

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.10.1336

• 短篇论著 •

载 IR-780 与多柔比星温敏脂质体的制备与表征

李叶阔^{1*}, 段琬璐¹, 唐家伟¹, 何晶玲¹, 严飞², 郑海荣²

1. 广州军区广州总医院超声科, 广州 510010

2. 中国科学院深圳先进技术研究院, 深圳 518055

[摘要] **目的** 制备同时包封 IR-780 和多柔比星(DOX)的温敏脂质体并进行表征。**方法** 采用薄膜水化法及硫酸铵梯度法制备载 IR-780 和 DOX 温敏脂质体(DOX-IR-780 thermo-sensitive liposome, DITSL)。采用 Malvern 激光粒度仪检测各脂质体的粒径、表面电位及多分散系数(PDI);采用激光诱导 DITSL 升温释药,检测各脂质体的释药特性。**结果** IR-780 和 DOX 同时被包封于温敏脂质体,成功制备得 DITSL。IR-780 和 DOX 的包封率分别为(94.47±8.57)%、(92.52±7.61)%;平均粒径(138.98±8.74) nm;略带负电位;PDI 为 0.32±0.02。激光 0.8 W/cm² 照射 5 min,温度最高升到 54.2 ℃,DOX 释药率达 80.1%。**结论** DITSL 具有药物包封率较高、粒径大小适宜、光热转化效率高、温度敏感性好的优点,并可通过激光控制释药,为下一步光热-化疗联合治疗肿瘤的研究奠定了基础。

[关键词] 温敏脂质体;多柔比星;IR-780;光热疗法;药物疗法

[中图分类号] R 943.41 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)10-1336-04

Preparation and characterization of thermo-sensitive liposomes loaded with IR-780 and doxorubicin

LI Ye-kuo^{1*}, DUAN Wan-lu¹, TANG Jia-wei¹, HE Jing-ling¹, YAN Fei², ZHENG Hai-rong²

1. Department of Ultrasound, General Hospital of PLA Guangzhou Military Area Command, Guangzhou 510010, Guangdong, China

2. Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, Guangdong, China

[Abstract] **Objective** To prepare and characterize a thermo-sensitive liposomes co-loaded with IR-780 and doxorubicin (DOX). **Methods** Membrane hydration method and ammonium sulfate gradient method were used to prepare IR-780/DOX thermo-sensitive liposomes (DITSL). The particle size, zeta potential and polydispersity coefficient (PDI) of liposomes were measured by Malvern laser particle size analyzer, and the drug release characteristic of DITSL induced by laser was also detected. **Results** DITSL loading both IR-780 and DOX was successfully prepared. The encapsulation efficiency of IR-780 and DOX was (94.47±8.57)% and (92.52±7.61)%, respectively; the average particle size was (138.98±8.74) nm, with slight negative potential; the PDI was 0.32±0.02. The drug release rate of DITSL was about 80.1% after laser radiation (0.8 W/cm², 5 min) and the highest temperature of DITSL was 54.2 ℃. **Conclusion** The prepared DITSL has high drug encapsulation efficiency, appropriate particle size, high photo-thermal conversion efficiency, good temperature sensitivity and laser-induced thermal drug release property, which lays a foundation study for the combination treatment of tumors with photo-thermal therapy and chemotherapy.

[Key words] thermo-sensitive liposomes; doxorubicin; IR-780; photo-thermal therapy; drug therapy

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(10): 1336-1339]

肿瘤严重威胁着人类健康,目前化疗是治疗肿瘤的有效手段之一,但化疗的不良反应大且会产生

一定的耐药性。光热联合化疗成为当今肿瘤治疗的热点。本课题组前期研究已验证了 IR-780 光热效

[收稿日期] 2017-03-18 **[接受日期]** 2017-06-27

[基金项目] 广东省自然科学基金(2016A030313611),广东省科技计划项目(2014A020212255),全军医学科研“十二五”计划课题(CWS12J076)。Supported by Natural Science Foundation of Guangdong Province (2016A030313611), Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (2014A020212255), and “12th Five-Year Plan” for Medical Science Research Foundation of PLA (CWS12J076).

