

· 研究论文 ·

载阿霉素超声敏感纳米泡的制备与性质

王辰允^{1,§}, 杜丽娜^{2,§}, 周文英², 程志刚¹, 金义光² (1. 中国人民解放军总医院, 北京 100853; 2. 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850)

[摘要] 目的:以阿霉素作为模型药物,制备载药超声敏感纳米泡以达到肿瘤靶向、超声敏感释药的目的。方法:合成两亲性两嵌段共聚物 PLGA-PEG,注入法制备载盐酸阿霉素(DOX)超声敏感纳米泡,研究其外观形态、工艺重现性及温度敏感性。结果:用最优处方工艺制备 3 批载 DOX 纳米泡,粒径为 168.83 nm, Zeta 电位为 -2.17 mV,工艺重现性好。结论:用两亲性共聚物制备获得具有超声敏感特性的纳米泡并装载抗癌药,有望成为新型肿瘤靶向药物传递系统。

[关键词] 纳米泡;超声敏感;肿瘤靶向;阿霉素

[中图分类号] R944 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-5213(2010)02-0097-03

Preparation and properties of doxorubicin-loaded ultrasonic-sensitive nanobubbles

WANG Chen-yun¹, DU Li-na², ZHOU Wen-ying², CHENG Zhi-gang¹, JIN Yi-guang² (1. General Hospital of PLA, Beijing 100853, China; 2. Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE Doxorubicin (DOX) as model drug was loaded in ultrasonic-sensitive nanobubbles. The aims of tumor-targeting and ultrasonic-sensitivity would be achieved using the novel carrier. **METHODS** The amphiphilic polymer, poly(D, L-lactide-co-glycolide)-monomethoxy-poly(ethylene glycol) (PLGA-PEG), was synthesized. DOX-loaded nanobubbles were prepared by injection method, and investigated on appearance, preparation reproducibility and temperature-dependence. **RESULTS** The size and Zeta potential of drug-loaded ultrasonic-sensitive nanobubbles was 168.83 nm and -2.17 mV, respectively. Three batches of products had the good reproducibility. **CONCLUSION** DOX-loaded ultrasonic-sensitive nanobubbles were prepared with amphiphilic copolymers. They would be a novel promising tumor-targeted drug delivery system (DDS).

KEY WORDS: nanobubbles; ultrasonic-sensitive; tumor-targeting; doxorubicin

超声造影剂(ultrasound contrast agent, UCA)是一类能够显著增强医学超声检测信号的诊断试剂^[1-2]。它利用声波对气体反射比液体大近 1 000 倍的原理得到更高的对比分辨率,从而利于疾病诊断。超声造影剂外膜可携带药物或基因,当到达肿瘤细胞时,在对靶部位成像同时,进一步加大超声强度,使微泡造影剂破碎释放药物或基因;同时超声所造成的空化效应(cavitation)能使肿瘤细胞形成暂时的孔道,利于药物进入肿瘤细胞内^[3-5]。目前临床上使用的微泡造影剂的平均直径 3~5 μm,可以顺利通过肺循环,实现左右心室腔、心肌及全身器官组织和病变的造影增强^[6]。但常规微米级超声造影剂不能穿透血管,携带的药物或基因在血管内释放后,只有少部分进入病变细胞内,不能有效跨越“内屏障”,限制了其对血管外疾病的诊断与治疗^[7]。肿瘤血管内皮间隙较大,允许小于 700 nm 的颗粒穿过,

为制备纳米泡并携带抗肿瘤药物进入肿瘤组织内部提供了可能。本研究以可生物降解的聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)为疏水段,以单甲氧基聚乙二醇(mPEG)为亲水段,合成得到两亲性两嵌段共聚物 PLGA-PEG 做为成膜材料;以具有气液相变性质、在血液中弥散性极差的高分子氟烷气体-全氟戊烷(相变温度 29.5 °C)为成像气体,以抗肿瘤药盐酸阿霉素(DOX)为模型药物,制备载 DOX 超声敏感纳米泡,并对其外观形态、工艺重现性和温度敏感性进行了考察。

1 材料

PLGA(济南健宝开元生物材料有限公司, Mw = 8 000, LA/GA, 50/50);单甲氧基聚乙二醇(PEG, Fluka, Mw = 2 000);聚乳酸-羟基乙酸-聚乙二醇单甲醚共聚物(PLGA-PEG, 自制, 081025);盐酸阿霉素(DOX, 浙江海正药业股份有限公司);三

