

雷公藤甲素脂质体制备及体内抗肿瘤实验研究

居星耀(浙江省湖州市妇幼保健院药剂科,浙江 湖州 313000)

摘要:目的 注入法制备雷公藤甲素脂质体,观察其形态特征和包封率,并对其体内抗 H22 疗效进行初步研究。方法 用注入法制备雷公藤甲素脂质体,通过普通光学显微镜和动态光散色粒度分析仪测定其形态、粒径,用 HPLC 测定其包封率;并建立 H22 荷瘤模型观察其抗肿瘤活性。结果 该法所得脂质体形态规则、粒度均匀,平均直径约为 45.6 nm,但包封率不是很高约为 46.7%;体内抗肿瘤实验结果表明,雷公藤甲素脂质体具有较强的抗 H22 活性,且与浓度呈正相关,而且相对“游离”雷公藤甲素毒性较小。结论 雷公藤甲素脂质体具有较强的抗肿瘤活性,且不良反应较小。

关键词:雷公藤甲素;注入法;脂质体;抗肿瘤

中图分类号:R931.6;R965.1

文献标识码:A

文章编号:1007-7693(2007)04-0271-04

Preparation of Triptolide-liposome and Its *in vivo* Antitumor Activity

JU Xing-yao(*Huzhou Maternity and Child Care Hospital, Huzhou 313000, China*)

作者简介:居星耀,男,主管药师

Tel: (0572)2030431

E-mail: jxy@hzfby.com

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare triptolide-liposome by infusion method, and investigate the properties, such as morphology, encapsulation efficiency, and anti-H22 cell lines effect *in vivo*. **METHODS** Triptolide-liposome was obtained by infusion method, its morphologic characteristics and encapsulation efficiency was detected by optical microscope, dynamic light scattering instrument and HPLC, respectively. Otherwise, its anti-H22 cell lines effect was evaluated by using mice bearing H22 tumor. **RESULTS** The shape of triptolide-liposome was regular and narrowly-distributed with average diameter of 45.6 nm; but its encapsulated efficiency was just reached 46.7%; *In vivo* anti-tumor assay indicated that triptolide-liposome had strong anti-H22 tumor activity, which was positively correlated with its concentration, and manifested less toxicity than free triptolide only. **CONCLUSION** Triptolide-liposome has great anti-tumor activity with less toxicity.

KEY WORDS: triptolide; infusion method; liposome; anti-tumor

雷公藤甲素(Triptolide, TRI)是卫矛科木质藤本植物雷公藤中提取的一个主要化学活性物质,是一种环氧二萜单体。长期临床应用及实验研究表明,雷公藤具有抗炎、抗生育、免疫抑制及抗肿瘤等多种药理活性^[1]。雷公藤甲素作为其中的一个主要化学成分在治疗各种免疫性疾病、炎性疾病及癌症方面起了很大作用,但也存在较多不良反应,如引起胃溃疡、男性精子减少或无精子症、女性月经减少或闭经、肝肾毒性等^[2]。诸多研究表明,脂质体运载药物可以极大优化原游离药物药动学,并可减小原药物的不良反应及增强疗效^[3-4]。为此,笔者拟采用注入法制备雷公藤甲素脂质体,并对其体内抗肿瘤疗效进行了初步研究。

1 材料及仪器

雷公藤甲素(深圳市牌牌科技有限公司);环磷酸胺(浙江省中医院);卵磷脂(phosphatidyl choline, PC, 北京美亚斯磷脂技术有限公司);胆固醇-丁二酸复合物(Cholesteryl succinate, CS, 自备);聚山梨酯 80(吐温-80, 天津市昆达化工有限公司);甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯;H22 瘤株(浙江中医药大学分子研究所);昆明种小鼠,雄性(清洁级),体重 18~20 g,购于浙江中医学院实验动物中心,基础饲料喂养于浙江中医学院实验动物中心。

SENCO R-201 旋转蒸发仪(上海中顺生物科技有限公司);Agilent HP 1100 型高效液相色谱系统(Agilent Technologies, USA);Nicom 380 ZLS 动态激光粒度分析仪((Nicom Particle Sizing Systems, Santa Barbara, CA);普通光学显微镜(Nicom)。

