

磁流体联合药物缓释载体介导的肿瘤磁感应热化疗

阳兵^{1,2}, 赵凌云¹, 徐小雨^{1,2}, 王晓文¹, 张晓东¹, 高福平¹, 唐劲天¹

1. 清华大学工程物理系; 粒子技术与辐射成像教育部重点实验室, 北京 100084
2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102

摘要 化学共沉淀法制备磁感应热疗用纳米介质——氨基硅烷修饰的磁流体, 超声乳化法制备担载多西紫杉醇的聚乳酸-羟基乙酸纳米缓释微球, 对二者进行理化表征, 并将二者作为磁感应热化疗复合介质进行系统性研究。红外光谱分析磁纳米粒子表面已经成功修饰氨基硅烷, 热重分析表明氨基硅烷包封率为 2.5%~3%, 透射电镜观察磁纳米粒子粒径约为 10nm, 振动样品磁强计验证磁流体为超顺磁性, 体外升温实验表明该纳米颗粒在交变磁场下具有良好的升温能力。扫描电镜观察高分子载药微球具有规则的形态, Zeta 电位检测微球表面呈负电性, 差示扫描量热仪分析多西紫杉醇在纳米微球内以非晶体形式存在, 高效液相分析载药高分子缓释微球具有良好的缓释性能, 细胞热化疗实验发现磁流体联合载药缓释微球具有良好的热协同效应。研究初步表明, 磁流体-高分子载药微球是一种有效的磁感应热化疗复合介质。

关键词 磁感应热疗; 磁性纳米颗粒; 高分子载药微球; 热化疗

中图分类号 Q354, Q356, R454.1

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2010)14-0026-07

Magnetic Thermochemotherapy Mediated by the Novel Composite Blend of Magnetic Nanoparticles and Drug-loaded Polymeric Nanoparticles

YANG Bing^{1,2}, ZHAO Lingyun¹, XU Xiaoyu^{1,2}, WANG Xiaowen¹, ZHANG Xiaodong¹, GAO Fuping¹, TANG Jintian¹

1. Key Laboratory of Particle & Radiation Imaging, Ministry of Education; Department of Engineering Physics, Tsinghua University, Beijing 100084, China
2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Abstract Amino silane coated Magnetic Nanoparticles (MNP) as the agent of Magnetic Mediated Hyperthermia (MMH) for cancer treatment were prepared by the chemical precipitation method. Docetaxel-loaded Polymeric Nanoparticles (DPN) for sustained drug release were fabricated by a single emulsion or solvent evaporation method. Blend of MNP and DPN was applied as the composite mediator for thermochemotherapy to combine MMH and sustained chemotherapy and to have the possible synergistic effect between hyperthermia and chemotherapy. Various state-of-the-art techniques were employed in the study for the characterizations of MNP and DNP, including surface morphology by Transmission Electron Microscopy (TEM), surface modification by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Thermogravimetry Analysis (TGA), surface charge (ξ -potential) and magnetic property by Vibrating Sample Magnetometer (VSM), etc. The inductive heating property of MNP was evaluated by monitoring the temperature increase of the MNP suspension under Alternative Magnetic Field (AMF). The drug encapsulation efficacy and the drug release of the DPN were conducted by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *In vitro* evaluation of the blend of MNP and DPN as the composite mediator for thermochemotherapy was conducted on the C6 rat glioma cells and the synergistic effect between MMH and chemotherapy was confirmed. All the observations support that the blend of MNP and DPN is a novel and effective composite mediator for magnetic thermochemotherapy.

Keywords magnetic mediated hyperthermia; magnetic nanoparticles; drug-loaded polymeric nanoparticles; thermochemotherapy

收稿日期: 2010-04-07

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金项目

作者简介: 阳兵, 硕士研究生, 研究方向为纳米药物与器械, 电子信箱: yangbing_840411@163.com; 唐劲天 (通信作者, 中国科协所属全国学会个人会员登记号: S090800253M), 教授, 研究方向为肿瘤学, 电子信箱: tangjt@mail.tsinghua.edu.cn

0 引言

手术、化疗、放疗依然是目前最主要的3种肿瘤治疗手段,但随着加温技术的发展和热生物学研究的深入,热疗作为方便、有效的肿瘤治疗手段受到越来越多的关注并得到广泛应用。与传统的热疗技术如水浴热疗、红外热疗、超声热疗、微波热疗相比,磁感应热疗技术具有可治疗深层肿瘤、靶向性高、副作用小、微创甚至无创的特点;且磁感应介质一经植入肿瘤部位,可以对病人进行重复多次热疗。在磁感应热疗介质的研究方面,大量研究表明磁流体是理想的磁感应热疗介质^[1-2]。由于磁流体具有液体的流动性和优良的磁学性能,可通过注射方式进入肿瘤,这成为当前热疗介质的研究热点和发展趋势。目前,磁流体磁感应热疗在德国已进入临床试验^[3]。虽然热疗技术取得了极大的进步,但在临床上,热疗大多是作为化疗和放疗的一种辅助治疗手段,以增强化疗或者放疗的效果。热化疗是指将药物化疗与热疗联合使用的、以期获得更佳的抗肿瘤效果的肿瘤治疗方法^[4]。药物的热协同效应是指药物化疗与热疗结合后,二者相互促进,从而达到比二者累加更强的疗效^[5]。体外研究发现许多抗肿瘤药物均具有热协同效应,但在临床使用中由于肌体对药物的代谢,使肿瘤组织中很难保持产生热协同效应所必需的药物浓度,而加大给药剂量和多次给药均会带来更大的副作用,从而影响了肿瘤热化疗疗效的提高^[6-7]。

