

肺部给药用高分子多孔微球的生物学评价研究进展

唐娜^①, 陈爱政^{①②*}, 王士斌^{①②}, 赵趁^①

① 华侨大学化工学院, 厦门 361021;

② 华侨大学生物材料与组织工程研究所, 厦门 361021

* 联系人, E-mail: azchen@hqu.edu.cn

2013-09-04 收稿, 2013-12-13 接受, 2014-05-16 网络版发表

国家自然科学基金(31170939, 51103049, 81171471)和华侨大学青年教师科研提升资助计划(ZQN-PY107)资助

摘要 肺部给药作为一种非侵入性给药方式, 在蛋白质、多肽类药物及肺部疾病药物的研究中得到快速发展. 具有低质量密度($<0.4 \text{ g/cm}^3$)和较大几何粒径($>10.0 \text{ }\mu\text{m}$)的载药高分子多孔微球, 可以在肺部有效地沉积并且减少肺部巨噬细胞的吞噬, 实现药物的局部或全身传递. 高分子多孔微球作为药物载体必须具备生物相容性和医用功能性 2 个基本特征. 本文主要综述了近年来对该基本特征进行生物学评价的研究进展, 并对研究中存在的问题提出建议. 其中生物相容性评价内容涵盖细胞、整体、分子 3 个水平; 医用功能性评价内容包括肺内沉积、肺部清除与吸收和载药高分子多孔微球的药效学研究进展.

关键词

高分子多孔微球
肺部给药
生物相容性
肺内沉积
药效学评价

20 世纪 50 年代, 肺部给药应用于治疗哮喘的急性发作, 是将药物制成气雾颗粒或干粉颗粒的形式, 以吸入气道和肺内来治疗疾病的一种方法, 这标志着肺部给药系统在临床上的真正应用. 近年来, 利用肺部给药进行蛋白质、多肽类药物以及疫苗、基因等传递已是当前给药系统中研究的热点之一^[1-3]. 肺复杂而特殊的生理结构使得肺部给药相较于其他给药途径占有很大的优势^[4,5]: 人体肺表面积大于 100 m^2 , 药物吸收面积大; 肺泡上皮细胞层薄($0.1\sim0.2 \text{ }\mu\text{m}$), 物质交换距离短, 药物吸收速度快; 肺部生物代谢酶活性低, 无肝脏首过效应, 生物利用度高.

肺部给药制剂可分为吸入喷雾剂、定量吸入气雾剂(metered dose inhalation, MDI)和干粉吸入剂(dry powder inhalation, DPI)3 种. DPI 相较于其他制剂具有明显优势, 不使用抛射剂, 不使用压力容器, DPI 适合蛋白质、多肽类药物的存放及给药, 而且不受药物溶解度的影响, 是目前肺部制剂研究的热点^[6]. 通过肺部给药有 2 种治疗目的: (i) 局部治疗肺部疾病如支气管哮喘、慢性阻塞性肺病、囊性纤维化、肺癌等^[7-9]; (ii) 通过肺部吸收药物, 起到全身治疗作

用^[10-12]. 早期将微细化药物应用于肺部给药存在药物肺部沉积量小、药物活性不稳定、剂量不易控制、需频繁给药等问题. 针对存在的问题, 对药物进行结构修饰及制成适宜的药物剂型得到了进一步研究. 其中药物缓控释制剂可在较长时间内持续释放药物起长效作用, 可解决肺部频繁给药、血药浓度“峰谷”波动较大、大分子药物不易吸收及药物活性不稳定等问题.

在肺部给药用缓控释载体中, 药用高分子材料制备的微球因具有良好的生物相容性和持续释放性能备受关注, 常用的微球高分子材料包括壳聚糖、环糊精、聚乳酸(poly(L-lactide), PLLA)、聚乳酸羟基乙酸(poly(lactide-co-glycolide), PLGA)等^[13-15]. 应用于肺部给药的传统高分子实心微球因较难满足良好的空气动力学性质而大部分滞留于口咽部, 只有少部分能到达肺, 故如何提高药物粒子肺内沉积量变得尤为重要. 1997 年, Edwards 等人^[16]制备了质量密度小于 0.4 g/cm^3 , 平均几何粒径大于 $5.0 \text{ }\mu\text{m}$ 的 PLGA 多孔微球, 可以在肺部有效沉积并且减少了肺部巨噬细胞的吞噬. 随后制备大多孔粒子应用于肺部给药的研究进入快速发展阶段, 新的制备方法和装置

引用格式: 唐娜, 陈爱政, 王士斌, 等. 肺部给药用高分子多孔微球的生物学评价研究进展. 科学通报, 2014, 59: 1487-1496

Tang N, Chen A Z, Wang S B, et al. Biological evaluation of porous polymeric microspheres for pulmonary drug delivery (in Chinese). Chin Sci Bull (Chin Ver), 2014, 59: 1487-1496, doi: 10.1360/972013-1007

也得到不断发展^[17].

本课题组分别采用高压静电抗溶剂法^[18]和二氧化碳抗溶剂法^[19,20]成功制备了可吸入性载药PLLA多孔微球:首次采用高压静电抗溶剂法制备的载甲氨蝶呤的PLLA多孔微球的空气动力学直径(aerodynamical diameter, D_a)约为3.1 μm , 几何粒径(geometric diameter, D_g)为25.0 μm ; 超临界二氧化碳抗溶剂法制备的载甲氨蝶呤和载溶菌酶的PLLA多孔微球的 $D_a < 4.7 \mu\text{m}$, $D_g > 10.0 \mu\text{m}$; 以上3种载药微球均满足肺部给药微粒的空气动力学性质要求(D_a 为1~5 μm , $D_g > 10 \mu\text{m}$)^[21,22], 具有应用于肺部给药的潜质.

高分子多孔微球应用于肺部给药存在的主要问题包括需要特殊的给药装置、给药剂量不准确和使用安全性. 目前干粉吸入器在市场上已有销售, 新型的干粉吸入器主要致力于制造可完全输送药物和根据患者差异性而实现可调节吸入剂量的给药装置^[23,24]. 而对于肺部给药用高分子多孔微球在呼吸系统及体内的生物安全性, 目前并未有太多相关研究报道指出其利弊. 为保证肺部给药用高分子多孔微球的安全有效, 必须对其进行严格的生物学评价, 需具备生物相容性和医用功能性2个基本特征. 本文对肺部给药用高分子多孔微球的生物学评价研究进行综述, 将从生物相容性和医用功能性两大方面进行

总结, 其中生物相容性评价内容涵盖细胞、整体、分子3个水平, 医用功能性评价内容包括肺内沉积研究、肺部清除与吸收和载药高分子多孔微球的药效学研究进展.

