文章编号:1000-5404(2007)10-0925-04

论著

GM-CSF耦联米托蒽醌脂质体的制备及体外抑瘤作用的实验研究

陈 姝,娄世锋,张 颖,张 萍 (重庆医科大学附属第二医院血液内科,重庆 400010)

提 要: 目的 制备粒-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor,GM-CSF)耦联米托蒽醌脂质体(liposome-entrapped mitoxantrone,LEM),比较其与LEM和米托蒽醌(dihydroxyanthraquinone,DHAQ)对HL60/ADM细胞的体外杀伤作用。**方法** 用逆向蒸发法制备LEM,高速离心法纯化LEM,比色法测定包封率,透射电镜下观察LEM的结构和粒径,以戊二醛交联法制备出LEM-GM-CSF,紫外分光光度法测定耦联率,流式细胞术测定LEM-GM-CSF中GM-CSF的活性保留率。通过MTT法检测所制备LEM-GM-CSF、LEM及DHAQ对HL60/ADM细胞的杀伤作用。**结果** LEM粒径分布均匀,为170~220 nm,包封率为80%,GM-CSF与LEM有较高的耦联率及活性保留率,分别为42.3%及74.6%;LEM-GM-CSF、LEM及DHAQ对HL60/ADM细胞具有杀伤作用,且LEM-GM-CSF的杀伤作用显著强于LEM和DHAQ。LEM-GM-CSF、LEM及DHAQ对HL60/ADM细胞作用24 h的IC_{50}分别是8.73、12.42、27.31 μg/ml;作用48 h的IC_{50}分别是:0.62、8.25、12.44 μg/ml。**结论** 本研究制备的LEM-GM-CSF对HL60/ADM细胞具有明显的杀伤作用,有望成为良好的抗白血病药物新剂型。

关键词: 米托蒽醌; 免疫脂质体;HL60/ADM细胞
中图法分类号: R943;R965;R979.1 **文献标识码**: A

Preparation of LEM-GM-CSF and its inhibition effect on HL60/ADM cells *in vitro*

CHEN Shu, LOU Shi-feng, ZHANG Ying, ZHANG Ping (Department of Hematology, The Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To prepare liposome-entrapped mitoxantrone (LEM)-GM-CSF and observe the cytotoxicity of HL-60/ADM cells treated with LEM-GM-CSF, LEM and dihydroxyanthraquinone (DHAQ) *in vitro*. **Methods** LEM was prepared by reverse phase evaporation (REV). High speed centrifugation was applied to separate LEM and dissociate DHAQ. Colorimetry was employed to determine encapsulation efficiency. The liposome structure and particle size were determined by transmission electron microscopy. GM-CSF was coupled to LEM by glutaraldehyde method. UV-spectrophotometric analysis was applied to measure the coupled efficiency. Flow cytometry was applied to determine the immunoconjugate retained efficiency. The cytotoxicity of HL60/ADM cells and interdiction efficiency of GM-CSF were investigated by MTT test. **Results** The encapsulation efficiency of LEM was 80%. Most liposomes were monolayer, and the particle size was 170 – 220 nm. Its coupled efficiency with GM-CSF was 42.3%, and the immunoconjugate retained efficiency was 74.6%. All LEM-GM-CSF, LEM and DHAQ had cytotoxicity on HL60/ADM, their cytotoxic power in decrement sequence: LEM-GM-CSF, LEM, DHAQ. After treated with LEM-GM-CSF, LEM and DHAQ for 24 h, the IC_{50} of HL-60/ADM was 8.73, 12.42, 27.31 μg/ml respectively and for 48 h the IC_{50} were 0.62, 8.25, 12.44 μg/ml. The inhibition rate increased in a dose-dependent manner. **Conclusion** The encapsulation efficiency, the coupled efficiency and the immunoconjugate retained efficiency of LEM-GM-CSF prepared by our method were satisfying. LEM-GM-CSF representing anti-leukaemia efficiency *in vitro* had cytotoxicity on HL60/ADM cells.

