

果胶多柔比星纳米混悬剂的制备及初步药效评价

范 菲^{1,2}, 唐小海^{1,2*}, 黎 霞¹, 冉茂盛², 李玲芳², 彭 琳^{1,2}

(1. 四川师范大学生命科学学院, 四川 成都 610101; 2. 重庆莱美药业股份有限公司, 重庆 401336)

摘要: 运用高压均质技术制备果胶多柔比星衍生物 (pectin-doxorubicin conjugate, PDC) 纳米混悬液, 评价其理化性质、体外释放、体内释放及抗肿瘤活性。以纳米粒平均粒径及多分散指数 (polydispersity index, PI) 为指标, 研究各影响因素如压力、循环次数和稳定剂种类对 PDC 纳米混悬剂的影响。考察 PDC 纳米混悬液在 pH 为 5.1 或 7.4 的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 中的累积释放率。腹腔注射多柔比星 (doxorubicin, DOX) 当量为 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 PDC 纳米混悬液或 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ DOX, 测定家兔血浆中 DOX 浓度。构建 SKOV₃ 细胞裸鼠模型, 腹腔注射 DOX 当量为 10、5、2.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 PDC 纳米混悬液, 观察裸鼠生长状态。结果表明: PDC 纳米混悬剂的平均粒径为 $118.8 \pm 6.93 \text{ nm}$, PI 为 0.14 ± 0.03 , zeta 电位为 $-27.2 \pm 0.36 \text{ mV}$ 。PDC 纳米混悬液在 pH 7.4 的 PBS 中基本不释放, 在 pH 5.1 时, 30 h 内累积释放率约 40%。腹腔给药后, PDC 组家兔血浆中 DOX 浓度低于 DOX 组, 呈现先升高后降低的趋势, 最终维持在 $60 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 左右。此外, PDC 纳米混悬液能有效抑制 SKOV₃ 细胞裸鼠移植瘤的生长, 高剂量组裸鼠腹水及瘤结节重量比阴性对照组显著减少。综上, PDC 有望开发成一种高效低毒的靶向治疗癌性腹水的新型药物。

关键词: 纳米混悬剂; 高压均质; 卵巢癌; 多柔比星; 果胶多柔比星衍生物

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2016) 09-1476-07

Preparation and evaluation of pharmacodynamic of the pectin-doxorubicin conjugate nanosuspensions

FAN Fei^{1,2}, TANG Xiao-hai^{1,2*}, LI Xia¹, RAN Mao-sheng², LI Ling-fang², PENG Lin^{1,2}

(1. College of Life Science, Sichuan Normal University, Chengdu 610101, China;

2. Chongqing Lummy Pharmaceutical Co., Ltd, Chongqing 401336, China)

Abstract: This study was conducted to produce pectin-doxorubicin conjugate (PDC) nanosuspensions by high-pressure homogenization, and investigating the physico-chemical properties, the cumulative release rate *in vitro* and *in vivo*, and the anti-tumor activity. The major production parameters such as pressure, cycle numbers and types of stabilizers on the mean particle size and polydispersity index (PI) of PDC nanosuspensions were investigated. The cumulative release rate in phosphate buffer saline (PBS) at pH 5.1 or 7.0 were studied. The concentration of doxorubicin (DOX) in plasma of rabbit were recorded after intraperitoneal injection of PDC nanosuspensions (DOX was equivalent to $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) or DOX ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). We established an animal model of the nude mice with SKOV₃ cell, and injected the PDC nanosuspensions (DOX was equivalent to 10, 5, 2.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) in the first day, and observed the growth state of nude mice. The particle size of PDC nanosuspensions was $118.8 \pm 6.93 \text{ nm}$, PI was 0.14 ± 0.03 , as well as the zeta potential was $-27.2 \pm 0.36 \text{ mV}$. It shows that no drug release was found in PBS at pH 7.4. About 40% cumulative release was determined

收稿日期: 2016-04-16; 修回日期: 2016-04-29.

基金项目: 国家科技重大专项资助项目 (2011ZX09102-001).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-28-85503334, E-mail: pharmmateceo@aliyun.com.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-0357

in PBS at 5.1 after 30 h. The concentration of DOX in plasma of PDC group was $60 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, and was lower than that of DOX group. Compared with control group, high-dose-group decreased the weight of nude mice's ascites tumor and burr knot. PDC nanosuspensions can inhibit the growth of SKOV₃ cell line in nude mice. In summary, PDC nanosuspensions are target-specific drugs with high efficiency and low toxicity in the ascites cancer model.

