药 学 文章编号:0253-3626(2009)01-0329-02

阿霉素脂质体的制备及对 MCF-7/DOX 作用的考察

颜 科,胡春梅,潘黎军,王 驰
(重庆医科大学药学院药化教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:制备阿霉素(Doxorubicin,DOX)脂质体,并考察其对耐阿霉素的人乳腺癌细胞(MCF-7/DOX)的作用。方法:采用硫酸铵梯度法制备脂质体;采用 MTT 法考察 DOX 脂质体对 MCF-7/DOX 的细胞毒性和逆转多药耐药(Multydrug resistance,MDR)的效果。结果:阿霉素的平均包封率为 90.77%。脂质体的细胞毒性实验结果显示,DOX 脂质体的 IC_{50} 比游离 DOX 小 4 倍;DOX 脂质体对 MCF-7/DOX 的逆转倍数是游离 DOX 的 4 倍。结论:硫酸铵梯度法适用于制备 DOX 脂质体,其具有较好的细胞毒性作用及一定的逆转 MCF-7/DOXMDR 的作用。

【关键词】阿霉素脂质体;硫酸铵梯度;多药耐药;人乳腺癌细胞
【中国图书分类法分类号】R943 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-06-17

Preparation of doxorubicin liposome and their effect on human MCF-7

YAN Ke, et al
(*Department of Pharmaceutical Chemical Pharmacy Laboratory College of pharmacy, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To prepare doxorubicin liposome and investigate its effect on human MCF-7 in vitro. *Methods*: DOX liposome was prepared by $(NH4)_2SO_4$-gradient method. The MTT method was used to test cytotoxicity and reverse multidrug resistance of DOX liposome on MCF-7/DOX. *Results*: DOX was encapsulated by 90.77%. The results of liposome MTT experiment suggested that IC_{50} of free DOX was 4 times bigger than DOX liposome. The DOX liposomes' reversing effect on MDR was 4 times as much as that of free DOX. *Conclusion*: The method of $(NH_4)_2SO_4$ gradient is suitable for producing DOX liposome and it has better cytotoxicity and reversing MDR effect on MCF-7 than free DOX.

【Key words】DOX liposome; $(NH_4)_2SO_4$ gradient method; Multidrug resistance; MCF-7

随着化疗药物的频繁使用,多药耐药(Multidrug resistance,MDR)问题已成为目前临床肿瘤治疗中的主要障碍[1]。近年来研究发现:脂质体作为药物递送系统(Drug delivery system,DDS)中的一种,除具有延长药物在体内循环时间、缓释、控释抗肿瘤药物等作用外,还具有一定的逆转肿瘤 MDR 的作用[2]。本文将抗肿瘤模型药物阿霉素(Doxorubicin,DOX)包封于脂质体中,进行体外细胞毒性考察,为进一步研究脂质体剂型对逆转肿瘤 MDR 机制积累了一定实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

RE-52 型真空旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);UV-2102PC 紫外分光光度计(日本尤尼可公司);pHS-3C 型精密酸度计(上海雷磁仪器厂);聚碳酯膜过滤器(Millipore 公司);LG10-2.4A 离心机(北京医用离心机厂);阿霉素原料药(浙江海正药业股份有限公司);卵磷脂(上海国药集团化学试剂有限公司);胆固醇(广州天马精细化工厂);Sepharose CL-4B(Sigma 公司);透析袋(MW 12 000~14 000)(Sigma 公司);孔径分别为 0.8 μm、0.45 μm、0.2 μm 的聚碳酯膜(Whatman 公司);乳腺癌细胞 MCF-7(中科院上海细胞库);乳腺癌耐阿霉素细胞 MCF-7/DOX (中科院上海细胞库);胎牛血清(Gibco 公司);RPMI1640 培养液(Gibco 公司);四甲基偶氮唑盐(MTT)(Sigma 公司);二甲亚砜(DMSO)(Sigma 公司);其余试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 DOX 脂质体的制备

