

PNIPAM-*b*-聚碳酸酯温敏胶束的制备及 用作药物控制释放载体的研究*

郑晓明 蒋 涛 贺 枫**

(生物医用高分子材料教育部重点实验室 武汉大学化学与分子科学学院 武汉 430072)

摘 要 以多孔硅球固定化猪胰脂肪酶(IPPL)为催化剂,温敏性 HO-PNIPAM 为大分子引发剂,5-甲基-5-烯丙氧羰基-三亚甲基碳酸酯(MAC)和 5,5-二甲基三亚甲基碳酸酯(DTC)为共聚单体,通过开环聚合合成了不同结构比例的两亲性嵌段型共聚物 P(MAC-*co*-DTC)-*b*-PNIPAM. 该嵌段型共聚物在水中可自组装形成稳定的胶束,其 CMC 值为 20 ~ 60 mg/L,干态粒径 20 ~ 70 nm,LCST 值为 38 ~ 43℃,细胞毒性实验显示其具有良好的生物相容性. 以疏水性药物醋酸泼尼松为模型药物,研究了嵌段型共聚物胶束对药物的负载及释放行为,结果表明载药胶束具有良好的温敏性药物释放性能.

关键词 嵌段型两亲性温敏胶束, PNIPAM, 生物可降解聚碳酸酯, 酶促聚合, 药物控制释放, 毒性

两亲性共聚物胶束是由亲-疏水链段在水溶液中形成的具有疏水性内核和溶剂化亲水外壳结构的有序聚合体^[1],粒径小且分布窄,作为药物载体时,纳米级的粒径以及外壳的亲水性,使其不易被网状内皮系统吞噬,并且在靶向位置表现出良好的渗透能力^[2]. 根据结构类型,两亲性共聚物胶束主要包括嵌段型、接枝型和星型等^[2],嵌段型共聚物胶束是其中研究最为广泛和深入的一类.

环境响应性胶束是对某些信号能够进行自反馈响应而调节其物理化学性质的一类新型胶束,作为药物控制释放载体时能根据环境条件的变化来控制其药物释放行为. 聚 *N*-异丙基丙烯酰胺(PNIPAM)具有最低临界溶解温度(LCST),在共聚物结构中常用作亲水链段以形成具有温敏性的环境响应性胶束^[3].

生物可降解聚碳酸酯是一类重要的生物可降解高分子材料,具有良好的生物相容性和机械加工性能,已被用作可吸收手术缝合线、骨固定材料、药物控制释放载体等^[4]. 功能化、共聚及共混是生物可降解聚碳酸酯常见的改性方法. 酶促聚合是近年来发展起来并得到广泛关注的一种新的聚合方法,具有反应条件温和和高效等优点,在生物医用高分子材料的合成中,还可有效避免金属

有机催化剂残留可能引起的毒性^[5]. 我们在以往的研究中已经利用酶促聚合的方法,合成了一系列不同结构的生物可降解聚碳酸酯及其共聚物材料,并用作药物和基因运载的载体^[6-8].

本文在前期工作基础上,采用多孔硅球固定化猪胰脂肪酶(immobilized porcine pancreas lipase on silica particles, IPPL)为催化剂,温敏性 HO-PNIPAM 为大分子引发剂,5-甲基-5-烯丙氧羰基-三亚甲基碳酸酯(MAC)和 5,5-二甲基三亚甲基碳酸酯(DTC)为共聚单体,通过酶促开环聚合,合成了不同结构比例的两亲性嵌段型共聚物 P(MAC-*co*-DTC)-*b*-PNIPAM;研究了 P(MAC-*co*-DTC)-*b*-PNIPAM 在水中的自组装行为以及对药物的负载和释放性能.

1 实验部分

1.1 试剂及纯化

猪胰脂肪酶(PPL)购于美国 Sigma 公司,活力为 198.90 U/mg 蛋白(pH = 6.0, 橄榄油为底物),使用文献[9]的方法制备了多孔硅球固定化猪胰脂肪酶(immobilized porcine pancreas lipase on silica particles, IPPL). *N*-异丙基丙烯酰胺(NIPAAm)购于 Acros 公司,直接使用. 巯基乙醇(HSCH₂CH₂OH)购于上海国药集团,减压蒸馏后

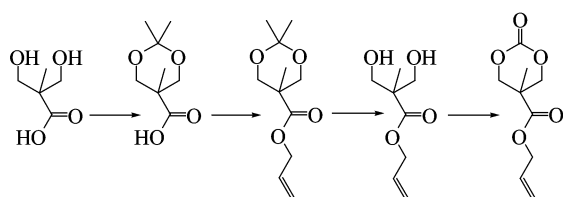
* 庆祝卓仁禧院士 80 华诞专稿;2011-04-18 收稿,2011-05-04 修稿;国家自然科学基金(基金号 50773058,21074098)资助项目; ** 通讯联系人, E-mail: hefeng@whu.edu.cn
doi:10.3724/SP.J.1105.2011.11120

使用. 过氧化二苯甲酰(BPO)购于上海化学试剂厂,使用前用95%乙醇重结晶3次. 其它试剂均为分析纯,使用前蒸馏纯化. 透析袋的截留分子量为8000~12000 Da. Hela 细胞购于武汉大学保藏中心,采用含有10%胎牛血清(FBS)以及1%抗生素(青霉素-链霉素10000 U/mL)的DMEM培养基(3-Dulbecco's Modified Eagle's Medium),在37℃下CO₂(5%)培养箱中培养. 噻唑蓝 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide, Amresco)用磷酸盐缓冲溶液(PBS, 0.1 mol/L, pH 7.4)配制成浓度为5 mg/mL的溶液.

