

TC-1 静脉脂肪乳剂的制备

付茂琦¹, 余祥彬^{2*}, 王龙坤², 袁建华³ (1.福建医科大学, 福州 350004; 2.福州辰星药业有限公司, 福州 350007; 3.上海惠同贸易有限公司, 上海 210000)

摘要: 目的 研制和生产 TC-1 静脉脂肪乳剂, 以期临床提供解救高血压危象的新型药物制剂。方法 处方配比为 TC-1 0.5 mg·mL⁻¹、精制蛋黄卵磷脂 1.2%、甘油 2.2%。注射用大豆油 20%; 通过初乳制备、高压匀化、灌装封口、热压灭菌等工序制得 TC-1 静脉脂肪乳注射液, 并在(5±2)℃条件下考察制剂 6 个月内的稳定性。结果 3 批小批量试验的检验结果, 用动态光散射法测定平均粒径<0.3 μm、粒度分布均匀、无>1 μm 粒子, 稳定性均符合中国药典 2010 年版及日本药局方的要求。结论 确定了超高压微射流均质机-MiniDeBEE 制备含药静脉脂肪乳的关键设备条件、工艺参数, 解决了工程配套问题, 所取得的成果有利于脂肪乳剂的生产。TC-1 静脉脂肪乳注射液的成功研制, 为含药静脉脂肪乳的制备及稳定性研究提供了一套切实可行的方法。

关键词: TC-1; 静脉脂肪乳剂; 稳定性

中图分类号: R944.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)12-1271-06

Preparation of TC-1 Intravenous Fat Emulsion

FU Maoqi¹, YU Xiangbin^{2*}, WANG Longkun², YUAN Jianhua³ (1.Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China; 2.Chenxing Pharmaceutical Co., Ltd, Fuzhou 350007, China; 3.Shanghai Whacko Trade Co., Ltd, Shanghai 210000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare fat emulsion of TC-1 for treatment of hypertensive crisis. **METHODS** The formula consisted of 0.5 mg·mL⁻¹ TC-1, 1.2% purified lecithin, 2.2% glycerol and 20% soybean oil. The procedure included coarse emulsion production, high-pressure homogenization, filling and sealing, autoclaving, quality tests, etc; and the stability of the preparation in 6 months under (5±2)℃ was tested. **RESULTS** The quality test results of the 3 batches of products showed that the average diameters was <0.3 μm measured by DLS, the distributions of particles were uniform, and there was no >1 μm particles, and the stability were found according to CP and JP. **CONCLUSION** The study focuses on the latest homogenizer named MiniDeBEE applying in the production of an intravenous fat emulsion in order to find out the machinery terms, operating data and solve the engineering problems. The results of this study are good for improving the production equipment of fat emulsion. The practical method of the study is useful to other intravenous fat emulsion containing drugs in production or stability research.

KEY WORDS: TC-1; intravenous fat emulsion; stability

TC-1 是一类新型的二氢吡啶类钙离子通道阻滞药物, 其作用机制为选择性地抑制动脉血管平滑肌细胞外的钙离子内流, 导致细胞内缺乏足够的钙离子, 从而使血管松弛, 血压降低。TC-1 作为一种新型静脉注射用抗高血压药, 代表了当前高血压治疗中的一大进步, 其可以在危重病护理中快速、精确地控制血压。来自急救室、手术室和监护室的综合资料显示, TC-1 脂肪乳注射液的上市, 将为医生控制患者血压提供新的、重要的临床手段^[1]。

基于对 1 406 例患者临床治疗和手术患者 6 项 III 期临床研究的结果, TC-1 原研单位英国阿斯利康公司(AstraZeneca), 美国 The Medicines Company 公司拥有其在除日本以外的全球市场的开发和商业化授权, 本品于 2008 年 8 月首次在美国上市。

一项名为 VELOCITY 的临床研究的主要研究者 Varon 博士指出, 注射 TC-1 后, 血压能够很快降至正常水平, 而且很多患者能在 10 min 内维持良好的血压水平, 这十分有利于急诊处理^[2]。TC-1 为一种创新的注射型抗高血压药物, 用于治疗急

基金项目: 福建省区域科技重大项目(2010Y3001)

作者简介: 付茂琦, 女, 硕士, 讲师 Tel: (0591)87391766

E-mail: fumaqi@sina.com

*通信作者: 余祥彬, 男, 硕士, 主任药师

Tel:

13905004666 E-mail: 13905004666@139.com

性高血压,效果可持续 72 h,该药可在口服药物无效或患者不方便使用口服药物时使用,起效迅速^[3]。与现有高血压药物通过肾或肝脏代谢不同,TC-1 在血液中代谢,不会在体内积蓄,特别适用于晚期器官损害的患者^[4]。但本品在中国大规模临床应用尚存在以下难题:①该药物并未在中国上市;②昂贵售价将限制药物的推广(300 美元·瓶⁻¹);③制剂稳定性欠佳,贮存和使用不便;国外不适宜的生产工艺可能在产品中引入金属粒子,带来安全隐患^[5]。

本实验以现代新药开发的思路为指导:采用高压乳匀工艺制备乳剂的原理和方法,成功研究出 TC-1 乳剂的制备工艺,不仅可以打破该药物只能依赖进口的僵局,使患者在治疗时的费用大大降低;而且其过程能为以后新药开发和新剂型的制备提供宝贵的经验。

1 仪器与材料

超高压微射流均质机-MiniDeBEE(美国 DeBEE);高速剪切机(上海 FLUKE 公司);XSZ-G 型光学显微镜(重庆光学仪器厂);Nicomp TM 380 动态光散射粒度测定仪(美国 Santa Barbara PSS 公司);800B 型离心机(上海安亭科学仪器厂制造);pHS-3B 精密 pH 计(上海精科仪器厂);旋转水浴灭菌器(自制);SIL-20ACMP 高效液相色谱仪(日本岛津公司);CSI20GXL 型超速离心机(日本 Hitachi 公司)。

注射用大豆油(铁岭北亚注射用油厂);注射用油酸(德国 Lipoid GmbH 公司);注射用蛋黄磷脂 E80(德国 Lipoid GmbH 公司);注射用甘油(浙江遂昌甘油厂);注射用水(自制);乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na,杭州余杭利人医药化工有限公司);其他所用的分析试剂均为色谱纯。

2 方法与验证

2.1 初乳制备工艺

从理论上讲,初乳制备的 2 种方法即干胶法和湿胶法,对制备 TC-1 静脉脂肪乳剂的初乳均适用,而经试验干胶法比湿胶法好,但干胶法不同的制备方法制得的初乳质量上是否有显著性差异需实验验证^[6]。

2.1.1 试验方法 油相准备:处方配比为 TC-1 250 mg(0.5 mg·mL⁻¹)、精制蛋黄卵磷脂 1.2%、甘油 2.2%、注射用大豆油 20%。按处方称取蛋黄卵磷脂、大豆油、TC-1 药物备用,将大豆油加入烧

杯中,水浴加热到 60 ℃保温,在剪切机连续搅拌下,缓慢加入蛋黄卵磷脂,继续搅拌约 20 min,至蛋黄卵磷脂几乎完全溶解。将药物加入油相中,搅拌 10 min。

水相准备:按处方量,称取甘油,量取一定体积的灭菌注射用水,将甘油倒入水中并搅拌均匀。

方法 1:在搅拌下,将水相缓慢加到油相中,搅拌 10 min,按处方量补足注射用水量,继续搅拌 10 min,制得初乳 1。

方法 2:在搅拌下,将油相缓慢加到部分水相中,搅拌 10 min,按处方量补足注射用水量,继续搅拌 10 min,制得初乳 2。

2.1.2 试验结果 2 种方法制得的初乳外观及物理性质虽无显著性差异,但仍能看出方法 2 存在油相损失问题,这是由于试验中油相未完全转入水相,烧杯壁有少量残留。因此在大批量生产中,若采用方法 2,油相损失问题而导致主药损失很难避免。故大批量生产采用方法 1 为宜。结果见表 1。

表 1 两种方法制得初乳试验结果

Tab 1 Test results of two coarse emulsions made by two methods

初乳	粒径/ μm	含量/%	黏度/ MPa·s	离心后 (4 000 r·min ⁻¹ , 2 min)
初乳 1	12	99	4.9	分层,可见少量油滴
初乳 2	16	96	4.7	分层,可见较多油滴

2.1.3 结论 初乳制备工艺确定为:①油相制备:按处方量,称取大豆油,放入烧杯中,加入蛋黄卵磷脂,边加边搅拌并保持大豆油温度 60 ℃,搅拌至卵磷脂完全溶解,加入 TC-1 并搅拌至完全溶解。②水相制备:按处方量,称取甘油,量取灭菌注射用水,将甘油加入水中,搅拌均匀。③初乳形成:在持续搅拌的条件下,将水相缓缓加入油相中,然后搅拌 10 min 得白色乳状液即初乳。但是,乳剂粒径的大小及分布关键取决于以下的均化过程。

