

地塞米松脂质体的制备及其对乳腺癌作用的体内外研究

敖惠¹, 李好文¹, 王一安¹, 付婧欣¹, 王向涛¹, 杨春静^{2*}

1. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193

2. 河南中医药大学第三附属医院, 河南 郑州 450003

摘要: **目的** 制备地塞米松脂质体, 探讨地塞米松对乳腺癌 4T1 细胞的生长抑制作用及对荷瘤鼠的抗肿瘤药效。**方法** 采用薄膜分散-超声法, 以粒径和多分散指数 (PDI) 为指标进行单因素实验考察了大豆磷脂 (SPC) 与甲氧基聚乙二醇磷脂 (DSPE-mPEG2000) 的质量比、SPC 与地塞米松的质量比、超声时间对地塞米松脂质体粒径的影响从而筛选得到最佳处方和最佳工艺条件。采用 MTT 法比较地塞米松注射液和地塞米松脂质体对 4T1 细胞的作用。建立 4T1 BAL B/c 荷瘤小鼠模型, 研究地塞米松脂质体对 4T1 荷瘤小鼠的体内抗肿瘤作用。**结果** 当 SPC 与 DSPE-mPEG2000 质量比为 5:1、SPC 与地塞米松质量比为 50:3、超声时间为 20 min 时制备得到的脂质体粒径最小, 粒径分布最窄, 室温放置 15 d 稳定, 于生理介质中稳定。MTT 测定结果显示地塞米松注射液和脂质体对 4T1 细胞生长抑制作用均较弱, 但在 4T1 荷瘤鼠的体内实验中, 在 5 mg/kg 的给药剂量下, 地塞米松脂质体的抑瘤率却高达 78.9%, 显著高于地塞米松注射液 (33.4%, $P < 0.05$) 和 8 mg/kg 紫杉醇注射液 (55%, $P < 0.05$)。**结论** 制备的地塞米松脂质体放置于生理介质中均能稳定存在, 能口服能静脉给药。地塞米松脂质体对 4T1 荷瘤小鼠肿瘤生长有较强的抑制作用, 但体外对 4T1 细胞抑制作用并不强, 推测地塞米松脂质体是通过调节肿瘤微环境来抑制肿瘤生长。

关键词: 地塞米松脂质体; 制备; 乳腺癌 4T1 细胞; 肿瘤抑制

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2020)02-0222-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.02.006

Preparation of dexamethasone liposome and its effects on breast cancer *in vitro* and *in vivo*

AO Hui¹, LI Hao-wen¹, WANG Yi-an¹, FU Jing-xin¹, WANG Xiang-tao¹, YANG Chun-jing²

1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

2. The Third Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China

Abstract: **Objective** To prepare long-circulating dexamethasone liposomes and investigate its inhibitory effect on the growth of breast cancer 4T1 cells and its anti-tumor effect on tumor-bearing mice. **Methods** The film dispersion-ultrasonic method was used to conduct single-factor experiments with particle size and polydispersity index (PDI) as indicators to investigate the effect of mass ratio of SPC to DSPE-mPEG2000, mass ratio of SPC to dexamethasone and ultrasound time on particle size to screen for the best prescription and the best process conditions. The effects of dexamethasone injection and dexamethasone liposomes on 4T1 cells were compared by MTT assay. 4T1 BAL B/c tumor-bearing mice model was established and the anti-tumor effect of dexamethasone liposome on 4T1 tumor-bearing mice *in vivo* was studied. **Results** When the mass ratio of SPC to DSPE-mPEG2000 was 5:1, the mass ratio of SPC to dexamethasone was 50:3, and the ultrasonic time was 20 min, dexamethasone liposome had the smallest particle size and the narrowest particle size distribution, stable at room temperature for 15 d and stable in physiological medium. MTT data showed that both dexamethasone injection and dexamethasone liposome had a weak inhibitory effect on the growth of 4T1 cells, but the inhibition rate of dexamethasone liposome was 78.9% at 5 mg/kg dosage *in vivo*, significantly higher than that of dexamethasone injection (33.4%, $P < 0.05$) and Paclitaxel injection at 8 mg/kg (55%, $P < 0.05$). **Conclusion** Dexamethasone liposome can exist stably in physiological medium and can be administered orally and intravenously. Dexamethasone liposome have a strong inhibitory

收稿日期: 2019-10-09

基金项目: 国家自然科学基金 - 广东联合基金资助项目 (U1401223)

作者简介: 敖惠 (1995—), 女, 江西高安人, 博士研究生, 研究方向为纳米给药系统及靶向递送。Tel: (010)57833264 E-mail: aohui2436@163.com

*通信作者 杨春静, 主任药师, 主要从事临床药学工作。E-mail: ycj5951@163.com

effect on the tumor growth of 4T1 tumor-bearing mice, but the inhibitory effect on 4T1 cells is not strong *in vitro*. It is speculated that dexamethasone liposome inhibit the growth of tumors by regulating the microenvironment of tumors rather than killing them directly.