研究表明多西紫杉醇热化疗能在一定程度上增强抗肿瘤效果,但是否具有协同效应则与细胞种类和药物浓度甚至热疗的温度有关^[8-10],缓释制剂可保持相对稳定的药物浓度。本研究将多西紫杉醇(Docetaxel,DTX)作为抗肿瘤模型药物,与聚乳酸-羟基乙酸共聚物(Poly(lactic-co-glycolic acid),PLGA)制成多西紫杉醇PLGA纳米缓释微球(Docetaxel PLGA Nanoparticles,DTX-PLGA-NP),在体外研究其热化疗协同效应,并拟进一步与磁感应纳米热疗介质联合使用进行磁感应热化疗的研究。本研究不仅仅是为了证明DTX-PLGA-NP的热协同效应,还在于提供PLGA-NP这样一种有效的热化疗药物载体,使之能进一步与一些廉价或者高毒性的抗肿瘤药物结合,一方面降低其毒性,另一方面通过热化疗提高其抗肿瘤效果,从而有可能为临床提供一种更安全、有效的肿瘤治疗方式。

1 材料与方法

1.1 材料和设备

PLGA(5050 DLG7A):美国Lakeshore Biomaterials公司;聚乙烯醇(Poly(vinyl alcohol),PVA):Sigma公司;香豆素(Coumarin 6,激发波长353nm,发射波长442nm)、氨基硅烷(3-Aminopropyltriethoxysilane,APTS,98%):美国IL公司;DTX:北京益康思达医药科技有限公司;多西他赛注射液:江苏恒瑞医药股份有限公司;二氯甲烷(分析纯):北京化工厂;FeCl₂·4H₂O、25%NH₃·H₂O:北京现代东方精细化学品有限公司;FeCl₃·6H₂O:国药集团化学试剂有限公司;超声仪:Sonics

公司;磁力搅拌器(VCX130PB型):金坛市荣华仪器制造有限公司;冷冻干燥机(HJ-4型):德国Christ公司;水浴锅(Alpha 1-2型):德国Memmert公司;水浴摇床:德国Memmert公司;电子天平(AL204-IC型):Mettler Toledol公司;酶标仪(Model680型):美国Bio-Rad公司;大鼠脑胶质瘤细胞C6:解放军第四军医大学赠送;DMEM培养基:Gibco公司;胎牛血清:Hyclone公司。

1.2 化学共沉淀法制备磁流体

将FeCl₂·4H₂O和FeCl₃·6H₂O按物质的量之比1:1.75加入三孔烧瓶中,加入一定量(110mL)超纯水,通入N₂,在95℃水浴锅中搅拌使之充分溶解后,加入约20mL 25%NH₃·H₂O使体系pH值为9.0,搅拌反应30min,冷却,水洗,醇洗,分散于200mL无水乙醇中,加入98%氨基硅烷5mL,通入N₂,在75℃条件下反应60min,水洗,醇洗。

1.3 PLGA-NP的制备

1) DTX-PLGA-NP的制备:将一定量PVA加入超纯水,磁力搅拌6h以上使之充分溶解,再将PLGA和DTX按一定比例加入二氯甲烷,轻轻振摇使之充分溶解;将PLGA和DTX的二氯甲烷溶液缓慢加入到PVA溶液中,超声乳化,磁力搅拌过夜,离心(12000r/min,10min),去上清液,加水重悬,反复3次去除残余的PVA和DTX。

2) 荧光素标记PLGA-NP的制备:将PLGA和香豆素加入到二氯甲烷中,避光轻轻振摇使之充分溶解,制备过程同DTX-PLGA-NP。

1.4 磁流体和PLGA纳米微球的理化表征

1.4.1 磁流体的理化表征

透射电镜(Hitachi H-7650)观察纳米粒子的形态和粒径;红外分析仪(Nicolet 560)对其表面官能团进行检测以确定氨基硅烷是否已经结合到磁纳米粒子的表面;将磁流体冻干,振动样品磁强计(Lakeshore 7307)对其进行磁性检测以检验其超顺磁性;热分析系统(TA公司,Q5000IR)对其进行热重分析以确定氨基硅烷的包封率,温度范围为20~800℃,升温速度为10℃/min,N₂保护;磁感应热疗临床机(自行研发)测定交变磁场下的升温能力。

1.4.2 PLGA纳米微球的理化表征

1) 仪器分析:扫描电镜(LEO-1530)对纳米粒子进行表面形貌观察;动态光散射(Malvern公司,Zetasizer 3000HS)检测纳米粒子的粒度分布和表面电荷;差示扫描量热仪(DSC,TA公司,Q2000)分析DTX在PLGA-NP中的存在形式,温度范围为0~200℃,升温速度为10℃/min,N₂保护。

