

❖ 实验研究

Preparation of a novel drug-loading ultrasound microbubble

WANG Hong-hong^{1,2}, RAN Hai-tao^{1,2*}, WANG Zhi-gang^{1,2}, ZHANG Ya-ping^{1,2}, HAO Lan^{1,2}

(1. Institute of Ultrasound Imaging, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China;

2. Department of Ultrasound, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

[Abstract] **Objective** To explore the efficiency of covalent bonding and static adsorption in combining ultrasound microbubbles with active poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) nanospheres, and to prepare a novel drug-loading ultrasound microbubble. **Methods** Positive charge of amino ultrasound microbubbles (MB-NH₂) were prepared with mechanical shaking. Negative PLGA nanospheres (NP) were prepared using double emulsification method. PLGA nanospheres (NP-COOH) were produced using carbodiimide method to activate the surface carboxyl of NP. The study was divided into two groups to combine ultrasound microbubbles with PLGA nanospheres: Static adsorption group (MB-NH₂ + NP) and collaborative group (MB-NH₂ + NP-COOH). The connection effect was observed under light microscope at different time. **Results** After 48 h, the wall of ultrasound microbubble was smooth, and no conjugation of nanospheres was observed under light microscope in static adsorption group. However, in collaborative group, the wall of ultrasound microbubble was not smooth and a number of small round nanospheres gathered around microbubble like a garland. **Conclusion** The synergistic effect of covalent bonding and static adsorption enables successful preparation of a novel drug-loading ultrasound microbubble, which is potential to provide a new train of thought on tumor therapy.

[Key words] Microbubbles; Contrast media; Covalent bonding; Static adsorption

一种新型载药超声微泡的制备

王红红^{1,2}, 冉海涛^{1,2*}, 王志刚^{1,2}, 张亚萍^{1,2}, 郝 兰^{1,2}

(1. 重庆医科大学超声影像学研究所, 重庆 400010; 2. 重庆医科大学附属第二医院超声科, 重庆 400010)

[摘要] **目的** 探讨共价结合与静电吸附法连接超声微泡与乳酸羟基乙酸共聚物(PLGA)纳米微球的效率, 制备一种新型载药超声微泡。 **方法** 采用机械振荡法制备正电荷氨基化超声微泡(MB-NH₂)。以双乳化法制备负电荷 PLGA 纳米微球(NP), 并用碳二亚胺法活化 NP 表面的羧基, 得到活性 PLGA 纳米微球(NP-COOH)。分 2 组连接超声微泡与纳米微球: 静电组(MB-NH₂ + NP)、共价静电协同组(MB-NH₂ + NP-COOH)。在光镜下不同时间点观察连接效果。 **结果** 48 h 后光镜下静电组超声微泡表面光滑, 周围未见纳米微球聚集; 共价静电协同组超声微泡表面不光滑, 周围布满数量不等的小圆形的纳米微球, 呈花环状。 **结论** 在共价结合与静电吸附的协同作用下, 可成功制备出一种新型载药超声微泡, 有望为肿瘤治疗提供一种新思路。

[关键词] 微泡; 造影剂; 共价结合; 静电吸附

[中图分类号] R445.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2011)04-0666-03

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81071157)、重庆市科技攻关项目(CSTC, 2009AB5216)。

[作者简介] 王红红(1985—), 女, 湖北宜昌人, 在读硕士。研究方向: 影像医学与核医学。E-mail: 85honghong@163.com

[通讯作者] 冉海涛, 重庆医科大学超声影像学研究所, 400010; 重庆医科大学附属第二医院超声科, 400010。E-mail: rht66@163.com

[收稿日期] 2010-11-02 **[修回日期]** 2010-12-13

近年来,药物剂型和制剂的研究已进入靶向给药系统(targeted drug delivery system, TDDS)时代。TDDS有望解决常规化疗药物缺乏靶向性、毒副作用大、疗效差的难题,成为肿瘤治疗研究的重点。目前TDDS的研究集中于靶向递送系统的探索和药物载体的改进。超声靶向微泡爆破^[1-3](ultrasound-targeted microbubble destruction, UTMD)技术是一种极具潜力的靶向给药新方法,能有效提高靶组织局部药物浓度、提高疗效、降低毒副作用,但该技术以微泡作为药物载体,存在载药量不足、稳定性差、局部维持时间短等缺陷。乳酸羟基乙酸共聚物(poly lactic-co-glycolic acid, PLGA)纳米微球^[4-6]以其载药量大、缓释性及生物相容性好等独特优势已成为一种较理想的化疗药物载体,但其靶向性是有待解决的难点。本实验拟通过共价结合与静电吸附的方法连接超声微泡和 PLGA 纳米微球,研制一种新型超声微泡药物载体。

