

## · 实验研究 ·

## 顺铂明胶微球体内释药特性的实验研究

王新木 封兴华 刘芳 马威 魏建华

【摘要】 目的 对比顺铂不同给药方法的效果,以了解顺铂明胶微球在体内的释药特点。方法 在 X 线监视下,将顺铂明胶微球超选择栓塞在犬颈外动脉及其分支,以顺铂溶液灌注颈外动脉或在股静脉点滴作为对照,不同时间点取血样测试血药浓度。取栓塞组织石蜡切片,常规苏木精-伊红染色,光镜观察。结果 动脉灌注法可以产生局部较高的血药浓度,但维持时间较短,静脉滴注法血药浓度维持时间较长,但局部与全身血药浓度无显著差异,使用顺铂明胶微球进行栓塞可以在较小的用药剂量上在局部维持相对较长时间较高的血药浓度。结论 顺铂明胶微球进行动脉栓塞可以显著降低全身血药浓度及用药剂量,达到肿瘤靶向治疗的目的。

【关键词】 顺铂;药物浓度;栓塞

Experimental study on drug release characters of cisplatin gelatin microsphere WANG Xin-mu, FENG Xing-hua, LIU Fang, et al. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Stomatological College, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

【Abstract】 Objective To evaluate the release characteristics of cisplatin gelatin microsphere (CGM) in experimental dogs by the analysis of different administration methods of cisplatin. Methods CGM was injected into the external carotid artery of dogs by selective artery catheterization for embolization under the supervision of X-ray. Cisplatin solution was perfused into the external carotid artery or infused into femoral vein as control. Blood samples were tested at different times and analyzed statistically. The embolized tissue was investigated histologically. Results A transient higher blood drug concentration (BDC) was produced by artery perfusion but a longer time of BDC maintenance was achieved through venous infusion. There was no significant difference shown between the concentrations in systemic and local circulations. Small dosage of CGM through artery embolization could produce a high BDC level for a longer period in the local region. Conclusions External carotid artery embolization with CGM could significantly reduce the circulatory drug level and application dosage achieving the purpose of targeted tumor therapy.

【Key words】 Cisplatin; Drug concentration; Embolization

近年来,随着介入治疗技术的普及与发展,陆续有多种化疗栓塞剂开始应用于临床<sup>[1]</sup>。在已有研究的基础上<sup>[2-4]</sup>,为了形成系列的微球类化疗栓塞剂,更好地满足临床上不同种类肿瘤的治疗需要,我们研制了顺铂明胶微球。本研究分析顺铂不同给药方法的血药浓度变化,研究用于动脉化疗栓塞的顺铂明胶微球在体内的药物释放特点,为今后的临床应用奠定基础。

## 材料与方法

## 一、仪器设备

石墨炉原子吸收分光光度仪 3F/2F 微导管(法国 MAG),显微摄影仪(日本 OLYMPUS),顺铂明胶微

球(直径  $100 \sim 300 \mu\text{m}$ )<sup>[2]</sup>,顺铂标准品(齐鲁制药厂产品)。

## 二、实验动物及分组

犬 12 只,体重  $16 \sim 19 \text{ kg}$ ,随机分为 3 组,每组 4 只。A 组,静脉滴注组。B 组,动脉灌注组。C 组,动脉栓塞组。

## 三、实验方法

(一) A 组 动物以 30% 戊巴比妥溶液静脉麻醉( $1.0 \text{ ml/kg}$ ),肝素化后( $20.0 \text{ mg/kg}$ ),股静脉推注  $0.175 \text{ mg/ml}$  顺铂溶液  $40 \text{ ml}$  ( $7 \text{ mg}$ ),注射速度控制为  $0.5 \text{ ml/min}$ 。开始注射后,监控颈外静脉及另一侧股静脉,在 15 和 30 min、1、2、4 和 6 h 各取血样  $1.0 \text{ ml}$ ,绘制本实验室条件下采用石墨炉原子吸收分光光度仪测定的顺铂标准吸收曲线,采用所拟合的线性回归方程,以原子吸收光谱法测定样品中的药物含量<sup>[5]</sup>。(注:电热原子化法的高温石墨炉工作条件:

波长 265.9 nm, 升温程序设计: 干燥 80 ~ 100 °C, 保持 30 s, 灰化 800 °C, 保持 30 s, 原子化 2750 °C, 保持 6 s, 清除 2850 °C, 保持 2 s)

(二) B 组 动物麻醉并肝素化后, X 线监控下于股动脉插 3F/2F 微导管至颈外动脉或颈外动脉的分支, 注入 1.75 mg/ml 顺铂注射液 4 ml (含顺铂 7 mg), 一侧股静脉注射生理盐水 40 ml 作对照, 注射速度控制为 0.5 ml/min, 监控另一侧股静脉与颈外静脉, 在 15、30 min、1、2、4 和 6 h 各取血样 1.0 ml, 以后步骤同 A 组。

(三) C 组 在颈外动脉注入顺铂明胶微球 20 mg (含药剂量约为 3.5 mg), 取血样时间点为 15、30 min、1、2、4 和 6 h, 余步骤与 B 组相同。

## 结 果

血药浓度测试结果如图 1 ~ 3 所示。颌面组织与血循环中药物浓度在静脉滴注组的变化趋势完全一致, 并且都较长时间的维持一个较低的水平; 在动脉灌注组中, 局部血药浓度高但持续时间很短 (半分钟), 之后两者的水平基本一致; 在顺铂明胶微球栓塞组中, 局部能够稳定维持较高的血药浓度, 而周围血药浓度则始终稳定在一个较低的水平。

栓塞部位软组织标本石蜡切片苏木精-伊红染色结果可以见到, 顺铂明胶微球大小、形态、结构基本一致, 栓塞于与微球直径相当的末梢动脉。或成簇状完全阻塞小动脉血管腔。血管周围未见有明显的炎症细胞浸润, 所有静脉血管内未发现有微球。

