

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.21.006

曲妥珠单抗修饰的阿霉素免疫脂质体的制备及体外性质研究*

江 峰¹ 陈江浩² 杨铁虹¹ 范 黎¹ 乔友备¹ 吴 红^{1△}

(1 第四军医大学药学院药物分析学教研室 陕西 西安 710032; 2 第四军医大学第一附属医院西京医院 陕西 西安 710032)

摘要 目的:制备表面键合曲妥珠单抗(trastuzumab, TMAB)的阿霉素免疫脂质(Doxorubicin-loaded immunoliposome, DOX-IML),并对其体外性质进行研究。方法:将磷脂酰胆碱、胆固醇、阿霉素、DSPE-MPEG2000 以一定比例混合,采用薄膜超声分散法制备阿霉素脂质体,将聚乙二醇衍生物 (1, 2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N- [succinimidyl (polyethylene glycol)-3400]、DSPE-PEG3400-NHS)连接到 TMAB;再与阿霉素脂质体连接得到 DOX-IML。研究不同浓度的 TMAB 对 DOX-IML 入胞能力及细胞毒性的影响;测定免疫脂质体的包封率、载药率、粒径、电荷及稳定性等性质;动态透析法模拟体外释药特性,激光共聚焦观察免疫脂质体对 AU565 细胞抗体介导的入胞作用;MTT 法研究 DOX-IML 抑制肿瘤细胞的生长。结果:成功制备了表面键合 TMAB 的阿霉素免疫脂质体,配体载入率分别是 53 %、75.5 %、84 %;每毫克 DOX-IML 中抗体的含量分别是 37、83、108 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$;阿霉素的包封率为 76.85%、载药量为 8.03%;粒径 131.8nm;表面电荷 -27mV。抗体含量 83 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ 的 DOX-IML 组的细胞存活率最低,细胞内荧光强度最高,且该免疫脂质体稳定性良好,具有一定缓释作用。DOX-IML 具有较强的特异性靶向作用,其入胞能力和细胞毒性均高于阿霉素脂质体。结论:DOX-IML 具有较强的特异性靶向作用,其入胞能力和细胞毒性均高于阿霉素脂质体,抗体含量适中时其入胞能力和细胞毒性最强。

关键词: 阿霉素;免疫脂质体;曲妥珠单抗;靶向

中图分类号: R944.15 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)21-4022-07

Preparation and Biological Activity in vitro of Trastuzumab-modified Doxorubicin Immunoliposome*

JIANG Feng¹, CHEN Jiang-hao², YANG Tie-hong¹, FAN Li¹, QIAO You-bei¹, WU Hong^{1△}

(1 Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Xijing Hospital, The first affiliated hospital of the school of Pharmacy, the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To prepare the doxorubicin immunoliposome(DOX IML) which was bonding trastuzumab(TMAB) on the surface and study its characterizations in vitro. **Methods:** Doxorubicin liposomes was prepared by film dispersion method with phosphatidylcholine, cholestenone, doxorubicin, DSPE-MPEG 2000, the polyethylene glycol derivatives (DSPE-PEG-NHS)combined with TMAB; immunoliposomes were prepared by the combination of TMAB-(PEG-DSPE)n and doxorubicin liposome. The properties of doxorubicin-loaded immunoliposome was analyzed such as encapsulation efficiency, the rate of drug loading, and average particle size and surface charge. The cellular uptake was assessed by confocal laser scanning microscopy(CLSM) using AU565 cells. The growth of tumor cells which was inhibited by doxorubicin were loaded immunoliposome by MTT method. **Results:** DOX IML was successfully prepared and the binding rate of average ligand were 53 %, 75.5%, and 84 % with the content of antibody on DOX IML being 37, 83, and 108 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ with the entrapment efficiency of DOX liposomes being 76.85% and the rate of drug loading being 8.03% and the average particle size being 131.8 nm and the surface charge being -27 mV, the cell survival rate of the DOX IML (83 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) was the lowest, the intracellular fluorescence intensity of the group was the highest, the immunoliposomes were stable and had the effect of controlled release. DOX IML had stronger effect of specific target. The endocytosis capacity and toxicity of DOX IML were higher than that of doxorubicin liposomes. **Conclusion:** DOX IML had strongly specific and targeted effect, both its endocytosis capacity and cytotoxicity were stronger than those of oxorubicin liposomal. When the contentration of antibody on DOX IML was moderate, the endocytosis capacity and cytotoxicity were the strongest.

Key words: Doxorubicin; Immunoliposome; Trastuzumab; Targetion

Chinese Library Classification(CLC): R944.15 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)21-4022-07

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81172510;81271687)

作者简介:江峰(1989-),男,硕士研究生,主要研究方向:靶向纳米药物, Tel:18792540914, E-mail: feng.qiao.2007@163.com

△ 通讯作者:吴红, E-mail: wuhong@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2014-03-20 接受日期:2014-04-13)

前言

免疫脂质体(immunoliposome, IML)是将抗体或配体通过聚合物(如聚乙二醇衍生物)连接在脂质体的表面,借助抗体或配体的特异性靶向作用,能够与肿瘤细胞表面上的抗原或者受体结合的作用,实现载药免疫脂质体的主动靶向作用,在靶区释放包封的药物,特异性杀伤靶细胞,达到治疗的目的^[1]。免疫脂质体具有制备工艺简便、无毒、免疫原性反应弱及可被生物体降解等优点,是现阶段抗体靶向治疗的研究热点^[2-4]。

