

# 依托泊苷胶束的制备与表征

劳新南<sup>1</sup>, 曹高忠<sup>2</sup> (1.桐乡市康复医院, 浙江 桐乡 314500; 2.温州医科大学附属第一医院, 浙江 温州 325000)

**摘要:** 目的 制备并表征装载依托泊苷(VP-16)的 D- $\alpha$ -生育酚-聚乙二醇琥珀酸酯(TPGS)胶束(VP-16/TPGS)。方法 采用薄膜水化法制备 VP-16/TPGS, 测定其粒径、Zeta 电位, 研究其体外药物释放行为, 考察其细胞摄取和细胞毒性, 评价其血液相容性。结果 所制得的 VP-16/TPGS 胶束具有较小的粒径; 具有较高的载药量和包封率; 体外呈现良好的缓控释效果; 可增强 H446 细胞对其的摄取, 进而提高抗肿瘤活性; 具有较高的血液相容性。结论 VP-16/TPGS 胶束是一种安全、有效的 VP-16 递送系统。

**关键词:** 依托泊苷; D- $\alpha$ -生育酚-聚乙二醇琥珀酸酯; 胶束

中图分类号: R943 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2017)07-0992-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.07.013

引用本文: 劳新南, 曹高忠. 依托泊苷胶束的制备与表征[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(7): 992-996.

## Preparation and Characterization of Etoposide Micelles

LAO Xinnan<sup>1</sup>, CAO Gaozhong<sup>2</sup> (1. The Rehabilitation Hospital of Tongxiang, Tongxiang 314500, China; 2. The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To prepare and characterize the etoposide(VP-16)-loaded D- $\alpha$  tocopheryl polyethylene glycol succinate(TPGS) micelles. **METHODS** The VP-16/TPGS was prepared using thin-film hydration method. The particle size and Zeta potential were measured. The drug release behavior, cellular uptake and cytotoxicity were also studied. At last, the hemocompatibility was also evaluated. **RESULTS** The prepared VP-16/TPGS micelles had small sizes, high drug loading capacity and encapsulated efficiency. The VP-16/TPGS micelles also exhibited a sustained and controllable *in vitro* release behavior. The enhanced cellular uptake of the VP-16/TPGS micelles by H446 cells improved the cytotoxicity. Besides, the VP-16/TPGS micelles showed a good hemocompatibility. **CONCLUSION** VP-16/TPGS nanomicelle may be a safe and efficient drug delivery system for VP-16.

**KEY WORDS:** etoposide; D- $\alpha$  tocopheryl polyethylene glycol succinate(TPGS); micelles

依托泊苷(etoposide, VP-16), 化学名为 4-去甲基表鬼臼毒素-9-(4,6-O-(R)亚乙基)- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷, 鬼臼毒素的糖代谢产物, 是一种半合成的抗肿瘤药物<sup>[1]</sup>。VP-16 对小细胞肺癌具有良好的疗效, 有效缓解率达 40%~85%; 对其他多种肿瘤, 如急性白血病、卵巢癌、睾丸肿瘤、恶性淋巴瘤等也有效<sup>[2-5]</sup>。目前临床上常用为 VP-16 注射液, 由于 VP-16 难溶于水, 该注射液含有大量的无水乙醇、吐温 80、聚乙二醇 400 作为药用辅料, 易引起超敏反应、胃肠道刺激、高血压等不良反应, 使得该注射液难以被患者耐受<sup>[2]</sup>。因而亟需开发一种安全、有效的 VP-16 注射液, 以降低 VP-16 注射液的不良反应。

目前, 纳米技术已被广泛应用到药物的传递和肿瘤治疗中。胶束制备方法简单且不使用有毒溶剂, 可提高制剂的安全性; 同时其特殊的“亲

水-疏水”链段构成的“核-壳”结构, 使其具有优异的装载疏水性药物的性能; 而其纳米级别的尺寸(<100 nm)及亲水的外壳, 使其具有长循环的特性, 并被动靶向于肿瘤组织部位, 进而提高疗效<sup>[6-9]</sup>。胶束已成为目前研究的热点<sup>[10-12]</sup>。

