

科安乳膏抗癌作用机理的初步研究

赵奇红¹, 张颖¹, 刘赞¹, 周绪天², 温龙平¹

(1. 中国科学技术大学生命科学学院, 安徽合肥 230027; 2. 安庆镇痛消瘤研究所, 安徽安庆 246001)

摘要: 为了寻求高效低毒副作用的抗癌药物, 对传统中药的剂型加以改进, 并且探寻其抗癌机理, 以安庆消瘤散传统剂型为基础, 运用透皮给药技术, 发展成新的剂型——科安乳膏。体外实验结果显示纳米化的药物悬液可以有效地抑制肿瘤细胞生长, 诱导凋亡; 体内试验显示科安乳膏通过透皮给药可以达到适宜的血药浓度和组织分布, 具有很好的阻止肿瘤内血管生成、抑制肿瘤生长的效果。结果表明科安乳膏是一种具有良好抗癌活性的透皮药物。

关键词: 科安乳膏; 抗癌活性; 皮肤黑色素瘤; 血管生成; 透皮给药

中图分类号: R282.71/.77/05 **文献标识码:** A

Anticancer effect of Kean Cream *in vivo* and *in vitro* on mouse melanoma skin cancer via transdermal drug delivery

ZHAO Qi-hong¹, ZHANG Ying¹, LIU Yun¹, ZHOU Xu-tian², WEN Long-ping¹

(1. School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China;

2. Anqing Anticancer & Analgesia Research Institute, Anqing 246001, China)

Abstract: To investigate the anticancer effect of Kean Cream, in which realgar nanoparticles are the main ingredient, a transdermal drug delivery system was applied to tumor tissues to increase its bioavailability and decrease its toxicity. The results show that Kean Cream could significantly suppress the proliferation and induce apoptosis of B16 melanoma cells, both in a dose-dependent manner, and tests *in vivo* show that Kean Cream can decrease tumor volume markedly compared to the control. Furthermore, HE stain revealed that Kean Cream can inhibit angiogenesis. Meanwhile, Kean at this concentration has little side-effect on mice. These results suggest that Kean Cream is a potential efficient transdermal anticancer agent.

Key words: Kean Cream; anticancer activity; melanoma; angiogenesis; transdermal drug delivery

0 引言

在中国和欧洲,几千年来雄黄(其主要活性成分为 As_4S_4)一直被用做一种药物或药方中的成分来

治疗多种疾病,如银屑病等^[1~4]。并且由于它显著的抗癌效应而在近些年来引起了越来越多的关注,尤其在治疗顽固性或复发性急性前髓细胞性白血病和慢性髓细胞性白血病方面疗效显著^[5,6]。经过纳

收稿日期:2008-07-04;修回日期:2008-11-12

基金项目:国家重点基础研究发展(973)计划(2006CB933300,2007CB935800),国家自然科学基金(30721002),中国科学院知识创新工程(KSCX2-YW-R-139),教育部培养基金(NO706035)和安徽省科技厅重点项目(07010302183)资助。

作者简介:赵奇红,男,1977年生,博士。研究方向:抗癌药物筛选及其机理研究。E-mail: qihong@mail.ustc.edu.cn

通讯作者:温龙平,博士/教授。E-mail: lpwen@ustc.edu.cn

米化处理之后,传统的中药材料的药效得到明显提高,临床治疗效果也有所提高^[7].透皮给药(TDD)是一种通过皮肤的药物吸收系统,能提供稳定的血浆药物浓度,减少对机体的副作用和给药次数,从而提高病人的生活质量,避免药物的首过代谢效应以及口服带来的低生物利用度^[8,9].本实验展示了科安乳膏的抗癌活性,并初步研究了它的抗癌作用机理.

