

# 顺铂隐形纳米粒的制备及在小鼠体内靶向性研究

张阳德\* 沈成蓉\* 段菁华 王吉伟 赵劲风\*\*

(中南大学湘雅医院卫生部肝胆肠外科研究中心 长沙 410008)

**摘要** 目的:制备顺铂聚氰基丙烯酸正丁酯隐形纳米粒(cisplatin polybutylcyanoacrylate stealth nanoparticles, CDDP-PBCA-mPEG),并研究其经小鼠尾静脉给药后在小鼠体内的生物分布差异。方法:复乳法制备 CDDP-PBCA-mPEG,以单甲氧基乙二醇进行表面修饰,建立高效液相色谱分析法,流动相选择甲醇-水(55:45),210nm 处检测。昆明种小鼠 60 只,随机分为游离 CDDP 组和 CDDP-PBCA-mPEG 组,每组 30 只,经小鼠尾静脉按 5mg/kg 的剂量分别注射上述 CDDP-PBCA-mPEG 或游离 CDDP。每组于给药后 15, 30 min, 1, 2, 6, 12 h 各处死 5 只小鼠,分别提取肝、肾、脾、心、肺、血浆样品,以高效液相色谱法测定 CDDP 的浓度。结果:CDDP-PBCA-mPEG 平均粒径为 170.9nm,平均包封率为 60.1%,平均载药量为 3.88%。12h 以内 CDDP-PBCA-mPEG 组小鼠肝脏中的 CDDP 浓度显著高于游离 CDDP 组( $P < 0.01$ ),而在肾脏中 CDDP 浓度显著低于游离 CDDP 组( $P < 0.01$ )。CDDP-PBCA-mPEG 组小鼠肝脏和血浆中 CDDP 浓度在各时间段缓慢释放。结论:CDDP-PBCA-mPEG 具有良好的肝靶向性,并具有缓慢释药的特点,降低了肾脏等脏器的药物分布,是治疗肝癌较理想的给药系统。

**关键词** 聚氰基丙烯酸正丁酯 单甲氧基乙二醇 隐形纳米粒 肝靶向性 顺铂

**中图分类号** Q819

近年来发展起来的纳米靶向给药系统在提高药物对肿瘤组织的靶向性、降低药物的毒副作用方面显示出巨大的发展前景<sup>[1]</sup>。由于普通抗癌纳米粒进入血液后易被单核吞噬系统(mononuclear phagocyte system, MPS)细胞作为异物识别而吞噬,影响其对癌细胞的靶向性,目前研究的策略就是对纳米粒进行表面修饰,制备能逃避 MPS 细胞吞噬的隐形纳米粒(stealth nanoparticles),亦称为长循环纳米粒(long-circulating nanoparticles)<sup>[2,3]</sup>。本研究采用可在体内生物降解的聚氰基丙烯酸正丁酯(polybutylcyanoacrylate, PBCA)为纳米载体,用顺铂为模型药物,以能阻止 MPS 细胞吞噬的亲水性长链单甲氧基乙二醇(methoxypolyethyleneglycol, mPEG)为纳米表面修饰剂,采用复乳法制备了隐形顺铂聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒(CDDP-PBCA-mPEG);并研究其经静脉给药后在小

鼠体内的靶向性分布特征。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器、材料与动物

顺铂标准品(中国药品生物制品检定所提供,纯度 $\geq 99\%$ );顺铂(10mg,山东齐鲁制药有限公司);单甲氧基乙二醇(mPEG5000-NH<sub>2</sub>)(北京凯正生物工程发展有限责任公司); $\alpha$ -氰基丙烯酸正丁酯(BCA)(广州白云医用胶有限公司);N,N-二甲基甲酰胺、脱氧胆酸钠、二氯甲烷(国药集团化学试剂有限公司)。Nicomp380ZLS 纳米粒度及 zeta 电位分析仪(美国 PSS. NICOMP 公司);超声波乳化仪(MODEL 500)(美国 Fisher Scientific);日本岛津 LC-6A 高效液相色谱仪(配 RF-530 荧光检测器, C-R3A 数据处理仪)。健康昆明小鼠,雌雄各半,6~8 周龄,体质量 18~22g(中南大学湘雅医学院动物实验中心)。

