

考布他汀 4A 磷酸酯缓释纳米粒的制备及抗肿瘤活性考察

夏虎雄^{1*}, 蒲君峰²

(1. 兰州大学第一医院药剂科, 兰州 730000; 2. 甘肃省人民医院药剂科, 兰州 730000)

[摘要] 目的:以聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物(PLGA)为载体材料,制备考布他汀 4A 磷酸酯(CA4P)缓释纳米粒,并考察其体内外抗肿瘤活性。方法:采用 W/O/W 复乳-溶剂挥发法制备 CA4P-PLGA 纳米粒(CA4P-PLGA-NPs),通过透射电镜观察其形态,激光光散射仪测定粒径分布,HPLC 测定载药量、包封率和体外累积释放率。采用 MTT 测定体外细胞毒活性,通过荷瘤裸鼠试验评价 CA4P-PLGA-NPs 体内抑瘤活性。结果:CA4P-PLGA-NPs 粒径分布较窄,平均粒径 113.7 nm,平均载药量(12.5±0.8)%,平均包封率(58.9±1.2)%,具有一定缓释效果。MTT 和荷瘤裸鼠试验表明 CA4P-PLGA-NPs 具有较好的抗肿瘤活性。结论:采用 W/O/W 复乳-溶剂挥发法制备的 CA4P-PLGA-NPs 具有一定的缓释作用,抗肿瘤活性较 CA4P 有所提高。

[关键词] 考布他汀 A4 磷酸酯;聚乳酸-羟基乙酸共聚物;缓释作用;纳米粒;抗肿瘤作用

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)08-0040-04

[doi] 10.11653/syjf2013080040

Preparation and Anti-tumor Activity Investigation of Combretastatin A-4P Nanoparticles Encapsulated with PLGA

XIA Hu-xiong^{1*}, PU Jun-feng²

(1. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China;

2. Department of Pharmacy, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare combretastatin A-4P (CA4P) sustained release nanoparticles with polylactic acid-polyglycolic acid (PLGA) as carrier material, and investigate its *in vitro* and *in vivo* anti-tumor activity. **Method:** CA4P-PLGA-NPs were made by W/O/W double emulsion solvent evaporation method, morphology of CA4P-PLGA-NPs was observed by transmission electron microscopy, particle size distribution was measured by dynamic laser scattering instrument, drug loading, encapsulation efficiency and *in vitro* cumulative release rate were determined by HPLC. *In vitro* cytotoxic activity of CA4P-PLGA-NPs on Hela cell was measured by MTT assay, *in vivo* antitumor activity was evaluated by tumor-bearing nude mice test. **Result:** Particle size distribution of CA4P-PLGA-NPs was narrow with average particle size was 113.7 nm, average drug loading was (12.5±0.8)%, average encapsulation efficiency was (58.9±1.2)%, these data showed that CA4P-PLGA-NPs had a certain sustained-release effect. CA4P-PLGA-NPs had good *in vitro* and *in vivo* anti-tumor activity through MTT and tumor-bearing nude mice test. **Conclusion:** CA4P-PLGA-NPs prepared by W/O/W solvent evaporation method had sustained-release effect, its anti-tumor activity was better than CA4P.

[Key words] combretastatin A-4P; polylactic acid-polyglycolic acid copolymer; sustained release; nanoparticles; anti-tumor effect

[收稿日期] 20121106(007)

[通讯作者] *夏虎雄,本科,主管药师,从事医院药房调剂研究,Tel:09318356578,E-mail:xiahx77@163.com

考布他汀 A-4 (Combretastatin A-4, CA4) 是 Pettit 小组从南非植物 *Combretum caffrum* 树干中提取分离得到的具有较强抗肿瘤活性的天然多羟基二苯乙烯类化合物^[1-2],是一种很有潜力的高效低毒

