论著

文章编号:1000-5404(2013)07-0614-04

PPLA纳米微球的溶血率与粒径相关性研究

肖 伟[1],王 敏[1],潘 君[2],刘 超[1],张廷秀[2],王 彬[2],钟冬火[2],张晓喜[2],糜 丽[2],刘 颖[2] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院骨科[1];400044 重庆,重庆大学生物工程学院生物材料与仿生工程研究中心[2])

[摘要] **目的** 研究新型聚乙二醇接枝聚乳酸(PPLA)自组装纳米微球浓度、微球粒径对溶血率的影响。**方法** 研究按照国家医疗器械生物学评价ISO10993.1-1997和GB/T16886.1-2001标准和要求进行,采用透析法,用动态激光光散射仪(DLS)进行粒径及Zeta电位检测,制备不同浓度、不同行粒径的PPLA自组装纳米微球。就制备的纳米微球采用水浴法及测量540 nm处光密度值并计算出纳米微球的溶血率。**结果** 随着微球浓度的增加,溶血率增加,粒径为960.8 nm的微球,在浓度为2.0 mg/mL时出现了轻度溶血;相同浓度(1.0 mg/mL或1.5 mg/mL)的微球,随着粒径(200~300 nm)的减小,溶血率增加,但都小于5%,可作注射用;在0.9% NaCl溶液中,PPLA纳米微球的临界溶血浓度为1.5~2.0 mg/mL,在此范围符合国家药物溶血标准。**结论** 纳米药物的纳米效应对其临床应用存在负面影响,粒径在纳米微球的溶血及其他性能评价存在显著影响,相同浓度下,微球的粒径越大,溶血率越小。

[关键词] 纳米微球;溶血;粒径;浓度
[中图法分类号] R944.9; R945 [文献标志码] A

Correlation of hemolysis with particle size of nanoparticles

Xiao Wei[1], Wang Min[1], Pan Jun[2], Liu Chao[1], Zhang Tingxiu[2], Wang Bin[2], Zhong Donghuo[2], Zhang Xiaoxi[2], Mi Li[2], Liu Ying[2] ([1]Department of Orthopedics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; [2]Center of Biomaterials and Bionics Engineering, College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing, 400044, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of concentration and size of self-assembly nanometer microsphere particles made by polyethylene glycol (peg) grafted poly (lactic acid) (PPLA) on hemolysis rate. **Methods** According to the national medical equipment biological evaluation ISO10993.1-1997 and GB/T16886.1-2001 standard and requirement, dialysis was carried out with a dynamic laser light scattering instrument (DLS) to measure particle size and Zeta potential. Different concentrations and particle sizes of PPLA self-assembly nanometer microspheres were prepared. Hemolysis rate of the nanometer microspheres was determined by water bath method and absorption value at 540 nm. **Results** With the increase of the concentration, hemolysis rate of microspheres was increased. For the microspheres in the size of 960.8 nm, they appeared light hemolysis when the concentration was 2.0 mg/mL. For the microspheres at the concentration of 1.0 or 1.5 mg/mL, their hemolysis rate was increased with the decrease of particle size (300 to 200 nm), though less than 5%, indicating that they can be injected. In 0.9% NaCl solution, the critical hemolysis concentration of PPLA nanometer microspheres was 1.5 to 2.0 mg/mL, which was in this range accord of national drug standards hemolysis. **Conclusion** Our research shows the negative effects of the nano drug' nano effect in the clinical application. Particle size exerts remarkable effect on hemolysis and other performance in the nanometer microspheres. When the concentration is same, the larger microspheres are, the lower hemolysis rate is.

[**Key words**] nanoparticle; hemolysis; particle size; density

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30300084). Corresponding author: Wang Min, E-mail: 52solar@sina.cn; Pan Jun, E-mail: panj@cqu.edu.cn

化疗是目前治疗骨肿瘤的主要手段之一,但抗癌药物缺乏对肿瘤部位的特异靶向性,在杀死肿瘤细胞的同时也杀死大量正常组织细胞,患者多不能耐受其严重的毒副作用而终止临床治疗。近年来纳米微球作

[基金项目] 国家自然科学基金(30300084)
[通信作者] 王 敏,E-mail:52solar@sina.cn;潘 君,E-mail:panj@cqu.edu.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130107.1727.005.html (2013-01-07)

