



雾化吸入羟基喜树碱对小鼠 B16 黑色素瘤 实验性肺转移的影响

张超¹, 胡巍², 方芸^{2*}

(1. 南京中医药大学 中西医结合鼓楼临床医学院, 江苏 南京 210029;

2. 南京大学 医学院 附属鼓楼医院, 江苏 南京 210008)

[摘要] 目的:通过雾化 10-羟基喜树碱(HCPT)用于治疗 B16 黑色素瘤肺转移癌小鼠,考察雾化吸入 HCPT 治疗肺癌的可行性以及疗效。方法:制作 B16 黑色素瘤肺转移癌小鼠模型,不同剂量雾化给药考察肺转移结节数、肺湿重、肺癌面积、平均直径等参数,计算脾脏指数和胸腺指数,并观察动物的生理生存状况,对肺癌组织进行病理组织学检查。结果:雾化给药组肺转移结节数、肺湿重、肺癌面积等参数明显少于模型组,直径相关参数未发生统计学差异;雾化给药组脾脏指数有所减小,胸腺指数较模型组和正常组有显著性差异,给药过程中雾化给药组实验动物生理状态均正常。病理组织学检查显示雾化给药组动物肺脏癌变组织状况有所改善。结论:雾化吸入 HCPT 给药对于黑色素瘤肺转移癌的治疗效果明显,具有一定的应用前景和深入研究的潜力。

[关键词] 雾化;羟基喜树碱;肺癌

10-羟基喜树碱(hydroxycamptothecine, HCPT)是从我国特有的珙桐科植物喜树 *Camptotheca acuminata* 中分离得到的 1 种抗肿瘤天然生物碱^[1]。其作用机制独特,主要通过抑制肿瘤细胞 DNA 拓扑异构酶 I (Topo I)起到抗肿瘤作用。目前已被广泛应用于膀胱癌、白血病等的治疗。肺癌作为全球致死率最高的恶性肿瘤之一,在临床上使用 HCPT 治疗时多采用静脉注射,较易产生毒副作用,因此常和其他抗癌药物联合使用进行化疗。

肺脏作为呼吸器官,具有巨大的吸收面积,肺上皮细胞极薄并且具有良好的通透性,对于一些大分子也具有一定透过性,下呼吸道的清除作用较为缓慢,具有较长的滞留时间。雾化给药系统正是将药物混合空气经呼吸道送入肺部,沉积在表面进行分布吸收,从而产生药效。针对肺部癌症,该给药途径可以使抗癌药物在肺脏和肿瘤组织中快速达到高浓度水平并减少在其他正常组织内的分布^[2],理论上确保疗效的同时可以有效降低抗癌药物的全身不良

反应。本文将初步考察雾化吸入 HCPT 用以治疗小鼠 B16F10 黑色素瘤肺转移癌模型,探究这一给药模式的可行性和治疗效果。

1 材料

1.1 动物与细胞 C57BL/6 小鼠(扬州大学比较医学中心),合格证号 SCXK(苏)2007-0001,体重 18~22 g,55 只,雌性。B16F10 小鼠黑色素瘤细胞株由南京中医药大学海洋中心药理实验室细胞库提供。实验动物在造模前饲养 1 周,饲养期间给予充足的食物和水,避免干扰刺激,控制环境温度和湿度,保持饲养空间的卫生。

1.2 药物与试剂 HCPT 注射液原料药(5 g·L⁻¹,黄石李时珍药业集团武汉李时珍药业有限公司,批号 20090701);乙腈(色谱纯,美国 TEDIA 公司);DMEM 高糖培养液(美国 Gibco 公司);小牛血清(兰州民海生物工程有限公司);胰酶(Sunshine);PBS(自制);Bouin's 固定液(自制)。