D- $\alpha$ -生育酚-聚乙二醇琥珀酸酯(tocopheryl polyethylene glycol succinate, TPGS)是一种水溶性的天然维生素 E 衍生物, 由疏水性的维生素 E 链段和亲水性的聚乙二醇链段组成, 可以自组装形成胶束, 已被用作疏水性抗肿瘤药物紫杉醇、多烯紫杉醇、多柔比星等的传递载体<sup>[13-14]</sup>。维生素 E 是人体必需的一种维生素, 而聚乙二醇已被美国 FDA 批准可用人体, 因而 TPGS 是一种安全的材料; 作为药物载体时, 可避免其他辅料所引起的不良反应。

本实验以 TPGS 作为 VP-16 载体, 通过薄膜

作者简介: 劳新南, 女, 主管药师 Tel: 13600559416 E-mail: xn\_lao@126.com

水化法, 制备装载 VP-16 的 TPGS 胶束(VP-16 loaded TPGS micelles, VP-16/TPGS), 研究所制得制剂的性能, 并对其体外抗肿瘤活性进行评价, 为 VP-16 的新剂型的开发提供实验依据。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Nano-ZS90 型激光粒度与 Zeta 电位分析仪(英国 Malvern 公司); KQ-3200B 型超声波清洗器(江苏昆山仪器有限公司); BT-125D 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司); R-201 型旋转蒸发仪(上海申顺生物科技有限公司); JEM-2100 型透射电子显微镜(日本 JEOL 公司); Varioskan LUX 全波长酶标仪(美国 ThermoFisher 公司); Lambda35 型紫外分光光度计(美国 PerkinElmer 公司)。

### 1.2 材料

VP-16 对照品和 VP-16 原料药均购自上海源叶生物技术有限公司; VP-16 注射液(齐鲁制药有限公司, 批号: WB1K12110008, 规格: 5 mL: 100 mg); 乙腈(色谱纯)、TPGS 均购自美国 Sigma-Aldrich 公司; CCK-8(上海碧云天生物技术有限公司); 其他试剂均为分析纯。

## 2 方法

### 2.1 VP-16/TPGS 胶束的制备

采用薄膜水化法制备胶束。以 10%载药量为例, 将 10 mg 的 VP-16 和 90 mg 的 TPGS 分别溶于 3 mL 乙腈中, 然后加入到 25 mL 单颈圆底烧瓶中, 混合均匀; 37 °C 下抽真空旋蒸除去乙腈, 制得均一的含 VP-16 和 TPGS 的混合薄膜; 加入 10 mL 超纯水, 热水浴中振摇, 制得澄清透明溶液, 使用 0.22 μm 微孔滤膜趁热过滤溶液, 除去游离的 VP-16, 即得装载 VP-16 的 TPGS 胶束溶液; 真空冷冻干燥, 得白色粉末状固体, 密封保存于 -20 °C, 以备后续使用。空白 TPGS 胶束的制备采用同法, 不加 VP-16。

### 2.2 VP-16/TPGS 胶束的表征

**2.2.1 粒径与 Zeta 电位** 按“2.1”项下方法, 制备理论载药量分别为 0, 5%, 10%, 15%, 20% 的 VP-16/TPGS 胶束溶液, 0.22 μm 微孔滤膜过滤后冷却至室温, 使用激光粒度仪测定其粒径及其分散指数(polydispersity index, PDI)和表面电位, 各样品平行测定 3 次取平均值。

**2.2.2 形态观察** 取“2.1”项下制得的 VP-16/TPGS 胶束溶液, 稀释至适宜浓度, 滴于硝酸纤维覆盖的铜网上; 磷钨酸负染色后, 自然晾干, 通过透射电子显微镜观察胶束形态。

### 2.3 载药量与包封率测定

**2.3.1 色谱条件** 色谱柱: HC-C<sub>18</sub> 键合硅胶柱, (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 水-乙腈(50:50); 流速: 1 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长: 254 nm; 进样量: 20 μL; 柱温: 30 °C。

**2.3.2 标准曲线的建立** 精密称量 VP-16 对照品 10 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加入乙腈超声溶解并定容, 得浓度为 1 000 μg·mL<sup>-1</sup> 的母液。将母液稀释得到 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19 μg·mL<sup>-1</sup> 的系列对照品溶液。按“2.3.1”项下色谱条件进样, 以峰面积(A)为纵坐标, VP-16 浓度(C)为横坐标, 进行线性回归, 建立 VP-16 标准曲线。

