

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

喜樹鹼 Camptothecin 與不同磷脂質 phospholipid 單分子層 在氣/液界面行為之研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2214-E-041-001-

執行期間：94 年 08 月 01 日至 95 年 07 月 31 日

執行單位：嘉南藥理科技大學化妝品應用與管理系

計畫主持人：周宗翰

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2 年後可公開查詢

中 華 民 國 95 年 8 月 4 日

喜樹鹼(camptothecin)與不同磷脂質在氣/液界面行為之研究

周宗翰*

*嘉南藥理科技大學化粧品科技研究所

摘要

喜樹鹼(camptothecin)經證實是一種低水溶性且有效的抗癌藥物。由於其低水溶性及在人體的生理環境下其構造容易轉換為失活的 carboxylate 結構，臨床使用時會導致嚴重的副作用。因此，需要一個適當的藥物載體如微脂粒，以增加其藥物傳遞的效力。微脂粒主要是由磷脂質(phospholipid)所組成的脂雙層結構，其穩定性與其薄膜組成的物理化學性質息息相關。目前有許多研究已指出藉由氣/液界面單分子層的研究可幫助了解薄膜中混合分子間的交互作用及提供有用的物化特性。本計劃分別進行氣/液界面上喜樹鹼/hydrogenated soybean phosphatidylcholine (HSPC) 與喜樹鹼/egg phosphatidylcholine (EPC)混合單分子層等溫線的量測及面積鬆弛實驗。並深入探討喜樹鹼與不同磷脂質間的交互作用。

關鍵字：喜樹鹼、HSPC、EPC、混合單分子層、氣/液界面

1、前言

Camptothecin(CPT)，喜樹鹼，於 1965 年被 Wall 等人發現具有抗癌活性[1]，可用於治療卵巢癌、肺癌、乳癌等多種惡性腫瘤，但用於臨床實驗時發現此藥物對病人造成如白血球減少 (leucopenia)、膀胱炎 (cystitis)、腹瀉等嚴重的副作用[2-4]。其結構會因不同之酸鹼值環境而以兩種不同型態成平衡狀態，如圖 1.1 所示。在酸性環境中以 lactone form 為主，而在鹼性環境下 lactone form 的 CPT 則會水解而形成 carboxylate form，即在人體生理條件下 CPT 是以 carboxylate form 存在的[5]，且在人體血液中，因為血清白蛋白易與 carboxylate form 結合，使 carboxylate form 含量會較相同 pH 值但不含血清白蛋白的情形下高[6]。

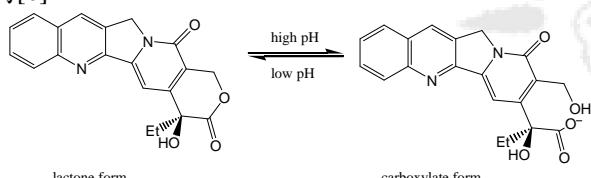


圖 1.1 喜樹鹼之兩種形式及其存在條件

為了克服上述造成臨床使用不便的缺點，出現利用如微脂粒(liposome)[7-12]為藥物傳遞系統包覆 CPT 的研究。然而這些文獻中，常使用的磷脂質為 dimyristic phosphatidyl choline(DMPC) 與 distearic phosphatidyl choline (DSPC) 均為較昂貴的材料。且其對喜樹鹼的包覆效率亦不高。本研究將採用易取得且價格較便宜的 EPC 與 HSPC 組成微脂粒作為喜樹鹼之微脂粒投藥系統的相關研究。微脂粒要能成功的應用於藥物釋放取決於微脂粒的物化性質。目前有許多研究已指出單分子層可視為脂雙層的片段部分，而且藉由氣/液界面單分子層的研究可幫助了解脂質膜中混合分子間的交互作用及提供有用的物化特性[13-20]。因此本研究分別進行氣/液界面上 HSPC/CPT 與 EPC/CPT 混合單分子層等溫線的量測及面積鬆弛實驗。並深入探討喜樹鹼與不同磷脂質間的交互作用。

