

新型阿霉素抗耐药性隐形脂质体的体外细胞毒和体内毒性研究

王坚成¹, 刘晓岩², 吕万良¹, How-Sung Lee³, Boon-Cher Goh⁴, 张强^{1*}

(北京大学药学院 1. 药剂系, 2. 细胞与分子药理系, 北京 100083;

3. 新加坡国立大学医学院药理系, 新加坡 117597; 4. 新加坡国立大学医院肿瘤研究所, 新加坡 117597)

摘要:目的 多药耐药 (multidrug resistance, MDR)是目前临床肿瘤治疗的主要障碍。本文研制了新型阿霉素抗耐药性隐形脂质体 (DARSLs),并对其体外细胞毒和体内毒性进行评价。方法 采用硫酸铵梯度法将阿霉素 (DOX)和维拉帕米 (VER)药物同时包载到隐形脂质体内,制备成 DARSLs;采用耐药性鼠前列腺肿瘤细胞株 MLLB2和子宫肉瘤细胞株 MES-SA/DX5进行体外细胞毒性评价;采用 SD大鼠对阿霉素抗耐药性隐形脂质体进行体内毒性评价。结果 在药脂比 (DOX/VER/Lipid, w/w/w)为 1:0.11:10时,阿霉素包封率大于 90%,维拉帕米包封率约为 70%。平均粒径为 (118.1 ± 22.3) nm。体外细胞毒性实验证实该脂质体能够在体外有效地逆转肿瘤细胞耐药性,并导致耐药肿瘤细胞生长抑制。体内系统毒性及心脏毒性实验结果显示,该脂质体能够明显改善游离阿霉素单独使用或与维拉帕米联合使用时产生的全身毒性,尤其是心脏毒性。结论 DARSLs具有相对较低的毒性,且能有效抑制耐药肿瘤的生长。

关键词: 阿霉素; 维拉帕米; 隐形脂质体; 多药耐药性; 毒性

中图分类号: R943.4; R965.3 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2005)05-0475-06

The *in vitro* cytotoxicity and *in vivo* toxicity of doxorubicin antiresistant stealth liposomes

WANG Jian-cheng¹, LIU Xiao-yan², LÜ Wan-liang¹, How-Sung Lee³,
Boon-Cher Goh⁴, ZHANG Qiang^{1*}

(1. Department of Pharmaceutics, 2. Department of Cellular and Molecular Pharmacology, Peking University, Beijing 100083, China; 3. Department of Pharmacology, National University of Singapore, Singapore 117597; 4. Department of Hematology and Oncology, National University Hospital, Singapore 117597)

Abstract: Aim Multidrug resistance (MDR) as a major obstacle to successful clinical cancer chemotherapy, searching a novel effective antiresistant drug would be necessary. **Methods** A novel doxorubicin anti-resistant stealth liposomes (DARSLs) was prepared by co-encapsulating doxorubicin (DOX) and verapamil (VER) into stealth liposomes with ammonium sulfate gradient remote loading approach. *In vitro* cytotoxicity of various DOX formulations and *in vivo* toxicity of DARSLs were evaluated using DOX-resistant rat prostate cancer cell line (MLLB2), human uterus sarcoma cell line (MES-SA/DX5) and normal SD rats, separately. **Results** The DARSLs liposome suspensions mainly consisted of homogeneous large unilamellar vesicles (LUV) with average particle size of (118.1 ± 22.3) nm. Encapsulation efficiencies of DOX and VER in DARSLs were more than 90% and about 70%, respectively, when the ratio of DOX/VER/Lipid was 1:0.11:10 (w/w/w). *In vitro* cytotoxicity tests of the DARSLs using rat prostate cancer cell line (MLLB2) and human uterus sarcoma cell line (MES-SA/DX5) showed that 5 μmol·L⁻¹ VER significantly reversed DOX-resistance of these 2 cell lines and

收稿日期: 2004-10-09.

* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 10 - 82802791, E-mail: zqdodo@bjmu.edu.cn

DARSLs was the most effective on inhibition of DOX-resistant cell growth. Besides, compared to FDFV, much slower DOX distribution (confocal microscopy) to nuclei and cytoplasm in MLLB2 cells for DARSLs suggested that it might possess distinct mechanism of cytotoxicity. Systemic and cardiac toxicity evaluations in normal SD rats suggested that liposomal encapsulation could significantly improve the severe cardiotoxicity arising from simultaneous administration of DOX and VER. **Conclusion** DARSLs is a novel anticancer liposome formulation with lower cardiotoxicity, effective drug-resistance reversal and intravenous injection.

Key words: doxorubicin; verapamil; stealth liposome; multidrug resistance; toxicity

随着化疗药物的频繁使用,肿瘤治疗中的耐药问题显得越来越突出,阿霉素也不例外。多药耐药(multidrug resistance, MDR)是目前临床肿瘤治疗中的主要障碍^[1,2]。已经证实将维拉帕米与抗肿瘤药物联合用药可以增加肿瘤细胞中抗肿瘤药物的积累^[3]。但是,其他研究也表明,当两者联合使用时,由于维拉帕米非特异性抑制正常组织中表达的P-糖蛋白,常会导致两种药物之间发生不良的动力学相互作用,从而使得抗肿瘤药物的体内毒性增强。本研究将维拉帕米和阿霉素共同包载在脂质体内制备阿霉素抗耐药性隐形脂质体制剂,并采用耐药肿瘤细胞株和正常SD大鼠对该脂质体制剂进行体外细胞毒和体内毒性的评价。

材料与方 法

材料与仪器 卵磷脂、胆固醇和 PEG₂₀₀₀-DSPE 购自 NOF (Tokyo, Japan); 硫酸铵, propidium iodide (PI), 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), 盐酸维拉帕米 (VER) 购自 Sigma (USA); 聚碳酸酯膜过滤器购自 Millipore Corporation (USA); 孔径分别为 0.6, 0.4, 0.2 和 0.1 μm 的聚碳酸酯膜购自 Whatman 公司。盐酸阿霉素 (DOX) 购自 Woo-Shin Med. Co. (S. Korea); 高效液相色谱 (Waters 2690 HPLC 系统, Waters Nova-pak C₈ 柱, 3.9 mm × 150 mm, 4 μm) 联接荧光检测器 (Waters 474 型) 和紫外检测器 (Waters 996 PDA)。其他试剂均为市售商品。

脂质体的制备 卵磷脂 (M_w : 750, 100 μmol), 胆固醇、PEG-DSPE (55: 40: 5, 摩尔比) 溶解于氯仿中。通过旋转蒸发形成均匀脂膜。加入 150 mmol·L⁻¹ 硫酸铵溶液将脂膜水化。充氮气, 在 60 °C 水浴中温育, 超声, 形成带有蓝色荧光透明液体。脂质体囊泡经过聚碳酸酯膜 (膜孔直径分别为 0.6, 0.4 和 0.2 μm) 依次挤压形成空白单室脂质体后, 取脂质体悬浮液 10 mL 装入透析膜袋中, 在 100

mmol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 1 L 中进行透析, 形成带有硫酸铵梯度的空白单室脂质体均匀液体。利用脂质体膜内外的硫酸铵梯度进行药物装载。临用前, 使用小柱离心法得到纯化的阿霉素抗耐药性隐形脂质体。未包载药物的空白脂质体制备过程与上述操作相似, 将用于水化脂膜的硫酸铵溶液更换为 100 mmol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 即可。脂质体形态学和粒径分别采用负染透射电镜 (Philips EM 400T Eindhoven, NL) 和光散射粒径测定仪 (Zetasizer 3000HSA, Malvern Instruments Ltd., USA) 进行考察。采用高效液相色谱测定脂质体包载的阿霉素和维拉帕米含量后, 计算各自的包封率。

