

氟碳乳剂的制备及其对机体供氧能力研究

闻郑峰¹, 朱 君², 管 军¹, 姚燕杰², 刘 恬², 何丹农², 林兆奋¹

(1. 第二军医大学附属长征医院急救科, 上海 200003)

(2. 纳米技术及应用国家工程研究中心, 上海 200241)

摘 要: 探究了以人工肺表面活性物质 (APS) 为载体的氟碳乳剂对肺癌细胞 (A549) 生长的影响以及通过肺部给药后对海水淹溺动物肺部氧合能力的改善情况。制备得到了分散性较好的氟碳乳剂, 其平均粒径为 46.62 nm。通过核磁共振及离子色谱证明了氟碳成功地封装其中, 氟碳的含量为 23.54%。通过 A549 细胞共孵育实验, 证明了氟碳乳剂能在 1% 氧浓度下较明显地促进 A549 细胞增殖; 当氟碳乳剂浓度为 5 mg/mL 时, 细胞增殖率达 124%, 而在正常氧浓度下, 其对 A549 细胞增殖无明显作用。实验兔的海水淹溺模型实验证明了, 海水淹溺实验兔氟碳乳剂肺部给药后血氧分压迅速恢复, 氟碳乳剂具有一定改善动物肺部氧合的能力。氟碳乳剂在低氧下能促进 A549 细胞增殖, 通过肺部给药后对海水淹溺动物肺部氧合能力有一定的改善, 这说明其在通过肺部给药来改善肺部通气应用中有潜在的应用价值。

关键词: 全氟化碳; 人工肺表面活性物质; 细胞增殖; 肺部氧合

中图分类号: R944 文献标识码: A 文章编号: 1674-3962(2016)06-0457-04

The Preparation of Perfluorocarbon Emulsion and Its Ability of Oxygen Supply to Organism

WEN Zhengfeng¹, ZHU Jun², GUAN Jun¹, YAO Yanjie², LIU Tian²,
HE Dannong², LIN Zhaofen¹

(1. Department of Emergency, Changzheng Hospital, The Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

(2. National Engineering Research Center for Nanotechnology, Shanghai 200241, China)

Abstract: Artificial pulmonary surfactant (APS) /Perfluorocarbon (PFC) emulsion using APS as a carrier is prepared through high-speed emulsification, the effect of APS/PFC emulsion on cell proliferation and its ability of improving pulmonary oxygenation to seawater drowning rabbits are explored. PFC content of APS/PFOB freeze-dried powder is 23.54%. A549 cell viability is increased gradually with the increasing concentration of APS/PFOB emulsion under condition of 1% oxygen concentration. About 124% cell proliferation rate is maintained when the concentration is 5 mg/mL. Moreover, it is demonstrated that APS/PFOB emulsion can improve pulmonary oxygenation to seawater drowning rabbits through pulmonary delivery. APS/PFC emulsion has abilities of promoting A549 cell proliferation during hypoxia and improving pulmonary oxygenation to seawater drowning rabbits through pulmonary delivery, it has potential application for improving lung ventilation.

Key words: perfluorocarbon; artificial pulmonary surfactant; cell proliferation; pulmonary oxygenation

1 前 言

目前, 研究较多的载氧体主要包括血红蛋白、氟碳化合物、合成血红素及其高分子配合物^[1]。其中, 氟碳化合物 (Perfluorocarbon, PFC) 是一种具有广泛的生物医学用途的大家族化合物。它具有稳定的物理化学性质, 同时具有良好的溶解气体的功能, 可以作为氧气和二氧化碳的运载体, 但由于其不溶于水及生物体液, 不

收稿日期: 2015-09-30

基金项目: 国家科技支撑计划 (2014BAK05B02); 国家自然科学基金 (51303135); 闵行区民生科技项目 (2014 MH089)

第一作者: 闻郑峰, 男, 1989 年生, 硕士研究生

通讯作者: 林兆奋, 男, 1964 年生, 教授, 博士生导师, Email: linzhaofen@sina.com

DOI: 10.7502/j.issn.1674-3962.2016.06.09

能直接应用于生物体,所以必须乳化以后才能使用。目前,氟碳乳剂已经成为研究的热点,其在人工血液、诊断造影、肺部通气等方面获得了大量的关注^[2-4],例如, Pisani 等采用包封全氟溴辛烷 (PFOB) 的聚合物球囊为超声和磁共振成像的双模态造影剂^[5]。Bauer 等将氟碳包封在聚合物纳米球或微球中作人工氧载体,用作血液替代品^[6]。然而,目前对于氟碳的研究多数停留在了实验阶段,无法实现其真正的应用,所以,对于氟碳及氟碳乳剂的研究依然值得关注。

