

# 奥曲肽靶向阿霉素脂质体的制备及其体外性质

袁东芬<sup>1</sup>, 孙敏捷<sup>1</sup>, 王宇<sup>2</sup>, 平其能<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国药科大学药剂学教研室, 南京 210009; <sup>2</sup> 扬子江药业集团南京海陵药业有限公司, 南京 210049)

**摘要** 探讨奥曲肽靶向脂质体的制备方法。首先采用乙醇注入法和硫酸铵梯度载药法制备阿霉素普通脂质体(P-L), 单因素研究多种处方组成及工艺参数对脂质体性质的影响。随后在阿霉素脂质体表面插入奥曲肽-聚乙二醇<sub>4000</sub>-氢化磷脂酰乙醇胺(Octreotide-PEG<sub>4000</sub>-HSPE), 获得奥曲肽靶向阿霉素脂质体(Oct-L)。采用柱分离法和粒径仪考察脂质体包封率、粒径分布、稳定性, 透射电镜观察脂质体形态, 透析法测定其释放性质。所制备的奥曲肽靶向脂质体外形圆整, 粒径略小于100 nm, 药物包封率约100%, 48 h释放约20%; 与阿霉素普通脂质体相比, 提高了对生长抑素受体表达阳性的NCI H-446细胞的毒性及其阿霉素摄取量。本实验表明, 乙醇注入、硫酸铵梯度及后插入法可应用于阿霉素脂质体的制备及脂质体奥曲肽靶向的修饰。

**关键词** 阿霉素; 奥曲肽靶向脂质体; 乙醇注入法; 硫酸铵梯度法; 后插入法

**中图分类号** R944 **文献标识码** A **文章编号** 1000-5048(2011)03-0223-07

## Preparation and *in vitro* characterization of octreotide-targeting doxorubicin liposome

YUAN Dong-fen<sup>1</sup>, SUN Min-jie<sup>1</sup>, WANG Yu<sup>2</sup>, PING Qi-neng<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009;

<sup>2</sup> Nanjing Hailing Pharmaceutical Co., Ltd., Yangtze River Pharmaceutical Group, Nanjing 210049, China

**Abstract** The aim of this study was to develop the preparation method of octreotide-targeting doxorubicin liposome. First, doxorubicin plain liposome (P-L) was prepared by ethanol injection and ammonium sulfate gradient loading, and optimized by single-factor design regarding formulation and pharmaceutical process. Then octreotide-targeting liposome (Oct-L) was obtained by post-inserting Octreotide-PEG<sub>4000</sub>-HSPE into prepared liposome. Sephadex G-50 column separation and zetasizer were used to evaluate drug entrapment efficiency, size distribution and storage stability; transmission electron microscopy was used to evaluate its surface morphology and dialysis method was used to investigate the drug release profile. It was shown that octreotide-targeting liposome had a mean size of 100 nm and a drug entrapment efficiency of 100%. The liposome particle was round and only 20% of entrapped doxorubicin was released after 48h incubation in pH 7.4 PBS under 37 °C. Compared to plain doxorubicin liposome, octreotide-targeting doxorubicin liposome showed stronger cytotoxicity and higher cellular uptake on NCI H-446 expressing somatostatin receptor. Therefore, ethanol injection, ammonium sulfate gradient loading and post-insertion method can be utilized to construct doxorubicin liposome and to achieve octreotide targeting modification.

**Key words** doxorubicin; octreotide-targeting liposome; ethanol injection; ammonium sulfate gradient loading; post-insertion method

This study was supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. SBK200922895)

脂质体是一种由磷脂和胆固醇组成的类生物细胞膜结构, 药物可包裹于亲水内核或者脂质双分

子层中。脂质体具有被动靶向性及缓释性, 可改变包裹药物的体内分布和药动学特性, 但缺乏特异靶

向性<sup>[1]</sup>。随着对肿瘤病理及分子变化机制研究的不断深入,可利用肿瘤细胞表面特异或过度表达的受体与特异配体的特殊作用,在普通脂质体表面修饰上特异配体,制备成靶向脂质体,可通过肿瘤细胞对配体的识别,将抗肿瘤药物浓集于肿瘤病灶,从而提高药物疗效,降低药物毒性<sup>[1,2]</sup>。

