

蓖麻蛋白碘化油乳化前后急性毒性的对比研究

龚承友 初曙光 蔡玉凤 沈祖铭

摘要:目的:探讨植物毒素碘化油乳化的缓释作用,以及乳化前后对机体的急性毒性差别。材料与方法:将蓖麻蛋白水剂和碘化油蓖麻蛋白乳剂分别用不同剂量注入小鼠腹腔,观察即刻反应和死亡高峰期、以及大体尸检情况。结果:蓖麻蛋白水剂的 LD_{50} 为 $12.78\mu\text{g}/\text{kg}$,碘化油蓖麻蛋白乳剂的 LD_{50} 为 $23.79\mu\text{g}/\text{kg}$,两者 $P<0.05$,有明显差异。死亡高峰期后者比前者推迟 2~3 天。结论:蓖麻蛋白碘化油乳化后可以达到缓释,在不增加副作用的情况下,碘油乳化后用量可增加。

关键词: 蓖麻蛋白 毒性 碘油乳剂

Comparative Study of Acute Toxicity of Pre and Post-Emulsified Lipiodol Ricin

Gong Chengyou, Chu Shuguang, Cai Yuefeng, Shen Zuming

Radiology Department, Gan Quan Hospital attached to Shanghai Tie Dao University, Shanghai 200065

ABSTRACT: The toxin of plant has been used for therapy of cancer for many years, but it has not been reported to be used for chemo-embodization after being emulsified with lipiodol. Purpose: To study the slow release of the lipiodol-emulsified toxin of plant as well as the acute toxicity difference of pre and post lipiodol-emulsified toxin of the plant. Materials and methods: the liquid and the emulsion of ricin were injected separately into the rats' abdominal cavities. The immediate reaction was observed, the peaks of death rate were recorded and the cadavours dissections of rats were done. Results: LD_{50} of the liquid ricin was $12.78\mu\text{g}/\text{kg}$ and LD_{50} of the emulsion ricin was $23.79\mu\text{g}/\text{kg}$. The significance of the test of LD_{50} was $P<0.05$. The latter's peak of death rate was postponed for 2~3 days. Conclusion: The slow release of lipiodol ricin emulsion was reliable with no increase of side-effects by raising the dosage.

Key words: Ricin; Toxicity; Lipiodol emulsion

随着肿瘤介入治疗的广泛开展,对一些实体瘤,尤其是肝癌、肾癌等肿瘤,“化疗栓塞”疗法取得了确切而可靠的疗效。这种方法是以碘化油为物理载体,将抗癌药物与之乳化,利用碘化油滞留在肿瘤主体及子灶的原理,将抗癌药物带到病灶区。由于抗癌药物有巨大的骨髓抑制和免疫抑制的副作用,所以用量和使用次数

受到严重影响,而植物毒素的抗癌作用可靠,但对骨髓抑制的副作用非常轻微,为了能将植物毒素用于介入治疗,我们进行了蓖麻蛋白乳化前后毒性的对比试验,以探索蓖麻蛋白碘化油乳剂的缓释作用,并进一步计算出在不增加副作用的情况下可增加的毒素剂量,现将实验研究的情况报告如下。

作者单位: 200065 上海铁道大学附属甘泉医院放射科

材料与方法

一、材料

所用的 40% 碘化油 (Lipiodol) 为上海信谊药厂生产。蓖麻蛋白 (Ricin) 是用蓖麻籽提取, 纯化及鉴定。具体步骤是, 蓖麻籽去壳, 置于高速捣碎机中, 加入乙醚-石油醚 (1:1) 混合溶剂, 浸没为止。蓖麻籽在溶剂中捣碎后, 离心去除上层溶剂 (含蓖麻油), 得脱脂干粉。用 pH7.4 PBS 浸没脱脂干粉以提取毒素。粗提取液经 Sephadex G75 凝胶过滤, 取第二、三峰。第二步通过琼脂糖 (Sephacrose 4B) 柱进行综合层析纯化。毒素的毒力测定, 先用生理盐水稀释的 0.5 ml 毒素液注射于普通小白鼠腹腔, 观察 72 小时小鼠死亡情况以确定毒力。