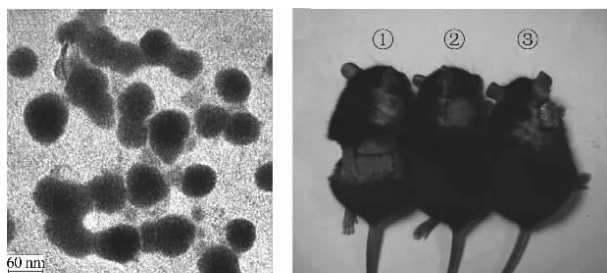
1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性 C57BL/6 小鼠(6~8 周,体重 20~24 g)购买自中国科学院上海实验中心,饲养在 SPF 级动物房中.动物实验的全部过程严格按照动物实验指导条例进行.

1.2 试剂

青霉素,链霉素,MTT 均购自美国 Sigma 公司.RPMI1640 细胞培养液和新生小牛血清购自美国 Gibco 公司.雄黄购自亳州敬德药业有限公司.将雄黄和生姜粉末纳米化处理后分散于 RPMI1640 中,超声处理 30 min,400 r/min 振荡过夜,最后通过 0.22 μm 的滤膜过滤处理.采用透射电镜(JEM-2011 JOEL,日本东京产)对药物粉末进行了形态学检测(图 1(a)).溶液中总砷浓度经过适当稀释后通过石墨炉原子吸收光谱分析法(GFAAS, AAnalyst 800, Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT, USA)进行检测.乳化剂的成分除了水以外全部购买自北京桑普生化有限公司.药粉和乳化剂形成 1:2(w/v)的乳剂供透皮实验使用.



(a) 透射电镜图

(b) 透皮给药方式

① 不涂于肿瘤组织皮肤,② 涂于肿瘤组织皮肤,

③ 只是涂有载体 CREAM 膏剂的对照组

图 1 科安乳膏药粉纳米粒子的透射电镜图和给药方式示意图

1.3 细胞培养

小鼠黑素瘤细胞 B16 购买自中国科学院上海细胞培养中心.细胞培养在 RPMI 1640 中,培养液中添加 10% 小牛血清、100 U/mL 青霉素、100 g/mL 链霉素,放置于含 CO_2 的细胞培养箱中 37 $^\circ\text{C}$ 培养,每 2~3 天传代一次以便细胞处于对数增长.

1.4 细胞生长抑制测定和凋亡检测

B16 细胞的生长抑制通过 MTT (3-[4,5-二甲基噻唑]-2-联二苯四唑盐溴化物)测定.简单地说,将细胞按照 2.0×10^5 个/mL 的浓度加入 96 孔板中,然后在细胞中加入不同浓度的药物悬液(0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.2, 0.5, 1, 1.5, 2 g/mL)并培养 48 h.此实验重复 3 次.最后,每孔加入 10 μL 的 5 mg/mL MTT,并于 37 $^\circ\text{C}$ 温箱中孵育 4 h.在孵育的过程中,活细胞能将四唑盐转化为蓝色的甲月替产物.然后,每孔中再加入 150 μL DMSO 来溶解细胞和甲月替结晶,通过读板计(Bio-teck, Elx 800, USA)读取 570 nm 波长处的光吸收值.

1.5 科安乳膏在活体内的抗癌活性研究和组织学分析

小鼠皮肤黑素瘤模型是通过在背侧注射 B16 细胞而建立的.肿瘤长到 80 mm^3 左右大小即可开始实验.肿瘤体积通过游标卡尺测量其长径和短径,再按以下公式进行计算:体积 = $0.52 \times \text{长径} \times \text{短径}^2$.为了探讨科安乳膏剂型和最适剂量,我们对科安乳膏和既往剂型(安庆消瘤散,复方粉剂)以及单一成分雄黄进行了体内抗癌活性比较,同时还进行了最适剂量研究.其活性成分提取之后也进行了抗癌活性比较.同时对于不同给药部位进行分析.给药时间都是开始实验的前三天,每天一次体外透皮给药.给药的剂量为 4 mL/(kg · d)于 2 cm^2 体表面积.活性成分抗癌活性试验中给药剂量换算成相当于科安乳膏的量.

对实验中动物体重、摄食行为以及行为状态等进行记录,以此来分析乳膏在此治疗浓度下对于动物的毒副作用.

