

紫杉醇长循环脂质体用于肿瘤小剂量化疗的研究

王俊平, 赵丽妮, 王伟(沈阳医学院药理学教研室, 沈阳 110034)

摘要: 目的 研制紫杉醇长循环脂质体(paclitaxel stealth liposome, PSL)用于肿瘤小剂量化疗, 评价其急性毒性和抗肿瘤作用。方法 制备 PSL, 其中含有聚乙二醇-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(PEG-DSPE)和油酸。PEG-DSPE 用于延长脂质体的血液循环时间, 油酸用于降低脂质体的粒度。利用激光粒度/Zeta 电位测定仪和 Sephadex G50 色谱柱, 观察和测定了 PSL 的粒度分布、Zeta 电位和包封率。采用昆明种小鼠, 比较了 PSL 与紫杉醇的急性毒性, 并且评价了 PSL 的长循环效果。采用小剂量给药方案, 评价了 PSL 的抗肿瘤作用。结果 在 5%葡萄糖水溶液中, PSL 的粒径为 $(138.6\pm 4.6)\text{nm}$, Zeta 电位为 $(-31.6\pm 7.9)\text{mV}$, 包封率可达 $(97.8\pm 2.6)\%$ ($n=3$)。长循环脂质体显著延长了紫杉醇的血液循环时间, 减轻了紫杉醇的急性毒性, 同时显著提高了紫杉醇的抗肿瘤作用。采用小剂量给药方案, PSL 的抗肿瘤作用显著高于紫杉醇注射液($P<0.01$)。结论 PSL 包封率高, 粒度小, 制备工艺简单。与紫杉醇注射液比较, PSL 更适用于肿瘤的小剂量化疗。

关键词: 紫杉醇; 长循环脂质体; 小剂量化疗

中图分类号: R943.4

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2010)11-1069-04

Anticancer Effect of Paclitaxel Carried with Stealth Liposome Used for Metronomic Chemotherapy

WANG Junping, ZHAO Lini, WANG Wei(Department of Pharmacology, Shenyang Medical College, Shenyang 110034, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare paclitaxel stealth liposome (PSL) used for metronomic chemotherapy and evaluate its acute toxicity and anticancer effect. **METHODS** PSL was prepared, in which oleic acid, vitamin E, cholesterol and PEG-DSPE(polyene glycol derivative of distearoylphosphatidyl ethanolamine, mean molecular weight of PEG 2000) were included. PEG-DSPE was used to extend the circulation time of PSL. Oleic acid was used to reduce the average particle size of PSL. PSL was characterized using laser light scattering instrument and Sephadex G50 column. The anticancer effect of PSL was evaluated using S180 tumor model and its acute toxicity was compared with that of free paclitaxel. **RESULTS** The average diameter of PSL was $(138.6\pm 4.6)\text{nm}$ and its Zeta potential was $(-31.6\pm 7.9)\text{mV}$ while its loading efficiency was $(97.8\pm 2.6)\%$. Compared with free paclitaxel, PSL showed lower acute toxicity and greater anticancer effect. In metronomic chemotherapy, PSL showed greater anticancer effect than free paclitaxel. **CONCLUSION** PSL, which showed high loading efficiency and small particle size, can be prepared easily and may become a better candidate for cancer metronomic chemotherapy than paclitaxel injection.

KEY WORDS: paclitaxel; stealth liposome; metronomic chemotherapy

肿瘤新生血管的内皮细胞对各种抗肿瘤化疗药物都很敏感^[1]。小剂量化疗是一种新型的化疗方案, 与传统的化疗方案截然不同^[2]。传统的肿瘤化疗方案一般是采用最大耐受剂量间隔较长时间(如 2~3 周)给药, 以确保人体正常组织在给药间隔期间得以适当的修复。但是, 这种较长的给药间隔, 使肿瘤血管也得以修复, 结果肿瘤营养供给得以恢复, 肿瘤继续生长, 是传统肿瘤化疗失败的原因之一。与之相反, 小剂量化疗是采用很小的剂量, 例如传统剂量的十分之一, 缩短给药时间间隔, 即频繁多剂量给药。小剂量化疗的根本目的是延长化疗药物和肿瘤血管的作用时间, 抑制肿瘤血管内皮细胞的生长, 阻断肿瘤的营养供给, 以达到“饿死”