1 肺部给药用高分子多孔微球的生物相容性研究进展

根据国际标准化组织(International Standardization Organization, ISO)定义, 生物相容性是指生命体组织对非活性材料产生合乎要求反应的一种性能, 一般是指材料与宿主之间的相容性. 药用高分子载体经肺部吸入给药后进入机体, 其生物相容性与载体性质以及肺部清除情况密切相关. 对于肺部给药剂剂的肺部安全性存在一定的争议, 主要研究肺上皮细胞损伤, 肺部免疫炎症和肺纤维化毒性. 如图1所示, 肺吸入颗粒物引起肺部毒性的几种作用机制密切相关, 主要包括^[25]: (i) 机体受刺激后产生过量高活性分子活性氧(reactive oxygen species, ROS)、活性氮(reactive nitrogen species, RNS), 引起细胞脂质过氧化、DNA 损伤、蛋白质损伤等效应造成肺上皮细胞损伤; (ii) ROS, RNS 活化胞内信号转导途径, 上调前炎性细胞因子、趋化因子和细胞黏附因子的转录和表达, 趋化炎性细胞和纤维细胞向损伤部位聚

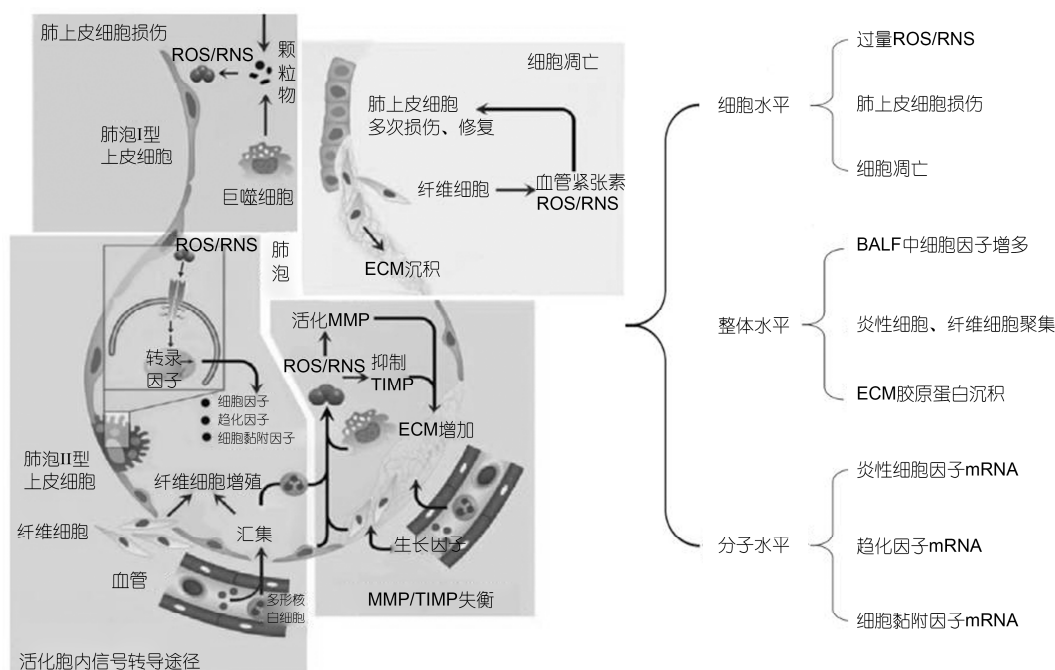


图1 肺吸入颗粒物的肺部毒性机制及各水平评价项目

集,造成炎性损伤;(iii) ROS, RNS 影响基质金属蛋白酶/组织金属蛋白酶抑制剂(matrix metalloproteinase/tissue inhibitor of metalloproteinase, MMP/TIMP)平衡,引起细胞外基质(extracellular matrix, ECM)稳态失衡,造成肺组织损伤;(iv) 肺上皮细胞反复的损伤和修复,纤维细胞聚集和 ECM 胶原蛋白的过度沉积,最终引起肺纤维化。相应地,可根据各个水平上检测指标(细胞因子、炎症细胞、胶原蛋白、mRNA 等)的变化进行肺吸入毒性研究。目前高分子药物载体的生物相容性研究主要从细胞、整体、分子 3 个水平展开^[26,27],要从作用机制层面进行生物相容性相关问题的研究。

1.1 细胞生物相容性

细胞生物相容性是指采用体外细胞培养法检测生物医用材料的生物相容性,具有简单、快捷、重复性佳且价廉等优点,被广泛应用于高分子药物载体的初步安全性评价。其体外实验结果可为进一步的体内动物实验提供一定的实验基础。针对高分子多孔微球经肺部给药后直接与生物体气道和肺接触,选用的细胞模型主要有 BEAS-2B, A549, 16HBE14o-, NHBE 和 Calu-3^[28]。常用的评价方法有形态学检测(光学显微镜、荧光显微镜/激光共聚焦显微镜、透射电子显微镜)、流式细胞技术(DNA 含量分析、膜联蛋白 V/碘化丙啶检测法)、四甲基偶氮唑盐法(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT 法)、二甲氧喹黄比色法(2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2h-tetrazolium-5-carboxanilide, XTT 法)、Alamar Blue 法、DNA 片段化检测和线粒体膜电位检测等。根据具体实验需求选择一种或多种方法进行检测,实验结果将更加可靠。

Kim 等人^[29]选用 Calu-3 和 A549 作为细胞模型研究白蛋白包覆 PLGA 多孔微球的细胞毒性,通过 MTT 法检测与多孔微球共培养 48 h 后 2 种细胞活性,结果表明均大于 90%,具有良好的细胞生物相容性,而且 Calu-3 细胞较 A549 细胞具有更好的相容性。Patel 等人^[30]和 Rawat 等人^[31]也选用 Calu-3 作为细胞模型,采用 MTT 法研究得到的 PLGA 多孔微球和聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸(poly(ethyleneglycol)-poly(lactic-co-glycolic acid), PEG-PLGA)多孔微球具有良好的细胞生物相容性。

