

聚电解质微球多级自组装制备双重药物载体^{*}

卫 兰 蔡春华 林嘉平^{**}

(华东理工大学材料科学与工程学院 上海市先进聚合物材料重点实验室 上海 200237)

摘 要 将表面带正电荷的壳聚糖(CS)微球和表面带负电荷的聚(L-谷氨酸)-*b*-聚氧化丙烯-*b*-聚(L-谷氨酸)(GPG)胶束共混,制备了 CS/GPG 聚集体水溶液体系.通过改变 CS/GPG 的共混比例,研究了 CS 微球和 GPG 胶束形成稳定 CS/GPG 聚集体水溶液体系的配比范围,并对其粒径分布和表面电位进行了表征.在此基础上,将 CS 微球作为亲水性药物阿司匹林(Asp)的载体,GPG 胶束作为疏水性药物阿霉素(DOX)的载体,通过多级自组装形成一种新型双重载药体系.研究了该双重药物载体的体外药物释放行为.结果表明,Asp 和 DOX 都具有很好的药物缓释效果,并且 2 种药物的释药行为都具有明显的 pH 值响应性.

关键词 壳聚糖,胶束,静电自组装,多级自组装,双重载药

目前,以水为分散剂的具有微观尺度的聚合物载药体系已成为药物载体研究领域的热点之一^[1~9].它可以均匀分散于水中,作为口服药剂或注射针剂等使用.在这类聚合物载体中,由两亲性共聚物自组装形成的胶束是包埋疏水性药物的常用载体之一^[10~13].为了使载药体系符合临床应用的要求,通常将功能性基团或链段以嵌段或接枝的方式引入到聚合物链段上,从而使载药胶束的释药行为具有环境响应性和/或靶向性等,这就是所谓的“智能型”载药胶束^[14~17].

水凝胶微球也是一类常见的药物载体.它具有三维网络状结构,其内部包含大量的水,因此可作为亲水性药物以及一些大分子蛋白和基因片段等的载体^[18~21].其中,阳离子型的壳聚糖,因其良好的生物相容性和 pH 值响应性而被广泛用于制备微球载体^[22~29].但是,由壳聚糖形成的微球载体结构较为松散,药物释放较快,通常需要用阴离子型聚合物如海藻酸钠等与其静电自组装形成核壳结构来延缓药物的释放周期^[28,29].

用于协同给药的双重载药体系已成为药物载体研究领域的一个新的发展方向^[30,31].与传统的单一载药体系相比,它可以分别调节多种药物的给药速率,使每种药物以适当的浓度传输到病灶部位,进而优化治疗效果.由于这类体系大多采用微观载体与本体支架复合^[30]或载药支架层层叠加^[31]的方式制备,因此得到的载药体系尺度较

大,一般只适用于植入性应用,使得双重载药体系的应用受到一定的限制.而微观尺度的双重载药体系既可作为载药组份制备成植入型组织工程支架,也可稳定分散在水溶液中作为注射针剂使用,因此具有更为广阔的应用前景.

针对临床应用中载药体系功能化和小尺度化的需求,本文提出了利用多级自组装的方法制备微观尺度双重载药体系的新设想.在研究中,采用表面带正电荷的壳聚糖(CS)微球和表面带负电荷的聚(L-谷氨酸)-*b*-聚氧化丙烯-*b*-聚(L-谷氨酸)(PLGA-*b*-PPO-*b*-PLGA,GPG)胶束,通过多级自组装形成聚集体.对形成稳定 CS/GPG 聚集体水溶液体系的条件、粒径分布和表面电位进行了表征.在此基础上,将 CS 微球作为亲水性药物阿司匹林(Asp)的载体,GPG 胶束作为疏水性药物阿霉素(DOX)的载体,通过多级自组装制备出一种新型双重载药体系,并对该载药体系的体外释放行为进行了研究.

1 实验部分

1.1 原料

壳聚糖(CS),脱乙酰度 $\geq 90\%$,国药集团化学试剂有限公司;阿司匹林(Asp),生化试剂,华阴锦前程制药有限公司;盐酸阿霉素(DOX-HCl),生化试剂,浙江海正药业公司.多聚磷酸钠,分析纯,国药集团化学试剂有限公司;四氢呋

^{*} 2011-01-28 收稿,2011-03-25 修稿;国家自然科学基金(基金号 50925308)资助项目;^{**} 通讯联系人,E-mail:jplnlab@online.sh.cn
doi:10.3724/SP.J.1105.2011.11025

喃(THF)和环己烷,分析纯,国药集团化学试剂有限公司,使用前以金属钠回流除去痕量水;苯甲醇、浓盐酸、氢氧化钾、二甲基甲酰胺(DMF)、二甲基亚砜(DMSO)、三乙胺、碳酸氢钠均为分析纯,上海菲达工贸有限公司;双端氨基聚氧化丙烯($\text{NH}_2\text{-PPO-NH}_2$, $M_n = 4000$), Sigma 公司;三光气,纯度为 0.99,海宁中联化学。

1.2 样品制备

1.2.1 PLGA-*b*-PPO-*b*-PLGA 三嵌段共聚物的合成

以 $\text{NH}_2\text{-PPO-NH}_2$ 为大分子引发剂,采用负离子开环反应,合成了聚(L-谷氨酸- γ -苯甲酯)-*b*-聚氧化丙烯-*b*-聚(L-谷氨酸- γ -苯甲酯)(PBLG-*b*-PPO-*b*-PBLG)三嵌段共聚物^[32,33]。通过在 THF 中碱解脱除 PBLG 上的苯甲基,制备了 PLGA-*b*-PPO-*b*-PLGA 三嵌段共聚物。核磁共振($^1\text{H-NMR}$, Bruker Avance 500)测试表明嵌段共聚物中 PBLG 的聚合度为 27,共聚物的分子量为 10900。凝胶渗透色谱(GPC, Waters 1515)测得其分子量分布(PDI)为 1.13。

