

金属铁与氟尿嘧啶配合物的体内抗肿瘤活性及其毒性

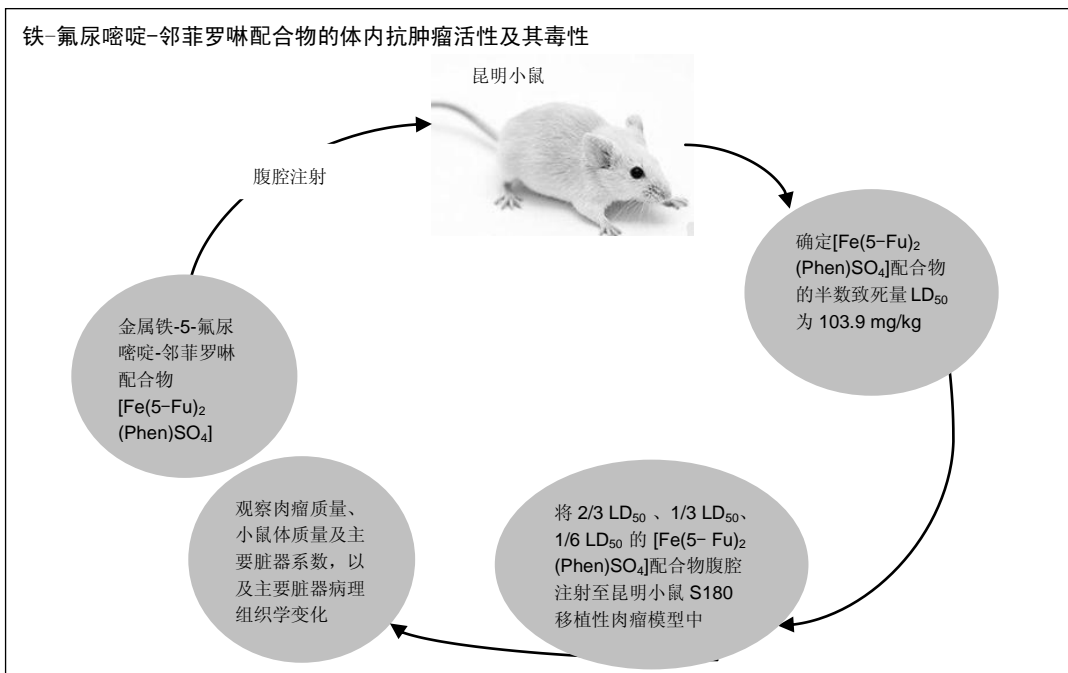
施敏¹, 周云², 杜馨娥¹, 陈英杰³, 王鹏¹, 钟文远⁴, 周轶平¹(¹昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 云南省昆明市 650500; ²云南开放大学化学学院, 云南省昆明市 650223; ³昆明医科大学基础医学院, 云南省昆明市 650500; ⁴昆明学院化学系, 云南省昆明市 650000)

引用本文: 施敏, 周云, 杜馨娥, 陈英杰, 王鹏, 钟文远, 周轶平. 金属铁与氟尿嘧啶配合物的体内抗肿瘤活性及其毒性[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(12):1779-1786.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.12.016

ORCID: 0000-0001-7630-0577(周轶平)

文章快速阅读:



施敏, 女, 1991 年生, 云南省曲靖市人, 昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室在读硕士, 主要从事肿瘤药理研究工作。

通讯作者: 周轶平, 副教授, 昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 云南省昆明市 650500

通讯作者: 钟文远, 教授, 昆明学院化学系, 云南省昆明市 650000

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2016)12-01779-08

稿件接受: 2016-02-01

<http://www.crter.org>

文题释义:

金属配合物: 配体与金属原子或离子通过配位键形成的配合物叫金属配合物。

金属配合物的优点: 结构简单, 合成线路短, 设备简单, 生产效率高, 药物来源有足够的保证, 极具研发前景。但迄今为止, 应用于临床的只有顺铂及其衍生物, 并且铂类金属药物有较强的肾毒性、神经毒性和胃肠道毒性, 长期服用耐药性明显。

摘要

背景: 前期研究表明, 金属铁与氟尿嘧啶、邻菲罗啉的配合物具有良好的体外抗肿瘤活性, 能抑制多株人癌细胞的增殖。

目的: 检测新型金属铁与氟尿嘧啶、邻菲罗啉配合物 $[\text{Fe}(5\text{-Fu})_2(\text{Phen})\text{SO}_4]$ 的体内抗肿瘤活性及毒性。

方法: 将 40 只昆明小鼠随机分为 4 组, 分别腹腔注射 72, 102.9, 147, 210 mg/kg 的 $[\text{Fe}(5\text{-Fu})_2(\text{Phen})\text{SO}_4]$ 配合物, 检测配合物的半数致死量。建立昆明小鼠 S180 移植性肉瘤模型, 造模后第 2 天随机分 8 组, 分别腹腔注射 $[\text{Fe}(5\text{-Fu})_2(\text{Phen})\text{SO}_4]$ 配合物 15 mg/kg(低剂量组)、 $[\text{Fe}(5\text{-Fu})_2(\text{Phen})\text{SO}_4]$ 配合物 30 mg/kg(中剂量组)、 $[\text{Fe}(5\text{-Fu})_2(\text{Phen})\text{SO}_4]$ 配合物 60 mg/kg(高剂量组)、生理盐水(阴性对照组)、顺铂(阳性对照组)、5-氟尿嘧啶、铁盐与邻菲罗啉, 1 次/d, 连续注射 7 d 后, 检测肉瘤质量、小鼠体质量及主要脏器系数, 以及主要脏器病理组织学变化。

