

雷帕霉素纳米粒子的制备、表征及其在移植静脉内的作用

邹君杰 张文丽 杨宏宇 马昊 章希炜

【摘要】 目的 制备雷帕霉素(RAPA)-聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)-纳米粒子(NPs),评价其表征及在移植静脉内药物释放特性。方法 采用乳化蒸发法制备 RAPA-PLGA-NPs,测定 RAPA-PLGA-NPs 形态、粒径、分布及包封率。透析袋法检测体外药物释放,高效液相色谱法测定移植前、移植后 7 d 和 21 d 时组织中 RAPA 的含量。结果 RAPA-PLGA-NPs 呈球形,粒径 180.3 nm,多分散指数 0.0458,包封率 87.31%。体外药物持续缓慢释放,21 d 时药物释放为总量的 80.2%。移植前、移植后 7 d 和 21 d 的 RAPA 组织浓度分别为(5.4±0.9) μg/g、(1.3±0.2) μg/g 和(0.9±0.1) μg/g。结论 RAPA-PLGA-NPs 包封率高、粒径小、范围窄,可长时间滞留于移植静脉并释放包载药物,在组织中维持较高的药物浓度。

【关键词】 雷帕霉素;聚乳酸-羟基乙酸共聚物;纳米粒子

【中图分类号】 R543 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 0253-3685(2012)02-0146-03

Preparation and characterization of rapamycin nanoparticles and its effect in vein graft ZOU Junjie, ZHANG Wenli, YANG Hongyu, et al. Department of Vascular Surgery, First Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, CHINA

【Abstract】 Objective To prepare a rapamycin(RAPA)-poly lactic-co-glycolic acid (PLGA)-nanoparticles(NPs) and assess its characterization and drug release characteristics in the vein graft. **Methods** RAPA-PLGA-NPs were prepared by emulsification-evaporation technique, and its morphology, grain size, distribution and encapsulation efficiency were analyzed. The drug release in vitro was detected by bag filter method. On the 0, 7th and 21st day after grafting, the contents of RAPA in the tissues were measured by high-performance liquid chromatography. **Results** The RAPA-PLGA-NPs were spherical with a grain size of 180.3 nm, polydispersity index of 0.0458 and encapsulation efficiency of 87.31%. The drug in vitro was continuously released with approximately 80.2% of total amount on the 21st day. The concentrations of RAPA on the 0, 7th and 21st day were (5.4±0.9) μg/g, (1.3±0.2) μg/g and (0.9±0.1) μg/g, respectively. **Conclusion** RAPA-PLGA-NPs have the characteristics of high encapsulation efficiency, small grain size and narrow range, and can stagnate in the vein graft with continuous drug release to maintain a high concentration in the tissues.

【Key words】 Rapamycin; Poly lactic-co-glycolic acid; Nanoparticle

[Jiangsu Med J, January 2012, 38(2):146-148.]

自体静脉移植是治疗下肢动脉闭塞和冠心病的有效方法,但是移植静脉狭窄甚至闭塞常导致治疗的失败。静脉壁内膜的增生是移植后狭窄的主要原因。雷帕霉素(RAPA)是一种高效的内膜增生抑制剂,利用血管支架作为 RAPA 缓释载体,能有效预防冠状动脉支架术后再狭窄。本研究以可生物降解高分子材料聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)共聚物作载药基质,通过纳米级粒化技术制备包载 RAPA-PLGA-纳米粒子(NPs)并建立大鼠颈静脉-颈动脉移植模型,观察该药物在体内的释放特性,进

而探讨其治疗移植静脉增生疾病的应用前景。

材料与amp;方法

一、材料

SD 大鼠(350-450 g)购自上海史莱克实验动物有限公司。RAPA 购自美国 Sigma 公司;PLGA (50:50,分子量 2000)购自山东岱罡生物公司;激光散射粒度测定仪(Zetasizer 3000, Malvern 公司);透射电镜(Jeol JEM-1010,日本)。

二、方法

1. RAPA-PLGA-NPs 的制备 称取 PLGA 75 mg 及 RAPA 2 mg,溶于 3 ml 二氯甲烷中,待完全溶解后,在 1500 r/min 的磁力搅拌下,滴入 20 ml 1%的

聚乙烯醇溶液中。磁力搅拌 1 h, 随后探头超声 (250 W) 4 min, 40℃ 减压蒸发 1 h 除去有机溶剂, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 得纳米粒混悬液。