细胞株 Mat-Ly-Lu-B2 (MLLB2), MES-SA (敏感细胞) 和 MES-SA/DX5 (耐药细胞) 细胞株均购自 ATCC (USA)。MLLB2 是由敏感的鼠前列腺肿瘤细胞株 MAT-Ly-Lu 经过含有阿霉素细胞培养液长期培养形成的耐药细胞株。耐药细胞株 MES-SA/DX5 由敏感细胞株 MES-SA (人子宫肉瘤细胞株) 在含有阿霉素培养液中经过长期培养建立起来。该 2 种耐药细胞株均有 P 糖蛋白的高度表达。

细胞毒试验 MTT 测定方法根据 Hansen 等^[4] 研究方法稍作修改。5 × 10³ 细胞 (MLLB2, MES-SA 和 MES-SA/DX5) 种植在 96 孔板中, 经过 24 h 培养, 细胞培养液更换为含有各种药物及不同药物浓度的培养液, 其中包括游离 DOX (FD), 脂质体包载 DOX (LD), 游离 DOX 和游离 VER 组成的混合液 (FDFV), 脂质体包载 DOX 和游离 VER 组成的混合液 (LDFV), DOX 脂质体和 VER 脂质体组成的混合液 (LDLV) 以及阿霉素抗耐药性隐形脂质体 (DARSLs)。空白培养液中培养的细胞作为空白对照。经 72 h 温育, 每一孔中加入 MTT (5 mg·mL⁻¹) 溶液 20 μL, 继续温育 4 h。小心移去培养液, 蓝色的甲瓚晶体溶解在二甲亚砜 100 μL 中, 振荡均匀后, 在波长 570 nm 处记录每个孔的吸收度。

实时监测细胞内阿霉素药物动态分布 激光扫

描共聚焦显微镜(LSCM)可以用来进行活细胞光学虚拟切片并能观察不同层次的细胞内药物分布情况。本实验利用这一特性来实时监测荧光药物被耐药细胞(MLLB2)摄入后的细胞内分布情况^[5-7]。仪器采用反转 Zeiss 激光扫描共聚焦显微镜(LSM510; Carl Zeiss, Germany)带有 Zeiss Plan-Apochromat 63 × /1.4 oil DIC 浸润目镜(Zeiss, Germany)的标准显微镜。光学虚拟切片厚度设定为 1 μm。将调整到合适浓度的药物加入到细胞培养液中,立即开始实时记录细胞内荧光分布情况。相同浓度的各种药物剂型 FD, FDFV 和 DARSLs (DOX 3.3 μmol·L⁻¹, VER 5 μmol·L⁻¹)都分别进行了细胞内阿霉素药物分布情况的观察。

动物实验方案 阿霉素用灭菌生理盐水调整浓度制成阿霉素注射液(FD),盐酸维拉帕米溶解在无菌生理盐水中制成维拉帕米注射液(FV),LD和DARSLs都分别使用无菌生理盐水稀释到合适浓度。

将实验动物(SD大鼠)随机分成6组,包括生理盐水对照组(Saline),FD,FV,FDFV,LDFV以及DARSLs,每组6-10只动物。各种药物剂型经尾静脉注射给药。

多剂量给药方案采用每次阿霉素剂量为 5 mg·kg⁻¹,维拉帕米的剂量为 1 mg·kg⁻¹,分3次给药,每次给药间隔3d,每组动物给药累加剂量为阿霉素 15 mg·kg⁻¹和维拉帕米 3 mg·kg⁻¹。此实验方案与肿瘤移植模型多剂量治疗方案基本一致。

