

去甲斑蝥素温敏型原位凝胶的制备及其对肝癌的抑制作用研究

谢明华¹, 蔡鑫君², 彭佳蓓¹, 蒋晓蕊¹, 葛敏^{1*} (1.杭州市余杭区第一人民医院药剂科, 杭州 311100; 2.浙江省中西医结合医院药剂科, 杭州 310003)

摘要: 目的 制备去甲斑蝥素温敏型原位凝胶并探讨其对肝癌的抑制作用。方法 以泊洛沙姆 407 及泊洛沙姆 188 为载体材料制备去甲斑蝥素温敏型原位凝胶, 采用小鼠 H22 肝癌细胞实体瘤模型考察去甲斑蝥素温敏型原位凝胶对荷瘤小鼠的肿瘤生长抑制作用。结果 制备所得原位凝胶在室温下外观为白色透明液体态, 凝胶温度下发生相转变形成凝胶时外观为白色透明凝胶态, 凝胶温度为 34 ℃, 具有显著的缓释特性; 体内抗肿瘤活性实验研究表明, 对小鼠荷肝癌实体瘤具有明显抑制作用。结论 去甲斑蝥素温敏型原位凝胶性质稳定, 并具有良好的抗肿瘤活性。

关键词: 去甲斑蝥素; 温敏型原位凝胶; 肿瘤抑制

中图分类号: R944.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2017)09-1262-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.09.010

引用本文: 谢明华, 蔡鑫君, 彭佳蓓, 等. 去甲斑蝥素温敏型原位凝胶的制备及其对肝癌的抑制作用研究[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(9): 1262-1265.

Study on Preparation and Anti-hepatoma of Norcantharidin Thermosensitive In-situ Gel

XIE Minghua¹, CAI Xinjun², PENG Jiabei¹, JIANG Xiaorui¹, GE Min^{1*} (1.Department of Pharmacy, First People's Hospital of Yuhang District, Hangzhou 311100, China; 2.Department of Pharmacy, Integrated Chinese and Western Medicine Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310003, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare thermosensitive in-situ gel of norcantharidin (NCTD) and to explore its inhibitory effects on hepatoma. **METHODS** NCTD thermosensitive in-situ gel was prepared using poloxamer 407 and poloxamer 188. Tumor growth inhibition caused by NCTD thermosensitive in-situ gel was examined on tumor-bearing mice using mouse H22 hepatoma cells to build a solid tumor model. **RESULTS** The prepared in-situ gel displayed a white transparent liquid state at room temperature but a white transparent gel state at gelling point, which was 34 ℃. Significant slow release characteristic was presented at gel state; anti-tumor activity experiment *in vivo* suggested significant inhibition effects on tumor growth in solid hepatoma bearing mice. **CONCLUSION** NCTD thermosensitive in-situ gel owns stable properties and good antitumor activities.

KEY WORDS: norcantharidin; thermosensitive in-situ gel; tumor inhibition

去甲斑蝥素(norcantharidin, NCTD)是斑蝥素的衍生物, 由马来酸酐和呋喃按 Diels-Alder 加成反应人工合成, 是我国首先合成的具有较强抗肿瘤活性和独特的升高白细胞作用的新型抗肿瘤药物, 主要用于原发性肝癌的治疗^[1-4], 具有良好的应用前景^[5-9]。但是 NCTD 有一定程度的泌尿系统毒性, 且较大剂量或长期使用有肾脏毒性; 同时, 由于其在体内消除速度较快, 给药次数增加, 降低了患者用药的顺应性。NCTD 的这些不良反应使其在临床应用上有着一定的限制。降低不良反应, 更好地发挥 NCTD 的抗肿瘤活性, 开发具有良好靶向性、缓释性的新型制剂已迫在眉睫^[10]。一

种制剂以溶液状态给药后, 能够立即在用药部位发生相变化, 成为半固体的凝胶状态, 称为原位凝胶。与传统的给药系统相比, 原位凝胶能较长时间和用药部位紧密接触; 有较好的生物粘附性, 从而提高生物利用度; 同时, 原位凝胶能够缓慢地释放药物, 减少给药次数, 提高患者用药的依从性。温度敏感型原位凝胶是一种随着温度的改变而发生相转变的凝胶, 将 NCTD 制备成温度敏感型原位凝胶用于局部抗肿瘤注射给药, 可延长药物在用药部位的停留时间, 使病患部位的药物浓度显著提高, 降低不良反应, 减少药物的刺激性, 从而增加药物的临床疗效^[11-14]。本实验通过