肿瘤的目的。因此, 肿瘤小剂量化疗也称为肿瘤的抗血管新生疗法。但是, 如何选择合适的化疗药物用于肿瘤小剂量化疗, 目前尚无明确的原则。

长循环脂质体(stealth liposome)是一种新型药物载体, 主要用于运载抗癌药物, 特别是脂溶性药物, 其作用是通过延长所运载的药物的血液循环时间, 减少药物向正常组织分布, 促进药物向血管通透性比较高的肿瘤组织分布, 而提高药物的疗效并减轻药物的不良反应^[3]。笔者推测, 长循环脂质体能够延长抗癌药物与肿瘤新生血管的作用时间, 有利于抗癌药物更好的发挥抑制肿瘤血管新生的作用, 更适用于肿瘤的小剂量化疗。

紫杉醇(paclitaxel)是红豆杉树皮中的一种抗癌

基金项目: 辽宁省教育厅科研项目(2004F068)

作者简介: 王俊平, 男, 博士, 教授 Tel: 14704020667 E-mail: greennasi@yahoo.com

药物,抗癌机制独特,能够促进微管蛋白聚合,进而抑制微管蛋白解聚,致使快速分裂的肿瘤细胞终止于有丝分裂阶段而死亡^[2]。但是,此药不良反应多且严重,主要有过敏反应、骨髓抑制、神经毒性、心血管毒性和肝脏毒性等^[4]。目前,临床上使用的紫杉醇脂质体,不良反应比紫杉醇注射液减轻,但是药效不提高^[5-6]。为了提高紫杉醇疗效同时降低其不良反应,并解决其水溶性差的问题,笔者研制了紫杉醇长循环脂质体(paclitaxel stealth liposome, PSL)用于肿瘤的小剂量化疗。

1 仪器与试剂

LC-10A型高效液相色谱仪附RF-10AXL型荧光检测器(日本岛津);激光粒度/Zeta电位分析仪(ELS800,日本);JSM-T200型扫描电子显微镜(JEOL,日本);高速匀浆机(Nissei Co.,日本);Sephadex G-50(上海医药工业研究院)。紫杉醇(美国Sigma公司,批号:T7191);大豆磷脂(上海金伴药业有限公司);胆固醇(华美生化公司);聚乙二醇-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(PEG-DSPE)(Polylipid Co. Ltd,美国);其他试剂均为国产分析纯或色谱纯。昆明种小白鼠,♀♂各半,体质健康,18~20 g,由沈阳医学院动物室提供,实验动物合格证号:SCSK(辽)2003-0016。C57BL/6小鼠,♀♂各半,体质健康,18~20 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物合格证号:SCXK(京)2002-0003。S180肉瘤和Lewis肺癌自行液氮保存。

2 方法与结果

2.1 PSL的制备

将紫杉醇、大豆磷脂、维生素E、胆固醇、油酸和PEG-DSPE(重量比为0.1:5:0.5:0.9:0.5:2),溶解于适量乙醇。采用旋转蒸发法,在氮气流中除乙醇,至形成黏稠的溶液,加入5%葡萄糖水溶液,脂质体自发形成,0.01 mol·L⁻¹ NaOH调节pH至7.4。将脂质体用高速匀浆机在冰水中(2.3×10⁴ r·min⁻¹)分散10 min,200 nm微孔滤膜过滤,即得PSL。

2.2 PSL的理化性质

制备3批PSL,采用激光粒度/Zeta电位分析仪,测定各批样品的粒度分布和Zeta电位。PSL的包封率(loading efficiency)用脂质体装载的紫杉醇的量占紫杉醇总量的百分比表示,用Sephadex G50柱色谱法测定。PSL中紫杉醇的量由HPLC测定,色谱条件见“2.3.1”项下内容。

在5%葡萄糖水溶液中,3批PSL的粒度分布为80~150 nm,平均粒径为(138.6±4.6)nm,Zeta电位均值为(-31.6±7.9)mV,包封率为(97.8±2.6)%(n=3)。