1.3 仪器 莱卡倒置显微镜(德国莱卡公司);Agilent 1100 高效液相色谱仪,SPD-10A 型荧光检测器(美国 Agilent 公司),Hedera ODS-3 C18 色谱柱(1.6 mm×250 mm,5 μm,江苏汉邦);C18 保护柱(10 mm×4.6 mm,5 μm,江苏汉邦);BARI-BOY 压缩雾化吸入机(德国百瑞有限公司);1200-II-A/B3 型生物安全柜(上海瑞仰净化装备有限公司);PHS-3C

[稿件编号] 20100302010

[基金项目] 南京市卫生局医学科技发展课题(YKK08052)

[通信作者] * 方芸,主任药师,硕士生导师, Tel: (025) 83304616-66669, E-mail: njglfy@163.com

[作者简介] 张超,硕士研究生, E-mail: colinainicky@163.com



pH计(上海雷磁)。

2 方法

2.1 细胞培养和动物模型制作 常规培养 B16F10 黑色素瘤细胞,实验前 4~5 d,按 1:10 传代于细胞培养瓶中,取对数生长期细胞,弃去培养液,PBS 洗净。加入 0.25% 胰酶消化液 1 mL,1~3 min 后,轻敲培养瓶使细胞脱落。加 10 mL DMEM,用移液管吹打细胞,获得单细胞悬液。1 200 r·min⁻¹ 离心细胞 10 min,用 PBS 洗 2 遍。计数调整细胞 2.5×10⁶ 个/mL。实验前每只小鼠尾静脉注射瘤液 0.2 mL 制作黑色素瘤自发性肺转移瘤小鼠模型。接种瘤液后第 2 天开始给药。

2.2 雾化吸入给药方案 雾化给药系统由 PARI-BOY 雾化机、直径为 0.8 cm 的塑料管和密闭的透明容器(1 L)组成,容器两端开口,一端通过塑料管和雾化机相连,另一端接外界大气。雾气通过塑料管进入密闭容器内,达到饱和后从对侧流出,以保持容器内雾气的流动性,防止药物液化贴壁。雾化机每分钟输出的气体量约为 4 L,可以将药液雾化成平均直径在 5 μm 以下的微粒,雾化 1 h 需要消耗约 2 mL 的药液。雾化给药时,将小鼠放置于容器中,保持自由呼吸并且避免外界干扰刺激,维持室温稳定。本试验将模型小鼠随机分为正常对照组、模型组、HCPT 雾化低、中、高剂量组;模型组 15 只,其余每组 10 只。高剂量组每天雾化 1 h(5 g·L⁻¹ 药液),中剂量组每天雾化 30 min(5 g·L⁻¹ 药液),低剂量组每天雾化 30 min(2.5 g·L⁻¹ 药液),各组每周给药 5 d,持续 21 d。

2.3 雾化吸入剂量控制 为对雾化给药剂量进行计算,在实验中使用公式 $D = C \times V \times DI \times T$ [3],其中 D 为雾化给药的剂量, C 为雾化装置中药物气体的饱和密度(通过对密闭容器内即时饱和气体药物进行液化收集,利用高效液相色谱法定量分析并进行换算。流动相乙腈-0.075 mol·L⁻¹ 醋酸胺 32:68,冰醋酸调 pH 6.4,流速 1.0 mL·min⁻¹), V 为实验动物每分钟的呼吸量(对于小鼠而言约为 1.0 L·min⁻¹·kg⁻¹), DI 为呼吸气体在动物肺部的分布系数(对于小鼠而言约为 0.3), T 为雾化吸入时间。在本试验中,经过公式计算,高剂量组小鼠模型经过 1 h 雾化的给药剂量约为 1.6 mg·kg⁻¹,中、低剂量组经过 30 min 雾化吸入的给药剂量分别约为 0.8, 0.4 mg·kg⁻¹。