小鼠被处死后,迅速取出肿瘤组织进行组织学检测.即用 10% 甲醛固定组织,乙醇脱水,常规组织切片,用苏木素-伊红(HE)染色.

1.6 砷在活体内的分布以及药代动力学检测

每次给药前采血,每次采血保证在每天的同一时刻,可以间隔 24 h 或 48 h.小鼠处死后,迅速取出肝、肾和肿瘤组织,-20 $^\circ\text{C}$ 冷冻保存,用于随后的组

Fig. 1 TEM spectra of the nanosized realgar particles and the transdermal drug deliveries

织砷含量测定. 样品中砷含量测定都采用石墨炉原子吸收光谱分析法测定.

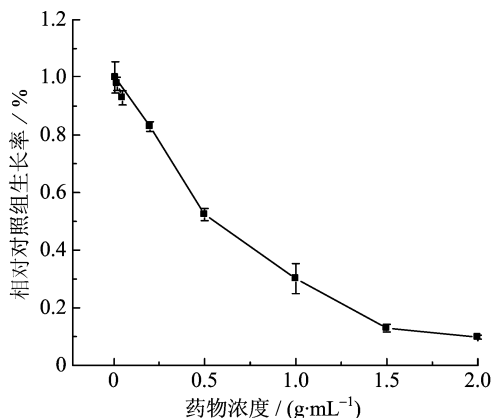
1.7 数据分析

数据以 mean ± S. D. 方式呈现, 并且使用了 Student's t-检验. 如果 p 值小于 0.05 则被认为具有统计学意义.

2 结果

2.1 药物对细胞增殖抑制作用研究

将 B16 黑色素瘤细胞以 1×10^5 个/mL 密度成功种入细胞之后, B16 细胞会被暴露在 0~2.0 g/mL 的药粉纳米悬液中 48 h. 它的增殖以浓度依赖的方式被显著抑制(图 2.), 而浓度小于 0.2 g/mL 时, 对增殖的抑制作用将会明显减弱; 当浓度大于 1.0 g/mL 时, 则可以直接杀死肿瘤细胞.



每个数据是细胞数目和空白对照组的比较百分数
图 2 科安乳膏药粉对于 B16 细胞生长的影响
Fig. 2 Effect of Kean on B16 cell proliferation

2.2 药物对凋亡的诱导作用研究

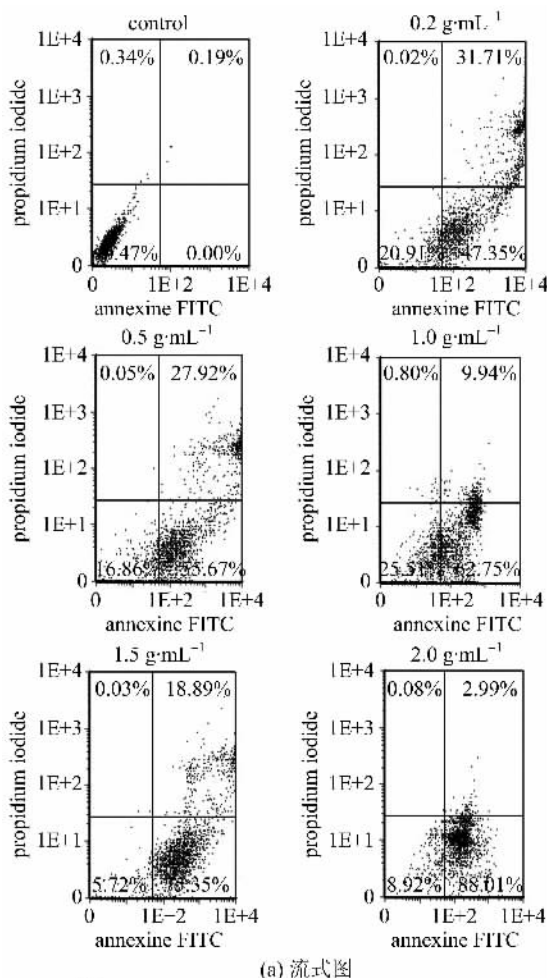
由流式细胞仪结果显示, 当浓度达到 0.2 g/mL 时, 凋亡率为 $(44.61 \pm 4.25)\%$; 达到 2.0 g/mL 时, 凋亡率为 $(86.42 \pm 1.71)\%$. 并且诱导能力是浓度依赖的(图 3).

