

两亲多糖纳米胶束作为药物缓释载体的制备及释药研究

周嘉嘉¹, 陈汝福¹, 卢红伟², 唐启彬¹, 周泉波¹, 张黎明²

(中山大学 1. 附属第二医院肝胆外科, 广东 广州 510120; 2. 化学与化学工程学院高分子研究所, 广东 广州 510275)

摘要: 【目的】合成葡聚糖接枝聚乳酸 (DEX-g-PLA) 两亲多糖共聚物, 检测其纳米胶束的相关参数, 初步探讨其纳米胶束在药物缓释方面的应用。【方法】采用偶联法合成 DEX-g-PLA。用透射电子显微镜观察所形成胶束的形态; 用动态光散射仪观察纳米胶束有效粒径的变化。体外药物释放实验考察其对不同水溶性药物的缓释作用。MTT 法考察其生物相容性。【结果】DEX-g-PLA 纳米胶束, 呈球形, 粒径在 50 ~ 190 nm 之间, 其有效粒径随聚乳酸含量的增加而增大。载药纳米胶束对疏水性维生素 B₂ 的缓释效果优于亲水性的 5-氟尿嘧啶。MTT 结果显示该纳米胶束具有良好的生物相容性。【结论】DEX-g-PLA 纳米胶束具有良好的生物相容性, 对疏水性药物的缓释作用优于亲水性药物, 有望成为新型药物缓释载体。

关键词: 葡聚糖; 聚合物; 药物载体; 药物释放体系

中图分类号: R944

文献标识码: A

文章编号: 1557-3554(2006)06-0667-05

Preparation and Drug Controlled-release of Biodegradable Amphiphilic Polysaccharide Nano-micelles as Drug Delivery Systems

ZHOU Jia-jia¹, CHEN Ru-fu¹, LU Hong-wei², TANG Qi-bin¹, ZHOU Quan-bo¹, ZHANG Li-ming²

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China;

2. Institute of Polymer Science, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the preparation of polylactide-grafted dextran copolymer (DEX-g-PLA), and to detect their correlative parameters and explore the application of nano-micelles for drug controlled-release.

【Methods】The polylactide-grafted dextran copolymer (DEX-g-PLA) was synthesized in a bulk lactide polymerization reaction using dextran derivative as macroinitiator and stannous octoate as catalyst. The surface morphology of the resulting nano-micelles was characterized by transmission electron microscopy and particle size was measured by dynamic light scattering. The controlled-release of drugs of different water-solubility was tested by in-vitro release studies, and the biocompatibility of nano-micelles was measured by MTT assay in vitro. 【Results】The DEX-g-PLA nano-micelles were of round or elliptical shape and their average diameters ranged from 50 nm to 190 nm, which were increased with the increase of content of PLA in micelles. The in-vitro release studies indicated that the release of hydrophobic vitamin B₂ from nano-micelles was obviously more sustained than that of hydrophilic 5-Fluorouracil. MTT assay suggested that DEX-g-PLA nano-micelles were of fine biocompatibility. 【Conclusion】The release of hydrophobic drugs from the biocompatible micelles of DEX-g-PLA is obviously more sustained than that of hydrophilic drugs, suggesting it would be a promising carrier for drug delivery systems.

Key words: dextran; polymer; drug carrier; drug delivery systems

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(6): 667-671]

纳米微粒用作药物传递和控制释放系统的载体, 已受到广泛关注^[1-4]。但目前, 纳米载体输送系统仍有缺陷^[5]。现用载体材料多为合成型高分子,

体内降解缓慢或难以降解; 常用于纳米粒表面亲水性修饰的聚乙二醇 (poly ethylene glycol, PEG) 或聚氧化乙烯 (poly ethylene oxide, PEO) 本身不能

收稿日期: 2006-06-09

基金项目: 国家高科技计划(863)基金资助项目(2002AA214061); 广东省自然科学基金资助项目(2003A031700); 广州市科委基金资助项目(2004Z3-D2011)

作者简介: 周嘉嘉(1981-), 男, 山东即墨人, 硕士生; 陈汝福, 副教授, 硕士生导师, 通讯作者。E-mail: chenrf63@163.com

被降解,上述材料的连续使用容易产生毒性。天然多糖材料具有可生物降解和生物相容性好等优势,可有效避免或降低纳米载体潜在的毒性作用^[6]。我们以源自天然的可生物降解的葡聚糖为原料,合成葡聚糖接枝聚乳酸 (polylactide-grafted dextran copolymer, DEX-g-PLA) 共聚物,考察 DEX-g-PLA 纳米胶束的生物相容性,并初步探讨载药纳米胶束对不同水溶性药物的缓释规律。

