

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 20720120153309

UDC_____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

甲氨蝶呤纳米靶向缓释系统的制备及体内
外抗肿瘤作用研究

Methotrexate Nanoparticles: Synthesis, Characterization,
and in Vitro and in Vivo Antitumoral Activity

陈 娟

指导教师姓名: 罗学涛 教授

厦门大学材料学院

专 业 名 称: 材料物理与化学

论文提交日期: 2015 年 4 月

论文答辩时间: 2015 年 5 月

学位授予日期: 2015 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2015 年 4 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

**Methotrexate Nanoparticles: Synthesis, Characterization,
and in Vitro and in Vivo Antitumoral Activity**



A Dissertation Submitted to the Graduate School in Partial Fulfillment of
the Requirements for the Degree of
Doctor Philosophy

By

Juan Chen

Supervised by

Professor **Xue-tao LUO**

Xiamen University

College of Materials, Xiamen University

April, 2015

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(厦门大学罗学涛教授)课题(组)的研究成果,获得(厦门大学罗学涛教授)课题(组)经费或实验室的资助,在(厦门大学罗学涛教授)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

摘要.....	I
Abstract.....	III
主要创新和贡献.....	VII
第一章 绪论.....	1
1.1 引言.....	1
1.2 纳米载药系统.....	2
1.2.1 纳米载药系统的特点.....	2
1.2.2 纳米载体材料.....	4
1.2.2.2 壳聚糖.....	5
1.2.2.3 明胶.....	10
1.2.2.3 聚酯.....	11
1.2.3 纳米粒的表征.....	11
1.3 靶向制剂.....	12
1.3.1 靶向制剂的分类.....	13
1.3.1.1 主动靶向制剂.....	13
1.3.1.2 被动靶向制剂.....	17
1.3.1.3 物理靶向制剂.....	17
1.4 抗肿瘤药物.....	18
1.4.1 抗肿瘤药物研究进展.....	18
1.4.2 抗肿瘤药物的生化机制.....	19
1.4.3 肿瘤组织特点.....	21
1.5 甲氨蝶呤.....	22
1.5.1 性质及作用机理.....	22
1.5.2 临床应用及存在问题.....	24
1.5.3 研究现状.....	26
1.6 本论文的选题依据与研究目标.....	28
1.6.1 选题依据.....	28
1.6.2 研究目标.....	29
1.7 研究思路.....	30

1.8 技术路线.....	31
1.9 研究内容.....	31
参考文献.....	32
第二章 实验过程及研究方法.....	44
2.1 实验试剂与仪器设备.....	44
2.1.1 实验试剂.....	44
2.1.2 实验仪器.....	45
2.1.3 细胞实验试剂及仪器.....	46
2.1.4 细胞培养试剂的配制.....	47
2.1.5 实验动物.....	48
2.2 实验过程.....	48
2.2.1 制备过程图.....	48
2.2.1.1 纳米粒制备过程图.....	48
2.2.1.2 离心过滤.....	49
2.2.1.3 冷冻干燥.....	50
2.2.2 细胞实验过程.....	50
2.2.3 动物实验过程.....	52
2.3 表征分析方法.....	53
2.3.1 结构表征.....	53
2.3.2 活体成像分析.....	54
2.3.3 流式细胞分析.....	55
2.3.4 激光共聚焦成像分析.....	55
参考文献.....	56
第三章 聚乙二醇化壳聚糖纳米粒的制备与表征.....	58
3.1 引言.....	58
3.2 实验方法.....	59
3.2.1 制备方法.....	59
3.2.1.1 溶液配制.....	59
3.2.1.2 壳聚糖纳米粒的制备.....	59
3.2.1.3 聚乙二醇化壳聚糖纳米粒的制备.....	60
3.2.2 影响因素考察.....	60

3.2.3 纳米粒的表征.....	61
3.2.3.1 粒径分布和 Zeta 电位.....	61
3.2.3.2 纳米粒表面形态研究.....	61
3.2.3.3 纳米粒红外光谱.....	61
3.2.3.4 核磁共振波谱 (NMR)	61
3.3 结果与讨论.....	62
3.3.1 粒径分布与 Zeta 电位.....	63
3.3.2 表面形态.....	68
3.3.3 结构分析.....	69
3.3.3.1 傅立叶红外光谱法 (FTIR)	69
3.3.3.2 核磁共振波谱 (NMR)	69
本章小结.....	70
参考文献.....	71
第四章 甲氨蝶呤聚乙二醇化壳聚糖纳米粒制备、表征及	
体内外抗肿瘤作用评价.....	75
4.1 引言.....	75
4.2 实验部分.....	76
4.2.1 制备方法.....	76
4.2.1.1 甲氨蝶呤纳米粒制备.....	76
4.2.1.2 标准曲线的测定.....	76
4.2.1.3 纳米粒荧光标记.....	76
4.2.1.4 细胞培养.....	77
4.2.1.5 动物模型建立.....	77
4.2.2 纳米粒的表征.....	78
4.2.2.1 粒径分布与 Zeta 电位.....	78
4.2.2.2 表面形态.....	78
4.2.2.3 傅立叶红外光谱法 (FTIR)	78
4.2.2.4 核磁共振波谱 (NMR)	78
4.2.2.5 凝胶渗透色谱法 (GPC)	79
4.2.3 体外释药研究.....	79
4.2.4 细胞毒性实验.....	79