## 讨 论

随着现代医学模式的转变, 头颈部肿瘤患者手术后的社会交往及生存质量越来越受到关注。介入治疗能够在保证较好治疗效果的同时, 较少破坏患者的容貌, 较好的解决了一些传统手术存在的问题, 不仅对血管性疾病可以产生较好的疗效, 而且适用于一些血供丰富的恶性肿瘤的治疗。我们对所研制

的 5-Fu 明胶微球以及乙基纤维素微球一系列的的各项性能检测结果表明, 载药微球化疗栓塞的介入治疗方法有很好的临床应用前景<sup>[2,6,7]</sup>。

药物的治疗效果和中毒作用, 直接与作用部位的药物浓度有关。从理论上说, 若作用部位所在组织血液灌注充足, 则血药浓度可作为作用部位药物浓度的可靠指标。因此, 本研究选择颈外静脉作血药浓度监控。犬颌面部的静脉有交通支, 当一侧颈外动脉被栓塞后, 对侧的静脉血可能会通过一些对压力敏感的静脉交通支回流到栓塞侧, 因此, 实际测得的局部静脉血药浓度可能会偏低一些。以原子吸收光谱法测量顺铂含量可以排除血清中其他有机成分的干扰<sup>[5]</sup>, 经顺铂标准品测试, 本法的误差可控制在 10% 以内。

从动物实验血药浓度的测试结果来看, 局部与全身血药浓度的差别在静滴组不显著 ( $P > 0.1$ ), 而动脉灌注组也仅是在注射药物的短期内有差别, 之后局部血药浓度迅速下降, 2 h 以后已经无明显差别 ( $P > 0.1$ )。在栓塞组, 虽然用药量只有对比组的 1/2 左右, 局部血药浓度仍较长时间维持在较高的水平, 且局部与全身血药浓度始终保持有 5 倍以上的差异 ( $P < 0.05$ ), 其临床意义是十分明显的。与体外药物释放试验相比, 在体内的载药微球的缓释作用更为明显, 局部药物浓度较高, 推测这可能是由于局部血液循环受阻后, 化疗药物可更长时间的滞留于局部组织所致, 而这正是栓塞化疗的特点之一。与 5-Fu 的各种给药方法相比<sup>[6,7]</sup>, 顺铂的血药浓度维持时间较长, 可以达到数小时, 这与两者的药物清除率是相一致的<sup>[8]</sup>。

从组织病理切片分析, 明胶微球不仅可以完全堵塞直径为 600 ~ 1 000  $\mu\text{m}$  的小动脉, 而且可以栓塞直径为 200 ~ 300  $\mu\text{m}$  微动脉, 且不会进入直径为 50  $\mu\text{m}$  以下的血管, 可以有效地防止因粒径过小而产生末梢栓塞导致的局部皮肤坏死, 以及通过所谓的“危险吻合”造成颅内重要功能区栓塞。

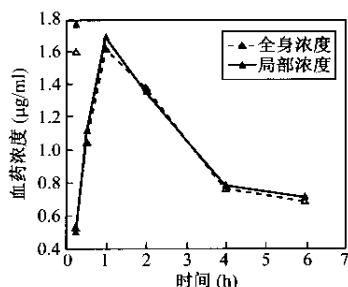


图 1 静脉滴注组血药浓度变化

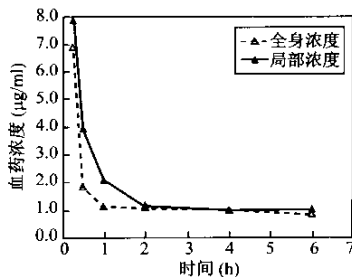


图 2 动脉灌注组血药浓度变化

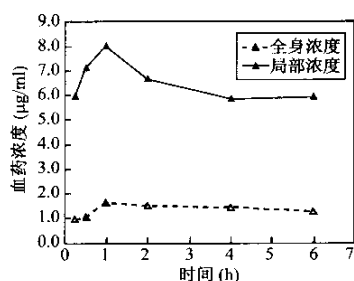


图 3 栓塞组血药浓度变化

顺铂明胶微球生物相容性较好 , 颗粒直径可控 , 悬浮性良好 , 实践证明其易于通过导管 , 栓塞效果确实可靠 , 药物释放特性较理想 , 经过进一步的测试 , 有望与 5-Fu、平阳霉素明胶微球等联合应用于颌面部肿瘤的综合治疗。

参 考 文 献

1 马威 , 封兴华 , 史无例 . 头颈部治疗性栓塞术的应用 . 介入放射学杂志 2000 , 9 : 53-54 .  
2 马威 , 封兴华 , 吴道澄 , 等 . 一种新型介入栓塞化疗的研制——5-氟尿嘧啶明胶微球的研制及相关生物学特性 . 实用口腔医学杂志 2000 , 16 : 402-404 .  
3 巩志立 , 赵晶 , 郑秋君 , 等 . 明胶微球乙型肝炎疫苗的研究 . 中国

生物制品学杂志 , 1997 , 10 : 165 .  
4 Wright KC , Greff RJ , Price RE . Experimental evaluation of cellulose acetate NF and ethylene-vinyl alcohol copolymer for selective arterial embolization . J Vasc Interv Radiol , 1999 , 10 : 1207 .  
5 方荣 . 原子吸收光谱法在卫生检验中的应用 . 北京 : 北京大学出版社 , 1991 .  
6 封兴华 , 马威 , 李维新 , 等 . 氟尿嘧啶明胶微球的体内释药特性的实验研究 . 实用口腔医学杂志 2000 , 16 : 463-465 .  
7 封兴华 , 刘芳 , 马威 , 等 . 乙基纤维素微球的细胞毒性检测及其动脉栓塞的研究 . 实用口腔医学杂志 2000 , 16 : 466-468 .  
8 李天晓 , 樊青霞 , 王瑞林 . 恶性肿瘤介入治疗学 . 郑州 : 河南医科大学出版社 , 2000 .

