

载阿霉素柔性脂质体的性质及体外抗肿瘤效应*

郭春芳 张阳德 王吉伟** 潘一峰 廖明媚 王 宁

(中南大学卫生部肝胆肠外科研究中心 长沙 410008)

摘要 目的:通过比较膜软化剂的添加对阿霉素(doxorubicin, DOX)脂质体载药性能及体外肿瘤细胞杀伤活性的影响,评估柔性脂质体用于静脉给药的潜在应用价值。方法:以 DOX 为模型药物,膜水化法制备阿霉素传统脂质体(DOX-CL)及阿霉素柔性纳米脂质体(DOX-FNL)。葡聚糖凝胶层析柱法比较两种脂质体的包封率;膜透析法检测两种载体药物释放度;粒度分析仪测定不同 pH 和介质下两类脂质体的水动力学粒径、电位及多分散系数(Polydispersity index, PDI);MTT 法检测两类脂质体对人乳腺癌 MCF-7 肿瘤细胞的杀伤效率;流式细胞术(FCM)检测两类脂质体作用后 MCF-7 的细胞周期。结果:DOX-FNL 的包封率较传统脂质体高;在中性 pH 条件以及在纯水、生理盐水、PBS、RPMI-1640 培养液及 10% FBS RPMI-1640 培养液中,DOX-FNL 的悬浮稳定性更为优良;DOX 在中性 pH 下的释放度稍低于 DOX-CL ($P < 0.05$);MTT 法测得两类脂质体对 MCF-7 细胞的细胞抑制率差别不大,但 DOX-FNL 的细胞抑制作用更为持久 ($P < 0.05$);FCM 检测结果表明,DOX-FNL 主要将 MCF-7 细胞阻滞于 G0/G1 期,且效果明显强于 DOX-CL ($P < 0.05$)。结论:与传统脂质体相比,DOX-FNL 具有更高的药物包封率和稳定性。DOX-FNL 不但可通过对细胞周期的高效阻滞抑制肿瘤细胞的生长,其在细胞内的作用时间也明显长于 DOX-CL。

关键词 盐酸阿霉素 柔性脂质体 乳腺癌

中图分类号 Q54

纳米脂质体是一类能将药物包裹于磷脂双分子层内部的微型泡囊体,其外部的类脂质可以和细胞膜融合,进而将所携带的药物运输至细胞内部。在传统纳米脂质体的基础上,如果添加某些具有膜软化功能的成分如胆酸钠、脱氧胆酸钠等^[1],便可以得到另外一种新型脂质体—柔性纳米脂质体(flexible nanoliposomes, FNL)。公认的理论认为,膜软化剂的加入扰乱了脂质体双分子层磷脂酰基链的顺序,使得该类脂质体比传统纳米脂质体具有更强的变形性。

虽然使用 FNL 作为透皮给药制剂的应用价值已经得以公认,但对其在体内全身给药的应用研究还鲜见报道。为进一步探讨此类纳米药物载体的临床应用潜能,本研究选定蒽环类广谱抗生素盐酸阿霉素(doxorubicin HCl, DOX)为包载药物,以对 DOX 作用敏

感的乳腺癌 MCF-7 细胞系为研究对象,从不同角度对添加有膜软化剂的纳米脂质体的性能进行了初步分析。重点对纳米脂质体是否会因成分的增加而导致性质变化、具有高度变形性的 FNL 是否能更好的被肿瘤细胞吞噬、药物分子是否能更加容易的被转运至肿瘤细胞行使其肿瘤杀伤效应等进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 盐酸阿霉素购自武汉远城科技有限公司;卵磷脂购自国药集团化学试剂有限公司;胆固醇购自国药集团化学试剂有限公司;胆酸钠购自合肥博美生物科技有限公司;葡聚糖 G50 购自上海伯奥生物科技有限公司;四甲基偶氮唑蓝 MTT、Hyclone 改良型 RPMI-1640 培养液购自赛默飞世尔生物化学制品北京有限公司;新生牛血清购自 FBS,浙江天杭生物科技有限公司;MCF-7 乳腺癌细胞株购自中南大学湘雅医学