[基金项目] 国家科技重大专项“重大创制新药”资助项目(编号:2009ZX09301-002);北京市自然科学基金资助项目(编号:7092076) **[作者简介]** 王辰允,女,博士,药师,电话:010-66937225, E-mail: cynthia_yun@yahoo.com.cn; 杜丽娜,女,博士,助理研究员,电话:010-66931220, E-mail: dulina@188.com. §: 作者贡献相同。 **[通讯作者]** 金义光,男,博士,副研究员,电话 010-66931220, E-mail: jinyg@sina.com

乙胺 (TEA, 天津市博迪化工有限公司); 全氟戊烷 (PFP, bp: 29, Mw = 288.03, ABCR); 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4, 依 2005 年版中国药典方法配制); 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 PLGA-PEG 的合成 取 2 g PLGA 于圆底烧瓶, 加 5 mL 二氯亚砷溶解, 回流 3 h, 减压蒸干溶剂得酰氯化 PLGA。取 1.2 g PEG, 加入 2 mL 二氯甲烷和 6 mL 吡啶, 搅拌溶解。用 3 mL 二氯甲烷溶解酰氯化 PLGA, 逐滴加至 PEG 溶液中, 冰浴反应 30 min 后逐渐升至室温, 待 PEG 不再减少时停止反应。减压除尽二氯甲烷, 得无色透明固体, 加入丙酮溶解, 以纯水为透析液, 用透析袋 (截留分子量 7 000, 北京经科宏达生物技术有限公司) 透析 24 h 以上。透析袋内溶液减压除尽水, 然后用无水甲醇沉淀, 得白色黏稠液体, 真空干燥, 得到白色胶状固体, 即为 PLGA-PEG。产品通过 NMR 仪 (JNM-ECA-400, 日本电子) 和红外光谱仪 (FTS-65A, Bio-Rad) 进行鉴定。

2.2 红外图谱解析 $\nu = 3\ 433.3\ \text{cm}^{-1}$ 附近宽吸收峰为 PLGA-PEG 中乳酸末端的 OH 吸收峰; $\nu = 2\ 884.7\ \text{cm}^{-1}$ 为甲基和亚甲基的 C-H 伸缩振动峰; $\nu = 1\ 758.0\ \text{cm}^{-1}$ 的强吸收峰是酯羰基 C=O 伸缩振动峰; $\nu = 1\ 187.4\ \text{cm}^{-1}$ 处的峰是酯基 C-O-C 伸缩振动峰, 证明嵌段共聚物中 -COO- 基团的存在; $\nu = 1\ 109.1\ \text{cm}^{-1}$ 处较大的峰是 mPEG 的醚键 C-O-C 伸缩振动峰; $\nu = 1\ 465.3$ 处的峰代表亚甲基的 C-H 弯曲振动; $\nu = 1\ 454.32\ \text{cm}^{-1}$ 为 C-C 的一系列伸缩振动峰; $\nu = 1\ 344.9$ 为甲基特征峰。

2.3 氢谱解析 $\delta = 1.583 \sim 1.600\ \text{ppm}$ 为 PLGA 嵌段 -CH₃ 上质子的化学位移峰; $\delta = 5.202 \sim 5.236\ \text{ppm}$ 为 PLGA 嵌段 -CH- 上质子的化学位移峰; $\delta = 4.734 \sim 4.868\ \text{ppm}$ 为 PLGA 嵌段 -CH₂- 上质子的位移峰, $\delta = 3.647\ \text{ppm}$ 为 PEG 嵌段 -CH₂- 上质子的位移峰, $\delta = 3.384\ \text{ppm}$ 为 PEG 嵌段 CH₃-O 上质子的位移峰^[8-9]。

嵌段共聚物中 2 种单体的组成比可由 ¹H-NMR 谱图上特征峰的面积求得。mPEG 嵌段亚甲基上氢即在 $\delta = 3.647\ \text{ppm}$ 处的化学位移峰面积 $S_{3.647} = 5.04$, PLGA 嵌段 -CH₂- 上氢即在 $\delta = 4.734 \sim 4.868\ \text{ppm}$ 处的化学位移峰面积 $S_{4.734-4.868} = 4.12$, 因特征峰化学位移处质子数与其峰面积成正比, 根据公式求出共聚物 PEG 嵌段中 -CH₂- 与 PLGA 嵌段中 -CH₂- 的理论质子数之比为 1.48, 实际值为 1.22。

$$S_a / S_b = \frac{(\text{PEG}/44) \times 4}{(\text{PLGA}/130) \times 2} \quad (\text{式 } 1)$$

