

纳米羟基磷灰石/硫酸钙复合人工骨顺铂缓释系统 注射液的制备与研究*

郑燕科, 张春强, 汤燕飞, 余佳明, 江 摩[△], 汤善华(解放军第 184 医院, 江西鹰潭 335000)

【摘要】目的 研制可注射 α -CSH-nano-HA/PHBV-PEG 顺铂释药系统, 为骨转移瘤提供新型的局部药物缓释系统。**方法** α -CSH-nano-HA/PHBV-PEG 载顺铂制成可注射用 α -CSH-nano-HA/PHBV-PEG cis-platinum 缓释微球, 研究其结构、释药特性、可注射性以及力学性能。**结果** (1) 第 1、3、5、7 天缓释微球的释药浓度分别为 97.5、90.7、83.2、68.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 第 7 天后趋于稳定。(2) 可注射 α -CSH-nano-HA/PHBV-PEG 顺铂释药系统在液固比为 0.7 时可注射性强, 与此同时缓释药系统随着液固比的增大凝固时间延长。**结论** α -CSH-nano-HA/PHBV-PEG 顺铂释药系统具有良好的注射性能和缓释作用。

【关键词】 α -半水硫酸钙; 顺铂; 局部药物缓释系统

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.01.008 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)01-0019-03

Preparation and study of α -CSF-nano-(HA)/ PHBV-PEG cis-platinum sustained release system injection* ZHENG

Yan-ke, ZHANG Chun-qiang, TANG Yan-fei, YU Jia-ming, JIANG Mo[△], TANG Shan-hua (184 Hospital of PLA, Yingtan, Jiangxi 335000, China)

【Abstract】Objective To research and prepare of α -calcium sulfate hydrate(CSH)-nano-hydroxyapatite(HA)/PHBV-PEG cis-platinum drug release system to provide the new type local drug sustained release system for metastatic bone tumor. **Methods** Cis-platinum was loaded into n-HA by the ion exchange method. The drug loaded n-HA was mixed with CSH(1 : 1) and coated with compomer poly(3-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate)(PHBV) and polyethylene glycol(PEG). The injectable α -CSH-nano-HA/PHBV-PEG cis-platinum sustained release microspheres were prepared. The release characteristics, injectability and mechanical property were researched. **Results** (1) The drug release concentration of the sustained release microspheres on 1, 3, 5, 7 d the cis-platinum concentration was 97.5, 90.7, 83.2, 68.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively, and then the concentration trended to be stabilized. (2) When the liquid/solid ratio was 0.7, the injectable α -CSH-nano-HA/PHBV-PEG cis-platinum drug delivery system has a strong injectability. At the same time the coagulation time was extended along with the increase of liquid/solid ratio. **Conclusion** The α -CSH-nano-HA/PHBV-PEG cis-platinum drug delivery system has the better in vitro releasing effect and injection property.

【Key words】 α -calcium sulfate hemihydrate; cis-platinum; drug delivery system

局部药物缓释系统(DDS)因其能在局部达到较高的药物浓度, 同时血药浓度低, 不良反应小, 为治疗骨转移瘤提供了有效的治疗用途^[1-3]。羟基磷灰石(HA)作为新型生物材料问世以来, 引起了材料学科和医学界的广泛兴趣。HA 因其化学成分和晶体结构与人体骨骼组织的主要无机矿物成分基本相同, 引入人体后不会产生排异反应, 故其作为骨修复替代材料在国内外广泛应用^[4]。其已被动物实验及临床研究证实具有无毒、无刺激性、良好的生物活性、生物相容性及骨传导性、较高的机械强度及化学性质稳定等特点^[5]。而纳米级羟基磷灰石(nano-HA)与半水硫酸钙(CSH)复合体作为一种新型骨修复材料, 无需二次手术其可行性已经得到证实^[2]。本研究采用具有生物活性的 nano-HA 作为载体, 外包装生物相容性好且可以降解的聚羟基丁酸酯-羟基戊酸酯共聚体/聚乙二醇(PHBV/PEG), 承载顺铂(cis-platinum), 制成 nano-HA/PHBV-

