

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

Steal-oligochitosan – liposome 包覆斑蝥素之研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2213-E-038-003-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：臺北醫學大學生物醫學材料研究所

計畫主持人：劉得任

計畫參與人員：劉得任 張勝彥 張智翔

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 10 月 31 日

Steal-oligochitosan-liposome 包覆斑蝥素之研究

計畫編號：NSC93-2213-E-038-003

計劃時程：93年8月1日至94年7月31日

劉得任 張勝彥 張智翔

中文摘要

微脂粒穩定性的研究在其應用發展上佔有舉足輕重的影響，因此本研究利用低分子量水溶性幾丁聚醣來修飾微脂粒表面，觀測幾丁聚醣對微脂粒物理穩定性的影響，同時也一並探討包覆抗癌藥物斑蝥素，幾丁聚醣對微脂粒包覆斑蝥素的滲漏情形。本實驗是以擠壓法(extrusion)製備微脂粒，並在製備完成的微脂粒溶液中添加(吸附)幾丁聚醣。實驗結果顯示，添加幾丁聚醣於微脂粒溶液中，會使微脂粒的界面電位下降，並且對微脂粒的初始粒徑會有增大的現象。此外，添加幾丁聚醣會使微脂粒懸浮液濁度上升。另外，當幾丁聚醣的添加量大於 1wt % 時，在 25°C 儲存溫度下，會加速微脂粒粒徑變大，造成所謂融合(fusion)的現象。至於脂質脂雙層分子間的影響，由 DSC 實驗中發現添加幾丁聚醣並不會影響微脂粒之相轉移溫度。

關於斑蝥素滲漏實驗，無論是在 25°C 及 4°C 下，傳統型與表面修飾型(添加 1wt% 幾丁聚醣)微脂粒的粒徑與滲漏速率，都無明顯差別。另外，在 37°C 下剪應流場(300sec⁻¹、800 sec⁻¹)環境下，無論是在粒徑及滲漏速率的比較，實驗結果顯示傳統型與表面修飾型微脂粒都是無明顯之差異；不過，就不同剪應力流場對傳統型與表面修飾型微脂粒的影響，兩者(傳統型與表面修飾型微脂粒)皆顯示出在高剪切率(800 sec⁻¹)的滲漏速率會高於低剪切率(300 sec⁻¹)。

Abstract

Physical stability of liposomes plays the critical roles in various stages of the applications and development of liposomes. In this study, we applied low molecular weight chitosan to modify the liposomes surface, and investigated the physical stability of liposomes. Moreover, we encapsulated cantharidin to study the effects of chitosan which cause drug leakage. In this study, the liposomes were prepared by the extrusion method. Chitosan was added to liposome dispersion to obtain the mixtures of various compositions. We showed that chitosan decreased zeta potential, and increased the size of liposomes. Whereas, the addition of 1wt% chitosan had increased the size of liposome at 25 °C, i.e. the behavior of fusion. Also, chitosan would increase the turbidity. Further, the DSC (differential scanning calorimeter) revealed that the addition of chitosan caused no difference in the intravesicle interaction.

To understand the behavior of cantharidin release, the conventional liposomes and modifier liposomes, revealed that there were no significant difference in size and the rate of drug release at 25 °C and 4 °C. Shear forces (shear rate in 300sec⁻¹、800 sec⁻¹) studies of the conventional liposomes and modifier liposomes showed that there were no significant difference in sizes and the rate of drug release at 37 °C. Furthermore, both the conventional liposomes and modifier liposomes showed the rate of drug release was higher at shear rate in 800 sec⁻¹ than shear rate in 300 sec⁻¹.

簡介

微脂粒應用於抗癌藥物傳輸系統中，多以包覆抗癌藥物載體自居，如紫杉醇與 doxorubicin，經微脂粒脂包覆可減少其對正常細胞之毒性及副作用，目前已上市之微脂粒相關產品，主要以靜脈注射劑為主，例如：Lipo-Dox 微脂粒注射劑，這種特殊的微脂粒產品是將一種毒性極高的抗癌藥物 doxorubicin (俗稱小紅莓) 包覆於微脂粒內，易於在微脂粒外表接生物辨識物質，具有導向飛彈的特性，不但可降低 doxorubicin 之毒性也提高了 doxorubicin 在腫瘤部位的濃度，定點攻擊癌細胞。此外，用於治療 AIDS 相關之卡波西肉瘤(kaposis' sarcoma)，以及針對其他腫瘤如卵巢癌、乳癌及前列腺癌的微脂粒劑型抗癌藥物也都在臨床試驗進行中，顯示微脂粒劑型之抗癌藥物具有很大的潛能性。

