

聚乳酸包载 5-氟尿嘧啶靶向超微粒子对人胃癌转移瘤的靶向性和控制释放研究

马春宝¹, 刘晓燕¹, 常 津^{1*}, 王 涛², 张庆瑜^{2*}

(1 天津大学材料学院纳米生物技术研究, 天津 300072;

2 天津医科大学总医院, 天津 300052)

摘要:使用 w/o/w 复乳法制备聚乳酸载 5-氟尿嘧啶超微粒子, 使用透射电镜、激光粒度仪和紫外分光光度计对超微粒子进行表征, 并考察其体外释药性质。将^{99m}Tc 标记的连有 VEGF₁₂₁ 单克隆抗体的超微粒子通过尾静脉注射到 SCID 裸鼠体内, 观察它对胃癌转移瘤的靶向效果和治疗效果。结果显示超微粒子成圆球形, 平均粒径为 195.2nm, 多分散系数为 0.148, 靶向载药超微粒子的载药率为 8.23%, 包封率为 24.71%。聚乳酸载 5-FU 超微粒子在 PBS 缓冲溶液中具有较好的控释效果, 累积释放量 Q 与时间平方根 $t^{1/2}$ 基本呈线性关系。尾静脉注射靶向超微粒子两小时以后可看到大部分超微粒子集中到肿瘤部位。在所有的实验组中, 含 5-FU 靶向载药超微粒子组的疗效最好, 说明本靶向载药超微粒子具有抑制肿瘤的血管生成并在肿瘤组织释放化疗药物抑制肿瘤生长的双重作用。

关键词: 靶向超微粒子; 控制释放; 抗 VEGF 单克隆抗体; 5-氟尿嘧啶

引言

化疗药物必须达到一定浓度才能有效杀伤肿瘤细胞, 加大药物剂量可以满足这一要求, 但化疗药物的毒副作用也同时增大。如何在增加靶细胞药物浓度的同时降低正常组织的药物浓度, 是目前肿瘤化疗的研究热点。药物靶向治疗在提高化疗药物疗效, 降低毒副作用方面具有广阔前景^[1,2]。

肿瘤生长和转移依赖于肿瘤血管生成, 抑制肿瘤血管的形成与生长是近年来肿瘤治疗的一个重要方向。血管内皮细胞的增殖、迁移和适合血管生长的基质形成, 是血管形成的重要环节。常见的恶性实体肿瘤多有 VEGF₁₂₁ 的过量表达, 抑制 VEGF 的活性能显著抑制肿瘤的生长。VEGF₁₂₁ 单克隆抗体可有效抑制 VEGF 对内皮细胞的促增殖作用, 在肿瘤治疗中发挥作用。本实验以抗肿瘤血管生长的抗体为导向, 以聚乳酸超微粒子为载体, 通过乙基[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺偶联作用于肿瘤局部, 能通过提高局部药物浓度, 缓释药物, 加速药物向细胞内转移, 延长局部滞留时间等方式大幅度提高疗效, 同时能降低给药量及全身药物浓度, 减轻毒副反应。在发挥最大抗癌作用的同时产生最小的全身毒副作用, 从而提高化疗效果。

1 结果与讨论

1.1 PLA 载药超微粒子的表征

1.1.1 透射电子显微镜(TEM)分析及粒径分布 超微粒子表面形貌、粒径及其分布是衡量其释放性能的重要因素, 对于超微粒子在人体内的循环和代谢起到重要的作用。表面光滑无粘连, 有利于其在体内的代谢与分布, 粒径大小则决定了其在体内的分布, 对其被动靶向起决定性作用^[7]。图 1 为 PLA 载 5-FU 超

基金项目: 国家自然科学基金(50373033); 天津市自然科学基金(05YFJZJC01001);

作者简介: 马春宝, 男, 24 岁, 硕士研究生, 从事载药纳米颗粒的研究。

* 联系人: E-mail: jinchang@tju.edu.cn; Tel: 022-27401821; Fax: 022-27890367; zhqy@yahoo.com.

