

# 异长春花碱脂质体的制备及安全性评价

程岚<sup>1</sup>, 李学涛<sup>1\*</sup>, 唐凌<sup>2</sup>

(1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600; 2. 大连医科大学, 辽宁 大连 116044)

**[摘要]** 目的: 制备异长春花碱(vinorelbine VRB)脂质体, 并对其安全性进行初步评价。方法: 采用薄膜分散法制备 VRB 脂质体, 对 VRB 脂质体的急性毒性、血管刺激性及溶血性等安全因素进行考察, 并以 VRB 注射液为对照, 比较 2 种制剂的半数致死量(LD<sub>50</sub>)、溶血性及血管刺激性等指标。结果: 所制备的 VRB 脂质体平均粒径 158.3 nm, 包封率为 85.3%; VRB 脂质体及注射液的 LD<sub>50</sub> 分别为 16.02, 4.16 mg·kg<sup>-1</sup>; 与注射液比 VRB 脂质体不引起家兔溶血和红细胞聚集反应, 静脉注射对家兔血管刺激性较 VRB 注射液减轻。结论: 所制备的 VRB 脂质体粒径均匀, 形态圆整, 包封率符合《中国药典》要求, 并且和注射液比具有较高的安全性。

**[关键词]** 异长春花碱; 脂质体; 安全性; 血管刺激性; 溶血性

**[中图分类号]** R965.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)20-0241-04

## Preparation and Safety Evaluation of Vinorelbine Liposems

CHENG Lan<sup>1</sup>, LI Xue-tao<sup>1\*</sup>, TANG Ling<sup>2</sup>

(1. Medicine Institute of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China;  
2. Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

**[Abstract]** **Objective:** To prepare the vinorelbine liposomes (VL) and investigate its safety. **Method:** Liposomes was prepared by thin-film ultrasonication method. The acute toxicity of VL was evaluated in Kunming mice. Its vein irritation and hemolysis was characterized in rabbits. Vinorelbine injection (VI) was taken as the control. LD<sub>50</sub>, vein irritation and hemolysis of these two preparations was compared. **Result:** The particle size of the liposome was 158.3 nm; The bilayer of the liposome was seen clearly; and the entrapment efficiency was 85.3%. The LD<sub>50</sub> of VL and VI in mice was 16.02, 4.16 mg·kg<sup>-1</sup> respectively. None of hemolysis, hemagglutination and vein irritation was observed after intravenous injection of VL into rabbits. **Conclusion:** Compared with VI, VL was safer and more efficient.

**[Key words]** vinorelbine; liposome; safety; vein irritation; hemolysis

**[收稿日期]** 20110303(001)

**[基金项目]** 辽宁中医药大学青年药学人才基金(yxrc0911)

**[第一作者]** 程岚, 在读博士, 硕士研究生导师, 新药开发, Tel: 0411-87586010, E-mail: sychenglan@163.com

**[通讯作者]** \* 李学涛, 讲师, 新型给药系统的研究, Tel: 0411-87586010, E-mail: lixuetao1979@yahoo.cn

肝、肾毒性的体外细胞评价方法, 或是研究辅料毒性的有效手段, 值得在进一步研究中探索。

### [参考文献]

[1] 马力, 林治卿, 张华山, 等. 非暴露式气管滴注 3 种典型纳米材料对大鼠肝、肾的毒性效应[J]. 生态毒理学报, 2008, 3(6): 584.

[2] 林本成, 裘著革, 张英鸣, 等. 三种纳米材料致大鼠肝肾损伤初步研究[J]. 卫生研究, 2008, 37(6): 651.

[3] 吴毅, 金少鸿. 药物辅料吐温 80 的药理、药动学及分析方法研究进展[J]. 中国药事, 2008, 22(8): 717.

[4] 何永亮, 易勇, 王红星, 等. 含吐温 80 中药注射剂对犬致过敏的研究[J]. 中药药理与临床, 2005, 21(1): 55.

