

表柔比星聚乳酸-羟基乙酸共聚物微球的制备及抗肿瘤活性研究

刘 炜*, 王晓彤, 刘 菊(首都医科大学附属北京世纪坛医院药剂科, 北京 100038)

中图分类号 R943;R736 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)34-4845-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.34.29

摘要 目的:制备表柔比星聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)微球,并考察其体外抗肿瘤活性。方法:以PLGA为载体,采用乳化-溶剂挥发法制备表柔比星PLGA微球。利用透射电子显微镜观察微球的形态结构,激光粒度分布测量仪检测其粒径分布;紫外分光光度法测定其主药含量,计算载药量和包封率;通过体外释放试验考察10 d内的累积释放度;采用MTT法检测所制微球和表柔比星对人乳腺癌MCF-7细胞的增殖抑制率。结果:所制表柔比星PLGA微球的粒径为 $(175.2 \pm 16.8) \mu\text{m}$,载药量为 $(8.6 \pm 1.3)\%$,包封率为 $(46.7 \pm 8.6)\%$ ($n=7$);4 h、24 h、10 d累积释放度分别为27.8%、41.7%、92.3%。与表柔比星比较,表柔比星PLGA微球能延长对人乳腺癌MCF-7细胞的增殖抑制率至96 h(表柔比星48 h的抑制率为96.7%,表柔比星PLGA微球96 h的抑制率为99.3%)。结论:成功制得表柔比星PLGA微球,其具有良好的体外缓释效果和抗肿瘤活性。

关键词 表柔比星;聚乳酸-羟基乙酸共聚物;微球;抗肿瘤活性

Study on Preparation and Antitumor Activity of Epirubicin-loaded PLGA Microspheres

LIU Wei, WANG Xiaotong, LIU Ju (Dept. of Pharmacy, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare epirubicin-loaded PLGA microspheres and study its *in vitro* antitumor activity. METHODS: Using PLGA as carrier, epirubicin-loaded PLGA microspheres were prepared by using emulsification-solvent evaporation method. The morphology of microspheres was observed by TEM; the distribution of particle size was determined by laser granulometry distribution measuring instrument; the content of main component was determined by UV spectrophotometry. The drug-loading amount and entrapment efficiency were calculated, and accumulative release rate (Q) was investigated by *in vitro* release test within 10 d. The proliferation inhibitory rates of prepared microspheres and epirubicin to human breast cancer MCF-7 cells were detected by MTT assay. RESULTS: The particle size, drug-loading amount and encapsulation efficiency of epirubicin-loaded PLGA microspheres were $(175.2 \pm 16.8) \mu\text{m}$, $(8.6 \pm 1.3)\%$ and $(46.7 \pm 8.6)\%$ ($n=7$); $Q_{4\text{h}}$, $Q_{24\text{h}}$ and $Q_{10\text{d}}$ were 27.8%, 41.7% and 92.3%, respectively. Compared with epirubicin, epirubicin-loaded PLGA microspheres could prolong inhibitory rate of epirubicin to MCF-7 cells for 96 h (48 h inhibitory rate of epirubicin was 96.7%, 96 h proliferation inhibitory rate of Epirubicin-loaded PLGA microspheres was 99.3%). CONCLUSIONS: Epirubicin-loaded PLGA microspheres are prepared successfully, and show good *in vitro* sustained-release effect and antitumor activity.

KEYWORDS Epirubicin; PLGA; Microspheres; Antitumor activity

化学药物治疗是当前最常用的肿瘤治疗手段,但由于大部分化疗药物对正常细胞和肿瘤细胞缺乏选择性,因此化疗反应率低,易引起严重的不良反应,从而限制了其临床应用^[1-2]。将药物制成微球后,由于微球中药物的缓释性,可以延长药作用时间,提高生物利用度,降低毒副作用,增强疗效,因此微球已成为近年来研究的热点^[3-4]。聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)是一类人工合成的亲脂性多聚物材料,具有良好的生物相容性和可生物降解性,在体内降解成乳酸和羟基乙酸,最终代谢为水和二氧化碳,无毒性^[5]和免疫原性^[6],近年来常应用于化疗药物和抗生素的缓释研发,部分已应用于临床^[6-7]。本研究选择PLGA作为药物载体包封材料,选择表柔比星作为包裹药物,制备表柔比星PLGA微球,考察其载药量、包封率、体外释药和抗肿瘤活性,为开发抗肿瘤药物的新型给药系统提供依据。

1 材料

1.1 仪器

* 副主任药师, 硕士。研究方向: 药物制剂。电话: 010-63926411。E-mail: liuwei8090@126.com

JEM-200C透射电子显微镜(日本日立公司);Lambda25紫外-可见分光光度计(美国铂金埃尔默公司);Zetasizer-3000激光粒度分布测量仪(英国Malvern公司)。

