

[文章编号] 1007-385X(2005)01-0052-05

阿霉素长循环热敏脂质体的研制及其靶向治疗肿瘤作用的研究

董兰凤, 赵兴茹, 冯凤莲, 范美菊, 杨丽 (河北医科大学药学院生药组, 石家庄 050017)

[摘要] **目的:** 研制阿霉素脂质体(AL)、阿霉素长循环脂质体(ALCL)和阿霉素长循环热敏脂质体(ALTSL)。研究不同类型脂质体对H22荷瘤小鼠肿瘤的抑制作用。**方法:** 建立荷瘤小鼠模型, 观察各实验组的抑瘤效果, 计算抑瘤率和生命延长率; HPLC法研究静脉给药后各实验组阿霉素的药代动力学规律及组织学分布特征; 制作病理切片, 观察各实验组肿瘤和心脏等组织的病理变化。**结果:** ALCL和ALTSL对H22荷瘤小鼠肿瘤有显著的抑制作用, 抑瘤率分别为57.8%和67.0% ($P < 0.01$); 尾静脉注射给药24h后, ALCL和ALTSL组荷瘤小鼠肿瘤组织和血液中的阿霉素含量明显上升, 而在心、肺中的含量显著降低; ALTSL使肿瘤细胞大量坏死, 而对心肌细胞无明显损伤。**结论:** ALCL和ALTSL均能提高化疗药阿霉素的抗肿瘤效果, 降低阿霉素的心肺毒性, 延长荷瘤小鼠的存活时间。

[关键词] 阿霉素长循环脂质体; 阿霉素长循环热敏脂质体; 靶向治疗; 抗肿瘤; HPLC

[中图分类号] R965; R730.5 [文献标识码] A

The Preparation and the Anti-Tumor Targeting Therapy of Adriamycin Long Circulating Temperature-Sensitive Liposome

DONG Lan-feng, FENG Feng-lian, FAN Mei-ju, YANG Li (Pharmacognosy Department, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

[**Abstract**] **Objective:** To develop adriamycin liposome (AL), adriamycin long circulating liposome (ALCL) and adriamycin long circulating temperature-sensitive liposome (ALTSL) and to study their anti-tumor effects on tumor-bearing mice. **Methods:** The antitumor activity was observed using the tumor weight as index. The life prolongation rate of mice was calculated according to the tumor-bearing mice survival time. The tissue distribution of adriamycin was determined by HPLC method. Tumor, heart, liver and kidney tissue of the tumor-bearing mice, were sliced and prepared to observe the tissue pathology differences. **Results:** Compared with free adriamycin, the anti-tumor effects of ALCL and ALTSL were remarkably increased. Their tumor growth inhibitory rates were 57.8% and 67.0% respectively. The study of pharmacokinetics indicated that the adriamycin concentrations were remarkably higher in tumor tissue and blood, lower in heart and lung tissue of ALCL and ALTSL groups when compared with the free ADM group; The pathology slices indicated that tumor cells in the ALTSL group with hyperthermia were mostly destroyed; the cardiac muscle cells in the ALTSL group were similar to the normal cardiac muscle. **Conclusion:** ALCL and ALTSL remarkably increased the adriamycin concentration on the tumor site, significantly enhanced the anti-tumor effects, decreased the side-effects (such as cytotoxicity) when compared with free ADM, they also significantly prolonged the survival time of the tumor-bearing mice.

[**Key words**] adriamycin long circulating liposome; adriamycin long circulating temperature-sensitive liposome; targeting therapy; anti-tumor; HPLC

阿霉素(adriamycin, ADM)是一种常用的广谱抗肿瘤化疗药,对白血病,恶性淋巴瘤,乳腺癌等具有很好的疗效^[1],但其对心脏的毒性作用限制了其在临床上的广泛和大量应用^[2]。脂质体阿霉素可以改变药物在体内的分布,增加药物到达靶部位的几率,明显降低药物对心、肾的毒性,从而减少对机体的毒性^[3]。

