

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.26.014

阿霉素脂质体的制备及其体外抗肿瘤活性的初步研究

张玉山¹ 平娟² 张永州² 苗久旺^{3,4} 王保全^{2Δ}

(1 中国人民解放军第 150 中心医院药剂科 河南 洛阳 471031; 2 河南大学淮河临床学院 河南 开封 475001;

3 山东中医药高等专科学校 山东 烟台 264199; 4 山东中医药大学药学院 山东 济南 250355)

摘要 目的:应用超声波分散法制备脂质体阿霉素,并比较脂质体阿霉素与游离性阿霉素抗肿瘤活性。**方法:**以卵磷脂和胆固醇为原料,将阿霉素包封于脂质体中,采用超声分散法制备脂质体阿霉素,对其在 290-700nm 范围内进行紫外扫描,用 SephadexG-50 柱分离脂质体阿霉素并计算其包封率。以昆明种小鼠为载体建立肿瘤模型(S180 型肉瘤)和细胞荧光染色法研究脂质体阿霉素的抗肿瘤活性,以 ZITA SIZER3000 型表面电位与粒度测定仪测定其粒径分布。**结果:**脂质体阿霉素在 480nm 处有最大吸收峰值,包封率达 91.3%,细胞荧光染色显示,脂质体及游离型阿霉素均对 S180 细胞有明显的抑制作用。**结论:**此法制备的脂质体阿霉素包封率高,粒径分布集中,脂质体阿霉素较游离型阿霉素有较强的抗肿瘤活性剂及较低的细胞毒作用,对阿霉素的临床应用有一定的参考价值。

关键词:阿霉素;脂质体;制备;抗肿瘤

中图分类号:R94,R963 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2014)26-5054-04

The Preparation of Adriamycin Liposome and the Preliminary Research of its Anti-tumor Activity in Vitro

ZHANG Yu-shan¹, PING Juan², ZHANG Yong-zhou², MIAO Jiu-wang^{3,4}, WANG Bao-quan^{2Δ}

(1 The people's liberation army 150 central hospital of Henan, LuoYang, Henan, 471031, China; 2 The Huaihe hospital of henan university, Kaifeng, Henan, 475001, China; 3 The traditional chinese medicine college of Yantai, Shandong, 264199, China;

4 The Pharmaceutical College of ShanDong traditional chinese medicine, Jinan, Shandong, 250355, China)

ABSTRACT Objective: To apply ultrasonic dispersion method to prepare adriamycin liposome, and compare the antitumor activity of adriamycin liposome and free doxorubicin. **Methods:** As Lecithin and cholesterol as raw materials, the adriamycin was encapsulated in the liposomes, with in 290-700 nm uv scanning and SephadexG-50 column separation of adriamycin liposome, the coating rate is calculated. Taking Kunming mice as carrier to establish tumor model and cell fluorescent staining method to study the antitumor activity of the driamycin liposome, making use of ZITA SIZER3000 Surface potential and granularity cryoscope to determine the particle size distribution. **Results:** Adriamycin liposome has maximum absorption peak at 480 nm, and the encapsulation rate was 91.3%, the cell fluorescence staining showed that liposomes and free type of doxorubicin has obvious inhibitory effect on S180 cells. **Conclusions:** This method of preparation of liposomes doxorubicin coating rate is high and has particle size distribution, the adriamycin liposome doxorubicin has strong antitumor active agent and low cytotoxic effect, and has certain reference value for the clinical application of doxorubicin.

