

聚甘油酸-g-胆固醇胶束的制备及药物释放性能研究*

黄晓倩¹ 何 斌^{2**} 宋丽晴² 杨 扬² 顾忠伟^{2**}

(四川大学¹ 高分子材料科学与工程学院² 国家生物医学材料工程技术研究中心 成都 610064)

摘 要 以甘油酸为单体,通过本体缩聚制备了水溶性生物降解高分子聚甘油酸,利用聚甘油酸侧基上的羟基固定生物相容性好的疏水性分子胆固醇,通过亲疏水作用自组装形成胶束.以形成的胶束作为载体负载抗肿瘤药物阿霉素,研究了药物的体外释放行为.将肝癌细胞 HepG2 与载药胶束共培养研究其体外抗肿瘤效果.研究表明,聚甘油酸-g-胆固醇共聚物在水中能够形成高分子胶束,临界胶束浓度为 63 $\mu\text{g/mL}$.胶束为球形,粒径分布窄,平均粒径约为 120 nm.载药胶束的体外持续释放时间可长达 12 h.低浓度时聚甘油酸-g-胆固醇胶束没有细胞毒性;当胶束浓度为 1 mg/mL 时,共培养的 3T3 成纤维细胞的活性依然保持 90%.体外抗肿瘤效果研究显示载药胶束能够顺利进入细胞,释放药物,抑制肿瘤细胞的增殖,其体外抗肿瘤效果好于自由阿霉素.

关键词 生物降解,聚甘油酸-g-胆固醇,胶束,药物释放

生物降解高分子胶束由于纳米尺度效应产生的被动靶向功能,已经成为一种重要的药物传输载体^[1].双亲性嵌段或接枝高分子是形成高分子胶束的两种主要形式.以脂肪族生物降解性聚酯为代表的嵌段高分子胶束药物载体已有大量的文献报道^[2,3].接枝型生物降解高分子胶束药物载体材料以天然高分子聚多糖为主^[4-6].尽管聚多糖类天然高分子具有良好的生物相容性,但由于其大多数为酶催化降解,因此,天然高分子胶束药物传输系统在实际应用中受到体内酶种类和活性的影响很大.

带有功能侧基,主链降解的合成生物降解高分子由于其合成难度及种类少等原因,仅有少量的文献报道^[7,8],并且主要集中于研究制备方法和性能.聚(L-赖氨酸)、聚(L-谷氨酸)、聚(L-天冬氨酸)等聚氨基酸类生物降解高分子由于带有氨基、羧基等功能侧基,通过接枝改性后能够用于构建合成生物降解高分子胶束^[9-11].我们进行了主链为聚酯,功能侧基为羧基的聚(L-苹果酸)及其共聚物的合成方法、性能及生物医学应用研究^[12-14].带有功能侧基的合成生物降解高分子,无论是聚氨基酸类还是聚(L-苹果酸),由于其功能侧基为氨基或羧基,在水环境中均会改变溶液的 pH 值,从而影响其医学应用.

聚甘油酸是带有功能侧基——羟基的一种新型聚酯型合成生物降解高分子.目前有文献报道的为聚(甘油酸-co-乙醇酸)或聚(甘油酸-co-乳酸)的共聚物^[15],通过对丙交酯或乙交酯单体的功能化制备六元环内酯,以配位开环聚合反应制备聚(甘油酸-alt-乙醇酸(乳酸))的交替共聚物.聚甘油酸均聚物的合成及其生物医学应用目前还鲜见文献报道.

本文以甘油酸为单体,通过缩聚反应合成了枝化的聚甘油酸均聚物,在聚甘油酸的功能侧基上部分接枝胆固醇,利用胆固醇的疏水性以及其对细胞膜磷脂双分子层的融合作用,使接枝共聚物自组装成为胶束,同时提高细胞对载药胶束的吞噬量.以抗肿瘤药物阿霉素为模型药物,将其负载到聚甘油酸高分子胶束中,研究了共聚物的细胞毒性、药物释放性能及对肝癌细胞 HepG2 体外增殖的抑制效果.结果表明,聚甘油酸-g-胆固醇高分子胶束有望作为一种新型的药物载体用于药物传递系统.

