

- [2] VERWEIJ-VAN WISSEN C P, AARNOUTSE R E, BURGER D M. Simultaneous determination of the HIV nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors lamivudine, didanosine, stavudine, zidovudine and zalcitabine in human plasma by reversed phase high performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2005, 816(1/2): 121-129.
- [3] TOMI M, NISHIMURA T, NAKASHIMA E. Mother-to-fetus transfer of antiviral drugs and the involvement of transporters at the placental barrier [J]. *J Pharm Sci*, 2011, 100(9): 3708-3718.
- [4] SUN Y H, LI X H, ZHOU L X, et al. Determination of zidovudine in human serum by HPLC-MS/MS [J]. *Anhui Med Pharm J(安徽医药)*, 2011, 15(5): 566-568.
- [5] ZHANG J J, YAO Y M, SUN J J, et al. Determination the concentration of nevirapine, lamivudine, stavudine, zidovudine, efavirenz in human plasma for simultaneous quantification by HPLC-MS/MS [J]. *Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志)*, 2010, 26(2): 133-136.

收稿日期: 2015-09-25

神经胶质瘤纳米级染色剂的制备研究

张东伟¹, 莫立根^{1*}, 聂国朝², 王琳¹, 宋威¹, 李小阳¹, 沈雪莲³ (1.广西医科大学附属肿瘤医院神经外科, 南宁 530021; 2.广西玉林师范学院生物纳米医药研究室, 广西 玉林 537000; 3.中国科学院深圳先进技术研究院影像中心, 广东 深圳 518055)

摘要: 目的 通过质量考察和处方筛选, 制备蓝色纳米级染色剂, 使之更容易透过血脑屏障, 被肿瘤细胞吸收。方法 以磷脂、双氨基 PEG、京尼平与胎牛血清为原料, 以超声均化法制备成蓝色纳米级染色剂冻干粉, 以形态、粒径为考察目标筛选制备处方。结果 制备神经胶质瘤的蓝色纳米级染色剂最佳处方为大豆卵磷脂 60 mg, 胎牛血清 900 μ L, 双氨基 PEG 10 mg·mL⁻¹, 京尼平 1.5 mg·mL⁻¹; 平均粒径为 71.57 nm, 平均电位为 49.6 mV, 电镜下形态良好。结论 制备的蓝色纳米级染色剂冻干粉粒径、形态符合质量要求, 纳米蛋白能有效裸眼示踪脑胶质瘤。工艺方法简单、实用。

关键词: 神经胶质瘤; 纳米粒子; 染色剂; 京尼平

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2016)09-1111-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.09.004

Preparation of Nanoscale Coloring Agent of Neurospagioma

ZHANG Dongwei¹, MO Ligen^{1*}, NIE Guochao², WANG Lin¹, SONG Wei¹, LI Xiaoyang¹, SHEN Xuelian³ (1.Department of Neurosurgery, Affiliated Cancer Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2.Center of Nano Biology and Medicine, Yulin Normal University, Yulin 537000, China; 3.Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare neurospagioma blue nanoscale coloring agent through inspect the preparation quality and screen the prescription, to make it much easier to through hemato encephalic barrier and absorbed by tumor cells. **METHODS** Phospholipid, NH₂-PEG-NH₂, genipin and fetal bovine serum were used as raw materials, prepared into blue nano coloring agent lipoprotein lyophilized powder by means of ultrasonic homogenization, and the preparation was screened through morphology and particle size. **RESULTS** The optimum process prescription was 60 mg soya bean lecithin, 900 μ L fetal bovine serum, 10 mg·mL⁻¹ NH₂-PEG-NH₂ and 1.5 mg·mL⁻¹ genipin; the average particle size was 71.57 nm, the average potential was 49.6 mV, and it was in good shape under the electric mirror. **CONCLUSION** The particle size and morphology of the prepared blue nanoscale coloring agent lyophilized powder meet the quality requirement and the nano protein can effectively naked eye tracking glioma. This process method is simple and practica.