Key words: nanosuspension; high pressure homogenization; ovarian cancer; doxorubicin; pectin-doxorubicin conjugate

多柔比星 (doxorubicin, DOX) 属于蒽环霉素类广谱抗肿瘤药物, 临床上广泛应用于治疗各种恶性肿瘤^[1]。与大多数抗肿瘤药物相同, DOX 不良反应较多, 最严重的是剂量依赖性心脏毒性, 不仅影响了患者的生存质量, 而且使 DOX 的应用受到限制^[2,3]。目前高效低毒的靶向药物研究成为热点^[4-7]。

果胶作为天然大分子多聚糖, 生物相容性好, 常被用作药物辅料、代血浆和载药载体。所以, 选用果胶为载体, 将果胶 C-6 位羧基与 DOX C-3' 位氨基以酰胺键偶联^[8], 制备果胶多柔比星衍生物 (pectin-doxorubicin conjugate, PDC), 其重均分子量为 6.050×10^5 , 数均分子量为 2.110×10^5 , 见合成路线 1。PDC 在体内通过溶酶体酶作用使共价键断裂, 释放出游离 DOX 而发挥药效, 达到增效减毒、靶向治疗肿瘤、减少药物毒性的目的^[9]。PDC 中载体果胶属于天然高分子多聚糖, 结构中含大量的羧基与羟基, 容易产生氢键, 形成刚性结构, 结合小分子 DOX 后, PDC 在水中和有机溶剂中的溶解性差。所以, 需要对 PDC 进

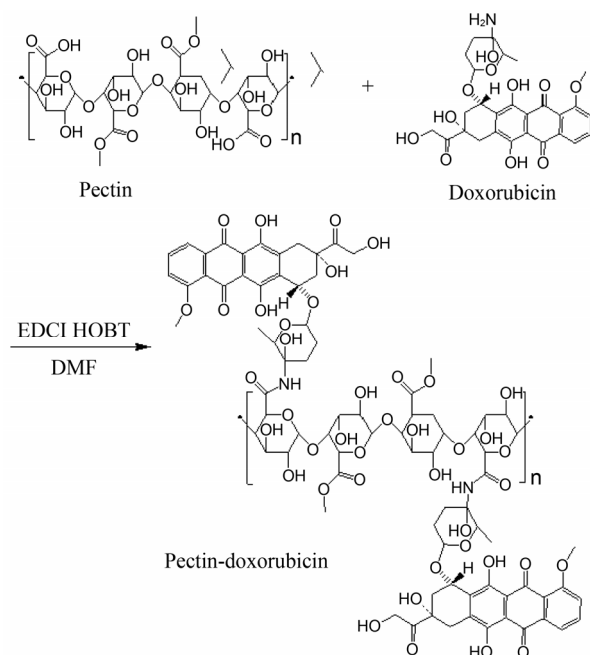
行增溶处理。目前常用的共溶剂增溶、环糊精包合、乳剂和微乳等技术存在有机溶剂残留、载药量低、稳定性差及制备工艺复杂等局限性。纳米混悬剂被广泛应用于解决药物因溶解性而限制应用的问题^[10, 11], 优点是处方简单, “纯药物”纳米粒增加比表面积, 从而增加药物的溶解度, 提高疗效^[12-14]。所以, 本研究拟采用自上而下的高压均质技术将 PDC 制备成纳米混悬剂^[15], 考察其理化性质和体内外释放, 并以 SKOV₃ 细胞裸鼠移植瘤为模型, 初步评价该混悬剂的抗肿瘤活性, 为下一步药物开发及临床应用提供参考依据。

材料与方法

仪器 超细匀浆器 F6/10-8G (上海弗鲁克流体机械制造有限公司); 高压均质机 NanoGenizer (苏州微流纳米生物技术有限公司); 激光粒度分析仪 Nicomp380 Z3000 (苏州微流纳米生物技术有限公司); 紫外分光光度计 TU-1810S (北京普析通用仪器有限公司); 透射电子显微镜 H-600 (日本日立公司); 透析袋 (M_w 3 500, 美国 Sigma 公司); Agilent 1260 [安捷伦科技 (中国) 有限公司]。

药品与试剂 PDC 由重庆莱美药业股份有限公司四川大学莱美联合实验室研制, 其中 DOX 购自浙江海正药业股份有限公司; 精制蛋黄卵磷脂 (E80, 德国 Lipoid GmbH 公司); 泊洛沙姆 188 (F68, 德国 BASF 公司); 聚乙烯吡咯烷酮-K30 (PVPK30, 杭州恒泉开发有限公司); 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na, 成都科龙化工试剂); 聚乙二醇 400 (PEG 400), 十二烷基硫酸钠 (SDS) (天津致远化学试剂有限公司); 2-羟丙基- β -环糊精 (2-HP- β -CD, Aladdin industrial corporation); 氯仿, 二甲基亚砜 (DMSO) (重庆化学试剂有限公司); 异丙醇 (天津市富宇精细化工有限公司); 色谱甲醇和色谱乙腈 (上海科丰化学试剂有限公司)。