1 材料与方法

1.1 材料

5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-Fu; 上海旭东); 维生素 B₂ (vitamin B₂, VitB₂; 北京怡康盛达); 乳酸、丙交酯、癸酸 (天津大茂试剂厂, 分析纯); 辛酸亚锡 (USA, Alfa); 透析袋 (截止相对分子质量 M_r=5 000~8 000, 广州东征); 培养基 RPMI 1640 (USA, Gibco), 噻唑蓝 (MTT, Sigma), 小鼠成纤维细胞 L-929 为我实验室保存。

1.2 DEX-g-PLA 的合成及表征

将一定量丙交酯、癸酸和辛酸亚锡置于 50 mL 容量瓶中, 氩气保护下搅拌反应 8 h。冷却至室温, 过滤干燥, 得端羧基聚乳酸。将一定量端羧基聚乳酸和羰基二咪唑置于氩气保护下反应 3 h; 加入葡聚糖的二甲基亚砷溶液继续高温反应 6 h。反应产物经过滤干燥, 得粉末状葡聚糖接枝聚乳酸共聚物。以溴化钾压片法制样, 对反应产物共聚物行红外光谱表征, 扫描次数为 32 次, 分辨率为 4 cm⁻¹。

按不同葡聚糖 (dextran) 和 (聚乳酸 (polylactic acid, PLA) 反应质量比, 重复上述实验, 根据不同的投料比例, 合成 3 批 DEX-g-PLA 样品, 分别标记为样品 a, b, c。采用红外光谱法分别测定 3 批样品中的 PLA 含量^[7]。

1.3 DEX-g-PLA 胶束的形态特征

将制成一定浓度的 DEX-g-PLA 胶束溶液, 滴于铜网上, 用质量分数 1% 的磷钨酸溶液负染色, 采用透射电子显微镜 (日本电子株式会社) 观察所形成胶束的形态。

1.4 DEX-g-PLA 胶束有效粒径的检测

分别将上述 3 批不同聚乳酸含量的 DEX-g-PLA (样品 a, b, c), 配成质量浓度为 1.4 mg/mL 的胶束溶液, 于 25.0 °C 下, 动态光散射测定其有效粒

径, 比较不同 PLA 含量样品的有效粒径的变化。

1.5 载药胶束的制备和性能测定

1.5.1 不同载药胶束的制备 以 5-Fu 为亲水性模型药物, 分别将 3 批不同 PLA 含量的 DEX-g-PLA 样品和 5-Fu 溶于 2 mL 蒸馏水中, 55 °C 水浴预热 6 h, 室温静置 24 h。取 2 mL 上述 5-Fu/胶束溶液置于透析袋中, 于 100 mL 蒸馏水中透析 6 h, 得 5-Fu/Dex-g-PLA 胶束溶液, 置 4 °C 保存备用。

以 VitB₂ 为疏水性模型药物, 按照上述实验操作, 制得 VitB₂/Dex-g-PLA 胶束溶液, 置 4 °C 保存备用。

1.5.2 不同载药胶束的药物包封率测定

用 UV-3150 双光束分光光度计 (日本岛津) 在波长 200~400 nm 之间扫描 5-Fu 标准液的紫外光谱。紫外分光光度计 (上海棱光精密仪器厂) 测定 5-Fu/胶束的透析液在 270 nm 波长处的吸光度 (A₂₇₀), 根据 5-Fu 溶液的标准曲线 [C (mg/mL) = -0.00136 + 0.02402 × A₂₇₀ (n = 5, r = 0.99988)] 计算透析液中 5-Fu 含量, 求得 5-Fu 胶束的包封率。

配制不同浓度的 VitB₂ 标准溶液, 根据 VitB₂ 标准溶液的 A₂₇₄ 值, 得 VitB₂ 溶液的标准曲线 [C (mg/mL) = -5.45119 × 10⁻⁴ + 0.02158 × A₂₇₄ (n = 5, r = 0.99933)]。紫外分光光度计测定 VitB₂/胶束的透析液在 274 nm 波长处的吸光度 (A₂₇₄), 根据 VitB₂ 溶液的标准曲线计算透析液中 VitB₂ 的含量, 求得 Vit B₂ 胶束的包封率。