收稿日期:2013-01-24 修回日期:2013-01-31

* 国家自然科学基金资助项目(30870619)

**通讯作者,电子信箱:nanoscience@foxmail.com

院细胞培养中心提供;其他试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器 CO₂ 恒温培养箱购自日本 Sanyo; THZ-82B 气浴恒温振荡器购自江苏省金坛市医疗仪器厂; Zetasizer 激光粒度分析仪购自英国马尔文公司; 低速冷冻离心机购自 Sigma; 酶标仪购自 Multiskan Spectrum; 紫外分光光度计购自美国 Thermo 公司; 间断式超声仪购自 Fisher sonic Dismembrator Model 500; 流式细胞仪购自 Becton Dickinson. RE-52 旋转蒸发器购自上海青浦沪西仪器厂; WH-2 微型漩涡混合仪购自上海沪西分析仪器厂; 超声破碎乳化仪购自 Fisher Scientific 公司。

1.3 方法

1.3.1 DOX-FNL 的制备 采用改进的膜水化法, 将 300mg 卵磷脂与 100mg 胆固醇共溶 10ml 甲醇-氯仿(2:1, v/v) 混合液内。旋转蒸发成膜后, 用 10ml 含有 15mg DOX、100mg 胆酸钠的 PBS 液洗膜, 由此得到 DOX-FNL 多室混悬液。将 DOX-FNL 混悬液间断超声 10min(30%, 30s 开, 30s 关), 静置 5min 后, 0.22μm 聚碳酸酯膜过滤, 即得 DOX-FNL 悬浮液。DOX-CL 制备过程中未添加胆酸钠, 空白纳米脂质体制备中未加 DOX, 其他的制备条件同上。

1.3.2 脂质体的粒径、电位及多分散系数(PDI)的测定 取 DOX-CL、DOX-FNL 悬浮液, 稀释 10 倍后测定其粒径、电位和 PDI。

1.3.3 脂质体包封率(EE)的测定 配制 0.005, 0.010, 0.015, 0.020, 0.025, 0.030, 0.035mg/ml 的 DOX 溶液, 480nm 测定吸光度, 绘制药物标准曲线。葡聚糖凝胶柱层析法分离游离 DOX 和脂质体。层析条件: 凝胶柱为 Sephadex G50, 径高比 1.5:20, 双蒸水洗脱, 流速 1ml/min, 室温层析。0.5ml 样品上柱, 洗脱。收集 DOX-FNL 洗脱液, 每管 2ml, 0.1ml 乙醇破乳, 测 DOX 浓度(C₁)。另取样品 0.5ml, 乙醇破乳, 测定 DOX 总浓度(C₂): 包封率计算公式为: EE% = C₁/C₂ × 100%。

1.3.4 脂质体在不同介质中的稳定性 将 DOX-CL、DOX-FNL 悬浮于生理盐水、双蒸水、PBS、RPMI-1640 培养液以及 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液中。于 24h, 48h, 72h 测定粒径、电位和 PDI。

1.3.5 DOX-FNL 在不同酸碱度下的稳定性 将 DOX-CL 和 DOX-FNL 悬浮 pH 分别为 5.0 和 7.4 的 PBS 液中, 于 24h, 48h, 72h 测定其粒径、电位及 PDI。

取 0.5ml 的 DOX-CL 和 DOX-FNL 悬浮液于分子截留量为 10 000 ~ 14 000 的透析袋(上海宝曼生物科技有限公司), 置于 100ml PBS(pH 分别为 7.4 和 5.0)溶

液中, 室温下磁力搅拌。每日测量透析液中 DOX 浓度, 连续 3d。根据 DOX 标准曲线分别计算 PBS 中 DOX 的累积释放量 Q。另取 0.5ml DOX-CL 和 DOX-FNL, 乙醇破乳后测定 DOX 总量(Total Dissolved Solids, TDS)。

$$\text{累积释放量}(Q) = A_n + \frac{(A_{n-1} + \cdots + A_2 + A_1) \times V_1}{V_2}$$