2) 包封率和体外药物缓释:将DTX-PLGA-NP冻干,精确称取5mg溶于2mL二氯甲烷,振摇使其充分溶解后自然挥干二氯甲烷,加入流动相(乙腈:水=48:52)5mL,振摇30min,静置4h后,取上清液1mL离心(12000r/min,10min),再取上清800μL,高效液相分析,参照标准曲线确定DTX含量进而计算包封率。体外缓释实验分组如表1所示,精确称取10mg DTX-PLGA-NP冻干粉末,置于高速离心管(50mL)中,加入

PBS10mL, 磁流体对照组和磁感应加热组每管中再加入自制磁流体 100mg, 每组有 3 个复管。将离心管放入 37℃水浴摇床中, 在摇床处理开后第 2,3,4,6,8,11,15d 取样。每次取样前对磁场辐照组和磁感应加热组进行磁场辐照处理, 磁场辐照组的磁场辐照强度为 300kHz、420A、30min, 磁感应加热组的磁场辐照强度为 300kHz、270A、30min (此磁场强度可使离心管中液体温度维持在 48~52℃)。

表 1 体外缓释实验分组
Table 1 *In vitro* release test groups

	DTX-PLGA-NP/mg	磁流体/mg	处理方式
对照组	10		
磁场辐照组	10		磁场辐照
磁流体组	10	100	
磁感应加热组	10	100	磁场辐照

1.5 细胞实验

1.5.1 细胞摄取

细胞培养皿 (3.5cm) 接种 C6 细胞 (10⁵/皿), 5% CO₂、37℃ 孵箱培养 24h 后, 去除旧培养液, 加入混有香豆素-PLGA-NP (100μg/mL) 的新鲜培养基, 共孵育 14h, 弃旧培养液, PBS 洗 3 遍, 冰乙醇固定 20min, 弃冰乙醇, PBS 洗 3 遍, PI (50μg/mL) 染色 40min, 弃 PI 染料, PBS 洗 3 遍, 激光共聚焦显微镜观察细胞对 PLGA-NP 的摄取。

1.5.2 体外热化疗

96 孔板接种 C6 细胞 (10⁴/100 (μL/孔)), 5% CO₂、37℃ 孵箱培养 24h 后, 弃去旧培养液, PBS 洗 1 遍, 加入混有不同浓度 (0.25, 2.5, 25μg/mL) 的 DTX 及相应的 DTX-PLGA-NP 的新鲜培养液。对照组放入 37℃ 孵箱培养, 热疗组放入 43℃ 孵箱培养 1h 后, 转入 37℃ 孵箱培养, 24h 组经 1 次 43℃ 热处理, 并在 24h 后进行 MTT 检测, 48h 组经 2 次 43℃ 热处理, 进行第一次热处理 24h 后换液 (换液的目的在于模拟体内环境对药物的代谢), 再次对其进行 43℃ 热处理, 24h 后 MTT 检测。

韦伯系数衡量热协同效应为

$$C=A \cdot B$$

其中, C 为韦伯系数, A 为热疗后细胞的相对增殖率, B 为药物作用后细胞的相对增殖率。若热化疗后细胞的相对增殖率低于韦伯系数 C , 则存在热协同效应, 反之则不存在热协同效应^[5]。

2 结果与讨论

2.1 磁流体的理化表征

红外分析发现样品中存在氨基硅烷特征峰 (1001: Si—O—C 伸缩震动峰, 1049: C—N 峰), 说明氨基硅烷已经修饰在磁流体的表面 (图 1); 透射电镜结果显示, 氨基硅烷修饰的磁流体 (APTS-MF) 的粒径约为 10nm, 但是存在一定程度的粒子间聚集, 从中可以看到在磁纳米粒子的表面有一层包覆结构

(图 2); 对 APTS-MF 进行热重分析, 在 20~100℃, 随着温度的升高, 样品有一个较为明显的失重过程, 在这个阶段主要是样品中残留的自由水和结合水的蒸发; 随着温度的继续上升, 在 220~500℃, 样品又出现一个明显的失重过程, 此阶段即是磁流体表面包覆的氨基硅烷的热解挥发, 从中可以计算出磁流体表面氨基硅烷的封装率为 2.5%~3% (图 3)。



图 1 磁纳米粒子的红外光谱图

Fig. 1 FTIR spectra of magnetic nanoparticles

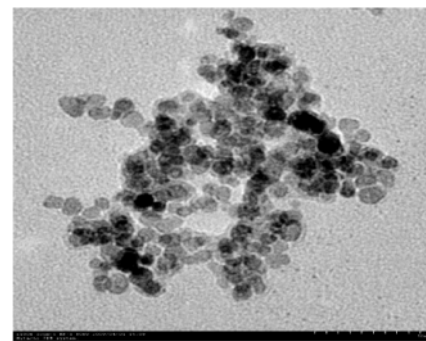


图 2 磁纳米粒子的透射电镜图

Fig. 2 TEM photo for the morphology of magnetic nanoparticles

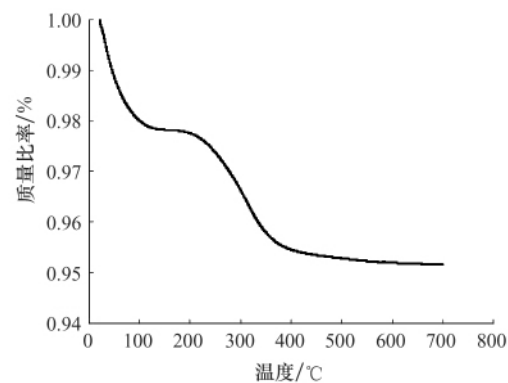


图 3 热重分析磁纳米粒子表面氨基硅烷的封装率

Fig. 3 TGA analysis for the amount of amino-silane coated in the surface of magnetic nanoparticles