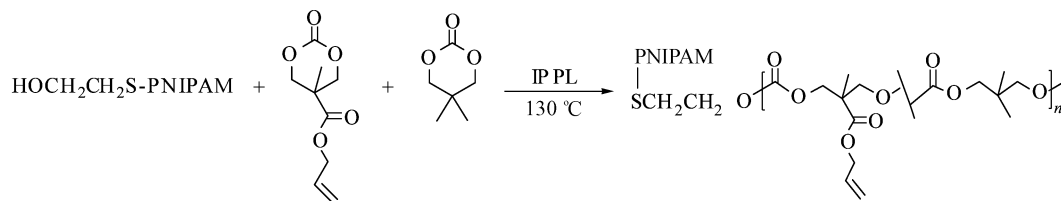
1.2 P(MAC-co-DTC)-*b*-PNIPAM 的合成

1.2.1 5-甲基-5-烯丙氧羰基-三亚甲基碳酸酯(MAC)的合成

如示意图1所示,5-甲基-5-烯丙氧羰基-三亚甲基碳酸酯(MAC)参考文献[10]合成.



Scheme 1 Synthesis of MAC



Scheme 3 Synthesis of P(MAC-co-DTC)-*b*-PNIPAM

1.3 聚合物的表征

采用 Mercury VX-300 型核磁共振仪(NMR)对共聚物的结构进行了表征,溶剂采用氘代氯仿(CDCl₃)或重水(D₂O). 聚合物的分子量及其分布由凝胶渗透色谱-多角度激光光散射联用分析(GPC-MALLS)测得, GPC 采用 Waters 2690 型凝胶渗透色谱仪, DMF 为淋洗液, 测试温度 30℃, 流速 0.3 mL/min; 双检测器包括多角度激光光散射信号检测器(DAWN EOS, Wyatt Technology, 激光波长 690 nm)以及示差折光检测器(Optilab DSP, Wyatt Technology).

1.4 共聚物胶束的形成

P(MAC-co-DTC)-*b*-PNIPAM 共聚物胶束通过

1.2.2 5,5-二甲基三亚甲基碳酸酯(DTC)的合成

5,5-二甲基三亚甲基碳酸酯(DTC)的合成参考文献[11].

1.2.3 HO-PNIPAM 的合成

以 HSCH₂CH₂OH 作为链转移剂, BPO 为引发剂, 通过自由基聚合合成了链端带有羟基的大分子引发剂 HO-PNIPAM^[12], 合成路线如示意图2所示. 将一定量的 NIPAAm、HSCH₂CH₂OH 及 BPO 溶于 50 mL 四氢呋喃中, 氮气保护下 70℃ 反应 7 h, 所得聚合物在乙醚中沉淀 3 次, 真空干燥至恒重.



Scheme 2 Synthesis of HO-PNIPAM

1.2.4 P(MAC-co-DTC)-*b*-PNIPAM 的合成

如示意图3所示, 以 IPPL 为催化剂, HO-PNIPAM 为大分子引发剂, 两种六元环状碳酸酯 MAC 和 DTC 为共聚单体, 合成了新型的嵌段型两亲性共聚物 P(MAC-co-DTC)-*b*-PNIPAM. 将一定量的 MAC、DTC、HO-PNIPAM 及 IPPL 置于聚合管中, 真空下封管, 130℃ 下反应 5 h, 反应产物溶于二氯甲烷, 过滤除去固定化酶, 滤液浓缩后再溶于少量四氢呋喃, 透析冻干, 产率 50%.

室温下透析的方法制得. 将 10 mg 共聚物溶于 3 mL 四氢呋喃, 置于透析袋中, 在 800 mL 蒸馏水中透析 48 h, 每 4 h 换一次蒸馏水.

以芘作疏水荧光探针^[2], 用 LS55 型荧光分光光度计(Perkin Elmer-2)测定了共聚物的临界胶束浓度(critical micelle concentration, CMC). 将等量的芘的丙酮溶液(6 × 10⁻⁷ mol/L)加入到一系列不同浓度的聚合物水溶液(0.0001~1 mg/mL)中, 室温下放置 24 h. 激发光谱的发射波长为 393 nm, 激发带宽和发射带宽分别为 5 nm 和 10 nm. 以 339 nm 处的荧光强度对共聚物浓度的对数值作图, CMC 值被定义为荧光强度发生突变时所对应的聚合物浓度.

1.5 共聚物胶束形态及尺寸的表征

用 JEOL JEM-100CX II 型透射电子显微镜 (transmission electron microscopy, TEM) 观察了 P(MAC-*co*-DTC)-*b*-PNIPAM 共聚物胶束的形态. 将铺有碳膜的铜网蘸取少量共聚物胶束, 并用 2 g/L 的磷钨酸染色. 加速电压为 100 kV.

