

植入型表阿霉素缓释药膜的制备及体内抑瘤活性

叶社房¹ 侯振清¹ 周志敏¹ 钟李明¹ 张其清^{1,2*}

¹(厦门大学生物医学工程研究中心/生物材料系/厦门市生物医学工程技术研究中心/
福建省生物医学工程重点实验室 厦门大学材料学院, 厦门 361005)

²(中国医学科学院/协和医科大学生物医学工程研究所 天津市生物材料重点实验室, 天津 300192)

摘要: 制备用于实体肿瘤局部治疗的植入型表阿霉素缓释药膜。采用复乳-溶剂挥发法制备聚乳酸载表阿霉素缓释微球,用交联复合法制备含载药微球的植入型胶原药膜;用扫描、透射电镜、共聚焦及粒度仪等考察微球和药膜的形貌、结构、粒径及体外释放;用 H22 肝癌荷瘤动物模型评价其体内抑瘤效果。结果:载药微球粒径分布均匀,外观圆整,平均粒径为 5.81 μm ;微球的载药量 4.39%,包裹率为 37.2%;10h 内载药微球在模拟体液中的累积释放率为 35%;腹腔注射载药微球与瘤体局部植入胶原药膜对 H22 肝癌均有明显的抑瘤效果;微球注射与药膜植入两种不同给药方式对 H22 肝癌抑瘤效果也存在显著性差异($P < 0.05$)。植入型载表阿霉素缓释胶原膜具有良好的药物局部缓释特性,在肿瘤的术后局部治疗方面具有良好的临床应用前景。

关键词: 表阿霉素;聚乳酸;胶原;植入型缓释药膜;肿瘤化疗

Intratumoral Chemotherapy with an Implantable Collagen Film Impregnated with Epirubicin-loaded Poly(lactic Acid) Microspheres Inhibits Tumor Growth in Hepatocellular Carcinoma Xenografts

YE She-Fang¹ HOU Zhen-Qing¹ ZHOU Zhi-Min¹ ZHONG Li-Ming¹ ZHANG Qi-Qing^{1,2*}

¹(Research Center of Biomedical Engineering; Research Center of Biomedical Engineering Technology of Xiamen City;
The Key Laboratory of Biomedical Engineering of Fujian Province; College of Materials, Xiamen University, Xiamen 361005)

²(Institute of Biomedical Engineering, Chinese Academy of Medical Science, Peking Union Medical College;
The Key Laboratory of Biomedical Material of Tianjin, Tianjin 300192)

Abstract: Drug-releasing implants delivering chemotherapeutic agents can provide promising local therapy to patients with malignant disorders. The purpose of the present study was to develop implantable collagen film impregnated with epirubicin-loaded poly(lactic acid) (PLA) microspheres (EPF-PM) for intratumoral administration in solid tumors. EPF-PM was prepared by double emulsion-solvent evaporation method, and the microspheres were further incorporated in biodegradable chemically cross-linked collagen to formulate implantable collagen film. The microspheres were characterized by scanning electron microscope, transmission electron microscope and laser confocus microscopy. *In vitro* release of epirubicin was examined by ultraviolet spectrophotometry. Transplantable murine hepatoma 22 (H22) model was used to evaluate the effects of EPF-PM or collagen film impregnated with EPF-PM on murine liver cancer. The results indicated that the epirubicin was well incorporated and dispersed homogeneously in PLA. The EPF-PM was uniformly spherical with average diameter of 5.81 μm , drug loading of 4.39%, and embedding ratio of 37.2%. The cumulative drug release rate of EPF-PM was 35% in analog body fluid at the 10h. The tumor growth rate was significantly inhibited by intraperitoneal injection of EPF-PM or intratumoral implantation of collagen film impregnated

收稿日期: 2006-09-27, 修回日期: 2008-04-23。

基金项目: 国家重大科学研究计划项目(2006CB933300); 福建省自然科学基金(C0610045); 厦门市科技计划项目(3502Z20055007); 厦门市科技创新资金项目(3502Z20041029)。

*通讯作者。E-mail: zhangqiq@xmu.edu.cn

with EPF-PM. A significant difference was shown in tumor inhibiting rate between intratumorally implanted group and intraperitoneal injection group ($P < 0.05$). These results suggests that the collagen film impregnated with EPF-PM show potential for localized controlled drug delivery applications and are suitable for postoperative chemotherapy of cancers.

