

青蒿素长循环脂质体的制备及体外性质评价

余茨蓝, 郑智元, 伊宸辰, 周沐野, 涂家生*, 孙春萌*

(中国药科大学, 药用辅料及仿创药物研发评价中心, 药学院, 江苏 南京 210009)

摘要: 青蒿素 (artemisinin, ART) 由于溶解度差、稳定性低, 限制了其应用。本研究采用长循环脂质体包裹青蒿素, 增强其溶解度及稳定性。以粒径和包封率 (entrapment efficiency, EE) 等为评价指标, 采用单因素试验及 Box-Behnken 响应面设计试验优化处方, 考察最优处方制备得到脂质体的外观形态、粒径分布、zeta 电位、放置稳定性、血清稳定性、体外释放和细胞毒性作用。结果表明, 载青蒿素长循环脂质体的最优处方为: 磷脂与胆固醇的质量比为 5.22 : 1, 青蒿素与磷脂的质量比为 1 : 23.15, 磷脂浓度为 $14.35 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, DSPE-mPEG 摩尔含量为 2%。按优化后处方制备所得青蒿素长循环脂质体呈类球形, 分布均匀, 粒径为 $(113.3 \pm 4.7) \text{ nm}$, 多分散系数 (polydispersity index, PDI) 为 0.227 ± 0.022 , zeta 电位为 $(-12.9 \pm 2.6) \text{ mV}$, 包封率为 $(95.88 \pm 4.8) \%$, 在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下放置 15 天稳定性良好, 血清中 24 h 内无明显聚集。体外释放实验表明青蒿素长循环脂质体具有缓释作用; 细胞毒性实验证实脂质体载体本身安全性较高, 载药脂质体制剂在高浓度时的细胞毒性作用低于游离青蒿素。本研究表明, 优化得到的青蒿素长循环脂质体具有简便的制备方法、适宜的理化性质和较高的安全性, 具有广阔的临床应用前景。

关键词: 青蒿素; 长循环脂质体; 处方优化; 理化性质; 细胞毒性

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 06-1002-07

Preparation and *in vitro* evaluation of artemisinin loaded long-circulating liposomes

YU Ying-lan, ZHENG Zhi-yuan, YI Chen-chen, ZHOU Mu-ye, TU Jia-sheng*, SUN Chun-meng*

(Center for Research Development and Evaluation of Pharmaceutical Excipients and Generic Drugs, School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: The therapeutic application of artemisinin (ART) is restricted in application due to its poor water solubility and stability. In this study, the long-circulating liposomes (L-Lip) were constructed to improve the solubility and stability of ART. The preparation method, physicochemical properties, serum stability, *in vitro* release profile and cytotoxicity of the ART loaded long-circulating liposomes were investigated. Using the particle size and entrapment efficiency (EE) as the evaluation index, the preparation procedure was optimized by the Box-Behnken response surface design based on the single factor screening method. The ART loaded long-circulating liposomes were prepared by filming rehydration method, and evaluated with particle size and entrapment efficiency. The optimal formulation was as follows: lipid-cholesterol = 5.22 : 1 (mass ratio), drug-lipid = 1 : 23.15 (mass ratio), lipid concentration = $14.35 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, and molar percentage of mPEG = 2%. The morphology of L-Lip was uniformly spherical shape according to optimal formulation. The mean size and polydispersity index (PDI) were about $(113.3 \pm 4.7) \text{ nm}$ and 0.227 ± 0.022 respectively, the zeta potential

收稿日期: 2018-02-23; 修回日期: 2018-03-14.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81501579, 81673364); 江苏省自然科学基金资助项目 (BK20150702).

*通讯作者 Tel: 86-25-83271305, E-mail: jiashengtu@alilyun.com; suncm_cpu@hotmail.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0161

was (-12.9 ± 2.6) mV, and the entrapment efficiency (EE) of ART was (95.88 ± 4.8)%. The L-Lip had good stability at 4 °C for 15 days and the particle sizes did not exhibit significant variations in 50% rat plasma over 24 h at 37 °C. The *in vitro* release study of formulation showed a sustained release. Moreover, the cytotoxicity exhibited that blank liposomes were of great safety. Compared with the free ART, the liposome formulation achieved lower cytotoxicity at the high concentration. The L-Lip successfully prepared by a simple filming-rehydration method exhibited ideal physicochemical properties and were enhanced safety, which may serve as a promising nanopatform for clinical application.