目前,肺部给药用高分子多孔微球的细胞生物

相容性评价多集中在载体微球对肺上皮细胞毒性实验上。要探讨其肺部毒性机制,可选用适宜的细胞模型进行体外研究细胞因子、炎症因子等在肺部毒性中的作用,相较于体内模型具有操作简单、影响因素少的优势。为更好地模拟肺部真实环境,减少实验动物用量,国外研究者建立了共培养细胞模型来研究肺吸入毒性^[32]。此外,高分子多孔微球作为药物载体应用于人体医疗,应对其血液相容性引起重视。体外红细胞诱导的溶血实验是通过载体材料与血液直接接触,测定红细胞释放的血红蛋白量来评价载体材料血液相容性的方法,具有简单、可靠等优点,可用于初步评价高分子多孔微球的血液相容性。

1.2 整体生物相容性

整体水平生物相容性评价主要以小鼠(*Mus musculus*)、大鼠(*Rattus norvegicus*)和兔子(*Oryctolagus cuniculus*)等啮齿动物为实验模型研究肺部给药高分子多孔微球的生物相容性,包括肺上皮细胞损伤、免疫炎症和肺纤维化毒性。肺上皮细胞损伤主要表现为细胞膜通透性增高,可检测支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中细胞渗透物水平;免疫炎症主要表现为血管通透性增高,分泌液渗出,细胞因子(NF- κ B(nuclear factor κ B)、趋化因子、TNF- α (tumour necrosis factor- α), IL-6(interleukin-6), IL-8(interleukin-8)等)及炎症细胞(巨噬细胞、粒细胞、淋巴细胞)增加;肺纤维化毒性主要体现在纤维细胞聚集和 ECM 胶原蛋白过度沉积。

Patel 等人^[30]以大鼠作为实验模型研究了经肺部给药载肝素的 PEG-PLGA 多孔微球的肺损伤实验,检测 BALF 成分表明,给药多孔微球组大鼠 BALF 中碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)与乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)活性远低于内毒素处理的阳性对照组大鼠酶活性,手术摘除大鼠的肺称重未出现明显的肺水肿现象。实验结果表明,肺部给药 PEG-PLGA 多孔微球未造成大鼠肺损伤。Dhanda 等人^[33]选用小鼠为实验模型研究了经超临界流体技术制备的 PLGA 多孔微球的肺吸入毒性,包括肺损伤、炎症反应和肺纤维化实验。检测 BALF 中总蛋白、LDH 水平来反映肺损伤情况,结果显示各组无显著性差异;通过肺组织切片和检测 BALF 中细胞数量研究炎症反应,结果表明仅有温和的炎症反应;通过肺组织切片马森三色染色法观察 ECM 中胶原蛋白沉

积以及肺组织匀浆检测总胶原蛋白含量以考察肺纤维化情况,实验结果表明肺吸入给药 PLGA 多孔微球未引起小鼠肺纤维化毒性。

目前药用高分子多孔微球的整体生物相容性评价多采用组织病理学和免疫学手段进行肺吸入毒性的研究^[11,34]。当载药多孔微球进入血液循环起全身治疗作用时,应进一步对其进行全身毒性实验以预测载体微球对生物体潜在的全身毒性作用,包括急性、亚急性、亚慢性和慢性4种毒性实验,根据微球应用要求选择合适的评价项目。

1.3 分子生物相容性

目前高分子材料应用于制备药物载体时,对其生物学评价涉及分子水平上的研究^[35]。同样地,多孔微球应用于肺部给药时,除了从细胞水平和整体水平评价其生物相容性,还需深入到分子水平去观察材料对细胞DNA、RNA、细胞调控及细胞外基质相关基因表达水平的影响,进一步检查其分子生物相容性。关于肺部给药用高分子多孔微球的分子生物相容性报道较少,可借鉴可吸入颗粒物的肺部毒性分子评价方法^[36,37]。Beyerle等人^[38]选用鼠肺泡II型上皮细胞(LA4)作为实验模型,采用荧光实时定量PCR法研究了聚乙烯亚胺(polyethylene imine, PEI)、聚乙烯亚胺-聚乙二醇共聚物(polyethylene imine-graftpoly(ethylene glycol)s, PEI-PEG)的肺部毒性机制;实验中选用二氧化硅晶体(fine crystalline silica, CS)、纳米氧化锌(nanosized ZnO, NZO)作为肺部毒性标准物,分析了材料与LA4细胞共培养后氧化应激反应相关基因 *Ugt1a2*(UDP-Glucuronosyl-transferase form 1A2), *Cryab*(alpha-B crystallin gene), *Mt2*(metallothionein 2), *Hmox1*(heme oxygenase-1), 炎症相关基因 *Nfkb1a*(nuclear factor of κ -light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor- α), *Cxcl10*(CXC chemokine ligand-10), *Casp1*(caspase-1), *Nos2*(nitric oxide synthase-2), *IL18*, *Lta*(lymphotoxin alpha), *Hspa1b*(heat shock 70 kD protein 1B), *Serpine1*(serpin peptidase inhibitor, clade E, member 1), *Csf2*(colony-stimulating factor 2), 细胞毒性相关基因 *Tnfsf10*(tumor necrosis factor superfamily, member 10), *E2f1*(E2F transcription factor 1), *Gadd45*(growth arrest and DNA damage-inducible 45), *Cdkn1a*(cyclin-dependent kinase inhibitor 1A), *Ddit3*(DNA damage-inducible transcript 3), *Bax*, *Tnfrsf1a*(tumor necrosis

factor receptor 1)和 *Ccng1*(cyclin G1)的表达情况。实验结果表明, PEI 及 PEI-PEG 载体的肺部毒性潜在作用机制为胞内氧化应激反应的发生及线粒体信号通路的改变; PEI-PEG 载体的细胞毒性较 PEI 载体毒性显著降低,但炎症细胞因子的 mRNA 水平提高,增加了炎症反应发生的可能性。从已有的肺部毒性研究可知,细胞水平和整体水平上肺上皮细胞损伤、肺部炎症及肺纤维化在不同程度上表现出 ROS、RNS、细胞因子、炎症细胞、胶原蛋白等表达上调^[25,33,39,40]。相应地在分子水平上可表现为一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、炎症细胞因子、生长因子等转录上调^[41,42],结合体内外实验结果,可进一步采用荧光实时定量 PCR 法检测对应指标的 mRNA 表达量,从分子水平上研究肺吸入毒性机制。