Key words: mitoxantrone; immunoliposome; HL60/ADM cells

基金项目:重庆市科委应用基础研究(2001)
Supported by the Research Project Foundation for Basic Research and Application of Scientific Committee of Chongqing(2001)
作者简介:陈 姝(1965-),女,重庆市人,硕士,副主任医师,主要从事血液肿瘤的基础和临床方面的研究,发表论文12篇。电话:(023)63704775
收稿日期:2006-08-28;**修回日期**:2007-03-19

米托蒽醌(dihydroxyanthraquinone, DHAQ)为蒽醌类抗肿瘤药物,对恶性淋巴瘤、急性白血病等具有较好的治疗效果[1]。但DHAQ明显的骨髓抑制作用、心脏毒性等,使药物应用受到限制。脂质体是肿瘤化疗药物的理想载体。可以在脂质体表面引入活性介导基团,依靠受体与配体之间的亲和力,通过其与靶细胞的特异性结合来实现专一靶向性。目前研究最多的这类脂质体是抗体修饰的脂质体,它具有细胞特异性,可以有效地将药物运送到靶细胞内,有效地杀灭靶细胞[2]。目前国内外研究较多的抗肿瘤靶向药物大多数属于单抗或以单抗为靶向载体的化学耦联物。粒-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)是一种在造血调控和免疫调节等方面有重要作用的细胞因子。大量研究表明大多数急性髓性白血病(acte myeloblastic leukemia, AML)细胞表达GM-CSF受体(GM-CSFR)[3]。GM-CSF具有较好的导向性,用其作为导向物质可以克服单克隆价格昂贵、人抗鼠抗体(HAMA)免疫原活性等问题[4-8]。本研究首先将DHAQ用脂质体包裹,制备出米托蒽醌脂质体(liposome-entrapped mitoxantrone, LEM),再将LEM与GM-CSF耦联形成米托蒽醌脂质体GM-CSF耦联物(LEM-GM-CSF)。LEM-GM-CSF可特异性地作用于表达GM-CSFR的肿瘤细胞,以提高DHAQ对肿瘤细胞的杀伤力;同时减少对正常组织细胞的不良作用。

1 材料与方法

1.1 材料

HL60/ADM细胞系由中国医学科学院血液学研究所提供,其GM-CSF结合位点平均为322个/HL60/ADM细胞,对DHAQ的耐药倍数为14[3]。

DHAQ原料药(重庆凯林制药有限公司),GM-CSF原料药(北京北医联合医药有限公司),胆固醇、卵磷脂、MTT、DMSO(Sigma公司),PE-抗人GM-CSF抗体及对照(美国Biolegend公司),胎牛血清(杭州四季青工程有限公司);Rotavapor Model-3旋转蒸发仪(上海医械专机厂),KQ2200B超声振荡仪(昆山市超声仪器有限公司),GL-20G-Ⅱ型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂),UV-751G分光光度仪(上海分析仪器厂),超净台(SW-CJ-ZE型,苏净集团苏州安泰空气技术有限公司),倒置显微镜(COIC型,重庆化学仪器厂),孵箱(TC2323-ZE型,美国SL公司)。

1.2 方法

1.2.1 LEM的制备 采用逆向蒸发法[9]。取10 mg DHAQ原料药,溶于蒸馏水中,将其缓慢加入卵磷脂2 g、胆固醇0.4 g的乙醚溶液,混匀后超声振荡30 min,减压蒸发40 min,30℃。高速离心20 min,上层蓝色乳液即为纯化的LEM,下层用于LEM包封率的测定。LEM包封率的测定:采用下式计算包封率(Qw%):

$$Qw\% = [(W_{总} - W_{游})/W_{总}] \times 100\%$$

$W_{总}$为DHAQ的总投样量,$W_{游}$为未包封的游离DHAQ含量。$W_{游}$的测定参照中国药典第二部中DHAQ和注射用DHAQ的含量测定项下的规定,采用比色法进行测定[10],在663 nm的波长处测定吸光度,DHAQ的吸收系数(E)为570。

1.2.2 LEM-GM-CSF的制备 采用戊二醛交联法[11]。取10%的LEM溶液13 ml,加入等量的25%戊二醛溶液中,室温20 ℃,放置10 min,过量的戊二醛用生理盐水透析4 h除去,加入1 mg GM-CSF原料药,4 ℃过夜。采用蔗糖密度梯度离心法分离游离的GM-CSF和LEM-GM-CSF[12]。

1.2.3 LEM-GM-CSF耦联率的测定 分离后的LEM-GM-CSF为脂质体-蛋白质复合物,用紫外分光光度法[11]测定其中蛋白质的含量即为耦联上的GM-CSF量。

耦联率=(纯化后LEM-GM-CSF的D值/纯化前LEM-GM-CSF的D值)×100%

1.2.4 LEM-GM-CSF中GM-CSF活性保留率的测定 采用流式细胞术(FCM)测定LEM-GM-CSF中GM-CSF活性的保留率。取对数生长期的HL60/ADM细胞,调成密度为5×10^5个/ml的细胞悬液,接种于6孔板上。实验分为3组:LEM-GM-CSF组加入浓度为2.5 μg/ml的LEM-GM-CSF溶液300 μl,GM-CSF组加入等体积浓度为0.9 μg/ml的GM-CSF溶液,空白对照组加入等体积生理盐水。于CO_2孵箱内培养2 h后,收集细胞,加入PE-抗人GM-CSF抗体,0.5 h后用PBS洗涤2次,流式细胞仪分析。根据下式计算LEM-GM-CSF中GM-CSF活性保留率:

