

聚乳酸和乳酸·乙醇酸的致突变性研究

浙江省医学科学院 计划生育研究所(杭州310013) 伏晓敏

浙江省医学科学院 职业病防治所(杭州310013) 乐俊仪

生物降解型高分子化合物聚乳酸(PLA)和乳酸·乙醇酸(PLGA)是作为避孕缓释剂的载体,在体内形成释放系统。近年来,国内外已把生物降解长效避孕药作为寻找新一代长效避孕药物的主攻方向。但是激素避孕药对人体的可能不良影响仍是一个有争议的问题,特别是PLA和PLGA作为一种载体,较长时间包埋在人体组织内,其遗传毒性及细胞毒性等的研究是急待解决的问题。据此,本研究对PLA、PLGA经小鼠微核试验、Ames试验及细胞毒性试验,进行突变性及细胞毒性的评价,为提供安全、有效的避孕药物载体提出科学依据。

材料和方法

一、材料

PLA及PLGA批号85/224,均由浙江省医学科学院药物研究所合成。

辛酸亚锡 Sigma 公司提供。

聚乙烯薄膜及涂有邻苯二甲酸酯的聚氯乙烯薄膜由浙江大学化工系提供。

S₀肝匀浆由浙江省医学科学院职业病防治所提供。

L-929小鼠成纤维细胞由上海劳动卫生职业病防治研究所提供

二、方法

(一) 小鼠淋巴细胞微核试验

取体重18—22克 NIH 雌性小鼠(由浙江省动物中心提供),每组5只。PLA及PLGA

各设122 mg/kg、488 mg/kg(分别相当临床剂量20倍和80倍)二个剂量组⁽¹⁾,另设相应的混悬剂对照组。小鼠一次肌肉注射,在不同时间(注射前、注射后3、10、25、55、90天)尾静脉取血观察外周血淋巴细胞微核及核变形(包括核凸出、核凹陷、双核、核碎裂、核空泡等),并在实验结束时以常规方法作骨髓微核试验。

(二) 辛酸亚锡 Ames 试验

按Ames方法^[2,3],使用四株测试菌株即TA₉₇、TA₉₈、TA₁₀₀及TA₁₀₂。辛酸亚锡的浓度为5、50、100、200、400、600 μl/皿,二甲基亚砜(DMSO)作溶剂对照,并设自发回变对照,同时作+/-S₀混合液(代谢活化系统)的平行试验。根据各菌株需要,使用相应的阳性诱变物对照。

(三) 细胞毒性试验

采用组织培养琼脂覆盖法^[4]。

受试材料制成1cm²的圆片,清洗干净后紫外灯照射消毒,涂有邻苯二甲酸的聚氯乙烯薄膜为阳性对照,聚酯薄膜为阴性对照。处理同上。

采用L-929小鼠成纤维细胞传代48—72小时生长旺盛细胞,以Eagle's MEM加10%小牛血清作为生长培养基,3%琼脂液与2倍Eagle's MEM等量混合为覆盖琼脂培养基。

将已制备30万/ml细胞悬液,以Peteri平板作单层细胞,培养24小时后以琼脂覆盖

和染色(0.1 ml 2 %中性红/10 ml 培养液)。每平板加10 ml(5ml 3 %琼脂液加5 ml 2 × Eagle's MEM)琼脂培养基覆盖, 使均匀分布,待凝固后放置试样, 每平板对称放置二块, 每种材料作两只平板。37℃培养24小时, 观察结果。

结果与讨论

一、小鼠淋巴细胞微核试验

PLA 和 PLGA 各剂量组及对照组的 NIH 小鼠一次肌注后不同时间外周血淋巴细胞微核率及核变形率结果详见表 1。

Table 1. Effects of PLA and PLGA on micronuclear frequencies of peripheral lymphocyte (MF) and frequencies of nuclear deformity (FND) in mice at different time