本实验制备了阿霉素脂质体(adriamycin liposome, AL)、阿霉素长循环脂质体(adriamycin long-circulating

[基金项目] 河北省科技厅课题(00276414)

[作者简介] 董兰凤(1965-),女,河南省隧平人,博士,副教授,主要从事肿瘤免疫的研究

liposome, ALCL)和阿霉素长循环热敏脂质体(adriamycin long-circulating thermosensitive liposomes, ALTSL),研究比较不同阿霉素脂质体的抗肿瘤作用,观察比较荷瘤小鼠的存活时间,并探讨其抗肿瘤机制。

1 材料与方法

1.1 动物和细胞株

Balb/c 小鼠,体重(18 ± 2)g,雄性。清洁动物,由河北医科大学实验动物学部小动物室提供,合格证号:冀医动管字 04082。H22 肿瘤细胞株由河北医科大学实验动物学部动研室冻存。

1.2 药品与试剂

阿霉素(浙江海正药业股份有限公司);大豆卵磷脂(phosphatidylcholine, sigma 公司);蛋黄卵磷脂(egg phosphatidylcholine,北京市海淀区微生物培养基制品厂);胆固醇(cholesterol, Japan);二棕榈酸磷脂酰胆碱(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPC),棕榈酸磷脂酰胆碱(1-palmitoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine, MPPC),氢化大豆卵磷脂(hydrogenated soy sn-glycero-3-phosphocholine, HSPC),聚乙二醇-2000-二硬脂酸磷脂酰乙醇胺交连物(DSPE-PEG2000)均购于美国 Avanti Polar Lipids 公司。

1.3 主要仪器

KQ118 型超声波处理仪(昆山市超声仪器有限公司);MVS-1 旋涡混合器(北京北德科学器材有限公司);旋转薄膜蒸发器(天津市玻璃仪器厂);3K30 型低温高速离心机(德国 Sigma 公司);电光分析天平(上海天平仪器厂);LC99 型高效液相分析仪(HPLC,北京温分分析仪器技术开发有限公司);WD-9403B 型紫外投射仪(北京六一仪器厂);超低温冰箱(日本三洋)。

1.4 阿霉素脂质体(AL)的制备^[46]

卵磷脂与胆固醇(二者摩尔比为 2:1)混合,按照实验[4-6]的方法旋转蒸发制备薄膜。以磷酸缓冲液(PBS)溶解薄膜,经 0℃ 下超声混合(10 min),60℃ 下涡旋震荡(30 min),然后过微孔滤膜(0.8, 0.4, 0.2 μm)各 3 次,得粒径为 100 nm 左右的空白蛋黄脂质体。取一定量的阿霉素溶于 PBS 中,将此溶液加入到上述空白脂质体中。0℃ 下超声 10 min,60℃ 下涡旋混合器中涡旋混合 30 min。即得 AL。

1.5 阿霉素长循环热敏脂质体(ALTSL)及阿霉素长循环脂质体(ALCL)的制备

精密称取 DPPC, MPPC, DSPE-PEG2000(摩尔比为 90:10:4),混合后加氯仿溶解成无色溶液。按上述方法 39℃, 100 r/min 下于旋转薄膜蒸发器中抽真空旋转蒸发制备薄膜(可用氯仿 2 次溶解),最终得到透明薄

膜。按上法制备得到 ALTSL。

膜组成为 DPPC:HSPC:胆固醇:DSPE-PEG2000 = 6.34:2.29:1:1.44(摩尔比为 100:50:30:6),步骤同上,制得 ALCL。

1.6 阿霉素脂质体包封率的测定:参照文献[6]的方法。

1.7 阿霉素脂质体粒径的测定

将阿霉素脂质体用生理盐水混悬稀释,水浴超声 30 min。用 Malvern Zetasizer 3000HS_A 粒度分布仪测定了其粒度分布,由粒度分布图显示样本的平均粒径。