结果与结论: $[\text{Fe}(5\text{-Fu})_2(\text{Phen})\text{SO}_4]$ 配合物的半数致死量为 103.9 mg/kg。与阴性对照组比较, 高剂量组、阳性对照组、5-氟尿嘧啶组可明显抑制肿瘤的生长($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且以高剂量组效果最明显($P < 0.01$)。60 mg/kg $[\text{Fe}(5\text{-Fu})_2(\text{Phen})\text{SO}_4]$ 配合物对肾脏的抑制作用较顺铂弱, 但对小鼠肝脏、脾脏、胸腺的抑制作用较顺铂强, 提示配合物的肾毒性较顺铂低, 但有较强的免疫毒性及肝毒性。

Shi Min, Studying for master's degree, School of Pharmaceutical Science & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming 650500, Yunnan Province, China

关键词:

生物材料; 载体材料; $[\text{Fe}(5\text{-Fu})_2(\text{Phen})\text{SO}_4]$ 配合物; 5-氟尿嘧啶; 邻菲罗啉; 体内抗肿瘤活性; 毒性; 生物无机材料

主题词:

铁; 氟尿嘧啶; 组织工程

基金资助:

云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项项目(2014FB011); 云南省教育厅科学研究基金重点项目(2014Z060)

Corresponding author:

Zhou Yi-ping, Associate professor, School of Pharmaceutical Science & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming 650500, Yunnan Province, China

Antitumor activity and toxicity *in vivo* of iron-fluouracil complex

Shi Min¹, Zhou Yun², Du Xin-e¹, Chen Ying-jie³, Wang Peng¹, Zhong Wen-yuan⁴, Zhou Yi-ping¹ (¹School of Pharmaceutical Science & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming 650500, Yunnan Province, China; ²School of Chemistry, Yunnan Open University, Kunming 650223, Yunnan Province, China; ³Basic Medical College of Kunming Medical University, Kunming 650500, Yunnan Province, China; ⁴Department of Chemistry, Kunming College, Kunming 650000, Yunnan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Previous research indicated that iron-fluorouracil-phenanthroline complex has good antitumor activity *in vitro*, which can inhibit the proliferation of human cancer cells.

OBJECTIVE: To detect the antitumor activity and toxicity of iron-fluouracil-phenanthroline complex, $[\text{Fe}(5\text{-Fu})_2(\text{Phen})\text{SO}_4]$, *in vivo*.

METHODS: A total of 40 Kunming mice were randomly divided into four groups, which were intraperitoneally injected with 72, 102.9, 147, 210 mg/kg $[\text{Fe}(5\text{-Fu})_2(\text{Phen})\text{SO}_4]$ and the half lethal dose of the complex was detected. One day after the establishment of mouse S180 sarcoma models, the model mice were randomly divided into eight groups, and administered with the intraperitoneal injection of 15 mg/kg (low dose group), 30 mg/kg (middle dose group), 60 mg/kg (high dose group) $[\text{Fe}(5\text{-Fu})_2(\text{Phen})\text{SO}_4]$, normal saline (negative control group), cisplatin (positive control group), 5-fluorouracil, iron-salt and phenanthroline, respectively. The injection was done once a day, lasting for 7 days. The weight of sarcomas, body weight, the main organ coefficient and histopathological changes of the main organs were detected.

RESULTS AND CONCLUSION: The half lethal dose of $[\text{Fe}(5\text{-Fu})_2(\text{Phen})\text{SO}_4]$ was 103.9 mg/kg. Compared with the negative control group, high dose group, positive control group and 5-fluorouracil could significantly inhibit the growth of the tumor ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the effect of high dose group was the most obvious ($P < 0.01$). Compared with cisplatin, 60mg/kg $[\text{Fe}(5\text{-Fu})_2(\text{Phen})\text{SO}_4]$ had a weaker inhibitory effect on the kidney, but higher inhibitory effect on the liver, spleen and thymus, indicating the complex has a lower nephrotoxicity, but stronger immunotoxicity and hepatotoxicity than cisplatin.

Subject headings: Iron; Fluorouracil; Tissue Engineering

Funding: the Application Basic Research Joint Project of Yunnan Provincial Science and Technology Department & Kunming Medical University, No. 2014FB011; the Scientific Research Fund of Yunnan Provincial Education Department, No. 2014Z060

Cite this article: Shi M, Zhou Y, Du XE, Chen YJ, Wang P, Zhong WY, Zhou YP. Antitumor activity and toxicity *in vivo* of iron-fluouracil complex. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(12):1779-1786.

Corresponding author:

Zhong Wen-yuan, Professor, Department of Chemistry, Kunming College, Kunming 650000, Yunnan Province, China

0 引言 Introduction

20世纪60年代, 顺铂抗肿瘤作用的发现及临床应用, 开创了金属配合物抗肿瘤药物研究的新领域^[1-3], 自此国内外对金属配合物的研究逐步扩展^[4]。目前国内外在该领域的研究十分活跃, 合成出多种新型铂配合物、稀土配合物、席夫邻菲罗啉碱金属配合物、有机锆配合物、茂钛配合物、金、银、铜配合物、有机锡配合物等

具有抗肿瘤活性的配合物^[5-6], 展示了金属配合物良好的开发前景。

金属配合物的结构简单, 合成线路短, 设备简单, 生产效率高, 药物来源有足够的保证, 极具研发前景。但迄今为止, 应用于临床的只有顺铂及其衍生物, 并且铂类金属药物有较强的肾毒性、神经毒性和胃肠道毒性, 长期服用耐药性明显^[7]。因此进一步扩展抗肿瘤金