乳腺癌是危害女性健康最常见的恶性肿瘤,且发病率呈逐年递增趋势,约 20-30% 的乳腺癌患者人类表皮生长因子-2(human epidermal growth factor receptor-2, HER2) 过度表达^[5]。HER2 基因在成人正常组织中表达水平较低,编码一种具有酪氨酸激酶活性的蛋白,能增强激酶活性,促进细胞分裂、增生和转化。HER2 蛋白高表达出现在乳腺癌发生的早期,提高了乳腺癌细胞的转移潜能,在卵巢癌和胃癌等肿瘤细胞中,也有不同程度 HER2 的高表达现象。近年来,人们根据 HER2 结构构建了具有靶向作用的单克隆抗体曲妥珠单抗(TMAB)^[6-8]。曲妥珠单抗是一种重组的人源化单克隆抗体,能与 HER2 受体结合,具有较强的亲和力 and 特异性,通过阻断人体表皮生长因子在 HER2 上的附着,发挥抗肿瘤效应^[9],为乳腺癌的治疗提供了新途径。曲妥珠单抗(即赫赛汀)已于 1998 年 10 月由美国 FDA 正式批准上市。

曲妥珠单抗对 HER2 阳性乳腺癌的治疗效果较好,患者无病生存期延长,但另有将近 50% 的 HER2 阳性患者对曲妥珠单抗治疗效果不明显,且大部分 HER2 阳性患者在经过一年的曲妥珠单抗治疗后,即会对其产生耐药性。阿霉素是一种常用的一线抗肿瘤药,本研究将曲妥珠单抗与阿霉素联合应用,制备了表面键合曲妥珠单抗的阿霉素免疫脂质体,通过曲妥珠单抗与癌细胞表面的 HER2 受体分子特异性结合^[10,11],赋予阿霉素脂质体主动靶向特征,促进药物入胞,从而探讨 DOX-IML 上不同 TMAB 浓度对 DOX-IML 的入胞能力及细胞毒性的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

Hei-VAPI 旋转蒸发仪(德国 Heidolph 公司);UV-3600 紫外分光光度计(日本 Shimadzu);F-6000 荧光分光光度计(日本 Hitachi 公司);BIO-RAD680 酶联免疫检测仪(美国伯乐公司);Olympus FV1000 激光共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司);SP TechCare 冷冻干燥机(美国 VirTis 公司);DelsaTMnano C particle Analyzer 粒度分析仪(美国 BECKMAN Coulter 公司)。

磷脂酰胆碱、胆固醇、盐酸阿霉素、RPMI-1640 培养均购于 sigma 公司;DSPE-MPEG 2000、1, 2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[succinimidyl(polyethylene glycol)-3400 (DSPE-PEG3400-NHS)均购于 American Nanocs 公司;曲妥珠单抗购自 Genentech Inc 公司;三氯甲烷等均购自天津福晨化学试剂厂。

1.2 方法

1.2.1 阿霉素脂质体的制备 参考文献^[12],精密称取磷脂酰胆碱 9 mg、胆固醇 3 mg、DSPE-MPEG2000 0.6 mg,加氯仿 2 mL,

超声助溶 2 min,使成澄清溶液,旋转蒸发制备脂质膜,加入含盐酸阿霉素 1 mg 的 PBS pH 7.4 缓冲液 3 mL 水化,振摇,超声处理 20 min,将溶液过 0.22 μm 的微孔滤膜,制得盐酸阿霉素脂质体。

1.2.2 TMAB- (PEG-DSPE)_n 和阿霉素免疫脂质体的制备 聚乙二醇衍生物 DSPE-PEG-NHS 与 TMAB 的摩尔比是 10:1,在 PBS pH7.4 的缓冲溶液中反应,4℃ 条件恒温震荡 12 h。将 1.5 ml 阿霉素脂质体与 1.5 mL TMAB-(PEG-DSPE)_n 等体积混合,4℃ 条件下避光恒温震荡 5 h,即得阿霉素免疫脂质体。

1.2.3 TMAB 上活性氨基数目的测定 (1)牛血清白蛋白标准曲线的制备:牛血清白蛋白(BSA)上的氨基数目为 60 个,以牛血清白蛋白做对照品,配制 0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 mg·mL⁻¹ 的系列牛血清白蛋白质量浓度,分别与过量的荧光胺反应,反应条件在 pH8.4 的硼酸缓冲溶液,4℃ 下反应 45 min,用荧光分光光度计进行测定,在激发波长 390 nm,发射波长 480 nm 下测定。以 F 对浓度 C 作线性曲线,得到标准曲线:F=1332.5C+412.68 相关系数 r²=0.9993。

(2) 活性氨基数目的测定:配制曲妥珠单抗 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg·mL⁻¹,分别与过量的荧光胺在 pH8.4 的硼酸缓冲溶液,4℃ 下反应 45 min,立即用荧光分光光度计测定,在激发波长 390 nm,发射波长 480 nm 下测定,可计算对应的牛血清白蛋白的浓度,根据公式可计算曲妥珠单抗上活性氨基数目 N。

$$N = \frac{\frac{C_{BSA} V_{BSA}}{M_{BSA}} \times 60}{\frac{C_{TMAB} V_{TMAB}}{M_{TMAB}}}$$