共聚物胶束的粒径大小与分布由 Nano-ZS ZEN 3600 型光散射粒径分析仪测量, 胶束溶液浓度为 0.2 mg/mL, 每个样品测定 3 次后取平均值.

1.6 共聚物胶束相转变行为的测定

共聚物胶束的最低临界溶解温度 (LCST) 采用紫外可见分光光度计 (Lambda Bio 40, Perkin-Elmer) 测定. 配制 0.2 mg/mL 的 P(MAC-*co*-DTC)-*b*-PNIPAM 的水溶液, 在不同温度 (28 ~ 45℃) 下测定其在 500 nm 处的吸光度. 每次测量前恒温 10 min, LCST 被定义为聚合物水溶液透过率为 50% 时所对应的温度值^[13]. HO-PNIPAM 的 LCST 值采用同样的方法测定.

1.7 共聚物细胞毒性的测定

以每孔 6000 个的密度将 HeLa 细胞种植在含 10% FBS 的 DMEM 培养基中. 在 96 孔板的每个孔洞中加入 100 μL 培养基, 37℃ 下于 5% 的 CO₂ 培养箱中培养 24 h. 将 100 μL 含有不同共聚物浓度的 DMEM 培养基灭菌后加入到上述培养基介质中, 对照组加入 100 μL 的完全培养基, 继续培养 48 h. 再将 20 μL MTT 溶液加入到 HeLa 细胞中, 继续培养 4 h. 弃去含有聚合物的 DMEM, 将 200 μL DMSO 加入其中并在室温下振荡, 用酶标仪 (550 BIO-RAD, USA) 测定 570 nm 波长处的吸光强度. 细胞存活率按下述公式计算:

$$\text{Relative cell viability (\%)} = \frac{(A_{\text{sample}} - A_0) / (A_{\text{control}} - A_0)}{\times 100}$$

其中 A_0 是空白的吸光值, A_{control} 是没有加聚合物时的吸光值, A_{sample} 是加聚合物后的吸光值.

1.8 共聚物载药胶束的制备

以疏水性消炎药物醋酸泼尼松作为模型药物, 采用透析法制备了共聚物载药胶束. 将 10 mg 共聚物和 1 mg 醋酸泼尼松溶于 2 mL 四氢呋喃, 置于透析袋中, 在 800 mL 蒸馏水中室温透析 24 h, 每 4 h 换一次蒸馏水, 所制备的共聚物载药胶束溶液冻干后保存. 取一定量的冻干胶束溶于 DMF 中, 270 nm 下测定其吸光度, 根据以下公式计算胶束的产率、载药量以及包封率:

$$\text{Micelle yield (wt\%)} =$$

$$\frac{\text{Weight of drug-loaded micelles}}{\text{Weight of copolymers and drug fed initially}} \times 100$$

$$\text{Drug loading content (wt\%)} =$$

$$\frac{\text{Weight of drug in micelles}}{\text{Weight of drug-loaded micelles}} \times 100$$

$$\text{Entrapment efficiency (wt\%)} =$$

$$\frac{\text{Weight of drug in micelles}}{\text{Weight of drug fed initially}} \times 100$$

1.9 共聚物载药胶束的药物释放性能研究

分别在 4℃ 和 37℃ 条件下研究了共聚物载药胶束的药物释放行为. 取一定量的载药胶束溶于 3 mL PBS, 置于透析袋中, 每隔一段时间取 3 mL 溶液, 再补加 3 mL 的 PBS. 测量取出的溶液在 243 nm 下的吸光度, 根据以下公式计算药物的释放量:

$$\text{Cumulative release (\%)} = (M_t / M_0) \times 100$$

其中 M_t 为在 t 时刻累积释放出的药物量, M_0 为载入共聚物胶束的药物总量.

2 结果与讨论

2.1 P(MAC-*co*-DTC)-*b*-PNIPAM 的合成

新型嵌段型两亲性共聚物 P(MAC-*co*-DTC)-*b*-PNIPAM 采用 2 步合成. 首先采用自由基聚合合成了链端为羟基的大分子引发剂 HO-PNIPAM, 通过调节链转移剂 HSCH₂CH₂OH 和单体 NIPAAm 的比例, 得到了两种分子量分别为 4500 和 2000 的 HO-PNIPAM. 第二步以固定化酶 IPPL 为催化剂, HO-PNIPAM 为引发剂, 130℃ 下本体聚合, 合成了 4 种不同结构比例的嵌段型两亲性共聚物 P(MAC-*co*-DTC)-*b*-PNIPAM, 结果如表 1 所示. 所得共聚物分子量随着 HO-PNIPAM 分子量的增加而增加; HO-PNIPAM 分子量不变时, 共聚物分子量随着疏水链段投料比的增加而增加.