立體穩定型微脂粒，其修飾微脂粒表面的高分子材料，可分為合成高分子及生物性高分子。幾丁聚醣(chitosan)，屬於生物性高分子，目前被廣泛利用於食品、農業、紡織、廢水處理等並由於其具有相當好的抗菌性、生物相容性及生物可分解性，為一良好之生醫材料，可運用於傷口癒合之敷料、藥物控制釋放、組織工程等不同領域。而幾丁聚醣的帶正電特性主要來自於主鏈旁的氨基，當幾丁聚醣的去乙酰程度越高，則主鏈旁的氨基也就越多，當幾丁聚醣在酸性的環境下會質子化形成具正電荷 NH_3^+ 的官能基；氨基越多，所帶正電荷就越多，因此所能吸附的陰離子、重金屬以及其他小分子也就越多。

抗癌毒藥斑蝥素(cantharidin)目前正被研究開發成新的抗癌藥物，但其毒性甚大，會引起黏膜潰爛及肝腎毒性。斑蝥素雖為高細胞毒性藥物，但對 Hep 3B 較具有高特异性，適合開發為抗肝癌藥。目前，大陸雖已臨床應用於肝癌的治療，但是斑蝥素的毒性仍令人膽怯，所以尚無其他國家核准於臨床治療，因此，本實驗期許利用微脂粒包覆斑蝥素，並利用微脂粒載體之降低毒性，做一所謂斑蝥素-微脂粒劑型之抗癌藥物。此外，本實驗在微脂粒改質上是使用新改質的低分子量水溶性幾丁聚醣，其此材料在中性溶液下帶負電，與過去文獻須溶解在酸性溶液下，帶正電之大分子量且非水溶性的幾丁聚醣，有所不同。所以本研究首先主

要探討微脂粒與幾丁聚醣之間的相互作用，期望能在微脂粒表面吸附幾丁聚醣，形成立體穩定型微脂粒，進一步用以包覆斑蝥素，目的希望能降低斑蝥素對正常細胞的毒性，也希望能提高微脂粒之物理穩定度。

立體作用力(steric force)

立體作用力也是排斥力，在微脂粒系統中立體排斥力的來源有兩種機制，其一為來自於脂雙層的熱波動(thermal undulation)，另外則是來自於較大極性頭基如多醣分子或高分子的表面在碰撞時，所造成不利於(unfavorable)滲透壓及熵(entropy)的貢獻。由於在微脂粒聚集及融合的過程中，會使粒徑增大，並伴隨著包覆物質的滲透，因此用來觀測微脂粒物理穩定性的主要方法有：觀測其粒徑隨時間之變化及包覆物質的滲透情形二種方法，而在探討其融合機制時，常添加陽離子來誘使聚集及融合的發生。根據過去的研究，我們可以將影響微脂粒物理穩定性的因子歸納為下列幾項：脂質成份、添加物、溫度、水環境(pH值及離子強度)等。對於具有帶電磷脂質(如：PS、PG、PA)所構成微脂粒，由於微脂粒間有靜電作用力存在，可以有較好的穩定性，不過當水溶液中pH值或離子強度改變時，會改變微脂粒表面的帶電情形，進而影響微脂粒粒子間的作用力，就容易發生聚集或融合的現象；然而對於由兩性磷脂質(如：PC)所組成之微脂粒，粒子間靜電作用力並非決定微脂粒穩定性的主要因素，所以此類微脂粒不會因溶液中pH值或離子強度的改變而造成聚集的發生，不過當溫度下降到相轉移溫度之下卻容易發生聚集，此現象也顯示水合力在其中扮演了舉足輕重的角色。此外，在微脂粒的成份中，最常見的非磷脂質組成的添加，如：膽固醇。膽固醇的結構中有一個3 β -氫氧基(3 β -hydroxyl group)和一個由三個六環與一個五環所構成的堅硬平面結構(rigid planar structure)及脂肪族側鏈(aliphatic planar chain)，由於膽固醇具有界面活性劑的特性，可以與磷脂質整齊的排列，在液晶態的微脂粒中加入膽固醇後，會增加脂肪酸鏈的秩序(order)及排列密度，提高微脂粒的堅硬度(rigidity)；然而，在磷脂質間排列整齊的凝膠態添加膽固醇，會使得磷脂質分子