### 1.2 顺铂隐性纳米粒制备

采用复乳法。取单甲氧基乙二醇 50mg 用双蒸水

收稿日期:2008-03-05 修回日期:2008-05-07

\* 并列第一作者

\*\*通讯作者,电子信箱:zhaojinfeng@hotmail.com

溶解,室温条件下搅拌,缓慢滴入等量  $\alpha$ -氰基丙烯酸正丁酯,磁力搅拌 3 ~ 5h,过滤,即得空白 PBCA-mPEG 纳米粒。再用 4ml 二氯甲烷溶解备用。取顺铂注射液 2.5mg,用 1ml 二甲基甲酰胺稀释。取此溶液,注入含有 PBCA-mPEG 的二氯甲烷溶液中,冰浴条件下用 15W 超声波乳化仪连续超声乳化 1min 后得到 W/O 初乳。将此初乳加入脱氧胆酸钠溶液中(6ml ,12mmol/L),冰浴下,再用超声波乳化仪超声乳化 15W,2min 得到 W/O/W 复乳。将所得复乳置于磁力搅拌器下搅拌直至二氯甲烷挥发,即得隐形纳米粒悬液,随后将隐形纳米粒悬液于 4℃ 下,20000r/min 离心 15min,弃去上清液,沉淀用蒸馏水洗三次,除去未包裹的游离顺铂,即得 CDDP-PBCA-mPEG 隐形纳米粒。

1.3 隐形纳米粒的粒径与 Zeta 电位测定

取各隐形纳米粒样品,蒸馏水稀释后,置于 Nicomp380ZLS 纳米粒度及 Zeta 电位分析仪样品管中,测定粒径及 Zeta 电位。

1.4 包封率和载药量测定

取 CDDP-PBCA-mPEG 溶液适量,于 4℃、35000r/min 离心 90 min,取上清液用 HPLC 测定浓度,得到游离顺铂量,按下面公式计算包封率,载药率:

包封率 = [ ( Wa - Ws ) / Ws ] × 100%

载药量 = [ ( Wa - Ws ) / Wnp ] × 100%

Wa:初始投药量; Ws:上清液中含药量; Wnp:纳米粒总质量

1.5 给药方法及标本制备

健康昆明小鼠 60 只(雌雄各半),随机分为 2 小组,每小组 30 只,分别为实验组和对照组。按 5mg/kg 剂量,对照组:尾静脉注射顺铂生理盐水;试验组:尾静

脉注射顺铂隐形纳米粒。每组皆于给药后 15、30min 和 1、2、6、12h 分断颈处死,充分放血后剖取每只小鼠的肝、脾、心、肺、肾,各小组内 5 只小鼠的器官、血液,全血离心取血浆,脏器组织称重、匀浆。取血浆 1.0ml 或各脏器组织 1.0g,加氯仿-甲醇(4:1)混合液 5ml,振摇 5min 后离心 10min (3000r/min),取氯仿层,以 40℃ 氮气吹干,残渣用流动相 100 $\mu$ l 溶解,进样 10 $\mu$ l,供高效液相色谱分析。

1.6 色谱条件<sup>[4]</sup>

分析柱: C18 色谱柱(150mm × 4.6mm );流动相: 甲醇:水(55: 45),磷酸盐缓冲液调节 pH 值至 2.47;流速:1ml/min,柱温:35℃ ;检测波长:210nm。

1.7 统计学方法

所有计量指标均以  $\bar{x} \pm s$  表示,统计学处理应用 SPSS 10.0 软件包。同一时间不同脏器的统计指标采用配伍方差分析,相同脏器不同时间的统计指标采用完全随机方差分析。

2 结 果

2.1 粒径与 Zeta 电位的结果

纳米粒度及 zeta 电位分析仪测得的平均粒径为 170.9nm,Zeta 电位-10.5mv。

2.2 包封率和载药量的结果

测得 CDDP-PBCA-mPEG 的平均包封率为 60.1%,载药量为 3.88%。

2.3 顺铂在各脏器分布

给药后 15、30min 和 1、2、6、12h 顺铂生理盐水组及顺铂隐形纳米粒组在小鼠体内各脏器中的药物分布及组间统计学比较结果见表 1。

表 1 顺铂在小鼠体内不同时间的生物分布(  $\mu$ g/ml 或  $\mu$ g / g ,  $\bar{x} \pm S$ , n = 5)