Key words: dexamethasone liposome; preparation; breast cancer 4T1 cell; tumor suppression

地塞米松是人工合成的糖皮质激素,具有抗病毒、抗风湿、抗过敏、抗炎作用,临床上主要用于过敏性、自身免疫性疾病,如皮肤性疾病、过敏反应、哮喘、风湿类疾病、慢性阻塞性肺疾病、结核病和其他严重的感染性疾病的治疗^[1]。近年来,地塞米松在抗肿瘤方面的应用也越来越多,可以缓解癌症患者化疗后的不良反应,提高患者生活质量^[2];作为抗肿瘤药物的增敏剂,提高药物的治疗效果,如 Wang 等^[3]用地塞米松预处理 4T1 荷瘤小鼠后再进行阿霉素治疗,可增加阿霉素在肿瘤部位的累积,调节了肿瘤部位细胞因子的表达,增强了阿霉素对肿瘤的抑制作用;作为抗肿瘤药物用于某些癌症,如宫颈癌^[4]、人非小细胞肺癌^[5]、乳腺癌^[6]等。王晶等^[7]对小鼠 Lewis 肺癌模型分别腹腔注射顺铂和地塞米松,发现给药组肿瘤质量均与对照组有显著差别,提示地塞米松能够抑制 Lewis 肺癌的生长。地塞米松是一种水难溶性的化合物,临床上常见的多为地塞米松磷酸钠或醋酸酯形式,在抗肿瘤研究中也多为地塞米松注射剂或将地塞米松原料药溶于分散介质中使用。由于机体对地塞米松的快代谢作用,需要使用大剂量的地塞米松才能实现良好的抗肿瘤作用^[4]。而且地塞米松在抗肿瘤研究中,常与具有抗肿瘤活性的化疗药物联用。纳米技术是提高药物水溶性的有效技术手段,目前地塞米松纳米制剂主要有地塞米松胶束^[8](用于类风湿性关节炎研究)、地塞米松纳米粒^[9](用于白血病研究)、地塞米松脂质体^[6](仍需与化疗药物联合使用),用于乳腺癌的地塞米松纳米制剂研究甚少。此外地塞米松长期在药理剂量下使用往往会有较多的不良反应,如骨质疏松、糖尿病、易感染、白内障、高血压、脂肪再分布等,且地塞米松的抗炎作用、免疫抑制作用可诱发或加重感染,导致免疫力下降,特殊群体如老人、儿童、孕妇需谨慎使用^[10]。因此本研究制备了能够静脉给药的长循环地塞米松脂质体,探讨单独给药时对乳腺癌 4T1 荷瘤鼠的抑瘤效果以及与地塞米松注射液的对比如,为地塞米松的临床抗肿瘤应用提供参考。

1 仪器与材料

Mettler Toledo AL204 电子天平(梅特勒-托利

多仪器有限公司); SHB-IIIS 循环水式多用真空泵(北京世纪予华仪器有限公司); RE-52CS 旋转蒸发器(上海振捷实验设备有限公司); MX-S 涡旋混匀仪(美国 Scilogex 仪器公司); Zetasizer nano ZS 型粒度仪(英国 Malvern Instruments 公司); RJ-TGL-16C 型高速台式离心机(无锡市瑞江分析仪器有限公司); UltiMate 3000 高效液相色谱仪(美国 Dionex 仪器公司); MCA-15AC 细胞培养箱(日本 Sanyo 公司); KQ3200DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Tecan Infinite M1000 PRO 多功能酶标仪(北京科学仪器有限公司)。