1.2.2 壳聚糖微球(CS-MPs)的制备

空白 CS 微球溶液的制备是将 40 mg CS 溶解在 15 mL 2 wt% 的醋酸水溶液中待用;将 10 mg 多聚磷酸钠溶解在 5 mL 去离子水中待用;将 CS 溶液置于 3000 r/min 下磁力搅拌,并将多聚磷酸钠水溶液逐滴滴加入 CS 溶液中,滴加完后搅拌 4 h 使 CS 微球固化。最终溶液置于透析袋中透析 1 天,除去过量的多聚磷酸钠。

载阿司匹林壳聚糖微球(Asp-CS)的制备是将 40 mg 的 CS 溶解在 15 mL 2 wt% 的醋酸水溶液中待用;将 10 mg 多聚磷酸钠和 20 mg Asp 溶解在 5 mL 去离子水中待用;将 CS 溶液置于 3000 r/min 下磁力搅拌,并将多聚磷酸钠/Asp 水溶液逐滴滴加入 CS 溶液中,滴加完后搅拌 4 h 使载 Asp 的 CS 微球固化。最终溶液置于透析袋中透析 1 天,除去游离的多聚磷酸钠及 Asp。

1.2.3 GPG 胶束的制备

空白 GPG 胶束溶液按以下方法制备是将 6 mg 的 GPG 三嵌段共聚物溶解在 10 mL DMF/DMSO 混合溶剂中(DMF/DMSO 体积比为 4/1)。然后将该溶液置于透析袋中透析 3 天,即得到空白 GPG 胶束溶液。

载阿霉素胶束(DOX-GPG)的制备是将 3 mg 的 DOX-HCl 和 6 mg 的 GPG 三嵌段共聚物溶解

在 10 mL DMF/DMSO 混合溶剂中(DMF/DMSO 体积比为 4/1)。然后再在溶液中加入 0.05 mL 三乙胺来中和 DOX 所带的盐酸。将该溶液在室温下搅拌一夜后置于透析袋中透析 3 天,即得到载 DOX 的 GPG 胶束溶液。

1.2.4 聚电解质微球的静电自组装

在磁力搅拌下,向 GPG 胶束溶液中缓慢滴加 CS 微球溶液。两种微球的浓度均为 0.5 mg/mL。最终溶液的 CS/GPG 比例分别为 0/10, 0.25/10, 0.5/10, 0.75/10, 1/10, 1.25/10, 1.5/10, 1.75/10, 2/10 和 10/0。

双重载药复合体系的制备是将预先制备好的 Asp-CS 溶液缓慢滴加到 DOX-GPG 胶束溶液中,并同时磁力搅拌使其混合均匀。溶液中聚合物微球载体的浓度均为 0.5 mg/mL,最终溶液中 CS/GPG 为 1.5/10。所得溶液直接用于体外药物释放实验。

1.3 性能测试

1.3.1 粒径分析

通过激光光散射仪(ALV, CGS-5022F)对空白 GPG 胶束溶液, CS 微球溶液以及 CS/GPG (CS/GPG 为 1.5/10)复合体系及其相应的载药体系的粒径分布进行表征。

1.3.2 表面电位表征

将 CS/GPG 配比分别为 0/10, 0.5/10, 1.0/10, 1.5/10, 1.75/10 和 10/0 的共混溶液用去离子水稀释 1 倍,使样品溶液的聚合物浓度均为 0.25 mg/mL,采用多普勒显微电泳仪(Malvern, zetasizer 3000HS)测定各载体颗粒的表面电位。

1.3.3 形貌表征

采用扫描电镜(HITACHI, S-4800)观察 DOX-GPG 胶束, Asp-CS 微球以及 Asp-CS/DOX-GPG 复合载体的形貌。将样品溶液滴加到铜网上并在室温下干燥,样品喷金后进行观察。

1.3.4 载药量和包封率的测定

Asp-CS 载药量的测定是取 2 mL Asp-CS 微球溶液,加入 8 mL 0.1 mol/L 的 HCl,并超声震荡 30 min 以破坏 CS 微球。溶液放置 24 h,使药物完全溶出后,离心取上层清液。用紫外分光光度计(SHIMADZU, UV-2550)测定 Asp 在 296 nm 处的吸收值,根据相应的标准曲线计算出 Asp 的浓度,得到 CS 微球的载药量为 15.7%,包封率为 31.8%。

DOX-GPG 载药量的测定是取 2 mL DOX-

GPG 胶束溶液,加入 8 mL 的 DMF,并超声震荡 30 min 以破坏胶束,释放出药物.用紫外分光光度仪测定 DOX 在 485 nm 处的吸收值,根据相应的标准曲线计算出 DOX 的浓度,得到 GPG 胶束的载药量 18.4%,包封率为 45.1%.

载药量和包封率的计算公式如下:

载药量(%) =
$$\frac{\text{载入药物的质量}}{\text{载入药物的质量} + \text{载体质量}} \times 100\% \quad (1)$$

包封率(%) =
$$\frac{\text{载入药物的质量}}{\text{投入药物的质量}} \times 100\% \quad (2)$$

1.4 体外药物释放实验

分别将 3 mL Asp-CS 微球溶液,DOX-GPG 胶束溶液和 Asp-CS/DOX-GPG 双重载药复合体系溶液置于透析袋中,放入 10 mL 不同 pH 值的缓冲溶液中.将样品置于恒温 37℃,转速为 90 r/min 的摇床内进行体外药物释放实验.定时将缓冲溶液取出,测定药物的释放量,并补充相同体积新的缓冲溶液.用紫外分光光度计测定 Asp 在 296 nm 及 DOX 在 485 nm 处的吸收值,与标准曲线进行比较,计算出缓冲液中的药物浓度,进而计算出药物的释放量.