2 肺部给药用高分子多孔微球的医用功能性研究进展

高分子多孔微球在满足良好生物相容性的前提下,进一步需要发挥其作为药物载体在肺部给药中的医用功能优势。其医用功能性可理解为有效传递药物,实现药物的缓控释、维持药物活性等功能,协助药物取得良好的治疗效果且副作用小,最终应用于医疗领域。如图2所示,载药高分子多孔微球借助适宜的给药装置经口吸入实现肺部给药,具有良好空气动力学性质的载药微球通过惯性撞击、重力沉降和布朗运动的沉降机制^[43]经支气管树沉积到深肺后持续释放,在体内通过黏膜纤毛清除、肺泡巨噬细胞吞噬和酶代谢的非吸收性清除和肺上皮细胞的吸收性清除^[44],可用于肺部疾病如肺癌、肺结核、支气管哮喘的治疗,也可以通过肺部吸收进入血液循环实现全身疾病如糖尿病、心血管疾病的治疗。目前肺部给药用高分

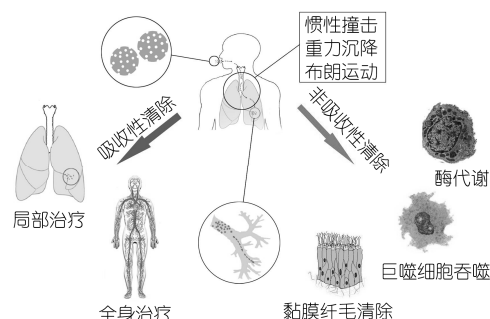


图2 载药高分子多孔微球经肺部给药后在体内清除途径

子多孔微球的医用功能性评价内容主要包括肺内沉积、肺部清除与吸收、载药多孔微球的药效学评价。

2.1 高分子多孔微球的肺内沉积评价

高分子多孔微球作为药物载体应用于肺部给药,首先需要具备药物传递的功能。凭借低质量密度($<0.4 \text{ g/cm}^3$)和较大几何粒径($>10.0 \mu\text{m}$)的特点,高分子多孔微球可在肺内有效地沉积,起到更好的药物传递效果,这与最终的治疗效果密切相关。因此,高分子多孔微球的肺内沉积量是其医药功能性评价的重要指标之一。目前针对多孔微球的肺内沉积评价主要分为体外评价法和体内评价法2大类。体外评价法包括惯性撞击器法和现代光学仪器法。惯性撞击器法是利用惯性撞击的原理对微粒进行定量检测,操作简单,重现性好,被广泛收录于各国药典,如双层液体碰撞器、Andersen 多级撞击器、Marple Miller 多级撞击器等^[45,46];现代光学仪器法分为激光衍射气雾粒径测定法和飞行时间空气动力学气雾粒径测定法^[47]。体内评价法通常选用小鼠、大鼠、兔子等动物作为实验模型,通过肺部给药后研究肺内沉积情况,主要包括药理学法直接测肺组织中药物微球浓度和成像法^[48]。通过体外评价法研究微粒的肺内沉积操作简单、费用低,而且不使用动物,但通常不能很好地模拟体内肺环境,肺沉积预测偏高^[49];选择体内评价法可更真实地考察微粒肺内沉积情况,其中药理学法可采用合适的药物检测技术^[50]实现肺内沉积的定量研究;肺显像法可观察全肺沉积情况,因其形象直观、精确等特点而得到广泛应用^[15,29,51]。特别地,若能利用活体成像技术实时、无创在体监测荧光标记的多孔微球在同一实验模型中的转移与变化,可以避免动物个体差异,而且可以减少动物用量,得到的实验结果将更加真实可靠^[52,53]。

Yang 等人^[45]采用安德森八级采样器(eight-stage Mark II Anderson Cascade Impactor)测定经双重乳化法制备的 PLGA 多孔微粒的空气动力学性质,PLGA 多孔微球的 D_g 为 $10\sim 20 \mu\text{m}$, D_a 为 $4.0\pm 1.2 \mu\text{m}$, FPF(fine particle fraction)为 $(32.0\pm 9.1)\%$,通过体外实验结果预测 PLGA 多孔微球可沉积到气管深处并且避免巨噬细胞的吞噬。Yoo 等人^[54]将 FITC 标记的花青素(anthocyanin, ATH)载入 PLGA 多孔微球,大鼠经肺吸入给药后采用肺显像法评价微球肺内沉积情况,实验结果显示,载药 PLGA 多孔微球在给药

30 min 后实现全肺有效沉积。Lee 等人^[15]也通过肺显像法观察 DiI 标记的 PLGA 多孔微球在大鼠体内的肺沉积情况,并将肺组织匀浆后测量其荧光强度以定量研究肺内沉积量。

2.2 高分子多孔微球的肺部清除与吸收评价

高分子多孔微球作为肺部给药用药物载体,除了实现药物的有效传递,还应具备维持药物释放、保护药物活性等医用功能。吸收的药物量及药物是否具有活性与最终的药物疗效有关。此外,生物可降解的高分子多孔微球在人体内的清除情况与人体安全有关。故高分子多孔微球应用于肺部药物的传递,其肺部清除与吸收情况是其医用功能性的重要体现。经肺部给药后的高分子多孔微球沉积到气道和肺部,在体内的清除方式包括经肺上皮细胞吸收性清除和经黏膜纤毛清除、肺泡巨噬细胞吞噬和酶代谢的非吸收性清除。一般地,沉积到气管、支气管里的微球通过黏膜纤毛清除进入咽喉进而随痰咳嗽排出体外或进入胃肠道被清除;沉积到肺部区域 $D_g < 10 \mu\text{m}$ 的微球多被巨噬细胞吞噬进入淋巴系统进而清除体外;肺泡 II 型上皮细胞主要分泌少量的生物酶对药物、载体有一定的降解清除作用。目前高分子微球的肺部吸收评价主要有体内动物模型、体外细胞模型、半体内模型^[55]。体内评价是指以小鼠、大鼠、兔子等为实验模型,经肺部给药后在实验点进行采血或将肺匀浆检测血药水平来反映肺部吸收情况^[30,56,57];体外细胞模型评价是指建立与肺泡膜功能相似的细胞模型,在细胞水平上对药物渗透行为进行考察,其中能较理想模拟体内吸收状况的细胞株有 A549, 16HBE14o- 和 Calu-3^[58];半体内模型则是通过肺隔离灌注法(isolated perfused lung, IPL)体外模拟肺生理状态系统来研究肺部吸收情况^[59,60]。近年来利用体外模型模拟肺生理特性来研究肺吸收还存在很大挑战,因此采用动物体内模型研究肺吸收的方法仍占主导地位,但鉴于肺部复杂的沉积和清除情况,现研究者多采用简化的体内吸收和清除模型进行评价^[30,31]。

