

Preparation and characteristics of PEG-coated long circulating polymer ultrasound microbubbles contrast agent containing vincristine sulfate

LING Xu^{1,2}, ZHANG Liang-ke^{1,2*}, LI Pan³, WANG Cheng-yuan⁴,
ZHANG Jing-qin^{1,2}, WANG Hai-ou^{1,2}, RAN Hai-tao³

(1. Institute of Life Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. School of Pharmacy, Chongqing Key Laboratory of Biochemistry & Molecular Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 3. Institute of Ultrasound Imaging, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; 4. Research Center of Medical Chemistry & Chemical Biology, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China)

[Abstract] **Objective** To prepare vincristine loaded PLGA-PEG ultrasound microbubbles contrast agent (VCR-PLGA-PEG-UMCA), and to evaluate its characteristics and imaging effect in vivo and in vitro. **Methods** A water in oil in water double emulsion/ solvent evaporation method was used to prepare microbubbles. Orthogonal experimental design was used to select the optimal formulation. Ultraviolet spectrophotometry was applied to determine the entrapment efficiency of microbubbles, the morphology of microbubbles was observed with optical microscopy and particle size, Zeta potential was measured with Malvern laser particle size measuring instrument. Then the imaging effect of VCR-PLGA-PEG-UMCA was evaluated in 2 rabbits in vivo. **Results** Acquired microbubbles were spherical, the mean diameter was 1.27 μm, the drug entrapment efficiency was (37.63 ± 0.61)% and Zeta potential was -24.88 mV. VCR-PLGA-PEG-UMCA enhanced the heart imaging effect of the rabbits in vivo. **Conclusion** VCR-PLGA-PEG-UMCA is successfully prepared with the above methods, and can enhance the imaging effect in vitro and in vivo.

[Key words] Vincristine; Ultrasound microbubble; Contrast media; Orthogonal test

载长春新碱长循环聚合物超声微泡造影剂的制备及性能评价

凌旭^{1,2}, 张良珂^{1,2*}, 李攀³, 汪程远⁴, 张景^{1,2}, 王海鸥^{1,2}, 冉海涛³

(1. 重庆医科大学生命科学研究院, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学药学院, 重庆市生物化学与分子药理学重点实验室, 重庆 400016; 3. 重庆医科大学附属第二医院超声影像学研究所, 重庆 400010; 4. 重庆工商大学药物化学与化学生物学研究中心, 重庆 400067)

[摘要] 目的 制备载硫酸长春新碱的聚乳酸-乙醇酸-聚乙二醇共聚物(PLGA-PEG)超声微泡造影剂, 观察微泡的一般特性及体内、外显影效果。方法 采用W/O/W复乳-溶剂挥发法制备超声微泡造影剂, 正交实验设计获得最佳制备工艺, 采用紫外分光光度法测定微泡的封装率和载药量, 光学显微镜观察微泡形态, 以马尔文激光粒径测量仪测定微泡造影剂的粒径、Zeta电位, 并观察微泡在兔心腔的显影效果。结果 获得的微泡造影剂为球形, 平均粒径约为1.27 μm, 封装率为(37.63 ± 0.61)%, Zeta电位为-24.88 mV, 静脉注射载药微泡后, 能增强兔心腔超声显影效果。结论 采用复乳-溶剂挥发法成功制备超声微泡造影剂, 能增强体内外超声显影效果。

[基金项目] 重庆市科委自然科学基金(CSTC, 2008BB5397)、国家自然科学基金(30770565)、重庆医科大学校办课题(NSFY200728、XBYB2007098)。

[作者简介] 凌旭(1983—), 男, 湖南株洲人, 在读硕士。研究方向: 药物新型给药系统研究。E-mail: lingxu_lx@163.com

[通讯作者] 张良珂, 重庆医科大学药学院, 重庆市生物化学与分子药理学重点实验室, 400016。E-mail: zlkdyx@126.com

[收稿日期] 2009-12-29 **[修回日期]** 2010-03-03

[关键词] 长春新碱; 超声微泡; 造影剂; 正交实验

[中图分类号] R943; R445.1 [文献标识码] A [文章编号] 1003-3289(2010)06-0993-04

长春新碱(vincristine, VCR)是提取自夹竹桃科植物长春花的一种生物碱,临床用于治疗神经细胞瘤等。由于具有明显的剂量限制性神经毒性,全身给药常引起毒副反应,大大限制了其临床应用。微泡造影剂通常指直径为 100 μm 以下的有壳微气泡,微泡壳厚 1~500 nm,壳体材料多为白蛋白、聚合物等,泡内气体通常是 CO_2 、氟碳气等^[1]。