Key words: epirubicin; polylactic acid; collagen; implantable drug delivery system; tumor chemotherapy

中图分类号 R943.41 文献标识码 A 文章编号 0258-8021(2008)04-0586-05

引言

化疗是恶性肿瘤常用的治疗方法之一。但常规化疗时,化疗药物难以在肿瘤内部达到有效浓度,并且药物全身分布而易引发系统性毒副反应。当发生严重不良反应时,患者由于顺应性差而被迫中断化疗。因此,研制出新型的抗肿瘤化疗药物,或改变现有化疗药物的剂型和药代动力学特性,使之以最适宜的方式作用于肿瘤组织是提高肿瘤化疗疗效的重要解决方案。对大多数实体肿瘤而言,后者显得尤为重要^[1-2]。

药物缓释系统是将化疗药物负载于可降解或不可降解的赋形剂,该系统具有保护药物活性,增加药物稳定性、改变药物在体内的分布,增加药物在靶器官的积累、降低药物的系统分布、提高治疗指数、减少毒副作用等优点。聚乳酸(poly-lactic acid, PLA)作为一种具有良好的生物相容性的可降解性高分子材料,以聚乳酸微球作为化疗药物载体已得到广泛应用^[3]。本研究采用复乳-溶剂挥发法,以表阿霉素(epirubicin, EPD)为模型药物,以聚乳酸为载体材料制备表阿霉素缓释微球;采用交联复合法制备含载药微球的植入型缓释胶原药膜;考察了微球和药膜的形貌、粒径、结构、体外释放等特性;利用 H22 肝癌荷瘤动物模型研究了载药微球与药膜的体内抑瘤效果。

1 材料和方法

1.1 材料

聚乳酸(PLA, DL 型,相对分子质量为 50000D)购自山东省医疗器械研究所;表阿霉素(99.2%)购自浙江海正药业股份有限公司;Span-80 购自国药集团化学试剂有限公司;Tween-80 购自广东省汕头市西陇化工厂;聚乙烯醇(PVA,聚合度 500)购自中国石化集团四川维尼纶厂;胶原由中国医学科学院生物医学工程研究所提供(采用牛腱通过胃蛋白酶消化,主要为 I 型胶原)^[4];透析袋购自美国 Greenbird 公司。昆明小鼠(4~5 周龄)由厦门大学抗癌研究

中心提供;H22 肝癌细胞株由上海药物研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 聚乳酸表阿霉素微球的制备及粒径测定

参照 Yang^[5]等提供的复乳-溶剂挥发法制备载药微球。初乳乳化剂采用 Span-80 和 Tween-80 混合乳化剂。将适量表阿霉素水溶液分散到 PLA 二氯甲烷溶液中制成初乳,然后将其分散在 100mL 1% 聚乙烯醇的溶液中制成复乳。室温挥发二氯甲烷,以 20000r/min 离心,水洗 3 次后冷冻干燥成桔红色粉末,-4℃ 低温密闭贮存。将 PLA 载药微球分散在适量去离子水中,用激光粒度分析仪(LS-POP)测定粒子的大小。

1.2.2 植入型表阿霉素缓释药膜的制备

将载药 PLA 微球分散在 0.4% 的胶原溶液(0.05% 的乙酸为溶剂)搅拌均匀后,铺于培养皿中置于 37℃ 烘干。以蒸馏水浸泡使膜与培养皿分离,将药膜以 0.25% 的甲醛溶液交联 2h,再将药膜铺于聚四氟乙烯板表面置于 37℃ 烘干,即得载表阿霉素缓释药膜。

1.2.3 载药微球、植入药膜的形貌观察

将 PLA 载药微球分散在适量去离子水中,分别用扫描电镜(LEO-1530)、透射电镜(H-600)以及共聚焦显微镜(Leica TCS SP2 SE)对微球的形态及表面特征进行观察;药膜喷金后用扫描电镜观察其形貌。

