

学校编码：10384
学号：24520091153025

分类号 _____ 密级 _____
UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

载 10-羟基喜树碱超声微泡的制备及其联合
超声抑瘤作用的研究

Preparation of HCPT-loaded ultrasonic microbubbles and
their enhanced antitumor effect combing with ultrasound

指导教师姓名： 张其清 教授
侯振清 副教授

专 业 名 称： 药理学

论文提交日期： 2012 年 月

论文答辩日期： 2012 年 月

学位授予时间 年 月

答辩委员会主席： _____

评 阅 人： _____

2012 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈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()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()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

原发性肝癌是威胁人类健康的重要疾病之一，目前关于肝癌的治疗手段以手术切除和化疗为主，然而手术切除治愈率低且易复发；传统的化疗药物无靶向性，毒副作用较大。因此，寻找更安全有效、靶向性高、毒副作用小的治疗方法非常必要。近年来，载药超声微泡因其本身特性备受人们关注，在超声联合载药微泡治疗肿瘤方面的研究已经取得了一些研究成果。

本文结合本实验室以往的研究成果，本文以聚乳酸为载体，以 10-羟基喜树碱（HCPT）为模型药物，采用正交试验设计，采用 SPG 膜乳化法制备出一定粒径、高载药量和包封率的缓释微泡，并通过 MTT 细胞毒性实验和小鼠肝癌模型的体内抑瘤实验考察所得微泡本身以及采用联合超声协同作用的抑瘤效果。

本文的具体研究工作如下：

1. 载 10-羟基喜树碱超声微泡的制备：固定其他条件，单因素考察 SPG 膜孔径、跨膜压力、乳化剂浓度、分散相与连续相的体积比对载药微泡形态及载药量和包封率的影响，分别筛选出三水平，选用 $L_9(3^4)$ 表，以载药量和包封率为双重指标，进行正交试验；最终确定膜乳化法制备载 10-羟基喜树碱微泡的最佳条件为：SPG 膜孔径为 $1.1\ \mu\text{m}$ ，跨膜压力为 100 KPa，连续相乳化剂 PVA 的浓度为 1%，分散相与连续相的体积比为 1:10。

2. 载 10-羟基喜树碱超声微泡的表征：对所得微泡的形态、粒径、载药量、包封率、微泡稳定性、HCPT 在微泡中的存在形式以及体外释药行为等进行了一系列的考察和表征。结果显示：所得微泡呈规则的球形，表面光滑圆整，粒径较均一，平均粒径为 $4\ \mu\text{m}$ ，分散性良好；载药量和包封率分别为 1.62% 和 71.2%，且制备工艺的重复性较好；低温保存下载药微泡的粒径和包封率稳定性良好， $^{60}\text{Co-}\gamma$ 射线灭菌基本不影响微泡的形态和包封率。HCPT 在载药超声微泡中以无定形态存在，与游离药物相比，微泡制剂更有利于药物释放，在超声作用下微泡破裂可加速药物溶出。

3. 载 10-羟基喜树碱超声微泡联合超声的抑瘤效果研究：分别以 Bel-7402 肝癌细胞和荷 H22 肝癌实体瘤的小鼠为模型，进行体外细胞增殖抑制率和体内

肿瘤抑制率的研究，研究结果表明：在体外，载 10-羟基喜树碱聚乳酸微泡造影剂能够有效抑制细胞增殖，同等剂量下，协同超声辐照对细胞的增殖抑制更为显著；在体内载药微泡也能有效抑制实体瘤的生长，且抑制效果具有明显的剂量依赖性，同剂量时，超声空化效应能大大提高载药微泡的疗效。而且微泡制剂降低了 HCPT 的毒副作用。

关键词：10-羟基喜树碱；超声微泡；正交试验；超声空化效应

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a grave threat to human health. At present, surgical resection and chemotherapy are the main treatment methods for it. However, both of them are imperfect alternatives because of the low excision rate and high recurrence rate of surgical resection, and lack of targeting and high cytotoxicity to body of traditional chemotherapy drugs. So it is essential to explore a kind of safe, high-targeting and low toxicity treatment. Recently, ultrasonic microbubbles are attracting a great deal of attention due to its own features, and some results have been achieved about the effects for cancer treatment combining with ultrasound.

Based on the achievements of previous work, this thesis optimizes the preparation condition of membrane emulsification method by orthogonal design, with HCPT being drug model and Polylactide (PLA) being shell material. We get spherical drug-loaded microbubbles with suitable particle size, high-drug loading content and entrapment efficiency, then the effects of drug-loaded microbubbles combining with ultrasound treatment method to inhibit tumor are evaluated in vitro and in vivo, by MTT essay and animal experiments, respectively.