Key words: artemisinin; long-circulating liposomes; formulation optimization; physicochemical property; cytotoxicity

青蒿素 (artemisinin, ART, 图 1) 是从中药青蒿中提取分离得到的具有过氧化基团的倍半萜内脂类化合物, 是抗疟剂的有效成分^[1]。近年来研究发现, 青蒿素及其衍生物还具有抗血吸虫、抗乙型肝炎病毒、免疫调节及抗肿瘤等作用^[2-5]。青蒿素类药物对乳腺癌、人类白血病、结肠癌和小细胞肺癌等细胞株均有体外抑制作用^[4, 5]。且青蒿素及其衍生物对铁含量高的肿瘤细胞具有选择性抑制作用, 并具有很好的耐受性, 不良反应较少^[6]。更为重要的是, 它对多药耐药的肿瘤细胞仍有活性^[7, 8]。然而青蒿素因其水溶性差、生物利用度低等特点限制了其使用。同时, 青蒿素分子内的过氧键在体内易被破坏, 稳定性较差, 影响药物的作用时间^[1]。

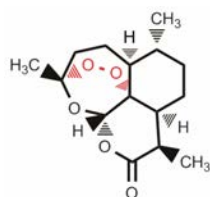


Figure 1 The chemical structure of artemisinin (ART)

脂质体 (liposome, Lip) 具有良好的生物相容性和靶向性, 是近年来研究较多的一种药物载体, 可以作为各类治疗药物的传递载体^[9]。利用脂质体包裹青蒿素可提高其溶解度, 增强其稳定性。但是, 普通脂质体易从体内清除, 聚乙二醇 [poly (ethylene glycol), PEG] 修饰普通脂质体制备而得的长循环脂质体 (long-circulating liposome, L-Lip) 可阻止巨噬细胞对脂质体的识别和摄取, 延长脂质体在血液中的循环时间, 在肿瘤部位获得较高的蓄积, 从而提高药物的治疗指数和疗效^[10]。

本研究应用薄膜分散法制备了青蒿素长循环脂质体, 并以包封率和粒径为指标, 对各处方因素进行了考察, 应用 Box-Behnken 响应面设计进行处方优化, 确定了青蒿素长循环脂质体的最优处方。按此处

方制备了 3 批样品, 测定了其粒度分布、zeta 电位和形态学, 并对其稳定性进行了初步考察。同时, 考察了脂质体的体外释放行为及细胞毒性作用。

材料与方法

材料与仪器 青蒿素 (artemisinin, ART, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 两种大豆卵磷脂 (soyben phosphatidylcholine, SPC): 一种来源于阿拉丁试剂公司, 纯度 > 98%; 另一种来源于上海太伟药业有限公司, 纯度约 85%; 蛋黄卵磷脂 (PC-98T, 纯度 > 95%, 注射用)、胆固醇 (cholesterol, CH)、DSPE-mPEG (上海艾韦特医药科技有限公司); DMEM 高糖培养基、胰酶、青霉素-链霉素溶液 (美国 HyClone 公司); 胎牛血清 (美国 CLARK Bioscience 公司); 噻唑蓝 (MTT, 南京助研生物技术有限公司); 三氯甲烷、二甲基亚砷 (dimethyl sulphoxide, DMSO)、十二烷基磺酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS) 等均为分析纯。

高效液相色谱系统 (high performance liquid chromatography, HPLC, 美国 Thermofisher Scientific 公司); ZORBAX SB-C18 色谱柱 (美国 Agilent Technologies 公司); DB-525 ZetaPlus 激光粒度分析仪 (美国 Brookhaven Instruments 公司); UV-1800 紫外可见分光光度计 (日本 Shimadzu 公司); 酶标仪 (美国 BioTek Instruments 公司)。

细胞株和动物 小鼠乳腺癌 (4T1) 细胞株 (南京凯基生物科技有限公司) 用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素溶液的 DMEM 培养基于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。

SD 大鼠 [南京市青龙山动物繁殖场, 许可证号: SCXK (浙) 2014-0001] 饲养于中国药科大学动物实验中心。

青蒿素长循环脂质体的制备 准确称取处方量的胆固醇、卵磷脂、DSPE-mPEG 和青蒿素, 置于 500 mL

茄形瓶中,加入氯仿 8 mL 溶解,固定于旋转蒸发器,38 °C 旋转蒸发 4 h 完全除去有机溶剂形成膜,加入 4 mL 生理盐水充分振摇至水化完全。超声波细胞粉碎机探头超声 (300 W, 5 min) 制备单层脂质体,过 0.22 μm 滤膜 3 次,降低粒径,得到带淡蓝色乳光的脂质体。

青蒿素长循环脂质体的处方筛选 通过单因素试验分别考察 3 种类卵磷脂 (SPC, 纯度 > 98%; SPC 纯度约 85%; PC-98T); 磷脂比 (3 : 1、5 : 1 和 7 : 1, 质量比); 药脂比 (1 : 10、1 : 12、1 : 15、1 : 20 和 1 : 25, 质量比); 磷脂浓度 (10、20 和 30 mg·mL⁻¹); DSPE-mPEG 含量 (2%、4% 和 6%, 摩尔比) 对青蒿素长循环脂质体粒径和包封率的影响。