**2.3.3 载药量与包封率的测定** 精密称取 VP-16/TPGS 胶束冻干品适量, 乙腈溶解并稀释, 按“2.3.1”项下条件进行测定, 并通过“2.3.2”项中建立的标准曲线方程计算 VP-16 含量。按下列公式计算: 载药量(drug loading capacity, DLC)(%)=(测得的药物量/胶束的取样量)×100%, 包封率(encapsulated efficiency, EE)(%)=测得的药物含量/理论药物含量×100%。

### 2.4 体外释放研究

分别取胶束溶液和生理盐水稀释的市售 VP-16 注射液(对照)适量, 加入到透析袋中, 置于含 0.5%吐温 80 的 PBS (pH=7.4)缓冲液中; 在 (37±0.5)°C、100 r·min<sup>-1</sup> 条件下恒温振荡, 在预先设定的时间点取样, 并更换新鲜释放介质。按“2.3”项下方法测定各时间点药物释放量, 计算 VP-16 累积释放量, 绘制药物流放曲线。本实验重复 3 次, 所得结果为 3 次平均值。

### 2.5 细胞学评价

**2.5.1 细胞摄取研究** 采用 HPLC 测定不同时间点细胞内药物含量, 考察人源小细胞肺癌细胞株(H446)对 VP-16/TPGS 胶束摄取行为。将处于对数生长期的 H446 细胞制备成细胞悬浮液, 接种于 6 孔板中, 每孔约 1×10<sup>6</sup> 个细胞, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h。分别加入 20 μg·mL<sup>-1</sup> 的 VP-16/TPGS 胶束溶液和市售 VP-16 注射液, 孵育

1, 2, 4 h, 胰酶消化并收集细胞, 使用冷的 PBS 溶液洗涤 3 次; 再加入 100  $\mu\text{L}$  纯化水, 液氮冷冻-室温复溶, 如此 3 次; 再加入乙腈沉淀蛋白, 萃取药物; 所得乙腈溶液按“2.3”项下方法测定药物含量。

**2.5.2 细胞毒性研究** 采用 CCK-8 法考察 VP-16/TPGS 胶束对 H446 细胞的生长抑制作用。取处于对数生长期的 H446 细胞悬浮液, 接种于 96 孔板中, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 细胞密度约为每孔  $5 \times 10^3$  个, 在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中培养 24 h。按 100  $\mu\text{L}$  每孔, 加入不同浓度梯度的 VP-16/TPGS 胶束溶液和市售 VP-16 注射液, 加完全培养基处理组作为空白对照, 设 6 个复孔, 继续培养 24 h。每孔加 CCK-8 溶液 20  $\mu\text{L}$ , 于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱再孵育 2 h, 在酶标仪 450 nm 处测定 OD 值, 取平均 OD 值分析并计算细胞存活率。

## 2.6 血液相容性

分别取新鲜制备的 2% 的兔红细胞混悬液 2.5 mL, 加入到 10 mL 试管中, 再分别加入 2.5 mL 纯化水(阳性对照)、生理盐水(阴性对照)、不同浓度的 VP-16/TPGS 胶束溶液或市售 VP-16 注射液, 混合均匀, 于 37  $^{\circ}\text{C}$  静置 3 h, 观察溶液状态; 将各管于 1 500  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 取上清液在紫外可见分光光度计上 545 nm 处, 以纯化水为空白读取各管 OD 值。溶血率计算公式如下: 溶血率(%) = (样品吸光度-阴性对照吸光度)  $\times$  100% / (阳性对照吸光度-阴性对照吸光度)

## 2.7 统计学分析

实验结果用  $\bar{x} \pm s$  表示。采用 SPSS 19.0 统计软件处理实验数据, 计量数据采用  $t$  检验,  $P < 0.05$  认为有统计学差异。

## 3 结果

### 3.1 VP-16/TPGS 胶束的表征

**3.1.1 粒径与 Zeta 电位** VP-16/TPGS 胶束溶液的粒径和表面电位变化见表 1。可以看出, 同空白胶束溶液相比, 装载 VP-16 的胶束的粒径略微增大, 而且随 VP-16 的投料量增大也增大; 但是所有胶束溶液的电位基本接近于电中性。

**3.1.2 形态观察** VP-16/TPGS 胶束的形态见图 1。可以看出, 胶束呈规则的单分散球形, 粒径约为 30 nm, 与纳米粒度仪测定的结果相吻合。

表 1 VP-16/TPGS 胶束理化性质结果( $n=3$ )