注: 式 (1) 中 S_a 、 S_b 分别为 PEG 嵌段亚甲基和 PLGA 嵌段亚甲基特征位移处理论峰面积, PEG、PLGA 分别为其各自相对分子质量

2.4 DOX 超声敏感纳米泡的制备 分别选取了薄膜分散法、溶剂挥发法、透析法及注入法制备 DOX 超声敏感纳米泡。注入法制备的胶束粒径最小且分散系数最小, 且操作简便、快速。因此选择注入法制备聚合物胶束较为合适。

将 DOX 与 TEA (1:3, mol/mol) 混合, 与 PLGA-PEG 以一定比例共混后溶于适量丙酮, 用注射器注入到搅拌的 PBS 中, 室温搅拌去除有机溶剂, 得 DOX 聚合物胶束溶液。过 0.45 μm 膜后, 用截留相对分子质量为 1 万的超滤管 5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, HPLC 分析超滤液中 DOX 含量。取 10 μL PFP, 冰浴超声条件下加入到 2 mL DOX 胶束溶液中, 继续超声 60 s, 冰箱 4℃ 保存。

2.5 纳米泡性质考察 由于 DOX 纳米泡在干燥状态下不复存在, 所以用电镜考察 DOX 胶束来判断粒子形态和均一性。取 DOX 聚合物胶束溶液 5 μL, 铺展于铜网表面, 用 2% 磷钨酸溶液 (pH 6.5) 染色, 空气中晾干后于透射电子显微镜 (CM 120, Philips) 下观察粒子的形态和大小。DOX 胶束的疏水段不被磷钨酸染色, 呈亮白色内核; 亲水的 PEG 外壳吸附了水相中的部分磷钨酸, 电镜下呈现灰色晕环。胶束呈明显的球形核壳结构, 而且大小较均匀, 见图 1。

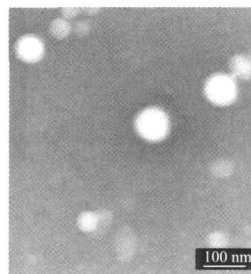


图 1 DOX 胶束透射电镜照片
Fig 1 The TEM image of DOX micelles

用最优化方、工艺制备 3 批载 DOX 纳米泡, 其粒径和 Zeta 电位变化较小, 说明制备工艺重现性好。DOX 含量为 $(147.9 \pm 6.9)\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 平均粒径为 $(168.8 \pm 9.4)\ \text{nm}$, Zeta 电位为 $(-2.17 \pm 0.22)\ \text{mV}$ 。

为研究 DOX 纳米泡静脉注入体内后其粒径随温度变化情况, 用激光纳米粒度仪 (Zetasizer Nano ZS, 英国 Malvern 公司) 考察 DOX 胶束 (未充填 PFP) 和 DOX 纳米泡从 25℃ (室温) 到 37℃ (模拟体内环境) 粒径变化。温度升高时, PFP 由液态转变为气态, DOX 纳米泡粒径增大; 温度降低时, 又恢

复到原来状态,见图 2。

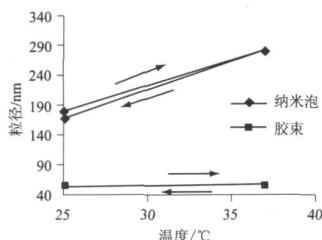


图 2 DOX 纳米泡粒径随温度变化图

Fig 2 The temperature dependency of DOX-loaded nanobubbles' and micelles' size

3 讨论

共聚物 PEG 嵌段中-CH₂-与 PLGA 嵌段中-CH₂-的质子数之比为 1.48,实际值为 1.22,实际值比理论值略小,可能有极少量未反应的 PLGA 单体存在^[10-11]。PLGA 为相对分子质量为 8 000 的高分子聚合物,羧基活性很弱,且自身链缠绕可能将羧基包裹不易被酰化,反应时间太长且不完全。二氯亚砷本身既做反应物,又做溶剂,反应时间大大减少,且反应完全。反应中催化剂选用碱性较弱的吡啶,既可除去盐酸促进反应进行,又不易破坏酯键形成。但吡啶沸点较高,较难除去,初始采用甲醇直接沉析方法除去过量吡啶及所生成的盐酸盐、过量 PEG,但发现吡啶盐酸盐用沉析方法难以除去,且因过量 PEG 溶于甲醇时将一部分产物也混悬在甲醇中,造成产物损失较多。采用纯化水透析的方法可同时将过量吡啶及盐酸盐、过量 PEG 除去。透析后旋蒸除去水,产物用甲醇沉析,可进一步将过量 PEG 除尽,且产物损失较少。