2.4 黑色素瘤肺转移模型实验检测指标 雾化给药期间每日称量实验动物体重,观察生理活动状态以及死亡情况。雾化给药 21 d 后,摘眼球放血,颈椎脱位法处死动物并进行解剖,剥离肺脏、脾脏和胸腺,生理盐水洗净,称取湿重。肺脏组织利用 Bouin's 固定液固定 24 h,用 75% 乙醇溶液洗净黄色固定液,于解剖显微镜下观察统计肺部转移肿瘤结节数、测量肺结节直径、最大结节直径,换算平均结节直径、肿瘤面积等参数;并按照公式分别计算肿瘤转移抑制率、相对肺重以及脾脏指数和胸腺指数。

肿瘤转移抑制率 = (模型组平均转移结节数 - 给药组平均转移结节数) / 模型组平均转移结节数 × 100%

相对肺重 = 肺湿重 / 体重 × 100%

脾脏指数 = 脾脏质量 / 体重

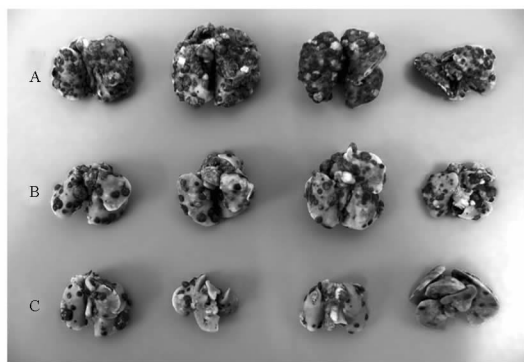
胸腺指数 = 胸腺质量 / 体重

2.5 肺癌组织病理学检查 给药结束后摘眼球放血,颈椎脱位法处死实验动物,剖取肺脏,生理盐水洗净,经 10% 甲醛溶液固定 24 h 后脱水,石蜡包埋,制作厚 4 μm 的标准切片。HE 染色制备小鼠肺脏组织病理标本,并在显微镜下观察。

2.6 统计学方法 实验数据使用 Microsoft Excel 2007 进行统计,所得结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并利用 Student's t -test 进行统计分析。 $P < 0.05$ 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 对黑色素瘤肺转移结节数、肺湿重、肿瘤面积的影响 经过 21 d 雾化给药后肉眼观察标本,发现模型组小鼠肺脏布满黑色肿瘤结节,且体积较大;雾化中、高剂量组肺脏肿瘤结节转移量明显少于模型组(图 1)。在解剖显微镜下观察,中、高剂量组抑癌作用较为明显,转移抑制率分别为 30.6%,51.3%;低剂量组结节数量也有所减少,抑制率为 16.3%。肺部肿瘤面积参数是根据圆形面积公式对每个结节面积进行换算,再统计求得。较于模型组,中、高剂量组肿瘤面积显著减少($P < 0.01$)。肺湿重可以体现肺脏损伤程度,相比正常小鼠,不论是雾化给药组还是模型组动物肺湿重都有显著增加,而较于模型组,不同剂量雾化吸入均可减轻肺湿重,其中中、高剂量组效果明显($P < 0.01$)。进一步考察相对肺重参数,也显示出相同的结论,表明不同剂量雾化给药可以在一定程度上改善肺脏的损伤(表 1)。



A. 模型组; B. 中剂量组; C. 高剂量组。

图1 模型组和 HCPT 雾化给药组黑色素瘤肺转移状况

表1 雾化 HCPT 对黑色素瘤肺转移小鼠肺湿重、相对肺重、肺转移结节数、肿瘤转移抑制率和肿瘤面积的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /mg · kg ⁻¹	实验后数量 /实验数量	肺重 /mg	相对肺重 /%	肺转移结节 数量	肿瘤转移 抑制率/%	肿瘤面积 /mm ²
正常	-	10/10	129.6 ± 5.4	0.65 ± 0.05	0	0	0
模型	-	11/15	655.9 ± 218.3 ⁴⁾	3.83 ± 1.36 ⁴⁾	162.3 ± 39.4	0	217.07 ± 77.89
HCPT	0.4	10/10	522.6 ± 189.3 ⁴⁾	2.70 ± 0.99 ⁴⁾	135.9 ± 48.6	16.3	167.10 ± 121.37
	0.8	10/10	396.9 ± 93.5 ^{2,4)}	2.15 ± 0.59 ^{2,4)}	112.6 ± 40.6 ¹⁾	30.6	125.93 ± 53.23 ²⁾
	1.6	10/10	307.8 ± 123.0 ^{2,3)}	1.66 ± 0.67 ^{2,3)}	79.1 ± 59.6 ²⁾	51.3	68.32 ± 49.19 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与正常组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表3同)。