1.8 建立荷瘤模型并分组给药

GKN 调 H22 肿瘤细胞数为 1×10^7 /ml,于 Balb/c 小鼠右后肢皮下接种 0.2 ml/只,建立荷瘤模型。待小鼠肿瘤长至直径 0.5 cm 左右时(第 6 天),选择肿瘤生长良好的荷瘤小鼠随机分为 5 组(每组 15 只):盐水对照组、游离阿霉素组、普通阿霉素脂质体组、阿霉素长循环脂质体组、阿霉素长循环热敏脂质体组。尾静脉注射阿霉素药量 5 mg/kg。第 9 天再注射 1 次,共 2 次。其中热敏脂质体组注射药物后,立即将小鼠麻醉,并将其带有肿瘤的后肢浸入 41℃ 温水中水浴加热 1 h。于荷瘤第 13 天摘眼球放血处死小鼠,观察和测定以下指标。

1.9 HPLC 法测定阿霉素脂质体静脉注射后在体内的组织分布:参照文献[6]的方法。

药物经尾静脉注射后,分别在给药后 1, 12, 24 h 时间摘眼球取血,断椎处死动物,取肝、心、脾、肺、肾、肿瘤组织精密称重(小于 1g 的组织取全部,大于 1g 的组织只取 1g)。HPLC 测定色谱条件:流速 1.5 ml/min,紫外检测波长 254 nm, C₁₈ 色谱柱,流动相为乙腈-水(32:68),用磷酸调至 pH3.0,外标法定量。

1.10 测定各组荷瘤小鼠的抑瘤率

荷瘤第 13 天各组小鼠摘眼球放血处死,分别剥离肿瘤称重,以下列公式计算抑瘤率。

$$\text{抑瘤率}(\%) = \frac{\text{对照组平均瘤重} - \text{给药组平均瘤重}}{\text{对照组平均瘤重}} \times 100\%$$

1.11 荷瘤小鼠肿瘤等脏器组织学观察

将小鼠肿瘤、心、肝、脾、肺、肾组织经甲醛固定,石蜡包埋切片,HE 染色,显微镜下观察肿瘤及各器官组织学变化。

1.12 观察各给药组荷瘤小鼠的生存期,计算各组荷瘤小鼠的生命延长率

生命延长率(LPR)(%) = (实验组小鼠的平均生存时间 - 对照组小鼠的平均生存时间) / 对照组小鼠的平均生存时间 × 100%

1.13 统计学处理

均采用两样本均数比较的 *t* 检验。

2 结果

2.1 阿霉素不同脂质体的包封率及粒径

阿霉素脂质体 (AL)、阿霉素长循环脂质体 (ALCL) 和阿霉素长循环热敏脂质体 (ALTSL) 的包封率分别为 97.61%、96.38% 和 97.72%。ALCL 的粒径为 (100 ± 15) nm。

2.2 各给药组对荷瘤小鼠瘤重的影响

各给药组均明显减轻荷瘤小鼠的肿瘤重量, 与对照组比较均有显著性差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。其中 ALCL 和 ALTSL 的抑瘤率分别达到 57.8% 和 67.0% (表 1)。

表 1 不同实验组的瘤重和抑瘤率 ($\bar{x} \pm s$)
Tab.1 Weight and inhibitory of tumor (g) in different experimental groups of mice

Groups	n	Wt. of tumor (g)	Inhibitory (%)	P
NS	7	1.02 ± 0.25		
ADM	6	0.63 ± 0.16	38.2%	<0.05
AL	7	0.58 ± 0.35	43.1%	<0.05
ALCL	6	0.43 ± 0.08 [▲]	57.8%	<0.01
ALTSL	7	0.35 ± 0.09 ^{▲*}	67.0%	<0.01

▲ $P < 0.01$ vs free ADM; * $P < 0.05$ vs ALCL

表 2 给药 24 h 后各组织中阿霉素的浓度 ($\mu\text{g/g}$, $\mu\text{g/ml}$) ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Tab. 2 Tissues concentrations of ADM at 24 h after administration ($\mu\text{g/g}$, $\mu\text{g/ml}$)