地塞米松(南京春秋生物工程有限公司,质量分数 98%,批号 100129-200804);地塞米松磷酸钠注射液(辰欣药业股份有限公司,规格 1 mL:5 mg,批号 1703016111);大豆磷脂(SPC,沈阳天峰生物制药有限公司,批号 SY-SI-170401);甲氧基聚乙二醇磷脂(DSPE-mPEG2000,上海拓旻生物有限公司,质量分数 95%);氯仿(北京化工厂,质量分数>99%,批号 20170619);甲醇、乙腈(色谱纯,美国 Fisher 公司,批号分别为 110301、106246);磷酸盐缓冲溶液(PBS)、RPMI 培养基(美国 HyClone 公司,批号分别为 AC13298279、AD15805337);二苯基四氮唑溴盐、青霉素混合液(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 413Y0513、20180807);胎牛血清、胰酶(美国 Gibco 公司,批号分别为 1932595、1928609);紫杉醇注射液(PTX,北京协和药厂,批号 170906)。

4T1 细胞购自国家实验细胞资源共享服务平台;32 只 6~8 周龄的 BAL B/c 雌鼠购自北京维通利华动物有限公司,SPF 级,体质量(20±2)g,合格证号 11400700215055,许可证编号 SCXK(京)2016-0011。

2 方法与结果

2.1 地塞米松脂质体的制备^[6]

采用薄膜分散-超声法制备地塞米松脂质体。按照一定比例称取 SPC、DSPE-mPEG2000、地塞米松,共溶于 20 mL 氯仿-甲醇(9:1)中,45℃ 旋转蒸发 10 min,除去有机溶剂形成薄膜,加入磷酸盐缓冲液,涡旋振荡,250 W 超声一定时间,即

得地塞米松脂质体。以粒径大小、多分散指数(PDI)值为指标,采用单因素试验对SPC与DSPE-mPEG2000的比例、SPC与地塞米松的比例、超声时间进行了筛选。

2.1.1 SPC与DSPE-mPEG2000质量比的确定 保持其他条件不变,将SPC与DSPE-mPEG2000的质量比设定为3:1、4:1、5:1、6:1分别制备4个地塞米松脂质体,测定粒径和PDI值,见表1。SPC与DSPE-mPEG2000的质量比为5:1时,制备得到的地塞米松脂质体粒径最小,为82.3 nm。因此,选择SPC与DSPE-mPEG2000的质量比为5:1。

表1 SPC与DSPE-mPEG2000质量比对脂质体粒径和PDI的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effect of mass ratio of SPC to DSPE-mPEG2000 on particle size and PDI of liposome ($\bar{x} \pm s, n=3$)

SPC/DSPE-mPEG2000	粒径/nm	PDI
3:1	111.00±2.40	0.41±0.09
4:1	90.57±0.42	0.42±0.00
5:1	82.30±0.72	0.41±0.02
6:1	91.85±0.47	0.43±0.01

2.1.2 SPC与地塞米松质量比的确定 保持其他条件不变,将SPC与地塞米松的质量比设定为50:5、50:4、50:3、50:2.5分别制备4个地塞米松脂质体,测定粒径和PDI值,结果见表2。SPC与地塞米松的质量比为50:3时,制备得到的地塞米松脂质体粒径最小,粒径分布也最窄。因此选择SPC与地塞米松的质量比为50:3。

表2 SPC与地塞米松质量比对脂质体粒径和PDI的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of mass ratio of SPC to DEX on particle size and PDI of liposome ($\bar{x} \pm s, n=3$)

SPC/地塞米松	粒径/nm	PDI
50:5	143.80±8.80	0.34±0.02
50:4	108.90±4.10	0.42±0.03
50:3	84.03±1.77	0.29±0.04
50:2.5	112.70±0.92	0.42±0.03

2.1.3 超声时间的确定 保持其他条件不变,改变超声时间,分别超声5、10、15、20 min得到4个地塞米松脂质体,测定粒径和PDI值,结果见表3。随着超声时间的延长,脂质体粒径也随之降低。超声15 min和超声20 min时,粒径相差不大,但超

声20 min得到的脂质体粒径分布更窄。考虑到脂质体制备工艺的简化,没有继续延长超声时间,因此选择超声20 min来制备地塞米松脂质体。

表3 超声时间对脂质体粒径和PDI的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of ultrasound time on particle size and PDI of liposome ($\bar{x} \pm s, n=3$)

超声时间/min	粒径/nm	PDI
5	121.80±2.5	0.53±0.04
10	118.90±0.40	0.44±0.02
15	87.82±2.30	0.34±0.04
20	84.03±1.77	0.29±0.04

