文章编号:1000-5404(2012)05-0427-04

论著

载紫杉醇-阿霉素微泡的制备以及控制释放研究

李 露,陈娟娟,刘先俊 (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院分子医学与肿瘤研究中心)

[摘要] **目的** 制备能同时携带2种抗肿瘤药物的脂质微泡,对其载药量以及体外控制释放能力进行研究。**方法** 以机械振荡法制备脂质微泡,嵌入法对紫杉醇进行装载以及生物素-亲和素体系连接阿霉素脂质体。粒径分析仪以及荧光显微镜对其表征分析,紫外分光光度法以及酶标仪分别测定紫杉醇和阿霉素载药量;在超声辐照条件下,促使微泡对紫杉醇以及阿霉素的释放,并测定各自药物释放量确定超声辐照微泡的药物释放效率。**结果** 粒径分析仪测得载药微泡其粒径约为(1.45±0.27)μm,荧光显微镜下能够观察到微泡周围显红色荧光;以3 mg固定磷脂用量,紫杉醇最大包封率为(54.64±2.98)%,每10^8个微泡载阿霉素量为(4.52±0.53)μg;当超声波机械指数为1.0时(MI=1.0),90%的微泡破碎以及紫杉醇和阿霉素释放率分别为15%和80%。**结论** 载药微泡在超声辐照作用下具有良好的药物释放能力,能够在超声图像辅助给药体系为肿瘤治疗提供一种有效的双药载体。

[关键词] 微泡;药物载体;紫杉醇;阿霉素;控制释放
[中图法分类号] R943; R944.9; R979.1 [文献标志码] A

Preparation and controlled-release characteristics of microbubbles loaded with paclitaxel and doxorubicin

Li Lu, Chen Juanjuan, Liu Xianjun (Molecular Medicine and Cancer Research Center, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To prepare ultrasound microbubbles (MBs) which can simultaneously load two anticancer drugs and investigate the drug-loading capacity and controlled-release characteristics. **Methods** MBs were fabricated by mechanical oscillation. Paclitaxel (PTX) was embedded into the membrane of MBs, and liposomes loaded with doxorubicin (DOX) were connected with MBs by biotin avidin linker system. The properties of prepared MBs were analyzed for their size by particle size analyzer and for their surface features by fluorescent microscopy. UV-visible spectrometry and multi-function microplate reader were used to identify their loaded doses of PTX and DOX respectively. The efficiency of ultrasound mediated drug release were identified by measuring the amount of PTX and DOX releasing from MBs. **Results** The prepared MBs were in an average diameter of (1.45±0.27) μm with red fluorescent surrounding. When 3 mg phospholipid was given, the maximum of PTX encapsulation efficiency was (54.64±2.98)% and each 1×10^8 microbubbles containing (4.52±0.53) μg DOX. When ultrasonic applications had the mechanical index of 1.0 (MI=1.0), the destruction of the MBs was 90% and the efficiency of PTX and DOX releasing were 15% and 80%, respectively. **Conclusion** Ultrasound radiation triggers drugs releasing from MBs, which might be used as an effective drug carrier that combining ultrasound image and drug delivery in the field of oncology treatment.

[**Key words**] microbubble; drug carrier; paclitaxel; doxorubicin; controlled release

Corresponding author: Liu Xianjun, E-mail: lxj6422@yahoo.com.cn

靶向治疗因其在疾病治疗过程中能够大大提高药物的疗效以及减少不良反应,尤其在肿瘤治疗领域,而被认为是一种理想的治疗模式[1]。目前,已在多个相关领域开展研究,超声辅助微泡定向爆破技术,在疾病靶向治疗中具有较好的应用前景。其中微泡作为一种有效的药物载体而受到人们广泛重视[2-3],它是一类其内充满特殊气体的小球体,根据包膜材料不同分为磷脂类微泡、白蛋白微泡、可降解高分子化合物微泡等,并联合超声辐照作为一条无创、高效、安全的治疗途径[4-5]。