为化疗药物载体已引起广泛关注[1-2]。在纳米药物领域,静脉注射是一种主要的给药方式,作为药物载体的纳米微球的生物相容性[3-6]亦备受关注,即将纳米微球应用于载药之前,需要进行一系列的生物学评价,包括血液相容性评价。从目前掌握的文献看,国内外仅关注了药物载体材料本身的血液相容性,而对于载体材料成型后得到的纳米微球的血液相容性评价鲜有报道,而这方面的研究对于纳米微球在抗肿瘤药物载体领域的应用具有决定性意义。本研究就本实验室制备的新型聚乙二醇接枝聚乳酸材料[polyethylene glycol (peg) grafted poly (lactic acid),PPLA][7]形成的自组装纳米微球的红细胞溶血性能进行探讨,包括纳米微球的浓度和粒径对红细胞溶血率的影响,旨在为骨肿瘤化疗纳米药物载体提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

PPLA根据文献[7]自制;0.9% NaCl注射液,西南药业股份有限公司;磷酸钠盐(PBS)缓冲液(0.01 moL/L, pH=7.2),北京中杉金桥公司;盐酸溶液(0.1 mol/L),重庆无机化学试剂厂;其他化学试剂为分析纯。

PC 405D磁力搅拌器,Corning公司;KQ-50B型超声波清洗器,上海科导超声仪器有限公司;动态激光光散射仪,Malvern Nano S90;Lambda900紫外可见近红外分光光度仪,美国Perkin-Elmer公司。

1.2 PPLA纳米微球的制备

参考本研究室建立的方法[8],称取100 mg PPLA,溶于一定体积N, N-二甲基甲酰胺(DMF)中,经超声分散均匀后,滴入9 mL 0.9%的NaCl水相介质中,室温下磁力搅拌(300 r/min)1 h后得到微球乳液。将乳液转移至透析袋中,以0.9%的NaCl为溶出介质,每2小时换1次NaCl溶液,透析24 h去除有机溶剂;并将透析后的乳液定容至4 mg/mL。

同法操作,分别以DMF或四氢呋喃(THF)为有机相,以PBS缓冲液(pH=7.2)或0.01 moL/L盐酸(HCl)溶液为水相介质,以0.9%的NaCl溶液为透析介质分别制备了不同粒径、浓度为1.0 mg/mL和1.5 mg/mL的PPLA纳米微球乳液。

1.3 PPLA微球的粒径及Zeta电位的测定

采用动态激光光散射仪(DLS)进行粒径及Zeta电位检测。

1.4 PPLA纳米微球的浓度对红细胞溶血率的影响

1.4.1 不同浓度的纳米微球溶液的制备 以1.2制备的微球乳液为母液,用0.9% NaCl溶液稀释,分别配置浓度为0.5~4.0 mg/mL的微球乳液,在漩涡器上混合均匀后测试粒径。

1.4.2 2%红细胞悬液的制备[9] 取5 mL健康男性的血液置于25 mL烧杯中,用玻璃棒搅动除去纤维蛋白原,使其成为脱纤维血液,加入10倍体积的0.9% NaCl溶液稀释,摇匀,1 500 r/min离心15 min,弃上清液,沉淀的红细胞再用0.9% NaCl溶液按上述方法洗涤2~3遍,至上清液不显红色为止。将所得的压积红细胞用0.9% NaCl溶液按体积比配置成2%的红细胞悬液。

1.4.3 溶血率检测 取6只洁净的离心管,编号1~3为供试管,4为阴性对照,5为阳性对照,按(表1)所示依次加入2%红细胞悬液、0.9% NaCl溶液或Millipore水、供试品,混匀后立即置(37±0.5)℃恒温水浴锅中温育[9]。3 h后,将试样管放入冰浴中阻止红细胞继续溶血[10],1 500 r/min离心15 min,收集上清液室温下放置30 min使血红蛋白氧化为氧合血红蛋白,用阴性对照上清液为参比,测得540 nm处各试样管上清液中氧合血红蛋白的光密度值[$D(540)$][11]。每个浓度的供试品均按此检查法做3个样。用下式计算各试验管的溶血率:

$$Z=\frac{A_t}{A_{pc}}\times 100\%$$

公式中Z为溶血率,A_t为供试管样$D(540)$值,A_{pc}为阳性对照样$D(540)$值。

设定评判标准[12]为:溶血率百分比 > 5%时,判断该材料具有溶血性,不宜注射使用。

表1 溶血试验测试分组(mL)