1 材料与方法

1.1 实验材料 二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC, Lipoid);氨基-聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(NH_2 -PEG-DSPE, Avanti);羧基端未封闭的 PLGA(聚合比 50:50, 山东);EDC/souf-NHS(Sigma);pH 值为 6 和 8 的 MES 缓冲液(Sigma);多聚赖氨酸(PLL, Sigma);FJ-200 高速分散均质机(上海标本模型厂);HJ-1 型磁力搅拌器(江苏荣华仪器公司);CKX41 倒置荧光显微镜(Olympus)。

1.2 MB- NH_2 的制备 将 25 mg PLL 粉末溶于 4.5 ml 双蒸水中,配置 PLL 溶液待用。将一定量的脂膜材料 DPPC、 NH_2 -PEG-DSPE 置于甘油及 PLL 溶液的混悬液中,42℃水浴 30 min,充入全氟丙烷气体,机械振荡 50 s,即得到 MB- NH_2 。采用马尔文公司 Nano ZS90 Zeta 电位分析仪测其表面电位。

1.3 NP 与 NP-COOH 的制备 采用双乳化法制备普通的 NP^[7]。取一定摩尔比的 NP、耦联活化剂 EDC/souf-NHS 分散于 MES 缓冲液中(pH 值 6),冰上轻摇孵育 1 h^[7-10]。5000 rpm 离心 5 min,共 3 次,去除过量的 EDC/souf-NHS 即得到表面羧基活化的 PLGA 纳米微球 NP-COOH,而使其具有共价结合的能力。以电位分析仪分别测 NP 与 NP-COOH 的表面电位。

1.4 微泡与纳米微球的连接 实验分为 2 组:静电组(MB- NH_2 + NP)、共价静电协同组(MB- NH_2 + NP-COOH),操作步骤相同。取等量超声微泡,用 MES 缓冲液(pH 值 8)漂洗 2 次。取过量微球分散于 MES 缓冲液(pH 值 8),缓慢滴入超声微泡中,冰上轻摇孵育 2 h^[8-10]。然后将 2 组样品移置 4℃冰箱继续孵育。12、24、36、48 h 后,取上层微泡,于光镜下分别观察 2 组的连接效果。

2 结果

2.1 MB- NH_2 一般特性 光镜下可见 MB- NH_2 呈圆形,表面光滑,大小较均一,分布较均匀。Zeta 电位分析仪测得 MB- NH_2 带正电荷,平均 Zeta 电位约

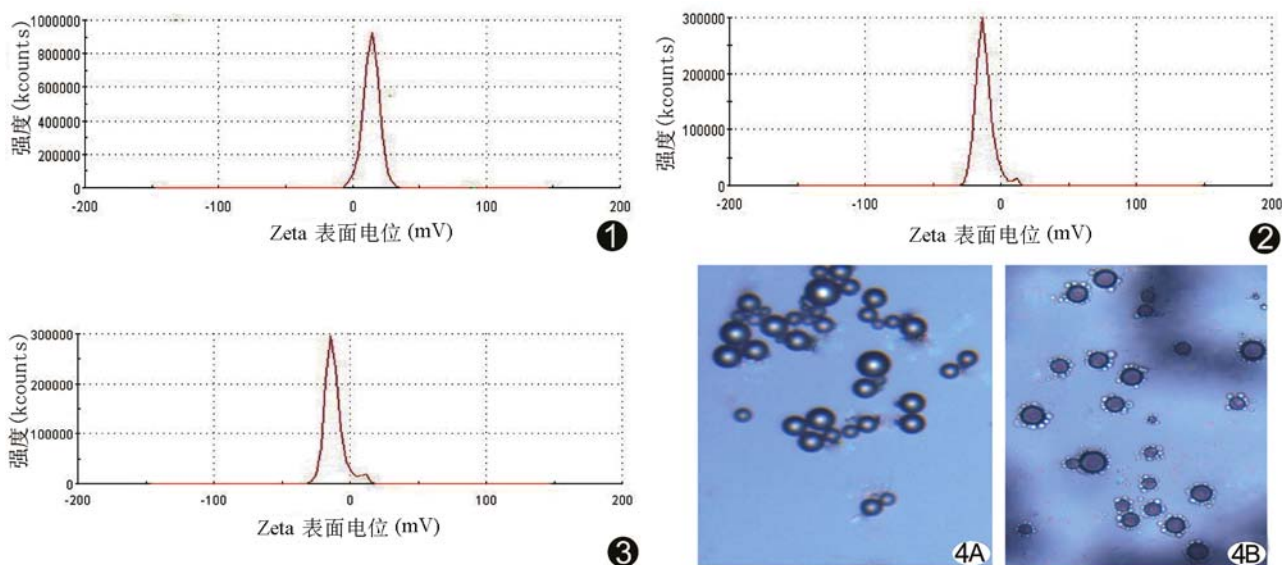


图 1 MB- NH_2 的 Zeta 表面电位图 图 2 NP 的 Zeta 表面电位图 图 3 NP-COOH 的 Zeta 表面电位图 图 4 光镜下超声微泡与纳米微球的连接情况($\times 400$) A. 静电组超声微泡周围未见纳米微球的聚集; B. 共价静电协同组可见超声微泡表面不光滑,周围布满数量不等的小圆形的纳米微球,呈花环状