[责任编辑 聂淑琴]

异长春花碱(vinorelbine, VRB)可以通过作用于肿瘤细胞微管蛋白而干扰肿瘤细胞代谢,临床主要用于治疗非小细胞肺癌、急性淋巴细胞白血病、转移性乳腺癌、也用于何杰金及非何杰金淋巴瘤,软组织肉瘤及神经母细胞瘤等<sup>[1]</sup>。但 VRB 具有一定的血管刺激性和神经系统等副作用,如何减小其刺激性和副作用是制剂学研究的主要任务之一。本研究以 VRB 注射液为对照,对 VRB 脂质体的急性毒性、血管刺激性及溶血性等安全因素进行了考察。

## 1 材料

**1.1 仪器与试剂** RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),DF2101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器(河南巩义市予华仪器厂),Mastersizer 2000 型粒径分析仪(Malvern Instruments Ltd.),Anke TDL-500B 型离心机(上海安亭科学仪器厂),TCQ-250 型超声波清洗器(中船七院七二六所),自动双重纯水蒸馏器(上海申立玻璃仪器有限公司)。

VRB 脂质体(辽宁中医药大学自制,批号 081101),VRB 注射液(法国皮尔法伯制药公司),生理盐水(上海百特医疗用品有限公司),Sephadex G-50(上海华蓝化学科技有限公司),蒸馏水(自制),其它试剂均为分析纯。

**1.2 动物** 新西兰家兔 8 只,体重(2.5 ± 0.5) kg,雌雄各半;昆明种小鼠 120 只,体重(20 ± 0.5) g,雌雄各半,均由辽宁中医药大学实验动物中心提供,合格证号分别为 SCXK(辽)2008-0002 和 SCXK(辽)2008-0001。

## 2 方法与结果

**2.1 VRB 脂质体的制备** 取 VRB 10 mg,卵磷脂 80 mg,胆固醇 39 mg 溶于 10 mL 三氯甲烷中,39.5 °C 下减压旋转蒸发 60 min 除去三氯甲烷,保持水浴温度 39.5 °C,将形成的均匀白色薄膜加入 pH 7.6 磷酸盐缓冲液至 25 mL,水化 30 min,超声 20 min(50 kHz),过 0.45 μm 微孔滤膜,即得<sup>[2]</sup>。

**2.2 VRB 脂质体的粒径分布** 精密移取 VRB 脂质体 0.5 mL,以 5% 葡萄糖注射液稀释至 20 mL,用马尔文激光粒度仪进行测定,以微粒的个数作为基准,测定其粒径并绘制粒径分布图,所测得微粒的平均粒径为 158.3 nm,粒径分布图见图 1。

**2.3 VRB 脂质体的微观形态观察** 采用磷钨酸负染色法观察脂质体微粒的微观形态:移取 VRB 脂质体 0.1 mL,加蒸馏水稀释至 5.0 mL,混匀。取 1 滴

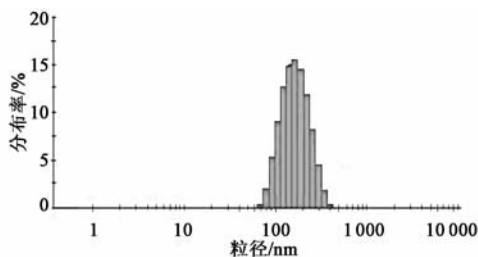


图 1 VRB 脂质体粒径分布图

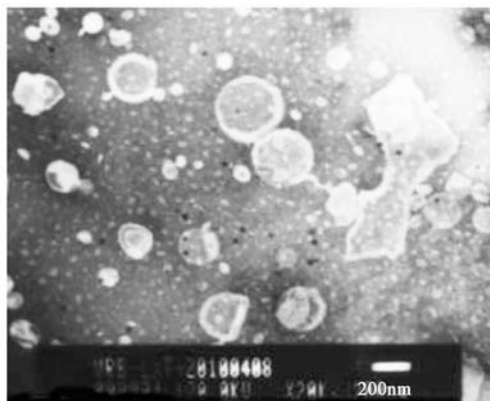


图 2 VRB 脂质体透射电镜图(×2 万)