其中, A_n 为各时间点的释放量, V₂ 为释放介质体积, V₁ 为取样体积。累积释放度(%) = Q/TDS × 100%。

1.3.6 DOX-FNL 对肿瘤细胞的毒性 将对数生长期的 MCF-7 细胞悬液取 1 × 10⁴/孔接种于 96 孔细胞培养板。5% CO₂, 37℃ 下培养 24h 后, 重新加入 200μl/孔含药培养液培养。设立调零组、空白组、DOX-CL 组、DOX-FNL 组。各组药物浓度分别为 0, 0.02, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6μg/ml, 每个浓度组设 3 个复孔。分别孵育 24h, 48h, 72h, 换新培养液 200μl/孔, 每孔加 5mg/ml MTT 溶液 20μl。孵育 4h, 弃培养液, 每孔加二甲基亚砷 150μl。37℃ 低速振荡 10min, 酶联免疫检测仪于 570 nm 波长测量各孔的吸光值。细胞抑制率 = [(对照组 OD_{570nm} - 实验组 OD_{570nm})/对照组 OD_{570nm}] × 100%。

1.3.7 DOX-FNL 对肿瘤细胞长期生存力的影响 将对数生长期的 MCF-7 细胞 1 × 10⁴/孔接种于 96 孔板 1 和 96 孔板 2。两板均设 0.6μg/ml DOX-CL 实验组、DOX-FNL 实验组, 游离 DOX 对照组、空白 FNL 对照组, 空白对照组和调零组, 每组 3 个复孔。72h 后, 板 1 MTT 法测量细胞存活率, 板 2 PBS 洗涤 2 次, 加入无药物培养液继续培养 72h, MTT 法分析各组细胞抑制率。

1.3.8 DOX-FNL 对细胞周期的影响 将 MCF-7 细胞制成 1 × 10⁵/ml 悬液接种六孔板, 每组 3 个复孔。贴壁后加入含有 1% FBS 的培养液培养 24h, 弃液, 用含 0.6μg/ml DOX-CL 和 DOX-FNL 的 10% FBS 培养液孵育 36h。设游离 DOX、空白 FNL 为对照组。收集细胞, 冷 PBS 洗涤 2 次, 4℃ 预冷的 70% 乙醇固定。离心, 3ml PBS 重悬 5min。400 目筛网过滤 1 次, 离心, 弃去 PBS。1ml PI 染液染色, 4℃ 避光 30min, 流式细胞测定细胞周期。

1.3.9 统计学分析 SPSS 17.0 单因素方差分析(One way ANOVA), 实验数据以均数 ± 标准差($\bar{X} \pm s$)表示, P < 0.05 具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 DOX-FNL 的表征分析

DOX 水溶液的线性回归方程式为: y = 19.652 92X

0.001 958, $r^2 = 0.99\ 824$ 。葡聚糖凝胶柱层析法测得 DOX-FNL 和 DOX-CL 封装率分别为 $55.4\% \pm 1.4\%$ 和 $40.21\% \pm 2.1\%$; DOX-FNL 的粒径、PDI 和电位分别为 $35.69 \pm 0.56\text{nm}$ 、 0.187 ± 0.021 和 $-43.14 \pm 1.21\text{mV}$; DOX-CL 的粒径、PDI 和电位分别为 $76.43 \pm 3.83\text{nm}$ 、 0.152 ± 0.003 和 $-7.18 \pm 0.33\text{mV}$ 。可以看出 DOX-FNL 的粒径较小,电位较高,较为稳定。

2.2 不同介质中 DOX-FNL 的稳定性分析

图 1 结果显示 DOX-FNL 在各种介质中悬浮后的粒径显著小于 DOX-CL($P < 0.05$),且电位明显偏高($P < 0.05$)。DOX-FNL 在双蒸水、生理盐水、RPMI1640 培养液及含有 10% FBS RPMI1640 培养液几种介质悬浮后,粒径、PDI 变化差异不大,但在 PBS 中悬浮 72h 后粒径、PDI 比 24h、48h 显著增大($P < 0.05$),而双蒸水中的电位最高。说明 DOX-FNL 在各种悬浮液中较 DOX-CL 稳定,但 PBS 不利于 DOX-FNL 的保存。