保留率=LEM-GM-CSF组的活性细胞数/GM-CSF组的活性细胞数×100%

1.2.5 对体外HL60/ADM细胞的杀伤作用 取无药培养1周的HL60/ADM细胞,配成5×10^4/ml的细胞悬液,接种于96孔板中。实验分为4组:分别加入对数级稀释的各组溶液LEM-GM-CSF、LEM及DHAQ,空白对照组加入等体积的生理盐水。每个浓度组设3个复孔。置于CO_2孵箱内培养24、48 h后,吸去培养液,加入无血清的培养液和浓度为50 mg/ml的MTT溶液,CO_2孵箱中孵育4 h,离心,弃上清液,加入DMSO 150 μl/孔,振荡20 min,分光光度仪测定D(570)。按下式求细胞存活率,根据线性方程求IC_{50}。

细胞存活率=[处理组D(570)值/对照组D(570)值]×100%

细胞抑制率=1-细胞存活率

1.3 统计学分析

采用SAS 8.1软件包进行多个样本均数比较的F检验和进一步两两比较的q检验。

2 结果

2.1 LEM-GM-CSF的制备结果

2.1.1 LEM形态结果 粒径为170~220 nm,多为单层脂质体(图1)。

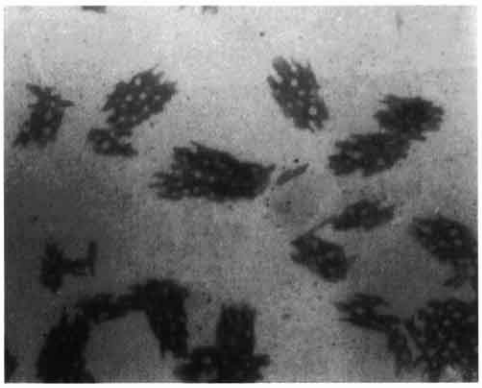


图 1　电镜下的脂质体　（TEM ×60 000）

2.1.2　LEM 的包封率　　LEM 的包封率为 80.1%，见表 1。

表 1　LEM 包封率测定结果

样本	包封率[$(\bar{x}\pm s)$%]	RSD(%)
1	81.71 ±0.86	1.06
2	78.36 ±0.56	0.71
3	80.23 ±0.60	0.75

2.1.3　LEM-GM-CSF-的耦联率　　LEM 与 GM-CSF 耦联后的耦联率为 42.3%，具体结果见表 2。

表 2　LEM 与 GM-CSF 的耦联率结果

样本	耦联率[$(\bar{x}\pm s)$%]	RSD(%)
1	41.01 ±0.52	1.27
2	43.50 ±0.67	1.54
3	42.39 ±0.36	0.85

2.1.4　GM-CSF 活性保留率结果　　由流式细胞仪测得。LEM-GM-CSF 组的活性细胞数为 25.08%，GM-CSF 组的活性细胞数 33.62%，由此算出 GM-CSF 活性保留率为 74.6%。

2.2　对体外 HL60/ADM 细胞的杀伤作用

经 LEM-GM-CSF、LEM、DHAQ 处理 24、48 h 后，HL60/ADM 细胞存活率（表 3、表 4）。

表 3　24 h 不同浓度的 LEM-GM-CSF、LEM、DHAQ 对 HL60/ADM 细胞的杀伤作用[SR，$(\bar{x}\pm s)$%]

浓度(μg/ml)	HL60/ADM 存活率		
	LEM-GM-CSF	LEM	DHAQ
0.0025	97.86 ±0.48	98.46 ±1.40	99.29 ±0.63
0.025	84.69 ±0.96[a]	97.74 ±0.93[b]	98.18 ±0.87[b]
0.25	75.22 ± 1.05[a]	83.77 ±0.99[ab]	95.72 ±0.41[b]
2.5	63.02 ±1.29[a]	67.28 ±0.80[ab]	87.45 ±0.76[b]
25	19.86 ±0.75[a]	28.40 ±1.86[ab]	54.41 ±1.02[b]

a：$P<0.05$，与相应浓度 DHAQ 组比较；b：$P<0.05$，与相应浓度 LEM-GM-CSF 组比较

表 4　48 h 不同浓度的 LEM-GM-CSF、LEM、DHAQ 对 HL60/ADM 细胞的杀伤作用[SR，$(\bar{x}\pm s)$%]