细胞株与动物 BALB/c (nu/nu) 裸鼠, 家兔 (成都达硕生物科技有限公司)。裸鼠许可证号: scxk



Scheme 1 The synthetic formula of the pectin-doxorubicin (DOX) conjugate nanosuspensions (PDC)

(川) 2013-24, 家兔许可证号: scxk (川) 2013-14。SKOV₃ 细胞 (由四川大学生物治疗国家重点实验室惠赠)。动物的饲养条件: $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 湿度 60%。饲养条件为 SPF 级, 整个实验研究过程遵从实验动物饲养管理和使用指南。

PDC 纳米混悬液的制备 取 10 mg PDC 固体粉末, 加入超纯水 10 mL, 用超速匀浆器以 $25\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 匀浆 5 min 进行初分散。所得初分散液置于高压均质机中, 在 110 MPa 压力下均质 25 min, 制得纳米混悬液。

稳定剂的筛选与制备条件优化 分别向 PDC 中加入质量分数为 0.05%、0.1%、0.5%、1% 和 2% 的 E80、PEG400、F68、PVPK30、CMC-Na 和 2-HP- β -CD, 按上述方法制备, 分别测定混悬液的粒径和电位。选取加入上述稳定剂后粒径和多分散指数 (polydispersity index, PI) 较优组, 于室温放置, 分别在第 5、10、15 天取样测定粒径, 选取粒径较优组对应的稳定剂作为该处方的稳定剂。重新称取 10 份 PDC, 均加入选定稳定剂, 按如上方法初分散后, 分别在 80、110、40、180 MPa 压力下均质初分散液, 在均质次数分别为 5、10、15、20、25、30 和 35 时取样, 测定粒径和 PI。

纳米粒粒径及 zeta 电位的测定 取纳米混悬液, 用超纯水稀释 1 倍, 于 Zetasizer Nano ZS90 测定粒径、PI 和电位, 每个样品测定 3 次, 取平均值。

重复性与稳定性 按最优处方制备 3 批 PDC 纳米混悬液, 于室温放置, 分别测定各批次样品第 5、10、15、30 天的粒径、PI 和 zeta 电位。

PDC 纳米混悬液形态观察 取适量最优处方制备的 PDC 纳米混悬液, 滴加于覆盖碳膜的铜网上, 用磷钨酸负染, 待混悬液中载液挥发后, 用透射电子显微镜 (TEM) 观察。放大倍数为 6.0×10^4 倍。加速电压为 75 kV。

载药量测定

色谱条件 色谱柱: ZORBAX SB-Aq C18 柱, 规格: $250\text{ mm} \times 4.6\text{ mm}$, 填料粒径 $5\text{ }\mu\text{m}$ 。流动相: SDS 缓冲液 (SDS 1.44 g、磷酸 0.68 mL 和水 500 mL): 乙腈: 甲醇为 47.2: 47.2: 5.6 (v/v)。流速: $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温: 25°C , 检测器: DAD, 检测波长: 254 nm, 进样量: $20\text{ }\mu\text{L}$ 。

标准曲线的制备 以超纯水为溶剂, 配制系列浓度的 DOX 标准液, HPLC 检测, 将标准溶液浓度 (Y_1) 对峰面积 (X_1) 进行线性回归, 得回归方程。以水和 DMSO 混合物 (1: 49, v/v) 作为溶剂, 配制系

列浓度的 DOX 标准液, 于紫外 (520 nm) 测定吸光度值, 将标准溶液浓度 (Y_2) 对吸光度 (X_2) 进行线性回归, 得回归方程。

载药量测定 取适量上述最优处方制备的 3 个批次 PDC 纳米混悬液, 分别于 $20\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液, HPLC 检测, 计算出游离 DOX 的质量浓度 (B), 由于 DOX 出峰时间为 10.055 6 min, 而 PDC 是大分子药物, 在该色谱条件下 20 min 内不出峰, 所以该方法能够准确测定游离 DOX 的量。另量取 PDC 纳米混悬液 1 mL, 加入 DMSO 溶解并定容至 50 mL, 以相同比例水与 DMSO 混合物为对照, 用紫外分光光度计于 520 nm 处测定吸光度值, 计算出混悬液中 DOX 的总质量浓度 (D)。PDC 载药量 (%) = $(D - B) / E \times 100$ (其中 E 为 PDC 质量浓度)。