二、方法

(一) 动物, 昆明种小鼠, 18~22g, 每组 10 只, 雌雄各半。由中国科学院上海动物实验中心提供。共有六组。

(二) 试验药物及配制, 蓖麻蛋白组用含 100 μ g/ml 蓖麻毒蛋白的水溶剂稀释后使用。碘油蓖麻蛋白组先将毒素液用生理盐水稀释成 10 μ g/ml 再按蓖麻蛋白:碘化油=1:4 的比例配制成 2 μ g/ml 浓度的碘油蓖麻蛋白乳剂。乳化方法是用超声波进行的。

(三) 给药剂量和途径, 两组剂量均为 10、15、20、25、30、35 μ g/kg。均为一次性腹腔内注射。

结 果

一、实验鼠死亡情况及尸检所见

蓖麻蛋白组死亡数第 1~7 天分别为 1、9、23、4、6、1、4 只, 第 2~3 天出现死亡高峰期, 以后出现消瘦并少量死亡。尸检肉眼观察胸腔有少量积液, 其余无异常。碘油蓖麻蛋白乳剂组, 死亡数第 1~7 天分别为 0、2、7、13、10、1、3 只, 死亡高峰期为注射后第 3~5 天。尸检肉眼观察有少量胸腔积液, 其余未见异常。以上实验均观察 7 天。

二、数据处理及半数致死量 (LD₅₀)

将上述数据输入微机 (费氏公式编程), 计算出 LD₅₀、LD₅、LD₉₅ 及 95% 可信限数据。结果是: 蓖麻蛋白组 LD₅₀=12.78 μ g/kg, 95% 可信限为 9.03~16.95 μ g/kg。碘油蓖麻蛋白乳剂组 LD₅₀=23.79 μ g/kg, 95% 可信限为 18.88~29.99 μ g/kg。并进行两 LD₅₀ 显著性测验, *P* 值小于 0.05, 说明有明显差异。

讨 论

碘化油注入肝癌病人的肝动脉后, 可长期选择性地滞留于肝癌组织中, 所以抗癌毒素与碘化油乳化后可用于治疗肝癌^[1]。但是, 碘化油抗癌毒素乳剂缓释作用的可靠性, 以及由于缓释而能增加抗癌毒素剂量比例的研究甚少, 国内外均少见报道。我们的研究结果说明了以下问题。

一、碘化油抗癌毒素在体内的缓释作用

在我们的试验中, 蓖麻蛋白水溶液与碘油蓖麻蛋白乳剂注入昆明鼠腹腔内, 即刻小鼠收腹扭体症状相似, 但小鼠的死亡高峰期乳剂组比水剂组推迟了 2~3 天, 尸检肉眼观察大体病理改变两组无区别。说明乳剂组由于毒素的缓释致毒性作用减弱。

二、抗癌毒素因碘化油乳化可成倍增加用药剂量

由于碘化油抗癌乳剂的缓释, 大大降低了药物的副作用, 本实验证明蓖麻蛋白水溶剂的 LD₅₀ 为 12.78 μ g/kg, 而碘油蓖麻蛋白乳剂的 LD₅₀ 为 23.79 μ g/kg, 后者约为前者的两倍。据此可以推断, 在不增加副作用的情况下, 抗癌药物的剂量碘化油乳化后可加大用量。这种效果的得来是通过药物的缓释增加了机体的耐受性, 同时肿瘤区药物浓度提高, 作用时间持久, 更有利于杀伤肿瘤细胞。

三、蓖麻蛋白与碘化油乳化后其活力不受影响

在以往的肝癌介入治疗中, 碘化油抗癌乳剂无论使用丝裂霉素和阿霉素等合成抗癌药, 未见用抗癌毒素乳化后肝动脉给药的报道。蓖麻蛋白的抗癌作用已一再被证实^[2,5], 并已制成