2.2 高压乳均工艺的研究及稳定性考察

2.2.1 单因素的确定 根据文献、上述试验设计及多次预试验结果,高压均化时所采用的压力、均化温度以及均化次数是决定乳剂形成、质量及稳定性的 3 个重要因素,因而确定这 3 个因素为主要试验考察因素,分别为因素 A、B 和 C^[7]。

2.2.1.1 因素 A 水平的确定 因素 A 为均化压力,是影响脂肪乳剂粒径大小及均匀性的重要因素。

初步试验：采用均化压力分别为 68 950，103 425，137 900 kPa，将初乳分别均化 2 次，采用激光粒度分析仪，按动态光散射法测定制得乳剂的粒度分布，结果见图 1。由粒度分布图可知，当均化压力为 68 950 kPa 时，制备的乳剂粒径较大、分布范围较小；当均化压力增加到 103 425 kPa 时，乳滴的粒径变小、分布范围变化很小；而增加压力到 137 900 kPa 时，粒径虽有减小，但分布范围变大。由此可见，均化压力增大，制得乳剂的粒度减小，但随着压力的不断增加，其粒径减小的速度减慢，因此确定均化压力的 3 个水平分别为 68 950，103 425，137 900 kPa。结果见图 1。

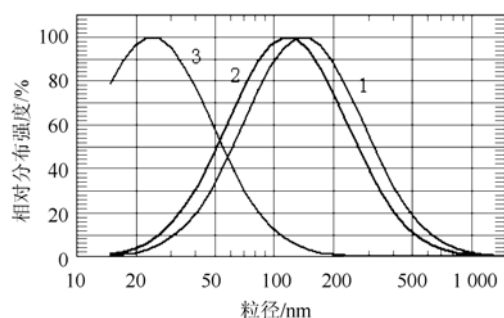


图 1 测得不同压力下乳剂粒度分布图
1—均化压力 68 950 kPa；2—均化压力 103 425 kPa；3—均化压力 137 900 kPa
Fig 1 The particle size distributions of the emulsions made at different pressures
1—homogenization pressure 18 950 kPa；2—homogenization pressure 103 425 kPa；3—homogenization pressure 137 900 kPa

2.2.1.2 因素 B 水平的确定 因素 B 为均化温度。高压均化时，对所采用的均化温度进行相应的选择。由于 TC-1 原料药在温度为 60 ℃的环境中仍较为稳定，未出现有关物质增加的情况，因而采用均化温度的 3 个水平分别为 20，30，40 ℃。

2.2.1.3 因素 C 水平的确定 因素 C 为均化次数。均化次数并非越多越好，当乳剂的粒径减小到一定值时，增加均化次数反而会引起粒子的集聚；增加均化次数还会增加工艺的复杂性以及产品的成本。根据因素 A 的试验与分析结果，初乳在 55 160 kPa 压力下均化，可起到预乳化的作用，在此基础上再增大下一个加工过程的均化压力。由于该乳匀机操作不当，很易堵塞，这种逐步加大压力的方式可以防止直接用较大的压力所导致的机器损坏。因而过程中首先选用 55 160 kPa 的压力对初乳预乳化一次，随后所用均化次数的 3 个水平分别为 1 次、3 次和 5 次。

2.2.2 正交试验设计 选择均化压力、均化温度

及均化次数作为考察因素，每个因素又设定 3 个水平，根据因素水平表，选择正交表 $L_9(3^4)$ 进行实验，并以制得的乳剂经稳定性加速试验后的粒度变化作为考察指标。正交设计表选用 $L_9(3^4)$ 因素水平表，见表 2。

表 2 因素水平表

Tab 2 Factors and levels

水平	均化压力(A)/kPa	均化次数(B)/次	均化温度(C)/℃
1	68 950	1	20
2	103 425	3	30
3	137 900	5	40

2.2.2.1 粒径测定 取 TC-1 乳剂用注射用水稀释 500 倍，适当调节光强度至 300 左右，室温进行测定，开始测定后至 Time history 曲线趋于直线时停止测定，保存数据。每个样品测定 3 次，取平均值。

