

三氧化二砷白蛋白微球的理化特性及抗肿瘤活性检测

陈华江^{1*}, 钟延强², 贾连顺¹, 肖建如¹

(1. 第二军医大学长征医院骨科, 上海 200003; 2. 第二军医大学药学院药剂学教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的:**制备三氧化二砷(As_2O_3)白蛋白微球并鉴定其理化特性及抗肿瘤活性。**方法:**通过乳化热固化法制备(As_2O_3)白蛋白微球,应用电镜、微球稳定性实验及体外动力缓释实验等测定其理化特性和释放特性,并以 MTT 法测定缓释液对骨肉瘤细胞株 U-2 OS、人肺癌细胞株(SPC-A-1)增殖的抑制能力。**结果:** As_2O_3 微球粒径集中在 56.4~256.7 μm ,平均(156 ± 3.56) μm 。微球含量为(55.22 ± 11.19)%。 As_2O_3 微球半数释放时间为 23.34 h。 As_2O_3 微球缓释液表现出对 U-2 OS 及 SPC-A-1 较强的抑瘤活性。**结论:**经检测乳化热固化法制备出的 As_2O_3 白蛋白微球,具有较好的理化、缓释特性及抑瘤能力。

[关键词] 三氧化二砷;蛋白微球;理化特性

[中图分类号] R 979.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)06-0644-03

Physicochemical property and *in vitro* antitumor activity of arsenic trioxide albumin microspheres

CHEN Hua-jiang^{1*}, ZHONG Yan-qiang², JIA Lian-shun¹, XIAO Jian-ru¹ (1. Department of Orthopedics, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

[ABSTRACT] **Objective:** To prepare arsenic trioxide (As_2O_3) albumin microspheres and to analyze their physicochemical properties and *in vitro* antitumor activities. **Methods:** As_2O_3 albumin microspheres were prepared by emulsification-heat solidification. Physicochemical and the slow-release properties of the microspheres were identified by the electron microscope, thermal stabilization analysis and dynamic dialysis system *in vitro*. MTT method was used to evaluate the inhibitory effect of the released fluid on human osteosarcoma cell line U-2 OS cells and human lung adenocarcinoma cell line SPC-A-1 cells. **Results:** The mean diameter of the microspheres was (156 ± 3.56) μm (ranging 56.4-256.7 μm), with the As_2O_3 content being (55.22 ± 11.19)% and $t^{1/2}$ of release time being 23.34 h. The slowly released fluid showed a significant inhibitory effect on U-2 OS and SPC-A-1 cells. **Conclusion:** As_2O_3 albumin microspheres prepared in the present study have satisfactory physicochemical, slow-releasing, and tumor-inhibition properties.

[KEY WORDS] arsenic trioxide;albumin microsphere;physicochemical property

[Acad J Sec Mil Med Univ,2007,28(6):644-646]

三氧化二砷(As_2O_3)用于治疗肿瘤具有悠久的历史。近年来由于 As_2O_3 在急性早幼粒白血病治疗中的显著疗效使这一老药重获新生。目前研究表明 As_2O_3 具有极为广泛的抗癌谱,不仅对白血病细胞具有极好的抑制作用,同时对于众多的实体肿瘤也有很好的抑瘤作用,其中包括肺癌、消化道肿瘤、卵巢癌、骨髓瘤和骨肉瘤等^[1-3]。目前的研究多集中于 As_2O_3 的全身用药,对于其局部用药的研究相对较少。研究证实,肿瘤局部化疗具有在局部获得相对于全身用药更高的药物浓度、减少全身用药达到该浓度所产生的多系统损害、直接作用于局部肿瘤细胞等优点。

本实验拟构建 As_2O_3 白蛋白微球,并考察其理化性能及抑瘤作用,为后期应用于骨及软组织肿瘤的局部化疗作前期准备。

1 材料和方法

1.1 实验原料器材 实验原料: As_2O_3 白蛋白微球(制备参照文献^[4]),乙醚(分析纯)。人骨肉瘤细胞株 U-2 OS 及人肺癌细胞株 SPC-A-1 均购自中国科学院上海细胞生物研究所细胞库。

实验器材: AFS-230 原子荧光光度计(北京海光仪器有限公司),紫外吸收分光光度计(日本日立公司),S-2460 扫描电子显微镜(Hitachi 公司),HPIAs-1000 高清晰度彩色病理图文分析系统,ZRD6-B 型药物溶出度仪(上海黄海药检仪器厂),

[基金项目] 国家自然科学基金(30400452). Supported by National Natural Science Foundation of China(30400452).

