

# 长春新碱 PEG-PE 胶束的制备及其对乳腺癌细胞生长的抑制\*

林宏英 陆晓燕 唐宁 梁伟\*\*

(中国科学院生物物理研究所, 蛋白质与多肽药物实验室, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101)

**摘要** 为提高长春新碱 (VCR) 的抗肿瘤活性并降低其毒副作用, 利用聚乙二醇衍生化磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)聚合物胶束作为载体制备了包载 VCR 的 PEG-PE 胶束 (VCR 胶束), 对其理化性质和体外抗肿瘤活性进行研究. 采用透射电镜观察胶束的外观形态, 动态光散射法测定粒径和粒度分布, HPLC 法测定包封率和体外释放度, MTT 法测定 VCR 胶束及游离 VCR 对 MCF-7 细胞的毒性. 透射电镜负染照片显示, VCR 胶束呈不规则的球状结构, 粒度分布窄而均一, 平均粒径在 $(11.1 \pm 0.1)$  nm; VCR 能有效被 PEG-PE 胶束包载, VCR 与 PEG-PE 的摩尔比在 1:2~1:10 的范围内包载量均大于 95%; 体外释放度和耐稀释试验结果表明, VCR 胶束在 HBS 和血清 (pH 7.0) 两种释放介质中稳定, 释放符合一级动力学释药模型; 体外细胞毒试验表明, VCR 胶束能显著提高 VCR 对 MCF-7 细胞生长的抑制作用. 制得的 VCR 纳米胶束具有良好的稳定性、较高包封率和显著提高 VCR 的抗肿瘤活性, 表明 PEG-PE 胶束将是 VCR 的一个高效输送载体.

**关键词** 长春新碱 (VCR), 胶束, 生长抑制

**学科分类号** R94

长春新碱 (vincristine, VCR) 为二聚吲哚类生物碱, 是从夹竹桃科植物长春花中提取的抗肿瘤药物. VCR 通过作用于肿瘤细胞微管蛋白而干扰肿瘤细胞代谢, 临床应用广泛, 主要用于治疗急性淋巴细胞白血病、何杰金及非何杰金淋巴瘤, 也用于治疗乳腺癌、支气管肺癌、软组织肉瘤及神经母细胞瘤等. 尽管 VCR 抗肿瘤疗效较好, 但由于其具有较大的神经系统毒性和局部刺激性使其在临床上的使用受限<sup>[1]</sup>. 为降低 VCR 的毒副作用, 提高或维持其疗效, 已有用碘化油、微球、普通脂质体、隐形脂质体和微乳作为 VCR 载体<sup>[2]</sup>. 由于静脉注射后, 普通脂质体中的 VCR 主要被单核吞噬细胞系统 (MPS) 摄取, 而对于非 MPS 系统, 由于血液循环时间很短, 往往在药物到达靶部位之前即被 MPS 摄取; VCR 微球和 VCR 碘化油虽然可通过局部靶向注射到肿瘤组织或肝动脉导管灌注治疗肝癌, 但只适合于栓塞及局部治疗, 不适合于肿瘤的整体治疗; 隐形脂质体虽不仅能延长血液循环时间且由于肿瘤组织血管的高通透性而易于在肿瘤组织处富集, 但制备工艺复杂; 微乳表面活性剂用量较大, 载药率低. 为克服上述这些问题, 有必要开发一种

可注射用的肿瘤靶向给药系统作为 VCR 药物载体.

聚合物胶束作为药物载体发展于 20 世纪 90 年代, 是由两亲性聚合物在水溶液中自发形成的一种自组装结构, 亲水性片段形成外壳, 疏水性片段形成内核, 构成独特的核-壳结构. 粒径一般为 5~50 nm, 具有载药量高、载药范围广、稳定性好、体内滞留时间长、独特的体内分布以及增加药物的稳定性、提高生物利用度和降低毒副作用等特点, 不仅可实现被动靶向给药, 还可以连接具有特异性识别功能的配基对其表面进行修饰实现主动靶向给药, 使药物有效地到达靶点<sup>[3]</sup>, 已成为目前药物传递系统研究的热点之一. 许多研究表明, 聚合物胶束作为抗肿瘤药载体能增强药物的抗肿瘤活性, 如包载阿霉素的 PEG-PBLA 胶束比游离阿霉素具有更明显的抗肿瘤活性, 剂量为  $23 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时未见 C26 小鼠中毒死亡, 该剂量约为游离药 DOX 最大耐受剂量的 2 倍<sup>[4]</sup>. 某些包载抗肿瘤药物的聚合物胶束已进入了临床试验阶段, 如 NK911<sup>[5]</sup>、

\*中国科学院知识创新工程重要方向项目(kjcx2-sw-h12-01).