2.3 PSL的长循环作用

2.3.1 标准曲线 采用HPLC测定紫杉醇的含量,色谱条件是在文献的基础上,结合本实验条件建立的^[7]。色谱柱为YMC-Pack ODS C₁₈柱(6.0 mm×150 mm,5 μm),流动相为乙腈-水(60:40),检测波长为227 nm,柱温25℃,流速1 mL·min⁻¹。精密量取紫杉醇脂质体适量,与等体积小鼠血浆混合均匀,得到96 μg·mL⁻¹紫杉醇血浆样品,再用小鼠血浆等比稀释,得到含紫杉醇浓度为24,12,6,3,1.5,0.75,0.36,0.18,0.09 μg·mL⁻¹的血浆样品。分别取样品200 μL,加入氯仿2 mL,醋酸盐缓冲溶液(pH=5)20 μL,涡旋混合3 min,连续2次,离心取有机层置50℃水浴中用氮气吹干,残渣用100 μL甲醇溶解,振摇离心取上清液50 μL注入液相色谱仪,记录峰面积。以峰面积为纵坐标,浓度为横坐标进行线性回归,即得标准曲线:Y=798 694 X+214 180,r=0.999 5,线性范围:0.18~24 μg·mL⁻¹。回收率:(87.2±2.3)%;精密度:2.6%。标准曲线制作和血样HPLC分析同时进行。

2.3.2 PSL与紫杉醇血药浓度的比较 取♀昆明种小鼠16只,按体重差异最小原则分成2组。一组动物尾静脉给予PSL,剂量为10 mg·kg⁻¹。另一组动物尾静脉给予紫杉醇,剂量为10 mg·kg⁻¹。分别于给药2,8 h后,断头采血置肝素化试管中,5 000 r·min⁻¹离心10 min,分离血浆。采用“2.3.1”项下方法测定动物血浆中紫杉醇的含量^[7]。将血浆冷冻干燥,加入200 μL甲醇,涡旋混合3 min,3 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液50 μL,进样测定。紫杉醇在血浆中的检测限为10 ng·mL⁻¹。按上述方法测定各血样中紫杉醇的血浆药物浓度,用于评价长循环脂质体延长紫杉醇在血液中循环时间的作用,结果见图1。结果表明,长循环脂质体显著延长了紫杉醇在血液中的循环时间。

2.4 PSL急性毒性

取♀健康昆明种小鼠20只,按体重差最小原则分成2组。一组动物尾静脉注射PSL,间隔24 h缓慢(3 min内完成)给药6次,剂量为8 mg·kg⁻¹。另一组动物尾静脉注射紫杉醇注射剂,间隔24 h缓慢(3 min内完成)给药6次,剂量为8 mg·kg⁻¹。记录各组