Table1 The different time distributions of the cisplatin in the mice body (  $\mu$ g/ml or  $\mu$ g / g ,  $\bar{x} \pm S$ , n = 5)

器官	时间(h)					
	0.25	0.5	1	2	6	12
肝						
a	0.33 ± 0.08	1.35 ± 0.11	1.34 ± 0.07	1.29 ± 0.12	0.69 ± 0.19	0.31 ± 0.05
b	7.17 ± 2.43	10.34 ± 1.86	16.26 ± 0.34	12.21 ± 0.26	8.26 ± 0.45	5.18 ± 0.25
脾						
a	0.58 ± 0.21	1.72 ± 0.28	1.63 ± 0.31	1.39 ± 0.21	0.81 ± 0.51	0.37 ± 0.18
b	7.57 ± 1.37	10.12 ± 2.15	13.25 ± 3.08	8.33 ± 2.21	5.78 ± 0.45	3.42 ± 0.26
心						
a	0.75 ± 0.28	1.37 ± 0.22	1.18 ± 0.15	1.15 ± 0.21	0.52 ± 0.12	0.20 ± 0.08
b	0.53 ± 0.21	0.88 ± 0.35	0.85 ± 0.18	0.63 ± 0.12	0.34 ± 0.15	0.23 ± 0.11
肺						
a	0.89 ± 0.31	1.66 ± 0.06	1.45 ± 0.25	1.18 ± 0.02	0.71 ± 0.16	0.38 ± 0.01
b	0.35 ± 0.13	0.63 ± 0.16	1.01 ± 0.02	0.67 ± 0.26	0.30 ± 0.05	0.08 ± 0.01

器官	时间(h)						
	0.25	0.5	1	2	6	12	
肾							
	a	0.91 ± 0.28	1.71 ± 0.52	1.57 ± 0.49	0.81 ± 0.23	0.46 ± 0.35	0.03 ± 0.01
血	b	0.55 ± 0.31	0.80 ± 0.32	0.88 ± 0.43	0.64 ± 0.26	0.45 ± 0.32	0.11 ± 0.08
	a	0.34 ± 0.03	0.77 ± 0.35	0.66 ± 0.12	-	-	-
	b	0.14 ± 0.03	0.30 ± 0.12	0.39 ± 0.05	0.22 ± 0.06	0.10 ± 0.01	0.01 ± 0.01

注：- no detected a;Free cisplatin b;CDDP-PBCA-mPEG

2.4 顺铂隐形纳米粒对肝高浓度聚集

给药后 15、30min 和 1、2、6、12h 顺铂隐形纳米粒组小鼠肝和脾组织中 CDDP 浓度均极显著高于顺铂生理盐水组 (P 值均 < 0. 01),而在心、肾、肺中 CDDP 浓度显著降低(P < 0. 01)。可见顺铂隐形纳米粒对肝和脾脏表现出明显的靶向积聚性,在给药 12h 后肝、脾中顺铂浓度仍高达 5.36,3.42μg /g。顺铂隐形纳米粒组在对肝和脾脏表现出明显靶向积聚性的同时,对肾脏和其他器官仅有很低的亲和性。

2.5 顺铂隐形纳米粒给药系数的缓释性

本实验结果表明,顺铂隐形纳米组肝脏中顺铂浓度在各时间段缓慢释放。小鼠尾静脉注射顺铂隐形纳米粒 1h,肝脏顺铂浓度达峰值,为 16.26μg /g,随后药物缓慢释放,2h 后小鼠肝脏组织中顺铂浓度为 12.21μg /g,6h 后为 8.26μg /g。12h 仍高达 5.18μg /g,是同时间对照组的 16.6 倍,是顺铂生理盐水对照组达峰值时(1.35μg /g)6 倍(图 1)。给药 30min 顺铂生理盐水组血浆中顺铂浓度即达到峰值 0.77μg/ml,2h 后血浆中已测不到顺铂。而顺铂长隐形纳米组在 2h 后才达峰值,随后缓慢释放,12h 仍可测到,为 0.01μg/ml。实验结果表明,顺铂隐形纳米组顺铂在血液循环系统中滞留时间更长,释放更为缓慢(图 2)。

