

双硫仑纳米混悬剂的制备及体内外抗乳腺癌研究

季宇彬^{1,2#}, 刘彪^{1,2#}, 于润琪^{2,3}, 王向涛^{1,2*}

(1. 哈尔滨商业大学, 生命科学与环境科学研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076; 2. 中国医学科学院、北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193; 3. 黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: 双硫仑 (disulfiram, DSF) 是一种传统的戒酒药物, 最近研究发现其对多种癌症类型均表现出强烈的生长抑制作用, 但是水溶性差、在胃肠中不稳定及血浆半衰期短的缺点限制了其药效的发挥。本研究拟将 DSF 制备成纳米混悬剂 (DSF-NSps) 来解决此问题。采用超声条件下的反溶剂沉淀法制备 DSF-NSps, 以纳米粒的粒径、多分散性指数 (PDI)、zeta 电位和放置稳定性等为指标筛选稳定剂。采用动态光散射法测定粒径、PDI 和 zeta 电位, 透射电镜观察纳米粒形态; 通过 DSF-NSps 在不同生理介质中的粒径变化来考察 DSF-NSps 在介质中稳定性。HPLC 测定载药量, 用透析的方法测定体外药物释放, MTT 比色法测定纳米粒和游离双硫仑的体外细胞毒性, 进而用 4T1 荷瘤小鼠研究纳米粒的体内抗肿瘤药效。所有动物实验符合动物实验伦理学标准, 并获得中国医学科学院药用植物研究所实验动物伦理委员会批准。结果表明, SPC (大豆磷脂)/TPGS (生育酚琥珀酸聚乙二醇酯) 组合稳定剂为 DSF 的优良稳定剂, 药载比为 DSF-SPC-TPGS = 24:20:4 时, 制得的 DSF-NSps 粒径较小且放置较稳定, 其载药量为 $(45.36 \pm 2.09)\%$, 平均粒径为 175.0 ± 0.75 nm, PDI 为 0.24 ± 0.07 , zeta 电位为 -14.3 mV, 外观呈球形; DSF-NSps 在磷酸盐缓冲液、生理盐水、5% 葡萄糖溶液、人工肠液、人工胃液和血浆中均能稳定存在, 满足静脉注射及灌胃的要求; 体外研究显示纳米粒装载显著提高了 DSF 在水相体系中的稳定性, DSF-NSps 可缓慢释放包封的药物, 并能提高 DSF 对癌细胞的生长抑制作用 (纳米粒和游离 DSF 在 48 h 的 IC_{50} 分别为 1.07 和 $5.53 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $P < 0.01$)。在荷瘤小鼠药效实验中, DSF-NSps 显示出良好的量效关系, 高、中、低剂量的肿瘤抑制率分别为 80.22%、75.14% 和 66.10%, 均显著高于阳性药紫杉醇注射液 (55.01%, $P < 0.05$); 组织分布实验显示 DSF-NSps 主要分布在肝、脾和肿瘤。综上, 将双硫仑制备成纳米粒后有望成为一种高效的抗肿瘤药物用于乳腺癌的治疗。

关键词: 双硫仑; 乳腺癌; 纳米混悬剂; 抗癌; 药理学

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)03-0565-09

Preparation of disulfiram nanosuspensions and their anti-tumor efficacy *in vitro* and *in vivo*

Ji Yu-bin^{1,2#}, Liu Biao^{1,2#}, Yu Run-qi^{2,3}, Wang Xiang-tao^{1,2*}

(1. Research Center on Life Sciences and Environmental Sciences, Harbin University of Commerce China, Harbin 150076, China; 2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; 3. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

Abstract: Disulfiram (DSF) is a traditional anti-alcohol drug, but it was recently found that DSF has strong inhibitory effect on the growth of a variety of cancer cells. However, its clinical application is greatly limited due to its poor solubility, instability in gastrointestinal tract and short plasma half-life. In this study, DSF is fabricated into

收稿日期: 2018-09-17; 修回日期: 2018-11-05.

基金项目: 国家自然科学基金-广东联合基金资助项目 (U1401223).

#并列第一作者.

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-57833266, E-mail: xtaowang@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0857

nanosuspensions with the aim of trying to solve these problems. DSF nanosuspensions (DSF-NSps) were prepared by the anti-solvent precipitation method under ultrasonication, and the suitable stabilizer was screened according to the size, polydispersity index (PDI), and zeta potential of the resultant nanosuspensions, along with their particle size change during the storage at room temperature. The particle size, PDI, and zeta potential of DSF-NSps were determined using dynamic light scattering method, while the morphology of DSF-NSps was observed by transmission electronic microscope (TEM). The stability of DSF-NSps in media was examined according to their particle size change in different physiological media. The concentration of DSF was measured by HPLC assay. The *in vitro* drug release was evaluated on basis of dialysis. MTT assay was employed to evaluate the *in vitro* cytotoxicity of DSF-NSps against cancer cell lines. The 4T1 tumor-bearing mouse model was used to evaluate the *in vivo* therapeutic efficacy of DSF-NSps. All the animal experiments were acquired according to the Regulations for Animal Experiments and Guidelines for Ethical as defined by Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College. As a result, the combinational use of soyabean lecithin (SPC) and *D*-alpha tocopherol acid polyethylene glycol succinate (TPGS) was determined to best stabilize DSF-NSps when the ratio of DSF-SPC-TPGS was 24:20:4 (weight ratio), with small particle size and good storage stability. The resultant DSF-NSps showed a regular spherical morphology and drug loading content of $(45.36 \pm 2.09) \%$, with average particle size of 175.00 ± 0.75 nm, PDI of 0.24 ± 0.07 and zeta potential of -14.3 mV. DSF-NSps displayed good particle size stability in a variety of biological media including phosphate buffer saline, normal saline, 5% glucose, artificial gastric fluid, artificial intestinal fluid and plasma, which would meet the demand of both intravenous and oral administration. The *in vitro* study demonstrated that nano-encapsulation greatly increased the stability of DSF in aqueous media, DSF-NSps exhibited sustained release of the encapsulated drug and significantly inhibited 4T1 cells compared to free DSF (IC_{50} , 1.07 vs $5.53 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $P < 0.01$). DSF-NSps showed a good dose-response relationship on the 4T1 tumor-bearing mice with the tumor inhibition rates at the three doses being 80.22%, 75.14% and 66.10%, all higher than that of paclitaxel injections (55.01%, $P < 0.05$). The *in vivo* biodistribution study displayed that DSF-NSps were mainly distributed into liver, spleen and tumor. In sum, disulfiram nanoparticles could be expected to provide an effective anti-cancer drug for the treatment of breast cancer.