属配合物的研究范围, 设计和合成出高效、低毒且克服耐药性的金属抗肿瘤配合物是目前的重要任务。

以目前临床抗肿瘤药物分子作为配体的新型配合物, 是发现新型抗肿瘤药物的新思路。5-氟尿嘧啶是临床上常见的抗肿瘤化疗药物^[8-9]。铁离子具有较强的配位能力^[10], 能与内酯类、琨类、黄酮类、生物碱等多种类型的天然产物形成配合物, 且大多数生成的配合物具有比原天然产物更强的抗肿瘤、抗菌或抗氧化等生物活性^[11-12]。邻菲罗啉是一种能与多种金属形成配合物的有机配体。用金属离子、邻菲罗啉与氟尿嘧啶形成配合物, 产生协同抗癌作用的研究目前尚未见报道。

课题组前期合成了金属铁与5-氟尿嘧啶、邻菲罗啉的配合物 $[\text{Fe}(5\text{-Fu})_2(\text{Phen})\text{SO}_4]$, 经过初步体外抗肿瘤活性筛选, 发现 $[\text{Fe}(5\text{-Fu})_2(\text{Phen})\text{SO}_4]$ 配合物的体外抗肿瘤活性强于5-氟尿嘧啶甚至顺铂。此次实验拟对其体内抗肿瘤活性及毒性进行研究, 探讨其未来成药的可能性。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 观察性实验。

1.2 时间及地点 实验于2014年11月至2015年2月在昆明医科大学药学院暨重点实验室完成。

1.3 材料 $[\text{Fe}(5\text{-Fu})_2(\text{Phen})\text{SO}_4]$ 配合物固体由昆明学院化学系钟文远教授提供(批号: 2014-12-24); 铁盐($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)(西陇化工股份有限公司, 批号: 121207); 5-氟尿嘧啶(上海华联制药公司, 批号: 990420); 邻菲罗啉(上海试剂三厂, 批号: 980611); 顺铂(云南个旧生物药业有限公司, 批号: 130802); 生理盐水(贵州天地药业有限责任公司, 批号: D12040102)。

实验动物: 6-8周龄昆明种小鼠, 雌雄各半, 体重18-24 g, 由昆明楚商科技有限公司提供, 许可证号: SCXK(湘)K2012-0002。

细胞: 小鼠肉瘤S180细胞株由昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室提供。

1.4 实验方法

细胞准备: 复苏保存在液氮中的S180瘤株, 用生理盐水将细胞浓度调整为 $1 \times 10^{11} \text{ L}^{-1}$, 然后将S180细胞悬液接种于小鼠腹腔, 每只0.2 mL, 细胞接种5-7 d小鼠腹腔隆起, 从中抽取腹水瘤细胞, 利用小鼠腹腔繁殖瘤细胞, 将小鼠腹腔内传2代以上的腹水瘤细胞用于实验。

$[\text{Fe}(5\text{-Fu})_2(\text{Phen})\text{SO}_4]$ 配合物的急性毒性实验: 40只昆明小鼠禁食4 h后称质量, 随机分4组, 每组10只, 分别腹腔注射72, 102.9, 147, 210 mg/kg 的 $[\text{Fe}(5\text{-Fu})_2(\text{Phen})\text{SO}_4]$ 配合物, 按0.02 mL/g一次性给药, 给药后立即观察动物反应, 连续观察14 d。采用Bliss法测定半数致死量(LD_{50})^[13-14]。

$[\text{Fe}(5\text{-Fu})_2(\text{Phen})\text{SO}_4]$ 配合物抗小鼠S180移植性肉瘤活性及毒性测试: 取在体内传2代生长良好的小鼠腹水S180细胞, 用生理盐水调成 $8 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ 细胞浓度的瘤细胞悬液, 按0.2 mL/只接种于小鼠右侧腋部皮下^[15-17]。

动物接种瘤细胞的第2天, 禁食4 h后将动物随机分为8组(每组动物数保证 ≥ 9 只), 分别腹腔注射 $[\text{Fe}(5\text{-Fu})_2(\text{Phen})\text{SO}_4]$ 配合物60 mg/kg(2/3 LD_{50} , 高剂量组)、 $[\text{Fe}(5\text{-Fu})_2(\text{Phen})\text{SO}_4]$ 配合物30 mg/kg(1/3 LD_{50} , 中剂量组)、 $[\text{Fe}(5\text{-Fu})_2(\text{Phen})\text{SO}_4]$ 配合物15 mg/kg(1/6 LD_{50} , 低剂量组)、与配合物高剂量等摩尔浓度的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 27.8 mg/kg(铁盐组)、5-氟尿嘧啶26 mg/kg(氟尿嘧啶组)、邻菲罗啉19.8 mg/kg(邻菲罗啉组)、顺铂2 mg/kg(阳性对照组)、生理盐水(阴性对照组)。 $[\text{Fe}(5\text{-Fu})_2(\text{Phen})\text{SO}_4]$ 配合物、顺铂、铁盐、5-氟尿嘧啶、邻菲罗啉均用生理盐水配成溶液, 溶解良好, 按0.02 mL/g腹腔注射给药, 1次/d, 连续给药7 d。

1.5 主要观察指标 停药后观察24 h, 处死动物, 称体质量, 解剖小鼠尸体, 剥离肿瘤组织、心、肝、脾、肺、肾及胸腺, 大体观察各脏器是否异常, 并称各脏器质量。分别取小鼠的肝脏、脾脏和胸腺组织, 固定后通过常规脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、推片、贴片、烤片、脱蜡、苏木精-伊红染色、封固, 光镜观察组织病理变化^[18-20]。