振动样品磁强计检测结果显示,随着磁场强度的升高($O \rightarrow A$),磁流体的磁化强度也迅速升高,当磁场强度继续升高时($A \rightarrow B$),磁流体的磁化曲线趋向于与横坐标平行,磁化强度达到最大 62 emu/g ;而当磁场强度从最高点 B 逐渐降到零点 O 时,磁流体的磁化曲线循升高的曲线轨迹反向降低到原点,施加反方向的磁场磁流体也具有相同的特性,这说明采用化学共沉淀法制备的磁流体具有超顺磁性(图 4);交变磁场下的升温实验表明, APTS-MF 具有良好的升温能力,在磁感应热疗临床机频率为 115 kHz 磁感应强度为 0.011 T 时,较高浓度的 APTS-MF (140 mg/mL) 可在 1 min 内从体温状态升至临床热疗温度 ($46 \sim 50^\circ\text{C}$);若降低磁流体的浓度,其升温性能出现相应的下降,因此,可通过控制磁流体的浓度和磁场参数实现热疗温度的控制(图 5)。

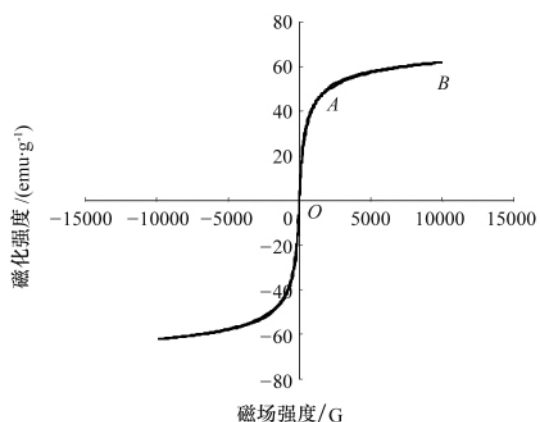


图 4 磁滞回线分析磁纳米粒子磁性

Fig. 4 Magnetization curves for the magnetic nanoparticles

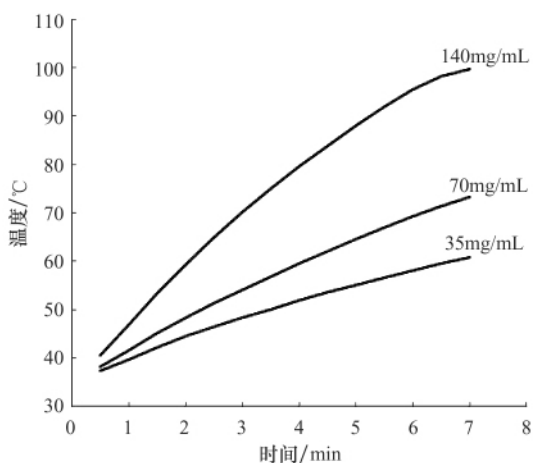


图 5 不同浓度磁流体在交变磁场下的升温

Fig. 5 Temperature curve for different concentrations of magnetic fluids under alternating magnetic field

目前,磁流体的制备方法有共沉淀法、高温裂解法、多元醇法等。高温裂解法制备的磁纳米粒子具有分散性好、粒径可控等优点,但其制备成本很高、反应条件苛刻^[11-12];化学共

沉淀法具有成本低、方法简单的优点,虽然其制备的磁流体存在一定的聚集,但经过氨基硅烷修饰后其聚集程度已经降低。从透射电镜图(图 2)可以看到其聚集后的最大直径也在 100 nm 左右,可以通过针管注射方式进入肿瘤组织内部,且聚集并不影响其磁学性能。磁强计检测及磁感应热疗临床机升温实验均表明,采用化学共沉淀法制备的磁流体是一种优良的磁感应热疗介质;氨基硅烷作为一种磁流体的表面修饰剂,除了能改善分散性外,还能提高磁流体的生物相容性,这已在临床试验^[3]中得到了证明。此外,磁流体经氨基硅烷修饰后,由于氨基存在,可以方便地在其上连接抗体或其他功能分子,在基因转染、靶向给药和生物检测等领域也有极大的应用前景。