图 1(a) 是所制备的嵌段型两亲性共聚物的 ¹H-NMR 图谱 (CDCl₃ 为溶剂). 从图中可以清楚地看见共聚物不同结构单元的特征峰, 其中 $\delta = 5.8 \sim 5.9$ 和 $5.2 \sim 5.3$ 为 MAC 侧链双键—CH=CH₂ 的特征峰; $\delta = 4.6$ 和 4.3 为 MAC 侧链—CH₂—CH=CH₂ 和主链—CH₂—O—CO—O—CH₂—的特征峰; $\delta = 4.0$ 为 DTC 主链—CH₂—O—CO—O—CH₂—的特征峰; $\delta = 1.3$ 和 0.9 为 MAC 及 DTC 侧链—CH₃ 的特征峰; $\delta = 1.1$ 、 $1.6 \sim 2.1$ 以及 4.0 分别为亲水链段 PNIPAM 侧链—NH—CH(CH₃)₂, 主链—CH₂—以及侧链

—NH—CH(CH₃)₂的特征峰.

单峰,且分布较窄.

共聚物的 GPC-MALLS 表征均显示为对称的

Table 1 Synthesis and characterization of P(MAC-co-DTC)-*b*-PNIPAM

Copolymer	PNIPAM		NIPAAm: MAC: DTC (molar ratio)		M_n^b	
	M_n^a	PDI	Feed ratio	¹ H-NMR	M_n^b	PDI
Copolymer-1	4500	1.96	1.4:1:0.4	8.7:1:0.3	10800	1.47
Copolymer-2	4500	1.96	0.9:1:0.4	5.3:1:0.3	13300	1.42
Copolymer-3	4500	1.96	0.3:1:0.4	3.4:1:0.2	13600	1.50
Copolymer-4	2000	2.39	1.8:1:0.4	3.8:1:0.2	6500	2.01

^a Determined by GPC; ^b Determined by GPC-MALLS

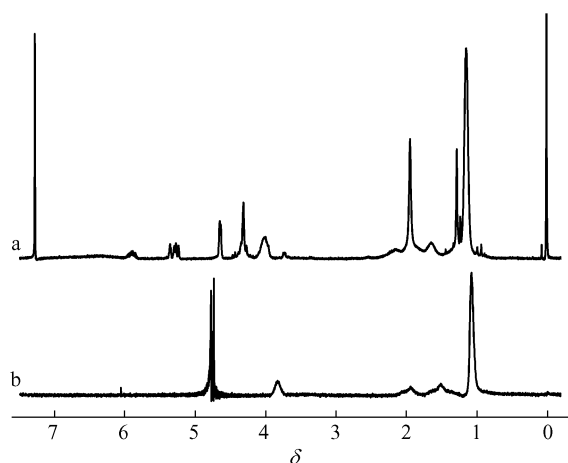


Fig. 1 ¹H-NMR (300 MHz) spectra of P(MAC-co-DTC)-*b*-PNIPAM copolymer (room temperature): (a) in CDCl₃ and (b) in D₂O

2.2 共聚物胶束的形成

嵌段型两亲性共聚物 P(MAC-co-DTC)-*b*-PNIPAM 在 D₂O 中的¹H-NMR 谱图如图 1(b)所示. 对比在 CDCl₃ 中共聚物的¹H-NMR 谱图(图 1(a)), 组成疏水链段的结构单元 MAC 及 DTC 的特征峰完全消失, 只剩下亲水链段 PNIPAM 的各个特征峰. 这是由于在水中聚集的疏水链段分子运动受限, 形成了稳定的核-壳结构的胶束.

当两亲性共聚物在水中的浓度高于其临界胶束浓度 CMC 时, 可形成以疏水段为核、亲水段为壳的胶束, 在水中稳定分散^[14]. 芘是一种芳香环碳氢化合物, 具有强疏水性, 在胶束形成过程中优先进入疏水相而发生分子水平上的光学物理性质变化, 广泛用于胶束体系的研究^[14]. 本文以芘作为疏水荧光探针, 研究了 P(MAC-co-DTC)-*b*-PNIPAM 在水介质中的胶束化行为.

以 Copolymer-4 为例, 图 2(a) 是荧光强度与聚合物浓度的相关曲线. 随着共聚物浓度的增加,

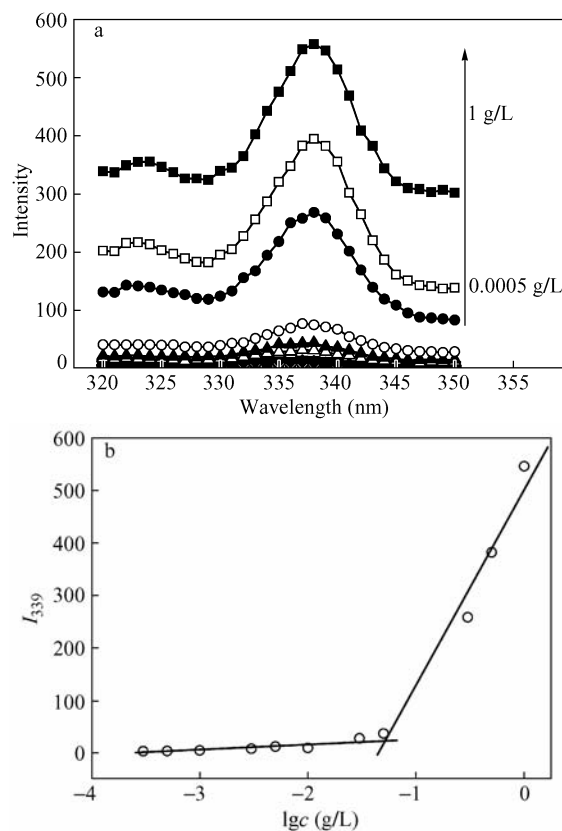


Fig. 2 (a) Fluorescence excitation spectra of pyrene with increasing concentrations of P(MAC-co-DTC)-*b*-PNIPAM ($\lambda_{em} = 339$ nm, [Pyrene] = 6×10^{-7} mol/L); (b) I_{339} in the excitation spectra as a function of logarithm of P(MAC-co-DTC)-*b*-PNIPAM concentration (The CMC of the micelles is 52 mg/L (Copolymer-4)).