[通信作者] 刘先俊,E-mail: lxj6422@yahoo.com.cn

本实验以生物相容性较高的磷脂作为原材料，采取嵌入法和生物素-亲和素体系，对两种极性不同的抗肿瘤药物——紫杉醇和阿霉素进行装载，希望为联合超声图像辅助给药体系在肿瘤治疗领域提供一种有效的双药载体。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

二棕榈酰磷脂酰胆碱（DPPC），二硬脂酰磷脂酰胆碱（DSPC），聚乙二醇2000-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺（DSPE-PEG2000），生物素化聚乙二醇-2000-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺（Bio- DSPE-PEG2000）（Avanti Lipoid，美国），胆固醇（Chol，Sigma，美国），紫杉醇（PTX，Sigma，美国），盐酸阿霉素（DOX，阿拉丁试剂），亲和素（Avdin，Sigma，美国），八氟丙烷（C_3F_8，天津核工业理化研究所），其他试剂均化学纯。

2.25 MHz聚焦超声探头（Valpey Fisher，美国），任意波形发生器（Tektronix，美国），信号放大器（150A100B，测仪联系，美国），多功能酶标仪（Biotek，美国），紫外分光光度计（PerkinElmer，美国），倒置荧光显微镜（Leica，德国），台式冷冻离心机（Thermo Fisher，德国），AccuSizer 780A粒度分析仪（PSS，美国），旋涡混合器（Labnet，美国），高频机械振荡仪（重庆影像研究所）。

1.2 方法

1.2.1 载紫杉醇微泡的制备　首先通过水化薄膜法获得紫杉醇脂质体，再经机械振荡制备载紫杉醇微泡，其方法如下：取DSPC，DSPE-PEG2000，Bio-DSPE-PEG2000（摩尔比为9∶5∶5）氯仿溶液，转移至洗净干燥试管内，并根据需求加入一定量的紫杉醇，通入氮气吹干形成磷脂膜，45 ℃真空干燥箱内除去残余氯仿，向试管内加入pH值为7.4缓冲液（Tris，甘油，1，2-丙二醇体积比为8∶1∶1），将其置于62 ℃水浴超声清洗仪内处理至均匀乳浊液，磷脂最终浓度为3 mg/ml。

将上述制备的紫杉醇脂质体，分装于西林瓶内加盖密封后，C_3F_8气体置换，高频振荡仪机械振荡45 s，即完成载紫杉醇微泡的制备，取10 μl微泡悬浮液，通过粒度分析仪进行粒径大小测定以及浓度分析。

1.2.2 载阿霉素脂质体的制备　利用脂质体对阿霉素进行被动装载，其方法如下：取DPPC∶Chol∶Bio-DSPE-PEG2000（摩尔比为60∶40∶5），制备空白脂质体，其步骤同1.2.1，磷脂最终浓度为10 mg/ml。然后，取空白脂质体1 ml置于EP管内，并加入1 mg阿霉素至完全溶解，将其置于65 ℃水浴约4 h，完成脂质体对阿霉素的封装。最后，将EP管置于14 000×g条件下离心10 min，除去游离阿霉素，收集阿霉素脂质体存于4 ℃冰箱备用。

1.2.3 微泡与阿霉素脂质体连接　取上述PBS稀释后的生物素化微泡1 ml（约为10^8个），加入500 μl亲和素（10 mg/ml），室温孵育15 min，离心洗涤（400×g，3 min）除去过量亲和素后，加入200 μl阿霉素脂质体，孵育15 min，再次离心洗涤，收集微泡，荧光显微镜进行观察，并拍照。

1.2.4 载紫杉醇浓度测定　紫杉醇溶于甲醇和N，N-二甲基乙酰胺（体积比1∶2），以半倍稀释法配置（25～400）μg/ml，紫外分光光度仪（265 nm）读取各标准溶液相应光密度值。

微泡载紫杉醇包封率分析：首先取10 μl洗涤后的载紫杉醇微泡，通过粒径分析仪确定微泡浓度，然后样品内加入1%破乳剂Triton X-100进行完全裂解，再加入三氯甲烷对紫杉醇进行抽提，氮气吹干，再次加入甲醇和N，N-二甲基乙酰胺（体积比1∶2），在紫外分光光度计265 nm条件下测定其光密度值，标准曲线法计算其载药量。