2. RAPA-PLGA-NPs 的表征 取新鲜 RAPA-PLGA-NPs 溶液 1 滴, 滴至覆有支持膜的铜网上干燥 2-3 min, 透射电镜观察 NPs 的形态。取新鲜的 RAPA-PLGA-NPs 溶液加去离子水稀释到适当浓度, 用激光散射粒度测定仪测定其粒径平均大小及分布, 动态光散射软件对数据进行处理。采用透析法测定药物的包封率, 8 h 后测定释放介质中游离药物的含量, 根据以下公式计算药物的包封率: $EE = (1 - C/C_0) \times 100\%$, 其中 EE 为包封率, C 为释放的游离药量, C_0 为总药量。

3. 体外药物释放实验 取 6 ml NPs 混悬液, 装入透析袋中, 扎紧透析袋后放入 120 ml 浓度为 0.5% 的十二烷基硫酸钠 (SLS) 溶液中, 在 37℃、300 r/min 下透析, 于不同时间点取出 500 μl 介质溶液, 分光光度计测量 RAPA 浓度, 得 NPs 中药物的累积释放率。

4. 体内药物释放实验 SD 大鼠颈静脉动脉移植模型: 取大鼠颈部正中切口, 游离外侧颈外静脉, 留取主干约 1 cm, 所取静脉段浸入含有 RAPA 浓度为 50 μg/ml RAPA-PLGA-NPs 的培养液 1 ml 中, 室温下浸泡 30 min, 然后将浸泡后的静脉采用套管法移植入同侧颈动脉。组织中 RAPA 浓度测定: 分别取植前、植入后 7 d 及 21 d 移植静脉, 采用高效液相色谱法测定静脉组织中的 RAPA 浓度, 每个时间点 5 只动物。色谱柱为 Alltech C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 预柱为 Alltech C18 (7.5 mm × 4.6 mm, 5 μm)。流动相为乙腈: 四氢呋喃: 水 (55: 5: 40); 检测波长为 277 nm, 流速为 1.2 ml/min, 柱温 60℃。

三、统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析, 计量资料均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 线性回归统计高效液相色谱峰面积与药物浓度的关系。

结 果

一、RAPA-PLGA-NPs 的表征及药物包封率

透射电镜观察显示, RAPA-PLGA-NPs 为表面光滑, 圆形球体, 且纳米粒之间无粘连。使用激光散射粒度仪测定 NPs 的粒径为 180.3 nm, 多分散指数为 0.0458, 粒径分布均一, 药物包封率为 87.31%。

二、RAPA 的体外释放

采用透析袋法测得 NPs 中药物的累积释放百

分数并绘制释放曲线, 体外第 1 天药物释放为药物总量的 27%, 随后药物持续缓慢释放, 至 21 d 时药物释放为总量的 80.2% (图 1)。

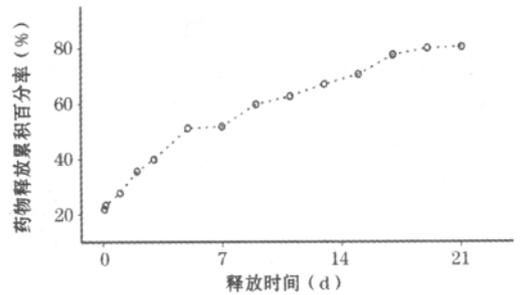


图 1 纳米粒药物的体外释放曲线

三、体内药物释放

组织中 RAPA 浓度测定以 RAPA 峰面积 A 为纵坐标, 药物浓度 C 为横坐标进行线性回归。回归方程为: $A = 4.4481C + 5.4082 \times 10^{-3}$, $r = 0.9995$ 。在 4-128 ng/ml 范围内线性良好, 植入前、植入后 7 d 及 21 d 药物浓度分别为 $(5.4 \pm 0.9) \mu\text{g/g}$ 、 $(1.3 \pm 0.2) \mu\text{g/g}$ 及 $(0.9 \pm 0.1) \mu\text{g/g}$ 。

