

壳聚糖基阳离子胶束用于共负载两种不同性质药物的研究*

张海雯¹ 王利群^{1, 2} 蒋宏亮^{1, 2 **}

(¹浙江大学高分子科学与工程学系 ²高分子合成与功能构造教育部重点实验室 杭州 310027)

摘 要 以季胺化壳聚糖-*O*-聚己内酯(TMC-PCL)胶束为载体,用于共负载 2 种不同亲疏水性质的抗肿瘤物质,阿霉素和吲哚菁绿;并研究了胶束包埋对吲哚菁绿的稳定性和光热效应的影响,以及阿霉素从胶束中的释放行为.结果表明,2 种抗肿瘤物质在 TMC-PCL 胶束中的实际载药量均可达 20%,且包封率超过 85%.进一步还用 MTT 法评价了不同载药胶束体系对肿瘤细胞的杀灭作用,发现共负载胶束经近红外激光辐照后,对肿瘤细胞的毒性远高于单载药体系.

关键词 壳聚糖, 阳离子胶束, 共负载, 肿瘤靶向

聚合物胶束用作药物传递载体具有可增溶难溶药物、尺寸与表面性质广泛可调、以及生物相容性好等优点,近十多年来得到了广泛研究.聚合物胶束可由两亲性共聚物在水溶液中经疏水相互作用自组装形成,带有相反电荷的聚电解质通过静电相互作用也可组装形成聚合物胶束^[1]. 聚合物胶束不仅能保护药物不被肝脏代谢酶降解失活,还能避开肾组织的清除;表面接有靶向基团的胶束能富集到肿瘤组织,提高药物的生物利用度并减少对正常组织的毒副作用^[2]. 疏水性抗肿瘤药物可通过物理包裹或化学键合的方式包载入胶束的疏水内核中,如 NK105^[3] 为一种负载了紫杉醇的聚乙二醇-聚天冬氨酸胶束,已在临床上用于治疗胃癌. Yoo 等通过将阿霉素(DOX)共价键合到聚乙二醇-*b*-(聚乳酸-*co*-羟基乙酸)共聚物的疏水嵌段上,控制 DOX 的释放速度^[4]. 目前大部分聚合物胶束载体仅能负载单一种类或多种同类性质的抗肿瘤药物. 如 Satoh 等制备了聚乙二醇-聚天冬氨酸胶束,用于负载两种油溶性的人造维生素 Am80 和 LE540^[5]. 但是,在临床中往往需要使用多种不同性质的抗肿瘤药物联合给药,提高抑瘤作用. 因此,设计能同时负载两种甚至多种不同性质抗肿瘤药物的载体具有十分重要的意义.

本课题组在前期研究中,选取壳聚糖和聚己内酯(PCL)为原料,以 *N,N*-二甲基化壳聚糖-十二烷基硫酸钠复合物(DMC-SDS)为前驱体,合成

了一类具有规整结构的两亲性接枝共聚物,主链为季胺化壳聚糖(TMC),侧链为 PCL, PCL 接枝到 TMC 的羟基上^[6]. 原料壳聚糖和 PCL 均具有良好的生物相容性和生物可降解性,是纳米抗肿瘤载药体系和组织工程研究中常用的生物材料^[7-9],此外壳聚糖阳离子特性有利于其被肿瘤细胞内吞或用于黏膜给药^[10]. TMC-PCL 共聚物在水介质中可组装形成窄粒径分布胶束,胶束外壳为 TMC,内核为 PCL,粒径大小在 30 nm 左右. 利用其阳离子两亲特性, TMC-PCL 胶束有望能通过静电与疏水相互作用,同时负载阴离子活性物质与疏水性化疗药物,从而实现 2 种不同性质药物的共负载与传递.