1.2.4 免疫脂质体的纯化 反应混合液经葡聚糖凝胶 G150 除去未反应的 TMAB 和 TMAB-(PEG-DSPE)_n 分子。先用洗脱液(0.9%生理盐水)冲洗葡聚糖凝胶柱 20 min,加入反应混合液 0.5 mL,待反应混合液与葡聚糖凝胶柱的表面几乎持平,再加入洗脱液开始洗脱,并收集阿霉素免疫脂质体。

1.2.5 免疫脂质体上抗体载入率及浓度的测定 按照 BCA 试剂盒的说明操作方法,配制 2.5 mg·mL⁻¹ 的标准品,将标准样品,按 0、1、2、4、8、16、20 μL 加到 96 孔板中加稀释液补足到 20 μL,各孔中加入 200 μL 配置好的 BCA 工作液,37℃ 放置 30 min,在 595 nm 出测吸收值,并制作标准曲线。得标准曲线:Y=0.1063X+0.0173,相关系数 r²=0.9999。

取纯化的免疫脂质 20 μL 加到 96 孔板中,并加入 200 μL 的 BCA 工作液,37℃ 放置 30 min,在 595nm 出测吸收值。载入率(%)= 载量 / 总投入量 × 100%。

分别取脂质体和免疫脂质体各 1 mL,放入已知重量的离心管中,在 -20℃ 下冷冻,再置于冷冻干燥机内进行冻干,并进行称重。经下式计算得每毫升免疫脂质体中含有抗体的量 M_{抗体}。

$$M_{\text{抗体}} = M_{\text{免疫脂质体}} - M_{\text{脂质体}}$$

1.2.6 阿霉素的包封率和载药率 (1)标准曲线的绘制:精密称取阿霉素标准品 10 mg,置于 100 mL 容量瓶中,加 PBS pH 7.4 缓冲溶液并且定容,得到阿霉素为 100 μg·mL⁻¹ 的储备液。分别取储备液 1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 mL,置于 10 mL 棕色容量瓶中,PBS 定容至刻度,得到浓度为 15、20、25、30、35、40 μg·mL⁻¹ 的阿霉素标准液。把 PBS 做为空白对照,478nm 波长处测定阿

霉素的吸收度。求吸收度(y)对阿霉素(x)吸光度回归曲线,求得回归方程 $y=0.0186x$, 相关系数 $r^2=0.9992$ 。

(2)测定包封率和载药率:包封率测定精密吸取阿霉素脂质体溶液 1 mL,将其置于透析袋中,放入盛有 100 mL PBS pH 7.4 的烧杯中进行透析,4 ℃ 条件下透析 24 h,每隔 20 min 从外液中取 5 mL,加入同体积、同温度的 PBS pH 7.4 缓冲液到透析外液中,测定阿霉素吸光度在 478 nm 处,透析结束,直到吸光度值几乎不变时。根据阿霉素吸光度标准曲线,计算游离阿霉素,按下式计算脂质体的包封率和载药率:

$$\text{包封率} = (W_{\text{总}} - W_{\text{游}}) / W_{\text{总}} \times 100\%$$

$W_{\text{总}}$ 为总投入药量, $W_{\text{游}}$ 为未包入脂质体的游离药量。

$$\text{载药率} = (W_{\text{总}} - W_{\text{游}}) / W_{\text{脂质体}} \times 100\%$$

$W_{\text{脂质体}}$ 为脂质体的总量。

1.2.7 阿霉素免疫脂质体的粒径和电位测定 取阿霉素免疫脂质体,用 Delsa™ nano C particle Analyzer 粒度分析仪进行测量。

1.2.8 体外释药实验 准确量取 3 mL 阿霉素免疫脂质体 (抗体含量 $83 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$),将其置于透析袋中,透析外液为 100 mL pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液, $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 搅拌在 37 ℃ 下,用移液器在一定的时间内取出 1 mL,并且加入相同体积的缓冲溶液,最后,用紫外分光光度计在波长 478 nm 处测定 A,计算 DOX 的含量。

1.2.9 阿霉素免疫脂质体的稳定性考察 将阿霉素免疫脂质体分成两批,分别在冰箱冷藏室(4 ℃)和室温(25 ℃)下存放一段时间。在实验的第 1、7、15、30、60 天分别考察其稳定性。渗漏率 = (制备当日药物包封量 - 放置后药物包封量) / 制备当日药物包封量 $\times 100\%$ 。

1.2.10 激光共聚焦测定 DOX 入胞情况 将对数生长期的 AU565 细胞配制成 $5.0 \times 10^5/\text{ml}$ 的细胞悬液,每个培养皿中加入 2 mL 细胞悬液,37 ℃,5% CO_2 孵育培养,细胞爬满 75%后,吸出培养液,用新鲜的 pH 7.4 PBS 洗三次,加入含有 2 mL 含药培养液 (① 抗体含量为 $37 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ 、 $83 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ 、 $108 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ 的阿霉素免疫脂质体,② DOX、DOX liposomes、DOX IML。(DOX 的浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),培养 4 h, PBS 缓冲溶液洗三次,1%多聚甲醛固定 20 min, DAPI 染色液($5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)避光染色 15 min, PBS 缓冲溶液洗三次,用激光共聚焦显微镜观察 DOX 的入胞情况。

