

蓖麻蛋白对裸鼠肝癌瘤体内注射的疗效及骨髓抑制的研究

龚承友 初曙光 陈陵际

摘要 目的: 为了观察蓖麻蛋白介入治疗肝癌的疗效, 比较蓖麻蛋白与丝裂霉素对骨髓抑制的差别。材料与方法: 用入肝癌裸小鼠皮下移植瘤为组织来源, 植入实验裸鼠肝内建立裸鼠肝癌模型, 以瘤体内注入生理盐水作对照, 比较蓖麻蛋白 ($4 \mu\text{g}/\text{kg}$)、碘油乳化蓖麻蛋白 ($8 \mu\text{g}/\text{kg}$)、丝裂霉素 ($500 \mu\text{g}/\text{kg}$) 肝癌瘤体内注射后的疗效, 观察肿瘤生长抑制率、甲胎蛋白、蛋白、血象及骨髓改变。结果: 蓖麻蛋白、碘油乳化蓖麻蛋白、丝裂霉素组肿瘤生长受到显著抑制 ($P < 0.05$), 肿瘤组织发生不同程度坏死, 甲胎蛋白降低与对照组比较有显著差别 ($P < 0.05$), 但三种剂型间无显著性差别。周围血象及骨髓抑制丝裂霉素比蓖麻蛋白明显 ($P < 0.01$), 结论: 蓖麻蛋白对肝癌的治疗作用明显, 其乳剂抗癌作用不变, 为蓖麻蛋白瘤内注射及乳化后肝动脉导向治疗提供了实验依据, 蓖麻蛋白骨髓抑制毒性明显低于丝裂霉素, 为反复给药提供了条件。

关键词: 动物实验 肝癌 蓖麻蛋白

The observation on the therapeutic effect injected into rat's hepatoma with ricin and the research in the inhibit of marrow

Gong chengyou Chu shuguang Chen lingji

Department of Radiology of Ganquan Hospital affliated of Shanghai Railway University

ABSTRACT: Purpose: To observe the therapeutic effects of the ricin's intervention in treating the hepatic carcinoma and to compare the restraint effect to bone marrow caused by ricin and mitomycin C. Materials and Methods: Use human grafted hepatic carcinoma to naked rat as transplanted rat's liver cancer model. The therapeutic effects of ricin ($4 \mu\text{g}/\text{kg}$) were compared with that of lipiodol-emulsified ricin ($8 \mu\text{g}/\text{kg}$) and mitomycin C ($500 \mu\text{g}/\text{kg}$) (all the dosages were of the one third of the LD50), with saline injected liver cancers as the control. To observe the tumour's growth inhibition rate, -FP hemogram and marrow change. Results: The growth of tumors in group of ricin, lipiodol-emulsified ricin, mitomycin C was inhibited, result in tumour necrosis. The inhibition in marrow showed more obvious in mitomycin C than in ricin. The -FP's reduction was significant in comparison with that of the control group, however, there were no remarkable difference among the three drug forms. Conclusion: Ricin has remarkable therapeutic effect on hepatic carcinoma. Ricin's emulsion was stable providing experiment basis for the toxicity to marrow is clearly lower than mitomycin C.

Key words: Animals experiments, Hepatic, Ricin emulsion

为了研究蓖麻蛋白介入性给药治疗肝癌的可能性和疗效, 并比较蓖麻蛋白与丝裂霉素等化疗药物毒性的差别, 我们建立了裸鼠移植

瘤肝癌模型, 分别于裸鼠肝癌瘤体内注入蓖麻蛋白、碘油乳化蓖麻蛋白、丝裂霉素 C, 并与生理盐水作对照, 观察了肝癌生长抑制率、瘤体坏

作者单位: 200065 上海铁道大学附属甘泉医院

死、甲胎蛋白、血象及胸骨骨髓情况。

材料与方法

一、裸小鼠肝内接种肝癌模型的建立

接种肝癌组织块来源为中国科学院上海药物研究所与中山医科大学第一附属医院合作建成的人肝癌裸小鼠皮下移植瘤模型(LC-412),病理诊断为肝细胞性肝癌,移植瘤已连传25代,两代间隔时间为4周,潜伏期约一周,移植成活率为100%。取第18代LC-412皮下型肝癌移植瘤在无菌条件下将肿瘤组织剪碎成1mm大小的瘤块备用,实验用8周龄的BALB/C雄性裸小鼠(中科院上海药物所提供),经水合三氯乙醛麻醉后行左侧肋下横切口手术,用套管针将瘤组织植入肝左叶肝实质内,缝合伤口后饲养三周。