2.2 PLGA 纳米微球的理化表征

扫描电镜显示,采用超声乳化法制备的 PLGA-NP 粒径大部分处在 500 nm 以下,但有少量的微米级高分子球,这可能是由于在制备过程中超声的能量分布不均匀所致;PLGA-NP 形态规整,均呈圆球状,在一些较大 PLGA-NP 表面发现有小孔(红色箭头),这种单孔结构有利于药物的释放(图 6)。进一步的粒度仪分析,整体上看制备的 PLGA-NP 处于纳米级 (419 nm),且具有良好的单分散性(多分散指数 0.208) (表 2)。DSC 分析结果(图 7)显示,DTX 的 DSC 曲线(蓝线)在 40°C 具有明显的放热相变峰,而 DTX-PLGA-NP 的 DSC 曲线(红线)发生了明显变化,只在 47°C 出现 PLGA 的相变峰,而没有出现 DTX 的特征峰。

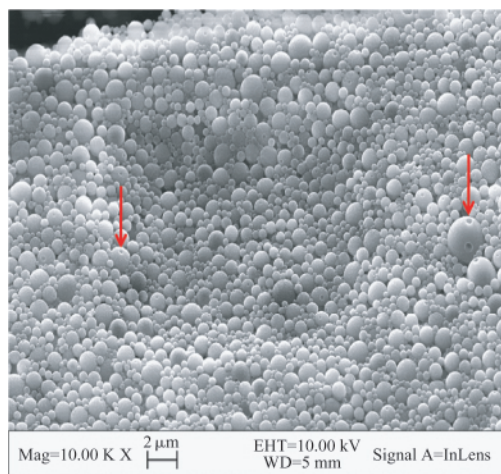


图 6 DTX-PLGA-NP 的扫描电镜

Fig. 6 SEM of DTX-PLGA-NP

高效液相的结果显示 DTX-PLGA-NP 的包封率为 53% ,粒径为 419 nm , Zeta 电位为 -19.7 mV ,多分散指数为 0.208 。体外缓释实验结果显示,DTX-PLGA-NP 的药物缓释速率较为稳定,并无初始突释的现象, 15 d 内的释放曲线趋向于零级释放曲线。磁场对药物的释放并无明显的影响;磁感应加热对 DTX-PLGA-NP 的药物释放有较大的影响,磁感应加热组的释放速率和最终释放量都明显高于对照组,说明加热对

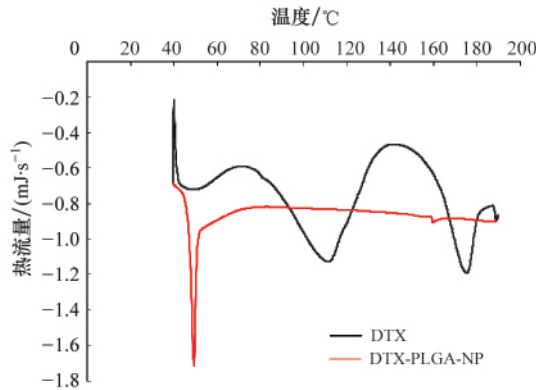


图7 差示扫描量热分析 DTX 状态

Fig. 7 DSC curves of DTX and DTX-PLGA-NP

DTX-PLGA-NP 的药物释放有促进作用; 在实验中发现磁流体组的释放速率高于磁感应加热组, 可能是因为磁流体表面分布着大量的氨基, 在 37°C 振荡的条件下可与 PLGA 的羧基发生化学反应, 加速 PLGA 的降解, 从而提高其释放速率。磁流体甚至比加热对 PLGA 降解的影响更大(图 8)。

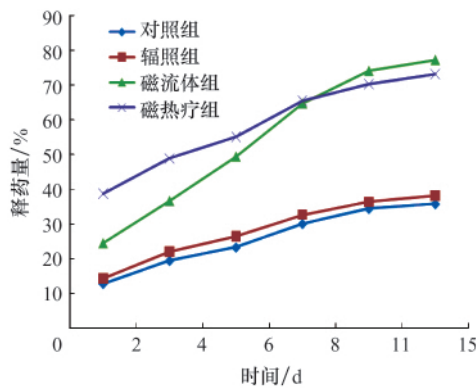


图8 DTX-PLGA-NP 体外缓释曲线

Fig. 8 *In vitro* release curves of DTX-PLGA-NP

PLGA 由乳酸和羟基乙酸聚合而成, 是一种可降解的功能高分子有机化合物, 具有良好的生物相容性和成球、成膜性能, 被广泛应用于制药、医用工程材料和现代化工业领域。在美国 PLGA 通过 FDA 认证, 正式作为药用辅料收录进美国药典。调整 PLGA 的单体比可以改变 PLGA 的降解时间。本研究采用 PLGA 单体比为 50/50, 分子量为 112kDa, 理论降解时间为 2 个月。DTX 是一种非水溶性药物, 以晶体形式存在。临床上使用的 DTX 制剂是将 DTX 溶于吐温 80 中, 临用前将其与 13%乙醇混合, 这样才能使 DTX 变为非晶体结构从而可被人体吸收, 但是这种方法会使 DTX 极易重新结晶析出, 失去药效。制成 DTX-PLGA-NP 后 DTX 以非晶体形式存在, 提高了其水溶性, 有利于人体组织的吸收, 从而更有利于药物作用发挥。

