

## · 实验研究 Experimental research ·

## 载药肿瘤微血管栓塞颗粒制备及其抗肿瘤作用初探

朴相浩, 李 媛, 李建男, 刘桂凤, 朱玮玮, 陈继冰, 徐克成

**【摘要】 目的** 制备加载化疗药物的纳米微粒, 研究其性质及体外释药特点, 探讨体外对人原代肝癌细胞的毒性作用, 为用于临床肿瘤微血管介入栓塞提供理论依据。**方法** 以盐酸吉西他滨-复方甘草酸苷共聚物为药物载体, 加载化疗药物多柔比星制备载药纳米微粒。扫描电镜观察微粒形态, 纳米粒度电位仪检测微粒粒径分布及电位, 高效液相色谱法计算载药率及包封率, 透析袋扩散法作体外释放动力学实验, 体外考察纳米药物稳定性及释药性能。CCK-8 法检测纳米药物在体外对人原代肝癌细胞的毒性作用。**结果** 本法制备的载药纳米微粒外观呈圆球形, 平均粒径  $(62.83 \pm 5.19)$  nm, 平均电位  $-17.9$  mV; 载药率、包封率分别为 3.16%、66.27%; 具有良好的缓释特性, 对人原代肝癌细胞生长有明显抑制作用。**结论** 本法制备的载药纳米微粒具有较好的药物缓释性及抗肿瘤效应, 是一种具有良好应用前景的抗肿瘤纳米药物。

**【关键词】** 纳米微粒; 抗肿瘤; 药物缓释; 吉西他滨; 甘草酸苷; 多柔比星

中图分类号: R587.1 文献标志码: A 文章编号: 1008-794X(2016)-08-0710-05

**Preparation of drug-loaded nanoparticles used for tumor microvascular embolization and its antitumor effect: a preliminary study in vitro** PIAO Xiang-hao, LI Yuan, LI Jian-nan, LIU Gui-feng, ZHU Wei-wei, CHEN Ji-bing, XU Ke-cheng. Department of Interventional Radiology, Affiliated Fuda Cancer Hospital, School of Medicine, Jinan University, Guangzhou, Guangdong Province 510665, China

Corresponding author: ZHU Wei-wei, E-mail: fudahospitalzww@outlook.com

**【Abstract】 Objective** To prepare a new type of drug-loaded nanoparticles, to study its properties and drug-release characteristics in vitro, to investigate its antitumor effect on human primary hepatocellular carcinoma cells, and to provide theoretical basis for clinical tumor microvascular interventional embolization therapy. **Methods** Gemcitabine hydrochloride and compound glycyrrhizin were mixed and used as the drug carrier, and chemotherapeutic drug, doxorubicin, was added for the preparation of drug-loaded nanoparticles. The surface structure and morphology of the drug-loaded nanoparticles were examined by scanning electron microscopy; the particle size distribution and the potential of the nanoparticles were analyzed by Zeta potential and nano-particle size analyzer; the drug-loaded rate and encapsulation rate were measured by high performance liquid chromatography (HPLC); the in vitro drug-release kinetics experiment was conducted with dialysis bag diffusion method; the stability and drug-release properties of nano-drug were investigated in vitro. The toxic effect of nano-drug on human primary hepatocellular carcinoma cells in vitro was determined by CCK-8 assay. **Results** The drug-loaded nanoparticles prepared by this method had a mean size of  $(62.83 \pm 5.19)$  nm with a spherical appearance, and its average potential was  $-17.9$  mV. The drug-loaded rate and encapsulation rate were 3.16% and 66.27% respectively. The drug-loaded nanoparticles possessed excellent sustained release characteristics and showed obvious inhibitory effect on human primary hepatocellular carcinoma cells.