Patel 等人^[30]采用双层乳化-溶剂挥发法制备了载低分子量肝素的 PEG-PLGA 多孔微球,通过收集大鼠 BALF 中巨噬细胞评价细胞摄取情况;进一步在实验点测定大鼠经肺部给药后血液中抗凝血因子 Xa 活性以及手术摘除肺组织匀浆测上清液微球浓度来研究肺吸收和清除情况。实验结果表明,载肝素的

PEG-PLGA 多孔微球可减少肺泡巨噬细胞摄取, 85% 的微球可在 6 d 内从肺部清除, 载药微球能实现低分子量肝素的稳定释放, 且药物半衰期增加 5~6 倍. Kim 等人^[61]通过肺成像技术研究了载阿霉素(doxorubicin, DOX)的 PLGA 多孔微球在肺部的清除情况, 经荧光染料标记后的多孔微球在 C57BL/6 小鼠肺部给药 1, 2, 3, 7, 10 和 14 d 后手术摘除肺叶于活体成像系统下进行成像分析, 实验结果表明, 载 DOX 的 PLGA 多孔微球可在肺部原位滞留长达 14 d.

2.3 载药高分子多孔微球的药效学评价

载药高分子多孔微球的药效学评价是基于肺内

沉积、吸收与清除之上的研究, 是其医用功能性的整体体现, 采用合适的生物学评价方法研究其药效学至关重要. 肺部给药具有快速吸收、提高生物利用度、降低药物细胞毒性、代谢反应少等优势, 药物模型多为蛋白质、多肽类药物, 基因、治疗肺部疾病药物以及抗肿瘤药物. 经肺部给药后载药高分子多孔微球在肺内有效沉积、吸收, 进而采用药效学方法评价肺部吸入制剂的等效性, 测定不同时间点的血药浓度或药效指标. 载药高分子多孔微球经肺部给药的治疗目的有局部肺部疾病治疗和全身疾病治疗, 其药效学评价相关文献见表 1. 总体上, 肺部给药用载药高分子多孔微球的药效学评价多采用疾病动物

表 1 载药高分子多孔微球经肺部给药后的药效学评价

来源	载药高分子多孔微球	微球性质	方法与结论
局部治疗	Dhanda 等人 ^[33] 载塞来昔布的 PLGA 多孔微球	$D_g=10.53\text{ }\mu\text{m}$ $\rho=0.07\text{ g/cm}^3$	经苯并花造模成功的 A/J 肺癌小鼠经肺部给药载药微球和联合尾静脉给药紫杉醇/卡铂后, 于实验点手术摘除肺和检测 BALF 中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)水平. 实验结果表明, 联合给药可减少 70% 的肿瘤多药耐药性和减少 58% 的 BALF 中 VEGF 的生成
	Yoo 等人 ^[54] 载 ATH 的 PLGA 多孔微球	$D_g: 5\sim 10\text{ }\mu\text{m}$ $\rho<0.12\text{ g/cm}^3$	A549 细胞经香烟烟雾提取液处理后加入载药多孔微球, 于实验点通过 CCK-8(cell counting kit-8)试剂盒检测细胞活性. 实验结果显示, 载药多孔微球中的 ATH 可持续释放 3 d, 能减少 ROS 对 A549 细胞的损伤, 可用于肺部疾病中氧化应激损伤的治疗
	Kim 等人 ^[61] 载 DOX 的 PLGA 多孔微球	$D_g=14.1\pm 2.1\text{ }\mu\text{m}$ $D_a=3.6\pm 0.4\text{ }\mu\text{m}$	C57BL/6 小鼠尾静脉注射黑色素瘤 B16F10 细胞建立转移性肺癌小鼠模型, 经肺部给药治疗后于实验点手术摘除小鼠的肺, 观察并称重. 实验结果显示, 载药微球组小鼠肺部黑色素瘤数量较未给药组小鼠黑色素瘤明显减少, 进而分析肺重具有显著性差异, 证明载 DOX 的 PLGA 多孔微球具有药理活性
	Kim 等人 ^[62] 载 TRAIL(tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand)/ DOX 的 PLGA 多孔微球	$D_g=11.5\pm 0.4\text{ }\mu\text{m}$	H226 细胞转移性肺癌模型的 BALB/c nu/nu 小鼠经肺部给药后于实验点通过肺组织切片和肺光镜观察及肺重检测评价联合治疗效果. 实验结果显示, 载药多孔微球组肺癌小鼠肺重($288.5\pm 50.6\text{ mg}$)显著低于未给药肺癌小鼠肺重($731.0\pm 118.6\text{ mg}$), 接近于空白对照组小鼠肺重($227.9\pm 24.8\text{ mg}$), 表明载药微球的药效性, 以及 TRAIL、DOX 联合给药可减少 DOX 剂量, 降低其细胞毒性
全身治疗	Kim 等人 ^[11] 载 Ex4-C ₁₆ (palmityl-acylated exendin-4)的 PLGA 多孔微球	$D_g=16.2\pm 2.3\text{ }\mu\text{m}$ $D_a=4.3\pm 0.5\text{ }\mu\text{m}$	II 型糖尿病 C57BL/6 小鼠经肺部给药后于实验点检测血糖浓度. 实验结果显示, 给药 12 h 后载药 PLGA 多孔微球组小鼠血糖浓度从 473 mg/dL 降低至 150 mg/dL, 随后其血糖浓度维持在 250 mg/dL 左右, 药效持续 5 d, 与空白 PLGA 多孔微球组小鼠血糖浓度具有显著性差异
	Kim 等人 ^[29] 载 Pal-Ex4 的 HAS (human serum albumin)-PLGA 多孔微球	$D_g=17.2\pm 2.1\text{ }\mu\text{m}$ $D_a=3.2\pm 0.3\text{ }\mu\text{m}$	II 型糖尿病 C57BL/6 小鼠经肺部给药后于实验点血糖仪检测尾静脉血的血糖浓度. 实验结果显示, 载药多孔微球组血糖浓度从 445.5 mg/dL 降低到 150.7 mg/dL, 药效持续 5 d
	Ungaro 等人 ^[51] 载胰岛素的 PLGA 多孔微球	$D_g=26.2\pm 1.2\text{ }\mu\text{m}$ $\rho=0.134\pm 0.003\text{ g/cm}^3$ $D_a=9.61\pm 0.46\text{ }\mu\text{m}$	大鼠经链脲霉素引发糖尿病, 经肺部给药后于实验点测量尾静脉血糖浓度. 实验结果显示, 载药多孔微球具有显著的降血糖作用, 且呈剂量和时间依赖性递增
	Rawat 等人 ^[31] 载低分子量肝素的 PLGA 多孔微球	$D_g=11.01\pm 2.27\text{ }\mu\text{m}$ $\rho=0.249\pm 0.018\text{ g/cm}^3$ $D_a<6\text{ }\mu\text{m}$	SD(Sprague-Dawley)大鼠经肺部给药载药多孔微球, 于实验点检测尾静脉血液中抗凝血因子 Xa 活性. 实验结果显示, 载药多孔微球具有抗凝血的药理活性, 并且肝素的半衰期延长约 5 倍

