

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2014.09.009

阿霉素脂质体制备工艺优化及 节拍式给药细胞探讨^①

汤 军, 窦霄云, 修 芸, 赵 怡

重庆医科大学 生命科学研究院, 重庆 400016

摘要: 目的: 优化阿霉素脂质体处方和制备工艺, 利用节拍式低剂量给药化疗方式探讨阿霉素脂质体对 HO-8910 人卵巢癌细胞的体外杀伤作用. 方法: 采用硫酸铵梯度法制备脂质体, 正交设计优选制备处方; 葡聚糖凝胶柱层析法分离含药脂质体与游离药物并测定包封率; 考察其体外释放度. 以常规给药 24 h 和节拍式低剂量给药 144 h 的形式分别考察阿霉素脂质体、阿霉素体外细胞的毒性作用. 结果: 所得优化处方为: 磷脂与胆固醇的质量比为 3:1, 硫酸铵浓度为 155 mmol/L, 药物与磷脂的质量比为 1:10, 孵育温度为 60 °C. 以优化处方制得的脂质体平均包封率达 92.86%; 脂质体具有一定的缓释作用. 脂质体的细胞毒性实验结果显示, 游离阿霉素与阿霉素脂质体 IC₅₀ 值 24 h 分别为 0.62 μg/mL 和 0.46 μg/mL, 144 h 分别为 0.06 μg/mL 和 0.01 μg/mL. 结论: 优化得到的阿霉素脂质体处方工艺简便, 包封率高; 无论是游离的阿霉素或是阿霉素脂质体, 运用节拍式低剂量给药的方式在 HO-8910 细胞中抑制率都明显优于 MTD 化疗方式给药, 其中脂质体药物节拍式低剂量给药方式对 HO-8910 细胞的抑制率明显优于游离药物.

关键词: 阿霉素脂质体; 正交设计; 节拍式低剂量给药; 体外细胞实验

中图分类号: Q813

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2014)9-0057-06

阿霉素(Doxorubicin, DOX)是临床常用的蒽环类抗恶性肿瘤药, 是治疗实体肿瘤最有效的药物之一. 与大多数抗肿瘤药物相同, DOX 不良反应较多, 如心脏毒性、骨髓抑制、消化道和肾脏毒性等, 不仅影响了患者的生存质量, 而且使 DOX 的应用受到限制. 节拍式给药(Metronomic Chemotherapy)是一种低剂量长时间给药的方法. 节拍式给药方式的药物总累积量比最大耐受量(Maximum Tolerated Dose, MTD)方式的要少, 因此可减少在 MTD 化疗方案中出现的诸多不良反应^[1-2]. 有文献报道采用降低用药剂量的化疗方式不仅可以减轻抗肿瘤药物的毒性反应, 并且在治疗肿瘤的效果方面也优于 MTD 方式^[3-7].

脂质体是一种抗癌药物载体, 有研究表明, 将 DOX 包入脂质体内可降低其对正常细胞的毒性, 同时可增强其杀伤肿瘤细胞的能力. 本研究设计将 DOX 包裹于脂质体中, 以包封率为指标, 采用正交实验筛选并优化了其处方和制备工艺; 将脂质体与节拍式低剂量化疗方式相结合, 以 HO8910 卵巢癌细胞为细胞模型, 采用 MTT 比色法, 探讨 DOX 脂质体和游离 DOX 水溶液的细胞毒性作用, 为临床应用阿霉素提供更多的用药方式.

① 收稿日期: 2013-07-15

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(2014AA022209); 国家自然科学基金资助项目(81370906).

作者简介: 汤 军(1983-), 女, 重庆渝中人, 硕士, 主要从事药理学研究.