本研究以两类具有不同亲疏水性的抗肿瘤物质为模型,包括疏水性抗肿瘤药物阿霉素(DOX)和阴离子型近红外光敏剂吲哚菁绿(ICG)^[11],研究其在 TMC-PCL 中的共负载与释放行为. 两类抗肿瘤物质中 DOX 为一类广谱抗癌药,通过抑制 DNA 与 RNA 的合成直接杀灭肿瘤细胞;而 ICG 已得到美国 FDA 认证可用于临床诊断,同时 ICG 还具有优异的近红外(NIR)光热效应,即在近红外激光辐照下产生大量热量,从而可用于肿瘤的光热疗法^[12,13]. 通过将 DOX 与 ICG 共负载于 TMC-PCL 胶束中,利用该胶束对肿瘤细胞优异的内化能力,协同 DOX 的化疗与 ICG 的光热疗法,有效杀灭肿瘤细胞.

* 2012-04-19 收稿,2012-05-28 修稿;国家自然科学基金(基金号 20974097 和 20774081)、国家重点基础研究发展计划(973 计划,项目号 2009CB930104)和中央高校基本科研基金(基金号 2010QNA4012)资助项目.

** 通讯联系人, E-mail: hljiang@zju.edu.cn

doi:10.3724/SP.J.1105.2012.12115

1 实验部分

1.1 实验材料

壳聚糖,黏均分子量(M_v) 15000,脱乙酰度 91%,奥星生物科技有限公司(浙江玉环);聚己内酯(PCL, $M_n=4000$),以辛酸亚锡为催化剂,苯甲醇为引发剂,开环聚合 ϵ -己内酯得到;阿霉素盐酸盐(DOX·HCl),纯度>99%,杭州海大制药化学制品有限公司(浙江杭州);吡啶菁绿,纯度>98%,百灵威科技有限公司(上海);三氟乙醇(TFE),威海新元化有限公司(山东威海);透析袋,截留分子量 3,500,华东医药股份有限公司(浙江杭州);其余药品试剂均为分析纯。

近红外激光器, $P=2\text{ W}$,最大发射波长 808 nm,深圳富喆科技有限公司(广东深圳);热电偶,探针 $\Phi=0.2\text{ mm}$,型号为 HYP0-33-1-T-G-60-SMP-M,美国 OMEGA 公司。

1.2 实验方案

1.2.1 测试与表征

TMC-PCL 聚合物结构由 500 MHz Bruker DMX-500 核磁共振仪($^1\text{H-NMR}$)进行表征,测量时将聚合物溶解在氘代三氟乙酸和重水的混合溶剂中(1/3, V/V).胶束粒径由 Brookhaven 90 Plus 动态光散射仪(DLS)在室温、 90° 观测角下进行测定,测量时胶束溶液浓度为 0.1 mg/mL,测量前先用 0.45 μm 滤膜过滤.胶束的表面电位由 Malvern nanoZS-90 Zeta 电位仪进行测定,测量时胶束浓度为 0.2 mg/mL,介质为 pH 7.4,10 mmol/L 离子强度的 PBS.胶束形态由透射电子显微镜(TEM, JEOL JEM-1230)观察,制样时将 5 μL ,0.1 mg/mL 胶束溶液滴在铜网上,自然干燥后用 0.2 wt% 的磷钨酸(PTA)染色.载药胶束在最大吸收波长(λ_{max})处的吸收由岛津 UV-1800 紫外-可见分光光度计(UV-Vis)检测,DOX 的检测波长为 483 nm,ICG 和 ICG 负载胶束(ICG-micelles)的检测波长分别为 780 nm 和 800 nm.

1.2.2 TMC-PCL 胶束的制备

TMC-PCL 聚合物的合成步骤参照本课题组的工作^[6],聚合物产物用 $^1\text{H-NMR}$ 表征.TMC-PCL 胶束由透析法制备.将 50 mg TMC-PCL 聚合物溶于 5 mL TFE,随后把溶液移入透析袋中在 pH 7.4 的 PBS 中透析 3 天,最终得到澄清透明的胶束溶液.胶束的尺寸和形貌分别由 DLS 和 TEM 进行表征.