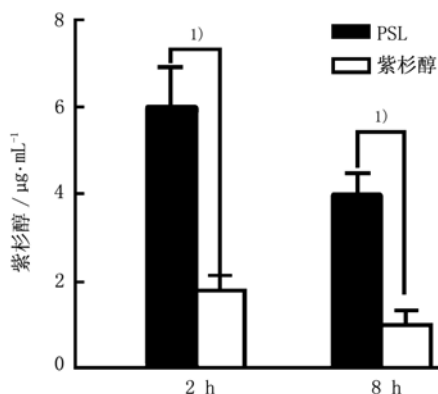


图 1 PSL 和紫杉醇血药浓度的比较

注: ¹⁾ $P<0.01$

Fig 1 Plasma paclitaxel concentration comparison of PSL and paclitaxel

Note: ¹⁾ $P<0.01$

动物的死亡率,用于评价长循环脂质体降低紫杉醇急性毒性的作用。

结果尾静脉注射紫杉醇后,14 d之内动物死亡率达到40%。但尾静脉注射PSL后,14 d之内没有动物死亡。因此,长循环脂质体显著降低了紫杉醇的急性毒性。

2.5 PSL抗肿瘤作用

在无菌条件下,取第10~14天生长良好的S180瘤原和Lewis肺癌瘤原,剥去包膜及中心坏死组织,用生理盐水洗净,分别制备体积比为1:10的匀浆(S180肉瘤)和1:25的匀浆(Lewis肺癌)。在动物前肢右腋下进行碘酒、乙醇消毒,每只昆明种小鼠接种0.2 mL S180瘤细胞匀浆,建立实体型动物肿瘤模型。将Lewis肺癌匀浆用细胞筛过滤,摇匀,每只C57BL/6小鼠尾静脉缓慢注射0.2 mL(3 min内完成),建立转移型动物肺癌模型。于接种后次日,将动物按体重差最小原则分为6组,每组10只,且♀♂动物数相等。实体瘤模型的给药方案:小剂量,紫杉醇和PSL的剂量均为 $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,肿瘤接种后第10天开始尾静脉注射,每日给药1次,共10次;大剂量给药方案,两者均为 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,于肿瘤接种后第10天尾静脉注射。肺转移型肿瘤模型的给药方案:小剂量,紫杉醇和PSL的剂量均为 $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,肿瘤接种后次日开始尾静脉注射,每日给药1次,共10次;大剂量给药方案,两者均为 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,于肿瘤接种后次日尾静脉注射。肿瘤接种后第21天,处死动物,解剖剥离S180瘤块,称瘤重,计算肿瘤生长抑制率(TIR),计算公式: $\text{TIR} = (\text{对照组平均瘤重} - \text{实验组平均瘤重}) / \text{对照组平均瘤重}$ 。肺转移

型Lewis肺癌的生长情况是根据C57BL/6小鼠肺表面瘤结节数来判断。

采用S180实体型肿瘤模型,比较PSL和紫杉醇在大剂量和小剂量给药方案条件下的抗肿瘤作用,结果见表1。采用Lewis肺癌的肺转移型肿瘤模型,比较PSL和紫杉醇在大剂量和小剂量给药方案条件下的抗肿瘤作用,结果见表2。结果表明,小剂量化疗方案显著提高了紫杉醇的抗肿瘤作用,PSL比紫杉醇更适用于肿瘤的小剂量化疗。

表 1 在大剂量和小剂量化疗条件下,紫杉醇和 PSL 对 S180 肉瘤的抑制作用的比较

Tab 1 Anticancer effect comparison of PSL and paclitaxel in S180 sarcoma following metronomic chemotherapy and large dose chemotherapy

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ $\times$ 次数	体重 (始/末)/g	瘤重/g ($\bar{x} \pm s$)	抑制率/ %
空白对照	—	20.2/25.6	1.52 ± 0.36	—
脂质体	—	19.8/25.6	1.48 ± 0.26	—
紫杉醇大剂量	10×1	19.8/22.5	0.98 ± 0.36	35.5
紫杉醇小剂量	1×10	19.8/23.5	0.62 ± 0.33	$59.2^{1)}$
PSL 大剂量	10×1	19.8/24.4	0.71 ± 0.23	$53.3^{2)}$
PSL 小剂量	1×10	19.8/25.7	0.38 ± 0.24	$75.0^{2)}$

注:与紫杉醇大剂量组及空白对照组比较,¹⁾ $P<0.01$;与紫杉醇大剂量组以及PSL大剂量组比较,²⁾ $P<0.01$

Note: Compared with large dose group of paclitaxel and blank control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with large dose groups of paclitaxel and PSL, ²⁾ $P<0.01$

表 2 在大剂量和小剂量化疗条件下,紫杉醇和 PSL 对转移型 Lewis 肺癌抑制作用的比较

Tab 2 Anti-metastatic effect comparison of PSL and paclitaxel in lung metastasis of Lewis lung tumor following metronomic chemotherapy and large dose chemotherapy

组别	给药方案/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ $\times$ 次数	瘤结节数 ($\bar{x} \pm s$)	抑制率/%
空白	—	33.3 ± 3.2	—
脂质体	—	31.6 ± 3.2	—
紫杉醇大剂量	10×1	22.3 ± 3.4	33.0
紫杉醇小剂量	1×10	16.8 ± 3.2	$49.6^{1)}$
PSL 大剂量	10×1	18.2 ± 2.6	45.3
PSL 小剂量	1×10	8.2 ± 2.6	$75.4^{2)}$