采用硫酸铵梯度法[3]制备 DOX 脂质体,分别称取处方量的卵磷脂、胆固醇,置 500 ml 圆底烧瓶,加氯仿溶解。旋转减压蒸发下除去氯仿,40℃真空干燥过夜。加入 250 mmol/L 硫酸铵溶液将脂膜水化。充氮气,在 50℃水浴中温育,超声。取脂质体悬浮液 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。脂质体囊泡经过聚碳酯膜(膜孔直径分别为 0.8 μm、0.45 μm、0.2 μm)依次挤压后形成带有硫酸铵梯度的空白单室脂质体。在上述空白脂质体中逐滴加入含

作者介绍:颜 科(1983-),男,硕士,
研究方向:肿瘤靶向研究。
通讯作者:王 驰,男,副教授,E-mail:Wchi639@sohu.com。

5 mgDOX 的溶液，混匀，水浴 40℃孵育 20 min，即得 DOX 脂质体。

1.2.2 DOX 脂质体质量评价

1.2.2.1 光谱分析 用 PBS（pH 7.4）配制一定浓度的 DOX 标准品溶液，以 PBS 为空白在 220~600 nm 波长范围内进行紫外扫描，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 0.5 ml，用 Triton-100 破乳后，用甲醇稀释到 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。

1.2.2.2 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）溶解并定容至刻度，混匀，即得浓度为 100 μg/ml 的标准储备液。精密吸取上述 DOX 标准储备液 0.1 ml，0.2 ml，0.5 ml，1 ml，2 ml，4 ml，6 ml，加至 10 ml 容量瓶中，PBS 稀释并定容至 10 ml 刻度，混匀即得浓度为 1.0 μg/ml，2.0 μg/ml，5.0 μg/ml，10.0 μg/ml，20.0 μg/ml，40.0 μg/ml，60.0 μg/ml 的 DOX 标准液。以 PBS 为空白，480 nm 波长处测定以上各溶液的吸收度。以吸收度（A）对 DOX 浓度（C）进行线型回归，求回归方程。

1.2.2.3 包封率的测定 取 DOX 脂质体混悬液 0.5 ml 过 Sepharose CL-4B 葡聚糖凝胶柱，用 PBS 以 0.3 ml/min 流速洗脱，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 DOX 浓度，按下式计算包封率：包封率 $=E_W$（%）$=W_{包}/W_{总}\times 100\%$，$W_{总}$：投入总药物量，$W_{包}$：包入脂质体的药物量。

1.2.2.4 脂质体粒径测定及形态观察 适量生理盐水稀释脂质体后，采用激光散射粒径仪测定脂质体粒径；取用生理盐水稀释后的脂质体，滴至载玻片上，以 1%（m/v）磷钨酸负染后，再滴至专用铜网上，自然挥干，使粒子在铜网上浓缩沉积，用透射电镜观察脂质体形态。

1.2.2.5 DOX 脂质体体外细胞毒性试验（MTT 法[4]） MCF-7/DOX 细胞在不含 DOX 的 RPMI1640 培养液中培养 2 周后备用。取对数生长期细胞用胰酶消化后，调整 MCF-7、MCF-7/DOX 两种细胞浓度为 5×10^6 个/ml，按每孔 200 μl，接种于 96 孔板中，分别加入不同终浓度的 DOX，每组设四复孔，在 37℃，5%CO_2 条件下培养 72 h 后，每孔加入 MTT 继续培养，4 h 后，吸掉上清液，每孔加入 DMSO 200 μl，以 570 nm 波长检测每孔吸光度（A）值，按下式计算细胞抑制率：细胞抑制率%=（1－实验组 A 值/对照组 A 值）×100%。采用回归方程式分别求出两种细胞对 DOX 的 IC_{50} 值，以上过程重复 3 次。再将以上各组数据代入下式计算逆转倍数和耐药指数：逆转倍数 = 耐药细胞逆转前 IC_{50}/耐药细胞逆转后 IC_{50}，耐药指数（RI）= 耐药细胞 IC_{50}/亲本细胞 IC_{50}。