1.2.3 ICG-micelles 的制备

ICG 分子的羧基使其在水溶液中呈现负电性,因此 ICG 可通过静电相互作用吸附在阳离子胶束表面.ICG-micelles 具体制备过程如下:将 ICG 溶液(0.5 mg/mL)和 TMC-PCL 胶束溶液(2 mg/mL)按一定比例在室温下混合,搅拌 2 h 保证 ICG 和胶束充分作用后,用超滤膜(3500 Da)过滤除去未结合的 ICG.在早期研究中我们发现,为维持 TMC-PCL 胶束的稳定性,聚合物主链季胺化程度需不低于 44%^[6],因此在本文中,ICG 和 TMC-PCL 所带 $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ 基团的摩尔投料比($\text{SO}_3^-/\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$)需控制在 0.2 以下.ICG 的负载效率由如下方法测试:ICG-micelles 溶液冻干后,将冻干粉重新溶解到 TFE 中,测定溶液在 780 nm 处的吸收值,并比对标准曲线计算 ICG 实际负载量和负载效率.ICG 和 ICG-micelles 的吸收光谱由 UV-Vis 检测;TMC-PCL 胶束负载 ICG 前后的尺寸分布由 DLS 检测.为减少 ICG 的光降解,以上所有实验均在避光条件下进行.

1.2.4 ICG 从胶束中的渗漏

将 ICG-micelles 溶液(1 mg/mL, $\text{SO}_3^-/\text{N}^+(\text{CH}_3)_3=0.05$)等分为若干份后,分别放入透析管中(每管 2 mL),并置于 pH 7.4、不同离子强度的 PBS(500 mL)中,37℃ 下避光震荡.每隔一定时间取出一支透析管,将 100 μL 胶束溶液加入 3 mL TFE 中,从而解组装 TMC-PCL 胶束,游离出所负载的 ICG,并通过测定 TFE 溶液在 780 nm 处的吸收,定量出胶束中 ICG 的残留量.由于 ICG 的热不稳定性,实验过程中负载于 TMC-PCL 中的 ICG 在 37℃ 环境下存在一定程度的降解,这也会导致其吸光度的降低.因此为了精确获得 ICG 渗漏行为,须测定 ICG 的热降解.方法如下:将 4 mL ICG-micelles 溶液加入到锡纸包裹避光的 5 mL 离心管中,并置放于 37℃ 的水浴中.每隔一段时间测定溶液在 800 nm 处吸收值,并和初始值比较,确定热降解百分数.

1.2.5 ICG 负载前后稳定性评价

负载 ICG 的光、热稳定性根据文献的方法测试^[13],并以相同 ICG 含量的游离 ICG 溶液为参照,研究 ICG 负载对其光、热稳定性的影响.

热稳定性的测试方法如下:将游离 ICG 和 ICG-micelles 溶于 50 mmol/L, pH 7.4 PBS 中,并等分成若干份后分装于 5 mL 锡纸包裹避光的离心管内(每管 4 mL).将离心管置于不同温度

(2℃, 16℃, 37℃, 45℃) 的环境中保存, 每隔一定时间取出, 分别测量 ICG 和 ICG-micelles 溶液在 780 nm 和 800 nm 的吸收, 并和初始值比较, 计算 ICG 降解百分比。

光稳定性的测试方法如下: 将 2 种浓度的游离 ICG 和 ICG-micelles 溶液等分为若干份后分装于 5 mL 离心管内(每管 4 mL), 并置于 250 W 泛光灯下 30 cm 处, 持续光照 2 h。每隔一定时间分别测量 ICG 和 ICG-micelles 溶液在 780 nm 和 800 nm 处的吸收, 并和初始值比较, 计算 ICG 降解百分比。本实验以室温避光保存的 ICG 和 ICG-micelles 溶液为对照组。

1.2.6 ICG 光热效应的研究

将 1 mL 不同浓度的 ICG 或 ICG-micelles 溶液装在圆盘中($D = 15$ mm), 并置于近红外激光器下 5 cm 处。用 808 nm 的激光持续辐照 1 min, 并用热电偶(探头置于光斑外 3 mm)监测溶液温度变化。

1.2.7 DOX/ICG 共负载胶束(DOX-ICG-micelles)的制备

本文采用两步法将 DOX 和 ICG 共负载到 TMC-PCL 胶束中。首先, 用 O/W 乳化法制备 DOX 负载胶束(DOX-micelles)^[14]。简而言之, 将 3 mg DOX·HCl 分散于 2 mL 三氯甲烷中, 并加入 2.4 μ L 三乙胺(TEA, 3 倍摩尔当量), 搅拌过夜脱除盐酸。在脱盐酸的 DOX 悬浊液中加入 10 mL 空白胶束溶液, 搅拌 2 h 后, 旋转蒸发除去三氯甲烷, 得到红色载药胶束溶液, 溶液用 0.45 μ m 滤膜滤去未负载的 DOX。进一步将 DOX-micelles 溶液与 ICG 溶液按一定比例混合搅拌, ICG 通过静电相互作用吸附到胶束中, 从而制备得到 DOX 与 ICG 共负载胶束。