单因素考察的结果表明,磷脂比、药脂比和磷脂浓度对青蒿素长循环脂质体的粒径和包封率影响较为显著,因而选取这 3 个因素作为考察对象。每个因素选取 3 个水平,采用 Box-Behnken 响应面设计来优化处方,其中各因素取值如下: 磷脂比 (X_1 , 3 : 1~7 : 1); 药脂比 (X_2 , 1 : 15~1 : 25); 磷脂浓度 (X_3 , 10~20 mg·mL⁻¹)。以包封率 (Y) 作为响应值,建立数学模型,优化青蒿素长循环脂质体的处方。每个因素的低、中、高 3 个水平分别记为-1、0、+1,各因素及水平见表 1。利用 Design Expert 8.0 软件建立 Box-Behnken 实验设计。

Table 1 Factors and levels of Box-Behnken experimental design

Independent variable	Coded level		
	-1	0	+1
Ratio of lipid to cholesterol (X_1)	3 : 1	5 : 1	7 : 1
Ratio of drug to lipid (X_2)	1 : 15	1 : 20	1 : 25
Lipid concentration (X_3)/mg·mL ⁻¹	10	15	20

青蒿素长循环脂质体粒径及电位的测定 取脂质体样品,加入生理盐水稀释至适宜浓度,取 2 mL,采用激光粒度分析仪经动态光散射法测定脂质体粒径分布和 zeta 电位。

青蒿素长循环脂质体形态学研究 取少量青蒿素长循环脂质体溶液,稀释至一定浓度,取适量滴至专用铜网上,自然挥干后,浸泡于磷钨酸溶液中染色。待铜网挥干后用透射电镜观察脂质体的形态。

青蒿素的含量测定 采用 HPLC 法测定青蒿素的含量,色谱条件: C18 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm), 乙腈-水 (60 : 40) 为流动相,流速 1 mL·min⁻¹,进样量 20 μL,检测波长 210 nm,柱温 25 °C。

青蒿素长循环脂质体包封率的测定 通过透析法除去游离的青蒿素,并采用 HPLC 测定青蒿素的含量,从而计算其包封率。具体操作如下,移取制备得到的青蒿素长循环脂质体溶液 2 mL,置于 3.5 kDa 孔径的透析袋中,在超纯水中透析 24 h。收集透析袋中的液体,转移至 10 mL 量瓶中,加入适量无水乙醇振摇破乳,待脂质体结构被充分破坏后,加入无水乙醇定容。另取未经透析的脂质体溶液 2 mL,同法操作。所得溶液分别过 0.22 μm 滤膜,进 HPLC 检测青蒿素的含量。脂质体包封率 (EE) 的计算公式如 (1) 所示:

$$EE = \frac{W_1}{W_2} \times 100\% \quad (1)$$

W_1 和 W_2 分别表示脂质体中青蒿素的质量和青蒿素的总质量。

青蒿素长循环脂质体的稳定性考察 取一定量的样品,密封于西林瓶中,置于室温和 4 °C 冰箱中放置 15 天,分别于第 0、7 和 15 天取出,观察外观,测定粒径、电位和渗漏率,考察样品的放置稳定性。按照青蒿素长循环脂质体包封率的测定项下操作测定脂质体中青蒿素的含量,并按公式 (2) 计算贮存过程中的渗漏率 (Q_L)^[11]。

$$Q_L = \frac{W_3 - W_4}{W_3} \times 100\% \quad (2)$$

其中, W_3 为新制备时脂质体中青蒿素的含量; W_4 为贮存一定时间后脂质体中青蒿素的含量。

青蒿素长循环脂质体的血清稳定性考察 用优化得到的处方工艺分别制备青蒿素普通脂质体和长循环脂质体。取一定量的脂质体溶液与等体积的大鼠血浆混合后,置于 37 °C 环境中孵育,定时取样,用紫外可见分光光度计 ($\lambda_{\max} = 750$ nm) 检测吸光度值,分别计算各时间点各组脂质体在血清中的透光率^[12]。