微粒子的 TEM 照片,超微粒子呈规整圆形,超微粒子之间无粘连。粒径大小为 100~200nm,平均粒径为 195.2 nm,多分散系数为 0.148,分布比较均一,分散性好。



图 1 载药超微粒子的 TEM 照片
Figure 1 TEM of 5-FU-loaded ultramicrospheres

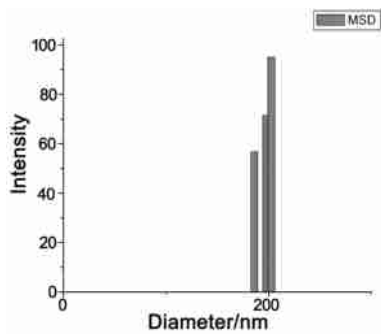


图 2 载药超微粒子的粒径分布
粒径:195.2nm,分散系数:0.148
Figure 2 Size of 5-FU-loaded ultramicrospheres mean diameter:
195.2nm, polydispersity:0.148

1.1.2 载药超微粒子载药率、包封率、释药行为的测定 当 5-FU 在 0.1N 的稀盐酸中浓度为 2~40μg/mL,其浓度与吸光度呈很好的线性相关性, $C=0.2592+21.62185A$ (C 为浓度, A 为吸光度),相关系数 $R=0.99997$ 。经测定本实验所制备的微球载药率为 8.23%,包封率为 24.71%。

PLA 载 5-FU 超微粒子在 pH=7.4 的磷酸盐缓冲溶液中的释放曲线如图 3 所示,载药超微粒子在最初的 24h 内有明显的突释效应,以累积释放量 Q 对时间平方根 $t^{1/2}$ 作图, Q 与 $t^{1/2}$ 之间基本呈线性关系,其曲线拟合方程为 $Q=26.39497+3.71262t^{1/2}$ ($R=0.95193$)。

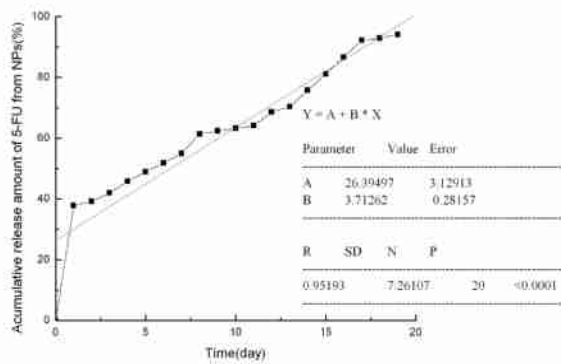


图 3 PLA 载 5-FU 纳米粒子在 PBS 中的释放曲线
Figure 3 Release behavior of 5-FU from ultramicrospheres

1.2 PLA 载 5-FU/VEGF 超微粒子的靶向性研究

将放射性标记的靶向超微粒子尾静脉注射到裸鼠体内,分别在 1h、2h 后通过 SPECT 观察靶向超微粒子的体内分布情况,其体内分布如图 4 所示:发蓝色荧光区域为整个裸鼠的显影,在靶向超微粒子注射 1h 后 SPECT 观察发现在鼠蹊部已有荧光显影,其后方还有少量绿色荧光,说明超微粒子大部分已经到达靶区。在注射后 2h SPECT 观察,发现超微粒子已经全部到达靶区,其它部位并无绿色荧光。一般来说,血管内注射超微粒子后,很少能主动定位于靶器官,主要为被动靶向。实际上,超微粒子主要被网状内皮细胞(RES)吞噬^[4~6]。本实验中 PLA 载 5-FU/VEGF 超微粒子能集中于鼠蹊部,即人胃癌转移瘤部位,说明抗 VEGF 单克隆抗体与微球连接后仍保持其活性,能够与胃癌细胞表达的 VEGF 结合,使 PLA 载 5-FU 超微粒子到达靶区,实现了主动靶向作用。

1.3 PLA 载 5-FU/VEGF 超微粒子的抑瘤效果

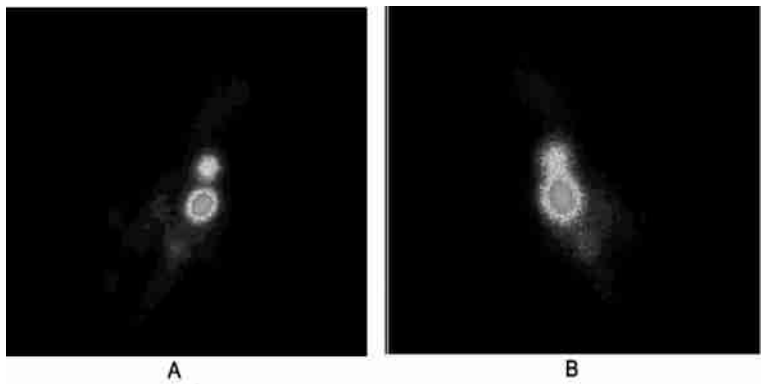


图 4 载药超微粒子的体内分布照片
A 1h 后观察 B 2h 后观察

Figure 4 Distribution of 5-FU-loaded ultramicrosphere in vivo
A fter injection 1h B After injection 2h