Groups	Liver	Heart	Spleen	Lung	Kidney	Blood	Tumor
Free ADM	12.440 ± 0.162	2.840 ± 0.277	11.658 ± 3.771	6.526 ± 1.332	5.822 ± 1.416	1.460 ± 0.276	1.278 ± 0.289
AL	22.840 ± 0.833 [▲]	1.788 ± 0.294	23.418 ± 2.743	6.062 ± 1.170	5.158 ± 2.142	2.854 ± 0.656 [△]	2.220 ± 1.129
ALCL	15.860 ± 4.172 *	1.974 ± 0.318	17.652 ± 5.297	4.848 ± 0.779	4.532 ± 1.343 [△]	4.794 ± 1.997 [▲]	4.688 ± 1.234 ^{△*}
ALTSL	13.821 ± 2.825 *	1.426 ± 0.322 [▲]	15.654 ± 4.918 *	3.516 ± 1.579 [△]	4.698 ± 2.383	3.662 ± 1.313 [▲]	9.145 ± 1.590 ^{□*}

△ $P < 0.05$, ▲ $P < 0.01$, □ $P < 0.001$ vs free ADM; * $P < 0.01$ vs AL

2.5 观察荷瘤小鼠生存时间发现

NS 组、ADM 组、AL 组和 ALCL 组小鼠分别于荷瘤第 13, 14, 14 和 23 天开始死亡; 死亡率达到 50% 的时间分别为第 16, 26, 30 和 52 天。前 3 组死亡率达 100% 的时间分别是第 20, 36 和 36 天。ALCL 组有 30% 的荷瘤小鼠生存期超过 60 d, LPR > 214.6%。

2.3 HPLC 法测定小鼠血液和各组织器官中阿霉素的含量

实验结果表明, 与游离阿霉素组相比, 在给药后 24 h 内, 普通阿霉素脂质体组在肿瘤组织和血液中的阿霉素浓度明显增加, 同时使心脏、肺脏中的阿霉素浓度明显降低。但也大大增加了肝脏、脾脏组织中的吞噬量; ALCL 和 ALTSL 组在肿瘤组织和血液中的阿霉素浓度进一步显著增加, 同时在心、肺组织中的阿霉素浓度进一步明显降低。与普通脂质体组比较, ALCL 和 ALTSL 组在肿瘤组织和血液中的阿霉素浓度也明显增高, 同时显著降低了肝脏、脾脏对脂质体的吞噬量。其中 ALTSL 组 (热敏加热组) 肿瘤局部的阿霉素浓度最高, 而心、肺组织中的阿霉素含量最低。提示长循环热敏脂质体配合肿瘤局部加热具有最好的药物靶向性和最低的心脏、肺脏毒副作用 (表 2; 图 1, 2)。

2.4 显微镜下观察各给药组荷瘤小鼠肿瘤、心脏等组织学特征

对照组肿瘤细胞生长旺盛, 排列密集, 呈腺样增生, 细胞排列成行; 游离阿霉素组及热敏脂质体组肿瘤细胞广泛坏死, 细胞核破碎溶解, 结构消失。其中热敏脂质体组可见肿瘤细胞凝固坏死。对照组正常心肌细胞完整, 细胞核清晰, 心肌肌横纹清晰可见; 游离阿霉素组心肌细胞肌横纹消失, 出现空泡样变性和坏死; 热敏脂质体组细胞空泡样变性和坏死少见, 病理损害明显减轻。肝、脾、肺、肾组织未见明显的异常变化 (图 3)。

ALTSL 组小鼠分别在荷瘤第 22, 24, 27 天分别有 1 只死亡, 其余的小鼠生存期均超过 60 d, 占 70%, LPR > 226.5% (见表 3)。

3 讨论

近年来, 有关脂质体包封药物的应用研究非常广

泛。抗肿瘤化疗药阿霉素脂质体包封后,可显著增加药物的抑瘤效果。其原因是由于实体瘤组织中血管增生,形成丰富的血管网,脂质体可以延长药物在体内的循环时间,增加药物与癌细胞的接触机会,因此可提高抑瘤率^[5,7]。本实验研制出的几种脂质体包封率较高,达到96%以上,这是保证其较好疗效的基本条件。另外制备的长循环脂质体(ALCL, ALTSL)粒径较小(100 nm 左右),也为药物在肿瘤部位靶向浓集提供了必要条件。