2 结果与讨论

2.1 聚电解质微球静电自组装行为的研究

CS 是典型的阳离子型聚合物,含有大量的氨基基团,其固化交联形成的微球会在表面带上正电荷;而 GPG 嵌段共聚物胶束,其壳结构是由带羧基的 PLGA 链段构成的,因此胶束的表面带有负电荷.将这两种溶液共混,CS 微球和 GPG 胶束会因为静电作用相互吸附,从而自组装形成聚集体.在适当 CS/GPG 配比下,这两种微球静电自组装会形成稳定的微观尺度聚集体的水溶液;如果选择的 CS/GPG 配比不恰当,形成的聚集体尺寸过大,或聚集体表面电荷的绝对值过小,则体系不稳定,聚集体会发生沉淀.图 1 所示的是 CS/GPG 混合溶液的照片,其中 CS/GPG 配比从左至右分别为 0/10、0.25/10、0.5/10、0.75/10、1.0/10、

1.25/10、1.5/10、1.75/10、2/10 和 10/0.由图 1 可以看出,随着 CS 溶液的滴加,体系由原来的透明状态逐渐产生蓝光进而变得浑浊直至沉淀.这说明 CS 微球颗粒与 GPG 胶束会通过静电自组装形成微观尺度聚集体而使体系产生蓝光,而 CS 微球含量的进一步增加使聚集体尺度增大因而变得浑浊甚至产生沉淀.图 1 中各样品的 CS/GPG 配比及样品状态列于表 1.当 CS/GPG 配比小于等于 1.5/10 时,CS/GPG 聚集体水溶液体系长期处于稳定状态.

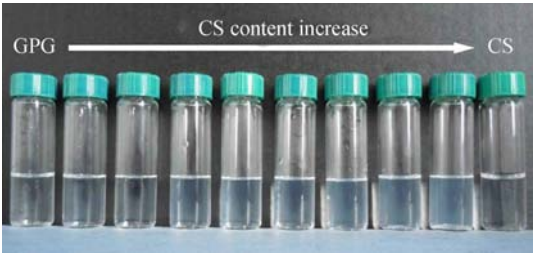


Fig. 1 Photographs of CS/GPG mixture
From left to right, the ratios of CS/GPG are 0/10, 0.25/10, 0.5/10, 0.75/10, 1.0/10, 1.25/10, 1.5/10, 1.75/10, 2/10 and 10/0, respectively

采用动态激光光散射对 GPG 胶束,CS 微球和 CS/GPG 聚集体的颗粒大小和分布做了进一步的表征,其结果如图 2 所示.图中 R_h 表示颗粒的平均流体力学半径.图 2(a)是 GPG 胶束溶液的激光光散射粒径分布图,GPG 胶束的 R_h 在 59 nm 左右,且分布较窄(分散指数 $PDI=0.10$);而通过溶液交联法制备的 CS 微球的 R_h 约为 177 nm,粒径分布则较宽($PDI=0.25$),如图 2(b)所示.图 2(c)是 CS/GPG 聚集体($CS/GPG=1.5/10$)的粒径分布图,聚集体的粒径分布很宽($PDI=0.50$),颗粒尺寸主要集中于 50 nm 到 4 μm 之间,体系的 R_h 约为 364 nm.造成 CS/GPG 聚集体粒径分布很宽的原因主要有以下几个方面:(1)在 CS/GPG 聚集体溶液体系中,各聚集体中 CS 与 GPG 的聚集程度不同,造成 CS/GPG 体系整体粒径呈现宽分布的特征;(2)CS/GPG 聚集体中 CS 微球组分本身的分布较宽,使得其与 GPG 复合形成的

Table 1 Sample state of CS/GPG mixture with CS/GPG ratios respectively at 0/10, 0.25/10, 0.5/10, 0.75/10, 1.0/10, 1.25/10, 1.5/10, 1.75/10, 2/10 and 10/0

Sample	GPG	CS/GPG 0.25/10	CS/GPG 0.5/10	CS/GPG 0.75/10	CS/GPG 1/10	CS/GPG 1.25/10	CS/GPG 1.5/10	CS/GPG 1.75/10	CS/GPG 2/10	CS
State	TS ^a	TS ^a	TS ^a	BA ^b	BA ^b	BA ^b	BA ^b	CL ^c	PR ^d	TS ^a

^a TS: transparent solution; ^b BA: blue appearance; ^c CL: cloudy solution; ^d PR: precipitation

聚集体分布变宽;(3)体系中有游离的 GPG 胶束存在,使得聚集体的分布变宽.

为了进一步研究 CS 微球和 GPG 胶束静电自组装形成的复合体系的结构,采用多普勒显微电泳仪对不同 CS/GPG 配比下形成的复合体系的表面 zeta 电位进行了分析,其结果如图 3 所示. zeta 电位是连续相与附着在分散粒子上的流体稳定层之间的电势差,它可以反映颗粒表面所带电荷的情况. 纯 GPG 胶束的 zeta 电位在 -52 mV 左右,而纯 CS 微球的 zeta 电位在 22 mV 左右. 随着 CS

微球滴加到 GPG 胶束溶液中,共混体系中聚集体微球的 zeta 电位由 CS/GPG = $0.5/10$ 时的 -45 mV 逐渐转变为 CS/GPG = $1.75/10$ 时的 -17 mV. 这说明 CS 微球与 GPG 胶束可通过静电自组装形成 CS/GPG 复合体系,使得复合体系表面 zeta 电位的绝对值随 CS 含量的增加而减小. 此外,在静电自组装过程中,带负电荷的 GPG 胶束包裹带正电荷的 CS 微球,使得 CS/GPG 复合体系的表面电荷呈现负值.

