

# 秋水仙碱对皮下移植 G422 小鼠 生存期影响的实验研究

周 勇, 余化霖

**【摘要】** 目的 观察秋水仙碱对 G422 胶质瘤小鼠生存期的影响。方法 建立小鼠皮下 G422 胶质瘤模型, 将 80 只健康小鼠随机均分成 4 组, 每组 20 只, 其中 3 组为实验组, 分别给予 0.500 mg/(kg·d)、0.050 mg/(kg·d)、0.005 mg/(kg·d) 的秋水仙碱治疗, 另一组为对照组。分别在 G422 胶质瘤接种后的第 2、5 天, 将 0.1 ml 药物注射于接种 G422 部位处, 一共 2 次。用药结束后, 观察小鼠平均生存期, 并计算小鼠生存时间延长率。结果 实验组的平均生存时间与对照组相比均明显延长, 其生存时间分别为 (44.28 ± 1.07)d、(42.79 ± 1.64)d、(40.09 ± 1.39)d, 生存时间延长率分别为 57.14%、50.99%、42.86%; 而对照组为 (28.28 ± 1.77)d; 结论 在瘤局部注射秋水仙碱可显著提高 G422 荷瘤鼠的生存期。

**【关键词】** 秋水仙碱; G422 胶质瘤; 动物模型; 间质内化疗

**【中图分类号】** R 446 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1009-2595.2014.09.006

## Effect of Colchicine on Survival Time of G422 Mice with Subcutaneous Transplantation

ZHOU Yong, YU Hua-lin. Department of Neurosurgery, Meishan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Meishan Sichuan 620020, China

Corresponding author: YU Hua-lin, E-mail: yuhl308@126.com

**【Abstract】 Objective** To observe the effect of colchicine on the survival time of the G422 glioma mice. **Methods** Model of the G422 glioma mice were established by subcutaneous transplantation and randomly divided into four groups with 20 mice each. Three experimental groups were given 0.5, 0.05, 0.005 mg/(kg·d) of colchicine, and the control group was given normal saline. At 2 d, 5 d after inoculation of tumor cells, 0.1 ml colchicine was injected in the tumor location for 2 times. At the end of treatment, the survival time was observed and the prolonged survival time was calculated. **Results**

The average survival times, (44.28 ± 1.07), (42.79 ± 1.64), (40.09 ± 1.39) days respectively, were longer in the experimental groups than (28.28 ± 1.77) days in the control group. Prolonged survival rates were 57.14%, 50.99%, 42.86% respectively in the experimental groups. **Conclusion** Local injection of colchicine in the tumor can significantly improve survival time of the G422 tumor-bearing mice.

**【Key words】** Colchicine; G422 Glioma; Animal models; Chemotherapy

脑胶质瘤发病率及复发率高, 预后差, 临床上治疗较为困难<sup>[1]</sup>, 对于恶性胶质瘤, 如神经胶质母细胞瘤, 单一手术治疗效果差, 最佳方案是手术切除肿瘤后, 辅以放疗和化疗。在胶质瘤的众多化疗方案中, 目前对间质内化疗研究比较多, 秋水仙碱在临床上对某些肿瘤有良好的治疗效果。在实验前首先准备好小鼠皮下 G422 胶质瘤的模型, 然后将秋水仙碱注射于瘤腔局部, 通过观察荷瘤鼠的生存期等指标来研究该药是否对胶质瘤有治疗作用, 以便为进一步建立大鼠的颅内胶质瘤模型进行实验提供依据。

## 1 材料及方法

### 1.1 G422 细胞株与实验动物

G422 胶质瘤细胞株由中科院昆明动物实验室提供。其中包括健康小鼠 80 只, 不限雌雄, 小鼠周龄 7~8 周, 体质量 20~24 g。

### 1.2 制作小鼠皮下 G422 胶质瘤模型

①通过脱颈的方式将 G422 荷瘤鼠处死, 将其放置于 75% 的酒精中浸泡约 1~2 min, 在无菌工作台上取出肿瘤组织; ②将肿瘤组织置于玻璃容器中, 然后加入 2 ml D-Hanks 液体将肿瘤组织彻底研磨碎后, 使用 200 目钢网进行过滤, 使用离心率为 800 r/min 的离心机处理 5 min 后获得瘤细胞沉渣; ③加入 D-Hanks 液体将沉渣处理成瘤细胞悬液, 调至细胞浓度为  $1 \times 10^7$