本文以乳酸-乙醇酸共聚物[poly(lactide-co-glycolide), PLGA]和聚乳酸-乙醇酸-聚乙二醇共聚物(PLGA-PEG)为膜材,采用复乳-溶剂挥发法制备载 VCR 聚乳酸-乙醇酸-聚乙二醇共聚物超声微泡造影剂(vincristine-loaded PLGA-PEG ultrasound microbubbles contrast agent, VCR-PLGA-PEG-UMCA),并观察其性质及体内、外显影效果。

1 材料与方 法

1.1 动物与试剂 新西兰大白兔 2 只(雄性,体质量为 2.0~3.0 kg,重庆医科大学实验动物中心)。

PLGA(LA/GA=50/50, MW=20 kDa, 山东医疗器械研究所), PLGA-PEG(PEG:MW=2000; PLGA:MW=20 kDa, 山东岱罡化学试剂厂), VCR(批号 021001, 纯度 98.9%, 广州环叶制药有限公司), 聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, VA, 日本可乐丽公司), Span 80(上海申宇医药化工有限公司), 甘露醇(批号 010723, 纯度 99.5%, 青岛胶南明月海藻工业公司), 乳糖(Tabletose 80, Meggle, Germany), D-葡萄糖(AR, 上海楷洋生物技术有限公司), 蔗糖(批号 F20090218, 国药集团化学试剂有限公司), 速眠新 II(兽药[2004]005013, 军事医学科学院军事兽医研究所), 其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器 Sartorius A200s 分析天平, Sonics VCX750 超声波细胞破碎仪, Olympus TH-200 光学显微镜, Hitachi S-3000 N 扫描电子显微镜, 旋转蒸发器(RE-52AA, 上海亚荣生化仪器厂), Malvern Zetasizer Nano ZS90 激光粒径分析仪, 离心机(KA-1000, 上海安亭科学仪器厂), Christ Alpha 1-2 LD 冷冻干燥机, Philips iU22 超声诊断仪。

1.3 实验方法

1.3.1 VCR-PLGA-PEG-UMCA 的制备 采用复乳-溶剂挥发法制备微泡^[2]。精密称取 2.0 mg VCR, PBS 溶解作内水相(W_1), 适量 PLGA 或 PLGA-PEG, Span 80 溶于 2.0 ml 二氯甲烷作油相(O), 混合 W_1 和 O, 冰浴探头超声(1000 J) 10 s, 得初乳(W/O); 配制 1% PVA 水溶液作外水相(W_2), 将 W_2 加入初乳中, 超声 10 s 形成复乳($W/O/W$)。旋转蒸发挥发干二氯甲烷, 离心 10 min(3000 r/min), 沉积物用蒸馏水洗 2 次。冷冻干燥, 真空下充入氟碳气体, 得 VCR-PLGA-PEG-UMCA。

1.3.2 正交实验优化处方 在单因素考察的基础上, 确定超声时间和乳化剂用量, 选择对 VCR-PLGA-PEG-UMCA 制备影响较显著的 4 个因素, 即投药量(A)、油水相体积比(B)、PLGA-(PLGA-PEG)浓度(C)、PLGA-(PLGA-PEG)质量比(W/W)(D)作为考察对象, 每个因素设 3 个水平, 根据正交设

计原理, 取 $L_9(3^4)$ 正交实验表进行实验^[3](表 1)。以 VCR-PLGA-PEG-UMCA 的包封率(S)为指标进行评分, 优选出最佳工艺条件, 以最佳工艺制备 5 批样品, 并考察制备工艺的重复性, 对该工艺进行验证。