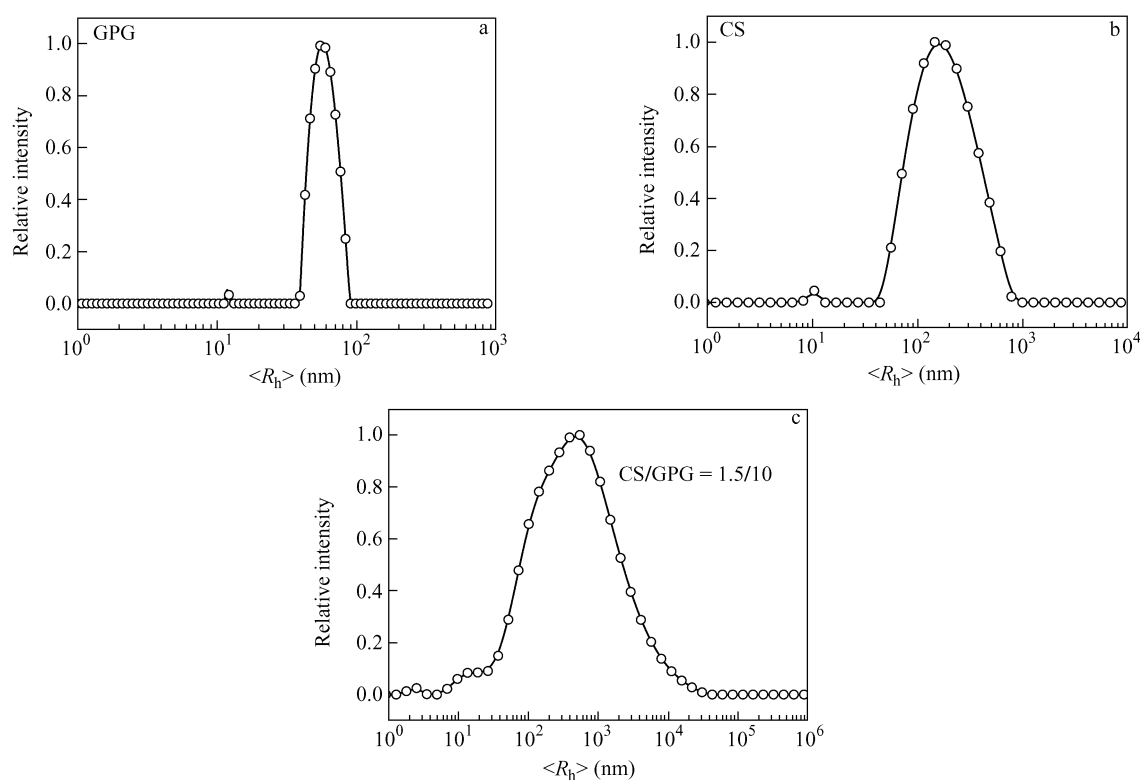


Fig. 2 $\langle R_h \rangle$ distributions of (a) GPG micelles, (b) CS nano-spheres and (c) CS/GPG conjugation (CS/GPG = $1.5/10$)

The observation angle was 90°

在通常情况下,同种电荷的聚电解质微球能够依靠静电排斥作用形成稳定的水溶液体系;而当在该体系中加入带异种电荷的聚电解质时,会中和聚电解质微球表面的电荷而使静电排斥作用减弱,当复合体系表面电荷的绝对值过小时(小于 17 mV),体系会发生沉淀^[34,35]. 在本研究中,当 CS/GPG 的配比大于 $1.5/10$ 时,CS 与 GPG 形成的聚集体表面电位的绝对值较小,从而使复合体系发生沉淀;而当 CS/GPG 的配比小于等于 $1.5/10$ 时,CS 微球的相对含量较小,此时 CS/GPG 聚集体表面电荷的绝对值较大(大于 24 mV),因此在该 CS/GPG 配比范围内,两者共混可以形成稳

定的复合体系.

2.2 药物载体的形貌表征

两亲性 GPG 嵌段共聚物可通过自组装作用包埋疏水性药物 DOX 形成载药胶束,而含水溶性药物 Asp 的 CS 溶液通过溶液交联反应可形成载药凝胶微球. 将这两种溶液按一定的比例共混,表面带正电荷的 Asp-CS 和表面带负电荷的 DOX-GPG 则会通过静电自组装形成 Asp-CS/DOX-GPG 双重载药复合体系. DOX-GPG 胶束、Asp-CS 微球和 Asp-CS/DOX-GPG 复合体系的形貌结构可通过 SEM 进行观察,其结果如图 4 所示. 图 4(a)显示的是 DOX-GPG 胶束的形貌照片. DOX-GPG 载

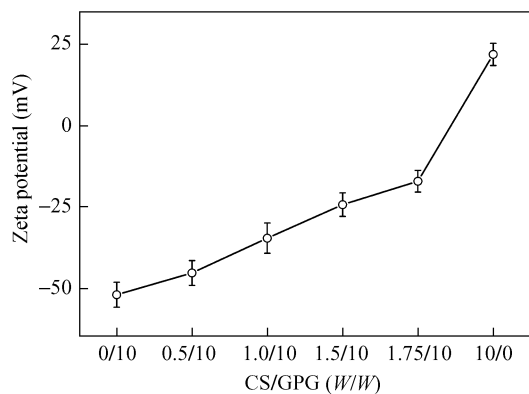


Fig. 3 Zeta potential of CS/GPG conjugations as a function of the ratio of CS/GPG