肺部是人体的开放性器官,作为蛋白多肽类药物的给药部位具有吸收面积大,血容量丰富,生物酶活性低等优点^[7-8]。肺泡表面活性物质 (Pulmonary Surfactant, PS) 是存在于正常肺泡内表面的一种能减弱肺泡表面张力的物质。这是一种以磷脂为主要成分的脂质和表面活性蛋白混合物,在肺泡表面具有独特的铺展功能和动态表面张力,能够降低肺泡表面张力,稳定肺泡,防止呼吸末期肺泡萎陷,以及免疫调节和器官保护特性,治疗肺部疾病^[9-11]。在临床上,人工肺表面活性物质 (Artificial Pulmonary Surfactant, APS) 制剂已被用于治疗肺部疾病或原发性疾病继发所引起的急性呼吸衰竭。APS 主要借助于与天然的 PS 相似的生理功能,弥补病理状态下机体自身 PS 成分、含量及异常所致的肺损伤,减轻肺功能障碍和支气管阻塞程度,缓解和改善病情。目前,利用 APS 为载体包载氟碳来作为肺部供氧材料的研究尚未见报道。

本文以二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC)、蛋黄卵磷脂为主要磷脂成分,添加四丁酚醛等表面活性剂来制备 APS^[12-13],并以其为载体,全氟溴辛烷 (PFOB) 为载氧体制备了 APS/PFOB 乳剂。并探究其对肺癌细胞 (A549) 生长的影响以及通过肺部给药后对海水淹溺模型氧合的改善。

2 实验方法

2.1 试剂

二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC, 百灵威)、蛋黄卵磷脂 (上海三杰生物技术有限公司)、全氟溴辛烷 (PFOB, Sigma)、甘油 (AR, 国药)、维生素 E (AR, 国药)、四丁酚醛 (阿拉丁)、胎牛血清 (Gibco)、F-12K 培养基 (Gibco)、青-链霉素 (Gibco)、CCK-8 (北京泛博生物化学有限公司)。

2.2 仪器

S25-2 型恒温磁力搅拌器 (上海司乐仪器有限公司)、超纯水机 (Hitech, 美国)、匀浆机 (IKA, 德国)、IMark 酶标仪 (Bio-rid, 美国)、CO₂ 恒温培养箱

(Thermo, 美国)、三气培养箱 (长沙华曦电子科技有限公司, 中国)、核磁共振仪 (Bruker, 德国)、纳米激光粒度仪 (Malvern, 英国)、透射电子显微镜 (JEOL, 日本)、离子色谱仪 (Dionex 500, 美国)。

2.3 氟碳乳剂的制备

取 60 mg DPPC、60 mg 蛋黄卵磷脂、10 mg 维生素 E、8 μ L 甘油、6 μ L 四丁酚醛与 2 mL PBS (pH = 7.4) 混合,将其置于恒温磁力搅拌器上,在 40 $^{\circ}$ C 下搅拌至无明显块状物时,冷却至室温,呈悬浊液状态。在反应液中加入 PFOB,在室温下采用匀浆机进行搅拌 (4 档),搅拌 1 min 停 1 min,间歇进行,往复 1~3 h。之后将其置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱内静置过夜,弃去下层沉淀,取上清液于离心机中离心 3 min,转速 2000 rpm,结束后取上清液即可^[13]。

2.4 乳剂的表征

将乳剂稀释 5 倍,利用马尔文激光粒度仪检测乳剂的粒径分布。透射电镜观察时,将乳剂稀释后滴至铜网,再用镊子将铜网捏住浸入 4% 的磷钨酸溶液中 40~50 s,然后取出烘干即可。离子色谱检测采用氧瓶燃烧法,分离柱: IonPac AG₁₄-AS₁₄,检测方式: 电导,淋洗液: NaHCO₃ 0.0010 M+Na₂CO₃ 0.0035 M,检测前先将样品冻干即可。¹⁹F 核磁共振检测时,将样品冻干后重溶于氘水检测即可。

2.5 细胞培养

肺癌细胞 (A549) 培养在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中,培养基为含 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素的 F-12K 培养基。细胞传代: 吸出培养基,用无菌 PBS 洗一遍,加入 0.25% 胰酶 1 mL 消化细胞,等到细胞变圆后加入 1 mL 培养基吹打,以 1000 r/min 离心细胞悬液 3 min,倒掉上层液体,再加入 1 mL 培养基将细胞吹打均匀,一传二接种至培养皿中。