1.2.11 MTT 法体外细胞毒性试验 将对数生长期的 AU565 细胞接种于 96 孔板中, 1×10^4 个 / 孔, 37 ℃, 5% CO_2 孵育培养,贴壁 24 h 后,加入含药培养液(① 抗体含量为 $37 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ 、 $83 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ 、 $108 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ 的阿霉素免疫脂质体,② DOX、DOX liposomes、DOX IML。(DOX 的浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 培养 48 h, MTT 法测定抑制率。抑制率(%) = (1 - 实验组 OD 值 / 对照组 OD 值) $\times 100\%$ 。

1.2.12 统计学分析 各组所得计量数据采用均数 $\pm$ 标准差表示,用 SPSS 13.0 软件处理数据,组间均数比较用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 阿霉素免疫脂质体的粒径和包封率

薄膜超声分散法制备的脂质体的粒径约 131.8 nm,测得脂质体的包封率 76.85%、载药量为 8.03%。表面电荷 -27 mV。

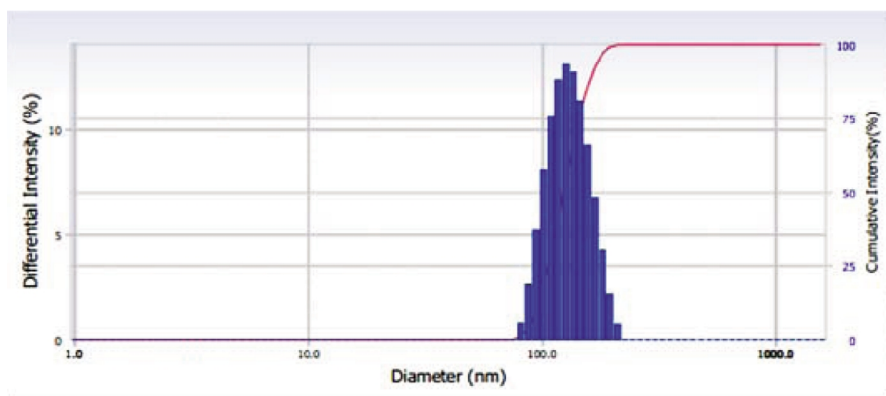


图1 盐酸阿霉素免疫脂质体的粒径

Fig.1 The particle size of DOX IML

2.2 曲妥珠单抗(TMAB)上活性氨基的数目

曲妥珠单抗空间结构复杂,其结构中的氨基有的裸露在抗体表面,有的在抗体的空间内部,裸露的氨基能与一些基团进行结合,空间内部的氨基不能参与反应,故裸露在抗体表面的氨基称作活性氨基。经测定:曲妥珠单抗上的活性氨基数目为 85 个。

2.3 参与反应的活性氨基数目

TMAB-(PEG-DSPE) $_n$ 中 n 代表每个 TMAB 分子上有多少个氨基与 DSPE-PEG-NHS 反应。过量的 DSPE-PEG-NHS 与 TMAB 上的氨基结合会破坏 TMAB 的活性区域导致其失活。

因此, $n(\text{DSPE-PEG-NHS}):n(\text{TMAB})=10:1$ 是较适宜的比例^[13],经计算 $n=7$ 。

2.4 阿霉素免疫脂质体 TMAB 的含量

经葡聚糖凝胶 G-150 分离,然后用 BCA 法测定阿霉素免疫脂质体上 TMAB 的含量, TMAB 的载入率为 75.5%。每毫克 DOX-IML 含有 $83 \mu\text{g}$ 曲妥珠单抗,即 $83 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

2.5 体外释药研究

动态透析法测定阿霉素免疫脂质体(抗体含量 $83 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$) 的体外释药特性。如图 2 所示, DOX IML 具有一定的缓释作用,随着透析时间的延长,在 72 h 时,累积释药量几乎达到平衡。

表 1 TMAB 的活性氨基数目

Table 1 The number of reactive amino group on TMAB

TMAB 浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$) TheConcentration of TMAB	TMAB 氨基数目(个) The number of amino on TMAB
0.7112	85.30
1.067	84.48
1.422	84.74
1.778	85.26
2.134	85.49
Average	85.05 ^a

注:a:以每个抗体分子上赖氨酸的数目为依据。每组数据为计算 5 次后的平均值。

Note: a: The number of amino groups on each antibody molecule is based on lysine. each data is the average of calculation for 5 times.

表 2 TMAB 参与反应的活性氨基数目

Table 2 The number of reactive amino groupin the reaction on TMAB

n(DSPE-PEG-NHD):n (TMAB)	TMAB 未反应氨基数目(个) The number of unreacted amino on TMAB	TMAB 反应的氨基数目(个) The number of reacted amino on TMAB
10:1	78.13	6.87
10:1	77.81	7.19
10:1	78.64	6.36
10:1	78.02	6.98
10:1	77.54	7.46
Average	78.03 ^a	6.97 ^a

注:a:以每个抗体分子上赖氨酸的数目为依据。每组数据为计算 5 次后的平均值。

Note: a:The number of amino groups on each antibody molecule is based on lysine. each data is the average of calculation for 5 times.