Key words: disulfiram; breast cancer; nanosuspension; anti-cancer; pharmacodynamics

双硫仑 (DSF) 是二硫代氨基甲酸酯家族的成员之一, 在临床上广泛用于抗酗酒药物^[1-5]。近年来学者们通过研究发现 DSF 对许多的癌症类型均表现出强烈的细胞毒性, 包括直肠癌、黑色素瘤、脑胶质瘤、乳腺癌及前列腺癌等^[6-10]。DSF 在血液恶性肿瘤和实体瘤的抗癌作用, 已经在临床前研究中被证实^[11,12], 其作用机制涉及抑制醛脱氢酶 (ALDH) 活性、诱导细胞毒性、抑制多种蛋白酶体和 NF κ B 活性、逆转机体多药耐药性等^[13-15], 但难溶于水及其在血液中的半衰期短等特性, 限制了 DSF 抗肿瘤作用的充分发挥^[16-20]。因此, 寻找一种可以解决 DSF 溶解性的方法并能促进其向肿瘤组织分布的载药系统很有必要^[14]。

据文献报道, 双硫仑在溶液中很不稳定, 而纳米粒 (NSps) 封装对许多不稳定性药物可以保持其固态形式并与外界导致其不稳定的因素相对隔离, 从而提高其稳定性^[17,18]; 纳米混悬剂具有表观溶解度高、稳定性好和药物粒径小, 更重要的是粒径 < 200 nm 混悬剂可以通过高通透性和滞留 (EPR) 效应能够更容易在肿瘤组织中富集^[20], 因此, 纳米制剂是解决 DSF 溶解性及

稳定性的一个可行方案。国内外学者们已经尝试将 DSF 制备成纳米粒并递送到肿瘤部位癌症, Song 等^[16]利用叶酸受体靶向聚乳酸-乙交酯-聚乙二醇 (PLGA-PEG-FA) 等包裹 DSF 并递送至乳腺癌肿瘤部位, 采用反溶剂沉淀法制备纳米粒 (药物-聚合物=1:10), 对 MCF-7 细胞作用 24 h 后游离 DSF 及其 NSps 的 IC_{50} 分别为 750 和 250 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 在急性实验中, NSps 腹腔注射 $12.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 为中毒剂量临界点; 在慢性实验中, NSps 腹腔注射 $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 为无毒剂量。通过腹腔注射及尾静脉注射将 NSps 注射到动物体内发现, 尾静脉给药有效抑制肿瘤生长而腹腔注射给药对肿瘤的生长没有显著影响, 这可能与 NSps 由腹腔入血存在屏障相关; Cvek 等^[15]设计了用 mPEG-PLGA 为载体, 掺入聚己内酯 (PCL) 并采用反溶剂沉淀法制备了 DSF 纳米制剂用于乳腺癌 (4T1) 的治疗 (mPEG-PLGA-PCL-DSF = 4:5:1), 体外可有效保护 DSF 免受降解; 在荷瘤小鼠实验中, 相对于游离 DSF 对肿瘤几乎没有抑制作用, 纳米粒在 24 天内对肿瘤的抑制率达到 43.2%。除了肿瘤抑制作用不足外, 该制备方法载药量较低, 制备

方法复杂,不利于产业化。本文利用大豆卵磷脂(SPC)和生育酚琥珀酸聚乙二醇酯(TPGS)作为联合载体制备DSF纳米混悬剂(DSF-NSps)可显著提高载药量、简化制备方法,在解决DSF静脉注射给药的同时,有望能基于EPR效应提高药物在肿瘤组织中分布从而提高其体内抗肿瘤药效。

材料与方法

主要仪器 Zetasizer nano ZS型粒度仪(英国Malvern Instruments公司);JEM-1400型透射电子显微镜(日本电子株式会社);UltiMate 3000高效液相色谱仪(美国Dionex仪器公司);Tecan Infinite M1000 PRO多功能酶标仪[力臻卓越(北京)科学仪器有限公司];HSX-150型细胞培养箱(上海和呈仪器制造有限公司)。

药物和试剂 DSF(大连美仑生物技术有限公司,含量>97%,批号D1126A);TPGS(西安海斯夫生物科技有限公司,批号20151203);SPC(沈阳天峰生物制药有限公司,批号SY-SI-170401);泊洛沙姆F-68(P-188,中国西格玛有限公司,批号018K0029);mPEG₂₀₀₀-PCL₂₀₀₀(济南岱罡生物工程有限公司,批号17031606);色谱甲醇和色谱乙腈(赛默飞世尔科技有限公司);实验用水为经过纯水仪净化过的纯水;其余试剂或药品均为分析级别。

动物及细胞系 健康BALB/c小鼠,雌性,体重 20 ± 2 g,北京华阜康生物科技股份有限公司,SPF级,合格证号:11401300078017,许可证编号:SCXK(京)2017-0020。实验符合动物实验的伦理学标准,并获得中国医学科学院药用植物研究所实验动物伦理委员会批准;4T1细胞购自北京协和医学院基础医学研究所细胞中心,RPMI培养基(批号AD15805337)、青霉素和链霉素双抗(批号20180105)(美国Hyclone公司);胎牛血清(FBS,美国Gibco公司,批号1891605)。

