

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 31420141150144

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

甲氨蝶呤磷脂复合物及其自组装纳米粒传输系统的制备、表征及其性能的研究

Preparation, characterization and property of MTX-PC complex and its self-assembled nano-drug delivery systems

李岩秀

指导教师姓名: 侯振清 教授

专 业 名 称: 生物医学工程

论文提交日期: 2017 年 月

论文答辩时间: 2017 年 月

学位授予日期: 2017 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2017 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人提交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(侯振清)课题(组)的研究成果,获得(侯振清)课题(组)经费或实验室的资助,在(侯振清)实验室完成。

(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

近年来,全球纳米药物的趋势越来越趋向于设计高度复杂的药物传输系统,使其兼具主动靶向性、治疗性和生物刺激响应性等多重疗效。然而这种高度复杂的药物系统在治疗中未必是一种优势,因此本文利用甲氨蝶呤(MTX)的结构特殊性,在系统中既作为靶向配体,又作为治疗性主体,设计并合成了一种同时具有靶向作用和治疗作用的新型抗癌药物甲氨蝶呤磷脂(MTX-PC)复合物自组装纳米粒药物传输系统,从而构建出了一种简单、灵活、多功能的给药系统。论文主要工作如下:

(1) MTX-PC 复合物的制备及表征:使用共溶剂法制备 MTX-PC 复合物,并对反应温度、反应时间、反应物投料比等反应条件进行优化实验,筛选出最佳反应条件制备 MTX-PC 复合物并对 MTX 在 MTX-PC 复合物中的存在形式进行表征。具体表征的项目有:粒径与电位分析、傅里叶变换红外光谱分析、X-射线衍射分析、热分析、核磁共振氢谱分析等。

(2) MTX-PC 复合物自组装纳米粒的制备及表征:通过薄膜分散法将两亲性 MTX-PC 复合物在水溶液中自组装成纳米粒,并对其形貌、粒径、电位、稳定性和药物释放性能进行表征,结果显示其不仅具有良好的分散性和高的载药量,而且渗透性和药物传递性能也能显著增强。

(3) MTX-PC 复合物纳米粒的体外细胞实验及体内抑瘤实验:通过细胞摄取实验、流式细胞实验、细胞内药物转运/分布/定位实验、细胞毒性实验考察 MTX-PC 复合物自组装纳米粒对过度表达叶酸受体的肿瘤细胞的靶向作用和抗肿瘤活性;通过尾静脉注射 MTX-PC 复合物纳米粒进入 H₂₂ 荷瘤小鼠体内的治疗影响,考察其肿瘤大小、体重变化以及生长状况,评价 MTX-PC 复合物纳米粒对于小鼠的抑瘤效果。

关键词:甲氨蝶呤;磷脂复合物;自组装

Abstract

Recently, the global trend in the field of nanomedicine has been toward the design of highly sophisticated drug delivery systems with active targeting and therapeutic functions, as well as responsiveness to biological stimuli for improving therapeutic efficacy. But offering sophistication generally increases their complexity that might be disadvantageous in pharmaceutical development. We hypothesize that using clinical anticancer drugs methotrexate (MTX) as both a targeting ligand and a therapeutic agent to interact with natural product phospholipid (PC) and thus self-assembly will lead to an efficient but simple and flexible, and multifunctional system. The main work is as follows:

(1) MTX-PC complex was prepared by co-solvent method and the reactive conditions such as reaction temperature, reaction time and ratios of MTX and PC etc were optimized. Then, differential scanning calorimetry (DSC), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), X-ray diffractometry (XRD), thermal gravity analysis (TGA), and etc. were used to investigate the distribution state of MTX in the pharmaceutical MTX-PC complex matrix.

(2) The self-assembled MTX-PC NPs were self-assembled by the amphiphilic MTX-PC complex with a novel lipid-drug complex film dispersion technique. The size, shape, potential, stability, and drug-release property of the self-assembly of MTX-PC complex were evaluated by several experiments. Results indicates that MTX-PC NPs possess amphiphilic property, high drug-loading efficiency and enhanced permeability.

(3) *In vitro* cell study and *in vivo* antitumor efficacy study of MTX-PC NPs: investigate the targeting efficacy and therapeutic efficacy of MTX-PC NPs towards FA receptors over-expressed cells by cellular uptake experiment, flow cytometry analysis, intracellular drug delivery, and cell cytotoxicity assay; evaluate the

antitumor effect in H₂₂ bearing mice after i.v. with MTX-PC NPs by observing growth condition, tumor size and weight.