( 收稿日期 2003-01-23 )

· 消息 ·

《放射学实践》第四届全国放射学术会议通知

中华医学会放射学分会与本刊共同举办的“新三峡 , 新实践——《放射学实践》第四届全国放射学术会议”拟定于 2004 年 9 月下旬在湖北省宜昌市召开 , 现向全国征集学术论文。届时将邀请国内知名医学影像学专家进行专题讲座。特将有关具体事项通知如下 :

- 1 征文内容 : 各系统医学影像学新进展 , 医学影像学新技术及临床应用 , 影像科室的现代化管理、质量控制与数字化建设 , 国内外影像学术和科研动态 , 创刊 19 周年《放射学实践》杂志今后的发展方向。  
2 征文要求 : ①论文须附 500 字左右的中文摘要 , 其文章以 2000 字为宜 ; ②所有文章均应未在公开刊物上发表过 , 作者姓名、单位、通讯地址、邮政编码、联系电话及电子邮件信箱应标注清楚 , 征文须附单位证明加盖公章 ; ③来稿应采用打印稿并附软盘 ( 文件格式为 Word 文档 ) 或发送 E-mail 至 radio@tjh.tjmu.edu.cn , xwang@tjh.tjmu.edu.cn , lwang@tjh.tjmu.edu.cn ; ④请在信封上注明“会议征文”字样。文稿请寄 430030 湖北省武汉市解放大道 1095 号 同济医院《放射学实践》编辑部 ; ⑤征文截稿日期 : 2004 年 7 月 20 日。  
3 会议形式 : 专家讲座、论文交流、学术讨论等。  
4 会务费 800 元 ( 含资料 ) , 食宿费用自理。

征文经专家评审后将编入《论文汇编》, 优秀论文全文发表于《放射学实践》正刊或增刊 , 论文发表另行收取版面费。征文作者将被邀请作为正式代表参加学术会议。出席会议者可获得国家级继续教育 I 类学分 8 分。

会议代表由大会组织参观三峡大坝 , 费用自理 ( 大会适当补贴 )。

凡参加研讨班的同志 , 请认真填写报名回执 ( 详告工作单位、地址、电话/传真、电子邮箱等 ) , 务必于 2004 年 7 月 20 前将回执寄至本刊编辑部。收到回执后我们将发正式会议通知 , 详告具体事宜。电话/传真 027-83662875

中华医学会放射学分会  
《放射学实践》编辑部  
宜昌市放射学分会  
二 00 四年二月

# 顺铂明胶微球体内释药特性的实验研究

作者：[王新木](#), [封兴华](#), [刘芳](#), [马威](#), [魏建华](#)  
作者单位：[王新木, 封兴华, 马威, 魏建华 \(70033, 西安市, 第四军医大学口腔医学院颌外科\)](#), [刘芳 \(北京, 解放军空军总医院检验科\)](#)  
刊名：[介入放射学杂志](#) [ISTIC PKU](#)  
英文刊名：[JOURNAL OF INTERVENTIONAL RADIOLOGY](#)  
年, 卷(期)：2004, 13(3)  
被引用次数：1次

## 参考文献(8条)

1. [马威, 封兴华, 史无例](#) [头颈部治疗性栓塞术的应用](#) [期刊论文] - [介入放射学杂志](#) 2000
2. [马威, 封兴华, 吴道澄](#) [一种新型介入栓塞化疗的研制-5-氟尿嘧啶明胶微球的研制及相关生物学特性](#) [期刊论文] - [实用口腔医学杂志](#) 2000
3. [巩志立, 赵晶, 郑秋君](#) [明胶微球乙型肝炎疫苗的研究](#) [期刊论文] - [中国生物制品学杂志](#) 1997
4. [Wright KC, Greff RJ, Price RE](#) [Experimental evaluation of cellulose acetate NF and ethylene-vinyl alcohol copolymer for selective arterial embolization](#) 1999
5. [方荣](#) [原子吸收光谱法在卫生检验中的应用](#) 1991
6. [封兴华, 马威, 李维新](#) [氟尿嘧啶明胶微球的体内释药特性的实验研究](#) [期刊论文] - [实用口腔医学杂志](#) 2000
7. [封兴华, 刘芳, 马威](#) [乙基纤维素微球的细胞毒性检测及其动脉栓塞的研究](#) [期刊论文] - [实用口腔医学杂志](#) 2000
8. [李天晓, 樊青霞, 王瑞林](#) [恶性肿瘤介入治疗学](#) 2000

