

# 阿克拉霉素 A 聚氰基丙烯酸异丁酯毫微粒 冻干针剂体内外抗肝癌活性\*

蒋学华 廖工铁 黄光琦\*\* 白绍槐\*\*\* 袁淑兰\*\* 张旋波\*\*\*

(华西医科大学药学院, 成都 610041)

**摘要** 阿克拉霉素 A 聚氰基丙烯酸异丁酯毫微粒的冻干针剂,能明显抑制体外培养人肝癌细胞株 7703 的生长,IC<sub>50</sub>为 0.28  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。在 0.8  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 浓度时,克隆形成抑制率为 90%,抑制作用有明显剂量依赖关系而未见明显时间依赖关系。静脉给药后,对常位移植人肝癌模型裸小鼠的抑瘤率为 86.84%,肿瘤细胞增殖活性阳性率为 20.83%。体内外均显示明显的抗肝癌活性,且体内抗肝癌活性比阿克拉霉素 A 冻干针剂强。

**关键词** 阿克拉霉素 A; 毫微粒; 抗癌活性

靶向毫微粒给药系统是近年国际药学界广泛关注的研究课题<sup>[1]</sup>。作者以第二代蒽环类抗癌抗生素阿克拉霉素 A (aclacinomycin A, ACM) 为模型药物<sup>[2]</sup>,以氰基丙烯酸异丁酯为载体材料<sup>[3]</sup>,制备出具肝靶向分布特点的阿克拉霉素 A 聚氰基丙烯酸异丁酯毫微粒 (aclacinomycin A polyisobutylcyanoacrylate nanoparticles, ACM-IBC-NP) 冻干针剂<sup>[4]</sup>,本文报道其体内外抗肝癌活性。

## 材料与 方法

ACM 由国家医药管理局四川抗菌素工业研究所提供; ACM 冻干针剂为市售日本产品,每安瓿 20 mg; ACM-IBC-NP 冻干针剂自制,粒径范围 45~120 nm,长度数目平均径 76.85 nm,胶粒动电位 -13.14 mV,载药量与药物载带率分别为 48.76% 和 98.83%。

人肝癌细胞株 7703, 获自上海市肿瘤研究所, 常规培养传代, 培养液为 RPMI-1640, 含 15% 小牛血清, 100  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  青霉素, 100  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  链霉素。

人肝癌移植瘤株 LTNM4, 由上海医科大学中山医院肝癌室建株<sup>[5]</sup>, 引至本校实验动物中心 (F75+11 代)。

BALB/C-nu/nu 裸小鼠引自中国药品生物制品检定所, 本校实验动物中心繁殖和饲养, 符合卫生部三级实验小鼠质量标准。

本文于 1994 年 8 月 1 日收到。

\* 国家自然科学基金与卫生部青年科学基金资助项目 [批准号分别是 37270786 和卫科计发(93)第 078 号]。

\*\* 华西医科大学肿瘤研究所

\*\*\* 华西医科大学实验动物中心

## 细胞毒性试验

**1 量效关系** 根据定性毒性试验结果,选择量效关系试验的药物浓度为  $0.1 \sim 0.8 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。

接种人肝癌细胞株 7703,  $1.5 \times 10^5/25 \text{ ml}$  瓶,共 60 瓶。第 2 天随机分为 12 组,每组 5 瓶,分别加入 ACM-IBC-NP 和 ACM 冻干针剂,最终浓度分别为含 ACM 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 和  $0.8 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ,一组加 0.1% IBC-NP 冻干品,另一组作空白对照。加药后作用 48 h,换完全培养液,再培养 48 h 后,TV 消化细胞,苔盼蓝染色,计算细胞存活率(cell survival rate, CSR)。

**2 时效关系** 接种人肝癌细胞株 7703,  $1.5 \times 10^5/25 \text{ ml}$  瓶,共 40 瓶。第 2 天随机分为 4 组,每组 10 瓶,分别加入 ACM-IBC-NP 冻干针剂,最终浓度为含 ACM  $0.28 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ,ACM 冻干针剂,最终浓度为含 ACM  $0.34 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ , 0.1% IBC-NP 冻干品,另设一组作空白对照。加药后,每隔 24 h 各组随机取 2 瓶细胞,TV 消化后,计数细胞总数,连续测定 5 天。