Keywords: methotrexate, phospholipid complex, self-assembly

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘 要.....	I
Abstract.....	III
目 录.....	I
Contents	I
第一章 绪 论	1
1.1 前言.....	1
1.2 甲氨蝶呤的治疗特点及研究进展	2
1.3 磷脂复合物的概况及特性	6
1.4 本课题提出的目的、意义、研究内容及创新点.....	11
参考文献	14
第二章 甲氨蝶呤磷脂复合物的制备及表征.....	19
2.1 仪器与材料.....	19
2.2 实验方法.....	20
2.3 结果与讨论.....	23
2.4 小结.....	37
参考文献	38
第三章 甲氨蝶呤磷脂复合物纳米粒的制备及表征.....	39
3.1 仪器与材料.....	39
3.2 实验方法.....	40
3.3 结果与讨论.....	41
3.4 小结.....	46
参考文献	48

第四章 甲氨蝶呤磷脂复合物自组装纳米粒的体内外实验.....	50
4.1 仪器与材料.....	50
4.2 实验方法.....	52
4.3 结果与讨论.....	54
4.4 小结.....	63
参考文献.....	65
全文总结与展望	66
全文总结.....	66
展望.....	67
硕士期间发表论文情况	68
致 谢.....	69

Contents

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English	III
Content in Chinese.....	I
Content in English	I
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Introduction.....	1
1.2 Therapeutic features and progress of MTX	2
1.3 Summary of phospholipid complex.....	6
1.4 Main focus, significance and key innovation point of this thesis.....	11
References	14
Chapter2 Preparation and Characterization of MTX-PC complex ..	19
2.1 Apparatus and materials	19
2.2 Experiments.....	20
2.3 Results and discussion	23
2.4 Summary.....	37
References	38
Chapter3 Preparation and Characterization of MTX-PC	
Nanoparticles.....	39
3.1 Apparatus and materials	39
3.2 Experiments.....	40
3.3 Results and discussion	41
3.4 Summary.....	46
References	48
Chapter 4 In vitro evaluation of MTX-PC Nanoparticles	50

4.1 Apparatus and materials	50
4.2 Experiments.....	52
4.3 Results and discussion	54
4.4 Summary.....	63
References	65
Conclusion and future works.....	66
Conclusion	66
Future works	67
Publications	68
Acknowledgement	69

第一章 绪论

1.1 前言

当今社会，癌症已经成为严重威胁人类健康的主要疾病之一。根据《Cancer Statistics in China, 2015》中报道，2015年中国地区出现了4292,000例新增癌症患者和2814,000例癌症死亡患者。随着癌症不断蔓延，已经严重威胁到人们的身体健康和^[1]生活质量。

如今，临床治疗癌症的常见方法有放射治疗法、化学药物治疗法、热疗法及外科手术切除等，但这些治疗方法存在着固有的局限性而导致治疗结果不理想，复发率高等严重缺点^[2]。人们“谈癌色变”，望而生畏，面临如此高的癌症发病率和死亡率却至今仍没有确切的病因和行之有效的治疗方法，癌症具有以下特征：其一，癌症是一种内源性疾病，肿瘤细胞与正常细胞共存于病人体内，在使用传统化疗药物杀死快速生长的癌细胞的同时，也会杀死体内很多正常的代谢旺盛的功能性细胞如皮下毛囊细胞、负责造血和维持免疫系统的造血干细胞、消化道上皮细胞等，所以导致癌症病人在接受治疗中产生严重的副作用，如脱发、容易感染、严重拉肚子等。如此严重的副作用，使得医生不得不在治疗癌症和维持患者基本生活之间不断权衡，不断修改治疗方案，减少药物剂量，甚至妥协^[3]。其二，癌症不是单一性疾病。众所周知，根源上癌症来源于肿瘤细胞的原癌基因变异，而每一种肿瘤细胞里的变异基因数量和类型都不止一个，差别甚远。例如，诺华（Novartis）最新的治疗肺癌药Ceritinib于2016年4月28日获FDA批准对1%左右的肺癌有很好的效果。由于Ceritinib治疗的是变异ALK基因，但仅约1%的肺癌患者才表现为ALK变异^[4]。基于癌症的多样性，制药企业和研究机构几乎每次只能针对一小部分患者研发药物，而研发每一种新药都需要大量时间成本和经济成本。其三，是癌症的突变抗药性。自然赋予了生命不断进化和不断适应环境的能力，而癌细胞不仅保留了这种能力，而且发挥得更强，针对杀死癌细胞的药物，癌细胞则不断突变产生耐药性。例如在Ceritinib的临床试验过程中，许多肿瘤细胞在临床试验几个月后就出现了变异的ALK丢失情况，新的基因变异出现来促进肿瘤细胞的代谢和增殖。