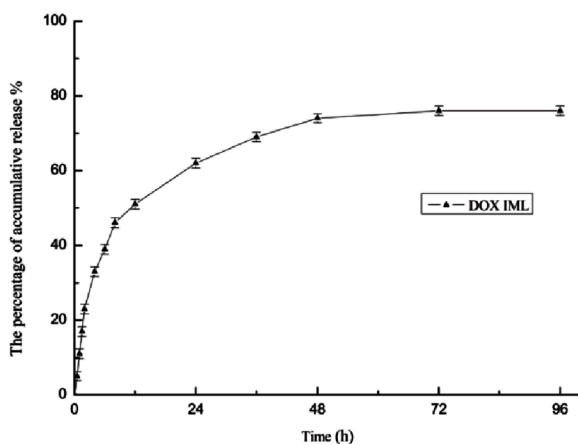


图 2 37 ℃, DOX IML 在 PBS 缓冲溶液 pH 7.4 中的释药曲线

Fig.2 In vitro DOX IML release profile in PBS pH 7.4 at 37℃

2.6 阿霉素脂质体的稳定性

在考察时间范围内,该阿霉素免疫脂质体(抗体含量 $83 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$)在冷藏室($4\text{ }^{\circ}\text{C}$)条件下具有一定的稳定性。结果见表 3。

2.7 细胞内摄取作用

(1)激光共聚焦显微镜评估细胞对不同抗体浓度阿霉素免疫脂质体(抗体含量为 $37 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ 、 $83 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ 、 $108 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ 的阿霉素免疫脂质体(DOX 的浓度为 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的摄取作用(蓝色为细胞核染色剂 DAPI,红色为阿霉素)。从图 3 可以看出,抗体含量 $83 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ 组内荧光强度最高。该组药物进入细胞的最

多。

(2)激光共聚焦显微镜评估细胞对阿霉素免疫脂质体(抗体含量 $83 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$)的摄取作用(蓝色为细胞核染色剂 DAPI,红色为阿霉素)。从图 4 可以看出,阿霉素组内荧光强度最高,阿霉素免疫脂质体次之,阿霉素脂质体的最弱。

2.8 细胞毒性研究

三种不同抗体浓度的阿霉素免疫脂质体,分别为 $37 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ 、 $83 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ 、 $108 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ (DOX 的浓度为 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。以 HER2 受体阳性 AU565 细胞为受试细胞, $83 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ 组的活细胞存活率最低,细胞毒性最大,见图 5。

AU565 细胞分别与阿霉素、阿霉素脂质体、阿霉素免疫脂质体共培养 48 h,实验结果如图 6 所示:阿霉素的细胞毒性最大,阿霉素免疫脂质体次之,阿霉素脂质体最小,空白脂质体无明显细胞毒性。

3 讨论

阿霉素是一种常用的抗肿瘤药,毒副作用较大,长时间应用会让机体产生耐药性,导致其疗效和应用受到限制^[14-17]。阿霉素脂质体能提高药物在肿瘤组织的分布,提高疗效,降低毒副作用,但缺乏肿瘤主动靶向性^[18]。免疫脂质体是近年来新兴的一个研究领域,其携带药物具有靶向性强、毒副作用小、半衰期长、运载量大等优点。作为药物载体,免疫脂质体在抗体和脂质体的联接技术上有着很高的要求,一般要求联接反应要尽可能迅速、简单、安全,用最少的操作来避免抗体变性,抗体是联接在与之反应的疏水锚联分子上,使其可以稳定地插入脂质体膜

表 3 阿霉素免疫脂质体稳定性的考察结果
Table 3 The stability of DOX IML

旋转条件(℃) Conditions	时间(d) Time	渗漏率(%) Percolation rate	粒径(mm) Particle size	外观 Appearance
4℃ cold storage	1	1.20	132	Red suspension
	7	4.67	134	Red suspension
	15	6.92	140	Red suspension
	30	9.84	157	Red suspension
	60	12.49	173	Red suspension
25℃ room temperature	1	1.74	132	Red suspension
	7	7.67	146	Red suspension
	15	14.40	205	Red suspension
	30	18.59	266	Red suspension
	60	23.65	375	a lo\ittle precipitation Rufous suspension massive precipitation