注入法是将共聚物溶于与水互溶的有机溶剂中,然后匀速注入到搅拌的水分散介质中,有机溶剂快速均匀分散到水中,聚合物在分子间氢键、静电相互作用、疏水相互作用等推动下自发构筑形成以疏水基团为内核、亲水基团为外壳的胶束。此种方法制备胶束的优点在于:有机相注入水相瞬间,胶束即形成,并随着搅拌在溶液中被分散均匀,局部浓度不

高,胶束不易聚集合并,因此制备得到的胶束粒径最小,适于制备胶束。

两亲性两嵌段共聚物 PLGA-PEG 在水中能自组装,DOX 依靠疏水作用协同进入、均匀分散在胶束的疏水核中,形成具有核/壳结构的载 DOX 胶束。Zeta 电位值较小的原因可能是纳米泡外层为 PEG 覆盖。但纳米泡外 PEG 层的相互排斥作用,仍能使纳米泡稳定存在。而且 DOX 纳米泡成膜材料 PLGA-PEG 具有很好的自我修复重排能力,使膜柔韧性较好,在温度变化时使纳米泡具有很好的稳定性。

参考文献:

- [1] Deng C, Lizzi F. A review of physical phenomena associated with ultrasonic contrast agents and illustrative clinical applications[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2002, 28: 277-286.
- [2] 金义光,杜丽娜. 药物传递-原理与应用[M]. 北京:化学工业出版社,2008:188.
- [3] Ferrara K, Pollard R, Borden M. Ultrasound microbubble contrast agents: Fundamentals and application to gene and drug delivery[J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2007, 9: 415-447.
- [4] Li Y, Hirokazu M, Michihiro N. Encapsulated ultrasound microbubbles: Therapeutic application in drug/ gene delivery[J]. *J Controlled Release*, 2006, 114: 89-99.
- [5] 周文英,杜丽娜,金义光. 超声微泡造影剂:基因和药物传递的原理与应用[J]. *国际药学研究杂志*, 2008, 35: 305-308.
- [6] 罗狄锋. 微泡型超声造影剂制备及其靶向应用研究进展[J]. *国际生物医学工程杂志*, 2007, 30: 120.
- [7] 马立康,徐军明,侯方高. 超声微泡造影剂的肿瘤靶向治疗研究进展[J]. *临床超声医学杂志*, 2007, 9: 166-168.
- [8] 刘兆民,常亮,秦莉. 可降解温敏型共聚物 PLGA-PEG-PLGA 的合成及辐照法分子量调整[J]. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2006, 24: 351-355.
- [9] 王晶,周庆颂,袁悦,等. 生物降解聚合物 PLGA-PEG-PLGA 的合成及表征[J]. *沈阳药科大学学报*, 2005, 22: 348-356.
- [10] Apfel R, CH. Gauging the likelihood of cavitation from short-pulse, low-duty cycle diagnostic ultrasound [J]. *Ultrasound Med Biol*, 1991, 17: 179-185.
- [11] Rapoport N, Gao Z. Multifunctional nanoparticles for combining ultrasonic tumor imaging and targeted chemotherapy [J]. *Oxford journals*, 2007, 99: 1095-1106.

[收稿日期]2009-10-22

液质联用研究 CHO-K1 细胞对巴氯酚的摄取

王欢¹, 韩海¹, 魏农农², 金海燕³, 蔡绍晖¹ (1. 暨南大学药学院, 广东 广州 510632; 2. 国家食品药品监督管理局药品审评中心, 北京 100038; 3. 暨南大学医学院, 广东 广州 510632)

[摘要] 目的:通过细胞摄取巴氯酚的体外药动学研究及液质联用定量检测方法的建立,为确定巴氯酚更合理的给药途径和跨越血脑屏障的机制研究提供依据。方法:利用 CHO-K1 细胞摄取药物的细胞生物学实验方法结合液质联用检测技术,以细胞/介质 (cell/medium, C/M) 比值为指标进行 CHO-K1 细胞摄取巴氯酚体外药动学研究,并进行方法学考察。本实验选取的

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(编号:30973565) [作者简介] 王欢,女,博士,讲师,电话:020-85223784, E-mail: wangh_lucky@163.com