3 讨论

顺铂是临床常用抗肝癌药物,其疗效呈剂量相关性,但大剂量可以引起不可逆性肾功能损害及严重的胃肠道反应,从而限制了临床应用及疗效的进一步提高。纳米靶向治疗是借助纳米粒为运输载体,将治疗药物或制剂定向作用于靶部位,从而达到减毒增效的作用。本实验用顺铂连接亲水 PEG 链段后,使 NP 内部为疏水的载药部位,而表面 mPEG 的亲水性更加有利于抵制和逃逸 MPS 的吞噬。同时降低内水相的用量和改用高剪切乳化仪提供更强大的乳化功效,使初乳

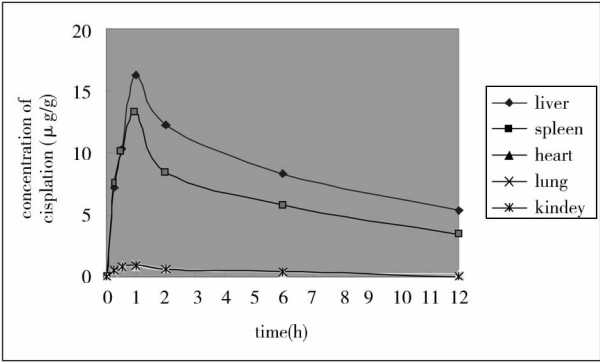


图 1 顺铂在各器官中的释放曲线  
Fig.1 Cisplatin release curve in the mice organ from the CDDP-PBCA-mPEG

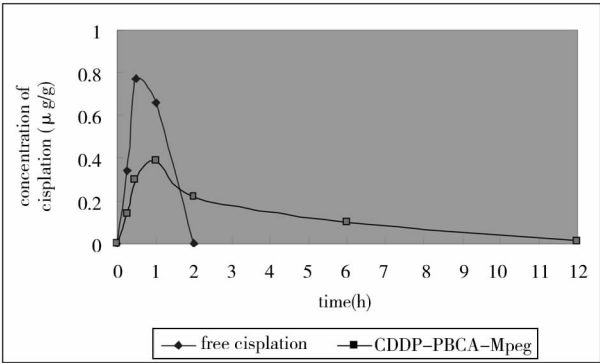


图 2 顺铂在血浆中的释放曲线  
Fig.2 Cisplatin release curve in the mice plasma from the CDDP-PBCA-mPEG

液粒径大大降低,更易得到纳米级复乳粒子<sup>[5]</sup>。最后制备获得的顺铂隐形纳米粒分散度良好,这是使该体系均匀释药的重要因素之一。

本研究在正常小鼠体内组织分布研究表明:顺铂聚氰基丙烯酸正丁酯隐形纳米粒(CDDP-PBCA-mPEG)具有明显的肝靶向性,即在肝组织中增加而在肝外器官分布减少,尤其是肾组织中较显著(P < 0. 01)。分

析纳米粒肝靶向行为的机理可能是:(1)载药纳米粒表面的粘附性及小的粒径,增加了药物与肝组织的接触时间与接触面积;(2)纳米粒有助于药物透过血管壁,增加药物的血管外分布;(3)纳米粒改变了顺铂的消除动力学,使其消除半衰期延长<sup>[6]</sup>;(4)纳米粒可改变膜转运机制,增加肝组织细胞内的药物积聚<sup>[7]</sup>。

目前研究已证明<sup>[8]</sup>:用亲水性物质对纳米粒进行表面修饰,制备成隐形纳米粒,由于它降低了纳米粒对亲脂性调理蛋白的结合,有效地减少体内调理蛋白对纳米微粒的吸附,使其修饰后的纳米粒能逃避 MPS 细胞的识别吞噬,延长在血中的循环时间,使其有更多的机会进入癌细胞实现被动靶向肿瘤治疗的目的。本研究结果表明,载顺铂隐形纳米粒在血液中释放缓慢,在血液循环中停留时间延长,因而肝组织有更多时间摄取药物。肝组织中顺铂的含量 12 小时仍高达 5.18μg/g,是同时间对照组的 16.6 倍,是顺铂生理盐水对照组达峰值时(1.35μg/g)6 倍。总之,经聚乙二醇修饰的顺铂聚氰基丙烯酸正丁酯隐形纳米粒肝靶向性强,毒副作用小且具有缓释效应,有望成为临床肝癌化疗新剂型。