二、给药方法及分组

BALB/C雄性裸小鼠肝脏植入肿瘤后三周,用上述同样方法麻醉荷瘤鼠,再次剖腹暴露肝脏,测量肝叶内移植瘤组织的长和宽,选取瘤块大小近似的荷瘤鼠作为给药对象。所给药物蓖麻蛋白为水溶液,碘油蓖麻蛋白乳剂为按4:1比例新鲜超声乳化而成,阳性对照药物采用丝裂霉素C(MMC),给药剂量均为半数致死量(LD₅₀)的三分之一。用结核菌素(OT)试验针吸取药液后,缓慢注入瘤体中心。根据注入药物的不同分成四组,G1组瘤体内注入生理盐水20μl(n1=8);G2组瘤体内注入蓖麻蛋白4μg/kg(n2=8);G3组瘤体内注入碘油乳化蓖麻蛋白8μg/kg(n3=8);G4组瘤体内注入丝裂霉素C500μg/kg(n4=8)。

三、观察指标

(一)肿瘤生长抑制率 每组荷瘤鼠给药后3周处死解剖,再次测量瘤体长和宽,计算瘤体体积。并按

$$\frac{\text{对照组}(dn - do) - \text{给药组}(dn - do)}{\text{对照组}(dn - do)} \times 100\%$$

的公式计算肿瘤生长抑制率(do为给药前瘤体体积;dn为给药后瘤体体积)。

(二)肿瘤坏死程度和范围 切取每一实验鼠肿瘤组织置于10%福尔马林液中固定,每份标本于近中心取三处作病理切片,HE染色,在光镜下观察肿瘤组织坏死情况,根据肿瘤坏死范围不同分成轻度(0%~30%以下),中度(30%~60%),重度(70%以上)三级。

(三)甲胎蛋白测定 用干燥玻管取实验动物血1ml,所有标本均按零标准稀释到合适浓度,采用甲胎蛋白双抗体放射免疫测定法,试剂由上海生物制品研究所提供,用EMJ-182型放射免疫计数器计数测定。

(四)血象及骨髓象 取实验动物耳朵血作常规血象玻璃涂片并采集血细胞及血红蛋白稀释液,检测白细胞数、血红蛋白量。解剖取下实验动物胸骨,置于10%福尔马林中固定,再作病理切片,在光镜下观察胸骨骨髓情况。

结 果

一、肿瘤生长抑制率

四组裸鼠肝癌瘤体内注入不同药物三周后剖腹,测量各鼠瘤体大小,按前述公式计算出各组肿瘤生长抑制率(见表1)。可见三种药物均有良好的肿瘤抑制效果。

表1 裸鼠肝癌瘤体内注药后肿瘤生长抑制率

	G1	G2	G3	G4
do	8.10 ± 1.23	8.44 ± 1.22	6.84 ± 0.88	7.35 ± 0.86
dn	20.55 ± 2.21	13.25 ± 1.12	11.82 ± 1.46	11.51 ± 1.37
抑瘤率	0.06	61.31	59.99	66.64
P值		P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01

二、肿瘤坏死情况

由于药物均注射在瘤体中心,所以每鼠选取瘤中心层面连续病理切片3张,观察肿瘤坏死范围,并根据不同坏死程度所占比例计算坏死率,(见表2),其坏死程度不一:对照组基本无坏死,部分见到小片状瘤细胞变性;丝裂霉素组及蓖麻蛋白组以轻、中度坏死为主,见到大小不