1.2.4 表阿霉素溶液标准曲线的测定

精确配制 4g/mL、6g/mL、8g/mL、10g/mL、12g/mL、14g/mL 的表阿霉素盐酸(0.1mol)溶液和 PBS 液,用紫外分光光度计(日本岛津 UV-2550)在 232nm 处测定表阿霉素的吸光度,制定标准曲线。

1.2.6 载药率和包封率的测定

精确称取 PLA 微球粉末,溶于二氯甲烷中,用 0.1mol HCL 萃取,离心取上清液,用紫外分光光度计在 232nm 处测定吸光度,得到表阿霉素的浓度,计算微球的载药率和包封率。载药率和包封率按以下公式计算^[6]:载药率 = 表阿霉素的含量/微球的质量 $\times 100\%$;包封率 = 实际载药率/理论载药率 $\times 100\%$ 。

1.2.7 载药微球的体外释放

取适量载药微球,将其置于 PBS 缓冲液中,在 37 ℃,72r/min 条件下的恒温振荡,定时取样,同时立即补加相同量的 PBS 缓冲液。样品在 232nm 处测定吸光度,根据标准曲线得到表阿霉素的浓度,计算出载药微球累积释放率。

1.2.8 体内抑瘤实验

荷瘤模型:取传代第 7d 的 H22 肝癌细胞瘤种,调制瘤细胞浓度为 1.6×10^7 /mL;将 0.3mL H22 细胞悬液(约含瘤细胞 5×10^6)皮下接种于昆明小鼠背部。待肿瘤体积达 200mm^3 时,开始用药治疗。

给药方法:参照文献[7],将制备的植入式药膜,剪成直径 0.8mm,长度 1mm。药膜用内径 0.8mm 带内芯的植药针经皮导入瘤体内。对照组行腹腔注射生理盐水和空白微球,治疗组注射 EPI(9mg/kg)和等摩尔浓度的载 EPI 微球。给药 2 周后,取肿瘤组织称瘤重;作常规组织切片,HE 染色;光镜下根据肿瘤坏死灶面积的大小、细胞生长状态、局部淋巴细胞浸

润等指标评价载药微球、药膜的体内抑瘤效果。

1.3 统计学处理

实验数据以均数 \pm 标准差表示,采用单因素方差分析,SNK-q 检验进行两两比较, $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果

2.1 载药微球与药膜的形态学考察及粒径测定

扫描与透射电镜显示,聚乳酸载表阿霉素微球为本体结构,紧密排列,分散良好,球形规则,微球之间有少许粘连(见图 1(a)~(c))。共聚焦显微镜显示,表阿霉素均匀分散于微球中,为基体式结构(图 1(d))。载药微球与胶原复合后的药膜电镜剖面显示,胶原膜成层状结构,微球紧密排列在胶原膜的各层之间,并且被胶原纤维紧紧交织缠绕,形成致密的网络结构(见图 1(e))。动态光散射粒径分析仪测得载药微球的平均粒径为 $5.81\mu\text{m}$ (见图 2)。

