

## 缓释载药聚乳酸凝胶预防气管纤维组织增生

彭莉莉<sup>1, 2</sup>, 李进让<sup>2</sup>, 孙建军<sup>2</sup>, 郭红光<sup>2</sup>, 郭坤<sup>3</sup>, 汤瑶<sup>4</sup>, 孙旭<sup>4</sup>, 张双庆<sup>4</sup>

(1 广东省广州市南方医科大学研究生学院, 广东 广州 510515; 海军总医院 2 耳鼻咽喉头颈外科, 3 病理科, 北京 100048; 4 国家药物安全评价监测中心, 北京 100176)

**[摘要] 目的** 探讨丝裂霉素C (mitomycin C, MMC) 与地塞米松磷酸钠 (dexamethasone sodium phosphate, DSP) 的聚乳酸凝胶对气管瘢痕组织形成的抑制作用。**方法** 在体外缓释实验中, 将MMC与DSP聚乳酸凝胶后置于恒温水浴摇床中, 药物的累积浓度通过紫外分光光度法测定。在体内缓释试验中, 通过喉气管外壁损伤建立瘢痕形成的动物模型。将42只新西兰大白兔进行气管外壁刮伤后分成7组: 实验组包括载MMC组3组 (0.1、0.2、0.4 mg)、载DSP组3组 (1、2、3 mg) 和空白对照组1组。0.4 mg MMC组动物于术后不同时间抽血, 通过质谱测量体内药物浓度及血常规。术后4周处死动物, 取气管外壁标本, HE染色观察纤维组织增生厚度。**结果** 体外实验1 mg MMC、2 mg DSP凝胶缓释分别可达35 d及28 d以上。动物体内两种药物凝胶在术后4周末完全降解。两种药物剂量组 (除0.1 mg MMC组外) 与对照组比较, 对气管壁纤维组织增生有明显抑制作用; 在MMC各剂量组中, 0.4 mg MMC组比其他组对纤维组织增生的抑制程度更明显; 在DSP不同剂量组中, 抑制作用无统计学意义; 0.4 mg MMC与3种剂量的DSP组纤维组织增生厚度差异均无统计学意义。术后1、7、14 d白细胞计数无统计学差异。**结论** MMC及DSP聚乳酸凝胶在动物体内外释放时间均长达4周, 可作为预防瘢痕形成的缓释用药。本研究为未来研制聚乳酸聚乙醇酸支架涂层药物缓释载体对喉气管狭窄的治疗提供了实验基础。

**[关键词]** 丝裂霉素; 气管; 瘢痕; 动物, 实验; 地塞米松磷酸钠; 聚乳酸

### Action of slow-release drug deliver system with poly lactic acid hydrogels in prevention of tracheal fibroplasia

PENG Lili<sup>1,2</sup>, LI Jinrang<sup>2</sup>, SUN Jianjun<sup>2</sup>, GUO Hongguang<sup>2</sup>, GUO Kun<sup>3</sup>, TANG Yao<sup>4</sup>, SUN Xu<sup>4</sup>, ZHANG Shuangqing<sup>4</sup>  
(1 Graduate School of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, 510515, China; 2 Department

of Otolaryngology Head and Neck Surgery, 3 Department of Pathology, Navy General Hospital, Beijing, 100048, China; 4 National Center for Safety Evaluation of Drug, Beijing, 100176, China)

Corresponding author: LI Jinrang (Email: entlir@yahoo.com.cn)