肿瘤抑制率=(阴性对照组平均瘤质量-实验组平均瘤质量)/阴性对照组平均瘤质量 $\times 100\%$,

体质量抑制率=(阴性对照组停药后平均体质量与初体质量比值-实验组停药后平均体质量与初体质量比值)/阴性对照组停药后平均体质量与初体质量比值 $\times 100\%$,

脏器系数(mg/g)=脏器质量/动物体质量^[21-22],

脏器抑制率=(阴性对照组平均脏器系数-治疗组平均脏器系数)/阴性对照组平均脏器系数 $\times 100\%$ 。

1.6 统计学分析 各组实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。应用SPSS 17.0统计软件, 采用方差分析 q 检验进行各实验组间的显著性检验。

2 结果 Results

2.1 [Fe(5-Fu)₂(Phen)SO₄]配合物的急性毒性 给药后72 h动物开始死亡, 死亡高峰出现在给药后5-10 d, 动物在死亡前出现步蹒跚、毛色差、蜷缩现象。

[Fe(5-Fu)₂(Phen)SO₄]配合物经腹腔注射一次性给药后小鼠的死亡情况, 见图1。

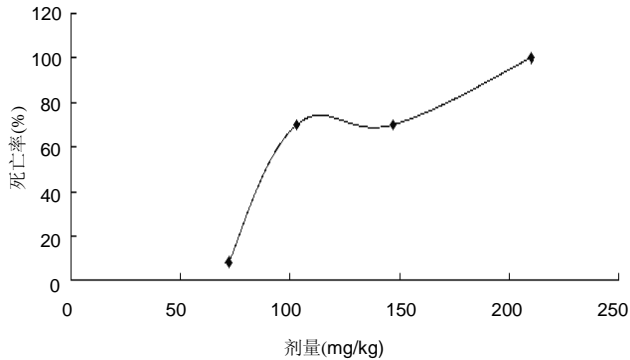


图1 不同剂量[Fe(5-Fu)₂(Phen)SO₄]配合物一次性腹腔注射后小鼠的死亡率

Figure 1 The mortality rate in mice administrated once [Fe(5-Fu)₂(Phen)SO₄] at different doses via intraperitoneal injection

由图看出, 在70-100 mg/kg剂量范围内, [Fe(phen)(5-Fu)₂SO₄]配合物对小鼠的致死率由8.3%迅速升高到70.0%; 在100-210 mg/kg剂量范围内, 致死率由70%平缓升至100%。用Bliss法计算[Fe(phen)(5-Fu)₂SO₄]配合物的半数致死量LD₅₀为103.9 mg/kg, 95%可信限为84.8-124.8 mg/kg。

2.2 [Fe(5-Fu)₂(Phen)SO₄]配合物对小鼠移植性肉瘤(S180)生长的抑制作用 连续给药7 d, 停药1 d后处死荷瘤小鼠, 迅速剥离肿瘤组织, 称量各组小鼠瘤湿质量, 计算抑瘤率, 结果见表1。

从表1可以看出, 与阴性对照组相比, 高剂量配合物和顺铂明显抑制了肿瘤的生长($P < 0.01$), 5-氟尿嘧啶对肿瘤生长也有较强的抑制作用($P < 0.05$); 配合物高剂量对肿瘤生长的抑制作用明显强于3种配体($P < 0.01$); 高剂量配合物对肿瘤生长的抑制作用强于顺铂($P < 0.05$)。

2.3 [Fe(5-Fu)₂(Phen)SO₄]配合物对荷瘤小鼠体质量的影响 见表2。

从表2可以看出, 小鼠体质量抑制率随着[Fe(5-Fu)₂(Phen)SO₄]配合物剂量的增大而增大; 与阴性对照组相比, 顺铂和高剂量配合物对小鼠体质量均有明显的抑制作用($P < 0.01$); 配合物高剂量对小鼠体质量的抑制作用均强于3种配体($P < 0.01$); 高剂量配合物对小鼠体质量的抑制作用强于3组配体和顺铂($P < 0.01$)。

表1 各组荷瘤小鼠肿瘤质量与肿瘤抑瘤率

Table 1 Tumor weight and antitumor rate in tumor-bearing mice of different groups

组别	动物数		肿瘤质量($\bar{x} \pm s$, g)	肿瘤抑瘤率(%)
	开始	最后		
阴性对照组	11	11	1.72±0.28	-
阳性对照组	11	11	0.75±0.15 ^b	56.4
高剂量组	9	8	0.08±0.02 ^{bcdef}	95.4
中剂量组	9	8	1.76±0.60	-2.3
低剂量组	9	9	1.73±0.51	-0.6
铁盐组	9	8	1.65±0.82	4.1
氟尿嘧啶组	10	10	1.16±0.33 ^a	32.6
邻菲罗啉组	9	7	1.62±0.76	5.8

表注: 与阴性对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与阳性对照组比较, ^c $P < 0.05$; 与铁盐组比较, ^d $P < 0.01$; 与氟尿嘧啶组比较, ^e $P < 0.01$; 与邻菲罗啉组比较, ^f $P < 0.01$ 。

2.4 [Fe(5-Fu)₂(Phen)SO₄]配合物对荷瘤小鼠心、肝、脾、肺、肾、胸腺系数的影响 见表3-5。

从表3可以看出, 与阴性对照组相比, 高剂量配合物和邻菲罗啉使小鼠心脏系数增大($P < 0.01$, $P < 0.05$); 顺铂和高剂量配合物使小鼠肺脏系数增大($P < 0.05$, $P < 0.01$); 其余各组对小鼠心脏系数和肺脏系数的影响均不大。

