

阿霉素温度/pH 双敏型自组装嵌段共聚物胶束的制备

古建春, 乔明曦, 高 玮, 赵秀丽, 胡海洋, 徐 佳, 晋运环, 陈大为*

(沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 本文用透析法制备了新型温度/pH 双敏自组装嵌段共聚物聚组氨酸-聚乳酸羟基乙酸-聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸-聚组氨酸 (OLH-b-PLGA-b-PEG-b-PLGA-b-OLH) 胶束, 采用荧光探针技术测定其不同温度下临界胶束浓度 (CMC); 用透析法测定共聚物胶束的包封率和载药量; 对胶束的粒径、形态和表面电位进行考察, 并对阿霉素胶束的体外释药和 pH 敏感性进行了研究。CMC 介于 $0.022\ 4\sim 0.001\ 7\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 胶束包封率为 92.8%, 载药量为 15.7%; 载药胶束粒径为 $(61.7\pm 13.4)\ \text{nm}$, zeta 电位为 $-9.88\ \text{mV}$; 阿霉素的体外释药速率随 pH 降低 (pH 7.4~5.0) 而增加。结果表明, 胶束的 CMC 随温度升高而降低, 体外释药具有明显的 pH 敏感性, 该载体材料作为抗肿瘤药物的靶向传递系统具有较好的应用前景。

关键词: 阿霉素; 温度/pH 敏感; 嵌段共聚物; 自组装胶束

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 07-0793-05

Preparation of adriamycin-loaded temperature/pH sensitive self-assembly block copolymer micelles

GU Jian-chun, QIAO Ming-xi, GAO Wei, ZHAO Xiu-li, HU Hai-yang,
XU Jia, JIN Yun-huan, CHEN Da-wei*

(School of Pharmaceutical Sciences, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: The dialysis method was employed to load adriamycin into the micells formed by temperature and pH sensitive polyhistidine-co-DL-lactide-co-glycolide-polyethylene glycol poly DL-lactide-co-glycolide-co-histidine (OLH-b-PLGA-b-PEG-b-PLGA-b-OLH). The critical micelle concentration (CMC) of the copolymer was measured with pyrene fluorescent probe method under different temperatures. The entrapment rate and drug-loading rate were determined with dialysis method. The diameter, morphology and surface potential of the copolymer micelles were investigated by corresponding instruments, respectively. The release behavior of adriamycin from copolymer micelles and the pH sensitivity were studied. The CMC of the copolymers ranged from $0.022\ 4$ to $0.001\ 7\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The entrapment rate and drug-loading rate were 92.8% and 15.7%, respectively. The micelles have a mean diameter of $(61.7\pm 13.4)\ \text{nm}$, and zeta potential was $-9.88\ \text{mV}$. The *in vitro* adriamycin release rate increased with the pH dropping from 7.4 to 5.0. The results indicated that the CMC of the copolymers decreased as the raising of temperature, drug release behavior from the micells possessed clearly pH sensitivity, and the copolymers may have a potential in targeted delivery system for anticancer drugs.

Key words: adriamycin; temperature / pH sensitive; block copolymer; self-assembly micelle

温度和pH敏感型聚合物一直是新型药物载体研究的热点。温度敏感型PLGA-PEG-PLGA共聚物具有随

温度变化产生溶液-凝胶的相转变的特点, 因此, 可作为注射缓控释给药系统的载体^[1,2]。其机制是: 该共聚物在水溶液中可形成以PEG为外壳、PLGA嵌段为内核的球状胶束, 溶液的胶束化行为随温度升高发生变化, 在某一温度下形成具有稳定胶束结构的半固体凝胶, 此温度称为共聚物的相转变温度^[3]。共

收稿日期: 2009-01-05.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30801456).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-24-23986306,