Groups/mg·kg ⁻¹	Pre-treatment		d 3		d 10		d 25		d 55		d 90		
	MF	FND	MF	FND	MF	FND	MF	FND	MF	FND	MF	FND	
Control	0.2	2.74	0	2.3	0.2	1.8	0.2	1.6	0	1.78	0	1.77	
PLA	122	0.2	1.42	0	1.36	0	1.48	0	1.36	0	1.4	0.8	1.77
	488	0.1	1.57	0	2.5	0.2	1.2	0	2.0	0	1.56	1.2	0.99
PLGA	122	0.3	1.25	0.2	1.39	0	1.29	0	1.23	0	0.97	1.2	1.76
	488	0.25	1.6	0	1.6	0	1.4	0	1.4	0	1.8	1.0	1.4

对照组不同时间收获的细胞, 淋巴细胞微核率在 0—0.3% 范围内波动, 而 PLA 和 PLGA 二个剂量组也在此范围内波动, 二者无显著性差异。核变形率也未见明显差异。核变形主要表现为核凸出及核凹陷, 可见少数双核及空泡。

骨髓微核试验表明, 对照组微核率为 0.8%, PLA 122 mg/kg、488 mg/kg 分别为 0.8 和 1.2%, PLGA 122 mg/kg、488 mg/kg 分别为 1.2 和 1.0%, 经查表法统计处理均未见显著性差异 (P > 0.05)。详见表 2。

Table 2. Effects of PLA and PLGA on micronuclear frequencies of polychromatic erythrocytes of bone marrow in mice

Dose (mg/kg)	Number of animals	Cell number	Micronuclear cell	Micronuclear frequencies %	P	
Control	5	5000	4	0.8		
PLA	122	5	5000	4	0.8	>0.05
	488	5	5000	6	1.2	>0.05
PLGA	122	5	5000	6	1.2	>0.05
	488	5	5000	5	1.0	>0.05

二、辛酸亚锡 Ames 试验

辛酸亚锡在 PLA 和 PLGA 合成过程中作为一种催化剂。辛酸亚锡水解产生 2-乙基己酸(2-EHA)。1985 年美国环保局提出在啮齿动物中 2-EHA 具有潜在的致癌和致畸危险性^[6]。为此本研究进行了辛酸亚锡的 Ames 试验。从测试的四株菌株 (+/-

S₀) 不同剂量辛酸亚锡的回变菌落数均与自发回变无显著性差异, 结果见表 3。在本实验条件下表明辛酸亚锡没有出现致突变性。

WHO 人类生殖处报导, 在啮齿动物中, 使用高于 100 mg/kg/天的 2-EHA 才能诱导过氧化酶增殖, 而造成肝肿瘤的危险^[6]。

Table 3. Results of mutagenicity test of administering the Stannous Octoate (Values are mean±SD)

Drugs and Concentrations (ug/Plate)	TA 102		TA 100		TA 98		TA 97		
	S9 ⁺	S9 ⁻	S9 ⁺	S9 ⁻	S9 ⁺	S9 ⁻	S9 ⁺	S9 ⁻	
Reversion	256.3±13.0	195.7±9.5	130.7±3.1	112.7±11.0	60.0±2.0	44.0±7.8	105.3±18.8	98.0±11.1	
DMSO	311.3±29.7	193.7±7.1	98.3±11.5	94.3±13.7	86.0±3.2	78.0±2.3	80.0±13.9	58.0±6.1	
Stannous Octoate	5	228.7±9.9	208.7±11.2	98.3±8.5	85.0±4.4	76.0±12.5	54.0±2.8	92.0±5.6	77.0±15.1
	50	225.0±13.3	197.0±4.6	95.3±5.5	85.5±0.7	81.0±12.0	56.0±3.5	81.0±5.0	68.7±11.2
	100	196.0±35.5	134.3±19.7	91.3±3.2	90.3±1.5	80.0±7.1	48.0±7.8	78.3±5.7	44.7±17.9
	200	207.7±9.3	186.3±11.1	99.3±4.0	87.0±2.6	68.0±11.0	55.0±7.0	72.0±17.1	61.7±7.8
	400	220.7±14.5	153.7±8.1	89.3±8.1	76.3±1.5	77.0±7.2	41.0±1.2	70.7±5.9	55.7±11.2
	600	216.7±20.8	189.0±4.4	102.7±6.4	82.7±3.1	76.0±6.0	48.0±5.8	65.6±12.2	64.3±21.5
2-AAF	10		>1000		>1000				
	50						>1000		
Sodium azide	10			>1000					
2,7-2AF	10					>1000			
Mitomycin C	10	>1000							