DOI: 10.3969/j.issn.1008-794X.2016.08.014

作者单位: 510665 广州 暨南大学医学院附属复大肿瘤医院(广州市复大肿瘤医院)介入科(朴相浩)、肿瘤研究所(李 媛、刘桂凤、朱玮玮、陈继冰、徐克成); 吉林大学第二医院普外科(李建男)

通信作者: 朱玮玮 E-mail: fudahospitalzww@outlook.com

**Conclusion** The drug-loaded nanoparticles prepared by this method have excellent sustained release characteristics and antitumor effect, therefore, this nano-drug is an anti-tumor medicine with good clinical application prospects. (J Intervent Radiol, 2016, 25: 710-714)

**【Key words】** nanoparticle; anti-tumor; drug release; gemcitabine; glycyrrhizin; doxorubicin

肿瘤在发达国家已成为威胁人类健康的头号杀手,在发展中国家也已成为第二大杀手<sup>[1]</sup>。全球肿瘤负担随着发展中国家人口老龄化加速和人口增长而持续上升,肿瘤相关生活方式如吸烟、体能活动不足、饮食方式西方化等,均促使肿瘤发病率逐年提高<sup>[2]</sup>。全球癌症流行病学数据库 GLOBOCAN 资料显示,2012 年全球新增肿瘤患者达 1 410 万例,死亡患者达 820 万例;其中 57% 新增患者和 65% 死亡患者发生在发展中国家<sup>[3]</sup>。传统肿瘤治疗方法如手术切除、化疗和放疗目前仍是临床上一线抗肿瘤疗法,然而由于大多数肿瘤具有隐匿性,发病时通常已近晚期,手术切除存在较多不可行性,而传统抗肿瘤药物治疗往往缺乏特异性,对正常组织和器官产生一定的不良反应,使得患者生存质量大大降低,令患者苦不堪言<sup>[4]</sup>。因此,建立针对恶性肿瘤药物治疗的创新性方法迫在眉睫。

介入栓塞是在血管造影下通过插入靶动脉的导管注入栓塞剂或载药栓塞微球,阻断肿瘤血供,使得肿瘤缺少必要的营养供应,也可增强药物对肿瘤的杀伤力并降低药物系统毒性,已成为肿瘤介入治疗最重要的技术之一<sup>[5]</sup>。但目前临床使用的栓塞剂如明胶海绵颗粒、聚乙烯醇(PVA)微粒、Embosphere 三丙烯明胶微粒等,均不能负载化疗药物,只能起到机械栓塞肿瘤供血动脉的作用;而 HepaSphere 等栓塞微球虽能加载化疗药物,但载药后直径达 200  $\mu\text{m}$ ,只能选择性栓塞小血管,对肿瘤微血管缺乏栓塞作用<sup>[6-7]</sup>。纳米药物一般指粒径在 1~100 nm 范围的药物,与传统药物相比具有高靶向性、缓控释性好、高生物利用度、低不良反应等优点,已有大量实验研究证实其在肿瘤治疗中的良好前景<sup>[8-9]</sup>。本研究以盐酸吉西他滨-复方甘草酸苷共聚物为药物载体,加载化疗药物多柔比星制备纳米微粒药物,实验观察其理化性质表征、药物缓释性能和体外抗肿瘤效应,为后续用于临床介入栓塞肿瘤微血管提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

主要试剂和仪器包括细胞培养箱(美国 Thermo

公司),移液器、离心机(德国 Eppendorf 公司),全波长酶标仪(美国 Thermo 公司),JSM-7600F 型热场扫描电子显微镜(日本电子株式会社),Zetasizer Nano ZSP 型纳米粒度电位仪(英国 Malvern 公司),HTEA01-01 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),TC10 型全自动细胞计数仪(美国 Bio-Rad 公司),CCK-8 细胞增殖与活性检测试剂盒(美国 Sigma-Aldrich 公司),1 640 培养基、磷酸缓冲液(PBS)、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶(美国 Invitrogen 公司),盐酸吉西他滨(美国 Eli Lilly 公司,H20110535),复方甘草酸苷注射液(日本米诺发源制药株式会社,国药准字 J20130071),注射用盐酸多柔比星(深圳万乐药业有限公司,国药准字 H44024359)。