E-mail: chendawei@syphu.edu.cn

聚物的分子结构变化可显著影响其溶液的相转变温度,如其相转变温度低于体温,可用作注射缓释给药系统载体;如其相转变温度高于体温,在生理温度下则以稳定的胶束状态存在,则可用于胶束靶向给药系统载体。

pH 敏感共聚物胶束被认为是抗肿瘤药物靶向给药的理想载体^[4]。目前研究的此类共聚物,多采用化学合成的方法对其进行结构修饰,在其分子结构中引入 pH 敏感的基团,增加其对体内 pH 变化的敏感性。组氨酸分子结构中存在 1 个咪唑基团,其 pK_a 在 6.5 左右,具有 pH 敏感性。环境 pH 发生变化时可产生亲水性和疏水性变化,因而,可用于制备 pH 敏感共聚物胶束。聚组氨酸[poly(L-histidine), PLH]^[5]在正常生理环境下 (pH 7.4) 分子结构中同时存在质子化和去质子化的组氨酸分子,对环境的 pH 变化极为敏感。此外,PLH 具有膜融合作用,在内吞小泡或溶酶体的弱酸性环境下带正电荷,可以与内吞小泡或溶酶体膜产生静电相互作用致其破裂,增加药物的细胞内释放。目前研制的组氨酸类聚合物胶束普遍存在对 pH 变化响应不灵敏,在体内由于血液稀释结构发生变化,导致药物泄露的缺点。在温度敏感 PLGA-PEG-PLGA 共聚物结构中引入组氨酸低聚物得到的聚组氨酸-聚乳酸羟基乙酸-聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸-聚组氨酸 (OLH-b-PLGA-b-PEG-b-PLGA-b-OLH),可结合两种聚合物的优点,同时具备 PLGA-PEG-PLGA 温敏嵌段良好的水溶性和稳定性与 PLH 的 pH 敏感性。

阿霉素 (adriamycin or doxorubicin, ADM) 是一种抑制癌细胞 DNA 合成的抗肿瘤药物。阿霉素在临床上主要用于肺癌、乳腺癌、肝癌、胃癌、前列腺癌等的治疗,但由于阿霉素分子结构不稳定,易受水分、光、热等的影响而发生水解、光解等变化,且存在心脏毒性、骨髓抑制等严重的不良反应和多药耐药性,严重影响其临床应用和疗效^[6,7]。

本文以实验室自制的温度/pH 双重敏感的嵌段共聚物聚组氨酸-聚乳酸羟基乙酸-聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸-聚组氨酸 (OLH-b-PLGA-b-PEG-b-PLGA-b-OLH)^[8,9]为载体,以阿霉素为模型药,制备包载阿霉素的聚合物胶束,并对阿霉素胶束的临界胶束浓度、载药方法和能力、胶束性质和体外释药行为进行了系统研究。

材料与方法

试剂与仪器 OLH-PLGA-PEG-PLGA-OLH (本实验室自制,采用凝胶渗透色谱法测得数均分子质

量 16 634,其中 OLH 嵌段的数均分子质量为 5 113); 芘(Sigma 公司,批号:115328045005354,含量 $\geq 97.0\%$); 盐酸阿霉素 (北京华奉联博科技有限公司,批号 HF 070312,含量 $> 98.0\%$); 透析袋 (上海绿鸟科技发展有限公司进口分装,批号:081008,截留分子量:3 500),其他试剂均为分析纯。

荧光分光光度计 (日本岛津公司,RF-5301 型); 紫外可见分光光度计 (北京瑞利分析仪器公司,UV-9100); 透射电子显微镜 (日本电子公司,JEM-1200EX 型); 粒度测定仪 (美国 Nicomp, PSS-380 型); zeta 电位测定仪 (美国 Beckman Coulter 公司,DELSA 400SX 型)。

临界胶束浓度 (CMC) 的测定 采用芘 (pyrene) 荧光探针技术测定嵌段共聚物 OLH-PLGA-PEG-PLGA-OLH 的临界胶束浓度^[8]。配制一系列不同浓度的嵌段共聚物胶束溶液,将其全部转移至 10 mL 棕色量瓶中,加入芘使其终浓度为 $1.2 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,分别置于 25、37 和 50 °C 平衡过夜,扫描测定荧光光谱。

载药胶束的制备 参考文献^[10]采用透析法制备胶束。称取一定量的盐酸阿霉素,1.5 倍量加入三乙胺及适量的二甲基亚砜 (DMSO),避光搅拌过夜,加入嵌段共聚物 40 mg,搅拌 5 h,将其转移到透析袋中,避光以 pH 7.4 的磷酸缓冲液透析。分别于 1、2、4、6 和 10 h 更换新鲜的缓冲液,透析 12 h 后得到载药胶束。分别考察溶剂种类和投药量对胶束包封率和载药量的影响。