将 DOX-micelles 溶液冻干后重新溶解到 TFE 中, 用 UV-Vis 测定 483 nm 处 DOX 的吸收, 并与标准曲线比较计算 DOX 的载药量(loading content, LC)和包封率(entrapment efficiency, EE)。计算公式如下, 其中 W_{loaded} 为实际 DOX 载入量, W_{added} 为 DOX 投料量, W_{Micelles} 为载药胶束的质量。

$$LC = (W_{\text{loaded}} / W_{\text{Micelles}}) \times 100\% \quad (1)$$

$$EE = (W_{\text{loaded}} / W_{\text{added}}) \times 100\% \quad (2)$$

1.2.8 DOX 从胶束中释放行为

将 3 mL DOX-micelles 或 DOX-ICG-micelles 溶液(1 mg/mL)放入透析袋中, 并置于 50 mmol/L, pH 7.4 PBS(50 mL)中进行透析。每隔一定时

间取出 4 mL 释放外液并补充新鲜 PBS。UV-Vis 测量 483 nm 下释放外液的吸收值, 计算得到 DOX 的累积释放量。为研究释放环境温度对 DOX 释放的影响, 实验在 37℃ 和 45℃ 两个条件下进行。

1.2.9 载药胶束细胞毒性的研究

采用 MTT 法研究不同载药胶束对人类肝癌细胞 HepG2 的细胞毒性。具体步骤如下: 将细胞悬液按 200 μ L/孔加入到 96 孔细胞培养板中, 每孔细胞数为 1×10^4 。孵育 24 h 待细胞充分贴壁后, 将培养液换成胶束溶液并继续培养 4 h。对于无需光照实验组, 孵育 4 h 后将培养液换成 MTT 溶液(0.5 mg/mL, 200 μ L/孔)并接着培养 4 h; 对光照实验组, 则在预孵育 15 min 后用 808 nm 的近红外光照射 1 min, 随后继续孵育直到 4 h 后将胶束溶液换为 MTT 溶液。待细胞和 MTT 共孵育 4 h 后, 翻板除去溶液, 并往每孔加入 150 μ L DMSO, 振荡 5 min 使甲瓖完全溶解。用酶标仪检测各孔于 570 nm 处的吸收值, 并计算细胞的存活率。

2 结果与讨论

2.1 TMC-PCL 胶束的制备

按照早期所研究的方法, 合成得到具有规整化学结构的 TMC-PCL^[6]。首先将壳聚糖与甲醛/甲酸反应, 合成得到二甲基壳聚糖(DMC), 该 DMC 具有明确规整的化学结构, 所有的胺基均仅发生二甲基化, 不存在单甲基胺基与三甲基胺基, 同时壳聚糖羟基不发生甲基化; 进一步通过 DMC 与十二烷基硫酸钠(SDS)之间的静电相互作用, 制备得到具有化学计量比的 SDS-DMC 复合物(SDC), 该复合物可溶于常见有机溶剂如 DMSO 与 DMF 中, 从而可作为 PCL 接枝反应的前驱体; PCL 的端羟基用六甲基二异氰酸酯(HDI)活化后, 在均相温和条件下, 接枝到 SDC 的羟基上, 获得 SDC-O-PCL; 进一步用三甲基胺基甲烷(tris)解复合 SDC 主链, 移除 SDS, 从而得到 DMC-PCL; 用碘甲烷对 DMC-PCL 进行甲基化, 即得到所需 TMC-PCL。通过改变 PCL 和 SDC 的投料比, 可改变 PCL 的接枝度; 改变 DMC-PCL 与碘甲烷的反应时间, 可调控 TMC-PCL 的季胺化程度。TMC-PCL 结构用 ¹H-NMR 表征, 如图 1 所示, 1~9 表示 TMC 主链的质子峰, 其中 δ 2.9(7) 和 δ 3.18(9) 分别为 N 上连接的二甲基和三甲基中 H 的化学