2.3 不同酸碱度对 DOX-FNL 性质的影响

表 1 4 结果显示两种脂质体在中性条件下粒径、PDI 均显著小于酸性($P < 0.05$),且电位较高,表明两种脂质体在中性条件下较稳定。DOX-FNL 的在中性条件下较 DOX-CL 粒径小,电位高($P < 0.05$),表明 DOX-FNL 在中性条件下较 DOX-CL 稳定。DOX-FNL 累积释放度低于 DOX-CL,但仍然达到较高水平。

表 1 不同 pH 对脂质体粒径的影响 (n=3,单位:nm)
Table1 The effect of pH to the particle size of liposomes

		24h	48h	72h
DOX-CL	5.0	74.20 ± 4.21	81.84 ± 3.40	106.40 ± 7.42
	7.4	63.89 ± 2.92 ^b	65.49 ± 3.97 ^b	67.83 ± 3.14 ^b
DOX-FNL	5.0	131.6 ± 4.20 ^a	112.3 ± 4.95 ^a	121.7 ± 6.85 ^a
	7.4	49.51 ± 1.36 ^{a,b}	41.27 ± 2.12 ^{a,b}	45.45 ± 4.55 ^{a,b}

表 2 不同 pH 对脂质体 PDI 的影响 (n=3)
Table 2 The effect of pH to the PDI of liposomes

		24h	48h	72h
DOX-CL	5.0	0.261 ± 0.024	0.283 ± 0.013	0.532 ± 0.012
	7.4	0.223 ± 0.019	0.245 ± 0.010 ^b	0.248 ± 0.017 ^b
DOX-FNL	5.0	0.451 ± 0.014 ^a	0.409 ± 0.019 ^a	0.480 ± 0.026 ^a
	7.4	0.286 ± 0.025 ^{a,b}	0.278 ± 0.016 ^{a,b}	0.295 ± 0.022 ^{a,b}

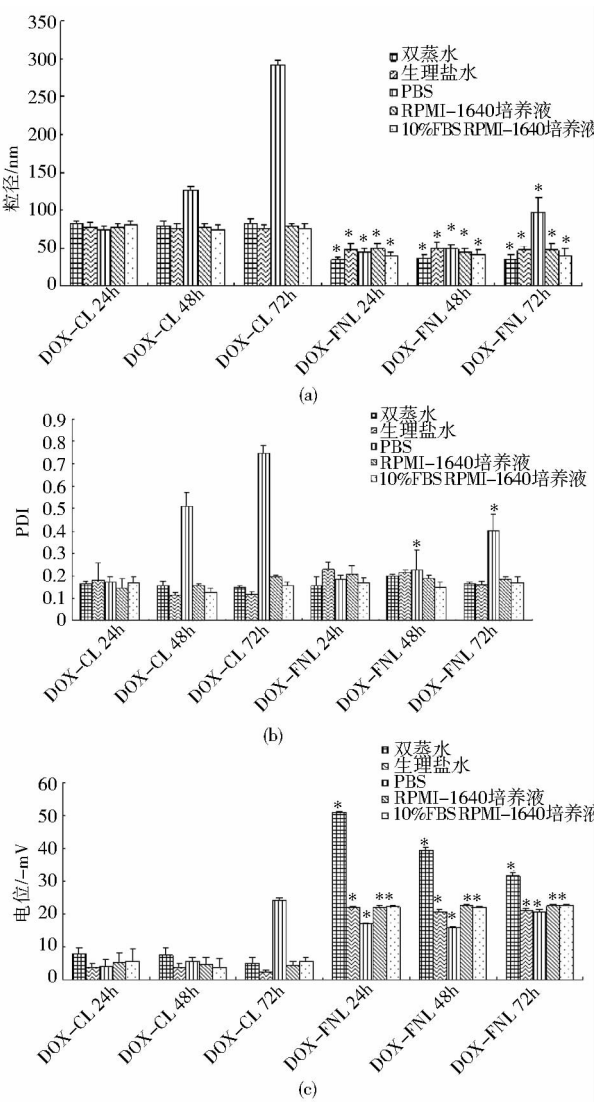


图 1 脂质体在不同介质中稳定性 (n=3)
Fig. 1 The stability of liposomes in different media (n=3)