KEY WORDS: glioma; nanoparticles; dye; genipin

脑胶质瘤是颅内最常见的原发性脑肿瘤。胶质瘤尤其是高级别脑胶质瘤具有恶性程度高、复发率高、病死率高和治愈率低的特点。手术目前

仍是治疗脑胶质瘤的主要手段, 但由于神经系统解剖的特殊性及其浸润性生长的特点, 肿瘤与正常脑组织之间的边界难以确定, 手术难以完全切除^[1-2]。

基金项目: 国家自然科学基金(81260227); 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 12980003-2-11, 桂科攻 14124004-2-16)

作者简介: 张东伟, 男, 硕士生 Tel: 18269100015 E-mail: 449200578@qq.com *通信作者: 莫立根, 男, 硕士, 主任医师, 硕士 Tel: 13807816094 E-mail: ligenmo@163.com

如何确定神经胶质瘤的边界,在尽可能的少切除正常脑组织的情况下完全切除神经胶质瘤,提高肿瘤切除率的同时减少损伤是神经外科医师面临的一大难题,纳米染色剂的理念的提出为此提供了可能性。

血脑屏障和神经胶质瘤细胞膜对粒径在50~70 nm之间带有正电荷的双亲性微粒通过性较好^[3-4],本研究采用纳米载体系统粒径作为检验指标制备出粒径接近50~70 nm的蓝色纳米级染色剂,进行制备处方筛选和质量考察,为下一步进行神经胶质瘤染色便于肉眼观察肿瘤边界,提高手术全切除率提供参考。

1 材料与仪器

1.1 材料

大豆卵磷脂(广东环凯微生物科技有限公司,批号:3203101);环己烷(成都市科龙化工试剂厂,分析纯,批号:P1070150);胎牛血清(金穗生物科技有限公司,批号:20130823);京尼平(广西山云生化科技有限公司,分析纯);双氨基PEG(上海西宝生物科技有限公司,批号:2K1310167)。

1.2 仪器

KQ-200VDE型双屏数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);VORTEX-GENIE2漩涡混合器(美国SI公司);Zetasizer Nano ZS90纳米粒度仪(英国Malven公司);ST-16R离心机(美国Thermo Fisher Scientific公司);PD-5冷冻干燥机(美国SIM INTERNATIOANL GROUP);U-850旋转蒸发器(瑞士BUCHI公司);HT7700透射电镜(日本日立公司)。

1.3 动物

SD大鼠,SPF级,体质量270 g,中国科学院深圳先进技术研究院提供,实验动物使用许可证号:SYXK(粤)2013-0119。

2 方法

2.1 蓝色纳米级染色剂的制备

精密称取处方量的大豆卵磷脂、胎牛血清离心液的上清液和双氨基PEG溶液,加入3 mL环己烷溶液,进行超声振荡,使各物质在环己烷中分散均匀。向溶液中加入处方量京尼平,超声振荡后将溶液放入40℃水浴锅,进行磁力搅拌,进行一定时间的交联。将上述交联完毕的溶液接入旋转蒸发器,去除环己烷,然后加入3 mL纯化水,振荡超声,即制成蓝色纳米级染色剂溶液。将上

述蓝色纳米级染色剂溶液放入-40℃环境中2 h,取出后接入冻干机48 h,制成蓝色纳米级染色剂冻干粉。

2.2 蓝色纳米级染色剂处方的筛选

根据实验前期研究、药物性质以及相关文献^[3-4]选取出对实验有明显影响的4个因素:大豆卵磷脂用量(A),双氨基PEG浓度(B),京尼平用量(C),胎牛血清用量(D)。设计出4因素3水平 $L_9(3^4)$ 正交试验,按照实验设计的每组实验编号重复3次实验,以测得蓝色纳米染色剂水溶液中的颗粒粒径为筛选指标。

2.3 染色剂样品的粒径、电荷检测

将蓝色纳米级染色剂冻干粉加入一定量纯化水,经过超声振荡,配制成 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 蓝色纳米级染色剂溶液。用Zetasizer Nano ZS90纳米粒度仪进行粒径和电荷检测,在25℃条件下纳米粒度仪运行12次,并进行分析得出粒径结果与图形;在20℃条件下纳米粒度仪运行10次,并进行分析,得出电荷结果与图形。

2.4 蓝色纳米级染色剂的形态学检测

精密量取蓝色纳米级染色剂冻干粉并加入纯化水,配制成 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的蓝色纳米级染色剂溶液,振荡超声5 min使其在水中分布均匀,并置于透射电镜下观察蓝色纳米级染色剂形态,记录其图形。