2.研究方法

2.1 實驗藥品

喜樹鹼 camptothecin 購自 Acros organics (比利時)，分子量 348.4，純度 > 98%。卵黃卵磷脂(egg yolk phosphatidyl choline; EPC) 分子量 773，純度 > 99% 與氫化之大豆卵磷脂 (hydrogenated soybean phosphatidyl choline; HSPC) 分子量 774，純度 > 98% 均購自 NOF，日本。實驗使用的有機溶劑甲醇 (methanol) 購自 J. T. Baker(美國)而氯仿(chloroform) 則購自 Merck (德國)。

2.2 實驗方法

2.2.1 單分子層等溫線的量測

單分子層行為的量測主要是利用 Langmuir film balance，601A，購自 Nima (英國)，其鐵弗龍槽面積為 $20 \times 30 \text{ cm}^2$ 。在實驗進行前，先將 Langmuir trough 清洗乾淨後於槽中填充次水相 (subphase)，並使用恆溫水槽將次水相的溫度調節至實驗溫度。以氯仿：甲醇 4 : 1 (v/v) 為溶劑，分別製配 HSPC/CPT 不同比例混合系統，EPC/CPT 不同比例混合系統，再利用微量注射針吸取所需體積均勻散佈在水面上。等待 10 分鐘待溶劑揮發後，開始以 $6 \text{ cm}^2/\text{min}$ 的速度移動阻隔棒壓縮單分子層，並紀錄表面壓力與每分子佔據面積隨時間的變化。每種混合單分子層等溫線皆經三次獨立實驗重複確認。

2.2.2 面積鬆弛實驗

由於當外加側表面壓為 30-35 mN/m 時，單分子層之行為可模擬微脂粒，因此將表面壓固定在 35 mN/m 以觀察單分子層在此定膜壓下之穩定性。與 3.2.2 單分子層等溫線量測方式相同，然而，為測量固定表面壓下單分子層面積鬆弛行為，不需壓縮至單分子層崩潰，僅需壓縮至所欲觀察之表面壓並將表面壓固定即可，並由電腦記錄指定時間內單分子層面積隨時間的變化情形。每組實驗皆重複三次。

3.結果與討論

3.1 HSPC/CPT 混合單分子層系統

圖 3.1 為不同莫耳比之 HSPC/CPT 混合單分子層在 37°C 磷酸緩衝溶液 (pH = 7.4) / 空氣界面的 π -A 等溫線圖。曲線 1 及曲線 5 分別代表純 HSPC 及純 CPT 之單分子層。明顯地，在 HSPC 單分子層中添加了原本沒有界面現象的 CPT 後，改變了純 HSPC 之 π -A 等溫線形狀。但 HSPC/CPT 莫耳比 100/4.4、100/8.8 及 100/20 之等溫線幾乎一樣（曲線 2、3、4），代表 CPT 與 HSPC 單分子層混合的交互作用是有限的。除此之外，HSPC/CPT 混合單分子層等溫線隨著所含 CPT 的濃度升高其等溫線會往左偏移，面積的減少可能是因為部分的 CPT 會從氣/液界面脫附至水中所造成。因此由圖可推測，莫耳比 100/4.4 應是 HSPC/CPT 能形成之 CPT 含量最高混合單分子層組成。

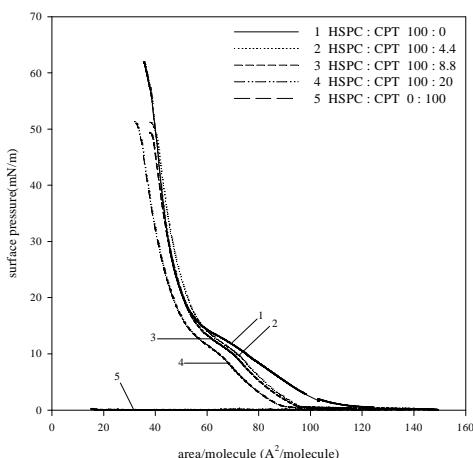


圖 3.1 在 37°C 下，不同莫耳比之 HSPC/CPT 混合單分子層於磷酸緩衝溶液 (pH = 7.4) / 空氣界面上之表面壓-每分子佔據面積等溫線圖。曲線 1. HSPC : CPT = 100 : 0，曲線 2. HSPC : CPT = 100 : 4.4，曲線 3. HSPC : CPT = 100 : 8.8，曲線 4. HSPC : CPT = 100 : 20，曲線 5. HSPC : CPT = 0 : 100。