阿霉素热敏脂质体,具有对中等热度敏感的特性,其最

图1 给药24 h后不同组织中阿霉素的浓度($\mu\text{g/g}$)

Fig. 1 ADM concentrations in different tissues at 24 h after administration

研究表明长循环脂质体降低了肝脏和脾脏网状内皮系统对阿霉素的吞噬量,延长了药物在血液中的循环时间,使其在肿瘤部位的聚集量是普通阿霉素脂质体或单纯阿霉素的3.4或9.4倍^[8]。制备一种新型的

图2 给药后24 h内阿霉素在肿瘤和心脏组织中的浓度分布(阿霉素静脉注射浓度为5 mg/kg)

Fig. 2 ADM levels in tumor and heart tissues at 1 h, 12 h and 24 h after injection (ADM equivalent to 5 mg/kg i. v.)

A: Tumor; B: Heart

图3 不同实验组荷瘤小鼠的肿瘤组织切片

Fig. 3 Tumor tissues of mice in different experimental groups

A: NS; B: Free ADM; C: ALCL; D: ALTSL

佳选择温度为39℃和40℃,与普通阿霉素脂质体或单纯药物相比,对人鳞状上皮细胞癌移植瘤细胞肿瘤生长具有显著抑制作用。长循环型阿霉素热敏脂质体(DXR-PEG-TSL)在体内循环时间长。当在病变部位加热时,可择优地将药物释放在肿瘤部位。研究发现给荷瘤 Balb/c 小鼠静脉注射此种脂质体3 h后,肿瘤局部加热,阿霉素在肿瘤组织局部有高浓度集中,提示药物主要释放在病变组织间质中,且对肿瘤的生长有抑制作用,并延长小鼠的存活时间^[8]。刘同刚等^[9]观

察了温度敏感阿霉素脂质体结合肿瘤局部热疗对荷 Lewis 肺癌小鼠的抗肿瘤效果,结果表明温度敏感阿霉素脂质体结合肿瘤局部热疗可显著提高阿霉素的抗癌效果,且药物的毒副作用明显降低。

本实验中制备的长循环脂质体和长循环热敏脂质体(ALCL, ALTSL)的抑瘤效果(抑瘤率 57. 8%, 67. 0%)与游离阿霉素(抑瘤率为 38. 2%)相比,均有了显著的提高。同时显著延长了荷瘤小鼠的生存时间,因而肯定了 ALCL, ALTSL 的优越性。本实验中应

用热敏脂质体时肿瘤局部加热的温度控制在 41℃, 对小鼠无任何损伤, 小鼠对此温度无不适反应。HPLC 测定结果表明, 热敏脂质体配合肿瘤局部加热, 24 h 内使肿瘤局部的阿霉素含量增加了 6~7 倍, 这充分体现了热敏脂质体良好的靶向性。病理切片结果显示, 静脉注射游离阿霉素, 明显损伤了心肌细胞的结构。静脉注射 ALTSL 配合肿瘤局部加热, 大大增加了肿瘤组织的损伤, 同时减少了对心肌细胞的损害。显示了热敏脂质体在增强抗肿瘤疗效的同时, 能有效的减低阿霉素的副作用。

表 3 不同实验组 H22 荷瘤小鼠的平均生存时间和生命延长率
Tab. 3 Average survival time and life prolongation rate of H22 mice in different experimental groups

Groups	n	Average survival time(day)	LPR(%)
NS	10	15.1	
ADM	9	24.1	60
AL	9	26.1	73.3
ALCL	10	>47.5	>214.6
ALTSL	10	>49.3	>226.5

进一步研制开发和改进阿霉素长循环热敏脂质体剂型, 选择恰当的局部加热方式和温度, 使之适用于临床治疗, 是我们今后研究的方向。

[参 考 文 献]

