

[文章编号 1000-1182(2004)03-0183-03

淋巴靶向平阳霉素—活性炭纳米微粒的研制

孙明磊¹, 温玉明², 王昌美², 李龙江², 王晓毅²

(1. 郑州大学第一附属医院 口腔颌面外科, 河南 郑州 450052;

2. 四川大学华西口腔医院 口腔颌面外科, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 制备淋巴结靶向抗癌纳米微粒——平阳霉素—活性炭纳米微粒, 用于治疗口腔癌颈淋巴结转移灶。方法 制备活性炭纳米微粒(CH-NP), 选择对口腔癌高度敏感平阳霉素(PYM)为模型药物, 考察活性炭纳米微粒对平阳霉素吸附效率。结果 活性炭纳米微粒的粒径分布为136~540 nm, 平均粒径为178 nm, 活性炭纳米微粒投入比例的增高, 对平阳霉素的吸附率相应增高, 10:1质量比下可达到99.38%的吸附。结论 活性炭纳米微粒对平阳霉素的吸附率高, 制备PYM-CH-NP行口腔癌周局部注射可使靶向淋巴结转移灶获得有效治疗效果。

[关键词] 平阳霉素; 活性炭; 纳米微粒; 口腔癌; 淋巴转移

[中图分类号] R 782 [文献标识码] A

Preparation of Lymphatic Targeting Dosage Form: Pingyangmycin Absorbed on Activated Carbon Nanoparticles SUN Ming-lei¹, WEN Yu-ming², WANG Chang-mei², LI Long-jiang², WANG Xiao-yi². (1. Dept. of Stomatology, the First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 2. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract Objective To prepare anticancer nanoparticles for targeting therapy for oral cancer lymph node metastasis. **Methods** The activated carbon nanoparticles(CH-NP) were prepared for drug carrier. Pingyangmycin(PYM), a high sensitive anti-cancer drug for oral squamous cell carcinoma, were selected as model drug. The activated carbon nanoparticles and PYM were mixed with saline and shaken 20 minutes so that PYM was absorbed on activated carbon enough, resulting in a new formulation of PYM (PYM-CH-NP). The absorbency of PYM on activated carbon nanoparticles was evaluated. **Results** The diameter distribution for CH-NP ranged from 136 nm to 540 nm, the average diameter was 176 nm. The proportion of CH-NP to PYM was increased and more absorbency of PYM on activated carbon nanoparticles was achieved. **Conclusion** The activated carbon nanoparticles has high absorbency of PYM. The new formulation PYM-CH-NP can be used as targeting therapy of cervical lymph node metastasis by peri-cancer submucosal injection.

Key words pingyangmycin; activated carbon; nanoparticle; oral cancer; lymph metastasis

转移是恶性肿瘤的基本生物学特性,也是引起术后肿瘤复发和患者死亡的主要因素之一。恶性肿瘤患者一旦出现转移,其治愈率和生存率将明显降低。口腔颌面部的淋巴管丰富,易早期发生颈淋巴结转移。化疗是恶性肿瘤综合治疗的重要组成部分,但全身化疗在淋巴结转移灶内药物浓度低,疗效差,且全身毒副作用大。根据口腔癌周毛细淋巴管的解剖生理特点和淋巴管内皮细胞主动吞噬、胞饮大分子和微粒物质的特性,为了提高淋巴靶向性和淋巴靶向治疗效果,本实验选择纳米活性炭微粒为载体,平阳霉素为模型药物,以微粒粒径和吸附率为质量评价指标,制备具有淋巴靶向性的平阳霉素—活性炭纳米微粒

(pingyangmycin carbon nanoparticles, PYM-CH-NP) 缓释制剂,以提高颈淋巴结转移灶内化疗药物的浓度和通过微粒的药物缓释而延长持续作用时间而达到提高颈淋巴结转移灶的治疗效果、降低血中药物浓度、减少全身不良反应。