Key word: Adriamycin; Liposomes; Preparation; Antitumor

Chinese Library Classification: R94, R963 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)26-5054-04

前言

近年来,靶向制剂的研究已经成为一个全球性的热点,其中脂质体的研究已经取得突破性的进展,脂质体是 20 世纪 60 年代由英国 Bangham 博士于 1965 年在《分子生物学杂志》上提出^[1]。脂质体是由磷脂双分子组成的空心球,当类脂分散在

水中时,类脂由于其固有的特性,在水中可以形成自发的空心双层球,在球的中间可加载亲水性成分,目前应用最多的是卵磷脂。脂质体目前一般可以分为三种,多层脂质体,大的单层脂质体,小的单层脂质体,这一般取决于制备工艺。目前国内外已经使用的脂质体有多种^[3,4],如超声分散法,乙醚法,震荡法。近年来被广泛应用于靶向药物的载体研究,当脂质体进入机体时,主要被网状内皮系统吞噬而激活机体自身的免疫系统,并改变被包封药物在体内的分布,将药物集中于肝,脾,骨等组织中,从而提高了药物的治疗指数,减少药物的剂量及降低药物的毒副作用^[5]。因此,脂质体在许多疾病尤其是癌症的治疗方面显示了明显的优越性^[6,7]。

作者简介:张玉山(1984-),男,硕士,药师,研究方向:临床药学,

E-mail:zhangyushan5375@126.com

Δ 通讯作者:王保全,男,硕士,研究方向:生化药学及药物的筛选,E-mail:wangbaoquan293@126.com

(收稿日期:2014-02-12 接受日期:2014-03-12)

20 世纪 80 年代初期,脂质体开始应用于萘环类药物(阿霉素)的有效载体,由于肿瘤生长部位的毛细血管通透性增加,使脂质体阿霉素的聚集量增加,并且由于脂质体的缓释作用,直接作用于肿瘤细胞部位,增加了治疗效果,而正常的组织由于毛细血管壁较完整,大部分的脂质体不能渗透,将药物与各种载体结合后,改变了药物在体内的全身分布,提高了肿瘤部位的药物浓度,降低了非肿瘤组织的药物浓度^[89]。随着研究的深入,人们开始认识到如果将阿霉素做成脂质体,不但可以降低药物的毒副作用,而且可以增加药物的抗癌作用。本文采用超声分散法制备了阿霉素脂质体,达到了 91.3% 的包封率,从脂质体阿霉素和游离性阿霉素体外抗肿瘤实验效果来看,脂质体阿霉素抗肿瘤活性高于游离性阿霉素。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

阿霉素(国药集团),胎牛血清(华美生物技术有限公司),葡聚糖凝胶 G-50(瑞典 pharmacia),DYY-6C 超声波细胞粉碎仪(上海沪西分析仪器厂),721 型荧光分光光度计(日本 Hitachi 公司生产),ZITA SIZER3000 表面电位与粒度测定仪(杭州中美仪器有限公司),CO₂ 恒温培养箱(日本 Sanyo 公司生产),24 孔培养板,96 孔培养板(杭州中美仪器有限公司)昆明种小鼠(河南省肿瘤医院肿瘤生物学研究所),氯仿(北京化学试剂厂),甲醇(北京化学试剂厂),丙酮(北京化学试剂厂),卵磷脂(国药集团),胆固醇(国药集团),S180 肉细胞(河南省肿瘤医院肿瘤生物学研究所),其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 阿霉素脂质体的制备 精密配置卵磷脂和胆固醇(总脂质浓度为 0.1 mol/ml),称取上述液体加入到 10 mL 的氯仿-甲醇溶液中(V/V:2/1),震荡充分,使其充分溶解,震荡过程中药放置溶液挥发。移液管精密移取 2 mL 到一梨形瓶中,使溶液刚好铺满底部,CO₂ 真空泵抽吸,吹干底部溶剂,使其成为一均匀的膜,加入以 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液配置而成的 3 mmol/L 的阿霉素溶液 1 mL,超声分散 30 min,在 DYY-6C 超声细胞粉碎仪上粉碎 10 次,每次时间为 30 min,直至呈现为均匀的上清液,7000 r/min 离心 15 min,上清液即是脂质体阿霉素微球。

1.2.2 阿霉素脂质体的最大吸收峰的测定 精密配置一定浓度的阿霉素脂质体(以 PBS 缓冲液为溶剂),以 PBS 为空白对照,在波长 290-700nm 范围内进行扫描,寻找脂质体阿霉素的最大吸收峰。