[作者简介] 李叶阔,博士,副主任医师。

*通信作者(Corresponding author). Tel: 020-88653681, E-mail: yekuoli@163.com

应对小鼠乳腺癌的治疗效果^[1], 然而, 单纯光热效应难以彻底消灭肿瘤组织。本研究拟制备同时包封化疗药物多柔比星(doxorubicin, DOX)和光敏剂 IR-780 的温敏脂质体(DOX-IR-780 thermo-sensitive liposomes, DITSL), 并采用激光照射释药, 以探索光热联合化疗治疗肿瘤的新途径。

1 材料和方法

1.1 主要材料与仪器

二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC, 美国 Avanti Polar Lipids 公司, 纯度>99%, 批号: 63-89-8), 单棕榈酰磷脂酰胆碱(MPPC, 美国 Avanti Polar Lipids 公司, 纯度>99%, 批号: 69525-80-0), 二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000(DSPE-PEG2000, 美国 Avanti Polar Lipids 公司, 纯度>99%, 批号: 474922-22-0); IR-780 碘化物; DOX(美国 Sigma-Aldrich 公司); PBS(美国 HyClone 公司)。挤出仪(美国 Avanti Polar Lipids 公司); Zeta 粒度仪(英国 Malvern 公司); 激光器(由中国科学院深圳先进技术研究院医工所提供, 自组装); DMI4000B 型倒置荧光显微镜、TCSSP5 型激光共聚焦显微镜、RM2255 型石蜡切片机(德国 Leica 公司); BSA223S 型电子天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司); Ti27 型红外热像仪(美国 Fluke 公司); LS55 型荧光光谱仪、Lambda35 型紫外-可见光光谱仪(美国 PerkinElmer 公司); FLS920 型荧光分光光度计(英国 Edinburgh Industries 公司)。

1.2 DITSL 的制备

取 DPPC、MPPC、DSPE-PEG2000(物质的量之比为 86:10:4)与 IR-780(IR-780: 脂质=5:100, 质量比)混溶于氯仿, 边涡旋边氮气吹干成均匀薄膜, 真空 3 h 抽去残留氯仿。加入 250 mmol/L (NH₄)₂SO₄ 溶液溶解脂质薄膜, 在 65 °C 水浴中超声振荡至澄清, 制成 IR-780 脂质体(ITSL)。将 ITSL 用挤出仪从 200 nm 聚碳酸酯膜中反复挤出, 制备成粒径均匀的 ITSL。将 ITSL 装于透析袋中, 放入 PBS 中透析 4 h。将 DOX 溶液(1 mg/mL)逐滴加入 ITSL 中, 边加边振荡, 利用硫酸铵梯度法将 DOX 载入 ITSL 内核制备得 DITSL。载 DOX 脂质体(DTSL)在成膜过程中只加入磷脂, 其余制作方法如 DITSL。使用 Zeta 粒度仪在室温下测粒径大小、粒径分布、多分散指数(PDI)和表面电位, 用紫外-可见光光谱仪检测各脂质体的吸收光谱。

1.3 IR-780 和 DOX 包封率的检测

使用荧光分光光度计测得 IR-780 和 DOX 的荧光值-浓度标准曲线。将制备好的各脂质体放入超滤管, 通过超速

离心法(11 200×g, 30 min)分离脂质体和游离的药物, 荧光分光光度计结合 IR-780 和 DOX 的荧光值-浓度标准曲线检测包封在脂质体内部的药物浓度, 计算包封率。包封率(%)=(包封的药物量)/(初始加入量)×100%。

1.4 激光诱导的体外升温

分别取 PBS、DTSL(DOX 15 μg/mL)、ITSL(IR-780 15 μg/mL)以及 DITSL(IR-780 15 μg/mL, DOX 15 μg/mL)各 1 mL 加入小试管中。用近红外激光(808 nm, 0.8 W/cm²)对每个样本照射 5 min, 每隔 30 s 用红外热像仪测量各脂质体溶液的温度并记录。

1.5 激光诱导 DITSL 药物释放

取 DITSL 和 DTSL 分别置入含 90% 血清的 PBS 中, 用近红外激光(808 nm, 0.8 W/cm²)分别照射 20 s、40 s、1 min、2 min、3 min、4 min、5 min, 检测辐照不同时间两种脂质体的 DOX 释放情况, 同时设无激光辐照为对照, 检测相同时间点 DITSL 的 DOX 释放量。

1.6 统计学处理

应用 SPSS 19.0 软件行数据分析。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本间比较采用 *t* 检验, 多样本比较采用单因素方差分析, 检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 DITSL 的构建