2.3 体外实验

细胞实验主要是比较临床用 DTX 制剂 (多西他赛注射液) 和 DTX-PLGA-NP 对 C6 细胞的生长抑制及其热协同效应。热处理 24h 后 MTT 结果显示, 在正常培养条件下 (37°C), 随着 DTX 制剂药物浓度在一定范围内的增高, 细胞增殖率出现下降, 但是药物浓度继续升高 (25 μ g/mL), 细胞的增殖率反而出现了上升, 而 DTX-PLGA-NP 在 3 个浓度梯度下均是随着浓度升高增殖率下降。在热化疗组可以看到, DTX 制剂在高浓度时细胞增殖率出现了最显著的下降, 结合热协同效应分析发现 DTX 制剂在低浓度和高浓度均具有了协同效应, 但在中浓度没有热协同效应, 而 DTX-PLGA-NP 各浓度组均具有热协同效应(图 9 和表 2)。从 48h 实验组可以发现, 细胞增殖率基本随着药物浓度的升高而降低, 在 0.25, 2.5 μ g/mL 两个浓度下 DTX-PLGA-NP 组的细胞增殖率稍低于制剂组; 25 μ g/mL DTX 制剂组的细胞增殖率最低(图 10)。48h 实验热协同效应分析发现, 只有 2.5 μ g/mL 和 25 μ g/mL 的 DTX-PLGA-NP 具有热协同效应(表 3)。激光共聚焦显微镜可以发现, 香豆素-PLGA-NP (绿色) 与 C6 细胞 (红色) 共孵育 14h 后, 大量的香豆素-PLGA-NP 被细胞所摄取(图 11)。

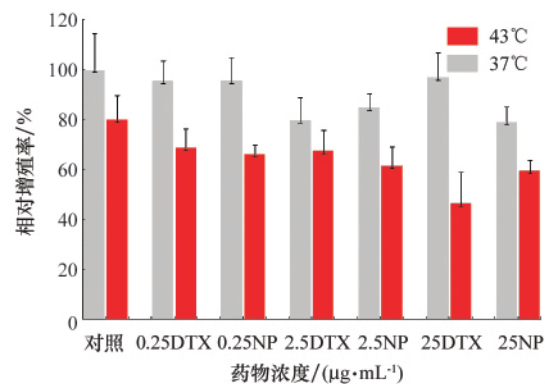


图9 热化疗后 C6 细胞的相对增殖率 (24h)

Fig. 9 Viability of C6 after thermochemotherapy (24h)

表 2 24h 组热协同效应分析 (24h)

Table 2 Analysis of heat synergistic effect (24h)

各浓度组	化疗	韦伯系数	热化疗	热协同效应
DTX (0.25 μ g/mL)	0.9565	0.7652	0.6892	+
DTX-NP (0.25 μ g/mL)	0.9560	0.7648	0.6621	+
DTX (2.5 μ g/mL)	0.7974	0.6379	0.6747	
DTX-NP (2.5 μ g/mL)	0.8493	0.6795	0.6152	+
DTX (25 μ g/mL)	0.9702	0.7761	0.4639	+
DTX-NP (25 μ g/mL)	0.7895	0.6316	0.5955	+

DTX 是一种作用于细胞微观系统的药物, 存在抑制细胞生长的最适浓度, 而 25 μ g/mL 已经超出了最适浓度。DTX-PLGA-NP 是一个缓释系统, 在 24h 内其释放出来的药物量还处在最适浓度之下, 因此, 随着 DTX-PLGA-NP 浓度的提高,

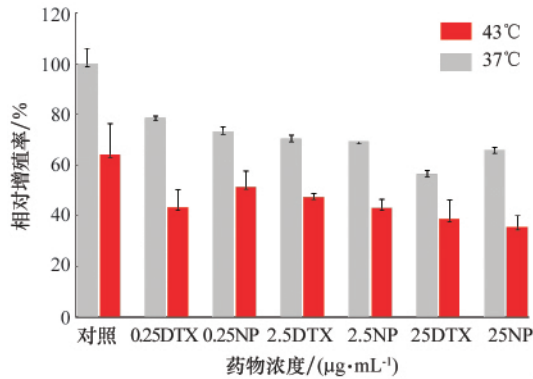


图 10 热化疗后 C6 细胞的相对增殖率 (48h)

Fig. 10 Viability of C6 after thermochemotherapy (48h)

表 3 48h 组热协同效应分析

Table 3 Analysis of heat synergistic effect (48h)

各浓度组	化疗	韦伯系数	热化疗	热协同效应
DTX (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.7851	0.5038	0.5832	
DTX-NP (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.7325	0.4700	0.5153	
DTX (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.7035	0.4515	0.4753	
DTX-NP (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.6942	0.4455	0.4330	+
DTX (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.5643	0.3621	0.3889	
DTX-NP (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.6571	0.4216	0.3570	+