稀释后的脂质体溶液置特制铜网上,静置 5 min,滴加 1% 磷钨酸负染色,用滤纸吸去多余染色液,在电镜下观察脂质体微粒的形态和大小,并照相,电镜观察照片见图 2。

**2.4 溶血试验** 取家兔血液 10 mL 置于涂有肝素的离心管中,在 3 000 r·min<sup>-1</sup> 条件下离心 20 min,弃去上层血浆,下层红细胞用生理盐水冲洗 5 次,每次 10 mL,每次冲洗后离心除去上清液,直至上清液不呈红色为止,然后吸取一定量红细胞,用生理盐水按体积比稀释制备 2% 红细胞混悬液,4 °C 冰箱中冷藏备用。取试管 7 支,编号为 0,1,2,3,4,5,6 号,每只试管分别加 2% 红细胞混悬液 2.5 mL,0-4 号管作为供试品试管,5 号管作为阴性对照试管,6 号管作为阳性对照试管<sup>[3]</sup>。按表 1 所示依次加入相应的溶液,混匀后,立即置(37 ± 0.5) °C 的恒温箱中进行温育,开始每隔 15 min 观察 1 次,1 h 后,每隔 1 h 观察 1 次,连续观察 3 h。按下述标准记录结果:全部溶血(++) :溶液呈澄明红色,试管底部无红细胞残留;部分溶血(+ -) :溶液呈淡黄色或浅红色。试管底部无红细胞残留或有少量红细胞残留;不溶血(-) :上清液为无色澄明或淡黄色,红细胞全部下沉。试验方法见表 1。

表1 溶血试验方法

试剂	编号						
	0	1	2	3	4	5	6
生理盐水/mL	2.0	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	0
蒸馏水/mL	0	0	0	0	0	0	2.5
VRB 脂质体/mL	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0	0
VRB 注射液/mL	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0	0
2% 红细胞/mL	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

\*注:试验中 VRB 脂质体与 VRB 注射液任选其中 1 种。

结果阴性对照管无溶血,阳性对照管全部溶血;不同剂量的 VRB 脂质体均无溶血作用;而 VRB 注射液 0.5 mL 组可见溶液呈淡黄色,试管底部有少量红细胞残留。表明 VRB 注射液有轻微的溶血作用,VRB 脂质体不会引起溶血与红细胞聚集。

**2.5 急性毒性 LD<sub>50</sub>** 取昆明种小鼠,雌雄各半,体重 18~22 g,随机分为 12 个剂量组,每组 10 只,各组间雌雄、体重均衡。给药前称各鼠体重。根据预试验结果:脂质体分为 5 个剂量组,相邻剂量组之间比例为 1:0.8,最高剂量组定为 32.00 mg·kg<sup>-1</sup>,最低剂量组定为 10.48 mg·kg<sup>-1</sup>;注射液分为 5 个剂量组,相邻剂量组之间比例为 1:0.8,最高剂量组定为 7.60 mg·kg<sup>-1</sup>,最低剂量组定为 2.50 mg·kg<sup>-1</sup>,分别采用小鼠尾静脉注射 VRB 脂质体和 VRB 注射液。注射前禁食 12 h,但不禁水<sup>[4]</sup>。给药后观察各组小鼠的一般状况,主要观察指标包括呼吸变化、活动度和频率变化、有无抽搐、条件和非条件反射的改变、眼毒症状、外周血管改变的表现、肌张力、胃肠道、尿道和皮肤症状,观察 2 周<sup>[5]</sup>。记录各组小鼠死亡数。实验过程中小鼠的死亡情况见表 2~3。

表2 VRB 脂质体组小鼠死亡情况(n=10)