PEG cis-platinum 微球, 再将 nano-HA/PHBV-PEG cis-platinum 与 α -CSH 复合, 作为人工骨材料, 对其注射性能、凝固时间、药物释放等进行研究, 以了解其实际应用的可行性和科学性。

1 材料与方法

1.1 材料 α -CSH(来自 Sigma 公司, γ 射线照射灭菌)、二水硫酸钙(CSD)、nano-HA 晶体(南京海泰纳米材料有限公司), 复合材料以 CSD 等为促凝剂, 以生理盐水作为固化液, 液/固比为 0.8, α -CSH 以水为固化液, 液固比为 0.36。聚羟基丁酸酯-羟基戊酸酯共聚体(PHBV)、聚乙二醇(PEG)购自华南理工大学材料科学与工程学院。

1.2 方法

1.2.1 nano-HA-cis-platinum 的制备 以质量比 2 : 1 取 nano-HA、cis-platinum, 均匀混合, 加入适量去离子水, 超声波

* 基金项目: 南京军区科技创新课题(08Z017); 江西省科技计划项目(2012BBG70038)。

作者简介: 郑燕科, 男, 主治医师, 硕士, 主要从事骨肿瘤基础与临床研究。 [△] 通讯作者, Email: jiangmoqq123@163.com。

分散 25 min, 在 26 °C 磁力搅拌 72 h。用去离子水离心洗涤 3 次, 浆液于 -80 °C 冻干, 磨成粉末, 得白色冻干粉 nano-HA-cis-platinum^[6]。

1.2.2 载药 nano-HA/PHBV-PEG cis-platinum 微球的制备

将 nano-HA-cis-platinum 白色冻干粉分散于含 PHBV 的二氯甲烷中(冻干粉与 PHBV 的质量比为 1:4), 并加入 PEG 20000(PEG20000 和 PHBV 的质量比为 2:1)。然后迅速加入外相水中, 其中含 0.4% 甲基纤维素(4 g/L w/v), 油相与水相的体积比为 1:10。剧烈搅拌至二氯甲烷完全挥发, 以 4 000 r/min 离心 15 min, 过滤, 水洗, 收集固体冷冻干燥, 环氧乙烷消毒备用^[7]。

1.2.3 电镜观察 将少量 nano-HA、nano-HA-cis-platinum、

nano-HA/PHBV-PEG cis-platinum 微球加入无水乙醇溶液中震荡 15 min, 然后将悬浮液移到带微栅膜的铜网上, 乙醇挥发。用 JEOL JEM-2100 高分辨透射显微镜进行分析。nano-HA/PHBV-PEG cis-platinum 微球铺于铝箔的黏性表面, 微球表面涂金, 扫描电镜观察微球大小和表面形态。

1.2.4 nano-HA 载药效果的测定以及复合材料体外释药实验

取 cis-platinum、纯 nano-HA 以及载药 nano-HA 各 20 mg 的样品, 溶于 1 mL 的二氯甲烷, 加入 5 mL 的 PBS 溶液剧烈震荡 10 min, 静置 1 h, 然后取上清液, 衍生法紫外 100~400 nm 全波段扫描, 先确定 cis-platinum 的特征吸收峰为 254 nm, 再对比纯 nano-HA 以及载药 nano-HA 在 254 nm 处是否存在差异, 以确定 cis-platinum 是否已经载入 nano-HA。在 cis-platinum 的特征吸收峰处运用紫外分光光度计(UV)检测不同浓度 cis-platinum 的吸光度, 并制作标准曲线和回归方程。将制得载药复合材料 90 mg 室温下浸泡于 20 mL 生理盐水中, 浸泡 24 h。吸除浸出液, 用 PBS 冲洗 3 次, 更换 PBS 液, 继续浸泡。于第 1、3、5、7、10、14、21、28 天分别取样, 每次取 5 mL 浸泡液作为检测样品, 同时加入 5 mL 新的生理盐水, 用 UV 检测计算释放药物的质量并绘制释药曲线。