**[ABSTRACT] OBJECTIVE** To compare the effect of slow-release mitomycin C (MMC) and dexamethasone sodium phosphate (DSP) with poly lactic acid (PLA) hydrogels on prevention of tracheal fibroplasia. **METHODS** In vitro slow-release study, MMC and DSP mixed with PLA hydrogels was palced in the water bath oscillators, the cumulative concentrations of MMC and DSP were determined by ultraviolet spectrophotometry. In vivo study, the rabbit model of tracheal fibroplasia was made through scratching the tracheal wall. After scuffing the tracheal walls, forty-two rabbits were divided into 7 groups averagely, three MMC groups (0.1、0.2、0.4 mg), three DSP groups (1、2、3 mg) and one control group. And then the blood drug level of rabbits in 0.4 mg MMC group at different time after operation was determined by mass spectrometry (MS). The blood routine test was done at above-mentioned corresponding time. Four weeks after operation, each animal was killed to get tracheal walls, which were then stained with hematoxylin and eosin (H&E), and the thickness of tracheal fibroplasia was calculated. **RESULTS** In vitro study, PLA hydrogels with 1 mg MMC and 2 mg DSP could release drug over 35 days and 28 days respectively. And in vivo study, these two kinds of PLA hydrogels hadn't degraded completely after 4 weeks. The tracheal wall fibroplasia in control group was thicker than that in both DSP and MMC groups except 0.1 mg MMC group. Among MMC groups, 0.4 mg MMC group had the best effect in

第一作者简介及通讯: 彭莉莉, 女, 福建人, 在读医学硕士, 主要研究方向为喉气管狭窄的诊疗。

Email: entpll@hotmail.com

通讯作者: 李进让 (Email: entlir@yahoo.com.cn)

inhibiting fibroplasia. While in DSP groups, the thickness of fibroplasia had no difference among three groups; and the difference of fibroplasia thickness was not significant between DSP groups and 0.4 mg MMC group. The leukocyte count on the 1st day, 7th day and 14th day after operation had no significant difference. **CONCLUSION** MMC and DSP PLA hydrogels could release drug over 4 weeks either in vitro or in vivo. Both MMC/PLA and DSP/

PLA hydrogels could inhibit fibroplasia of the tracheal wall and be used as slow-release administration in prevention of fibroplasia, which provided experimental basis for studying PLGA scaffold slow-delivery system for treating laryngotracheal stenosis in the future.

**[Key words]** Porfirimycin; Trachea; Cicatrix; Animals, Laboratory; dexamethasone sodium phosphate; poly lactic acid

丝裂霉素C (Mitomycin C, MMC) 与抗肿瘤、抗瘢痕形成、减少肉芽组织增生和防止组织粘连的作用近年来得到了公认, 被广泛应用于临床相关治疗中。在耳鼻咽喉头颈外科中, MMC对预防喉粘连和鼻腔粘连有一定疗效<sup>[1~4]</sup>, 但所有研究均是一次性用药, 把含有MMC的棉片在创面敷贴4~5 min, 不能完全解决粘连问题。国外报道用聚乳酸聚乙醇酸 (Poly L-lactide-co-glycolide, PLGA) 纳米微粒可以作为喉部的缓慢释药载体<sup>[5]</sup>。聚乳酸凝胶为可注射用生物降解性材料, 其生物组织相容性好。地塞米松磷酸钠 (dexamethasone sodium phosphate, DSP) 为糖皮质激素类用药, 其价格便宜, 局部用药不良反应少, 可抑制纤维组织增生, 本实验将聚乳酸凝胶作为MMC、DSP的缓释载体用于喉气管瘢痕形成的动物模型, 研究其对气管纤维组织增生的抑制作用, 为未来研究PLGA支架涂层药物缓释载体对喉气管狭窄的治疗提供实验基础。

## 1 资料与方法

### 1.1 实验材料。

**1.1.1 试剂。**MMC (罗氏公司), 温敏型聚乳酸凝胶 (山东济南岱罡生物科技公司), DSP及曲安奈德对照品 (中国药品生物制品检定所), 甲醇 (色谱纯, Fisher Scientific公司), 甲酸 (色谱纯, 批号CDK4581, Wako公司), 娃哈哈纯净水。