荧光强度出现一个突变, 表明胶束的形成以及芘进入胶束的疏水内核; 荧光强度发生突变时所对应的聚合物浓度被定义为 CMC 值; 图 2(b) 是 339 nm 处荧光强度 I_{339} 与浓度对数值的相关曲线, 图中突变点的浓度即为 Copolymer-4 的临界胶束浓度 CMC (52 mg/L).

表 2 列出了 4 种不同结构比例共聚物胶束的

尺寸、CMC 值以及 LCST 值. 从表中可看出,所制备的嵌段型两亲性共聚物胶束均具有较低的 CMC 值,在水溶液具有较好的稳定性,能稳定存在于稀水溶液中. 对于具有相同 PNIPAM 亲水链段的共聚物,疏水链段越长,疏水间相互作用力越

大,CMC 值越小,这与文献[15]报道的结果类似;而对于具有不同长短 PNIPAM 亲水链段但亲-疏水比例相近的共聚物(Copolymer-3 和 Copolymer-4),PNIPAM 分子量越小,相应疏水链段的长度越短,疏水间作用力越弱,CMC 值越大^[16].

Table 2 Characterization of self-assembled block micelles

Copolymer	PNIPAM		Average size		TEM (nm)	CMC (mg/L)	LCST (°C)
	M_n^a	LCST (°C)	d (nm)	PDI			
Copolymer-1	4500	36.3	155	0.27	26	56	38.0
Copolymer-2	4500	36.3	167	0.07	43	24	39.0
Copolymer-3	4500	36.3	192	0.10	70	21	40.0
Copolymer-4	2000	38.0	165	0.16	35	52	42.5

^aDetermined by GPC

2.3 共聚物胶束的形态及尺寸的表征

采用 TEM 观察了嵌段型共聚物胶束的形貌和大小. 从图 3 中可以看出,共聚物胶束呈规则球状分布. 对于具有相同 PNIPAM 亲水链段的共聚物,疏水链段越长,胶束内核越大,胶束粒径越大;而对于具有不同长短 PNIPAM 亲水链段但亲-疏水比例相近的共聚物 Copolymer-3 和 Copolymer-

4,PNIPAM 分子量越小,相应的疏水链段长度越小,胶束粒径变小.

表 2 列出了采用光散射粒径分析仪测量的嵌段型共聚物胶束的大小与分布. 胶束在水中的粒径呈单一均匀分布,平均水合粒径为 155 ~ 192 nm,大于 TEM 观察的胶束干态尺寸,这与文献报道一致^[17],但两种方法所观察到的粒径变化趋势一致.

