

• 药学 •

胃癌治疗候选新药 GX1-rmhTNF α 一般药理学研究 *薛晓静 白玉赞 吴开春[△] 樊代明

(第四军医大学西京消化病医院 陕西 西安 710032)

摘要 目的 通过研究 GX1-rmhTNF α 对动物重要生命功能的影响,观察其主要药效学以外的药理作用,为临床研究和安全用药提供信息。方法 分别取大鼠、小鼠肌肉注射,测试 GX1-rmhTNF α 对动物中枢神经系统、心血管系统、呼吸系统的影响。结果: GX1-rmhTNF α 三个剂量组对动物中枢神经系统、呼吸系统、心血管系统无明显影响,与生理盐水对照组比较 $P>0.05$ 。结论:在本实验中, GX1-rmhTNF α 对小鼠的中枢神经系统无明显影响,对大鼠呼吸系统、心血管系统无显著性影响,提示其不良反应小。

关键词 GX1-rmhTNF α ;一般药理学

中图分类号 R735.2 R965 文献标识码 A 文章编号 :1673-6273(2011)09-1775-04

General Pharmacology of GX1-rmhTNF α : A Drug Candidate
for Gastric Cancer*XUE Xiao-jing, BAI Yu-yun, WU Kai-chun[△], FAN Dai-ming

(Digestion Hospital of Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT Objective: To determine the effect of GX1-rmhTNF α to the vital organs or systems the functions of are acutely critical for life, identify undesirable pharmacodynamic properties of them, to observe the general pharmacology of polysaccharides from GX1-rmhTNF α except the main pharmacodynamics, and then provided the experimental basis for human safety. **Methods:** Mice given GX1-rmhTNF α for injection respectively by tail iv were determined the influence on cardiovascular, respiratory and central nervous system of animals. **Results:** The spontaneous activity and coordinated movement and pentobarbital sodium-induced hypnosis in mice were not obviously affected by the 3 doses of GX1-rmhTNF α injection. The blood pressure and heart rate and respiratory system in mice had no obvious difference by the 3 doses of GX1-rmhTNF α injection ($P>0.05$). **Conclusion:** The drug had no effects on nervous, cardiovascular and respiratory systems of the animals. It exerted that the systematic side of GX1-rmhTNF α is little.

Key words: GX1-rmhTNF α ; General pharmacology

Chinese Library Classification: R735.2, R965 Document code: A

Article ID:1673-6273(2011)09-1775-04

前言

GX1-rmhTNF α 融合蛋白是利用基因重组技术制备的一种高效低毒的抗胃癌新生血管形成的药物^[1]。本文研究了此融合蛋白在治疗范围内或治疗范围以上的剂量时对动物中枢神经系统、心血管系统、呼吸系统等的的影响。为临床研究和安全用药提供信息,也为长期毒性实验设计提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

药物:冻干重组 GX1-rmhTNF α 用生理盐水稀释成所需浓度;动物:Balb/c 小鼠,4 周龄,质量约为 17-20g,雌雄各半;SD 大鼠,5 周龄,质量约为 180-200g,均购自第四军医大学实验动物中心;仪器:台式称重计 RM26200 型多道生理信号采

集系统,成都仪器厂和日本光电株式会社联合生产。

1.2 方法

1.2.1 对中枢神经系统影响的实验

(1)GX1-rmhTNF α 对小鼠一般行为活动的影响 取 Balb/c 小鼠 40 只(雌雄各半),随即分为 4 组,每组 10 只,低剂量组 0.25mg/kg,中剂量 0.5mg/kg,高剂量 1.0mg/kg,溶剂对照组为生理盐水,均肌肉注射给药,观察给药后各组小鼠的一般行为表现,步态、流涎、肌颤等情况。连续观察 7 天。