2.6 氟碳乳剂对细胞生长影响

将 A549 细胞消化离心后以 5000/孔接种于 96 孔板中,每孔 100 μ L 培养基,放入二氧化碳恒温培养箱中培养。12 h 后,吸出培养基,每一列以 6 孔为单位,加入含有不同浓度氟碳乳剂的培养基,浓度分别为 0.04、0.08、0.15、0.3、0.6、1.2、2.5、5 mg/mL,阴性对照组中只加 F-12K 培养基。分别在正常氧浓度和 1% 氧浓度下培养 12 h,之后吸出培养基,加入 100 μ L 含 10% CCK-8 的培养基,在未接种细胞的一组空白孔也加入含 CCK-8 的培养基作为空白对照组,在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 4 h^[14-15]。用 IMark 酶标仪检测 96 孔板各孔在 450 nm 波长处的吸光度 (A 值),计算出各组吸光度的均值,以阴性对照组的吸光度值作为 100% 的细胞增殖率,不

同浓度及条件组的细胞增殖率依据以下公式求出: $P\% = (\text{各组 A 均值} - \text{空白组 A 值}) / (\text{阴性对照组 A 均值} - \text{空白组 A 值}) \times 100\%$ 。

2.7 体内供氧实验

建立实验兔海水淹溺缺氧模型, 通过肺部给药, 探究氟碳乳剂对动物氧合的作用效果。将实验兔分为两组, 分别进行海水淹溺的建模, 每只实验兔(约 2 kg)从气道灌注海水, 1.2 mL/min, 持续 5 min。海水灌注完后 30 min 进行给药处理。对照组从气道滴注 0.9% NaCl 溶液, 实验组滴注 APS/PFOB 乳剂, 观察实验兔的腿动脉处的血氧分压变化 (P_{O_2})。采用 3% 的戊巴比妥钠麻醉, 注射剂量为 2 mL/kg。气道滴注给药的速度为 0.5 mL/min, 最终给药量为 1 mL/kg。

2.8 统计学分析

数据结果通过均值 \pm 标准差呈现。使用 SPSS 18.0 软件进行统计分析, 采用独立样本 t 检查的方式比较各组的均值进行数据分析, P 值小于 0.05 认为具有统计学差异。

3 结果与讨论

图 1a 为乳剂的水合粒径分析结果, 其平均水合粒径 46.62 nm, 且分布较为集中。从图 1b 可以看出乳剂粒径普遍在 40 nm 左右, 单分散性很好, 几乎所有纳米球都是单独存在, 未出现团聚。纳米乳剂的粒径与分散

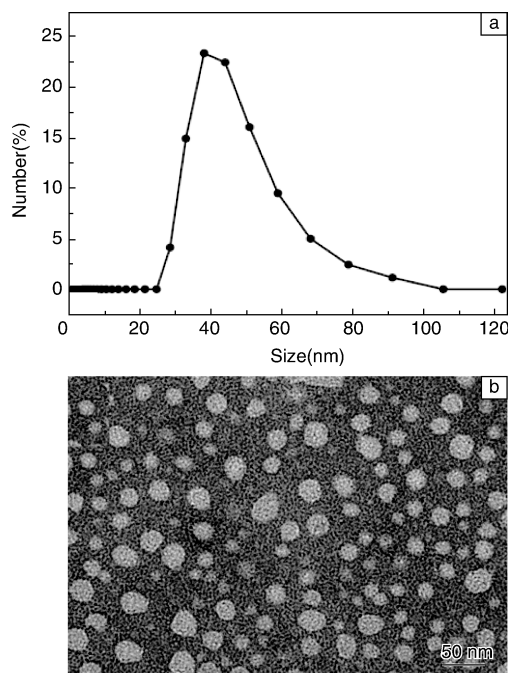


图1 氟碳乳剂的粒径分布 (a) 和 TEM 照片 (b)
Fig. 1 Size distribution (a) and TEM image (b) of APS/PFOB emulsion