基金项目: 杭州市科技计划项目(20140633B57); 杭州市医药卫生科技计划(2015B32201552416); 杭州市余杭区科技计划项目(2014003)

作者简介: 谢明华, 男, 硕士生, 主管药师 Tel: (0571)89369507 E-mail: xmh53072@163.com *通信作者: 葛敏, 女, 副主任药师 Tel: (0571)89369508 E-mail: gm682013@sina.com

制备 NCTD 温度敏感型原位凝胶,测定凝胶温度和考察体外释药,并进行体内抗肿瘤作用研究,以期制备出适合临床使用的安全、有效、不良反应小、有良好抗肿瘤作用的新型给药系统。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent); BT25S 分析天平[赛马利科学仪器(北京)有限公司]; KQ-50E 超声仪(昆山市超声仪器有限公司); SHA-C 型水浴恒温振荡器(常州澳华仪器有限公司); TQZ-312 台式全温振荡器(上海精密实验设备有限公司); 85-2 型恒温磁力搅拌器(上海志威电器有限公司); Centrifuge 5415R 型离心机(德国 Eppendorf); BS223S 型电子天平(德国 Sartorius); CX21 型显微镜(Olympus 公司); Cobas 8000 型生化仪(德国罗氏公司)。

1.2 材料与试剂

NCTD 对照品(中国食品药品检定研究院,纯度:99.9%,批号:100414-201302); NCTD 原药(美仑生物,纯度>98%,批号:MB2105); 泊洛沙姆 188(上海昌为医药辅料技术有限公司,批号:WPDI608B); 泊洛沙姆 407(上海昌为医药辅料技术有限公司,批号:WPMI556B); 羟丙甲基纤维素(上海卡乐康有限公司); H22(小鼠肝癌细胞株)。

1.3 动物

Balb/c 裸鼠,♀,SPF 级,4~6 周龄,体质量 16~20 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物合格证号:SCXK(沪)2007-0005,饲养于浙江大学动物实验中心 SPF 屏障系统内。

2 方法

2.1 NCTD 温敏型原位凝胶的制备^[15]

精密称取 NCTD 原药 62.5 mg 于 50 mL 烧杯中,加入 25 mL 纯化水,搅拌使溶解。然后将其倒入一个预先加入 7 g 泊洛沙姆 407、0.4 g 泊洛沙姆 188 以及 0.025 g 羟丙甲基纤维素的烧杯中。混合物自然溶胀 4 ℃ 储存过夜除气泡,直到形成透明的溶液。

2.2 胶凝温度、凝胶相变时间及凝胶相变前后黏度的测定

按“2.1”项下方法制备 3 份 NCTD 温敏型原位凝胶溶液,应用倒置法进行测试^[16],测得溶液不再流动时所需的最低温度即为胶凝温度,每个样品测 3 次,取平均值;按“2.1”项下方法制备

3 份 NCTD 温敏型原位凝胶溶液,25 ℃ 放置 0.5 h,置于已预热至 37 ℃ 的试管中并保温,记录相变时间;按“2.1”项下方法制备 3 份 NCTD 温敏型原位凝胶溶液,分别测定 25 ℃ 和 37 ℃(胶凝后)时的黏度,考察凝胶相变前后黏度的变化。

2.3 稳定性的考察

将 2 份凝胶溶液分别于 25 ℃ 和 37 ℃ 条件下放置 15 min,2 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,观察其是否有分层等不稳定现象。

2.4 NCTD 温敏型原位凝胶体外释药的考察

精密吸取 5 mL 供试品溶液加入经过处理的透析袋内,将袋口扎紧放入装有 100 mL PBS(pH 6.6)溶液的广口瓶中,将广口瓶放入(37±1)℃ 的恒温水浴振荡器中,定时吸取 0.5 mL 透析液,并补加入等量的 PBS 溶液。同时考察原药的释放情况。采用 HPLC 测定 NCTD 浓度,计算累积释放率并绘制累积释放曲线。