(a) particle size (b) PDI (c) zeta potential
* VS DOX-CL group in the same media at the same time ($P < 0.05$)

表 3 不同 pH 对脂质体电位的影响 (n=3,单位:mV)
Table 3 The effect of pH to the zeta potential of liposomes

		24h	48h	72h
DOX-CL	5.0	-0.86 ± 0.14	-1.71 ± 0.95	-0.12 ± 0.01
	7.4	-5.54 ± 0.50 ^b	-7.16 ± 0.36 ^b	-5.65 ± 0.21 ^b
DOX-FNL	5.0	-14.63 ± 1.05 ^a	-14.57 ± 1.17 ^a	-14.40 ± 1.32 ^a
	7.4	-20.43 ± 1.32 ^{a,b}	-21.34 ± 1.20 ^{a,b}	-20.47 ± 1.63 ^{a,b}

表 4 不同 pH 对脂质体释放度的影响 (n=3)

Table 4 The effect of pH to the release of liposomes

		24h	48h	72h
DOX-CL	5.0	0.25 ± 0.03	0.64 ± 0.05	0.72 ± 0.02
	7.4	0.62 ± 0.02 ^b	0.82 ± 0.02 ^b	0.83 ± 0.01 ^b
DOX-FNL	5.0	0.44 ± 0.06 ^a	0.44 ± 0.03 ^a	0.45 ± 0.02 ^a
	7.4	0.63 ± 0.01 ^a	0.70 ± 0.08 ^{a,b}	0.71 ± 0.05 ^{a,b}

a VS DOX-CL group at the same pH ($P < 0.05$); b VS pH 5.0 ($P < 0.05$)

2.4 DOX-FNL 对肿瘤细胞的毒性

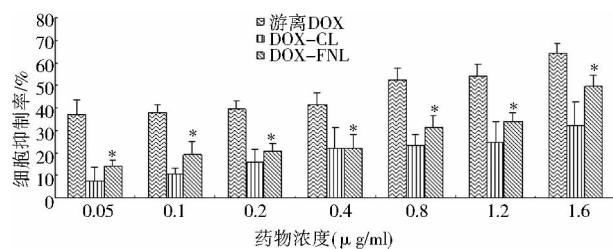


图 2 不同药物作用 MCF-7 细胞 24h (n=3)

Fig. 2 Different drugs treated MCF-7

cells for 24h (n = 3)

* VS free DOX group ($P < 0.05$)

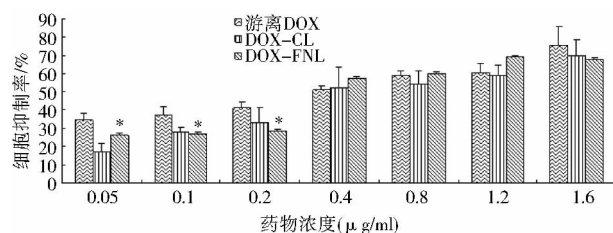


图 3 不同药物作用 MCF-7 细胞 48h (n=3)

Fig. 3 Different drugs treated MCF-7

cells for 48h (n = 3)

* VS free FNL group ($P < 0.05$)

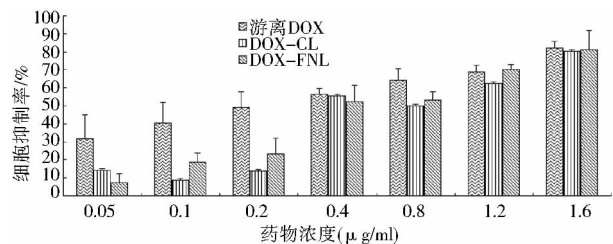


图 4 不同药物作用 MCF-7 细胞 72h (n=3)

Fig. 4 Different drugs treated MCF-7

cells for 72h (n = 3)