然后以相同的方法检测 DOX 脂质体的 IC_{50}，逆转倍数和耐药指数。

2 结 果

2.1 DOX 脂质体质量评价

DOX 回归方程为 A=0.018 9C-0.006 5，r= 0.999 5，P<0.001，平均回收率为 99.1%（n=3）。DOX 脂质体的平均包封率为 90.77%（n=5）。用硫酸铵梯度法制备的 DOX 脂质体平均粒径为（76±22.3）nm（n=4），电镜下可见挤压后获得的脂质体混悬液中含有分布均匀的单室脂质体囊，多呈球形或椭球形，见图 1。

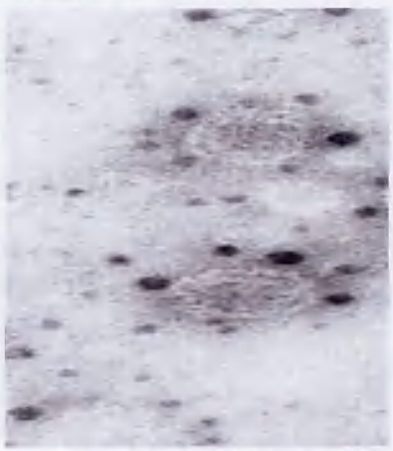


图 1 DOX 脂质体透射电镜照片（×12 000）

2.2 DOX 脂质体体外细胞毒性试验

DOX 组对 MCF-7/DOX 的 IC_{50} 比 DOX 脂质体组的大 4 倍，其耐药指数也比 DOX 脂质体组大 4 倍，结果见表 1。表明将 DOX 制成脂质体剂型后其对 MCF-7/DOX 的杀伤作用增强且有一定的逆转效果。

表 1 DOX 组与 DOX 脂质体组对 MCF-7/DOX 的作用

组 别	IC_{50}（μg/ml）	逆转倍数	耐药指数（RF）
阴性对照（DOX 水溶液）	3.822	—	152.90
DOX 脂质体组	0.982	3.89	39.28

注：DOX 组与 DOX 脂质体组之间比较，P<0.05

3 讨 论

脂质体是磷脂分散在水中时形成的脂质双分子层，其内部为水相的闭合囊泡 由于其结构类似生物膜，故又称人工生物膜（Artificial biological membrane），其作为药物的载体具有以下优点：（1）脂质体载体能保护被包裹物；（2）能有效地控制药物释放；（3）通过改变脂质体大小和电荷，可以控制药物在组织内的分布与在血液中的清除率；（4）改变某种物理因素，例如改变用药局部的 pH、病变部位的温度等，能明显改变脂质体膜的通透性，使脂质体选择性地释放药物；（5）可用 mAb 等配体修饰脂质体，使药物靶向病变部位（即药物导弹）；（6）脂质体

临床研究 文章编号:0253-3626(2009)01-0331-04

大动脉转位并室间隔完整患儿的术前治疗策略

吴晓云[1], 田 杰[1], Nick Archer[2]
(1.重庆医科大学附属儿童医院心血管内科,重庆 400014;2.牛津儿童医院小儿心内科,牛津 OX3 9DU)