PDC 体外释放研究 以 PBS 为溶剂, 配制系列浓度的 DOX 标准液, 在上述色谱条件下, HPLC 检测, 将标准溶液浓度 (Y_3) 对吸光度 (X_3) 进行线性回归, 得回归方程。取 PDC 纳米混悬液 ($20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、载药量 25.3%、游离 DOX 0.2%) 1 mL 和 $5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ DOX 溶液 1 mL 分别装入透析袋内, 密封后置于 40 mL pH 为 7.4 或 5.1 的 PBS 中透析, 透析条件为: 恒温 37°C , $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。分别于 0.5、2、4、6、8、24、32、48 和 72 h 取释放液 0.5 mL, 在上述色谱条件下, HPLC 检测, 计算透析液中 DOX 的质量浓度 (A)。每次取样后及时补加等量放置于 37°C 的 PBS。由于 PDC 中游离 DOX 含量很低, 只占体系 DOX 总量的 0.2%, 所以游离 DOX 对 PDC 释放率影响很小, 释放率 (%) = $A / (\text{PDC 质量浓度} \times \text{载药量} + \text{游离 DOX 质量浓度})$ 。

PDC 体内释放研究 标准曲线的制备: 以血浆为溶剂, 配制系列 DOX 标准液, 按如下方法萃取: 取标准液 1 mL, 加入内标柔红霉素溶液 ($200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) $20\text{ }\mu\text{L}$ 混匀, 加入萃取液 (氯仿-异丙醇 3: 1, v/v) 1 mL, 漩涡震荡 10 min, -80°C 速冻 20 min, 取出后 $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 得到下层有机层。再重复萃取 1 次, 将 2 次所得有机层合在一起, 40°C 水浴真空挥干, 取流动相 1 mL 溶解挥干物, 在上述色谱条件下 (检测器换成荧光检测器), HPLC 检测。将标准溶液浓度 (Y) 对柔红霉素与 DOX 峰面积之比 (X) 进行线性回归 (已证明柔红霉素与 DOX 峰面积呈线性关系), 得回归方程。

按 DOX 给药剂量为 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 分别向家兔腹腔注射预热至 37°C 的 PDC 纳米混悬液 ($20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、载药量 25.3%、游离 DOX 0.2%) 或 DOX 溶液, 给药后 5、20、40、60、90、120、180、240、300 和

360 min 从心脏取血, 所得血液于 $2\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取血浆 1 mL, 按照制备标准曲线的方法萃取后, HPLC 检测, 计算血浆中 DOX 浓度。由于 PDC 中游离 DOX 仅占体系 DOX 总量的 0.2%, 含量极低, 所以测定的血浆中 DOX 的浓度主要是从 PDC 中解离的 DOX, 绘制 DOX 浓度-时间曲线来评价腹腔给药后 PDC 在血浆中的释放。

PDC 对 SKOV₃ 细胞裸鼠移植瘤模型的抑制作用 取 BALB/c (nu/nu) 裸鼠 40 只, 每只腹腔接种 2×10^6 个 SKOV₃ 卵巢癌细胞, 7 天后随机分为 5 组, 称重并腹腔给药: DOX 组 (DOX $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$); PDC 高剂量组 (含 DOX $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$); PDC 中剂量组 (含 DOX $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$); PDC 低剂量组 (含 DOX $2.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 和阴性对照组 (生理盐水 $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。常规观察裸鼠生长状态, 每隔 7 天称体重, 28 天后断颈处死所有裸鼠, 解剖并收集腹水与瘤结节, 精密称重并计算体重变化 (体重变化为末次称量的平均体重与给药前平均体重的差值, 负值表示体重减轻)。

统计方法 采用 SPSS 统计学软件 (version 17.0) 进行多组间独立样本 *t* 检验, $P<0.05$ 说明具有显著差异, $P<0.01$ 说明具有极显著差异, 计量数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示。

结果

1 稳定剂的筛选与制备条件优化

稳定剂种类及用量对 PDC 纳米混悬剂的粒径和表面电荷影响很大。应用 PEG 400 和 CMC-Na 制备的纳米混悬液粒径和 PI 均较大; 卵磷脂制备的纳米混悬液粒径降低, 但 PI 均大于 0.4, 说明纳米粒的分

散区间比较广, 均不符合纳米混悬剂的要求; F68、PVPK30 和 2-HP- β -CD 制得的纳米粒粒径均能达到 300 nm 以下, 较为理想, 结果见图 1。

在室温放置 15 天, 应用 PVPK30 制备的纳米粒粒径增至 $589.9\pm 13.3\text{ nm}$, 且纳米混悬液中出现明显絮状物; 2-HP- β -CD 制备的纳米粒粒径增至 $711.3\pm 35.3\text{ nm}$, 且纳米混悬液分层, 上层澄清, 下层鲜红; F68 制备的纳米粒粒径为 $285.4\pm 8.7\text{ nm}$, 室温放置 15 天粒径为 $281.4\pm 9.2\text{ nm}$, 几乎没有变化, 观察外观, 颜色鲜红, 分布均一, 说明应用 F68 制备的混悬液能保持体系稳定。故研究选择 F68 为该处方的稳定剂, 结果见表 1。