位移,通过比较这两个峰的峰面积可计算产物 TMC-PCL 的季胺化程度;a ~ e 为 PCL 的质子峰,比较 δ 2.2(e)处 PCL 上亚甲基(2nH,n 为 PCL 的 DP)和 δ 4.97(1)处壳聚糖单元链节中 H1 的峰面积能计算 PCL 的接枝度.计算所得 PCL 接枝为 3.13%.连接侧链 PCL 和主链 TMC 的 HDI 链段的质子峰,其峰面积较小,且峰形被 PCL 峰(b ~ d)和 TMC 峰(9)掩盖,因此在谱图中并未归属其化学位移.由于 TMC-PCL 的季胺化程度直接影响聚合物胶束的细胞毒性以及胶束在水介质中的胶体稳定性,为控制聚合物胶束的细胞毒性在较低范围内,并避免胶束在水介质中的聚集,本文将产物季胺化程度控制在 55%.

TMC-PCL 在中性水介质中可组装形成窄粒径分布的球形胶束(如图 2),DLS 测定其平均粒径为 37.7 nm,胶束在 pH 7.4,离子强度为 10 mmol/L 的 PBS 中的表面电势为(26.2 $\pm$ 0.46) mV.

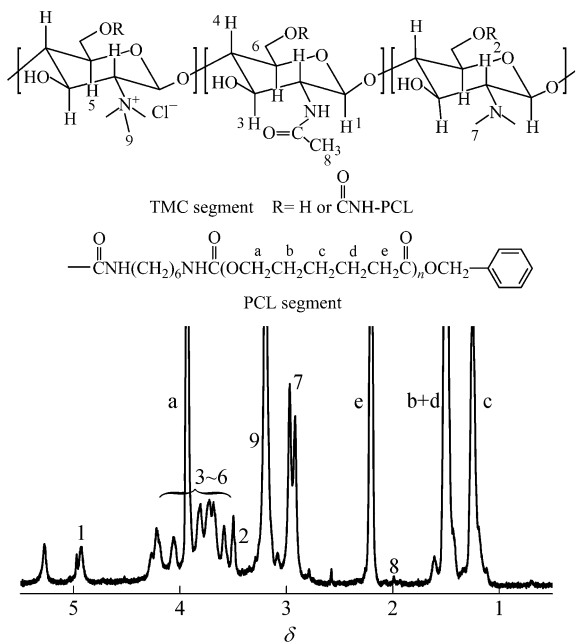


Fig. 1 ^1H -NMR spectrum of TMC-PCL in the mixture of CF_3COOD and D_2O (1/3, V/V)