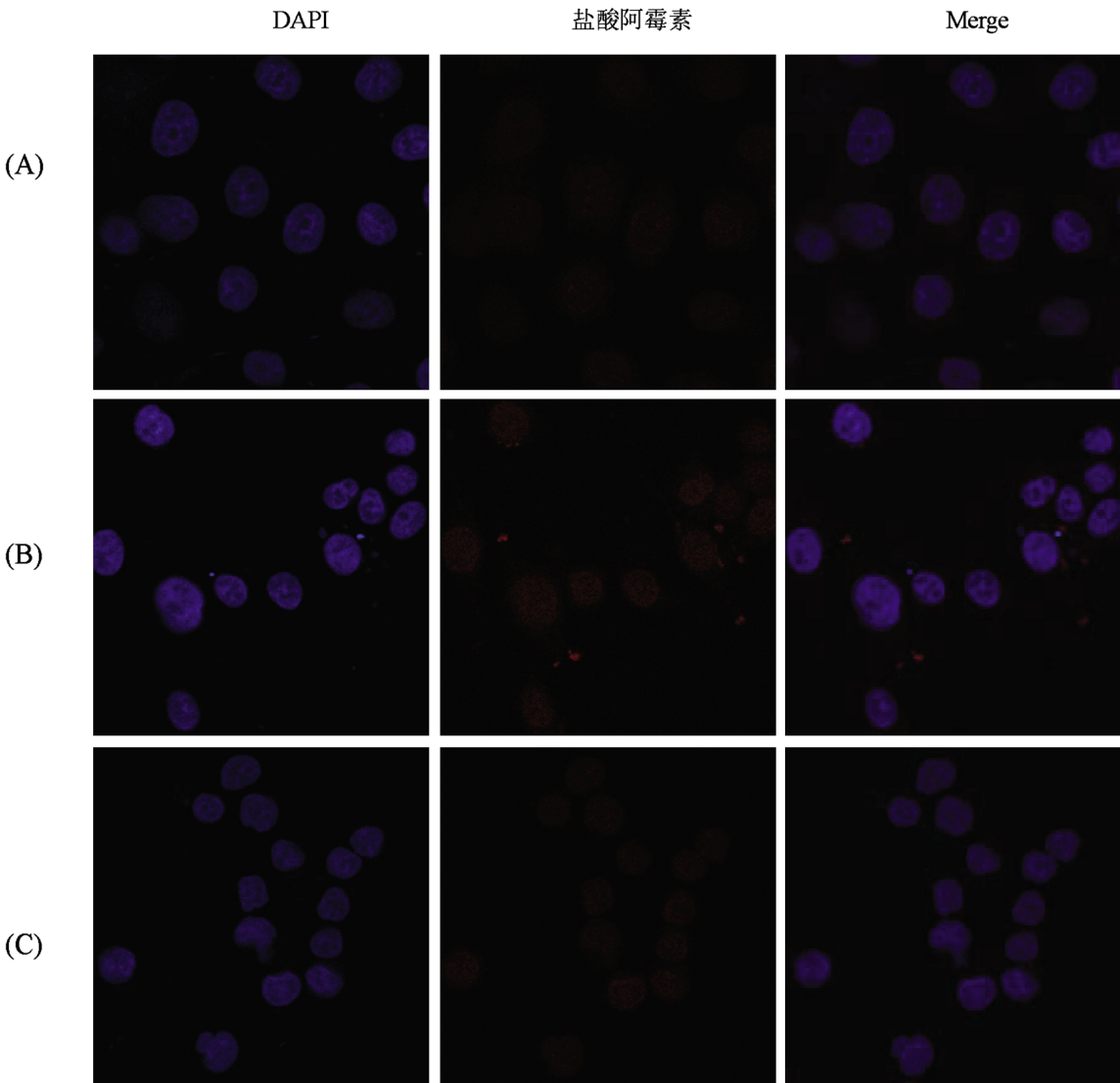


图 3 AU565 细胞 37℃ 下与抗体含量为 37 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ (A)、83 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ (B)、108 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ (C)的阿霉素免疫脂质体共孵育 4 h 后的激光共聚焦图片
Fig.3 Cellular uptake observed by CLSM into AU565 cells after incubating with 37 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ (A)、83 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ (B)、108 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ (C)of antibody concentration on DOX IML for 4 h at 37℃