一的多个液化坏死灶,碘油乳化蓖麻蛋白组以中度坏死为主,三组坏死边缘均见到生长活跃的肿瘤细胞。

表 2 各组肿瘤组织坏死率

分级	G1	G2	G3	G4
轻	1.25	37.5	37.5	25
中		37.5	50.0	37.5
重		25.0	12.5	37.5

三、甲胎蛋白的测定结果

本实验选择的肝癌病人移植于裸鼠皮下时其甲胎值为 12500ng/ml,属甲胎高浓度病人,裸鼠的甲胎值定性试验均为阴性,由于裸鼠取血极为困难,故本实验未作给药前后甲胎值定量对照,只作给药后组间甲胎值比较,各组甲胎均值见表 3,可见给药组均值明显低于对照组 ($P < 0.01$)。

四、血象及胸骨骨髓改变

各组血红蛋白(Hb),白细胞计数(WBC)均值见表 3,结果表明丝裂霉素组显著低于对照组 ($P < 0.01$),而蓖麻蛋白组和碘油乳化蓖麻蛋白组虽低于对照组,均无显著性差异 ($P > 0.05$)。胸骨病理切片每鼠随机选取 3 张,连续观察 5 个高倍视野,计算骨髓内成熟白细胞个数,结果发现蓖麻蛋白组和乳化蓖麻蛋白组与对照组之间无差异,丝裂霉素组则低于对照组 ($P < 0.05$)。

表 3 各组血色素、白细胞及甲胎蛋白均值

	G1	G2	G3	G4
Hb	140 ± 10.82	125.75 ± 11.59	127 ± 17.44	92.13 ± 22.48
WBC	8.83 ± 1.02	7.61 ± 0.85	7.25 ± 1.03	5.18 ± 1.23
a - FP	2462.5 ± 936.37	626.25 ± 193.46	932.5 ± 281.06	636.25 ± 215.7

讨 论

一、蓖麻蛋白治疗肝癌的疗效

蓖麻毒素的抗肿瘤作用首先由 Mosthger 发现,1970 年 Lin 等证实了蓖麻毒素对小鼠艾氏

腹水癌生长有预防作用。虽然已有人尝试蓖麻蛋白来治疗人类肿瘤,但人们的注意点还是主要集中在蓖麻毒素 A 链与抗肿瘤单克隆抗体的结合物,即免疫毒素的肿瘤导向治疗上,结果收效甚微。我们是用蓖麻毒素 AB 链混合蛋白,用裸鼠肿瘤瘤体内直接注射的方法,研究蓖麻毒素对肝癌的治疗效果。本研究表明,裸鼠肝癌瘤内注射蓖麻蛋白水剂、碘油乳化蓖麻蛋白及丝裂霉素 C 均可造成肿瘤坏死,并显著抑制肿瘤的生长,与对照组相比有极其显著的差异,由此可见蓖麻蛋白抗肝癌的作用是肯定的。

二、蓖麻蛋白治疗肝癌减轻了骨髓抑制的副作用

近年来肝癌介入治疗取得了可喜的进步,经肝动脉局部灌注 5-氟脲嘧啶、丝裂霉素或顺铂等化疗药物,同时合并用明胶海绵、碘油等栓塞肿瘤供血动脉,或在碘油中加入少量化疗药物进行化疗栓塞,均取得一定效果。但肝动脉灌注化疗药物一般量较大,这样在杀灭癌细胞的同时,也损伤了正常的组织细胞,造成药物性肝损害及骨髓抑制。蓖麻蛋白等植物毒素的特点就在于其用量极微就足以杀灭癌细胞,从而使上述困难有所改观。另一方面,肝癌介入化疗虽然比静脉化疗减少了消化道反应等副作用,但骨髓抑制现象仍然比较严重,我们介入治疗的 350 余例肝癌病人中血小板、白细胞、血色素减少的发生率几为 100%,有少数病人因白细胞数不能回升,而失去了再次介入治疗的机会,也有部分病人原发性肝癌已基本消灭,但却死于转移,说明病人免疫功能受到抑制。通过本实验我们发现,蓖麻蛋白对裸鼠骨髓的抑制轻微,白细胞数、血红蛋白量与对照组比较无显著统计学的差别,胸骨片上亦无白细胞抑制表现,明显优于丝裂霉素。蓖麻蛋白骨髓抑制副作用较轻,这一优势将有希望使之成为肝癌介入治疗的一个理想药物。但仍需待今后用介入方法注射蓖麻蛋白,进一步证实其抑制骨髓作用轻微的结论。