由图 2-4 结果表明,游离 DOX、DOX-CL 及 DOX-

FNL 对 MCF-7 细胞的抑制作用随时间及浓度上升。DOX-FNL 在 24h 内对细胞的抑制作用同 DOX-CL 无明显差异 ($P > 0.05$),但较游离 DOX 明显偏低 ($P < 0.05$)。DOX-CL 及 DOX-FNL 的细胞抑制率随药物作用时间增加而逐渐增加,最终同 DOX 的作用效果无明显差异 ($P > 0.05$)。提示 DOX-FNL 同 DOX-CL 在对肿瘤细胞有相同抑制作用的情况下对身体的副作用小。

2.5 DOX-FNL 对肿瘤细胞长期生存力的影响

图 5 结果显示游离 DOX 组、DOX-FNL 组和 DOX-CL 组对细胞都有一定的抑制作用。去药后用新鲜培养基培养 72h 后,3 组的细胞抑制率均持续上升,而去药培养 72h 后的 DOX-FNL 组细胞抑制率较游离 DOX 和 DOX-CL 组明显增强 ($P < 0.05$),说明 DOX-FNL 对 MCF-7 具有较好的长期抑制作用。

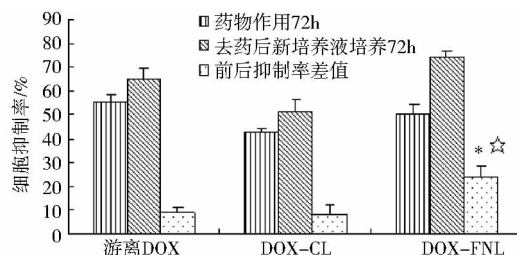


图 5 药物作用 MCF-7 细胞 72h 后

去药培养 72h (n=3)

Fig. 5 Drugs treated MCF-7 cells for 72h

and cultured for 72h (n = 3)

* VS free DOX group ($P < 0.05$);

☆ VS DOX-CL group ($P < 0.05$)

2.6 DOX-FNL 对 MCF-7 细胞生长周期的影响

图 6 结果显示,同空白对照组的细胞周期相比,游离 DOX 作用后的细胞主要阻滞于 S 期 (94.57%, 空白对照组 11.88%),而 DOX-FNL 同 DOX-CL 一样,主要将细胞阻滞于 G0/G1 期 (DOX-FNL 组 88.68%, DOX-CL 组 77.06%, 空白对照组 71.61%),但阻滞效果明显强于 DOX-CL ($P < 0.05$)。

纳米脂质体因其固有的生物相容性、可降解性及较小的毒性,已被广泛作为可经过口服、静脉注射、经皮给药等途径进入体内的药物载体。

FNL 具有高度变形性、高渗透性以及高亲水性等多种性质,主要由磷脂、胆固醇和膜软化剂制备而得。膜软化剂能增加药物载体膜性双分子层的弹性,主要包括胆酸钠、脱氧胆酸钠、司盘 60 等。大量研究表明, FNL 可将多种药物由皮肤外部转移至皮肤内层,并随

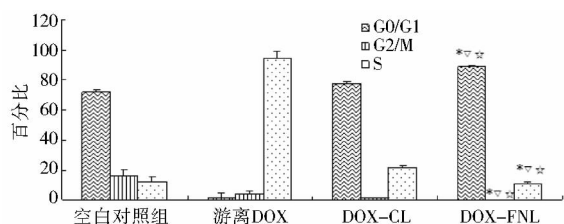


图6 药物对 MCF-7 细胞周期的影响 (n=3)

Fig. 6 The impact of drugs on MCF-7 cell cycle

* VS control group ($P < 0.05$); ▽ OS free DOX group ($P < 0.05$); ☆ CS DOX-CL group ($P < 0.05$)

后进入血液循环^[4]。目前,对 FNL 的研究主要集中于透皮给药方面^[2]。普遍的观点是:在透皮水化力的作用下,FNL 可通过自身挤压效应携带药物穿过角质层间区域。FNL 的透皮机制可分为 2 种:一种是以纳米脂质体作为药物载体,利用囊泡体将药物携带进入角质层的渗透梯度和水合力理论^[2]。另一种机制认为,FNL 可作为透皮增强剂改变细胞间脂质,使得药物分子较轻松的透过角质层^[3]。