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

甘油酸(日本 TCI, 25 g, 40% 水溶液)、胆固

* 2010-08-26 收稿, 2010-11-21 修稿; 国家自然科学基金(基金号 50830105)、国家重点基础研究发展计划(973 计划, 项目号 2011CB606206)、国家高技术研究发展计划(863 计划, 项目号 2007AA021801)、四川省青年科技基金(基金号 07ZQ026-013)和四川省应用基础研究项目(项目号 2008JY0032)资助; ** 通讯联系人, E-mail: bhe@scu.edu.cn; zwgu@scu.edu.cn
doi:10.3724/SP.J.1105.2011.10252

醇、环二己基碳酰亚胺(DCC)、丁二酸酐、苾、磷酸盐缓冲溶液(PBS)、*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)、四氢呋喃(THF)、乙醚、三乙胺、三氯甲烷、二氯甲烷等均为分析纯,购置于成都市科隆化工试剂厂。

样品的核磁共振(NMR)分析采用 Bruker AV-400 核磁共振波谱仪,重水为溶剂,TMS 为内标。聚甘油酸及其共聚物的分子量及分子量分布由凝胶渗透色谱(GPC)测定(Waters 1515),以单分散的聚苯乙烯为标样,DMF 为淋洗液。利用纳米粒度及电位分析仪(DLS)测试纳米粒子在水溶液中的粒径分布。利用透射电子显微镜(TEM, H-600 Electron Microscope)和原子力显微镜(AFM, ECLIPSE Ti-U MFP-3D-BIO)分析纳米粒子的微观形貌。激光共聚焦扫描显微镜(CLSM)(Leica TCP SP5)分析载药纳米粒子在肿瘤细胞内的分布,酶联免疫检测分析(ELISA)采用 Biorad 公司的 Model-550 型酶联免疫检测仪。

1.2 载药纳米胶束的制备

称取 10 g 甘油酸加入 50 mL 圆底烧瓶,加热到 85℃在 20 Pa 的真空下反应 38 h。将得到的缩聚产物溶于金属钠干燥的 THF,于大量无水乙醚中沉淀,得到聚甘油酸,产率为 86%。¹H-NMR (D_2O , δ): 3.8 ~ 4.0 (m, CH in —CH—CH₂—O), 4.2 ~ 4.8 (m, CH₂ in —CH—CH₂—O)。由 GPC 测得的聚甘油酸的数均分子量(M_n)为 9200,分子量分布(M_w/M_n)为 2.2。

称取胆固醇 1 g,丁二酸酐 0.52 g(摩尔比 1:2)加入 100 mL 带支口烧瓶,抽真空后通入氮气,在氮气气氛中,用注射器加入 30 mL 新蒸的 THF,搅拌使二者全部溶解。持续搅拌 48 h 后,真空除去 THF,用二氯甲烷/水萃取,将产物干燥后保存。

称取 0.05 g 经丁二酸酐处理的胆固醇和 0.27 g 聚甘油酸(理论接枝率 5%)装入 100 mL 烧瓶中,溶于 10 mL 纯化后的 DMF 中,将 0.4 g DCC 溶于 10 mL 干燥的 DMF 中,在冰水浴中缓慢加入混合溶液。滴加完毕后室温反应 24 h。混合物过滤后于乙醚中沉淀反应,得到胆固醇接枝的聚甘油酸,产率 90%。根据胆固醇中亚甲基和甲基上的氢与甘油酸重复单元次甲基上的氢的比值,计算出胆固醇的接枝量约为 5%,与投料比相当。¹H-NMR (D_2O , δ): 3.8 ~ 4.0 (m, CH in —CH—CH₂—O), 4.2 ~ 4.8 (m, CH₂ in —CH—CH₂—O), 0.8 ~ 2.0 (m, CH, CH₂ and CH₃ in

cholesterol), 2.2 (m, CH₂ in OCCH₂CH₂CO), 5.2 ~ 5.3 (m, CH in C = CH in cholesterol)。由 GPC 测得的胆固醇接枝聚甘油酸共聚物的数均分子量(M_n)为 11400,分子量分布(M_w/M_n)为 2.5。