## 克隆形成试验

人肝癌细胞株 7703,每平皿(60 mm)接种 1000 个,共 36 个平皿。第 2 天分为 12 组,每组 3 个平皿。分别加入 ACM-IBC-NP 和 ACM 冻干针剂,最终浓度为含 ACM 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 和  $0.8 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ,一组加 0.1% IBC-NP 冻干品,另设一组空白对照。药物作用 48 h 后,换完全培养液,将平皿再置二氧化碳孵箱继续培养 12 天,取出后用冰醋酸:甲醇(1:3)固定, Giemas 染色,对各组进行克隆计数,计数  $\geq 50$  个细胞的集落为一个克隆,并计算克隆形成抑制率(inhibition ratio of colony formation, IRCF)。

## 体内抑瘤试验

在无菌条件下,取 6~8 周龄 BALB/C-nu/nu 裸鼠 18 只,经 0.8% 戊巴比妥钠溶液全身麻醉,剖腹,直视下将人肝癌裸鼠移植瘤株 LTNM4 的肝癌组织约  $1 \text{ mm}^3$  移植于裸鼠肝右叶实质内,经良好止血后,分层缝合腹膜和皮肤,术后裸鼠饲养于 SPF 室内。

移植术后 24 h,将裸鼠随机分为 3 组,每组 6 只。一组给予 ACM-IBC-NP 冻干针剂,剂量以 ACM 计为  $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,第 2 组给予 ACM 冻干针剂,剂量  $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,第 3 组为生理盐水组, $0.1 \text{ ml} \cdot 10 \text{ g}^{-1}$ 。尾静脉给药,每 3 日一次,连续给药 5 次。停药后观察 14 天,断颈处死,剖取心、肝、脾、肺、肾等脏器,分离肝癌组织,称定重量,进行光镜检查与核分裂计数分析。并计算抑瘤率(TIR)。

## 肝脏肿瘤细胞增殖活性分析

将取自抑瘤试验的裸鼠肝脏肿瘤组织,常规甲醛固定,石蜡包埋后,用抗增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)单克隆抗体 PC10,采用高敏感的 ABPAP 法显示增殖细胞,用目镜计数器计数 500 个肿瘤细胞,计算阳性百分率<sup>[6]</sup>。

# 结 果

## ACM-IBC-NP 冻干针剂的细胞毒活性

**1 浓度对细胞毒性的影响** 以 CSR 对药物浓度作图得浓度效应曲线,见图 1。由图 1 可见,随着药物浓度增加,细胞存活率明显降低,表明 ACM-IBC-NP 冻干针剂与 ACM 冻干针剂对人肝癌细胞株 7703 具明显的细胞毒性作用,并有明显的剂量依赖关系。二者对人肝癌细胞株 7703 生长的半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )分别为  $0.28 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  与  $0.34 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ,二者间无显著差异( $P > 0.05$ )。0.1% IBC-NP 冻干品未见细胞毒作用,CSR 为 100%。

**2 ACM-IBC-NP 冻干针剂对体外培养细胞生长的抑制作用** 以药物作用时间对活细胞数作图,得细胞生长曲线,见图2。由图2可见,在各自的  $IC_{50}$  浓度作用下,ACM-IBC-NP 冻干针剂与 ACM 冻干针剂对人肝癌细胞株 7703 的生长有显著抑制作用(与空白对照组比较,  $P < 0.01$ ); 0.1% IBC-NP 冻干品对人肝癌细胞生长无显著抑制作用( $P > 0.05$ ); 两种制剂对人肝癌细胞生长的抑制作用无显著差异( $P > 0.05$ ); 两种制剂对人肝癌生长的抑制作用无明显的时间依赖关系。

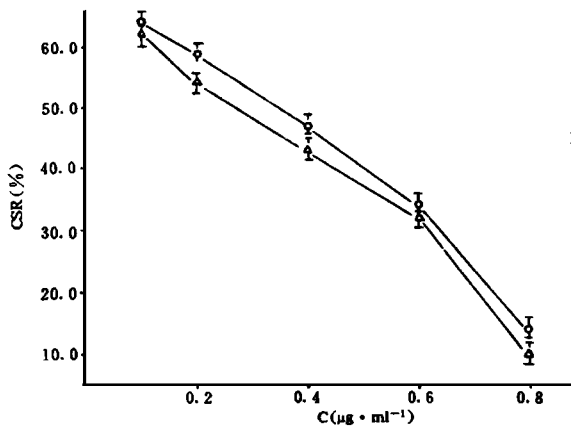


Fig 1 Effect of lyophilized ACM-IBC-NP and ACM on cell survival rate (CSR) of human hepatoma 7703 cell *in vitro*. —○— ACM; —△— ACM-IBC-NP.