### 1.2 人原代肝癌细胞制备

选择 5 例经病理检查证实的新鲜肝癌标本,无菌条件下切取肝癌组织约 1.0  $\text{cm}^3$  大小, PBS 液洗涤 2~3 次,剪成小块,胰酶消化,经 200 目尼龙网筛过滤,用 RPMI 1 640 培养液(含 10% 胎牛血清)置培养箱中培养。常规消化、传代。

### 1.3 载药纳米微粒制备

200 mg 盐酸吉西他滨溶解于 20 ml 复方甘草酸苷注射液,用移液器反复抽吸释放制成均匀半透明胶体,从而获得化疗药物载体;10 mg 盐酸多柔比星溶于 2 ml 灭菌注射用水(40℃ 水浴 5 min),与 20 ml 复方甘草酸苷注射液一同加入化疗药物载体中,移液器反复吹打混匀,制成颜色、质地均一的载药纳米微粒混悬液。此制备方法已申请专利(申请公布号 CN 105030682 A)。

### 1.4 载药纳米微粒表征及粒径测试

取适量载药纳米微粒混悬液样品摇匀,滴入锡箔上至干燥,喷金后用扫描电镜观察形态。取适量载药纳米微粒混悬液样品分散在去离子水中,用纳米粒度电位仪测定纳米微粒电位及粒径分布状况。

### 1.5 载药率及包封率测定

取样品溶液,超速冷冻离心(4℃, 30 000 r/min, 45 min),将上清液 20  $\mu\text{l}$  注入液相色谱仪,得到游离药物浓度。依照《中国药典》(2015 年版)计算载药率和包封率:载药率=(微粒制剂中所含药物重/微粒制剂总重)×100%,包封率=(微粒制剂中包封的

药量/微粒制剂中包封与未包封的总药量)×100%。  
 色谱条件: 色谱柱为 Kromasil C18 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm, 美国 Thermo 公司); 流动相为甲醇-0.05 mol/L 醋酸铵溶液 (含 0.3% 冰醋酸); 0~5 min 为 10% A, 5~10 min 为 10%~75% A, 10~15 min 为 75% A, 15~16 min 为 75%~10% A, 16~20 min 为 10% A; 流速为 1 ml/min; 柱温为室温; 检测波长为 252 nm; 进样量为 10 μl。

### 1.6 载药纳米微粒体外释放

采用透析袋扩散法作体外释放动力学实验, 取载药纳米微粒混悬液 10 ml 置于透析袋, 投入装有 100 ml 释放介质的玻璃烧杯中, 以原料药为对照, PBS 液 (pH 7.4) 为释放介质。置于 37℃ 恒温振荡箱中 100 r/min 恒温振荡, 分别于 12、30 min, 1、2、4、8、12、24、36、48、60、72 h 取透析袋外透析液 5 ml, 测定药物含量, 计算累积药物释放率, 并补充同温释放介质 5 ml。

### 1.7 载药纳米微粒细胞毒性实验

取对数生长期人原代肝癌细胞, 胰酶消化法制备细胞悬液, 全自动细胞计数仪作活细胞计数, 完全培养基调整细胞浓度至  $5 \times 10^4$  个/ml, 接种至 96 孔细胞培养板, 每孔 100 μl 细胞悬液; 随后置于 37℃、含 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中全湿度培养 24 h。分为空白对照组和实验组, 空白对照组常规培养, 实验组分别加入一定剂量药物培养 24、48、72 h 后每孔加入 10 μl CCK-8 溶液, 置于细胞培养箱内继续培养 4 h, 用酶标仪测定 450 nm 处各孔吸光度值。

### 1.8 统计学分析

所有统计学分析均通过 SPSS 13.0 统计软件完成。每组实验均重复 3 次, 数据以均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 差异比较用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 载药纳米微粒表征