2.3 科安乳膏体内抗癌活性研究

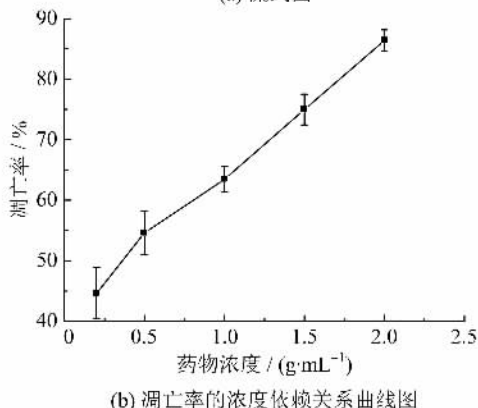
2.3.1 不同剂型比较和最适剂量研究

为了显示新剂型科安的抗癌活性, 将消瘤散既往剂型、单一成分雄黄, 和新剂型科安进行了体内实验比较(如图 4(a)). 与对照组相比, 既往剂型和单一成分雄黄在抗癌效果上相当, 但是科安乳膏则有更好的效果.

为了测定科安的抗癌剂量, 还进行了最适剂量的研究. 将科安分为四个剂量梯度, 比较各个剂量在抗



(a) 流式图



(b) 凋亡率的浓度依赖关系曲线图

B16 细胞用 annexine-V 和 PI 染色

图 3 科安乳膏药粉作用于 B16 细胞后流式图(a)和凋亡率分析图(b)

Fig. 3 Two-color FACS analysis of B16 cells stained with fluorescein-labeled annexine-V and PI after treated with different Kean powder concentration (a) and the curve of apoptosis ratio (b)

肿瘤中的效果. 由图 4(b)可以看出, 抗癌效果和给药剂量存在浓度依赖关系. 我们发现在 4 mL/(kg · d)

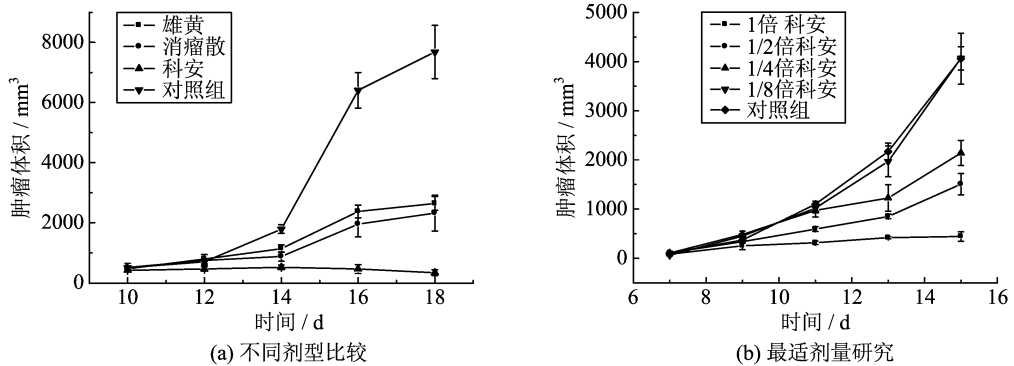


图 4 科安乳膏对于 B16F10 动物模型的体内抗癌活性研究

Fig. 4 Effect of Kean Cream on the growth of mouse melanoma B16F10 xenograft of C57BL/6 *in vivo*

浓度下抗癌效果最好,此浓度即是我们所要求的最适剂量。

2.3.2 各种剂型治疗后动物体重变化

实验中一直记录动物体重变化和涂抹部位皮肤组织的变化.由图 5 可以看出,药物对于动物体重的影响在各组中没有明显的差异.皮肤组织也没有大的变化(数据没有显示).这说明在 $4 \text{ mL}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 浓度下,同对照组相比毒副作用没有差异.而此时抗癌作用最佳(如图 4(b)).