【摘 要】目的:探讨大动脉转位并室间隔完整(Transposition of the great rteries-intactventriculon septum,TGA-IVS)患儿的术前诊治。方法:收集 28 例确诊为 TGA-IVS 病例的完整临床资料,分析患儿的主要临床表现,确诊依据,术前治疗方案,术前死亡率、并发症等相关资料。结果:本组病例男 19 例,女 9 例,平均妊娠年龄 38[+4] 周,平均产重 3.244 kg。产前诊断 7 例(25%),产后诊断 21 例(75%),产后平均确诊年龄为 45 h,均不伴有染色体异常及心外畸形。所有患儿均以紫绀为最突出和首要的临床表现。一旦经超声心动图检查确诊或高度疑诊,立即给予前列腺素 E_2(PGE_2)持续滴注,其中 25 例(89%)有效的维持了动脉导管的开放,并于确诊后成功施行了球囊房间隔造口术(BAS),BAS 时患儿的平均年龄为 21 h,平均血氧浓度从 BAS 前的 (56 ± 26)% 提高至 BAS 后的 (82 ± 19)%($P<0.05$),术前死亡及严重并发症各 1 例(3.5%),其中 9 例(32%)病情稳定的患儿回家观察,等待手术。结论:本组病例术前 100%采用了 PGE_2 及 BAS 治疗,其应用安全、有效,能显著提高血氧浓度,降低术前并发症及死亡率,及时挽救患儿的生命,为进一步手术治疗的宝贵时机。

【关键词】先天性心脏病;大动脉转位;球囊房间隔造口术;前列腺素
【中国图书分类法分类号】R541.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-09-22

作者介绍:吴晓云(1966-),女,副教授,博士,
研究方向:儿童先天性心脏病的基础及临床研究。

基金项目:国家留学基金委"西部地区人才培养特别项目"
(留金出[2004]3050 号)资助。

本身对人体无毒性和免疫抑制作用。因此,脂质体在许多疾病,尤其在癌症治疗中显示出明显的优越性。

脂质体给药系统的有效性在于其可使抗肿瘤药物用量大大增加而不增加药物的毒副作用,其通过肿瘤组织特有的生理特性——通透性增强与滞留效应(Enhanced permeability and retention effect, EPR)可增加肿瘤组织与肿瘤细胞内药物的浓度,故与游离药物相比,脂质体包载药物时可增加药物的细胞毒性。本文将 DOX 制成脂质体剂型,提高了对细胞的有效杀伤能力。而相较于游离 DOX,脂质体剂型则有一定的逆转作用。

MDR 发生的机制与多种蛋白的表达和代谢有关:MDR 外排泵(p-glyco-protein,P-gp)、MDR 相关蛋白(Multidrug resistance-associated proteins,MRP1)以及拓扑异构酶等。其中,P-gp 介导的 MDR 在肿瘤的耐药形成中具有重要作用,被称为经典的 MDR。

脂质体包载抗肿瘤药物逆转 MDR 的假设机理目前包括脂质体直接与 P-gp 相互作用。中性磷脂酸如卵磷脂(PE)和磷脂酰乙醇胺(PC)等是多种脂质体的主要的组成成分,被认为是 P-gp 的作用底物,可与药物竞争 P-gp 结合位点。例如含 PC 和 PE 的脂质体使药物的内吞增加且增加 MDR 细胞的细胞毒性,这一现象不但发生在脂质体包载药物而且也发生在空白脂质体与药物的混合物,表明脂质体与细胞发生直接作用[5]。

参 考 文 献

[1] 于冬青,易永芳.肿瘤多药耐药研究进展[J].中华实用医学,2001,3(12):26-29.
[2] 柯爱武,李 羲.脂质体逆转肿瘤多药耐药研究进展[J].国外医学:预防.诊断.治疗用生物制品分册,2005,28(2):75-79.
[3] 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.
[4] Wang J,Goh B,Lu W,et al. In vitro cytotoxicity of stealth liposomes co-encapsulating doxorubicin and verapamil on doxorubicin-resistant tumor cells[J]. Biol Pharm Bull,2005,28(5):822-828.
[5] Lo Y L. Phospholipids as muhidrug resistance modulators of the transport of epirubicin in human intestinal epithelial Caco-2 cell layers and everted gut sacs of rats[J]. Biochem Pharmacol,2000,60(9):1381-1390.

(责任编辑:关蕴良)