从表4可以看出, 配合物对肝脏系数的抑制率随着剂量的增大而增大。与阴性对照组相比, 高剂量配合物、中剂量配合物、顺铂、5-氟尿嘧啶和邻菲罗啉对小鼠肝脏有明显的抑制作用($P < 0.01$), 中剂量配合物、顺铂、铁盐和5-氟尿嘧啶对小鼠肾脏有明显的抑制作用($P < 0.01$), 低剂量配合物对小鼠肝脏和肾脏有一定的抑制作用($P < 0.05$); 高剂量配合物对小鼠肝脏的抑制作用强于3种配体($P < 0.01$); 高剂量配合物对小鼠肝脏的抑制作用强于顺铂($P < 0.01$), 对小鼠肾脏的抑制作用弱于顺铂($P < 0.01$)。

从表5可以看出, 配合物对小鼠脾脏和胸腺系数的抑制率随着剂量的增大而增大。与阴性对照组相比, 高剂量配合物、中剂量配合物对小鼠脾脏和胸腺有明显的抑制作用($P < 0.01$), 低剂量配合物对小鼠胸腺有明显的抑制作用($P < 0.01$), 顺铂和5-氟尿嘧啶对小鼠脾脏和胸腺也有明显的抑制作用($P < 0.01$); 高剂量配合物对小鼠脾脏的抑制作用强于3种配体($P < 0.01$), 对小鼠胸腺的抑制作用强于铁盐($P < 0.01$)和邻菲罗啉($P < 0.01$); 高剂量配合物对小鼠胸腺的抑制作用强于顺铂($P < 0.05$)。

表2 各组荷瘤小鼠体质量的变化

Table 2 Changes in the body weight of tumor-bearing mice

组别	动物数		初体质量($\bar{x}\pm s$, g)	末体质量($\bar{x}\pm s$, g)	末体质量/初体质量($\bar{x}\pm s$)	抑制率(%)
	开始	最后				
阴性对照组	11	11	22.81±2.16	28.68±2.85	1.26±0.10	–
阳性对照组	11	11	22.34±1.11	21.76±2.52	0.97±0.09 ^a	23
高剂量组	9	8	22.09±2.15	16.63±2.21	0.75±0.08 ^{abcde}	40.5
中剂量组	9	8	22.13±1.25	27.67±1.94	1.25±0.05	0.8
低剂量组	9	9	22.00±1.42	27.99±3.35	1.27±0.08	–0.8
铁盐组	9	8	22.52±1.35	28.59±3.32	1.27±0.11	–0.8
氟尿嘧啶组	10	10	22.63±1.11	27.47±1.35	1.22±0.06	3.2
邻菲罗啉组	9	7	22.38±1.17	28.09±2.46	1.25±0.08	0.8

表注: 与阴性对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与阳性对照组比较, ^b $P < 0.01$; 与铁盐组比较, ^c $P < 0.01$; 与氟尿嘧啶组比较, ^d $P < 0.01$; 与邻菲罗啉组比较, ^e $P < 0.01$ 。

表3 各组荷瘤小鼠心脏系数和肺脏系数

Table 3 The heart and lung coefficients in tumor-bearing mice

组别	心脏系数($\bar{x}\pm s$, mg/g)	心脏抑制率(%)	肺脏系数($\bar{x}\pm s$, mg/g)	肺脏抑制率(%)
阴性对照组	4.67±0.76	–	7.50±0.82	–
阳性对照组	4.67±0.39	0.1	8.40±1.71 ^b	–12.0
高剂量组	5.75±0.50 ^a	–23.0	8.83±0.71 ^a	–17.7
中剂量组	4.75±0.57	–1.6	7.11±1.02	5.2
低剂量组	4.42±0.63	5.4	7.29±0.89	2.8
铁盐组	4.71±0.46	–0.9	7.34±0.97	2.1
氟尿嘧啶组	4.53±0.48	3.1	7.02±0.38	6.4
邻菲罗啉组	5.25±0.80 ^b	–12.3	6.92±0.58	7.8

表注: 与阴性对照组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$ 。

表4 各组荷瘤小鼠肝脏系数和肾脏系数

Table 4 The liver and kidney coefficients in tumor-bearing mice

组别	肝脏系数($\bar{x}\pm s$, mg/g)	肝脏抑制率(%)	肾脏系数($\bar{x}\pm s$, mg/g)	肾脏抑制率(%)
阴性对照组	74.84±10.16	–	14.66±1.31	–
阳性对照组	61.26±5.16 ^b	18.1	11.65±1.24 ^b	20.5
高剂量组	51.30±3.29 ^{bcd^{ef}}	31.5	14.11±1.92 ^c	3.7
中剂量组	65.29±7.69 ^b	12.8	12.38±1.26 ^b	15.5
低剂量组	67.18±2.78 ^a	10.2	13.16±1.89 ^a	10.2
铁盐组	69.72±8.50	6.8	12.88±1.37 ^b	12.1
氟尿嘧啶组	64.28±4.04 ^b	14.1	12.88±1.47 ^b	12.1
邻菲罗啉组	65.72±5.83 ^b	12.2	13.37±1.03	8.8

表注: 与阴性对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与阳性对照组比较, ^c $P < 0.01$; 与铁盐组比较, ^d $P < 0.01$; 与氟尿嘧啶组比较, ^e $P < 0.01$; 与邻菲罗啉组比较, ^f $P < 0.01$ 。

2.5 主要脏器病理切片观察 小鼠肝脏、脾脏和胸腺组织的石蜡切片、苏木精-伊红染色的形态学观察结果, 见图2。阴性对照组小鼠肝脏组织中大面积散在核碎屑, 局部见碎裂细胞核, 大面积核周空泡, 核大颜色深且核