## 相似文献(10条)

1. 学位论文 [张庆](#) [顺铂白芨混合微粒腹腔化疗治疗肝癌药物浓度对比的动物实验研究](#) 2006  
目的: 从腹腔局部淋巴结内顺铂 (DDP) 浓度及静脉血中 DDP 浓度的对比方面研究白顺铂白芨混合微粒 (CBMP) 腹腔近距离化疗治疗原发性肝癌及减小化疗药物副作用的的作用机制, 为其临床应用提供理论和实验依据。  
方法: 用直接注射法肝癌实验动物模型造模成功后, 随机分为三组 (1) 荷瘤大鼠静脉应用 DDP 组; (2) 荷瘤大鼠腹腔应用 DDP 组; (3) 荷瘤大鼠腹腔应用 CBMP。分别对比 (1) (2) 组间及 (2) (3) 组间淋巴结内及血液中铂浓度各组的差异性。本文数据用 t 检验、秩和检验分析其统计学意义。  
成果: 腹腔应用 CBMP 与静脉应用 DDP 相比有显著性差异, 与腹腔应用 DDP 相比静脉血中铂浓度亦有显著性差异, 淋巴结中铂浓度在 2 小时后有显著性差异; CBMP 可以提高淋巴结内的铂浓度, 及减少血液中的铂浓度, 从而增强了药物的抑瘤作用, 减小了药物的副作用。  
结论: CBMP 腹腔化疗治疗原发性肝癌增强了局部淋巴结化疗药物的疗效, 及减小了全身药物的副作用。本研究为 CBMP 的临床应用提供了科学的实验、理论依据。
2. 期刊论文 [许媛媛, 周晓铁, 王竞, 叶宏杨, 储成顶, 姚余有](#) [生物组织中顺铂药物浓度的石墨炉原子吸收测定法](#) - [安徽医科大学学报](#) 2007, 42 (2)  
目的 建立生物组织中顺铂药物浓度的测定方法. 方法 采用过氧化氢消解法, 组织样品经过消解挥发浓缩, 盐酸溶解, 石墨炉原子吸收光谱法测定. 结果 方法的主要指标如下: 线性范围为 0. 02~2. 00 μg/g, 检出限为 0. 018 μg/g, 回收率为 91%~115. 0%, RSD 为 12% 以内. 结论 该方法完全符合中国药典 2005 版规定, 可用于检测生物组织中顺铂药物浓度.
3. 学位论文 [王晨龙](#) [三氧化二砷和顺铂诱导人肝癌HepG2细胞凋亡的作用研究](#) 2005  
目的: 研究三氧化二砷 (As2O3) 和顺铂 (CDDP) 联合应用对人肝癌 HepG2 细胞株凋亡的诱导作用, 并且深入探讨其作用机制, 从而为将三氧化二砷和顺铂联合应用于临床治疗肝癌提供更坚实的实验基础和理论依据, 为肝癌的化学药物治疗探索出一条新的途径。  
方法: (1) 利用 MTT 法 (四唑蓝比色法) 检测经不同浓度的 As2O3 和 CDDP 处理过的人肝癌 HepG2 细胞株的吸光度值 (OD 值), 计算细胞生长抑制率, 并且绘制随药物浓度变化的细胞生长抑制曲线; 同时通过计算两药相互作用系数 (CDI) 来评价两种药物的相互作用性质。  
(2) 以不同浓度的 As2O3 和 CDDP 对人肝癌 HepG2 细胞进行处理, 利用 AO/EB 荧光染色法观测肝癌细胞随药物剂量-时间变化的凋亡情况, 形态学变化, 并且计算药物诱导细胞凋亡率。  
(3) As2O3 和 CDDP 单独及联合使用对人肝癌 HepG2 细胞分别进行处理, 采用即用型非生物素免疫组化 Elivision Tmplus 检测方法, 结合计算机图像分析, 检测 Bax, Bcl-2, Fas 蛋白在肝癌细胞中的表达情况。  
(4) 采用流式细胞仪技术, 观察和分析经过 As2O3 和 CDDP 两种药物处理后的人肝癌 HepG2 细胞株的细胞周期变化情况, 以及细胞凋亡率。  
(5) 利用端粒重复扩增实验 (TRAP) 技术结合非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳银染法, 测定人肝癌 HepG2 细胞株经过 As2O3 和 CDDP 两种药物单用及联用不同时间后端粒酶活性的变化情况。  
结果: (1) 不同浓度的 As2O3 (1 μg/ml、2 μg/ml 和 4 μg/ml) 和 CDDP (0. 25 μg/ml、0. 5 μg/ml、1. 0 μg/ml 和 2. 0 μg/ml) 单用药及联合用药组均可以抑制人肝癌 HepG2 细胞株的生长, 并且具有明显的剂量-时效关系; 同时观测到各联合用药组对肝癌细胞的抑制率均较各相应的单独用药组显著增强, 其中低浓度联合用药组的抑制率增加更为明显: 中低浓度的 As2O3 (2 μg/ml) 与 CDDP (0. 25 μg/ml、0. 5 μg/ml 和 1. 0 μg/ml) 联合应用对人肝癌 HepG2 细胞作用 24h 时, 细胞抑制率分别为: 35. 54%, 41. 77%, 44. 34%; 作用 48h 时, 细胞抑制率分别为: 62. 14%, 66. 43%, 69. 43%; 作用 72h 时, 细胞抑制率分别为: 67. 84%, 77. 93%, 84. 48%。  
(2) 细胞形态学的改变: 在荧光显微镜下, 可以观察到对照组细胞呈现弥散而均匀的荧光, 而经过 As2O3 和 CDDP 共同处理过的细胞则出现大量典型的凋亡细胞, 凋亡细胞内可见到明显的核碎裂现象, 并且其核内可见染色浓度改变的颗粒状荧光。计算 200 个细胞的细胞凋亡率, 结果显示: 细胞凋亡率变化具有一定的剂量-时效性; 单独使用 As2O3 低浓度组 (1 μg/ml) 与对照组比较差异没有显著意义 (P=0. 071), 单独使用 CDDP 中低浓度组与对照组比较差异有显著意义 (P<0. 05); 而 As2O3 和 CDDP 联合用药组, 在药物浓度较低时凋亡细胞的比例就已经很高。  
(3) As2O3 和 CDDP 对人肝癌 HepG2 细胞株的 Bax、Bcl-2 与 Fas 三种基因表达影响的研究表明, 两种药物作用的浓度和时间与这三种基因的表达有密切的



关系。低浓度As203(1.0 μg/ml)和CDDP(0.2 μg/ml)在早期(24h)即可以使这三种基因的表达发生变化,但并不十分明显。随着药物浓度增加以及作用时间延长,基因的表达发生较明显的变化:实验组肝癌细胞的Bax和Fas基因的表达明显增加,Bcl-2基因的表达明显降低,而对照组肝癌细胞Bcl-2基因表达增加,Bax,Fas基因的表达率较低。同时通过研究发现As203和CDDP两药联合组对三种基因表达的影响要强于两药单独用药组,表达差异均有显著统计学意义(P<0.05)。

(4)流式细胞仪分析结果显示As203和CDDP各用药组在DNA图上均可见在G1期细胞前凋亡细胞呈现典型特征性的亚二倍体凋亡峰(Sub-G1峰,即Ap峰-apoptotic peak),联合用药组的凋亡数值要高于各单独用药组,由此可以说明As203和CDDP均有诱导肝癌细胞凋亡的作用,两药联合应用时诱导细胞凋亡的作用大大增强,并且可以使S期细胞减少,将细胞生长周期阻滞于G2/M期。

(5)通过端粒酶活性的检测发现,As203和CDDP两种药物单用及联用组作用24h时,人肝癌HepG2细胞的端粒酶检测结果为阳性;作用48h时,各单独组端粒酶检测仍然为阳性,联合用药组的端粒酶活性则有一定程度的抑制;各单独用药组作用72h后端粒酶检测结果还为阳性,而联合用药组作用72h后端粒酶检测则为阴性。由此可以说明,联合用药组24h尚不能阻断端粒酶的活性,其原因可能为药物浓度较低,作用时间较短;在48h时则可以部分阻断端粒酶活性,但作用72h后即可以完全阻断端粒酶活性,相比较各单独用药组阻断端粒酶活性的作用均明显增强,可见这两种药物阻断端粒酶活性的作用具有一定的剂量-时效性,随着药物浓度提高和作用时间延长其抑制作用增强。