的广谱抗肿瘤药物。CA4 可直接抑制血管内皮细胞的增殖,破坏肿瘤细胞的血管系统,从而达到抗肿瘤目的^[3-4]。体外试验表明 CA4 可杀死多种癌细胞,但其水溶性很差,限制了其临床应用。经过一系列研究,科研人员通过结构改造制得水溶性较好的 CA4 前药衍生物—考布他汀 A4 磷酸酯(CA4P), CA4P 适合于体内给药,药物进入体内后在血浆中可解离出 CA4,从而发挥抗肿瘤作用,同时提高了 CA4 体内抗肿瘤活性。临床前研究表明,CA4P 可抑制多种肿瘤试验模型,目前,CA4P 在英、美等国已进入了临床评估^[5-8],具有较好应用价值。因此,制备合适的制剂显得至关重要。

本实验利用生物可降解材料包裹 CA4P,制备抗癌活性更强并具有一定缓释作用的 CA4P 制剂。聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)已成为美国 FDA 批准的体内可降解材料,已作为药用辅料被 2007 年版《美国药典》收载。PLGA 由聚乳酸(PLA)和聚羟基乙酸(PGA)以不同比例合成,其降解速度因 PLA 和 PGA 比例不同而不同,本实验选择 PLGA(50:50)作为 CA4P 的载体材料,制备 PLGA-CA4P 缓释纳米粒,并考察其体内外抗肿瘤活性。

1 材料

BALB/c 雌性裸小鼠,SPF 级,北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 SCXK(京)2010-0003。

LC-10AT 型高效液相色谱仪(日本岛津),C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm, 日本岛津公司),2.5 L 型冷冻干燥机(美国 Labconco 公司),H-7000 型高分辨透射电子显微镜(日本日立公司),BI-200SM 型激光光散射仪(美国 Brookhaven 公司),Thermo Scientific 型 CO₂ 培养箱(美国赛默飞世尔科技公司),AO Microsta 倒置显微镜(美国 AO 光学公司),Bio-Rad680 型酶标仪(美国伯乐公司)。

CA4P(杭州广林生物医药有限公司),CA4P 对照品[HPLC 纯度 ≥ 98%,凯试(上海)科技有限公司],PLGA(L-G 50:50, MW = 25 000,深圳绿保科技有限公司),聚乙烯醇(PVA,北京化学试剂公司),MTT 试剂和 DMEM 培养基(美国 Sigma 公司),甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 空白 PLGA-NPs 的制备^[9-11] 精密称取 PLGA 10 mg,溶于 2 mL 二氯甲烷中,构成有机相;取双蒸水 1 mL 加入有机相中,涡旋混匀,形成 W/O 初乳。称取一定量 PVA 加入双蒸水中使其充分溶解,调节

至质量分数 0.5%,构成外水相,将制备的初乳加至外水相中,高速混匀,将所得乳液加至 0.5% PVA 溶液中,蒸发有机溶剂 4~5 h,挥干二氯甲烷,低温高速离心,下层悬浮于超纯水中,冻干,即得。

2.2 CA4P-PLGA-NPs 的制备^[9-11] 精密称取 PLGA 10 mg,按 2.1 项下方法制备纳米粒,将 2.1 项下“双蒸水”改为“10 g·L⁻¹ CA4P 水溶液”,即得。

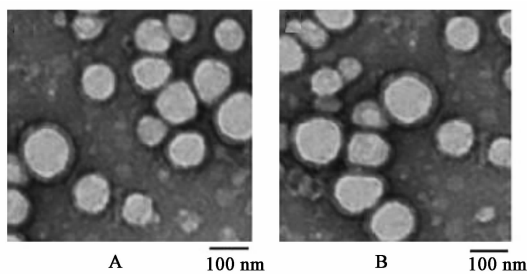
2.3 CA4P 标准曲线的绘制 精密称取 CA4P 10 mg,置于 100 mL 量瓶中,用流动相溶液定容,作为对照品溶液。精密量取 CA4P 对照品溶液 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 mL,分别加至 10 mL 量瓶中,用流动相定容至刻度,得质量浓度分别为 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 mg·L⁻¹ 的溶液。精密吸取上述溶液各 20 μL,注入高效液相色谱仪,以峰面积为纵坐标,CA4P 质量浓度为横坐标,得标准曲线 $Y = 9.75 \times 10^5 X + 3\ 050$ ($r = 0.999\ 3$),表明 CA4P 在 0.5~32 mg·L⁻¹ 线性关系良好。