間緊密的排列被推開，導致磷脂質頭基排列較為鬆散，而使得凝膠態的流動性增加，因而降低了微脂粒的堅硬度。

研究動機與實驗目的

微脂粒發展至今，其穩定性的控制及穩定機制仍未清楚瞭解，然而在醫藥學的應用上，對於其穩定性的控制與預測卻是十分重要的。

文獻指出以PEG或其他的親水性高分子修飾微脂粒的表面，可增加生理穩定性，其中PEG以共價方式接於脂質錨再插入微脂粒，形成效果最佳且最廣泛地被使用。故本研究使用幾丁聚醣吸附於微脂粒表面，期望能提高其物理穩定性，並包覆斑蝥素，觀測其在靜態及動態的粒徑變化及藥物滲漏情況。因此，在整個研究實驗之主題，大致包括了下列幾項：

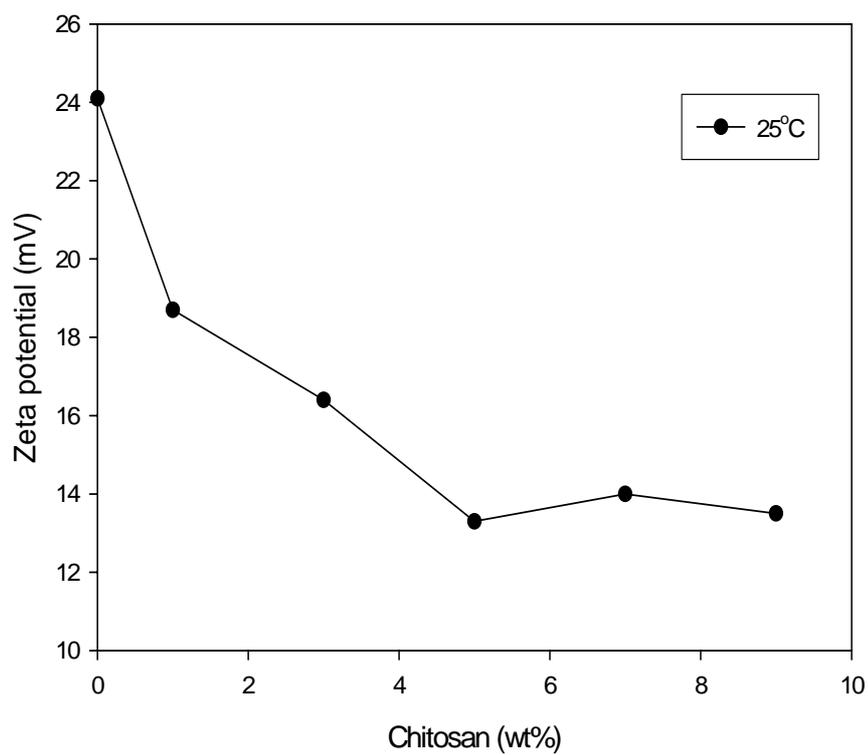
- 1.量測不同組成的微脂粒，在不同儲存溫度下其粒徑隨時間之變化，藉以說明微脂粒之物理穩定性。
- 2.量測不同組成微脂粒之界面電位，藉以說明微脂粒與幾丁聚醣之交互作用機制。
- 3.使用濁度計量測濁度，其觀測幾丁聚醣對微脂粒穩定性(聚集)的影響。
- 4.利用DSC量測不同組成微脂粒的相轉移溫度，探討添加物對脂雙層排列之影響。
- 5.利用cone/plate黏度儀所生成之流場剪應力，測試剪應力對微脂粒粒徑之影響。
- 6.不同組成的微脂粒，在不同儲存溫度下，包覆斑蝥素粒徑及藥物滲漏隨時間變化之情形。
- 7.利用 cone/plate 黏度儀所生成之流場剪應力，測試剪應力對微脂粒粒徑及包覆物滲漏之影響，說明微脂粒脂雙層結構之穩定度。