心电图记录 动物心电图(ECG)使用心电图记录仪(ADInstrument Power Lab)记录,数据采集使用 Chart 4 for Windows 软件(Version 4.1)。静脉注射第1个剂量后记录5h,第2和第3个剂量给药后记录1h,观察心电图谱中各个参数的变化。所有动物实验麻醉均使用7%水合氯醛溶液(0.35 mg·kg⁻¹, ip)。动物麻醉后,将电极针插入脚趾皮肤内记录心电图(ECG)。ECG各种参数(包括心率,QRS,Q-T)从心电图谱中读取数据。

心肌组织切片 采用透射电子显微镜观察心肌组织损伤情况^[8]。各组动物(每组3只)在接受iv3个给药剂量,每隔3d给予1个剂量,累加阿霉素剂量为 15 mg·kg⁻¹和维拉帕米剂量为 3 mg·kg⁻¹。d9处死动物,取出心脏组织。切取左心室部分放入2.5%(w/v)戊二醛中固定2h,小心分割成体积大约为1mm³的长条小块,然后固定、脱水、包埋、切片等。将超薄片移放到300目镍网小圆网上,然后

用2%(w/v)乙酸双氧铀溶液染色8min,晾干,使用 Philips EM200 电子显微镜观察心肌细胞的损伤情况。生理盐水组作对照。

统计学分析 数据统计学显著性差异分析采用 Student's *t*-test 进行处理。

结果

1 脂质体形态、粒径及药物包封率

采用电子显微镜观察负染脂质体,结果显示挤压后获得的脂质体悬浮液中含有分布均匀的单室脂质体囊,多呈球形或椭圆形。采用激光散射粒径仪测定脂质体粒径,结果表明包载有阿霉素和维拉帕米的脂质体平均粒径为(118.1 ± 22.3) nm。从形态和粒径看,DARSLs,LD以及空白脂质体之间粒径大小和分布并没有显著性差异。根据HPLC测定结果,计算得到DARSLs脂质体中阿霉素包封率大于90%,维拉帕米包封率为70%。

2 不同阿霉素制剂间细胞毒性的比较

各种阿霉素制剂对鼠前列腺耐药肿瘤细胞(MLLB2)和人子宫肌瘤细胞(MES-SA和MES-SA/DX5)的体外细胞毒性采用MTT分析方法进行评价(表1)。结果显示:DARSLs的IC₅₀大约为0.080 μmol·L⁻¹,与LDFV(1.0 μmol·L⁻¹)相比较,对耐药细胞株MLLB2的细胞毒性增加约13倍(P < 0.01),并且耐药逆转效果也达到了最大(1783倍)。LDFV制剂的细胞毒性显著大于FDLV制剂(P < 0.05),而在LDLV和DARSLs两种制剂间没有显著性差异。

不同阿霉素剂型对耐药细胞株(MES-SA/DX5)的细胞毒性(IC₅₀ μmol·L⁻¹)与MLLB2细胞毒试验的结果十分相似。游离阿霉素(FD)对敏感细胞株(MES-SA)的细胞毒性(IC₅₀)为0.158 μmol·L⁻¹。在该耐药细胞株的毒性实验中发现,与FD相比,DARSLs的IC₅₀约为0.130 μmol·L⁻¹,其耐药性逆转效应增加了17倍。DARSLs,LDLV,FDFV和FDLV阿霉素制剂的IC₅₀值无显著性差异,而且基本上都获得了最大的耐药逆转效果,使得耐药细胞完全恢复对阿霉素的敏感性。与这四种制剂相比,含有相同浓度阿霉素和维拉帕米的LDFV却表现出了相对弱的细胞毒性[IC₅₀为(0.21 ± 0.06) μmol·L⁻¹](P < 0.05)。对于该细胞株而言,LD与FD之间的细胞毒性没有显著性差异。