注:与紫杉醇大剂量组比较,¹⁾ $P<0.01$;与紫杉醇小剂量组以及PSL大剂量组比较,²⁾ $P<0.01$

Note: Compared with large dose group of paclitaxel, ¹⁾ $P<0.01$; compared with small dose group of paclitaxel and large dose groups of PSL, ²⁾ $P<0.01$

2.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用SPSS 11.5对实验数据进行成对 t 检验。

3 讨论

PSL 包封率高、粒度小,制备工艺简单。与

紫杉醇注射液比较, PSL 毒性低, 疗效高, 更适用于肿瘤的小剂量化疗。

在5%葡萄糖水溶液中, PSL的粒径为 $(138.6 \pm 4.6)\text{nm}$, Zeta电位为 $(-31.6 \pm 7.9)\text{mV}$, 包封率可达 $(97.8 \pm 2.6)\%(n=3)$ 。长循环脂质体显著延长了紫杉醇的血液循环时间, 提高了紫杉醇的抗肿瘤作用, 同时减轻了紫杉醇的急性毒性。小剂量给药方案显著提高了紫杉醇的抗肿瘤作用, 且PSL比紫杉醇更适用于肿瘤的小剂量化疗。

本试验制备的PSL有2个特点: ①PSL含有油酸, 当pH调节到7.4的时候, 部分油酸分子转化成带有负电荷的表面活性剂, 进而降低了脂质体的粒度, 同时提高了脂质体的稳定性; ②PSL表面镶嵌了聚乙二醇(PEG)链, 能够避免网状内皮系统对脂质体的破坏, 使PSL能够在血液中循环较长时间, 因而提高了紫杉醇和肿瘤血管的作用时间, 有利于抑制肿瘤血管新生。与传统紫杉醇脂质体不同, 后者静脉注射后, 会大量蓄积到肝脏和脾脏中, 半衰期短, 不利于治疗肝脏和脾脏之外的肿瘤^[7]。

由于肿瘤组织的血管通透性比较高, 长循环的PSL会蓄积到肿瘤组织, 特别是肿瘤血管附近, 同时会减少PSL向血管通透性很低的正常组织的分布, 因而提高了紫杉醇的疗效, 同时减轻了紫杉醇

的不良反应。长循环脂质体能够延长紫杉醇与肿瘤新生血管的作用时间, 有利于紫杉醇更好的发挥抑制肿瘤血管新生的作用以及抗肿瘤转移作用, 更适用于肿瘤的小剂量化疗。

REFERENCES

- [1] GARCIA-SAEMNZ J A, MARTIN M, CALLES A, et al. Bevacizumab in combination with metronomic chemotherapy in patients with anthracycline-and taxane-refractory breast cancer [J]. *J Chemother*, 2008, 20(5): 632-639.
- [2] EMMENEGGER U, SHAKED Y, MAN S, et al. Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of chronic low-dose metronomic cyclophosphamide therapy in mice [J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(8): 2280-2289.
- [3] ELBAYOUMI T A, TORCHILIN V P. Enhanced cytotoxicity of monoclonal anticancer antibody 2C5-modified doxorubicin-loaded PEGylated liposomes against various tumor cell lines [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2007, 32(3): 159-168.
- [4] ALTMANN K H, GERTSCH J. Anticancer drugs from nature-natural products as a unique source of new microtubule-stabilizing agents [J]. *Nat Prod Rep*, 2007, 24 (2): 327-357.
- [5] WU H. Prevention and treatment of adverse reactions induced by paclitaxol [J]. *Chin J New Drugs (中国新药杂志)*, 2002, 11(2): 168-169.
- [6] WEI F, CHENG W C. Study on cytotoxic effect and antitumor effect of paclitaxel liposome [J]. *Acta Univ Med Tongji (同济医科大学学报)*, 2001, 30(1): 46-49.
- [7] ZHOU W, WENG G, CHEN W Z, et al. Tissue distribution of paclitaxel liposome in rats [J]. *Chin Pharm J (中国药理学杂志)*, 2005, 20(18): 1402-1404.

收稿日期: 2010-01-25