模型直接研究药物治疗效果。随着生物学科新理论和新技术的发展,药效学的评价模式逐渐向细胞水平初评、分子水平复评、整体水平终评模式发展,为药效学评价提供了更系统全面的评价模式和方法。肺部给药用高分子多孔微球的药效学评价应根据实验的需求选择合适的评价模式和方法。

3 结语与展望

对肺部给药用高分子多孔微球进行完善的生物学评价是其进入临床应用的前提和条件。理想的高分子多孔药物载体应具备良好的生物相容性和医用功能性2个基本特征,可解决蛋白质、多肽类等药物给药困难的问题,提高药物生物利用度并减小药物毒副作用。近年来,生物医用材料的生物学评价涵盖了临床医学、分子生物学、细胞生物学、免疫学等不同领域技术,实现了从细胞水平到整体水平再到分子水平的全面发展,但并没有形成统一完善的评价标准,更多是参照ISO10993或GB/T16886实验项目;此外肺部给药制剂的安全性和功能性受药物性质、载体性质、动物模型、给药装置等多因素影响,对建立统一完善的评价体系提出了更高的要求。在未来的研究中,学者应致力于完善肺部给药用高分子多孔微球的生物学评价体系。

生物相容性评价方面,细胞水平上进行的体外实验主要是体现材料的细胞毒性以及为体内实验提供参考依据,因此应建立更接近于体内真实环境的细胞模型及共培养细胞模型,还应重视载体材料的

血液相容性研究;整体水平上除了选用啮齿类动物作为体内模型进行肺局部毒性实验,还应考虑到载体高分子材料本身及降解产物对生物体的影响,进行急性或慢性全身毒性实验;对其进行分子水平上的DNA、RNA、细胞调控及细胞外基质相关基因表达水平的研究有助于潜在毒性及毒性机制的研究;从细胞、整体、分子水平系统而全面地去探究高分子多孔微球对机体的细胞毒性、免疫炎性、肺部纤维化、全身毒性等。医用功能性方面,高分子多孔微球的肺内沉积可通过体内外评价相结合的方法,体外评价为体内实验提供数据支持,减少实验动物用量;高分子多孔微球在肺部吸收与清除情况复杂,可结合细胞模型和动物模型的优势进行定性及定量研究;特别地,微球在肺部的清除降解情况与肺部毒性紧密相关,进行相应的体外降解实验及体内清除实验能更好地将微球的安全性和药效性结合起来;药效学评价总体遵循细胞水平初评、分子水平复评、整体水平终评模式,根据载药多孔微球的具体应用要求选择合适的评价模式。目前,肺部给药用高分子多孔微球的生物学评价研究并不系统完善,评价内容多是单一的功能性评价或生物相容性研究,若能完整地将生物相容性研究与医用功能性研究结合起来,系统完善地对其进行生物学评价,将会促进肺部给药用高分子多孔微球的生物学评价模式和研究方法的发展。总之,肺部给药用高分子载体生物学评价体系的建立将预示着肺部给药制剂在临床应用中的潜力与发展。

参考文献

- 1 Mansour H M, Rhee Y S, Wu X. Nanomedicine in pulmonary delivery. *Int J Nanomed*, 2009, 4: 299–319
- 2 Sou T, Meeusen E N, de Veer M, et al. New developments in dry powder pulmonary vaccine delivery. *Trends Biotechnol*, 2011, 29: 191–198
- 3 Lam J K, Liang W, Chan H K. Pulmonary delivery of therapeutic siRNA. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, 64: 1–15
- 4 Courrier H M, Butz N, Vandamme T F. Pulmonary drug delivery systems: Recent developments and prospects. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 2002, 19: 425–498
- 5 Patton J S, Byron P R. Inhaling medicines: Delivering drugs to the body through the lungs. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6: 67–74
- 6 龚伟, 杨阳, 金义光, 等. 新型药物递送系统研究进展. *中国科学: 生命科学*, 2011, 41: 894–903
- 7 Paggiaro P L, Dahle R, Bakran I, et al. Multicentre randomised placebo-controlled trial of inhaled fluticasone propionate in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *International COPD Study Group. Lancet*, 1998, 351: 773–780
- 8 Diab R, Brillault J, Bardy A, et al. Formulation and *in vitro* characterization of inhalable polyvinyl alcohol-free rifampicin-loaded PLGA microspheres prepared with sucrose palmitate as stabilizer: Efficiency for *ex vivo* alveolar macrophage targeting. *Int J Pharm*, 2012, 436: 833–839