各脂质体的光学特性如图 1 所示。ITSL 在 793 nm 处有最大吸收峰, DTSL 在 492 nm 处有最大吸收峰, DITSL 在 793 nm 和 492 nm 均有显著吸收峰, 表明 DITSL 成功构建。

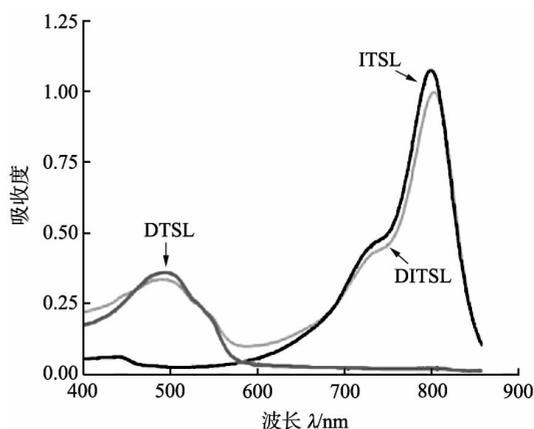


图 1 载药脂质体的紫外-可见光光谱图

DITSL: 载 IR-780 和多柔比星(DOX)温敏脂质体; ITSL: 载 IR-780 温敏脂质体; DTSL: 载 DOX 温敏脂质体

2.2 DITSL 表征

各脂质体的粒径分布如图 2 所示, 载单药脂质体平均粒径均小于 100 nm, 而 DITSL 平均粒径为 139 nm 左右。各脂质体的药物包封率均高于 90%, 提示温敏脂质体是良好的载药工具。DITSL 粒径大小、PDI、zeta 电位及包封率见表 1。

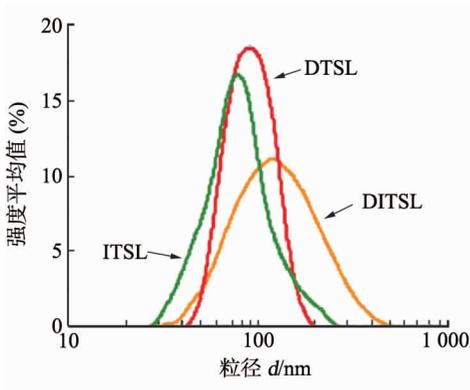


图2 载药脂质体的粒径分布

DITSL: 载 IR-780 和多柔比星(DOX)温敏脂质体; ITSL: 载 IR-780 温敏脂质体; DTSL: 载 DOX 温敏脂质体

2.3 红外热像仪显示结果 0.8 W/cm² 激光照射 5 min 后, DITSL、ITSL、DTSL 和 PBS 组的最高温度分别为 54.2、54.1、34.1、33.7 °C (图 3), 各组在激光照射前的起始温度均为 24.4 °C。ITSL 和 DITSL 组的温度升高一段时间后开始缓慢下降。单因素方差

分析结果显示各组间差异有统计学意义 ($F = 1764.08, P < 0.05$); 多重比较结果显示, PBS 和 DTSL 组为同类子集 ($P > 0.05$), ITSL 和 DITSL 组为同类子集 ($P > 0.05$), 两子集间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.4 激光诱导 DITSL 的药物释放特性 DITSL 释药率随激光辐照时间延长而增加, 照射 1 min 后达 56.0%, 照射 5 min 后达 80.1% (图 4)。无激光辐照 DITSL 的药物释放率较低, 5 min 后约为 8.9%。DTSL 在激光辐照下的药物释放率与 DITSL 无激光情况相仿, 5 min 后的药物释放率约为 11.2%。单因素方差分析结果显示各组间差异有统计学意义 ($F = 490.30, P < 0.05$); 多重比较结果显示, DTSL+激光组和 DITSL 组为同类子集 ($P > 0.05$), DITSL+激光组与这两组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表1 各脂质体的性质表征

