

医疗机构制剂活血益气方抗瘤丸基于裸鼠荷瘤模型的工艺筛选

陈 菲 冯英楠 张 鹏 庄 伟 林晓兰

(首都医科大学宣武医院药剂科,北京,100053)

摘要 目的:筛选医疗机构制剂活血益气方抗瘤丸(简称KLW)的制备工艺。方法:将足够量的大鼠神经胶质瘤C6细胞注射至裸鼠右侧腋窝,建立裸鼠荷瘤模型,按瘤块体积随机分组,分别灌胃给予等量的不同工艺KLW1~4,以替莫唑胺为阳性对照,以溶媒(去离子水)为模型对照,测量裸鼠体重、瘤体积,并观察给药前后小鼠症状;连续给药15 d后,处死,称量裸鼠瘤重量。结果:KLW-1中、高剂量组裸鼠瘤块重量,KLW-1高剂量组瘤体积,均低于模型对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),阳性对照组瘤块重量及瘤体积均低于模型对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。其他处方组裸鼠瘤块重量、体积与模型对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。各待测组(KLW-1~4高、中、低剂量组)裸鼠体重与模型对照组比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),阳性对照组给药后裸鼠体重明显低于模型对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。各组有少量裸鼠死亡。结论:抗瘤丸在荷瘤裸鼠模型中具有一定抑瘤效果,与待测工艺比较,原制剂工艺抑瘤效果较好,成本低廉,适用于大规模现代化生产。

关键词 抗瘤丸;神经胶质瘤;裸鼠;抑瘤;工艺

Technology Screening of Qi Supplement and Blood Activation Prescription Kangliu Pills Prepared by Medical Institutes Based on Nude Mice Tumor-Bearing Model

Chen Fei, Feng Yingnan, Zhang Peng, Zhuang Wei, Lin Xiaolan

(Department of Pharmacy, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China)

Abstract Objective: To screen the preparation technology of qi reinforcement and blood circulation promotion prescription-Kang Liu Wan (KLW) for medical institutes. **Methods:** A sufficient amount of C6 mice neuroglioma cell were injected into nude mice right armpit to establish a Nude Mice Tumor-Bearing model. Experimental mice were randomly divided into groups based on model tumor size and intragastrically administered with equal amounts of KLW1-4. Temozolomide was set as a positive control and vehicle (deionized water) as a model control. The nude mice weight and tumor size were measured, and the symptoms of mice was observed during the whole experiment. After 15 day's experiment, the tumor was weighed. **Results:** The tumor weight of KLW-1 middle and high dose group were lower than those in the model control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The tumor weight and tumor size in the positive group were lower than those in the model control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). Compared with control group, all other prescription groups had no significant difference in the weight and size of tumor, and the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). And all preparation technology test groups had no statistically significant difference in weight ($P > 0.05$) when compared with control group. The positive control group was significantly decreased when compared with control group after treatment, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). A small number of nude mice died in each group. **Conclusion:** KLW has a specific anti-tumor effect in Nude Mice Tumor-Bearing model. Compared with preparation test technology, traditional prescription process technology has advantage in anti-tumor effect, prescription cost and mass-production technologies adaptability

Key Words Kang Liu Wan; Neuroglioma; Nude mice; Anti-tumor; Preparation technology

中图分类号:R-33;R289.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.10.057

活血益气方抗瘤丸(简称KLW)是治疗神经胶质瘤的医疗机构制剂,临床应用近40年,年销售额近300万元,临床观察结果证实了该药的有效性与

安全性^[1],具有较强的市场竞争力与较深远的社会效益和经济效益,曾获北京市科技进步一等奖。但是KLW作为医疗机构制剂,仅限本医疗机构使用,

基金项目:北京市科委十病十药(Z141100002214016);北京市教委2017年度首都中医药研究专项(1ZY13);2016年北京市中医药科技发展资金项目(JJ2016-10)

作者简介:陈菲(1984.11—),女,硕士,主管药师,研究方向:中药新药研发,E-mail:chenfeijill@163.com

通信作者:林晓兰(1963.08—),女,学士,主任药师,研究方向:中药制剂研发与医院药学管理,E-mail:xlilin83@163.com

为服务广大患者,急需向新药转化。鉴于 KLW 工艺简单并缺乏相关数据支持,故在新药研发过程中,其合理性亟待进一步探索。我们采用荷瘤裸鼠模型,以抑瘤效果为观察指标,对制剂工艺进行筛选,旨在确定 KLW 最优工艺,为新药研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与动物 人神经胶质瘤细胞 U87(由首都医科大学宣武医院提供)。裸小鼠 BALB/c Nude, 雄性,18~22 g,126 只,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,实验动物质量合格证号:11401300024482;11401300023307,屏障环境饲养。