奥曲肽(octreotide, Oct)是由8个氨基酸构成的环状多肽,为天然生长抑素的人工合成类似物,但较天然生长抑素具有更好的体内稳定性及更强的与生长抑素受体 SSTRs 的亲合力<sup>[3-5]</sup>。临床上,奥曲肽可用于治疗神经内分泌瘤<sup>[3,6]</sup>,并且奥曲肽的放射性衍生物<sup>[4]</sup>,如<sup>123</sup>I-[Tyr<sup>3</sup>]-octreotide, <sup>111</sup>Indiethylenetriamine penta-acetic acid (DTPA) octreotide, 和  $\beta$ -emitter yttrium-90 [<sup>90</sup>Y-DOTA<sup>0</sup>, Tyr<sup>3</sup>] octreotide (OctreoTher) 可用于 SSTRs 表达阳性的肿瘤显像检测。上述奥曲肽的实际应用均为奥曲肽靶向阿霉素脂质体提供了实践基础。此外,已有的关于奥曲肽靶向脂质体的研究<sup>[7]</sup>,奥曲肽与阿霉素<sup>[8]</sup>、紫杉醇<sup>[4,9]</sup> 偶联物的研究均证实了奥曲肽修饰能提高药物在肿瘤病灶处的分布,提高疗效。本课题组曾将自制的奥曲肽靶向材料 HSPE-PEG<sub>4000</sub>-Octreotide 与磷脂、胆固醇混合旋转成膜后,通过薄膜分散法制备奥曲肽靶向阿霉素脂质体(一步法),在体外细胞实验中证实了奥曲肽的靶向性<sup>[10]</sup>。

本文采用乙醇注入法结合后插入法制备奥曲肽靶向阿霉素脂质体。后插入法广泛应用于将各类蛋白多肽类配体修饰于脂质体表面<sup>[11-14]</sup>,较一步法更为优良,但尚未见文献报道用于奥曲肽配体。本文通过 MTT 实验以及细胞荧光摄取实验证实,后插入法也适用于奥曲肽配体对脂质体的修饰。

## 1 材料

### 1.1 试剂

盐酸阿霉素(doxorubicin, DOX, 印度 RPG 生命科学公司);大豆卵磷脂(由于磷脂酰胆碱含量 > 80%, 缩写为 PC, 德国 Degussa 公司);胆固醇(cholesterol, CH, 国药集团化学试剂有限公司);HSPE-PEG<sub>4000</sub>-Octreotide(自制<sup>[10]</sup>);葡聚糖凝胶 50(Sephadex G-50, 北京欣经科生物技术有限公司);噻唑

兰(MTT, 美国 Amresco 公司);RPMI-1640、胎牛血清 FBS(美国 Gibco 公司);其他试剂均为市售分析纯。

### 1.2 仪器

UV-9600 紫外可见分光光度计(北京瑞利分析仪器有限公司);RF-5301PC 荧光分光光度计(日本岛津公司);Zetasizer 3000HSA 型粒径分析仪(英国 Malvern 公司);JEM22010 UHR 高分辨透射电镜(日本电子光学公司);Multiskan MK3 型酶标仪(美国 Thermo 公司)。

### 1.3 细胞株

NCI H-446(人小细胞肺癌细胞)购自中国医学科学院肿瘤细胞库。

## 2 方法与结果

### 2.1 阿霉素含量测定方法的建立

2.1.1 检测波长 量取浓盐酸 3.2 mL 至 50 mL 量瓶中,以去离子水定容。精密量取上述盐酸溶液 10 mL 至 100 mL 量瓶中,以异丙醇定容,配制成酸化异丙醇溶液。分别量取 4 mg/mL 阿霉素生理盐水溶液 0.25 mL 和空白脂质体溶液 0.75 mL 于 10 mL 量瓶,加入酸化异丙醇溶液破乳定容,以酸化异丙醇溶液为空白,于 200 ~ 800 nm 进行扫描。在 480 nm 处阿霉素有最大吸收,且此处空白脂质体组分对阿霉素的测定无干扰,故选定 480 nm 为阿霉素的检测波长。

2.1.2 标准曲线的绘制 精确量取 500  $\mu$ g/mL 阿霉素水溶液 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0 mL 于 10 mL 量瓶中,以酸化异丙醇溶液定容,配成浓度范围为 5 ~ 50  $\mu$ g/mL 的阿霉素标准溶液,以酸化异丙醇溶液为空白,于 480 nm 处测定吸收度(A)。以 A 对质量浓度 c( $\mu$ g/mL) 进行回归,  $A = 0.0127c + 0.0085$ ,  $r = 0.9999$ , 在 5 ~ 50  $\mu$ g/mL 质量浓度范围内线性良好。

### 2.2 阿霉素普通脂质体的制备

采用乙醇注入法制备空白脂质体,硫酸铵梯度法载药,以粒径分布及包封率为考察指标,摸索处方因素及制备工艺,制备阿霉素普通脂质体。

2.2.1 脂质体制备 称取 PC 200 mg,按比例称取 CH,两者同时超声溶解于一定体积的无水乙醇中,35  $^{\circ}$ C 恒温搅拌下缓慢滴入 175 mmol/L 硫酸铵