[作者简介] 陈华江,博士,讲师、主治医师。

* Corresponding author. E-mail: spine.chen@163.com

细胞孵箱(Hereaus),高速低温离心机(Beckman),酶联免疫检测仪(Biolisa)。

1.2 As₂O₃ 白蛋白微球制备 参照文献^[4]将 As₂O₃ 100 mg与 250 mg 人血清白蛋白溶于 1 ml 的 0.15 mol·L⁻¹ NaCl 溶液中,运用乳化热固化法,制备并干燥得淡黄色 As₂O₃ 白蛋白微球。封入安瓿,暗处低温保存。

1.3 As₂O₃ 微球含量测定 参照微球消解法测定 As₂O₃ 微球含量。精确称量 As₂O₃ 微球各 300 mg,分成 3 组。每组含 As₂O₃ 微球 100 mg 加入试管中,以 0.3%胃蛋白酶溶液 50 ml,恒温 37℃,消解 3 h,待溶液澄清后,加水稀释至 200 ml,以原子荧光分光光度计法测量其中 As₂O₃ 浓度^[5]:

$$\text{As}_2\text{O}_3 \text{ 微球含量} = \frac{\text{As}_2\text{O}_3 \text{ 含量}}{100 \text{ mg}} \times 100\%$$

1.4 微球粒径 随机选取 As₂O₃ 微球,分成 3 组,以扫描电子显微镜分析。每组在扫描电镜下选取 3 个视野,以 HPIAs-1000 高清晰度彩色病理图文分析系统测量任意 100 个微球粒径,取其平均值并确定粒径范围。

1.5 微球稳定性实验(光照稳定性试验) 精确称量 As₂O₃ 白蛋白微球 10 mg 以上述微球消解法进行 As₂O₃ 含量测定,设为对照组。另称量 As₂O₃ 白蛋白微球 30 mg,分成 3 组封入安瓿中设为实验组,置 2 500 lx 不变光下分别照射 5 d 和 10 d 及 37℃ 避光保存 3 个月后,测定 As₂O₃ 含量。每组设 3 个平行实验。

1.6 微球体外释放特性实验 配制模拟体液^[7]: 8 g NaCl、0.2 g KCl、1.44 g Na₂ HPO₄、0.24 g KH₂PO₄,溶于 800 ml 水中,经 pH 计检测、盐酸稀释,并以 pH 计调至 7.4 处,定容至 1 000 ml。

参照动态膜透析法^[6],称取 As₂O₃ 微球 10 mg 于透析袋,袋内加模拟体液 5 ml,扎紧端口中,以浸入含 495 ml 模拟体液中,恒温(37±1)℃,恒速振荡 50 r/min,分别于 2、4、6、8、13、18、23、28 h 取样,取样后即补充等量的模拟体液。每天取样 1 次进行浓度测定,取样后即补充等量的模拟体液。每次取样量为 20 ml,以相等量 As₂O₃ 粉末进行直接溶出实验以作对比。按以下公式计算:

$$\text{累积缓释百分比} = \frac{\text{累计缓释量}}{\text{样本初始含量}} \times 100\%$$

1.7 细胞培养及药物诱导 骨肉瘤细胞株 U-2 OS、人肺癌细胞株 SPC-A-1 接种于含有 10% 小牛血清的 DMEM 液中,5%CO₂,37℃,饱和湿度下常规培养。细胞传代后 24 h 用血细胞计数板直接计数法精确计数细胞,用小牛血清将细胞配成 1×10³/ml 细胞浓度,接种 96 孔培养板,每孔接种 1 ml,接

种 24 h 后,进行无血清同步化 24 h 处理。将上述不同缓释时间取样的 As₂O₃ 溶液行⁶⁰Co 消毒,加入实验孔中,每组设 3 个重复孔。对照组加入相同体积的培养液。药物作用 24 h。于每孔加入浓度为 5 mg/ml 的 MTT(噻唑蓝)溶液 0.1 ml,在 BIOLISA 酶联免疫检测仪上测定每孔的 D₅₇₀ 值。抗肿瘤药物对肿瘤细胞的抑制率按下式计算:

$$\text{抑制率} = \frac{1 - \text{加药实验组 } D_{570} \text{ 值}}{\text{未加药对照组 } D_{570} \text{ 值}} \times 100\%$$