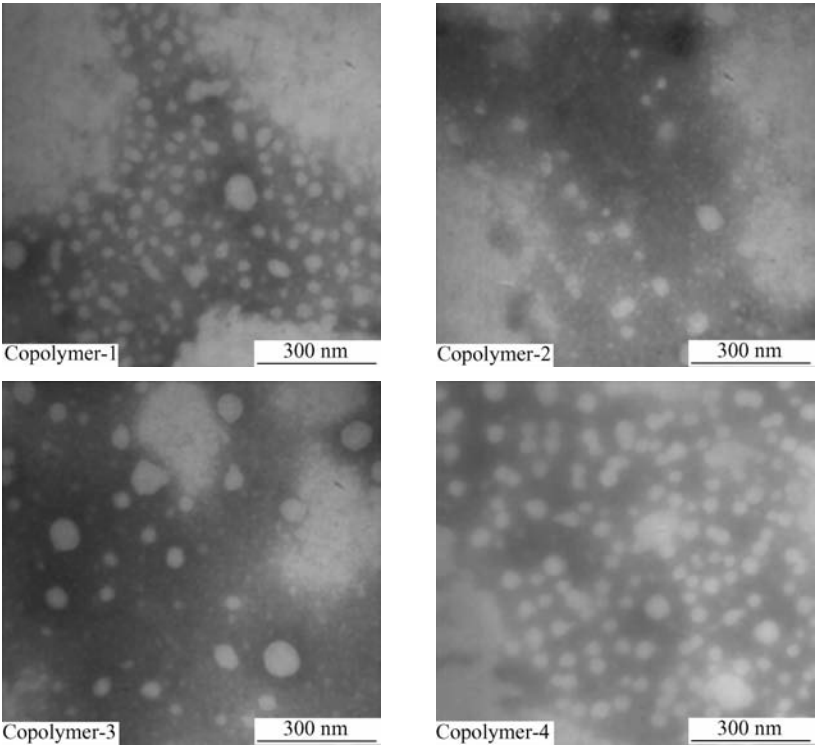


Fig. 3 TEM image of the P(MAC-co-DTC)-*b*-PNIPAM micelles

2.4 共聚物胶束的温敏性研究

文献报道 PNIPAM 在 32 ~ 33℃ 间存在灵敏的温敏相转变^[18],其全部转变发生在一个极窄的

温度范围内,对应的相转变温度称为 LCST. 温度低于 LCST 时,PNIPAM 由于分子中氮原子与水分子的氢键相互作用而溶于水;当温度高于 LCST

时,氢键被破坏,PNIPAM 中侧链异丙基以及碳-碳主链的疏水相互作用增强,最终导致聚合物与水溶液发生相分离. PNIPAM 的 LCST 值与分子量相关,分子量越小,LCST 值越高^[19]. 本研究中,根据溶液透过率的变化与温度的关系来考察聚合物的温度敏感性,LCST 值被定义为 500 nm 波长下达到聚合物水溶液透过率 50% 所对应的温度值. 结果见表 2.

本文中分子量 4500 和 2000 的大分子引发剂 HO-PNIPAM 的 LCST 值分别为 36.3℃ 和 38.0℃. 嵌段型共聚物 P(MAC-co-DTC)-*b*-PNIPAM 的 LCST 值高于其相应组成 HO-PNIPAM 的 LCST 值,如 Copolymer-4 的 LCST 值为 42.5℃ (图 4),高于其亲水链段 HO-PNIPAM 的 LCST 值(38.0℃). 在嵌段型共聚物 P(MAC-co-DTC)-*b*-PNIPAM 分子中,疏水性聚碳酸酯链段的引入会使 LCST 值升高,可能的原因是共聚物在水介质中形成的有序核-壳结构,有利于 PNIPAM 链段与水的相互作用. 实验结果还表明,对于具有相同 PNIPAM 亲水链段的共聚物,疏水链段越长,LCST 值越高;而对于具有不同长短 PNIPAM 亲水链段但亲-疏水比例相近的共聚物 Copolymer-3 和 Copolymer-4,PNIPAM 分子量越大,LCST 值越低.

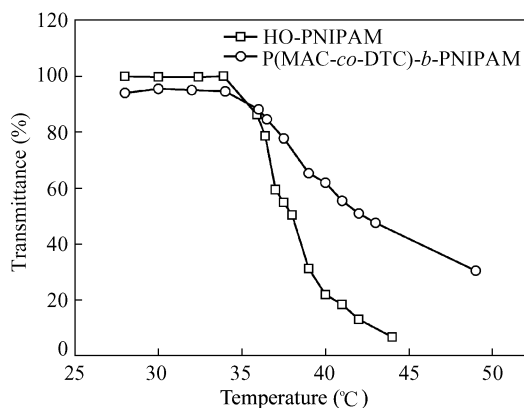


Fig. 4 Optical transmittance of aqueous solutions of P(MAC-co-DTC)-*b*-PNIPAM with its corresponding PNIPAM (Copolymer-4)

PNIPAM 在温度升至其 LCST 附近时,分子链开始由亲水性向疏水性转变,其分子体积会发生一定程度的收缩^[18]. 本文分别在 25℃ 和 40℃ 下观察了嵌段型共聚物胶束的形貌和大小,如图 5 所示, Copolymer-4 所形成的胶束在 40℃ 时的粒径比 25℃ 时的粒径有一定程度的减小.

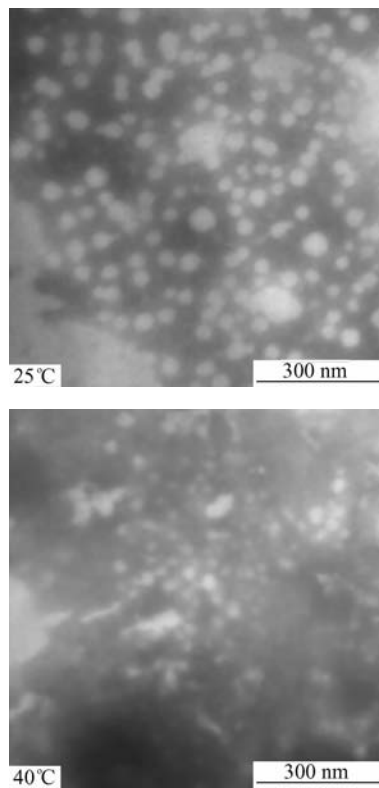


Fig. 5 TEM image of the P(MAC-co-DTC)-*b*-PNIPAM micelles at 25℃ and 40℃ (Copolymer-4)

2.5 共聚物的细胞毒性研究

文献中报道生物可降解聚碳酸酯^[20]和 PNIPAM^[14]都具有较低的细胞毒性. 本文考察了不同浓度共聚物溶液对 Hela 细胞生长的影响. 如图 6 所示,当 Copolymer-4 浓度达到 0.4 mg/mL 时, Hela 细胞的生长仍然基本不受影响,表明所制备的嵌段型两亲性共聚物 P(MAC-co-DTC)-*b*-PNIPAM 具有良好的生物相容性.