溶液 10 mL 中,35 °C 真空旋转蒸发去除乙醇,补加硫酸铵溶液定容至 10 mL,35 °C 旋转水合 30 min。400 W 探头超声一定次数(工作 1 s,暂停 1 s)后,过 0.15 μm 醋酸纤维素滤膜 5 次,制得空白脂质体,测定粒径分布。空白脂质体以生理盐水透析 5 h(1 h 换液 1 次)后,按一定药脂比将脂质体溶液与 4 mg/mL 阿霉素盐酸盐生理盐水溶液混合后于 45 °C 旋转载药 30 min,制得阿霉素脂质体,测定包封率及粒径分布。

### 2.2.2 包封率的测定

**包封率测定方法** 取载药脂质体 0.6 mL 平均分成两份,一份过 Sephadex G-50 葡聚糖凝胶柱,以生理盐水为洗脱液分离脂质体和游离阿霉素。收集脂质体组分,以酸性异丙醇溶液破乳后,于 480 nm 处测定吸收度,按标准曲线计算阿霉素浓度。另一份载药脂质体样品稀释到与上柱后脂质体组分相同体积,以酸性异丙醇溶液破乳后,于同样条件下测定吸收度,按标准曲线计算阿霉素浓度。两个浓度的比即为包封率(entrapment efficiency, EE)。

**Sephadex G-50 柱洗脱效果考察** 以生理盐水平衡 Sephadex G-50 柱后,取阿霉素脂质体 0.3 mL 上柱,用 0.9% 氯化钠溶液洗脱,控制流速 1.4 mL/min,每 30 秒收取一份,加入适量酸化异丙醇稀释,以酸化异丙醇为空白对照,测量吸收度  $A$ ,绘制洗脱曲线。洗脱曲线表明阿霉素脂质体和游离阿霉素可完全分离,脂质体组分于 3.5 ~ 6.5 min 被洗脱出,Sephadex G-50 柱分离法可用于阿霉素脂质体包封率的测定。

**柱回收率的考察** 用 2 mg/mL 阿霉素水溶液将脂质体样品稀释成高、中、低 3 种浓度的阿霉素脂质体溶液,每个浓度各取 0.6 mL,平均分成两

份。一份以生理盐水为洗脱液收集脂质体组分和游离阿霉素组分,以酸性异丙醇溶液破乳定容后,于 480 nm 处测定吸收度,计算阿霉素浓度。另一份稀释到与上柱后脂质体组分和阿霉素组分相同体积,以酸性异丙醇溶液溶解定容后,于 480 nm 处测定吸收度,计算阿霉素浓度。两个浓度的比即为柱回收率(recovery rate, RR),结果表明当阿霉素水溶液与脂质体体积比为 1:2、2:2、2:1 时,RR (%) 分别为  $95.66 \pm 0.36$ 、 $99.04 \pm 0.34$ 、 $97.39 \pm 1.85$  ( $n=3$ )。可以看出 Sephadex G-50 凝胶柱对脂质体和游离阿霉素的吸附较少,Sephadex G-50 柱分离法可用于阿霉素脂质体包封率的测定。

**2.2.3 乙醇体积对粒径的影响** 根据“2.2.1”项,按  $n(\text{PC}):n(\text{CH})=5:1$ ,400 W 超声 250 次(工作 1s,暂停 1s),制备空白普通脂质体,摸索乙醇体积对粒径大小及多分散系数(poly index, PI)的影响,试验结果如表 1 所示。

**Table 1** Effect of the volume of ethanol on size distribution of blank liposome ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

V(ethanol)/mL	Size/nm	Poly index
1	164.2 ± 12.5	0.240 ± 0.039
3	149.8 ± 15.0	0.180 ± 0.013
5	101.1 ± 15.4	0.260 ± 0.038

可以看出乙醇体积越大,粒径越小,同时说明磷脂溶液加入的速度越缓慢,越有利于制备粒径较小的单室脂质体。考虑到乙醇滴加时间及乙醇去除问题,将乙醇体积定为 5 mL。

### 2.2.4 磷脂与胆固醇物质的量比对包封率的影响

按不同 PC 与 CH 物质的量比制备空白脂质体,测定粒径分布,透析后按  $m(\text{DOX}):m(\text{PC})=1:15$  载药,测定包封率及载药后粒径分布,见表 2。

**Table 2** Effect of molar ratio of PC to CH on size distribution and entrapment efficiency (EE) ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