**【作者单位】** 620020 四川眉山, 眉山市中医医院神经外科(周 勇); 昆明医科大学第一附属医院微创神经外科(余化霖)

**【通讯作者】** 余化霖, E-mail: yuhl308@126.com

个/ml,取0.1 ml 细胞悬液(即  $1 \times 10^6$  个细胞)于小鼠右后大腿的内侧皮下进行接种。

### 1.3 分组以及用药方式

将接种 G422 的小鼠随机分为 4 组(3 组实验组以及 1 组对照组),3 组实验组根据秋水仙碱剂量[ $(0.5 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d}), 0.05 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d}), 0.005 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ ]设为高、中、低三组(即第 1、2、3 组),其余设为生理盐水对照组;每组分配 20 只小鼠,分别在 G422 胶质瘤细胞接种后的第 2、5 天,将 0.1 ml 的药物皮下注射于原接种 G422 的部位,共 2 次。从每组中抽取 15 只小鼠观察其生存时间并对肿瘤体积进行测量,其余 5 只测量肿瘤重量。

### 1.4 观察生存期

注射药物后,将小鼠放回鼠笼中饲养,观察小鼠生存情况,记录生存时间(d)。观察时间为 45 d 后,若小鼠还未死亡,则以 45 d 计算,计算生命延长率<sup>[2]</sup>,其计算公式如下。

生命延长率 =

$$\frac{\text{实验组平均存活天数} - \text{对照组平均存活天数}}{\text{对照组平均存活天数}} \times 100\%$$

### 1.5 肿瘤体积的测定

如果用手能够扪及肿瘤时,使用游标卡尺测量肿瘤大小,每隔 3~5 d 测量一次,计算肿瘤体积。

肿瘤体积 =  $a \times b^2 / 2$  (a 为肿瘤的最大径, b 为与最大径垂直的最宽径)<sup>[3]</sup>。

### 1.6 肿瘤重量

从每组中随机选出 5 只小鼠测量肿瘤重量,对照组在接种后 20 d,实验组在接种后 35 d 予以脱颈处死,从双侧腹股沟处将两下肢剪下,分别对其重量进行测量,两下肢的重量之差即为瘤体的重量<sup>[4]</sup>。

### 1.7 统计学处理

采用 SPSS 14.0 的统计软件对结果进行统计。数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用方差分析,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 实验组与对照组的生存期比较

实验组第 1、2、3 组生存时间分别为  $(44.28 \pm 1.07) \text{d}$ 、 $(42.79 \pm 1.64) \text{d}$ 、 $(40.09 \pm 1.39) \text{d}$ ,生存时间延长率分别为 57.14%、50.99%、42.86%;而对照组生存时间为  $(28.28 \pm 1.77) \text{d}$ ,生命延长率为 0%。样本均数经过方差分析比较差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ),说明各实验组中小鼠生存时间不一致。实验组 3 组中的小鼠体质量比较无明显差异( $P > 0.05$ ),对照

组与其余各组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 2.2 肿瘤体积

对照组小鼠接种 10 d 后,肿瘤开始生长  $(0.53 \pm 0.14) \text{cm}^3$ ,15 d 体积  $(2.38 \pm 0.98) \text{cm}^3$ ,20 d 时体积为  $(3.85 \pm 1.06) \text{cm}^3$ ,约 25 时体积  $(6.08 \pm 1.61) \text{cm}^3$  后肿瘤出现坏死、出血或液化情况,此时若测量肿瘤体积可能会出现缩小的情况。但是实验组中的小鼠大约在在进行 28 d 左右的接种后,肿瘤才出现生长的迹象。见表 1。

表 1 实验组小鼠肿瘤体积 ( $\text{cm}^3, \bar{x} \pm s, n = 20$ )

Table 1 Tumor volume in experimental groups ( $\text{cm}^3, \bar{x} \pm s, n = 20$ )

组别	28 d	31 d	36 d	40 d
第 1 组	$0.63 \pm 0.31$	$1.58 \pm 0.38$	$3.05 \pm 2.06$	$7.98 \pm 2.01$
第 2 组	$0.73 \pm 0.13$	$2.28 \pm 0.35$	$4.15 \pm 1.46$	$8.08 \pm 1.09$
第 3 组	$0.83 \pm 0.94$	$1.98 \pm 0.14$	$4.85 \pm 2.16$	$6.38 \pm 1.51$