1.1.2 药物 活血益气方 KLW 原工艺,简称 KLW-1,由首都医科大学宣武医院提供;活血益气方 KLW 待选工艺,简称 KLW-2、KLW-3、KLW-4,由一诺信远医药科技有限公司制备;替莫唑胺(TMZ,泰道,美国仙灵葆雅公司授权生产,批号:4DZAA04001)。

1.1.3 试剂与仪器 胎牛血清(FBS,天津市灏洋生物制品科技有限责任公司,批号:20150517),DMEM 培养基(Invitrogen corporation,批号:1177237),胰蛋白酶(Amresco Company,批号:0458)。CO₂ 培养箱(NAPCO 6500 型),生物安全柜(CLASS TYPE B2 型),台式离心机(eppendorf centrifuge 5430R),电子数显卡尺(SF2000 型),倒置显微镜(Leica DM3000),电子天平(PB602-N,TE2101-L)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型建立 1)分组:按照工艺不同分别设置 KLW-1、KLW-2、KLW-3、KLW-4 的高中低剂量组。KLW-1:按照医疗机构制剂 KLW(首都医科大学宣武医院,京药制字 Z20063103)再注册批件(批件号:再 20140137B)制法生产。KLW-2:加水煎煮 2 次,合并 2 次煎液,取上清浓缩,干燥。KLW-3:川贝、沉香加水、乙醇分别提取 2 次,提取液合并,取上清液备用;三七等 70% 乙醇回流提取 2 次,提取液合并,取上清液回收乙醇;余药加水煎煮 2 次,合并 2 次煎液,取上清液浓缩,与醇提液和川贝、沉香提取液合并,浓缩,干燥。KLW-4:川贝、沉香加入水及乙醇分别提取 2 次,提取液合并,取上清液备用;三七等加 70% 乙醇回流提取 2 次,提取液合并,取上清液回收乙醇;余药加水煎煮 2 次,合并 2 次煎液,取上清液浓缩,加乙醇至含醇量 70%,搅匀,静置,取上清液,回收乙醇,取醇提取液和川贝、沉香提取液合并,浓缩,干燥。

2)模型建立:U87 细胞培养在含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养基中,置 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中,常规培养。取对数生长期的 U87 细胞,0.25% 胰酶消化后,磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗 2 遍,离心,用无血清的 DMEM 培养基重悬细胞。将细胞悬液注射至裸鼠右侧腋窝,0.2 mL/只,保证 5 × 10⁶ 个细胞一次性注射至裸鼠右侧腋窝。

1.2.2 给药方法 待动物体内瘤块长到 300~1000 mm³ 时将裸鼠按瘤块大小分组,使每组动物的瘤块大小平均值接近,同时须考虑动物的体重,尽量使各组动物体重平均值接近。分组后立刻灌胃给予不同浓度受试药物:待测组分别给予高、中、低剂量 KLW1~4,阳性对照组给予替莫唑胺胶囊(TMZ),模型对照组给予同体积的去离子水(灭菌)。给药剂量见表 1。1 次/d,连续给药 15 d 后处死裸鼠。

表 1 各组给药剂量设定(n=9)

组别	裸鼠给药剂量	与人用剂量倍比
KLW-1 低剂量组	0.84 g 生药/kg	0.5 倍
KLW-1 中剂量组	1.7 g 生药/kg	等效
KLW-1 高剂量组	3.4 g 生药/kg	2 倍
KLW-2 低剂量组	0.84 g 生药/kg	0.5 倍
KLW-2 中剂量组	1.7 g 生药/kg	等效
KLW-2 高剂量组	3.4 g 生药/kg	2 倍
KLW-3 低剂量组	0.84 g 生药/kg	0.5 倍
KLW-3 中剂量组	1.7 g 生药/kg	等效
KLW-3 高剂量组	3.4 g 生药/kg	2 倍
KLW-4 低剂量组	0.84 g 生药/kg	0.5 倍
KLW-4 中剂量组	1.7 g 生药/kg	等效
KLW-4 高剂量组	3.4 g 生药/kg	2 倍
阳性对照组(TMZ)	38.7 mg/kg	等效
模型对照组	-	-