**1.1.2 仪器。**恒温水浴摇床, Thermo TSQ Quantum Access三重四极杆串联质谱仪, 配有电喷雾离子源 (ESI)、山特C10KS UPS和Edward mechanical pump, Thermo Accela超高效液相色谱仪, 配有Accela的高压泵、自动进样器、柱温箱、Xcalibur 2.0.7系统软件, LABCONCO Refrigerated CentriVap Concentrator台式冷冻离心浓缩仪 (美国LABCONCO公司); N-EVAP112 Nitrogen evaporator氮吹仪和OA-SYS heating System (Organomation Associates) 高速冷冻离心机: Sakura M201-IVD; 高速台式离心机: Eppendorf centrifuge 5415R; 涡旋机Stuart和Vortex Genie 2; 取液器: Biohit Proline等

**1.1.3 实验动物。**新西兰大白兔, 由海军总医院动物室提供。

**1.2 体外MMC、DSP缓释实验。**

**1.2.1 体外释放条件。**将聚乳酸凝胶加入双蒸水, 于4℃冰箱中放置24 h以上, 直至完全溶解得到澄清溶液, 搅拌下加入MMC、DSP搅拌10 min。37℃水浴放置5 min, 制成原位凝胶。取1 ml 1 mg/ml的MMC聚乳酸凝胶及1 ml 2 mg/ml的DSP聚乳酸凝胶分别置于10 ml PH为7.4 PBS中, 在37℃恒温摇床中培养, 以120 r/min的速度持续振荡。分别于1、4、6、8、12 h, 1、3、5、7、14、21、28、35 d取出样本100 μl并加入等量的新鲜PBS溶液<sup>[6]</sup>。

**1.2.2 样本测试。**采用紫外分光光度法测定样本浓度, 各样本通过0.45 μm微孔滤膜过滤, 测定释放介质中MMC及DSP的含量。通过观察各时间点留取的浸出液分别测出在365 nm及242 nm处的紫外分光光度值, 实验重复3次。

**1.2.3 累积释放率的计算。**利用标准曲线计算各标本药物浓度, 用SPSS13.0统计软件包绘制凝胶释药浓度与时间关系曲线。

**1.3 动物体内缓释实验。**

**1.3.1 给药方法。**新西兰大白兔42只, 2个月龄, 重量 (2.05±0.21) kg, 雌雄不限。共分成7组, 每组6只: 载MMC组3组, 分别为0.1、0.2、0.4 mg, 载DSP组3组, 分别为1、2、3 mg, 空白对照组1组。每只动物在麻醉 (速眠新与氯胺酮1:1混合, 1 ml/kg) 下进行, 用15号手术刀对气管外壁 (约第2~5气管环) 不断搔刮30次, 约5 mm×10 mm大小, 明显充血后放置0.2 ml聚乳酸凝胶与明胶海绵的混合物, 并用半圆形硅胶管置于药物凝胶上方固定, 空白组聚乳酸凝胶与明胶海绵的混合物中不含有药物。观察时间为术后4周, 通过空气栓塞处死动物后取标本, 标本经过福尔马林固定, 石蜡切片, 然后进行HE染色后在光学显微镜下观察纤维组织增生厚度, 通过IMAGE J软件处理计算气管外壁至纤维组织增生最高点的垂直距离。

**1.3.2 样本采集。**分别在1、3、7、10、14、21 d从耳缘静脉取血1 ml, 3000 r/min, 离心15 min, 取上清血浆-80℃冻存。分别在1、7、14 d从耳缘静脉抽血1.5 ml, 进行血常规检查。

**1.3.3 样本测试。**取4.0 ml eppendorf管, 加入200 μl 混合兔血浆, 分别加内标曲安奈德 (triamcinolone acetone, TCL) 各10 μl, 振荡混匀, 再分别加入有机溶剂2.2 ml, 振荡2 min, 于4℃ 6000 rpm高速离心5 min,

取上清液2.0 ml于40℃离心浓缩挥干后, 加200 μl流动相溶解, 振荡1 min, 于7000 rpm高速离心5 min, 精密吸取上清液加取10 μl进样分析。通过超高效液相色谱-电喷雾-串联三重四极杆质谱法测定家兔血浆中MMC的含量。

1.3.4 实验结果采用SPSS13.0统计软件进行数据分析, 定量资料的数据近似正态分布采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 通过One-Way ANOVA进行多组样本均数的比较。