称取 5 mg 聚合物和 2 mg 阿霉素于小瓶中,溶于 2 mL 三氯甲烷。将三氯甲烷溶液滴加至 30 mL 水中,剧烈搅拌使三氯甲烷挥干。然后将水溶液浓缩离心,浓缩后将水溶液冷冻干燥,得到载药胶束。

精确称取一定量的载药胶束,溶于适量 DMSO 中,超声 10 min,功率为 100%。测定该溶液在波长 485 nm 处的紫外吸收值,依据标准吸收曲线计算胶束的载药量和包封率。

1.3 临界胶束浓度(CMC)的测定

以苾为荧光探针,发射波长为 395 nm,激发波长为 300 nm。将空白胶束溶解在苾溶液中,配制 1、0.5、0.1、0.05、0.01、0.005、0.001、 5×10^{-4} 、 1×10^{-4} 、 5×10^{-5} 、 1×10^{-5} 、 5×10^{-6} 、 1×10^{-6} mg/mL 等不同浓度的溶液。将不同浓度的紫外吸收值作图,计算聚甘油酸-*g*-胆固醇胶束的临界胶束浓度^[16]。

1.4 体外药物释放

称取少量载药胶束溶解于 PBS 溶液中,取 3 个平行样,分别加入 0.5 mL 试样于透析袋中。将透析袋浸没于 30 mL 相同 PBS 溶液里。放入恒温振荡器(温度 37℃)。定时取样 2 mL,随后补加 2 mL PBS 到溶液中,在 485 nm 处测定紫外吸光度。根据阿霉素的标准曲线,计算释放的药物浓度。

1.5 体外细胞毒性实验

采用大鼠 3T3 成纤维细胞进行胶束的细胞毒性实验。将培养好的细胞接种于 96 孔板。参考文献[17]的方法,配浓度为 0.1、0.5 和 1 mg/mL 的样品。每个浓度的样品设 5 个平行样。将不同浓度的样品与细胞共培养 24 h,用 MTT 法检测细胞的存活率,评价胶束的细胞毒性。