包封率和载药量的测定 采用透析法测定其包封率和载药量^[11]。先用透析法分离包入胶束中的药物和游离药物,然后测定包入胶束中的阿霉素的量,因共聚物材料的加入量已知,故通过公式可计算包封率和载药量。紫外扫描阿霉素的吸收波长在 240 和 481 nm,而共聚物的最大吸收波长在 223 nm,故紫外吸收波长选择在 481 nm。紫外分光光度计法测定不同浓度下阿霉素水溶液的吸收度,以阿霉素浓度 (C) 对吸收度 (A) 进行线性回归,在 0.5~32 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内得标准曲线: $C = 0.0187A + 0.0103$ ($r = 0.9998, n = 9$)。说明在此范围内,阿霉素浓度与吸收度之间线性关系良好。

根据以下公式计算包封率 (entrapment efficiency, EE) 和载药量 (loading content, LC)。

$$\text{包封率} = \frac{W_1}{W_2} \times 100\%$$

$$\text{载药量} = \frac{W_1}{W_1 + W_3} \times 100\%$$

式中: W_1 胶束中药物的质量 (mg), W_2 为加入的药物的质量 (mg), W_3 为共聚物载体的质量 (mg)。

胶束的粒径、形态及 zeta 电位的测定 采用动态光散射方法 (DLS) 测定胶束的粒径。使用透射电子显微镜 (TEM) 观察胶束的形态。使用 zeta 电位测定仪测定胶束的 zeta 电位。

胶束的体外释放及 pH 敏感性考察 用透析法制备阿霉素共聚物胶束, 精密吸取 3 份载药胶束各 1.5 mL 于透析袋中, 分别置于 100 mL pH 7.4、pH 6.8 和 pH 5.0 的释放介质中, 37 °C 下恒温搅拌, 转速 30 r·min⁻¹, 定时取出释放介质 3 mL, 同时补充等体积等温的新鲜释放介质。紫外分光光度法测定释放介质中的药物含量, 计算累积释放度并绘制释放曲线。

结果与讨论

1 CMC 的测定

芘是一种极性较弱的稠环芳烃类荧光物质, 对外界环境极性变化极其敏感, 可用来测定共聚物分子聚集形成胶束的 CMC^[8,12]。从图 1 可见, 随聚合物浓度增加, 激发波长发生红移, 由 374 nm 长移到 375 nm, 393 nm 长移至 394 nm。用共聚物浓度 (g·L⁻¹) 的对数值为横坐标, 以芘在 375 nm 和 374 nm 荧光强度的比值 (I_{375}/I_{374}) 为纵坐标得到的曲线转折处对应的横坐标即可求出共聚物的 CMC。共聚物在 25、37 和 50 °C 下的 CMC 值分别为 0.022 4、0.005 12 和 0.001 74 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 结果表明, 共聚物在水溶液形成胶束的行为具有明显的温度敏感性, 随温度升高, CMC 值降低, 形成更加稳定的胶束。并且, 此类共聚物的 CMC 远低于其他 pH 敏感材料如聚组氨酸-聚乙二醇 (polyHis-b-PEG) 的 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^[8]和聚乳

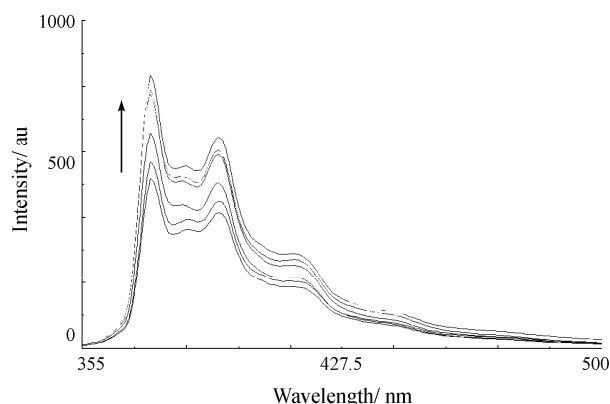


Figure 1 Excitation spectra of pyrene as a function of copolymer concentration. The arrow represents an increase in the concentration of copolymer