## 2 结果

2.1 体外释放实验。1 mg MMC在体外缓释时间可达35 d以上, 2 mg DSP在体外缓释时间可达28 d以上。DSP早期释放相对较快, 6 h DSP累积释放浓度达(31.51 ± 2.31)%, 28 d时累积释放浓度达(92.01 ± 1.76)%, 以后释放逐渐缓慢, 逐渐趋于平衡(图1)。MMC在21 d之前释放较缓慢, 累积释放浓度达(32.05 ± 1.81)%, 35 d时累积释放浓度达(84.28 ± 3.06)%, 此后释放速度越来越快, 考虑与MMC药物本身不稳定有关(图2)。

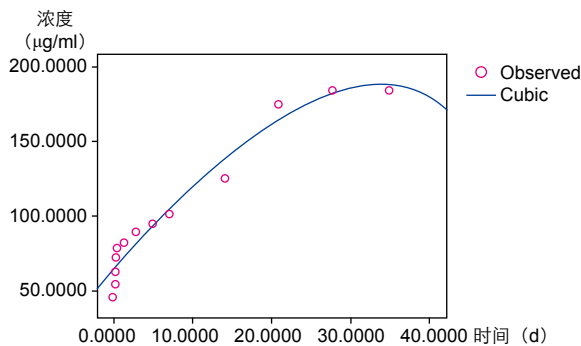


图1 体外实验DSP累积释放率

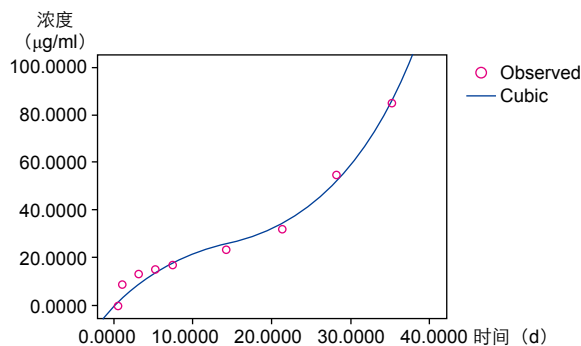


图2 体外实验MMC累积释放率

2.2 动物体内释放实验。通过超高效液相色谱-电喷雾-串联三重四极杆质谱法测定家兔血浆中MMC的含量, 测量其中一组0.4 mg MMC在动物体内缓释浓度, 从第1~21天血浆中平均浓度为(0.16 ± 0.12) ng/ml, 在第7天释放浓度达到高峰, 第10天以后药物释放逐渐趋于平衡(图3)。MMC药物浓度在动物血浆内非常低, 术后1、7、14 d抽血观察白细胞计数, 结果分别为(9.03 ± 1.57) × 10<sup>9</sup>/L、(9.85 ± 1.63) × 10<sup>9</sup>/L和(10.17 ± 3.11) × 10<sup>9</sup>/L, 通过One-Way ANOVA LSD检验发现3组白细胞计数差别无显