- [1] Yong RC, Ozols RF, Myers CE. The anthracycline neoplastic drugs [J]. *New Engl J Med*, 1981, 305: 139-153.
- [2] Pacher P, Liaudet L, Bai P, *et al*. Activation of poly (ADP-ribose) polymerase contributes to development of doxorubicin-induced heart failure [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, 300 (3): 862-867.
- [3] Batist G, Ramakrishnan G, Rao CS, *et al*. Reduced cardiotoxicity and preserved antitumor efficacy of liposome-encapsulated doxorubicin and cyclophosphamide compared with conventional doxorubicin and cyclophosphamide in a randomized, multicenter trial of metastatic breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2001, 19 (5): 1444-1454.
- [4] 常贵民, 段芳龄, 扬淑英, 等. 脂质体阿霉素的制备及包封率测定方法的研究 [J]. *中国医院药学杂志*, 1999, 19(6): 328-331
- [5] Needham D, Anyarambhatla G, Kong G, *et al*. A New temperature-sensitive liposome for use with mild hyperthermia: Characterization and testing in a human tumor xenograft model [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(5): 1197-1201.
- [6] 吕万良, 齐宪荣, 孙华东, 等. 阿霉素隐形脂质体的研制及其在小鼠体内的组织分布 [J]. *中国药学杂志*, 1999, 34(5): 310-312.
- [7] Ishida O, Marugama K, Yanagie H, *et al*. Targeting chemotherapy to solid tumors with long-circulation thermosensitive liposomes and local hyperthermia [J]. *Jpn J Cancer Res*, 2000, 91: 118-126.
- [8] Sakae U, Kazuo M, Osamu I, *et al*. Enhanced tumor targeting and improved antitumor activity of doxorubicin by long-circulating liposomes containing amphipathic poly(ethylene glycol) [J]. *Int J Pharm*, 1995, 126: 41-48.
- [9] 刘同刚, 唐敏章, 金发光. 加温敏感阿霉素脂质体治疗小鼠荷 Lewis 肺癌 [J]. *第四军医大学学报*, 2003, 24(4): 335-337.

[收稿日期] 2004 - 08 - 02

[修回日期] 2004 - 12 - 09

[本文编辑] 韩 丹, 王 莹

优秀论文征稿评选活动

《中华现代外科学杂志》编辑部将于 2005 年 2 月 1 日至 005 年 6 月 30 日举行优秀论文征稿评选活动!

在此活动期间, 本刊将为获得国家自然科学基金、国家级、省部级基金项目资助的论文以及取得前沿课题突破性进展的论文颁布发优秀论文证书, 并对相应文章的第一作者给予每千字符 50 元的优秀论文奖励; 时本刊专家编辑委员会和中华首席医学网联合推出优秀论文专栏, 凡在此次评选活动中获得获得优秀论文奖的文章将有机会被中华首席医学网优秀论文专栏收录。希望广大专家、作者、读者能不吝赐教, 踊跃来稿!

《中华现代外科学杂志》是由中华临床医药学会主办的专业医学学术期刊。本刊为半月刊, 具有 ISSN/CN 标准刊号, 现已被中华首席医学网和中文生物医学期刊文献数据库(CMCC)等收录, 您可以在中华首席医学网(www.shouxi.net)免费查看本期刊各期的全文文献内容。

本刊近期投稿栏目的主题是:

1. 有实际指导意义的述评、临床研究、经验介绍、临床病理(例) 讨论和病例报告, 以及反映国内外外科重要进展的文献综述等。
2. 探讨大外科领域(普通外科、骨外科、神经外科、泌尿外科等) 某一方面的理论研究、临床基础研究和实验研究工作成果的论文。
3. 中医药、中西医结合防治常见耳鼻咽喉 - 头颈要外科疾病的经验和科研进展。
4. 新技术、新疗法、新器械的创制, 书评, 学术讨论, 学术动态等。

投稿信箱: 北京 100035-55 信箱; 邮编: 100035; 电话: 010-62242528; E-mail: waikexue@sohu.com