2.4 载药量和包封率的测定 按 2.2 项下方法制备 3 批 CA4P-PLGA-NPs,离心(5 000 r·min⁻¹, 10 min),测定上清液中 CA4P 含量,按下式计算载药量和包封率。结果平均载药量(12.5 ± 0.8)%,平均包封率(58.9 ± 1.2)%,表明制备工艺的重复性良好。

$$\text{载药量} = \frac{\text{微球内 CA4P 质量}}{\text{微球质量}} \times 100\%$$

$$\text{包封率} = \frac{\text{CA4P 总质量} - \text{上清液中 CA4P 质量}}{\text{CA4P 总质量}} \times 100\%$$

2.5 外观形态观察 采用透射电子显微镜观察 CA4P-PLGA-NPs 的形态及粒径。取一定量 CA4P-PLGA-NPs 悬浮液,经超声匀化后滴在洁净载玻片上,常温干燥后制成微粒样品片,真空条件下将试样表面喷涂金钼合金,置于透射电镜下进行观察,见图 1。表明制得的 CA4P-PLGA-NPs 为均匀规则的球状粒子,外观圆整均匀,纳米粒之间基本无粘连。



A. 空白 PLGA-NPs; B. CA4P-PLGA-NPs

图 1 纳米粒透射电镜

2.6 粒径分布测定 采用激光光散射仪测定。取

少许冻干的 CA4P-PLGA-NPs, 悬浮于适量用 0.22 μm 滤膜滤过的水中, 转入洗净的测定瓶中, 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 进行激光光散射测定。结果显示, 空白 PLGA-NPs 及 CA4P-PLGA-NPs 平均粒径分别为 110.6, 113.7 nm。

2.7 体外释放试验 取相同质量的 CA4P-PLGA-NPs 共 3 份, 分别悬浮于 pH 7.4 的 PBS 溶液 (5 mL) 中。悬浮液置于 10 kDa 透析膜袋中, 分别放入含有 pH 7.4 的 PBS 溶液 20 mL 的大烧杯中。将大烧杯放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床中, 以 60 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振摇, 于 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 24, 36, 60, 120, 240, 360, 480 h 分别取样 2 mL, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 吸取 20 μL 注入色谱仪, 测定 CA4P 含量, 每次取样完后补充相应 PBS 溶液, 绘制 CA4P 体外释放曲线 (图 2)。结果表明 CA4P-PLGA-NPs 体外释放无明显突释现象, 随着时间的增加, 累积释放率缓慢增加, 480 h 后累积释放率可达 80%, 达到了持续缓慢释药的目的。

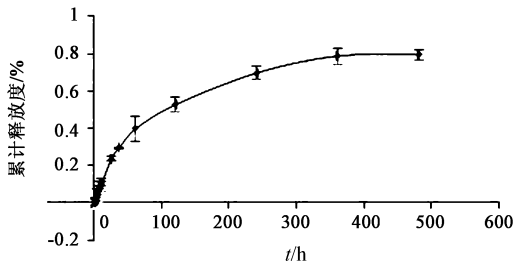


图 2 CA4P 体外累积释放曲线

2.8 体外细胞活力测定 HeLa 细胞系采用 DMEM 培养基, 细胞培养液含 10% 胎牛血清、青霉素 (100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 和链霉素 (100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 于 95% 湿度 (37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2) 条件下培养。HeLa 细胞以 4×10^3 每孔的密度于 96 微孔板上培养 16~20 h, 将培养的细胞分为空白组, CA4P 组, PLGA-NPs 组和 CA4P-PLGA-NPs 组, 每组设低、中、高 3 个质量浓度, 空白组用 PBS 溶液处理细胞, CA4P 组用 10, 20, 40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CA4P 处理细胞, PLGA-NPs 组用 80, 160, 320 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PLGA-NPs 处理细胞, CA4P-PLGA-NPs 组用 80, 160, 320 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CA4P-PLGA-NPs 处理细胞 48 h, 处理后, 更换培养液, 细胞在含有 0.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MTT 试剂的培养基上培养 4 h, 培养后产生的甲瓩用 DMSO 溶解, 振摇 10 min 后用酶标仪于 570 nm 测定吸光度 (A), 每组 A 与空白作比较, 计算细胞活力 (图 3)。