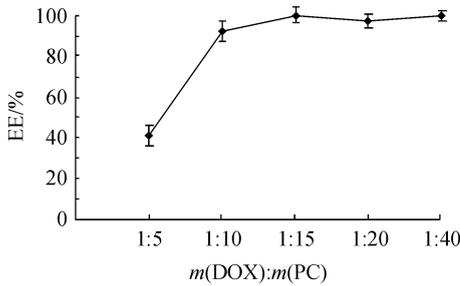
$n(\text{PC}):n(\text{CH})$	Blank liposome		DOX liposome		EE/%
	Size/nm	Poly index	Size/nm	Poly index	
3:1	110.5 ± 16.7	0.272 ± 0.003	95.9 ± 10.2	0.397 ± 0.077	96.94 ± 1.83
5:1	98.1 ± 6.4	0.299 ± 0.014	91.9 ± 8.3	0.370 ± 0.037	100.00 ± 0.00
7:1	98.3 ± 15.3	0.285 ± 0.016	92.4 ± 8.7	0.356 ± 0.032	97.97 ± 2.86
10:1	90.8 ± 2.8	0.380 ± 0.013	96.5 ± 2.1	0.399 ± 0.041	95.88 ± 4.13
15:1	99.9 ± 13.6	0.328 ± 0.014	98.6 ± 11.4	0.386 ± 0.039	98.61 ± 0.98

PC: phosphatidylcholine; CH: cholesterol; DOX: doxorubicin

试验结果表明,PC 与 CH 物质的量比对粒径分布和包封率的影响较小,且包封率在  $n(\text{PC}):n(\text{CH})=5:1$  时达到最大。

**2.2.5 药脂比对包封率的影响** 采用  $n(\text{PC}):n(\text{CH})=5:1$ ,按照不同药物与磷脂的质量比制备载药脂质体,考察药脂比  $m(\text{DOX}):m(\text{PC})$  对包封

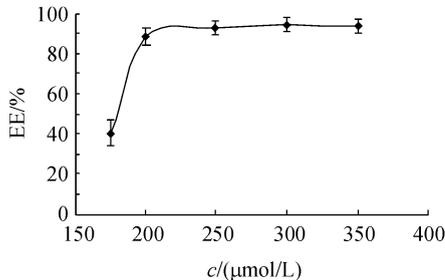
率的影响。



**Figure 1** Effect of weight ratio of DOX to PC on entrapment efficiency ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

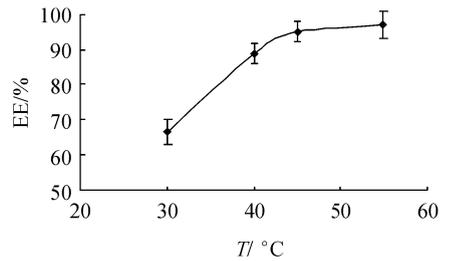
由图1可以看出药脂比对包封率影响较大,当药脂比小于1:15,包封率接近100%;而药脂比大于1:15,包封率明显下降。

**2.2.6 硫酸铵浓度梯度对包封率的影响** 脂质体内外硫酸铵浓度梯度是提供包载阿霉素的动力。按照  $m(\text{DOX}):m(\text{PC})=1:5$ , 采用不同浓度的硫酸铵溶液制备脂质体, 考察硫酸铵浓度梯度对包封率的影响, 结果见图2。可见硫酸铵浓度越大, 包封率越高。当硫酸铵浓度达200 mmol/L以上时, 包封率不再显著增加, 这可能是受脂质体内水相体积的限制。



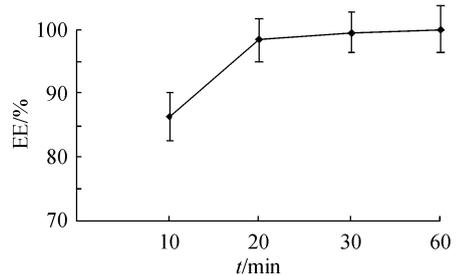
**Figure 2** Effect of concentration of ammonium sulfate on entrapment efficiency ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

**2.2.7 载药温度对包封率的影响** 按照  $m(\text{DOX}):m(\text{PC})=1:5$ , 硫酸铵浓度为300 mmol/L, 采用不同温度载药, 考察载药温度对包封率的影响, 结果如图3所示。结果表明, 当载药温度低于磷脂相转变温度(40℃), 阿霉素包封率较低。随着载药温度的升高, 脂质体磷脂膜流动性越强, 促使分子型的阿霉素更容易进入脂质体内水相, 使得包封率提高。考虑到磷脂的稳定性, 将载药温度定为45℃。