結果

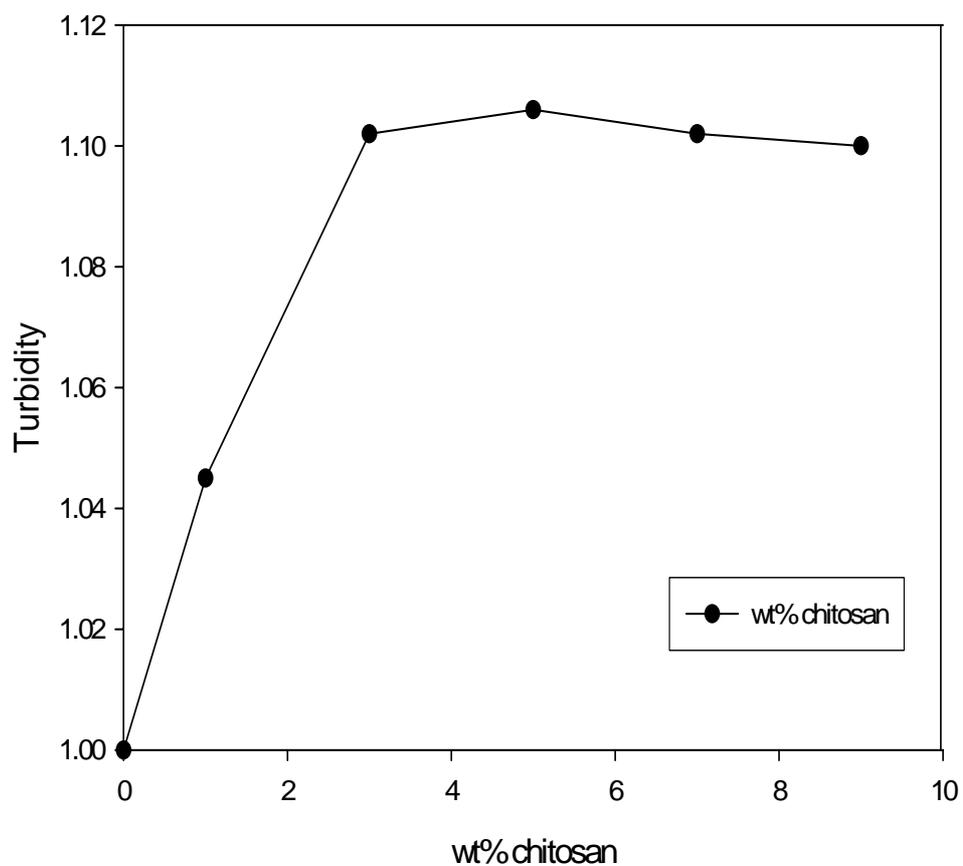
一、不同組成微脂粒之界面電位(mV)

組成	25°C
Blank	24.1± 0.5
1wt% chitosan	18.7± 0.6
3wt% chitosan	16.4± 0.4
5wt% chitosan	13.3± 0.6
7wt% chitosan	14.0± 0.5
9wt% chitosan	13.5± 0.8