Tab. 1 Results of the physico-chemical properties of VP-16/TPGS micelles( $n=3$ )

| 编 号 | 理论载药量/% | 粒径/nm          | PDI             | 电位/mV  | 载药量/%            | 包封率/%            |
|-----|---------|----------------|-----------------|--------|------------------|------------------|
| S1  | 0       | 25.3 $\pm$ 0.1 | 0.15 $\pm$ 0.03 | -1.018 | 0                | 0                |
| S2  | 5       | 27.2 $\pm$ 0.2 | 0.18 $\pm$ 0.02 | -1.063 | 4.89 $\pm$ 0.03  | 97.80 $\pm$ 0.60 |
| S3  | 10      | 28.9 $\pm$ 0.4 | 0.18 $\pm$ 0.04 | -0.760 | 9.45 $\pm$ 0.32  | 94.52 $\pm$ 3.21 |
| S4  | 15      | 30.6 $\pm$ 0.3 | 0.19 $\pm$ 0.03 | -0.842 | 13.67 $\pm$ 0.26 | 91.33 $\pm$ 1.73 |
| S5  | 20      | 33.3 $\pm$ 0.6 | 0.22 $\pm$ 0.03 | -0.996 | 17.70 $\pm$ 0.38 | 88.50 $\pm$ 1.90 |

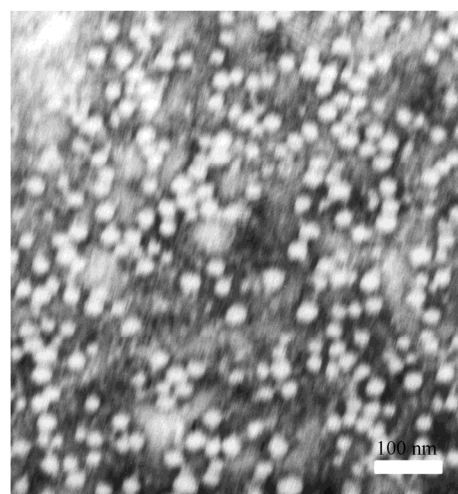


图 1 VP-16/TPGS 胶束的形态

Fig. 1 The morphology of VP-16/TPGS micelles

### 3.2 载药量与包封率

**3.2.1 标准曲线的建立** 在 0.78~100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  内, 浓度与峰面积呈现良好的线性关系, 标准曲线方程为  $A=8.578C+1.484$  ( $r=0.999\ 8$ )。

**3.2.2 载药量与包封率** VP-16/TPGS 胶束的载药量与包封率结果见表 1。可以看出, 随 VP-16 的投料量增大也载药量增高, 但包封率随之下降; 当投料比达到 20/80 时, 包封率 $<90\%$ 。因而, 综合载药量与包封率考虑, 选择 15% 的载药量组进行后续试验研究。

### 3.3 体外释放研究

VP-16 制剂的体外释放曲线见图 2。可以看出, 市售 VP-16 注射液组药物快速释放, 在前 10 h, 累积释放量达 90%; 而 VP-16/TPGS 组药物呈现缓慢释放的状态, 前 10 h 累积释放量为 65%, 之后曲线趋于平稳, 48 h 时的累积释放量约为 83%。

### 3.4 细胞学评价

**3.4.1 细胞摄取研究** VP-16 的细胞摄取量见图 3。可以看出, 细胞对 VP-16 的摄取呈现时间依赖

性, 随时间延长, 细胞对 VP-16 的摄取量增多; 同时, 同市售 VP-16 注射液组相比, VP-16/TPGS 胶束组细胞摄取了更多的 VP-16[2 h,  $(0.68 \pm 0.09) \mu\text{g}$  vs  $(1.52 \pm 0.10) \mu\text{g}$ ; 4 h,  $(1.86 \pm 0.21) \mu\text{g}$  vs  $(3.53 \pm 0.36) \mu\text{g}$ ;  $P < 0.05$ ]。