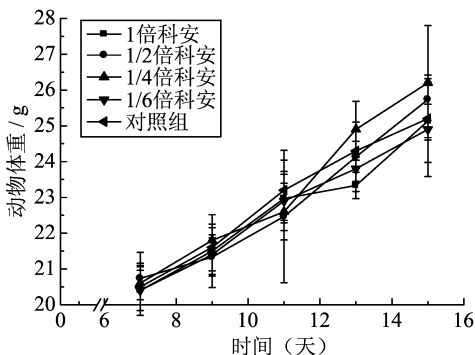


图 5 科安乳膏对于 B16F10 动物模型的体重变化的影响

Fig. 5 The changes of animal body weight in groups after administration of Kean Cream on the growth of mouse melanoma B16F10 xenograft of C57BL/6 *in vivo*

2.3.3 不同给药部位比较

将科安乳膏涂抹在肿瘤鼠的不同部位,来观察和分析它的抗癌效果.结果发现(如图 6),直接涂抹于肿瘤皮肤有很好的效果,给药后肿瘤几乎停止生长;将科安乳膏涂抹在非肿瘤部位的皮肤也能起到一定的抗癌效果;而对照组肿瘤生长迅速.这可能与肿瘤中丰富的血管生成有关系.涂抹于肿瘤皮肤表面会更利于药物的吸收和分布,起到更好的效果;涂抹于非肿瘤皮肤表面时,通过血液循环也可以到达

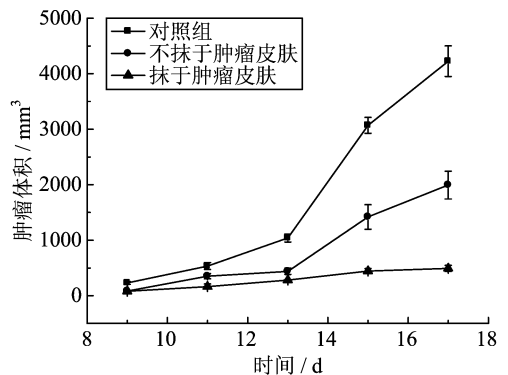


图 6 科安乳膏对于 B16F10 动物模型的不同给药部位的体内抗癌活性研究

Fig. 6 Effect of Kean Cream on the growth of mouse melanoma B16F10 xenograft of C57BL/6 *in vivo* via different smeared part on experimental animal skin