2.2.2.2 考察制备工艺效果 考察乳剂样品在经上述实验后，乳滴粒度的变化，是否聚合并变大，并比较各份样品之间的差异，以反映各样品的稳定性。

2.2.2.3 试验方法及试验数据 用 $L_9(3^4)$ 正交设计表格进行均化工艺的筛选，按“2.1.1”项下选定的初乳最优化条件，按正交设计试验并制备乳剂，以每个试验制得的乳剂经稳定性加速试验后的粒度变化作为考察指标，按“2.2.2.1”项下的粒径测定方法测定，结果见表 3，方差分析结果见表 4。

由表 3 可知，对最大粒径影响因素的主次顺序为 $A>B>C$ ；对 $>1 \mu\text{m}$ 的粒子数量影响因素的主次顺序为 $A>B>C$ 。结合表 4 的方差分析结果，A 因素对 2 个指标均有影响，尤其是对 $>1 \mu\text{m}$ 的粒子数量影响，结果显示差异具有统计学意义 ($P<0.01$)，并且 A 因素的水平 2 和水平 3 对 2 个指标影响结果显示差异不具有统计学意义，因此以 A_2 为佳；B 因素对 2 个指标影响结果显示差异具有统计学意义 ($P<0.05$)，同样 B 因素水平 2 和水平 3 对 2 个指标影响结果显示差异不具有统计学意义，因此以 B_2 为佳；C 因素在设定水平内对 2 个指标的影响均很小 ($P>0.1$)，差异不具有统计学意义。因此确定最优水平为 $A_2B_2C_1$ ，即选择高压均化操作的最佳条件为压力 103 425 kPa，均化次数为 3，温度 20 ℃左右。

2.2.3 高压均化工艺对其他指标的影响 测定上述 9 次试验制得乳剂含量、含量均匀度和 pH 值。试验结果显示，各种样品的含量及含量均匀度之

表 3 正交试验安排和结果

Tab 3 Experimental design and results by the orthogonal design

水平	试验号	A 均化压力	B 均化次数	C 均化温度	D 误差项	最大粒径 (X)/ μm	10-X	>1 μm 粒子 数(Y)	70-Y
10-X	1	1	1	1	1	7.6	2.4	67	3
	2	1	2	2	2	6.3	3.7	64	6
	3	1	3	3	3	5.9	4.1	60	10
	4	2	1	2	3	6	4	59	11
	5	2	2	3	1	5	5	54	16
	6	2	3	1	2	5.3	4.7	55	15
	7	3	1	3	2	5.8	4.2	59	11
	8	3	2	1	3	4.8	5.2	57	13
	9	3	3	2	1	4.6	5.4	55	15
	K ₁	10.2	10.6	12.3	12.8				
	K ₂	13.7	13.9	13.1	12.6				
	K ₃	14.8	14.2	13.3	13.3				
	R	1.533	1.200	0.333	0.233				
	70-Y	K ₁	19.00	25.00	31.00	34.00			
		K ₂	42.00	35.00	32.00	32.00			
		K ₃	39.00	40.00	37.00	34.00			
		R	7.667	5	2	0.667			

表 4 方差分析表

Tab 4 Analysis of variance

水平	方差来源	方差 平方和 1	自由度 N	均方 MS	F 值	P
10-X	A	3.846 7	2	7.693 3	44.38	<0.05
	B	2.660 0	2	5.320 0	30.69	<0.05
	C	0.186 7	2	0.373 3	2.15	>0.1
	D(误差)	0.086 7	2	0.173 3	1	
70-Y	A	104.22	2	208.44	117.25	<0.01
	B	38.889	2	77.778	43.75	<0.05
	C	6.889	2	13.777	7.75	>0.1
	D(误差)	0.888 9	2	1.777 8	1.00	

间差异不具有统计学意义,pH 值之间差异不明显,但随着高压均化压力的增大,pH 值有降低的趋势。结果见表 5。

表 5 9 次试验制得乳剂含量、含量均匀度和 pH 值

Tab 5 The emulsion's pH, content uniformity and content of the nine experiments

试验次数	含量/%	含量均匀度 RSD/%	pH
1	107.9	0.8	8.52
2	108.3	0.5	8.38
3	105.5	0.7	8.30
4	102.7	0.6	8.36
5	104.3	0.4	8.35
6	103.8	0.3	8.26
7	104.8	0.5	8.26
8	103.6	0.8	8.27
9	106.1	0.7	8.16