(2)对戊巴比妥钠阈剂量致小鼠睡眠时间的影响 取小鼠 40 只(雌雄各半),分组及给药同 2.1.1 项,给药 30min 后,各组小鼠均腹腔注射阈剂量戊巴比妥钠(50mg/kg),至翻正反射消失为入睡时间,从翻正反射消失至恢复时间为睡眠持续时间。观察并记录其数值。用组间 t 检验比较各用药组与对照组差异的显著性。

* 基金项目:创新药物研究开发(2009ZX09103) 国家 863 计划(2006AA02Z103 2006AA02A402);

军队重点项目(06G087) 国家自然科学基金重大项目(81090270,81090273)

作者简介:薛晓静(1984-),女,第四军医大学西京消化病医院消化内科硕士

[△]通讯作者:吴开春,男,博士生导师,长江学者特聘教授,西京消化病医院副院长 E-mail: kaicwu@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2011-01-05 接受日期:2011-01-28)

(3)对戊巴比妥钠阈下剂量致小鼠睡眠时间的影响 取小鼠 40 只(雌雄各半) ,分组及给药同 2.2.1 项 ,给药 30min 后 ,各组小鼠均腹腔注射阈剂量戊巴比妥钠(25mg/kg) ,小鼠翻正反射消失达 1min 以上为睡眠。观察药后 30min 小鼠睡眠数。用 X² 检验判断组间比较差异的显著性。

(4)对小鼠协调机能的影响 取小鼠 50 只(雌雄各半) ,随机均分为 5 组 :NS 对照组 ,氯丙嗪组 10mg/kg ,GX1-rmhTNFα 注射组(0.25mg/kg, 0.5mg/kg, 1.0mg/kg) 。单次肌肉注射给药 ,于给药后 30 ,60 ,90 ,120min ,将小鼠放置于倾斜 60 度光滑木板上 ,测定其 30s 内跌下动物数(放 3 次跌 2 次为阳性)。

1.2.2 对麻醉大鼠呼吸系统及心血管系统的影响

取 SD 大鼠 24 只(雌雄各半) ,随机分为 4 组 :NS 对照组 ,GX1-rmhTNFα 高、中、低 3 个剂量组。实验时用 1%戊巴比妥钠 40mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠 ,将大鼠仰位固定于木板上 ,颈总动脉插管 ,通过压力换能器 ,观察记录收缩压 ,舒张压。通过

呼吸换能器 ,观察记录呼吸频率 ,通过多功能信号处理器输入到计算机 ,由计算机自动采样处理。待血压、心电、呼吸的波动曲线稳定后肌肉给药 ,记录给药前及后 15 ,30 ,60 ,120 ,180min 各指标变化。

2 结果

2.1 对中枢神经系统的影响

2.1.1 对小鼠一般行为表现的影响 给药各组小鼠的一般行为正常 ,瞳孔 ,姿势 ,步态等均正常 ,亦未见惊厥 ,呼吸困难 ,流涎 ,肌颤等现象 ,反应情况与对照组小鼠相似 ,表明本品对小鼠一般行为表现无明显影响。

2.1.2 对戊巴比妥钠阈剂量致小鼠睡眠时间的影响 用药组与对照组小鼠睡眠时间比较差别无显著意义(P>0.05)。结果见表 1。

表 1 GX1-rmhTNFα 对小鼠阈剂量戊巴比妥钠催眠作用的影响(n=10, min, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 GX1-rmhTNFα effects on the pentobarbital-induced hypnosis

Group		Latent period of sleep	Duration of sleep
Control		3.58± 0.58	37.34± 2.72
GX1-rmhTNFα	0.25mg/kg	3.90± 0.65	38.36± 2.20
	0.5mg/kg	3.47± 0.63	37.54± 2.32
	1.0mg/kg	3.46± 0.55	40.86± 2.25