样品	2%人红细胞悬液	0.9% NaCl	蒸馏水	供试品溶液
1~3	2.5	2.2	–	0.3
4	2.5	2.5	–	–
5	2.5	–	2.5	–

1.5 PPLA纳米微球的粒径对溶血率的影响

选取前面实验得到的临界溶血浓度范围以下的微球浓度(1.0、1.5 mg/mL),制备了相同浓度、不同粒径的PPLA纳米微球,按1.4.3方法,测试其溶血率。

1.6 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 18.0统计软件进行TTEST检验分析。

2 结果

2.1 PPLA微球的粒径和Zeta电位

依预期目的制备了不同浓度、粒径相近及不同粒径、浓度相同的微球(表2)。同时,微球的Zeta电位为负,电位值均接近或大于30 mV,表明其良好的稳定性。

表2 不同条件下制备PPLA纳米微球的粒径及Zeta电位

样品	浓度 (mg/mL)	制备过程 有机相	制备过程 水相介质	平均粒径 (nm)	分散系数 (PDI)	Zeta电位 (mV)
1	1.0	DMF	0.01 mol/L盐酸	104.0	0.106	-33.26
2	1.0	DMF	PBS缓冲液(pH=7.2)	214.1	0.114	-36.79
3	1.0	THF	PBS缓冲液(pH=7.2)	300.0	0.189	-45.09
4	1.5	DMF	PBS缓冲液(pH=7.2)	225.1	0.195	-33.40
5	1.5	DMF	0.9% NaCl溶液	960.8	0.335	-41.58

DMF:N, N-二甲基甲酰胺;THF:四氢呋喃

2.2 不同浓度PPLA微球的溶血率

从表3可以看出,随着微球浓度的增加,溶血率增加。微球浓度≤1.5 mg/mL,溶血率<5%。微球浓度≥2.0 mg/mL,溶血率>5%,认为此时出现了溶血现象。提示制备的粒径为960.8 nm的PPLA微球,在浓度≥2.0 mg/mL时不宜作注射用。

表3 不同浓度 PPLA 纳米微球的溶血率

材料浓度(mg/mL)	D(540)值	平均溶血率(%)
0.5	0.012 ±0.001	1.23
1.0	0.016 ±0.003	1.70
1.5	0.033 ±0.007	3.52
2.0	0.052 ±0.010	5.53
2.5	0.066 ±0.008	7.07
3.0	0.096 ±0.019	10.2[a]
3.5	0.101 ±0.024	10.8[a]
4.0	0.174 ±0.022	15.6

a: $P<0.05$,与其他 PPLA 浓度微球比较

2.3 不同粒径 PPLA 微球溶血率

根据2.2得到的结果,本实验选取1.0、1.5 mg/mL 2个浓度制备了相同浓度不同粒径的微球,研究粒径对溶血影响。从表4可见,浓度相同时,溶血率随着粒径的增大而减小。相同浓度、不同粒径的纳米微球的溶血率存在显著差异($P<0.05$),均在规定范围内,可作注射用。

表4 不同粒径的 PPLA 纳米微球的溶血率

样品	PPLA 微球浓度 (mg/mL)	平均粒径 (nm)	分散系数 (PDI)	Zeta 电位 (mV)	平均溶血率 (%)
1	1.0	104.0	0.106	-33.26	2.03
2	1.0	214.1	0.114	-36.79	1.06[a]
3	1.0	300.0	0.189	-45.09	0.62[a]
4	1.5	225.1	0.195	-33.44	4.45
5	1.5	960.8	0.335	-41.58	3.52[b]

a: $P<0.05$,与 1.0 mg/mL 最小粒径微球的溶血率比较;b: $P<0.05$,与 1.5 mg/mL 最小粒径微球的溶血率比较

3 讨论

临床上化疗是骨肿瘤治疗中十分重要的手段,是防止复发及彻底治愈骨肿瘤的重要方法。具有缓释、控释和靶向性的纳米药物具有一定治疗优势。本研究以 PPLA 作为一种具有良好生物相容性和明显抗非特异性蛋白吸附的纳米药物载体材料[6],前期研究证实 PPLA 在水中的溶解度低、通过自组装可形成粒径和表面电荷易控的球形纳米微球[7],因而选择它作为研究纳米微球的纳米效应对红细胞溶血的影响模型具有一定的参考价值,同时为 PPLA 在药物缓释领域的应用提供一定的根据。

溶血试验是材料或微球与血红细胞在体外接触过程中,所致红细胞溶解和血红蛋白游离程度的测定方法[13],是血液相容性评价方法中唯一的国家标准方法,溶血率超标,则该医用材料在体内使用时可能引起溶血的不安全因素。该试验能敏感地反映试样对红细胞的影响,故为一特别有意义的材料及微球筛选试验。已有实验观察到,溶血活动与组织培养反应、与体内急性毒性试验都具有高度相关性[13],与材料的形状也相关[14-15]。凝血则是材料与血液相接触时,血液的流动和血管壁状态发生了变化,材料被生物体作为异物而识别,二者界面在发生了一系列复杂的相互作用后所产生的现象[13]。聂宇等[16]提出嵌段共聚物的亲疏水性结合的微相分离结构表面对与血液相容性起到一定的促进作用,PPLA 作为一种聚乙二醇改性两亲聚合物同样具有此特征。