结论:(1)本实验证明,在体外As203和CDDP两种药物联合应用具有明显的协同抗肝癌作用,可以显著抑制人肝癌HepG2细胞株的生长,并且具有明显的剂量-时效关系。

(2)As203和CDDP两种药物联合应用抑制人肝癌细胞生长的作用在于其选择性诱导肝癌细胞的凋亡,且联合用药组的诱导凋亡率明显高于各单独用药组,说明两药联用有显著的协同诱导肝癌细胞凋亡的作用。在药物浓度方面,如果将本实验中联合组所用浓度再降低一些,是否亦能获得与单独用药时相当或更好的疗效,还有待进一步验证。

(3)As203和CDDP两种药物诱导肝癌细胞凋亡的作用与Bax,Bcl-2,Fas基因的表达改变有关,其增强了促进凋亡基因Bax,Fas的表达,下调了抑制凋亡基因Bcl-2的表达,Bcl-2与Bax的比例减少,这是其诱导肝癌细胞凋亡的重要分子机制之一。

(4)As203和CDDP两种药物联合应用可以改变肝癌细胞周期,使人肝癌细胞S期细胞减少,将细胞生长周期阻滞于G2/M期,阻止细胞的有丝分裂,从而延长细胞周期时间,这亦是其诱导肝癌细胞凋亡的重要机制之一。

(5)As203和CDDP联合应用增强了抑制端粒酶活性的作用,从而抑制了肝癌细胞的生长,而端粒酶表达的抑制可能出现在凋亡之前,而不是凋亡的结果,所以端粒酶活性的抑制与肝癌细胞凋亡之间的关系尚不是十分明确,是否为As203和CDDP对端粒酶活性的抑制而启动肝癌细胞的凋亡过程有待进一步探讨。

(6)本实验证明As203和CDDP在体外可以抑制肝癌细胞的生长,诱导肝癌细胞凋亡,两药联合应用体现了中、西医药结合的特色与优势。因此,很有必要继续进行动物体内实验及临床试验,从而为将这两种药物组合最终广泛应用于临床治疗肝癌提供更加坚实可靠的实验基础和理论依据,为肝癌的化学药物治疗探索出一条新的具有广阔应用前景的道路。

4. 学位论文 [苏翔宇 奈达铂与顺铂联合应用抗人食管癌Eca-109细胞的体外实验研究](#) 2008

目的:研究奈达铂(NDP)联合顺铂(CDDP)对人食管癌细胞株Eca-109的增殖及凋亡的影响,并探讨其机制。

方法:采用MTT法检测其对Eca-109细胞的增殖抑制率,中效原理法判断联合用药的相互作用;采用流式细胞术分析早期凋亡细胞比例;采用RT-PCR和免疫细胞化学技术、蛋白印迹法分析Ki-67及Bax、Bcl-2表达的变化。

结果:NDP、DDP均明显抑制Eca-109细胞的生长,且呈剂量依赖性;两者联合使用时,低浓度时呈拮抗效应,高浓度时呈协同效应; IC50浓度的NDP、DDP和1/2IC50NDP+1/2IC50DDP对Eca-109细胞的抑制率分别为(41.85±4.1)%, (47.38±2.9)%和(52.45±0.9)%;流式细胞术结果表明正常对照组、NDP组、DDP组、联合用药组细胞早期凋亡率依次增加,单独用药组与联合用药组相比有差异;与单独用药组比较,联合用药组Ki-67、Bcl-2基因(蛋白)表达显著降低,而Bax基因(蛋白)表达显著增高。

结论:低浓度NDP和DDP联合应用与两药高浓度单独应用相比,对Eca-109细胞增殖的抑制作用和诱导凋亡能力均有明显增强,本结果对于食管癌的治疗具有一定的临床意义。

5. 期刊论文 [刘正亮. 王晓云. 许长春 顺铂微球药物含量的石墨炉原子吸收测定法 -职业与健康](#)2003, 19(7)

顺铂(CDDP)学名顺氯铂(cis-diamino dichloro platin)对多种动物和人体肿瘤疗效明显,为临床常用的广谱抗癌药物。

6. 学位论文 [陆静 三氧化二砷和顺铂诱导人肝癌HepG2细胞凋亡的作用研究](#) 2009

目的:

研究三氧化二砷(As203)和顺铂(CDDP)联合应用对人肝癌HepG2细胞株凋亡的诱导作用,并且深入探讨其作用机制,从而为将三氧化二砷和顺铂联合应用于临床治疗肝癌提供更坚实的实验基础和理论依据,为肝癌的化学药物治疗探索出一条新的途径。

方法:

(1)利用MTT法(四唑蓝比色法)检测经不同浓度的As203和CDPP处理过的人肝癌HepG2细胞株的吸光度值(OD值),计算细胞生长抑制率,并且绘制随药物浓度变化的细胞生长抑制曲线;同时通过计算两药相互作用系数(CDI)来评价两种药物的相互作用性质。

(2)以不同浓度的As203和CDPP对人肝癌HepG2细胞进行处理,利用AO/EB荧光染色法观测肝癌细胞随药物剂量—时间变化的凋亡情况,形态学变化,并且计算药物诱导细胞凋亡率。

(3)As203和CDPP单独及联合使用对肝癌细胞分别进行处理,采用即用型非生物素免疫组化Elivision™ plus检测方法,结合计算机图像分析,检测Bax,Bcl-2,Fas蛋白在肝癌细胞中的表达情况。

(4)采用流式细胞仪技术,观察和分析经过As203和CDPP两种药物处理后的人肝癌HepG2细胞株的细胞周期变化情况,以及细胞凋亡率。

(5)利用端粒重复扩增实验(TRAP)技术结合非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳银染法,测定人肝癌HepG2细胞株经过As203和CDPP两种药物单用及联用不同时间后端粒酶活性的变化情况。