(14.00 ± 6.06)mV(图 1)。

2.2 NP 与 NP-COOH 的一般特性 光镜下 NP 与其活化后得到的 NP-COOH 在形态大小分布上无明显区别。Zeta 电位分析仪测得 NP 与 NP-COOH 电位无明显差别,其中 NP 平均 Zeta 电位约(-12.38 ± 5.90) mV(图 2), NP-COOH 平均 Zeta 电位约(-12.79 ± 5.70)mV(图 3)。

2.3 微泡与纳米微球的连接效果 12、24 h 后,在光镜下 2 组微泡周围都未见纳米微球聚集,36 h 后静电组超声微泡周围未见纳米微球的聚集;共价静电协同组视野中部分超声微泡周围可见少量微球聚集。48 h 后静电组超声微泡周围仍未见纳米微球的聚集(图 4A);但共价静电协同组满视野的超声微泡表面不光滑,周围布满数量不等的微球,呈花环状(图 4B)。

3 讨论

随着 TDDS 的发展,超声微泡与 PLGA 纳米微球已成为理想的药物载体。超声波破坏微泡造影剂可以增强空化效应,使药物在靶点定位释放和提高治疗效果。但由于微泡的中心为惰性气体,外壳为菲薄的脂膜,其载药量十分有限;微泡体内稳定性较差,在体内受到血流剪切力和温度的影响,易被破坏。而 PLGA 纳米微球具有适当的粒径,在尺度上下降 3 个数量级时,表面积可提高 6 个数量级(100 万倍),具有较高的载药量;在体内具有较好的生物相容性与稳定性,可缓释药物,较长时间维持血药浓度,延长作用时间。

本实验将结合超声微泡与 PLGA 纳米微球作为药物载体的自身优势,互相补助,扬长避短,制备一种新型高效的靶向给药系统。实验中所用的 PLGA 材料上含有羧基,经过耦联活化剂的作用,可与带有氨基的微泡通过共价键结合。实验中,静电组 MB-NH₂ 与 NP 虽带不同的电荷,能够相互吸引充分接触,但静电作用十分不稳定,经过多次漂洗后,微泡不能将微球牢固地结合在其表面。共价静电协同组中 MB-NH₂ 与 NP-COOH 在静电作用下相互吸引、充分接触,能让微球表面的活性羧基与微泡表面的氨基发生化学反应牢固结合;光镜下可见超声微泡表面不光滑,周围布满数

量不等的纳米微球。

通过不同组别的对照研究,表明静电作用与共价作用存在各自的优缺点,只有两种作用同时存在才能成功并牢固地结合超声微泡和 PLGA 纳米微球,制备出一种新型的药物载体,可提供一种新的靶向给药途径,为肿瘤治疗拓展新思路。

[参考文献]

- [1] Bekeredjian R, Kroll RD, Fein E, et al. Ultrasound targeted microbubble destruction increases capillary permeability in hepatomas. *Ultrasound Med Biol*, 2007, 33(10):1592-1598.
- [2] Bekeredjian R, Kuecherer HF, Kroll RD, et al. Ultrasound-targeted microbubble destruction augments protein delivery into testes. *Urology*, 2007, 69(2):386-389.
- [3] 汪朝霞, 王志刚. 超声微泡造影剂携基因或药物治疗研究. *中国介入影像与治疗学*, 2006, 3(4):306-308.
- [4] Diao YY, Han M, Ding PT, et al. DOX-loaded PEG-PLGA and Pluronic copolymer composite micelles enhances cytotoxicity and the intracellular accumulation of drug in DOX-resistant tumor cells. *Pharmazie*, 2010, 65(5):356-358.
- [5] Danhier F, Lecouturier N, Vroman B, et al. Paclitaxel-loaded PEGylated PLGA-based nanoparticles: in vitro and in vivo evaluation. *J Control Release*, 2009, 133(1):11-17.
- [6] Cheng J, Teply BA, Sherifi I, et al. Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Biomaterials*, 2007, 28(5):869-876.
- [7] 冉海涛, 任红, 王志刚, 等. 一种新型高分子聚合材料微泡超声造影剂的制备与体外显影实验. *中华超声影像学杂志*, 2005, 14(10):774-776.
- [8] Kocbek P, Obermajer N, Cegnar M, et al. Targeting cancer cells using PLGA nanoparticles surface modified with monoclonal antibody. *J Control Release*, 2007, 120(1-2):18-26.
- [9] Liu J, Li J, Rosol TJ, et al. Biodegradable nanoparticles for targeted ultrasound imaging of breast cancer cells in vitro. *Phys Med Biol*, 2007, 52(16):4739-4747.
- [10] Acharya S, Dilnawaz F, Sahoo SK. Targeted epidermal growth factor receptor nanoparticle bioconjugates for breast cancer therapy. *Biomaterials*, 2009, 30(29):5737-5750.