常规溶血实验采用的供试品为医药用材料的浸提液,主要考虑化学影响,而本研究探讨物理影响。首先选择粒径较大的微球,探讨微球浓度的影响,避免小粒径带来的纳米效应,进而在临界溶血浓度范围内,选择相同浓度、不同粒径的小粒径微球,探讨微球粒径的影响。发现 PPLA 纳米微球在 1.5 ~2.0 mg/mL 时出现一定的溶血现象,同时没有发现凝血现象,显示了 PPLA 微球良好的血液相容性,为其作为注射剂型提供了依据。

研究发现,除了 PPLA 纳米微球的浓度外,微球的粒径对溶血率也有显著影响,随着粒径的增大,溶血率下降。Maher 等[17-18]研究发现,表面活性剂对细胞的胞溶作用有两种过程:增溶和渗透,一般情况下认为,在高于表面活性剂的临界胶束浓度下,对细胞胞溶的机制主要是增溶作用,表面活性剂通过形成混合胶束,最终引起全部或部分细胞膜脂质体和蛋白的溶解。PPLA 是一种具有表面活性的两亲性聚合物,其微球溶液中 PPLA 的浓度大于它的临界胶束值;微球与红细胞的接触中,相同的微球浓度下,粒径越小则比表面积越大,与红细胞的接触面积也越大,致使对细胞的增溶概率增大,其溶血率也会更大。由于本研究仅就 PPLA 纳米微球进行探讨,所得结果是否适用于其他生物材料的纳米微球还有待进一步的证实。但是,本研究结果提示,在纳米微球的溶血及其他性能评价时,除了考虑浓度以外,还需要考虑粒径的影响。

综上所述,本实验通过制备不同浓度、不同粒径的 PPLA 自组装纳米微球测量其溶血性能,证实了其浓度、粒径对溶血性能存在明显影响。然而如何运用 PPLA 自组装纳米微球作为抗骨肿瘤药物载体应用于临床还有待进一步探究。

参考文献:

[1] Sokolova V V, Radtke I, Heumann R, *et al*. Effective transfection of cells with multi-shell calcium phosphate-DNA nanoparticles[J]. Biomaterials, 2006, 27(16): 3147-3153.

[2] Fazil M, Md S, Haque S, *et al*. Development and evaluation of rivastigmine loaded chitosan nanoparticles for brain targeting [J]. Eur J Pharm Sci, 2012, 47(1): 6-15.

[3] Cheng Y, Yu S, Zhen X, *et al*. Alginic acid nanoparticles prepared through counterion complexation method as a drug delivery system[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2012, 4(10): 5325-5332.

[4] Gupta A K, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide

nanoparticles for biomedical applications[J]. Biomaterials, 2005, 26(18): 3995-4021.
[5] Chen B, Wu W, Wang X. Magnetic iron oxide nanoparticles for tumor-targeted therapy[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2011, 11(2): 184-189.
[6] Brownlie A, Uchegbu I F, Schatzlein A G. PEI-based vesicle-polymer hybrid gene delivery system with improved biocompatibility[J]. Int J Pharm, 2004, 274(1/2): 41-52.
[7] 赵明媚, 潘君, 李永刚, 等. 一种可阻止非特异性蛋白质吸附的新型聚乳酸材料——聚乙二醇接枝聚乳酸[J]. 高分子材料科学与工程, 2007, 23(3): 231-234.
[8] 王彬, 潘君, 刘颖, 等. 聚乙二醇接枝聚乳酸的自组装纳米微球的制备及性能[J]. 化学学报, 2008, 66(4): 487-491.
[9] 国家药典委员会. 中国药典(一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2005.
[10] Fukui H, Koike T, Saheki A, *et al*. Evaluation of the efficacy and toxicity of amphotericin B incorporated in lipid nano-sphere (LNS)[J]. Int J Pharm, 2003, 263(1/2): 51-60.
[11] Henkelman S, Rakhorst G, Blanton J, *et al*. Standardization of incubation conditions for hemolysis testing of biomaterials[J]. Mater Sci Eng C, 2009, 29(5): 1650-1654.
[12] Ciochina A D, Bredetean O, Dimitriu D C, *et al*. Considerations on *in vitro* and *in vivo* magnetic nanoparticles hemocompatibility testing[J]. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 2009, 113(1): 279-285.
[13] 陈宝林, 王东安, 封麟先, 等. 生物医用高分子材料的血液相容性研究--抗凝血材料的设计[J]. 绥化学院学报, 2007, 27(1): 186-188.
[14] Nicolau P J. Long-lasting and permanent fillers: biomaterial influence over host tissue response[J]. Plast Reconstr Surg, 2007, 119(7): 2271-2286.
[15] 孙皎, 刘义荣, 钱云芳. 生物材料试样形状对溶血率的影响[J]. 口腔材料器械杂志, 1993, 2(2): 17-18.
[16] 聂宇, 段友容, 张志荣. mPEG表面修饰的PLGA嵌段共聚物的血液相容性评价[J]. 生物医学工程学杂志, 2007, 24(2): 336-339.
[17] Maher P, Singer S J. Structural changes in membranes produced by the binding of small amphipathic molecules[J]. Biochemistry, 1984, 23(2): 232-240.
[18] Jones M N. Surfactants in membrane solubilisation[J]. Int J Pharm, 1999, 177(2): 137-159.