2.1.4 最佳处方和最佳工艺条件 本研究拟得到粒径小、粒径分布窄的地塞米松脂质体,经过单因素实验最终确定最佳处方和最佳工艺条件为:按照质量比SPC/DSPE-mPEG2000(5:1)、SPC/地塞米松(50:3)称取药物和脂材,共溶于20 mL的氯仿-甲醇(9:1)混合溶剂中,45℃旋转蒸发10 min,除去有机溶剂形成薄膜,加入磷酸盐缓冲液,涡旋振荡,250 W超声20 min,即得地塞米松脂质体。

2.2 地塞米松脂质体的表征

2.2.1 粒径、PDI值和放置稳定性的考察 按照最佳处方和最佳工艺条件制备地塞米松脂质体,采用动态光散射法测得平均粒径为(84.03±1.77) nm, PDI值为0.29±0.04,见图1。制备的脂质体室温放置15 d,粒径无明显变化,表明室温放置稳定,见图2。

2.2.2 地塞米松脂质体生理介质稳定性考察 将制备得到的地塞米松脂质体按体积比1:4分别与PBS溶液、人工胃液、人工肠液、血浆混匀,马上测定粒径,作为0 h的初始粒径,然后37℃水浴孵育,分别在2、4、6、8 h观察有无浑浊沉淀等肉眼可见的变化,并取样测定粒径,见图3。

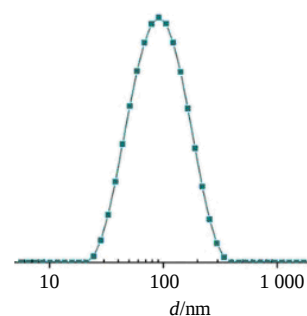


图1 地塞米松脂质体的粒径分布

Fig. 1 Particle size distribution of dexamethasone liposome

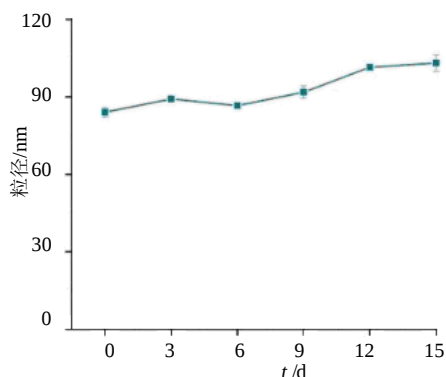


图2 地塞米松脂质体室温放置粒径随时间变化曲线

Fig. 2 Particle size curves of dexamethasone liposome at room temperature over time

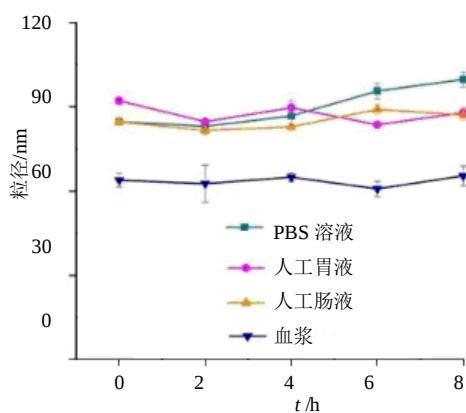


图3 地塞米松脂质体在生理介质中粒径随孵育时间变化曲线

Fig. 3 Particle size curves of dexamethasone liposome in physiological medium with incubation time

数据显示,地塞米松脂质体在 PBS、人工胃液、血浆中 37℃ 孵育 8 h 后,粒径无明显变化,表明地塞米松脂质体适合口服和静脉给药。

2.2.3 包封率的测定 取地塞米松脂质体适量,置于超滤离心管中,13 000 r/min 下离心 30 min,取续滤液适量,HPLC 测定游离药物的含量。另取地塞米松脂质体适量,用色谱纯甲醇稀释 20 倍,涡旋,13 000 r/min 下离心 20 min,取上清液采用 HPLC 测定地塞米松脂质体中药物总含量,计算包封率 (EE),结果显示地塞米松脂质体包封率为 89.6%±1.2% (n=3)。

$$EE = (W_1 - W_2) / W_1$$

W_1 为脂质体中药物总含量; W_2 为游离的药物含量

2.3 地塞米松测定方法学建立

2.3.1 色谱条件^[11] Agela Venusil MP C₁₈ 色谱柱

(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水(51:49); 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温 25℃; 检测波长 240 nm; 进样量 20 μL。