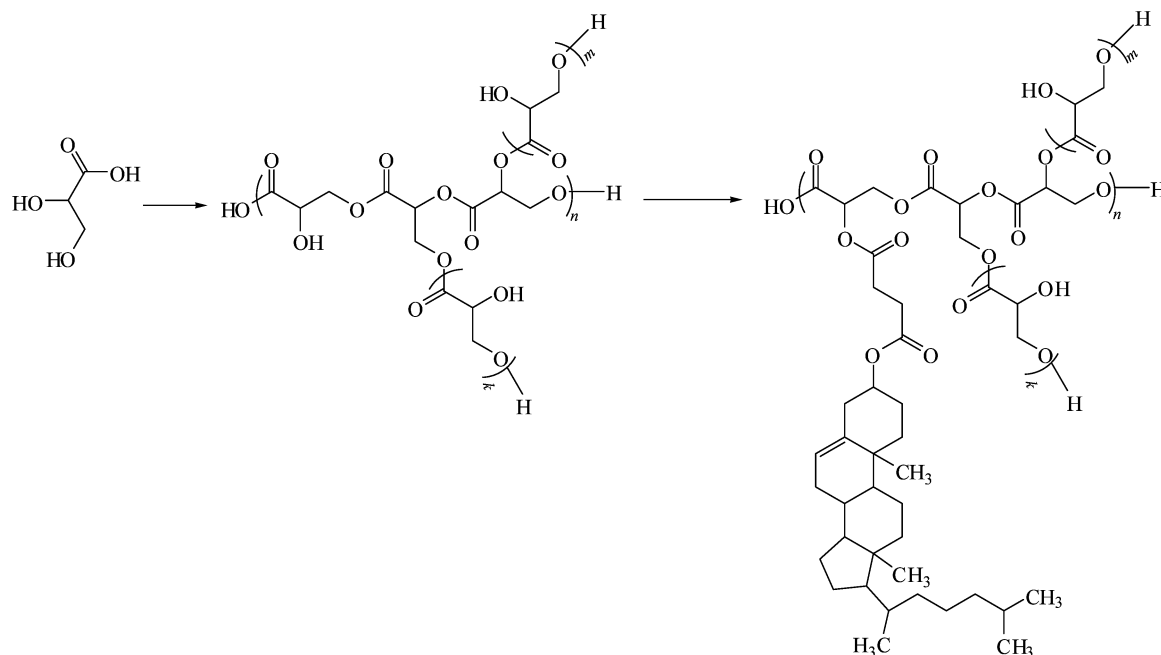
1.6 体外抗肿瘤实验

采用 HepG2 细胞作为实验对象,参考文献[9],将细胞接种于 96 孔板,待细胞贴壁生长后,加入载药胶束(阿霉素终浓度为 7.5 μ g/mL),设 5 个平行样。并采用自由阿霉素作阳性对照组,以及生理盐水作为阴性对照组。采用 MTT 法,分别在 24,48,72 h 检测细胞存活率。并在 4 h 时用激光共聚焦显微镜观察细胞形貌。

2 结果与讨论

甘油酸是含有 2 个羟基和 1 个羧基官能团的有机物,通过本体缩聚可制备含有羟基为功能侧基的聚甘油酸.由于脱水缩聚无法控制聚甘油酸

的线型结构,因此,得到的聚甘油酸为枝化的聚酯高分子.胆固醇接枝聚甘油酸共聚物的合成路线如示意图 1 所示.聚甘油酸以及聚甘油酸-*g*-胆固醇的结构表征已在实验部分给出.



Scheme 1 The synthetic route of poly(glyceric acid)-*g*-cholesterol

共聚物临界胶束浓度(CMC)根据胶束中芘的含量变化作图确定.由于芘在水中最大激发波长为 334 nm,随着共聚物浓度增加,最大激发波长渐渐红移至 338 nm^[18],因此吸光度比值(I_{338}/I_{334})随浓度的拐点即为临界胶束浓度.图 1 所示为胆固醇接枝率为 5% 的共聚物形成胶束的临界胶束浓度,作图得到的胶束 CMC 约为 63 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

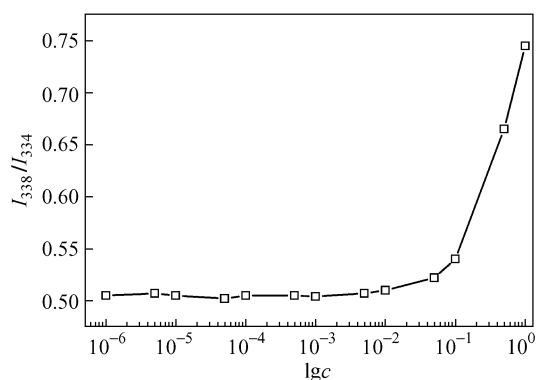


Fig. 1 The critical micelle concentration of poly(glyceric acid)-*g*-cholesterol

共聚物胶束的粒径及粒径分布通过动态光散射(DLS)测定,DLS 的结果如图 2 所示.从图中可以看出胶束粒子粒径分布主要在 80 ~ 180 nm 之间,呈单分散性.胶束的平均粒径为 120 nm.

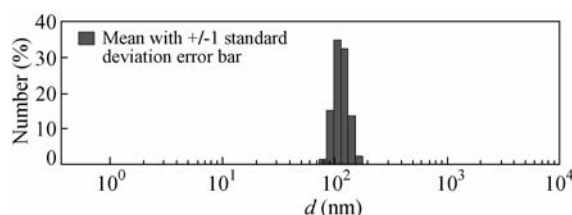


Fig. 2 The size and size distribution of micelles

共聚物胶束的形貌分别用透射电镜(TEM)和原子力显微镜(AFM)进行了观察.所得的胶束形貌图分别为图 3 和图 4.由图 3 和图 4 可以看到,胶束的形状比较规整,为球形.由于胶束的单分散性,球的粒径略有差别.对比图 2 和图 3 可以看出 DLS 测得的粒径比透射电镜所测粒径稍大,这是因为 DLS 测得的胶束粒径为水合粒径,胶束在水中有一定程度的溶胀,因此,DLS 所测粒径大于 TEM 所测粒径.