酸-聚乙二醇 (PLA-b-PEG) 4.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (25 °C)^[12]。CMC 测定结果表明, 该共聚物胶束具有较好的热力学稳定性, 其温度敏感性可以减少因注射后血液稀释造成的胶束的解离和破坏, 提高胶束在血流中的稳定性。

2 载药胶束的制备和载药情况的考察

制备胶束的方法很多, 在实验中尝试了溶解法、薄膜分散法、乙醇注入法和透析法等。溶解法虽然制备胶束较快且便捷, 但由于阿霉素脱盐酸盐过程中过量的三乙胺以及生成的盐难以除去, 影响胶束的稳定性, 且胶束粒径分布不均。薄膜分散法和乙醇注入法难以找到既能较好的溶解共聚物又有较好的挥发性的良好溶剂。而透析法效果较好, 粒径分布较均匀且稳定性好。文献^[8-13]报道类似共聚物多采用透析法制备, 故该共聚物选用透析法制备胶束。

在透析法制备胶束的过程中分别采用了 3 种不同的溶剂, 即二甲基亚砜 (DMSO)、*N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF) 和乙醇, 得到的包封率和载药量的顺序均为: DMSO > DMF > 乙醇, 见表 1。由此选定 DMSO 为分散溶剂。

考察了投药量对包封率和载药量的影响, 结果如表 2 所示。实验证明: 在聚合物量一定的情况下, 随着投药量逐渐增加到 8 mg, 载药量增加, 而包封率下降, 但变化不大; 继续增加至 12 mg, 包封率和载药量均迅速下降。载药量下降的原因可能是过多的难溶性固体药物干扰胶束的形成和稳定性, 导致胶束聚沉, 具体原因还在研究中。

3 胶束的粒径测定

动态光散射仪测得空白胶束的粒径为 (23.1±3.2) nm, 载药胶束的粒径为 (61.7±13.4) nm, 粒径分布如

Table 1 Influence of kinds of solvents on the encapsulation of adriamycin (ADM) in copolymer micelles

Solvent	EE/%	LC/%
DMSO	87.3	9.84
DMF	75.8	8.65
Ethanol	49.8	5.86

EE: Entrapment efficiency; LC: Loading content

Table 2 Influence of ADM amount on the encapsulation of ADM in copolymer micelles

ADM/mg	EE/%	LC/%
4	94.3	8.62
8	92.8	15.7
12	74.1	8.48

DMSO volume was 1.0 mL

图 2 所示。可以看出, 该共聚物空白与载药胶束粒径分布均较好, 载药后粒径稍有增大。原因可能是胶束的疏水性空腔包载阿霉素后, 由于阿霉素分子的挤占引起胶束内核和外壳膨胀, 导致胶束粒径增加。

4 阿霉素胶束的透射电镜观察

空白胶束的透射电镜照片和阿霉素胶束透射电镜照片如图 3 所示。背景为黑色的磷钨酸溶液, 阿霉素胶束为白色球状。由电镜照片可见共聚物胶束具有规则的类球形结构, 大小均一。电镜照片测得的粒径与动态光散射法测得的粒径相比偏小, 原因是电镜照片中的粒径为干胶束的粒径, 而动态光散射的粒径为溶液状态的粒径, 此差异是由于测定方法不同造成的。

5 Zeta 电位的测定

Zeta 电位测定仪测得胶束的 zeta 电位为 -9.88 mV。研究^[14]报道带负电的微粒有在血小板表面附着的倾向, 而且电势绝对值越大, 越容易吸附。该胶束的 zeta 电位绝对值不是很大, 被血小板表面附着的倾向较小, 可更多地进入靶组织和靶细胞, 提高靶向效率。

6 胶束的体外释放及 pH 敏感性考察

阿霉素胶束在不同释放介质中的释放曲线如图 4A 所示。通过实验数据可以看出, 在 pH 7.4 的释放介质中, 胶束释药平稳, 96 h 累积释药量为 38.7%, 表现出较好的缓释效果, 可以有效携带药物至靶组织和靶细胞, 减少药物对机体正常组织和器官的毒性。在 pH 6.8 时可见释药明显加快, 且有一定的缓释效果, 此 pH 值与肿瘤组织的 pH 较接近^[11], 便于部分药物在肿瘤组织释放。在 pH 5.0 时, 阿霉素胶束突释明显, 释药快速且完全, 96 h 释药近 95%, 有利于在