圖 3.2 則為不同表面壓下 HSPC/CPT 混合單分子層實際面積與組成關係圖。非線性的關係表示兩不同分子是可混合的(miscible)，在表面壓小於 30 mN/m 時，由於無 CPT 實際分子佔據面積，無法十分確切的判定 CPT 與 HSPC 分子間在低表面壓下之作用情形。但是非線性的關係雖不明顯仍可獲得，表示兩分子可混合但作用不明顯，當表面壓升至 30 mN/m 甚至更高時，混合單分子層分子實際佔據面積與預估之理想混合面積相較之下呈膨脹狀態，其可能原因為 HSPC 單分子層原本在高表面壓下分子間之脂肪酸鏈可排列整齊而有較強之疏水作用力，因 CPT 的介入破壞其排列，造成膨脹作用。

再者，HSPC/CPT 莫耳比 100/4.4、100/8.8、100/20 之實際混合面積在高表面壓下成線性變化，應是 CPT 已被擠出而並非以 HSPC/CPT 100/8.8 與 100/20 (莫耳/莫耳) 的組成形成混合單分子層。因此在低表面壓時 HSPC/CPT 應可以高於 100/4.4 (莫耳/莫耳) 的比例形成混合單分子層，而到高表面壓時過量之 CPT 分子會被擠出，使實際混合面積越趨近於線性變化。

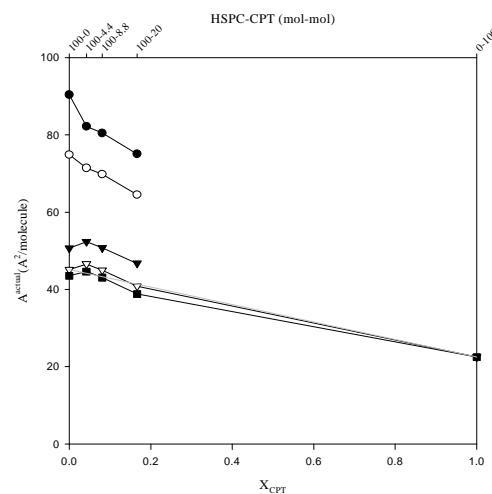


圖 3.2 在 37°C 下，不同莫耳比之 HSPC/CPT 混合單分子層於磷酸緩衝溶液 (pH = 7.4) / 空氣界面在不同表面壓 5 (●)，10 (○)，20 (▼)，30 (△)，35 (■) mN/m 時，實際混合面積與組成的關係。淺色線為 HSPC/CPT 混合單分子層於膜壓 30 mN/m 時虛擬理想混合面積。

圖 3.3 是對 HSPC/CPT 混合單分子層在固定表面壓 35 mN/m 所進行之鬆弛實驗。如圖所示，純 HSPC 在此固定膜壓下分子佔據面積並未隨時間有改變，為相當穩定之單分子層。然而在添加 CPT 而成 HSPC/CPT 100/4.4 (莫耳/莫耳) 混合單分子層後，每分子佔據面積隨時間增加而急速減小，達平衡時之分子佔據面積已較鬆弛實驗開始時之分子佔據面積少了 27%。此比率遠大於混合單分子層中 CPT 之含量，故分子佔據面積減少並非完全因 CPT 由單分子層漏失所造成，而有可能是 HSPC 與 CPT 在此表面壓下有分子重新排列行為或成核成長的機制發生，當混合單分子層中 CPT 含量更高時，面積縮小的程度越高。因此 CPT 的添加使得 HSPC/CPT 混合單分子層在氣/液界面固定表面壓 35 mN/m 下，呈現出動態不穩定之混合單分子層。

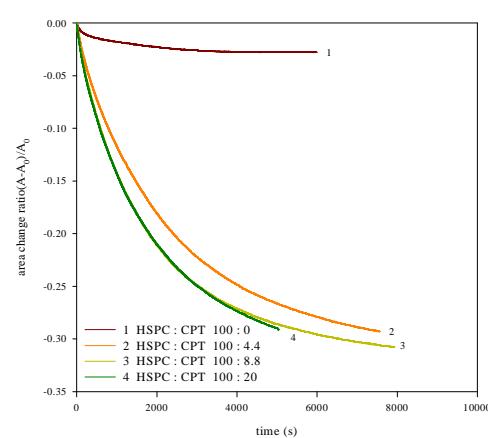


圖 3.3 在 37°C 下，不同莫耳比之 HSPC/CPT 混合單分子層於磷酸緩衝溶液 (pH = 7.4) / 空氣界面在表面壓 35 mN/m 時，單分子層面積變化比率隨時間的變化關係。