青蒿素长循环脂质体的体外释放度考察 取等浓度的青蒿素溶液、青蒿素脂质体和青蒿素长循环脂质体溶液各 0.5 mL,分别置于 3.5 kDa 孔径的透析袋中,两端扎紧,置于 15 mL 的具塞试管中,各加入 pH 6.8 磷酸盐缓冲液 (含 2% SDS) 10 mL 作为释放介质。将具塞试管置于恒温水浴振荡器中,37 °C、100 r·min⁻¹ 振荡释放。分别于 0.5、1、2、4、6、8、10、24、36 和 48 h 各取出释放介质 1 mL。每次取样后,在具塞试管中补充新鲜的释放介质 1 mL。用 HPLC 测定释放液中青蒿素的浓度,按公式 (3) 计算不同时间点药物的累积释放度 (Q)。

$$Q = \frac{C_n V + \sum_{i=1}^{n-1} C_i V_i}{m} \times 100\% \quad (3)$$

其中, C_i 和 C_n 分别表示第 i 次和第 n 次取样时, 释放介质中青蒿素的浓度; V 表示释放介质的总体积 (10 mL); V_i 表示第 i 次的取样体积 (1 mL); m 表示样品中青蒿素的总质量。

青蒿素长循环脂质体的细胞毒性 采用 MTT 法考察空白脂质体和载青蒿素脂质体的细胞毒性。将小鼠乳腺癌 (4T1) 细胞以 6×10^3 个/孔接种于 96 孔板中, 在 37°C 、5% CO_2 环境中孵育 24 h, 弃去培养液。分别加入不同浓度的空白脂质体和载青蒿素脂质体, 以青蒿素溶液作为对照组, 继续孵育 24 和 48 h。每孔分别加入 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ MTT 溶液 200 μL , 继续孵育 4 h, 弃去上清液, 每孔再加入 DMSO 150 μL , 振荡 10 min 使结晶物充分溶解, 用酶标仪在 570 nm 波长下测定各样品的吸光度值 (I_s), 同时测定调零孔的吸光度值 (I_B) 和对照孔的吸光度值 (I_C), 根据公式 (4) 计算细胞存活率 (V)。

$$V = \frac{I_s - I_B}{I_C - I_B} \times 100\% \quad (4)$$

数据分析 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。计量数据用均值 \pm 标准差表示。组间均数差异采用 Student's-*t* 检验。 $P < 0.05$ 表示具有显著性差异。

结果和讨论

1 青蒿素长循环脂质体的单因素处方筛选

1.1 卵磷脂种类对青蒿素长循环脂质体粒径和包封率的影响 磷脂双分子层是脂质体的主要结构, 因此选用了不同纯度、不同生产厂家的卵磷脂制备脂质体, 以考察卵磷脂种类对青蒿素长循环脂质体粒径和包封率的影响。结果表明, 磷脂的种类对青蒿素长循环脂质体的粒径和包封率都有显著的影响, 这可能是由于不同磷脂所带的电荷及分子间作用力等不同, 导致其所制备得到脂质体的结构及形态发生改变, 从而表现出不同的粒径和包封率 (图 2A)。其中, 采用 PC-98T 制备的青蒿素长循环脂质体粒径最小, 且包封率最高。因此, 选用这种磷脂制备脂质体。

1.2 磷胆比对青蒿素长循环脂质体粒径和包封率的影响 磷脂与胆固醇是脂质体的主要成分, 因此考察磷脂与胆固醇的质量比对青蒿素长循环脂质体粒径和包封率的影响。由图 2B 可以看出, 磷胆比对脂质体的粒径和包封率影响均较大, 但并不呈线性变化。因此, 将磷胆比的范围选在 3:1~7:1 之间用于后续多因素考察。

1.3 药脂比对青蒿素长循环脂质体粒径和包封率的影响 药脂比是影响脂质体制剂包封率的重要因素。由图 2C 可以看出, 药脂比对脂质体的粒径和包封率影响均较大, 但并不呈线性变化。因此, 选择药脂比在 1:10~1:25 之间。