3 耐药细胞内阿霉素动态分布

利用激光扫描共聚焦显微镜实时监测耐药细胞

摄入阿霉素药物的动态过程,药物在细胞内分布情况见图 1。结果显示温育 10 min,3种阿霉素制剂所形成细胞内荧光分布基本相同,均在细胞浆内;随着温育时间延长,三者之间发生明显的差异。温育 240 min后,FD组细胞内的阿霉素荧光仍仅分布在细胞浆内,没有发现药物进入细胞核,FDFV和DARSLs组细胞内阿霉素荧光分布情况非常相似,阿霉素荧光基本上均匀弥散在整个细胞内,包括细胞核内,但相对于FDFV组而言,DARSLs组细胞内的阿霉素分布扩散过程非常缓慢。

4 动物体内全身毒性

在给药的 9 d内,每天记录动物存活数目和体重。结果发现,在给药 3个剂量后,FD或FDFV组动物发生严重的体重减轻(图 2),并且出现 30% - 50%的死亡率。而接受脂质体制剂给药组(LDFV和DARSLs)动物,体重减轻情况明显改善且存活率仍为 100%。另外,生理行为学观察结果显示游离药物组中 80%动物有不同程度的腹泻症状发生并且毛发脏乱,而在脂质体制剂组则没有发现这些特征。经各种阿霉素药物连续 3个剂量处理后的动物

Table 1 Cytotoxicity of various DOX formulations (IC_{50} , $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) on MLLB2, MES-SA and MES-SA/DX5 cell lines

Fomulation	$IC_{50} / \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$						
	FD	FDFV	LD	LDLV	LDFV	FDLV	DARSLs
MLLB2	141 ±33	0.15 ±0.03	89 ±4	0.100 ±0.010	1.0 ±0.5	0.30 ±0.15	0.080 ±0.020
(RF)**	(1.0)	(958)	(1.59)	(1 423)	(147)	(465)	(1 783)
MES-SA/DX5	2.3 ±0.4	0.130 ±0.020	2.1 ±0.3	0.140 ±0.020	0.21 ±0.06	0.140 ±0.020	0.130 ±0.010
(RF)**	(1.0)	(17.69)	(1.08)	(17.04)	(10.75)	(17.04)	(17.97)
MES-SA	0.158						

* MLLB2, MES-SA and MES-SA/DX5 (5 000 cells/well) were incubated in medium containing various DOX fomulations for 72 h at 37 °C in an atmosphere of 95% humidity and 5% CO₂. MTT assay was analysed by microplate reader at wavelengths 570 nm and 650 nm (n = 3 - 6). ** Reversal factors were calculated from the ratio between the mean IC₅₀ values of other DOX fomulations and Free DOX only. DARSLs: Doxorubicin antiresistant stealth liposomes fomulation; FD: Free doxorubicin; LD: Doxorubicin stealth liposomes fomulation; FDFV: Mixture of free doxorubicin and free verapamil fomulation; FDLV: Mixture of free doxorubicin and liposomal verapamil fomulation; LDFV: Mixture of liposomal doxorubicin and free verapamil fomulation; LDLV: Mixture of liposomal doxorubicin and liposomal verapamil fomulation