2.3.2 标准曲线的建立 精密称取地塞米松原料药 5 mg, 甲醇溶解并定容到 50 mL 量瓶中, 得到 100 μg/mL 地塞米松母液, 用甲醇稀释得到 80、60、40、20、10、5、1、0.1 μg/mL 地塞米松工作溶液, 按照上述色谱条件进行测定, 记录峰面积。以地塞米松峰面积对质量浓度进行线性拟合, 得回归方程 $Y = 0.6989X - 0.2779$ ($r^2 = 0.9998$), 表明地塞米松在 0.1~80 μg/mL 与峰面积线性关系良好。

2.3.3 地塞米松脂质体中地塞米松的测定 取 1 mL 地塞米松脂质体溶液, 用色谱纯甲醇稀释 20 倍, 13 000 r/min 下离心 20 min, 取上清液 HPLC 测定浓度, 得到峰面积数据 (A), 计算地塞米松脂质体溶液实际浓度 (C)。

$$C = (A + 0.2779) / (0.6989 \times 50)$$

2.4 地塞米松脂质体对 4T1 细胞的增殖抑制实验

将培养至对数期的 4T1 细胞接种于 96 孔板, 每孔 150 μL (8 000 个细胞/孔), 37℃、5% CO₂ 培养 24 h, 弃去培养基。每个组别均按照 100、50、25、10、5、2.5、0.5 μg/mL 给药 150 μL, 平行实验 6 组, 以空白培养基为对照。继续培养 48 h 后, 每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 20 μL, 培养箱孵育 4 h。小心弃去各孔上层液体, 每孔加入 DMSO 溶液 200 μL, 将培养板置于微孔板振荡器上震荡 10 min, 使晶体溶解均匀, 酶联免疫荧光仪 570 nm 下检测吸光度 (A) 值, 计算细胞抑制率。紫杉醇注射液、地塞米松注射液、地塞米松脂质体在不同浓度下对 4T1 细胞的抑制率见表 4, 使用 GraphPad Prism 5 软件计算各组别 IC₅₀ 值。

$$\text{细胞抑制率} = 1 - \text{实验组 A 均值} / \text{空白组 A 均值}$$

可以看出, 紫杉醇注射液组对 4T1 细胞的抑制作用呈剂量相关性, 抑制率最高为 72.84%, IC₅₀ 值为 5.068 μg/mL。地塞米松注射液在 0.5~10 μg/mL 对 4T1 细胞无抑制作用, 在 50 μg/mL 时抑制率也仅为 11.96%; 地塞米松脂质体对 4T1 细胞的抑制作用呈剂量相关性, 在 100 μg/mL 时对 4T1 的抑制率也只有 41.71%, 两者最高抑制率均小于 50%, 无法计算 IC₅₀ 值, 但可以推测出地塞米松注射液、地塞米松脂质体组的 IC₅₀ 值大于 100 μg/mL。从实验数据可以得出, 地塞米松原料药几乎对 4T1 细胞无杀伤作用, 而制备成地塞米松脂质体后对 4T1 细胞的

抑制作用大大增强,并且差异具有显著差异,但细胞毒作用仍比较弱。类似的研究结果也有文献报道,如张改容^[12]发现地塞米松在高浓度 471 $\mu\text{g/mL}$ 时才对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞具有一定的抑制作用,

在低浓度范围内与对照组比较差异无统计学意义;赵麟^[13]的 MTT 实验结果也表明地塞米松在不同浓度、不同孵育时间时均对非小细胞肺癌 H1975 细胞无抑制作用。

表4 不同组别对 4T1 细胞的抑制率 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)Table 4 The inhibition rate of different groups on 4T1 cell ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

质量浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	抑制率/%		
	紫杉醇注射液组	地塞米松注射液组	地塞米松脂质体组
0.5	16.60 $\pm$ 0.35	-1.79 $\pm$ 2.05	7.76 $\pm$ 1.32
5	61.80 $\pm$ 1.48	-0.23 $\pm$ 5.74	15.89 $\pm$ 2.94
10	64.34 $\pm$ 2.06	0.43 $\pm$ 2.41	22.50 $\pm$ 3.95
25	69.13 $\pm$ 0.97	8.25 $\pm$ 4.70	29.98 $\pm$ 4.20
50	70.07 $\pm$ 0.73	11.96 $\pm$ 0.53	40.33 $\pm$ 1.87
100	72.84 $\pm$ 0.16	38.78 $\pm$ 2.31	41.71 $\pm$ 2.13