对裸鼠进行给药治疗后,按时测量裸鼠肿瘤大小,给药 10 天后,所有的 5-FU 制剂组,包括 5-FU 原药组、PLA 载 5-FU 超微粒子组与 PLA 载 5-FU/VEGF 组与对照组相比,肿瘤体积均显著下降,且 PLA 载 5-FU/VEGF 组的肿瘤抑制率明显高于其它组(表 1,图 5)。对照组、PLA 空载超微粒子组、5-FU 组 (20mg/kg)、抗 VEGF 单克隆抗体组、PLA 载 5-FU 超微粒子组及 PLA 载 5-FU/VEGF 组 (20mg/kg) 的抑瘤率分别为 0、5.42%、46.39%、34.94%、40.96%和 59.04%。抗 VEGF 单克隆抗体组的肿瘤抑制率为 34.94%,说明抗 VEGF 单克隆抗体能有效抑制恶性实体肿瘤中过量表达的 VEGF,抑制 VEGF 对内皮细胞的促增殖作用,在肿瘤治疗中发挥作用。同时 PLA 载 5-FU/VEGF 超微粒子组的肿瘤抑制率较同等剂量的 5-FU 原药组明显升高(59.04%比 46.39%),表明靶向超微粒子的抗肿瘤效果优于同剂量的原药,从而可以在保证治疗效果的同时减少化疗药物的用量,降低化疗药物的毒副作用。

表 1 各组裸鼠肿瘤体积大小

Table 1 Volume of tumors of each group		
组别	肿瘤体积/cm ³	抑制率/100%
对照组	1.66	
5-FU 纯药组	0.89	46.39
PLA 空载超微粒子组	1.57	5.42
PLA 载 5-FU 超微粒子组	0.98	40.96
PLA 载 5-FU/VEGF 超微粒子组	0.68	59.04
抗 VEGF 单克隆抗体组	1.08	34.94

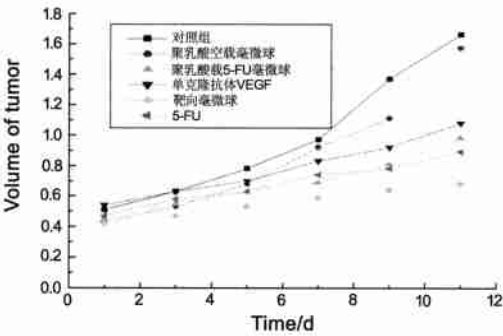


图 5 肿瘤生长曲线
Figure 5 Growth curve of tumors

2 结论

本文利用复乳法制备了 PLA 载 5-FU 超微粒子,超微粒子呈规整圆形,无粘连,平均粒径为 195.2nm,多分散系数为 0.148,载药率为 8.23%,包封率为 24.71%。PLA 载药超微粒子在最初的 24h 内有明显的突释效应,以累积释放量 Q 对时间平方根 $t^{1/2}$ 作图, Q 与 $t^{1/2}$ 之间基本呈线性关系,其曲线拟合方程为 $Q=26.39497+3.71262t^{1/2}$ ($R=0.95193$)。

再将制备好的 PLA 载 5-FU 超微粒子与抗 VEGF 单克隆抗体连接,制备靶向载药超微粒子。通过 SPECT 观察其在裸鼠体内的靶向性情况,发现靶向载药超微粒子通过尾静脉注射到裸鼠体内两小时后可到达移植肿瘤部位,说明抗 VEGF 单克隆抗体与粒子连接后仍能保持其活性,能主动与胃癌细胞表达的 VEGF 结合,实现了靶向载药超微粒子的主动靶向作用。