肿瘤部位,起到一定的抗癌作用。

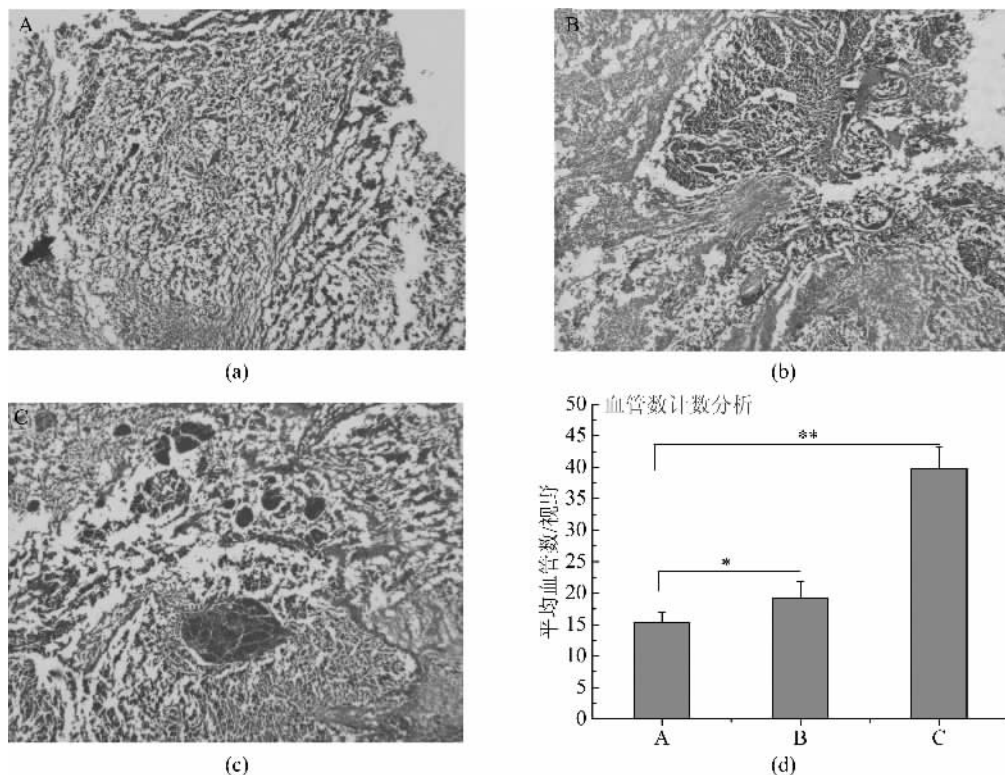
3 科安乳膏对于肿瘤内血管生成的作用

HE 染色和对 HE 染色切片单个视野计数($n=6$)结果显示(如图 7),科安作用后可以显著抑制血管生成,使得血管数目明显减少(对照组和肿瘤组比较有统计学差异, $p < 0.05$).非肿瘤部位皮肤涂抹则不能产生较好效应,可能和血管分布和生成相关。

4 药物组织分布和血药变化研究

由用药后砷在体内的分布变化可以看出(如图 8(a)),直接涂抹于肿瘤皮肤组中,在脏器中分布较其他组高;而在肿瘤中分布最高,这与抗肿瘤结果呈相关关系,可能是肿瘤皮下有丰富的血管生成。

血砷在两种透皮给药方式中前期没有明显差



mean ± SD, n=6. * $p > 0.05$ 肿瘤皮肤涂抹与非肿瘤皮肤涂抹比较; ** $p < 0.001$ 为肿瘤皮肤涂抹和对照组比较
HE 染色切片显示肿瘤内血管密度在涂抹于肿瘤皮肤(a)和非肿瘤皮肤(b)以及对照组(c)中;(d)血管密度定量

图 7 科安乳膏抗血管生成作用

Fig. 7 Effects of Kean Cream on tumor angiogenesis

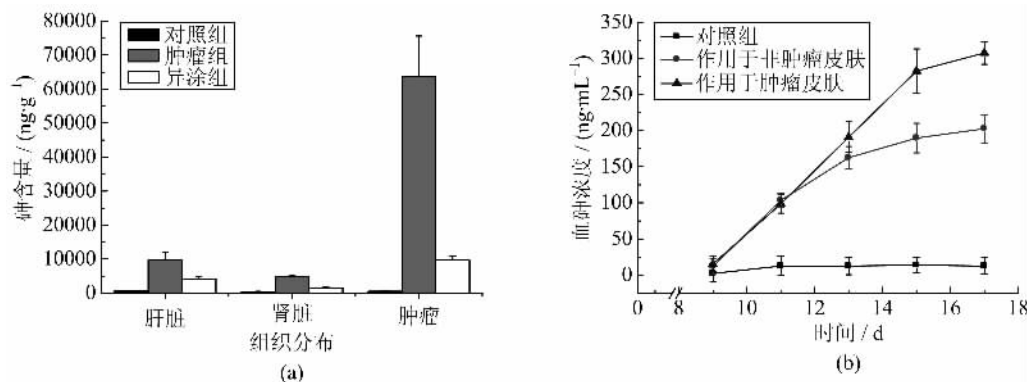


图 8 科安乳膏于动物体内的组织分布(a)和血药浓度变化图(b)

Fig. 8 Biodistribution (a) and pharmacokinetics (b) of Kean Cream *in vivo*

异;15 天之后血液中的砷含量开始有了统计学差异(如图 8(b)). 如果持续给药,预计将有明显的缓释作用.