$n=3$

脂质体	药脂比	粒径 $d/nm, \bar{x} \pm s$	Zeta 电位 $\varphi/mV, \bar{x} \pm s$	PDI $\bar{x} \pm s$	包封率 (%), $\bar{x} \pm s$
空白		77.53 ± 4.44	-8.21 ± 0.24	0.23 ± 0.05	
ITSL	1 : 20	94.05 ± 1.74	-9.57 ± 0.12	0.28 ± 0.03	99.98 ± 3.12
DTSL	1 : 20	84.55 ± 7.41	-10.74 ± 0.41	0.24 ± 0.03	97.39 ± 4.42
DITSL	1 : 20	138.98 ± 8.74	-11.54 ± 0.52	0.32 ± 0.02	92.52 ± 7.61(DOX), 94.47 ± 8.57(IR-780)

药脂比为药物与脂质的质量比。ITSL: 载 IR-780 温敏脂质体; DTSL: 载多柔比星(DOX)温敏脂质体; DITSL: 载 DOX 和 IR-780 温敏脂质体; PDI: 多分散指数

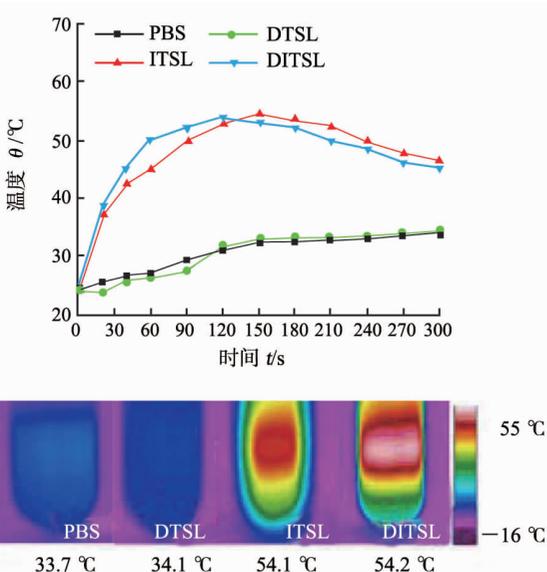


图3 DITSL、ITSL 和 DTSL 在 808 nm 激光辐照下的光热升温效应和红外热像图

DITSL: 载 IR-780 和多柔比星(DOX)温敏脂质体; ITSL: 载 IR-780 温敏脂质体; DTSL: 载 DOX 温敏脂质体。PBS 组和 DTSL 组与 ITSL 组和 DITSL 组比较, $P < 0.05$

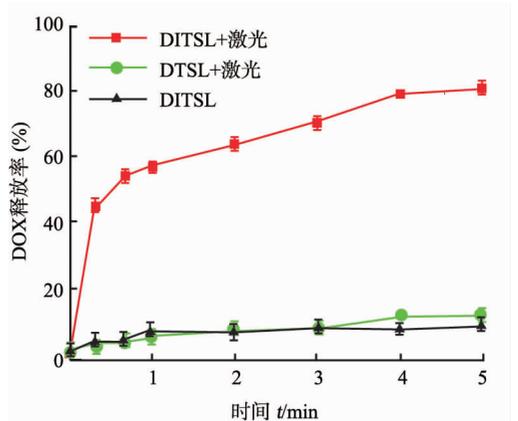


图4 激光照射下 DITSL 中多柔比星(DOX)累计释放情况 DITSL: 载 DOX/IR-780 温敏脂质体; ITSL: 载 IR-780 温敏脂质体; DTSL: 载 DOX 温敏脂质体。DITSL+激光组与 DTSL+激光组和 DITSL 组比较, $P < 0.05, n=5, \bar{x} \pm s$

