

和厚朴酚脂质体的制备及表征

吴德强

(南昌大学第二附属医院 江西南昌 330006)

摘要:目的:为了提高和厚朴酚的稳定性和溶解性,增强其肿瘤靶向性,制备和厚朴酚脂质体并对其进行表征。方法:采用薄膜水化-挤出法制备和厚朴酚脂质体,通过超滤法测定包封率,以包封率为指标优化和厚朴酚脂质体的制备工艺和处方因素,通过粒径分布和体外释放对其进行表征。结果:优化工艺和处方为磷脂与药物的重量比为 60:1,磷脂与胆固醇的重量比为 20:1,水化介质为 pH 6.5 磷酸盐缓冲液,超声时间为 6 min。所得到的和厚朴酚脂质体平均粒径为 150 nm,96 h 体外累积释药量为 55.2%。结论:优化工艺所制备的和厚朴酚脂质体包封率高,工艺稳定,基本达到了缓释控释及靶向制剂的设计要求。

关键词:和厚朴酚;脂质体;正交设计;缓释制剂

The Preparation and Characterization of Honokiol Liposome

WU De-qiang

(The Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi330006)

Abstract: Objective: Preparing and charactering Honokiol liposome; to improve the stability, solubility and tumor-targeting effect of Honokiol. Methods: Honokiol liposome was prepared by the film hydration extrude method. The encapsulate efficiency was determined by ultrafiltration and the optimum formation was selected by means of orthogonal design of experiment followed charactering the distribution of particle size and Honokiol in vitro release behavior. Results: The optimum formula was as follows: the ratio of lecithin to drug was 60:1; lecithin: cholesterol was 20:1; pH of PBS was 6.5, ultrasonic time was 6 min. The average particle size was 150 nm and the cumulative release of Honokiol at 96 h was 55.2%. Conclusion: The encapsulate efficiency of Honokiol liposome is high and achieve the requirement of controlling release and target formula.

Key words: Honokiol; Liposome; Orthogonal design; Sustained-release preparation

中图分类号:R283.6

文献标识码:B

doi:10.13638/j.issn.1671-4040.2014.08.057

和厚朴酚(honokiol)是厚朴中的主要有效成分之一,是厚朴发挥药效的重要物质基础。现代药理学研究证实,和厚朴酚除了具有抗炎、抗菌、抗氧化、拮抗钙调素、调节胃肠功能等多种药理活性^[1-2],还具有明显的抗肿瘤活性^[3-5]。由于结构中含有酚羟基,所以稳定性不好,容易被氧化。尤其是其水溶性差,大大限制了和厚朴酚的制剂开发和临床应用。脂质体作为一种药物载体,可以将一些不稳定、易氧化的药物包封在脂质体中,药物因受到脂质体双层膜的保护,在很大程度上提高了药物的稳定性,又解决了难溶性药物的溶解性,延长了和厚朴酚在血液中的半衰期。同时利用肿瘤新生血管的增强渗透和滞留(EPR)效应,使药物借助纳米脂质体递药系统往肿瘤部位靶向递药。本研究设计将和厚朴酚包裹于脂质体中,改善和厚朴酚稳定特性和溶解性;同时利用肿瘤 EPR 被动靶向作用提高和厚朴酚的治疗效果;以包封率为指标,采用正交实验筛选并优化了其处方和制备工艺,旨在探索包封率高、缓控释给药的和厚朴酚脂质体。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 采用 RE-52 型真空旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);超声波细胞粉碎仪(宁波新芝仪器研究院);粒径与 ζ 电位分析仪(model 380XLS, Nicomp TM, Santa Barbara, CA, USA); 岛津高效液

相色谱系统;岛津 SPD-10A 紫外检测器;3K 透析袋(绿鸟科技);离心机(上海安亭科学仪器厂);超滤管(MW 3000, Millipore);XW280A 型旋涡混合器(上海青浦沪仪器厂);透射电镜(Joel JEM-1230, Japan)。

1.2 试剂 大豆卵磷脂(上海太伟药业);胆固醇购于美国 sigma 公司;和厚朴酚(深圳美荷生物科技有限公司);甲醇(色谱纯);其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 和厚朴酚脂质体的制备 采用薄膜水化-挤出法制备和厚朴酚脂质体:精密称取大豆卵磷脂、胆固醇、和厚朴酚置于茄形瓶中,加入乙酸乙酯使脂质完全溶解。将茄形瓶置旋转蒸发仪上,40℃减压蒸发有机溶剂,使脂质溶液形成一层均匀薄膜。真空干燥过夜,使溶剂除尽。加入磷酸盐缓冲液(PBS)水化,探头超声。水化液经 0.80、0.45、0.22 μm 滤膜高压挤出,得和厚朴酚脂质体混悬液,置于 4℃冰箱保存备用。