1.2.5 可注射 α -CSH-nano-HA/PHBV-PEG cis-platinum 的

制备 取 20 mL 无菌注射器, 样品分为两组, 载药组和未载药组。1.0 g nano-HA/PHBV-PEG cis-platinum 微球或者 1.0 g nano-HA/PHBV-PEG 微球, 1.0 g α -CSH, 0.05 g CSD。以生理盐水为固化液, 并按液固比加入固化液并搅拌, 加入固化液开始计时。迅速搅拌均匀, 1 min 将浆体注入模具内, 并按照相关标准进行评价材料经过注射器的注射性能, 同时评价样品在不同液固比(mL/g)下的注射性能^[8]。液固比值分别设定如下: 载药组 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7; 未载药组 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8。30 s 注射 1 次, 当浆液在注射器上无法注射时定义为凝固时间。

1.2.6 释放曲线绘制 以标准曲线计算各时间点药物浓度,

用 GraphPad Prism 5 绘制 nano-HA/PHBV-PEG cis-platinum 释药浓度与时间关系曲线。

1.2.7 人工骨材料注射效果评价标准 人工骨材料注射效果

评价标准分为佳、可、勉强、差和极差 5 个等级。佳: 注射顺利稳定, 材料流畅顺利通过针头; 可: 注射属顺利但需要施加一定推动力; 材料稳定通过针头; 勉强: 需要较大推动力方可注射, 材料不能稳定通过针头; 差: 需要大力方可将材料从针筒推出, 材料在针管中频繁受阻, 注射流量极不稳定; 极差: 材料很难注

射或完全无法注射。

2 结 果

2.1 电镜观察结果 透射镜下可见 nano-HA 为纳米相晶体颗粒, 尺寸为 30~60 nm(图 1)。

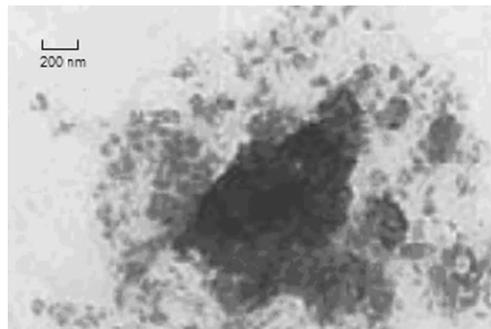
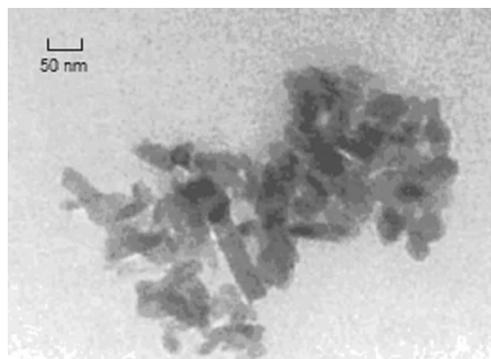


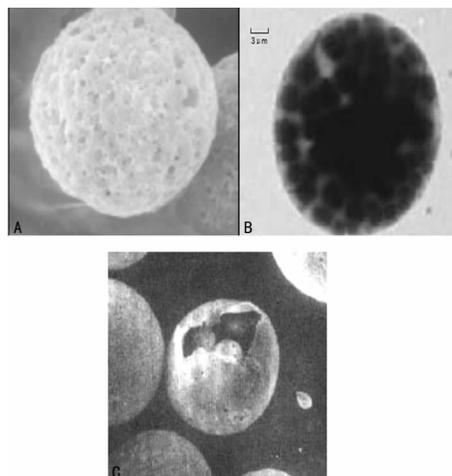
图 1 nano-HA 呈短棒状(透射电镜 200K)

nano-HA-cis-platinum 由于晶体的凝聚和表面吸附 cis-platinum 以及 cis-platinum 颗粒叠加在一起形成二次颗粒大小在 100~300 nm, 平均粒径为 199.5 nm(图 2)。



注: 表面吸附大量 cis-platinum。

图 2 nano-HA-cis-platinum 呈晶体自然凝聚状态



注: A 为 nano-HA/PHBV-PEG cis-platinum 微球(扫描电镜 \times 500); B 为高分辨透射显微镜 nano-HA/PHBV-PEG cis-platinum 形态; C 为 PHBV-PEG cis-platinum 微球。