浓缩(图2A); 高剂量组小鼠肝脏组织中中央静脉周围细胞核周空泡, 浓缩核较少, 核仁清晰(图2B), 表明高剂量配合物对小鼠肝脏的损伤程度比阴性对照组小。阴性对照组小鼠脾脏组织中红白髓分界不清, 淋巴细胞增生

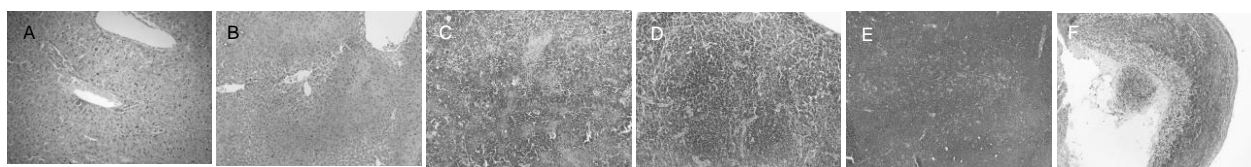


图2 阴性对照组与高剂量组小鼠肝脏、脾脏和胸腺组织切片形态学观察(苏木精-伊红染色, $\times 200$)

Figure 2 The morphology of liver, spleen and thymus sections of sacroma bearing mice (hematoxylin-eosin, $\times 200$)

图注: 图中 A、C、E 分别为阴性对照组小鼠肝脏组织、脾脏组织与胸腺组织, B、D、F 分别为高剂量组小鼠肝脏组织、脾脏组织与胸腺组织。与阴性对照组比较, 高剂量组小鼠脾脏和胸腺萎缩明显。

表5 各组荷瘤小鼠脾脏系数和胸腺系数

Table 5 The spleen and thymus coefficients in tumor-bearing mice

组别	脾脏系数($\bar{x}\pm s$, mg/g)	脾脏抑制率(%)	胸腺系数($\bar{x}\pm s$, mg/g)	胸腺抑制率(%)
阴性对照组	9.94 \pm 1.43	-	4.35 \pm 1.26	-
阳性对照组	3.36 \pm 0.94 ^a	66.2	1.57 \pm 0.84 ^a	63.9
高剂量组	2.15 \pm 0.76 ^{acde}	78.4	0.47 \pm 0.25 ^{abcde}	89.1
中剂量组	6.69 \pm 1.74 ^a	32.7	1.16 \pm 0.56 ^a	73.2
低剂量组	9.54 \pm 1.85	4.0	2.56 \pm 0.82 ^a	41.3
铁盐组	8.62 \pm 2.36	13.4	3.75 \pm 1.51	13.8
氟尿嘧啶组	6.77 \pm 1.72 ^a	31.9	1.32 \pm 0.36 ^a	69.7
邻菲罗啉组	9.00 \pm 1.19	9.5	3.92 \pm 1.00	9.9

表注: 与阴性对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与阳性对照组比较, ^b $P < 0.05$; 与铁盐组比较, ^c $P < 0.01$; 与氟尿嘧啶组比较, ^d $P < 0.01$; 与邻菲罗啉组比较, ^e $P < 0.01$ 。

明显, 核深染, 细胞核胞浆少, 星空明显(图2C); 高剂量组小鼠脾脏组织中红髓内有核细胞数量下降明显, 致使整个红髓内无核红细胞占据了大量区域, 白髓生发中心有缩小趋势, 未见星空, 脾脏萎缩(图2D)。阴性对照组小鼠胸腺组织中皮质、髓质分界不清, 淋巴细胞增生明显(图2E); 高剂量组小鼠胸腺组织中两侧包膜部细胞急剧减少, 可清楚看见细胞间间隙, 整个细胞所占视野面积不到阴性对照组的1/3, 胸腺萎缩明显(图2F)。高剂量配合物导致小鼠脾脏和胸腺萎缩, 表明它对小鼠的免疫器官脾脏和胸腺有严重的损伤。

3 讨论 Discussion

前期研究表明 $[\text{Fe}(5\text{-Fu})_2(\text{Phen})\text{SO}_4]$ 配合物具有良好的体外抗肿瘤活性, 能抑制多株人癌细胞的增殖^[23]。本实验用小鼠移植性肉瘤模型评价受试样品的体内抗肿瘤活性。实验结果表明, 高剂量 $[\text{Fe}(5\text{-Fu})_2(\text{Phen})\text{SO}_4]$ 配合物明显地抑制了肿瘤的生长, 抑瘤率高达 95.4%, 说明 $[\text{Fe}(5\text{-Fu})_2(\text{Phen})\text{SO}_4]$ 配合物具有较好的体内抗肿瘤作用。本实验在对 $[\text{Fe}(5\text{-Fu})_2(\text{Phen})\text{SO}_4]$ 药效学的试验设计中, 引入了一些基本的毒理学评价指标, 如观察样品对荷瘤小鼠瘤重影响的同时, 还初步了解样品对小鼠体质量及主要脏器的影响, 以期利用少量的动物获得