表 1 正交实验因素水平表

因素水平	投药量(A)	油水相体积比(B)	PLGA-(PLGA-PEG)浓度(%) (C)	PLGA-(PLGA-PEG)质量比(D)
1	1.0	0.5/0.1	3.0	2/1
2	2.0	1.0/0.1	5.0	1/1
3	4.0	2.0/0.1	7.0	1/2

1.3.3 VCR-PLGA-PEG-UMCA 的形态、粒径及 Zeta 电位

采用光学显微镜观察其形态; Malvern 激光粒径测量仪测定其粒径分布及 Zeta 电位。

1.3.4 VCR-PLGA-PEG-UMCA 包封率的测定 包封率的测定方法: 采用紫外分光光度法。经紫外线扫描, 确定 VCR 的最大吸收波长为 296 nm, 相关辅料和溶剂在此波长处无吸收。以二氯甲烷和甲醇混合溶剂(3:1, V/V)溶解微泡, 测定微泡中包裹的 VCR 含量。

绘制标准曲线: 二氯甲烷和甲醇混合溶液(3:1, V/V)作溶剂, 配制 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ VCR 溶液, 分别稀释成 4.0、8.0、12.0、16.0、20.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 296 nm 下测定吸光度 A 值。以浓度 C 对吸光度 A 进行线性回归分析, 得到标准曲线方程: $A = 0.0121C + 0.0025$, $r = 0.9998$ 。

测定包封率: 精密称取 VCR-PLGA-PEG-UMCA, 二氯甲烷和甲醇混合溶液溶解, 296 nm 下测定 A 值, 代入标准曲线方程, 按下述公式计算包封率:

$$\text{包封率} = \frac{\text{微泡载带的 VCR 重量}}{\text{投药量}} \times 100\%$$

1.3.5 不同冷冻保护剂对 VCR-PLGA-PEG-UMCA 成型性影响 分别采用甘露醇、蔗糖、D-葡萄糖、乳糖作为微泡的冻干保护剂, 对冻干产品的外观、色泽、复溶效果等进行考察, 选择最佳冻干保护剂。

1.3.6 VCR-PLGA-PEG-UMCA 体外显影实验^[4,5] 精密称取 VCR-PLGA-PEG-UMCA, 将其分散于脱气水中, 混匀后盛入一小水囊内并密封, 用空白脱气水水囊作为对照; 将上述内含 VCR-PLGA-PEG-UMCA 水囊和脱气水水囊同时放入盛有脱气水的容器中进行显影, 以彩色超声诊断仪对比观察两水囊显影情况。

1.3.7 VCR-PLGA-PEG-UMCA 体内心脏显影^[6,8] 以速眠新 II(0.1 ml/kg)肌注麻醉大白兔, 脱去心脏区体毛并保定。套管针经兔耳缘静脉建立静脉通道, 连接三通管, VCR-PLGA-PEG-UMCA(0.1 ml/kg)经兔耳缘静脉团注, 即刻追注 1.0 ml 生理盐水冲洗管道, 以彩色超声诊断仪观察兔心脏实质显影效果。

2 结果

2.1 VCR-PLGA-PEG-UMCA 制备工艺筛选 对正交实验结果进行分析,各因素对 VCR-PLGA-PEG-UMCA 包封率影响顺序依次为投药量(A)、油水相体积比(B)、PLGA-(PLGA-PEG)浓度(C)、PLGA-(PLGA-PEG)质量比(D)(表2),最佳制备处方和制备工艺为 A₂B₃C₂D₁,即投药量为2.0 mg,油相与水相体积比为 2.0:0.1, PLGA-(PLGA-PEG)的浓度为 0.5%, PLGA与PLGA-PEG的质量比为 2:1。按照优化处方制备 5 批 VCR-PLGA-PEG-UMCA,包封率为(37.63 ± 0.61)% (表2)。

表2 正交实验设计与结果

编号	A	B	C	D	包封率(%)
1	1	1	1	1	28.34
2	1	2	2	2	35.73
3	1	3	3	3	33.75
4	2	1	2	3	38.32
5	2	2	3	1	43.57
6	2	3	1	2	41.53
7	3	1	3	2	27.56
8	3	2	1	3	31.25
9	3	3	2	1	38.12
K ₁	32.607	31.407	33.707	36.677	—
K ₂	41.140	36.850	37.390	34.940	—
K ₃	32.310	37.800	34.960	34.440	—
R	8.830	6.393	3.683	2.237	—