二、界面電位之變化



三、微脂粒之濁度變化

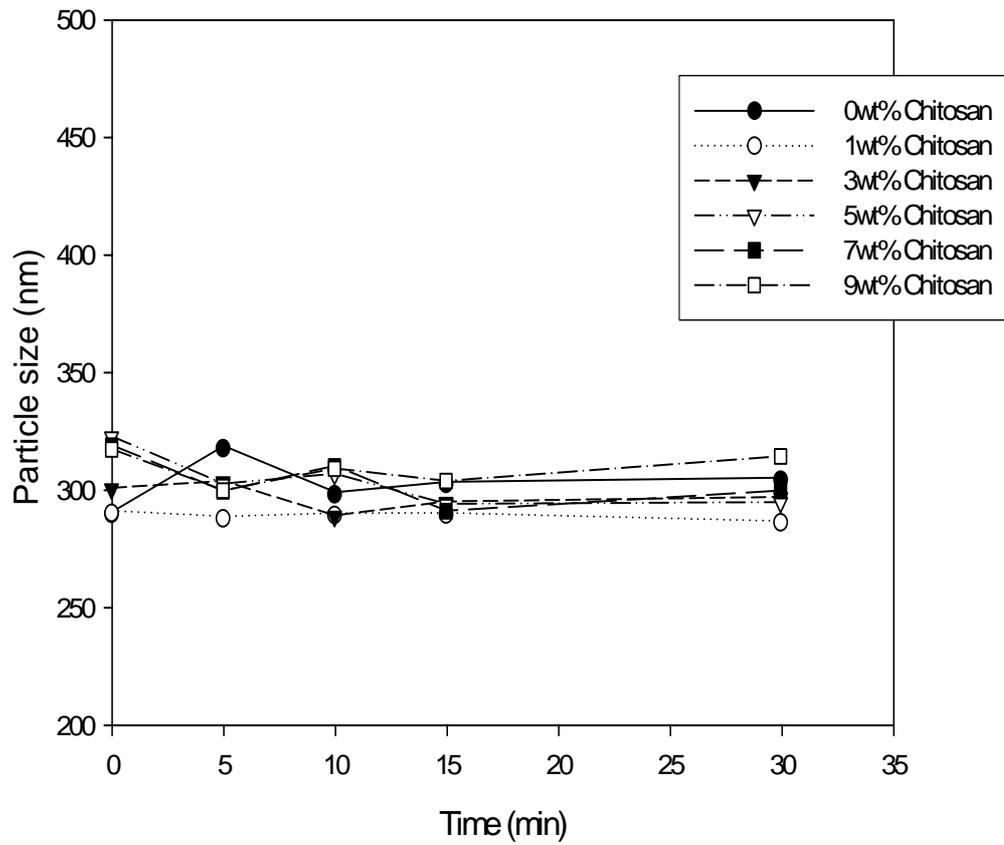


四、相轉移溫度

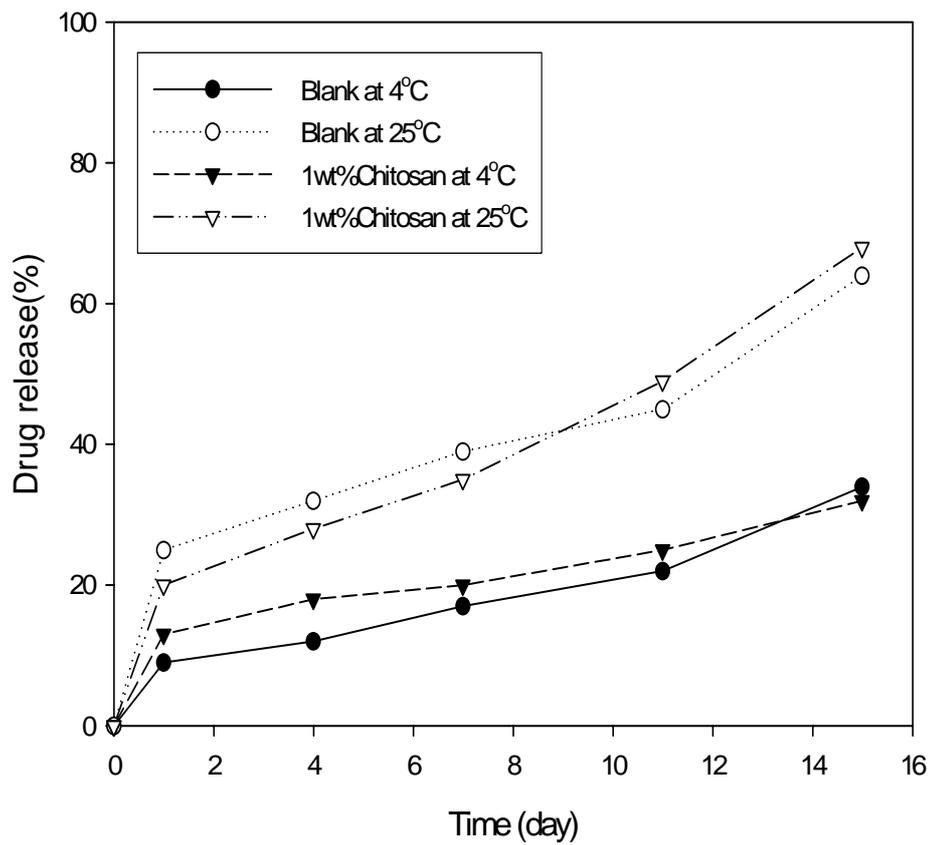
組成	T_c (°C)
Pure DPPC	41.5
Blank	44.2
1wt% chitosan	43.9
3wt% chitosan	44.3
5wt% chitosan	44.0
7wt% chitosan	44.8
9wt% chitosan	44.0

(Blank 表示未加幾丁聚醣之微脂粒)