免疫毒素,也称抗体导向毒素,如肺癌单克隆抗体-蓖麻毒素 A 链结合物^[3]。我们的实验表明,碘油蓖麻蛋白乳剂注入小鼠腹腔后即刻反应同蓖麻蛋白水剂相同,对小鼠的毒性作用依旧,只是由于缓释而使 LD₅₀提高。由此可见蓖麻蛋白同碘化油乳化后其活力不受影响。为临床上用碘化油毒素乳剂治疗肝癌等实体肿瘤提供了实验依据。

四、植物蛋白如蓖麻蛋白和相思豆蛋白国内尚无标准制品供应,所以蓖麻蛋白的提取、纯化、活力测定及定量是实验成功的关键环节。另外各种不同碘化油乳剂稳定性是有差异的^[4],改进乳化方法,探讨油水混合比例,采用何种乳化手段及是否加乳化剂等也是需要进一步研究的问题。

参考文献

1. Zwai, Maeda H, Konno J. Use of oily contrast medium for selective drug targeting to tumor: enhanced therapeutic effect, and X-ray image, *Cancer Res*, 1984;44:2115.
 2. 王庆诚. 免疫毒素在肿瘤治疗上的应用. *肿瘤*, 1986; 2:90.
 3. 谈立松, 潘惠忠, 沈毅, 等. 肺癌单克隆抗体-蓖麻毒素 A 链结合物的制备及毒性讨论. *肿瘤* 1987;6: 260.
 4. 施海彬、李麟荪、谈恒山. 碘油抗癌药物化疗栓塞剂的理化特性研究. 1994;8:510.
 5. Oystein Fodstad, Gunnar Kvalheim, Aslak Godal, et al. Phase Study of the Plant Protein Ricin. *Cancer Res*, 1984;44:862.
-
- (上接第 111 页)
4. Song HY, Choi KC, Cho BH, et al. Esophagogastric neoplasms: palliation with a modified Gianturco stent *Radiology* 1991;180:349.
 5. Lehtovira J, Kiekara O, Soimakauio S. Balloon dilatation of esophageal strictures in children with a simplified technique *Acta Radiol* 1992;33:172.
 6. Tytgat GNJ. Dilation therapy of benign esophageal stenoses *World J Surg* 1989;13:142.
 7. Song HY, Han YM, Kim HN, et al. Corrosive esophageal stricture safety and effectiveness of balloon dilation *Radiology* 1992;184:373.
 8. Kim IO, Yeon KM, Kim WS, et al. Perforation complicating balloon dilation of esophageal strictures in infants and children *Radiology* 1993;189:741.
 9. de Lange EE, Shaffer HA Jr, Holt PD. Esophagoenteric anastomotic leaks; treatment with fluoroscopically guided balloon dilatation *AJR* 1994;162: 51.
 10. Mihailovic T, Erisic VN. Balloon dilation of cricopharyngeal achalasia *Pediatric Radiology* 1992; 22:522.
 11. Huynh PT, de Lange EE, Shaffer HA Jr. Symptomatic webs of the esophagus; treatment with fluoroscopically guided balloon dilation *Radiology* 1995; 196:789.
 12. Cox JGC, Winter RK, Maslin SC, et al. Balloon or bougie for Dig Dis *Sci* 1994; 39:776.
 13. Ott DJ, Donati D, Wu WC, et al. Radiographic evaluation of achalasia immediately after Pneumatic dilatation with the Rigiflex dilator. *Gastrointest Radiol* 1991;16:279.
 14. Irving JD, Dwen WJ, Linsell J, et al. Management of diffuse esophageal spasm with balloon dilatation *Gastrointest Radiol* 1992;17:189.
 15. McNicholas MMJ, Gibney RG, MacErlaine DP. Radiologically guided balloon dilatation of obstructing gastrointestinal strictures. *Abdom Imaging* 1994;19:102.
 16. Holt PD, de Lange EE, Shaffer HA Jr. Strictures after gastric surgery treatment with fluoroscopically guided balloon dilatation *AJR* 1995;164:895.
 17. de Lange EE, Shaffer HA Jr. Rectal strictures treatment with fluoroscopically guided balloon dilatation *Radiology* 1991;178:475.
 18. Campbell DM, Geraghty JG, McBride K, et al. Radiologically controlled balloon dilatation of rectal strictures *Clin Radiol* 1991;44:77.