Note: P >0.05 vs control group

2.1.3 对小鼠戊巴比妥钠阈下剂量催眠的协同作用 结果见表 2 3 个剂量组入睡个数与对照组比较差别无显著意义(P>0.05)。

提示 GX1-rmhTNFα 对戊巴比妥钠阈下剂量致小鼠催眠没有协同作用。

表 2 对小鼠戊巴比妥钠阈下剂量催眠的协同作用(n=10, min, $\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of GX1-rmhTNF on subthreshold-dose pentobarbital sodium-induced hypnosis in mice

Group		Fall asleep	Percentage
Control		2	20%
GX1-rmhTNFα	0.25mg/kg	1	10%
	0.5mg/kg	1	10%
	1.0mg/kg	2	20%

Note: P >0.05 vs control group

2.1.4 对小鼠协调机能的影响 各剂量组对小鼠协调运行无明显影响 ,用药组和对照组跌落数量无明显差别。阳性对照组小

鼠只有一只未跌落。结果见表 3。

表 3 GX1-rmhTNFα 对小鼠协调机能的影响(n=10)

Table 3 GX1-rmhTNFα effects on coordinated movements of mice

Group		Fall(3min)
NS		1
GX1-rmhTNFα	0.25mg/kg	2
	0.5mg/kg	1
	1.0mg/kg	0
Positive control	10mg/kg	9

2.2 对麻醉大鼠呼吸系统及心血管系统的影响

明显影响 ,与对照组比较其差别均无显著意义(P > 0.05)。结果

2.2.1 对大鼠血压的影响 与给药前比较 ,GX1-rmhTNFα 三个 见表 4 5。

剂量组在用药前和用药后各时间点对舒张压和收缩压均未见

表 4 GX1-rmhTNFα 对麻醉大鼠收缩压的影响(n=6, $\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of GX1-rmhTNFα injection on blood pressure of mice

Times	mmHg			
	NS	Maximal	Medium	Minimal
Before injection	117.06± 7.61	116.67± 6.84	114.47± 5.82	119.65± 3.81
After injection 30min	118.38± 7.42	118.45± 3.44	120.79± 4.53	121.62± 5.97
60min	116.51± 4.21	121.09± 2.88	115.27± 7.52	120.18± 5.04
120min	118.44± 2.69	116.95± 5.73	116.58± 5.71	118.40± 8.31
180min	118.75± 3.31	118.46± 4.87	118.98± 8.88	120.43± 4.46

P >0.05 vs control group

表 5 GX1-rmhTNFα 对麻醉大鼠舒张压的影响(n=6, $\bar{x} \pm s$)

Table 5 Effect of GX1-rmhTNFα injection on blood pressure of mice

Times	mmHg			
	NS	Maximal	Medium	Minimal
Before injection	78.72± 5.42	76.28± 6.43	74.00± 5.62	80.43± 2.84
After injection 30min	78.95± 6.70	78.98± 4.38	81.34± 5.54	77.54± 6.89
60min	74.45± 5.70	80.72± 5.84	76.80± 7.12	80.87± 6.14
120min	77.53± 5.99	77.90± 3.66	77.01± 4.99	83.35± 5.24
180min	79.74± 5.18	76.61± 3.61	79.73± 5.08	79.45± 6.00

Note: P >0.05 vs control group

2.2.2 对大鼠呼吸的影响 与给药前比较 ,GX1-rmhTNFα 三个 影响(P > 0.05)。见表 6。

剂量组在用药前和用药后各时间点对大鼠呼吸频率未见明显

表 6 GX1-rmhTNFα 对麻醉大鼠呼吸频率的影响(n=6, 次 / 分, $\bar{x} \pm s$)

Table 6 Effect of GX1-rmhTNFα injection on the respiratory frequency of mice

Times	NS	Maximal	Medium	Minimal
Before injection	91.00± 9.47	88.67± 6.56	93.50± 8.50	84.33± 5.65
After injection 30min	96.17± 7.28	94.17± 5.15	100.83± 6.74	90.17± 7.33
60min	93.33± 7.79	90.50± 5.24	96.50± 6.09	89.00± 2.61
120min	96.33± 7.66	89.17± 6.01	94.67± 6.47	89.33± 5.20
180min	93.50± 10.09	88.50± 4.89	95.50± 7.20	88.50± 3.78