随着均质压力的增加, 粒径快速减小, 当压力达到 110 MPa, 均质次数为 25 次时, 粒径为 $117.0\pm 13.2\text{ nm}$, PI 为 0.113 ± 0.054 ; 压力继续增加, 粒径变化不明显。随着均质次数的增加, 粒径减小, PI 明显降低, 当均质次数达到 25 次时, PI 均小于 0.2, 体系分散性良好; 当均质次数大于 25 次时, PI 变化不大, 结果见图 2。实验发现, 均质压力越高, 体系产热越严重。采用先低压后高压的方法进行均质, 能有效减少仪器产热。根据均质次数筛选结果, 采用在 80 MPa 条件下先均质 10 次, 再在 110 MPa 条件下均质 25 次的方法制备纳米混悬液。

2 重复性与稳定性

3 批 PDC 纳米混悬剂粒径均小于 150 nm, 平均粒径为 $118.8\pm 6.93\text{ nm}$, PI 值为 0.14 ± 0.03 , 平均 zeta 电位为 $-27.2\pm 0.36\text{ mV}$, 说明优化处方制备的 PDC 纳米混悬剂具有很好的重复性。样品于常温下放置 5、10 和 15 天, 平均粒径小于 130 nm, 电位为

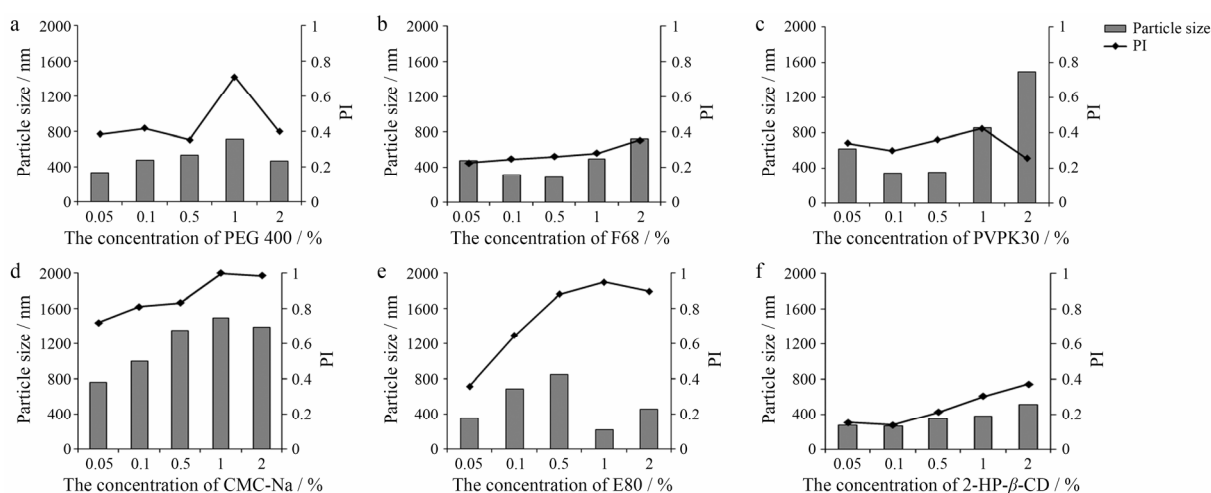
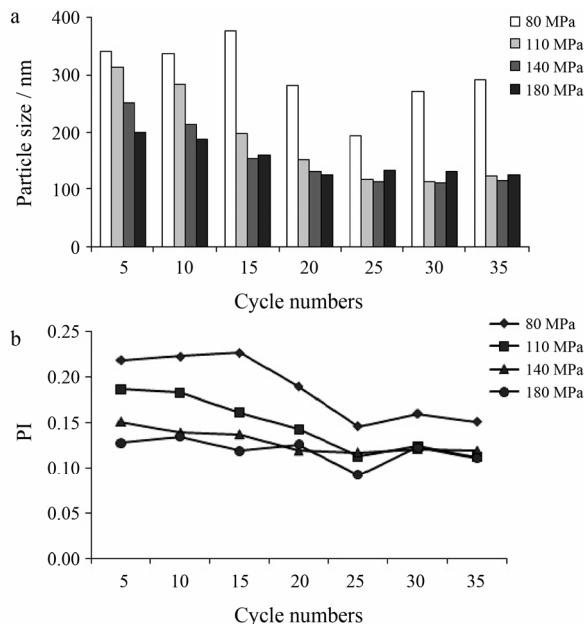


Figure 1 Effect of different stabilizers on the mean particle size and polydispersity index (PI) of PDC. a: Polyethylene glycol 400 (PEG 400); b: Poloxamer188 (F68); c: Polyvinylpyrrolidone (PVPK30); d: Sodium carboxyl methyl cellulose (CMC-Na); e: Lipoid (E80); f: (2-Hydroxypropyl)- β -cyclodextrin (2-HP- β -CD). $n=3$, $\bar{x}\pm s$