1.2 药品与试剂

注射用盐酸表柔比星(浙江海正药业股份有限公司,批号:150309,规格:每支10 mg);聚乙烯醇(PVA,美国Sigma公司,批号:150309);PLGA[中国科学院成都有机研究所,批号:111367,丙交酯(LA)-乙交酯(GA)(50:50)]。

1.3 细胞

人乳腺癌MCF-7细胞由中国科学院成都有机研究所提供。

2 方法

2.1 微球的制备

将注射用盐酸表柔比星配制成质量浓度为4 mg/ml的表柔比星水溶液,缓慢加入质量浓度为25 mg/ml的PLGA二氯甲烷溶液中,超声1 min后形成初乳,滴加到15 ml 1% PVA溶液中,继续超声乳化1 min,旋转蒸发使二氯甲烷挥发完全,混悬液即为表柔比星PLGA微球混悬液。10 000 r/min(离心半

径10 cm)离心10 min,将沉淀用超纯水洗涤并离心3次,冷冻干燥得固化的表柔比星PLGA微球。

2.2 微球的形态及粒径分布

将表柔比星PLGA微球粉末均匀分散地黏附于导电胶上,表面喷镀金膜,在透射电子显微镜下观察微球的形态结构。取表柔比星PLGA微球分散于2 ml超纯水中,应用激光粒度分布测量仪测定微球的平均粒径和分布。

2.3 表柔比星线性关系考察

精密称取注射用盐酸表柔比星10 mg,置于50 ml量瓶中,加入水溶解并稀释至刻度,得到盐酸表柔比星溶液。取稀释至系列梯度浓度的表柔比星溶液,采用可见光480 nm作为表柔比星的检测波长,测定吸光度(A)。以表柔比星的质量浓度(c)与其对应的A值作线性回归,绘制标准曲线。

2.4 微球载药量与包封率的测定

精密称取表柔比星PLGA微球10 mg,加入10 ml超纯水中,形成表柔比星PLGA微球混悬液;再加入二氯甲烷1 ml,超声10 min,待PLGA充分溶解后,4 000 r/min(离心半径10 cm)离心5 min。吸取全部上清液,在480 nm波长处检测A,代入回归方程计算表柔比星含量。按公式计算包封率和载药量,包封率(%)=微球中药物质量/投入的药物总量×100%;载药量(%)=微球中药物质量/微球的质量×100%。

2.5 体外释放试验

称取定量的表柔比星PLGA微球,分散于pH 7.4的磷酸盐缓冲液(PBS)中,置于密封透析袋内,PBS为释放介质,转速为100 r/min,于37 ℃恒温水浴振荡,分别于1、2、4、6、8、10、12、24、48、96、144、192、240 h吸取释放接收液2 ml,并补入空白释放介质2 ml。于480 nm波长处测定各时间点释放接收液的吸光度,计算累积释放度,绘制释放曲线。另称取适量注射用盐酸表柔比星,按照上述相同方法考察盐酸表柔比星对照品的释药特性。

2.6 体外抗肿瘤试验

应用MTT法检测表柔比星PLGA微球对人乳腺癌MCF-7细胞的抑制率,用0.25%胰酶消化细胞后稀释至细胞密度为 $5 \times 10^6 \text{ L}^{-1}$ 的细胞悬浮液,接种于96孔板中,每孔加入200 μl 悬液,置于培养箱中培养。细胞贴壁后,分别加入待测药物,置于培养箱中常规培养。以表柔比星PLGA微球中表柔比星的含量作为定量,取相同含量的表柔比星作为阳性对照,试验分为对照组(不加药)、表柔比星组和表柔比星PLGA组,每组5个平行孔。分别处理12、24、48、72、96 h后弃培养基,每孔加入20 μl 质量浓度为0.5 g/L的MTT,继续孵育4 h,弃培养基,加入200 μl 的二甲基亚砜(DMSO)。用酶标仪于570 nm波长检测各孔光密度(OD)。按公式计算细胞增殖抑制率:增殖抑制率=(1-给药组OD值/对照组OD值)×100%。

2.7 统计学方法

采用SPSS 18.0软件统计处理数据,所有计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两比较采用卡方检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 微球的基本特性

表柔比星的回归方程为 $c = 36.2054A - 0.3158$ ($r = 0.99975$),检测质量浓度的线性范围为0.01~0.1 mg/ml。所制备的表柔比星PLGA微球呈规则圆整的球状,分散性良好,平均粒径为

(175.2 ± 16.8) μm ,载药量为(8.6 ± 1.3)%,包封率为(46.7 ± 8.6)%($n = 7$)。表柔比星PLGA微球的透射电镜图见图1。