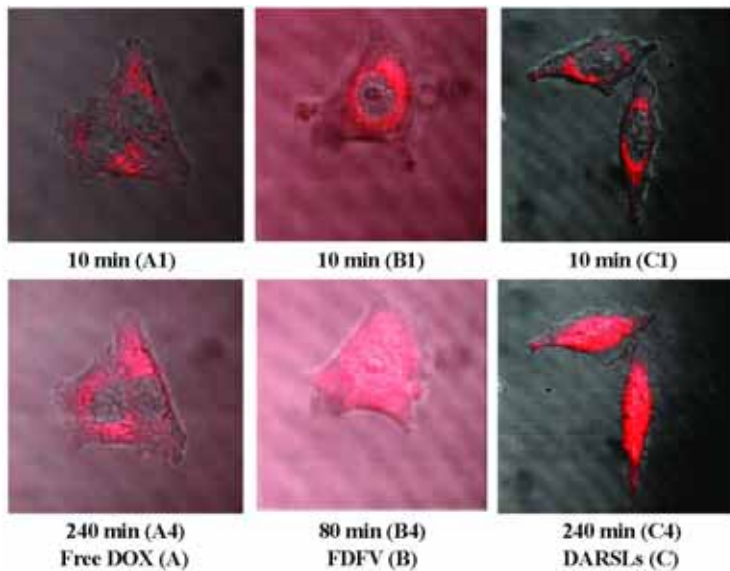


Figure 1 MLLB2 cells were exposed to free DOX, FDFV and DARSLs at concentration of $5.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DOX and $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ VER. Intracellular distribution of DOX fluorescence was monitored by laser scanning confocal microscopy with a Zeiss Plan-Apochromat $63 \times / 1.4$ oil DIC immersion objective lens. Photographs were modified by Zeiss LSM image browser (Ver 2.80). DARSLs: Doxorubicin antiresistant stealthy liposomes fomulation; FDFV: Mixture of free doxorubicin and free verapamil fomulation

脾脏重量/体重的变化结果表明,与对照组相比,游离药物(FD和FDFV)处理过的动物脾脏重量显著降低($P < 0.01$)。而在阿霉素脂质体制剂组中脾脏萎缩情况则有明显的改善($P < 0.05$),虽然相对于生理盐水对照组而言仍有一定程度的损伤。

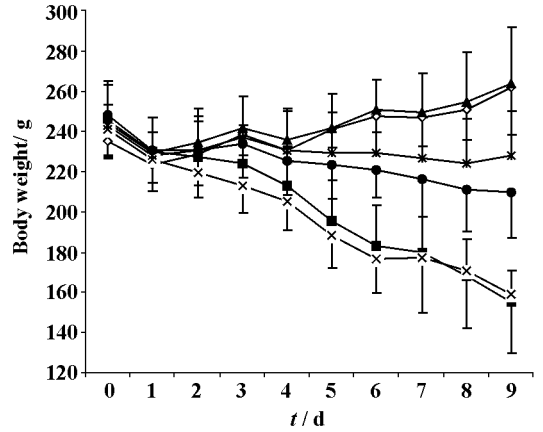
5 心电图参数的变化

从心电图各参数变化中可以看出,游离药物组(FD和FDFV)动物心电图中心电图Q-T间距延长,QRS波形增宽,T波消失,与文献报道的阿霉素^[9]心脏毒性的机制解释基本一致。而在脂质体组中均未发现明显的心电图参数变化。表2显示了各种药物制剂在静脉注射给药期间心率减缓的百分数。

6 透射电子显微镜观察心肌损伤情况

心肌损伤的典型电子显微镜照片显示在图3。从图片中可以看出,游离药物组动物(FD和FDFV)右心室心肌均发生严重损伤,心肌细胞出现严重的空泡以及心肌纤维发生严重萎缩(图3B和图3C),脂质体组(LDFV和DARSLs)动物右心室心肌切片中发现轻微的心肌损伤,与游离药物组相比有显著性差异。并且仅有极少量的小空泡在心肌细胞中出现,而且心肌纤维也没有发现明显的萎缩(图3D和图3E)。用LDFV和DARSLs两种脂质体制剂分别

处理过的动物,其心肌损伤无明显差异。图3A显示生理盐水对照组动物正常心肌,可以清晰观察到完整而排列紧密的心肌细胞。



◇—◇ Saline; ■—■ FD; ▲—▲ FV; ×—× FDFV; ●—● DARSLs

Figure 2 The body weight changes were monitored over 9 day period (each dose interval 3 days). DARSLs: Doxorubicin antiresistant stealth liposomes fomulation; FD: Free doxorubicin; FV: Free verapamil; FDFV: Mixture of free doxorubicin and free verapamil fomulation; LDFV: Mixture of liposomal doxorubicin and free verapamil fomulation