**Figure 3** Effect of loading temperature on entrapment efficiency ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

**2.2.8 载药时间对包封率的影响** 按照  $m(\text{DOX}):m(\text{PC})=1:5$ , 硫酸铵浓度为300 mmol/L, 载药温度为45℃, 采用不同载药时间制备阿霉素脂质体, 考察载药时间对包封率的影响, 结果如图4所示。载药时间越长, 包封率越高。



**Figure 4** Effect of loading time on entrapment efficiency ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

**2.2.9 超声次数对粒径分布的影响** 采用400 W超声(工作1 s, 暂停1 s), 通过考察超声次数对脂质体粒径分布的影响, 摸索欲制得略小于100 nm载药脂质体的超声条件, 试验结果见表3。可以看出, 超声次数在250次左右可获得粒径略小于100 nm的脂质体。

**Table 3** Effect of sonication cycles on size distribution

Sonication cycles	Size/nm	Poly index
150	119.5	0.267
200	106.8	0.28
250	95.3	0.298
300	94.6	0.302
350	92.5	0.312

**2.2.10 脂质体稳定性考察** 在上述单因素考察试验中, 获得两个较优处方, 载药量分别为1, 2 mg/mL。分别制备3份载药脂质体, 测定粒径及包封率, 于4℃冰箱放置一个月后再次考察粒径分布及包封率, 处方及实验结果如表4所示。

**Table 4** Two formulations of DOX liposomes and their storage stability at 4 °C ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Formulation <sup>Δ</sup>	$c[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ (mmol/L)	$m(\text{DOX}):$ $m(\text{PC})$	$t(\text{Loading})/$ h	$c(\text{DOX})/$ (mg/mL)	Size/nm		EE/ %	
					0	30 d	0	30 d
1	175	1:15	0.5	1	93.6 ± 3.97	110.4 ± 6.26	100.0 ± 0	97.48 ± 2.34
2	300	1:5	1	2	103.9 ± 0.24	NA	95.41 ± 3.11	NA*

<sup>Δ</sup> $n$  (PC):  $n$  (CH),  $V$  (ethanol) and drug loading temperature of both formulations were 5:1, 5 mL and 45 °C, respectively.

NA: not available. \* One of the three preparations of liposomal formulation precipitated after a month

从表4可看出,处方2长期稳定性不如处方1。处方1在4 °C储存一个月后粒径仅有少量增大,药物泄露较少,一个月后包封率仍在90%以上,稳定性较好,因此采用此处方及工艺制备阿霉素普通脂质体。

### 2.3 奥曲肽修饰的阿霉素脂质体的制备

**2.3.1 脂质体磷脂含量测定** 按照一定的靶向材料 HSPE-PEG<sub>4000</sub>-PE 与磷脂的物质的量比修饰阿霉素普通脂质体。为了确定靶向材料的投料量,需准确地测定脂质体磷脂含量。精密吸取脂质体 0.5 mL,以去离子水稀释定容至 10 mL。取上述溶液 1 mL,加甲醇 5 mL 破乳后旋蒸干,加入氯仿 10 mL 超声使溶解,制得脂质体样品溶液。精密吸取脂质体样品 1 mL 溶液于 10 mL 具塞离心管中,加氯仿至 3 mL,加显色剂 3 mL,涡旋离心后按硫氰铁铵显色法<sup>[15-16]</sup>测定磷脂含量。以  $A$  对浓度  $c$  (mg/mL) 回归,得到标准曲线方程  $A = 9.4477c + 0.0015$ ,  $r = 0.9999$ ,表明磷脂在 0.0067 ~ 0.05 mg/mL 浓度范围内线性良好。

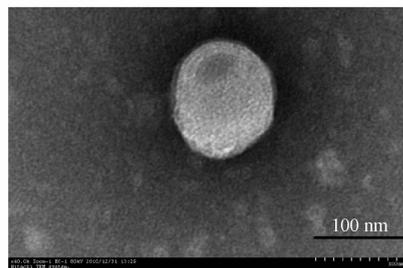
### 2.3.2 后插入法制备奥曲肽修饰的阿霉素脂质体

将制备好的脂质体置于 40 °C 水浴锅中恒温搅拌,测定磷脂含量后,按  $n(\text{HSPE-PEG}_{4000}\text{-Octreotide}):n(\text{PC}) = 3:100$  加入 HSPE-PEG<sub>4000</sub>-Octreotide 水溶液,孵育 4h 后,置于截留相对分子质量为 8 000 的透析袋中以生理盐水透析 2 d,以去除渗透出的硫酸铵及未插入的 HSPE-PEG<sub>4000</sub>-Octreotide,即制得奥曲肽修饰的阿霉素脂质体。载药方法同普通脂质体,包封率约 100%,所得脂质体粒径  $[(111.9 \pm 1.85) \text{ nm}, \text{PI}:0.203 \pm 0.016]$  与普通脂质体粒径  $[(103.7 \pm 1.14) \text{ nm}, \text{PI}:0.229 \pm 0.009]$  相似。