1 材料与仪器

1.1 材料

阿霉素原料药(浙江海正药业股份有限公司);胆固醇(广州天马精细化工厂);蛋黄卵磷脂(上海国药集团化学试剂有限公司);Sephadex G-50(Sigma 公司);透析袋(MW 12000-14000);混合纤维微孔滤膜,孔径为 $0.45 \mu\text{m}$ (上海市新亚净化器件厂);人卵巢癌细胞 HO-8910(重庆医科大学);四甲基偶氮唑盐(Sigma 公司);胎牛血清(Mdgenics 公司);RPMI1640(Hyclone 公司),其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器

UV-2102 PC 紫外分光光度计(日本尤尼可公司);层析柱(重庆医用玻璃厂);Sartorius BS210S 电子天平(德国 Sartorius 公司);真空旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);SHB-C 循环水多用真空泵(郑州杜甫仪器厂);KQ2200B 超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司);WH-1 型旋涡仪(上海沪西分析仪器厂);pHS-3C 型精密酸度计(上海雷磁仪器厂);生物超净工作台 SW-CJ-2FD(苏净安泰空气技术有限公司);CO₂ 培养箱(美国 HEPA 公司);超低温电冰箱 MDF192(日本 SANYO 公司);普通光学显微镜 BH-2(日本 OLYMPUS 公司);高速离心机 5415D(德国 Eppendorf 公司);ELX800 酶标仪(BIO-TEK 公司)。

2 方法与结果

2.1 硫酸铵梯度法制备阿霉素脂质体

采用硫酸铵梯度法制备 DOX 脂质体^[8],蛋黄卵磷脂和胆固醇适量,加至圆底烧瓶中,加入氯仿 10 mL,40 °C 旋转减压蒸发除去氯仿,在瓶壁内形成均匀的脂质薄膜,40 °C 真空干燥,12 h. 加入 155 mmol/L 硫酸铵缓冲溶液(pH=5.5)将脂膜水化,于 60 °C 水浴中温育,间歇超声 5 min. 取脂质体混悬液 10 mL 置于透析袋中,在磷酸缓冲液(PBS, pH=7.4)2 L 中进行透析. 脂质体囊泡过 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜,形成空白脂质体. 在上述空白脂质体中逐滴加入含 5 mg DOX 的溶液,混匀,水浴 40 °C 孵育 20 min,即得 DOX 脂质体。

2.2 光谱分析

用磷酸盐缓冲液(PBS, pH=7.4)配制一定体积质量分数的 DOX 标准品溶液,以 PBS 为空白对照,在 220~600 nm 波长处进行紫外扫描,根据扫描图谱(图略)所示,DOX 在 480 nm 处有最大吸收. 另取空白脂质体 0.2 mL,经 Triton X-100 破乳后,用甲醇稀释至 10 mL,在 220~600 nm 范围内进行紫外扫描,根据扫描图谱(图略)可知,空白脂质体在 480 nm 处无吸收,故可确定 480 nm 为 DOX 的测定波长。

2.3 标准曲线的绘制

精密称取 DOX 标准品 10 mg,置于 100 mL 量瓶中,加 PBS(pH=7.4)溶解,混匀,即得体积质量分数为 $100 \mu\text{g/mL}$ 的标准储备液. 精密吸取上述 DOX 标准储备液 0.1,0.2,0.5,1.0,2.0,4.0,6.0 mL,分别加至 10 mL 容量瓶中,PBS 缓冲液稀释并定容至 10 mL 刻度,混匀即得体积质量分数为 1.0,2.0,5.0,10.0,20.0,40.0,60.0 $\mu\text{g/mL}$ 的 DOX 标准液. 以 PBS 为空白对照,480 nm 波长处测定以上各溶液的吸光度. 以吸光度(A)对 DOX 浓度(C)进行线性回归,回归方程为

$$A = 0.0189C - 0.0065 \quad r = 0.9995$$

结果表明,DOX 在 1.0~60.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。

2.4 洗脱曲线的绘制

采用 Sephadex G-50 型葡聚糖凝胶柱色谱法分离脂质体和游离药物. 取 0.5 mL DOX 脂质体上柱,用 PBS 洗脱,流速控制在 0.3 mL/min 左右,用刻度试管每 2 mL 收集 1 份,共收集 17 份,每份分别用 10% 的 Triton X-100 破乳后用甲醇稀释至 4 mL. 取空白脂质体 0.5 mL 上柱,收集洗脱液用 10% 的 Triton X-100 破乳后用甲醇稀释至 4 mL 作为空白,在上述条件下进行测定,记录吸光度,绘制洗脱曲线(图 1). 结

果表明脂质体在 4 mL 处洗脱出柱,至 18 mL 时已基本洗脱完全,游离药物集中在 20~32 mL.