1.8 统计学处理 采用 SPSS 10.0 软件进行数据分析。

2 结 果

2.1 微球微结构分析 经电镜扫描可见微球表面光滑,圆整。经图像分析示 As₂O₃ 微球粒径集中在 56.4~256.7 μm,平均(156±13.56) μm(图 1)。

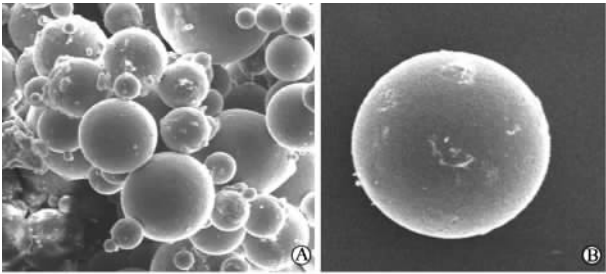


图 1 电镜下 As₂O₃ 蛋白微球
Fig 1 As₂O₃ albumin microsphere
under electron microscope (×4 000)

A:Aggregate phase; B:Single microsphere

2.2 As₂O₃ 微球含量测定及光稳定性检测 经微球消解法测定,微球含量为(55.22±11.19)%。As₂O₃ 微球封入安瓿后经 2 500 lx 不变光照射 5 d、10 d 和 37℃ 避光保存 3 个月仍有 98.7%、94.8% 和 95.5% 的药物未分解,说明 As₂O₃ 白蛋白微球对该类条件是稳定的。

2.3 As₂O₃ 微球体外释放特性实验 动态膜透析实验表明,As₂O₃ 微球释放速度明显慢于 As₂O₃ 粉剂直接释放(图 2)。而 As₂O₃ 粉剂在 4 h 内释放完。回归方程:Y=13.05 t^{1/2}-13.07(r=0.98),其中 Y 为 As₂O₃ 微球累积缓释百分比(%),t^{1/2} 为时间(h)的平方根。由此计算 As₂O₃ 微球 50% 缓释时间为 23.34 h。

2.4 细胞抑制能力测定 由图 3 可知,随着 As₂O₃ 微球缓释时间的延长,其细胞抑制率增加。结合图 2,As₂O₃ 微球随缓释时间延长而浓度逐渐上升,由此可知 As₂O₃ 随浓度上升对骨肉瘤细胞株 U-2 OS、