\*\* 通讯联系人. Tel: 010-64889861, E-mail: weixx@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2006-02-27, 接受日期: 2006-03-31

KRN5500<sup>[6]</sup>.

聚乙二醇衍生化磷脂酰乙醇胺 (PEG-PE) 是在体内可降解并经美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准的可用于人体的药物载体材料, 具有良好的生物相容性和安全性. 由于其临界胶束浓度 (CMC) 很低 ( $10^{-6} \sim 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 形成的胶束稳定, 粒径较小 (小于 50 nm), 并具有长循环特性, 因而被认为是将药物通过高通透性和高截留性效应 (EPR 效应) 输送到肿瘤部位的、具有广阔发展前途的药物载体<sup>[7]</sup>. PEG-PE 胶束能有效包载它莫西芬、紫杉醇和地喹氯铵等多种水溶性差的抗肿瘤药物, 且显示了较高的肿瘤组织分布率和良好的抗肿瘤效果<sup>[8]</sup>. 与 PEG 修饰的脂质体相比, PEG-PE 胶束因具有相对更小的粒径而能更有效地使药物在截留尺寸小的肿瘤部位蓄积<sup>[9]</sup>.

目前, 聚合物胶束仅用于疏水性药物的包载和运输, 将药物包载于其疏水性内核. 对于水溶性药物而言, 往往通过化学修饰共价地将药物连接到聚合物胶束上. 人们利用纳米制备技术将 VCR 包载于纳米载体中, 通过控制纳米载体的粒度和药物在体内的释放行为来达到提高疗效降低毒性的目的. 由于长春新碱以硫酸盐的形式供临床应用, 水溶性较强、分子质量较大, 很难对其进行有效的包载并控制药物的体内外释放行为. 长春新碱脂质体是研究最多的一种纳米制剂, 虽已进入临床研究多年, 但该脂质体的稳定性一直未能很好地解决, 在贮存过程中药物快速从脂质体中泄漏, 最终未被批准用于临床治疗<sup>[10]</sup>. 本文首次用 PEG-PE 制备了包载水溶性较强的抗肿瘤药物 VCR 的胶束并对含药胶束的理化性质和体外抗肿瘤活性进行了研究, 以期解决上述问题.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 试剂.** 硫酸长春新碱 (杭州民生制药厂提供); 聚乙二醇 2000-二硬酯酰磷脂酰乙醇胺 (PEG2000-DSPE, Avanti polar lipids); 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (Gibco 公司); 胰蛋白酶 (Gibco 公司); DMEM 培养基 (Gibco 公司); MTT (Sigma 公司); MCF-7 细胞株 (ATCC 公司, US); 甲醇、三氯甲烷为色谱纯, 其余试剂均为分析纯.

**1.1.2 仪器.** Shimadzu 高效液相色谱仪, 型号: LC-10AT; ZRS-8G 智能溶出试验仪 (天津大学无线电厂); Sartorius 天平; BUCHI 旋转蒸发仪.

### 1.2 方法

**1.2.1 VCR 的 PEG-PE 胶束制备.** 按 VCR 与 PEG-PE 不同的摩尔比, 吸取一定量  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 VCR 乙醇溶液和  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  PEG-PE 的三氯甲烷溶液置旋蒸瓶中, 再加入适量三乙胺, 混合均匀. 于  $40^\circ\text{C}$  恒温水浴中用旋转仪除去有机溶剂形成含药脂膜, 再真空干燥除尽残留的有机溶剂. 于上述脂膜中加入 HBS ( $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  HEPES,  $0.9\%$  NaCl, pH 7.0) 缓冲溶液, 充氮气, 密封, 于  $40^\circ\text{C}$  恒温水浴中水化 30 min, 室温下放置 2 h 后, 过  $0.2 \mu\text{m}$  的无菌滤膜, 用 HBS 溶液调节 VCR 的终浓度约为  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 即得包载 VCR 的 PEG-PE 胶束 (以下简称 VCR 胶束), 置  $4^\circ\text{C}$  冰箱保存备用.