### 2.4 脂质体形态学考察

采用透射电镜(TEM)观察载药奥曲肽靶向脂质体的表面形态。将脂质体混悬液用蒸馏水稀释 100 倍后,滴至敷有支撑膜的铜网上,以 1% 磷钨酸负染,自然晾干后,于 TEM 下观察其形态,并拍照,

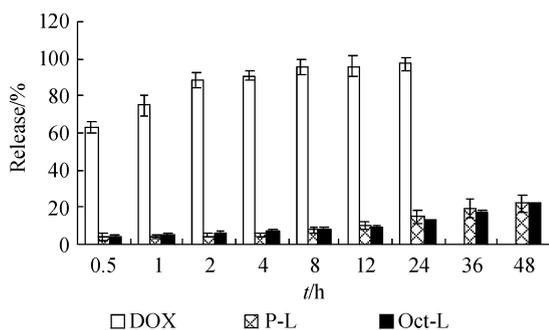
见图5。脂质体粒子为球形或类球形,可见指纹环状螺旋结构。



**Figure 5** Transmission electron micrograph of octreotide-modified liposomes

### 2.5 脂质体的体外释放行为

将阿霉素(DOX)、阿霉素脂质体(P-L)或阿霉素奥曲肽靶向脂质体(Oct-L)分别用 pH 7.4 PBS 稀释至 50 μg/mL,各取 1 mL 置于截留相对分子质量为 8 000 的透析袋中,将透析袋置于 pH 7.4 PBS 30 mL 中,37 °C 恒温搅拌 48 h。分别于一定时间取透析外液 0.5 mL,通过荧光强度测定释放出的阿霉素含量,并补充新鲜 PBS 0.5 mL。绘制时间-累积释放百分数图(图6)。



**Figure 6** In vitro release of DOX from DOX solution and liposomal DOX ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

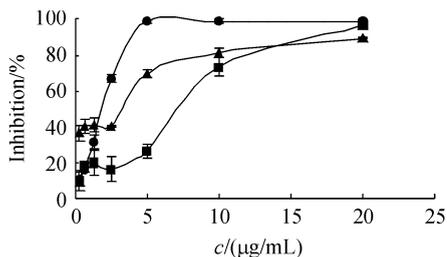
P-L: doxorubicin plain liposome; Oct-L: octreotide-targeting Dox liposome

从图6可以看出,游离的 DOX 24 h 即释放完全,而阿霉素普通脂质体和阿霉素奥曲肽免疫脂质体 48 h 释放约 20%,说明制备的脂质体对阿霉素有良好的缓释效果,并且类似于文献[11],奥曲肽

的靶向修饰并不影响药物的释放性质,靶向脂质体仍具有良好的稳定性。释放结果可以说明在细胞毒及细胞摄取荧光试验中,奥曲肽靶向脂质体与阿霉素普通脂质体在细胞实验中的差异不是由释放性质差异引起的,而是由奥曲肽修饰引起的,佐证了后插入法的有效性。

## 2.6 MTT 法测定阿霉素 3 种剂型的活性

将处于对数生长期的 NCI H-446 细胞按每孔  $4 \times 10^4$  个细胞接种于 96 孔板中,培养 24 h 后,每孔加入新鲜培养基 100  $\mu\text{L}$ ,再加入已用培养基稀释至特定浓度的阿霉素 (DOX)、阿霉素脂质体 (P-L) 或阿霉素奥曲肽靶向脂质体 (Oct-L) 溶液 100  $\mu\text{L}$ ,使阿霉素终浓度为 20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.312 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,并设空白培养基对照孔,每组设 3 个平行孔,于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中继续培养 24 h。24 h 后,每孔加入含 5 mg/mL MTT 的 PBS 溶液 20  $\mu\text{L}$ 。用微型振荡器振荡混匀后,用酶标仪在参考波长 630 nm、检测波长 570 nm 的条件下测定吸收度,扣除空白培养基对照孔的吸收度后,计算药物对肿瘤细胞的抑制率,绘制抑制曲线,见图 7。