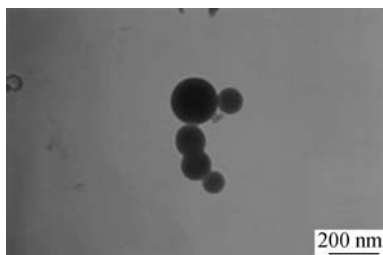


Fig. 3 The TEM photograph of micelles

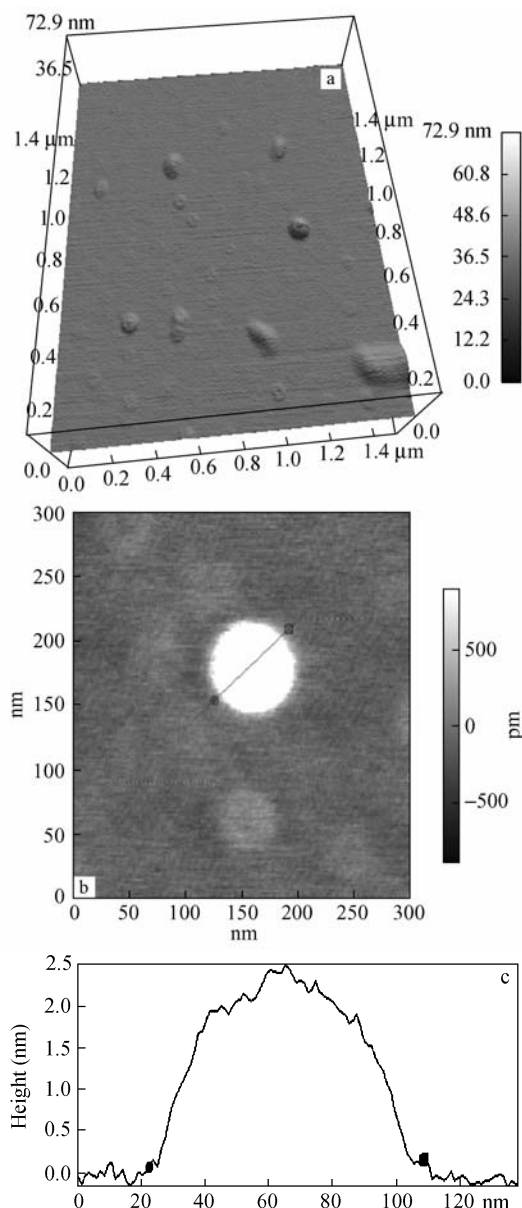


Fig. 4 The AFM photographs of micelles

图4为原子力显微镜测得的共聚物胶束的形貌,图4(a)为胶束的三维立体图像,可以看到明显的球形结构.图4(b),4(c)为测定的某一胶束的高度和粒径.所测的胶束的粒径约为80 nm,高

度为2.5 nm.这是因为球形的胶束在AFM测试过程中失水坍塌,导致其高度远远小于粒径.

根据载药量和包封率的公式计算得知,聚(甘油酸-*g*-胆固醇)共聚物胶束的载药量为18.71%,包封率为46.78%.相对于载药胶束来说,此载药量较高,但包封率偏低,可能的原因是胆固醇与阿霉素间有较强的疏水作用,导致载药量较高,但由于胆固醇的接枝率仅为5%,使形成的载药胶束稳定性较差,因此胶束的包封率偏低.

胶束的体外药物释放曲线在pH = 7.4的磷酸缓冲液中测定,体外药物释放曲线如图5所示.从体外药物释放曲线中可以看到,在0.5 h内,阿霉素的释放速率较快,有短暂爆释现象,爆释率为30%左右.但从2 h开始,释放速率较为恒定,几乎呈线性;至10 h以后,释放速率十分平缓,此时的累积释放率为76%.胶束的药物释放曲线说明其具有药物的缓释功能,具备作为药物释放载体的条件.