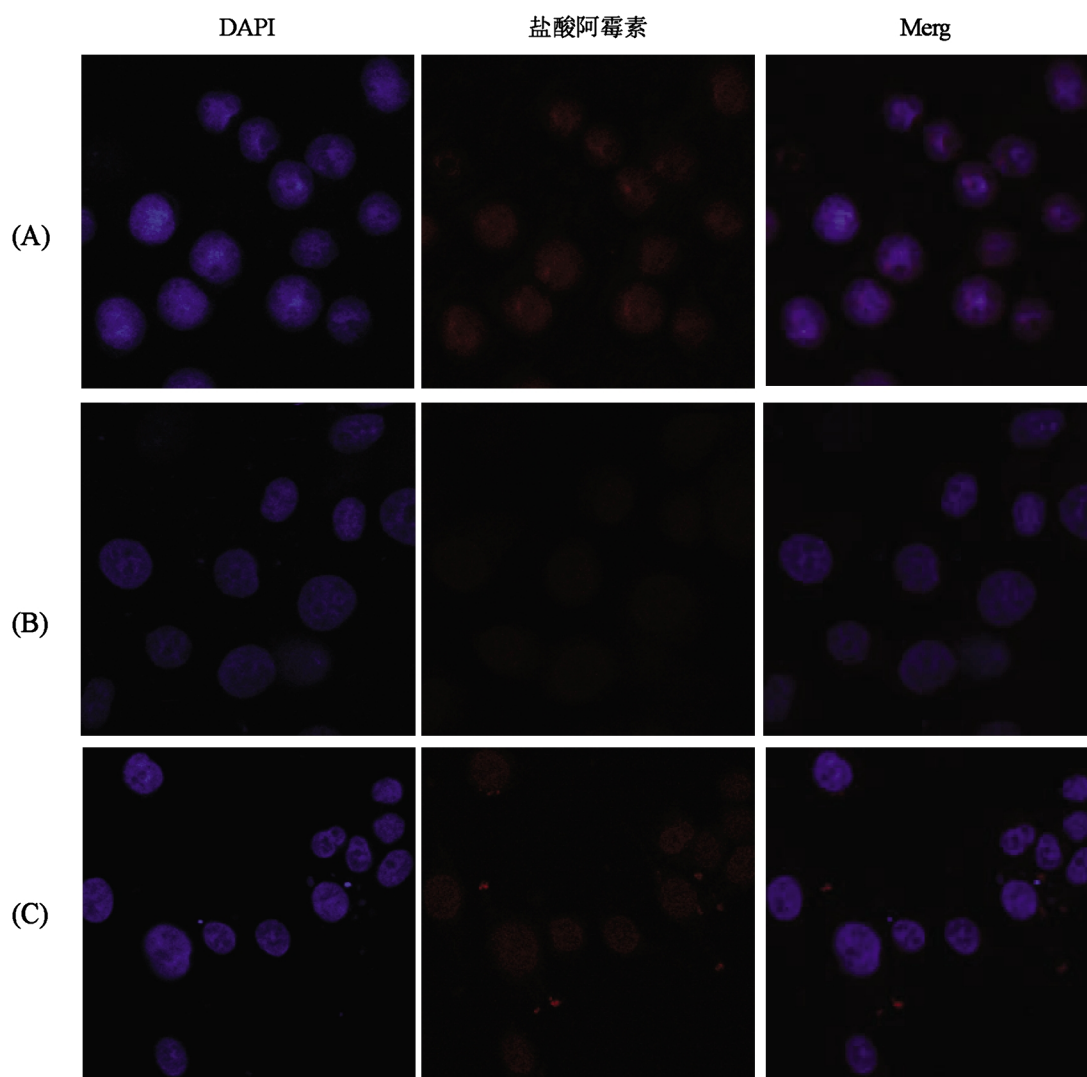


图4 AU565 细胞 37℃ 下与 DOX(A), DOX liposomes(B), DOX IML(C)共孵育 4 h 后的激光共聚焦图片

Fig.4 Cellular uptake observed by CLSM into AU565 cells after incubating with DOX(A), DOX liposomes(B), DOX IML(C) for 4 h at 37 °C

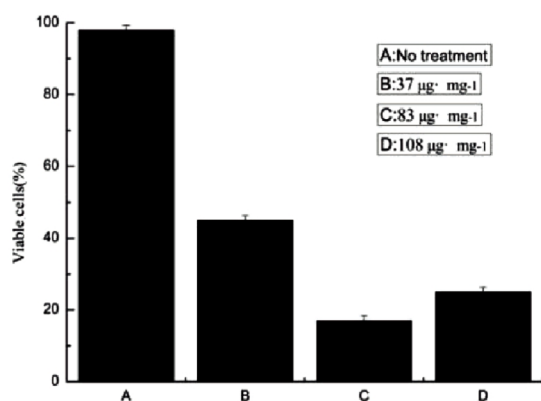


图5 抗体含量为 37 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ (B)、83 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ (C)、108 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ (D)的毒性实验

Fig.5 Viable cells of AU565 cells incubating with 37 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ (B), 83 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ (C), 108 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ (D) at 37 °C for 48 h

中。本实验引入 HER2 受体的配体分子 TMAB, 在偶联剂的作用下, 将 TMAB 分子偶联到脂质体上, 即形成免疫脂质体。TMAB 本身就具有一定的治疗作用, 不仅能增强阿霉素脂质体对肿瘤细胞的主动靶向性, 提高药物在肿瘤细胞内的含量, 降

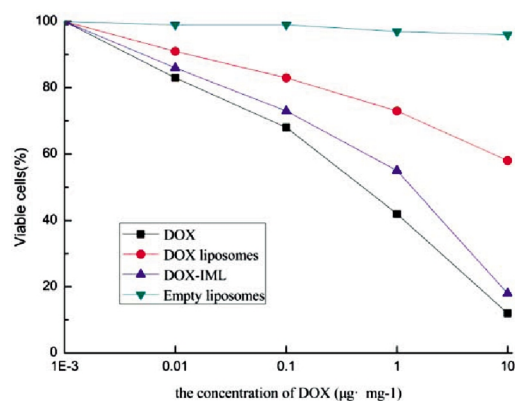


图6 DOX, DOX liposomes, DOX IML 和 empty liposomes 的细胞毒性

Fig.6 Cytotoxicity of AU565 cells incubating with DOX, DOX liposomes, DOX IML and empty liposomes in various drug concentrations at 37 °C for 48 h

低阿霉素对正常细胞的毒副作用^[19], 还可增强治疗效果。

阿霉素免疫脂质体具有一定的缓释作用, 在 12 h 内释药量累计达 40 %, 随着透析时间的延长, 在 72 h 时累积释药量几乎达到平衡, 累积释药达 77 % 左右。阿霉素免疫脂质体在 4 °C

下,稳定性较好。在 25℃ 下,随着测量时间的延长,粒径越来越大,颜色由红色变为暗红色,而且伴有大量沉淀产生。对高、中、低三种不同抗体浓度的阿霉素免疫脂质体的入胞能力和毒性研究发现:抗体含量 $83 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ 的免疫脂质体组内荧光强度最强,细胞存活率最低,而高抗体浓度的免疫脂质体的荧光强度和细胞毒性较低。这可能是因为免疫脂质体上过量的抗体之间以及免疫脂质体之间产生较强的空间位阻,导致结合到肿瘤细胞上的免疫脂质体数量减少,进入细胞的药量降低,从而导致毒性降低。激光共聚焦实验显示阿霉素组内荧光强度最高,阿霉素免疫脂质体次之,阿霉素脂质体的最弱,表明阿霉素免疫脂质体的入胞能力比阿霉素脂质体强。MTT 法细胞毒性试验显示阿霉素的细胞毒性最大,阿霉素免疫脂质体次之,阿霉素脂质体最小,阿霉素免疫脂质体的细胞毒性比阿霉素脂质体强。由此可见,阿霉素免疫脂质体的入胞能力和细胞毒性均高于阿霉素脂质体。在体外细胞实验中,阿霉素通过分子扩散直接进入肿瘤细胞,细胞内药物含量最高^[20],进而毒性最大;在体内实验中,由于体内复杂环境的干扰,阿霉素到达病灶部位或肿瘤细胞内的含量较小,大部分药物会聚集在正常组织中,毒副作用增大。