就直径大于 2 mm 的肿瘤数量所占比例而言,中、高剂量组有所减小,表明雾化给药适度改善了直径较大的肿瘤结节在肺脏中的分布状况(表2)。

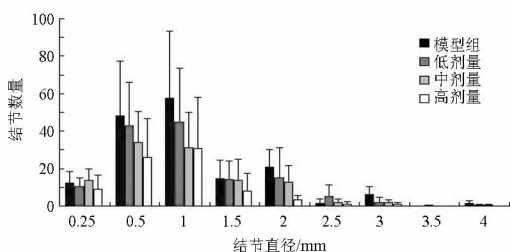


图2 模型组和 HCPT 雾化给药组的肿瘤直径分布情况

表2 雾化 HCPT 对黑色素瘤肺转移结节直径相关参数的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 /mg · kg ⁻¹	结节平均直径 /mm	最大结节直径 /mm	直径大于 2 mm 的结节比例/%
模型	-	1.09 ± 0.21	3.55 ± 0.52	19.1 ± 8.2
HCPT	0.4	1.00 ± 0.31	3.06 ± 0.86	19.4 ± 0.8
	0.8	0.92 ± 0.22	3.44 ± 0.58	15.7 ± 7.7
	1.6	0.92 ± 0.20	2.83 ± 0.56 ¹⁾	11.9 ± 12.3

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对黑色素瘤肺转移癌结节直径大小相关参数的影响 对于肺转移癌,结节直径参数是重要的参考指标。不论是模型组还是雾化给药组,结节数量都集中分布在直径 0.5 mm 至 1 mm 范围内,在直径大于 2 mm 的范围中,高剂量组则很少再出现结节(图2)。雾化给药组平均直径较模型组有所下降,但是变化差异不明显。在最大肿瘤直径方面,低、中剂量组减小幅度不大,而高剂量组最大肿瘤直径则明显小于模型组($P < 0.01$)。肺表面的肿瘤结节直径范围从最小 0.25 mm 至最大 4 mm,范围较广且数量变化较大,其中大于 2 mm 可以算作较大结节,