迄今为止,已有众多学者成功地使用 FNL 包载了多种抗肿瘤药物^[5]。但不同的药物甚至同分异构体被此类载体包载后,均表现出不同的渗透效率。目前对于 FNL 的研究主要集中于透皮给药的研究^[6]。在口服给药研究领域,Huang 等^[7]首次成功地将 FNL 用于口服给药,并发现载儿茶酸 FNL 能有效突破血脑屏障,并表明其机制极有可能是通过大脑毛细血管内皮细胞的吞噬作用进入到脑内。Li 等^[8]通过鼻腔给药,也证明柔性脂质体载体穿过 BBB 的能力高于其他载体。但目前尚未见使用 FNL 包裹药物进行静脉给药的相关报道。

在本研究中,我们尝试将一种常用的广谱抗癌药物—DOX 载入 FNL,发现在中性 (pH 7.4) 条件下,此种携带有阿霉素的 FNL 比酸性 (pH 5.0) 条件下更为稳定。有鉴于肿瘤区域的微环境内呈酸性环境,此结果暗示,当 DOX-FNL 经静脉进入肿瘤组织后,可能会较正常组织范围内的 FNL 具有更快的释放药物潜能。同样,由于细胞内的溶酶体区域也为酸性环境^[9],进入溶酶体的 DOX-FNL 也可能在溶酶体吞噬以前释放出 DOX。

高价电位能保持脂质体的良好分散性,低于 -15mV 能导致纳米颗粒产生明显的聚集^[10]。实验中的 DOX-FNL 在中性条件下的电位高于此临界值,因而有

良好的稳定性。而 DOX-FNL 在各种介质中包括 10% FBS 血清的培养液的特征变化不大,则表明了 DOX-FNL 在 MTT 法测试毒性的过程中相对稳定。

两种脂质体对 MCF-7 细胞毒性测试表明 DOX-FNL 和 DOX-CL 能持续释放 DOX,而各种药物处理 MCF-7 细胞 72h 后检测得到的细胞存活率与去药后用新的 10% FBS 培养液培养 72h 后抑制率相比,DOX-FNL 对 MCF-7 细胞的抑制作用更持久,暗示加入了胆酸钠的盐酸 DOX-FNL 可能较其他药物具有更好的变形及融合 MCF-7 的细胞膜的能力,将盐酸 DOX 传递到胞内,发挥更好的疗效。Xie 等^[11]也认为,因脂质体的结构同细胞膜的结构相似,增加了 BBB 内皮细胞的亲和力,提高了药物传递效率。细胞周期分析发现游离 DOX 将 MCF-7 细胞阻滞于 S 期,而 DOX-FNL 及 DOX-CL 将 MCF-7 细胞阻滞于 G0/G1 期,这可能是因为水溶性的 DOX 进入磷脂双分子层较慢,对已经进入了 S 期的细胞进行 DNA 合成的抑制,而具有磷脂双分子层的 DOX-CL 和 DOX-FNL 因相似相容性能较快进入细胞,阻止了 RNA 和蛋白质的合成,从而将细胞阻滞于 G0/G1 期。

DOX-FNL 较 DOX-CL 显著将 MCF-7 的细胞周期阻滞于 G0/G1 期说明 DOX-FNL 可能具有更好的膜融合能力而快速的进入细胞内部。

3 结 论

综上所述,本研究提示柔性脂质体作为阿霉素抗癌药物的载体,不但能更有效地实现药物的高效包裹和细胞内转运,而且具有更为优良的靶向性抗肿瘤治疗效果。

参考文献

- [1] Mustafa M E, Ossama Y A, Viviane F N, et al. Lipid vesicles for skin delivery of drugs: reviewing three decades of research. *International Journal of Pharmaceutics*, 2007, 332: 1-16.
- [2] Gillet A, Lecomte F, Hubert P, et al. Skin penetration behaviour of liposomes as a function of their composition. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2011, 79: 43-53.
- [3] Honeywell N, Arenja, Bouwstra. Skin penetration and mechanisms of action in the delivery of the D2-agonist rotigotine from surfactant-based elastic vesicle formulations. *Pharm. Res.*, 2003, 20: 1619-1625.
- [4] Honeywell N, Bouwstra. The *in vitro* transport of pergolide from surfactant-based elastic vesicles through human skin: a suggested