药胶束呈现规整的球状,其表面平滑,直径在 100 ~ 120 nm 左右.通过溶液交联反应制备的 Asp-CS 微球,大致呈现球状形貌,其表面较为粗糙,直径在 210 nm 左右,其形貌如图 4 (b) 所示.图 4 (c)

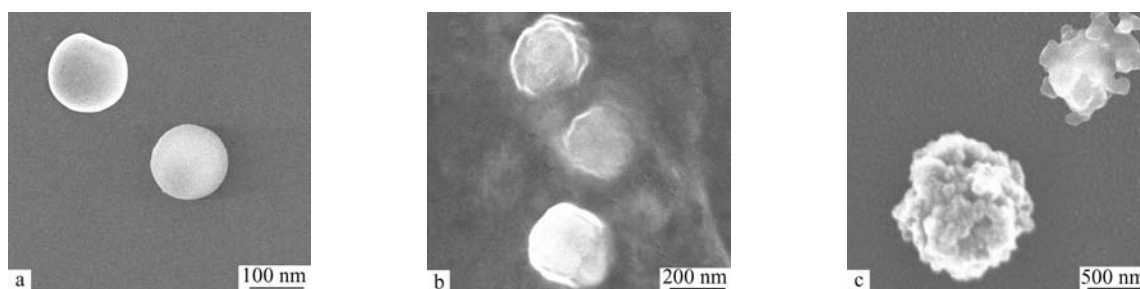


Fig. 4 SEM photographs of (a) DOX-loaded GPG micelles, (b) Asp-loaded CS nanoparticles and (c) Asp-CS/DOX-GPG dual-drug loaded conjugates

2.3 体外药物释放实验

首先,分别对单纯的 Asp-CS 和 DOX-GPG 载药体系的体外释药行为进行了测试.图 5 (a) 是 Asp-CS 微球的释药曲线. Asp 的释放行为具有 pH 值响应性,其速率随外界 pH 值的减小而增大.在 pH = 5.5 的条件下,Asp 在 24 h 内完全释放.这是因为阳离子型的 CS 在酸性条件下质子化,并通过静电排斥作用使得凝胶网络结构的孔隙增大,从而使得药物的释放通道变宽,释药速率随之增大^[36].图 5 (b) 是 DOX-GPG 胶束的释药曲线. DOX 的释放行为也具有 pH 响应性,其释放速率也随 pH 值的减小而增大(如图 5 (b)).这是因为随着 pH 值的变化,GPG 胶束中的 PLGA 链段构象会从碱性条件下的无规线团(random-coil)转变为酸性条件下刚性的 α -螺旋结构(α -helix),使得 PLGA 链段发生坍塌. PLGA 壳层的链段坍塌会对胶束内核产生一定的作用力,从而使得 PPO 内核

显示的是 Asp-CS/DOX-GPG 双重载药复合体系的 SEM 照片.如图所示,Asp-CS/DOX-GPG 双重载药复合体系是由颗粒聚集形成的,其形貌不如载药胶束和凝胶颗粒规整,尺度约为 1 μ m. Asp-CS/DOX-GPG 复合体系的表面粗糙,其表面附着粒子的直径在 100 nm 左右.同时,我们也通过激光光散射对 DOX-GPG 载药胶束、Asp-CS 微球以及 Asp-CS/DOX-GPG 双重载药复合体系的粒径分布进行了分析.结果显示,DOX-GPG 胶束、Asp-CS 微球和 Asp-CS/DOX-GPG 复合体系的 R_h 分别为 63、179 和 376 nm,载药体系的分散指数 PDI 分别为 0.12、0.28 和 0.52.与空白载体相比,各载药体系的平均流体力学半径略有增加,且分布情况与其对应的空白载体相似(见图 2).这些激光光散射的测试结果与扫描电镜观察到的载药体系的颗粒大小基本一致.

受挤压变形,载药胶束的粒径减小,DOX 得以快速从胶束中释放出来^[16,37,38].采用动态激光光散射对不同 pH 值下的 DOX-GPG 胶束的粒径变化进行分析,结果显示该载药体系的 R_h 从 pH = 8.2 时的 80 nm 左右降至 pH = 5.5 时的 48 nm 左右,从而证实了 PLGA 壳层链段在酸性条件下坍塌对胶束核产生挤压作用.并且,由于 PLGA 链段形成的 α -螺旋结构为刚性,壳层链段仍具有一定的空间伸展性(而不是“倒伏”在胶束核表面形成更致密的胶束壳层),从而使得胶束壳层的体积收缩对药物释放的阻碍作用不大.因此 DOX 的释放速率随 pH 值的减小而增大.另外,我们在前期的研究中发现 DOX 溶解度的 pH 依赖性对胶束释药行为的影响不大,在非 pH 敏感型胶束中,不同 pH 值下 DOX 的释放速率的变化很小^[15].这说明 DOX 释药行为的 pH 响应性主要是由 GPG 胶束的 pH 敏感性引起的.