表3 VCR-PLGA-PEG-UMCA 在不同冻干保护剂下成型性考察(n=5)

冷冻保护剂 (10%, W/V)	色泽	外观	复溶速度 (生理盐水)	复溶后微泡数量 光镜下(×400)
D-葡萄糖	++++	++++	++++	++++
蔗糖	++++	++++	+++	+++
乳糖	+++	++++	+++	++++
甘露醇	++++	++++	+++	+++

注:“++++”为最佳,“+++”为次之,依次类推

2.2 VCR-PLGA-PEG-UMCA 形态表征

由图1可知,光学显微镜下,VCR-PLGA-PEG-UMCA 粒径较均匀,分散性好。由图2可知,平均粒径 1.27 μm, Zeta 电位为-24.88 mV。

2.3 不同冻干保护剂对 VCR-PLGA-PEG-UMCA 成型性影响 以 10% D-葡萄糖作冻干保护剂所获得的 VCR-PLGA-PEG-UMCA 冻干粉,各项指标考察结果均为最佳(表3),故本实验选 10% D-葡萄糖作为微泡冻干保护剂。

2.4 体外显影实验 VCR-PLGA-PEG-UMCA 水囊内部具有高回声信号,点状回声细小、均匀;而脱气水囊内部无回声信号(图3)。

2.5 兔心脏显影实验 静脉注射 VCR-PLGA-PEG-UMCA 10 s 后,兔心腔内开始出现细小、均匀的点状显影,15 min 后心腔仍可见显影信号(图4)。



图1 光学显微镜观察 载硫酸长春新碱的聚乳酸-乙醇酸-聚乙二醇共聚物超声微泡粒径均匀,分散性好(×400)

3 讨论

超声造影是随着超声造影剂制备技术和图像显影技术的不断完善而逐步发展起来的新技术。超声破坏携带药物或基因的微泡造影剂定位释放技术是新型的无创性基因转移与药物释放技术^[9-10]。其作用机制是液体中存在的微小气泡(空化核)在超声波作用下产生振荡、扩大、收缩至内爆等一系列动力学效应,即空化效应,增加超声照射下的空化效应,对细胞产生短暂可逆的“声孔作用”,使细胞膜通透性短暂增加,从而使药物或治疗基因能够进入到细胞内。

目前临床所用超声造影剂多为内含气体的微气泡,填充气体可为二氧化碳、空气或大分子惰性气体(如氟碳气体)等;其成膜材料有磷脂类化合物、白蛋白、糖类、非离子表面活性剂、可生物降解的高分子聚合物等。氟碳气体分子量较大,溶解度和弥散度较低;天然或合成的高分子聚合物抗压性和稳定性高,其中使用较广泛、研究较多的高分子聚合物为 PLGA,其优点在于降解产物无毒,生物相容性好,分子结构中无肽链,无免疫原性。因此,以高分子聚合物作膜材料的微泡成为近年来超声造影剂研究的热点^[11]。高分子聚合物为膜材料的超声微泡可有效携带药物,借助体外超声空化的能量在预定区域击破微泡,使药物在局部组织释放和渗透,提高局部药物浓度,达到靶向治疗的目的^[12]。目前已包裹药物有阿霉素等^[13]。