1.2.5 载阿霉素浓度测定　通过半倍稀释法配置（1.125～18）μg/ml阿霉素溶液，并在酶标仪条件下（激发光480 nm，发射光590 nm）读取相对荧光强度。

载阿霉素浓度测定：取10 μl载阿霉素微泡通过粒径分析仪确定微泡浓度，然后样品以1%破乳剂Triton X-100处理，最后收集溶液，酶标仪测定溶液相对荧光强度，标准曲线法计算其载药量。

1.2.6 超声对药物的释放效率研究　根据不同超声机械指数分成MI=0.35组、MI=0.7组、MI=1.0组，一并设置紫杉醇以及阿霉素完全裂解组，紫杉醇完全裂解组其测定紫杉醇方法同1.2.4，阿霉素完全裂解组其测定方法同1.2.5。其余处理组实验方法如下：首先需通过粒径分析仪确定微泡粒径分布以及浓度，再取1 ml载紫杉醇-阿霉素微泡悬浮液，将其置于EP管内，2.25 MHz，周期为50%，辐照30 s后，再次测定微泡粒径分布以及浓度，再以低速离心（400×g，3 min）条件收集紫杉醇沉淀，并加入甲醇和N，N-二甲基乙酰胺（体积比1∶2），紫外分光光度仪测定各组内紫杉醇溶液的光密度值。液相层则通过超速离心（14 000×g，3 min）方式分离脂质体与游离阿霉素，最终将获得的阿霉素溶液，通过酶标仪测定各组内阿霉素溶液的相对荧光强度。

$$药物释放率=\frac{超声处理组游离药物量}{完全裂解组药物总量}\times 100\%$$

$$微泡破碎率=\frac{超声处理组}{超声处理前}\times 100\%$$

1.3 统计学方法

采用Excel软件进行统计处理，数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用线性回归分析、单因素方差分析进行比较。

2 结果

2.1 标准曲线绘制

紫杉醇标准曲线绘制，在紫外分光光度仪（265 nm）条件下，读取各标准溶液吸光系数分别为0.042、0.069、0.154、0.264、0.503。并以紫杉醇浓度为横坐标，光密度值为纵坐标，绘制标准曲线，线性回归方程为$y=0.001\ 2x+0.016\ 5$，$R^2=0.997\ 5$。

阿霉素标准曲线绘制，在酶标仪（激发光480 nm，发射光590 nm）条件下，读取各标准溶液相对荧光强度分别为375、761、1 368、2 533、4 720。并以相对荧光强度为横坐标，阿霉素浓度为纵坐标，绘制标准曲线，线性回归方程为$y=0.003\ 9x-0.673$，$R^2=0.998\ 6$。

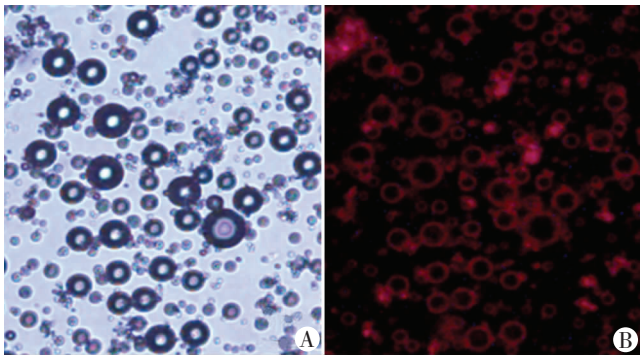
2.2 载紫杉醇、阿霉素微泡表征以及其载药量分析

紫杉醇以嵌入方式装载于磷脂疏水层，分别对各组内微泡的浓度和载药量进行分析，其结果如表 1 所示，以固定 3 mg 磷脂量，当加入药量为 200 μg 时，紫杉醇的包封率达到为 54.64%，每 10^8 微泡携带紫杉醇为 24.26 μg，当紫杉醇浓度提高到 800 μg 时，微泡载药量虽然成倍增加，但是其包封率却大大降低，此外，随着紫杉醇浓度的改变，微泡浓度从最初 5.72×10^8 个/ml 降至 3.48×10^8 个/ml，减少近 2 倍。微泡平均粒径分布位于 1.43～1.63 μm 之间，各组之间并无明显差异。