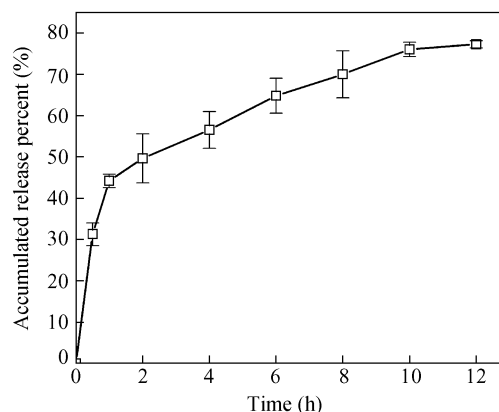


Fig. 5 In vitro drug release of micelles

采用大鼠3T3成纤维细胞与不同浓度的空白胶束共培养进行胶束的细胞毒性测试,测试结果如图6所示.共培养24 h后,胶束浓度为0.1和0.5 mg/mL的样品中细胞的存活率均接近100%,说明在此浓度下,胶束几乎不具有细胞毒性.当空白胶束的浓度为1 mg/mL时,细胞的存活率有所降低,为90%左右,说明随着浓度的升高,共聚物胶束显示出轻微的细胞毒性.根据前面提到的载药量以及临床使用的阿霉素剂量计算可知,实际使用过程中胶束的浓度远小于1 mg/mL.因此,聚甘油酸-*g*-胆固醇共聚物胶束有望作为抗肿瘤药物的传输载体.

为了研究载药胶束的体外抗肿瘤效果,将载药胶束与肝癌细胞HepG2体外共培养,自由阿霉

素为对照(图 7). 对比共培养 1,2,3 天的肿瘤细胞的存活率可以发现,第 1 天和第 2 天,载药胶束与自由阿霉素对肝癌细胞的杀死率接近,第 3 天,载药胶束的杀死肝癌细胞的效果大大高于自由阿霉素. 与载药胶束共培养 3 天的肝癌细胞的存活

率为 45%,而自由阿霉素的存活率为 60%. 这是由于胶束有缓释作用,在细胞内能够较长时间保持阿霉素的浓度,因此,共培养 3 天后,载药胶束的杀死肿瘤细胞的效果好于自由阿霉素.