2.2.4 高压乳匀工艺的确定 用微射流器将初乳在较低压力(55 160 kPa)下均化一次,测定 TC-1 含量^[8],调整 pH 值,然后在高压(103 425 kPa)下均化两次,温度控制在 20℃左右,即得成品乳。取样检测粒度、pH 值及含量。

2.2.5 稳定性的考察 按照上述含量及粒径测定方法对制备产品进行分析,并在(5±2)℃条件下进行为期 6 个月的加速试验,第 1,2,3,6 月取样检验,并与试验开始时进行比较^[9]。3 批样品相关物质检查见图 2,稳定性实验结果见表 6。

表 6 稳定性实验结果

Tab 6 Results of stability

批号	时间/ 月	有关物质	pH 值	粒径/ nm	含量/ %
P20120318	0	总杂≤2.0%; 单杂≤0.5%	7.7	288.4	101.0
	1	总杂≤1.5%; 单杂≤0.3%	7.7	286.5	100.6
	2	总杂≤1.5%; 单杂≤0.3%	7.6	292.4	99.9
	3	总杂≤1.5%; 单杂≤0.3%	7.5	290.3	99.4
	6	总杂≤1.5%; 单杂≤0.3%	7.4	286.0	98.5
P20120326	0	总杂≤2.0%; 单杂≤0.5%	7.2	296.9	100.6
	1	总杂≤1.5%; 单杂≤0.3%	7.1	298.3	99.7
	2	总杂≤1.5%; 单杂≤0.3%	7.1	303.6	99.2
	3	总杂≤1.5%; 单杂≤0.3%	7.0	300.1	99.2
	6	总杂≤1.5%; 单杂≤0.3%	6.8	302.5	98.6
P20120406	0	总杂≤2.0%; 单杂≤0.5%	7.4	288.3	101.4
	1	总杂≤1.5%; 单杂≤0.3%	7.4	286.6	100.3
	2	总杂≤1.5%; 单杂≤0.3%	7.2	283.5	99.6
	3	总杂≤1.5%; 单杂≤0.3%	7.2	293.3	99.3
	6	总杂≤1.5%; 单杂≤0.3%	6.9	302.7	98.1

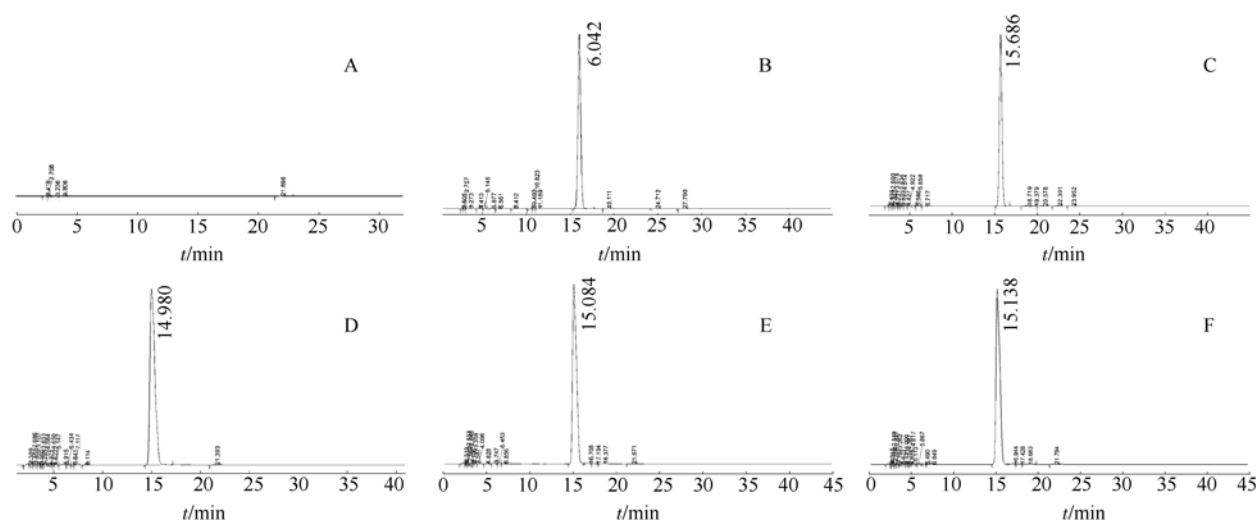


图 2 TC-1 HPLC 色谱图

A-空白辅料；B-TC-1 原料药；C-TC-1 乳剂对照；D-P20120318 相关物质检查；E-P20120326 相关物质检查；F-P20120406 相关物质检查