2.5 包封率的测定

精密移取 DOX 脂质体混悬液 0.5 mL 上柱,用 PBS 洗脱,分离脂质体和游离药物,收集 4 mL 至 18 mL 洗脱液,UV 检测脂质体中药物浓度.按 2005 年版《中国药典》^[9]中的相关规定,测定包封率.

$$EN = (1 - C_f/C_t) \times 100\%$$

式中 EN 为包封率, C_f 为游离药物的量, C_t 为脂质体悬液中药物的总量.

2.6 正交实验因素与水平的设计

采用单因素筛选的条件,初步制定 DOX 脂质体的制备处方,在此基础上采用四因素三水平 $L_9(3^4)$ 的正交设计方案,选择影响脂质体包封率的主要因素:磷脂与胆固醇的质量比(A),硫酸铵浓度(B),药物与磷脂的质量比(C),孵育温度(D),结果见表 1.

表 1 $L_9(3^4)$ 正交实验因素水平表

| 水 平 | 因 素 | | | |
|-----|------------------|---------------------------------------|-----------------|---------------|
| | A 磷脂与胆固醇 的质量比 | B 硫酸铵浓度 /(mmol · L ⁻¹) | C 药物与磷脂的 质量比 | D 孵育温度 /°C |
| 1 | 2 : 1 | 125 | 1 : 20 | 50 |
| 2 | 3 : 1 | 155 | 1 : 10 | 60 |
| 3 | 4 : 1 | 175 | 1 : 5 | 70 |

采用直观分析法分析,结果表明:各因素对包封率的影响程度为 $C > B > A > D$. 最佳组合为 $C_2B_2A_2D_2$,即磷脂与胆固醇的质量比为 3 : 1,硫酸铵浓度为 155 mmol/L,药物与磷脂的质量比为 1 : 10,孵育温度为 60 °C,结果见表 2.

表 2 DOX 脂质体正交设计结果

| 实验号 | 因 素 | | | | 包封率 |
|------|------------------|---------------------------------------|-----------------|---------------|------|
| | A 磷脂与胆固醇的 质量比 | B 硫酸铵浓度 /(mmol · L ⁻¹) | C 药物与磷脂的 质量比 | D 孵育温度 /°C | |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 83.4 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 92.3 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 79.1 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 86.6 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 80.1 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 90.7 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 76.5 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 84.6 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 85.9 |
| 均值 1 | 84.9 | 82.2 | 86.2 | 83.1 | |
| 均值 2 | 85.8 | 85.7 | 88.3 | 86.5 | |
| 均值 3 | 82.3 | 85.2 | 78.6 | 83.4 | |
| 极差 | 3.47 | 3.50 | 9.70 | 3.37 | |

通过对处方和工艺中各关键因素的验证,最终确定制备 DOX 脂质体的最佳处方和工艺流程,其验证结果见表 3.

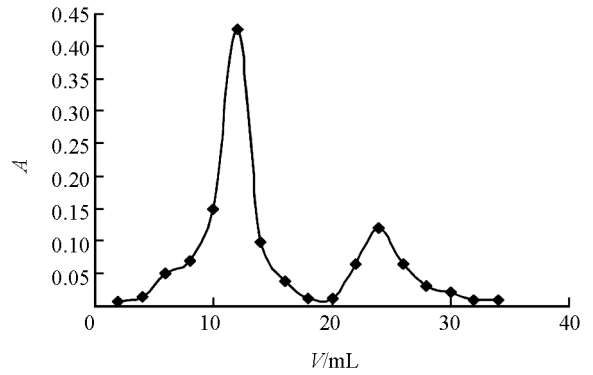


图 1 DOX 脂质体的洗脱曲线

表 3 最佳工艺验证包封率

| No. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Average E/% |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| E _w /% | 93.27 | 91.21 | 92.57 | 93.61 | 93.68 | 92.86 |

2.7 DOX 脂质体体外释放实验

分别取 DOX 脂质体和其游离药物水溶液 5 mL, 加入长约 10 cm 的透析袋中, 两端扎紧后, 悬置于盛有 50 mL PBS(pH=7.4) 的具塞锥形瓶中, 密塞, 于 37 °C 水浴恒温振荡, 定时取外液 2.0 mL, 同时补加等量同温的 PBS. 参照脂质体包封率测定方法, 测定释药介质中药物体积质量分数, 并计算累积释药分数 Q. 从实验结果可知, DOX 脂质体在 48 h 内释放完全, 而游离药物的水溶液在 8 h 内释放完全. 由此表明脂质体形式对 DOX 起到了较好的缓释作用(图 2).