2.2 和厚朴酚脂质体包封率测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱:大连依利特 C18 柱(150 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水-冰乙酸(70:30:0.2); 流速:1.0 mL/min; 紫外检测波长:254 nm; 柱温:25℃。

2.2.2 标准曲线绘制 配制质量浓度为 0.5、2.0、

5.0、8.0、12.0、16.0、20.0 $\mu\text{g/mL}$ 的一系列和厚朴酚对照品溶液。按上述色谱条件进样,以峰面积和质量浓度进行线性回归,得回归方程 $A=54\ 610 - 2\ 125.8(R_2=0.999\ 8)$,在 0.5~20.0 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内线性关系良好,精密度和回收率均符合分析要求。

2.2.3 包封率测定 和厚朴酚脂质体包封率测定采用超滤法:精密移取 0.3 mL 脂质体胶体溶液于超滤管中,离心 10 min,吸取下层液,甲醇稀释后,取 20 μL 按照 2.2.1 条件测定药物含量。计算未包封的和厚朴酚量(M_1)。另外精密移取 0.3 mL 脂质体胶体溶液,用甲醇破乳后测定和厚朴酚,计算胶体溶液中和厚朴酚量(M_2),计算包封率($EE\%$),计算公式为 $EE\%=(M_2-M_1)/M_2$ 。

2.3 正交试验优化和厚朴酚脂质体处方 脂质体制备工艺因素及处方因素都会影响脂质体的药物包封率,所以,本研究在前期试验时采用单因素分析方法考察薄膜分散法制备和厚朴酚脂质体的一些工艺和处方条件,在单因素考察的基础上,通过正交设计试验优化和厚朴酚脂质体处方和制备工艺。

2.3.1 因素和水平的选择 在单因素考察的基础上,以脂质体的包封率为考察指标。选择影响脂质体包封率的主要因素:磷脂与药物的重量比(A)、磷脂与胆固醇的重量比(B)、水相介质种类(C)及超声时间(D)4个对包封率影响较大的因素作为考察因素,每个因素设3个水平。见表1。

表1 因素水平表

| 水平 | 因素 | | | |
|----|--------|--------|-------------|--------|
| | A | B | C | D(min) |
| 1 | 60 : 1 | 20 : 1 | Water | 6 |
| 2 | 30 : 1 | 10 : 1 | PBS(pH 7.4) | 4 |
| 3 | 15 : 1 | 5 : 1 | PBS(pH 6.5) | 2 |

2.3.2 正交试验结果分析 选用 L9(3⁴) 正交试验设计表安排 9 次试验,制得和厚朴酚脂质体,分别测定和厚朴酚包封率。见表 2。根据正交试验表,从极差 R 来看,各因素对包封率的影响大小次序为: A > B > C > D。在试验所选的范围内,超声时间对和厚朴酚包封率的影响最小,磷脂与药物的重量比对包封率影响最大。根据实验结果,并综合经济原则,最后确定最佳工艺和处方条件为 A₁B₁C₃D₁,即磷脂与药物的重量比为 60 : 1,磷脂与胆固醇的重量比为 20 : 1,水化介质为 pH 6.5 磷酸盐缓冲液,超声时间为 6 min。

2.4 工艺验证 为了进一步验证上述优化处方和工艺的稳定性及可行性,以优化出的最佳工艺进行 3 次验证实验,和厚朴酚包封率结果可从表 3 中看出,用优化后的处方和工艺制备的和厚朴酚脂质体包封率比其他正交试验的结果都更好,说明优化成功,优化处方和工艺稳定、可行。见表 3。

表2 L9(3⁴)正交试验设计结果

| NO. | A | B | C | D | EE(%) |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 90.4 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 88.3 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 82.3 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 73.6 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 80.3 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 65.3 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 62.4 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 58.6 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 51.2 |
| K1 | 264.0 | 236.4 | 214.3 | 221.9 | |
| K2 | 216.2 | 227.2 | 213.1 | 216.0 | |
| K3 | 172.2 | 198.9 | 225.0 | 214.5 | |
| R | 91.8 | 27.5 | 11.9 | 7.4 | |