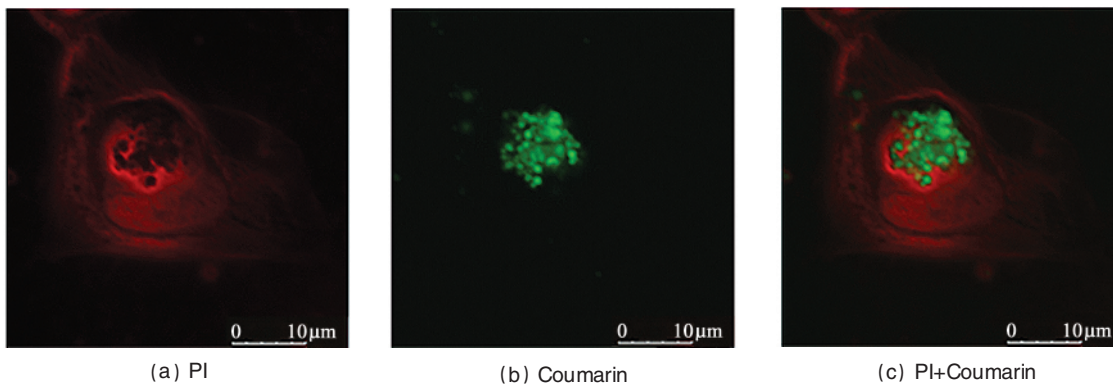


图 11 激光共聚焦

Fig. 11 Laser scanning confocal microscope

细胞增殖率逐渐降低; 虽然高浓度 (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和低浓度 (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 DTX 均有热协同效应, 但高浓度的抗肿瘤药物通常有较大的副作用, 因此, 研究低浓度抗肿瘤药物的热协同效应有更大的临床应用价值。48h 实验在第二次热处理之前进行换液是为了模拟体内环境对药物的代谢而导致浓度降低, 从图 10 可以看出, 0.25 和 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DTX 制剂的细胞增殖率较同浓度的 DTX-PLGA-NP 组高, 这是由于换液后导致制剂组的药物浓度下降, 而 DTX-PLGA-NP 组在换液后仍能释放药物, 使培养液中维持较高的药物浓度, 从而提高细胞抑制率。25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 DTX 制剂组的细胞增殖率最低, 这可能是由于换液后孔板中残留的药物浓度较其他组更趋近于最适浓度。从 48h 实验热协同效应分析发现, 只有 2.5 和 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 DTX-PLGA-NP 有热协同效应, 这一方面可能是由于缓释促使药物浓度较高, 另一方面可能是由于细胞对 DTX-PLGA-NP 的摄取。产生热化疗协同效应的一个机制是热逆转了细胞的耐药反应, DTX-PLGA-NP 被细胞所摄取后, 可以逃避细胞膜耐药机制, 且可减少药物在体内的代谢, 药物释放后直接作用于细胞内作用靶点, 从而进一步提高疗效。

紫杉醇类作为一线化疗药物, 对许多肿瘤都具有很好的疗效, 在临床上得到了广泛的使用, 但是紫杉醇也具有大

多数化疗药物的共同缺点: 对人体正常组织毒性较大、半衰期短、治疗窗口窄等。体内实验^[13-15]和临床试验^[16-18]表明, 紫杉醇热化疗具有更好的抗肿瘤效果, 但是体外实验发现紫杉醇是否具有热协同效应与很多因素有关。缓释制剂是一种新兴的制剂技术, 研究表明缓释微球可有效地降低药物毒性, 延长药物的有效作用时间, 减少给药次数^[19-22]。且有研究证明, 纳米微球可以通过血脑屏障, 从而对脑瘤产生更好的疗效, 最新研究表明多西紫杉醇微球在多种细胞上都有明显的热协同效应^[23-25]。

3 结论

采用化学共沉淀法制备的磁流体是一种优良的磁感应热疗介质。采用超声乳化法制备的 DTX-PLGA-NP 具有粒径小、形态规则、封装率高的特点, 在体外有良好的缓释特性。DTX 具有浓度依赖的热协同效应, 在较低的药物浓度结合热疗能产生更强的抗肿瘤效果, 但是普通制剂在人体内代谢速度快, 很难维持较为稳定的药物浓度, 因此, 在重复热疗中热协同效应难以持久。PLGA-NP 有良好的药物缓释性能, 可以保护药物免受机体代谢的影响, 从而使体系保持较为恒定的药物浓度, 此外, PLGA-NP 易被细胞所摄取, 药物释放出来直接作用于靶点, 可逃避细胞耐药反应, 是一种潜在的理想热

化疗药物载体。

参考文献 (References)