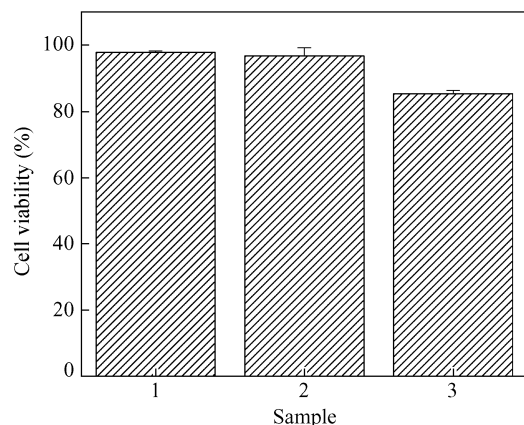


Fig. 6 The cytotoxicity of micelles

1) 0.1 mg/mL; 2) 0.5 mg/mL; 3) 1 mg/mL

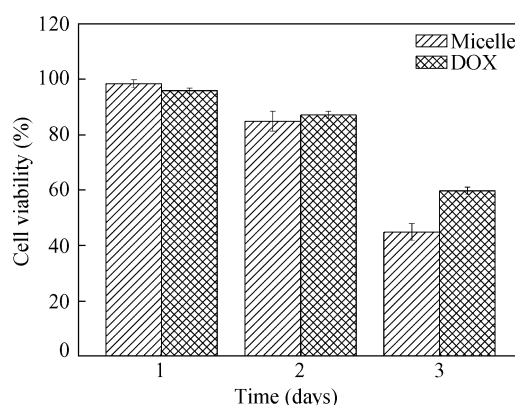


Fig. 7 In vitro anti-tumor effect of micelles

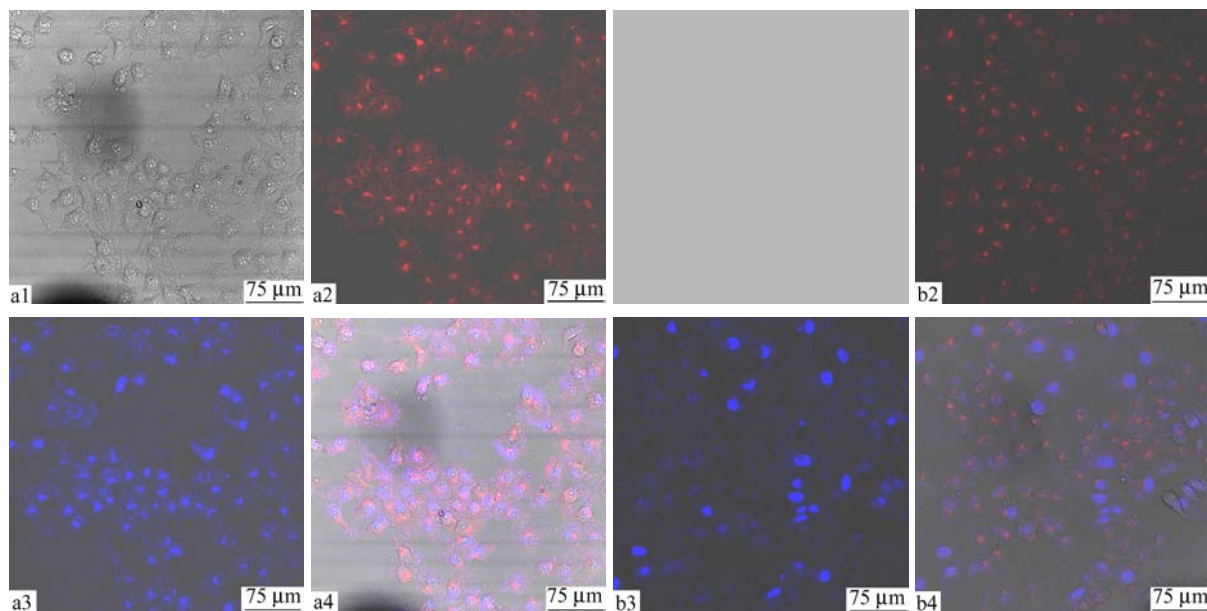


Fig. 8 Confocal microscopic images of HepG2 cells incubated with free DOX and DOX-loaded micelles

a) Free DOX; b) DOX loaded micelles; a1, b1) HepG2 cells; a2, b2) Fluorescence of DOX; a3, b3) Nucleus; a4, b4) Overlapped images

阿霉素的抗肿瘤机制是抑制 RNA 和 DNA 的合成,胶束中负载的阿霉素只有进入肿瘤细胞才能起到杀伤效果. 因此,只有阿霉素尽量多地进入到细胞内才能够起到很好的杀死肿瘤细胞的效果. 为了验证自由阿霉素和载药胶束对肝癌细胞的作用部位,将二者与肝癌细胞 HepG2 共同培养 4 h,然后将细胞核染色,用激光共聚焦 (CLSM) 进

行检测. 结果如图 8 所示. 自由阿霉素和载药胶束均大量进入穿过细胞膜进入细胞内部,这就是载药胶束具有较好的体外抗肿瘤效果的原因.

3 结论

通过缩聚合成了新型生物降解高分子聚甘油酸,利用其接枝胆固醇制备了胶束,将抗肿瘤药物

阿霉素负载到胶束中并研究了药物的体外释放行为和体外抗肿瘤效果. 结果表明,聚甘油酸-*g*-胆固醇共聚物胶束的临界胶束浓度为 63 $\mu\text{g/mL}$,平均粒径约为 120 nm,药物释放结果表明阿霉素的

持续释放时间可长达 12 h. 聚甘油酸-*g*-胆固醇共聚物胶束的细胞毒性低,载药胶束能够顺利进入细胞,释放药物,抑制肿瘤细胞的增殖,其体外抗肿瘤效果好于自由阿霉素.