著统计学意义。由于DSP用量较小, 局部给药对全身的不良反应少, 故未测其体内释放浓度。

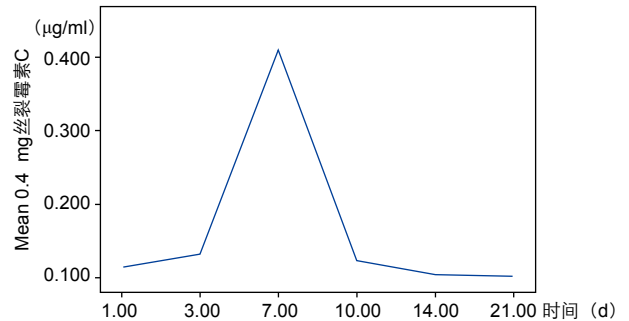


图3 动物体内0.4 mg 丝裂霉素C释放浓度曲线

2.3 HE染色观察瘢痕增生厚度。术后4周动物气管外壁纤维增生组织标本, 空白组与0.1 mg MMC组纤维组织增生厚度无明显差别, 随着不同MMC剂量的增加, 抑制纤维组织增生的作用越强; 1 mg DSP与2 mg DSP对纤维组织增生无明显差异(图4~图9)。MMC与DSP药物凝胶在术后4周尚未完全降解, 药物缓释时间较长。空白组与两种药物凝胶的各个剂量组对纤维组织增生的抑制作用效果(除0.1 mg MMC组外)差异均有统计学意义(表1); 在MMC凝胶不同剂量组中, 0.4 mg MMC组与其他剂量组纤维组织增生厚度差异均有统计学意义(与0.1 mg MMC组相比 $t = -0.480$ , 与0.2 mg MMC组相比,  $t = -0.317$ ,  $P$ 均 < 0.05), 0.4 mg MMC为动物体内抑制纤维组织增生效果最好的最低剂量; 在DSP不同剂量组中, 总体差异无显著统计学意义( $t$ 分别为0.132、0.167、0.035,  $P$ 均 > 0.05), 1 mg DSP为动物体内最大程度抑制气管瘢痕形成的合适剂量; 0.4 mg MMC与DSP各组间抑制纤维组织增生的程度差异均无统计学意义(与1 mg DSP组相比 $t = -0.138$ , 与2 mg DSP组相比 $t = -0.007$ , 与3 mg DSP组相比 $t = 0.028$ ,  $P$ 均 > 0.05)。

## 3 讨论

MMC最早发现于1956年, 是从头状链霉菌培养液中分离提取的一种广谱抗肿瘤药物, 其作用原理是通过解聚细胞DNA, 阻碍其复制, 从而抑制细胞(包括肿瘤细胞、成纤维细胞等)的有丝分裂。MMC可以抑制细胞分裂、

表1 4周时空白组与MMC及DSP不同剂量组气管周围纤维组织增生厚度差异( $\bar{x} \pm s$ , mm)

药物及剂量	气管周围纤维组织增生厚度	$t$	$P$
空白组	0.82 ± 0.29		
0.1 mg MMC	0.65 ± 0.16	0.168	0.165
0.2 mg MMC	0.49 ± 0.24	0.332	0.008
0.4 mg MMC	0.17 ± 0.09	0.648	0.000
1 mg DSP	0.31 ± 0.33	0.510	0.000
2 mg DSP	0.18 ± 0.13	0.642	0.000
3 mg DSP	0.14 ± 0.13	0.677	0.000