通过分组进行的抗肿瘤治疗实验,发现抗 VEGF 单克隆抗体组对肿瘤有抑制作用,表明抗 VEGF 单克隆抗体可有效抑制恶性实体瘤中过量表达的 VEGF,抑制 VEGF 对内皮细胞的促增殖作用,在肿瘤治疗中发挥作用。所有的 5-FU 制剂,包括 5-FU 纯药组、PLA 载药超微粒子组、靶向载药超微粒子组与对照组相比,肿瘤体积均显著下降,靶向载药超微粒子组的疗效最好,说明本靶向载药超微粒子具有抑制肿瘤血管生成和在肿瘤局部释放化疗药物而诱导肿瘤细胞膜凋亡双方面的疗效。

3 材料与方法

3.1 实验仪器及原料

聚乳酸(分析纯),山东医疗器械研究所,5-氟尿嘧啶,原药,天津人民制药厂,牛血清白蛋白(M_w :65 000 分析纯),天津血液研究所。人胃癌 MGC-803 细胞株由上海市肿瘤研究所实验病理室提供。SCID 裸鼠,SPF 级,共 54 只,由中国医学科学院实验动物研究所提供。

BI-90Plus 激光粒度仪,美国布鲁克-海文公司,JEOL-100CXII 型透射电子显微镜,日本电子光学公司,UV-9100 型紫外-可见光分光光度计 北京瑞利分析仪器厂,单光子发射型计算机断层显像仪(SPECT),美国 GE 公司 DISCOVERY-VH 型。

3.2 复乳法制备聚乳酸靶向载药超微粒子

将 2.5mL 5%的 5-FU 的 NaOH 溶液在超声条件下滴加到 5mL 的 PLA 有机溶剂溶液中,形成水/油(W/O)初乳溶液。将 0.3%牛血清白蛋白的水溶液在超声分散条件下,逐滴加入至初乳体系中,形成 W/O/W 复合体系在电磁搅拌下挥发一段时间,然后离心、洗涤、冻干,得到固化的载药超微粒子。称取质量比为 5:1 的 5-FU 超微粒子与单克隆抗体 VEGF,溶于 pH=6.86 的缓冲溶液中,在搅拌状态下加入乙基[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺(与单抗的质量比为 2:1),4℃下搅拌过夜,将所得溶液离心分离(16000r/min, 5min),超声分散后用蒸馏水洗涤三遍,冷冻干燥,所得白色粉末固体即为靶向载药超微粒子。

3.3 PLA 载 5-FU/VEGF 超微粒子的标记

在制备好的靶向载药超微粒子中加入二巯基乙醇,其加入量按 1~1.5mg(0.15mL)单克隆抗体中加入 20μg(20μL)的二巯基乙醇计算,摇匀后在 4℃条件下透析过夜,加 SnCl₂ 及亚甲基二磷酸盐(含 SnCl₂·2H₂O 50μg 和亚甲基二磷酸盐 0.5mg)混匀,再加新鲜淋洗的 ^{99m}TcO₄-550-740MBq 溶液,将其混合均匀,室温下反应 10min 后使用。

3.4 PLA 载药超微粒子的体外评价

3.4.1 载药超微粒子的表征 用透射电子显微镜观察载药超微粒子的结构、粒径及表面形貌,激光粒度仪分析载药超微粒子的粒径分布。

3.4.2 载药超微粒子载药率、包封率、释药行为的测定 准确称取冷冻干燥后的 5-FU 载药粒子 5 mg,溶于 5mL CH₂Cl₂ 溶液中,振荡摇匀后用 5mL 0.1M 稀盐酸萃取,然后以 3 000r/min 进行离心,收集上层溶液,重复萃取三次。然后用紫外分光光度计在 265nm 处测萃取液的吸光度值,与浓度-吸光度标准曲线对照,可得到相应的 5-FU 的浓度,进而得到微粒中 5-FU 的质量。

精密称取 5-FU 载药粒子 20mg,装入透析袋内,扎紧后放入盛有 5mL pH=7.4 的 PBS 缓冲溶液的小瓶中。将小瓶置于 37℃的水平恒温振荡器内(频率 72r/min),并开始计时。于一定时间取样 5mL 用紫外分光光度计测定 5-FU 的含量,并更换新鲜的 PBS 溶液。以三次实验取平均值,绘制载药微粒释放曲线。