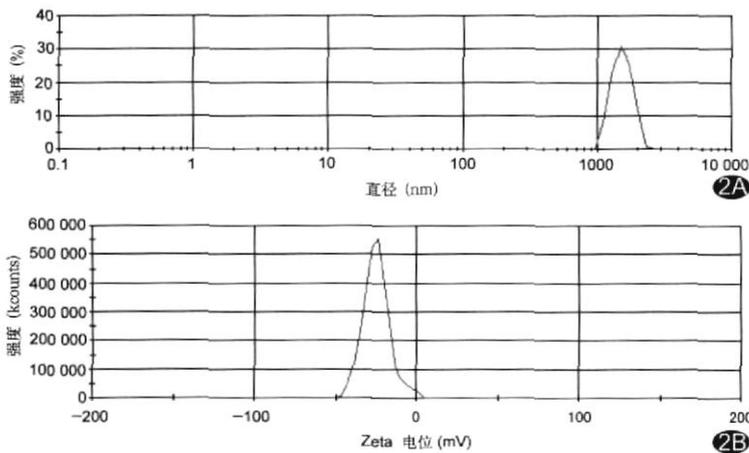


图2 VCR-PLGA-PEG-UMCA 粒径(A)和 Zeta 电位(B)分布图

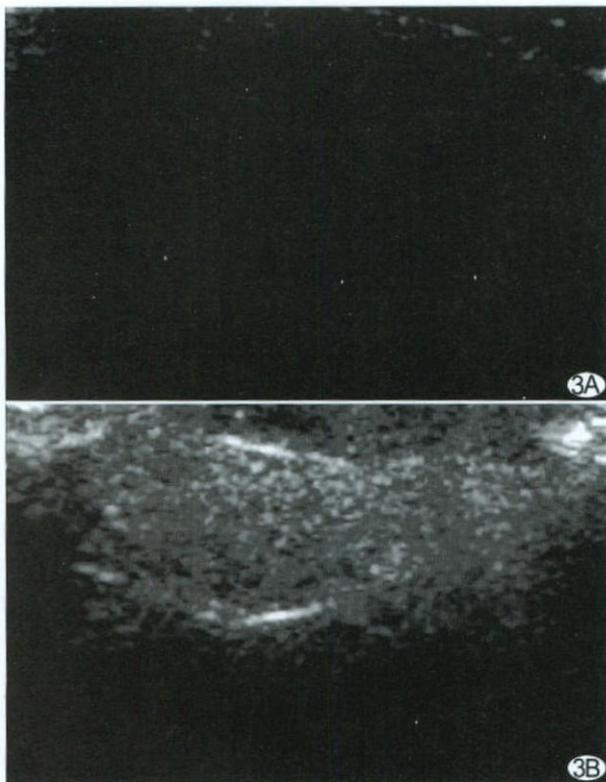


图 3 VCR-PLGA-PEG-UMCA 体外显影图 A. 脱气水囊显影图; B. 造影剂显影图

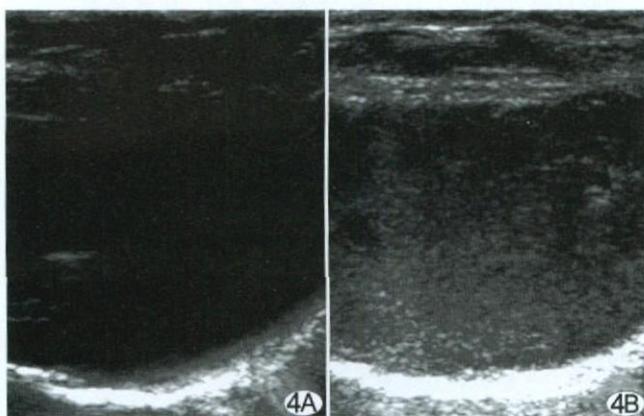


图 4 VCR-PLGA-PEG-UMCA 兔心腔内显影图 A. 未注射造影剂显影图; B. 注射造影剂 10 s 后显影图

本实验中采用聚乙二醇(PEG)修饰 VCR-PLGA-PEG-UMCA, 微泡表面被柔顺而亲水的 PEG 链部分覆盖, 极性的 PEG 增强了 VCR-PLGA-PEG-UMCA 的亲水性, 减少了血浆蛋白与 VCR-PLGA-PEG-UMCA 膜的相互作用, 降低了被巨噬细胞吞噬的可能, 在循环系统的滞留时间得到延长, 可有效提高靶向效率。本实验结果提示, 作为一种新型的药物载体, 以 PLGA-PEG 为膜材料的微泡在药物靶向释放及基因治疗方面具有广阔的发展前景。

制备 VCR-PLGA-PEG-UMCA 时, W/O 乳液的稳定性是影响包封率和成型性的重要因素。由于 W/O 乳液不稳定, 若获得的 W/O 乳液放置时间过长或乳化剂选用不当, 易