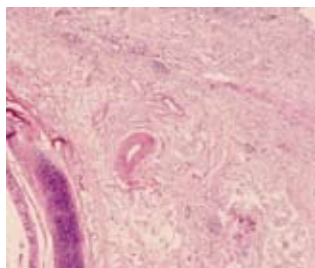


图4 空白对照组, HE×40

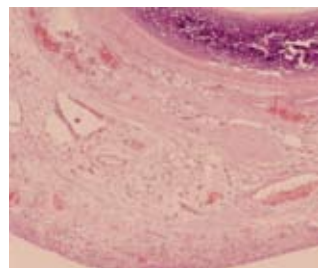


图5 0.1 mg MMC组, HE×40

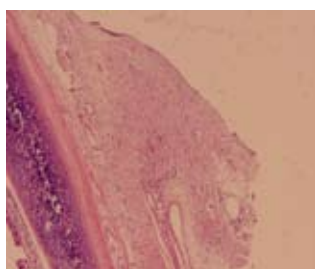


图6 0.2 mg MMC组, HE×40

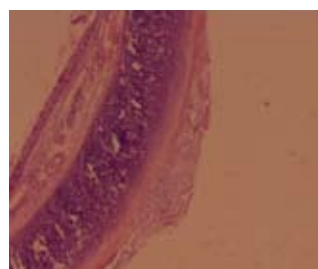


图7 0.4 mg MMC组, HE×40

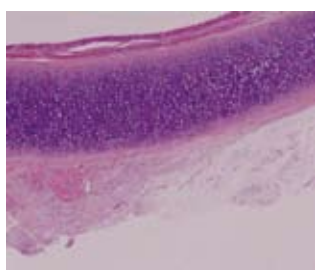


图8 1 mg DSP组, HE×40

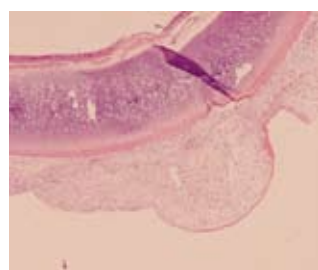


图9 2 mg DSP组, HE×40

蛋白合成和纤维细胞增生。作为一种广谱抗肿瘤药物, MMC常用于乳腺、肺、胰腺及结肠直肠癌的系统化疗。Rahbar等<sup>[7]</sup>报道MMC可减少纤维肉芽的生成及最终减少喉狭窄的形成。DSP为糖皮质激素, 具有明显抗炎作用, 其对各种原因(物理、化学、生物、免疫等)引起炎症都有很强的抗炎作用, 减轻炎症早期的渗出、水肿、毛细血管扩张、白细胞浸润及吞噬反应。在炎症后期可抑制毛细血管和纤维母细胞的增生, 延缓肉芽组织生成, 防止粘连及瘢痕形成。方怀玺和张明<sup>[8]</sup>对地塞米松明胶海绵复合物预防硬脊膜外粘连进行研究, 发现对于瘢痕粘连有一定的临床效果, 但对于气管瘢痕形成的局部DSP药物凝胶治疗国内外尚未报道。

温敏型聚乳酸水凝胶可以随环境温度的变化而发生可逆性的相转变, 为可降解性的生物性材料, 与组织生物相容性好<sup>[9]</sup>。根据材料的特点, 将其作为组织缺损的一种填充材料或者可用于注射到体内的药物缓释载体。聚乳酸凝胶在冷藏条件下为液态, 常温下为胶体状, 可携带药物, 在喉气管疾病应用方面, 可作为良好的注射用药物缓释载

体。温敏型聚乳酸凝胶注射到体内后, 在体温作用下原位凝固, 可将其作为药物释放载体, 把所需剂量的药物与聚乳酸凝胶混合后注射到患病部位, 可迅速形成凝胶。这种原位形成的水凝胶可以和周围组织牢固的结合, 可控制在特定部位形成凝胶, 在病灶处精确地释放包裹的药物, 有效地控制了凝胶中药物的释放范围, 减轻全身的不良反应。

不管在体外或者体内进行药物缓释实验, 我们都可以发现聚乳酸凝胶包裹药物释放速度较慢, 2 mg DSP聚乳酸凝胶体外可持续释放达4周以上, 1 mg MMC聚乳酸凝胶体外释放时间达5周以上, 0.4 mg MMC聚乳酸凝胶在体内21 d仍未释放完全, 第7天时血液浓度达到高峰, 缓释速度缓慢, 对全身的影响小, 可以作为抗肿瘤药物的良好载体, 对肿瘤可以长期持续作用。

在耳鼻咽喉头颈外科手术中, 目前常用的预防粘连的药物为MMC, 通过本实验研究可以发现, 0.1 mg MMC组与空白组相比, 对气管壁纤维组织增生的抑制作用不大, 说明0.1 mg MMC尚未达到治疗的剂量。1、2、3 mg DSP剂量组中对纤维组织增生的抑制效果与MMC组最佳抑制纤维增生的0.4 mg MMC剂量组无显著统计学差异, 故可将0.4 mg MMC、1 mg DSP的聚乳酸凝胶作为动物体内抑制喉气管瘢痕形成的最适剂量。