图 3 nano-HA/PHBV-PEG cis-platinum 微球与 PHBV-PEG cis-platinum 微球形态

高分辨透射显微镜以及扫描电镜下可见 nano-HA/PHBV-PEG cis-platinum 微球大小均匀, 表面形态一致, 为多孔皱缩结构, 平均粒径为 55.4 nm, PHBV-PEG 形成缓释膜。微球

破裂后大微球里面有大量小微球,小微球平均粒径为 8.1 nm (图 3)。

2.2 复合材料体外释药效果测定 经实验证实 cis-platinum 的特征吸收峰在 254 nm,而未载药的 nano-HA 在此处没有特征吸收峰(图 4)。

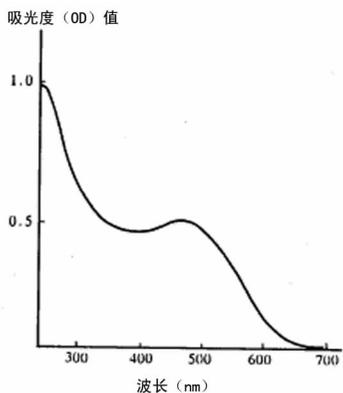


图 4 cis-platinum 的紫外吸收光谱

在 254 nm 处测定 10、20、40、60、80、100 $\mu\text{g/mL}$ cis-platinum 的吸光度,得到 cis-platinum 的标准曲线,并得其回归方程 $Y=0.0138X+0.212$, $R^2=0.982$ (X 为样品浓度, Y 为吸光度)(图 5)。

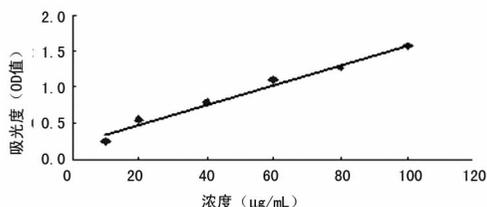


图 5 cis-platinum 的标准曲线

第 1、3、5、7 天缓释微球的释药浓度分别为 97.5、90.7、83.2、68.5 $\mu\text{g/mL}$,第 10 天后趋于稳定,体现出缓释微球良好的缓释性能,见图 6。

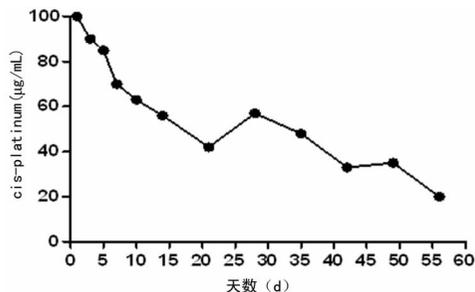


图 6 nano-HA/PHBV-PEG cis-platinum 的释药曲线

表 1 未载药组和载药组不同液固比下的注射性能以及凝固时间

项目	未载药组(mL/g)					载药组(mL/g)				
	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7
注射性能	差	勉强	勉强	可	佳	差	差	勉强	可	佳
凝固时间(min)	3	5	6	12	23	2	3	7	15	25

2.3 注射性能以及凝固时间 生理盐水作为固化液,对于未

载药组,液固比(mL/g)为 0.4 时不能注射,而液固比为 0.5、0.6 时可以勉强注射,为 0.7、0.8 时可以注射,0.8 时最佳。对于载药组而言,液固比(mL/g)为 0.3、0.4 时不能注射,0.5 时勉强可以注射,0.6、0.7 时可以注射,0.7 时最佳。凝固时间随着液固比的变大而变长。见表 1。

3 讨论

α -CSH-nano-HA/PHBV-PEG-cis-platinum 释药系统以 α -CSH 为支架,nano-HA 为载药核心,外包装可生物降解的 PHBV 及 PEG 高分子化合物而形成的,其较一般的局部药物缓释系统有不同的特性,良好的药物缓释功能,药物爆释不明显^[9]。这是由其结构及组成所决定的。nano-HA//PHBV-PEG-硫酸庆大霉素微球存在大微球包裹小微球的结构,形成了多级缓释膜,膜表面存在大小不等的微米级或纳米级的孔隙^[10],保证水分的进入和药物的稀释;nano-HA 的表面效应,吸附药物能力强;nano-HA 尺寸效应,nano-HA 之间纳米级通道;外包装降解可调控的高分子聚合物 PHBV 及 PEG,并以 α -CSH 为支架^[11]。