Note: P >0.05 vs control group

2.2.3 对大鼠心率的影响

药后各时间点对大鼠心率未见明显影响(P > 0.05)。见表 7。

与给药前比较 ,GX1-rmhTNFα 三个剂量组在用药前和用

表 7 GX1-rmhTNFα 对麻醉大鼠心率的影响(n=6,次 / 分, $\bar{x} \pm s$)

Table 7 Effect of GX1-rmhTNFα injection on the heart rate of mice

Times	NS	Maximal	Medium	Minimal
Before injection	356.83± 40.71	338.33± 31.60	329.67± 47.77	381.67± 40.71
After injection 30min	364.83± 43.87	346.50± 30.45	341.17± 44.70	388.33± 38.02
60min	361.33± 42.29	347.00± 33.18	337.33± 43.43	382.33± 33.67
120min	358.17± 45.12	342.17± 34.18	334.83± 45.67	384.67± 37.16
180min	359.33± 43.35	344.00± 31.70	333.67± 47.13	382.50± 37.56

Note: P >0.05 vs control group

3 讨论

胃癌是临床上我们最常见到的消化道恶性肿瘤之一,对人们的生命和健康造成严重危害,传统的手术、放、化疗等都是基于直接攻击和消灭肿瘤本身,由于肿瘤细胞基因异质性高,易突变,往往难以达到满意的疗效。肿瘤血管抑制治疗是近年肿瘤治疗研究领域的一个热点^[2-6]。

GX1-rmhTNF α 是一种高效低毒的抗胃癌新生血管形成的药物。通过体内分布及对其作用机制的研究,发现GX1-rmhTNF α 能够靶向入荷瘤裸鼠肿瘤血管内皮上,引起肿瘤血管内皮细胞凋亡,从而增加肿瘤血管间隙,使更多的药物进入肿瘤组织,抑制肿瘤生长^[7]。新药的安全性问题是新药淘汰率高的关键原因^[8],为全面地了解该药的作用范围和特点,以便对它作出正确的评价,按国家新药临床前研究的指导原则,我们设计了本实验。

一般药理学研究是指观察主要药效学以外的药理作用,主要观察神经系统、呼吸系统、心血管系统三个方面,通过一般药理学研究,可以确定受试物非期望出现药物效应的情况,它可能关系到人的安全性,评价受试物在毒理学和/或临床研究中观察到的药物不良反应和/或病理生理作用,研究所观察到的和/或推测的药物不良反应机制。通过一般药理学研究,可为长期毒性试验设计提供参考,为临床研究和安全用药提供信息,为开发新的适应症提供信息^[9-12]。

GX1-rmhTNF α 不同剂量组给药后小鼠一般行为活动正常,运动协调性好,对由戊巴比妥钠致小鼠睡眠的潜伏期及睡眠维持时间无明显影响,提示对小鼠中枢神经系统无明显抑制作用,注射后,对麻醉大鼠的平均动脉压、心率及呼吸频率不受影响。提示此药对心血管系统、呼吸系统无明显影响。

综上所述,GX1-rmhTNF α 在药效剂量范围内,对动物神经系统、呼吸系统、心血管系统均无明显影响,表明本品安全性较高,毒副作用较小,值得进一步开发并且应用于临床。

参考文献(References)