3 讨论

温度敏感脂质体是壳膜由双分子层脂质组成 (主要是磷脂和胆固醇)、内部为水相的闭合囊泡, 壳

膜磷脂的疏水尾部相对, 具有典型的双亲分子特性^[2-5]。其包封范围广泛, 亲水性药物、两性药物和疏水性药物均可被包封^[6-8], 且可在一定温度作用下释放包封的药物。因此, 本研究采用温敏脂质体作为运载亲水性药物 DOX 和脂溶性光敏剂 IR-780 的载体, 并利用 IR-780 的光热效应, 采用激光激发升温释药。紫外-可见分光光度计检测结果表明 ITSL 在 793 nm 处有最大吸收峰, 符合 IR-780 的吸收特征; DTSL 在 492 nm 处有最大吸收, 与 DOX 吸收峰相似; DITSL 同时在 793 nm 和 492 nm 有显著吸收峰, 表明亲水性的 DOX 和疏水性的 IR-780 被同时包封于脂质体内, DITSL 构建成功。本研究制备的 DITSL 平均粒径为 (138.98 ± 8.74) nm, 略带负电荷, PDI 为 0.32 ± 0.02 , 说明粒径分布均匀, IR-780 和 DOX 的包封率均高达 90% 以上。红外热像仪检测结果证实 0.8 W/cm^2 激光照射 5 min 时, DITSL 和 ITSL 最高温度分别升到 $54.2 \text{ }^\circ\text{C}$ 和 $54.1 \text{ }^\circ\text{C}$, 而 DTSL 和 PBS 组的升高幅度低于 DITSL 和 ITSL 组。缺乏光热制剂时激光不能有效地转化成热能, 因此 DTSL 和 PBS 组只有轻微的温度升高, 而 DITSL 和 ITSL 组由于 IR-780 的存在温度明显升高, 但升高一段时间后会缓慢下降, 推测其原因可能是 IR-780 在光照一段时间后发生了分子之间的自猝灭。

本研究结果显示 0.8 W/cm^2 激光照射 1 min 后 DITSL 的释药率达到 56.0%, 照射 5 min 时释药率约 80.1%。而 DTSL 中由于不含 IR-780, 光热转换效率低, 在激光辐照下的释药率与 DITSL 无激光情况相仿, 5 min 后的释药率约为 11.2%; 无激光辐照 DITSL 5 min 后的释药率也仅为 8.9%。表明 IR-780 在激光作用下升温, 温敏脂质体双分子膜由“凝胶”态转变到“液晶”态结构, 膜的流动性增大, 膜变薄, 脂质体表面出现裂孔, 导致包封药物的迅速释放^[9]。

综上所述, 本研究制备的 DITSL 可同时包封 IR-780 和 DOX, 包封率高、理化性质良好, 并能在激光照射下高效释药, 未来我们将开展细胞水平实验和动物实验研究其对肿瘤治疗的效果。

[参考文献]

- [1] 周群芳, 段琬璐, 黎国峰, 严飞, 刘锐洪, 李叶阔. IR-780 光热治疗小鼠乳腺癌移植瘤的初步研究[J]. 临床肿瘤学杂志, 2015, 22: 303-306.
- [2] LEE B K, YUN Y H, PARK K. Smart nanoparticles for drug delivery: boundaries and opportunities [J]. Chem Eng Sci, 2015, 24: 158-164.
- [3] QIU Y, GUO L, ZHANG S, XU B, GAO Y, HU Y, et al. DNA-based vaccination against hepatitis B virus using dissolving microneedle arrays adjuvanted by cationic liposomes and CpG ODN [J]. Drug Deliv, 2016, 23: 2391-2398.
- [4] SCHWENDENER R A, SCHOTT H. Liposome formulations of hydrophobic drugs [J]. Methods Mol Biol, 2010, 605: 129-138.
- [5] VENKATAHARSHA P, MAHESHWARA E, RAJU Y P, REDDY V A, RAYADU B S, KARISSETTY B. Liposomal *Aloe vera* trans-emulgel drug delivery of naproxen and nimesulide: a study [J]. Int J Pharm Investig, 2015, 5: 28-34.
- [6] WU H, YAO L, MEI J, LI F. Development of synthetic of peptide-functionalized liposome for enhanced targeted ovarian carcinoma therapy [J]. Int J Clin Exp Med, 2014, 7: 4809-4818.
- [7] THAMPHIWATANA S, GAO W, PORNATTANANANGKUL D. Phospholipase A2-responsive antibiotic delivery via nanoparticle-stabilized liposomes for the treatment of bacterial infection [J]. J Mater Chem B Mater Biol Med, 2014, 2: 8201-8207.
- [8] YU T, CHAN K W, ANONUEVO A, SONG X, SCHUSTER B S, CHATTOPADHYAY S, et al. Liposome-based mucus-penetrating particles (MPP) for mucosal theranostics: demonstration of diamagnetic chemical exchange saturation transfer (diaCEST) magnetic resonance imaging (MRI) [J]. Nanomedicine, 2015, 11: 401-405.
- [9] ANDERSON V C, THOMPSON D H. Triggered release of hydrophilic agents from plasmalogen liposomes using visible light or acid [J]. Biochim Biophys Acta, 1992, 1109: 33-42.

[本文编辑] 曾奇峰