2.5 体内抗肿瘤活性

将 0.2 mL 的 H22 细胞悬液($8 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$)皮下注射于裸鼠腋下,生长 1 周后测量肿瘤体积达到 100 mm³,将裸鼠随机分为 6 组($n=6$):空白组,瘤内注射不含药物的凝胶;模型组,不给任何药物;注射剂组,NCTD 腹腔注射,给药剂量为 2 mg·kg⁻¹,每天给药 1 次;温敏型原位凝胶低、中、高剂量组,瘤内注射,NCTD 给药剂量分别为 3.3, 6.6, 9.9 mg·kg⁻¹,隔 3 d 给药 1 次。每次给药前测量裸鼠体质量及瘤径。停药观察 2 d 后处死动物,测瘤径和瘤重。根据以下公式计算肿瘤体积:肿瘤体积(V)= $1/2 \times \text{长径} \times \text{短径}^2$ 。

2.6 统计学处理

选择 SPSS 16.0 软件进行统计分析,采用独立样本 *t* 检验分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义, $P<0.01$ 为差异有显著统计学意义。

3 结果

3.1 NCTD 温敏型原位凝胶的外观与胶凝温度测定

NCTD 温敏型原位凝胶室温时外观为白色透明液体态,胶凝温度时外观为白色透明凝胶态。所制得的 3 份样品的相变温度分别为 34, 33.9, 34.1 ℃。结果显示 NCTD 温敏型原位凝胶相变温度稳定在(33.9~34.1)℃,相变温度合适,符合在室温下为流体,在体温下发生相转变形成凝胶的要求。

3.2 凝胶相变时间测定

3 份样品发生相变时间分别为 101, 103, 102 s。

结果显示 NCTD 温敏型原位凝胶的相变时间较短, 胶凝速度较快, 表明凝胶溶液在体温下能迅速胶凝。

3.3 凝胶相变前后黏度的测定

NCTD 温敏型原位凝胶在室温下黏度较小, 有很好的流动性; 在体温下黏度较大。结果见表 1。

表 1 凝胶相变前后的黏度测定

Tab. 1 Viscosity of NCTD thermosensitive in-situ gel before and after gelation

温度/℃	黏度/mPa·s		
	样品 1	样品 2	样品 3
25	310	330	320
37	>100 000	>100 000	>100 000

3.4 稳定性考察

凝胶溶液在 25 ℃ 和 37 ℃ 胶凝后经离心不发生分层现象, 提示制剂稳定性较好。

3.5 体外药物释放考察

NCTD 原药及原位凝胶在 24 h 内的释放曲线见图 1, 由图中可以看出 NCTD 原位凝胶比原药释放缓慢, 说明原位凝胶具有缓释的效果。

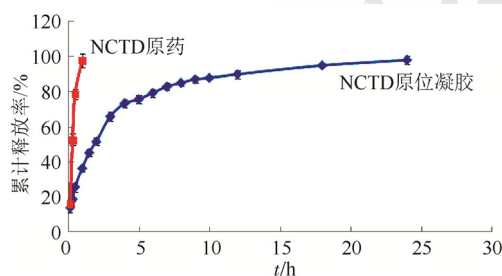


图 1 NCTD 原药及原位凝胶释放曲线($n=3$)

Fig. 1 *In vitro* drug release profiles of NCTD thermosensitive in-situ gel and free NCTD drug($n=3$)

3.6 体内抗肿瘤作用

NCTD 温敏型原位凝胶低、中、高剂量组与空白组、模型组比较, 肿瘤生长均缓慢($P<0.01$), 结果见图 2。与注射剂组比较, NCTD 温敏型原位凝胶中剂量组肿瘤体积显著改善($P<0.05$), 高剂量组有极显著的改善($P<0.01$), 这表明 NCTD 温敏型原位凝胶能有效抑制肿瘤生长, 延长荷瘤鼠存活时间。第 10 天注射剂组小鼠体质量明显低于其他组, 原位凝胶各剂量组体质量与空白组、模型组比较无明显降低, 这表明 NCTD 温敏型原位凝胶具有良好的安全性。