The contents are summarized as follows:

1. Preparation of HCPT-loaded ultrasonic microbubbles

Three levels were selected from the influencing factors of microbubble shape, drug loading (DL) and entrapment efficiency (EE) based on the single-factor test, which are SPG membrane pore size, transmembrane pressure, the concentration of emulsifier, the volume ratio of dispersed phase and continuous phase. Then we arranged the orthogonal experiment as $L_9(3^4)$ table to establish the best preparation condition with DL and EE as two factors. The optimum condition of preparing HCTP-loaded microbubble by the membrane emulsification is as follows: SPG membrane with 1.1 μm pore size was chosen, transmembrane pressure was 100 KPa, the concentration of PVA in continuous phase was 1%, and the ratio of dispersed phase and continuous phase was 1:10.

2. Characterization of HCPT-loaded ultrasonic microbubble

The obtained HCPT-loaded microbubbles by the optimized recipes and preparation technique was examined and characterized in many ways, including shape, particle size, drug loading, entrapment efficiency and morphology of HCPT in microbubbles. Results showed that they are regular sphere with smooth surface, specific diameters about 4 μ m, and outstanding monodisperse. The drug content and encapsulation efficiency can reach 1.62% and 65.5% respectively, and the results showed satisfactory reproducibility. XRD patterns displayed that HCPT was amorphous state in drug-loaded ultrasound microbubbles. In addition we studied its release profile in vitro, which indicated that compared with free drugs, the microbubble preparations displayed favourable release behavior, and it could be better when ultrasound irradiation was added.

3. The antitumor effect of HCPT-loaded microbubble combined with ultrasound

The inhibition rate of cell proliferation in vitro and tumor growth inhibition effect in vivo were investigated by MTT assay with Bel-7402 hepatoma cell as object and animal experiment in which H₂₂ solid tumor mice was introduced as the model. The results suggested that both in vitro and in vivo, HCPT-loaded microbubbles had dose-dependent inhibitory effects, and at the same dosage the inhibition effect of HCPT-loaded microbubbles was higher when combining with ultrasound (P<0.01). Furthermore this kind of treatment can decrease side effects of HCPT.

Key words: 10-hydroxycamptothecin; Ultrasonic Microbubble; Orthogonal Design; Cavitation.

目 录

摘 要	I
英文摘要.....	III
第一章 绪 论.....	1
1.1 10-羟基喜树碱简介	1
1.2 超声造影剂简介	3
1.3 载体材料.....	7
1.4 微泡制备方法.....	9
1.5 本课题的提出和研究内容	13
参考文献.....	16
第二章 载 10-羟基喜树碱超声微泡的制备和表征.....	21
2.1 前言.....	21
2.2 仪器与材料.....	22
2.3 实验方法.....	23
2.4 实验结果与讨论	28
2.5 本章小结.....	40
参考文献.....	42
第三章 载 10-羟基喜树碱超声微泡联合超声的抑瘤效果研究.....	44
3.1 仪器和材料.....	44
3.2 实验方法.....	46
3.3 结果与讨论.....	51
3.4 本章小结.....	58
参考文献.....	60
全文总结与展望	62
硕士期间科研成果及所获奖励.....	64

致谢.....65

厦门大学博硕士论文摘要库

Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Introduction	1
1.1 An introduction to 10-hydroxycamptothecine	1
1.2 An introduction to Ultrasound contrast agent	3
1.3 Carrier materials.....	7
1.4 Preparation methods of microbubbles	9
1.5 Main Focus of This Thesis.....	13
References	16
Chapter 2 Preparation and properties of HCPT-loaded ultrasonic microbubbles	21
2.1 Preface.....	21
2.2 Apparatus and materials	22
2.3 Experiments	23
2.4 Results and discussions	28
2.5 Summary of this chapter	39
References	42
Chapter 3 The study about antitumor effects of HCPT-loaded ultrasonic microbubbles combing with ultrasound	44
3.1 Apparatus and materials	44
3.2 Experiments	46
3.3 Results and discussions	51
3.4 Summary of this chapter	58
References	60