4.2.5 细胞摄取实验.....	80
4.2.6 细胞凋亡实验.....	80
4.2.7 体内动物荧光成像实验.....	80
4.3 结果与讨论.....	81
4.3.1 甲氨蝶呤聚乙二醇化壳聚糖纳米粒的制备.....	81
4.3.2 甲氨蝶呤聚乙二醇化壳聚糖纳米粒的表征.....	83
4.3.2.1 粒径分布、Zeta 电位与形貌.....	83
4.3.2.2 傅立叶红外光谱法 (FTIR)	84
4.3.2.3 核磁共振波谱 (NMR)	84
4.3.2.4 凝胶渗透色谱 (GPC)	86
4.3.3 体外药物释放.....	87
4.3.4 药物敏感性分析.....	88
4.3.5 细胞内摄取.....	89
4.3.6 细胞凋亡实验.....	90
4.3.7 体内动物实验.....	91
本章小结.....	93
参考文献.....	93
第五章 甲氨蝶呤纳米体系的多靶点协同增效研究.....	98
5.1 引言.....	98
5.2 实验部分.....	99
5.2.1 制备方法.....	99
5.2.1.1 载 PEM 纳米粒的制备.....	99
5.2.1.2 标准曲线的测定.....	100
5.2.2 药物释放.....	100
5.2.3 细胞实验.....	100
5.2.4 动物实验.....	101
5.3 结果与讨论.....	101
5.3.1 双载药纳米体系的制备.....	101
5.3.2 药物敏感性实验.....	105
5.3.3 流式细胞分析.....	109
5.3.4 体内抗肿瘤疗效评价.....	111

本章小结.....	116
参考文献.....	117
第六章 总结与展望.....	121
6.1 结论.....	121
6.2 展望.....	123
攻读博士期间的研究成果.....	124
致谢.....	128

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Contents

Abstract (Chinese)	I
Abstract (English)	III
Innovation and Contribution	VII
1. Introduction	1
1.1 Introduction	1
1.2 Nanocarrier Drug Delivery System	2
1.2.1 The characteristics of Nanocarrier	2
1.2.2 Classification of Nanocarrier Materials	4
1.2.2.2 Chitosan	5
1.2.2.3 Gelatin	10
1.2.2.3 Polyester	11
1.2.3 Characterization of Nanoparticles	11
1.3 Targeted System	12
1.3.1 Classification of Targeted System	13
1.3.1.1 Active Targeted Preparation	13
1.3.1.2 Passive Targeted Preparation	17
1.3.1.3 Physical Targeted Preparation	17
1.4 Drugs for Malignant Tumors	18
1.4.1 Study on Antitumor Drugs	18
1.4.2 Biochemical Mechanism of Antitumor Drugs	19
1.4.3 The Characteristics of Tumor Tissue	21
1.5 Methotrexate	22
1.5.1 Properties and Action Mechanism	22
1.5.2 Clinical Application and Problems	24
1.5.3 Research Status	26
1.6 Research Background and Target	28
1.6.1 Background	28
1.6.2 Target	29
1.7 Research Ideas	30
1.8 Technical Route	31
1.9 Research Contents	31
References	32
2.Experiments and Methods	44

2.1 Chemicals and Apparatus.....	44
2.1.1 Chemicals and Reagents.....	44
2.1.2 Experiment Apparatus.....	45
2.1.3 Materials and Apparatus for Cell Section.....	46
2.1.4 Preparation of Cell Culture Reagent.....	47
2.1.5 Experimental Animals.....	48
2.2 Procedures.....	48
2.2.1 Preparation Process.....	48
2.2.1.1 Preparation Process of Nanoparticles.....	48
2.2.1.2 Centrifugal and filter.....	49
2.2.1.3 Freeze Drying.....	50
2.2.2 Cell Experiment.....	50
2.2.3 Animal Experiment.....	52
2.3 Analysis Methods.....	53
2.3.1 Structural Characterizations.....	53
2.3.2 in Vivo Imaging Analysis.....	54
2.3.3 Flow Cytometry Analysis.....	55
2.3.4 Confocal Laser Scanning Microscopy.....	55
References.....	56
3. Preparation and Characterization of Pegylated Chitosan.....	58
3.1 Introduction.....	58
3.2 Experimental Methods.....	59
3.2.1 Preparation Methods.....	59
3.2.1.1 Solution Preparation.....	59
3.2.1.2 Preparation of Chitosan Nanoparticles.....	59
3.2.1.3 Preparation of Polyethylene glycol Chitosan Nanoparticle.....	60
3.2.2 Influence Factors.....	60
3.2.3 Characterization of Nanoparticles.....	61
3.2.3.1 Particlesize distribution and Zeta potential.....	61
3.2.3.2 Surface Morphology of Nanoparticles.....	61
3.2.3.3 Infrared Characterization of Nanoparticles.....	61
3.2.3.4 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR)	61
3.3 Results and Discussion.....	62
3.3.1 Particlesize distribution and Zeta potential.....	63
3.3.2 Surface Morphology.....	68

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.