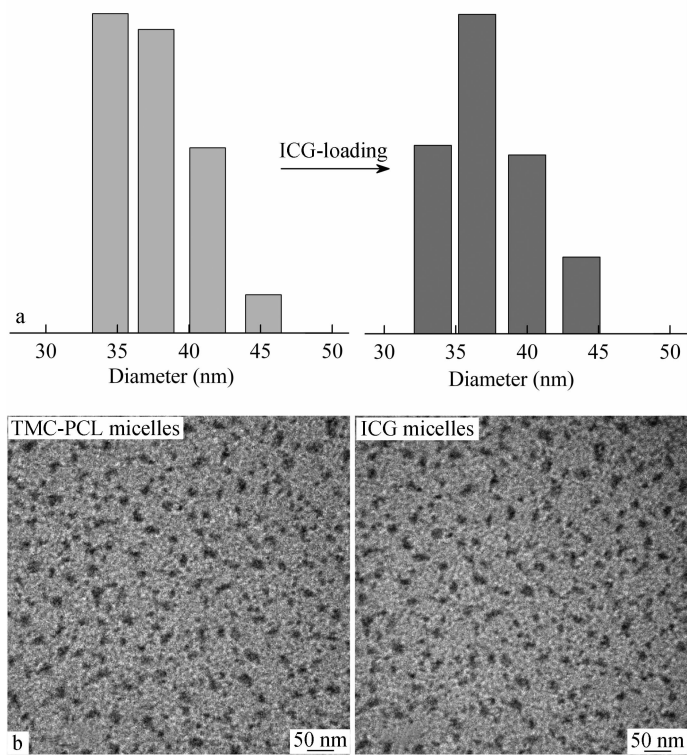


Fig. 2 (a) Size distribution of TMC-PCL micelles before and after ICG loading (ICG-micelles were prepared at $\text{SO}_3^-/\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ ratio of 0.05) and (b) TEM images of blank TMC-PCL micelles and ICG-micelles prepared at $\text{SO}_3^-/\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ ratio of 0.05

2.2 ICG 负载胶束的制备和表征

ICG-micelles 通过混合 ICG 溶液和 TMC-PCL 胶束溶液制备所得. 负载后的 ICG 表现出最大吸

收波长(λ_{max})的位移(图 3(a)), λ_{max} 处的吸收值也有所增强. 类似结果在许多文献中都有报道^[15,16]. Kirchherr 等研究了疏水程度不同的表面

活性剂包载 ICG 后吸收光谱的变化,结果发现疏水性越强的载体包载 ICG 后,ICG 吸收峰红移现象越明显^[16];通过静电相互作用,将 ICG 负载于聚烯丙基胺(PAH)纳米胶囊(NCs)中后,ICG 的吸收峰也存在位移现象^[15].吸收光谱中左右 2 个峰分别为 ICG 的双分子聚集体(dimer)和单分子 ICG(monomer)的吸收峰^[12],游离 ICG 溶液 monomer/dimer 比为 1.8,负载到 TMC-PCL 中后该值提高到 2.3,这表明 TMC-PCL 胶束削弱了 ICG 分子间的相互作用,阻止了 ICG 分子的聚集.

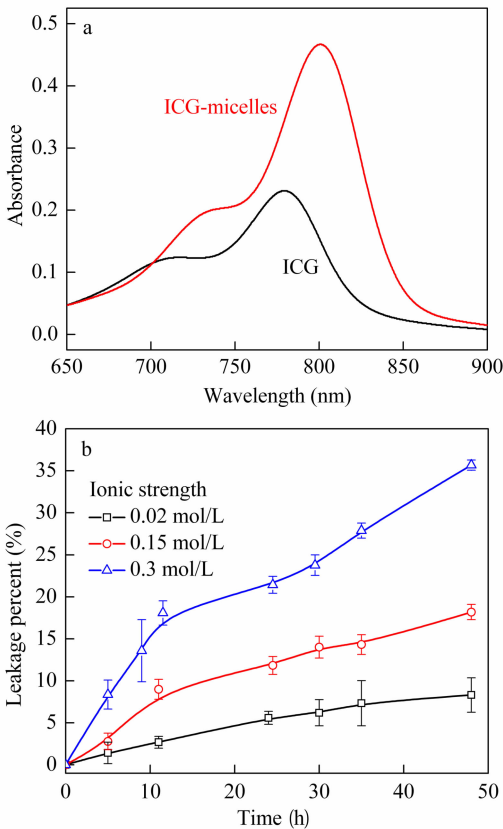


Fig. 3 (a) Absorption spectra of free ICG and ICG-micelles in pH 7.4, 50 mmol/L PBS buffer (ICG concentration was 10 $\mu\text{g/mL}$ and $\text{SO}_3^-/\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ ratio was 0.05.) and (b) ICG leakage from ICG-micelles in pH 7.4 PBS buffer with different ionic strengths at 37°C ($\text{SO}_3^-/\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ ratio was 0.05.)

在早前的研究中,我们发现为维持 TMC-PCL 胶束的胶体稳定性,TMC-PCL 主链的季胺化程度须高于 44%^[6],本文采用的 TMC-PCL 季胺化程度为 55%,因此 ICG 对 TMC-PCL 主链上 $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ 的摩尔比应不超过 0.2.表 1 为 ICG/TMC-PCL 胶束投料比对 ICG 在胶束中的负载量(LC)与包埋率(EE)的影响,相较于文献中已有 ICG 载体,TMC-

PCL 胶束可有效负载 ICG.如 ICG 在聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLGA)纳米颗粒中的 EE 和 LC 分别为 60% 和 0.15%^[17];而 PAH NCs 用于负载 ICG 时,随着 LC 从 11.3% 增加到 23.1%,EE 从 97.1% 降至 34.1%^[10].ICG 在 TMC-PCL 胶束中的负载量对胶束粒径无显著影响,随着 $\text{SO}_3^-/\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ 摩尔比的增加,胶束粒径都在 35 ~ 45 nm 范围内,这也通过 TEM 表征得到证实(图 2(b)).