1 材料和方法

1.1 实验材料和仪器

医用级活性炭(上海制炭总厂), Sartorius 1712型电子天平(贺力室公司,日本), L8-80M型超速离心机(Beckman公司,美国), AMRAY 1000B型扫描电镜(日立公司,日本), Mastersizer 2000型激光散射粒度分析仪(Malvern公司,英国), UV-1601紫外分光光度计(日本岛津公司), 注射用盐酸平阳霉素(天津太河制药有限公司), 平阳霉素标准品(中国药品生物制品检定所,含量为99.5%)。

[收稿日期 2003-09-02; 修回日期 2004-03-04

[基金项目] 卫生部科学基金资助项目(98-1-221)

[作者简介] 孙明磊(1973-), 男, 河南人, 讲师, 博士

[通讯作者] 孙明磊, Tel: 0371-6862251

1.2 活性炭纳米微粒的制备

医用级活性炭,经核动力气流粉碎至粒径在600 nm以下(由中国空气动力研究与发展中心完成)。

1.3 活性炭纳米微粒的质量考察

将制备好的活性炭纳米微粒按每瓶10 mg分装,于180 °C烤箱中活化4 h,加入2 ml生理盐水溶散,超声分散后,取适量制片,扫描电镜下观察形态。再用激光散射粒度分析仪测定平均粒径和粒径的分散度,粒径的分散度用跨距(span)表示,其计算公式: $span = (D_{90} - D_{10}) / D_{50}$,其中 D_{90} 、 D_{10} 、 D_{50} 分别表示有90%、10%、50%的微粒数小于该值的粒径,跨距越小,表示微粒大小越均匀。

1.4 活性炭纳米微粒对平阳霉素吸附效率的实验

取盐酸平阳霉素标准品1 mg,加蒸馏水25 ml溶解,用UV-1601紫外分光光度仪在200~400 nm范围内扫描,在291.5 nm处有最大吸收,选用291.5 nm作为测定波长。精密称取平阳霉素标准品5 mg,配置成200 mg/L、100 mg/L、50 mg/L、25 mg/L、12.5 mg/L、6.25 mg/L的溶液,于291.5 nm扫描,根据结果求得回归方程。将平阳霉素用蒸馏水配成0.16 g/L的原始浓度,平阳霉素和活性炭纳米微粒按照1:1至1:10的质量比例吸附,在37 °C恒温箱中经震荡器剧烈震荡20 min,使平阳霉素充分被吸附,经0.05 μm微孔滤膜过滤,滤液高速离心后取1.5 ml在200~400 nm范围内再次扫描,仍然在291.5 nm波长下获得最大吸收,表明活性炭纳米微粒吸附平阳霉素并未改变其理化性质。每组样品取滤液2 ml在291.5 nm波长下扫描,测定吸收值,代入回归方程,求得相应浓度,然后计算不同配比下的吸附率。吸附效率=(原始浓度-实验浓度)/原始浓度。本实验中原始浓度为0.16 g/L。

1.5 统计分析

采用SPSS 10.0统计软件对数据进行回归分析。

2 结果

2.1 PYM-CHNP形态观察及粒径测量

PYM-CHNP为均匀的黑色,呈细腻的粉状,表面细腻光洁。在电镜下呈微细的小球形颗粒,个别微粒有粘连,粒径分布范围为136~540 nm,平均粒径为178 nm,粒径跨距为2.27。

2.2 平阳霉素工作曲线

平阳霉素标准品各浓度下的吸收值见表1,统计分析,求得回归方程: $A = 0.0032 + 5.9207C$, $r = 0.9997$ (A为吸收值,C为药物浓度)。结果表明,平阳霉素在10~200 mg/L范围内,浓度和吸收值有良好线性关系。

表1 平阳霉素标准品各浓度下的吸收值

药物浓度 (mg/L)	200	100	50	25	12.5	6.25
OD均值	1.163 0	0.611 0	0.295 0	0.142 0	0.062 5	0.028 5

2.3 活性炭纳米微粒对平阳霉素的吸附效率

不同比例的活性炭纳米微粒对平阳霉素的吸附率结果见表2,从表2的结果可以看出:在37 °C下,随活性炭纳米微粒投入比例的增高,对平阳霉素的吸附率相应增高,活性炭和药物在6:1质量比下可达到90%以上的吸附,10:1质量比下可吸附99.38%的平阳霉素。