#### 1.2.2 VCR 胶束理化性质的研究.

a. 形态和粒径的检测. 将 VCR 胶束用 HBS 稀释至 PEG-PE 的终浓度为  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 取适量滴加在铜网上, 用醋酸铀进行负染, 置透射电镜下观察包载 VCR 的 PEG-PE 胶束的形态. 并用动态激光散射仪测定其粒径和粒径分布.

b. 包封率的测定. 参照文献[2], 用 HPLC 法测定 VCR 的含量. 色谱柱: Discovery C18 ( $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ); 流动相:  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸二氢钠水溶液 - 甲醇 ( $40 : 70$ , pH 7.0); 检测波长:  $298 \text{ nm}$ ; 流速:  $1.0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . 精密吸取 VCR 胶束  $200 \mu\text{l}$ , 置于离心过滤管 (MWCO 30 ku) 中, 离心 ( $10\,000 \text{ r/min}$ ) 15 min, 取滤液  $20 \mu\text{l}$ , 加流动相稀释至  $200 \mu\text{l}$ , 混匀, 取  $20 \mu\text{l}$  进样, 计算游离 VCR 的量 ( $F_{\text{游离}}$ ). 另取 VCR 胶束  $20 \mu\text{l}$ , 用甲醇稀释 10 倍, 再用流动相稀释 10 倍, 混匀, 取  $20 \mu\text{l}$  进样, 计算 VCR 胶束中 VCR 的总量 ( $F_{\text{总}}$ ). 以下式计算包封率:

$$\text{包封率} = (1 - F_{\text{游离}} / F_{\text{总}}) \times 100\%$$

c. 体外释放试验. 取 VCR 胶束  $2 \text{ ml} (2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1})$ , 加等量的 HBS 或 FBS 稀释, 混匀. 精密移取上述溶液  $1 \text{ ml}$  分别置于透析袋 (MWCO 1 2000~14 000 u) 中, 一式三份, 用手术线扎紧透析袋两端, 将透析袋放入  $37^\circ\text{C}$  恒温水浴的转篮中, 转篮转速为  $50 \text{ r/min}$ . 透析介质为  $150 \text{ ml}$  HBS, 分别于 0.5、1、2、4、6、12、24 h 取透析外液  $200 \mu\text{l}$ , 同时补加等量的相同温度的 HBS. 按上述 HPLC 法分别测定透析外液中 VCR 的含量和总的药物含量, 以下式计算各时间点 VCR 胶束的释放度.

释放度 = (释放介质中药物的量 / VCR 胶束中的药物总量)  $\times 100\%$

d. 耐稀释实验. 取 VCR 胶束 1 ml, 加 HBS, 将 VCR 的浓度稀释为  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . 精密吸取  $50 \mu\text{l}$ , 分别用 HBS 稀释 10 倍、100 倍、1 000 倍后, 以下操作同释放度试验, 分别于 2、6、12 h 取样  $100 \mu\text{l}$ , 置于离心过滤管 (MWCO 30 ku) 中, 离心 ( $10\,000 \text{ r/min}$ ) 15 min, 取滤液  $20 \mu\text{l}$ , 加流动相稀释至  $200 \mu\text{l}$ , 混匀, 取  $20 \mu\text{l}$  进样, 再按“包封率测定”方法操作, 计算包封率.

e. 体外抗肿瘤活性的研究. 采用四唑盐比色法 (MTT 法) 考察 VCR 胶束及游离 VCR 对 MCF-7 细胞的细胞毒性. MCF-7 细胞以 DMEM 培养液培养在培养瓶中, 置于  $37^\circ\text{C}$  培养箱中, 通入  $5\% \text{ CO}_2$  (相对湿度为  $95\%$ ). 2 天换一次培养液, 并于倒置显微镜下观察细胞生长状态, 待细胞生长至近融合时, 用胰蛋白酶消化, 将细胞按  $3 \times 10^3/\text{孔}$  接种于 96 孔培养板中, 培养 24 h 后, 吸去培养液, 每孔