- 9 Sharma R, Saxena D, Dwivedi A K, et al. Inhalable microparticles containing drug combinations to target alveolar macrophages for treatment of pulmonary tuberculosis. *Pharm Res*, 2001, 18: 1405–1410
- 10 Ward M E, Woodhouse A, Mather L E, et al. Morphine pharmacokinetics after pulmonary administration from a novel aerosol delivery system. *Clin Pharmacol Ther*, 1997, 62: 596–609
- 11 Kim H, Park H, Lee J, et al. Highly porous large poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres adsorbed with palmityl-acylated exendin-4 as a long-acting inhalation system for treating diabetes. *Biomaterials*, 2011, 32: 1685–1693
- 12 Gupta V, Gupta N, Shaik I H, et al. Liposomal fasudil, a rho-kinase inhibitor, for prolonged pulmonary preferential vasodilation in pulmonary arterial hypertension. *J Control Release*, 2013, 167: 189–199
- 13 Kim H K, Chung H J, Park T G. Biodegradable polymeric microspheres with “open/closed” pores for sustained release of human growth hormone. *J Control Release*, 2006, 112: 167–174
- 14 Ungaro F, De Rosa G, Miro A, et al. Cyclodextrins in the production of large porous particles: Development of dry powders for the sustained release of insulin to the lungs. *Eur J Pharm Sci*, 2006, 28: 423–432
- 15 Lee J, Oh Y J, Lee S K, et al. Facile control of porous structures of polymer microspheres using an osmotic agent for pulmonary delivery. *J Control Release*, 2010, 146: 61–67
- 16 Edwards D A, Hanes J, Caponetti G, et al. Large porous particles for pulmonary drug delivery. *Science*, 1997, 276: 1868–1871
- 17 赵趁, 陈爱政, 王士斌, 等. 超临界二氧化碳流体技术制备多孔微球研究进展. *科学通报*, 2012, 57: 3459–3466
- 18 Chen A Z, Yang Y M, Wang S B, et al. Preparation of methotrexate-loaded, large, highly-porous PLLA microspheres by a high-voltage electrostatic antisolvent process. *J Mater Sci Mater Med*, 2013, 24: 1917–1925
- 19 Chen A Z, Zhao C, Wang S B, et al. Generation of porous poly-L-lactide microspheres by emulsion-combined precipitation with a compressed CO₂ antisolvent process. *J Mater Chem B*, 2013, 1: 2967–2975
- 20 Kang Y Q, Zhao C, Chen A Z, et al. Study of lysozyme-loaded poly-L-lactide (PLLA) porous microparticles in a compressed CO₂ antisolvent process. *Materials*, 2013, 6: 3571–3583
- 21 Musante C J, Schroeter J D, Rosati J A, et al. Factors affecting the deposition of inhaled porous drug particles. *J Pharm Sci*, 2002, 91: 1590–1600
- 22 Telko M J, Hickey A J. Dry powder inhaler formulation. *Resp Care*, 2005, 50: 1209–1227
- 23 Islam N, Gladki E. Dry powder inhalers (DPIs)—A review of device reliability and innovation. *Int J Pharm*, 2008, 360: 1–11
- 24 Islam N, Cleary M J. Developing an efficient and reliable dry powder inhaler for pulmonary drug delivery—A review for multidisciplinary researchers. *Med Eng Phys*, 2012, 34: 409–427
- 25 Walters D M, Cho H Y, Kleeberger S R. Oxidative stress and antioxidants in the pathogenesis of pulmonary fibrosis: A potential role for Nrf2. *Antioxid Redox Sign*, 2008, 10: 321–332
- 26 林晓芬, 陈爱政, 王士斌. 磁性氧化铁纳米颗粒的生物相容性研究进展. *科学通报*, 2011, 56: 2223–2228
- 27 Chou L, Firth J D, Nathanson D, et al. Effects of titanium on transcriptional and post-transcriptional regulation of fibronectin in human fibroblasts. *J Biomed Mater Res*, 1996, 31: 209–217
- 28 Bérubé K, Aufderheide M, Breheny D, et al. *In vitro* models of inhalation toxicity and disease the report of a frame workshop. *Atla-Altern Lab Anim* 2009, 37: 89–141
- 29 Kim H, Lee J, Kim T H, et al. Albumin-coated porous hollow poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles bound with palmityl-acylated exendin-4 as a long-acting inhalation delivery system for the treatment of diabetes. *Pharm Res*, 2011, 28: 2008–2019
- 30 Patel B, Gupta V, Ahsan F. PEG-PLGA based large porous particles for pulmonary delivery of a highly soluble drug, low molecular weight heparin. *J Control Release*, 2012, 162: 310–320
- 31 Rawat A, Majumder Q H, Ahsan F. Inhalable large porous microspheres of low molecular weight heparin: *In vitro* and *in vivo* evaluation. *J Control Release*, 2008, 128: 224–232
- 32 Willetts R. Development of a co-culture model of the human lungs for toxicity testing and identification of biomarkers of inhalation toxicity. Doctor Dissertation. Birmingham: Aston University, 2012
- 33 Dhanda D S, Tyagi P, Mirvish S S, et al. Supercritical fluid technology based large porous celecoxib-PLGA microparticles do not induce pulmonary fibrosis and sustain drug delivery and efficacy for several weeks following a single dose. *J Control Release*, 2013, 168: 239–250
- 34 Oh Y J, Lee J, Seo J Y, et al. Preparation of budesonide-loaded porous PLGA microparticles and their therapeutic efficacy in a murine asthma model. *J Control Release*, 2011, 150: 56–62
- 35 Chen A Z, Lin X F, Wang S B, et al. Biological evaluation of Fe₃O₄-poly(L-lactide)-poly(ethylene glycol)-poly(L-lactide) magnetic microspheres prepared in supercritical CO₂. *Toxicol Lett*, 2012, 212: 75–82