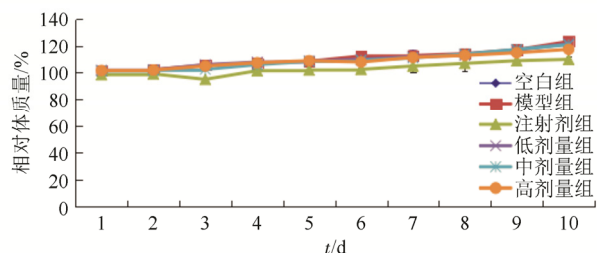
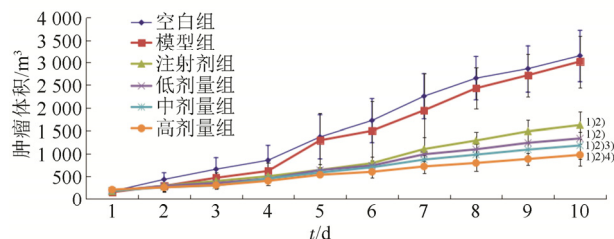
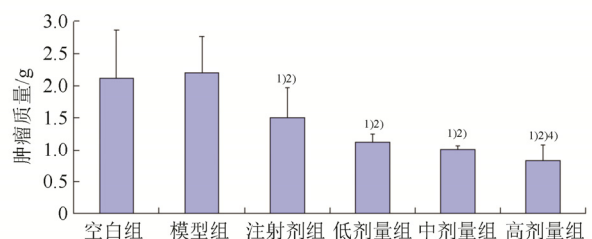


图 2 NCTD 温敏性原位凝胶体内抗肿瘤作用研究($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

与空白组相比, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组相比, ²⁾ $P<0.01$; 与注射剂组相比, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 2 Anti-tumor activity of NCTD thermosensitive in-situ gel on H22 tumor-bearing mice($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

Compared with blank group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.01$; compared with injection group, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$.

4 讨论

根据预实验结果以及相关参考文献^[17-19], 用泊洛沙姆 407、188 以及羟丙甲基纤维素作为辅料来制备温敏型原位凝胶, 凝胶温度适宜人体体温, 体外溶蚀时间较长, 有利于延长 NCTD 在用药部位的滞留时间, 且其体外释放呈现出明显的缓释特性。泊洛沙姆 407、188 在凝胶中所占的比例对凝胶温度的影响较大, 为使温敏型原位凝胶在注入人体后随温度升高迅速发生相转变, 应使凝胶温度略低于人体体温为最适宜^[20-22]。此外, 由于温敏型原位凝胶的制备需要一个过程, 需让其在自然溶胀, 4 ℃ 条件下储存 3~4 d 才能制备成透明的溶液^[23]。

在体内的抗肿瘤活性实验中, 以模型组、空白组和 NCTD 注射液组为对照, 比较了 NCTD 温敏型原位凝胶低、中、高剂量组对荷瘤小鼠的抑瘤作用, 结果表明中、高剂量的温敏型原位凝胶抑瘤效果较好。这主要由于温度敏感型凝胶注入

人体后由于温度升高而迅速发生相转变,在给药部位变成半固体状态的凝胶,填充于组织间隙,使患病部位的药物浓度显著提高,达到靶向、增加药物疗效的目的^[22-25]。根据本研究结果,将进一步通过相关药效学及药动学研究,从而开发适合临床应用的 NCTD 新制剂。