进一步借助于生物素-亲和素体系对阿霉素脂质体进行装载，结果如图 1 所示，白光视野下微泡粒径分布大小不均，无聚集现象，粒径分析仪确定微泡连接前后粒径有微小改变，但其平均粒径仍小于 2 μm；荧光显微镜下，微泡周围呈花环状红色荧光，并对其载药量分析，每 10^8 个微泡携带阿霉素约为（4.52 ± 0.53）μg，此外，由于微泡生物素修饰程度的可控性，还能够进一步提高对阿霉素脂质体的装载能力。

表 1 紫杉醇对微泡粒径、浓度、包封率以及载药量的影响（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

PTX 量（μg）	微泡浓度（10^8 个/ml）	平均粒径（μm）	包封率（%）	载药量（μg/10^8 个）
100	5.72 ± 0.25	1.63 ± 0.28	41.51 ± 3.82	7.23 ± 1.25
200	4.57 ± 0.34	1.46 ± 0.07	54.64 ± 2.98	24.26 ± 3.76
400	4.14 ± 0.52	1.43 ± 0.12	37.52 ± 1.72	36.71 ± 5.32
800	3.48 ± 0.72	1.47 ± 0.05	30.62 ± 2.67	70.73 ± 8.54

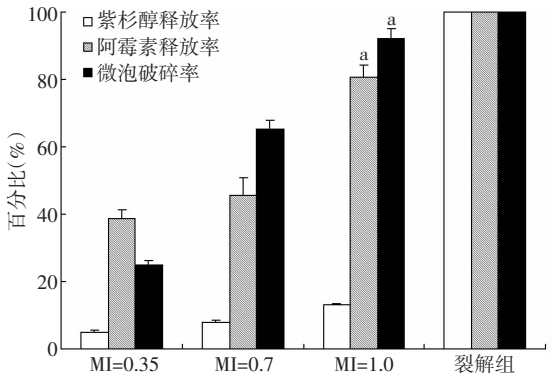


A：普通视野下观察；B：荧光显微镜观察

图 1 载阿霉素脂质体与微泡连接情况（×200）

2.3 超声辐照对载药微泡的影响

当载药微泡分别通过不同超声机械指数处理后，其结果如图 2 显示随着机械指数的增加微泡破碎率以及药物释放率都有所提升，当在较低机械指数时 MI = 0.35，微泡破碎率约为 25%，阿霉素释放率则达到 40%，紫杉醇释放不明显。然而，当达到较高机械指数时 MI = 1.0，90% 以上的微泡发生破碎，阿霉素释放效率提升至 80%，然而，疏水性较强的紫杉醇释放率虽然有所增加，但也仅为 15% 左右。同时，我们对超声前后微泡粒径相对分布进行测定，如图 3，随着机械指数的增加各组内微泡浓度逐渐降低，其相对粒径分布趋势线发生明显改变，小于 2 μm 的微泡相对分布有所减少，然而大于 2 μm 的微泡则有所增加。