Table 1 Effects of different stabilizers on the stability of PDC under ambient temperature for 15 days. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

Compound	PI	Zeta potential /mV	Particle size/nm			
			0 d	5 d	10 d	15 d
0.1% F68	0.261 $\pm$ 0.06	-27.0 $\pm$ 0.3	285.4 $\pm$ 8.7	276.2 $\pm$ 11.1	309.5 $\pm$ 12.3	281.4 $\pm$ 9.2
0.5% PVPK30	0.340 $\pm$ 0.037	-23.4 $\pm$ 0.2	357.3 $\pm$ 11.6	398.8 $\pm$ 15.3	379.5 $\pm$ 6.4	589.9 $\pm$ 13.3
0.1% 2-HP- β -CD	0.138 $\pm$ 0.029	-22 $\pm$ 0.2	267.8 $\pm$ 9.8	351.2 $\pm$ 17.5	462.4 $\pm$ 16.8	711.3 $\pm$ 35.3

**Figure 2** Effect of homogenization pressure and cycle numbers on the particle size(a) and polydispersity index (PI, b) of the pectin-doxorubicin conjugate nanosuspensions. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

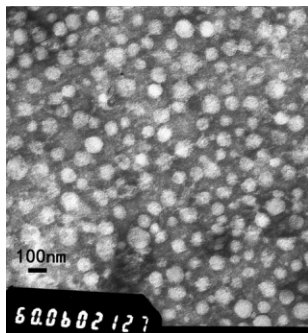
-27.2 $\pm$ 0.36 mV, 与 0 天相比变化不大, 外观颜色鲜红, 体系分散均一, 无沉降和絮凝; 第 30 天平均粒径增至 178.1 $\pm$ 14.65 nm, 溶液出现轻度分层, 轻轻振摇后呈现良好的可重悬浮性, 说明体系在 30 天内可以保持良好的稳定性。

3 PDC 纳米混悬液形态观察

透射电子显微镜下, PDC 纳米粒呈圆球状, 粒径 100 nm 左右, 见图 3。

4 PDC 载药量测定

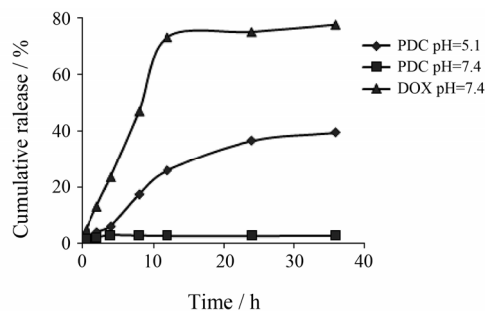
以水为溶剂得回归方程: $Y_1 = 0.0257 X_1 + 0.0074$

**Figure 3** Transmission electron microscope imaging of PDC

($R^2 = 0.9998$), 以 DMSO 与水的混合物为溶剂得回归方程: $Y_2 = 51.2730 X_2 + 0.0885$ ($R^2 = 0.9999$)。测定上述 3 个批次 PDC 载药量分别为 24.9%、25.3% 和 25.8%, 游离 DOX 占样品 DOX 总量的百分比分别为 0.3%、0.2% 和 0.2%, 游离 DOX 量比较低, 主要是由于 PDC 原料药通过透析等方法纯化除去了一定量的游离 DOX 及相关物质。

5 PDC 体外释放研究

以 PBS 为溶剂得回归方程: $Y_3 = 0.0125 X_3 + 0.0056$ ($R^2 = 0.9996$)。当缓冲液 pH 为 7.4 时, DOX 在 10 h 内迅速释放, 释放率在 70% 以上, PDC 则基本无释放。当 pH 为 5.1 时, PDC 在 30 h 内持续缓慢释放, 释放率约为 40%, 结果见图 4。

**Figure 4** The release profile of PDC and DOX in phosphate buffered saline (PBS) at pH 5.1 or 7.4

6 PDC 体内释放研究

以血浆为溶剂得回归方程: $Y_4 = 0.0007 X_4 - 0.0047$, $R^2 = 0.9996$ 。腹腔给药后, DOX 组中血浆 DOX 浓度 5 min 内达到 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 左右, 2 h 内降至 60 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 左右。PDC 组血浆 DOX 浓度先升高至 200 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 左右, 后降低并维持在 60 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 左右。每组平行做两次, 结果重复性好。由此可见, 腹腔给药后, PDC 组血浆 DOX 浓度比 DOX 组低, 有利于减少 DOX 全身毒性, 结果见图 5。