参考文献

[1] 秦仁义,裴法祖. 纳米生物技术在实验外科的应用前景. 中华实验外科杂志, 2003,20:773~775

Qin R Y, Qiu F Z. Chinese Journal of Experimental Surgery, 2003,20:773~775

[2] Haley B, Frenkel E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. Urol Oncol, 2008,26(1):57~64

[3] Moghimi S M, Szebeni J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. Prog Lipid Res, 2003, 42(6): 463~478

[4] 葛勇前,张玉勤,陆国椿. HPLC 法同时测血浆及组织中顺铂和依托泊苷的浓度. 药物分析杂志. 2003,23(2):87~90  
Ge Y Q, Zhang Y Q, Lu G C, Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2003,23(2):87~90

[5] Mainardes R M, Evangelista R C. PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution. Int J Pharm, 2005, 290(1~2):137~144

[6] 张阳德,雷蕾,张煦. 表阿霉素聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒治疗移植性肝癌. 中华实验外科杂志, 2006,23:1197~1199  
Zhang Y D, Lei L, Zhang X. Chinese Journal of Experimental Surgery, 2006,23:1197~1199

[7] 张阳德,吴泽健,龚连生,等. 半乳糖的白蛋白磁性阿霉素纳米粒在正常大鼠体内的靶向性分布的研究. 中华实验外科学杂志, 2004,21:1073~1075  
Zhang Y D, Wu Z J, Gong N S, et al. Chinese Journal of Experimental Surgery, 2004,21:1073~1075

[8] Alexis F, Rhee J W, Richie J P. New frontiers in nanotechnology for cancer treatment. Urol Oncol, 2008,26(1):74~85

Study on Targeting Distribution of Cisplatin Stealth Nanoparticles in Normal Mice

ZHANG Yang-de SHEN Cheng-rong DUAN Jing-hua Wang Ji-wei ZHAO Jin-feng  
(National Hepatobiliary & Enteric Surgery Research Center Ministry of Health,  
Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

**Abstract** Objective To prepare cisplatin polybutylcyanoacrylate stealth nanoparticle (CDDP-PBCA-mPEG) and observe the different tissue distributions of the nanoparticles in the mice body after the injection via lateral tail vein, and to study the targeting distribution of CDDP-PBCA-mPEG on normal mice livers. Methods CDDP-PBCA-mPEG was prepared by double emulsion method, with the surfacemodified by methoxypolyethyleneglycol. High-performance liquid chromatography (HPLC) method was established using methyl alcohol and water (55:45) as mobile phase; detection was done at 210nm. Sixty mice were randomly divided into 2 groups with 30 mice in each group: non conjugated free CDDP group and CDDP-PBCA-mPEG group, A single dose of either conjugated or free cisplatin equaled 5mg/kg of body weight was delivered via the tail vein. Five mice in each

trail were sacrificed at 15 , 30 minutes, 1 ,2,6 and 12 hours after the injection , respectively. The cisplatin concentrations in the collected livers, kidneys, spleens, hearts, lungs and plasma were demonstrated using a high performance liquid chromatography with fluorescence detector. Results The mean diameter of the prepared CDDP-PBCA-mPEG was 170.9 nm;the mean entrapment efficiency of the particles was 60.1% ;and the drug loading rate was 3.88%. The cisplatin concentrations of the mice liver in the experimental groups was significantly higher than those in the control groups(  $P < 0.01$  ). The nanoparticle conjugated cisplatin was significantly lower than those in the control groups(  $P < 0.01$  ) and cleaned up quickly from the kidney tissues. Cisplatin was released slowly in the liver and plasma during the detection period in the experimental groups. Conclusion CDDP-PBCA-mPEG has the liver targeting with slow medicine release. It also decreases the medicine distribution in the kidney and other organs. In the treatment of liver cancer, the polybutylcyanoacrylate stealth nanoparticle system has a good liver targeting ability, which increases the anticancer activity and markedly decreases the toxicity of cisplatin.

**Key words** Polybutylcyanoacrylate Methoxypolyethyleneglycol Stealth nanoparticles Liver targeting Cisplatin