a：$P<0.05$，与 MI = 0.7 比较

图 2 不同机械指数对微泡的破碎率、紫杉醇以及阿霉素释放率的影响

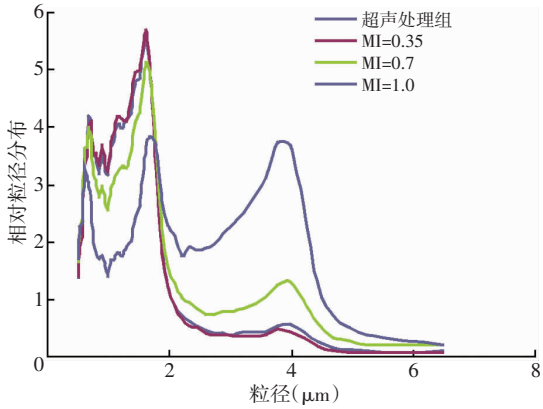


图 3 不同机械指数处理对微泡粒径分布的影响

3 讨论

目前，脂质微泡作为一类超声造影剂，已在临床方面进行大量使用。然而，随着研究的进一步深入，脂质微泡的功能不仅局限于在疾病诊断方面的应用，而且在疾病治疗领域，如化学药物治疗和基因治疗等方面，也显示着诱人的应用前景[6]。其中关于超声图像辅助给药体系已成为研究的重点领域，它主要依赖超声微泡造影剂，以微泡作为药物载体，借助超声成像系统对载药微泡进行实时成像，并在较高机械指数的超声辐照下，促使微泡在局部发生破裂，达到体外监测并控制药物局部释放的目的[7]。由于在该体系中微泡作为重要的药物/DNA 输送工具以及造影剂，起着决定性的作用，那么关于微泡制备以及载药方式等方面也就成为研究的热点。

紫杉醇是一类有效的细胞周期阻滞剂，能够特异性地与细胞的微管结合，干扰细胞的正常分裂。但因其水溶性低，常常需要与一些增溶剂一起使用，如聚氧乙烯蓖麻油和无水乙醇，易引起机体过敏反应和神经毒性等。阿霉素则是一类与细胞 DNA 特异性结合的化学合成药物，能够抑制细胞 DNA 以及 RNA 的合成，并诱导细胞凋亡，但其细胞毒性大，易造成全身不良反

应,目前,它们仍作为抗肿瘤药物在临床上的使用[8-10],最近的研究结果表明通过药物的联合应用其治疗效果明显优于单药[11]。然而,微泡作为一类新型的药物载体,有能力在构建双药体系表现出其自身的优势。

本实验分别通过嵌入法以及生物素-亲和素体系对上述两种不同溶解特性的抗肿瘤药物进行同时装载。通过粒径分析仪测得载双药微泡的其平均粒径小于2 μm,满足顺利通过肺循环的要求,以及实验中所采用具生物相容性较好的磷脂作为原材料,保证了其造影的安全性,为今后进一步在临床上的应用奠定基础。微泡作为新型的药物承载者,在载药方式以及能力方面有着自身的优势,对紫杉醇的装载,仅通过对载紫杉醇脂质体进行简单的机械振荡,就能够获得载有紫杉醇的微泡。对其载药能力分析结果显示,当以3 mg磷脂为固定量,加入200 μg紫杉醇时,虽然较单纯脂质体的载药量有所降低,但微泡仍然能有效地对紫杉醇进行装载,并且其最大包封率能够达到54.64%,此外,研究发现随着紫杉醇用量的增加,而微泡的成泡率有所下降,并且紫杉醇的装载效率大大降低,这可能是由于紫杉醇的引入,在脂质微泡单层膜形成过程中,影响了磷脂分子的重排。微泡对阿霉素的装载方面,本次实验采取较为经典的生物素-亲和素体系,利用微泡外周的亲水层携带生物素修饰的阿霉素脂质体,当磷脂各成分物质的量比在9∶5∶5的条件下,得到的载药微泡,既能够满足对微泡较高分散性的要求,而且也能够满足对阿霉素装载的有效浓度,其结果显示每10^8个微泡可携带阿霉素量约为(4.52±0.53) μg。

本次实验通过上述两种方法成功构建了以微泡为核心的双药载体,并且在超声辐照时,具有较好的药物释放效能。微泡在较高机械指数作用下表现出较高的破碎率,与此同时阿霉素以及紫杉醇释放率也相应提升,但是根据实验结果来看阿霉素的释放效率远远优于紫杉醇,其原因主要受各自的溶解特性的影响。其实,在超声辐照时,微泡受到不对称的拉升以及压缩,最终发生破裂,其表现形式主要两种:一种仅造成内部气体的溶出,微泡坍塌,固缩;另一种能够将微泡崩裂形成更小的碎片。由于紫杉醇脂溶性的特点,对其快速释放能力形成一定的困难,但就这一药物释放模式,在肿瘤化疗过程中,却有着它自身的优势,如:一方面可以利用迅速释放的阿霉素对靶组织进行早期的快速杀伤,另一方面借助脂质体对紫杉醇的缓释能力,进一步对靶组织形成持续杀伤,最终达到药物治疗的目的。