扫描电镜观察可见载药纳米微粒形态特征为球形, 形态较为均一, 呈分散状态, 粒径大小在 50~100 nm 范围内, 具有良好的稳定性和分散性 (图 1)。纳米粒度电位仪测得载药纳米微粒平均粒径为  $(62.83 \pm 5.19)$  nm, 与扫描电镜检测基本吻合; 粒径电位分布呈单峰, 峰度较陡, 范围狭窄, 平均多分散指数 (PDI) 为 0.327, 说明被检测纳米微粒悬液中颗粒分散状态良好, 未出现聚合现象 (图 2)。载药纳米微粒 Zeta 电位平均值为 -17.9 mV。

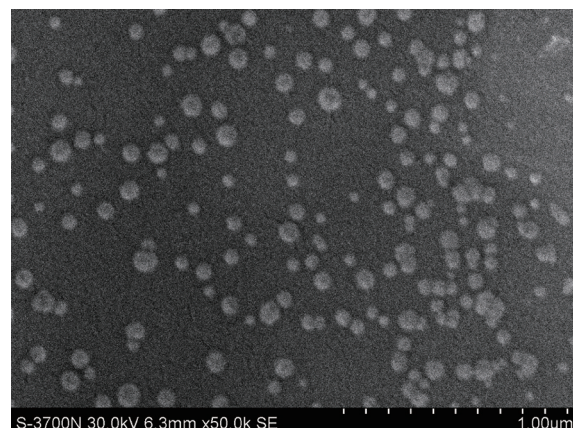


图 1 载药纳米微粒扫描电镜图 (×50 000)

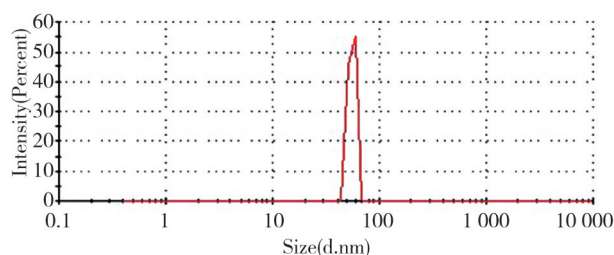


图 2 载药纳米微粒粒径分布图

### 2.2 载药纳米微粒载药率和包封率

1 高效液相色谱法标准曲线方程为  $Y = 126.60X - 235.71$ ,  $r = 0.9993$ 。测得游离药物浓度为  $80.30 \mu\text{g/ml}$ , 经计算后载药纳米微粒载药率为 3.16%, 包封率为 66.27%。

### 2.3 载药纳米微粒体外释放

载药纳米微粒体外累积释放曲线见图 3。载药纳米微粒中药物累积释放率在 24 h 时为  $(34.10 \pm 3.34)\%$ , 48 h 时达到  $(61.43 \pm 2.72)\%$ , 48 h 内药物累积释放率随时间变化逐步上升, 此后上升速率保持平缓, 72 h 时达到约  $(73.59 \pm 3.45)\%$ 。