2 方法

2.1 脂质体的制备

采用改良的注入法制备雷公藤甲素脂质体^[5],分别称取雷公藤甲素、PC 和 CS 适量(PC: CS = 2: 1 mol/mol),然后用适量无水乙醇超声溶解,再加入适量吐温-80 混合均匀后用注射器缓慢注入到 10 mL(10% 乙醇)37% 水相中(针头浸入水下),并不断搅拌;滴毕后继续搅拌 10 min,最后减压除去乙醇即得雷公藤甲素脂质体。

2.2 脂质体形态观察

吸取一滴上述脂质体悬液滴在普通载玻片上,然后盖上盖玻片于普通显微镜下观察并拍照记录。

2.3 脂质体粒径及其分布测定

取少许上述脂质体悬液,用双蒸水适当稀释后于 20℃ 条

件下,632.8 nm 处测定粒径大小分布及平均粒径。不同时间多次测量(3~6 次)最终确定平均粒径。

2.4 包封率测定

将上述脂质体悬液准确定容至 10 mL,然后准确吸取 1 mL 至小烧杯中 30℃ 真空干燥后用流动相超声溶解,过 0.45 μm 滤膜并用流动相定容至 5 mL,混匀即为样品溶液。进样 20 μL 色谱分析,按下式计算包封率。

$$\text{包封率}/\% = \frac{\text{包封药物量}/\text{mg}}{\text{加入药物总量}/\text{mg}} \times 100\%$$

色谱条件:色谱柱:μ-Bondapak C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水-异丙醇(4:3:1);检测波长:219 nm;流速:1.0 mL · min⁻¹;柱温:30℃。

2.5 体内抗 H22 试验

2.5.1 动物模型建立 无菌操作,取第 8 天活化处理的 H22 腹水,呈乳白色牛奶状为宜;用无菌 D-Hanks 液稀释成 1.5 × 10⁷ 个 · mL⁻¹ 瘤细胞浓度的稀释液,每鼠右前肢腋部皮下注射 0.1 mL 前述稀释液。

2.5.2 小鼠分组 取昆明小鼠 60 只,体重(20 ± 2)g,随机分成以下六组,每组 10 只:A 组(空白对照组);B 组(低剂量雷公藤甲素脂质体);C 组(中剂量雷公藤甲素脂质体);D 组(高剂量雷公藤甲素脂质体);E 组(雷公藤甲素);F 组(环磷酸胺)。

2.5.3 给药方式和剂量 A 组:静脉注射生理盐水 0.3 mL/只;B 组:静脉注射 0.3 mL/只雷公藤甲素脂质体(相当于雷公藤甲素 2 μg/只);C 组:静脉注射 0.3 mL/只雷公藤甲素脂质体(相当于雷公藤甲素 4 μg/只);D 组:静脉注射 0.3 mL/只雷公藤甲素脂质体(相当于雷公藤甲素 6 μg/只);E 组:静脉注射 0.3 mL/只雷公藤甲素(相当于雷公藤甲素 4 μg/只);F 组:腹腔注射环磷酸胺 0.3 mL/只(相当于环磷酸胺 0.4 mg/只)。造模后 24 h 开始给药,连续给药 14 d,观察并隔天记录各组小鼠体重。

2.5.4 抑瘤率测定 第 15 天颈椎脱臼法处死各组小鼠,解剖剥离各小鼠肿瘤,称取瘤重,按照下式计算抑瘤率:

$$\text{抑瘤率}/\% = \frac{\text{A 组平均瘤重}/\text{g} - \text{其他任一组的平均瘤重}/\text{g}}{\text{A 组平均瘤重}/\text{g}} \times 100\%$$

2.5.5 统计学分析 不同药物浓度组间的比较采用完全随机设计的方差分析,各药物浓度组与对照组的比较采用 Dunnett *t* 检验。

3 结果

3.1 脂质体形态及平均粒径

100 × 普通光镜下观察,所得脂质体成细小球状,见图 1。动态激光粒度仪分析表明,脂质体粒径呈多分散性,主要集中于 30 nm 左右,但有小部分位于 70 nm 左右,为此平均粒径约为 45.6 nm,见图 2。总体来说,该法值得的脂质体粒径较小,而且相对比较均匀。