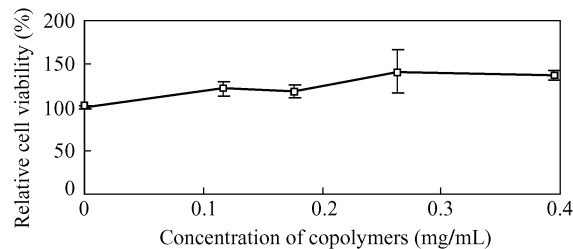


Fig. 6 Cytotoxicity of P(MAC-co-DTC)-*b*-PNIPAM copolymer at various concentrations (Copolymer-4)

2.6 共聚物胶束的药物负载与释放性能研究

以疏水性消炎药物醋酸泼尼松作为模型药物,采用透析法制备了载药共聚物胶束. 研究了不同结构共聚物胶束的药物负载与释放性能.

Table 3 Micelle yield, drug loading content and entrapment efficiency of P(MAC-co-DTC)- <i>b</i> -PNIPAM			
Copolymer	Micelle yield (%)	Drug loading content (%)	Entrapment efficiency (%)
Copolymer-1	88. 7	3. 5	34. 7
Copolymer-2	75. 9	5. 8	50. 5
Copolymer-3	78. 2	4. 5	39. 1
Copolymer-4	65. 0	3. 7	24. 9

如表 3 所示,嵌段共聚物结构比例不同,其形成的载药胶束的产率、载药量和包封率也不同. 结果表明,对于具有相同 PNIPAM 亲水链段的共聚物,随着疏水链段的增加,共聚物胶束的载药量和包封率存在一个先增加后减小的过程. 药物的负载源于疏水间作用力,疏水链段的生长有利于药物的负载;同时,亲水链段对胶束的稳定存在起到重要作用;因此合适的亲-疏水比例有助于获得高的载药量和包封率(Copolymer-2). 而对于具有不同长短 PNIPAM 亲水链段但亲-疏水比例相近的共聚物 Copolymer-3 和 Copolymer-4 ,PNIPAM 分子量越小,相应的疏水链段分子量也越小,疏水间作用力越弱,胶束产率、载药量以及包封率也越小.

进一步研究了共聚物载药胶束在不同温度 PBS 缓冲溶液中的药物释放行为,如图 7 所示. 在相同温度条件下,具有相同 PNIPAM 亲水链段的共聚物,其疏水链段越长,释药速率越慢,但同时亲-疏水链段比例过低时会降低胶束的稳定性,从而加快药物的释放;而对于具有不同长短 PNIPAM 亲水链段但亲-疏水比例相近的共聚物 Copolymer-3 和 Copolymer-4 ,PNIPAM 分子量越小,释药速率越快,这是由胶束的稳定性决定的,亲水链段的增加有利于胶束的稳定. 同时,4℃ 和 37℃ 不同温度下的药物释放研究表明,所制备的嵌段型两亲性胶束具有良好的温敏性药物释放性能. 当温度低于 LCST 值时(4℃),PNIPAM 链段的亲水性使胶束的核-壳结构较为稳定,药物主要以扩散的形式缓慢释放;当温度接近 LCST 值时(37℃),PNIPAM 链段转变为疏水性的,PNIPAM 链段发生收缩,同时胶束稳定性降低,导致药物释放速率明显加快,这与文献报道的结果类似^[15].

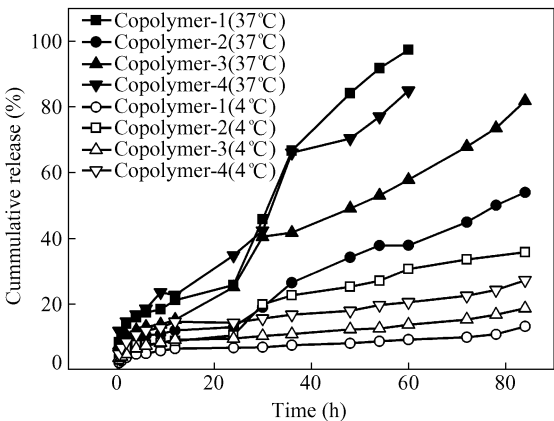


Fig. 7 Drug release of P(MAC-co-DTC)-*b*-PNIPAM micelles containing prednisone acetate at 4℃ and 37℃

3 结论

本文设计合成了由温度敏感 PNIPAM 亲水链段和生物可降解 P(MAC-co-DTC)疏水链段组成的新型嵌段型两亲性共聚物 P(MAC-co-DTC)-*b*-PNIPAM. 该共聚物具有良好的生物相容性,在水中能够自组装形成球形的稳定胶束,并且具有温敏性,LCST 值为 38 ~ 43℃. 药物负载和释放结果表明,共聚物胶束在温度接近和低于 LCST 值时的药物释放行为显示了良好的温敏性,即 37℃ 时的释放速率明显大于 4℃ 时的释放速率;其药物的负载和释放性能还可通过调节其亲-疏水比例来调节,疏水链段比例越高,药物负载越大,而亲水链段的增加有利于胶束的稳定性. 上述结果表明所制备的嵌段型两亲性温敏胶束 P(MAC-co-DTC)-*b*-PNIPAM 是一类具有优良性能和应用前景的药物控制释放载体.