Conclusions and future works.....62

Publications and Rewards.....64

Acknowledgements.....65

厦门大学博硕士学位论文摘要库

第一章 绪论

1.1 10-羟基喜树碱简介

10-羟基喜树碱 (10-hydroxy-camptothecin HCPT) 是从我国特有植物喜树 (*camptotheca acuminata*) 的皮和果实中分离得到的 20 多个单体中抗肿瘤作用最强的生物碱^[1], 是制备其他喜树碱类衍生物药品的重要中间体, 目前该生物碱是唯一用于临床的 DNA 拓扑异构酶 I (TOPO- I) 抑制剂, 其抗肿瘤活性强, 抗癌谱广, 毒性较低^[2], 与其他常用抗肿瘤药无交叉耐药性^[3], 已广泛应用于肝癌、胃癌、头颈部癌症及白血病等多种恶性肿瘤的治疗, 是一种很有发展前途的抗癌药物, 但是其特殊的理化性质使其临床应用受到很大限制。

1.1.1 10-羟基喜树碱的物理性质

10-羟基喜树碱 (HCPT) 是一种黄色粉末或柱状结晶型粉末, 遇光易变质, 分子式为 $C_{20}H_{16}N_2O_5$, 分子量为 364.357, 熔点为 272-273℃, 是喜树碱的天然衍生物, 不溶于水, 微溶于甲醇、无水乙醇、氯仿、吡啶等有机溶剂, 易溶于稀碱溶液中, 溶液具有蓝色荧光。

1.1.2 10-羟基喜树碱的化学结构和药理作用机制

HCPT 的化学结构如图 1.1, 该分子为五环结构, 分子结构高度不饱和, 五环之间有共轭系统, 其中 A 和 B 为喹啉环, C 为吡咯酮环, E 是一个具有手性碳的六元 α -羟基内酯环结构。喜树碱类似物的构效关系研究表明, E 环上的 α -羟基内酯环是该类化合物抗肿瘤活性的必需基团^[4,5], HCPT 与 Topo I 间的相互作用^[6]和体内抗癌疗效^[7]在结构上要求保持 α -羟基内酯环的完整性, 内酯环打开则活性大大降低甚至消失^[8]。而内酯环的开闭状态依赖于环境的酸碱性, 在酸性条件下, 内酯环大部分以闭合形式存在, 呈现出较高的活性; 而在生理条件或 PH 较高时, 内酯环会迅速水解, 平衡后 80% 以上的药物以羧酸盐形式存在, 活性极低^[9]。在 37℃ 且 pH7.4 的人血浆中, HCPT 半衰期仅为 11 min, 平衡时内酯结构仅占 0.2%, 人血浆蛋白倾向于结合开环的 HCPT, 其结合力是内酯形式的 150

倍^[10]。

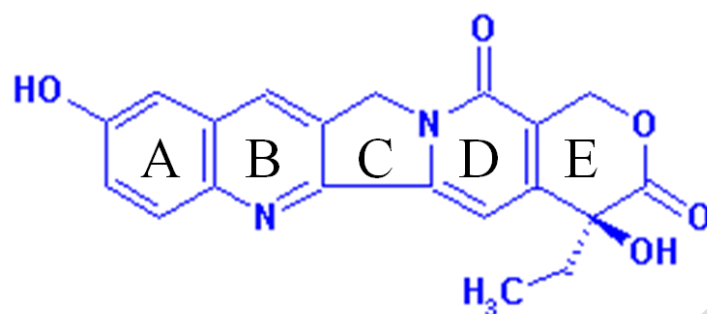


图 1.1 HCPT 的分子结构图

Fig. 1.1 Configuration of 10-hydroxycamptothecin

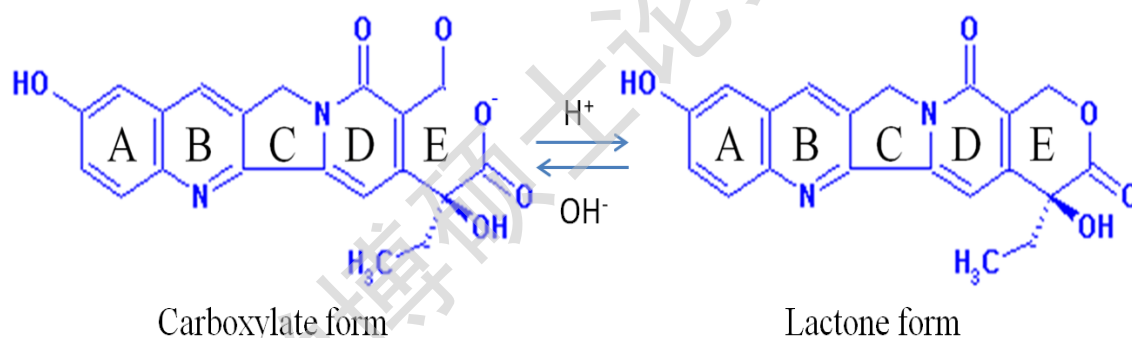


图 1.2 酸碱条件下 HCPT 内酯环形式(右)与羧酸盐形式(左)的平衡

Fig. 1.2 The balance between HCPT lactone form(right) and carboxylic acid salt form (left) under different pH conditions