$$\text{细胞活力} = A_{570\text{样}} / A_{570\text{对照}}$$

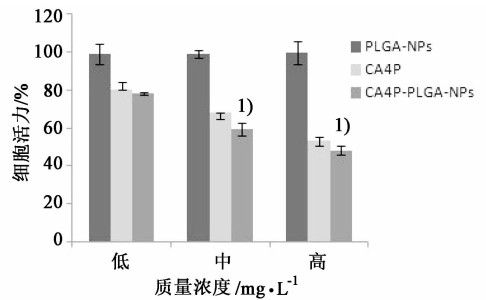


图 3 PLGA-NPs, CA4P 及 CA4P-PLGA-NPs 细胞活力测定 (¹⁾ $P < 0.05$)

由图 3 可知, PLGA-NPs 几乎没有细胞毒活性, 低质量浓度时, CA4P-PLGA-NPs 与 CA4P 细胞毒活性差异无统计学意义, 中、高质量浓度下, CA4P-PLGA-NPs 较 CA4P 具有较好的细胞毒活性, 且具有显著性差异。

2.9 体内抑瘤试验 选 4~6 周, 体重 (16~20) g, 饲养在 SPF 条件下的雌性裸小鼠 56 只。将选好的 56 只裸小鼠于无菌条件下在右前肢腋部皮下接种 1×10^7 个 HeLa 细胞, 24 h 后, 按体重编号, 随机分成生理盐水组, PLGA-NPs 组, CA4P 组和 CA4P-PLGA-NPs 组, 每组 14 只, 共 4 组。待小鼠肿瘤体积达到 200 mm^3 时开始给药。生理盐水组每天按 0.01 $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 尾静脉注射给药, CA4P 组每天按 20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给药, PLGA-NPs 组和 CA4P-PLGA-NPs 组每天按 160 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给药, 4 组给药体积相同。小鼠给药过程中自由摄食饮水, 每天于给药前后均需测瘤体积 (图 4), 称体重。共给药 2 周, 最后 1 d 停止喂食供水, 称体重, 处死, 解剖皮下肿瘤, 称湿重, 计算抑瘤率 (IR)。结果平均肿瘤湿重分别为 (1.03 \pm 0.16), (1.04 \pm 0.24), (0.49 \pm 0.32), (0.40 \pm 0.24) g; IR 分别为 0, 0, 52.43%, 61.17%。说明与对照组相比, 治疗 2 周后, PLGA-NPs 组平均肿瘤湿重无明显降低, 即空白纳米粒 PLGA-NPs 无细胞毒活性, CA4P 组和 CA4P-PLGA-NPs 组均可明显抑制肿瘤生长, 治疗 2 周后肿瘤湿重与生理盐水组相比明显降低 ($P < 0.01$), CA4P-PLGA-NPs 组和 CA4P 组相比, 抑瘤率明显提高, 且具有统计学差异。

$$\text{瘤体积} = (a \times b^2) / 2, a \text{ 为 瘤 长 度, } b \text{ 为 宽 度}$$

$$\text{IR} = (1 - \text{实验组平均瘤重} / \text{对照组平均瘤重}) \times 100\%$$

由图 4 可知, 生理盐水组和 PLGA-NPs 组几乎不能抑制肿瘤生长, 在治疗两周后, 裸小鼠瘤体积达 700 mm^3 , CA4P 组和 CA4P-PLGA-NPs 组具有明显抑制肿瘤生长的作用, 治疗一周后, CA4P-PLGA-NPs