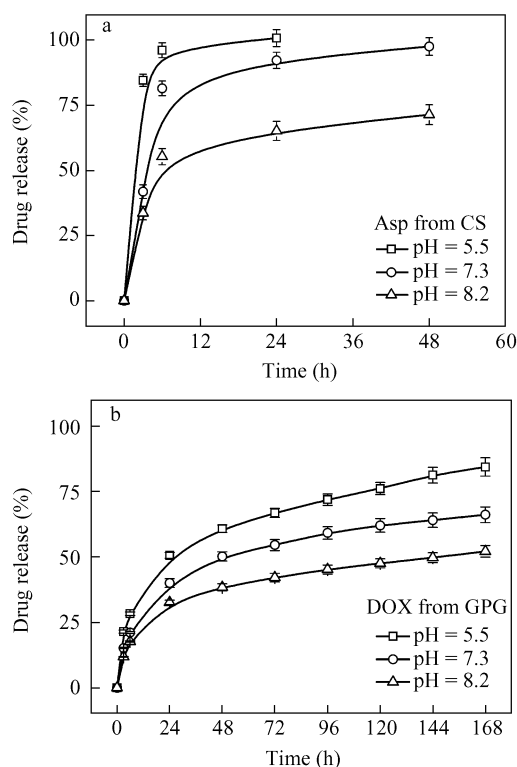


Fig. 5 Drug release profiles of (a) Asp from CS nano-spheres and (b) DOX from GPG micelles at 37°C with various pH values

基于以上研究,进一步考察了这两种载药微球通过静电自组装形成的 Asp-CS/DOX-GPG 双重载药体系的释药行为. 采用 CS/GPG = 1.5/10 的 CS/GPG 复合体系,使双重载药体系在形成稳定溶液的配比范围内具有最高的载药量,该 Asp-CS/DOX-GPG 双重载药体系的释药曲线如图 6 所示. 从图中可以看出,Asp(图 6(a))和 DOX(图 6(b))的释药行为都具有 pH 值响应性,两种药物的释放速率都随着 pH 值的降低而增大,这与其各自单载药体系的释药特性相一致(见图 5),说明药物载体通过静电自组装形成双重载药复合体系后,其各自的 pH 响应性仍然能被保留. 此外,复合体系中 Asp 的释放速率与 Asp-CS 体系相比明显减小(见图 5(a)). 这是由于原先结构较为松散的 CS 微球通过静电自组装作用被大量带负电荷的 GPG 胶束包裹,使得药物扩散的通道变窄,药物释放速率随之大大降低. 图 6(b)中,DOX 在释药初期的药物突释量略高于 DOX-GPG 载药体系,这可能是由于在制备 DOX-GPG/Asp-CS 复合体系的过程中,有极少部分的 DOX-GPG 胶束被破坏,部分 DOX 预先扩散到了溶液体系中,使

得复合体系中 DOX 的突释更为明显. 由于扩散到溶液体系中的 DOX 的量很小,对 DOX-GPG/Asp-CS 载药体系的释药行为影响不大,且双重药物载体的载药量很难精确测定,因此制得的复合体系没有经过透析直接用于体外释药实验. 相比较 Asp 而言,DOX 的释放速率虽与 GPG 载药胶束体系相比有所下降,但下降的趋势要小得多,这是由两方面原因造成的:(1) GPG 胶束载体通过两亲性嵌段共聚物自组装形成比较致密的核壳结构,使得药物扩散速率小,其本身具有较长的释药周期. 因此与 CS 微球静电复合后,释药周期延长不明显;(2) 在 Asp-CS/DOX-GPG 体系中,大量的 GPG 胶束聚集在 CS 微球的表面而不是被包裹,这使得大量的 GPG 载药胶束仍直接与外界接触,其释药行为与单独的 GPG 载药胶束相似.

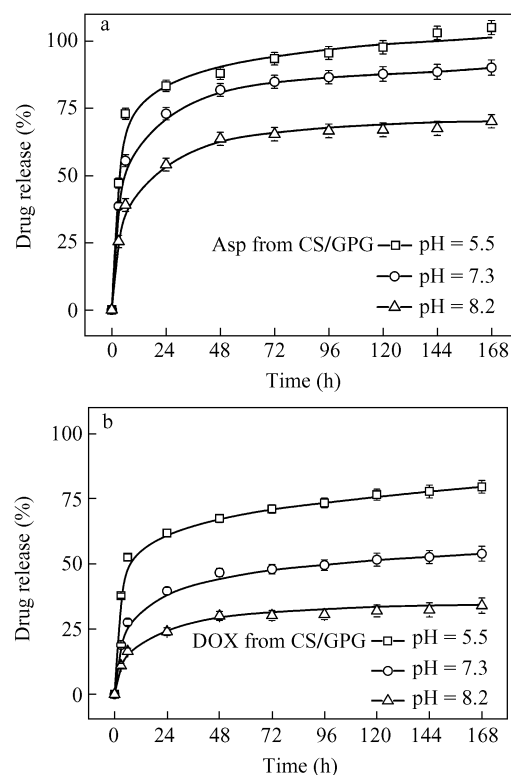


Fig. 6 Drug release profiles of (a) Asp and (b) DOX from CS/GPG dual-drug loaded system at 37°C with various pH values

CS 与 GPG 包埋药物并最终形成具有微观尺度的双重载药体系的过程实际上是聚合物通过多级自组装形成聚集体的过程. 其形成机理如图 7 所示,疏水性药物 DOX 首先通过初级自组装被包埋在表面带有负电荷的 GPG 纳米胶束内,而亲水性药物 Asp 则通过溶液交联反应被包埋在表面带