7 PDC 对 SKOV₃ 细胞裸鼠移植瘤模型的抑制作用

PDC 高、中和低剂量组产生的腹水量分别为 0、0.90 $\pm$ 0.74 和 2.02 $\pm$ 0.63 g, 瘤结节量分别为 0.22 $\pm$ 0.13、0.58 $\pm$ 0.58 和 1.18 $\pm$ 0.28 g; DOX 组产生的腹水量为 0.18 $\pm$ 0.16 g, 瘤结节量为 0.17 $\pm$ 0.12 g; 而阴性对照组

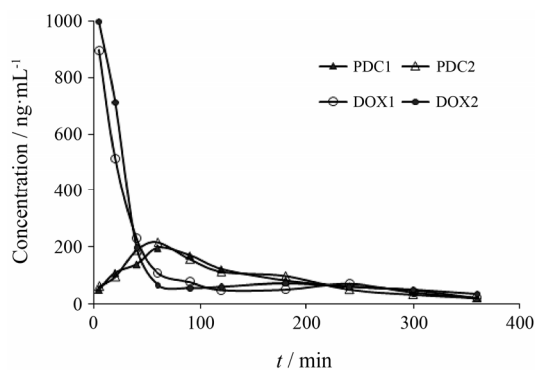


Figure 5 The drug concentration-time curve of DOX. Injected with PDC (DOX was equivalent to $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) and DOX ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), observed the concentration of DOX in plasma for 360 min

产生的腹水量为 $2.36 \pm 0.43 \text{ g}$, 瘤结节量为 $1.20 \pm 0.24 \text{ g}$ 。3 个剂量组均能有效的抑制腹水及瘤结节的生长, 且呈量效关系。PDC 高剂量组腹水和瘤结节基本消失, 与 DOX 组效果相当, 3 个剂量组与阴性对照组相比有极显著差异 ($P < 0.01$)。从体重变化来看, PDC 高剂量组和 DOX 组裸鼠体重分别增加 0.5 g 和减少 1.8 g , 与阴性对照组 (增加 3.2 g) 相比具有极显著差异 ($P < 0.01$), 可能是由于腹水和瘤结节的减小, 而 DOX 组体重轻于 PDC 高剂量组, 可能是由于 DOX 腹腔注射对裸鼠刺激性大, 影响其生长, 结果见表 2。

Table 2 Effect of PDC on the SKOV₃ model of nude mice. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs DOX group

Group/mg·kg ⁻¹		Burrknot /g	Ascites tumor /g	Body weight change/g
Control	5	1.20 ± 0.24	2.36 ± 0.43	3.2
DOX	5	0.17 ± 0.12**	0.18 ± 0.16**	-1.8**
PDC	2.5	1.18 ± 0.28##	2.02 ± 0.63##	2.7
	5	0.58 ± 0.58*#	0.90 ± 0.74***	1.6
	10	0.22 ± 0.13**	0**	0.5**

讨论

本实验室研制的 PDC 是一种新型高分子靶向抗肿瘤药物, 但因其溶解度差而被限制应用。本文采用高压均质法, 对方剂及制备条件进行优化, 将 PDC 制备成纳米混悬剂, 粒子比表面积增大, 药物的溶出速率也得到增加, 同时根据 Ostwald-Freundlich 方程, 纳米药物的溶解度增加。通过添加 $0.5\% \text{ F68 (w/v)}$, 降低纳米粒表面张力, 形成空间位阻, 维持体系的相对稳定性^[16], 使其室温条件下放置 30 天不沉降、不聚积。

PDC 在 pH 5.1 的磷酸盐缓冲液中持续缓慢释放,

释放率约为 40%, 而在 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中基本不释放, 由此可知, PDC 在酸性条件下更易于释放。癌细胞在 pH 值小于 7 的微酸性体液环境中生长活跃, 溶酶体的内环境 pH 也较低 (pH 约为 5), 这些条件均有利于 PDC 在特定细胞及肿瘤部位的靶向释放。腹腔注射 6 h 内, PDC 组血浆 DOX 浓度远远低于 DOX 组, 说明 PDC 在一定程度上可以减少 DOX 的全身毒性, 但需要进一步研究证明。腹腔给药后, PDC 能有效抑制 SKOV₃ 细胞裸鼠移植瘤模型中腹水及瘤结节的生长, 显示出与 DOX 相当的抗肿瘤活性。综上, PDC 有望开发成为一种新型靶向抗肿瘤药物, 或许是靶向治疗癌性腹水的腔内治疗药物。