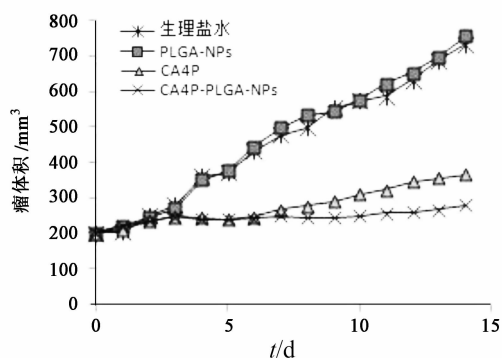


图4 裸小鼠治疗期肿瘤增长曲线

组较 CA4P 组具有更好的抑制肿瘤生长的作用。

3 讨论

CA4P 具有较强的抗肿瘤活性,是一种很有潜力的抗肿瘤药物,但目前对 CA4P 缓释纳米制剂的研究还未见报道。本实验采用 W/O/W 复乳-溶剂挥发法成功制备了 CA4P-PLGA-NPs,该纳米粒粒径约 113.7 nm,由于肿瘤组织血管丰富,通透性大,大分子结合物更容易进入肿瘤内部,而且肿瘤组织缺乏有效的淋巴排泄,使得结合物的清除减少,从而肿瘤组织可有效地捕获并保留大分子结合物^[12-14]。CA4P 用 PLGA 包裹后,分子变大,从而更容易进入肿瘤内部,使得 CA4P 能在肿瘤组织缓慢释放,解离出 CA4 发挥抗肿瘤活性。本实验难点在于如何提高 CA4P-PLGA-NPs 制备过程中载药量和包封率,在今后工作中,本课题组会着重对 CA4P-PLGA-NPs 制备工艺进行探索和研究,以制备出高载药量和高包封率的 CA4P-PLGA-NPs。

[参考文献]

[1] 王超磊,孙炳峰,姚和权,等. 植物来源的抗肿瘤药物研究进展[J]. 药学进展,2011,35(5):193.
 [2] Pettit G R, Singh S B, Boyd M R, et al. Antineoplastic agents. 291. isolation and synthesis of combretastatins A-4, A-5 and A-6[J]. J Med Chem, 1995, 38 (10):1666.
 [3] Gaukroger K, Hadfield J A, Lawrence N J, et al. Structural requirements for the interaction of combretastatins with tubulin: how important is the trimethoxy unit? [J]. Org Biomol Chem, 2003, 17 (1):3033.

[4] Su J, Laursen B E, Eskildsen-Helmond Y, et al. The vascular-disrupting agent, combretastatin-A4-phosphate, enhances neurogenic vasoconstriction in rat small arteries [J]. Eur J Pharmacol, 2012, 695(1/3):104.
 [5] Kirwan I G, Loadman P M, Swaine D J, et al. Comparative preclinical pharmacokinetic and metabolic studies of the combretastatin prodrugs combretastatin A4 phosphate and A1 phosphate [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(4):1446.
 [6] Pettit G R, Temple C. Antineoplastic agents 322. synthesis of combretastatin A-4 prodrugs [J]. Anticancer Drug Design, 1995, 10:299.
 [7] Hadimani M B, Hua J, Jonklaas M D, et al. Synthesis, *in vitro*, and *in vivo* evaluation of phosphate ester derivatives of combretastatin A4 [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2003, 13(9):1505.
 [8] Bedford S B, Quarterman C P, Rathbone D L. Synthesis of water soluble prodrugs of cytotoxic agent combretastatin A-4 [J]. Bioorg Med Chem Lett, 1996, 6(2):157.
 [9] 胡三元,陈伟杰,闫治波,等. 载重组人血管内皮抑制素的 PEG-PLGA 纳米粒及其制备方法, 中国: 201010211937.5 [P]. 2010-05-26.
 [10] Chang J, Jallouli Y, Kroubi M, et al. Characterization of endocytosis of transferrin-coated PLGA nanoparticles by the blood-brain barrier [J]. Int J Pharm, 2009, 379(2):285.
 [11] Kuo Y C, Lin P I, Wang C C. Targeting nevirapine delivery across human brain microvascular endothelial cells using transferrin-grafted poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles [J]. Nanomedicine, 2011, 6(6):1011.
 [12] 熊清平,张强华,徐燕萍,等. 白藜芦醇固体脂质体纳米粒抑制小鼠移植性肿瘤 H22 的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2):153.
 [13] Maeda H, Sawa T, Konno T. Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS [J]. J Control Release, 2001, 74(1/3):47.
 [14] 黄雄,林敏超,余柏村,等. 鬼臼毒素及其衍生物新型制剂抗肿瘤作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(13):296.

[责任编辑 仝燕]