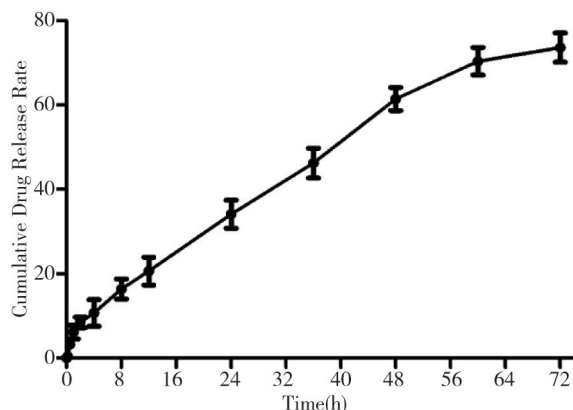


图 3 载药纳米微粒体外药物释放曲线

### 2.4 载药纳米微粒体外抑瘤作用

载药纳米微粒在不同浓度下对于人原代肝癌细胞的体外抗肿瘤活性见图 4, 24 h 时载药纳米微粒



对人原代肝癌细胞的杀伤作用与空白对照组相比不明显,而 48 h 和 72 h 时各浓度均对人原代肝癌细胞具有一定的细胞毒性。

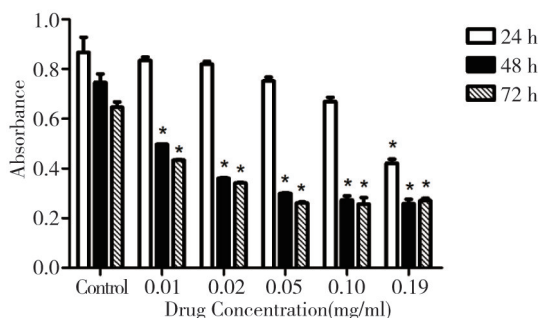


图 4 不同浓度载药纳米微粒对人原代肝癌细胞生长的影响

注: \* 与对照组比较,  $P < 0.05$

### 3 讨论

肿瘤血管与正常血管不同,具有以下特征:肿瘤血管不成熟,管壁发育不完全,内皮细胞形态不规则;内皮细胞层不连续,血管平滑肌细胞覆盖较少,外周细胞和内皮细胞联系差;基质膜不规则,结构异常;形成不均匀、连接松散的管腔层<sup>[10]</sup>。这些特征使得血管对大分子的渗透性及组织液压力升高,导致动脉内灌注的水溶性化疗药物容易漏出血管到组织中去,而常规动脉栓塞剂因粒径较大,难以进入微血管网。纳米药物的出现在一定程度上克服了这一弊端,有望达到更好的治疗效果。

纳米技术是 20 世纪 80~90 年代发展起来的新兴前沿学科,是 21 世纪尖端科学和重点学科之一。纳米技术发展给医学领域,特别是癌症和心血管疾病治疗等方面带来了一场深刻变革<sup>[11]</sup>。由于肿瘤组织较正常组织通透性增强及存在滞留效应,纳米药物针对肿瘤组织的靶向效应更加明显,并在很大程度上克服或弥补了放疗、化疗等传统肿瘤治疗手段的弱点,从而成为临床肿瘤治疗的候选药物<sup>[11-13]</sup>。首先,肿瘤组织具有特殊的高通透性和滞留性,只有纳米尺寸药物才能通过肿瘤血管内皮系统缝隙,进入并积聚在肿瘤组织;其次,纳米药物通过功能化修饰可实现在体内的智能化输送,具有靶向定位及药物释控功能,同时减少药物不良反应;第三,借助载体特有的结构和性质,可装载难溶性药物,解决此类抗肿瘤药物递送难题<sup>[14]</sup>。理想的纳米药物应具有较高的药物负载率、较长的体内循环时间和较好的生物安全性<sup>[15]</sup>。

多柔比星是一种抗有丝分裂和细胞毒性的细胞周期非特异性抗肿瘤药物,能成功缓解多种恶性肿

瘤,如急性白血病、淋巴瘤、软组织骨肉瘤、儿童恶性肿瘤及成人实体瘤,尤其是肝癌、肺癌和乳腺癌<sup>[16]</sup>。本研究以盐酸吉西他滨-复方甘草酸苷共聚物为药物载体,加载多柔比星制备载药纳米微粒,用扫描电镜观察载药纳米微粒形态特征,可见载药纳米微粒形态较为均一,呈圆球形,粒径大小在 50~100 nm 范围内;电位及粒度分析仪检测载药纳米微粒显示其电位平均值为 -17.9 mV,平均粒径为  $(62.83 \pm 5.19)$  nm,与扫描电镜检测基本吻合,粒径分布呈单峰,峰度较陡,范围狭窄,聚合指数小,说明被检测的纳米微粒悬液具有良好的稳定性和分散性;高效液相色谱法测得载药纳米微粒载药率和包封率分别为 3.16% 和 66.27%;透析袋扩散法体外释放动力学实验测得 24 h 内累计药物释放率为  $(34.10 \pm 3.34)\%$ ,72 h 内能持续缓慢释放药物且释放浓度比较稳定,72 h 时载药纳米微粒中药物累积释放达到  $(73.59 \pm 3.45)\%$ 。由此可见,本研究制备的载药纳米微粒具有较稳定的缓释作用。CCK-8 法评价该纳米药物在体外对人原代肝癌细胞的抗肿瘤活性,结果发现其对人原代肝癌细胞有明显的杀伤作用,且呈浓度和时间依赖性,即该载药纳米微粒对肿瘤细胞具有一定的细胞毒性。