2.5 地塞米松脂质体对 4T1 荷瘤小鼠肿瘤生长的抑制实验

2.5.1 4T1 乳腺癌模型建立 将培养至对数期的 4T1 细胞用含 10%胎牛血清的 RPMI 培养基悬浮,于 BAL B/c 小鼠右腋皮下接种 0.2 mL (1×10^6 个细胞/只),在 SPF 级环境下饲养,并密切关注肿瘤生长情况。

2.5.2 模型动物的分组和处理 至小鼠肿瘤体积约为 100 mm^3 ,将所有小鼠随机分成 4 组,每组各 8 只。对照组给予 0.2 mL 生理盐水,紫杉醇注射液组给予紫杉醇注射液 8 mg/kg、地塞米松注射液组给予地塞米松注射液 5 mg/kg,地塞米松脂质体组给予 5 mg/kg 地塞米松脂质体,均静脉给药,隔天给药 1 次,共给药 7 次。观察实验期间小鼠进食、排便、精神状态、活动情况。每次给药前称量小鼠体重,测量肿瘤长宽,计算肿瘤体积 (V),绘制肿瘤生长曲线。

$$V=0.5ab^2$$

a 为肿瘤最长径, b 为肿瘤最短径

于最后 1 次给药后 24 h,颈椎脱臼处死小鼠,剥离肿瘤,取出肝、脾、肿瘤并称定质量,计算抑瘤率、肝指数、脾指数。组间比较的显著性差异由 SPSS 22.0 软件计算得到。

抑瘤率 = 1 - 治疗组平均瘤质量 / 阴性对照组平均瘤质量

2.5.3 实验结果 考察地塞米松对乳腺癌荷瘤小鼠的作用时,给药剂量由查阅文献所得。由表 5 数据可以看出,紫杉醇注射液组和地塞米松脂质体组小鼠的肿瘤大小均与生理盐水组比较具有显著差异 ($P < 0.01$),而地塞米松注射液组与对照组比较无显著差异。比较各组小鼠的抑瘤率数据,地塞米松注射液组仅为 33.4%,而地塞米松脂质体组高达 78.9%,高于紫杉醇注射液组 (抑瘤率为 55%),表明地塞米松制备成脂质体后,抗肿瘤作用得到了大大增强。

表5 不同组别对 4T1 荷瘤小鼠肿瘤生长的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)Table 5 Effects of different groups on tumor growth in 4T1 tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量/ $(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	瘤质量/g	抑瘤率/%	肝指数	脾指数
对照	—	2.80 $\pm$ 0.88	—	0.051 1 $\pm$ 0.003 0	0.040 6 $\pm$ 0.005 3
紫杉醇注射液	8	1.26 $\pm$ 0.06**	55.0 $\pm$ 2.1	0.052 6 $\pm$ 0.004 0	0.031 6 $\pm$ 0.008 0
地塞米松注射液	5	1.86 $\pm$ 0.15	33.4 $\pm$ 5.5	0.053 1 $\pm$ 0.005 0	0.022 5 $\pm$ 0.004 0**
地塞米松脂质体	5	0.59 $\pm$ 0.11**&	78.9 $\pm$ 4.0#&	0.059 6 $\pm$ 0.002 0	0.022 4 $\pm$ 0.003 0**

与对照组比较: ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$; 与紫杉醇注射液组比较: # $P < 0.05$; 与地塞米松注射液组比较: & $P < 0.05$

** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ vs normal saline group; # $P < 0.05$ vs PTX injection group; & $P < 0.05$ vs DEX injection group

从小鼠肿瘤体积生长曲线图来看, 3个给药组肿瘤生长均慢于对照组, 其中地塞米松脂质体组小鼠肿瘤体积变化最慢; 从小鼠体质量变化曲线图看, 各组别小鼠体质量略有下降, 但无明显变化。3个给药组的肝指数与对照组均无显著差别, 但地塞米松注射组和地塞米松脂质体组的脾指数与对照组相比有显著差异, 提示在5 mg/kg给药剂量下, 地塞米松对脾脏仍有一定影响。见图4。