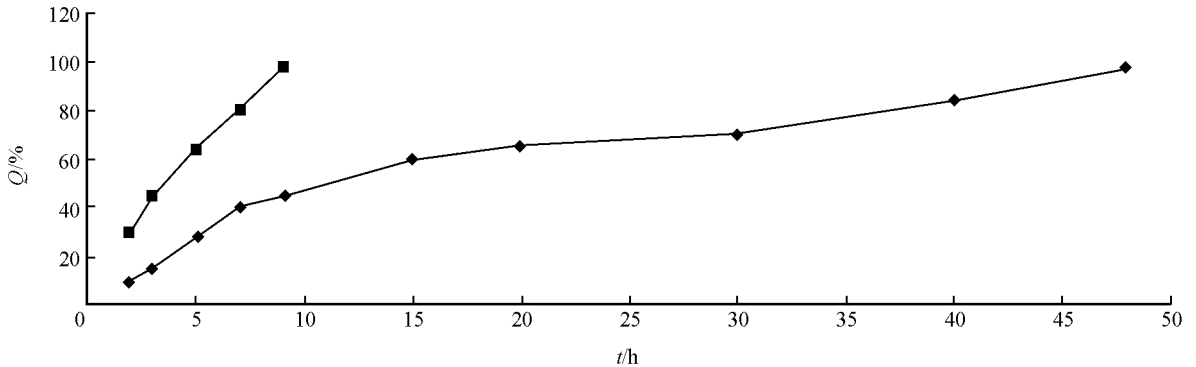


图 2 DOX 脂质体与 DOX 水溶液的平均累积释药量曲线

2.8 低剂量连续给药细胞初步实验

将人卵巢癌 HO-8910 细胞于含体积分数为 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养基中, 37 °C、5% CO₂ 条件下培养. 实验时以胰酶消化, 制备单细胞悬液, 调整细胞体积单位为 1.0×10^5 /mL. 取指数生长期细胞制成 1.0×10^5 /mL 细胞悬液, 以 180 μ L/孔接种于 96 孔培养板上, 培养 24 h 后分别加入 10 μ L 不同体积质量分数的 DOX 和 DOX 脂质体药液, 使之终体积质量分数分别为 1 μ g/mL, 0.1 μ g/mL, 0.01 μ g/mL, 0.001 μ g/mL; 设立 2 个对照组, DOX 的对照组为加入等量的 10 μ L 生理盐水溶液, DOX 脂质体的对照组加入 10 μ L 空白脂质体溶液. 按照 A, B, C 3 种给药方案给予细胞药物. A 方案: 细胞培养 24 h 后, 分别投入不同体积质量分数的游离药物和脂质体药物, 24 h 后测细胞 MTT 值; B 方案: 细胞培养 24 h 后, 每 24 h 投入不同体积质量分数的游离药物, 一共投药 6 次, 144 h 后测细胞 MTT 值; C 方案: 细胞培养 24 h 后, 每 48 h 投入不同体积质量分数的脂质体药物, 一共投药 3 次, 144 h 后测细胞 MTT 值^[10].

半数抑制浓度(IC₅₀) 是指在用药后存活的细胞数量减少一半时所需的药物浓度^[11]. 在 MTT 法中, 就是以对照组吸光度 OD 值减少一半所需的药物浓度为 IC₅₀. 公式为 $\lg IC_{50} = X_m - I(P - (3 - P_m - P_n)/4)$, 其中 X_m: lg 最大剂量; I: lg 最大剂量/相临剂量; P: 阳性反应率之和, P_m: 最大阳性反应率, P_n: 最小阳性反应率.