Table 1 ICG loading content and entrapment efficiency of ICG-micelles with different $\text{SO}_3^-/\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ ratios

$\text{SO}_3^-/\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ ratio	Loading content (wt%)	Entrapment efficiency (%)
0.05	7.07	98.22
0.1	12.86	95.26
0.2	22.47	93.49

游离 ICG 在人体内的半衰期极短,仅 2 ~ 4 min^[12],理想的载体一方面应能高效负载 ICG,另一方面在血液循环中,应能将 ICG 保留在胶束中,避免其渗漏.通过测定 ICG 从胶束中的渗漏,评价了 TMC-PCL 胶束对 ICG 的保留能力.图 3 (b)显示了 37°C 下,ICG-micelles 在 pH 7.4、不同离子强度的 PBS 中的渗漏行为.由于 ICG 和胶束之间通过静电相互作用结合,ICG 的渗漏行为受到介质离子强度大小的影响.当离子强度为 0.02 mol/L 时,48 h 渗漏量仅有 8.31%;在生理条件下,48 h 渗漏量为 18.18%;当离子强度高达 0.3 mol/L 时,渗漏较为明显.相较其它 ICG 载体,TMC-PCL 胶束表现出良好的 ICG 保留能力.PAH NCs 载体负载 ICG 后,在 PBS 中保存 8 h 后 ICG 仅剩余 49%^[15].通过将 ICG 和四丁基铵(TBA)复合,以提高 ICG 的疏水性,随后用透析法将 ICG-TBA 载入聚(苯乙烯-*alt*-马来酸)-*b*-聚苯乙烯(PSMA-*b*-PSTY)胶束中^[18],可降低 ICG 在生理条件下的渗漏量(11%),但该胶束制备过程较为复杂.本研究中,ICG 不仅可通过简便途径负载到 TMC-PCL 胶束中,还能在生理条件下被该胶束有效截留,避免在体内循环过程中的损失.

2.3 ICG 负载前后光、热稳定性的研究

ICG 是一种光、热不稳定的小分子染料,且在人体内的半衰期极短^[12],很多文献曾报道过将 ICG 负载到纳米载体中后,其光、热稳定性得到改善^[13, 16].本文以游离 ICG 溶液为参照,研究了负载 ICG 的光、热降解行为.如图 4 和 5 所示,负载后 ICG 的光、热降解速率变慢,稳定性提高.在

45℃下保存 4 天后,游离 ICG 仅剩余 20%,而负载 ICG 仅减少了 12%. 在光降解实验中,10 μg/mL 的游离 ICG 和负载 ICG 溶液经 2 h 光照后,前者损失 75% 后者仅为 18%. 与 PAH NCs 相比,TMC-PCL 表现出与其类似的热稳定性改善效果,但对光稳定性的改善程度更为显著^[13]. Kirchherr 等研究表明,载体疏水性越强,对 ICG 稳定性的改善效果越明显^[16]. 因此,ICG 和 TMC-PCL 胶束之间除静电相互作用外,或许还存在一定程度的疏水相互作用,从而使 ICG 负载后表现出比 PAH NCs 更高的稳定性.