1.2.3 阿霉素脂质体包封率的测定 取包封过的阿霉素脂质体 1 mL,用蒸馏水稀释 10 倍,用移液管准确取 1 mL 的稀释液滴加到预先平衡好的 Sephadex G-50 凝胶柱上,以 0.05mol/L 的 PBS(pH7.6)洗脱,每 2 mL 收集一份,连续收集 60 mL,以空白脂质体为对照,测定各管 480nm 处脂质体阿霉素中阿霉素的含量,按文献^[8]方法测定脂质体阿霉素的包封率。

1.2.4 阿霉素脂质体粒径的测定 配置 0.4 g/L 的阿霉素脂质体分散于 pH 7.6 的磷酸盐缓冲液中,以 ZITA SIZER3000 型表面电位与粒度测定仪测定其粒径分布。应用动态光散射软件进行数据处理,记录其粒径分布特征。

1.2.5 脂质体阿霉素的体外抗肿瘤活性

1.2.5.1 体外肿瘤模型的建立 冻存的细胞需经 3 次继代后,方可进行试验,将复苏的 S180 细胞接种于小鼠腋下(0.3 mL 每只),待瘤体长到 1 cm 左右时取出瘤体,剥离结缔组织,将 1 g 的瘤组织加入 4 mL 的生理盐水匀浆后传代。

1.2.5.2 S180 体外抗肿瘤试验 将 1/3 的 S180 细胞混悬液接种于昆明种小鼠右侧腋下,(0.3 mL/只),共 27 只,随机分为三组(各 9 只):a 生理盐水组,b 阿霉素组,c 脂质体阿霉素组,接种第一天后尾静脉给药,小鼠每周称重 2-3 次,同时测定瘤体的生长,宽度,高度,计算瘤体积。接种 2 周后将小鼠拉断颈椎处死,剥离瘤体称重记录。

1.2.5.3 S180 细胞的体外细胞毒活性 将接种前 24h 内的 S180 细胞按 4×10^7 个每孔接种于 24 孔培养板上,置于 37℃,5%CO₂ 细胞培养箱中,培养至 80%-90% 融合程度,体外细胞毒活性实验时,弃去前一天细胞培养板中配制的培养液,以 pH 值 7.6 的 PBS 溶液洗涤 2-3 次后,加入浓度为 0.05 g/ml 的脂质体阿霉素及至总体积为 0.5 mL,继续培养 3-4 h,然后弃去培养液,以 PBS 溶液洗涤 2-3 次,将培养板直接放置于荧光显微镜下在不同的时间进行观察。

2 结果

2.1 由图 1 可以看见,阿霉素脂质体粒径分布呈单一峰,分布较为均匀,脂质体粒径集中在 90-350 nm 范围内。

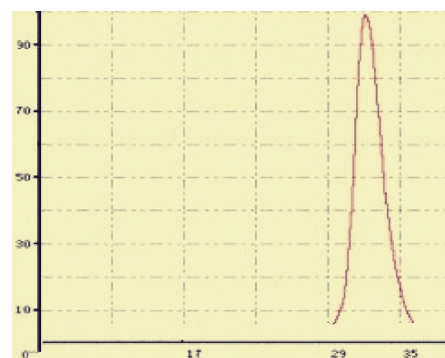


图 1 阿霉素脂质体的粒径分布图($\times 10\text{nm}$)

Fig. 1 The particle size distribution of adriamycin liposome

2.2 图 2 是阿霉素脂质体(以 PBS 缓冲液为溶剂),以 PBS 为空白对照,在波长 290-700 nm 范围内进行扫描得到的紫外吸收谱图,由图可以看出,阿霉素脂质体的最大吸收峰在 480 nm 附近,这和文献报道的一致^[10]。