1.2.3 检测指标 分别在给药第 0、3、6、9、12、15 天测量动物体重、肿瘤的最大直径 L(cm)和最小直径 D(cm),计算各组肿瘤体积 V(cm³), $V = 1/2 \times L^2 \times D$ 。并于给药 15 d 后处死,剥离瘤块称重。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 11.5 统计软件进行数据分析。瘤块体积和重量计算为单变量因素计量资料,先进行单因素方差分析,然后根据方差分析结果,进行 Dunnett-t 检验。计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用 t 检验。以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠行为学观察结果 实验期间,KLW-1 高剂量组于给药后第 9 天死亡 1 只,KLW-1 低剂量组第 9 天死亡 2 只,KLW-2 低剂量组第 6 天死亡 1 只,KLW-3 高剂量组第 9 天死亡 1 只,KLW-3 中剂

表2 KLW 对裸鼠瘤块体积的影响($\bar{x} \pm SD, n=9, \text{mm}^3$)

组别	给药前	给药后				
		第3天	第6天	第9天	第12天	第16天
KLW-1 低剂量组	149.6 ± 39.6	200.8 ± 65.2 *	308.4 ± 110.5 *	787.5 ± 255.5 *	1819.7 ± 437.0	2475.5 ± 654.3
KLW-1 中剂量组	149.5 ± 42.2	228.8 ± 48.7	433.2 ± 140.4	791.2 ± 226.0 *	1453.1 ± 426.4 *	1702.6 ± 352.8
KLW-1 高剂量组	146.5 ± 38.1	166.9 ± 50.5 *	296.3 ± 102.8 *	532.8 ± 163.0 *	1166.0 ± 420.7 *	1241.1 ± 461.6 *
KLW-2 低剂量组	154.2 ± 42.9	175.6 ± 55.0 *	356.8 ± 96.4	982.4 ± 263.8	1730.0 ± 495.7	1987.4 ± 565.9
KLW-2 中剂量组	154.0 ± 35.4	204.5 ± 56.8 *	312.5 ± 79.6 *	843.5 ± 198.4 *	1944.9 ± 508.8	1894.8 ± 714.5
KLW-2 高剂量组	155.8 ± 42.6	203.5 ± 62.1 *	358.7 ± 125.3	878.1 ± 246.5	2109.0 ± 467.7	2015.3 ± 514.0
KLW-3 低剂量组	148.1 ± 36.9	219.6 ± 56.7 *	228.4 ± 78.0 *	983.6 ± 227.1	1891.6 ± 385.7	2361.1 ± 713.0
KLW-3 中剂量组	151.8 ± 40.6	164.9 ± 30.5 *	373.3 ± 112.0	942.3 ± 350.0	1605.1 ± 444.1	1705.8 ± 696.6
KLW-3 高剂量组	155.5 ± 36.9	212.0 ± 54.1 *	307.2 ± 90.8 *	835.1 ± 212.8 *	1575.0 ± 491.8	1666.6 ± 695.7
KLW-4 低剂量组	151.2 ± 40.2	204.5 ± 45.2 *	385.6 ± 83.6	827.2 ± 125.3 *	1488.4 ± 322.8 *	1703.6 ± 545.9
KLW-4 中剂量组	156.1 ± 40.8	191.9 ± 30.7 *	366.9 ± 86.3	977.3 ± 239.2	1800.5 ± 354.1	1831.3 ± 677.3
KLW-4 高剂量组	153.7 ± 38.5	165.5 ± 23.5 *	460.5 ± 135.1	1190.4 ± 352.4	1983.0 ± 466.0	1873.7 ± 642.6
阳性对照组(TMZ)	197.1 ± 19.6 *	275.7 ± 72.2	385.4 ± 82.4	967.5 ± 319.3	1096.0 ± 257.0 *	685.0 ± 222.5 **
模型对照组	157.4 ± 42.0	305.3 ± 109.8	491.1 ± 149.0	1232.8 ± 347.7	2145.3 ± 432.4	2317.8 ± 662.2

注:与模型对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

量组第9天死亡1只,KLW-3 低剂量组分别于3、6天死亡1只,KLW-4 中剂量组第9天死亡1只,KLW-4 低剂量组第12死亡1只,阳性对照组第9天死亡1只,模型对照组第3天死亡1只。各处方组和模型对照组存活裸鼠临床症状、行为活动、腺体分泌、呼吸、粪便等均未见明显异常。

2.2 KLW 对裸鼠体重的影响 整个给药期间,KLW-1~4 高中低各剂量组裸鼠体重均增长,差异无统计学意义($P>0.05$)。阳性对照组裸鼠体重逐渐降低,与模型对照组比较,阳性对照组裸鼠体重在给药后明显低于模型对照组,差异有统计学意义($P<0.01$)。见图1。