包封率 = (药物总量 - 透析液中的药物含量) / 药物总量 × 100 %。

1.5.3 不同载药胶束体外释药实验 取 5-Fu/Dex-g-PLA 胶束溶液 5 mL 装入透析袋中, 置于 25 mL PBS (pH 7.4) 中, 于 37 °C 恒温静置透析, 间隔一定时间取出透析液, 同时补充 25 mL 缓冲液, 保持透析袋外液体积不变, 紫外分光光度计测定透析液的 A₂₇₀。将 3 批样品重复上述实验操作 3 次, 根据标准曲线计算不同时间的药物释放量, 再计算累积释放量并绘制体外释放曲线。分别取 3 批 VitB₂/Dex-g-PLA 胶束溶液参照上述方法, 重复实验 3 次, 以均数 ± 标准差为参数绘制药物体外释放曲线。

1.6 体外细胞毒性实验 (MTT 比色法)

分别将 3 种不同 PLA 含量的 DEX-g-PLA (样品 a, b, c) 以 RPMI 1640 培养液配成相同浓度的溶液; 选用对数生长期的传代小鼠成纤维细胞 L-

929, 以 1.0×10^4 个/孔接种于 24 孔板内, 加入完全培养液, 置于 37 °C、体积分数 5% CO_2 培养箱内孵育, 24 h 后弃去原培养液, 加入上述含 DEX-g-PLA 样品的 RPMI 1640 培养液与 L-929 细胞共孵育培养, 检测各实验材料对 L-929 细胞生长曲线的影响。其中, D 为不含多糖衍生物的细胞悬液, 阴性对照组, E 为 RPMI 1640 培养液, 空白对照组。

2 结果

2.1 DEX-g-PLA 红外光谱表征

葡聚糖(DEX)的红外光谱在 990 cm^{-1} 、 $1\ 600 \text{ cm}^{-1}$ 、 $2\ 900 \text{ cm}^{-1}$ 和 $3\ 400 \text{ cm}^{-1}$ 处存在特征吸收峰, 在 $1\ 750 \text{ cm}^{-1}$ 处无羰基吸收峰, 而 DEX-g-PLA 的红外光谱除了在 990 cm^{-1} 、 $1\ 600 \text{ cm}^{-1}$ 、 $2\ 900 \text{ cm}^{-1}$ 和 $3\ 400 \text{ cm}^{-1}$ 处出现葡聚糖的特征吸收峰以外, 在 $1\ 750 \text{ cm}^{-1}$ 处还存在明显的羰基吸收峰(箭头所示, 图 1), 证实聚乳酸支链的存在, 提示葡聚糖

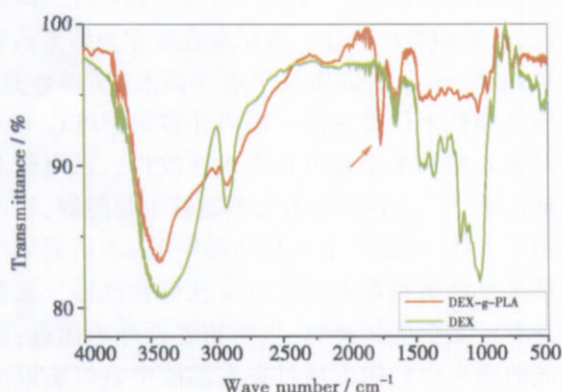


图 1 聚乳酸接枝葡聚糖的红外光谱图

Fig.1 The Infra Red (IR) spectra of dextran and DEX-g-PLA graft copolymer

接枝聚乳酸共聚物形成。

2.2 不同聚糖接枝聚乳酸共聚物中聚乳酸含量

共聚物中聚乳酸的百分比含量, 随反应前聚乳酸用量的增加而增大(表 1)。

2.3 不同浓度 DEX-g-PLA 溶液的胶束化形态

临界胶束浓度之上的共聚物溶液(样品 a), 自组装形成纳米微球结构, 呈圆形或椭圆形, 粒径约 20 ~ 50 nm 左右(图 2); 临界胶束浓度以下的共聚物溶液未能胶束化形成纳米微球, 呈均质胶冻状。

表 1 不同反应比例聚糖接枝聚乳酸共聚物中聚乳酸含量
Table 1 Different percentages of PLA in DEX-g-PLA resulting from different ratios of reactants

Sample	M_0 (reactants) ^{1)/} g		w(compositions) ^{2)/} %	
	PLA	DEX	PLA	DEX
a	0.5	2.0	21.45	78.55
b	1.0	2.0	33.55	66.45
c	1.5	2.0	50.22	49.78