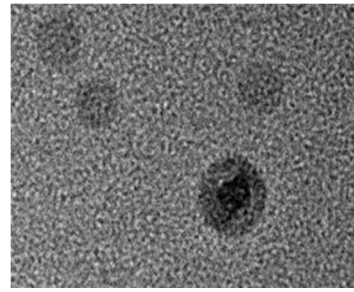


图1 表柔比星PLGA微球的透射电镜图(×200)

Fig 1 TEM photos of epirubicin-loaded PLGA microspheres (×200)

3.2 体外释放分析

表柔比星PLGA微球在前4 h释放较快,累积释放度迅速达27.8%;此后微球释放平稳缓慢,24 h累积释放度为41.7%;10 d累积释放度为92.3%。此现象原因在于部分未包封药物游离在微球表面,被迅速释放出来,引起前期若干小时的迅速释放;后期被包裹在微球内部的表柔比星逐渐释放出来,因此该阶段的释放缓慢。表柔比星PLGA微球和表柔比星的24 h内以及表柔比星PLGA微球10 d内的体外释放曲线见图2。

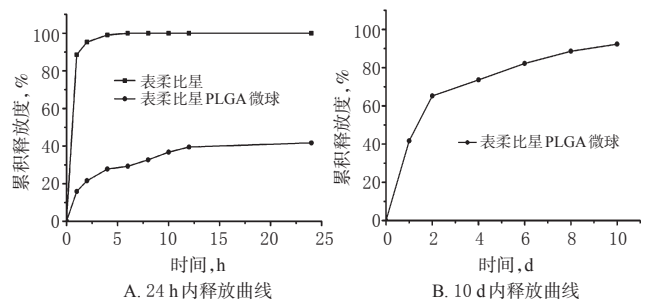


图2 体外释放曲线

Fig 2 The release curves *in vitro*

3.3 体外抗肿瘤活性

表柔比星PLGA微球和表柔比星对人乳腺癌MCF-7细胞的增殖均有显著的抑制作用,表柔比星PLGA微球和表柔比星对人乳腺癌MCF-7细胞的体外抑制作用在96 h内,随着时间的延长,抑制作用增强。表柔比星和表柔比星PLGA微球在12、24 h时的增殖抑制率差异无统计学意义($P > 0.05$)。48 h时表柔比星的细胞增殖抑制率为96.7%,此后进入平台期。表柔比星PLGA微球在48 h时的增殖抑制率为62.3%,显著低于表柔比星($P < 0.05$);在96 h时细胞增殖抑制率为99.3%,与表柔比星比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。表柔比星PLGA微球和表柔比星对MCF-7细胞的增殖抑制曲线见图3。

4 讨论

化学治疗药物在杀伤肿瘤细胞、延长肿瘤患者生存期的同时,由于其选择性较低,易产生严重的副作用,限制了其临床应用。近年来采用降解生物材料为囊材包裹化疗药物制备载药微球的研究和应用越来越广泛,其中PLGA是广泛用作控释和缓释给药系统的一种合成高分子材料。其制备的微球体系具有以下特点:能够控制微球的大小,延长药物释放时间,降低药物毒副作用和刺激性^[8]。目前已报道的应用PLGA包裹的化疗药物有氟尿嘧啶、多柔比星、丝裂霉素、喜树碱等^[9]。

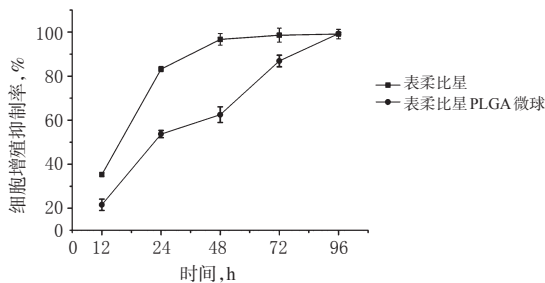


图3 表柔比星 PLGA 微球和表柔比星对 MCF-7 细胞的抑制曲线

Fig 3 The proliferation inhibitory curves of epirubicin-loaded PLGA microspheres and epirubicin to MCF-7 cells

表柔比星是阿霉素的同分异构体,通过直接嵌入 DNA 碱基对之间、干扰转录过程、阻止 mRNA 的形成而发挥抗肿瘤作用,对乳腺癌、恶性淋巴瘤、头颈部癌等多种肿瘤均具有显著的抑制作用^[10]。本研究利用载药微球技术制备表柔比星 PLGA 微球,探讨其对人乳腺癌 MCF-7 细胞的毒性作用,以寻找适合临床应用的药物传递系统。