3.2 EPC/CPT 混合單分子層系統

圖 3.4 為不同莫耳比之 ECP/CPT 混合單分子層在 37°C 磷酸緩衝溶液 (pH = 7.4) / 空氣界面上的 π -A 等溫線圖。在此系統中，可觀察 CPT 與 EPC 之間的關係。曲線 1 及曲線 5 分別代表純 EPC 及純 CPT 之單分子層。CPT 與 EPC 形成之混合單分子層 π -A 等溫線形狀僅與 EPC π -A 等溫線有些微的不同，並未如 CPT 對 HSPC 單分子層 π -A 等溫線造成明顯的改變，此應與 EPC 分子在此溫度下為分子排列較鬆散的型態而 CPT 加入並不能對此排列有太大改變有關或表示 CPT 與 EPC 的交互作用較 CPT/HSPC 不明顯。而且 EPC/CPT 莫耳比 100/4.4、100/8.8 及 100/20 之等溫線幾乎一樣（曲線 2、3、4），代表 CPT 與 EPC 單分子層混合的量亦有限，等溫線往左偏移、分子佔據面積的減少可能是因為部分未被留在 EPC 單分子層中的 CPT 溶解至水中，分子漏失所造成。因此由圖可知，莫耳比 100/4.4 應也是 EPC/CPT 能形成之 CPT 含量最高混合單分子層組成。

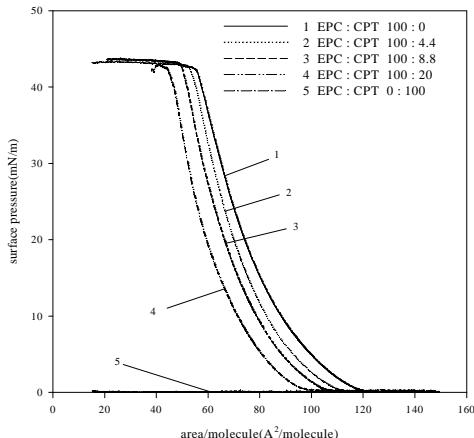


圖 3.4 在 37°C 下，不同莫耳比之 EPC/CPT 混合單分子層於磷酸緩衝溶液 (pH = 7.4) / 空氣界面上之表面壓-每分子佔據面積等溫線圖。1. EPC : CPT = 100 : 0 , 2. EPC : CPT = 100 : 4.4 , 3. EPC : CPT = 100 : 8.8 , 4. EPC : CPT = 100 : 20 , 5. EPC : CPT = 0 : 100 。

圖 3.5 則為不同表面壓下 EPC/CPT 混合單分子層實際面積與組成關係圖。無論低表面壓或高表面壓，不同組成之 EPC/CPT 混合單分子層實際混合面積在低表面壓下略成非線性（接近線性），到了高表面壓較為明顯的為非線性關係，非線性關係表示兩分子是可混合的(miscible)，即 EPC 與 CPT 可能可形成至少比例為 100/8.8 (莫耳/莫耳) 之混合單分子層。

圖 3.6 為對 EPC/CPT 混合單分子層在固定表面壓 35 mN/m 所進行之鬆弛實驗。如圖所示，純 EPC 單分子層在此表面壓下即為一不穩定之單分子層，其每分子佔據面積不停地隨時變化著。EPC/CPT 混合單分子層之分子佔據面積在此表面壓下也隨時變有大幅變化，並與 HSPC/CPT 混合單分子層於鬆弛實驗中情形類似，EPC/CPT 100/8.8 (莫耳/莫耳) 混合單分子層面積減少比率高達 25%，而 100/20 (莫耳/莫耳) 混合單分子層面積減少比率更高達 60%，皆遠遠大於混合單分子層中 CPT 的含量，除了 EPC 本身不穩定及 CPT