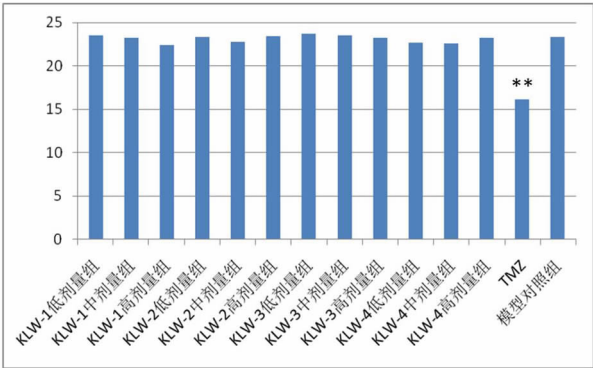


图1 KLW 对 BALB/c 雄性裸鼠体重的影响

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

2.3 KLW 对裸鼠瘤块体积的影响 KLW-1 高剂量组在给药后第3、6、9、12、16天,KLW-1 中剂量组第9、12天,KLW-1 低剂量组第3、6、9天,LW-2 高剂量组第3天,KLW-2 中剂量组第3、6、9天,KLW-2 低剂量组第3天,KLW-3 高剂量组第3、6、9天,KLW-3 中剂量组第3天,KLW-3 低剂量组第3、6天,KLW-4

高剂量组第3天,KLW-4 中剂量组第3天,KLW-4 低剂量组第3、9、12天,裸鼠瘤块体积明显低于模型对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。阳性对照组第12、16天,裸鼠瘤块体积明显低于模型对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

2.4 KLW 对裸鼠瘤块重量的影响 KLW-1 高、中剂量组裸鼠瘤块重量明显低于模型对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),其他待测组裸鼠瘤块重量与模型对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。阳性对照组裸鼠瘤块重量明显低于模型对照组,差异有统计学意义($P<0.01$)。见图2。

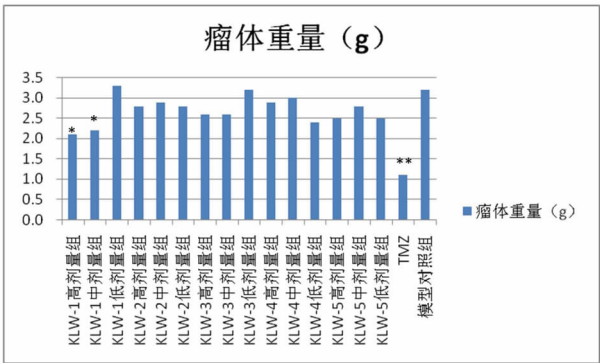


图2 KLW 对裸鼠瘤块重量的影响

注:与模型对照组比较* $P<0.05$,** $P<0.01$

3 讨论

KLW 具有利湿解毒、扶正培本、活血化瘀的功效,用于湿热蕴毒证,适用于脑胶质瘤,脑垂体瘤的辅助治疗。临床研究^[2]显示,早期前瞻性研究其总有效率为64.7%;回顾性研究^[3]表明,该药可以延长恶性神经胶质瘤的生存时间,具有肯定疗效。基础研究表明,KLW 具有抑制胶质瘤细胞增殖的作

用^[4-5],且该作用与促进胶质瘤细胞凋亡相关;经处方筛选,得到优化的 KLW 处方。然而,作为医疗机构制剂,制剂工艺确定缺乏依据,无相关筛选数据,影响该药的新药研发。因此,本实验在处方优化基础上进行制备工艺筛选。

KLW 由 18 味中药组成,由于药味较多,难以使用正交试验的方法进行优化,故通过专家论证会的方式得出待选方 KLW-2、3、4,分别将待选工艺与原工艺 KLW-1 进行抑瘤效果比较。因为原工艺为部分水提取,余下药味原粉入药的浓缩蜜丸。因此,在工艺筛选过程中,待选方保证水提部分工艺和剂型不变,为提高药物利用率,降低服药量,针对原粉入药部分进行提取工艺筛选。KLW-2,模拟传统中药水煎剂,即水煎两次合并使用,浓缩加蜜制丸。KLW-3,参考 KLW 组成药味中的有效成分,设计提取工艺。经文献检索及 2015 版《中国药典》要求,对抗 KLW 原粉入药的十三味药味逐一研究。参考君药三七、土茯苓及具有明确抗癌作用的白英、半枝莲等有效成分性质^[7-14],如三七有效成分为七皂苷、人参皂苷^[15]、土茯苓落新妇苷及总黄酮^[16-17]、白英抗癌成分甾体生物碱类和皂苷类化合物^[18-20]、半枝莲醇提物^[21],并结合现代化工业生产的具体情况,将提取工艺设计为 70% 乙醇回流提取。为使方中川贝、沉香有效成分最大限度保留,采用水、乙醇分别提取。余药采取传统水煎煮方法。以上提取液合并、浓缩、制丸。KLW-4,为减少给药剂量,提高制剂稳定性,在 KLW-3 基础上,对水提部分进行醇沉除杂,余下工艺同 KLW-3。