更多指标对样品的有效性及安全性进行客观及完整的评价^[24-25]。

脏器系数是衡量药物对动物脏器影响程度的常用指标, 在一定程度上也反映了药物的毒副作用。在肿瘤治疗中, 肿瘤的发生、生长和免疫有着非常重要的关系^[26]。

胸腺和脾脏是主要的免疫器官, 直接影响机体的免疫功能^[27-39]。高剂量配合物对小鼠脾脏系数和胸腺系数抑制率分别为 78.4%和 89.1%, 表明高剂量配合物对小鼠的免疫器官脾脏和胸腺均有严重损伤, 病理切片的结果也显示脾脏和胸腺明显萎缩且结构紊乱, 提示高剂量配合物严重损伤了荷瘤小鼠的免疫系统。高剂量配合物对小鼠的心脏系数和肺脏系数的抑制率为负值, 可能是因为高剂量对小鼠的体质量有明显的抑制作用, 使体质量减轻, 而导致心脏和肺脏系数增大。高剂量配合物对小鼠肝脏系数的抑制率为 31.5%, 明显强于顺铂($P < 0.01$), 说明高剂量配合物对小鼠的肝脏有较强的抑制作用。对阴性对照组荷瘤小鼠的肝组织切片观察发现: 存在肝组织损伤的形态。虽然高剂量配合物对肝脏系数有较强的抑制作用, 但它对肿瘤细胞有明显的抑制作用, 能够抑制肿瘤细胞的生长, 减少肿瘤细胞对机体的损伤, 因此它对肝组织损伤的程度比阴性对照组小。高剂量配合物对小鼠肾脏系数的抑制率明显低于顺铂($P <$

0.01), 说明配合物高剂量的肾毒性比顺铂小。高剂量配合物的抗肿瘤作用明显优于顺铂, 对肾脏的抑制作用比顺铂小, 但对小鼠肝脏、脾脏、胸腺的抑制作用比顺铂大, 提示配合物的肾毒性较顺铂低, 但有较强的免疫毒性及肝毒性。

高剂量配合物对小鼠肿瘤生长、小鼠体质量、肝脏、脾脏的抑制作用强于 3 种配体, 差异有非常显著性意义 ($P < 0.01$), 对胸腺的抑制作用强于铁盐 ($P < 0.01$) 和邻菲罗啉 ($P < 0.01$); 配体铁盐对小鼠肿瘤生长及各脏器均没有明显的抑制作用; 配体 5-氟尿嘧啶对小鼠肿瘤生长有一定的抑制作用 ($P < 0.05$), 对小鼠肝脏、肾脏、脾脏和胸腺有明显的抑制作用 ($P < 0.01$); 配体邻菲罗啉除了对肝脏有一定抑制作用外, 对肿瘤生长及各脏器均无明显的抑制作用。

实验中发现, 与配合物高剂量等摩尔浓度的铁盐、5-氟尿嘧啶和邻菲罗啉混合后对小鼠腹腔注射, 导致 10 只受试动物立即死亡, 而高剂量组在整个实验中仅致 1 只小鼠死亡, 说明合成的配合物降低了 3 种配体混合的毒性。研究表明配合物的合成, 使配体形成了协同的抗肿瘤活性, 但同时也增强了免疫毒性及肝毒性。未来, 将就配合物的作用机制进行研究, 必要时对其进行结构改造, 进一步探讨这类金属氟尿嘧啶配合物成药的可能性。

感谢: 感谢昆明医科大学基础医学院实验中心凌亚伟老师制做了组织切片。

作者贡献: 周轶平、钟文远进行实验设计, 实验实施为施敏、杜馨娥、王鹏, 实验评估为陈英杰, 资料收集为周云, 施敏成文, 周轶平审核。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 实验过程中对动物的处置符合伦理学要求, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 本刊实行双盲外审制度, 文章经国内小同行外审专家审核, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Rosenberg B, VanCamp L, Trosko JE, et al. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature*. 1969;222:385-386.
- [2] Frezza M, Hindo S, Chen D, et al. Novel Metals and Metal Complexes as Platforms for Cancer Therapy. *Curr Pharm Des*. 2010;16(16):1813-1825.
- [3] Jungwirth U, Kowol CR, Keppler BK, et al. Anticancer Activity of Metal Complexes: Involvement of Redox Processes. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(4): 1085-1127.
- [4] 李燕红, 吴娟, 徐宁志, 等. 新型抗肿瘤药物研究进展[J]. 武警医学, 2011, 10(22):901-903.
- [5] Daniel KG, Chen D, Orlu S, et al. Clioquinol and pyrrolidine dithiocarbamate complex with copper to form proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res*. 2005; 7:R897-908.
- [6] Muhammad N, Guo Z. Metal-based anticancer chemotherapeutic agents. *Curr Opin Chem Biol*. 2014;19C:144-153.
- [7] 祝兴勇, 尤启冬, 张文萍, 等. 铂(II)类抗肿瘤药物[J]. 化学进展, 2008, 9(20):1324-1332.
- [8] Mazzaferro S, Bouchemal K, Ponchel G. Oral delivery of anticancer drugs II: the prodrug strategy. *Drug Discov Today*. 2013;18(1-2):93-98.
- [9] Prachayasittikul V, Pingaew R, Nantasenamat C, et al. Investigation of aromatase inhibitory activity of metal complexes of 8-hydroxyquinoline and uracil derivatives. *Drug Des Dev Ther*. 2014;8:1089-1096.
- [10] Fatfat M, Merhi RA, Rahal O, et al. Copper chelation selectively kills colon cancer cells through redox cycling and generation of reactive oxygen species. *BMC Cancer*. 2014;14:527.
- [11] 蔡放, 江仁望. 天然产物的金属铜配合物研究进展[J]. 亚太传统医药, 2011, 7(6):163-168.
- [12] 牟永平, 吴刚, 周立社, 等. 抗肿瘤金属配合物及其药理作用的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2007, 23(11): 1409-1413.
- [13] 黎七雄, 汪晖, 肖清秋, 等. 半数致死量(LD50)Bliss法的评价及计算[J]. 数理医药学杂志, 1995, 8(4):318-320.
- [14] 姜晓东, 阎政礼, 周桂凤. R程序在Bliss法计算半数致死量中的运用[J]. 实用预防医学, 2011, 18(3):431-432.
- [15] Cui BK, Liu S, Li SH, et al. Effect of Tea Polyphenol on Oxidative Injury in S180 Cells Induced Hepatocarcinoma Mice. *Int J Mol Sci*. 2012;13:5571-5583.
- [16] 冯浩丽, 高建平. 党参多糖体内抗肿瘤活性研究及急性毒性实验[J]. 山西中医, 2012, 28(8):49-50.
- [17] 朱坤杰, 宋娟, 沈云虹, 等. 库拉索芦荟多糖和木立芦荟多糖体内抗肿瘤作用[J]. 中成药, 2010, 11(32):1978-1980.