HCPT 是 DNA 拓扑异构酶 I 抑制剂^[11,12]。TOPO I 是生物体内广泛存在的一类必需酶，影响 DNA 拓扑结构^[13]，在 DNA 复制、转录和重组中均起着重要作用，由于癌细胞中 TOPO I 含量比正常细胞高得多，所以更易遭受 TOPO I 抑制剂的作用，从而达到杀死癌细胞的目的。实验研究表明，HCPT 属于细胞周期特异性的药物，主要作用于 DNA 合成期 (S 期)，对 G₁、G₂ 与 M 期细胞有轻微杀伤力，而对 G₀ 期细胞没有作用。在影响疗效的诸多因素中，时间占主要地位，然而 HCPT 在体内代谢很快，成为临床应用的一大障碍^[14,15,16]。

1.1.3 10-羟基喜树碱的临床应用

HCPT 是一种很有发展前景的抗肿瘤药物,目前 HCPT 用于临床的制剂主要有钠盐注射液、粉针剂及胶囊剂,一般用量为 4-8 mg/d。钠盐注射液中 HCPT 分子通过与 NaOH 作用形成钠盐,溶解性大大增加,但分子结构中具有酚羟基,露置于空气中,遇光、热极不稳定,易氧化和水解,含量下降,同时由于其内酯环被打开,疗效降低,半衰期减短,而且静脉注射也可能带来感染、形成血栓及药物外渗引起组织坏死的危险;钠盐粉针剂解决了注射液的储存稳定性,但仍存在开环疗效降低且半衰期短的问题;胶囊剂适合于胃肠道肿瘤的治疗,不过在加大给药剂量时会增加毒副作用。

针对这些缺陷,很多学者纷纷通过结构修饰或者改变剂型研制了 10-羟基喜树碱的前体药物、微球^[17]、乳剂、脂质体^[18]、纳米粒等形式,这些给药系统能不同程度地稳定 HCPT 的内酯环活性部位,改变药物在体内的分布,提高药物在肿瘤部位的浓度,降低毒副作用,提高疗效。本文是以聚乳酸 (PDLLA) 为载体,制备载 10-羟基喜树碱的微泡,改变了载药方式,制备出活性较高的 10-羟基喜树碱微泡缓释剂。

1.2 超声造影剂简介

1.2.1 超声微泡

超声造影剂 (Ultrasound contrast agent, UCA) 是在超声成像中用来增强图像对比度的物质,主要作为诊断试剂应用于临床微小血管灌注检测与成像。常规超声造影对于一些疾病引起的组织结构变化具有较好的诊断和定位效应,但是有一些病变组织与正常组织具有相似的回声特性,这样就容易发生误诊或漏诊,另外,常规的超声造影对软组织损伤的诊断精确度不高,使其临床应用具有较大的局限性。而超声造影剂的出现则弥补常规超声诊断的缺陷和不足,它能够区别正常组织与病变组织血流灌注的细微差别,显著增加两者之间的影像对比度,使超声诊断的应用范围大大扩宽,超声成像诊断技术得到快速发展。

理想的超声造影剂应能随血流分布到全身各处,反映各器官的血流灌注情况,而又不干扰血流动力学,一般具有如下特点:① 无毒副作用和免疫原性;② 能经外周静脉注射,本身含有或进入人体后能够产生可增强回声信号的气泡,

且对循环系统不产生影响；③ 大小适宜，分散性好，能通过肺循环和毛细血管；④ 半衰期不可太短，诊断期间保持足够的稳定性；⑤ 不会影响全身血流状态。

目前认为最有效的超声造影剂是微气泡，它可以通过改变组织器官对超声的散射、衰减以及超声波在组织中的传播速度及非线性效应来增强图像信号，显著提高诊断的敏感性和特异性。微气泡一般由外部的成膜材料和内部气泡组成，前者用来阻止微泡内部气体向外扩散和防止微泡间的融合，提高稳定性；内部气泡一般为低溶解度和低弥散性的高分子量惰性气体。

1.2.2 微泡超声造影剂的分类

根据微泡内气体的种类可分为含氧气、二氧化碳、空气和大分子惰性气体的微泡超声造影剂；

根据微泡的包膜材料大致可分为蛋白质类、脂类和高分子类为材料的微泡超声造影剂。

(1) 以白蛋白为成膜材料的微泡超声造影剂 上世纪 80 年代 Feinstein 等通过超声声振的方法制备了以人血白蛋白为成膜材料的包膜超声造影剂^[19]，这种造影剂具有包膜强度高、微泡稳定、无毒等优点，但是价格昂贵，在人体中易产生免疫反应。