由單分子層漏失外，有可能和 HSPC 相同，在此表面壓下與 CPT 混合後可能有成核成長機制產生，使單分子層面積驟減。

由以上利用固定表面壓下面積鬆弛實驗分別對 HSPC-CPT 及 EPC-CPT 間作用力探討可知，CPT 與 HSPC 分子間作用情形較 EPC 與 CPT 之間的交互作用明顯，且在固定表面壓 35 mN/m 下均為不穩定之混合單分子層。HSPC 及 EPC 與 CPT 有些微之作用力，但分別僅能與 CPT 形成莫耳比 100/4.4 及 100/8.8 之混合單分子層。在固定表面壓 35 mN/m 下，純 HSPC 雖較純 EPC 穩定，與 CPT 混合後其面積鬆弛行為亦較 EPC/CPT 混合分子層小但仍同為非動態穩定之混合單分子層。

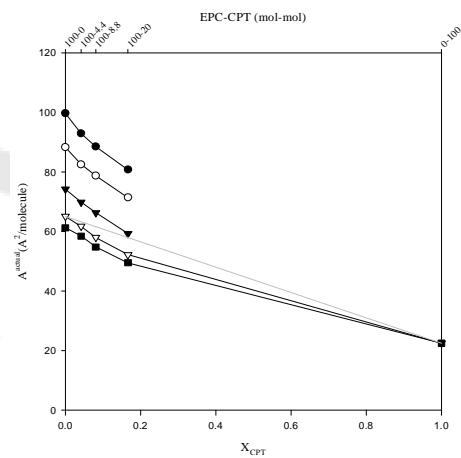


圖 3.5 在 37°C 下，不同莫耳比之 EPC/CPT 混合單分子層於磷酸緩衝溶液 (pH = 7.4) / 空氣界面上在不同表面壓 5 (●), 10 (○), 20 (▼), 30 (▽), 35 (■) mN/m 時，實際混合面積與組成的關係。淺色線為 EPC/CPT 混合單分子層於膜壓 30 mN/m 時虛擬理想混合面積。

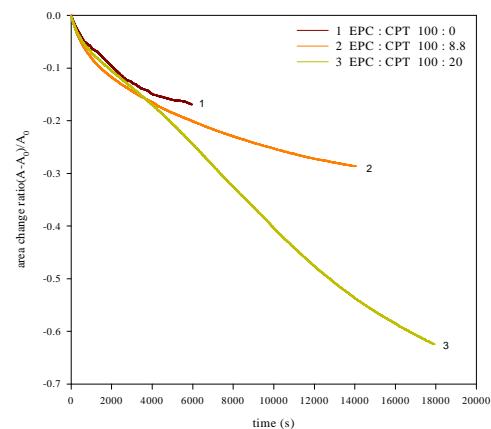


圖 3.6 在 37°C 下，不同莫耳比之 EPC/CPT 混合單分子層於磷酸緩衝溶液 (pH = 7.4) / 空氣界面上在表面壓 35 mN/m 時，單分子層面積變化比率與時間關係。

4. 結論

藉由在 37°C 下 HSPC/CPT 混合單分子層與 EPC/CPT 混合單分子層在氣/液界面的表面壓-每分子佔據面積等溫線可知 CPT 本身不會在氣液界面上形成

穩定的不溶性單分子層，而且 CPT 與 HSPC 之間及 CPT 與 EPC 之間的交互作用力均有限。然而由等溫線的變化看來，HSPC 與 CPT 之間的交互作用比 EPC 與 CPT 之間得交互作用大。除此之外，吾人發現莫耳比 100/4.4 應是 HSPC/CPT 能形成之 CPT 含量最高混合單分子層組成。部分過多的 CPT 可能會從氣/液界面脫附至水中導致分子佔據面積的減少。

從 HSPC/CPT 與 EPC/CPT 兩不同比例混合系統的面積鬆弛曲線結果看來，在高表面壓 35mN/m 下，純 HSPC 單分子層為一穩定之單分子層、無顯著的面積鬆弛行為。然而隨著 CPT 的添加使得混合單分子層產生明顯的面積鬆弛現象，所以 HSPC 與 CPT 混合分子層為動態不安定的單分子層，類似的現象亦發生於 EPC/CPT 混合單分子層系統。但是 EPC/CPT 混合系統的面積鬆弛行為更為顯著。