性对其保存和应用有着重要的意义, 较小的粒径及较好的单分散性有利于其生物学的应用, 能更容易被生物体吸收产生作用, 也有利于其长时间的稳定保存。

为证明乳剂中成功包载了 PFOB, 我们对乳剂进行了 ^{19}F 核磁共振检测。如图 2 所示, 在化学位移为 6 左右的位置, 出现了 3 个较强的 ^{19}F 的峰, 分别对应 PFOB 中氟元素的 3 种不同化学环境, 这证明了 PFOB 被成功地包载在乳剂之中。此外, 通过离子色谱的检测, 定量地表征了材料中 PFOB 的载药量。样品冻干后离子色谱的检测结果为, F 含量为 15.24%, 经过换算可得出, PFOB 的含量为 23.54%。

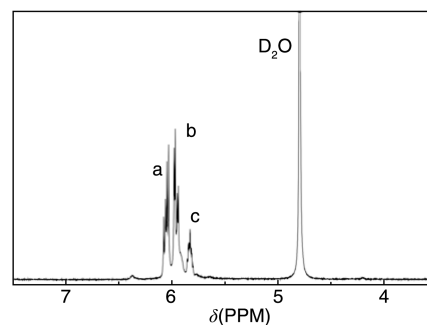


图2 APS/PFOB 乳剂的 ^{19}F 核磁共振图谱
Fig. 2 ^{19}F NMR spectrum of APS/PFOB emulsion

为探究 APS/PFOB 乳剂对不同条件下细胞生长的影响, 我们检测了 1% 氧浓度和正常氧浓度下, 其对细胞生长影响的区别。如图 3 所示, 在 1% 氧浓度下乳剂与细胞共孵育 12 h 后, 细胞增殖率随着氟碳乳剂浓度的提高而升高, 与对照组均有明显差异 ($P < 0.05$), 在浓度为 0.04~0.6 mg/mL 时升高较快, 之后趋于平缓, 当浓度达到 5 mg/mL 时, 细胞增殖率达到了 124%。而在正常氧浓度下共孵育的细胞增殖率有较大波动, 无明显变化趋势。从该实验结果可以推测, 在 1% 氧浓度下培养时, 由于环境中缺少氧气, PFOB 中溶解的氧气释放至培养基, 被细胞吸收, 促进细胞增殖。细胞乳剂浓度越高, 含氧量也就越多, 对细胞的促进作用越明显。而在正常氧浓度下培养时, 环境中本身不缺少氧气, 氟碳乳剂的存在并不能起到明显的作用, 甚至由于乳剂的添加对细胞生长产生了一定的影响, 使其增殖率出现波动。

为进一步探究氟碳乳剂的体内供氧能力, 我们采用实验兔的海水淹溺模型进行了实验。如图 4 所示, 实验兔正常呼吸时其血氧分压 (P_{O_2}) 为在 100 mmHg 左右, 在灌注海水以后其血氧分压急速下降至 40 mmHg 左右, 并且在半小时后依然无明显变化, 这可能是由于海水淹溺不仅造成了窒息, 也对肺部造成了无法快速恢复的损伤, 导致肺部氧合能力下降。而在给药后, 实验兔的血

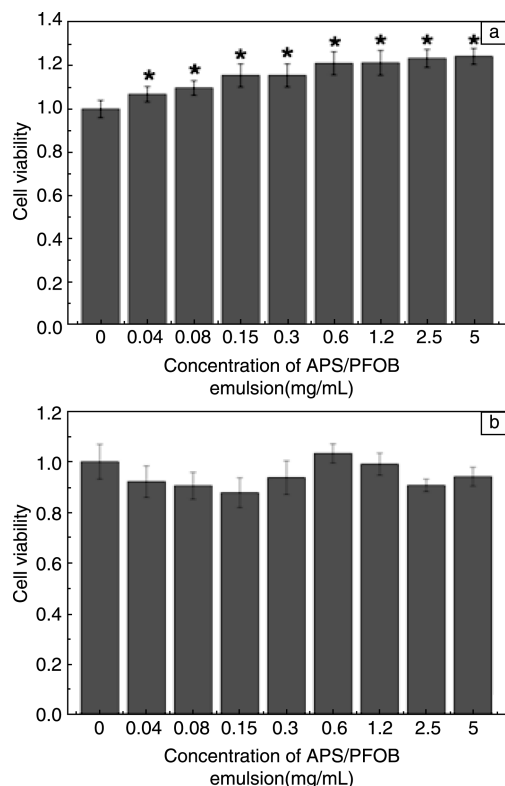


图 3 APS/PFOB 乳剂与 A549 细胞在 1% 氧浓度 (a) 和正常氧浓度下 (b) 孵育 12 h 后细胞增殖情况; * 代表相比于对照组有统计学差异 ($P < 0.05$)