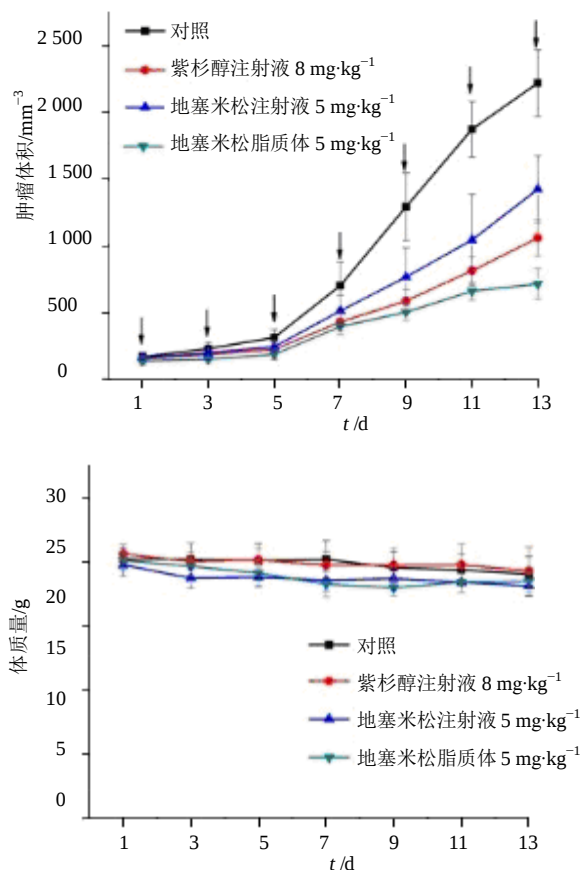


图4 小鼠肿瘤体积和体质量的变化曲线

Fig. 4 Change curve of tumor volume and weight in mice

3 讨论

体外实验中, 地塞米松注射液在50 µg/mL的高浓度时对4T1细胞的抑制率也仅有11.96%, 但荷瘤鼠体内实验中, 以5 mg/kg的剂量静脉注射时也取得了33.4%的抑瘤率, 显示地塞米松并非是基于细胞毒作用发挥抗肿瘤作用。意外的是, 将地塞米松制备成脂质体后, 对4T1荷瘤鼠的抑瘤率高达78.9%, 显著高于8 mg/kg对紫杉醇注射液的抑瘤率($P < 0.05$), 更远远高于相同剂量的地塞米松注射液($P < 0.05$)。这些数据证明基于非细胞毒作用的地塞米松脂质体用作抗肿瘤药物具有广阔的临床应用前

景。长循环脂质体抗肿瘤疗效显著优于地塞米松注射液, 其原因可能主要如下: (1) 制备的长循环脂质体粒径小, 仅为84.03 nm, 可由于EPR^[14]效应而较易进入肿瘤组织, 提高了地塞米松在肿瘤部位的滞留量; (2) 长循环脂质体的包封改变了地塞米松的体内代谢行为, 使其更利于抗肿瘤作用的发挥。

目前对于地塞米松的抗肿瘤机制虽有不少研究, 但尚未有定论。有研究认为地塞米松可作用于细胞周期的G1期, 诱导细胞凋亡^[15]。克祯或^[16]建立了H22肝癌模型, 根据实验结果提出地塞米松是通过减少细胞凋亡而抑制肿瘤生长的观点。实体瘤由肿瘤细胞和间质细胞组成, 其中间质部分占实体瘤的90%左右, 主要包括结缔组织、血管、炎症细胞等。肿瘤主要通过细胞间信号传导通路, 调节间质细胞的生长, 形成利于肿瘤细胞生长繁殖转移的微环境。因此, 抗肿瘤药物除了直接杀伤肿瘤细胞, 还可以调节肿瘤微环境来抑制肿瘤的生长和转移。目前地塞米松通过其免疫抑制作用^[17]、抑制血管生长^[18]、抗炎作用^[19-20]、调节雌激素水平^[21]来抑制肿瘤生长这一观点被大多数学者接受。

综上所述, 本研究制备了地塞米松脂质体, 粒径小, 室温放置以及于生理介质中稳定, 并研究了地塞米松脂质体单独给药在乳腺癌荷瘤鼠模型上的抗肿瘤效果, 结果显示脂质体包封可显著提高地塞米松抑瘤率。本研究结果为地塞米松脂质体对乳腺癌等肿瘤的治疗提供了参考, 在抗肿瘤研究方面具有良好的应用前景。