加入以 DMEM 倍比稀释的 VCR 胶束及 VCR 各  $100 \mu\text{l}$ , 每个浓度设 3 个平行孔, 阴性对照孔加培养液  $100 \mu\text{l}$ . 继续培养 72 h 后, 吸去培养液, 每孔中加入  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  MTT 的 PBS 溶液  $100 \mu\text{l}$ , 再培养 4 h, 吸去孔内培养液, 每孔中加入含  $10\% \text{ SDS}$  的  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液  $100 \mu\text{l}$  溶解紫色结晶产物,  $37^\circ\text{C}$  放置 12 h 后, 用酶标仪在  $590 \text{ nm}$  测定吸光度.

## 2 结 果

### 2.1 VCR 胶束的形态和大小

包载 VCR 的 PEG-PE 胶束为透明的乳浊状悬液. 透射电镜 (TEM) 负染照片显示, VCR 胶束呈不规则的球状结构, 粒度分布窄而均一, 为典型的核-壳结构的胶束 (图 1a). 动态光散射法测得的 VCR 胶束的粒径与电镜照片观察到的非常一致, 平均粒径在  $(11.1 \pm 0.1) \text{ nm}$  (图 1 b).

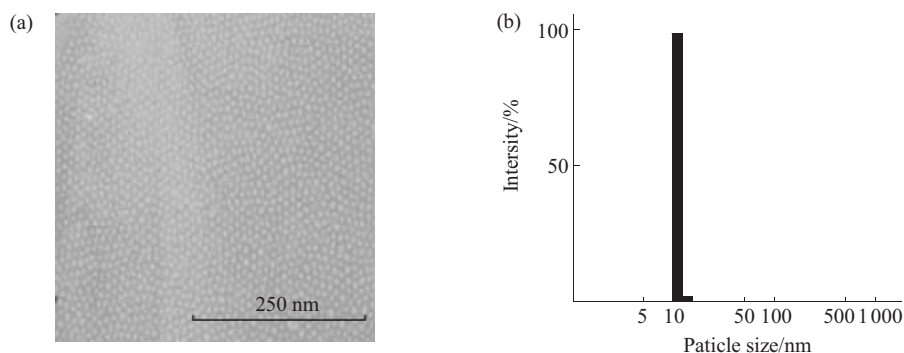


Fig. 1 Transmission electron microscope photograph of VCR encapsulated PEG-PE micelles (a) and particle size distribution of VCR encapsulated PEG-PE micelles measured by laser dynamic scatter (b)

### 2.2 VCR 胶束的包载效率

药物包载量是评价药物纳米输送载体的一个重要指标, 高包载效率的纳米载体不但可以减少纳米材料的用量, 更重要的是降低纳米材料本身的不良反应及其对药物的影响. 因此本文以包封率为指标对 VCR 与 PEG-PE 的药/脂比进行了研究, 结果见表 1. VCR 与 PEG-PE 的摩尔比在  $1:2 \sim 1:10$  的范围内对 VCR 的包载量无明显影响, 包载量在  $95\% \sim 98\%$  之间. 上述结果说明, 增加 PEG-PE 的用量并不能显著提高 VCR 的包载量. 另一方面, 从不同药/脂比对 VCR 包载量的实验结果来看, VCR 与 PEG-PE 的摩尔比为  $1:2$  时, VCR 的包载量就高达  $95\%$ , 表明 PEG-PE 胶束作为 VCR 的输送载体是有可能的.

Table 1 Efficiency of encapsulation of VCR in PEG-PE micelles

Molar ratio (VCR:PEG <sub>2000</sub> -DSPE)	Efficiency of encapsulation / %
1 : 2	$94.67 \pm 0.94$
1 : 4	$95.97 \pm 1.34$
1 : 6	$98.72 \pm 0.79$
1 : 10	$97.77 \pm 1.04$

### 2.3 VCR 胶束的释放度

控制或延缓药物的释放可显著提高药物的疗效和降低毒副作用, 因此, 药物的释放速率是衡量纳米药物载体的又一重要标志. 为了解胶束中 VCR 的释放特性及血清对 VCR 释放的影响, 选择药/脂比为  $1:2$  的 VCR 胶束进行释放度研究, 结果见图 2.