5 讨论

人们普遍认为化疗治疗癌症主要是通过引起癌细胞凋亡,但同时,它也会使得癌细胞通过改变凋亡途径而产生抗药性. 如果有一种药在引起细胞凋亡

的同时还能抑制肿瘤组织的血管发生,那必将大大提高抗癌药物在活体内的疗效. 血管发生,即许多新血管的生成,是支持实体瘤生长的关键步骤. 因此,将引发细胞凋亡与抑制肿瘤组织的血管发生结合在一起是当今一种非常有前景的治疗癌症的方法. 现阶段,各种抑制血管生成药物的主要靶细胞都是内皮细胞,因为 VEGF(即血管内皮生长因子)是其血管结构的基本单元. 而 VEGF 蛋白能够选择性地影

响一系列血管发生所必需的内皮细胞的功能,这些功能包括增加血管的通透性、加速血管的构建等。

砷剂被用来治疗人类疾病已经有很多年了,之前也有很多报道证明了其确有抗癌疗效。所报道的各种抗癌机制大致包括调整 Bcl-2,更改谷胱甘肽氧化还原系统,或者是激活 caspase 途径以及终止细胞周期等等。这些机制中的一个或一些也可以用来解释科安引起 B16 细胞凋亡以及抑制血管生成的机制。

本研究中,我们通过透皮来运输药物,从而提高了疗效,降低了毒性。药代动力学研究表明,这种运输系统能产生更高的血浆药物浓度、延长药物作用时间,从而提高治疗效果。体内抗癌分析说明了药物的抗癌活性。与此同时,小鼠的体重、摄食行为以及行为活动状态等能显示小鼠健康状况的记录结果表明,各组小鼠的健康状况并无明显区别,这表明了在此治疗浓度下它具有较低的副作用。

总而言之,我们实验中所列举的数据说明,科安有效成分可以通过皮肤进入肿瘤组织,引起肿瘤细胞凋亡从而抑制肿瘤的生长;另一方面,它能通过抑制肿瘤组织血管发生而延缓肿瘤的生长。所以,科安乳膏是一种有着巨大潜力的新型透皮抗癌药物。

参考文献(References)

[1] Anonymous. The inner canon of Emperor Huang[M]. Beijing: Chinese Medical Ancient Books Publishing House, 2003.
佚名. 黄帝内经[M]. 北京:中国医学古籍出版社, 2003.

[2] Frankenberger WT Jr. Environmental chemistry of

arsenic[M]. New York: Marcel Dekker Inc, 2002.

[3] Xiang Yang, Chen Nna-nan, Zhang De-jie, et al. Establishment of serum pharmacology testing method for Compound Realgar Natural Indigo Tablets [J]. Journal of The Fourth Military Medical University, 2005,26(17):1 594-1 597.
向阳,陈楠楠,张德杰,等.复方黄黛片中药血清药理学研究方法的建立[J]. 第四军医大学学报, 2005, 26(17): 1 594-1 597.

[4] The Cooperation Group of Phase II Clinical Trial of Compound Huangdai Tablet. Phase II clinical trial of compound Huangdai tablet in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia [J]. Chin J Hematol, 2006, 27:801-804.

[5] Lu D P, Wang Q. Current study of APL treatment in China[J]. Int J Hematol, 2002,76:316-318.

[6] Lu D P, Qiu J Y, Jiang B, et al. Tetra-arsenic tetrasulfide for the treatment of acute promyelocytic leukemia: a pilot report [J]. Blood, 2002, 99:3 136-3 143.

[7] Wang Xiao-bo, Xi Rong-gang, Zhang Zhi-ran, et al. Study on pharmacokinetics of nanoparticle realgar powders in rabbit [J]. Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army, 2002, 18 (6): 324-326.
王晓波,袭荣刚,张治然,等. 纳米级雄黄粉体药代动力学研究. 解放军药理学学报, 2002, 18(6) :324 -326.

[8] Prausnitz M R, Mitragotri S, Langer R. Current status and future potential of transdermal drug delivery [J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2004, 3: 115-124.

[9] Thomas B J, Finnin B C. The transdermal revolution [J]. Drug Discovery Today, 2004,9(16): 697-703.