Fig. 3 A549 cell proliferation after incubated with APS/PFOB emulsion for 12 h under the condition of 1% oxygen concentration and normoxia, respectively. * indicates significant differences compared to the control group ($P < 0.05$)

氧分压逐渐恢复,特别是在 60 min 左右的时间内恢复最为迅速,最终血氧分压稳定在 100 mmHg 左右。而滴注生理盐水的对照组,其血氧分压恢复缓慢,最终只稳定在了 60 mmHg 左右的位置。该实验结果说明氟碳乳剂能够改善海水淹溺后的肺部氧合能力,帮助动物更快地恢复血氧分压。作者认为氟碳乳剂的这一效果,既得益于氟碳本身的载氧能力,也得益于我们采用人工肺表面活性物质作为载体,其有助于改善肺部的氧合能力。

4 结 论

本文采用高速乳化法,以人工肺表面活性物质为载体,制备得到了分散性较好的氟碳乳剂,其平均粒径为 46.62 nm。通过核磁共振及离子色谱证明了氟碳成功地包封其中,氟碳的含量为 23.54%。此外,通过 A549 细胞共孵育实验,证明了氟碳乳剂能在 1% 氧浓度下较明显地促进 A549 细胞增殖,当氟碳乳剂浓度为 5 mg/mL 时,细胞增殖率达 124%,而在正常氧浓度下,其对 A549 细胞增殖无明显作用。通过实验兔的海水淹溺模

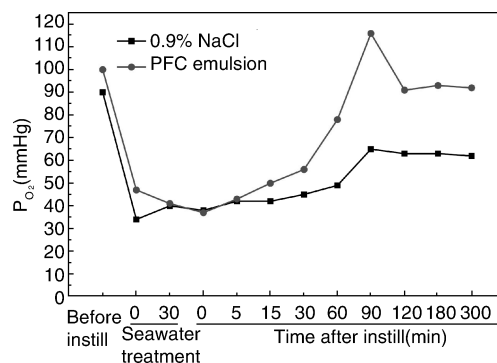


图 4 海水淹溺模型的实验兔经 APS/PFOB 乳剂肺部给药后血氧分压变化

Fig. 4 P_{O_2} changes of seawater drowning rabbits after APS/PFOB emulsion pulmonary delivery

型实验的验证,证明了氟碳乳剂具有一定改善动物肺部氧合的能力,这说明其未来有潜在的应用价值。

参考文献 References

- [1] Simoni J. *Artificial Organs* [J], 2012, 36 (2): 123-126.
- [2] Brandhorst D, Iken M, Brendel M D, et al. *Transplantation* [J], 2005, 79 (4): 433-437.
- [3] Lowe K C. *Journal of Materials Chemistry* [J], 2006, 16 (43): 4 189.
- [4] Diaz-Lopez R, Tsapis N, Santin M, et al. *Biomaterials* [J], 2010, 31 (7): 1 723-1 731.
- [5] Pisani E, Tsapis N, Galaz B, et al. *Advanced Functional Materials* [J], 2008, 18 (19): 2 963-2 971.
- [6] Bauer J, Zahres M, Zeller mann A, et al. *Journal of Microencapsulation* [J], 2010, 27 (2): 122-132.
- [7] Mansour H M, Rhee Y S, Wu X. *International Journal of Nanomedicine* [J], 2009, 4: 299-319.
- [8] Smola M, Vandamme T, Sokolowski A. *International Journal of Nanomedicine* [J], 2008, 3 (1): 1-19.
- [9] Haitisma J J, Lachmann U, Lachmann B. *Advanced Drug Delivery Reviews* [J], 2001, 47 (2): 197-207.
- [10] Bakshi M S, Zhao L, Smith R, et al. *Biophysical Journal* [J], 2008, 94 (3): 855-868.
- [11] Creuwels L A J M, vanGolde L M G, Haagsman H P. *Lung* [J], 1997, 175 (1): 1-39.
- [12] Ji Y, Liu C, Pei Y Y. *Acta Pharmacologica Sinica* [J], 2007, 28 (5): 744-750.
- [13] Moolman F S. *Oxygen Carriers for a Novel Bio-Artificial Liver Support System* [M]. Pretoria: University of Pretoria, 2005.
- [14] Gao Y, Wu H, He D, et al. *Biomed Rep* [J], 2013, 1 (1): 47-52.
- [15] Ting L, Bo W, Li R, et al. *Molecular Biology Reports* [J], 2010, 37 (6): 2 593-2 598.