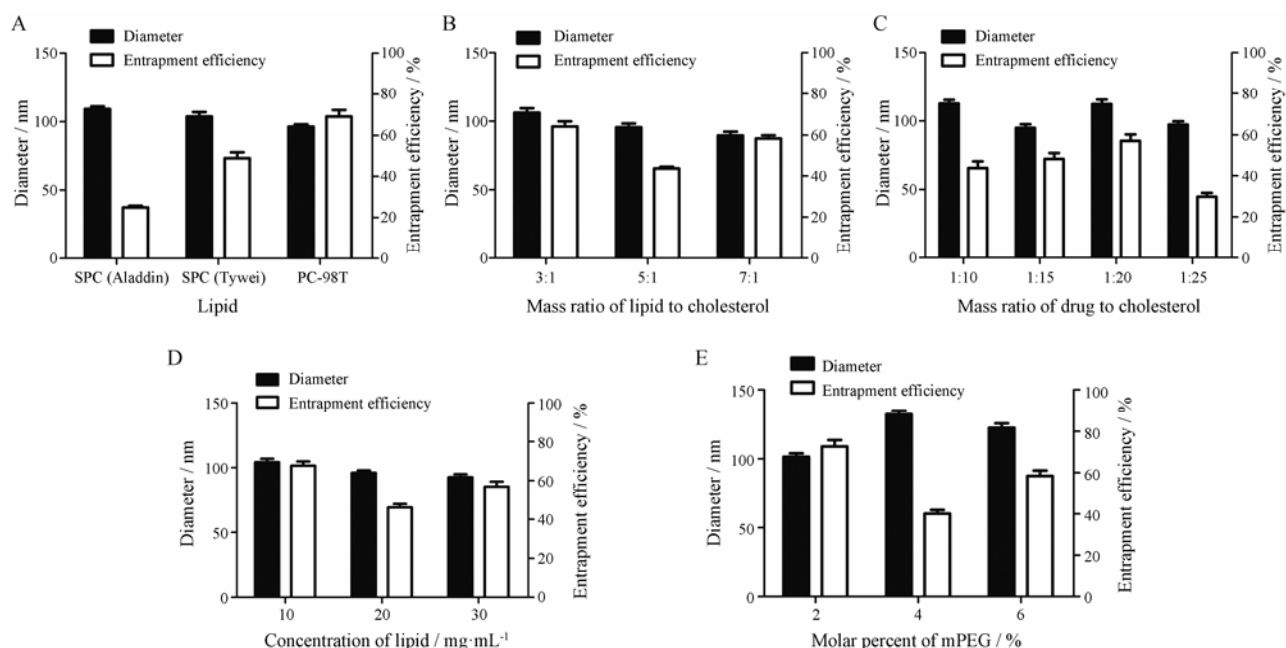


Figure 2 Effect of the kinds of lipid (A), mass ratio of lipid to cholesterol (B), mass ratio of drug to lipid (C), concentration of lipid (D), molar percent of mPEG (E) on particle size and entrapment efficiency. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

1.4 磷脂浓度对青蒿素长循环脂质体粒径和包封率的影响 考察不同磷脂浓度对青蒿素长循环脂质体粒径和包封率的影响。由图 2D 可以看出, 随着磷脂浓度的增加, 脂质体的粒径逐渐减小, 包封率先减小再增加, 且变化范围较大, 但并不呈线性变化。因此, 选择磷脂浓度在 $10\sim 30\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 之间。

1.5 DSPE-mPEG 含量对青蒿素长循环脂质体粒径和包封率的影响 DSPE-mPEG 是构成长循环脂质体的主要成分, 考察不同含量 DSPE-mPEG 对青蒿素长循环脂质体粒径和包封率的影响。由图 2E 可以看出, 随着 DSPE-mPEG 的减少, 粒径先增大再降低, 而包封率先减少再增大, 在 DSPE-mPEG 含量为 2% 时, 脂质体的粒径最小, 包封率最高。因而, 选择加入 2% DSPE-mPEG 制备青蒿素长循环脂质体。

2 Box-Behnken 响应面设计优化处方

2.1 回归模型的建立 利用 Design Expert 8.0 软件建立 Box-Behnken 实验设计。对实验测得数据进行二次多元回归分析, 得到 X_1 、 X_2 、 X_3 与 Y 的二次多项回归方程:

$$Y=92.08+8.58X_1+19.90X_2-5.56X_3-0.45X_1X_2+0.54X_1X_3-1.91X_2X_3-38.46X_1^2-15.91X_2^2-25.10X_3^2 (R^2=0.9921)$$

对该模型进行显著性检验。由显著性检验结果可知, X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_1^2 、 X_2^2 和 X_3^2 对 Y 均有显著性影响, 其他项对 Y 的影响不显著。模型的概率 $P<0.0001$, 表

明模型极显著, 模型的确定系数 $R^2=0.9921$, 说明响应值的变化有 99.21% 来源于所选自变量, 即磷脂与胆固醇的比例、药物与磷脂的比例、磷脂质量浓度, 方程的响应值与自变量间线性关系显著。模型的变异系数 (coefficient of variation, CV) 为 7.57%, 说明模型的精密密度良好。同时, 方程的失拟项 F 值为 3.37 ($P>0.05$), 失拟项不显著, 说明该回归方程在整个回归区域的拟合情况良好, 回归模型可用于代替实验真实点对实验结果进行分析。

2.2 响应曲面分析与优化条件的确定 利用 Design Expert 8.0 软件绘制不同影响因素对于响应值的三维曲线图, 结果见图 3。由图可见, 包封率随着磷脂浓度、磷脂比及药脂比的增大, 均有先增加后减小的趋势。得到最优处方条件为磷脂与胆固醇的质量比为 5.22:1, 青蒿素与磷脂的质量比为 1:23.15, 磷脂浓度为 $14.35\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。以最优处方制备青蒿素长循环脂质体, 考察其体外性质。