REFERENCES

- 1 Kataoka K, Harada A, Nagasaki Y. Adv Drug Deliv Rev, 2001, 47: 113 ~ 131
- 2 Gao J, Ming J, He B, Fan Y, Gu Z, Zhang X. Eur J Pharm Sci, 2008, 34: 85 ~ 93
- 3 Gao Jieming(高界铭), Guo Yingzhi(郭颖志), Gu Zhongwei(顾忠伟), Zhang Xingdong(张兴栋). Acta Polymerica Sinica(高分子学报), 2008, (2): 174 ~ 178
- 4 Liu J, Li H X, Jiang X, Zhang C, Ping Q. Carbohydr Polym, 2010, 82(2): 432 ~ 439
- 5 Meng Jianqiang(孟建强), Dong Yongquan(董永全), Li Zichen(李子臣). Acta Polymerica Sinica(高分子学报), 2010, (5): 550 ~ 555
- 6 Lin X P, Gao W, Huang X, Zang P, Chen L, Wu H. Carbohydr Polym, 2010, 82(2): 460 ~ 465
- 7 Shen Y, Chen X, Gross R. Macromolecules, 1999, 32: 3891 ~ 3897
- 8 Bizzarri R, Chiellini F, Solaro R, Chiellini E, Camass-Marion S, Guerin P. Macromolecules, 2002, 35: 1215 ~ 1223
- 9 Zhang Jie(张洁), Wu Guolin(伍国琳), Wang Zheng(王铮), Xu Xu(徐旭), Wang Yinong(王亦农), Ma Jianbiao(马建标). Acta Polymerica Sinica(高分子学报), 2009, (12): 1179 ~ 1185
- 10 Yuan H, Luo K, Lai Y, Pu Y, He B, Wang G, Wu Y, Gu Z. Mole Pharm, 2010, 7(4): 953 ~ 962
- 11 Gillies E, Jonsson T, Fréchet J. J Am Chem Soc, 2004, 126(38): 11936 ~ 11943
- 12 He B, Wan E, Chan-Park M. Chem Mater, 2006, 18: 3946 ~ 3955
- 13 He B, Chan-Park M. Macromolecules, 2005, 38: 8227 ~ 8234
- 14 He B, Bei J, Wang S. Polymer, 2003, 44(4): 989 ~ 994
- 15 Leemhuis M, Kruijtzter J, Nostrum C, Hennink W. Biomacromolecules, 2007, 8: 2943 ~ 2949
- 16 Kataoka A, Matsumoto T, Yokoyama M, Okano T, Sakurai Y, Fukushima S, Okamoto T, Kwon G. J Controlled Release, 2000, 64: 143 ~ 153
- 17 Li Yuan(李媛), Ji Li(吉丽), Wang Gang(王刚), Song Liqin(宋丽晴), He Bin(何斌), Li Li(李莉), Nie Yu(聂宇), Wu Yao(吴尧), Gu Zhongwei(顾忠伟). Science China Chemistry(中国科学:化学), 2010, 40(3): 247 ~ 254
- 18 Guo H, Zhao X, Wang J. J Colloid Interf Sci, 2005, 284: 646 ~ 651

PREPARATION AND DRUG RELEASE BEHAVIOR OF POLY(GLYCERIC ACID) -g-CHOLESTEROL MICELLES

HUANG Xiaoqian¹, HE Bin², SONG Liqin², YANG Yang², GU Zhongwei²

(¹ School of Polymer Science & Engineering, ² National Engineering Research Center for Biomaterials, Sichuan University, Chengdu 610064)

Abstract A novel biodegradable poly(glyceric acid) (PGA) was synthesized by the polycondensation of glyceric acid. The hydrophobic and biocompatible molecule cholesterol was immobilized on the pendant functional group of PGA. The micelles were formed by the self-assemble driven by the hydrophilic-hydrophobic interaction. Anti-tumor drug doxorubicin was loaded in the micelles to study the drug release profile. The anti-tumor effects *in vitro* were evaluated with liver cancer cell HepG2. The results demonstrated that the content of cholesterol grafted was nearly the same as the feeding dose. The micelles of poly(glyceric acid) -g-cholesterol were formed in phosphate buffer solution (PBS) and the critical micellization concentration was 63 $\mu\text{g/mL}$. The micelles were spherical with narrow size distribution; the average diameter was around 120 nanometers. The drug-loading rate and entrapment efficiency of the micelles with 5 mol% cholesterol content in the copolymer were 18.71% and 46.78%, respectively. The sustaining drug release time of the micelles was as long as 12 h. The study of cytotoxicity found that the micelle was nontoxic when the concentration was below 0.5 mg/mL and it showed low cytotoxicity when the concentration was 1 mg/mL. The *in vitro* anti-tumor effect study showed that the drug loaded micelles could enter into the cancer cells by endocytosis, and the anti-tumor effect of the micelles was better than that of free doxorubicin.

Keywords Biodegradable, Poly(glyceric acid) -g-cholesterol, Micelle, Drug release