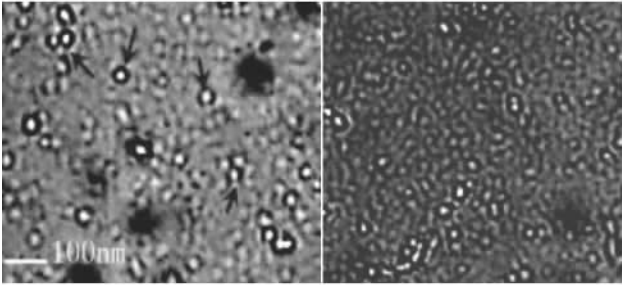


图 1 普通光镜下脂质体形态(×100)

Fig 1 Photographs of triptolide-liposome under light microscope 100 × (scale bar, 100 nm)

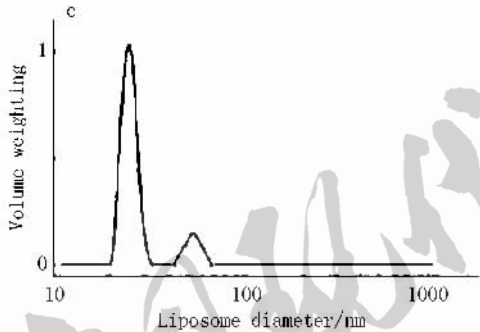


图 2 脂质体粒径分布图

Fig 2 Size distribution of triptolide-liposome

3.2 脂质体包封率测定

本法参靖会等^[6]报道中所用条件,雷公藤甲素在 0.8 ~ 3.2 μg · mL⁻¹ 内与峰面积有良好的线性关系($r=0.999\ 8$); 平均回收率为 98.21%,RSD 为 0.43%。该条件下所制备的脂质体所测得的包封率为 46.7%。

3.3 各组小鼠体重变化情况

隔天称取各组小鼠体重,记录小鼠体重变化情况见图 3。从下图中各组小鼠体重变化可知,雷公藤甲素各剂量组及环磷酰胺给药组平均体重基本上都在空白对照组之下,推测雷公藤甲素确实存在一定不良反应。另外相对而言,E 组小鼠平均体重最轻,而脂质体各剂量组平均体重相对比 E、F 组高,提示脂质体剂型药物可能具有减毒作用。

3.4 抑瘤率测定

各组小鼠连续给药 14 d 后于第 15 天颈椎脱臼法处死,解剖肿瘤称取瘤重,见表 1。从表中数据可以看出,雷公藤甲素对 H22 瘤株有抑制作用,且呈量效关系。高剂量雷公藤甲素脂质体抑制率达到了 49.26%,与环磷酰胺组的抑瘤率 51.48% 相当,表明该脂质体药物有较好的抗 H22 特性。此外,C、D 两组比较,虽然没有显著性差异,但从两者的体重变

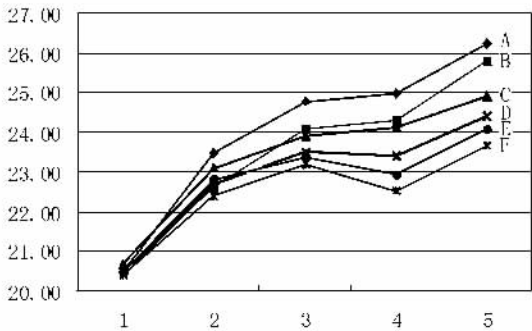


图 3 各组小鼠体重变化情况图

A: 空白组;B: 低剂量脂质体组;C: 中剂量脂质体组;D: 高剂量脂质体组;E: 雷公藤甲素组;F: 环磷酰胺组

Fig 3 Variation of body weight of the mice bearing H22 tumor treating with different drugs

A: control group; B: low dosage group of triptolide liposome; C: middle dosage group of triptolide liposome; D: high dosage group of triptolide liposome; E: triptolide group; F: cyclophosphamide group

表 1 各给药组抑瘤率

组别	平均瘤重/g	抑瘤率/%
A	0.812 ± 0.327	-
B	0.658 ± 0.324	18.97
C	0.568 ± 0.214 ¹⁾	30.05
D	0.412 ± 0.251 ²⁾	49.26
E	0.610 ± 0.314 ¹⁾	24.87
F	0.394 ± 0.121 ²⁾	51.48