Fig 2 HPLC chromatography of TC-1

A-blank accessories; B-API of TC-1; C-TC-1 comparison products; D-related substances determination of P20120318; E-related substances determination of P20120326; F-related substances determination of P20120406

3 灭菌工艺的确定

3.1 灭菌方法的选择

常用的灭菌方法有：湿热灭菌、干热灭菌、气体灭菌与辐射灭菌。每种方法都有其适用范围和特点，对于药品生产来说：湿热灭菌用于对热稳定的注射剂的最终灭菌、不耐干热的生产器具以及无菌工衣等的灭菌；干热灭菌用于安瓿、金属物品等的灭菌；气体灭菌用于洁净室、无菌室以及空调管道等空间灭菌；而辐射灭菌很少用到。除辐射灭菌，其他灭菌方法在静脉脂肪乳剂的试验及生产过程中都必须使用，以保证最终产品达到无菌要求^[10]。

3.2 方法

据文献报道，对热不敏感的药物制成的脂肪

乳剂，可以采用热压灭菌^[11]。常用的方法有 121 ℃，15 min。本研究中考察了 121 ℃，10 min；121 ℃，15 min；121 ℃，25 min 热压灭菌效果、灭菌后乳液外观及含量的变化。

3.3 结果与结论

3 种灭菌条件的效果一样，均达到无菌要求。热压灭菌 15 min 和 25 min 相比，得到的乳剂外观无差别，含量无变化，未检出有关物质或出现增多的情况，粒度减小。而 121 ℃，25 min 条件下含量下降较明显，有关物质超出限度，粒度有所变大。因其他 2 种灭菌工艺对制剂的稳定性均无影响。为保证无菌，设定热压灭菌条件为 121 ℃，15 min。结果见表 7。

表 7 灭菌工艺对乳剂稳定性的影响

Tab 7 Influence on stability of emulsion after sterilization by autoclaving

灭菌条件	灭菌前			灭菌后		
	外观	含量/%	有关物质	外观	含量/%	有关物质
121 ℃ 10 min	乳白色均径为 278.3 nm	102.8	符合规定	乳白色均径为 280.6 nm	102.2	符合规定
121 ℃ 15 min	乳白色均径为 278.3 nm	102.8	符合规定	乳白色均径为 278.3 nm	102.5	符合规定
121 ℃ 25 min	乳白色均径为 278.3 nm	102.8	符合规定	乳白色均径为 278.3 nm	96.6	不符合规定

4 结论

本实验对 TC-1 脂肪乳的制备进行了系统地试验研究，主要内容如下：①通过单因素考察试验，确定了处方中各种辅料的用量及配比：精制蛋黄卵磷脂 1.2%，甘油 2.2%，大豆油 20%；初乳制备温度 60 ℃。通过不同工艺的比较试验，确定了初

乳的制备工艺：采用干胶法。②以研究国际先进的 Microfluidizer-MiniBEE 型高压均化机中的应用为重点，以制得粒度小、分布均匀的乳剂为目的，采用正交试验方法，确定了静脉脂肪乳制剂的高压均化工艺及参数：用微射流器将初乳在较低压力(55 160 kPa)下均化一次，测定 TC-1 含量，调整

pH 值, 然后在高压(103 425 kPa)下均化 2 次, 温度控制在 20 ℃左右, 即得成品乳。③对灭菌方法及工艺进行考察, 确定热压灭菌条件为: 121 ℃, 15 min。