1) m_0 (reactants): dosage of reactants; 2) w(compositions): mass fraction in DEX-g-PLA

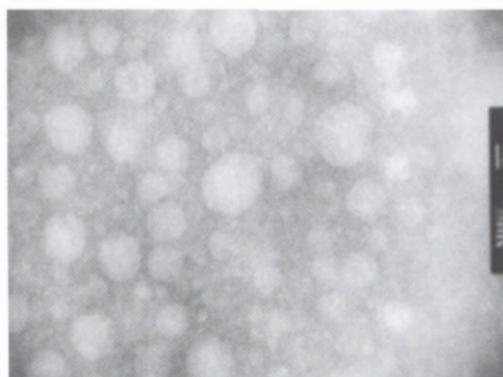


图 2 水溶液中葡聚糖接枝聚乳酸纳米胶束电镜照片

Fig.2 Transmission electron micrograph of DEX-g-PLA nano-micelles in aqueous solutions (Bar=20 nm, $\times 200\ 000$)

2.4 不同葡聚糖接枝聚乳酸胶束的有效粒径分布

不同聚乳酸含量的 DEX-g-PLA 胶束, 其有效粒径不同; 且随着 DEX-g-PLA 中聚乳酸含量的增加, 纳米胶束的有效粒径随之增大, 自 44.6 nm 增至 189.2 nm。

2.5 不同载药胶束的药物包封率

紫外法重复测定 3 批 5-Fu/DEX-g-PLA 纳米胶束透析液中 5-Fu 含量, 算得 3 批 5-Fu/DEX-g-PLA(a, b, c) 的 5-Fu 包封率分别为 8.8%, 9.3%, 10.5%。同法, 测得 3 批 VitB₂/DEX-g-PLA(a, b, c) 的 VitB₂ 包封率分别为 58.7%, 60.8%, 61.5%。

2.6 载 5-氟尿嘧啶胶束的药物释放实验

纳米胶束所承载的 5-氟尿嘧啶在最初 10 h 内迅速释放, 达药物总量的 70% 左右, 随后药物释放速度减缓, 最终到达平衡。但 3 种不同聚乳酸含量的 DEX-g-PLA 样品的 5-Fu 释放曲线相似, 随聚合物胶束中聚乳酸含量的增加, 5-Fu 的释放无明显减缓趋势(图 3)。

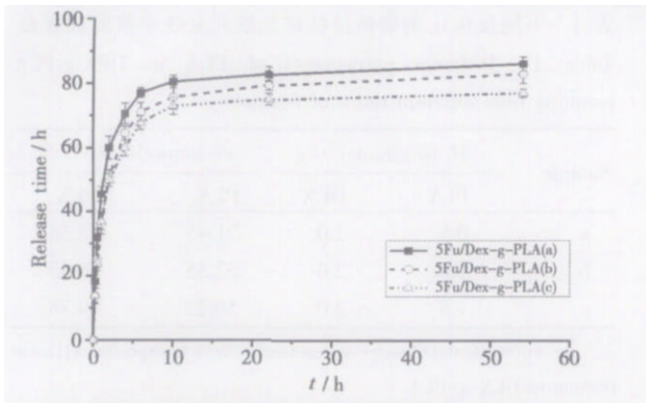


图 3 载 5- 氟尿嘧啶胶束的药物释放曲线

Fig.3 Cumulative releasing curves of 5-Fu from 5-Fu encapsulated nano-micelles in vitro

2.7 载维生素 B₂ 胶束的药物释放实验

纳米胶束所承载的 VitB₂ 逐渐释放, 逐渐到达平衡。且随着 DEX-g-PLA 中聚乳酸含量的增大, 其药物释放速度逐渐减缓(图 4)。

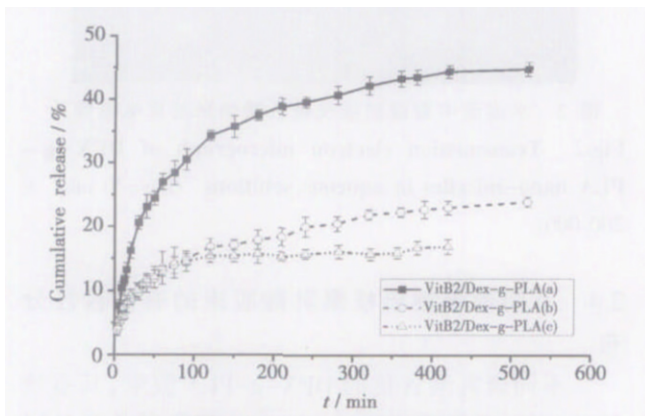
图 4 载维生素 B₂ 胶束的药物释放曲线

Fig.4 Cumulative releasing curves of Vit B₂ from VitB₂ encapsulated nano-micelles in vitro