最后,通过测定超声辐照后各组内微泡粒径的相对分布,其结果显示,较未处理时,微泡粒径发生了较大的改变,其中较小粒径显著减少,其原因可能与微泡的共振频率有关,当较小粒径的微泡共振频率较为接近超声发射频率时,形成较强的瞬时空化作用,有利于载药微泡的药物释放,但是在微泡发生强空化效应时,往往伴随有较高能量的产生,如果使用不当,易对组织造成机械损伤,因此,在我们今后的研究过程中,还应该对其相关的超声参数进行优化,通过选取合适的超声探头,适宜的超声辐照时间以及机械指数等,一方面保证载药微泡在体内的局部药物释放效率,另一方面应当尽量避免或者减小因为超声辐照对机体组织所造成的损伤,确保使用安全[12]。

本实验以微泡为载体核心,不仅满足同时对两种抗肿瘤药进行装载,而且在超声辐照下也表现出良好的药物释放能力,能够为今后超声图像辅助给药体系在肿瘤治疗领域的应用提供新方法。

参考文献:

[1] Yeo Y. Battling with environments: drug delivery to target tissues with particles and functional biomaterials[J]. Ther Deliv, 2010, 1(6): 757-761.

[2] Rapoport N, Nam K H, Gupta R, *et al*. Ultrasound-mediated tumor imaging and nanotherapy using drug loaded, block copolymer stabilized perfluorocarbon nanoemulsions[J]. J Control Release, 2011, 153(1): 4-15.

[3] Klibanov A L. Microbubble contrast agents: targeted ultrasound imaging and ultrasound-assisted drug-delivery applications[J]. Invest Radiol, 2006, 41(3): 354-362.

[4] Tinkov S, Bekeredjian R, Winter G, *et al*. Microbubbles as ultrasound triggered drug carriers[J]. J Pharm Sci, 2009, 98(6): 1935-1961.

[5] 吴青, 朱照静. 10-羟基喜树碱乳酸-羟基乙酸共聚物超声微泡制备及工艺优化[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(14): 1349-1352.

[6] Mayer C R, Geis N A, Katus H A, *et al*. Ultrasound targeted microbubble destruction for drug and gene delivery[J]. Expert Opin Drug Deliv, 2008, 5(10): 1121-1138.

[7] Deckers R, Moonen C T. Ultrasound triggered, image guided, local drug delivery[J]. J Control Release, 2010, 148(1): 25-33.

[8] Friedrich M, Diesing D, Villena-Heinsen C, *et al*. Taxanes in the first-line chemotherapy of metastatic breast cancer: review[J]. Eur J Gynaecol Oncol, 2004, 25(1): 66-70.

[9] Sakamoto J, Matsui T, Kodera Y. Paclitaxel chemotherapy for the treatment of gastric cancer[J]. Gastric Cancer, 2009, 12(2): 69-78.

[10] Wong A, Soo R A, Yong W P, *et al*. Clinical pharmacology and pharmacogenetics of gemcitabine[J]. Drug Metab Rev, 2009, 41(2): 77-88.

[11] Briasoulis E, Karavasilis V, Tzamakou E, *et al*. Interaction pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin (Caelyx) on coadministration with paclitaxel or docetaxel[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2004, 53(5): 452-457.

[12] Choi J J, Feshitan J A, Baseri B, *et al*. Microbubble-size dependence of focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening in mice *in vivo*[J]. IEEE Trans Biomed Eng, 2010, 57(1): 145-154.

(**收稿**:2011-10-08;**修回**:2011-11-28)

(编辑 张 维)