### 2.3 肿瘤的称重

实验组中的小鼠因使用了抗肿瘤药物,所以肿瘤细胞出现生长的时间较对照组晚,在同一时间点上并不同步,所以作者选取 20 d 以及 35 d 这两个时间点对测量小鼠的体质量,与接种时相比,可以反映肿瘤的生长速度。实验组 3 组间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),对照组与其余各组间比较差异均有统计学意义( $F = 7.25, P < 0.05$ )。对照组于接种后 20 d、实验组接种后 35 d 各处死 5 只小鼠进行瘤重的测量,见表 2。

表 2 4 组小鼠第 20 天以及第 35 天时体质量的变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 2 Weight change in 4 groups at the 20 d and 35 d ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	药物剂量	20 d 平均 增重(g)	35 d 平均增 重(g)
第 1 组	$0.500 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 秋水仙碱	$4.28 \pm 1.07$	$14.28 \pm 1.07$
第 2 组	$0.050 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 秋水仙碱	$2.79 \pm 1.64$	$12.79 \pm 1.64$
第 3 组	$0.005 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 秋水仙碱	$3.09 \pm 1.39$	$13.09 \pm 1.39$
第 4 组	0.1 ml 生理盐水	$12.28 \pm 1.77$	大部分小鼠已死亡

### 2.4 对照组小鼠 20 d、实验组小鼠 35 d 时的瘤重

对照组小鼠 20 d 时的瘤重为  $(6.79 \pm 1.64) \text{g}$ ,实验组小鼠 35 d 时的瘤重为组 1:  $(6.28 \pm 1.07) \text{g}$ ,组 2:  $(8.79 \pm 1.64) \text{g}$ ,组 3:  $(8.09 \pm 1.39) \text{g}$ ,组 4(生理盐水 0.1 ml): 大部分小鼠已死亡。

## 3 讨论

脑胶质瘤是中枢神经系统中常见的恶性肿瘤,占颅内肿瘤的第一位。近二十年以来,随着影像学的发展和手术技术的提高,一定程度上促进了神经上皮性

肿瘤的诊治,但恶性神经上皮性肿瘤的预后仍没有改善。目前胶质瘤治疗的难点在于,因肿瘤呈浸润性生长,与脑组织无明显边界,即使影像学和肉眼可以见到边界,但肿瘤细胞实际的浸润早已超过这一界限,因而手术不能完全切除,术后复发率高。化疗作为手术后的一种辅助治疗手段,其显效的重要前提是“可见”肿瘤的全切和选用有效的化疗药物,但限制化疗效果的因素包括:肿瘤局部药物浓度,化疗药物的敏感性,化疗药物的耐受性,全身的毒副作用等<sup>[5]</sup>。近年来,提高化疗效果的常用方法有:体外药物敏感试验预测个体反应、血-脑脊液屏障可逆性开放、动脉内化疗、间质内化疗。其中,间质内化疗达到的化疗效果较好<sup>[6-7]</sup>。刘金龙等<sup>[8]</sup>报告显微外科切除加术中中间质内化疗治疗胶质瘤,未观察到间质化疗并发症;王树凯等<sup>[9]</sup>在术中对面胶质瘤残腔进行喷洒生物胶与博来霉素混合剂,取得良好疗效;于耀宇等<sup>[10]</sup>对复发的恶性胶质瘤患者在术中使用生物胶及硝唑混合剂对进行缓释化疗,术后进行了中位时间为8月的随访,并复查头颅磁共振未见肿瘤复发转移情况。

本研究的目的是寻找一种新的应用于胶质瘤治疗的化疗药物,作者在前期进行了体外实验,证实了秋水仙碱具有抑制G422胶质瘤细胞生长的作用<sup>[11]</sup>。近年来,大量实验和临床研究发现秋水仙碱有抗肿瘤的作用,临床上已经证实该药对乳腺癌有一定作用,并已经成功应用于临床<sup>[12]</sup>,秋水仙碱能与 $\beta$ 微管蛋白结合,阻止了其他蛋白单体继续添加,同时还可以通过诱导微管的解聚来对纺锤体的形成产生抑制,使细胞有丝分裂停滞在M期,从而阻止了细胞的进一步分裂繁殖<sup>[13]</sup>。然而,秋水仙碱毒性过大,副作用多,这在一定程度上限制它的应用。目前对秋水仙碱研究还是主要集中在其构效关系上,希望通过结构修饰的方法,来提高疗效而降低毒副作用的目的。