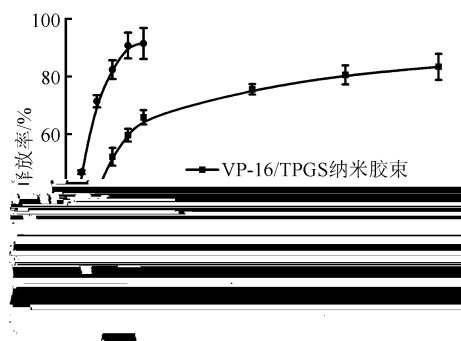


图2 体外药物释放曲线

Fig. 2 *In vitro* drug release behavior

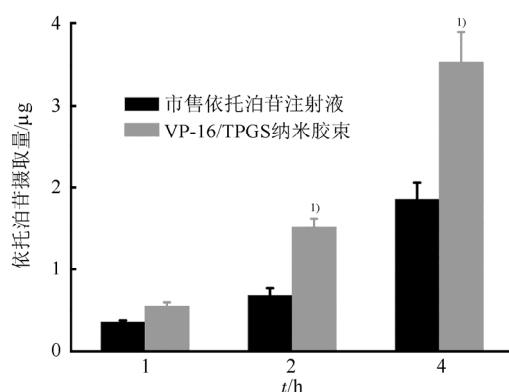


图3 H446 细胞对 VP-16 的摄取与市售 VP-16 注射液组相比,  $^{1)}P < 0.05$ 。

Fig. 3 The cellular uptake of etoposide by H446 cells Compared with VP-16 injection,  $^{1)}P < 0.05$ .

**3.4.2 细胞毒性研究** VP-16 对人小细胞肺癌 H446 细胞的生长抑制作用见图 4。可以看出, VP-16 的抑制作用呈现浓度依赖性, 随浓度增高, H446 细胞的生长受到明显抑制; 并且 VP-16/TPGS 胶束组的抑制作用更明显,  $IC_{50}(8.834 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$  小于市售 VP-16 注射液组( $IC_{50}=14.017 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )。

### 3.5 血液相容性

市售 VP-16 注射液主要通过静脉注射给药, 作为其改进剂型, VP-16/TPGS 也主要通过静脉给药, 因而应当考察其与血液的相容性, 溶血率结果见图 5。可以看出, 在 VP-16 浓度增大到  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时, VP-16/TPGS 的溶血率仅为 0.3%,  $< 5\%$  (溶血率  $> 5\%$  时, 视为有溶血作用), 可视为无溶血作用。

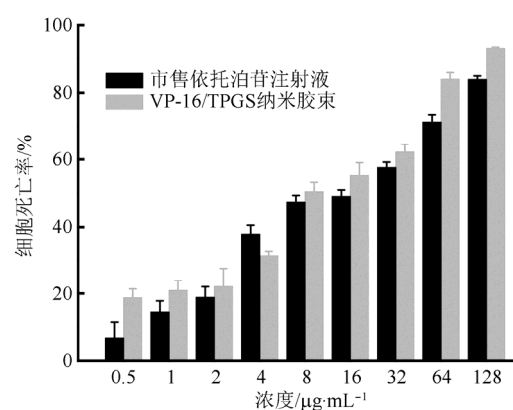


图4 VP-16 制剂对 H446 细胞的毒性

Fig. 4 The cytotoxicity of etoposide formulation on H446 cells

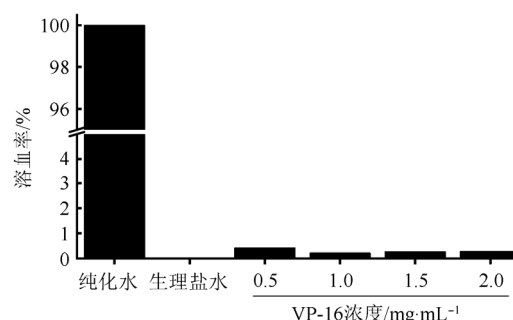


图5 VP-16/TPGS 胶束的溶血率

Fig. 5 The hemolysis rate of VP-16/TPGS micelles

## 4 讨论

VP-16 必须富集于肿瘤组织部位, 才能有效地发挥抗肿瘤作用, 但是目前临床使用的 VP-16 注射液缺乏靶向性, 且所用辅料具有一定的不良反应。而聚合物胶束是一种优异的传递疏水性药物的载体, 可通过肿瘤组织 EPR 效应(增强的渗透和滞留作用), 而被动靶向富集于肿瘤组织, 从而提高药物浓度。将 VP-16 胶束化能够优化 VP-16 的使用。