因此，人们期望研究新的靶向纳米药物传递系统，将药物或者其它有效活性物质选择性地运输到肿瘤部位，将治疗性药物的作用尽可能锁定或指引向目标靶细胞、靶器官和组织内，不威胁正常细胞、器官和组织的功能，从而增强对肿瘤细胞的杀伤能力，减少毒副作用，提高疗效，实现肿瘤靶向治疗^[5]。随着分子生物学技术的飞速发展和纳米技术的深入，靶向性的纳米粒药物传递系统已经成为一个活跃的研究领域^[5,6]。

1.2 甲氨蝶呤的治疗特点及研究进展

1.2.1 甲氨蝶呤的结构及作用机制

甲氨蝶呤 (Methotrexate, MTX)，2, 4-diamino-N10-methyl propylglutamic acid，是在 60 年前首次被 Seeger 等合成，从化学结构上可视作叶酸的蝶呤基中的羟基被氨基取代后的的叶酸衍生物^[7]，橙黄色结晶性粉末，几乎不溶于水、乙醇、三氯甲烷、二氯甲烷或乙醚，在 20℃ 下 MTX 的水溶解度为 0.01 mg/mL。MTX 在强酸性溶液中不稳定，酰胺基会水解，生成谷氨酸和蝶呤酸而失去活性。MTX 的结构式如图 1.1 所示，化学名为 L-(+)-N-[4-[(2,4-二氨基-6-蝶啶基)甲基]甲氨基]苯甲酰基]谷氨酸。

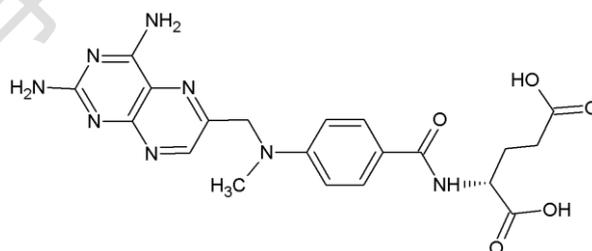


图 1.1 甲氨蝶呤的化学结构式

Fig. 1.1 The chemical structure of Methotrexate

MTX 是一种抗叶酸类抗肿瘤药物，与二氢叶酸还原酶 (DHFR) 的结合比二氢叶酸强 1000 倍，几乎不可逆地结合 DHFR，主要抑制 DHFR 而使二氢叶酸 (DHFA) 不能还原成具有生理活性的四氢叶酸 (FA)，从而使嘌呤核苷酸和嘧啶核苷酸的生物合成过程中一碳基团的转移作用受阻，导致 DNA 的生物合成

受到抑制^[8]。此外，MTX 也有对胸腺核苷酸合成酶的抑制作用，但抑制 RNA 与蛋白质合成的作用则较弱，主要作用于细胞周期的 S 期，属细胞周期特异性药物，对 G1/S 期的细胞也有延缓作用，对 G1 期细胞的作用较弱。MTX 结构中的 N' 与二氢叶酸还原酶中的天门冬氨酸的羧基形成较强的结合形式，从而较强地抑制二氢叶酸还原酶的作用。此外，发现 MTX 对胸腺嘧啶合成酶（TS）也有抑制作用，对所有细胞的核酸代谢都可产生致命的作用。

1.2.2 甲氨蝶呤的药理作用及临床应用

MTX 进入细胞是通过以下两种不同的机制：依赖能量的 FA 受体介导的主动靶向和结合还原性叶酸载体的主动运输。当甲氨蝶呤进入细胞后，会经过谷氨酸侧链的聚合反应演变成二氢叶酸还原酶抑制剂^[9]。药物动力学研究结果表明，甲氨蝶呤在体内 t_{1/2β} 为二室型，初期 2-3h，终末期 8-10h。口服吸收良好，1-5h 血浆药物浓度达到最高峰，主要经肾脏（40%-60%）排泄，大部分以原药形式排出体外，少部分药物（<10%）通过胆汁排泄^[10]。临床上主要用于治疗急性白血病、绒毛上皮细胞癌和恶性葡萄胎、头颈部肿瘤、乳腺癌、宫颈癌等肿瘤，但在这些治疗中都存在着严重的副作用^[11, 12]。