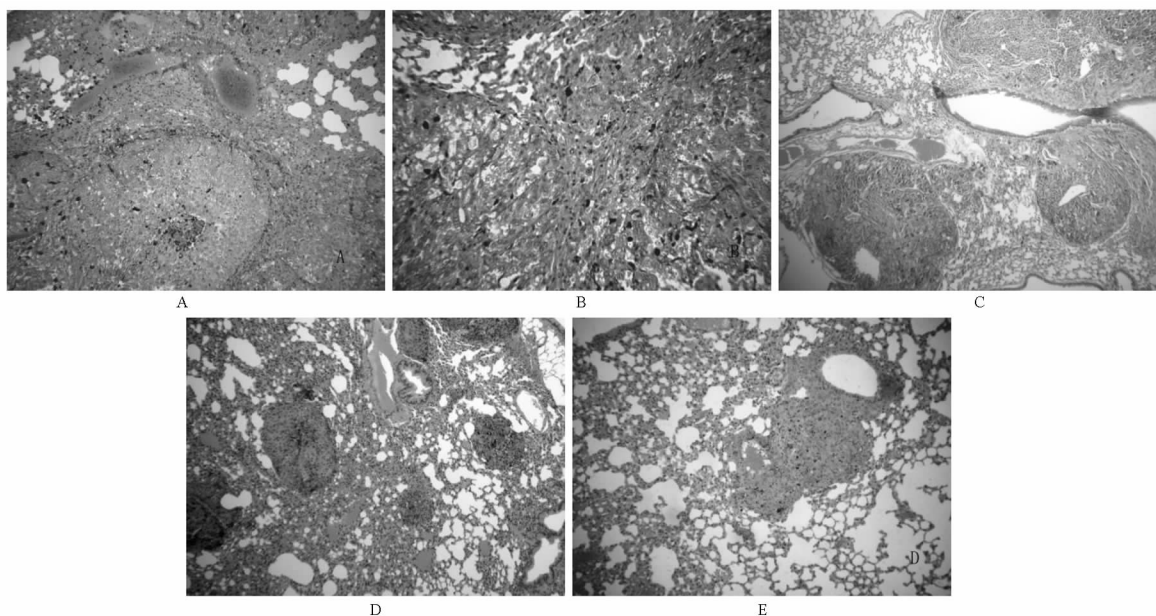
3.3 对脾脏质量、胸腺质量和相关免疫指数的影响 雾化给药各剂量组的脾脏质量和脾脏指数与正常组和模型组相比均没有显著差异,但是均有一定的增长。与正常组比较,各组的胸腺质量和胸腺指数均有所减小,其中模型组和低、中剂量组具有显著性差异($P < 0.01$)。而与模型组相比,雾化给药组的胸腺质量和胸腺指数有所增加,并且中、高剂量组具有统计学差异($P < 0.05$)(表3)。

3.4 病理组织学检查 模型组动物肺脏存在多处恶性黑色素瘤结节,结节较大,细胞核异形性明显,核分裂多见,瘤细胞浆内大量黑色素,肺泡壁较完整,存在肺泡充血、变性、坏死现象,经放大后可见有大量黑色素瘤特有的色素颗粒沉积。雾化给药组动物肺脏与模型组相比,在视野范围内存在较少恶性黑色素瘤结节,并且结节较小,肺泡壁完整,少见或未见肺泡充血、变形、坏死等状况,支气管未见明显异常(图3)。

3.5 对模型动物生理生长状况的影响 在给药期间,雾化给药组平均动物体重没有明显变化,未出现死亡。模型组动物平均体重从第 15 天开始下降(图4),由 19.2 g 下降至 16.0 g,并且伴随有动物死

表3 模型组和 HCPT 雾化给药组脾脏重、胸腺重、脾脏指数、胸腺指数的差异 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	脾脏质量/mg	脾脏指数	胸腺质量/mg	胸腺指数
正常	-	77.38 ± 9.53	38.85 ± 3.79	43.51 ± 3.53	21.90 ± 1.92
模型	-	70.43 ± 11.92	40.45 ± 4.46	25.78 ± 7.63 ⁴⁾	15.08 ± 4.94 ⁴⁾
HCPT	0.4	80.03 ± 7.02	41.20 ± 3.25	31.04 ± 6.56 ⁴⁾	16.00 ± 3.38 ⁴⁾
	0.8	79.30 ± 5.80	42.58 ± 2.40	36.61 ± 4.57 ^{2,4)}	19.65 ± 2.16 ^{1,3)}
	1.6	78.44 ± 7.56	42.03 ± 3.30	36.93 ± 9.37 ²⁾	19.83 ± 5.11 ¹⁾



A. 模型组 ($\times 100$); B. 模型组 ($\times 200$); C. 低剂量组 ($\times 100$); D. 中剂量组 ($\times 100$); E. 高剂量组 ($\times 100$)。

图3 模型组与雾化给药组小鼠肺组织病理学变化(HE)

亡(表1)。通过解剖观察,模型组在黑色素瘤肺转移过程中肺脏严重受损,且会少量转移到肠、肝、心脏等重要脏器,造成小鼠生理活动变差、毛色粗糙、体质下降、运动减少,直至死亡。相比而言,雾化给药组体重并未发生较大波动,生理状况均正常,未发现明显其他脏器转移。