表3 验证试验结果

| | 样品1 | 样品2 | 样品3 | ($\bar{X} \pm S$) | RSD(%) |
|-------|------|------|------|---------------------|--------|
| EE(%) | 92.4 | 90.5 | 89.6 | 91.8 \pm 1.4 | 15 |

2.5 酚脂质体理化表征 采用上面优化的处方和工艺条件制备和厚朴酚脂质体,通过测定粒径和体外药物的累积释放率对其物理化学性质进行表征。

2.5.1 粒径分布 采用粒度/Zeta 电位测定仪,测定和厚朴酚脂质体的粒径分布。为防止多散射现象,样品均用去离子水稀释至适当浓度后测定。结果和厚朴酚脂质体粒径呈现正态分布趋势,平均粒径为 150 nm 左右,非常有利于通过 EPR 效应进入肿瘤组织。

2.5.2 和厚朴酚脂质体体外释放 采用透析法考察和厚朴酚脂质体的体外释放行为。释放介质为含 0.5%吐温-80 的 PBS 溶液^[6]。取 1 L 和厚朴酚脂质体溶液加入到预溶胀的透析袋内 (MWCO=5 000 Da),扎紧袋口,放入装有 50 mL 释放介质的容器中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴,100 rpm 振荡下进行释放实验。按照预先设定时间从释放介质中取样 0.5 mL,同时补入等量 37 $^{\circ}\text{C}$ 空白释放介质。采用 HPLC 法测定释放样品中的和厚朴酚浓度,以和厚朴酚的 DMSO 溶液作为对照。结果和厚朴酚 DMSO 溶液体外释放快且释放完全,说明透析袋对和厚朴酚吸附较少,可以用来评价和厚朴酚脂质体的体外释放行为。和厚朴酚脂质体无明显突释现象,呈现出缓慢释放,尤其是 24 h 几乎接近零级释放。所以和厚朴酚脂质体不仅可以改善和厚朴酚稳定性和溶解性能,还具有缓控释性能,为开发和厚朴酚的缓控释制剂提供一定的借鉴作用。

3 讨论

脂质体制备过程中常常遇到包封率不高等问题,通过前期预试验发现,影响脂质体包封率的因素是多方面的。因此,本实验我们选取部分重要影响因素,通过正交试验设计和分析,优化出高包封率的工艺和处方因素,并对优化出来的和厚朴酚脂质体进行体外理化性能表征。本实验制备的和厚朴酚脂质体为普通脂质体,如果对其表面进行适当修饰,可以得到预期

各种功能性脂质体。比如对磷脂进行聚乙二醇(PEG)修饰后,可以得到长循环脂质体;各种抗原-抗体修饰可以制备各种免疫脂质体。这些修饰的脂质体更能够发挥药物在体内缓控释及靶向效应。

参考文献

[1]Maruyama YJ,Kuribara H.Overview of the pharmacological featurers of honokiol[J].CNS Drug Reviews,2000,6(1):35-44
 [2]刘可云,董志,朱毅,等.厚朴酚与和厚朴酚的药理学研究现状[J].中成药,2006,28(5):716-718
 [3]Yang SE,Hsieh MT,Tsai TH.Down-modulation of Bcl-XL, release of

cytochrome c and sequential activation of caspases during honokiol induced apoptosis in human squamous lung cancer CH27 cells[J]. Biochem Pharmacol,2002,63(9):1 641-1 651
 [4]薛芳,成志勇,梁文同,等.和厚朴酚对 U937/ADR 细胞系耐药逆转作用及其机制研究 [J]. 上海交通大学学报 (医学版),2009,29(9): 1 305-1 309
 [5]顾伟,范昕建,吴疆,等.和厚朴酚对肝癌 HepG2 细胞生长抑制及凋亡的作用[J].细胞与分子免疫学杂志,2008,24(6):620-622
 [6]Fang F,Gong CY,Qian ZY.Honokiol Nanoparticles in Thermosensitive Hydrogel: Therapeutic Effects on Malignant Pleural Effusion[J].ACS nano,2009,3(12):4 080-4 088
 (收稿日期: 2013-10-21)

复方仙草素对肝癌血道肺转移瘤表达的实验研究*

薛晓彤¹ 张博² 董晓恺³ 陈建衡¹ 任青华^{2#}

(1 山东省泰山疗养院 泰安 271000;2 山东省医学科学院 济南 250062;3 山东省立医院 济南 265513)