浓度(μg/ml)	HL60/ADM 存活率		
	LEM-GM-CSF	LEM	DHAQ
0.0025	85.22 ±1.47	97.96 ±0.41	99.49 ±0.44
0.025	75.94 ±1.05[a]	85.68 ±0.55[b]	95.16 ±1.82[b]
0.25	66.02 ±1.77[a]	73.16 ±1.49[ab]	86.96 ±0.42[b]
2.5	45.54 ±1.70[a]	53.46 ±1.04[ab]	68.18 ±3.28[b]
25	12.01 ±0.61[a]	20.22 ±0.95[ab]	28.16 ±1.58[b]

a：$P<0.05$，与相应浓度 DHAQ 组比较；b：$P<0.05$，与相应浓度 LEM-GM-CSF 组比较

LEM-GM-CSF、LEM 和 DHAQ 对 HL60/ADM 细胞作用 24 h 的 IC_{50} 分别是：8.73、12.42、27.31 μg/ml；作用 48 h 的 IC_{50} 分别是：0.62、8.25、12.44 μg/ml。LEM-GM-CSF、LEM 和 DHAQ 对 HL60/ADM 细胞都有一定的杀伤作用，但杀伤率存在较大差异，LEM-GM-CSF 对 HL60/ADM 细胞的杀伤效果最好，LEM 次之，DHAQ 最差。

3　讨论

白血病的导向治疗是目前研究的热点，而脂质体具有一定的靶向性，是肿瘤化疗药物的理想载体，但普通脂质体作为载体的靶向性是一种被动靶向性，它具有分布不理想、稳定性较差的缺点。为了提高脂质体的靶向性，近年来人们将对肿瘤细胞表面抗原具有特异性的抗体结合到脂质体的表面制成免疫脂质体，通过导向物质特异性与靶细胞表面的相应受体结合，使脂质体到达肿瘤靶部位释放药物，进一步提高了脂质体的靶向性。

目前国内外研究较多的抗肿瘤靶向药物大多数属于单抗或以单抗为靶向载体的化学耦联物。但单抗具有价格昂贵、反复注射鼠型单抗可产生 HAMA、不能多次重复使用等局限，从而限制了其临床的广泛应用。GM-CSF 是一种在造血调控和免疫调节等方面有重要作用的细胞因子。它与 GM-CSFR 结合后促进多种造血细胞的存活、增殖、分化，并通过提高中性粒细胞/单核细胞、树突状细胞等的数量发挥免疫调节作用。Abi-Habib 等用 ^{125}I 标记的 GM-CSF 来研究体外细胞系和来自急性白血病患者细胞相应受体的分布时发现：被研究的所有患者的白血病细胞和体外细胞株 HL60、KG-1 都表达 GM-CSFR[3]。此外，近年来国外学者也多次发表了用 GM-CSF 结合免疫毒素在治疗难治性和复发性 AML 的研究报道。国外正在进行 GM-CSF 携带生物毒素或药物治疗 AML 的Ⅰ期临床试验[13-15]。可见 GM-CSF 作为载体用于白血病的导向治疗是完全可行的。本研究采用的 LEM-GM-CSF 制备、纯化和鉴定方法具有可行性。用该法制备的 LEM-GM-CSF 具

有较高的药物包封率、耦联率和活性保留率。用 LEM-GM-CSF 导向治疗可能有几大优势：① 重组人 GM-CSF 容易得到，经济、实用，可以克服单克隆抗体价格昂贵、不能广泛运用的局限。② 克服了反复注射鼠型单抗导致 HAMA、不能多次重复使用的缺点。③ LEM-GM-CSF 载药量大，可特异性地作用于表达 GM-CSFR 的肿瘤细胞，明显提高肿瘤细胞内药物浓度。从而提高药物疗效，克服耐药。MTT 结果提示：LEM-GM-CSF 对 HL60/ADM 细胞具有显著的增殖抑制效应。LEM-GM-CSF 的 IC_{50} 明显的低于 LEM 及 DHAQ 的 IC_{50}。当药物作用 24 h 时，LEM-GM-CSF 的 IC_{50} 仅为 DHAQ 的 IC_{50} 的 1/3，而当药物作用 48 h 时，LEM-GM-CSF 的 IC_{50} 仅为 DHAQ 的 IC_{50} 的 1/20。由此说明 LEM-GM-CSF 制剂可明显提高 DHAQ 的药物效应，而且用其较低的剂量即可发挥强大的细胞杀伤作用，从而使 DHAQ 达到更好的抗白血病作用，同时有望降低药物的毒副作用。

参考文献：

[1] 潘启超，胥 彬. 肿瘤药理学与化学治疗学[M]. 郑州：河南医科大学出版社，2002：179－180.