HPLC分析DSF的色谱条件及标准曲线的建立

色谱条件 HPLC色谱柱选择C18反向色谱柱(Venusil XBP C18, 250 mm×4.6 mm, 5 μm),检测波长210 nm,流动相为乙腈-水(70:30, v/v),流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 $25 \text{ }^\circ\text{C}$,进样量 $20 \text{ } \mu\text{L}$ 。

专属性考察 称取一定量的DSF,用乙腈溶解,按照上述色谱条件进行检测,观察峰形的对称性及有无干扰峰。

标准曲线的建立 精密称取DSF 10 mg,置于25 mL量瓶中,加入适量色谱乙腈并充分溶解,用乙腈定容至25 mL,以配制 $400 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ DSF母液,取母液适量,用乙腈依次配制100、50、25、10、5、2.5、1和

$0.1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ DSF溶液,各取 $20 \text{ } \mu\text{L}$,采用高效液相色谱在210 nm处检测其峰面积,以峰面积为纵坐标,药物的质量浓度($C, \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)为横坐标建立DSF标准曲线,并计算回归方程。

准确度和精密度考察 精密称取DSF 10 mg,用乙腈溶解并配制低、中、高3个浓度的质量控制样品($1、50$ 和 $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),在0、3、6、12和24 h采用HPLC测其色谱峰(每个时间点的样品新鲜配制且每个浓度平行3份),得日内精密度;每日新鲜配制3个浓度质控样品,连续3日测定,得日间精密度。配制上述低、中、高浓度的质控样品HPLC连续测定3次,将测得的色谱峰面积代入标准曲线方程,计算DSF测定浓度,与真实浓度比较得到DSF回收率。

DSF-NSps制备和稳定剂筛选 本文拟通过反溶剂沉淀法制备纳米混悬剂,拟通过单因素考察,称取适量载体(TPGS、PEG₂₀₀₀-PCL₂₀₀₀)与DSF共同溶于丙酮中,在室温、250 W超声的条件下,将混合有机溶液滴注到去离子水中,在 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 下减压旋转蒸发除去有机溶剂得DSF-NSps。以P-188为载体时,将P-188溶解到水相,DSF适量溶于丙酮中;以SPC为载体时,将SPC溶于乙醇,DSF溶于丙酮,混匀后作为有机相;以SPC和TPGS为联合载体时,将SPC溶于乙醇,TPGS和DSF溶于丙酮,两者混匀作为有机相。以DSF-NSps粒径大小及多分散指数(PDI)为主要考察指标,筛选不同的药载比来优化配方。

DSF-NSps粒径和形态 选择动态光散射法测定其在 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 下平均粒度、zeta电位和PDI。以DSF含量计,将DSF-NSps用去离子水稀释到 $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。取 $5 \text{ } \mu\text{L}$ 滴加到300目铜网上,室温静置5 min,滤纸吸干多余样品,室温放置10 min,滴加 $6.0 \text{ } \mu\text{L}$ 乙酸铀染色90 s,室温自然晾干,透射电镜下加速电压为120 kV观察纳米粒子的形态和大小。

载药量考察 将DSF-NSps冻干,取冻干粉末 5 mg (W)于量瓶中,乙腈溶解并定容至 100 mL (V), $13\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心20 min,取上清液 $200 \text{ } \mu\text{L}$,采用HPLC测定DSF质量浓度(C),平行3次实验。根据以下等式计算DSF-NSps的载药量(DLC): $\text{DLC}(\%) = V \times C / W \times 100\%$

体外释放

DSF-NSps体外释放 将NSps($2 \text{ mL}, 2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)密封在透析袋(MWCO: 8 000~14 000)中,浸入含有1% Tween 80的磷酸盐缓冲液(PBS, $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4) 50 mL 中, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 连续搅拌,在0.5、1、2、4、6、8、10、12、24、48、72、96、120和144 h时间点取释放外液 1 mL ,并补充相同体积的新鲜释放介质,每

24 h 更换 1 次释放外液。根据释放外液中 DSF 的增加计算 NSPs 的累积释放, 平行 3 份实验。

双硫仑混悬液体外释放 精密称取 DSF 10 mg, 在超声辅助下均匀分散在 0.4% 羧甲基纤维素钠 10 mL 中, 以制备双硫仑混悬液, 用 HPLC 测定实际浓度, 并采用上述方法测定双硫仑混悬液的累积释放, 平行 3 份实验。

DSF-NSPs 在生理介质中的粒径稳定性的考察 配制浓度为 1.8% NaCl、10% 葡萄糖、2 倍浓度 (2×) PBS, 将 DSF-NSPs 分别与上述生理介质等体积混合, 37 °C 孵育, 在 0、2、4、6 和 8 h 取样测定其粒径变化 (平行 3 份实验)。

DSF-NSPs 在人工胃肠及血浆中稳定性考察 取 DSF-NSPs (1 mg·mL⁻¹) 分别与人工胃液、人工肠液、血浆 (1:4, v/v) 混匀, 37 °C 孵育, 于 0、2、4、6 和 8 h 取样观察, 测粒径及 PDI 变化 (平行 3 份实验)。

纳米粒装载对双硫仑体外降解的影响

纯水中的降解曲线 取 DSF 10 mg 溶于 200 μL DMSO 溶液中, 用水稀释至 10 mL, 取 50 μL 加入甲醇 950 μL, 13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 分离上清, 取 200 μL, 采用 HPLC 测定原始浓度。剩余混悬液在 37 °C、100 r·min⁻¹ 连续搅拌, 在 0、6、24、48、72 和 96 h 取样, 同上处理, 用 HPLC 测量 DSF 浓度, 与初始 DSF 浓度对比计算 DSF 剩余百分比, 对相应的时间作图, 绘制 DSF 在纯水中的降解曲线。以纯水为分散介质配制 1 mg·mL⁻¹ DSF-NSPs, 同法绘制 DSF-NSPs 在纯水中的降解曲线 (平行 3 份实验)。