本实验结果表明,KLW 各测试组均能在不同程度上降低裸鼠肿瘤体积及重量,其中 KLW-1 中、高剂量组有统计学意义。各测试组的裸鼠体重与阴性对照组比较无明显区别。KLW 抑瘤效果不如阳性对照药替莫唑胺,但与阳性对照组比较对裸鼠体重改变较少,体现了中药与化疗药物相比安全性高。除 KLW-3 组死亡较多外,其余各组死亡只数近似。经专家组论证,一致认为 KLW 原工艺成本低廉、抑瘤效果较好,且前期临床基础扎实,适用于进一步研发推广。

参考文献

[1]陈菲,冯英楠,庄伟,等.中药医院制剂活血益气方对裸鼠抑瘤作

用及小鼠急性毒性的实验研究[J].世界中医药,2017,12(10):2423-2430.

[2]宋慕玲,徐庆中,冷守忠,等.中药复方抗癌丸粉治疗脑胶质瘤疗效的初步观察[J].中西医结合杂志,1984,4(1):10-12.

[3]庄伟,林晓兰,姜德春,等.中药 KLW-1 治疗恶性神经胶质瘤的临床研究[J].中国新药杂志,2011,20(19):1894-1897.

[4]林晓兰,陈菲,连增林.活血益气方 KLW 对神经胶质瘤细胞抑制作用的实验研究[J].北京中医药,2011,30(5):396-397.

[5]陈菲,林晓兰,连增林,等.MTT 法测定中药益气活血方 KLW₁ 对神经胶质瘤细胞 U87-MG 细胞增殖的抑制作用[J].北京中医药,2012,6(9):466-467.

[6]冯英楠,陈菲,张鹏,等.优化治疗神经胶质瘤复方抗癌丸的实验研究[J].世界中医药,2015,10(3):403-407.

[7]詹合琴,张文熙,闫福林,等.三七皂苷 Rg1 对脑缺血损伤后大鼠脑组织凋亡因子表达的影响[J].广东医学,2014,35(10):1478-1481.

[8]邓海进,肖晓山,马松梅.三七对胃缺血-再灌注损伤大鼠 Bcl-2 及 Bax 的影响[J].广东医学,2014,35(13):2007-2010.

[9]周进,赵朋.白花蛇舌草对 Renca 肾癌细胞模型小鼠凋亡相关蛋白 Fas、caspase3 及 caspase7 表达影响[J].中国生化药物杂志,2016,36(12):37-45.

[10]赵晓芳,李中华,等.半枝莲含药血清对肝星状细胞凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 的影响[J].临床医药实践,2013,22(2):112-113.

[11]董贺,张太平.山楂中谷甾醇抑制肿瘤细胞的研究[J].中国生化药物杂志,2009,30(4):270-272.

[12]谭永华.基于薯蓣皂苷元的抗肿瘤活性衍生物设计与合成研究[D].贵阳:贵州大学,2016:20-22.

[13]詹奇,胡韶山,郑永日,等.中药治疗胶质瘤作用机制的研究现状[J].哈尔滨医科大学学报,2007,41(5):519-520.

[14]杨莹.天然中药抗肿瘤机制的研究进展[J].医学综述,2010,16(3):363-365.

[15]姜祖祥.三七总皂苷的现代提取方法研究进展[J].中国中医药资讯,2011,3(22):23-24.

[16]马兰.探究土茯苓不同方法干燥导致落新妇苷含量的差异[J].天津药学,2016,28(3):6-7.

[17]王敏,陈文龙,王志仁,等.HP-20 型大孔吸附树脂对土茯苓总黄酮的富集纯化作用[J].中成药,2015,37(9):2074-2078.

[18]杨苏宁.抗癌中药白英的研究现状[J].中国中医药资讯,2011,20(3):385-386.

[19]宋敏,王翔林,孙立新.不同来源白英乙醇提取物抗肿瘤活性比较[J].实用药物与临床,2011,14(3):224-226.

[20]尹海龙,李建,董俊兴.白英的化学成分研究[J].军事医学,2013,34(7):279-280.

[21]芦冲,张睿芬,高彦宇,等.半枝莲醇提物含药血清对人结肠癌 HT-29 细胞增殖、凋亡和周期的影响[J].中国中医药学报,2016,44(2):51-52.

(2017-01-03 收稿 责任编辑:张雄杰)