- [18] Aikemu A, Umar A, Yusup A, et al. Immunomodulatory and antitumor effects of abnormal Savda Munziq on S180 tumour-bearing mice. *BMC Complem Altern M.* 2012;12:157.
- [19] 孙燕,王俊平,苏龙,等.黄连解毒汤对小鼠S180移植性肿瘤的抑制作用[J].东北农业大学学报,2013,44(9):63-67.
- [20] 赵凤丽,袁野,孙婷婷,等.人参皂苷结构修饰物HRG的体内抗肿瘤活性研究[J].中国药理学杂志, 2012,20(47):1625-1629.
- [21] Zhang Y, Xiao Y, Wang P, et al. Compositions and Anti-Tumor Activity of Pyropolyporus fomentarius Petroleum Ether Fraction In Vitro and In Vivo. *PLoS One.*2014;9(10): e109599.
- [22] 覃华,张琰,韩艳,等.穿心莲内酯对S180小鼠体内抗肿瘤作用的研究[J].科学技术与工程, 2010,10(28):6971-6874.
- [23] 周轶平,陈元晓,周云,等.铜、铁、锌-氟尿嘧啶配合物合成及其对肿瘤细胞增殖的抑制[J].中国组织工程研究, 2014,18(39):6309-6315.
- [24] 沈建忠.动物毒理学[M].北京:中国农业出版社,2002.
- [25] 李寿祺.动物毒理学原理与方法[M].成都:四川大学出版社,2003.
- [26] Yuan HM, Song JM, Li XG, et al. Enhanced immunostimulatory and antitumor activity of different derivatives of k-carrageenan oligosaccharides from *Kappaphycus striatum*. *J Appl Phycol.* 2011;23:59-65.
- [27] Alexander M, Steffen J. Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity.* 2014;40(5):642-656.
- [28] Liu RM, Zhang XJ, Liang GY, et al. Antitumor and antimetastatic activities of chloroform extract of medicinal mushroom *Cordyceps taii* in mouse models. *BMC Complem Altern M.* 2015;15:216.
- [29] Liu RM, Zhang XJ, Liang GY, et al. Erratum to: 'Antitumor and antimetastatic activities of chloroform extract of medicinal mushroom *Cordyceps taii* in mouse models'. *BMC Complement Altern Med.* 2015; 15:284.
- [30] Schneider T, Ehrig K, Liewert I, et al. Interference with the CXCL12/CXCR4 axis as potential antitumor strategy: superiority of a sulfated galactofucan from the brown alga *Saccharina latissima* and fucoidan over heparins. *Glycobiology.* 2015;25(8):812-824.
- [31] Abu N, Mohamed NE, Yeap SK, et al. In vivo antitumor and antimetastatic effects of flavokawain B in 4T1 breast cancer cell-challenged mice. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:1401-1417.
- [32] Bastian A, Thorpe JE, Disch BC, et al. A small molecule with anticancer and antimetastatic activities induces rapid mitochondrial-associated necrosis in breast cancer. *J Pharmacol Exp Ther.*2015;353(2):392-404.
- [33] Schmieler R, Hoffmann J, Becker M, et al. Regorafenib (BAY 73-4506): antitumor and antimetastatic activities in preclinical models of colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2014;135(6): 1487-9146.
- [34] Shin Y, Kim GD, Jeon JE, et al. Antimetastatic effect of halichondramide, a trisoxazole macrolide from the marine sponge *Chondrosia corticata*, on human prostate cancer cells via modulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *Mar Drugs.* 2013;11(7):2472-2485.
- [35] Gangjee A, Namjoshi OA, Yu J, et al. N2-Trimethylacetyl substituted and unsubstituted-N4-phenylsubstituted-6-(2-pyridin-2-ylethyl)-7H-pyrrolo [2,3-d]pyrimidine-2,4-diamines: design, cellular receptor tyrosine kinase inhibitory activities and in vivo evaluation as antiangiogenic, antimetastatic and antitumor agents. *Bioorg Med Chem.* 2013;21(5): 1312-1323.
- [36] Sun T, Chen QY, Wu LJ, et al. Antitumor and antimetastatic activities of grape skin polyphenols in a murine model of breast cancer. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(10):3462-3467.
- [37] Alam A, Blanc I, Gueguen-Dorbes G, et al. SAR131675, a potent and selective VEGFR-3-TK inhibitor with antilymphangiogenic, antitumoral, and antimetastatic activities. *Mol Cancer Ther.* 2012;11(8):1637-1649.
- [38] Zhou L, Du L, Chen X, et al. The antitumor and antimetastatic effects of N-trimethyl chitosan-encapsulated camptothecin on ovarian cancer with minimal side effects. *Oncol Rep.* 2010; 24(4): 941-948.
- [39] Zhu H, Liu XW, Cai TY, et al. Celastrol acts as a potent antimetastatic agent targeting beta1 integrin and inhibiting cell-extracellular matrix adhesion, in part via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010;334(2):489-499.