含 10% 胎牛血清的 PBS 中降解曲线 取 DSF 10 mg 溶于 200 μL DMSO 溶液中, 用 PBS 稀释至 10 mL, 同上处理, 采用 HPLC 测量 DSF 原始浓度和不同时间点浓度, 绘制 DSF 在 10% 胎牛血清的降解曲线。以含 10% 胎牛血清的 PBS 配制 1 mg·mL⁻¹ DSF-NSPs, 同法绘制 DSF-NSPs 在 10% 胎牛血清中的降解曲线 (平行 3 份实验)。

DSF-NSPs 体外细胞毒性实验 将 4T1 细胞培养至对数期, 制备单细胞悬液, 按细胞数 1×10⁴ 个/孔 (150 μL) 接种于 96 孔细胞培养板中, 置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养过夜, 倒置显微镜下观察到细胞贴壁后, 弃上清, 分别加入 150 μL DSF 质量浓度为 100、50、25、10、5、1、0.1、0.05 和 0.01 μg·mL⁻¹ 的 DSF-NSPs 和游离药物 (用不完全培养基稀释而成), 放入培养箱培养 48 h, 每孔加入 5 mg·mL⁻¹ MTT 20 μL, 37 °C、5% CO₂ 继续孵育 4 h, 终止培养, 弃上清, 每孔加 DMSO 200 μL, 振荡, 使用酶标仪在 570 nm 吸收波长处测定其吸光度值 (A), 计算其 IC₅₀ 值并计算抑制率

(IR): $IR(\%) = (1 - A_{\text{给药组}}/A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

DSF-NSPs 体内乳腺癌药效研究 每只小鼠右侧腋窝皮下接种 4T1 乳腺癌瘤细胞悬液 0.2 mL (含 8.0×10⁵ 个细胞)。肿瘤生长至瘤体体积大约为 100 mm³ 时, 筛选出肿瘤大小相对一致的小鼠, 随机分成 8 组: ① 生理盐水阴性对照 (0.2 mL, iv); ② PTX 阳性对照 (8 mg·kg⁻¹, iv); ③ 空白纳米粒组 (Blank-NSPs, iv); ④ DSF 混悬液 (0.4% CMC 20 mg·kg⁻¹, ig); ⑤ DSF-NSPs 组 (20 mg·kg⁻¹, ig); ⑥ DSF-NSPs 组 (20 mg·kg⁻¹, iv); ⑦ DSF-NSPs 组 (10 mg·kg⁻¹, iv); ⑧ DSF-NSPs 组 (5 mg·kg⁻¹, iv)。每组 8 只小鼠, 静脉注射每两天尾静脉给药 1 次, 口服给药的每日给药, 连续给药 2 周。每日观察并记录各组小鼠的行为状态, 隔日用电子秤称量小鼠体重并用电子游标卡尺测量肿瘤长 (L) 和宽 (W), 计算瘤体积 (V)。停药后, 脱颈椎处死小鼠, 完整剥离腋窝皮下瘤体, 按公式计算抑瘤率 (IR):

$$V = L \times W^2 / 2$$

$$IR(\%) = [(V_{\text{对照组}} - V_{\text{给药组}}) / V_{\text{对照组}}] \times 100\%$$

静脉注射组组织分布实验 DSF 中掺入少量近红外荧光探针 Dir (药物与 Dir 质量重量比 40:1), 按照 DSF-NSPs 制备方法制备荧光标记的 DSF-NSPs, 在上述抗乳腺癌药效研究中高剂量 DSF-NSPs 组最后一次给予荧光标记的 DSF-NSPs (20 mg·kg⁻¹, iv)。给药 24 h 后处死小鼠, 取出心、肝、脾、肺、肾和肿瘤, 用小动物活体成像仪 (IVIS Spectrum CT) 进行拍照成像, 分析 DSF-NSPs 荧光物质在组织中的分布。

统计学方法 使用 IBM SPSS Statistics 软件版本 19 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) 的单因素方差分析进行实验组间的统计分析, $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

结果

1 DSF 体外 HPLC 条件的建立

1.1 专属性 由图 1 可见, DSF 保留时间为 11.773 min 且峰形良好、对称, 无其他杂质峰的干扰, 专属性良好, 满足色谱测定要求。

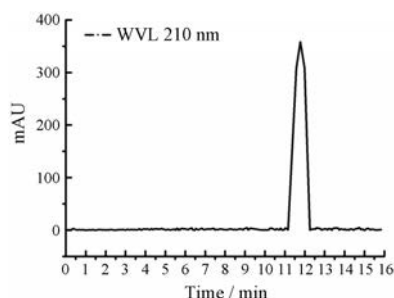


Figure 1 HPLC chromatogram of disulfiram (DSF)

1.2 标准曲线建立 以标准溶液色谱峰面积为纵坐标, 浓度为横坐标进行线性回归, 得到标准回归曲线方程为 $y = 0.7282x + 0.1456$ ($R^2 = 0.9999$), 线性范围为 $0.1 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.3 准确度与精密度考察 3个质量浓度 ($1, 50$ 和 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 回收率分别为 99.60% 、 99.87% 和 99.44% , 对应的 RSD 值分别为 1.35% 、 1.56% 和 0.92% , 平均回收率为 99.64% , 在 $95\% \sim 105\%$ 之间, 符合体内外测定要求。