2.8 体外细胞毒性实验

从各组的细胞生长曲线(图 5)可见, 随着培养天数的增加, A 值逐渐升高, 4 d 后细胞增殖趋势变缓; 3 组不同聚乳酸含量的两亲多糖材料对 L-929 细胞相对增殖率的影响与阴性对照组差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

纳米粒子是指其粒径尺寸在 10 ~ 100 nm 的固体颗粒, 具有超微小体积, 能够穿透组织间隙并极易被细胞吸收, 可通过人体最小的毛细血管, 在

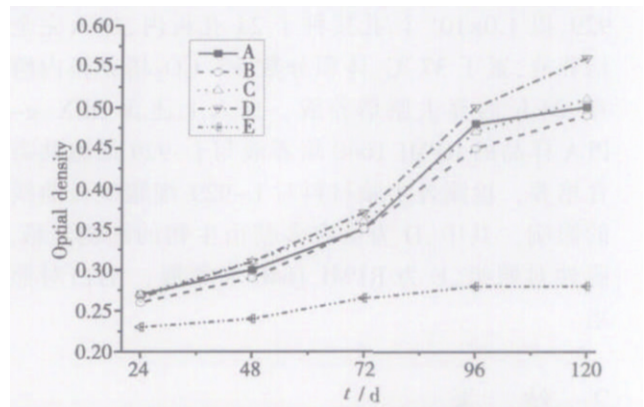


图 5 不同两亲多糖材料对 L-929 细胞生存曲线的影响

Fig.5 Growth-curves of L-929 cells incubated with nano-micelles in vitro

A: sample A group; B: sample B group; C: sample C group; D: negative control group without nano-micelles; E: blank group

医药领域已显示广泛的应用前景。

纳米材料的生物安全性是近年来备受关注的研究领域^[9], 良好的生物相容性是纳米材料用于医药领域的首要必备条件。本研究使用的 PLA 是美国 FDA 批准用于临床试验的可生物降解高分子聚合物, 在体内代谢终产物是 CO₂ 和 H₂O, 对人体无毒性, 生物相容性极佳。然而聚乳酸作为纳米药物缓释载体, 还存在诸如粒子表面疏水, 亲水性差, 细胞亲和性不佳等缺陷。国内外多采用 PEG、PEO 等对聚乳酸纳米微粒进行亲水性改性, 已有较多文献报道^[9,10]。但 PEG 等本身不能被生物降解, 长期作用于人体, 可能产生不利的副作用。本研究采用天然亲水性多糖葡聚糖进行接枝聚合改性, 葡聚糖具有可完全生物降解、生物相容性好等优点, 所形成的两亲多糖衍生物可在水溶液中自组装形成稳定的球形纳米微粒, 粒径在 50 ~ 190 nm 之间。经细胞生长曲线证实, 基于葡聚糖改性修饰的聚乳酸微粒对 L929 细胞的生长无抑制作用, 显示出良好的生物相容性。

3 批不同聚乳酸含量的两亲多糖衍生物, 其纳米胶束有效粒径, 随着聚乳酸含量增加呈增高趋势。由于两亲接枝共聚物在水溶液中是通过分子间和分子内疏水缔合作用自组装形成胶束的^[11], 疏水性的聚乳酸被亲水性的葡聚糖包裹而构成胶束的核心, 胶束有效粒径的变化可能与作为胶束内核的疏水性聚乳酸的空间位阻有关。

理想的药物缓释制剂不仅可有效的减少给药次数, 而且还可保证给药间期平稳的血药浓度。

Venkatraman等^[12]研究了 PLA-PEG-PLA 三嵌段共聚物胶束对不同水溶性药物的缓释作用, 认为其三嵌段共聚物胶束对疏水性药物的效果更佳。本实验分别考察不同 PLA 含量及不同水溶性药物对缓释效果的影响, 结果显示, DEX-g-PLA 接枝共聚物胶束对疏水性的 VitB₂ 的负载效率明显高于亲水性药物 5-Fu, 对 VitB₂ 的缓释效果也优于 5-Fu, 与 Venkatraman 的结论相似, 而且载药纳米胶束的药物负载效率和药物缓释效果, 都随着 PLA-g-DEX 中的疏水性聚乳酸链段含量的增大而更明显, 可能与 VitB₂ 更易于吸附结合聚乳酸链段有关; 而 5-Fu 的缓释效果则不如维生素 B₂ 明显, 且不同聚乳酸含量对 5-Fu 的释放效果无显著性改变, 可能与 5-Fu 的水溶性较明显、较难吸附包裹于胶束的疏水性核心有关。因此, 如何进一步提高两亲多糖纳米胶束作为 5-Fu 等亲水性药物的缓释药物载体的研究有待于继续深入进行。