3 青蒿素的含量测定 青蒿素的 HPLC 测定中, 采用峰面积定量法, 线性方程为: $A=851059C+6333.9$, $R^2=0.9996$, 线性范围为 $0.01\sim 1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。低、中、高 (0.01 、 0.05 和 $0.1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 3 个浓度的平均回收率分别为 101.6%、100.8% 和 98.95%, RSD% 分别为 0.8%、1.2% 和 1.4%。日间精密度的 RSD 分别为 1.2%、1.6% 和 1.8%, 均符合要求。

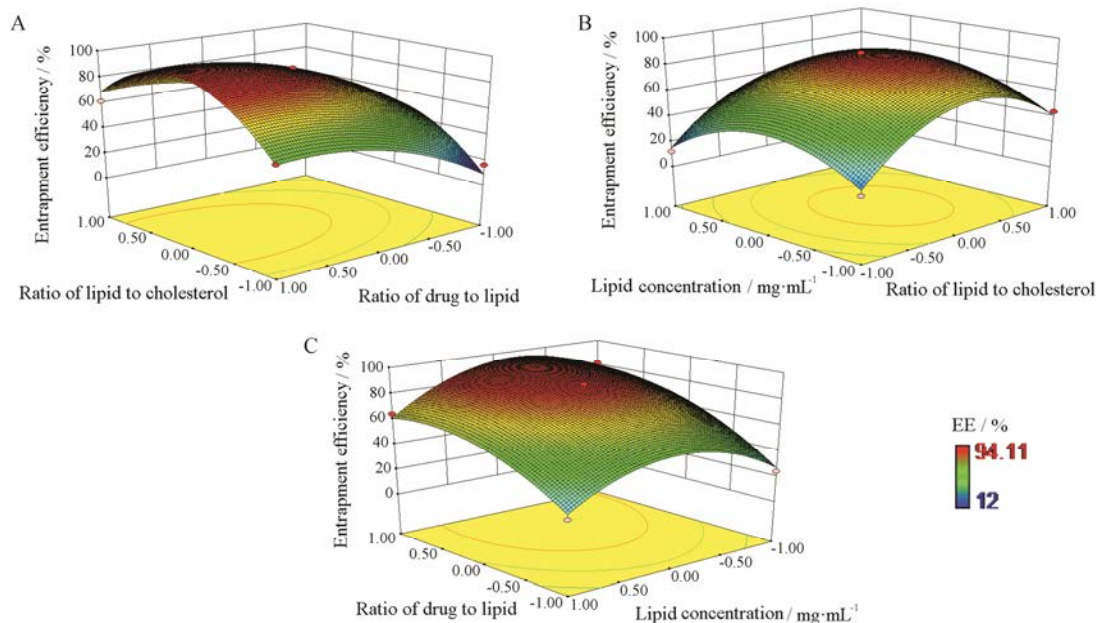


Figure 3 Response surface plot showing effect of mass ratio of lipid to cholesterol and mass ratio of drug to lipid on response entrapment efficiency (A); response surface plot showing effect of lipid concentration and mass ratio of lipid to cholesterol on response entrapment efficiency (B); response surface plot showing effect of mass ratio of drug to lipid and lipid concentration on response entrapment efficiency (C)

4 青蒿素长循环脂质体的质量研究 按最优处方条件制备 3 批青蒿素长循环脂质体, 以验证所优化处方的可行性。透射电镜结果显示 (图 4A), 青蒿素长循环脂质体具有球状或近球状双层结构, 粒子间无聚集现象, 分布较均匀。测得粒径结果如图 4B 所示, 长循环脂质体的平均粒径为 (113.3 ± 4.7) nm, PDI 为 0.227 ± 0.022 , 说明长循环脂质体的粒径分布比较均匀。测得电位结果如图 4C 所示, zeta 电位为 (-12.9 ± 2.6) mV, 说明青蒿素长循环脂质体表面荷负电, 微粒间的静电排斥可提高脂质体的分散性, 有利于其稳定性。

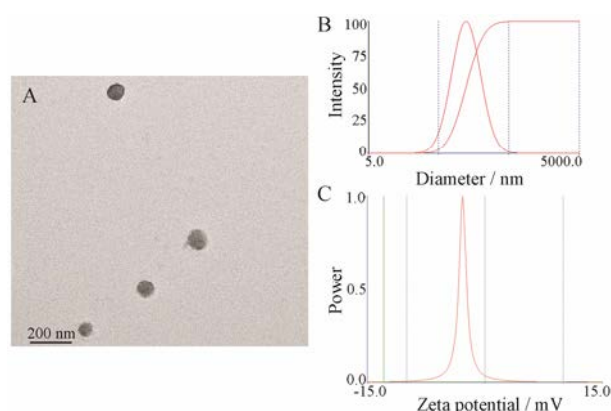


Figure 4 Transmission electron microscope (TEM) image of artemisinin loaded long-circulating liposomes (A); size distribution of artemisinin loaded long-circulating liposomes (B); zeta potential of artemisinin loaded long-circulating liposomes (C)