- 36 Wessels A, Van Berlo D, Boots A W, et al. Oxidative stress and DNA damage responses in rat and mouse lung to inhaled carbon nanoparticles. *Nanotoxicology*, 2011, 5: 66–78
- 37 Li J J, Muralikrishnan S, Ng C T, et al. Nanoparticle-induced pulmonary toxicity. *Exp Biol Med*, 2010, 235: 1025–1033
- 38 Beyerle A, Irmeler M, Beckers J, et al. Toxicity pathway focused gene expression profiling of PEI-based polymers for pulmonary applications. *Mol Pharm*, 2010, 7: 727–737
- 39 Nassimi M, Schleh C, Lauenstein H, et al. A toxicological evaluation of inhaled solid lipid nanoparticles used as a potential drug delivery system for the lung. *Eur J Pharm Biopharm*, 2010, 75: 107–116
- 40 Samy R P, Ng C T, Bay B H, et al. Carboxylate microsphere-induced cellular toxicity in human lung fibroblasts. *Exp Biol Med*, 2012, 237: 635–643
- 41 Musah S, DeJarnett N, Hoyle G W. Tumor necrosis factor- α mediates interactions between macrophages and epithelial cells underlying proinflammatory gene expression induced by particulate matter. *Toxicology*, 2012, 299: 125–132
- 42 Määttä J, Lehto M, Leino M, et al. Mechanisms of particle-induced pulmonary inflammation in a mouse model: Exposure to wood dust. *Toxicol Sci*, 2006, 93: 96–104
- 43 Hofmann W. Modelling inhaled particle deposition in the human lung—A review. *J Aerosol Sci*, 2011, 42: 693–724
- 44 El-Sherbiny I M, Villanueva D G, Herrera D, et al. Overcoming lung clearance mechanisms for controlled release drug delivery. In: Smyth H D C, Hickey A J, eds. *Controlled Pulmonary Drug Delivery*. New York: Springer, 2011. 101–126
- 45 Yang Y, Bajaj N, Xu P, et al. Development of highly porous large PLGA microparticles for pulmonary drug delivery. *Biomaterials*, 2009, 30: 1947–1953
- 46 Nolan L M, Tajber L, McDonald B F, et al. Excipient-free nanoporous microparticles of budesonide for pulmonary delivery. *Eur J Pharm Sci*, 2009, 37: 593–602
- 47 Shekunov B Y, Chattopadhyay P, Tong H H, et al. Particle size analysis in pharmaceuticals: Principles, methods and applications. *Pharm Res*, 2007, 24: 203–227
- 48 Jaafar-Maalej C, Andrieu V, Elaissari A, et al. Assessment methods of inhaled aerosols: Technical aspects and applications. *Expert Opin Drug Deliv*, 2009, 6: 941–959
- 49 Meenach S A, Kim Y J, Kauffman K J, et al. Synthesis, optimization, and characterization of camptothecin-loaded acetalated dextran porous microparticles for pulmonary delivery. *Mol Pharm*, 2012, 9: 290–298
- 50 郭磊, 吴弼东, 谢剑炜. 药物分析检测技术研究进展. *中国科学: 生命科学*, 2011, 41: 904–912
- 51 Ungaro F, d'Emmanuele di Villa Bianca R, Giovino C, et al. Insulin-loaded PLGA/cyclodextrin large porous particles with improved aerosolization properties: *In vivo* deposition and hypoglycaemic activity after delivery to rat lungs. *J Control Release*, 2009, 135: 25–34
- 52 Lee J, Lee C, Kim T H, et al. Pulmonary administered palmitic-acid modified exendin-4 peptide prolongs hypoglycemia in type 2 diabetic db/db mice. *Regul Pept*, 2012, 177: 68–72
- 53 Hadina S, Wohlford-Lenane C L, Thorne P S. Comparison of *in vivo* bioluminescence imaging and lavage biomarkers to assess pulmonary inflammation. *Toxicology*, 2012, 291: 133–138
- 54 Yoo N Y, Youn Y S, Oh N M, et al. Antioxidant encapsulated porous poly(lactide-co-glycolide) microparticles for developing long acting inhalation system. *Colloids Surf B*, 2011, 88: 419–424
- 55 Sakagami M. *In vivo*, *in vitro* and *ex vivo* models to assess pulmonary absorption and disposition of inhaled therapeutics for systemic delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006, 58: 1030–1060
- 56 Sinha B, Mukherjee B. Development of an inhalation chamber and a dry powder inhaler device for administration of pulmonary medication in animal model. *Drug Dev Ind Pharm*, 2012, 38: 171–179
- 57 Sinha B, Mukherjee B, Pattnaik G. Poly-lactide-co-glycolide nanoparticles containing voriconazole for pulmonary delivery: *In vitro* and *in vivo* study. *Nanomedicine*, 2013, 9: 94–104
- 58 Steimer A, Haltner E, Lehr C M. Cell culture models of the respiratory tract relevant to pulmonary drug delivery. *J Aerosol Med*, 2005, 18: 137–182
- 59 Dong M, Mürdter T, Philippi C, et al. Pulmonary delivery and tissue distribution of aerosolized antisense 2'-O-Methyl RNA containing nanoplexes in the isolated perfused and ventilated rat lung. *Eur J Pharm Biopharm*, 2012, 81: 478–485
- 60 Selg E, Acevedo F, Nybom R, et al. Delivering horseradish peroxidase as a respirable powder to the isolated, perfused, and ventilated lung of the rat: The pulmonary disposition of an inhaled model biopharmaceutical. *J Aerosol Med Pulm D*, 2010, 23: 273–284
- 61 Kim I, Byeon H J, Kim T H, et al. Doxorubicin-loaded highly porous large PLGA microparticles as a sustained-release inhalation system for the treatment of metastatic lung cancer. *Biomaterials*, 2012, 33: 5574–5583
- 62 Kim I, Byeon H J, Kim T H, et al. Doxorubicin-loaded porous PLGA microparticles with surface attached TRAIL for the inhalation treatment of metastatic lung cancer. *Biomaterials*, 2013, 34: 6444–6453

Biological evaluation of porous polymeric microspheres for pulmonary drug delivery

TANG Na¹, CHEN AiZheng^{1,2}, WANG ShiBin^{1,2} & ZHAO Chen¹

¹ College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China;

² Institute of Biomaterials and Tissue Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China

As a non-invasive administration method, inhalable pulmonary drug delivery is suitable for the delivery of protein- and peptide-based drugs to treat lung diseases. Porous polymeric microspheres, which possess low mass densities ($<0.4 \text{ g/cm}^3$) and large mean geometric diameters ($>10.0 \text{ }\mu\text{m}$), provide local or systemic drug delivery as they are deposited directly in the lung, and the uptake by alveolar macrophages is reduced. As inhalable drug carriers, porous polymeric microspheres should be biocompatible and offer *in vitro* drug-release properties. We review the progress in biological evaluation of these microspheres and propose solutions for the current problems. The biocompatibility evaluation of porous polymeric microspheres has been summarized at cellular, integrated and molecular levels. The medical function evaluation has been conducted on lung deposition, clearance and absorption within the lung and pharmacodynamics of drug loaded porous polymeric microspheres.

porous polymeric microspheres, pulmonary drug delivery, biocompatibility, deposition in lung, pharmacodynamics evaluation

doi: 10.1360/972013-1007