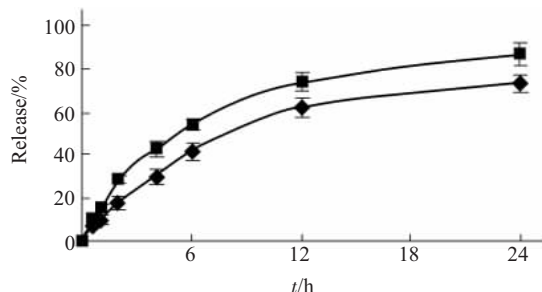
VCR胶束在 HBS (pH 7.0) 和含 50% FBS 的 HBS (pH 7.0) 两种释放介质中呈有规律的释放且无突释现象. 采用零级释放、一级释放、Higuchi 方程和 Weibull 分布函数 4 种释药模型分别对胶束的释放曲线进行拟合, 拟合结果表明 (表 2), 胶束中 VCR 的释放明显符合一级释放方程 ( $r = 0.9968$ ) 和

Weibull 分布方程 ( $r = 0.9954$ ).

血清对 VCR 胶束的释放有一定的影响, 在各测定时间点, 与不含血清的介质相比累计释放百分量升高约 10%, 但未改变胶束中 VCR 的释放特性, 释放符合一级释放方程 ( $r = 0.9997$ ) 和 Weibull 分布方程 ( $r = 0.9986$ ).

**Table 2 Regressing results for cumulative release of VCR encapsulated PEG-PE phospholipid micelles**

	HBS	With 50%FBS
Zero order kinetics	$y = 0.0284t + 0.1456$ $r = 0.9313$	$y = 0.0314t + 0.2258$ $r = 0.9141$
One order kinetics	$\lg(y - 0.7345) = -0.0676t - 0.1203$ $r = 0.9968$	$\lg(y - 0.8717) = -0.0661t - 0.0878$ $r = 0.9997$
Higuchi equation	$y = -0.1709t^{1/2} - 0.0423$ $r = 0.9849$	$y = -0.1912t^{1/2} - 0.0124$ $r = 0.9803$
Weibull distribution function	$\ln \ln \frac{1}{1-F(x)} = 0.7941 \ln t + 2.1251$ $r = 0.9954$	$\ln \ln \frac{1}{1-F(x)} = 0.7803 \ln t + 1.6811$ $r = 0.9986$



**Fig. 2 Release of VCR from VCR containing PEG-PE micelles (n=3) in HBS (pH 7.0)**

◆—◆: Without FBS; ■—■: With 50% FBS.

**2.4 VCR 胶束的耐稀释性**

包载抗肿瘤药物的纳米粒一般经静脉或动脉注射给药, 在进入体循环时被体液稀释, 尤其对聚合物胶束制剂, 因其形成是取决于所用聚合物的 CMC, 当聚合物的浓度低于 CMC 时, 胶束会缓慢解离成聚合物分子的单体状态, 释放出被包载的药物. 因此, 胶束制剂的耐稀释性具有重要的临床应用价值. 从表 3 中可看出, VCR 胶束有较显著的耐稀释性, 用 HBS 稀释 1 000 倍于 37℃ 孵育 6 h 仍有近 75% 的 VCR 以胶束的形式存在.

**Table 3 VCR containing PEG-PE micelles resist dilution with HBS**

t/h	Efficiency of encapsulation (%) with diluting indicative volumes		
	10	100	1000
2	80.6 ± 5.34	77.1 ± 4.56	82.0 ± 2.28
6	80.9 ± 2.30	75.3 ± 4.05	72.6 ± 1.23
12	70.9 ± 3.02	43.7 ± 4.24	57.5 ± 3.97