结果:

(1)不同浓度的As203(1 μg/ml、2 μg/ml和4 μg/ml)和CDPP(0.25 μg/ml、0.5 μg/ml、1.0 μg/ml和2.0 μg/ml)单用药及联合用药组均可以抑制人肝癌HepG2细胞株的生长,并且具有明显的剂量—时效关系;同时观测到各联合用药组对肝癌细胞的抑制率均较各相应的单独用药组显著增强,其中低浓度联合用药组的抑制率增加更为明显:中低浓度的As203(2 μg/ml)与CDPP(0.25 μg/ml、0.5 μg/ml和1.0 μg/ml)联合应用对人肝癌HepG2细胞作用24h时,细胞抑制率分别为:35.54%,41.77%,44.34%;作用48h时,细胞抑制率分别为:62.14%,66.43%,69.43%;作用72h时,细胞抑制率分别为:67.84%,77.93%,84.48%。

(2)细胞形态学的改变:在荧光显微镜下,可以观察到对照组细胞呈现弥散而均匀的荧光,而经过As203和CDPP共同处理过的细胞则出现大量典型的凋亡细胞,凋亡细胞内可见到明显的核碎裂现象,并且其核内可见染色度改变的颗粒状荧光。计算200个细胞的细胞凋亡率,结果显示:细胞凋亡率变化具有一定的剂量—时效性;单独使用As203低浓度组(1 μg/ml)与对照组比较差异没有显著意义(P=0.071),单独使用CDPP中低浓度组与对照组比较差异有显著意义(P<0.05);而As203和CDPP联合用药组,在药物浓度较低时凋亡细胞的比例就已经很高。

(3)As203和CDPP对人肝癌HepG2细胞株的Bax、Bcl-2与Fas三种基因表达影响的研究表明,两种药物作用的浓度和时间与这三种基因的表达有密切的关系。低浓度As203(1.0 μg/ml)和CDPP(0.25 μg/ml)在早期(24h)即可以使这三种基因的表达发生变化,但并不十分明显。随着药物浓度增加以及作用时间延长,基因的表达发生较明显的变化:实验组肝癌细胞的Bax和Fas基因的表达明显增加,Bcl-2基因的表达明显降低,而对照组肝癌细胞Bcl-2基因表达增加,Bax,Fas基因的表达率较低。同时通过研究发现As203和CDPP两药联合组对三种基因表达的影响要强于两药单独用药组,表达差异均有显著统计学意义(P<0.05)。

(4)流式细胞仪分析结果显示As203和CDPP各用药组在DNA图上均可见在G1期细胞前凋亡细胞呈现典型特征性的亚二倍体凋亡峰(Sub—G1峰,即Ap峰—apoptotic peak),联合用药组的凋亡数值要高于各单独用药组,由此可以说明As203和CDPP均有诱导肝癌细胞凋亡的作用,两药联合应用时诱导细胞凋亡的作用大大增强,并且可以使S期细胞减少,将细胞生长周期阻滞于G2/M期。

(5)通过端粒酶活性的检测发现,As203和CDPP两种药物单用及联用组作用24h时,人肝癌HepG2细胞的端粒酶检测结果为阳性;作用48h时,各单独组端粒酶检测仍然为阳性,联合用药组的端粒酶活性则有一定程度的抑制;各单独用药组作用72h后端粒酶检测结果还为阳性,而联合用药组作用72h后端粒酶检测则为阴性。由此可以说明,联合用药组24h尚不能阻断端粒酶的活性,其原因可能为药物浓度较低,作用时间较短;在48h时则可以部分阻断端粒酶活性,但作用72h后即可以完全阻断端粒酶活性,相比较各单独用药组阻断端粒酶活性的作用均明显增强,可见这两种药物阻断端粒酶活性的作用具有一定的剂量—时效性,随着药物浓度提高和作用时间延长其抑制作用增强。

结论:

(1) 本实验证明, 在体外As203和CDPP两种药物联合应用具有明显的协同抗肝癌作用, 可以显著抑制人肝癌HepG2细胞株的生长, 并且具有明显的剂量—时效关系。

(2) As203和CDPP两种药物联合应用抑制人肝癌细胞生长的作用在于其选择性诱导肝癌细胞的凋亡, 且联合用药组的诱导凋亡率明显高于各单独用药组, 说明两药联用有显著的协同诱导肝癌细胞凋亡的作用。在药物浓度方面, 如果将本实验中联合组所用浓度再降低一些, 是否亦能获得与单独用药时相当或更好的疗效, 还有待进一步验证。

(3) As203和CDPP两种药物诱导肝癌细胞凋亡的作用与Bax, Bcl-2, Fas基因的表达改变有关, 其增强了促进凋亡基因Bax, Fas的表达, 下调了抑制凋亡基因Bcl-2的表达, Bcl-2与Bax的比例减少, 这是其诱导肝癌细胞凋亡的重要分子机制之一。

(4) As203和CDPP两种药物联合应用可以改变肝癌细胞周期, 使人肝癌细胞S期细胞减少, 将细胞生长周期阻滞于G2/M期, 阻止细胞的有丝分裂, 从而延长细胞周期时间, 这亦是其诱导肝癌细胞凋亡的重要机制之一。

(5) As203和CDPP联合应用增强了抑制端粒酶活性的作用, 从而抑制了肝癌细胞的生长, 而端粒酶表达的抑制可能出现在凋亡之前, 而不是凋亡的结果, 所以端粒酶活性的抑制与肝癌细胞凋亡之间的关系尚不是十分明确, 是否为As203和CDPP对端粒酶活性的抑制而启动肝癌细胞的凋亡过程有待进一步探讨。

(6) 本实验证明As203和CDPP在体外可以抑制肝癌细胞的生长, 诱导肝癌细胞凋亡, 两药联合应用体现了中、西医药结合的特色与优势。因此, 很有必要继续进行动物体内实验及临床试验, 从而为将这两种药物组合最终广泛应用于临床治疗肝癌提供更加坚实可靠的实验基础和理论依据, 为肝癌的化学药物治疗探索出一条新的具有广阔应用前景的道路。