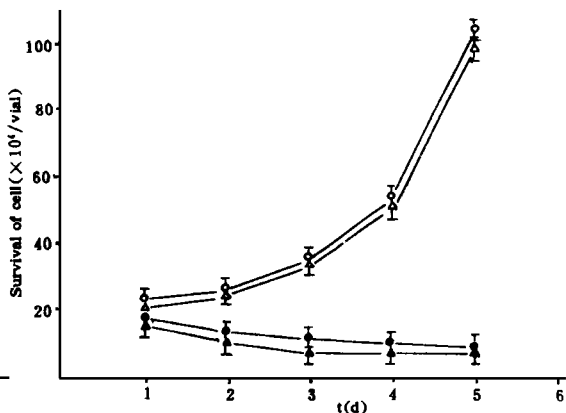


Fig 2 Effect of lyophilized ACM-IBC-NP and ACM on growth of human hepatoma 7703 cell *in vitro*. —○— Control; —△— IBC-NP; —●— ACM; —▲— ACM-IBC-NP.

**ACM-IBC-NP 对人肝癌细胞株 7703 克隆形成的影响**

不同药物浓度对测得的 IRCF 见表 1。由表 1 可见,给药组在各浓度时对人肝癌细胞株 7703 形成克隆有显著抑制作用( $P < 0.01$ ),并有明显的剂量依赖关系;两种制剂对克隆形成的抑制作用无明显差异( $P > 0.05$ ); 0.1% IBC-NP 冻干品对人肝癌细胞株 7703 克隆形成无明显影响( $P > 0.05$ )。

**Tab 1 Inhibition ratio of colony formation (IRCF) of lyophilized ACM-IBC-NP injection and ACM for human hepatocarcinoma cell (%)**

Drug	Concentration ( $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )				
	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8
ACM-IBC-NP	38 ± 1.5	43 ± 3.0	56 ± 4.2	78 ± 4.0	90 ± 2.8
ACM	34 ± 2.0	40 ± 3.5	54 ± 3.1	72 ± 4.1	88 ± 3.5
0.1% IBC-NP	3 ± 3.0				

ACM; aclacinomycin A; ACM-IBC-NP; aclacinomycin A polyisobutylcyanoacrylate nanoparticles

**ACM-IBC-NP 对常位移植人肝癌裸鼠的抑瘤作用**

结果表明,ACM-IBC-NP 冻干针剂与 ACM 冻干针剂有不同程度的抑瘤作用,二者的抑瘤率分别为 86.84% 和 46.69%,具有显著差异( $P < 0.01$ )。

光镜检查心、肝、脾、肺、肾等脏器未见异常;各实验组肝癌组织在光镜下可见明显差别,生理盐水组肿瘤细胞增生活跃,核分裂多,为4~8个/HP,ACM-IBC-NP冻干针剂组与ACM冻干针剂组肿瘤细胞核分裂数减少,分别有2~4个/HP和3~5个/HP,且多为中期相。

### ACM-IBC-NP冻干针剂对常位移植人肝癌裸鼠肿瘤细胞增殖活性的影响

各实验组裸鼠肿瘤细胞增殖活性阳性率测定结果分别是,ACM-IBC-NP冻干针剂组20.8%,ACM冻干针剂组为72.5%,生理盐水对照组为95.8%。ACM-IBC-NP冻干针剂组裸鼠肝癌细胞增殖活性阳性率显著低于ACM冻干针剂组与生理盐水对照组( $P < 0.005$ );ACM冻干针剂组裸鼠肝癌细胞增殖活性阳性率显著低于生理盐水对照组( $P < 0.005$ )。表明ACM-IBC-NP冻干针剂与ACM冻干针剂对常位移植人肝癌裸鼠肿瘤细胞增殖活性有显著抑制作用,前者影响大于后者。

## 讨 论

ACM是第二代蒽环类广谱抗癌抗生素,为了提高ACM的抗肝癌效果,降低其毒副作用,研制了具肝靶向分布特点的ACM-IBC-NP冻干针剂。

体外抗肝癌活性的比较研究表明,ACM-IBC-NP冻干针剂与ACM冻干针剂对人肝癌细胞株7703有明显的抗肝癌活性,其抗肝癌活性具有明显的剂量依赖关系而无明显的时间依赖关系。

体内抗肝癌活性的比较研究表明,ACM-IBC-NP冻干针剂与ACM冻干针剂对裸鼠常位移植人肝癌有不同程度的抗癌活性,二者的抑瘤率分别为86.84%和46.64%,有显著差异( $P < 0.01$ )。