2 稳定剂筛选

以 TPGS、SPC、P-188、PEG₂₀₀₀-PCL₂₀₀₀ 和 SPC/TPGS 为载体制备 DSF-NSps, 结果发现 (表 1), 以 P-188、PEG₂₀₀₀-PCL₂₀₀₀ 为稳定剂时, 制备过程中出现不可逆的白色絮状沉淀; 以 TPGS 为稳定剂制备的纳米粒放置过夜后析出不可逆的白色沉淀; 而以卵磷脂 SPC 为稳定剂时, 在 1:2 和 1:1 两个药载比下均可制备得到 DSF-NSps, 以 1:1 时制备的纳米粒最小, 但提高药载比至 2:1 时, 未能制备成纳米混悬剂。单独以 SPC 为稳定剂制备的 DSF-NSps, 在体内没有长循环作用, 故考虑以 SPC/TPGS 为联合稳定剂, 以赋予其长循环效应。如表 1 所示, 当 DSF:SPC:TPGS = 24:20:4 (重量比) 时, 粒径较小, PDI 也较为合适, 故选择该比例作为 DSF-NSps 的处方用于后续的研究。

Table 1 The size, polydispersity index (PDI) and zeta potential of the resultant DSF nanosuspensions (DSF-NSps) at different ratio with the final drug concentration of $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. SPC: Soybean lecithin; TPGS: *D*-Alpha tocopherol acid polyethylene glycol succinate. - Not prepared as a nanosuspension; *Irreversible white precipitate produced after overnight

Drug:stabilizer	Ratio	Size/nm	PDI	Zeta/mV
DSF:SPC	1:2	219.7 ± 5.68	0.212 ± 0.02	-22.1
	1:1	155.5 ± 5.17	0.212 ± 0.02	-17.8
	2:1	-	-	-
DSF:TPGS*	1:1	159.1 ± 1.18	0.130 ± 0.02	-25.3
DSF:SPC:TPGS	1:1:1	-	-	-
	24:24:4	349.2 ± 6.36	0.385 ± 0.08	-15.5
	24:20:4	175.0 ± 0.75	0.235 ± 0.07	-14.6

3 DSF-NSps 制备及载药量

按照上述筛选的处方制备 DSF-NSps, 粒径为 $175.0 \pm 0.75 \text{ nm}$, PDI 为 0.235 ± 0.07 , 电位为 -14.6 mV , 粒径分布见图 2。HPLC 测得 DSF-NSps 载药量为 $(45.36 \pm 2.09)\%$, 低于理论载药量 50% , 主要原因可能是因为转移过程中药物附着而部分损失。

4 DSF-NSps 形态

透射电镜下 DSF-NSps 大体上为球形且分布均匀,

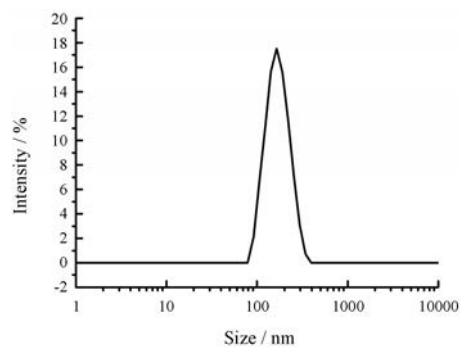


Figure 2 Particle size and distribution of DSF-NSps

目测粒径约为 100 nm 左右 (图 3), 小于动态光散射法测定的粒径。这主要是动态光散射测定是 DSF-NSps 在以水为分散介质中的等效粒径, 是在湿态、具有水化层时的粒径; 而透射电镜下看到的是纳米粒在干态失去水化层后的粒径。

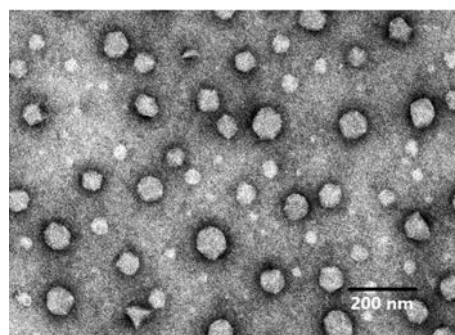


Figure 3 Transmission electron microscope images of DSF-NSps

5 DSF-NSps 在生理介质中稳定性

生理介质中粒径稳定性考察 (图 4) 结果显示, DSF-NSps 在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 与生理盐水、 5% 葡萄糖、PBS、人工胃液、人工肠液和血浆中孵育 8 h 均表现出粒径显著增大, PDI 较为稳定, 不会与血浆成分 (包括酶和血清白蛋白) 相互作用产生聚集现象, 说明 DSF-NSps 可以调制成等渗溶液, 满足静脉注射及口服灌胃给药的要求,

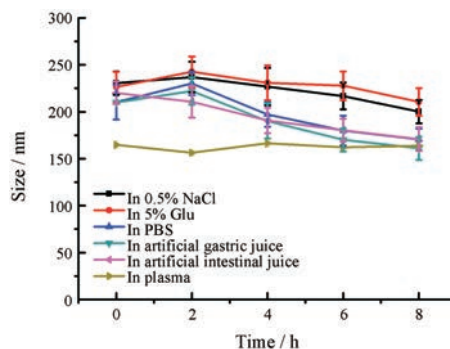


Figure 4 Particle size change of DSF-NSps in 0.9% NaCl, 5% glucose (Glu), phosphate buffer saline (PBS), artificial gastric juice, artificial intestinal fluid and plasma at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

为进一步体内研究奠定基础。

6 纳米包封对 DSF 降解影响

由图 5A 可知, 游离 DSF 在水中快速降解, 6 h 后仅剩余 45%, 48 h 后剩余不到 25%, 而 DSF-NSPs 能显著减少药物的降解, 48 h 时超过 70% DSF 仍然存在; 在含 10% FBS 的 PBS 溶液中 (图 5B), 游离 DSF 6 h 后剩余 43%, 48 h 后剩余不到 20%, 而 DSF-NSPs 在 24 h 时仍有 70% DSF, 24 h 后 DSF-NSPs 发生明显降解。综上, DSF-NSPs 在 37 °C 水溶液中 48 h 内保持相对稳定; 在近生理条件 (含 10% FBS 的 PBS 和 37 °C) 下, 24 h 内保持相对稳定。