2.5 动物染色实验

SD大鼠术前12 h禁食,麻醉后,剪去头顶毛发,固定,常规消毒,去头皮,露颅骨,钻小孔,不可伤及硬脑膜。微量注射器抽取25 μL 的C6细胞悬液,针尖触及硬脑膜,沿钻孔进针3.5 mm,后退1 mm缓缓注入细胞悬液,缓慢退针,用无菌骨蜡封闭骨孔,洗净术野,消毒,缝合皮肤,切口消毒,常规饲养12 d后,将蓝色纳米级染色剂加水超声溶解后进行尾静脉注射,2 h后开颅观察示踪效果,另一组注射生理盐水做为对照。

2.6 统计学方法

应用SPSS 16.0统计学软件设计正交试验表,并对实验数据和结果进行处理和分析。

3 结果

3.1 蓝色纳米级染色剂的处方筛选

蓝色纳米级染色剂正交试验的因素水平设计见表1,正交试验的结果与分析见表2~3。根据表2~3的结果分析,各因素对蓝色纳米级染色剂颗粒

粒径的影响程度依次为 A>D>B>C, 即对蓝色纳米级染色剂颗粒粒径的影响程度依次为大豆卵磷脂用量>胎牛血清用量>双氨基 PEG 浓度>京尼平用量。综合以上结果, 用超声分散法制备蓝色纳米级染色剂的优化处方为 A1、B2、C2、D2, 即: 大豆卵磷脂 60 mg, 双氨基 PEG 水溶液 10 mg·mL⁻¹, 京尼平水溶液 1.5 mg·mL⁻¹, 胎牛血清 900 μL。用以上处方重复 3 次, 制备出 3 批蓝色纳米级染色剂, 经过测量, 蓝色纳米级染色剂的颗粒粒径分别为 73.99, 73.39, 74.28 nm, 均优于正交试验中各分次实验, 表明处方优化成功。

表 1 因素与水平表

Tab. 1 The factors and levels

水平	大豆卵磷脂 用量(A)/mg	双氨基 PEG 浓度(B)/mg·mL ⁻¹	京尼平浓度 (C)/mg·mL ⁻¹	胎牛血清 用量(D)/μL
1	60	5	1	850
2	70	10	1.5	900
3	80	15	2	950

表 2 正交试验的结果与分析

Tab. 2 Result and analysis of orthogonal design

实验号	因素				粒径/ nm	粒径/ nm	粒径/ nm
	A	B	C	D			
1	3	3	3	1	140.1	138.2	141.1
2	3	1	2	3	137.3	133.5	137.9
3	2	3	1	3	136.9	134.6	136.2
4	1	1	1	1	108.8	105.6	110.0
5	1	3	2	2	80.2	79.6	82.3
6	1	2	3	3	92.6	90.3	93.9
7	2	1	3	2	110.9	107.3	112.1
8	3	2	1	2	111.2	109.7	113.6
9	2	2	2	1	100.5	98.2	103.6
K ₁	93.700	118.156	118.511	116.233			
K ₂	115.589	101.511	105.900	100.767			
K ₃	129.178	118.800	114.056	121.467			
R	35.478	17.289	12.611	20.700			

3.2 蓝色纳米级染色剂粒径和电位的鉴定

以筛选出的处方, 制备出 1 mg·mL⁻¹ 蓝色纳米

表 3 方差分析

Tab. 3 Variance analysis

因素	离差平方和	自由度	方差	F	F 临界值	P	最优方案
A	5 767.362	2	2 883.681	697.415	3.55	<0.05	A1
B	1 726.076	2	864.538	209.087	3.55	<0.05	B2
C	736.216	2	368.108	89.026	3.55	<0.05	C2
D	2 085.287	2	1 042.643	252.162	3.55	<0.05	D2
误差	74.427	18	4.135				

级染色剂溶液, 在纳米粒度仪下测定结果。由图 1 蓝色纳米级染色剂粒径及其分布图可得出: 制备的蓝色纳米级染色剂平均粒径为 71.57 nm; 由图 2 蓝色纳米级染色剂的电位分布图可得出: 制备的蓝色纳米级染色剂平均电位为 49.6 mV。