表2 不同比例的活性炭纳米微粒对平阳霉素的吸附率

配比(PYM:CHNP)	OD均值	实验浓度(g/L)	吸附率(%)
1:1	0.598 0	0.100 5	37.190 0
1:2	0.445 0	0.074 6	53.380 0
1:3	0.306 0	0.051 1	68.060 0
1:4	0.188 0	0.031 2	80.500 0
1:5	0.164 0	0.027 2	83.000 0
1:6	0.082 0	0.013 3	91.680 0
1:8	0.024 3	0.003 6	97.750 0
1:9	0.016 8	0.002 3	98.560 0
1:10	0.009 1	0.001 3	99.380 0

3 讨论

常用剂型的药物经静脉、口服或局部注射后,药物分布于全身,真正到达治疗靶区的药物量仅为给药量的小部分,而大部分药物在非靶区的分布不仅无治疗疗效,还会带来毒副作用。因此,新剂型药物的开发成为现代药剂学发展的一个方向,其中尤以靶向给药系统(targeted drug delivery system, TDDS)的研究为热点¹。纳米微粒在靶向给药系统中占有非常重要的地位,它是指粒径为10~1 000 nm固态微粒的总称。纳米微粒以其良好的靶向性、稳定性、生物相容性和表面易修饰性、释药持续性、制备工艺简单等优点成为以微粒(microparticles)为载体的TDDS中研究的热门课题²。同时,由于恶性肿瘤细胞膜的通透性增加使得纳米微粒更易进入肿瘤细胞而发挥作用。当然,目前的纳米微粒主要靠网状内皮细胞间存在允许纳米微粒通过的间隙和内皮细胞对微粒的吞噬作用而实现其靶向作用,尚属一类被动靶向制剂,因而微粒粒径是决定其体内分布和靶向性最重要的因素之一³。

近年来对癌周淋巴管的研究证明^{4,5}:恶性肿瘤瘤周存有丰富的毛细淋巴管,随肿瘤的发展,能诱导

癌周组织生成大量新生毛细淋巴管,该毛细淋巴管缺乏基底膜或基底膜不完整,内皮细胞间连接松散,存在许多开放性的间隙。并随癌周毛细淋巴管在密度和管腔增大的同时,在组织内压和锚丝张力的作用下,使内皮细胞间隙最大可扩大到 300 nm ~ 5 μm,另外淋巴管内皮细胞有主动吞噬和胞饮微粒的作用,大分子和微粒物质可经内皮细胞间通道进入毛细淋巴管,这为纳米微粒的淋巴靶向化疗提供了生理和解剖基础。而毛细血管有基底膜,内皮细胞连接紧密无开放间隙。已有研究证实活性炭微粒具有良好的淋巴靶向性⁶,因此通过控制粒径,制备适当粒径的活性炭微粒,提高对药物的吸附性和淋巴靶向性,可以提高对淋巴结转移灶的治疗效果。本研究中,本课题组研制平均粒径为 178 nm 的 PVM-CH-NP 经局部注射进入癌周毛细淋巴管,使其引流入颈淋巴结转移灶内以达到持续有效的药物浓度,发挥更好的抗肿瘤作用。

目前,用于纳米药物运载系统的载体有活性炭微粒、脂质体、高分子化合物如聚乳酸、乳酸-乙醇酸共聚物、聚丙烯酸酯类等⁷。其中活性炭微粒制备相对简便、价廉、易保存,吸附力高,可以吸附多种药物,不改变药物分子的作用,有良好的缓释性,具有良好的生物相容性,同时可使淋巴结黑染作示踪有利于手术清扫⁸。

平阳霉素是临床常用的抗肿瘤药物,具有较广的抗癌谱,比博莱霉素临床疗效高,尤其对头颈部肿瘤⁹。它与几种常见的抗肿瘤药物氨甲喋呤、丝裂霉素、高三尖杉酯碱等相比其药物敏感性最高,对口腔鳞癌效果显著,低剂量时对口腔鳞癌细胞有较强的杀伤作用,是口腔鳞癌的首选用药。平阳霉素骨髓抑制轻微,对造血及免疫功能基本无损害,可用于免疫功能低下的老年晚期癌症患者,副作用轻微,肺毒性低