7 DSF-NSPs 体外释放

由图 6 可知, DSF-NSPs 在 24 h 内呈相对快速释放, 累积药物释放达约 25%, 之后释放趋缓慢, 在 168 h 累计释放 (43.99 ± 3.35)%。从体外释放曲线看, DSF-NSPs 7 天释放不到 50%, 其主要原因可能是释放到介质中 DSF 发生降解, 导致实测的药物量较释放出来的药物量减少, 见图 5A。DSF 混悬液 (0.4% CMC) 释放缓慢, 在 24 h 累计药物释放约 13.61%, 168 h 累计释放仅为 (15.76 ± 2.48)%, 释放率低的主要原因是 DSF 溶解度低, 混悬液颗粒大、溶出低, 同时释放到介质中的 DSF 也易发生降解。

8 DSF-NSPs 细胞毒性实验

如图 7 所示, 无论是游离 DSF 还是 DSF-NSPs,

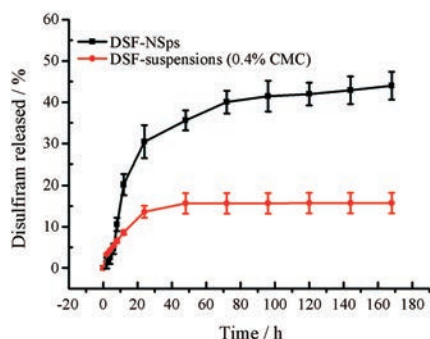


Figure 6 Cumulative DSF release from DSF-NSPs and DSF suspensions (0.4% CMC) at 37 °C with in 168 h ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

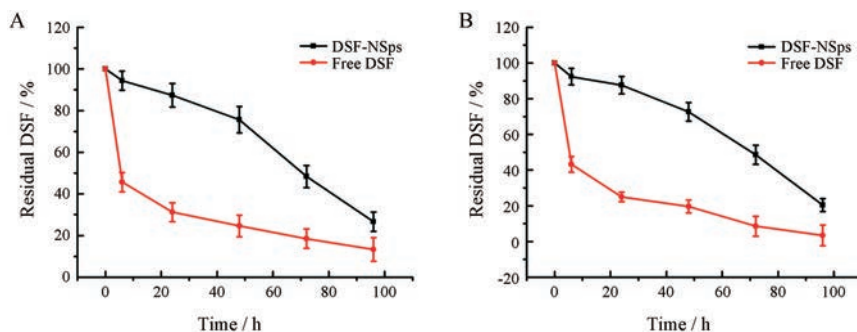


Figure 5 Residual DSF of free DSF and DSF-NSPs in distilled water (A) and in PBS containing 10% fetal bovine serum (FBS) at 37 °C (B) ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

对 4T1 细胞的生长抑制都具有剂量依赖关系。但在所有的浓度点, DSF-NSPs 的生长抑制作用都非常显著地高于游离 DSF ($P < 0.01$), DSF-NSPs 和 DSF 的 DMSO 溶液对 4T1 细胞在 48 h 的 IC_{50} 分别为 1.069 和 5.526 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 组间差异显著 ($P < 0.01$)。说明 DSF-NSPs 提高了 DSF 的体外抗肿瘤作用, 这既有纳米粒包封的保护作用减少 DSF-NSPs 中 DSF 降解, 也有载药纳米粒提高细胞对药物摄取的作用。

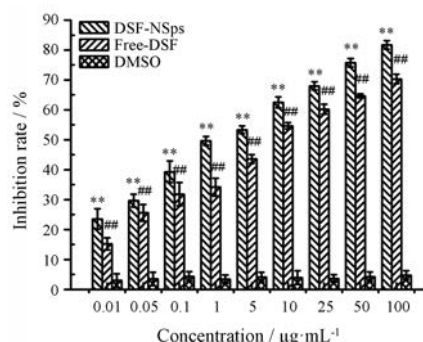


Figure 7 Proliferation inhibition of DSF-NSPs against 4T1 cells after 48 h of incubation. $n = 3, \bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs free DSF, ### $P < 0.01$ vs dimethyl sulfoxide (DMSO)

9 DSF-NSPs 体内抗肿瘤研究

以紫杉醇注射液 ($8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, iv) 为阳性对照, 生理盐水作为阴性对照, 实验中各组荷瘤鼠的肿瘤体积随时间变化曲线见图 8A, 小鼠体重随时间变化曲线如图 8B 所示, 实验结束时各组小鼠肿瘤情况见图 9。生理盐水组肿瘤体积迅速增加, 两周后达到 2500 mm^3 , DSF 物理混悬液几乎没有观察到抗肿瘤作用 (图 8A)。然而, DSF-NSPs 无论静脉注射还是口服给药均表现出显著肿瘤生长抑制作用 ($P < 0.05$)。口服给药组 ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 肿瘤抑制率均与紫杉醇注射液组 ($8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 无显著差异 (59.03% 与 55.01%), DSF-NSPs 静脉注射高、中、低剂量组肿瘤抑制率 (80%、75.86%、69.21%) 均与紫杉醇注射液 (55.01%) 相比具有显著性差异 ($P <$

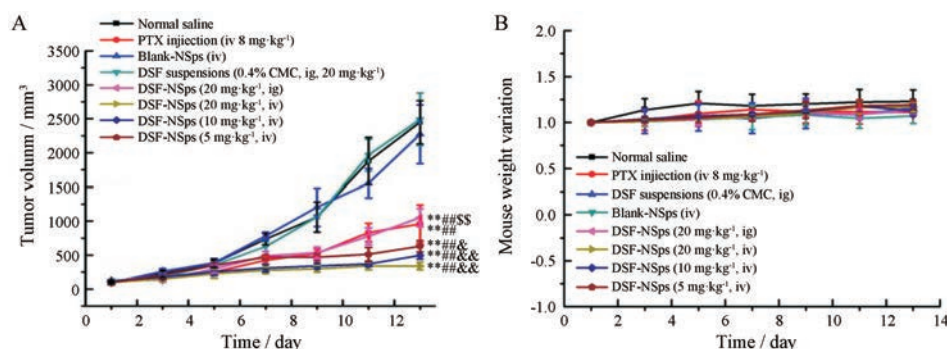


Figure 8 The *in vivo* anti-tumor study on 4T1-bearing mice. A: Change of tumor volume of 4T1 tumor-bearing mice with time; B: Change of relative body weight of 4T1 tumor-bearing mice with time. PTX: Paclitaxel. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs NaCl solution group; # $P < 0.01$ vs blank group; $^{SS}P < 0.01$ vs DSF suspensions group; $^{\&}P < 0.05$, $^{\&\&}P < 0.01$ vs PTX group