注:与空白组比较有显著性差异,1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$; A-F 代表不同药物治疗组如图 3 所示

Notes: Showed significant difference compared with control group, 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$; A-F stand for different drug treatment group as described for fig. 3

化再结合这两个抑瘤率来看,提示脂质体剂型一定程度上确实可以减小雷公藤甲素不良反应而增强疗效。

4 讨论

多项研究报道表明,脂质体进入人体内主要被网状内皮系统吞噬而激活机体的自身免疫功能,并可改变被包封药物的体内分布,使药物主要在肝、脾、肺和骨髓等组织器官中积蓄,从而提高药物的治疗指数,减少药物的治疗剂量和降低药物的毒性^[7]。为此,本实验中采用注入法制备雷公藤甲素脂质体,并对其体内抗 H22 疗效进行了初步研究。结果表明:该法所制备的雷公藤甲素脂质体粒度均匀,具有较好的抗 H22 活性,且在一定程度上可以减小其不良反应,但有待进一步确证。

高剂量组雷公藤甲素脂质体抑瘤率达 49.26%,与环磷酰胺相当,表明雷公藤甲素有较好疗效。我们前期体外 MTT 实验表明,雷公藤甲素可以通过诱导 H22 细胞凋亡而对其起到杀伤作用,即诱导细胞凋亡可能是雷公藤甲素起到体内抗 H22 癌细胞的一种机制。此外,丁怡等^[8]研究发现,雷公藤甲素可以通过抑制 u-PA mRNA 和蛋白的表达而抑制内皮细胞的迁移活性,最终表现为对血管生成的抑制。肿瘤的旺

盛生长依赖于血管新生,如果某个药物对血管生成有抑制作用,则其对肿瘤生长也会起到抑制效应。因此,抑制 H22 肿瘤血管生成也可能是雷公藤甲素抑制肿瘤生长的一种机制。一种药物的某种疗效往往是通过多种靶点、多种途径共同作用实现的,要使雷公藤甲素的抗肿瘤效果发挥极致,我们对其具体作用机制还有待做进一步深入研究。

参考文献

- [1] QIANG C Q, LIU S R, DU B M. Advances in pharmacological research of Tripterygium Wilfordii Hook. f. [J]. J Emerg Syndromes Tradit Chin Med(中国中医急症), 2006, 15(2): 198.
- [2] YU L Z, BIAN H M. Poisonous and side Effects and Advance in Research of Tipterygium Wilfordii Hook. f. [J]. Heilongjiang J Tradit Chin Med(黑龙江中医药), 2005, 48(2): 52-54.
- [3] RAHMAN Y E, HANSON W R. Mechanisms of reduction of anti-tumor drug toxicity by liposome encapsulation[J]. Ann N Y Acad Sci, 1978, 308(1): 325-342.

- [4] MEHTA R T, HOPFER R L, McQUEEN T, *et al.* Toxicity and therapeutic effects in mice of liposome-encapsulated nystatin for systemic fungal infections [J]. Antimicrob Agents Chemother. 1987, 31(12): 1901-1903.
- [5] GONG L, YANG H P, WANG K, *et al.* Preparation and evalution of demethoxycurcumin encapsulated liposome [J]. West China J Pharm Sci(华西药学杂志), 2005, 20(5): 421-423.
- [6] JING H, ZHAO H R, ZHANG Y J, *et al.* Method RP- HPLC to Determine the Amount of Thyroxin in Liposome of Tripterygium Wilfordii [J]. J Shaanxi Coll Tradit Clin Med(陕西中医学院学报), 2006, 29(1): 57-58.
- [7] Daryl C. Drummond, Olivier Meyer, Keelung Hong. Optimizing Liposomes for Delivery of Chemotherapeutic Agents to Solid Tumors [J]. Pharmacol Rev, 1999, 51(3): 691.
- [8] DING Y, ZHAO Q L, LI Y G, *et al.* Effects of Triptolide on Migration of Vascular Endothelial Cells [J]. J Sichuan Univ: Med Sci Ed(四川大学学报:医学版), 2005, 36(3): 347-350.

收稿日期: 2006-12-30