讨 论

雷帕霉素 (RAPA) 是一种高效的内膜增生抑制剂, 除抑制血管平滑肌细胞增殖外, RAPA 同时可以抑制平滑肌细胞的迁移。利用血管支架作为药物缓释载体, 能有效预防冠状动脉支架后再狭窄^[1]。胡新华等^[2]研究发现, 在大鼠颈静脉-腹主动脉移植模型中, 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 及其底物在移植后 14 d 升至最高, 约 8 周后逐步恢复至正常水平, 提示 RAPA 可能是防治血管移植后狭窄闭塞的有效药物。Schachner 等^[3]用聚乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物为 RAPA 载体涂抹于小鼠移植静脉周围, 对内膜增生有一定的抑制作用, 但是该共聚物为载体药物释放时间短, 植入体内 7 d 有 80% 的药物释放, 不能完全满足抑制早期内膜增生的需要。新型的可生物降解 PLGA 纳米控释载药制剂能显著改善药物穿透组织能力、再分布时程和滞留时间^[4]。Kimura 等^[5]利用聚乙二醇-PLGA-NPs 携带伊马替尼 (一种血小板衍生因子酪氨酸激酶抑制剂), 通过体外作用移植静脉, 明显抑制兔颈静脉移植后的内膜增生; 而此前的动物实验中, 通过口服常规剂量的该药物对兔颈静脉移植后的内膜增生没有抑制作用。Mei 等^[6]的动物研究证实, 动脉内球囊扩张后局部灌注紫杉醇 NPs 能有效的抑制动脉损

伤后的内膜增生。因此, RAPA-PLGA-NPs 有望成为治疗移植静脉狭窄闭塞的新方法。

移植静脉对纳米药物的吸收过程是实现高效能移植静脉给药的第一道障碍, 对血管内壁吸附能力差和易于解吸附的药物在移植至动脉循环后在短时间内即被血流迅速清除。有类似的关于动脉内局部给药的研究显示, 一次性给予 100-200 nm 的 PLGA-NPs 动脉内局部灌注, 生理盐水洗脱 30 min 后动脉组织中 NPs 含量由 $(4.25 \pm 0.21) \mu\text{g}/\text{mg}$ 降至 $(0.97 \pm 0.10) \mu\text{g}/\text{mg}$, 而洗脱 60 min NPs 含量并不继续下降, 表明 PLGA-NPs 与血管壁有较强的亲和性, 能够改善药物在血管内的实际吸附量, 从而提高药物在血管壁的穿透性和作用时间, 是血管组织控释给药系统的理想基质^[7]。

纳米载药系统透过血管壁并分布其内的能力与粒径大小成反比例关系, 与药物与血管作用时间成正比。本研究制备的 RAPA-PLGA-NPs 药物包封效率高, 平均粒径为 180.3 nm, 较苗立夫等^[8]制备的 RAPA 纳米微粒小, 且分布范围窄, 是较为理想的血管局部用药纳米载药系统。体外释放实验表明, RAPA-PLGA-NPs 缓释效能好, 其释药时间大于 3 周, 能满足对移植静脉内 mTOR 的持续抑制需要。RAPA 为脂溶性药物, 其扩散释药的速度较低, 有利于长期存留在给药及再分布部位, 更适用于对移植静脉的给药。

纳米载药系统除了在细胞摄取、组织亲和性和穿透能力方面具有独有的优势外, 其药物控释能力也有助于抑制移植静脉内膜增生。通过调节制备参数以及聚合体的组份, 可使包装的治疗药物在 1 周数月内缓慢释放, 有效延长了治疗药物的作用时限。Wilensky 等^[9] 研究显示, $1.14 \mu\text{m}$ 的微粒转导系统可将局部药物维持在可检浓度 7 d; $5 \mu\text{m}$ 的转导体系经动脉腔内给药后, 可在动脉新生内膜、中膜、外膜中检测到, 而且持续 2 周以上。曾勇等^[10] 在球囊损伤兔髂动脉模型上观察了经局部腔内灌注地塞米松-PLGA-NPs 的药代动力学和药效学特征, 结果显示经局部单次灌注 NPs 3 h 后局部组织地塞米松药物浓度 $>5000 \text{ ng}/\text{mg}$ 干重组织, 且药物在局部组织持续 14 d。目前在移植静脉体外给药并间置于动脉循环后的组织药物浓度的研究未见文献报道, 本研究对大鼠颈静脉采用体外 RAPA-PLGA 溶液中浸泡 30 min 后再进行静脉-动脉移植, 植入第 1 周药物浓度下降较快, 与血流的冲刷和纳米药物突释有