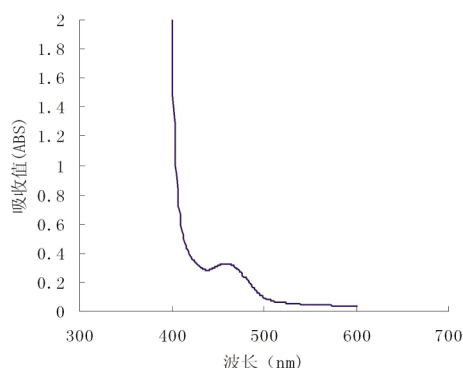


图 2 阿霉素脂质体的紫外吸收谱图

Fig.2 The UV absorption spectra of adriamycin liposome

2.3 游离阿霉素和脂质体阿霉素对 S180 小鼠实体瘤的影响

表 1 游离阿霉素和脂质体阿霉素对 S180 小鼠实体瘤的影响

Table 1 The effects of free adriamycin liposome and adriamycin on S180 solid tumor

Therapeutic drugs	Delivery time(d)	Animals numeber	Inhibition rate	Tumor weight
The control group	1	9	-----	1.43± 0.56
The control group	7	9	-----	1.51± 0.47
Free adriamycin	1	9	11.7%	1.31± 0.27
Free adriamycin	7	9	16.7%	1.34± 0.57
Adri liposome	1	9	41.3%	1.13± 0.23
Adri liposome	7	9	45.2%	1.09± 0.21

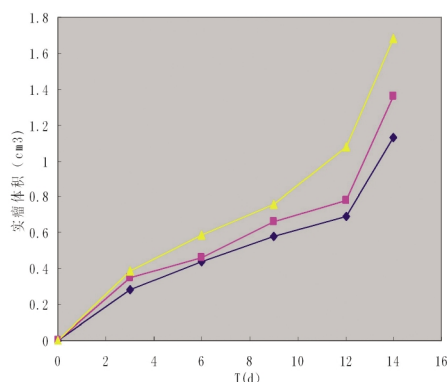


图 3 游离阿霉素及脂质体阿霉素对 S180 小鼠实体瘤的作用比较(3d)

Fig. 3 Comparison of the effects of free adriamycin liposome and adriamycin on the solid tumor S180 mice(3d)

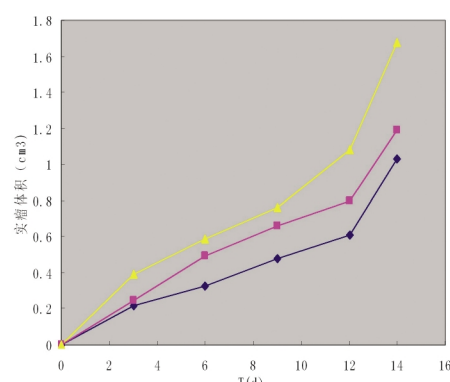


图 4 游离阿霉素及脂质体阿霉素对 S180 小鼠实体瘤作用的比较(7d)

Fig. 4 Comparison of the effects of free adriamycin liposome and adriamycin on the solid tumor S180 mice(7d)

从表 1,图 3,4 可知,游离阿霉素和脂质体阿霉素对 S180 小鼠的抑制作用明显不同,和生理盐水对照组相比,小鼠实体瘤的重量明显减轻,图 3,4 黄线部分代表生理盐水组,红线代表游离阿霉素组,蓝线代表脂质阿霉素组,分别于 3d,7d 时测定瘤体的长,宽,厚,计算体积并作肿瘤生长抑制曲线,游离阿

霉素和脂质体阿霉素对 S180 实体瘤有明显抑制作用,在 7d 时两者对肿瘤细胞的抑制率分别达 16.7%,45.2%。明显的可以看出脂质体阿霉素对肿瘤细胞有很好的杀细胞毒作用。