于博莱霉素,局部应用组织刺激性较小。由于淋巴靶向制剂行口腔癌周黏膜下注射的用药方式限制了每次用药剂量和要求局部组织刺激性小,所以本研究选用平阳霉素,其不仅对口腔鳞癌细胞有强的杀伤作用,而且每次用药剂量较小,局部组织刺激性小,适合于淋巴化疗的给药方式。

[参考文献]

- 1] 丁健,吴镭. 中国药科学发展战略与新药研究开发 M. 上海: 第二军医大学出版社, 1999: 172-174.
- 2] Crosasso P, Brusa P, Dosio F, et al. Antitumoral activity of liposomes and immunoliposomes containing 5-fluorouridine prodrugs. J. J Pharm Sci, 1997, 86(7): 832-839.
- 3] Moghimi SM. Prolonging the circulation time and modifying the body distribution of intravenously injected polystyrene nanospheres by prior intravenous administration of poloxamine-908. A "hepatic-blockade" event or manipulation of nanosphere surface *in vivo*. Biochim Biophys Acta, 1997, 1336(1): 1-6.
- 4] 景纯,温玉明,王大章,等. 人体口腔颊舌部淋巴管的结构特点及分布与癌转移 J. 华西口腔医学杂志, 1995, 13(2): 125-129.
- 5] 景纯,温玉明,王大章,等. 口腔颊舌鳞癌周淋巴管形态学特征与颈淋巴结转移 J. 华西口腔医学杂志, 1995, 13(2): 130-133.
- 6] Sakakura C, Takahashi T, Sawai K, et al. Enhancement of therapeutic efficacy of aclarubicin against lymph node metastases using a new dosage form: Aclarubicin adsorbed on activated carbon particles J. Anticancer Drugs, 1992, 3(3): 233-236.
- 7] 杨凯,温玉明,李龙江,等. 颈淋巴结靶向葫芦素 BE 聚乳酸纳米微粒冻干针剂的研制 J. 华西口腔医学杂志, 2001, 19(6): 347-350.
- 8] Kitamura K, Hagiwara A, Otsuji E, et al. Activated carbon-oriented gastrectomy for early gastric cancer J. Br J Surg, 1995, 82(5): 647-650.
- 9] 何桂丽,陈缜,徐基铨. 头颈部恶性肿瘤体外短期化疗药敏测试研究 J. 耳鼻咽喉-头颈外科, 1998, 5(1): 59-61.

(本文编辑 汤亚玲)

第九届全国正畸临床提高班招生通知

四川大学华西口腔医学院依托华西雄厚的师资和办学经验,将于 2004 年 10 月 12 日举办为期 3 周的“第九届全国正畸医师临床提高班”。

为了确保教学质量,我院将派出具有丰富的临床经验和教学经验的专家组成强大教学阵容,罗炯彬教授、陈扬熙教授、赵志河教授以及一批具有博士学位的青年教师和留学回国人员将参与教学。本班着重动手能力以及规范化操作技术的训练,通过系统学习后,基本能独立开展口腔正畸的治疗工作。

学习班拟通过专题讲座及实验室实习,病案讨论等,培养一批熟悉正畸基础理论,掌握方丝弓、直丝弓技术及治疗程序,熟悉功能矫治器的制作,以及牙周病、颞下颌关节病的正畸治疗,外科正畸治疗等技术的人员。同时介绍当今国内外正畸发展新动态。为使学习班学员了解 MEAW 技术的原理,特邀请日本专家专题讲解 MEAW 技术的原理及病例,并对部分学员作弓丝训练。本班招生对象为在职口腔专业人员,培训时间 3 周,培训费 3500 元/人(含材料消耗费用)。食宿自理。要参加 MEAW 弓丝训练者须另付 500 元/人,请提前联系并自带器械(细丝钳,方丝转矩钳,末端切断钳)以便安排。

联系地址:四川省成都市人民南路三段 14 号 华西口腔医学院教学办公室

联系电话:028-85501436, Email: jw503 @email. scu. edu. cn.