3.5 PLA 载 5-FU/VEGF 超微粒子的靶向性研究

取 6 只已建立胃癌转移瘤模型的 SCID 裸鼠,将放射性标记的靶向载药超微粒子从尾静脉注射到体内,分别在注射后一小时、两小时通过 SPECT 观察靶向载药超微粒子的体内分布,考察靶向载药超微粒子的靶向性。

3.6 PLA 载 5-FU/VEGF 超微粒子的抑瘤效果

将 48 只雌雄各半已建立胃癌转移瘤模型的 SCID 裸鼠随机分为 6 组每组 8 只,分别为空白对照组(只注射生理盐水),纯药组,空载超微粒子组,PLA 载 5-FU 超微粒子组,PLA 载 5-FU/VEGF 超微粒子组和抗 VEGF 单克隆抗体组。给药方式为尾静脉注射给药,在整个实验过程中只注射一次,每周测量两次肿瘤大小,测量其长(A)和宽(B),将肿瘤视为近似球形,按公式肿瘤体积 = $A \times B^2 / 2$ 计算肿瘤体积。从治疗当天开始,至第 11 天断颈处死裸鼠,测量肿瘤体积,并根据公式,肿瘤生长抑制率 = 1 - (治疗组肿瘤体积 /

对照组肿瘤体积) $\times 100\%$, 计算肿瘤生长抑制率。

参考文献:

- [1] Gabizon A A. *Adv Drug Delivery Rev*, 1995, 16(2): 285~294.
- [2] Zhong G G, Heidi D F, Natalya R. *J Controlled Release*, 2005, 102: 203~222.
- [3] Yin W K, Feng S S. *Biomaterials*, 2005, 26(15): 2713~2722.
- [4] Oyewumi M Q, Yokel R A, Jay M. *J Controlled Release*, 2004, 95(3): 613~626.
- [5] Prahba S, Zhou W Z, Panyan J. *Int J Pharm*, 2002, 244(1-2): 105~115.
- [6] Lobenberg R, Araujo L, Briessen H. *J Controlled Release*, 1998, 50(1-3): 21~30.

Study of Targeting and Controlled Release Behavior of ⁵-Fluorouracil-loaded PLA Ultramicon on the Treatment of Human Gastric Tumor Xenograft

MA Chun-bao¹, LIU Xiao-yan¹, CHANG Jin^{1*}, WANG Tao², ZHANG Qing-yu^{2*}

(1 *Institute of Nanobiotechnology, School of Materials Science & Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China;*

2 *General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China*)

Abstract: ⁵-FU-loaded PLA ultramicon were prepared by a w/o/w emulsion evaporation method, and were characterized by transmission electron microscopy (TEM), particle size analyzer and UV spectrometer. The release performances of ⁵-FU loaded PLA ultramicon in vitro were studied. The VEGF/⁵-FU loaded PLA ultramicon labeled technetium-^{99m} were injected in nude mice by tail vein to observe targeting effect and therapeutic effect. TEM observation showed ultramicon were spherical, The mean diameter was 195.2nm, and the index of polydispersity was 0.148, the drug content was 8.23%, and the encapsulation efficiency was 24.71%. There was a linear relationship between the amount of accumulative release Q and time square root $t^{1/2}$. After targeted ⁵-FU loaded PLA ultramicon injection 2 hours, the majority of ultramicon centralized at tumor site. In all the treatment groups, ⁵-FU/VEGF loaded PLA ultramicon group had best result. That demonstrated ⁵-FU/VEGF loaded PLA ultramicon had multiple function with inhibition of growth of blood vessel of tumor and controlled release drug in the tumor site.

Key words: Targeted ultramicon; Controlled release; VEGF monoclonal antibody; ⁵-Fluorouracil

(上接第 50 页)

Progress on Synthesis and Surface-modification of Thermoplastic Polyurethane

GUO Jin-tang, LIU Bing

(*School of Chemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China*)

Abstract: This paper reviewed new development of synthesis and surface-modification of polyurethane as biomaterials in details. Their advantages and disadvantages and unique physical and chemical properties of all kinds of polyurethane biomaterials were analyzed, and several critical surface-modifying methods were pointed out.

Key words: Polyurethane; Surface-modification; Grafting; Biomaterials; Bioactive macromolecule