- [1] Jordan A, Scholz R, Wust P, *et al.* Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles [J]. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 1999, 201: 413–419.
- [2] Rosensweig R. Heating magnetic fluid with alternating magnetic field[J]. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2002, 252: 370–374.
- [3] Gneveckow U, Jordan A, Scholz R, *et al.* Description and characterization of the novel hyperthermia and thermoablation–system MFH300F for clinical magnetic fluid hyperthermia[J]. *Med Phys*, 2004, 31(6): 1444–1451.
- [4] Issels R D. Hyperthermia adds to chemotherapy [J]. *Eur J Cancer*, 2008, 44(17): 2546–2554.
- [5] Yeh Y A, Herenyiova M, Weber G. Quercetin: Synergistic action with carboxyamidotriazole in human breast carcinoma cells [J]. *Life Sci*, 1995, 57: 1285–1292.
- [6] Takemoto M, Kuroda M, Urano M, *et al.* The effect of various chemotherapeutic agents given with mild hyperthermia on different types of tumours[J]. *Int J Hyperthermia*, 2003, 19(2): 193–203.
- [7] Urano M, Ling C C. Thermal enhancement of melphalan and oxaliplatin cytotoxicity *in vitro*[J]. *Int J Hyperthermia*, 2002, 18(4): 307–315.
- [8] Michalakis J, Georgatos S D, Romanos J, *et al.* Micromolar taxol, with or without hyperthermia, induces mitotic. catastrophe and cell necrosis in HeLa cells[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2005, 56(6): 615–622.
- [9] Barnes A P, Miller B E, Kucera G L. Cyclooxygenase inhibition and hyperthermia for the potentiation of the cytotoxic response in ovarian cancer cells[J]. *Gynecol Oncol*, 2007, 104(2): 443–450.
- [10] Michalakis J, Georgatos S D, de Bree E, *et al.* Short-term exposure of cancer cells to micromolar doses of paclitaxel, with or without hyperthermia, induces long-term inhibition of cell proliferation and cell death *in vitro*[J]. *Ann Surg Oncol*, 2007, 14(3): 1220–1228.
- [11] Sun S, Zeng H, Robinson D B, *et al.* Monodisperse MFe_2O_4 ($M=Fe, Co, Mn$) nanoparticles[J]. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(1): 273–279.
- [12] Sun S, Zeng H. Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles[J]. *J Am Chem Soc*, 2002, 124(28): 8204–8205.
- [13] Cividalli A, Livdi E, Ceciarelli F, *et al.* Hyperthermia and paclitaxel—epirubicin chemotherapy: Enhanced cytotoxic effect in a murine mammary adenocarcinoma[J]. *Int J Hyperthermia*, 2000, 16(1): 61–71.
- [14] Mohamed F, Marchettini P, Stuart O A, *et al.* Thermal enhancement of new chemotherapeutic agents at moderate hyperthermia [J]. *Ann Surg Oncol*, 2003, 10(4): 463–468.
- [15] Mohamed F, Stuart O A, Glehen O, *et al.* Docetaxel and hyperthermia: Factors that modify thermal enhancement[J]. *J Surg Oncol*, 2004, 88(1): 14–20.
- [16] Deraco M, Rossi C R, Pennacchioli E, *et al.* Cytoreductive surgery followed by intraperitoneal hyperthermic perfusion in the treatment of recurrent epithelial ovarian cancer: A phase II clinical study[J]. *Tumori*, 2001, 87(3): 120–126.
- [17] Jones E L, Prosnitz L R, Dewhirst M W, *et al.* Thermochemoradiotherapy improves oxygenation in locally advanced breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(13): 4287–4293.
- [18] Jiang Z, Yan W, Ming J, *et al.* Docetaxel weekly regimen in conjunction with RF hyperthermia for pretreated locally advanced non-small cell lung cancer: A preliminary study[J]. *BMC Cancer*, 2007, 7: 189.
- [19] Feng S S, Zhao L Y, Zhang Z P, *et al.* Chemotherapeutic engineering: Vitamin E TPGS-emulsified nanoparticles of biodegradable polymers realized sustainable paclitaxel chemotherapy for 168h *in vivo* [J]. *Chemical Engineering Science*, 2007, 62: 6641–6648.
- [20] Feng S S, Huang G F. Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol (R)) from nanospheres of biodegradable polymers[J]. *Journal of Controlled Release*, 2001, 71(1): 53–69.
- [21] Mu L, Feng S S. Vitamin E TPGS used as emulsifier in the solvent evaporation/extraction technique for fabrication of polymeric nanospheres for controlled release of paclitaxel (Taxol (R))[J]. *Journal of Controlled Release*, 2002, 80(1–3): 129–144.
- [22] Mu L, Feng S S. A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol (R)): PLGA nanoparticles containing Vitamin E TPGS[J]. *Journal of Controlled Release*, 2003, 86(1): 33–48.
- [23] Liu B, Yang M, Li X, *et al.* Enhanced efficiency of thermally targeted taxanes delivery in a human xenograft model of gastric cancer [J]. *J Pharm Sci*, 2008, 97(8): 3170–3181.
- [24] Yang M, Ding Y, Zhang L, *et al.* Novel thermosensitive polymeric micelles for docetaxel delivery [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2007, 81(4): 847–857.
- [25] Liu B, Yang M, Li R, *et al.* The antitumor effect of novel docetaxel-loaded thermosensitive micelles [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008, 69(2): 527–534.

(责任编辑 王芷)

·学术动态·

“第三届全国生物入侵学术研讨会”征文

中国植物保护学会将于 2010 年 11 月 26—29 日在海口市召开“第三届全国生物入侵学术研讨会”。会议以全球变化与生物入侵为主题,针对我国入侵生物的预防预警、检测监测、控制管理等方面的理论与技术,尤其是全球气候变化下的生物入侵这一热点与前沿问题展开广泛交流。

征文内容: ① 全球变化(气候变化、大气变化、土地利用格局变化)对生物入侵的影响; ② 入侵物种的基础生物学与生态学; ③ 入侵物种的防控(预防预警、检测监测、生态修复、综合治理等)新技术。

全文截稿日期: 2010 年 10 月 20 日。

联系电话: 0898-23300243, 彭正强; 电子信箱: lypehy@63.cnm。

会议网址: <http://www.ipmchina.net/cspp/>。