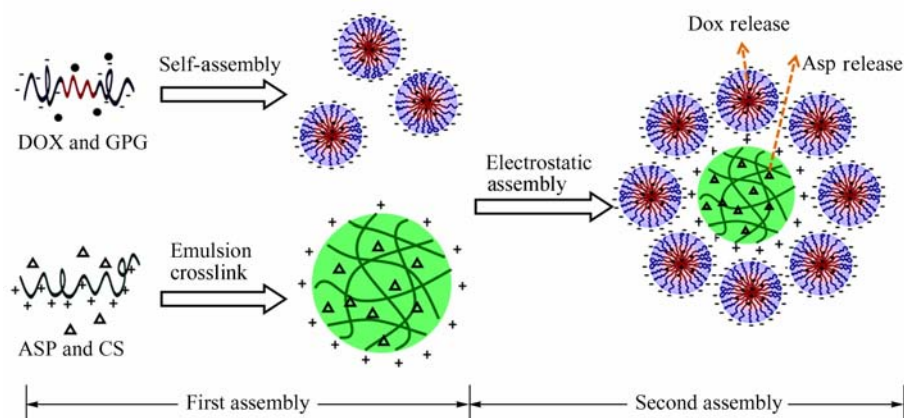


Fig. 7 Schematic representation of the multi-step self-assembly process for the Asp-CS/DOX-GPG dual-drug loaded system

有正电荷的 CS 微球中. 将这两种表面带有异种电荷的载药微球按一定的配比共混, 通过静电自组装使其形成具有多级结构的双重载药体系.

本研究中, 提出了通过 GPG 与 CS 的多级自组制备具有微观尺度的 Asp-CS/DOX-GPG 双重载药体系的新方法. 与传统药物载体相比, 它具有以下几点优势: (1) 与单一载药的微球载药体系相比, 双重载药体系可用于多种药物的协同治疗. 该载药体系可分别控制多种药物的释放行为, 使这些药物在不同时间段内达到各自适宜的释放量, 提高治疗效果, 从而克服载药体系单一给药的不足; (2) 与目前宏观尺度的双重载药体系相比, 微观尺度的载药体系具有更广阔的应用前景; (3) 体系内两种药物的环境响应性释放行为都被很好地保留, 为实现药物的智能给药和靶向给药提供可能. 该载药体系有望在可控协同给药等治疗领域中有很好的应用前景.

3 结论

通过静电自组装, 使表面带正电荷的 CS 微球和表面带负电荷的 GPG 胶束共混形成 CS/GPG

复合体系. 研究了 CS 微球和 GPG 胶束形成稳定 CS/GPG 聚集体溶液体系的配比范围. 结果显示, 当 CS/GPG 配比小于等于 1.5/10 时, 可形成稳定的溶液体系. 通过激光光散射和 Zeta 电位表征发现, 纳米尺度的 GPG 胶束和 CS 微球通过静电自组装可形成具有较宽分布的微观复合体系且其表面电位呈现负值, 这说明 GPG 胶束包裹 CS 微球形成表面带负电荷的复合体系. 该过程是聚合物 CS 和 GPG 通过多级自组装形成聚集体的过程. 将包埋亲水性药物 Asp 的 CS 微球和疏水性药物 DOX 的 GPG 胶束混合并通过静电自组装可以制备一种新型双重载药体系. 在该 Asp-CS/DOX-GPG 复合体系中, Asp 和 DOX 的体外释药速率具有明显的 pH 值响应性. 与单一的 Asp-CS 载药微球体系相比, 复合体系中 Asp 的释药周期大大延长, 这是因为带负电荷的 GPG 胶束在 CS 凝胶微球表面聚集, 使得 CS 载药微球的释药通道变窄, 从而降低了 Asp 的释放速率. 这一新型双重载药复合体系可望为多重载药体系的研究带来新的思路, 并在协同给药的治疗领域中得到很好的应用.