5 青蒿素长循环脂质体的稳定性考察 稳定性考察结果表明, 青蒿素长循环脂质体在 4°C 环境中放置 15 天, 外观、平均粒径、PDI 和电位均未发生明显变化, 药物渗漏率均小于 5% (表 2), 说明该脂质体溶液在低温 (4°C) 条件下放置, 15 天内的稳定性良好。

6 青蒿素长循环脂质体的血浆稳定性考察 本研究中选择 50% 大鼠血浆模拟体内环境, 考察载药脂质体的血浆稳定性。结果表明, 长循环脂质体的稳定性

Table 2 Stability of artemisinin loaded long-circulating liposomes. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. PDI: Polydispersity index

Evaluating indicator	Time/day		
	0	7	15
Particle size/nm	113.3 ± 4.7	106.6 ± 3.8	118.9 ± 2.6
PDI	0.227 ± 0.022	0.194 ± 0.016	0.242 ± 0.024
Zeta potential/mV	-12.9 ± 2.6	-13.6 ± 3.2	-10.8 ± 2.2
Percolation rate/%	0.0 ± 0.0	0.01 ± 0.002	2.3 ± 0.6

优于普通脂质体。长循环脂质体在 24 h 内无明显聚集和沉淀, 稳定性较好 (图 5A)。这可能是由于长循环脂质体表面修饰有亲水性的 PEG, 在脂质体的表面形成一层水化膜, 可掩盖脂质体表面的疏水性结合位点, 阻碍血浆成分接近脂质体, 减少脂质体与血浆蛋白的相互作用, 增加脂质体的稳定性。

7 青蒿素长循环脂质体的体外释放度考察 游离青蒿素溶液、青蒿素脂质体及青蒿素长循环脂质体体外累积药物释放结果见图 5B。在 1 h 时, 游离青蒿素溶液、青蒿素脂质体及青蒿素长循环脂质体的累积释放量分别为 99.10%、58.22% 和 37.36%, 游离青蒿素溶液达到最大释放。24 h 后, 青蒿素脂质体及青蒿素长循环脂质体的累积释放量分别为 81.49% 和 83.63%, 达到最大累积释放量, 之后释放趋于平缓。相比于游离青蒿素溶液的快速释放, 两种青蒿素的脂质体均表现出一定的缓释能力。

8 青蒿素长循环脂质体的细胞毒性 由图 6A 可知, 在实验浓度范围内, 空白脂质体及空白长循环脂质体对 4T1 细胞的抑制率均较低, 当脂质体浓度达到 $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 并作用 48 h 后, 细胞存活率亦均大于 80%, 表明了脂质体载体的安全性。轻微的细胞毒性可能是由于脂质体制备过程中残留的少量有机溶剂导致。图 6B 展示了游离 ART 溶液及包载 ART 的不同脂质体对 4T1 细胞的抑制作用。包载 ART 的普通脂质体和长循环脂质体对 4T1 细胞的抑制作用未表现出明显差异。在低浓度时, 游离 ART 组与脂质体

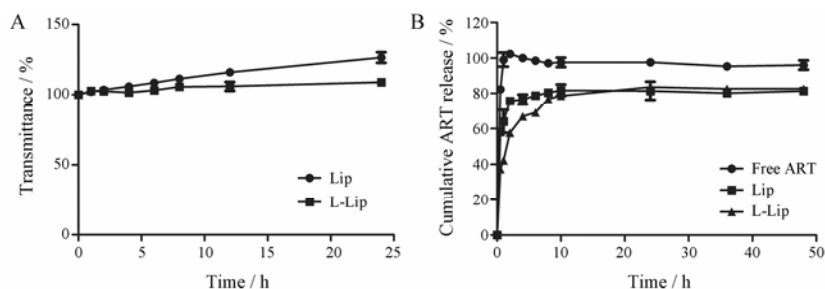


Figure 5 The variation in turbidity (represented by transmittance) of ART-loaded liposomes (Lip) and ART-loaded long-circulating liposomes (L-Lip) in 50% rat plasma over 24 h at 37°C (A). *In vitro* release profile of ART in 2% SDS (pH 6.8) solution at 37°C (B). $n=3$, $\bar{x} \pm s$