**2.5 VCR 胶束对乳腺癌细胞生长的抑制作用**

为了评价 VCR 经 PEG-PE 胶束包载是否改变 VCR 原有的抗肿瘤效果, 用 MTT 法测定了 VCR 胶束抑制人乳腺癌细胞(MCF-7)增殖情况并以游离 VCR 为对照. 由图 3 可见, VCR 胶束与游离 VCR 相比显示较强的抗肿瘤活性, 在低浓度时两者差别更为明显. 用 Logit 法分别计算 VCR 胶束和游离 VCR 的  $IC_{50}$  值,  $IC_{50}$  值分别为  $(0.060 \pm 0.027) \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $(3.34 \pm 0.54) \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 表明 VCR 经 PEG-PE 胶束包载后增强了 VCR 对乳腺癌细胞生长的抑制作用.

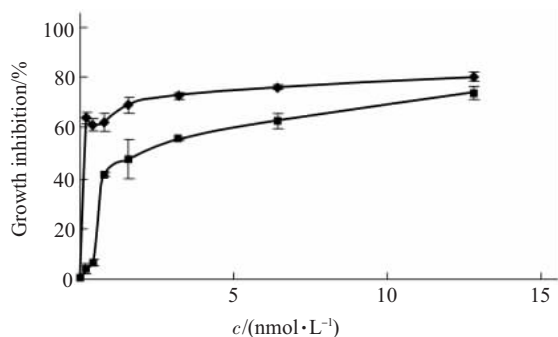


Fig. 3 Effect of micellar VCR and free VCR on growth inhibition in MCF-7 cell

◆—◆: Micellar VCR; ■—■: Free VCR.

### 3 讨 论

利用胶束的自组装原理, 本文首次用 PEG-PE 聚合物制备了包载 VCR 的 PEG-PE 胶束, 该方法制备工艺简单, 制得的胶束粒度分布窄而均一, 平均粒径为  $(11.1 \pm 0.1)$  nm 且获得了较高的包载效率 ( $\sim 95\%$ ). VCR 胶束释药缓慢并符合理想的一级动力学释药模型. VCR 胶束还具有较强的耐稀释性, 并显著地提高 VCR 对乳腺癌细胞生长的抑制作用.

药物的性质和浓度、载体的性质和用量等均会影响聚合物胶束的载药率, 以不同摩尔比制得的 VCR 胶束均具有较高的包封率, 说明 VCR 与 PEG-PE 之间具有强的相互作用. 从释放和耐稀释性试验结果进一步证明 VCR 与 PEG-PE 分子之间存在明显的作用. 为了将来更好地开发包载 VCR 的 PEG-PE 胶束并将其应用于临床, VCR 与 PEG-PE 形成胶束的分子机制还有待进一步阐明.

VCR 胶束显著提高 VCR 对乳腺癌细胞生长的抑制作用提示, VCR 胶束可能引起细胞内 VCR 的浓度升高, 因为一般认为 VCR 的作用靶标在细胞内的微管, 只有提高胞内 VCR 的浓度才能增强其抗肿瘤活性. 如果上述推断成立, 说明 VCR 包载于 PEG-PE 胶束中增强了 VCR 的跨膜转运和细胞内蓄积能力. 已有的研究表明, 纳米胶束通过内吞的方式进入细胞, 并以内涵体的形式存在于胞浆内, 形成的内涵体与溶酶体融合导致胶束解聚释放出被

包载的药物<sup>[1]</sup>. PEG-PE 胶束如何促进 VCR 的跨膜转运仍需进一步研究.