(**收稿**:2012-10-16;**修回**:2012-12-26)
(编辑 吴培红)

文章编号:1000-5404(2013)07-0617-01

个案与短篇

合并脑干钙化 Fahr 病一家系报告

董美学[1,2],李 琦[1,2],谢 鹏[1,2] (400016 重庆,重庆医科大学:附属第一医院神经内科[1],神经科学研究中心,重庆市神经生物学重点实验室[2])

[**关键词**] Fahr 病;脑干;家系;基底节钙化
[**中图法分类号**] R745.7 [**文献标志码**] B

Fahr 病又称特发性基底节钙化(idiopathic basal ganglia calcification,IBGC),是神经系统退行性疾病的一种。本病多呈家族性聚集发病,散发少见,以脑组织,特别是基底节及齿状核对称性钙盐沉积为特征。其钙化分布广泛,好发部位依次为苍白球、尾状核、壳核、丘脑、额顶叶脑回,钙化也偶见于小脑齿状核及小脑皮质[1],合并脑干钙化者在以往病例报告中罕见。现报告 Fahr 病一家系如下。

1 临床资料

如图1所示,先证者Ⅱ4:男性,55岁,4年前无明显诱因出现声音嘶哑,后症状逐渐加重,出现吐词不清,饮水呛咳,吞咽困难,走路不稳,运动迟缓,不能完成精细活动等。小便有时失禁,大便便秘。神经系统检查:蹒跚步态,双眼睑下垂伴眼球垂直运动受限,咽反射存在。四肢肌肉无萎缩,肌张力增高,双上肢肌力Ⅴ级,双下肢肌力Ⅳ级,左侧 Hoffman 征(+),左侧掌颌反射(+),膝反射及跟腱反射亢进,右侧下肢痛觉、关节位置觉及振动觉减退。双侧指鼻不准,快速轮替动作笨拙,闭目站立时左右摇摆。实验室检查均未发现异常:两次血钙2.26、2.43 mmol/L,两次甲状旁腺激素12.0、38.7 pg/mL,降钙素3.7 pg/mL,血清磷、铜、铜蓝蛋白均在正常范围内,未发现寄生虫感染及肿瘤发生。事件诱发电位P300:绝对潜伏期平均为355 ms,视觉诱发电位(VEP):(-)。头颅CT提示:双侧半卵圆中心、侧脑室周围、额叶、基底节区、枕叶、丘脑、中脑、小脑、延髓多发对称性钙化(图2)。

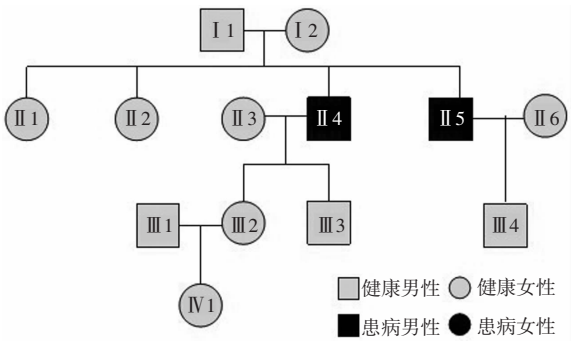


图1 本例 Fahr 病患者家系图

[**通信作者**] 谢 鹏,E-mail:xiepeng58@21cn.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130131.1705.003.html(2013-01-31)

(下转621页)