摘要:目的:研究和探讨复方仙草素抗肝肿瘤转移的作用机理,为临床用药提供理论依据。方法:取小鼠 60 只,随机分成模型对照组、低浓度组与高浓度组各 20 只。各组小鼠尾静脉注射 W₂₅₆ 肿瘤细胞悬液 0.25 mL/只,次日开始用药。模型对照组给予生理盐水,低浓度组与高浓度组分别给予不同浓度的复方仙草素,连续给药 18 d,于第 19 天处死动物,剥离肺脏称重,以单盲法计数肺转移瘤结节抑制率、肺转移瘤生长指数抑制率,同时进行转移瘤组织形态学、病理学检验。结果:模型对照组肺组织可见广泛的转移病灶,复方仙草素用药组肺结节转移瘤明显少于模型对照组,且高浓度组优于低浓度组。结论:高浓度复方仙草素对肝癌血道肺转移瘤具有较强的抑制作用。

关键词:肝癌血道肺转移瘤;复方仙草素;肿瘤表达;药用疗效

中图分类号:R285.5

文献标识码:B

doi:10.13638/j.issn.1671-4040.2014.08.058

复方仙草素由止血的仙鹤草与补气的人参两味中药组成,其主要有效成分是仙鹤草素和人参皂甙。在以往的临床和基础实验中,我们发现该两味中药已经不再是传统意义上止血和补气的作用,而且具有非常广泛的药理功效,尤其对抑制恶性肿瘤的转移具有良好的治疗效果。为进一步探讨中医药抗肿瘤转移的作用机理,我们对中药复方仙草素进行了深入的实验研究。现报告如下:

1 材料与方

1.1 材料 动物:昆明种健康小白鼠,清洁级(二级)、雄性、体重(25±0.5)g,山东省动物实验中心提供,合格证书:动管资字(SYXK 鲁 2009)第 01569 号。瘤株:W₂₅₆ 肿瘤细胞,中国中医研究院生物科学研究所提供。标本:转移瘤组织,山东省医学科学院基础医学研究所提供。药品:复方仙草素,山东省医学科学院基础医学研究所中药室提供。仪器:GF-2 卧式离心机,北京中外科技医疗公司生产。SD-3 组织匀浆器,江苏南京药理研究院创强科技公司生产。LY 型紫外分光光度计,上海浦江科技有限公司生产。QR-3 型扭力天平,山东医疗器械总公司生产。

1.2 实验方法 动物分组:取小鼠 60 只,随机分成模型对照组、低浓度组与高浓度组各 20 只。肝癌血道肺转移瘤模型建立:取传代 8~12 d、生长良好的 W₂₅₆ 肿瘤瘤株,颈椎脱臼,固定于蜡板上,用碘酊、酒

精消毒瘤株腹部皮肤,打开腹腔,选择生长良好无坏死或液化的肿瘤组织,放置平皿内,剪成 2~3 mm³ 的小块,用玻璃组织匀浆器研磨,混匀后放入无菌容器内,D-Hanks 液洗涤 3 次,离心 2 次,取上清液加生理盐水稀释成 1:3 的瘤细胞悬液。调整细胞浓度为 2×10⁶ mL(细胞存活率>96%)。所有小鼠尾部消毒后,尾静脉注射 W₂₅₆ 肿瘤细胞悬液 0.25 mL/只,整个操作应在 60 min 内完成。动物用药:模型对照组给予同体积的生理盐水;高浓度组给予复方仙草素 4.80 g/kg;低浓度组给予复方仙草素 2.40 g/kg。每日灌胃 1 次,每次 0.80 mL,连续给药 18 d,于第 19 天处死动物,剥离肺脏称重,Bouin 液固定,以单盲法计数肺转移瘤结节数,计算肺结节抑制率、肺转移瘤生长指数抑制率,同时将剥离的转移瘤组织固定于福尔马林溶液中,石蜡包埋、切片、免疫组化,进行肿瘤组织形态学、病理学观察。

1.3 统计学方法 采用 SPSS15.0 统计软件进行方差分析检验,研究数据均以($\bar{X} \pm S$)表示。

2 结果

2.1 三组实验效果比较 与模型对照组比较,高浓度组肺结节抑制率为 34.86%、P<0.05,肺转移瘤生长指数抑制率为 31.50%、P<0.05,具有显著性差异;与模型对照组相比较,低浓度组肺结节抑制率为 28.84%、P>0.05,肺转移瘤生长指数抑制率为 16.53%、P>0.05,无显著性差异。见表 1。

* 基金项目:山东省科技厅项目(编号:2009GG5WZ02281)

通讯作者:任青华,E-mail:qinghua9946@163.com