7. 期刊论文 [张玉勤. 葛勇前. 蔡树模. 陆国椿. 动脉及静脉注射化疗药物的血浆及组织药物浓度变化特征 -中华肿瘤杂志2002, 24 \(4\)](#)

目的探讨不同化疗药物经动脉及静脉途径注射后血浆及组织内药物浓度的变化规律. 方法 10只成年新西兰雌兔随机平均分为两组(动脉组和静脉组). 一组经髂内动脉、另一组经耳缘静脉注射顺铂(DDP)、5-氟脲嘧啶(5-Fu)和依托泊甙(Vp-16). 注射后于不同时间采血样及子宫组织标本, 以HPLC法测定血浆及子宫组织中药物浓度. 所得数据用3P97软件处理, 计算药代动力学参数. 结果动脉及静脉注射3种药物后, 在血浆及靶组织中的浓度均呈现了规律性的变化, 其变化过程均可以三室模型来描述. 动脉注射3种药物的药代动力学参数与静脉注射的药代动力学参数不同, 动脉组注射药物后, 血浆药物峰浓度均低于静脉组, 而靶组织内药物峰浓度均高于静脉组, 靶组织内药物AUC(药时曲线下面积)值均明显高于静脉组. 结论动脉注射DDP、5-Fu和Vp-16较静脉注射有不同程度的优势, 这种优势与药物的药理特性有关.

8. 学位论文 [李娜. 双氢青蒿素对人卵巢癌顺铂耐药细胞SKOV3/CDDP的体外影响及作用机制的研究 2009](#)

目的: 观察双氢青蒿素对人卵巢癌顺铂耐药细胞SKOV3/CDDP的体外影响, 并检测双氢青蒿素作用于SKOV3/CDDP细胞Livin、P-gp、Topo-Ⅱ β蛋白的表达变化. 探讨双氢青蒿素对卵巢癌耐药细胞SKOV3/CDDP的作用机制. <br>

- 方法: <br>
1. 体外培养人卵巢癌细胞SKOV3及耐药细胞SKOV3/CDDP, 采用MTT比色法检测双氢青蒿素和顺铂对细胞增殖抑制和耐药逆转的作用. <br>
  2. 流式细胞技术测定双氢青蒿素和顺铂对SKOV3/CDDP细胞周期分布和凋亡的影响. <br>
  3. 经Giemsa染色光学显微镜观察SKOV3/CDDP细胞的形态学改变. 4. 细胞免疫化学法分析双氢青蒿素和顺铂干预后SKOV3/CDDP细胞Livin、p-gp、Topo-Ⅱ β蛋白的表达变化. <br>
- 结果: <br>
1. 顺铂对SKOV3/CDDP细胞的IC50. 为34. 12mg/L, 是对SKOV3细胞的( IC507. 52mg/L) 4. 54倍. <br>
  2. 不同浓度的双氢青蒿素对两种细胞的抑制作用随浓度的增加而增强, 呈明显的剂量依赖性, 组间比较差异具有显著性(P<0. 05); 同一浓度作用于两种细胞, 抑制作用的差异无显著性(P>0. 05). 双氢青蒿素对于SKOV3细胞的IC50为27. 45 μ mol/L, 对SKOV3/CDDP细胞的IC50为29. 22 μ mol/L. <br>
  3. 双氢青蒿素联合顺铂作用于SKOV3细胞, 使顺铂IC50由单用时的7. 52 mg/L, 下降到2. 16 mg/L. 对SKOV3/CDDP细胞, 双氢青蒿素10 μ mol/L, 联合顺铂, 使顺铂的IC50由单一用药时的34. 12mg/L下降为15. 25mg/L, 逆转倍数2. 24; 双氢青蒿素20 μ mol/L联合顺铂使顺铂的IC50下降为4. 83mg/L, 逆转倍数7. 06. <br>
  4. 药物作用SKOV3/CDDP细胞48h后, 双氢青蒿素组和顺铂联合双氢青蒿素组在细胞周期G1期前均出现亚二倍体的凋亡峰, 而顺铂2. 5mg/L组无明显凋亡峰出现. S期细胞比例下降, G0/G1期细胞比例上升, 凋亡率增高, 药物浓度越高, 该作用越强, 联合用药比单独用药时更加明显(P<0. 05). <br>
  5. 药物作用24h后, 培养液均清亮, 对照组细胞生长密集, 光泽度好; 各加药组细胞密度均较对照组低, 光泽度下降. 48h后可见对照组细胞已有重叠生长, 而双氢青蒿素组及联合用药组细胞贴壁率下降, 培养液浑浊, 出现细胞凋亡的特征, 如细胞数减少, 稀疏, 细胞形态破坏, 缩小, 变圆, 胞膜破裂, 胞核出现肿胀、碎裂、核固缩等. 上述细胞凋亡变化随着药物浓度的升高变化更为明显. <br>
  6. Livin、P-gp蛋白在SKOV3/CDDP细胞呈强阳性表达, 较在SKOV3细胞高; 而Topo-Ⅱ β蛋白则呈低表达, 与SKOV3细胞比较明显偏低, 均有显著差异(P<0. 01). <br>
  7. SKOV3/CDDP细胞经不同浓度的药物干预, 随药物浓度增加, 各剂组Livin、P-gp阳性反应物强度明显降低, 染色变淡, 而Topo-Ⅱ β阳性细胞数增加, 染色加深. Livin、P-gp蛋白表达逐渐减弱, 而Topo-Ⅱ β蛋白的表达逐渐增强. 与用药前比较, 有统计学意义(P<0. 05). <br>

结论: <br>

1. 双氢青蒿素对人卵巢癌细胞SKOV3及顺铂耐药细胞SKOV3/CDDP的增殖具有明显抑制作用, 且呈剂量依赖性. <br>
2. 双氢青蒿素能将SKOV3/CDDP细胞阻滞于G0/G1期, 即影响肿瘤细胞DNA的合成, 在细胞周期G1期前出现了明显亚二倍体凋亡峰, 说明其同时诱导肿瘤细胞凋亡. <br>
3. 双氢青蒿素可通过阻滞细胞周期、下调Livin和p-gp蛋白表达、上调Topo-Ⅱ β表达从而发挥抑制增殖和诱导凋亡作用, 同时可以增强卵巢癌耐药细胞对顺铂的敏感性, 逆转肿瘤细胞耐药. 本实验仅仅只是初步的研究, 其确切机制, 有待进一步深入研究.