三、探索毒素导向治疗新剂型和给药新途径

早在 1900 年,德国药物学家 Ehrlich 就提出使药物定向导向靶细胞而提高药物治疗的专一性的设想。1975 年,单克隆抗体(McAb)的问世为定向治疗提供了大量可选用的载体,使其向实用阶段的目标大大前进了一步。然而,近年来的研究表明,免疫毒素所取得的成果远低于人们原先理想的期望值。原因是有些毒素或毒素片段虽然在体内或体外的实验中显示出对肿瘤组织很强的杀伤力,但一旦与 McAb 连接后则对肿瘤抗原作用明显减弱,或者没有细胞毒作用。为了解决这一问题,众多的科技工作者在毒素非特异性结合和免疫原性,载抗体和免疫连接物诸多方面进行研究,仍进展甚微。自肿瘤介入性治疗开展以后,特别是药物碘油乳化剂用于肝癌等实体性肿瘤栓塞化疗后,碘油在肿瘤内积聚的物理导向性得到了肯定。碘油可以全部积聚充填在肝癌供血动脉、癌血窦,甚至可以充填到引流静脉或肿瘤侵犯的门脉小分支中,所以利用碘油这个物理载体把蓖麻蛋白导向到肝癌内是完全可能的。本实验证明,蓖麻蛋白碘油乳化后不影响它的细胞毒性,于裸鼠肝

癌瘤内注射后达到了与蓖麻蛋白水剂和丝裂霉素相似的抑瘤效果。同时本实验也不需要进行免疫毒素制造的繁复生物工程,而是利用碘油的物理导向来实现使用毒素原药这一新剂型提供了一定的依据。当然,给药途径也由静脉点滴变成肿瘤内注射或肿瘤供血动脉的介入给药。由此可以开辟毒素治疗肝癌的新途径。

参考文献

1. 董生,肖湘生,陈庆华,等. 肝动脉注射羟基喜树碱明胶微球对大鼠移植性肝癌的疗效研究,中华放射学杂志,1996,1:45.
2. 詹金彪. 蓖麻毒素与肿瘤导向治疗. 实用肿瘤杂志,1989,1:58.
3. oystein Fodstad, gunnar Kualhein, aslak Godal, et al. Phase I study of the plant protein ricin. Cancer Research, 1984, 44, 862.
4. J. Michael Loard, Jynne L M Jon, Robertus. Ricin: structure, mode of action, and some current application. The FASEB Journal 1994, 8: 201.
5. 王义,吴孟超,张晓华. 肝动脉化疗栓塞的研究现状,国外医学外科学分册. 1991,5:257.

(上接 218 页)

plasty. Disease Month, 1993, 9: 617.

3. Hanasaki K, Nakano I, Arita H. Receptor mediated mitogenic effect of thromboxane A₂ in vascular smooth muscle cells. Biochem Pharmacol, 1990, 40: 2535.

4. 北京制药工业研究所. 川芎有效成分的研究. 中华医学杂志, 1977, 7: 420.

5. 宫伟星. 川芎嗪心血管药理的研究进展. 中国医院药学杂志, 1990, 10: 511.

6. 兰桂芬,孙骏骑,常燕来,等. 川芎嗪对血小板血栓素 A₂ 的生物合成及其生物活性的影响. 北京第二医学院学报, 1980, 1: 50.

7. 何红兵,仲剑平,叶必远. 川芎嗪促进静脉内皮细胞产生前列环素的研究. 中华实验外科杂志, 1990, 7: 163.

8. 王玉良,巴彦坤. 川芎嗪对心血管组织的药理和电生理作用——一种新的钙拮抗剂. 中西医结合杂志, 1985, 5: 291.