[2] Cauchetier E, Paul M, Rivollet D, *et al*. Therapeutic evaluation of free and liposome-encapsulated atovaquone in the treatment of murine leishmaniasis [J]. Int J Parasitol, 2000, 30(6): 777－783.

[3] Abi-Habib R J, Liu S, Bugge T H, *et al*. A urokinase-activated recombinant diphtheria toxin targeting the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor is selectively cytotoxic to human acute myeloid leukemia blasts[J]. Blood, 2004, 104(7): 2143－2148.

[4] Feldman E, Kalaycio M, Weiner G, *et al*. Treatment of relapsed or refractory acute myeloid leukemia with humanized anti-CD33 monoclonal antibody HuM195[J]. Leukemia, 2003, 17(2): 314－318.

[5] Burke J M, Caron P C, Papadopoulos E B, *et al*. Cytoreduction with iodine-131-anti-CD33 antibodies before bone marrow transplantation for advanced myeloid leukemias[J]. Bone Marrow Transplant, 2003, 32(6): 549－556.

[6] Feldman E J, Brandwein J, Stone R, *et al*. Phase III randomized multicenter study of a humanized anti-CD33 monoclonal antibody, lintuzumab, in combination with chemotherapy, versus chemotherapy alone in patients with refractory or first-relapsed acute myeloid leukemia[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(18): 4110－4116.

[7] Kell W J, Burnett A K, Chopra R, *et al*. A feasibility study of simultaneous administration of gemtuzumab ozogamicin with intensive chemotherapy in induction and consolidation in younger patients with acute myeloid leukemia[J]. Blood, 2003, 102(13): 4277－4283.

[8] Sandmaier B M, Bethge W A, Wilbur D S, *et al*. Bismuth 213-labeled anti-CD45 radioimmunoconjugate to condition dogs for nonmyeloablative allogeneic marrow grafts[J]. Blood, 2002, 100(1): 318－326.

[9] 张敬如，黄复生，王 昆. 全反式维甲酸脂质体制备及稳定性研究[J]. 第三军医大学学报，2006，28(8)：807－809.

[10] 中华人民共和国药典委员会. 中国药典2000年版第二部[S]. 北京：化学工业出版社，2000：附录ⅡB，附录27.

[11] 牛荣丽，薛弘燮，李志良. 阿苯达唑免疫脂质体的制备[J]. 新疆医科大学学报，2001，24(1)：60－62.

[12] 汪 冰，杨翰仪，赵凤章，等. 用密度梯度离心法分离脂质体——IgG复合物与游离IgG[J]. 中华物理医学杂志，1993，15(1)：39－41.

[13] Frankel A E, Powell B L, Hall P D, *et al*. Phase I trial of a novel diphtheria toxin/granulocyte macrophage colony-stimulating factor fusion protein (DT388GMCSF) for refractory or relapsed acute myeloid leukemia[J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(5): 1004－1013.

[14] Burbage C, Tagge E P, Harris B, *et al*. Ricin fusion toxin targeted to the human granulocyte-macrophage colony stimulating factor receptor is selectively toxic to acute myeloid leukemia cells[J]. Leuk Res, 1997, 21(7): 681－690.

[15] Jedema I, Barge R M, Frankel A E, *et al*. Acute myeloid leukemia cells in G0 phase of the cell cycle that are unresponsive to conventional chemotherapy are sensitive to treatment with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/diphtheria toxin fusion proteins[J]. Exp Hematol, 2004, 32(2): 188－194.

（编辑 陈聪连）

文献标识码的标识方法

为了便于文献的统计和期刊评价，确定文献的检索范围，提高检索结果的适用性，每1篇文章或资料应标识1个文献标识码。一般设置以下5种标准：

A：理论与应用研究学术论文（包括综述报告）

B：实用性技术成果报告（科技）、理论学习与社会实践总结（社科）

C：业务指导与技术管理性文章（包括领导讲话、特约评论等）

D：一般动态性信息（通讯、服道、会议活动、考功等）

E：文件、资料（包括历史资料、统计资料、机构、人物、书目、知识介绍等）

不属于上述各类的文章以及文摘、索引、补白、广告、启事等不加文献标识码。