参考文献:

- [1] 陈汝福, 陈积圣. 纳米技术在肿瘤诊断与治疗中的应用前景[J]. 癌症, 2004, 23(12): 1714-1716.
- [2] PANYAM J, LABHASETWAR V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2003, 55(3): 329-347.
- [3] 殷香保, 王捷, 陈汝福, 等. 丝裂霉素纤维蛋白胶凝胶化疗的缓释特性[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2004, 25(7): 67-69.
- [4] ASIF M, ARAYNE M S, SULTANA N, et al. Fabrication of nanoparticles within polymeric pores for controlled release of drug [J]. Pak J Pharm Sci, 2006, 19(1): 73-84.
- [5] NA K, PARK K H, KIM S W, et al. Self-assembled hydrogel nanoparticles from curdlan derivatives: characterization, anti-cancer drug release and interaction with a hepatoma cell (HepG2)[J]. J Control Release, 2000, 69(2): 225-236.
- [6] HONG S R, CHONG M S, LEE S B, et al. Biocompatibility and biodegradation of cross-linked gelatin/hyaluronic acid sponge in rat subcutaneous tissue [J]. J Biomater Sci Polym Ed, 2004, 15(2): 201-214.
- [7] CAI Q, WAN Y, BEI J, et al. Synthesis and characterization of biodegradable polylactide-grafted dextran and its application as compatilizer [J]. Biomaterials, 2003, 24(20): 3555-3362.
- [8] FLORITO S, SERAFINO A, ANDREOLA F, et al. Toxicity and biocompatibility of carbon nanoparticles[J]. J Nanosci Nanotechnol, 2006, 6(3): 591-599.
- [9] 张黎明, 欧富初, 陈汝福. 可降解瓜尔胶载药微胶囊的聚乙二醇修饰改性[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2005, 44(1): 45-48.
- [10] LEE J, CHO E C, CHO K. Incorporation and release behavior of hydrophobic drug in functionalized poly(D, L-lactide)-block-poly(ethylene oxide) micelles[J]. J Control Release, 2004, 94(2-3): 323-335.
- [11] 陈涛, 汤冬梅, 林嘉平, 等. 聚肽接枝共聚物的自组装行为研究[J]. 高等学校化学学报, 2005, 26(5): 988-990.
- [12] VENKATRAMAN S S, JIE P, MIN F, et al. Micelle-like nanoparticles of PLA-PEG-PLA triblock copolymer as chemotherapeutic carrier[J]. Int J Pharm, 2005, 298(1): 219-232.

(编辑 张敏瑞)

· 简 讯 ·

附属第一医院首例脑深部慢性电刺激治疗帕金森病成功

中山大学附属第一医院神经外科 8 月初在神经内科帕金森病治疗中心大力支持和核磁共振室协助下, 开展了 1 例帕金森病(PD)病人的脑深部慢性电刺激手术, 局麻术中测试病人临床症状改善明显。因做脑深部慢性电刺激的 PD 病人手术后要先观察 1 个月的早期反应, 于 9 月 6 日正式开机启动脑起搏器, 调整参数观察疗效, 病人的症状完全缓解, 开机前不能穿衣服、扣纽扣、下蹲和行走不稳, 开机后病人立即能够很好地完成上述动作, 并能慢跑, 病人和家属都非常满意。该病人手术的成功, 填补了附一院立体定向功能手术的空白, 标志 PD 治疗已经进入了一个崭新的时期, 达到国际先进水平。

脑深部慢性电刺激(DBS), 又称脑起搏器治疗 PD 在上世纪末开始应用于临床, 是目前世界上最好的治疗 PD 方法。它克服了毁损手术的缺点, 对于双侧症状的患者可一期手术, 治疗效果持久, 副作用少, 不破坏脑的神经核团, 为将来有更好的治疗手段提供了物质基础。

(刘金龙)