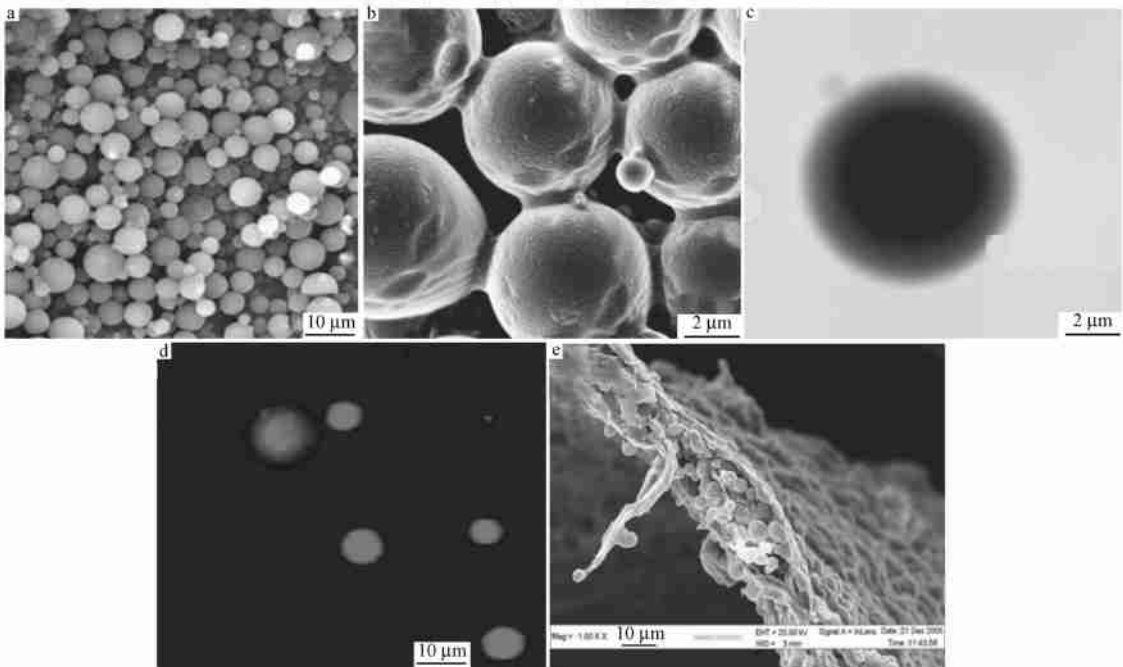


图 1 聚乳酸载表阿霉素微球与胶原药膜的形态。(a)和(b)扫描电镜照片;(c)透射电镜照片;(d)激光共聚焦照片;(e)胶原药膜剖面的扫描电镜照片

Fig. 1 Morphology of epirubicin-loaded polylactic acid microspheres. (a) and (b) under scanning electron microscope; (c) under transmission electron microscope; (d) under laser confocus microscopy; (e) morphology of implantable collagen film impregnated with epirubicin-loaded polylactic acid microspheres observed by scanning electron microscope

2.2 载药微球的载药率和包封率的测定

表阿霉素在 232nm 处有最大吸收峰,对照标准曲线(其回归方程为 $y = 0.04776x + 0.02418$, $r^2 = 0.99880$)得到表阿霉素的浓度,计算微球的载药率

和包封率。优化参数后,载药微球以 PLA150mg、表阿霉素 20mg/mL 的参数来制备,测得载 EPI 微球的药物包裹率为 4.39%,载药量 37.2%。

2.3 载药微球的体外释放

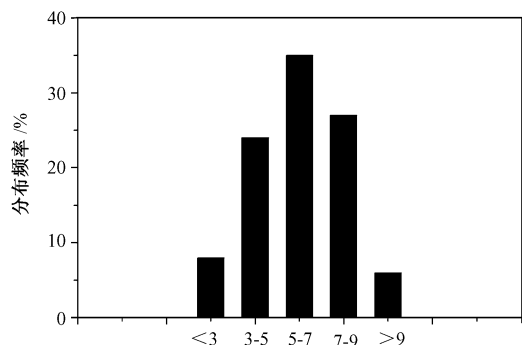


图2 聚乳酸载表阿霉素微球的粒径与粒径分布

Fig. 2 Size distribution of epirubicin-loaded polyactic acid microspheres

从图3中可以看出,载药微球在6h内具有突释行为,释放了21.9%,24h后释放趋于平缓,缓释效果良好。聚乳酸载表阿霉素微球72h释放了34.9%,具有明显的缓释特性。