4 讨论

肺癌是全世界临床上致死率最高的恶性肿瘤之一,目前可靠的治疗手段仍为化疗^[4]。传统给药途径治疗肺癌面临着一系列困难,其疗效不理想、严重的系统毒性对患者造成了极大痛苦,限制了多数抗癌药物的使用。经前期研究发现^[5]静脉注射 HCPT 后只能短时间维持肺部血药浓度,而在其他脏器中分布较多,使肺癌组织内的药物无法达到有效浓度水平。而对于雾化给药系统,理论上可以直接将药物靶向输送到肺部,在保证疗效的同时减少药物的使用量。HCPT 的临床耐受剂量约为 $16 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ ^[6],折换成小鼠的等效剂量约为 $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,而本试验 HCPT 经过 1 h 的雾化实际给药量仅有 $1.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,中剂量经过 30 min 雾化的实际给药量只有 $0.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,却达到了较为理想的治疗效果。

对于肺转移癌的药效学指标,多选择转移结节

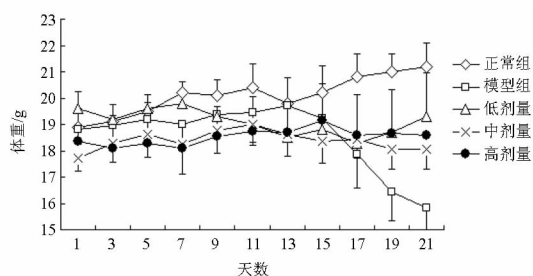


图4 模型组与 HCPT 给药组小鼠体重变化状况



数和抑制率,较为单一、片面。本试验在此基础上增加结节分布、最大结节直径、平均直径等参数,细化指标,从不同角度全面考察药物对黑色素瘤的抑制效果。经统计,雾化给药组肺癌结节数量、肺湿重、肿瘤面积和最大结节直径等参数均有显著性减小,但是对于平均结节直径和大结节所占比例影响不大;并且可以改善免疫系统损伤,在给药期间未见动物生理活动发生异常变化。实验结果验证了雾化给药治疗肺癌的可行性,体现了雾化吸入 HCPT 的抗癌作用。提示疗效的产生可能是由于药物经雾化吸入后靶向分布至肺脏组织,提高肺脏局部药物浓度水平,避免首关消除和血液循环分布过程,防止药物过多积聚在肝脏和血液,从而加快了起效时间,减少了全身的不良反应。

雾化给药作为一种新兴治疗手段,存在着独特的应用优势,同样具有自身的缺点。该给药途径临床上用于肺癌治疗曾有过尝试,但是缺乏系统的临床前研究。雾化给药装置的稳定性和剂量控制一直都是临床前实验的难点。对于大型动物和人而言多用呼吸面罩进行给药,但是给予小鼠一类的小型动物则无法进行,因为面罩的雾化面积和雾化气流量远远高于小鼠的承受能力,使得药物流失较多。国内对于雾化给药剂量的选择方法上主要分为控制雾化给药时间^[7]和控制雾化液药量^[8]2种,前者单纯的对雾化时间进行定量,缺少对吸入药量的准确估计;后者简单的把装置雾化的药液量与动物吸入的药量等同,均不准确,况且这两种情况均没有一套成熟的理论公式来解决剂量换算问题。

本试验以小鼠的自由呼吸为主,通过调整密闭空间的大小来保持气体药物的流动性,排除外界环境对雾化过程的干扰,克服了雾化给药的不稳定性。雾化器所产生的药物微粒平均直径小于 5 μm ,更加有利于药物在肺脏组织中的分布,避免在雾化过程中过多附着在呼吸道中^[9]。而对于剂量控制问题,本实验所提出的 $D = C \times V \times DI \times T$ 公式,将动物自