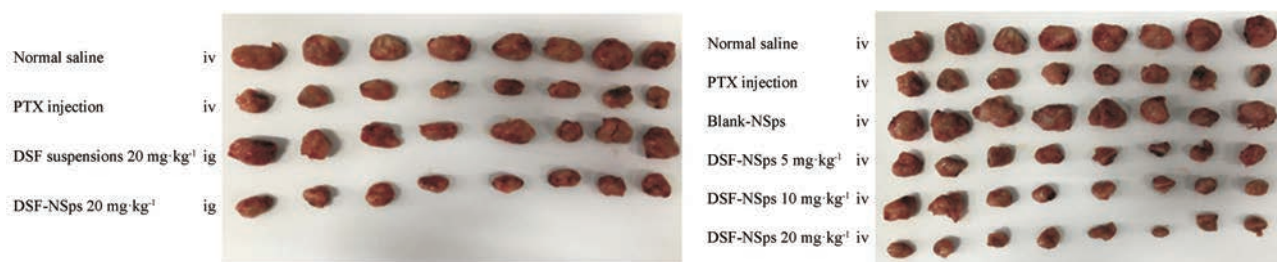


Figure 9 Tumor images of 4T1 tumor-bearing mice ($n = 8$, $\bar{x} \pm s$)

0.05), 并具有良好的量效关系。从体重随时间变化曲线可知, 各组小鼠平均体重比较稳定, 并略有上升。

10 DSF-NSps体内组织分布

荷瘤小鼠静脉注射荧光标记 DSF-NSps (20 mg·kg⁻¹) 后组织分布情况如图 10。给药 24 h 后, DSF-NSps 在各组织中的浓度由高到低顺次为: 肝>脾>肿瘤>肾>心, 可以看出 NSps 在小鼠体内主要集中在肝、脾和肿瘤。肿瘤/肝的荧光强度比值为 (20.28±4.37)%, 说明 NSps 具有一定的被动靶向特性, 可以通过 EPR 效应到达肿瘤部位。



Figure 10 The distribution of Dir solution, Dir/DSF-NSps in the major organs of tumor-bearing mice at the end of the experiment (24 h) *in vivo*, fluorescent imaging of tumor part and other vital organs (from left to right: tumor, heart, liver, spleen, lung, kidney) ($n = 5$, $\bar{x} \pm s$)

讨论

本文制备的 DSF-NSps 粒径为 175.0 ± 0.75 nm, 可通过 EPR 效应将药物递送至肿瘤部位^[20]; 稳定性研究表明, DSF-NSps 在人工胃液、人工肠液及生理盐水、PBS、5% 葡萄糖、血浆等生理介质或等渗注射介质中均能稳定存在。因此, 可将其调整为等渗溶液, 适用于口服和静脉给药。

DSF 在纯水和 PBS 中的溶解度非常低, 故体外释放中使用含有 1% Tween 80 的 PBS (0.01 mol·L⁻¹, pH 7.4) 作为释放介质, DSF-NSps 持续释放 7 天, 是一种典型的持续和长时间的药物释放体系, 这与 DSF 的低溶解度有关, 也与药物扩散和基质侵蚀机制有关^[21,22]。DSF 在水相中不稳定, 容易降解成二乙基二硫代氨基甲酸 (diethyldithiocarbamic acid, DDC), 进一步降解成二硫化碳和乙胺^[23]。而作为对照的 DSF 物理混悬液累计释放较低, 其原因首先是因为 DSF 溶解度低, 原料药混悬液颗粒大、溶出低、释放慢, 同时释放出来的 DSF 又很快发生降解。这也部分解释了为什么药理学研究中, DSF 物理混悬液几乎没有表现出抗肿瘤作用。DSF 物理混悬液口服没有抗肿瘤效果, 与 DSF 口服戒酒并不冲突, 因为发挥戒酒作用的, 并非 DSF 原性药物, 而是其在体内的代谢产物^[24,25]。

由于纳米包封的保护作用, 制备的纳米混悬剂显著降低 DSF 的降解, 这不仅利于 DSF-NSps 在胃肠道

中的稳定性,也易于被肠微绒毛所滞留^[26],使得从 DSF-NSPs 中释放出来的 DSF 能较快被吸收入血,减少了被降解的机会。除了有游离的 DSF 形式被吸收入血,部分 DSF-NSPs 还可通过派氏结或经由淋巴系统入血。这些可能是每天口服 DSF-NSPs (20 mg·kg⁻¹) 与隔天注射紫杉醇注射液具有相似抑瘤率的原因。研究结果显示,DSF-NSPs 可能是 DSF 发挥抗肿瘤作用有前景的制剂形式,亟待对其进行更系统、深入的研究,以便其高效、安全地惠及肿瘤患者。

结论

DSF-NSPs 与市场上的抗肿瘤药物相比,具有市场价格低、疗效好、耐受性高和安全性高等优点,具有巨大市场潜力。本研究为 DSF 进一步研究和临床应用奠定了基础。