参考文献

- [1] Buxant F, Kindt N, Laurent G, et al. Antiproliferative effect of dexamethasone in the MCF-7 breast cancer cell line [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(3): 4051-4054.
- [2] Kim J H, Hwang Y J, Han S H, et al. Dexamethasone inhibits hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in colon cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(34): 9887-9899.
- [3] Wang H, Wang Y, Rayburn E R, et al. Dexamethasone as a chemosensitizer for breast cancer chemotherapy: potentiation of the antitumor activity of adriamycin, modulation of cytokine expression, and pharmacokinetics [J]. *Int J Oncol*, 2007, 30(4): 947-953.
- [4] 曾建华, 钟玲, 徐波. 地塞米松对宫颈癌细胞裸鼠移植瘤生长的抑制作用 [J]. *第三军医大学学报*, 2008, 30(13): 1279-1282.
- [5] Wang L J, Jian L, Hao F R, et al. Dexamethasone

- suppresses the growth of human non-small cell lung cancer via inducing estrogen sulfotransferase and inactivating estrogen [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2016, 37(6): 845-856.
- [6] 齐宪荣, 苏海涛. 抗癌组合物及其制剂和应用 [P]. 中国: 106177959A, 2016-12-07.
- [7] 王 晶, 鲍永霞, 耿 莹. 地塞米松影响 Lewis 肺癌小鼠移植瘤生长及微血管生成的研究 [J]. 中国癌症杂志, 2012, 22(1): 5-9.
- [8] Wang Q, Jiang J, Chen W, *et al*. Targeted delivery of low-dose dexamethasone using PCL-PEG micelles for effective treatment of rheumatoid arthritis [J]. *J Control Release*, 2016, 230: 64-72.
- [9] Krishnan V, Xu X, Barwe S P, *et al*. Dexamethasone-loaded block copolymer nanoparticles induce leukemia cell death and enhance therapeutic efficacy: a novel application in pediatric nanomedicine [J]. *Mol Pharm*, 2013, 10(6): 2199-2210.
- [10] 王丽杰, 卢 炜, 周田彦. 地塞米松应用于肿瘤治疗的研究进展 [J]. 药学报, 2015, 50(10): 1217-1224.
- [11] 杜有云. 地塞米松眼用微乳凝胶的制备及评价 [D]. 广州: 广东药科大学, 2017.
- [12] 张改容. 地塞米松对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株化疗敏感性影响及相关机制研究 [D]. 大连: 大连医科大学, 2012.
- [13] 赵 麟. 奥希替尼联合地塞米松抑制非小细胞肺癌的有效性研究 [D]. 锦州: 锦州医科大学, 2017.
- [14] Maeda H. Toward a full understanding of the EPR effect in primary and metastatic tumors as well as issues related to its heterogeneity [J]. *Adv Drug Deliver Rev*, 2015, 91: 3-6.
- [15] Yun J C, Ji I L, Chong S M, *et al*. Anti-proliferative effect and action mechanism of dexamethasone in human medullary thyroid cancer cell line [J]. *Endocr Res Comm*, 2011, 36(4): 149-157.
- [16] 克祯戡. 地塞米松对小鼠 H22 肝癌的作用研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2015.
- [17] Petrillo MG, Fettucciari K, Montuschi P, *et al*. Transcriptional regulation of kinases downstream of the T cell receptor: another immunomodulatory mechanism of glucocorticoids [J]. *BMC Pharmacol Toxicol*, 2014, 15(1): 35-46.
- [18] Westendorf J J, Hoepfner L. Glucocorticoids suppress tumor angiogenesis and *in vivo* growth of prostate cancer cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 25(2): 181-182.
- [19] Mantovani A, Allavena P, Sica A, *et al*. Cancer-related inflammation [J]. *Nature*, 2008, 454(7203): 436-444.
- [20] Jing W, Chunhua M, Shumin W. Effects of acteoside on lipopolysaccharide-induced inflammation in acute lung injury via regulation of NF- κ B pathway *in vivo* and *in vitro* [J]. *Toxicol Appl Pharm*, 2015, 285(2): 128-135.
- [21] Gong H, Jarzynka M J, Cole T J, *et al*. Glucocorticoids antagonize estrogens by glucocorticoid receptor-mediated activation of estrogen sulfotransferase [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(18): 7386.