### 参 考 文 献

- 1 卢懿, 侯世祥, 陈彤. 长春花抗癌成分长春新碱研究的进展. 中国中药杂志, 2003, **28** (11): 1006~1009  
Lu R, Hou S X, Chen T. China J Chinese Materia Medica, 2003, **28** (11): 1006~1009
- 2 Wang J P, Takayama K, Nagai T. Pharmacokinetics and antitumor effects of vincristine carried by microemulsions composed of PEG-lipid, oleic acid, vitamin E and cholesterol. Int J Pharm, 2003, **251** (1~2): 13~21
- 3 Park E K, Lee S B, Lee Y M. Preparation and characterization of methoxy poly (ethylene glycol)/poly ( $\epsilon$ -caprolactone) amphiphilic block copolymeric nanospheres for tumor-specific folate-mediated targeting of anticancer drugs. Biomaterials, 2005, **26** (9): 1053~1061
- 4 Kataoka K, Matsumoto T, Yokoyama M, *et al.* Doxorubicin-loaded poly (ethylene glycol)-poly- ( $\beta$ -benzyl-L-aspartate) copolymer micelles: their pharmaceutical characteristics and biological significance. J Controlled Release, 2000, **64** (1~3): 143~153
- 5 Nakanishi T, Fukushima S, Okamoto K, *et al.* Development of the polymer micelle carrier system for doxorubicin. J Controlled Release, 2001, **74** (1~3): 295~302
- 6 Kwon G S. Polymeric micelles for delivery of poorly water-soluble compounds. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier System, 2003, **20** (5): 357~403
- 7 Lukyanov A N, Gao Z G, Mazzola L, *et al.* Polyethylene glycol-diacyl lipid micelles demonstrate increased accumulation in subcutaneous tumors in mice. Pharm Res, 2002, **19** (10): 1424~1428
- 8 Lukyanov A N, Gao Z G, Torchilin V P. Micelles from polyethylene glycol/phosphatidylethanolamine conjugates for tumor drug delivery. J Controlled Release, 2003, **91**: 97~102
- 9 Weissig V, Whiteman K R, Torchilin V. Accumulation of protein-loaded long-circulating micelles and liposomes in subcutaneous lewis lung carcinoma in mice. Pharm Res, 1998, **15** (10): 1552~1556
- 10 Zhigaltsev I V, Maurer N, Akhong Q F, *et al.* Liposome-encapsulated vincristine, vinblastine and vinorelbine: a comparative study of drug loading and retention. J Controlled Release, 2005, **104** (1): 103~111
- 11 Savic R, Luo L, Eisenberg A, *et al.* Micellar nanocontainers distribute to defined cytoplasmic organelles. Science, 2003, **300** (5619): 615~618

## VCR Encapsulated in Phospholipid Micelles to Improve Effect of Growth Inhibition on MCF-7 Cells\*

LIN Hong-Ying, LU Xiao-Yan, TANG Ning, LIANG Wei\*\*

(National Laboratory of Biomacromolecules, Protein & Peptide Pharmaceutical Laboratory,  
Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract** Vincristine (VCR) encapsulated in phospholipid micelles (micellar VCR) were made of polyethylene glycol phosphatidyl ethanolamine (PEG-PE) to improve its effect of growth inhibition on breast tumor cells and to decrease its drug toxicity. The morphological examination of micellar VCR was performed by transmission electron microscope (TEM). The mean particle size and size distribution were determined by dynamic light scattering (DLS). The entrapment efficiency and release behavior of VCR in micelles were investigated by reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC). The MTT method was employed to test the cytotoxicity of VCR-encapsulated micelles and free VCR in the MCF-7 cells. The micellar VCR exhibited an irregular spherical shape from TEM photographs. VCR can be efficiently encapsulated in PEG-PE micelles that having high entrapment efficiency (95%) when using the molar ratios of VCR/PEG-PE from 1 : 2 to 1 : 10. The mean diameter of the micellar VCR was  $(11.1 \pm 0.1)$  nm with narrow size distribution. The results of release and dilution experiments indicated that the micellar VCR was stable in both HBS and serum (pH 7.0), and the release profile of VCR from micelles can be well described by one-order kinetic equation ( $r = 0.9997$ ). The cytotoxic activity of VCR encapsulated PEG-PE micelles demonstrated high inhibitory effect on MCF-7 cell growth compared to the free VCR. It is concluded that VCR encapsulated in PEG-PE micelles were stable and have high drug entrapment efficiency and high effect of growth inhibition *in vitro*. PEG-PE micelles may be promising vectors for delivery of VCR into tumor *in vivo*.

**Key words** vincristine, PEG-PE micelles, growth inhibition of tumor cells

---

\*This work was supported by a grant from Key Innovative Projected of The Chinese Academy of Sciences (kjcx2-sw-h12-01).

\*\*Corresponding author . Tel: 86-10-64889861, E-mail: weixx@sun5.ibp.ac.cn

Received: February 27, 2006 Accepted: March 31, 2006