1.2.3 甲氨蝶呤的剂型研究现状

为了提高甲氨蝶呤的生物利用度、延长作用时间、增强特异性靶向和减少副作用，近几年来，人们进行了很多关于克服甲氨蝶呤副作用的新型药物传递系统研究，其分类和比例如下图 1.2 所示，这些系统均在一定程度上提高了甲氨蝶呤的治疗效果和安全性，例如甲氨蝶呤脂质体、甲氨蝶呤树枝状大分子、甲氨蝶呤聚合物胶束等，其中部分也进一步地使用靶向配体修饰，使之具有靶向性。

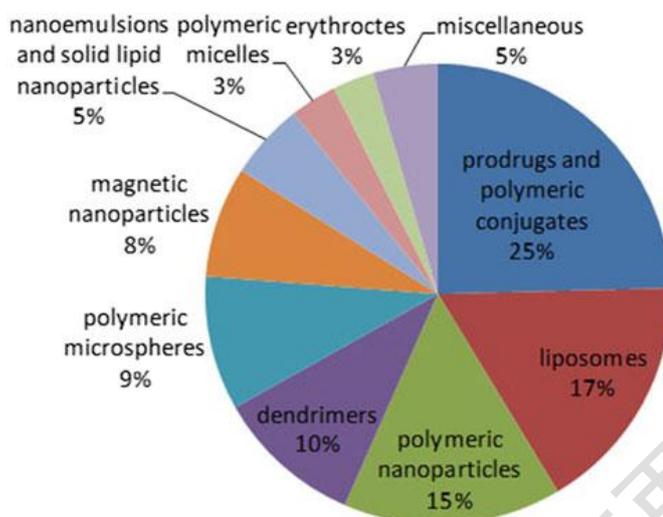


图1.2 目前已发表的甲氨蝶呤抗肿瘤药物传递系统的分类图示

Fig. 1.2 Comparison of published researches and developments of methotrexate for treatment of cancer and rheumatoid arthritis according to involvement of each delivery system

1.2.3.1 甲氨蝶呤树枝状大分子聚合物

树状大分子是一类高度枝化的单分散性大分子，其内部结构呈疏水性，外表面呈亲水性，被广泛地用作延长甲氨蝶呤的血浆半衰期、增加肿瘤部位聚集和减少非特异性靶向增强抗肿瘤活性。Kong 等人报道了以 PAMAM、PEG 和 MTX 制备 PAMAM-PEG/MTX 复合物，结果显示复合物相比于纯药在肿瘤小鼠体内表现出更长的血浆半衰期和作用时间，更好的抗肿瘤活性^[13]。此外，Zhang 等人成功地以 Generation 3 PAMAM 为药物载体，首先在 G3 PAMAM 表面引入水溶性基团，然后将其与 MTX 多价共轭结合，构建了 PAMAM-MTX 配合物药物传递系统^[14]。在低 pH 的肿瘤环境下，树枝状大分子表面发生质子化，引起树枝状大分子与 MTX 的排斥力作用，从而释放 MTX。实验结果显示该系统对于过度表达 FA 受体的肿瘤细胞如 KB 细胞具有很好的靶向治疗效果，有效地减小了副作用和增强了疗效，同时也具有一定的临床应用潜力。

1.2.3.2 甲氨蝶呤脂质体

脂质体是指由双层脂质分子包裹亲水部分形成的微小球型囊泡结构，易穿过生物膜^[15]。Williams 等人成功地评价了纯药与 MTX 脂质体在大鼠实验中抗急性

感染的效果，分别用空白脂质体、MTX 纯药、MTX 脂质体对大鼠连续 7 日进行静脉注射，结果表明 MTX 脂质体有显著增强的抗炎作用^[16]。在另一项研究中，作者又指出，多室甲氨蝶呤脂质体（multilamellar vesicles conjugated MTX, MTX-MLV）相对于纯药和普通 MTX 脂质体在静脉注射中都具有更强的抗炎效果^[17]。Prabhu 等人通过薄膜水合法后包裹一层亲水生物相容性聚合物如壳聚糖的方法制备了 MTX 隐形脂质体（Stealth liposomes）（210-260 nm）^[18]，并评价其在抗原诱导的关节炎大鼠体内的作用。采用壳聚糖对传统脂质体的包裹增加了脂质体的物理稳定性和包封率，增加了血液循环时间，相比于纯药 MTX，减少了大鼠关节内的水肿体积。