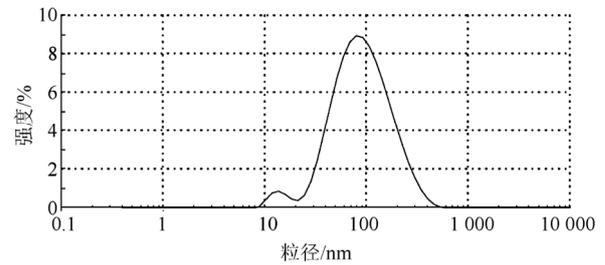


图 1 蓝色纳米级染色剂粒径及其分布

Fig. 1 Particle size and distribution of blue nanoscale coloring agent

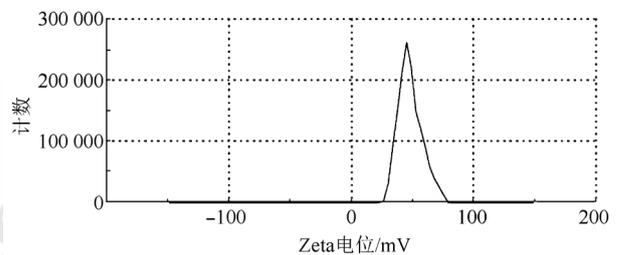


图 2 蓝色纳米级染色剂的电位分布

Fig. 2 Zeta potential distribution of blue nanoscale coloring agent

3.3 蓝色纳米级染色剂的形态学鉴定

在透射电镜下, 以 100 000 倍放大, 形态图如图 3 所示, 电镜测量粒径结果在纳米粒度仪测定范围内, 形态基本呈圆形, 图形大小较为均匀。

3.4 蓝色纳米级染色剂的染色效果

染色效果见图 4(C6 脑胶质瘤 SD 大鼠模型染色效果视频截图)所示, 染色之前无法看出肿瘤组织, 染色之后肿瘤组织及扩散区域被染成蓝色。由图 4 可见, 蓝色纳米级染色剂的染色效果较好, 在自然光下可以直接观察到肿瘤情况。

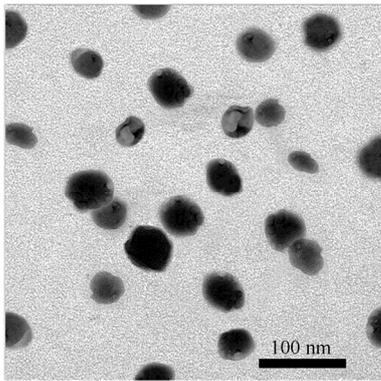


图3 蓝色纳米级染色剂透射电镜图

Fig. 3 Sem figure of blue nanoscale coloring agent

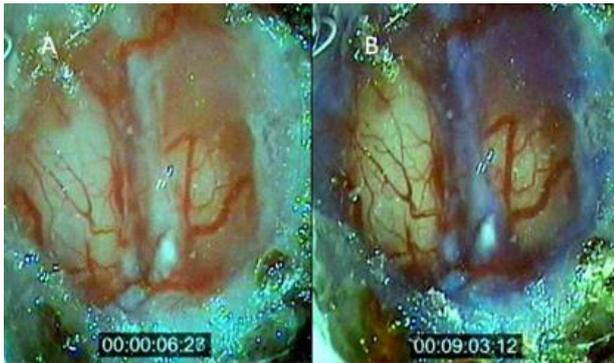


图4 蓝色纳米级染色剂的染色效果

A-染色前; B-染色后。

Fig. 4 The dyeing effect of blue nanoscale coloring agent

A-before colouring; B-after colouring.