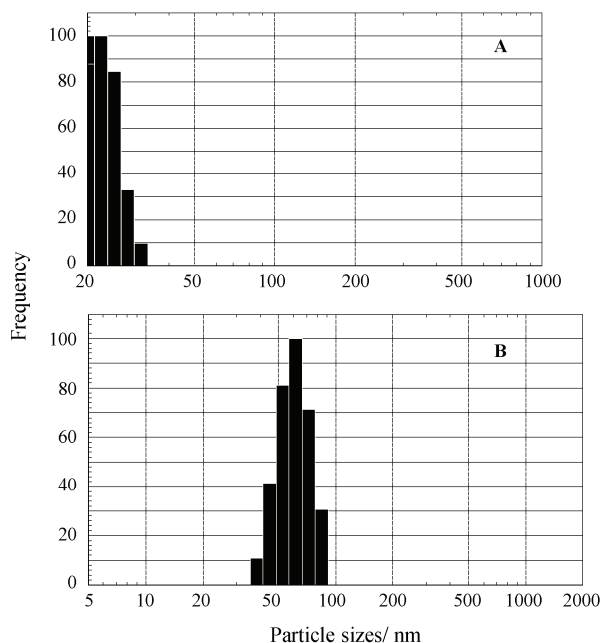


Figure 2 Polymer micelles' size (A) and ADM polymer micelles' size (B) and their distributions

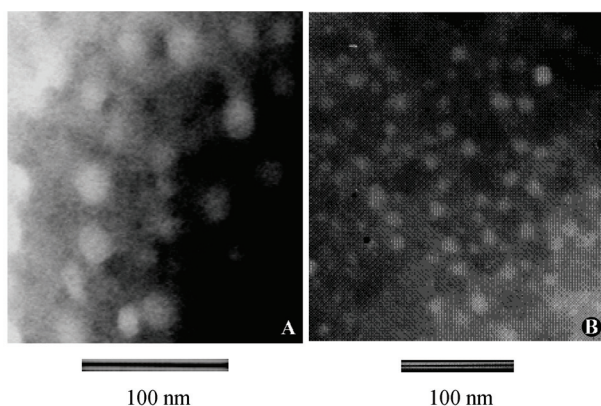


Figure 3 TEM photograph of blank micelles (A) and ADM micelles (B)

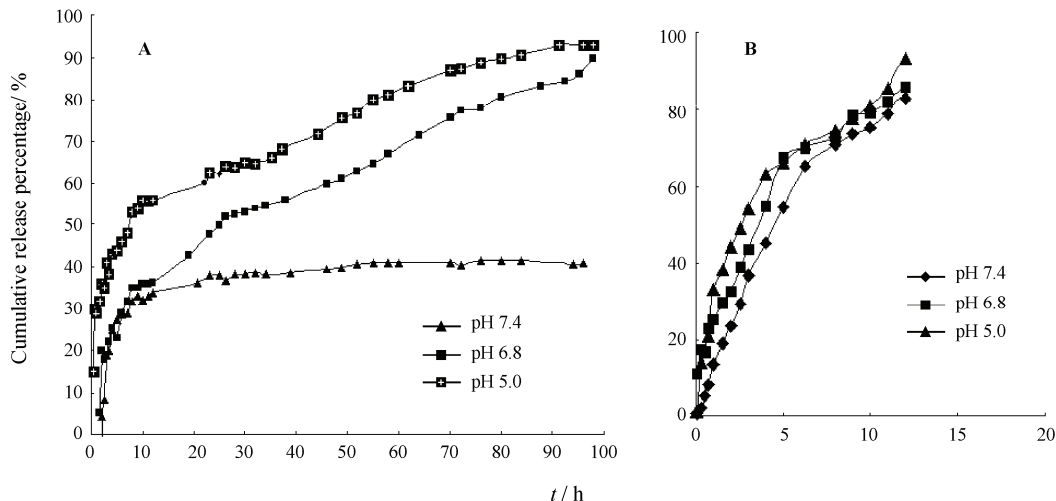


Figure 4 Release of ADM from polymer micelles(A) and ADM (B) *in vitro*

肿瘤细胞中释药, 因此可能提高肿瘤细胞内部的药物浓度, 实现更快地杀伤肿瘤细胞的目的。而阿霉素原料的体外释放如图 4B 所示, 并没有表现出明显的缓释和 pH 敏感释药特征。