组别	剂量	死亡数	死亡率
	/mg·kg <sup>-1</sup>	/只	/%
1	10.48	0	0
2	13.11	3	30
3	16.38	5	50
4	20.48	7	70
5	25.60	8	80
6	32.00	10	100

上述实验结果按照寇氏法公式计算 VRB 脂质体和 VRB 注射液的 LD<sub>50</sub> 及 95% 的可信区间,结果 VRB 脂质体和 VRB 注射液的 LD<sub>50</sub> 分别为 17.13, 4.16 mg·kg<sup>-1</sup>,其 95% 的可信区间分别为 13.76~20.50, 3.39~4.93 mg·kg<sup>-1</sup>。

表3 VRB 注射液组小鼠死亡情况

组别	剂量	死亡数	死亡率
	/mg·kg <sup>-1</sup>	/只	/%
1	2.50	0	0
2	3.12	1	10
3	3.91	5	50
4	4.88	7	70
5	6.08	9	90
6	7.60	10	100

**2.6 血管刺激性** 取家兔 9 只,随机分为 3 组,每组 3 只:第 1 组家兔每日耳缘静脉滴注生理盐水注射液 20.0 mg·kg<sup>-1</sup>,第 2 组每日耳缘静脉滴注 VRB 脂质体 20.0 mg·kg<sup>-1</sup> (0.1 g·L<sup>-1</sup>),第 3 组每日耳缘静脉滴注 VRB 注射液 20.0 mg·kg<sup>-1</sup> (0.1 g·L<sup>-1</sup>)。连续滴注 7 d,末次给药后 24 h,木棒击毙,剪取距注射部位 1,3 cm 处兔耳,置于 10% 福尔马林溶液中固定,石蜡包埋,HE 染色。光镜下观察药物对兔耳血管的刺激性反应<sup>[6]</sup>。观察注射部位兔耳静脉血管扩张充血、血栓形成、水肿及炎性细胞浸润等改变。根据病变轻重程度不同,依次标记为:“-”,“+”,“++”,“+++”。组织正常用“-”表示;有改变者用“+”表示:“+”表示轻度,指改变范围小(<切片面积 30%);“++”表示重度,指改变范围大(>切片面积 60%);“+++”表示中度,指改变范围介于轻度与重度之间者。

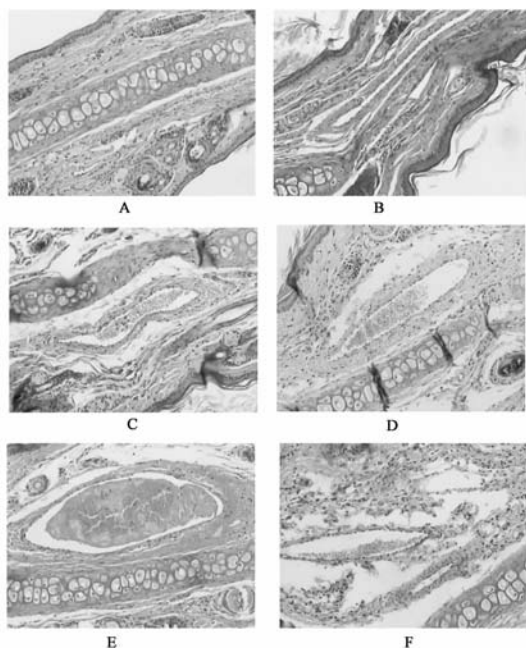
由表 4 及图 3 可见:第 1 组(1 cm)兔耳缘静脉可见轻度充血,(3 cm)未见有明显异常;第 2 组(1 cm)兔耳缘静脉可见轻度充血和少量中性粒细胞,(3 cm)只见轻微充血;第 3 组(1 cm)兔耳缘静脉可见血管扩张充血、有纤维蛋白形成、局部血管坏死、间质出血,(3 cm)血管扩张充血、间质有出血及少量炎细胞浸润现象。结果显示:每组距离注射部位不同的血管病理改变情况不同,随着距离的增加药物对血管的刺激性明显降低;脂质体组与注射液组相比,兔血管炎性细胞浸润、充血、水肿均明显减轻。该结果可能与将刺激性的药物采用磷脂膜材包载后可以减少了药物与血管的直接接触的机会,从而降低了药物对血管的直接刺激性有关。