REFERENCES

1 Adams M L, Lavasanifar A, Kwon G S. J Pharm Sci, 2003, 92(7): 1343 ~ 1355
2 Wei H, Cheng S X, Zhang X Z, Zhuo R X. Prog Polym Sci, 2009, 34(9): 893 ~ 910
3 Zhao Changwen (赵长稳), Zhuang Xiuli (庄秀丽), Chen Xuesi (陈学思), Jing Xiabin (景遐斌). Acta Polymerica Sinica (高分子学报), 2008, (11): 1096 ~ 1101
4 Suriano F, Coulembier O, Hedrick J L, Dubois P. Polym Chem, 2011, 2: 528 ~ 533
5 Gross RA, Kumar A, Karla B. Chem Rev, 2001, 101: 2097 ~ 2124

- 6 He F, Jia H L, Liu G, Wang Y P, Feng J, Zhuo R X. *Biomacromolecules*, 2006, 7: 2269 ~ 73
- 7 Wang C F, Lin Y X, Jian T, He F, Zhuo R X. *Biomaterials*, 2009, 30: 4824 ~ 4832
- 8 He F, Wang C F, Jian T, Han B, Zhuo R X. *Biomacromolecules*, 2010, 11: 3028 ~ 3035
- 9 He F, Zhuo R X, Liu L J, Jin D B, Feng J, Wang X L. *React Funct Polym*, 2001, 47(2): 153 ~ 158
- 10 He F, Liu G, Tang X L, Shi W, Feng J, Zhuo R X. *Wuhan University Journal (Natural Science Edition)*, 2005, 51: 704 ~ 708
- 11 Matsuo J, Aoki K, Sanda F, Endo T. *Macromolecules*, 1998, 31(14): 4432 ~ 4438
- 12 Kohori F, Sakai K, Aoyagi T, Yokoyama M, Sakurai Y, Okano T. *J Control Release*, 1998, 55: 87 ~ 98
- 13 Chen Yougen, Sone M, Fuchise K, Sakai R, Kakuchi R, Duan Qian, Sun Jingliang, Narumi A, Satoh T, Kakuchi T. *React Funct Polym*, 2009, 69: 463 ~ 469
- 14 Kedar U, Phutane P, Shidhaye S, Kadam V. *Nanomed-Nanotechnol Biol Med*, 2010, 6: 714 ~ 729
- 15 Rapoport N. *Prog Polym Sci*, 2007, 32(8-9): 962 ~ 990
- 16 Allen C, Maysinger D, Eisenberg A. *Colloid Surf B-Biointerfaces*, 1999, 16(1-4): 3 ~ 27
- 17 Morita T, Horikiri Y, Suzuki T, Yoshino H. *Int J Pharm*, 2001, 219(1-2): 127 ~ 137
- 18 Schild H G. *Prog Polym Sci*, 1992, 17(2): 163 ~ 249
- 19 Chen G, Hoffman A S. *Nature*, 1995, 373: 49 ~ 52
- 20 Seow W Y, Yang Y Y. *J Control Release*, 2009, 139(1): 40 ~ 47

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF PNIPAM-*b*-POLYCARBONATE COPOLYMERS AS SELF-ASSEMBLED THERMOSENSITIVE MICELLES FOR DRUG DELIVERY

ZHENG Xiaoming, JIANG Tao, HE Feng

(Key Laboratory of Biomedical Polymers of Ministry of Education, Department of Chemistry, Wuhan University, Wuhan 430072)

Abstract A series of poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM)-blocked polycarbonates, P(MAC-*co*-DTC)-*b*-PNIPAM, were designed as thermosensitive micelles for drug delivery. The amphiphilic block copolymers were synthesized by enzymatic ring-opening copolymerization of HO-PNIPAM, 5-methyl-5-allyloxycarbonyl-trimethylene carbonate (MAC) and 5,5-dimethyltrimethylene carbonate (DTC). The novel block copolymers were characterized by ¹H-NMR and GPC-MALLS analyses. All the amphiphilic copolymers were able to self-assemble into nano-sized micelles in aqueous solutions with hydrophilic PNIPAM shells and hydrophobic polycarbonates cores. The critical micelle concentration (CMC) determined by fluorescence spectroscopy using pyrene as a probe was around 20 ~ 60 mg/L. Transmission electron microscopy (TEM) measurements showed that the micelles presented even spherical shape and the diameters of them were about 20 ~ 70 nm. The micelles exhibited thermosensitivity at lower critical solution temperature (LCST) of around 38 ~ 43 °C, which was related to the hydrophilic PNIPAM blocks. *In vitro* experiments demonstrated that the P(MAC-*co*-DTC)-*b*-PNIPAM showed low cytotoxicity. Furthermore, the micelles were loaded with hydrophobic drug of prednisone acetate (PA) and *in vitro* drug release investigation also displayed thermosensitivity. The results suggested that P(MAC-*co*-DTC)-*b*-PNIPAM copolymers would be a promising thermosensitive carrier for drug delivery.

Keywords Amphiphilic thermosensitive micelles, PNIPAM, Biodegradable polycarbonates, Enzymatic polymerization, Drug delivery, Cytotoxicity