由表 4 可知, 无论是游离药物还是由脂质体作为载体的药物, 用节拍式低剂量给药的化疗方式都优于一次性给药. 由表 5 可知, DOX 脂质体的 IC₅₀ 明显低于游离的 DOX.

表 4 各组体积质量分数药物对 HO-8910 的抑制率

| 体积质量分数 /(μ g · mL ⁻¹) | 游离 DOX/% | | DOX 脂质体/% | |
|---|----------|-------|-----------|-------|
| | 24 h | 144 h | 24 h | 144 h |
| 1 | 43.70 | 76.50 | 29.20 | 89.50 |
| 0.1 | 36.20 | 64.30 | 37.90 | 91.80 |
| 0.01 | 8.24 | 34.10 | 29.20 | 58.90 |
| 0.001 | -2.44 | 1.02 | 2.14 | 24.80 |

表 5 游离 DOX 与脂质体 DOXIC₅₀ 值 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

| | 游离阿霉素 | 阿霉素脂质体 |
|-------|-------|--------|
| 24 h | 0.62 | 0.46 |
| 144 h | 0.06 | 0.01 |

3 讨 论

本研究在参考有关文献的基础上^[11], 采用硫酸铵梯度法制备 DOX 脂质体, 在单因素实验基础上采用 L₉(3⁴) 正交设计实验, 以包封率为指标, 磷脂与胆固醇的质量比、硫酸铵浓度、药物与磷脂的质量比、孵育温度为主要因素, 筛选出了制备 DOX 脂质体的最佳处方, 提高了 DOX 脂质体的包封率. 所得优化处方为磷脂与胆固醇的质量比为 3 : 1, 硫酸铵浓度为 155 mmol/L, 药物与磷脂的质量比为 1 : 10, 孵育温度为 60 °C. 以优化处方制得的脂质体平均包封率达 92.86%.

实验中, 笔者以人卵巢癌细胞 HO-8910 细胞作为细胞模型, 分别采用节拍式低剂量或 MTD 化疗方式给药, 比较 DOX 水溶液和 DOX 脂质体对肿瘤细胞的细胞毒性作用. 结果显示无论是 DOX 水溶液或是 DOX 脂质体, 运用节拍式低剂量给药的方式在 HO-8910 细胞中抑制率明显优于 MTD 化疗方式给药; DOX 脂质体节拍式低剂量给药方式对 HO-8910 细胞抑制率明显优于 DOX 水溶液; 在节拍式给药方式中, DOX 脂质体使用的剂量为实验 MTD 体积质量分数的 1/100. 脂质体具有一定的缓释作用. 脂质体的细胞毒性实验结果显示, 游离阿霉素与阿霉素脂质体 IC₅₀ 值 24 h 分别为 0.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 0.46 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 144 h 分别为 0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 优化得到的阿霉素脂质体处方工艺简便, 包封率高; 无论是游离的阿霉素或是阿霉素脂质体, 运用节拍式低剂量给药的方式在 HO-8910 细胞中抑制率都明显优于 MTD 化疗方式给药, 其中脂质体药物节拍式低剂量给药方式对 HO-8910 细胞的抑制率明显优于游离药物.

本课题设计的目的是将脂质体与节拍式低剂量化疗方式相结合, 从而减少药物对系统的毒副作用, 同时通过维持低剂量血药治疗体积质量分数来增加治疗效果. 研究结果证实, 节拍式低剂量给药方式与脂质体抗癌药物结合能够减少用药剂量, 提高疗效. 本实验研究方向也许会为今后的癌症治疗提供一种创新的战略, 同时也提供了一种新的抗血管生成治疗方式与药剂学 TDDS 相结合的思路.