人肺癌细胞株 SPC-A-1 的抑制率增强。

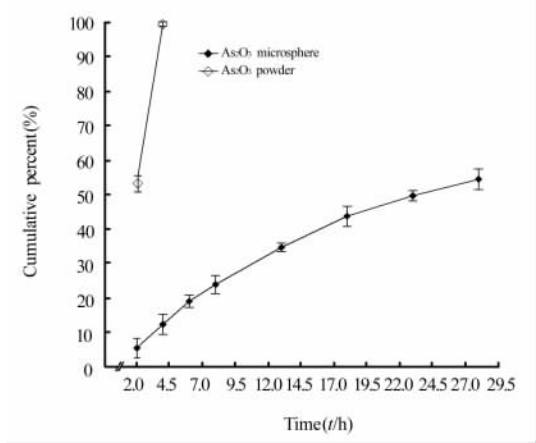


图 2 As₂O₃微球及粉末累积缓释百分比

Fig 2 Accumulative release of As₂O₃ microsphere and powder

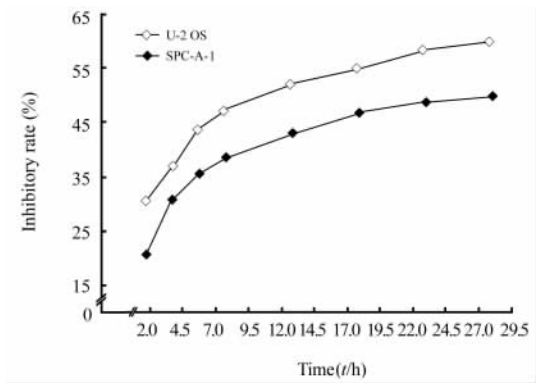


图 3 As₂O₃微球缓释液对

U-2 OS、SPC-A-1 细胞株增殖的影响

Fig 3 Influence of slow-released fluid of

As₂O₃ microsphere on U2-OS and SPC-A-1 cells lines

3 讨论

微球是一种用适宜高分子材料为载体包裹或吸附药物而制成的球形或类球形微粒,粒径一般为1~500 μm。作为微球载体一般应具有良好的生理相容性、生物降解性、较大的载药能力和良好的缓释性。载药的载体一般为:(1)天然高分子载体材料,这类材料一般无毒、无抗原性,目前应用较多,如白蛋白、明胶、淀粉等;(2)合成高分子载体材料^[7]。本次实验以人血白蛋白为微球的包裹材料,也可用牛血清白蛋白代替。研究表明,由于白蛋白微球在制备过程中已变性,故无抗原性,在临床使用中具有较高的安全性^[7]。微球粒径集中在56.4~256.7 μm,平均(156±3.56) μm。含量为(55.22±11.19)%,经检测具有较好的稳定性。本实验制备微球的目的

是后期与骨水泥复合,以制备载药骨水泥,故平均直径选取100~200 μm之间,其目的是缓释后骨水泥中留下的孔隙以利于后期骨细胞长入。本实验中以动态膜透析法检测As₂O₃微球在体外模拟体液中的缓释性能,主要是为了近似地模拟体内体液不断循环的内环境。经回归方程计算As₂O₃微球的半数缓释时间为23.34 h,与As₂O₃粉末直接溶出实验有显著差异,证明本实验设计并制作的As₂O₃蛋白微球具有良好的缓释性能。

近年来研究表明As₂O₃具有极为广泛的抗癌谱,不仅对白血病细胞具有极好的抑制作用,同时对于众多的实体肿瘤也有很好的作用,其中包括肺癌、胰腺癌、食管癌、卵巢癌、胃癌和结肠癌等^[8-10]。砷剂对肿瘤细胞的作用与剂量相关,即提高单位体积的砷剂浓度则可提高对肿瘤细胞的抑制率。本实验中随模拟体液中As₂O₃微球累积释出百分比增加,其对骨肉瘤细胞株U-2 OS、人肺癌细胞株SPC-A-1的抗肿瘤活性增强,为As₂O₃白蛋白微球后期应用奠定了基础。

[参考文献]

[1] Litzow M R, Lee S, Bennett J M, et al. A phase II trial of arsenic trioxide for relapsed and refractory acute lymphoblastic leukemia[J]. Haematologica, 2006,91:1105-1108.

[2] 郭卫,汤小东,唐顺,等. 三氧化二砷联合化疗治疗Ⅲ期成骨肉瘤、尤文肉瘤的初步报告[J]. 中华外科杂志, 2006, 44: 805-808.

[3] Wu K L, Beksac M, van Droogenbroeck J, et al. Phase II multicenter study of arsenic trioxide, ascorbic acid and dexamethasone in patients with relapsed or refractory multiple myeloma [J]. Haematologica, 2006,91:1722-1723.

[4] 钟延强,蒋雪涛. 肝动脉栓塞用顺铂白蛋白微球的研究[J]. 药学报, 1995, 30: 543-548.

[5] Kallinteri P, Fatouros D, Klepetsanis P, et al. Arsenic trioxide liposomes: encapsulation efficiency and *in vitro* stability [J]. J Liposome Res, 2004, 14: 27-38.

[6] Hitzman C J, Elmquist W F, Wattenberg L W, et al. Development of a respirable, sustained release microcarrier for 5-fluorouracil I: *In vitro* assessment of liposomes, microspheres, and lipid coated nanoparticles[J]. J Pharm Sci, 2006, 95: 1114-1126.

[7] 钱军民,张兴,吕飞,等. 聚合物微球的制备及在药物缓释/探释中的应用[J]. 精细石油化工进展, 2002, 3: 22-27.

[8] Scholz C, Richter A, Lehmann M, et al. Arsenic trioxide induces regulated, death receptor-independent cell death through a Bcl-2-controlled pathway[J]. Oncogene, 2005, 24: 7031-7042.

[9] Korper S, Nolte F, Thiel E, et al. The role of mitochondrial targeting in arsenic trioxide-induced apoptosis in myeloid cell lines[J]. Br J Haematol, 2004, 124: 186-189.

[10] Cheung W M, Chu P W, Kwong Y L. Effects of arsenic trioxide on the cellular proliferation, apoptosis and differentiation of human neuroblastoma cells[J]. Cancer Lett, 2007, 246: 122-128.

[收稿日期] 2007-01-13

[修回日期] 2007-05-22

[本文编辑] 尹 荟