随着分子生物材料的发展和工艺技术的进步, 生物可降解材料与组织的相容性越来越好, 其在临床上的使用也越来越广泛, 与临床实际应用联系越来越紧密。近年来由于聚乳酸材料的研究和推广, 其药物缓释载体方面相关临床实验研究越来越多, 对其生物材料性质有了更深入的了解。本研究主要将其作为气管局部给药的缓释载体, 预防喉气管纤维组织的增生。目前喉气管狭窄是困扰耳鼻喉科医师的一个临床难题, 其主要原因为外伤引起瘢痕组织增生引起喉气管管腔狭窄, 心血管内科药物涂层冠脉支架在临床上研究及应用较广<sup>[10, 11]</sup>, Laaksovirta等<sup>[12]</sup>2001年报道了PLGA支架作为前列腺螺旋支架支撑尿道缓解尿路梗阻的实验研究, Robey等<sup>[13]</sup>动物实验证明了PLGA可降解支架可以在气道内固定与支撑手术重建的气道。PLGA及PLA能在一定的时期内维持一定的形状。根据不同聚乳酸与聚乙醇酸的比例, 可以研制不同降解速度、硬度与强度的支架, 并包裹MMC、DSP等预防纤维组织增生的药物, 不仅可以维持支撑管腔, 还可以抑制瘢痕形成, 从而达到预防喉气管狭窄的目的。本实验在动物模型方面稍作修改, 由于新西兰大白兔气管细, 气管切开不能成活, 虽进行大量动物实验也没能建立喉气管狭窄模型, 由于经费限制没有进行大型动物(如犬)的研究, 而将其动物模型改为新西兰大白兔喉气管外壁纤维组织增生模型, 并成功建立, 而不影响研究结果, 为未来研究可生物降解PLGA支架的涂层药物缓释治疗喉气管狭窄提供了实验基础。

## 参考文献

1. Simpson CB, James JC. The efficacy of mitomycin-C in the treatment of laryngotracheal stenosis. *Laryngoscope*, 2006, 116: 1923-1925.
2. Smith LP, Roy S. Treatment strategy for iatrogenic nasal vestibular stenosis in young children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2006, 70: 1369-1373.
3. Huan EM, Simpson CB. Airway complications from topical mitomycin C. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2005, 133: 831-835.
4. Rahbar R, Valdez T, Shapshay S. Preliminary results of intraoperative mitomycin-C in the treatment and prevention of glottic and subglottic stenosis. *J Voice*, 2000, 14: 282-286.
5. Kolachala VL, Henriquez OA, Shams S, et al. Slow-release nanoparticle-encapsulated delivery system for laryngeal injection. *Laryngoscope*, 2010, 120: 988-994.
6. 殷香保, 王捷, 伍衡, 等. 丝裂霉素纤维蛋白胶凝胶化治疗的缓释特性. *中山大学学报(医学科学版)*, 2004, 25: 542-545.
7. Rahbar R, Shapshay SM, Healy GB. Mitomycin: effects on laryngeal and tracheal stenosis, benefits, and complications. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2001, 110: 1-6.
8. 方怀玺, 张明. 地塞米松明胶海绵复合物预防硬脊膜外粘连: 83例随访. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 35: 7084-7085.
9. Jeong B, Bae YH, Kim SW. Drug release from biodegradable injectable thermosensitive hydrogel of PEG-PLGA-PEG triblock copolymers. *J Control Release*, 2000, 63: 155-163.
10. Tamai H, Igaki K, Kyo E, et al. Initial and 6-month results of biodegradable poly-L-lactic acid coronary stents in humans. *Circulation*, 2000, 102: 399-404.
11. Ormiston JA, Webster MW, Armstrong G. First-in-human implantation of a fully bioabsorbable drug-eluting stent: the BVS poly-L-lactic acid everolimus-eluting coronary stent. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2007, 69: 128-131.
12. Laaksovirta S, Talja M, Välimaa T, et al. Expansion and bioabsorption of the self-reinforced lactic and glycolic acid copolymer prostatic spiral stent. *J Urol*, 2001, 166: 919-922.
13. Robey TC, Välimaa T, Murphy HS, et al. Use of internal bioabsorbable PLGA "finger-type" stents in a rabbit tracheal reconstruction model. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2000, 126: 985-991.

(收稿日期: 2011-09-02)

编辑 卢曦