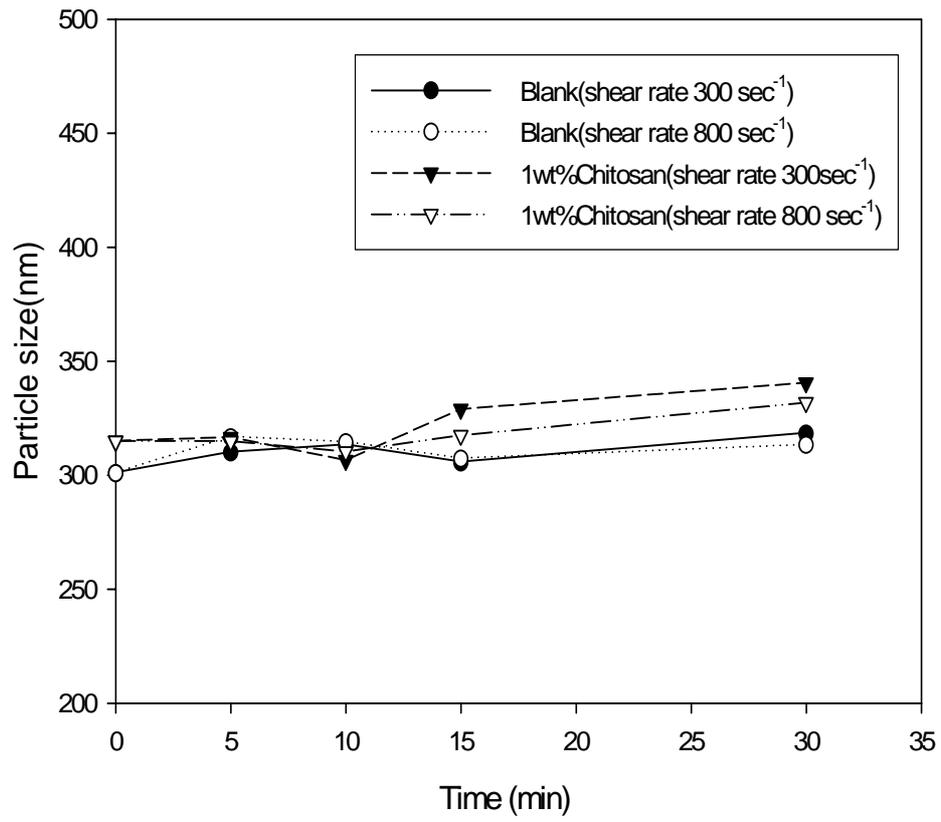
五、添加不同wt% chitosan對微脂粒在剪應力流場(300sec^{-1})環境下，隨不同流場時間下之粒徑變化



六、微脂粒包覆斑蝥素於不同儲存溫度下之滲漏率變化



七、不同流場剪應力，對微脂粒脂雙層結構之穩定度影響



結論

1. egg PC: vitamin E: cholesterol: SA=16:4:4:1(莫耳比)製備而成的微脂粒，在系統酸鹼值為pH=7.4(Tris buffer)環境下量測，微脂粒脂雙層表面帶正電，顯示微脂粒粒子間具有微弱的靜電斥力。
2. 添加不同含量的幾丁聚醣於微脂粒溶液中，會使得微脂粒的界面電位正的愈少(由24mV降低到13mV)，並且對微脂粒的初始粒徑會有增大的現象；同時微脂粒界面電位與初始粒徑，在添加5wt%幾丁聚醣後，沒有持續明顯變化。
3. 在微脂粒溶液中，當幾丁聚醣的量添加大於1wt%時，在25°C儲存溫度下，會加速微脂粒粒徑變大，造成所謂融合(fusion)的現象。
4. 由濁度實驗中，在微脂粒溶液中，添加幾丁聚醣會使微脂粒懸浮液濁度上升。
5. 至於在分子層面的影響，由DSC實驗發現添加幾丁聚醣並不會影響微脂粒之相轉移溫度。
6. 在25°C下，添加幾丁聚醣的微脂粒對剪應力(外力)流場的承受度並無明顯影響。
7. 關於斑蝥素滲漏實驗，在25°C及4°C儲存溫度下，添加幾丁聚醣(1wt%)時，並不會影響微脂粒的粒徑與滲漏速率。
8. 在37°C及剪應力流場(300sec⁻¹、800sec⁻¹)環境下，在包覆斑蝥素的微脂粒溶液中，表面修飾型微脂粒，其微脂粒的粒徑及滲漏速率

與傳統型微脂粒無明顯差別；不過，觀測不同剪應力流場對傳統型與表面修飾型微脂粒的影響，兩者(傳統型與表面修飾型微脂粒)皆顯示出在高剪切率(800 sec^{-1})的滲漏速率會大於低剪切率(300 sec^{-1})。