### 3 讨论

脂质体作为新型的靶向载体,可以明显降低抗肿瘤药物的毒性和副作用,提高药物的靶向分布和疗效。所以脂质体在临床应用(特别在抗肿瘤药物

表 4 各组病理组织学检查

组别	注射部位/cm	充血	血栓	水肿	出血	炎症细胞浸润	硬结	坏死
生理盐水组	1	+	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-
VRB 脂质体	1	+	-	-	-	+	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-
VRB 注射液	1	+++	-	+	+	+++	+	+
	3	+++	-	+	+	+	-	-



A. 生理盐水 iv(1 cm); B. 生理盐水 iv(3 cm); C. 耳缘 iv VRB 脂质体  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (1 cm); D. 耳缘 iv VRB 脂质体  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (3 cm); E. 耳缘 iv VRB  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (1 cm); F. 耳缘 iv VRB  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (3 cm)

图 3 家兔耳缘静脉病理切片

的临床应用)方面具有广阔的发展前景。本文考察了 VRB 脂质体的制备工艺并对 VRB 脂质体的安全性进行了评价,为其长期毒性试验和临床研究提供试验依据。

VRB 属于二吡啶类生物碱,作者曾分别对 VRB 脂质体制备方法进行了考察,结果采用薄膜分散法所制备脂质体的包封率较高。激光粒度分析仪测定了脂质体的平均粒径为  $158.3 \text{ nm}$ ,采用磷钨酸负染色法观察脂质体的微观形态,透射电镜观察结果显示所制备的脂质体外观圆整,大小均匀,可以明显观察出脂质体的双分子层结构(图 2)。

$LD_{50}$ 是反映急性毒性大小的一个重要指标,一

般来说,毒性大的物质其  $LD_{50}$ 较小,毒性小的物质其  $LD_{50}$ 较大,但它不能作为判定化学物质安全性的唯一依据。化学物质的毒性大小除了  $LD_{50}$ 这个指标外,还与物质中毒死亡的时间、最长致死时间和平均致死时间等许多因素有关,而且不同实验条件下,同一物质得到的  $LD_{50}$ 值不同,所以  $LD_{50}$ 只能作为进一步毒理实验的参考依据。

VRB 注射液临床应用使用不当容易引起静脉炎等副作用<sup>[7]</sup>,在临床使用完毕后,需要用生理盐水冲洗静脉,以减轻药物对血管的刺激。通过药物的血管刺激性试验发现:将药物制备成脂质体后,药物对家兔血管所致的炎症细胞浸润、充血、水肿等现象均明显减轻。可能与药物被脂质体包载后减少了药物与血管的直接接触的机会,从而降低了药物对血管的刺激有关。

### [参考文献]

[1] 张湘茹,孙燕.新抗肿瘤药异长春花碱[J].北京医学,1992,14(3):171.  
 [2] 宋力,范文源.优福定脂质体的处方与工艺优化[J].中国药房,2007,18(19):1479.  
 [3] 陈奇.中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,1996:168.  
 [4] 陈帅君,谢民强,王蕾,等.顺铂磁性纳米药物的安全性评价[J].中国药房,2008,19(25):1941.  
 [5] 田维维,刘清飞,罗国安,等.卡铂前体脂质体的制备及安全性的初步评价[J].中国新药杂志,2006,15(13):1070.  
 [6] 钱之玉.药理学实验与指导[M].北京:中国医药科技出版社,2003:153.  
 [7] 龚珍珠,王霞,熊建萍,等.异长春花碱致静脉反应预防体会[J].江西医药,2006,41(12):1047.

[责任编辑 聂淑琴]