HA 和 CSH 都是公认的优良成骨材料。有实验证明 CSH/HA 复合人工骨具有良好的微孔性是各种蛋白药物的合适载体^[6]。1987 年 Frame 等尝试将它们复合以改善单一 HA 材料注射性能不佳的缺点。实验发现,两材料复合用于犬下颌骨缺损修复,获得了协同的成骨活性:这种复合材料不仅塑形性和充填性满意,其成骨性能甚至与 HA 自体骨相当^[7]。Shigeru 等将这种复合物注射于兔胫骨骨髓内,4 周后即见新骨形成,8 周已十分明显。研究所用的复合人工骨系 nano-HA 与 CSH 组成,nano-HA 的晶体尺度与天然骨接近,具有更好的理化及生物学性能,动物实验已发现该复合物降解时间适当,具有良好的成骨活性^[9]。

本研究研制了一种具有 α -CSH/nano-HA 与 PHBV/PEG 复合体材料的药物缓释系统,这样的药物缓释系统使得顺铂的释药时间延长,从 nano-HA/PHBV-PEG cis-platinum 的释药曲线可以看出药物突释不明显。而且在合适的液固比下,药物具有良好的注射性能。与普通的 nano-HA/PHBV-PEG 缓释系统相比,本研究的缓释系统采用 α -CSH/nano-HA 复合人工骨,使得顺铂缓释系统具有了比较良好的成骨活性。本研究使传统的抗肿瘤药物顺铂兼具药物缓释性能以及缓释系统的良好成骨性能,为骨转移瘤的治疗提供了更为广阔的应用前景。

参考文献

[1] Fu J, Shen J, Gao G, et al. Natural polyphenol-stabilised highly Cross linked UHMWPE with high mechanical properties and low wear for joint implants[J]. J Mater Chem B, 2013, 23(11):4727-4735.
 [2] Luciani A, Coccoli V, Orsi S, et al. PCL microspheres based functional scaffolds by bottom-up approach with predefined microstructural properties and release profiles [J]. Biomaterials, 2008, 29(36):4800-4807.
 [3] Wang L, Weng L, Song S, et al. Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanoparticles with various counterions as templates[J]. J Ceramic Society of Japan, 2010, 118(12):1195-1198. (下转第 25 页)

现, RSA 患者绒毛和蜕膜中 Treg/Th17 比值明显低于正常对照组。Th17 和 Treg 细胞来自同样的前体细胞, 原始 CD4⁺ T 细胞在 TGF-β 和 IL-6 刺激下分化为 Th17 细胞而在 TGF-β 刺激下分化为 Treg 细胞; 同时 Treg 细胞转录因子 Foxp3 和 Th17 细胞转录因子 RORγt 能够相互抑制对方的功能。因此, 本研究结果提示, Treg/Th17 平衡失调与自发性流产的发生有关。

总之, 本研究结果表明绒毛和蜕膜中 Treg/Th17 数量和功能平衡在维持正常妊娠中发挥重要作用, 绒毛和蜕膜中 Treg/Th17 数量和功能失衡可能参与 RSA 免疫发病机制。探讨绒毛和蜕膜中 Treg/Th17 细胞数量和功能平衡与 RSA 发病机制的关系, 将可能为诊断和治疗 RSA 的治疗提供理论和实验依据。

参考文献

[1] Bubanovic IV. Induction of thymic tolerance as possibility in prevention of recurrent spontaneous abortion[J]. Med Hypotheses, 2003, 60(4): 520-524.

[2] Peiser M. Role of Th17 cells in skin inflammation of allergic contact dermatitis[J]. Clin Dev Immunol, 2013, 2013: 261037-261039.

[3] Galati D, De Martino M, Trotta A, et al. Peripheral depletion of NK cells and imbalance of the Treg/Th17 axis in idiopathic pulmonary fibrosis patients[J]. Cytokine, 2014, 66(2): 119-126.