总之,DOX-IML 上抗体适中时,其入胞能力和细胞毒性是最强的;阿霉素免疫脂质体具有较强的特异性靶向作用,其入胞能力和细胞毒性均高于阿霉素脂质体。由于曲妥珠单抗本身就具有一定的治疗作用^[21],其是否具有协助阿霉素脂质体共同抗癌的作用,尚需进一步的研究证实。

参考文献(References)

- [1] Manjappa A S, Chaudhar K R, Venkataraju M P, et al. Antibody derivatization and conjugation strategies: application in preparation of stealth immunoliposome to target chemotherapeutics to tumor [J]. J Control Release, 2011, 150(1): 2-22
- [2] Feng B, Tomizawa K, Michiue H, et al. Development of a bifunctional immunoliposome system for combined drug delivery and imaging in vivo[J]. Biomaterials, 2010, 31(14): 4139-4145
- [3] Elbayoumi T.A, V.P. Torchilin. Tumor-specific antibody-mediated targeted delivery of Doxil reduces the manifestation of auricular erythema side effect in mice[J]. Int J Pharm, 2008, 357(1-2): 272-279
- [4] Lukyanov A N, Elbayoumi T A, Chakilam A R, et al. Tumor-targeted liposomes: doxorubicin-loaded long-circulating liposomes modified with anti-cancer antibody [J]. J Control Release, 2004, 100 (1): 135-144
- [5] Dent S, Oyan B, Honig A, et al. HER2-targeted therapy in breast cancer: a systematic review of neoadjuvant trials [J]. Cancer Treat Rev, 2013, 39(6): 622-631
- [6] Larsen, P.B., I. Kumler, D.L. Nielsen. A systematic review of trastuzumab and lapatinib in the treatment of women with brain metastases from HER2-positive breast cancer [J]. Cancer Treat Rev, 2013, 39(7): 720-727
- [7] Tagliabue E, Campiglio M, Pupa S M, et al. Activity and resistance of trastuzumab according to different clinical settings [J]. Cancer Treat Rev, 2012, 38(3): 212-217
- [8] Olson E M, Najita J S, Sohl J, et al. Clinical outcomes and treatment practice patterns of patients with HER2-positive metastatic breast cancer in the post-trastuzumab era[J]. Breast, 2013, 22(4): 525-531
- [9] Lazaridis G., G. Pentheroudakis, N. Pavlidis. Integrating trastuzumab in the neoadjuvant treatment of primary breast cancer: accumulating evidence of efficacy, synergy and safety [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2008, 66(1): 31-41
- [10] Mehta, A.I., A.M. Brufsky, J.H. Sampson. Therapeutic approaches for HER2-positive brain metastases: circumventing the blood-brain barrier [J]. Cancer Treat Rev, 2013, 39(3): 261-269
- [11] Taheri A, Dinarvand R, Atyabi F, et al. Trastuzumab decorated methotrexate-human serum albumin conjugated nanoparticles for targeted delivery to HER2 positive tumor cells [J]. Eur J Pharm Sci, 2012, 47(2): 331-340
- [12] 袁东芬, 孙敏捷, 王宇, 等. 奥曲肽靶向阿霉素脂质体的制备及其体外性质[J]. 中国药科大学学报, 2011(03): 223-229
Yuan Dong-fen, Sun Min-jian, Wang Yu, et al. Preparation and properties in vitro of Octreotide targeted doxorubicin liposomes [J]. Journal of China Medicine University, 2011(03): 223-229
- [13] Du C, Deng D, Shan L, et al. A pH-sensitive doxorubicin prodrug based on folate-conjugated BSA for tumor-targeted drug delivery[J]. Biomaterials, 2013, 34(12): 3087-3097
- [14] Rihova B, Strohalm J, Hovorka O, et al. Doxorubicin release is not a prerequisite for the in vitro cytotoxicity of HPMA-based pharmaceuticals: in vitro effect of extra drug-free GlyPheLeuGly sequences [J]. J Control Release, 2008, 127(2): 110-120
- [15] Talelli M, Iman M, Rijcken C J, et al. Targeted core-crosslinked polymeric micelles with controlled release of covalently entrapped doxorubicin[J]. J Control Release, 2010, 148(1): 121-122
- [16] Henninger C, Huelsenbeck J, Huelsenbeck S, et al. The lipid lowering drug lovastatin protects against doxorubicin-induced hepatotoxicity [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2012, 261(1): 66-73
- [17] Lowery A, Onishko H, Hallahan D E, et al. Tumor-targeted delivery of liposome-encapsulated doxorubicin by use of a peptide that selectively binds to irradiated tumors [J]. J Control Release, 2011, 150(1): 117-124
- [18] Amadori D, Milandri C, C zomella G, et al. A phase I/II trial of non-pegylated liposomal doxorubicin, docetaxel and trastuzumab as first-line treatment in HER-2-positive locally advanced or metastatic breast cancer[J]. Eur J Cancer, 2011, 47(14): 2091-2098
- [19] Chegaev K, Riganti C, Rolando B, et al. Doxorubicin-antioxidant co-drugs[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2013, 23(19): 5307-5310
- [20] Burris HA Rd, Tibbitts J, Holden S N, et al. Trastuzumab emtansine (T-DM1): a novel agent for targeting HER2+ breast cancer [J]. Clin Breast Cancer, 2011, 11(5): 275-282