9. 期刊论文 [孙秀丽. 李小平. 王建六. 魏丽惠. 子宫内膜癌术中区域性动脉灌注化疗的研究 -现代妇产科进展 2006, 15 \(6\)](#)

目的: 研究子宫内膜癌术中区域性动脉灌注化疗( ILAIC) 的药代动力学特点、组织病理学变化以及子宫内膜癌的近期疗效和作用机制. 方法: (1) 随机将40只新西兰白兔分为动脉灌注组和静脉注射组, 用高效液相色谱分析仪( HPLC) 测定不同途径注射顺铂( cDDP) 后血浆及组织中的药物浓度, 比较髂内动脉灌注与耳缘静脉注射cDDP后, 其药代动力学参数及子宫、肾脏中药物浓度的差异; (2) 用TUNEL法研究ILAIC诱导子宫内膜癌细胞凋亡的情况; 免疫组织化学法研究ILAIC对子宫内膜癌细胞PCNA表达的影响. 结果: (1) ILAIC后cDDP的代谢符合二室开放模型. 动脉组子宫中药物浓度明显高于静脉组, 而肾脏药物浓度明显低于静脉组(P<0. 05); (2) 动脉灌注组中肿瘤细胞的增殖指数( PI) 为( 44. 25±19. 89) %, 略低于静脉组的( 52. 00±14. 64) %, 但差异无显著性(P>0. 05); (3) 动脉灌注组中肿瘤细胞的凋亡指数( AI) 为( 16. 00±11. 54) %, 明显高于静脉组的( 7. 20±6. 24) %, 差异有显著性(P<0. 05). 结论: ILAIC后, 子宫中有较高浓度的化疗药物而肾脏中的药物浓度明显低于静脉化疗后; ILAIC对肿瘤细胞的杀伤作用部分是通过诱导细胞凋亡实现的, 同时可降低肿瘤细胞的增殖活力; 初步结果显示, ILAIC近期疗效可靠, 无明显副作用.

10. 学位论文 [江琪琪. 和厚朴酚联合顺铂治疗人肺癌A549的实验研究 2006](#)

目的: 和厚朴酚( Honokiol, HNK) 是从传统中药厚朴的根皮、枝皮中, 提取分离的一种带有烯丙基的连苯二酚类化合物, 是厚朴的主要有效成分之一, 近年研究表明其具有抗肿瘤的作用, 具有极高的临床使用价值. 顺铂( Cisplatin, DDP) 是临床治疗非小细胞肺癌一线化疗药, 是一种直接破坏DNA合成的金属铂类络合物化疗药物. HNK和DDP都具有较强的抗肿瘤效应, 它们的作用机制不同, 因此我们设想联合应用HNK和DDP是否产生更强的抗肿瘤效果?

本实验建立了人A549肺腺癌裸鼠肿瘤模型, 通过多次腹腔注射的治疗方式, 分别予以经典的抗肿瘤的一线用药顺铂或和厚朴酚, 单药治疗、联合治疗或不治疗, 以探讨抗肿瘤血管形成、肿瘤细胞凋亡与联合治疗肿瘤的可行性.

材料和治法: 在6-8周龄的雌性裸鼠建立人A549肺瘤实体瘤模型, 裸鼠接种成瘤后开始治疗: 将荷瘤小鼠随机分为6组, 每组5只。

A组（生理盐水对照组）每日腹腔给药，连续给药3周。B组（脂质体对照组），脂质体每日腹腔给药，连续给药3周。C组（低剂量和厚朴酚组），脂质体包裹的厚朴酚5mg/kg，药物浓度为40%，每日腹腔给药，连续给药3周。D组（单纯顺铂组），剂量为4mg/kg，腹腔给药，每周2次，共4次。E组（高剂量和厚朴酚组）脂质体包裹的厚朴酚25mg/kg，溶于0.2ml生理盐水中，药物浓度为40%，每日腹腔给药，连续给药3周。F组（高剂量和厚朴酚联合顺铂组）为D组和E组治疗的联合，脂质体包裹的厚朴酚药物浓度为40%，每日腹腔给药，连续给药3周。顺铂剂量为4mg/kg，腹腔给药，每周2次，共4次。顺铂给药后4小时再给予脂质体包裹的厚朴酚。观察裸鼠肿瘤大小，生存曲线，化疗毒副反应，并进行肿瘤组织免疫组化和肿瘤细胞凋亡分析。

结果：本实验证明厚朴酚与顺铂联合治疗A549肺癌导致更强的抗肿瘤效应，小鼠没有明显的不良反应。研究结果提示联合组肿瘤明显小于对照组（ $P<0.05$ ），生存期显著长于对照组。肿瘤组织的病理切片HE染色显示，联合治疗组的肿瘤组织中坏死区域明显大于对照组，免疫组化显示联合组肿瘤组织中新生血管密度显著低于对照组（ $P<0.05$ ），TUNNEL法显示联合治疗组中肿瘤细胞凋亡显著多于对照组。

结论：该项研究首次表明使用厚朴酚与顺铂联合治疗恶性肿瘤，取得了协同抗肿瘤效应，分析其机制可能为二者的联合协同抑制了肿瘤新生血管形成、诱导了肿瘤细胞的凋亡，联合化疗治疗恶性肿瘤具有可行性。

引证文献(1条)

1. 丁清 两种药物控释载体的体外释药性能[期刊论文]-中国组织工程研究与临床康复 2008(32)

本文链接: [http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_jrfsxzz200403023.aspx](http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_jrfsxzz200403023.aspx)  
授权使用: qkxb11(qkxb11), 授权号: 50a342d0-1728-4b3e-96f5-9e2b00a5ce6c

下载时间: 2010年11月11日