导致破乳, 进行二次超声后, 形成 O/W 乳液, 而非预期制备的 W/O/W 复乳, 冷冻干燥后不是空心的微泡, 而是实心的微球, 影响微泡在体内的显影效果。因此, 制备微泡时应注意选用合适的乳化剂, 并在第一次超声获得 W/O 乳液后立即进行 W/O/W 复乳的操作。

VCR-PLGA-PEG-UMCA 冻干粉生理盐水重分散放置 1 周后颜色变浅, 底部有沉积, 振摇后, 底部见少量沉积物, 光镜下观察微泡粒径增大, 部分粘连; 放置 1 个月后, 混悬液分层, 底部有较多沉淀, 振摇后沉淀未能均匀分散, 光镜下观察微泡粘连严重。而 VCR-PLGA-PEG-UMCA 以冻干粉形式保存 6 个月后重分散粒径未见变化。因此, VCR-PLGA-PEG-UMCA 以冻干粉形式保存为宜。

本文采用 W/O/W 复乳-溶剂挥发法成功制备 VCR-PLGA-PEG-UMCA, 通过正交实验优化主要影响因素, 获得最佳制备工艺, 并考察 VCR-PLGA-PEG-UMCA 体内、外显影情况, 结果显示 VCR-PLGA-PEG-UMCA 能增强兔心腔超声显影效果。

[参考文献]

- [1] Kheirloom A, Dayton PA, Lum AF, et al. Acoustically active microbubbles conjugated to liposomes: characterization of a proposed drug delivery vehicle. *J Control Release*, 2007, 118(3):275-284.
- [2] Dillen K, Vandervoort J, Van den Mooter G, et al. Evaluation of ciprofloxacin loaded eu dragit RS100 or RL100/PLGA nanoparticles. *Int J Pharm*, 2006, 314(1):72-82.
- [3] 李莉, 黄永灿, 常丽, 等. 盐酸四环素缓释微球的制备. *华西药理学杂志*, 2008, 23(4):391-393.
- [4] 敖梦, 王志刚, 冉海涛, 等. 包裹 G α DTPA 的高分子材料超声造影剂的制备与体外显影实验. *中国超声医学杂志*, 2009, 25(4):337-339.
- [5] 贺娟, 孙江川, 常淑芳, 等. 人卵巢癌靶向超声造影剂的制备及其体外寻靶能力观察. *中国医学影像技术*, 2009, 25(6):929-931.
- [6] 汪朝霞, 王志刚, 许川山, 等. 一种载基因及多聚赖氨酸的脂质超声微泡造影剂制备的实验研究. *中国超声医学杂志*, 2009, 25(2):101-104.
- [7] 刘学兵, 王志刚, 许川山, 等. 载竹红菌素脂质微泡的制备及对兔 VX2 肝肿瘤的显影实验. *中国医学影像技术*, 2008, 24(10):1508-1510.
- [8] 刘学兵, 王志刚, 许川山. 载药脂质超声微泡造影剂的制备及应用研究. *中国介入影像与治疗学*, 2008, 5(2):156-159.
- [9] Unger E, Matsunaga TO, Schumann PA, et al. Microbubbles in molecular imaging and therapy. *Medicamundi*, 2003, 47(4):58-65.
- [10] 严思静, 李攀, 袁佩, 等. 载 10 羟基喜树碱脂质超声微泡的处方制备及一般特性研究. *中国医学影像技术*, 2009, 25(4):574-577.
- [11] 靳巧锋, 钟跃, 罗祥林, 等. 共聚物微泡造影剂的制备与体外二次谐波特性研究. *南方医科大学学报*, 2008, 28(1):54-56.
- [12] Klibanov AL. Microbubble contrast agents: Targeted ultrasound imaging and ultrasound assisted drug delivery application. *Invest Radiol*, 2006, 41(3):354-362.
- [13] 冉海涛, 任红, 王志刚, 等. 包裹阿霉素的高分子材料微泡声学造影剂制备及显影效果实验研究. *临床超声医学杂志*, 2005, 7(4):217-220.