- [1] Shanshan Cao, Yan Liu, Xiaohua Li, Yingqi Zhang, Kaichun Wu, Daiming Fan, et al. Expression, purification, and characterization of recombinant protein GX1-rmhTNF α [J]. Molecular biotechnology, 2009,43(1):1-7
- [2] Hajitou A, Pasqualini R, Arap W. Vascular targeting: recent advances and therapeutic perspectives[J]. Trends Cardiovasc Med, 2006, 16(3): 80-88
- [3] Bishop-Bailey D. Tumour vascularisation: a druggable target [J]. Curr Opin Pharmacol, 2008, 2(2):83-88
- [4] Thoenes L, Gü nther M. Novel approaches in anti-angiogenic treatment targeting endothelial F-actin: a new anti-angiogenic strategy?[J]. Curr Opin Mol Ther, 2008,10(6):579-590
- [5] CDER, FDA. Guidance for industry: single dose acute toxicity testing for pharmaceuticals(Final), 1996
- [6] Zhang, Y.Q., Zhao, N., Li, B., Liu, L., Wang, Z.L., Zhu, B.E., Yan, Z. L. and Su, C.Z. Preparation of a novel recombinant human tumor necrosis factor- α by gene engineering technology[J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2002,18(4): 402-405
- [7] 曹珊珊, 吴开春, 颜真, 等. 重组融合蛋白 GX1-rmhTNF α 的克隆、表达及鉴定[J]. 细胞与分子免疫学, 2006,22(4) Cao Shan-shan, Wu Kai-chun, Yan Zhen, et al. Cloning, expression and identification of recombinant fusion protein GX1-rmhTNF α [J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2006,22(4)
- [8] 秦伯益. 新药评价概论[M]. 北京:人民卫生出版社,1998 Qin Bo-yi. Generality of new drug evaluation [M]. Beijing: People's Medical Publish House, 1998
- [9] 徐叔云, 卞如谦, 陈修. 药理实验方法学(3 版)[M]. 北京:人民卫生出版社,2002,1:805,941 Xu Shu-yun, Bian Ru-lian, Chen Xiu. Experimental method of drug [M]. Beijing: People's Medical Publish House, 2002,1:805,941
- [10] 金伯泉主编. 细胞和分子免疫学 [M]. 北京: 科学出版社,2001, 176-177 Jin Bo-quan chief edited. Cell and molecular immunology [M]. Beijing: Scientific & Technical Publishers, 2001, 176-177
- [11] 袁伯俊, 王治乔. 新药临床前安全性评价与实践 (第一版)[M]. 北京:军事医学科学出版社,1997 Yuan Bo-jun, Wang Zhi-qiao. Security evaluation and practice of new drug before clinical application [M]. Beijing: Military medicine science publisher, 1997
- [12] 沈建中. 动物毒理学[M]. 北京:中国农业出版社,1980 Shen Jian-zhong. Animal toxicology [M]. Beijing: China agriculture publisher, 1980
- [13] 彭代银, 韩岚, 张丛芬, 等. 丹皮多糖一般药理学研究[J]. 安徽中医学院学报, 2005, 24(2): 30-32 Peng Dai-yin, Han Lan, Zhang Cong-fen, et al. Study on the General Pharmacological Action of Polysaccharides from Mudan Cortex [J]. Journal of Anhui Traditional Chinese Medical College, 2005, 24(2): 30-32
- [14] 熊筱娟, 陈武, 郑国安, 等. 乌索酸的一般药理学实验研究[J]. 江西师范大学学报(自然科学版), 2005, 29(1): 81-84 Xiong Xiao-juan, Chen Wu, Zheng Guo-an, et al. Pharmacologic Study of Ursolic Acid[J]. Journal of Jiangxi Normal University(Natural Sciences Edition), 2005, 29(1): 81-84
- [15] 王心如. 毒理学基础 (第四版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004,179-181 Wang Xin-ru. Toxicology foundation [M]. Beijing: People's Medical Publish House, 2004,179-181
- [16] 徐灵建, 孙福璋, 王文云, 等. 复方水蛭精胶囊的一般药理学实验研究[J]. 中国生化药物杂志, 2003, 24(2): 65-68 Xu Ling-jian, Sun Fu-zhang, Wang Wen-yun, et al. Experimental study on general pharmacology of Fufangshuizhijing capsule[J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2003, 24(2): 65-68