本实验中使用由生物安全性良好的维生素 E 和聚乙二醇组成的 TPGS 作为药物载体, 采用薄膜水化法制备了装载 VP-16 的 TPGS 胶束。该制备方法未使用任何有毒表面活性剂, 所制备的胶束具有较小的粒径, 呈规则的单分散分布, 且粒径为 20~30 nm, 可通过 EPR 效应被动靶向于肿瘤组织部位; 而其表面基本不荷电, 可减小体循环过程中的非特异吸附。该胶束具有较高的载药量和包封率, 在载药量达 15% 时, 包封率仍  $> 90\%$ , 表明 TPGS 是一种有效的 VP-16 载体。体外释放研究表明, 该载药胶束具有更慢的药物释放行为,

表明 VP-16 胶束具有良好的缓控释效果, 有助于延长体循环时间。体外抗肿瘤活性实验表明, VP-16 胶束与市售 VP-16 注射液组均有明显抑制 H446 细胞的作用, 但胶束组显示更强的抗肿瘤活性, 结合细胞摄取结果, 可以看出这是因为 VP-16 胶束化增强了 H446 细胞对药物摄取, 使更多的药物富集于细胞, 因而产生更强的杀伤作用。血液相容性研究表明, VP-16 胶束没有溶血作用, 因而 VP-16/TPGS 适于静脉注射给药, 有利于体内应用。

因而, 本研究所制备的 VP-16/TPGS 胶束是一种安全、有效的 VP-16 递送系统, 值得进一步深入的研究。

## REFERENCES

- [1] HANDE K R. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor [J]. *Eur J Cancer*, 1998, 34(10): 1514-1521.
- [2] BENJAMIN C, FU J, NEIL D. Enhanced efficacy of local etoposide delivery by poly (ether-anhydride) particles against small cell lung cancer *in vivo* [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(2): 339-344.
- [3] DEANDELO D J, FATHI A T, WERNER L. A phase 1 study of lenalidomide in combination with mitoxantrone, etoposide, and Ara-C in patients with relapsed or refractory Acute Myeloid Leukemia [J]. *Blood*, 2015, 119(6): 126-2550.
- [4] KUMAR A, LE N, SANTOS J. Chemotherapy is of value in second line and beyond, relapsed high-grade, serous epithelial ovarian cancer: An analysis of outcomes obtained with oral etoposide [J]. *Am J Clin Oncol*, 2016. Doi: 10.1097/coc.0000000000000281.
- [5] YOU B, SALLES G, BACHY E. Etoposide pharmacokinetics impact the outcomes of lymphoma patients treated with BEAM regimen and ASCT: a multicenter study of the LYmphoma Study Association (LYSA) [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2015, 76(5): 939-948.
- [6] KATAOKA K, HARADA A, NAGASAKI Y. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 47(1): 113-131.
- [7] YOKOYAMA M. Polymeric micelles as a new drug carrier system and their required considerations for clinical trials [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2010, 7(2): 145-158.
- [8] LI Y P, XIAO K, LUO J T. A novel size-tunable nanocarrier system for targeted anticancer drug delivery [J]. *J Control Release*, 2010, 144(3): 314-323.
- [9] FANG J, NAKAMURA H, MAEDA H. The EPR effect: unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011, 63(3): 136-151.
- [10] WANG G H, SHEN H P, JIN C S, et al. Antitumor activity of stearic acid grafted chitosan oligosaccharide polymeric micelles loading podophyllotoxin against human glioma cells [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2016, 33(7): 1248-1251.
- [11] XU H Y, XIE L Y, CHANG D, et al. Preparation of MePEG-PLGA hydroxy camptothecin nanoparticles by improved dialysis method [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2016, 33(6): 746-751.
- [12] HOU J, LI J, SUN E, et al. Synergistic effect of *Epimedii folium* fried with suet oil for warming kidney and enhancing yang in dosage form of self-assembled micelles [J]. *China J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2016, 41(14): 2633-2637.
- [13] MU L, FENG S S. Vitamin E TPGS used as emulsifier in the solvent evaporation/extraction technique for fabrication of polymeric nanospheres for controlled release of paclitaxel (taxol) [J]. *J Control Release*, 2002, 80(1-3): 129-144.
- [14] PAN J, WANG Y T, FENG S S. Formulation, characterization, and *in vitro* evaluation of quantum dots loaded in poly(lactide)-vitamin E TPGS nanoparticles for cellular and molecular imaging [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 101(3): 622-633.

收稿日期: 2016-12-01  
(本文责编: 曹粤锋)