的不良反应。

表2 五组大鼠治疗后平均生存期($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	平均生存期(d)	生命延长率(%)	P*
NS	12.86 $\pm$ 2.20	-	-
ADM	21.66 $\pm$ 3.26	71.1	$P < 0.01$
Lip+ADM	25.65 $\pm$ 4.70	102.6	$P < 0.01$
LADM	17.30 $\pm$ 6.22	261.9	$P < 0.01$
MDP-LADM	46.54 $\pm$ 6.80	112.3	$P < 0.01$

*与生理盐水比较,MDP-LADM与LADM比较 $P < 0.01$

2.3 从表3中大鼠治疗后肿瘤坏死程度来看,NS组肿瘤细胞增生活跃,以轻度坏死为重,ADM组与Lip+ADM组分裂数减少,Lip+ADM组稍好一点。原因可能是磷脂对细胞具有一定的修复,保护作用^[8]。LADM组以中度及重度坏死为主,而MDP-LADM组无轻度坏死,全部为中、重度坏死,说明MDP对成骨肉瘤的靶向性造成肿瘤部位LADM数量增加。

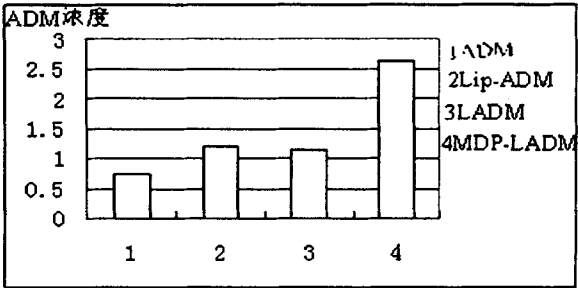


图1 各组大鼠给药后骨组织中ADM浓度($\mu\text{g/g}$)

表 3 五组大鼠治疗后的肿瘤坏死程度($n=10$)

坏死程度	NS	ADM	Lip+ ADM	LADM	MDP-LADM
轻	9	3	5	2	0
中	1	4	3	4	5
重	0	2*	2	3*	5

* ADM 组和 LADM 组死亡一只

2.4 在处理组中荷瘤鼠肿瘤大小不同,以 MDP-LADM 组最小,对照组最大,肿瘤组织切片在显微镜下观察到肿瘤细胞坏死程度不一致,MDP-LADM 组坏死程度最大,肿瘤细胞呈大片状广泛坏死,细胞结构消失,核碎裂溶解,呈均一的嗜酸性改变,LADM 组形态与 MDP-ADM 组类似,但坏死程度轻一些,ADM 组肿瘤细胞呈小片状坏死,部分瘤细胞核边集、固缩及少量坏死灶,对照组肿瘤细胞,各处理组肿瘤组织切片可多见纤维钙化区以及大血管分布。同时光镜下可见对照组心肌细胞正常,细胞间连接及心肌横级清晰细胞核清晰完整,MDP-LADM 组仅见部分心肌肌横纹模糊,空泡变性而坏死则罕见,病理损害明显减轻,肺、肝、脾、肾组织未见异常。LADM 组与 MDP-LADM 组类似,程度较 MDP-LADM 组稍重一些。ADM 组可见细胞间连接模糊,心肌横纹消失及心肌空泡样变性或坏死。各组未见明显的肺转移性。由此也说明 MDP 对成骨肉瘤的靶向作用, ^{99m}Tc 标记的 ECT 扫描结果亦证实了这一点。

2.5 成骨肉瘤组织中阿霉素的含量测定结果表明 MDP-LADM 组中阿霉素含量明显增加,比 LADM 组、LADM 组及 Lip-ADM 组增加 25%~30%。荷瘤鼠肿瘤部位呈现均匀,致密的放射性核素浓度分布,肿瘤轮廓清晰可见。

3 讨论

3.1 阿霉素脂质体用于肿瘤治疗的报道甚多,其主要特点是利用脂质体的缓释作用以及脂质体和细胞的融合、内吞机制,改变了给药途径,从而降低阿霉素的不良反应,提高疗效。另一方面脂质体在体内主要被网状内皮系统丰富的器官如肝、脾等组织所摄取,因此具有一定的肝、脾、靶向性的特点,对治疗网状内皮部位的肿瘤非常有利,但对非网状内皮部位的肿瘤如骨肿瘤的治疗作用即受到了限制,因此国内外抗肿瘤药物脂质体用于骨肿瘤治疗的研究报道甚少。MDP 是临床常用的亲骨恶性肿瘤的检索扫描剂载体,具有天然亲

骨性,其亲骨性机制尚不清楚,可能与骨肿瘤快速生长过程中局部血管丰富,代谢旺盛、异常而造成的钙离子积累、pH 值改变等因素有关,ECT 扫描亦表明 MDP 在骨肿瘤部位呈现放射性浓集。由于磷脂和 MDP 都含有-OH 基,我们采用具有双功能基的 1,4-二异氰基甲苯酯使它们交联,再用其制备阿霉素脂质体即得到 MDP 与阿霉素脂质体的交联物,用它来治疗骨肿瘤,大大提高了药物在骨肿瘤组织中的浓度。从以往的研究结果来看,LADM 组中阿霉素在心脏中的含量明显低于其它各组,而在肝、脾中的含量高于其它各组,但是在骨中的含量很低^[9]。本实验利用 MDP 对成骨肉瘤的靶向作用使得阿霉素在骨肿瘤部位的浓度增加,再结合阿霉素脂质体的缓释性,提高其对骨肿瘤的治疗效果,降低了毒副作用。本研究为阿霉素脂质体治疗骨肿瘤进入临床打下了基础。

参考文献

- 1 Dorr RT., Von Hoff DD. *Cancer Chemotherapy Handbook*. 2nd. 出版地: Appleton and Norwalk, 1994, 284.
- 2 Myers CE, Chabner BA. Anthracyclines. In: Chabner BA, Collins JM, eds. *Cancer Chemotherapy-Principles and practice*: Lippincott: Philadelphia, 1990, 356.
- 3 Van Hoest QGCM, Steerenberg P. A, Gommein DJA, *et al.* Reduced cardiotoxicity and nephrotoxicity with preservation of antitumor activity of doxorubicin entrapped in stable liposomes. *Cancer Res*, 1984, 44: 3698.
- 4 谭天序主编. *临床核医学*. 北京: 人民卫生出版社, 1993, 861.
- 5 吴道澄, 朴湘浩, 王执民, 等. 阿霉素脂质体肝动脉栓塞后的体内分布与药代动力学研究. *现代应用药学*, 1997; 14(1): 24.
- 6 许国强, 黄雪红. 疏水改性聚乙烯醇的黏度行为. *精细化工*, 1999, 16(6): 1.
- 7 杭州大学化学系分析化学教研室编. *分析化学手册*. 第三册. 北京: 化学工业出版社, 1983, 410.
- 8 鄂征. *组织培养技术*. 北京: 人民卫生出版社, 1993, 107.
- 9 吴道澄, 陈江浩, 王执民. 阿霉素脂质体经肝动脉栓塞治疗肝癌的药效学研究. *中国现代应用药学*, 1998; 15(6): 10.