关, 而随后药物浓度下降缓慢, 推测药物消除速率明显下降考虑与血管外膜、中膜对药物清除的保护作用和 PLGA 纳米药物自身的缓释效能有关。文献报道, RAPA 血浆浓度维持在 $(59 \pm 12) \text{ ng}/\text{ml}$ 水平 14 d 可有效抑制约克夏自猪冠状动脉损伤后新生内膜增殖^[11]; RAPA 作用 48 h 抑制血小板衍生生长因子诱导的平滑肌细胞迁移初始剂量为 $2 \text{ ng}/\text{ml}$ ^[12]。本研究中 PLGA-NPs 给药后 7、21 d 局部组织药物浓度分别为 $(1.3 \pm 0.2) \mu\text{g}/\text{g}$ 、 $(0.9 \pm 0.1) \mu\text{g}/\text{g}$, 血管局部药物浓度高, 有效作用浓度时程涵盖损伤后血管平滑肌细胞迁移和增殖的始动和高峰期, 能够满足抑制移植静脉内膜增生的治疗需要。

参 考 文 献

- [1] Lagerqvist B, James SK, Stenestrand U, et al. Long-term outcomes with drug-eluting stents versus bare-metal stents in Sweden[J]. *N Engl J Med*, 2007, 356(10): 1009-1019.
- [2] 胡新华, 张强, 杨军, 等. 雷帕霉素靶蛋白及其底物在自体移植静脉中的表达及意义[J]. *中华外科杂志*, 2006, 44(15): 1053-1057.
- [3] Schachner T, Zou Y, Oberhuber A, et al. Local application of rapamycin inhibits neointimal hyperplasia in experimental vein grafts[J]. *Ann Thorac Surg*, 2004, 77(5): 1580-1585.
- [4] Haddadi A, Elamanchili P, Lavasanifar A, et al. Delivery of rapamycin by PLGA nanoparticles enhances its suppressive activity on dendritic cells[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2008, 84(4): 885-898.
- [5] Kimura S, Egashira K, Nakano K, et al. Local delivery of imatinib mesylate (STI571)-incorporated nanoparticle ex vivo suppresses vein graft neointima formation[J]. *Circulation*, 2008, 118(Suppl 14): 65-70.
- [6] Mei L, Sun H, Jin X, et al. Modified paclitaxel-loaded nanoparticles for inhibition of hyperplasia in a rabbit arterial balloon injury model[J]. *Pharm Res*, 2007, 24(5): 955-962.
- [7] 宋存先, 朱振峰, 杨菁, 等. 载药纳米微粒在血管组织中的吸收[J]. *中国医学科学院学报*, 2000, 22(5): 440-443.
- [8] 苗立夫, 杨菁, 黄超群, 等. 雷帕霉素聚乳酸-聚乙醇酸纳米粒子的制备、表征及血管内局部给药效能[J]. *中国医学科学院学报*, 2008, 30(4): 491-497.
- [9] Wilensky RL, March KL, Gradus-Pizlo I, et al. Regional and arterial localization of radioactive microparticles after local delivery by unsupported or supported porous balloon catheters[J]. *Am Heart J*, 1995, 129(5): 852-859.
- [10] 曾勇, 朱文玲, 朱振峰, 等. 纳米粒子携带地塞米松局部腔内注射预防球囊损伤后再狭窄的实验研究[J]. *中国介入心脏病学杂志*, 2001, 9(3): 115-117.
- [11] Gallo R, Padurean A, Jayaraman T, et al. Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by targeting regulators of the cell cycle [J]. *Circulation*, 1999, 99(16): 2164-2170.
- [12] Braun-Dullaeus RC, Mann MJ, Seay U, et al. Cell cycle protein expression in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo is regulated through phosphatidylinositol 3-kinase and mammalian target of rapamycin [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21(7): 1152-1158.