REFERENCES

- [1] REN J, LI G, ZHAO W, et al. Norcantharidin combined with ABT-737 for hepatocellular carcinoma: Therapeutic effects and molecular mechanisms [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(15): 3962-3968.
- [2] XIONG X, WU M, ZHANG H, et al. Atg5 siRNA inhibits autophagy and enhances norcantharidin-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma [J]. Int J Oncol, 2015, 47(4): 1321-1328.
- [3] CHEN S, QU X, WAN P, et al. Norcantharidin inhibits pre-replicative complexes assembly of HepG2 cells [J]. Am J Chin Med, 2013, 41(3): 665-682.
- [4] YANG H, GUO W, XU B, et al. Anticancer activity and mechanisms of norcantharidin-Nd3II on hepatoma [J]. Anticancer Drugs, 2007, 18(10): 1133-1137.
- [5] YANG P Y, HU D N, KAO Y H, et al. Norcantharidin induces apoptosis in human prostate cancer cells through both intrinsic and extrinsic pathways [J]. Pharmacol Rep, 2016, 68(5): 874-880.
- [6] LIU M C, LIU L, WANG X R, et al. Folate receptor-targeted liposomes loaded with a diacid metabolite of norcantharidin enhance antitumor potency for H22 hepatocellular carcinoma both *in vitro* and *in vivo* [J]. Int J Nanomed, 2016(11): 1395-412.
- [7] ZHANG J T, FAN Y Z, CHEN C Q, et al. Norcantharidin: a potential antiangiogenic agent for gallbladder cancers *in vitro* and *in vivo* [J]. Int J Oncol, 2012, 40(5): 1501-1514.
- [8] YU T, HOU F, LIU M, et al. Norcantharidin anti-angiogenesis activity possibly through an endothelial cell pathway in human colorectal cancer [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(2): 499-503.
- [9] LI Y, SUN Y, LIU F, et al. Norcantharidin inhibits renal interstitial fibrosis by blocking the tubular epithelial-mesenchymal transition [J]. PLoS One, 2013, 8(6): e66356.
- [10] MA J, TENG H, WANG J, et al. A highly stable norcantharidin loaded lipid microspheres: preparation, biodistribution and targeting evaluation [J]. Int J Pharm, 2014, 473(1/2): 475-484.
- [11] WU G, YUAN Y, HE J, et al. Stable thermosensitive in situ gel-forming systems based on the lyophilizate of chitosan/ α,β -glycerophosphate salts [J]. Int J Pharm, 2016, 511(1): 560-569.
- [12] DE DESSI M, BORZACCHIELLO A, MOHAMED THSSI M, et al. Novel biomimetic thermosensitive β -tricalcium phosphate/chitosan-based hydrogels for bone tissue engineering [J]. J Biomed Mater Res A, 2013, 101(10): 2984-2993.
- [13] DENG L P, DONG J, CAI H. Cantharidin as an antitumor agent: a retrospective review [J]. Curr Med Chem, 2013, 20(2): 159-166.
- [14] LU C, LIU M, FU H, et al. Novel thermosensitive in situ gel based on poloxamer for uterus delivery [J]. Eur J Pharm Sci, 2015(77): 24-28.
- [15] ZHAO Y, ZHOU L, LIU J, et al. Preparation and investigation of a novel levobupivacaine in situ implant gel for prolonged local anesthetics [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2016(16): 1-5.
- [16] MORSI N, GHORAB D, REFAI H, et al. Ketorolac tromethamine loaded nanodispersion incorporated into thermosensitive in situ gel for prolonged ocular delivery [J]. Int J Pharm, 2016, 506(1/2): 57-67.
- [17] GANDRA S C, NGUYEN S, NAZZAL S, et al. Thermoresponsive fluconazole gels for topical delivery: rheological and mechanical properties, *in vitro* drug release and anti-fungal efficacy [J]. Pharm Dev Technol, 2015, 20(1): 41-49.
- [18] CHU K, CHEN L, XU W, et al. Preparation of a paeonol-containing temperature-sensitive in situ gel and its preliminary efficacy on allergic rhinitis [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(3): 6499-6515.
- [19] NANJWADE B K, DESHMUKH R V, GAIKWAD K R, et al. Formulation and evaluation of micro hydrogel of Moxifloxacin hydrochloride [J]. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 2012, 37(2): 117-123.
- [20] CHEN E, CHEN J, CAO S L, et al. Preparation of nasal temperature-sensitive in situ gel of Radix Bupleuri and evaluation of the febrile response mechanism [J]. Drug Dev Ind Pharm, 2010, 36(4): 490-496.
- [21] SHIH Y H, LIN X Z, YEH C H, et al. Preparation and therapeutic evaluation of (188) Re-thermogelling emulsion in rat model of hepatocellular carcinoma [J]. Int J Nanomedicine, 2014(9): 4191-4201.
- [22] SINGH N K, LEE D S. In situ gelling pH- and temperature-sensitive biodegradable block copolymer hydrogels for drug delivery [J]. J Control Release, 2014(193): 214-227.
- [23] LIN Z, MEI D, CHEN M, et al. A comparative study of thermo-sensitive hydrogels with water-insoluble paclitaxel in molecule, nanocrystal and microcrystal dispersions [J]. Nanoscale, 2015, 7(36): 14838-14847.
- [24] SALIS A, RASSU G, BUDAI-SZUCS M, et al. Development of thermosensitive chitosan/glycerophosphate injectable in situ gelling solutions for potential application in intraoperative fluorescence imaging and local therapy of hepatocellular carcinoma: a preliminary study [J]. Expert Opin Drug Deliv, 2015, 12(10): 1583-1596.
- [25] WANG D, ZHAO J, LIU X, et al. Parenteral thermo-sensitive organogel for schizophrenia therapy, *in vitro* and *in vivo* evaluation [J]. Eur J Pharm Sci, 2014(60): 40-48.

收稿日期: 2017-01-04

(本文责编: 蔡珊珊)