2.4 游离阿霉素及脂质体阿霉素对 S180 肿瘤细胞的免疫荧光染色

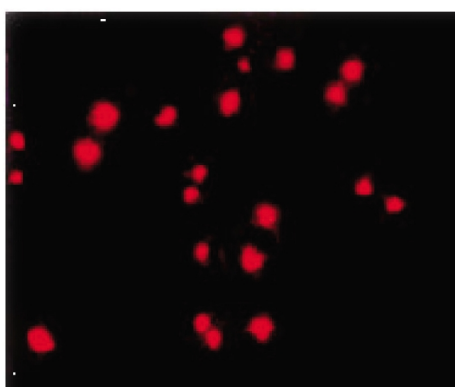


图 5 游离阿霉素对 S180 的细胞荧光染色

Fig.5 The S180 cell fluorescence staining of free adriamycin

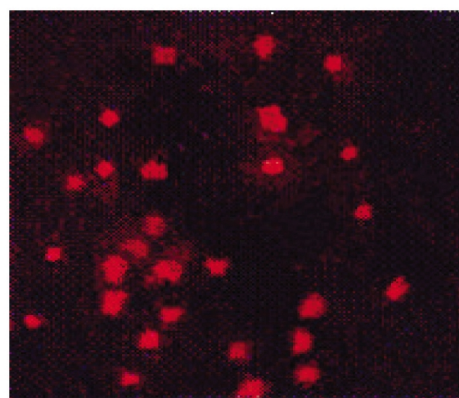


图 6 脂质体阿霉素对 S180 细胞的荧光染色

Fig. 6 The S180 cell fluorescence staining of adriamycin liposome

由图 5,6 可以看出,脂质体阿霉素与 S180 细胞共同温化孵育 3 h 后,细胞荧光染色显示阿霉素大部分集中于细胞内,呈现出较为集中的红染(图 6),而游离阿霉素只能部分进入细胞,仅存在散在的红染(图 5)。

3 讨论

目前为止,脂质体的制备技术有很多种,主要包括薄膜分散法,乙醇注入法,逆向蒸发法等几种^[11-13],但包封率难以达到

60%,在总结前人经验的基础上,本文采用超声分散法制备的阿霉素脂质体包封率达 91.3%,较文献^[14]报道的高,这可能因为阿霉素是脂溶性药物,在生理环境下表现为质子化,很容易与带负电荷的磷脂结合而使包封率增加,而超声波可加大打碎粒度亦可增加其包封率^[15],本文采用紫外分光光度法测定脂质体包封率,不仅方法简单易操作,而且准确度高,灵敏度强。实验结果显示,阿霉素脂质体粒径较小,粒径检测呈单峰,分布较均匀,具有纳米材料的特征,有利于通过细胞膜,适合细胞膜的摄取,可应用于临床。阿霉素脂质体和游离阿霉素的细胞抑制比结果显示,阿霉素脂质体对 S180 细胞抑制效率更高,抑制作用更强,同时从小鼠细胞转染的荧光染色来看,阿霉素脂质体在与肿瘤细胞共同温化孵育 3 h 后,药物很大部分进入细胞并集中在细胞内,可以很大程度的发挥作用,而游离阿霉素只能部分进入细胞,不能在短时间内发挥作用,这些都提示阿霉素包封在脂质体中可以更好的发挥细胞毒作用,这和文献报道的一致^[16]。

脂质体的临床用途多种多样,国内外已经有相关报道^[17-18],目前脂质体的研究多倾向于体内外多相性研究,如我国创制的多相脂质体和复方唐杉新草碱多相脂质体体外研究表明,该多相脂质体可明显抑制小鼠移植性肿瘤的生长,延长肿瘤负荷小鼠的寿命^[19],另研制成功了复方氟尿嘧啶多相脂质体^[20],对小鼠 Lewis 肺癌、NVA737 乳腺癌、U14 宫颈癌人工移植的瘤结抑制率分别为 75%, 95%, 91%,同时能阻断小鼠 Lewis 肺癌株的肺转移,效果比游离氟尿嘧啶明显为好。有不少脂质体种类已应用于临床研究,并在治疗肺癌等方面取得了可喜的进展。

参 考 文 献(References)