参考文献:

- [1] TULPUL A, GROOPMAN J, SAVILLE MW, et al. Multicenter Trial of Low-Dose Paclitaxel in Patients with Advanced AIDS-Related Kaposi Sarcoma [J]. *Cancer*, 2002, 95(1): 147-154.
- [2] KLEMENT G, BARUCHEL S, RAK J, et al. Continuous Low-Dose Therapy with Vinblastine and VEGF Receptor-2 Antibody Induces Sustained Tumor Regression Without Overt Toxicity [J]. *J Clin Invest*, 2000, 105(8): R15-R24.
- [3] BELLO L, CARRABBA G, GIUSSANI C, et al. Low-Dose Chemotherapy Combined with an Antiangiogenic Drug Reduces Human Glioma Growth in Vivo [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(20): 7501-7506.
- [4] MAN S, BOCCI G, FRANCA G, et al. Antitumor and Anti-Angiogenic Effects in Mice of Low-Dose (Metronomic) Cyclophosphamide Administered Continuously Through the Drinking Water [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(10): 2731-2735.
- [5] STOLL B R, MIGLIORINI C, KADAMBI A, et al. A Mathematical Model of the Contribution of Endothelial Progenitor Cells to Angiogenesis Intumors: Implications for Anti-Angiogenic Therapy [J]. *Blood*, 2003, 102(7): 2555-2561.
- [6] KERBEL R S, KLEMENT G, PRITCHARD K I, et al. Continuous Low-Dose Anti-Angiogenic (Metronomic) Chemotherapy: from the Research Laboratory Into the Oncology Clinic [J]. *Ann Oncol*, 2002, 13(1): 12-15.
- [7] HAHNFELDT P, FOLKMAN J, HLATKY L. Minimizing Long-Term Tumor Burden: the Logic for Metronomic Chemotherapeutic Dosing and Its Antiangiogenic Basis [J]. *J Theor Biol*, 2003, 220(4): 545-554.
- [8] GRANT G J, BARONHOLZ Y, BOLOTIN E M, et al. A Novel Liposomal Bupivacaine Formulation to Produce Ultralong-Acting Analgesia [J]. *Anesthesiology*, 2004, 101(1): 133-137.

- [9] 中国药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 110—111.
- [10] BOCCI G, NICOLAOU K C, KERBEL R S. Protracted Low-Dose Effects on Human Endothelial Cell Proliferation and Survival in Vitro Reveal a Selective Antiangiogenic Window for Various Chemotherapeutic Drugs [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(23): 6938—5943.
- [11] 颜 科, 胡春梅, 潘黎军, 等. 阿霉素脂质体的制备及对 MCF-7/DOX 作用的考察 [J]. *重庆医科大学学报*, 2009, 34(3): 329—331.

Study on Preparation of Doxorubicin Liposome and Its Cytotoxicity Evaluation with Rhythmical Low-Dosage Administration

TANG Jun, DOU Xiao-yun, XIU Yun, ZHAO Yi

Institute of Life Science, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: Objective: To optimize the formula and preparation technique of doxorubicin liposome, and to evaluate its cytotoxicity on human ovarian cancer HO8910 cells in vitro with rhythmical low-dosage administration. Methods: Doxorubicin liposome was prepared by the $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -gradient method. The optimum formation was selected by means of the orthogonal design of experiment. The in vitro drug release behavior of liposome was evaluated by the dialysis method. MTT assay was applied to investigate the cytotoxicity of doxorubicin liposome and free doxorubicin with common administration after 24 h and rhythmical low-dosage administration after 144 h on HO8910 cells. Results: The optimum formula was as follows: the ratio of lecithin to cholesterol was 3 : 1, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration was 155 mmol/L, drug : lecithin was 1 : 10, temperature was 60 °C. The average entrapment efficiency for doxorubicin was 92.86%. The release of liposome was relatively slow. The cytotoxicity test showed that IC_{50} of free doxorubicin and doxorubicin liposomes were 0.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 0.46 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively at 24 h and 0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ at 144 h. Conclusion: The selected formulation and preparation technique of doxorubicin liposome is reasonable in prescription, practicable in techniques and high in encapsulation efficiency. MTT indicated that the inhibition rates of free doxorubicin and doxorubicin liposomes with rhythmical low-dosage administration were much higher than those with MTD chemotherapy administration, and rhythmical low-dosage administration had much higher inhibition rate for HO8910 cells than free drug.

Key words: doxorubicin liposome; orthogonal design; rhythmical low-dosage administration; in vitro cell research

责任编辑 夏 娟