4 讨论

脑胶质瘤是颅内最常见的恶性肿瘤。手术是否彻底切除肿瘤是影响胶质瘤患者预后的最主要因素之一。由于胶质瘤呈浸润性生长,术前检查和术中显微镜下无法准确定位和判断肿瘤与正常脑组织边界,手术难以完全切除,手术后极易复发,预后极差。手术联合放疗同步替莫唑胺化疗是目前治疗新诊断胶质瘤的标准方案。然而,国外相关研究^[5]表明,该标准治疗方案使新诊断胶质母细胞瘤患者生存获益,但其中位生存期仅为14.6个月,5年的生存率仅为9.8%^[6],生存时间非常有限,疗效仍难以令人满意。采用多种新的技术方法有效提高手术全切率,保护脑功能,提高患者生存率和生存质量,是国内外学者长期努力的方向。

以往染色剂对肿瘤进行染色后,需要在MRI、CT、超声等仪器下显影,难以实现直接观察;肿瘤荧光染色法需要在暗室中或较暗的光线下,用光激发才能辨别肿瘤细胞,黑暗操作环境给手术操作带来极大的不便;手术导航系统,是以核磁

共振、CT等医学影像数据为基础,在电脑上显示出一个三维可视的“虚拟人脑”,医师手中的探针指向哪里,是否已经到达肿瘤边缘,前面是否为重要组织或正常组织,均能通过屏幕显示出来^[7-8]。但是对于精准手术,医师需要观察病变组织,又要观察电脑屏幕,不断来回切换视角,很容易造成手术错误,而一般的手术导航系统价格昂贵,一般基层医院很难配备,相应的手术费也大大增加,一般患者难以承受^[9]。为了解决以上难题,Nie等^[10]使用合成材料——聚丙烯纳米粒为载体,包裹考马斯亮蓝、亚甲蓝、靛氰绿等合成染料为染色剂,发明了一种脑肿瘤裸眼可视踪剂,在这种以聚丙烯酰胺为载体的肿瘤裸眼可视影像技术中,聚丙烯酰胺在体内很难降解,存在生物兼容性问题,且考马斯亮蓝等合成染料有一定的不良反应。而肿瘤裸眼可视纳米染色剂的发展将会提高神经外科手术的成功率,同时降低神经胶质细胞瘤的复发率。

实验曾使用蛋清蛋白,发现蛋清蛋白的稳定性较差,而且蛋清蛋白对部分是较强的致敏原,改进实验方案关键是改进使用的蛋白。实验中使用胎牛血清蛋白明显优于蛋清蛋白的稳定性,且免疫原性较弱。从ZS90纳米粒度仪的检测结果看出,平均纳米粒径比较小,接近于70 nm,平均电位在49.6 mV,由于在接近于50 nm处更易突破血脑屏障被细胞所吞噬,阳离子物质更易通过血脑屏障,所以结果符合粒径要求^[11-12]。从电镜检测结果看出,纳米颗粒分布均匀,符合要求。

本实验提供一种肿瘤裸眼可视纳米染色剂,包括以下原料:可溶性蛋白、卵磷脂、京尼平、双氨基PEG,经超纯水溶解、混匀制得粒径 ≤ 100 nm的蓝色的肿瘤裸眼可视纳米染色剂。本实验的肿瘤裸眼可视纳米染色剂能实现外科医师在正常光线下,不需要借助额外的仪器,肉眼区分肿瘤组织与正常组织,手术中准确切除肿瘤。

REFERENCES

- [1] MATSUDA M, ONUMA K, SATOMI K, et al. Exophytic cerebellar glioblastoma in the cerebellopontine angle: case report and review of the literature [J]. *J Neurol Surg Rep*, 2014, 75(1): e67-72.
- [2] 温林豹, 陈刚. 胶质瘤的治疗策略[J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2011, 10(4): 382-384.
- [3] CHITHRANI B D, GHAZANI A A, CHAN W C. Determining the size and shape dependence of gold