—▲— DOX; —■— P-L; —●— Oct-L

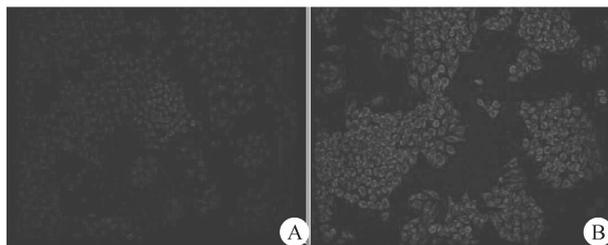
**Figure 7** Cytotoxicity (24 h) of three preparations of DOX to NCI H-446 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

从图 7 可以看出,在对 NCI H-446 的毒性中,由于游离阿霉素荷正电易与表面呈负电性的细胞膜亲和,游离阿霉素毒性 ( $\text{IC}_{50}$  1.40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 大于阿霉素普通脂质体 ( $\text{IC}_{50}$  3.84  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),但采用后插入法制备的奥曲肽靶向脂质体 ( $\text{IC}_{50}$  1.24  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 明显提高了阿霉素脂质体对受体表达阳性的 NCI H-446 细胞毒性,证实了后插入法修饰的有效性。

## 2.7 荧光显微镜观察细胞摄取

将处于对数生长期的 NCI H-446 细胞按每孔  $1 \times 10^5$  个细胞接种于 24 孔板中,培养 24 h 后,弃去培养液,分别加入以培养基稀释至 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的

阿霉素普通脂质体或者阿霉素奥曲肽靶向脂质体溶液 0.4 mL。37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 6 h 后,用冷的 PBS 洗涤 3 次,置于倒置荧光显微镜下观察拍照 (图 8)。结果与细胞毒性试验一致,采用后插入法制备的奥曲肽靶向脂质体在 NCI H-446 细胞上的摄取量明显多于阿霉素普通脂质体,说明后插入法实现了脂质体奥曲肽修饰。



**Figure 8** Fluorescence images of NCI H-446 cells after incubation with P-L (A) and Oct-L (B) for 6 h at 37  $^{\circ}\text{C}$  ( $\times 200$ ). DOX concentration of both preparations was 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$

## 3 讨论

本文采用乙醇注入法和硫酸铵梯度载药首先制备了阿霉素普通脂质体,通过考察乙醇体积,磷脂胆固醇比,超声次数等条件对粒径分布及包封率的影响,制备了粒径略小于 100 nm,包封率接近 100%,稳定性良好的阿霉素脂质体。在所研究的范围内,药脂比、硫酸铵梯度以及载药温度对包封率影响较大,乙醇体积及超声次数影响粒径大小。在此普通脂质体的工艺条件上,通过后插入法制备了阿霉素奥曲肽靶向脂质体,相比于普通阿霉素脂质体而言,具有更高的细胞毒及细胞摄取量,证实了插入法的有效性。体外释放试验表明,阿霉素奥曲肽靶向脂质体稳定性良好,释放性质与普通阿霉素脂质体相似。课题组早期采用薄膜分散和一步法制备的普通脂质体和奥曲肽靶向脂质体释放性质也相似<sup>[10]</sup>。但本文采用的乙醇注入和后插入法制备的阿霉素普通脂质体和奥曲肽靶向脂质体,48 h 释放更少,缓释效果更好,更稳定。

目前配体通常通过 PEG 链共价修饰于脂质体表面,共有 3 种常见方法。一种是一步法,将靶向材料配体-PEG-磷脂与脂质体磷脂和胆固醇共同旋转成膜,按照薄膜分散的方法制备靶向脂质体<sup>[7,10]</sup>;一种是后修饰法,即先将带有活性末端的聚乙二醇磷脂材料与脂质体磷脂和胆固醇共同旋转成膜,制备成脂质体后,再通过配体与 PEG 活性

末端的反应进行修饰<sup>[17]</sup>。第三种方法即为本文中所采用的后插入法。后插入法相对于一步法及后修饰法更为优越。一步法存在**成膜不均**<sup>[18]</sup>,批间差异大,靶头可分布于脂质体内外两侧,造成靶头的浪费<sup>[14]</sup>等问题。后修饰法存在**修饰效率低,修饰量不宜控制**等缺点<sup>[14]</sup>。后插入法**不仅方便快捷,还可避免成膜中所用有机溶剂对蛋白类配体活性的影响,同时不同配体修饰的脂质体或者不同配体修饰密度的脂质体可来源于同一批普通脂质体**,易于工业化生产,批间差异可控。本文应用乙醇注入、硫酸铵梯度结合后插入法更适合获得理想的奥曲肽靶向脂质体。