REFERENCES

- 1 Moddarese M, Brown M B, Zhao Y, Tamburic S, Jones S A. *Int J Pharm*, 2010, 400: 176 ~ 182
- 2 Tao Y, Liu R, Liu X, Chen M, Yang C, Ni Z. *Nanoscale Res Lett*, 2009, 4: 341 ~ 343
- 3 Yu Q, Chen H, Zhang Y, Yuan L, Zhao T, Li X, Wang H. *Langmuir*, 2010, 26: 17812 ~ 17815
- 4 Liu C, Zhao G, Liu J, Ma N, Chivukula P, Perelman L, Okada K, Chen Z, Gough D, Yu L. *J Control Release*, 2009, 140: 277 ~ 283
- 5 Hui T, Chen D, Jiang M. *Macromolecule*, 2005, 38: 5834 ~ 5837
- 6 Feng Z, Wang Z, Gao C, Shen J. *Adv Mater*, 2007, 19: 3687 ~ 3691
- 7 Song Y, Sun Y, Zhang X, Zhou J, Zhang L. *Biomacromolecules*, 2008, 9: 2259 ~ 2264
- 8 Zhang G, Niu A, Peng S, Jiang M, Tu Y, Li M, Wu C. *Acc Chem Res*, 2001, 34: 249 ~ 256
- 9 Rong Jianhua(容建华), Duan Taiwei(段泰炜), Wen Hongge(温鸿戈), Qu Xiaozhong(屈小中). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2010, (4): 484 ~ 489
- 10 Prabakaran M, Grailer J J, Pilla S, Steeber D A, Gong S. *Biomaterials*, 2009, 30: 5757 ~ 5766
- 11 Chen S, Li Y, Guo C, Wang J, Ma J, Liang X, Yang L R, Liu H Z. *Langmuir*, 2007, 23: 12669 ~ 12676
- 12 Rösler A, Vandermeulen G W M, Klok H A. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 53: 95 ~ 108
- 13 Wang H, An Y, Huang N, Ma R, Li J, Shi L. *Macromol Rap Commun*, 2008, 29: 1410 ~ 1414
- 14 Wei H, Zhang X Z, Cheng S X, Zhuo R X. *J Control Release*, 2006, 116: 266 ~ 274
- 15 Li G, Shi L, Ma R, An Y, Huang N. *Angew Chem*, 2006, 118: 5081 ~ 5084
- 16 Lin J, Zhu J, Chen T, Lin S, Cai C, Zhang L, Zhuang Y, Wang X S. *Biomaterials*, 2009, 30: 108 ~ 117
- 17 Wei H, Zhang X Z, Cheng C, Cheng S X, Zhuo R X. *Biomaterials* 2007, 28: 99 ~ 107
- 18 Qiu Y, Park K. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 53: 321 ~ 339
- 19 Vinogradov S V, Bronich T K, Kabanov A V. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, 54: 135 ~ 147
- 20 Zhang J, Qian Z, Gu Y. *Nanotechnology*, 2009, 20: 325102
- 21 Xun W, Wu D Q, Li Z Y, Wang H Y, Huang F W, Cheng S X, Zhang X Z, Zhou R X. *Macromol Biosci*, 2009, 9: 1219 ~ 1226
- 22 Umadevi S K, Thiruganesh R, Suresh S, Reddy K B. *Biopharm Drug Dispos*, 2010, 31: 407 ~ 427
- 23 Liu H, Chen B, Mao Z, Gao C. *J Appl Polym Sci*, 2007, 106: 4248 ~ 4256
- 24 Agnihotri S A, Mallikarjuna N N, Aminabhavi T M. *J Control Release*, 2004, 100: 5 ~ 28
- 25 Felt O, Buri P, Gurny R. *Drug Devel Ind Pharm*, 1998, 24: 979 ~ 993
- 26 Shi Xiaowen(施晓文), Li Xiaoxia(李晓霞), Du Yuming(杜予民). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2011, (1): 1 ~ 11
- 27 Yang Xiaomin(杨小敏), Chen Xiliang(陈西良), Ma Mingwang(马明旺), Yang Kang(杨康), Liu Dan(刘丹), Zhu Zhiyong(朱智勇). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2009, (12): 1198 ~ 1204
- 28 Yang S J, Chang S M, Tsai K C, Chen W S, Lin F H, Shieh M J. *J Gene Med*, 2010, 12: 168 ~ 179
- 29 Peng X, Zhang L. *Langmuir*, 2005, 21: 1091 ~ 1095
- 30 Xia W, Chang J, Lin J, Zhu J. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008, 69: 546 ~ 552
- 31 Manna U, Patil S. *Langmuir*, 2009, 25: 10515 ~ 10522
- 32 Cai C, Zhang L, Lin J, Wang L. *J Phys Chem B*, 2008, 112: 12666 ~ 12673
- 33 Wei L, Cai C, Lin J, Chen T. *Biomaterials*, 2009, 30: 2606 ~ 2613
- 34 Freitas C, Müller RH. *Int J Pharm*, 1998, 168: 221 ~ 229
- 35 Riddick T M. *Zeta Meter Manual*. New York: Minuteman Press, 1968. 320 ~ 331
- 36 Kaminski K, Zazakowny K, Szczubialka K, Nowakowska M. *Biomacromolecules*, 2008, 9: 3127 ~ 3132
- 37 Chècot F, Brûlet A, Oberdisse J, Gnanou Y, Mondain-Monval O, Lecommandoux S. *Langmuir*, 2005, 21: 4308 ~ 4315
- 38 Chung JE, Yokoyama M, Okano T. *J Controlled Release*, 2000, 65: 93 ~ 103

DUAL DRUG DELIVERY SYSTEM FROM MULTI-STEP SELF-ASSEMBLED POLYELECTROLYTE NANOPARTICLES

WEI Lan, CAI Chunhua, LIN Jiaping

(Shanghai Key Laboratory of Advanced Polymeric Materials, School of Materials Science and Engineering,
East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

Abstract Self-assembly of chitosan (CS) particles and poly(L-glutamic acid)-*b*-poly(propylene oxide)-*b*-poly(L-glutamic acid) (GPG) triblock copolymer micelles was investigated. The CS particles are cationic hydrogels, while the GPG micelles have anionic poly(L-glutamic acid) shells. Therefore, the two kinds of polyelectrolyte particles can electrostatic self-assemble into microscopic CS/GPG conjugates. The CS/GPG ratio range for the CS particles and GPG micelles to electrostatic self-assemble into a sustained CS/GPG conjugates solution was established. The CS/GPG conjugates were prepared by dropping CS particle solution into GPG micelle solution under stirring, with the CS/GPG ratio of 0.25/10, 0.5/10, 0.75/10, 1.0/10, 1.25/10, 1.5/10, 1.75/10 and 2/10. The CS/GPG conjugates are stable in water when the CS/GPG ratio is equal or less than 1.5/10. The particle size distribution of GPG micelles, CS particles, and CS/GPG conjugates were determined by the dynamic light scattering. GPG micelles show a narrow distribution with the average R_h of 59 nm, while the CS particles and CS/GPG conjugates show much broaden distributions with the R_h of 177 nm and 364 nm respectively. Zeta potential tests show that the GPG micelles exhibit surface negative charge of -52 mV and the CS particles exhibit surface positive charge of 22 mV. The surface charge of CS/GPG conjugates are negative and the average absolute value of the surface charge decreases with increasing CS amount. In vitro drug release behaviors of the Aspirin (Asp)-loaded CS particles, Doxorubicin (DOX)-loaded GPG micelles, and the Asp-CS/DOX-GPG conjugates (CS/GPG = 1.5/10) were studied as a function of pH value. Both Asp and DOX show pH sensitive release behaviors in all the three drug-loaded systems. Moreover, the release rate of Asp shows a dramatic decrease in the Asp-CS/DOX-GPG system, as compared with the Asp-CS nanoparticles.

Keywords Chitosan, Micelles, Electrostatic self-assembly, Multi-step self-assembly, Dual-drug delivery