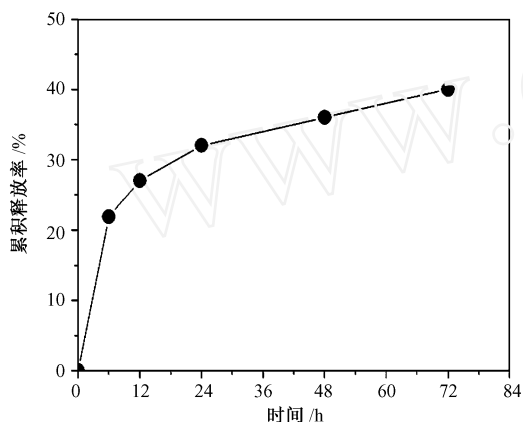


图3 聚乳酸载表阿霉素微球的体外释放曲线

Fig. 3 In vitro release profile of epirubicin-loaded polyactic acid microspheres

2.4 载药微球与药膜的体内抑瘤效果

给药后2周,空白微球与对照组的瘤重分别为 $8.23\text{g} \pm 1.02\text{g}$ 和 $8.25\text{g} \pm 1.12\text{g}$;表阿霉素组、载药微球组、载微球药膜组的瘤重分别 4.30 ± 1.06 、 3.25 ± 0.98 、 3.20 ± 0.88 ,抑瘤率分别为65.5%、70.6%、75.5%;与空白微球与对照组相比,表阿霉素组、载药微球组和载微球药膜均显示有明显的肿瘤抑制效果($P < 0.05$);SNK-q检验表明,表阿霉素组、载药微球组与载微球药膜的各组之间的抑瘤率也有显著性差异($P < 0.05$)见表1。

2.5 病理学检查

病理检查可见对照组瘤细胞结构清楚,多边形,呈片状密集分布,细胞增殖分裂旺盛(见图4(a));表阿霉素注射组可见肿瘤细胞小灶性破坏(见图4

(b));腹腔注射的表阿霉素微球组及瘤内植入的载表阿霉素药膜组均可见瘤细胞呈明显凝固性坏死,并融合成片状,病理结果显示表阿霉素微球及药膜组对肿瘤组织有较强的体内抑制效果(见图4(c)和图4(d))。

表1 载表阿霉素微球与药膜的体内肿瘤抑制效果

Tab. 1 The inhibiting rate of tumor after administrating epirubicin-loaded polyactic acid microspheres or implantable collagen film impregnated with epirubicin-loaded polyactic acid microspheres

组别	样本数	瘤重/g	抑瘤率/%
空白对照组	8	8.23 ± 1.02	—
空白微球组	8	8.25 ± 1.12	—
表阿霉素组	8	$5.30 \pm 1.06^*$	65.5
载表阿霉素微球	8	$3.25 \pm 0.98^*$	70.6
载药微球药膜组	8	$3.20 \pm 0.88^*$	75.5

注: *与空白微球组比较, $P < 0.05$; 与表阿霉素微球、载药微球药膜组比较, $P < 0.05$

3 讨论和结论

控缓释制剂将传统药物包埋于某种基质或载体中,利用基质的吸附、增粘、支架连接或膜屏障等作用提高药物稳定性,延缓药物释放速度,使药物吸收减慢、作用时间延长、毒性降低。这种新型制剂克服了传统药物尤其是抗肿瘤药半衰期短、难于长时间维持有效药物浓度以及缺乏靶向性、全身毒副作用大、患者耐受性差等缺点,是目前抗肿瘤药物研究的发展趋势之一^[2, 7-8]。

PLA是一类可生物降解的多聚体药物载体,具有良好的生物相容性,无免疫原性,降解和吸收速度较快能在体内逐渐降解为 CO_2 和水,有利于药物均匀分布在基质中,因此非常适合于药物释放系统,主要作药物控缓释的载体和软组织修复材料,已成为近年来控缓释剂研制的常用载体^[3]。复乳法是在药物释放系统中应用很广的一种包囊技术,尤其适用于水溶性的化学类药物^[9-12]。本研究以表阿霉素盐酸盐原料药为模型药物,根据芯材和囊材的物理化学性质,用复乳法制备载表阿霉素聚乳酸微球的最佳条件,优化参数后载药微球以PLA150mg、表阿霉素20mg/mL的参数来制备,测得载EPI微球的药物包裹率为4.39%,载药量37.2%。