身的生理特征与雾化装置的运行状况相结合,全面考虑了整套雾化给药平台的特点,通过控制时间的变化来调节不同的给药剂量,并且对其进行估算,相对于以往的单方面考虑雾化器的特性来进行定量的方法更加准确,也给未来寻找准确合适的安全剂量、进一步精确临床雾化给药提供了一个研究方向。

本试验结果表明雾化吸入这一给药途径对于肺癌的治疗具有一定的可行性,存在较大的研究潜力,通过雾化吸入 HCPT 可以有效地抑制黑色素瘤的肺部转移,并且能够显著改善模型动物的生理状况,相关雾化吸入给药系统对于 HCPT 治疗肺癌的作用机制还有待进一步的研究。

[参考文献]

- [1] Wall M E, Wani M C, Cook C E, et al. Plant antitumor agents. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata* [J]. J Am Chem Soc, 1966, 88(16): 3888.
- [2] 陈军,方芸,张海霞. 雾化吸入羟基喜树碱在兔体内的组织分布[J]. 药学报, 2004, 39(9): 747.
- [3] Koshkina N V, Kleinerman E S, Waidrep C, et al. 9-Nitrocamptothecin liposome aerosol treatment of melanoma and osteosarcoma lung metastases in mice [J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(7): 2876.
- [4] Koshkina N V, Waldrep J C. Camptothecins and lung cancer: improved delivery systems by aerosol. [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2003, 3(4): 251.
- [5] 方芸,张海霞,谈恒山. 雾化吸入与静脉注射羟基喜树碱在兔体内的药动学比较[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(16): 1255.
- [6] 张力,李苏,廖海,等. 羟基喜树碱 I 期药代动力学及人体耐受性临床研究[J]. 癌症, 2001, 20(12): 1391.
- [7] 王忆勤,董志颖,李福凤,等. 复方麻辛雾化液对哮喘豚鼠气道炎症机制的影响[J]. 中国新药与临床杂志, 2007, 26(11): 817.
- [8] 朱晨,曾鸣,闫凌丽,等. 雾化吸入布地奈德对博莱霉素致大鼠肺纤维化的干预作用[J]. 泸州医学院学报, 2008, 31(5): 493.
- [9] Kellaway I W, Farr S J. Liposomes as drug delivery systems to the lung [J]. Adv Drug Deliv Rev, 1990, 5(1): 149.



10-Hydroxycamptothecin aerosol treatment inhibits lung metastases in B16F10 melanoma mice models

ZHANG Chao¹, HU Wei², FANG Yun^{2*}

- (1. *Nanjing Drum Tower Hospital Clinical of Traditional Chinese and Western Medicine of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;*
2. *Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China*)

[**Abstract**] **Objective:** To estimate the effect of 10-hydroxycamptothecin (HCPT) to the melanoma lung metastasis mice models and the feasibility of aerosol delivery treatment for lung cancer therapy. **Method:** B16F10 melanoma lung metastasis mice models were made, and nodules number, inhibition rate, tumor area, mean nodules diameter and so on were investigated after the aerosol delivery treatment. Spleen index and thymus index were calculated at the end of the experiments. The change of body weight, physiological state and the lung tumor tissue in pathological histology were inspected. **Result:** The total number of tumor lesions, weight of lungs and the area of lung metastasis of aerosol treatment group had significant difference comparing with normal group and control group. Mean nodules diameter had no significant difference comparing with control group. The spleen index of aerosol treatment group was decreased and thymus index was significantly decreased comparing with normal group and control group. During the treatment there are no obvious changes in physiological state. The lung cancer tissue of aerosol delivery treatment group was recovered in pathological histology. **Conclusion:** The results suggested that aerosol delivery of HCPT demonstrated powerful antitumor activity and was useful for melanoma lung metastasis by aerosol delivery treatment.

[**Key words**] aerosol; 10-hydroxycamptothecin; lung cancer

doi:10.4268/cjcm20110522

[责任编辑 张宁宁]