- nanoparticle uptake into mammalian cells [J]. *Nano Lett*, 2006, 6(4): 662-668.
- [4] LÜ Q, HAN M, LI L M, et al. Study of doxorubicin liposome modified with transferrin and folic acid targeting to glioma *in vitro* [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2012, 29(11): 963-970.
- [5] STUPP R, MASON W P, VAN DEN BENT M J, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma [J]. *New Engl J Med*, 2005, 352(10): 987-996.
- [6] STUPP R, HEGI M E, MASON W P, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial [J]. *Lancet Oncol*, 2009, 10(5): 459-466.
- [7] HOLT R W, DEMERS J L, SEXTON K J, et al. Tomography of epidermal growth factor receptor binding to fluorescent antibody *in vivo* studied with magnetic resonance guided fluorescence recovery in varying orthotopic glioma sizes [J]. *J Biomed Opt*, 2015, 20(2): 26001.
- [8] HUANG M, XIONG C, LU W, et al. Dual-modality micro-positron emission tomography/computed tomography and near-infrared fluorescence imaging of EphB4 in orthotopic glioblastoma xenograft models [J]. *Mol Imaging Biol*, 2014, 16(1): 74-84.
- [9] ACERBI F, BROGGI M, EOLI M, et al. Is fluorescein-guided technique able to help in resection of high-grade glioma [J]. *Neurosurg Focus*, 2014, 36(2): E5.
- [10] NIE G, HAH H J, KIM G, et al. Hydrogel nanoparticles with covalently linked coomassie blue for brain tumor delineation visible to the surgeon [J]. *Small*, 2012, 8(6): 884-891.
- [11] DOMÍNGUEZ A, SUÁREZ-MERINO B, GOÑI-DE-CERIO F. Nanoparticles and blood-brain barrier: the key to central nervous system diseases [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2014, 14(1): 766-779.
- [12] OKURA T, HIGUCHI K, KITAMURA A, et al. Proton-coupled organic cation antiporter-mediated uptake of apomorphine enantiomers in human brain capillary endothelial cell line hCMEC/D3 [J]. *Biol Pharm Bull*, 2013, 37(2): 286-291.

收稿日期: 2016-01-07

大黄素对脓毒症大鼠血糖和胰岛素抵抗的影响

赵滋苗^a, 蔡宛如^{b*}, 陆军^a, 王飞^a, 丁月平^a, 叶肖琳^a, 马丹女^a(浙江中医药大学附属第二医院, a.重症医学科; b.呼吸科, 杭州 310005)

摘要: 目的 研究大黄素对脓毒症大鼠高血糖及胰岛素抵抗的影响。方法 60只SD大鼠随机分为假手术组、模型组、大黄素组、二甲双胍阳性对照组。手术前1h, 大黄素组灌胃给予100 mg·kg⁻¹的CMC-Na混悬液, 二甲双胍阳性对照组灌胃给予150 mg·kg⁻¹的CMC-Na混悬液, 按照盲肠结扎穿孔法建立脓毒症模型。分别测定术前及术后1, 2, 4, 6, 12, 24h的血糖值, 及术后2h的胰岛素水平, 计算胰岛素抵抗指数, 并于术后24h腹主动脉取血, 酶联免疫吸附法检测IL-6、TNF-α、CRP水平。结果 大黄素能改善脓毒症大鼠的胰岛素抵抗, 抑制脓毒症大鼠感染后血糖的升高, 并能明显降低炎症因子IL-6、TNF-α、CRP的水平。结论 大黄素能降低脓毒症大鼠的高血糖, 改善其胰岛素抵抗, 其作用机制可能与抑制炎症细胞因子分泌有关。

关键词: 大黄素; 脓毒症; 高血糖; 胰岛素抵抗

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2016)09-1115-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.09.005

Effect of Emodin on Hyperglycemia and Insulin Resistance of Sepsis Rats

ZHAO Zimiao^a, CAI Wanru^{b*}, LU Jun^a, WANG Fei^a, DING Yueping^a, YE Xiaolin^a, MA Danyu^a(The Second Affiliated Hospital of Zhejiang Traditional Chinese Medicine University, a.Intensive Care Unit; b.Department of Respiration, Hangzhou 310005, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects of emodin on hyperglycemia and insulin resistance of the sepsis rats. **METHODS** Sixty SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, emodin group and metformin positive control group. At 1 h before operation, emodin group rats were given 100 mg·kg⁻¹ CMC-Na suspension by gavage and 150 mg·kg⁻¹ CMC-Na for metformin positive control group, sepsis model were based on cecal ligation and puncture. The blood glucose in rats were measured at 0, 1, 2, 4, 6, 12, 24 h before and after operation, and at 2 h after operation, the insulin levels

基金项目: 国家自然科学基金(81273678); 浙江省中医药科技计划立项项目(2015ZA113)

作者简介: 赵滋苗, 男, 硕士, 主治医师 Tel: (0571)85288370
教授, 博导 Tel: (0571)85267135 E-mail: caiwanru@aliyun.com

E-mail: zzm751031@163.com *通信作者: 蔡宛如, 女, 主任医师,