结论

本实验研究结果表明, 透析法制备的阿霉素新型温度/pH 双敏自组装嵌段共聚物胶束稳定性好, 粒径小而均匀, 载药粒径在 61.7 nm 左右。包载疏水性药物阿霉素的能力强, 体外释放和 pH 敏感实验发现, 该胶束具有很好的 pH 敏感释药特点, 适合作为该药物的细胞靶向给药载体。关于该材料的其他理化特性、包载不同药物的能力、细胞实验和体内实验正在开展中。该材料在作为疏水性抗肿瘤药物的细胞靶向传递系统中具有很好的应用前景。

References

- [1] Jeong JH, Kim SW, Park TG. Biodegradable triblock copolymer of PLGA-PEG-PLGA enhances gene transfection efficiency [J]. *Pharm Res*, 2004, 21: 50–54.
- [2] Tyagi P, Li Z, Chancellor M, et al. Sustained intravesical drug delivery using thermosensitive hydrogel [J]. *Pharm Res*, 2004, 21: 832–837.
- [3] Shim WS, Yoo JS, Bae YH, et al. Novel injectable pH and temperature sensitive block copolymer hydrogel [J]. *Biomacromolecules*, 2005, 6: 2930–2934.
- [4] Hao TN, Qiao MX, Li Z, et al. Progress in the study of pH and temperature sensitive biodegradable block copolymers [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2008, 43: 123–127.
- [5] Patchornik A, Berger A, Katchalski E. Poly-L-histidine [J]. *Am Chem Soc*, 1957, 79: 5227–5230.
- [6] Omelyanenk V, Kopeckova P, Gentry C, et al. Targetable HPMA copolymer-adriamycin conjugates: recognition, internalization and subcellular fate [J]. *J Control Release*, 1998, 53: 25–37.
- [7] Lee ES, Gao ZG, Kim Dongin, et al. Super pH-sensitive multifunctional polymeric micelle for tumor pH_e specific TAT exposure and multidrug resistance [J]. *J Control Release*, 2008, 129: 228–236.
- [8] Eun SL, Hyun JS, Kun Na, et al. Poly(L-histidine)-PEG block copolymer micelles and pH-induced destabilization [J]. *J Control Release*, 2003, 90: 363–374.
- [9] Qiao MX, Chen DW, Ma XC, et al. Injectable biodegradable temperature-responsive PLGA-PEG-PLGA copolymers: synthesis and effect of copolymer composition on the drug release from the copolymer-based hydrogels [J]. *Int J Pharm*, 2005, 294: 103–112.
- [10] Yin HQ, Lee ES, Kim D, et al. Physicochemical characteristics of pH-sensitive poly(L-Histidine)-*b*-poly(ethylene glycol)/poly(L-lactide)-*b*-poly(ethylene glycol) mixed micelles [J]. *J Control Release*, 2008, 126: 130–138.
- [11] Lee ES, Kyung TO, Kim D, et al. Tumor pH-responsive flower-like micelles of poly(L-lactic acid)-*b*-poly(ethylene glycol)-*b*-poly(L-histidine) [J]. *J Control Release*, 2007, 123: 19–26.
- [12] Han SK, Na K, You HB. Sulfonamide based pH-sensitive polymeric micelles: physicochemical characteristics and pH-dependent aggregation [J]. *Colloids Surf A, Physicochem. Eng Asp*, 2003, 214: 49–59.
- [13] Kim GM, Bae YH, Jo WH. pH-induced micelle formation of poly(histidine-co-phenyl alanine)-block-poly(ethylene glycol) in aqueous media [J]. *Macromol Sci*, 2005, 5: 1118–1124.
- [14] Liang WQ. *Biopharmaceutics and Pharmacokinetics (生物药剂学与药代动力学)* [M]. 2nd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2003: 113.