临床使用的微囊注射量以 500 mg/kg/人来计算,其含辛酸亚锡总量为 0.3 mg/kg,按 24 小时吸收量,其中含 2-EHA 总量即为 0.24 mg/kg,90 天释放吸收量相当于 2.6×10^{-3} mg/kg/天,从而可见 PLA 和 PLGA 中辛酸亚锡含量远低于此水平。

三、细胞毒性试验

琼脂覆盖试验法用于直接检验医用材料中的可浸出毒性物质的存在,试验材料位于琼脂单层表面与其相接触,如果扩散物质有较高的浓度和毒性,则从样品浸出的可溶性物质扩散区内的染色细胞脱色,甚至引起脱色区细胞溶解,以此即可证明浸出毒性物质的存在。根据标准,反应指标 $R = Z/L$ (区域指标/细胞溶解指标),阳性材料反应指标 $R = 4/5, 5/5, 5/5, 5/5$,阴性材料 $R = 0/0$ 。

PLA 和 PLGA 的反应指标 R 均为 0/0。

由此推论 PLA 和 PLGA 自身均无毒性物质存在,没有出现细胞毒性。

综上所述,PLA 和 PLGA 经以上各种试验,结果均为阴性,没有出现致突和细胞毒性。

参 考 文 献

- [1] Beck LR, Flowers CE, Pope VZ, et al, Am J Obstet Gynecol 1983, 147:815
- [2] Ames BN, Mccann J, Yamasaki E, Mutat Res 1975, 31(6):347
- [3] Maron DM, Ames BN, Mutat Res 1983, 113:173
- [4] 上海市第二医科大学生物医学材料研究室:细胞毒性试验——组织培养琼脂覆盖法,上海市标准、非直接接触血液的医用生物材料生物性能测试沪/-86,1985, 1—5
- [5] World Health Organization Special Programme for Research, Development and Research Training in Human Reproduction: Toxicology group consultation on the toxicity of Stannous Octoate and related compounds. WHO Document, Geneva, 9—10 November 1987

Mutagenicity Study of The Polylactide and Polylactide-Co-Glycolide

Fu Xiaomin, Le Junyi¹

(Zhejiang Academy of Medical Sciences, Family Planning Research Institute,

¹Institute of Labour Hygiene and Treatment and Prevention of Occupational Disease, Hangzhou 310013)

ABSTRACT

The evaluate of mutagenicity and cytotoxicity on control release drug-load carrier — biodegradable polymer polylactide (PLA) and polylactide-Co-glycolide (PLGA) was determined by micronuclei test, Ames test and cytotoxicity test.

During 90 days after injecting PLA-or PLGA in mice, the frequencies of micronuclei of peripheral lymphocyte collected at different time in control group and in each dose group [of PLA or PLGA were 0—0.3%. The frequencies of micronuclear of bone marrow were 0.8—1.2%. There was no significant difference in these two parameters between control and PLA or PLGA.

The results of Ames test showed that the number of colen reversion of stannous octoate in different concentrations, a catalyzer in the synthesizing polymer PLA or PLGA, has no significant difference as compared with their self-reversion.

The results of cytotoxicity test Showed that the reaction indexes of PLA or PLGA were $R=0/0$.

All of parameters tested in present study are negative, and therefore, there were no mutagenicity and cytotoxicity appeared in both PLA and PLGA.

Key words Polylactide, Polylactide-Co-Glycolide, Stannous Octoate, Mutagenicity, Cytotoxicity