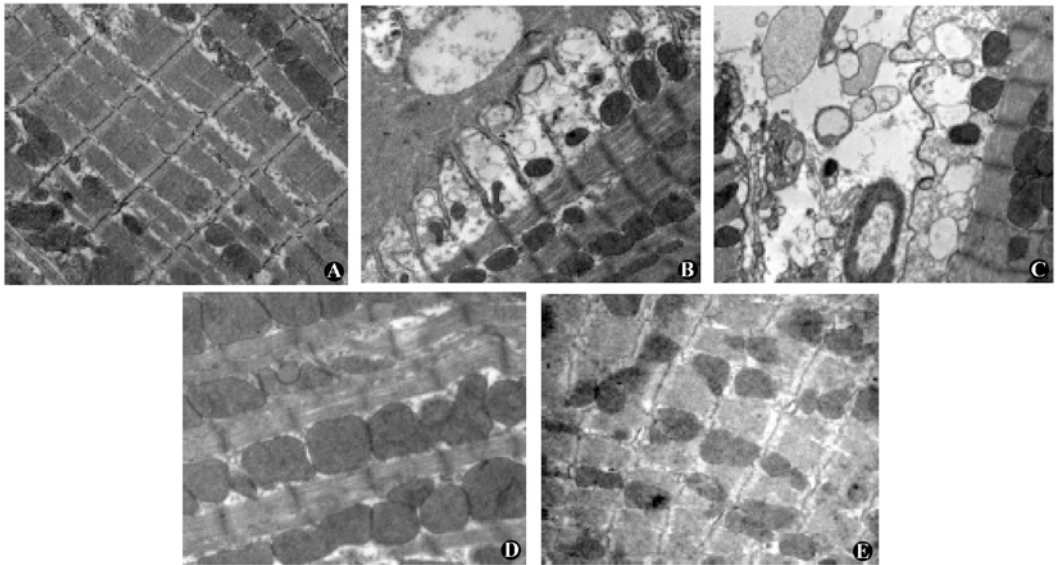


Figure 3 Left ventricle from SD rats treated with Saline (A), FD (B), FDFV (C), LDFV (D), DARSLs (E) at cumulative doses of DOX $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ and VER $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Rats treated with free DOX (FD and FDFV) with severe vacuolation and atrophy of myocardial fiber; Rats treated with liposomal DOX (LDFV and DARSLs) with mild vacuolation of myocardial fiber (TEM, $\times 12\text{k}$). DARSLs: Doxorubicin antiresistant stealth liposomes fomulation; FD: Free doxorubicin; FDFV: Mixture of free doxorubicin and free verapamil fomulation; LDFV: Mixture of liposomal doxorubicin and free verapamil fomulation

Table 2 Reduced percentage of heart rate during iv bolus injection of various formulations (n = 10 - 15 rats per group)

Group	FD	FDFV	LDFV	DARSLs	FV	Saline
Reduction /%	3.8 ± 2.1	24 ± 5 ^{**}	20 ± 4 ^Δ	15 ± 3 ^{#ΔΔ}	21 ± 4	0.3 ± 0.4

^{**} P < 0.01 vs FD; ^Δ P < 0.05, ^{ΔΔ} P < 0.01 vs FDFV; [#] P < 0.05 vs LDFV. DARSLs: Doxorubicin antiresistant stealth liposomes fomulation; FD: Free doxorubicin; FV: Free verapamil; FDFV: Mixture of free doxorubicin and free verapamil fomulation; LDFV: Mixture of liposomal doxorubicin and free verapamil fomulation