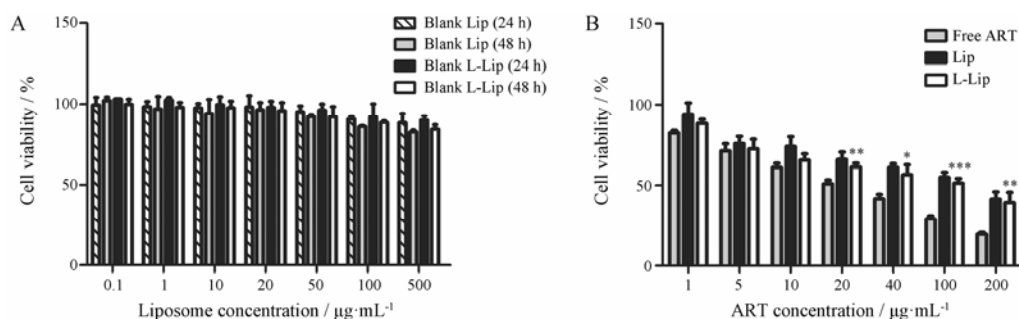


Figure 6 The cytotoxicity study on blank and ART loaded liposomes and free ART. A: Cytotoxicity of blank liposomes against 4T1 cells at 24 and 48 h, respectively; B: Cytotoxicity of ART loaded liposomes and free ART against 4T1 cells. $n=6$, $\bar{x} \pm s$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs free ART

制剂组之间亦未表现出明显差异。随着给药浓度的增加,对细胞的抑制作用逐渐增强,当给药浓度大于 $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,游离 ART 组比脂质体制剂组表现出更强的细胞抑制作用。一方面可能是由于脂质体载体的包载,减弱了 ART 的毒性,增强了其安全性;另一方面也可能是由于溶解 ART 时加入的 DMSO 导致,随着给药浓度的增加, DMSO 的含量增加,当浓度提高至一定程度时, DMSO 对细胞的毒性则会表现出来,造成制剂对 4T1 细胞毒性进一步增加,而不仅仅是由 ART 产生细胞毒性。

结论

PEG 可以延长脂质体在体内的循环时间,改变脂质体的组织分布。本研究通过处方条件的筛选及优化,成功制备了负载青蒿素的长循环脂质体。所制备得到的长循环脂质体外观形状规整均一,理化性质稳定,体外释放具有缓释作用,体外细胞毒性实验证明了空白脂质体载体的安全性,载药脂质体制剂对 4T1 细胞的毒性具有浓度依赖性,但在较高浓度下,其毒性显著低于游离 ART,说明载药脂质体具有较高的系统安全性。

References

- [1] Trigg PI. 2-Qinghaosu (artemisinin) as an antimalarial drug [M] // Hostettmann K. Economic and Medicinal Plant Research. London: Academic Press, 1989, 3: 19–55.
- [2] Borrmann S, Szlezák N, Faucher JF, et al. Artesunate and praziquantel for the treatment of *Schistosoma haematobium* infections: a double-blind, randomized, placebo-controlled study [J]. J Infect Dis, 2001, 184: 1363–1366.
- [3] Romero MR, Efferth T, Serrano MA, et al. Effect of artemisinin/artesunate as inhibitors of hepatitis B virus production in an "in vitro" replicative system [J]. Antiviral Res, 2005, 68: 75–83.
- [4] Efferth T, Dunstan H, Sauerbrey A, et al. The anti-malarial artesunate is also active against cancer [J]. Int J Oncol, 2001, 18: 767–773.
- [5] Singh NP, Lai H. Selective toxicity of dihydroartemisinin and holotransferrin toward human breast cancer cells [J]. Life Sci, 2001, 70: 49–56.
- [6] Singh NP, Lai HC. Artemisinin induces apoptosis in human cancer cells [J]. Anticancer Res, 2004, 24: 2277–2280.
- [7] Beekman AC, Woerdenbag HJ, Van Uden W, et al. Stability of artemisinin in aqueous environments: impact on its cytotoxic action to Ehrlich ascites tumour cells [J]. J Pharm Pharmacol, 1997, 49: 1254–1258.
- [8] Singh NP, Lai HC. Synergistic cytotoxicity of artemisinin and sodium butyrate on human cancer cells [J]. Anticancer Res, 2005, 25: 4325–4331.
- [9] Singla AK, Garg A, Aggarwal D. Paclitaxel and its formulations [J]. Int J Pharm, 2002, 235: 179–192.
- [10] Woodle MC, Lasic DD. Sterically stabilized liposomes [J]. Biochim Biophys Acta, 1992, 1113: 171–199.
- [11] Wu J, Zhu JB. Preparation of acyclovir liposome and study on its stability [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2003, 38: 552–554.
- [12] Fu H, Hu GL, He Q. Preparation of cell penetrating peptide TAT and cleavable PEGco-modified liposomes loaded with paclitaxel and its in vitro apoptosis assay [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2014, 49: 1054–1061.