本文以 PLGA 作为缓释载体、PVA 为交联剂,制备表柔比星 PLGA 微球。经扫描电镜观察发现,微球表面光滑规则;经测定,载药量为 $(8.6 \pm 1.3)\%$,包封率为 $(46.7 \pm 8.6)\%$ 。包封率和载药量是评价微球体系的重要参考指标,包封率是指包裹进入微球的药量与投药量的比值,包封率越高,说明制备条件控制越好。而载药量则与具体的治疗所需药物浓度相关^[11]。由于表柔比星作为一种化疗药,其活性很高,较小的用药剂量、较低的载药量就能满足临床治疗。

通过对人乳腺癌 MCF-7 细胞进行体外药理学实验证实,表柔比星 PLGA 微球对人乳腺癌 MCF-7 细胞有显著的抑制效果,其抑制细胞增殖的作用首先与纳米微球的缓释特性有关。微球将药物包裹在内部,随着微球的降解,药物缓慢释放出来,达到长效治疗的目的,因此达到减少给药次数、提高药物利用率的目的。其次与纳米微球进入细胞的方式有关。载药微球以细胞内吞方式进入细胞质,其荷载的药物在胞质中被释放^[12-13],长效持久地作用于肿瘤细胞,发挥杀伤效应^[12,14]。已有相关研究报道,以 PLGA 为载体制备的药物纳米微球通过胞吞作用进入细胞质,并使药物在细胞内缓慢释放^[15]。表柔比星 PLGA 微球在 96 h 时对人乳腺癌细胞 MCF-7 的增殖抑制率达 99.3%,而表柔比星在 96 h 时抑制率为 99.1%,二者比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。这提示表柔比星能从载药微球中缓慢释放出来,发挥细胞毒作用,且其效应未受到载药材料的影响。

综上所述,本研究所制备的表柔比星 PLGA 微球具有良好的缓释效果。

参考文献

[1] DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014[J]. *CA Cancer J Clin*, 2014, 64(4):252.

[2] Monje M, Dietrich J. Cognitive side effects of cancer therapy demonstrate a functional role for adult neurogenesis

[J]. *Behavi Brain Res*, 2012, 227(2):376.

[3] Iwamoto T. Clinical application of drug delivery systems in cancer chemotherapy: review of the efficacy and side effects of approved drugs[J]. *Biol Pharm Bull*, 2013, 36(5):715.

[4] Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, 54(5):631.

[5] Danhier F, Ansorena E, Silva JM, et al. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications[J]. *J Control Release*, 2012, 161(2):505.

[6] Niu C, Wang Z, Lu G, et al. Doxorubicin loaded superparamagnetic PLGA-iron oxide multifunctional microbubbles for dual-mode US/MR imaging and therapy of metastasis in lymph nodes[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(9):2307.

[7] Zhao YZ, Dai DD, Lu CT, et al. Epirubicin loaded with propylene glycol liposomes significantly overcomes multi-drug resistance in breast cancer[J]. *Cancer Lett*, 2013, 330(1):74.

[8] Cui Y, Xu Q, Chow PKH, et al. Transferrin-conjugated magnetic silica PLGA nanoparticles loaded with doxorubicin and paclitaxel for brain glioma treatment[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(33):8511.

[9] Wang J, Ng CW, Win KY, et al. Release of paclitaxel from polylactide-co-glycolide (PLGA) microparticles and discs under irradiation[J]. *J Microencapsul*, 2003, 20(3):317.

[10] Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Huovinen R, et al. Adjuvant capecitabine, docetaxel, cyclophosphamide, and epirubicin for early breast cancer: final analysis of the randomized FinXX trial[J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(1):11.

[11] 董鑫. PLGA 载多柔比星磁性纳米微球的制备与表征[J]. 常熟理工学院学报:自然科学版, 2008, 22(10):43.

[12] Betancourt T, Brown B, Brannonpeppas L. Doxorubicin loaded PLGA nanoparticle by nano-precipitation: preparation, characterization and in vitro evaluation[J]. *Nanomedicine: Lond*, 2007, 2(2):219.

[13] Xu P, Gullotti E, Tong L, et al. Intracellular drug delivery by poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles, revisited [J]. *Mol Pharm*, 2009, 6(1):190.

[14] 罗宇燕, 成晓岚, 郭喆霏, 等. 微球中聚乳酸羟基乙酸共聚物浓度与微球结构、释药、降解的关系研究[J]. *中国药房*, 2015, 26(7):986.

[15] Sottani C, Poggi G, Quaretti P, et al. Serum pharmacokinetics in patients treated with transarterial chemoembolization (TACE) using two types of epirubicin-loaded microspheres[J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(5):1769.

(收稿日期:2016-03-26 修回日期:2016-07-05)

(编辑:邹丽娟)