- [1] Zhu Xi-qiang, Zhai Guang-xi. Study Oil preparation of niosome encapsulating low molecular weight heparin [J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmacology, 2001, 25(2): 232-234
- [2] Gao Jing, Huang Shao-lie. Comparison of liposome preparation methods[J]. China Oils and fats, 2004, 29(10): 52-55
- [3] Chang Gui-min, Duan Fang-ling, Yang Shu-ying, et al. Studies on preparation and characteristics of liposomal adriamycin [J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 1999, 19(6): 329-332
- [4] Robert C, Malvy C, Couvreur P. Inhibition of the friend retrovirus by antineoplastic oligonucleotide encapsulated in liposome: mechanism of action[J]. Pharm Res, 1993, 10(10): 1427-1433
- [5] Guo Jian-xin, Ping Qi-neng, Huang Luo-sheng. Studies on Preparation and Deformability of Flexible Nano-Liposome Containing Cyclosporine[J]. Journal of China Pharmaceutical University, 1999, 30(3): 187-191
- [6] James H, Joel E. Ultrastructural Features of Adriamycin-Induced Skeletal and Cardiac Muscle Toxicity [J]. Am J Pathol, 1985, 118(2): 288-297
- [7] Wei HM, Guo KY, Mei JZ, et al. Cytotoxicity effect and Bcl-2 expression of K562 cells treated with hyperthermia and adriamycin in vitro[J]. China Journal of Modern Medicine, 2007, 17(14): 1674-1677
- [8] Tyagi P, Chancellor M. Recent advances in intravesical drug/gene delivery[J]. mol-pharm, 2006, 3(4): 369-379
- [9] Kobayashita T, Ishida T, Okada Y, et al. Effect of transferring receptor-targeted liposomal doxorubicin in P-glycoprotein-mediated drug resistant tumor cells[J]. Int J Pharm, 2006: 432
- [10] Hu Feng-qun, Zhao Meng-dan, Yuan H, et al. A novel chitosan oligosaccharides tearic acid micelles for gene delivery: Properties and invitro transfection studies[J]. Int J Pharm, 2006, 315(1-2): 158-166
- [11] Zhou Li, Wu Xiao-qun. Liposome and its application [J]. Modern Chemical Industry, 1997, (9): 18-20
- [12] Wang C Y, Yughes K W, Huang L. Improved cytoplasmic delivery to plant protoplasts via pH-sensitive liposome [J]. Plant Physiol, 1986, 82: 179-186
- [13] Quan Dong-qin, Su De-sen, Gu Xue-qiu. Studies on the Preparation and Characteristics of Empty Proliposomes as a Drug Carrier[J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 1999, 16(3): 160-164
- [14] Hu F Q, Yuan H, Zhang H H, et al. Preparation of solid lipid nanoparticles with clobetasol propionate by a novel solvent diffusion method in aqueous system and physicochemical characterization [J]. Inter J Pharm, 2002, 239(2): 121-128
- [15] Zhao Meng-dan, Yu Fei-jiang, Yu Yong-he. Preparation of adriamycin-liposome and its cytotoxicity on human ovarian carcinoma SKOV3 cells in vitro[J]. Zhe Jiang Medical Journal, 2008, 30(4): 337-339
- [16] Qian Hao, Ling Pei-xue, Wang Feng-shan, et al. Research Progress of Application in Liposome Targeting to Malignant Tumor [J]. Food and Drug, 2007, (3): 46-49
- [17] Rahman A, Treat J, Roe JK, et al. A phase I clinical trial and pharmacokinetic evaluation of liposome-encapsulated doxorubicin[J]. J Clin Oncol, 1990, 8: 1093-1097
- [18] Gerald H M, Aquilur R, Ira P, et al. Increased effectiveness of Liposome-encapsulated doxorubicin in multidrug-resistant transgenic mice compared with free doxorubicin[J]. JNCI, 1992, 10: 804-807
- [19] Gu Xue-qiu, Ma Zhu-qing, Li Huan-qiu, et al. New forms of cancer drug POLYPHASE LIPOSOME (I) screening of POLYPHASE LIPOSOME 139 anticancer activity [J]. Chinese Traditional And Herbal Drugs, 1992, 13(4): 13-17
- [20] Gu Xue-qiu. Anticancer drug targeting carrier China POLYPHASE LIPOSOME research[M]. The first edition, Beijing: Chinese medicine science and Technology Press, 1991: 331