肿瘤细胞增殖活性测定可用于临床肿瘤化疗评价<sup>[7]</sup>,PCNA是肿瘤细胞增殖过程中G<sub>1</sub>期和S期交界时大量存在的一种抗原,单克隆抗体PCIO是抗PCNA的抗体,以高敏感的ABPAP法,用PCIO显示PCNA,以判断肿瘤细胞中增殖活性细胞,因而,作者以此方法用于考察药物对肿瘤细胞增殖活性的影响。结果表明,ACM-IBC-NP冻干针剂与ACM冻干针剂对裸鼠常位移植人肝癌细胞增殖活性有显著抑制作用,二者的增殖活性阳性率分别是20.83%与72.50%,即前者抑制作用强于后者。

ACM-IBC-NP冻干针剂与ACM冻干针剂在体外抗肝癌活性间无显著差异,在体内抗肝癌活性间则有明显差异,一方面表明由于ACM-IBC-NP冻干针剂在体内分布时的肝靶向作用,使其肝癌细胞中药物量高于游离ACM(待发表),使前者在体内抗肝癌活性强于后者,而体外试验对药物间无分布差异,使其对肿瘤细胞的细胞毒性也无差异;另一方面提示,抗癌药物靶向制剂药效学评价以常位移植动物模型优于体外试验,前者能反映出靶向制剂与常规制剂的差异性。

## 参 考 文 献

- 1 蒋学华,廖工铁,姚倩. 毫微粒作为药物载体的应用. 中国药学杂志, 1994, 29: 643
- 2 Oki T, Matsuzawa Y, Yoshimoto A *et al.* New antibiotics, aclacinomycin A and B. *J Antibiotics*, 1975, 28: 830
- 3 张志荣,廖工铁. 聚氰基丙烯酸酯毫微粒的研究进展. 中国药学杂志, 1994, 29: 323
- 4 蒋学华,廖工铁. 阿克拉霉素A聚氰基丙烯酸异丁酯毫微粒冻干针剂的研究. 中国药学杂志, 1994, 29(增刊): 28

- 5 汤钊猷, 马曾辰, 薛琼等. 裸鼠人体肝癌移植模型的建立与应用. 肿瘤, 1986, 6 : 10
- 6 Carcia RL, Coltrera MD, Gown AM *et al.* Analysis of proliferative grad using anti-PCNA/cyclin monoclonal anti-bodies in fixed embedded tissues. *Am J Pathology*, 1989, 134 : 733
- 7 Dei Bino G, Silvestrini R, Costa A *et al.* Morphological and clinical significance of cell kinetics in non-Hodgkin' s lymphomas. *Basic Appl Histochem*, 1986, 30 : 197

## THE ANTIHEPATOMA EFFECT OF LYOPHILIZED ACLACINOMYCIN A POLYISOBUTYLCYANOACRYLATE NANOPARTICLES IN VITRO AND IN VIVO

XH Jiang, GT Liao, GQ Huang, SH Bai, SL Yuan and XB Zhang

(School of Pharmacy, West China University of Medical Sciences, Chengdu, 610041)

**ABSTRACT** This paper reports the results of experiments on the antihepatoma effects of live targeted drug delivery system—lyophilized aclacinomycin A polyisobutylcyanoacrylate nanoparticle (ACM-IBC-NP) *in vitro* and *in vivo*. The median inhibition concentration were found to be  $0.28 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  and  $0.34 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  of lyophilized ACM-IBC-NP and ACM respectively *in vitro*. The inhibition ratio of colony formation were found to be 99% and 88% of lyophilized ACM-IBC-NP and ACM respectively *in vitro*. The antihepatoma activity was shown to be significantly concentration dependent. The results showed that lyophilized ACM-IBC-NP and ACM possess strong cytotoxicity on human hepatoma cell 7703, and the cytotoxicity was not significantly different between lyophilized ACM-IBC-NP and ACM *in vitro*. The model of orthotopic transplantation of human hepatoma in nude mice were used for evaluation of the activity of lyophilized ACM-IBC-NP against hepatoma. The tumor inhibition rate were found to be 86.84% for lyophilized ACM-IBC-NP and 46.69% for ACM. The cell proliferative activity of hepatoma were found to be 20.83% by lyophilized ACM-IBC-NP and 72.50% by ACM. All the results indicate that lyophilized ACM-IBC-NP and ACM have clinical application potential and the antihepatoma activity of lyophilized ACM-IBC-NP was obviously higher than that of ACM.

**Key words** Aclacinomycin A; Nanoparticles; Antitumor activity