### 参考文献

- [1] 易学文(Yi XW),吴霞(Wu X). 免疫脂质体的研究进展[J]. 四川理工学院学报:自然科学版[J *Sichuan Univ Sci Eng (Nat Sci Ed)* ],2004,**17**(3):133-136.
- [2] 栗艳(Li Y),洪芳(Hong F). 免疫脂质体在肿瘤治疗中的应用[J]. 中国药房(*J China Pharm*),2001,**12**(2):112-113.
- [3] de Herder WW, van der Lely AJ, Lamberts SW. Somatostatin analogue treatment of neuroendocrine tumours[J]. *Postgrad Med J*, 1996,**72**(848):403-408.
- [4] Huang CM, Wu YT, Chen ST. Targeting delivery of paclitaxel into tumor cells via somatostatin receptor endocytosis[J]. *Chem Biol*, 2000,**7**(7):453-461.
- [5] Guillermet-Guibert J, Lahlou H, Pyronnet S, et al. Somatostatin receptors as tools for diagnosis and therapy: Molecular aspects[J]. *Best Pract Res Cl Ga*,2005,**19**(4):535-551.
- [6] Anthony CT, Hughey S, Lyons J, et al. The effect of drug dose and drug exposure time on the binding, internalization, and cytotoxicity of radiolabeled somatostatin analogs[J]. *J Surg Res*,2004,**119**(1):1-13.
- [7] Zhang J, Jin W, Wang X, et al. A novel octreotide modified lipid vesicle improved the anticancer efficacy of doxorubicin in somatostatin receptor 2 positive tumor models[J]. *Mol Pharm*,2010,**7**(4):1159-1168.
- [8] Nagy A, Schally AV, Halmos G, et al. Synthesis and biological evaluation of cytotoxic analogs of somatostatin containing doxorubicin or its intensely potent derivative, 2-pyrrolinodoxorubicin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,1998,**95**(4):1794-1799.
- [9] Shen H, Hu D, Du J, et al. Paclitaxel-octreotide conjugates in tumor growth inhibition of A549 human non-small cell lung cancer xenografted in to nude mice[J]. *Eur J Pharmacol*,2008,**601**(1/3):23-29.
- [10] Sun MJ, Wang Y, Shen J, et al. Octreotide-modification enhances the delivery and targeting of doxorubicin-loaded liposomes to somatostatin receptors expressing tumor *in vitro* and *in vivo*[J]. *Nanotechnology*,2010. doi:10.1088/0957-4484/21/47/475101.
- [11] Uster PS, Allen TM, Daniel BE, et al. Insertion of poly(ethylene glycol) derivatized phospholipid into pre-formed liposomes results in prolonged *in vivo* circulation time[J]. *FEBS Lett*,1996,**386**(2/3):243-246.
- [12] Lu J, Jeon E, Lee BS, et al. Targeted drug delivery crossing cytoplasmic membranes of intended cells via ligand-grafted sterically stabilized liposomes[J]. *J Control Release*,2006,**110**(3):505-513.
- [13] Iden DL, Allen TM. *In vitro* and *in vivo* comparison of immunoliposomes made by conventional coupling techniques with those made by a new post-insertion approach[J]. *Biochim Biophys Acta*,2001,**1513**(2):207-216.
- [14] Saul JM, Annapragada A, Natarajan JV, et al. Controlled targeting of liposomal doxorubicin via the folate receptor *in vitro*[J]. *J Control Release*,2003,**92**(1/2):49-67.
- [15] 朱莉(Zhu L),潘黎军(Pan LJ),胡春梅(Hu CM),等. 5-氟尿嘧啶核苷前药脂质体中磷脂含量的测定[J]. 中国药房(*J China Pharm*),2008,**19**(7):547-548.
- [16] 林筱琦(Lin XQ),王建华(Wang JH),温浩(Weng H),等. 阿苯达唑脂质体中磷脂含量测定[J]. 新疆医科大学学报(*J Xinjiang Med Univ*),2002,**25**(2):119-120.
- [17] Torchilin VP, Levchenko TS, Lukyanov AN, et al. *p*-Nitrophenyl-carbonyl-PEG-PE-liposomes: fast and simple attachment of specific ligands, including monoclonal antibodies, to distal ends of PEG chains via *p*-nitrophenylcarbonyl groups[J]. *Biochim Biophys Acta*,2001,**1511**(2):397-411.
- [18] 周正源(Zhou ZY),唐海玲(Tang HL),徐宇虹(Xu YH),等. 多肽靶向脂质体的表面配体修饰密度及其体内肿瘤靶向效果的研究[J]. 生物物理学报(*Acta Biophys Sin*),2010,**26**(3):216-224.