References

- [1] Cong J, Wang YY, Zhang X, et al. A novel chemoradiation targeting stem and nonstem pancreatic cancer cells by repurposing disulfiram [J]. *Cancer Lett*, 2017, 409: 9-19.
- [2] Fasehee H, Ghavamzadeh A, Alimoghaddam K, et al. A comparative cytotoxic evaluation of disulfiram encapsulated PLGA nanoparticles on MCF-7 cells [J]. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*, 2017, 11: 102-107.
- [3] Wang ZP, Tan J, McConville C, et al. Poly lactic-co-glycolic acid controlled delivery of disulfiram to target liver cancer stem-like cells [J]. *Nanomedicine*, 2017, 13: 641-657.
- [4] Najlah M, Ahmed Z, Iqbal M, et al. Development and characterisation of disulfiram-loaded PLGA nanoparticles for the treatment of non-small cell lung cancer [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2016, 12: 10-15.
- [5] Fasehee H, Dinarvand R, Ghavamzadeh A, et al. Delivery of disulfiram into breast cancer cells using folate-receptor-targeted PLGA-PEG nanoparticles: *in vitro* and *in vivo* investigations [J]. *J Nanobiotechnol*, 2016, 14: 32.
- [6] Morrison BW, Doudican NA, Patel KR, et al. Disulfiram induces copper-dependent stimulation of reactive oxygen species and activation of the extrinsic apoptotic pathway in melanoma [J]. *Melanoma Res*, 2010, 20: 11-20.
- [7] Zhou XZ, Lei T, Miao LL, et al. Disulfiram-loaded mixed nanoparticles with high drug-loading and plasma stability by reducing the core crystallinity for intravenous delivery [J]. *J Colloid Interf Sci*, 2018, 529: 34-43.
- [8] Liu P, Brown S, Goktug T, et al. Cytotoxic effect of disulfiram/copper on human glioblastoma cell lines and ALDH-positive cancer-stem-like cells [J]. *Br J Cancer*, 2012, 107: 1488-1497.
- [9] Cheriyan VT, Wang Y, Muthu M, et al. Disulfiram suppresses growth of the malignant pleural mesothelioma cells in part by inducing apoptosis [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e93711.
- [10] Liu P, Kumar IS, Brown S, et al. Disulfiram targets cancer stem-like cells and reverses resistance and cross-resistance in acquired paclitaxel-resistant triple-negative breast cancer cells [J]. *Br J Cancer*, 2013, 109: 1876-1885.
- [11] Robinson T, Pai M, Liu J, et al. High-throughput screen identifies disulfiram as a potential therapeutic for triple-negative breast cancer cells: interaction with IQ motif-containing factors [J]. *Cell Cycle*, 2013, 12: 3013-3024.
- [12] Lin MH, Moses DC, Hsieh CH, et al. Disulfiram can inhibit MERS and SARS coronavirus papain-like proteases *via* different modes [J]. *Antiviral Res*, 2018, 150: 155.
- [13] Yang H, Zonder JA, Dou QP. Clinical development of novel proteasome inhibition for cancer treatment [J]. *Expert Opin Investig Drug*, 2009, 18: 957-971.
- [14] Wang W, Xi M, Duan X, et al. Delivery of baicalein and paclitaxel using self-assembled nanoparticles: synergistic anti-tumor effect *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int J Nanomedicine*, 2015, 10: 3737-3750.
- [15] Cvek B. Cytotoxic effect of disulfiram / copper on human glioblastoma cell lines and ALDH-positive cancer-stem-like cells [J]. *Br J Cancer*, 2013, 108: 993.
- [16] Song W, Tang Z, Lei T, et al. Stable loading and delivery of disulfiram with mPEG-PLGA / PCL mixed nanoparticles for tumor therapy [J]. *Nanomedicine*, 2016, 12: 377-386.
- [17] Fasehee H, Zarrinrad G, Tavangar SM, et al. The inhibitory effect of disulfiram encapsulated PLGA NSPs on tumor growth: different administration routes [J]. *Mater Sci Eng C*, 2016, 63: 587-595.
- [18] Abu-Serie MM, El-Rashidy FH. *In vitro* collapsing colon cancer cells by selectivity of disulfiram-loaded charge switchable nanoparticles against cancer stem cells [J]. *Recent Pat Anti-cancer Drug Discov*, 2017, 12: 260-271.
- [19] Hoda M, Pajaniradje S, Shakya G, et al. Anti-proliferative and apoptosis-triggering potential of disulfiram and disulfiram-loaded polysorbate 80-stabilized PLGA nanoparticles on hepatocellular carcinoma Hep3B cell line [J]. *Nanomedicine*, 2016, 12: 1641-1650.
- [20] Zhang L, Tian B, Li Y, et al. A copper-mediated disulfiram-loaded pH-triggered PEG-shedding TAT peptide-modified lipid nanocapsules for use in tumor therapy [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7: 25147-25161.
- [21] Duan X, Xiao J, Yin Q, et al. Multi-targeted inhibition of tumor growth and lung metastasis by redox-sensitive shell crosslinked micelles loading disulfiram [J]. *Nanotechnology*, 2014, 25: 125102.
- [22] Dinarvand R, Sepehri N, Manoochehri S, et al. Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer

- agents [J]. *Int J Nanomed*, 2011, 5: 877-895.
- [23] Li HL, He YX, Gao QH, et al. Folate-polyethylene glycol conjugated carboxymethyl chitosan for tumor-targeted delivery of 5-fluorouracil [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9: 786-792.
- [24] Ma BJ, Hou PY, Zeng Y, et al. Determination of related substances in disulfiram bulk drug by HPLC and investigation of its stability [J]. *West China J Pharm Sci (华西药科学杂志)*, 2015, 30: 94-96.
- [25] Conticello C, Martinetti D, Adamo L, et al. Disulfiram, an old drug with new potential therapeutic uses for human hematological malignancies [J]. *Int J Cancer*, 2012, 131: 2197-2203.
- [26] Ji YB, Nie FR, Zhou XX, et al. Preparation of gambogic acid nanosuspensions and their anti-tumor efficacy [J]. *Acta Pharm Sin (药科学报)*, 2018, 53: 453-459.