讨论

维拉帕米作为耐药抑制剂应用时通常需要达到 2 - 6 μmol·L⁻¹,而在抗心律失常时仅需要 0.4 - 1.2 μmol·L⁻¹[10]。因此,在应用维拉帕米作为耐药抑制剂时尤须关注其心脏毒性。DARSLs在大鼠血浆中的释放试验结果表明,在 37 °C 孵育 30 min,阿霉素泄漏率仅为 0.5%,维拉帕米的泄漏率小于 10%(待发表资料)。这一结果也佐证了脂质体包载能够在一定程度上降低两种药物心脏毒性。

体外细胞毒性试验结果表明,即使含有相同浓度的阿霉素和维拉帕米,由于包载方法和剂型不同,各种阿霉素制剂所表现的细胞毒性也不相同,DARSLs组细胞内阿霉素分布扩散相对较慢的结果与其体外细胞毒有一定的相关性。这一结果可能是由一系列具有细胞生长抑制作用的复杂因素所引起,其中可能是由于脂质成分插入到细胞膜后引起膜表面蛋白结构的变化或影响到一些决定细胞凋亡的重要基因,如 p53 基因[11]。目前,更深入的作用机制研究还在进行中。

从动物生存状态、体重变化以及脏器变化的结果,初步证实了阿霉素脂质体制剂能够明显的改善动物体内毒性。心电图和心肌组织切片观察结果进一步表明,脂质体组(LDFV和 DARSLs)对游离阿霉素引起的心脏毒性起到了显著性的改善作用。将维拉帕米同时包载到阿霉素隐形脂质体内可以显著地降低在静脉注射给药期间的心率减缓效应。这些结果表明阿霉素和维拉帕米的脂质体包载在以静脉注射给药时,可以在一定程度上保护由游离药物引起的心脏毒性,这为临床耐药肿瘤治疗提供新的思路和解决方案。

References

[1] Klohs WD, Steinkampf RW. The effect of lysosomotropic agents and secretory inhibitors on anthracycline retention

and activity in multiple drug-resistant cells [J]. *Mol Pharmacol*, 1988, **34**(2):180 - 185.

[2] Sehested M, Skovsgaard T, Roed H. The carboxylic ionophore monensin inhibits active drug efflux and modulates *in vitro* resistance in daunorubicin resistant Ehrlich ascites tumor cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 1988, **37**(17):3305 - 3310.

[3] Tsunro T, Iida H, Tsukagoshi S, et al. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia *in vivo* and *in vitro* through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil [J]. *Cancer Res*, 1981, **41**(5):1967 - 1972.

[4] Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill [J]. *J Immunol Methods*, 1989, **119**(2):203 - 210.

[5] Shuman H, Murray JM, DiLullo C. Confocal microscopy: an overview [J]. *Biotechniques*, 1989, **7**(2):154 - 163.

[6] Meschini S, Molinari A, Calcabrini A, et al. Intracellular localization of the antitumor drug adriamycin in living cultured cells: a confocal microscopy study [J]. *J Microsc*, 1994, **176**(Pt3):204 - 210.

[7] Bontenbal M, Sieuwerts AM, Peters HA, et al. Uptake and distribution of doxorubicin in hormone-manipulated human breast cancer cells *in vitro* [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 1998, **51**(2):139 - 148.

[8] Michael J. *Cancer Treatment Symposia: Proceeding of the Workshop on Mitoxantrone Cardiotoxicity and the Workshop on Clinical Evaluation of Anthracycline Cardiotoxicity* [M]. USA: NIH, 1984. 33 - 17.

[9] Jensen RA, Acton EM, Peters JH. Doxorubicin cardiotoxicity in the rat: comparison of electrocardiogram, transmembrane potential, and structural effects [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1984, **6**(1):186 - 200.

[10] Krishna R, Mayer LD. Multidrug resistance (MDR) in cancer: Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2000, **11**:265 - 283.

[11] Poujol S, Tilleul P, Aste C, et al. Effect of mitoxantrone liposomes on multidrug-resistant breast cancer cells [J]. *Anticancer Res*, 1999, **19**(4B):3327 - 3331.