通过本次实验的研究结果看出,实验组的平均生存时间与对照组相比均明显延长,因此认为在瘤局部注射秋水仙碱可显著提高G422荷瘤鼠的生存期。而在进行前期实验的基础上,下一步有必要改进实验条件,选用耐受力较强的SD大鼠,制作颅内胶质瘤模型进行实验,以进一步探讨秋水仙碱抗肿瘤的具体效果。此外,秋水仙碱对脑组织并无毒副作用,而对神经组织有多发毒性及其安全性均需要进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] 韦军葆,朱小东,陈 龙,等. 133例脑胶质瘤患者预后因素分析[J]. 重庆医学, 2013, 42(32): 3908-3910
- [2] 张东旭,范引科,郭淑云,等. 芝麻素抗肿瘤作用的研究[J]. 中国医药导报, 2013, 10(29): 101-104
- [3] 颜次慧. 以间充质干细胞作为载体的肿瘤靶向治疗[D]. 北京:北京协和医学院, 2012
- [4] 王建杰,闫冬梅,董 航,等. 丹皮酚抑制小鼠乳腺癌细胞生长作用及机制的研究[J]. 中国免疫学杂志, 2013, 29(1): 48-51
- [5] 甄世明,杨丽娟,胡胜利,等. 裸鼠化疗前后不同时期胶质瘤组织中毛细血管扩张性共济失调突变基因的表达[J]. 中华实验外科杂志, 2012, 29(3): 459-461
- [6] 方恒虎,聂 青,康静波,等. 三维适形放疗联合替莫唑胺化疗治疗弥漫性脑干胶质瘤[J]. 中华肿瘤杂志, 2011, 33(9): 707-709
- [7] 陈祎阳,王焕宇,马全锋,等. 核转录因子- $\kappa$ B抑制蛋白激酶小分子干扰RNA增强人胶质瘤细胞替莫唑胺化疗敏感性[J]. 中华实验外科杂志, 2013, 30(11): 2330-2332
- [8] 刘金龙,陈硕朗,林佳平,等. 胶质瘤显微手术切除加术中中间质化疗的临床效果[J]. 中华显微外科杂志, 2003, 26(2): 156-158
- [9] 王树凯,保建基,徐国本,等. 脑胶质瘤术中博来霉素缓释化疗12例[J]. 郑州大学学报, 2007, 37(5): 698-699
- [10] 于耀宇,马廉亨,秦尚振,等. 脑胶质瘤细胞术后间质化疗联合同步放疗的临床研究[J]. 中国临床神经外科杂志, 2005, 10(5): 342-344
- [11] 雷三喜,周厚俊,肖宗宇,等. 秋水仙碱对胶质瘤细胞抑制作用的体外实验研究[J]. 昆明医学院学报, 2008, 29(5): 85-88
- [12] 刘 翎,刘宗英,孟 帅,等. 作用于秋水仙碱结合位点的微管蛋白抑制剂药效团的构建及应用[J]. 中国新药杂志, 2012, 21(9): 1026-1031
- [13] 韩福国,戚 欣,李 静. 考布他汀A4类肿瘤血管破坏剂的研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(4): 739-744

(2014-07-10 收稿)

(上接第859页)

差异,下降25.4%。因此,对于亚甲基蓝光化学法对冷沉淀具有一定的损伤作用,是否可应用于临床仍有待进一步考证。

## 参 考 文 献

- [1] Cid J, Caballo C, Pino M, *et al.* Quantitative and qualitative analysis of coagulation factors in cryoprecipitate prepared from fresh-frozen plasma inactivated with amotosalen and ultraviolet A light [J]. *Transfusion*, 2013, 53(3): 600-605
- [2] Ettinger A, Miklauz MM, Bihm DJ, *et al.* Preparation of cryoprecipitate from riboflavin and UV light-treated plasma [J]. *Transfus Apher Sci*, 2012, 46(2): 153-158

- [3] 江朝富. 临床输血风险及对策[J]. 实用医学杂志, 2003, 19(3): 226-228
- [4] 谭美芳,单桂秋. 血液成分病毒灭活的研究进展[J]. 华南国防医学杂志, 2012, 26(6): 610-613
- [5] Elliott BM, Aledort LM. Restoring hemostasis: fibrinogen concentrate versus cryoprecipitate [J]. *Expert Rev Hematol*, 2013, 6(3): 277-286
- [6] Prowse C. Properties of pathogen-inactivated plasma components [J]. *Transfus Med Rev*, 2009, 23(2): 124-133
- [7] Hornsey VS, Krailadsiri P, MacDonald S, *et al.* Coagulation factor content of cryoprecipitate prepared from methylene blue plus light virus-inactivated plasma [J]. *Br J Haematol*, 2000, 109(3): 665-670

(2014-01-08 收稿)