以上是通过 3 批小批量试验所获得的 TC-1 静脉脂肪乳制备的关键工艺及参数, 对工业化生产是否完全适合, 须通过中试放大予以验证^[12]。

REFERENCES

- [1] HUSSAR D A. New drugs: Clevidipine butyrate, difluprednate, and tetrabenazine [J]. J Am Pharm Assoc, 2008, 48(6): 815-821.
- [2] LESLIE J, BRISTER N, LEVY J H, et al. Treatment of postoperative hypertension after coronary artery bypass surgery. Double-blind comparison of intravenous isradipine and sodium nitroprusside [J]. Circulation, 1994, 90(5): 256-261.
- [3] BERGESE S D, PUENTE E G. Clevidipine butyrate: a promising new drug for the management of acute hypertension [J]. Expert Opin Pharmacother, 2010, 11(2): 281-295.
- [4] ARONSON S. Clevidipine in the treatment of perioperative hypertension: assessing safety events in the ECLIPSE trials [J]. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2009, 7(5): 465-472.
- [5] MIRTALLO J M, DASTA J F, KLEINSCHMIDT K C, et al. State of the art review: Intravenous fat emulsions: Current applications, safety profile, and clinical implications [J]. Ann Pharmacother, 2010, 44(4): 688-700.
- [6] ZHENG J M. Handbook of Pharmaceutical Excipients(药用辅料手册) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 1263.
- [7] DAVIS S S, HANSRANI P K. The influence of emulsifying agents on the phagocytosis of lipid emulsions by macrophages [J]. Int J Pharm, 1985, 23(1): 69-77.
- [8] GYLLENHAAL O, KARLSSON A, VESSMAN J. Packed-column supercritical fluid chromatography for the purity analysis of clevidipine, a new dihydropyridine drug [J]. J Chromatogr A, 1999, 862(1): 95-104.
- [9] SCHULZ L T, ELDER E J J R, JONES K J, et al. Stability of sodium nitroprusside and sodium thiosulfate 1:10 intravenous admixture [J]. Hosp Pharm, 2010, 45(10): 779-784.
- [10] Ch.P(2010)Vol II (中国药典 2010 年版. 二部) [S]. 2010: Appendix 65-66.
- [11] LEVEEN H H, GIORDANO P, SPLETZER J. The mechanism of removal of i.v.injected fat [J]. Arch Surgery, 1961, 83: 169-179.
- [12] LAMMERHOFER M, GYLLENHAAL O, LINDNER W. HPLC enantiomer separation of a chiral 1,4-dihydropyridine monocarboxylic acid [J]. J Pharm Biomed Anal, 2004, 35(2): 259-266.

收稿日期: 2013-08-28

shRNA 沉默 STAT3 基因对结肠癌细胞增殖及顺铂敏感性的影响

王朝阳¹, 王莹², 丁丽宏¹, 周静^{3*} (1.内蒙古医科大学附属医院, 呼和浩特 010050; 2.内蒙古第一机械集团有限公司医院, 内蒙古包头 014030; 3.内蒙古医科大学, 呼和浩特 010010)

摘要: 目的 构建携带信号转导与转录激活子 3(STAT3)基因的短发夹 RNA(shRNA)真核表达载体, 观察 pGPU6/GFP/Neo-STAT3 重组质粒对 HCT116 细胞顺铂化疗敏感性的影响。方法 设计并构建稳定转录 shRNA STAT3 的质粒, 采用脂质体法转染结肠癌 HCT116 细胞, Western blot 法检测转染后 STAT3 蛋白表达变化, MTT 法检测细胞增殖变化。重组质粒联合顺铂作用于 HCT116 细胞后, MTT 法检测细胞存活率。结果 成功构建了 pGPU6/GFP/Neo-STAT3 重组质粒, 测序证实重组质粒构建正确。重组质粒转染 HCT116 细胞后, 细胞增殖明显受抑制, STAT3 蛋白表达降低。重组质粒联合顺铂治疗后, 细胞增殖活性显著降低。结论 shRNA STAT3 重组质粒能明显降低 HCT116 细胞中 STAT3 蛋白的表达, 抑制细胞增殖, 提高结肠癌细胞对顺铂的敏感性。

关键词: 信号转导与转录激活子 3; RNA 干扰; 结肠癌; 顺铂

中图分类号: R963

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)12-1276-05

Effects of STAT3 Gene Silencing by ShRNA on Colon Carcinoma Cells and Chemotherapy Sensitivity to Cisplatin

WANG Zhaoyang¹, WANG Ying², DING Lihong¹, ZHOU Jing^{3*} (1.Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical College, Hohhot 010050, China; 2.The Hospital of the First Machinery Group, Inner Mongolia Autonomous Region, Baotou 014030, China; 3.Inner Mongolia Medical College, Hohhot 010010, China)

基金项目: 内蒙古医学院青年创新基金(NY2010QN008, NY2011QN026)

作者简介: 王朝阳, 男, 博士, 副主任医师 Tel: 13947104160 E-mail: wzydoc@163.com *通信作者: 周静, 女, 博士, 副教授 Tel: (0471)6557564 E-mail: nmzhoujing2004@sina.com