5. 參考文獻

1. Wall M. E., Wani M. C., Cook C. E., Plant anti-tumor agents. 1. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloid leukemia and tumor inhibitor from Camptotheca acuminata. *J. Am. Chem. Soc.*, 88, 3888-3890 (1966)
2. Gottlieb J. A., Guarino A. M., Call J. B., Preliminary pharmacologic and clinical evaluation of camptothecin sodium (NSC-100880). *Cancer Chemother. Rep.*, 54, 461-470 (1970)
3. Muggia F. M., Creaven P. J., Hansen H. H., Phase I clinical trial of weekly and daily treatment with camptothecin (NSC-100880): correlation with preclinical studies. *Cancer Chemother. Rep.*, 56, 515 (1972)
4. Moertel C. G., Schutt R. J., Reitemeier R. J., Phase II study of camptothecin (NSC-100880) in the treatment of advanced gastrointestinal cancer. *Cancer Chemother. Rep.*, 56, 95 (1972)
5. Hertzberg R. P., Caranfa M. J., Holden K. G., Jakas D. R., Gallagher G., Mattern M. R., Mong S. M., Bartus J. O., Johnson R. K., Kingsbury W. D., Modification of the hydroxy lactone ring of camptothecin: inhibition of mammalian topoisomerase I and biological activity. *J. Med. Chem.*, 32, 715-720 (1989)
6. Mi Z., Burke T. G., Marked interspecies variations concerning the interactions of camptothecin with serum albumins: a frequency-domain fluorescence spectroscopic study. *Biochemistry*, 33, 12540-12545 (1994)
7. Burke T. G., Mishra A. K., Wani M. C., Wall M. E., Lipid bilayer partitioning and stability of camptothecin drugs. *Biochemistry*, 32, 5352-5364 (1993)
8. Burke T. G., Gao X., Stabilization of topotecan in low pH liposomes composed of distearoylphosphatidylcholine. *J. Pharma. Sci.*, 83, 967-969 (1994)
9. Subramanian D., Muller M. T., Liposomal encapsulation increase the activity of the topoisomerase I inhibitor topotecan. *Oncol. Res.*, 7(9), 461-469 (1995)
10. Sugerman S. M., Zou Y. Y., Wasan K., Poirot K., Kumi R., Reddy S., Perez-soler R., Lipid-complexed camptothecin: formulation and initial biodistribution and antitumor activity studies. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 37, 531-538 (1996)
11. Cortesi R., Esposito E., Maietti A., Menegatti E., Nastruzzi C., Formulation study for the antitumor drug camptothecin: liposomes, micellar solutions and a microemulsion. *Inter. J. Pharma.*, 159, 95-103 (1997)
12. Koshkina N. V., Gillbert B. E., Waldrep J. C., Knight A. S. V., Distribution of camptothecin after delivery as a liposome aerosol or following intramuscular injection in mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 44, 187-192 (1999)
13. Blume A., A comparative study of the phase transitions of phospholipids bilayers and monolayers. *Biochim. Biophys. Acta*, 557, 32-44 (1979)
14. Weis R. M., McConnell H. M., Cholesterol stabilizes the crystal-liquid interface in phospholipids monolayers. *J. Phys. Chem.*, 89, 4453-4459 (1985)
15. Mitchell M. L., Dluhy R. A., In situ FT-IR investigation of phospholipids monolayer phase transitions at air-water interface. *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 712-718 (1988)
16. Alsina M. A., Mestres C., Rabanal F., Busquets M. A., Reig F., Miscibility of HBV peptides and dipalmitoylphosphatidylcholine in monolayers. *Langmuir*, 9, 1129-1133 (1993)
17. Bürner H., Benz R., Gimmler H., Hartung W., Stillwell W., Abscisic acid-lipid interactions: a phospholipids monolayer study. *Biochim. Biophys. Acta*, 1150, 165-172 (1993)
18. Rana F. A., Mautone A. J., Dluhy R. A., Surface chemistry of binary mixtures of phospholipids in monolayers. Infrared studies of surface composition at varying surface pressure in pulmonary surfactant model system. *Biochemistry*, 32, 3169-3177 (1993)
19. Gopal A., Lee K. Y. C., Morphology and collapse transition in binary phospholipids monolayers. *J. Phys. Chem. B*, 105, 10348-10354 (2001)
20. Izumi K., Seiichi A., Hidekatsu M., Atsushi S., Phosphatidylcholine monolayers observed with Brewster angle microscopy and π -A isotherms. *Thin Solid Films*, 393, 80 (2001)