References

- [1] Thomas L, Belmont S, Christen MO, et al. Cardiovascular and survival effects of sympatho inhibitors in adriamycin induced cardiomyopathy in rats [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2004, 18: 649–655.
- [2] Ewer MS, Ewer SM. Cardiotoxicity of anticancer treatments: what the cardiologist needs to know [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2010, 7: 564–575.
- [3] Mukherjee S, Banerjee SK, Maulik M, et al. Protection against acute adriamycin-induced cardiotoxicity by garlic: role of endogenous antioxidants and inhibition of TNF- α expression [J]. *BMC Pharmacol*, 2003, 3: 16.
- [4] Gao HL, Jiang XG. The development of novel tumor targeting delivery strategy [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 272–280.
- [5] Zhang D, Li JY, Wang XC, et al. Preparation and evaluation of doxorubicin hydrochloride liposomes modified by poly (2-ethyl-2-oxazoline)-cholesteryl methyl carbonate [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2015, 50: 1174–1179.
- [6] Zhao B, Fan YC, Wang XQ, et al. Cellular toxicity and anti-tumor efficacy of iRGD modified doxorubicin loaded sterically stabilized liposomes [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2013, 48: 417–422.
- [7] Lu JQ, Zhao WC, Huang YX, et al. Targeted delivery of doxorubicin by folic acid-decorated dual functional nanocarrier [J]. *Mol Pharm*, 2014, 11: 4164–4178.
- [8] Cheng M, Xie P, Tang XH, et al. Preparation and lymphatic targeting research of targeting antitumor drug: pectin-adriamycin conjugates [J]. *J Biomed Eng (生物医学工程杂志)*, 2009, 26: 569–574.
- [9] Tang XH, Xie P, Ding Y, et al. Synthesis, characterization and *in vitro* and *in vivo* evaluation of a novel pectin-adriamycin conjugate [J]. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18: 1599–1609.

- [10] Lipinski CA. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability [J]. *Pharmacol Toxicol Methods*, 2000, 44: 235-249.
- [11] Rui TQ, Zhang L, Qiao HZ, et al. Preparation and physico-chemical and pharmacokinetic characterization of ginkgo lactone nanosuspensions for antiplatelet aggregation [J]. *J Pharm Sci*, 2016, 105: 242-249.
- [12] Perrut M, Jung J, Leboeuf F. Enhancement of dissolution rate of poorly-soluble active ingredients by supercritical fluid processes. Part I: micronization of neat particles [J]. *Int J Pharm*, 2005, 288: 3-10.
- [13] Möschwitzer JP, Müller RH. Factors influencing the release kinetics of drug nanocrystal-loaded pellet formulations [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2013, 39: 762-769.
- [14] Kalvakuntla S, Deshpande M, Attari Z, et al. Preparation and characterization of nanosuspension of aprepitant by H96 process [J]. *Adv Pharm Bull*, 2016, 6: 83-90.
- [15] Van Eerdenbrugh B, Van Den Mooter G, Augustijns P. Top-down production of drug nanocrystals: nanosuspension stabilization, miniaturization and transformation into solid products [J]. *Int J Pharm*, 2008, 364: 64-75.
- [16] Durham OZ, Shipp DA. Suspension thiol-ene photopolymerization: effect of stabilizing agents on particle size and stability [J]. *Polymer*, 2014, 55: 1674-1680.

正大天晴药业集团股份有限公司为国内肝健康药物研发和生产基地之一，是国家重点高新技术企业、国家火炬计划连云港新医药产业基地重点骨干企业、“国内最佳研发生产线”十佳工业企业（第2名）、江苏省创新型企业。企业效益连续多年增长30%以上并连续多年位居全国医药行业百强之列，且逐年上升，工信部发布的2012年度中国制药工业百强榜中，正大天晴排名第28位。

公司现有员工2750人，拥有5个全资子公司、6个控股子公司，在连云港、南京、盐城和淮安分别建有研发和生产基地。正大天晴药业产品治疗涉及肝病、肿瘤、糖尿病、呼吸、心脑血管、感染等多个疾病领域，在肝病药物研发领域具备突出优势，2013年肝病药物产品在国内医院市场占有率已达到19%（IMS）。

正大天晴一贯重视研发创新工作，始终把技术创新视为企业生命的源泉，经过40多年的发展和探索，逐步形成了完善的创新体系。目前拥有研发人员500余名，高级工程师23名，博士17名，硕士200余名，博士、硕士及具有高级技术职称的人员占40%以上，逐渐形成了以国家“千人计划”等高端人才组成的海归团队、博士项目创新团队、高工经验技术团队和专家学术支持团队几大人才梯队，承担着正大天晴药业的新药研发、工艺改造等一系列重要的科研任务。公司先后成功地研制了具有自主知识产权的肝病治疗药物，并成功完成了数十个科研成果的产业化。

“十五”以来，公司先后承担了国家、省重点科技项目30多个，通过这些重点项目的实施及产业化，加大了企业与科研院所之间学术交流、产品研究、技术支持、成果转让等方面的合作力度，使得企业创新能力及科技管理水平得到了明显提高，为公司的快速发展提供了有力的支持。