(2) 以磷脂化合物为成膜材料的微泡超声造影剂 这类造影剂能显著增强显影效果，具有主动靶向的特点，可以实现靶向超声诊断，而且微泡一般较稳定，存放时间长，粒径可在几个到数十个微米间。近年来，对此类造影剂的研究较多，但是仍然存在一些缺点，如成本高、有效增强显影时间较短等缺点，限制了其临床应用。

(3) 以高分子材料为成膜材料的微泡超声造影剂 由可生物降解的聚合物和天然高分子制备的微泡具有稳定性强、可静脉注射、显影效果好、粒径可控等优点，相比蛋白质和脂类，它还可以通过高分子材料的种类、聚合条件等参数的改变而得到声学性能可控的微泡。因此，近年来已成为微泡超声造影剂的研究热点。

1.2.3 微泡超声造影剂在治疗的应用

微泡超声造影剂作为诊断试剂的研究已取得很大成就，已广泛应用于人体许多重要器官病变的早期检查和诊断。同时，随着超声治疗技术在临床的应用，微

泡超声造影剂更以其独特的优势发挥了重要作用。

正常的用药剂量应在最低有效浓度和最小中毒量之间。要使药物具有疗效，必须使血药浓度达到最低有效浓度，一旦低于最低有效浓度，药物就不能表现出应有的疗效。在传统的给药方式下，服用的药物只有一部分到达病灶，大部分随血液到达全身各组织器官，而病灶部位的药物浓度只能维持较短的时间，为了维持必要的药物浓度，只能增加给药次数来增加剂量，但是这种用药方式会使体内血药浓度大幅波动，常超过人体的药物最高耐受剂量或低于最低有效剂量。有时超过安全范围 (margin of safety) 损伤正常组织，甚至引起新的疾病，而有时却因未达到有效治疗范围而失效，血药浓度如图 1.3 中虚线所示。(图中虚曲线表示传统药物制剂的血药浓度的变化，实曲线表示控缓释给药系统的血药浓度的变化)可以说，高效药如果没有合适的剂型也不能发挥应有的疗效，寻找安全、高效的药物剂型是药物研究的重点和难点。

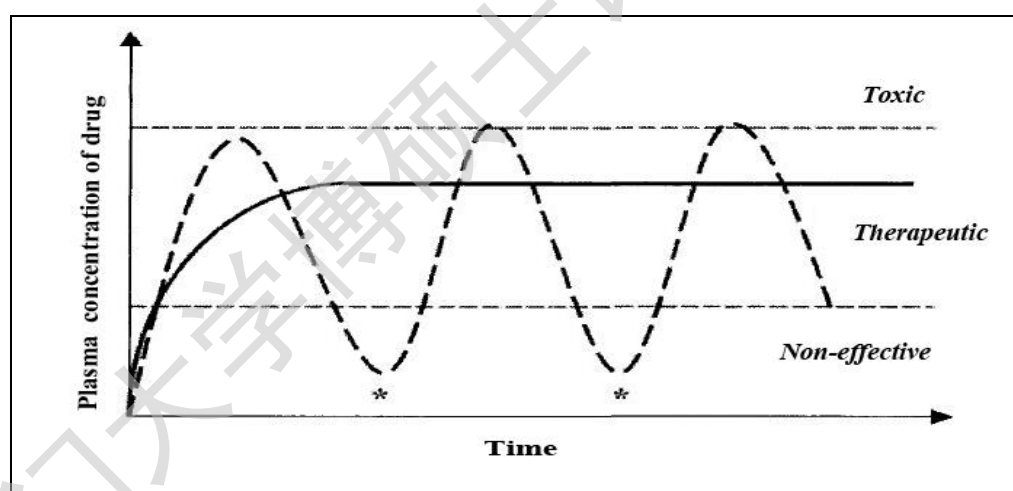


图 1.3 传统药物制剂和缓控释制剂给药系统的血药浓度变化

Fig. 1.3 Schematic diagram of drug concentration changes in blood after taking the traditional doses and sustained-release and controlled-release drug delivery systems

药物控制释放系统 (controlled release delivery system, CRDDS) 是利用可缓慢降解的材料作为载体，将药物运输至靶组织，使药物能按照预先设计的剂量缓慢释放，血药浓度始终保持在有效范围内。CRDDS 可大大提高药物的利用率^[20]，提高疗效，同时也能减少给药次数，降低对正常组织的毒副作用，减轻患者的痛

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.

厦门大学博硕士论文摘要库