1.2.3.3 甲氨蝶呤聚乙二醇聚合物

聚乙二醇(PEG)是一种被广泛用于提高抗癌药物治疗指数的聚合物。Yousefi 等人制备了 MTX 与不同分子量的 PEG 连接的酯 MTX-PEGs，并表征了其理化性能，所制备的 MTX-PEGs 中 MTX 与 PEGs 等摩尔比^[19]。Shukla 等人使用相似的方法也合成了 MTX-PEG 配合物并使用 ^{99m}Tc 作标记^[20]，药代动力学实验表明了 MTX 的消除呈现为二室模型；使用 U87MG 人胶质瘤细胞做体外细胞毒性实验结果显示 MTX 与 PEG 聚合物增强了 MTX 剂量依赖性的细胞毒性。

1.2.3.4 甲氨蝶呤磁性纳米粒

研究表明，磁性纳米粒不仅适于发展为核磁共振显影剂用于肿瘤的诊断，而且还可潜在地包载化疗药物进行局部药物治疗和磁感应治疗，还可用作基因传递载体。Kohler 等人成功制备了磁性 MTX 配合物纳米粒^[21]，该磁性纳米粒首先被三甲氧基硅烷修饰而构成自组装单层结构，然后与 MTX 通过酰胺键连接（MTX 的末端羧基与纳米粒表面的胺基连接），结果表明 MTX 在模拟溶酶体环境的低 pH 条件下呈现出较好的释放，此外，在 HeLa 细胞和 MCF-7 细胞中进行的细胞活性实验也表明了 MTX 在靶向细胞中的胞内酶的作用下的化学分解释放。Zhang 等人合成了磁性壳聚糖微球连接 MTX 的靶向药物传递系统用于药物控制释放^[22]。首先将 MTX 与壳聚糖链通过肽键连接，然后以戊二醛作交联剂采用悬浮交联技术制备磁性壳聚糖微球。

1.2.3.5 甲氨蝶呤碳纳米管

在近几年的研究中，也出现了碳纳米管等的甲氨蝶呤药物传递系统。Chen 等人通过将甲氨蝶呤直接结合在金纳米粒子（AuNP）表面合成了 MTX-AuNP，相同剂量下相比于纯药对于某些肿瘤细胞表现出更强的细胞毒性，能够有效地抑制 Lewis 肺癌小鼠中肿瘤的发展^[23]。Samor 等人用多种连接分子如多肽和酯将 MTX 连接到多壁碳纳米管上，实验表明这种 MTX 碳纳米管结合物对于 MCF-7 细胞具有更强的细胞毒性，尤其是使用多肽作为基质时效果更好^[24]。

1.2.3.6 传统甲氨蝶呤药物传递系统缺点

现阶段，MTX 临床中常用的剂型仍为片剂和注射剂等，尽管甲氨蝶呤已经成为了各种恶性肿瘤和淋巴瘤的有效药物之一，但其体内消除快、毒副作用明显等仍然严重地限制着甲氨蝶呤的临床应用。低剂量时 MTX 的生物利用度较高但高剂量时生物利用度只有 10%-20%，MTX 用药剂量的提高可能会提高疗效，但同时会导致严重的副作用。通常情况下，MTX 治疗叫停的原因几乎都是疗效降低而副作用剧烈，普遍存在的胃肠道性副作用如腹泻、腹部疼痛、恶心、口腔炎等。在这些副作用中，胃肠道不适和骨髓抑制与叶酸拮抗有着直接关系，由于这些组织新陈代谢较快，对嘌呤、核苷酸、嘧啶等有大量需求。这些副作用严重影响着甲氨蝶呤的临床应用剂量，所以设计新的剂型以降低甲氨蝶呤的不良反应、充分发挥甲氨蝶呤的靶向作用和治疗作用是迫在眉睫、极其重要的任务^[25]。本文即开展一种载药量高、毒性低、具有靶向性的甲氨蝶呤磷脂复合物自组装纳米粒的研究。

1.3 磷脂复合物的概况及特性

1.3.1 磷脂的结构及其性质

磷脂是可溶于油相和可分散于水相的两亲性分子，在其结构中含有极性和非极性的基团，是含磷酸根的脂类物质的总称，主要有卵磷脂（PC）、脑磷脂（PE）、肌醇磷脂（PI）、磷脂酸（PA）等^[26]。PC 和 PE 大量存在于大部分脂质中，它们是细胞膜的主要构成，表 1.1 表示了典型磷脂结构中各成分的比例。卵磷脂是具有最高熵值的圆柱体形状磷脂，它构成了双分子层的结构，它的结构中包括一个饱和链和一个不饱和链^[27-29]。脑磷脂是圆锥形状的，但它本身不构成双分子层

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库