[4] Wang WJ, Liu FJ, Qu HM, et al. Regulation of the expression of Th17 cells and regulatory T cells by IL-27 in patients with unexplained early recurrent miscarriage[J]. J Reprod Immunol, 2013, 99(1/2): 39-45.

[5] Lin QD, Qiu LH. Pathogenesis, diagnosis, and treatment of recurrent spontaneous abortion with immune type[J]. Front Med China, 2010, 4(3): 275-279.

[6] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data

by the comparative C(T) method[J]. Nat Protoc, 2008, 3(6): 1101-1108.

[7] Gobert M, Lafaille JJ. Maternal-fetal immune tolerance, block by block[J]. Cell, 2012, 150(1): 7-9.

[8] Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, et al. Regulatory T cells and immune tolerance[J]. Cell, 2008, 133(5): 775-787.

[9] Yin Y, Han X, Shi Q, et al. Adoptive transfer of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells for prevention and treatment of spontaneous abortion[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2012, 161(2): 177-181.

[10] Wang BL, Su H, Chen Y, et al. A role for trichosanthin in the expansion of CD4CD25 regulatory T cells[J]. Scand J Immunol, 2010, 71(4): 258-266.

[11] Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, et al. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H) 17 cells[J]. Nature, 2008, 454(7202): 350-352.

[12] Qi W, Huang X, Wang J. Correlation between Th17 cells and tumor microenvironment[J]. Cell Immunol, 2013, 285(1/2): 18-22.

[13] Zhao L, Tang Y, You Z, et al. Interleukin-17 contributes to the pathogenesis of autoimmune hepatitis through inducing hepatic interleukin-6 expression[J]. PLoS One, 2011, 6(4): e18909.

[14] Wang WJ, Hao CF, Yi L, et al. Increased prevalence of T helper 17(Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients[J]. J Reprod Immunol, 2010, 84(2): 164-170.

[15] 杨小猛, 赵丹, 陈书恩, 等. CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞、TGF-β 和 IL-10 在反复自然流产中的变化[J]. 医药论坛杂志, 2011, 32(12): 19-21.

(收稿日期: 2014-05-03 修回日期: 2014-09-21)

(上接第 21 页)

[4] Wong KL, Wong CT, Liu WC, et al. Mechanical properties and in vitro response of strontium-containing hydroxyapatite/polyetheretherketone composites[J]. Biomaterials, 2009, 30(23/24): 3810-3817.

[5] 王雪毓, 陈玲, 苏健裕, 等. 高直链玉米淀粉对聚己内酯组织工程支架结构和性能的影响[J]. 华南理工大学学报, 2009, 37(12): 18-22.

[6] 王杨, 胡金莲. 抗感染纳米羟基磷灰石局部药物缓释微球的研制及体外释药实验[J]. 家庭医药: 医药论坛, 2010, 2(11): 818-820.

[7] 章柏平, 汤善华, 张立, 等. 可塑性纳米羟基磷灰石/聚羟基丁酸酯-羟基戊酸酯共聚物-聚乙二醇释药系统治疗兔骨髓炎[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(21): 3871-3876.

[8] 杨春丽, 刘金辉, 蔡旗. 热毒宁注射液联合盐酸氨溴索注射液佐治婴幼儿毛细支气管炎的疗效观察[J]. 中国医药指南, 2013, 11(33): 199-200.

[9] 曹耿华, 毕衍泽, 陈民芳, 等. 骨折内固定用新型 Mg-Zn-Ca/HA 复合材料的成分、组织结构与性能[J]. 稀有金属材料与工程, 2013, 42(8): 1633-1637.

[10] Peng QY, Cong PH, Liu XJ, et al. The preparation of PVDF/clay nanocomposites and the investigation of their tribological properties[J]. Wear, 2009, 266: 713-720.

[11] Kim HJ, Kim UJ, Kim HS, et al. Bone tissue engineering with premineralized silk scaffolds[J]. Bone, 2008, 42(6): 1226-1234.

(收稿日期: 2014-04-24 修回日期: 2014-09-19)