- mechanism of action. J. Control. Release, 2003, 86: 145-156.
- [5] Zheng W S, Fang X Q, Wang L L, et al. Preparation and quality assessment of itraconazole transfersomes. International Journal of Pharmaceutics, 2012, 436: 291-298.
- [6] Pathomthat S, Phensri T, Uracha R, et al. Physico-chemical characteristics of methotrexate -entrapped oleic acid -containing deformable liposomes for in vitro transepidermal delivery targeting psoriasis treatment. International Journal of Pharmaceutics, 2012, 427: 426-434.
- [7] Huang Y B, Tsai M J, Wu P C, et al. Elastic liposomes as carriers for oral delivery and the brain distribution of (+) - catechin. Journal of Drug Targeting, 2011, 19(8): 709-718.
- [8] Li W Z, Zhou Y Q, Zhao N, et al. Pharmacokinetic behavior and efficiency of acetylcholinesterase inhibition in rat brain after intranasal administration of galanthamine hydrobromide loaded flexible liposomes. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2012, 34: 272-279.
- [9] Torchilin V P, Weissig V. 脂质体. 第二版, 北京: 化学工业出版社, 2005: 208.
- Torchilin V P, Weissig V. Liposomes. 2^{ed}. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 208.
- [10] Kaur I P, Bhandari R, Bhandari S, et al. Potential of solid lipid nanoparticles in brain targeting. J Control Release, 2008, 127: 97-109.
- [11] Xie Y, Ye L, Zhang X, et al. Transport of nerve growth factor encapsulated into liposomes across the blood brain barrier: in vitro and in vivo studies. J Control Release, 2005, 105: 106-119.

Characterization and the Anti-tumor Effect of Doxorubicin Flexible Liposome *in vitro*

GUO Chun-fang ZHANG Yang-de WANG Ji-wei PAN Yi-feng LIAO Ming-mei WANG Ning

(Ministry of Health Hepatobiliary & Enteric Surgery Research Center, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract Objective: To evaluate the potential application of flexible nanoliposomes containing membrane softening agent in intravenous administration by comparing doxorubicin (DOX) load capability and tumor cell inhibition of different nanoliposomes. Methods: Traditional liposomes (DOX-CL) and flexible nanoliposomes (DOX-FNL) were prepared by film hydration method with DOX as a model drug. Encapsulation efficiency of liposomes were investigated by Dextran gel chromatography column method. The hydrodynamic size, zeta potential and polydispersity index (PDI) of liposomes in different pH condition and media were characterised by particle size analyzer. The drug release of two liposomes in vitro were detected with membrane dialysis method. The human breast cancer MCF-7 cell viability of two liposomes were investigated with MTT assay. The cell cycle changes of MCF-7 cells induced by DOX-CL and DOX-FNL were detected by flow cytometry. Results The encapsulation efficiency of DOX-FNL was higher than DOX-CL, and the DOX-FNL had more excellent suspension stability in neutral pH conditions, water, physiological saline, PBS and RPMI-1640 culture medium with/without 10% FBS. The release rate of two liposomes was no significant difference ($P > 0.05$) in different pH conditions. The cytotoxic detection results showed that the inhibition of MCF-7 cells was hardly different between DOX-CL and DOX-FNL, while tumor cell killing effect of DOX-FNL was more endurable than DOX-CL ($P < 0.05$). The FCM detection results showed that the cell cycle of MCF-7 arrested in G0/G1 phase by DOX-FNL was similar as the DOX-CL, moreover, DOX-FNL is more effective than DOX-CL ($P < 0.05$). Conclusion DOX-FNL has higher drug encapsulation efficiency and stability than DOX-CL. DOX-FNL can affect the cell cycle, and its drug action time is significantly higher than DOX-CL.

Key words Doxorubicin hydrochloride Flexible nanoliposomes Breast cancer