载表阿霉素聚乳酸微球72h释放了34.9%,具有明显的缓释效果。但同时可以看到载药微球具有明显的突释行为,6h释放了21.9%,24h后释放趋

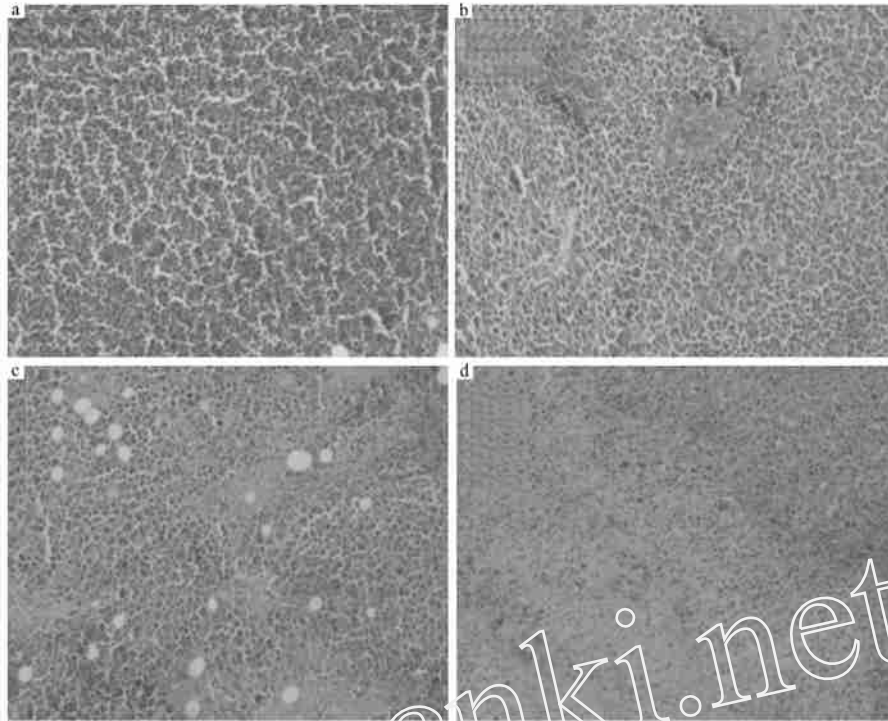


图4 病理学观察经聚乳酸载表阿霉素微球与胶原药膜处理后的肿瘤形态学变化。(a)对照组;(b)表阿霉素组;(c)表阿霉素微球组;(d)载药微球药膜组($\times 200$)

Fig.4 The pathologic microscopic examination of tumor after administratingsaline 0.9% saline (a), epirubicin (b), epirubicin-loaded poly(lactide) microspheres (c) or implantable collagen film impregnated with epirubicin-loaded poly(lactide) microspheres (d) (magnification $\times 200$)

于平缓,缓释效果良好。载药微球先突释后缓释主要是因为以下原因:第一,载药微球表面吸附的表阿霉素在 PBS 液中首先释放出来,造成药物的突释。第二,当表面吸附的表阿霉素释放完后,微球内部的表阿霉素通过微球表面的微小孔洞向外扩散,并且随着时间的延长,聚乳酸表面出现溶蚀现象以及进一步的降解致使内部药物缓慢释放到介质中。经甲醛交联的胶原 PLA 载药微球剖面显示胶原膜成层状结构,微球紧密排列在胶原膜的层与层之间,并且被胶原纤维紧紧交织缠绕,形成致密的网络结构,对载药药膜局部植入后的药物稳定释放有重要作用。

本研究采用 H22 肝癌荷瘤动物模型,采用腹腔内注射或瘤内局部植入载表阿霉素微球药膜,考察该新型制剂治疗肝癌的疗效。结果显示,用本实验方法制备的聚乳酸空白微球局部无明显的刺激反应,显示出良好的生物相容性,对实体瘤的生长没有抑制作用,证实聚乳酸本身不具备抗肿瘤效应;载药微球及药膜组均显示出较好的抗肿瘤效应。本研究认为造成二者差别的原因是由于载药微球及药膜的缓释特性,使药物的作用时间较长,发挥了较好的局部抑瘤作用。本研究表明,植入型载表阿霉素聚微

球的胶原药膜具有良好的药物局部缓释特性,将为抗肿瘤药物的局部给药提供又一有效手段,可望在肿瘤的术后治疗方面具有良好的临床应用前景。

参考文献

- [1] 周剑寅,王效民,张其清. 化疗药缓释制剂局部治疗肝癌的研究进展[J]. 国外医学外科学分册, 2005, 32: 270 - 274.
- [2] Allen TM, Cullis PR. Drug delivery systems: entering the mainstream[J]. Science, 2004, 303:1818 - 1822.
- [3] Auras R, Harte B, Selke S. An Overview of Poly(lactides) as Packaging Materials[J]. Macromol Biosci, 2004, 4: 835 - 864.
- [4] 丁时踊,刘玲蓉,李学敏,等. 以胶原为载体的蛋白药物体内释放和药代动力学的研究[J]. 中国生物医学工程学报, 2005, 24(6): 775 - 779
- [5] Yang YY, Chung TS, Ng NP. Morphology, drug distribution, and *in vitro* release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method[J]. Biomaterials, 2001, 22(3): 231 - 241
- [6] Meng Fantao, Ma Guanghui, Qiu Wei, *et al.* W/O/W double emulsion technique using ethyl acetate as organic solvent: effects of its diffusion rate on the characteristics of microparticles [J]. J Control Release, 2003, 91: 407 - 416.