本研究制备的载药纳米颗粒大小约为红细胞的 1/80,远小于毛细血管直径,故理论上不会引起正常毛细血管阻塞,即不会使正常组织遭受损伤。利用肿瘤毛细血管结构的特殊性,发挥纳米药物微粒选择性肿瘤毛细血管阻滞作用,可避免栓塞剂应用,减少不良反应,利于广泛应用于各种脏器肿瘤的介入治疗。

综上,本方法制备的载药纳米微粒是一种具有良好稳定性和分散性、较高载药率和包封率、良好药物缓释能力,同时对人原代肝癌细胞具有一定杀伤作用的抗肿瘤药物,具有良好临床应用前景。下一步我们将通过荷瘤动物模型,进一步探讨纳米药物体内抗肿瘤效果及药代动力学等性质,并对作用机制进行深入探讨,以期临床治疗肿瘤提供新的理论依据。

### [参考文献]

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65: 5-29.
- [2] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008[J]. Int J Cancer, 2010, 127: 2893-2917.

- [3] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65: 87-108.
- [4] 郭向群, 曹建民, 曹晓宇. 抗肿瘤药物萃析及进展[J]. 医学信息(上旬刊), 2010, 23: 3057-3058.
- [5] Tam KY, Leung KC, Wang YX. Chemoembolization agents for cancer treatment[J]. Eur J Pharm Sci, 2011, 44: 1-10.
- [6] 赵 艳, 韩国宏, 白 苇, 等. 药物缓释微球肝动脉化疗栓塞治疗肝癌研究进展[J]. 介入放射学杂志, 2012, 21: 79-83.
- [7] 周官辉, 孙军辉, 张岳林, 等. HepaSphere 载药微球栓塞治疗不可切除肝癌 15 例[J]. 介入放射学杂志, 2015, 24: 869-872.
- [8] Rosenblum D, Peer D. Omics-based nanomedicine: the future of personalized oncology[J]. Cancer Lett, 2014, 352: 126-136.
- [9] 欧阳雪晖, 欧阳塘, 张学军. 纳米材料/技术在介入治疗中的应用现状和前景[J]. 介入放射学杂志, 2013, 22: 265-270.
- [10] 任 莹, 孙启明, 林莉萍, 等. 肿瘤血管靶向药物的研究进展[J]. 生命科学, 2007, 19: 427-432.
- [11] 于 斌, 连海燕, 王 野, 等. 纳米材料应用于肿瘤治疗的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2015, 37: 594-598.
- [12] Wei T, Chen C, Liu J, et al. Anticancer drug nanomicelles formed by self-assembling amphiphilic dendrimer to combat cancer drug resistance[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112: 2978-2983.
- [13] 易承学, 余江南, 徐希明. 纳米药物载体在中药制剂研发中的应用[J]. 中国中药杂志, 2008, 33: 1936-1940.
- [14] 张微微, 魏 炜, 马光辉, 等. 纳米载体的理化性质对细胞学效应及抗肿瘤效果的影响[J]. 癌症进展, 2014, 12: 256-260.
- [15] Yang X, Li Z, Wang N, et al. Curcumin-encapsulated polymeric micelles suppress the development of colon cancer in vitro and in vivo[J]. Sci Rep, 2015, 5: 10322.
- [16] 杨联军, 朱立新, 包和婧, 等. 载阿霉素 PLGA 纳米微球的制备及其对人骨肉瘤 MG63 细胞的抑制作用[J]. 实用医学杂志, 2014, 30: 528-531.

(收稿日期:2015-12-02)

(本文编辑:边 伟)