(下转第 596 页)

- [5] 王波, 胡平. 从“纳米蜘蛛”说起——电纺丝的全球产业化[J]. 新材料产业, 2007, (6): 58 - 62.
- [6] 赵敏丽, 杨小平, 邓旭亮, 等. 电纺丝 PLLA/HA 复合纤维支架的制备及体外降解性能研究[J]. 中国生物医学工程学报, 2006, 25(4): 476 - 480.
- [7] Deitzel JM, Kleinmeyer JD, Hirvonen JK, *et al.* Controlled deposition of electrospun poly(ethylene oxide) fibers [J]. *Polymer*, 2000, 42: 8163 - 8170.
- [8] Zussman E, Burman M, Yarin AL, *et al.* Tensile Deformation of electrospun nylon-6,6 nanofibers [J]. *Journal of Polymer Science: B: Polymer Physics*, 2006, 44: 1482 - 1489.
- [9] 赵衡柱, 杨青芳, 艾莉. 聚-羟基丁酸酯(PHB)在医学领域中的应用研究[J]. 材料导报, 2004, 18(5): 55 - 58.
- [10] Yoshihiro I, Hirokazu H, Masanobu K, *et al.* A composite of hydroxyapatite with electrospun biodegradable nanofibers as a tissue engineering material [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005, 100(1): 43 - 49.
- [11] Huang Zhengming, Ramakrishna S, Kotaki M. *et al.* A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites [J]. *Composites Science and Technology*, 2003, 63: 2223 - 2253.
- [12] Greiner A and Wendorff JH. Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2007, 46: 5670 - 5703.
- [13] Schmack G, Kramer S, Dorschner H, *et al.* Effect of electron irradiation on the properties of poly(3-hydroxybutyric acid) fibers and their in vitro degradation [J]. *Polymer Degradation and Stability*, 2004, 83: 467 - 472.
- [14] Majid MIA, Ismail J, Few LL, *et al.* The degradation kinetics of poly(3-hydroxybutyrate) under non-aqueous and aqueous conditions [J]. *European Polymer Journal*, 2002, 38: 837 - 839.
- [15] Zhao Dongmei, Wang Yuxin, Yu Dingsheng, *et al.* Composition-graded films of fluorapatite/PHB fabricated via electrospinning for tissue engineering [J]. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 2007, 22(4): 379 - 393.

(上接第 590 页)

- [7] Kraus S, Miller BH, Swinehart JM, *et al.* Intratumoral chemotherapy with fluorouracil/epinephrine injectable gel: a nonsurgical treatment of cutaneous squamous cell carcinoma [J]. *J Am Acad Dermatol*, 1998, 38: 438 - 442.
- [8] Markman M. Intraperitoneal chemotherapy in the management of malignant diseases [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2001, 1: 142 - 148.
- [9] Hastie K, Ramesar K, Cuschieri A. Local and systemic effects of repeated intraperitoneal epirubicin treatment [J]. *Eur J Surg Oncol*, 1991, 17: 379 - 383.
- [10] Yang YY, Chia HH, Chung TS. Effect of preparation temperature on the characteristics and release profiles of PLGA microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method [J]. *J Control Release*, 2000, 69: 81 - 96.
- [11] Liu Rong, Ma Guanghui, Meng Fantao. *et al.* Preparation of uniform-sized PLA microcapsules by combining Shirasu Porous Glass membrane emulsification technique and multiple emulsion-solvent evaporation method [J]. *J Control Release*, 2005, 103: 31 - 43.
- [12] Ruan Gang, Feng Sishen, Li Qiutian. Effects of material hydrophobicity on physical properties of polymeric microspheres formed by double emulsion process [J]. *J Control Release*, 2002, 84: 151 - 160.