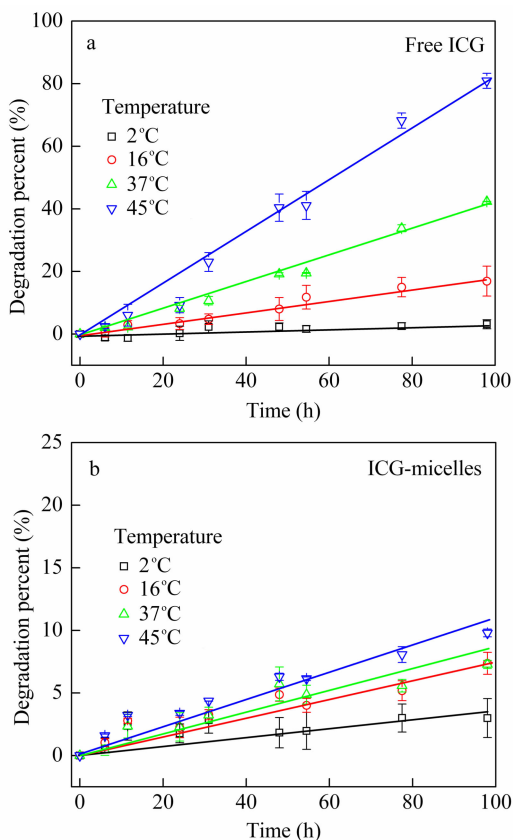


Fig. 4 The effect of temperature on the stability of free ICG (a) and ICG-micelles (b)

The concentrations of either free or the immobilized ICG were all fixed at 50 μg/mL, $\text{SO}_3^-/\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ ratio in the micelles was 0.065.

2.4 ICG 的光热效应

ICG 的光热行为如图 6 所示. 持续光照 1 min 后,游离 ICG 和 ICG-micelles 溶液都存在不同程度的温度提升,并且 ICG 含量越高,温度提升量 (ΔT) 越大. 当 ICG 浓度为 5 μmol/L 时,1 min 光照后 ICG-micelles 溶液可提升 5 ~ 6℃,即在实际应用中可以把环境温度从 37℃ 提升到 43℃ 左右.

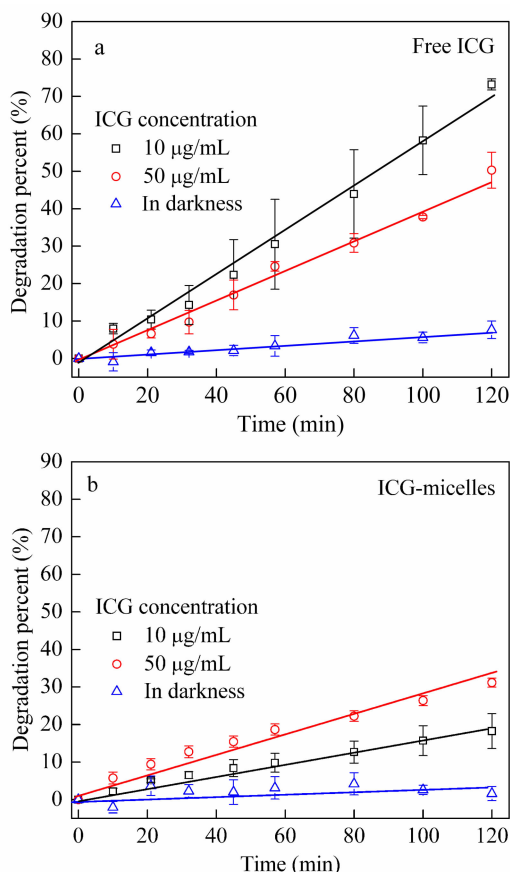


Fig. 5 The effect of light exposure on the stability of free ICG (a) and ICG-micelles (b)

The concentration of ICG-micelles was fixed at 0.5 mg/mL. $\text{SO}_3^-/\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ ratio in the micelles was 0.065 and 0.013, which equivalent to ICG concentration of 50 μg/mL and 10 μg/mL respectively.

文献研究表明 43℃ 的高温会对肿瘤细胞的细胞膜和细胞骨架产生不可逆的损伤,并能阻止其再修复^[19]. 因此,在 5 μmol/L ICG 浓度下光照 1 min,能起到杀灭肿瘤细胞的作用,但更低的 ICG 浓度光照后 ΔT 较小,对肿瘤细胞的杀灭作用会较之减弱. 从实验结果中,我们还发现 ICG-micelles 的 ΔT 大于游离 ICG 的 ΔT ,这意味着 ICG 经负载后,其光照升温能力增强. 然而 ICG 负载到其它类似载体中后,其光照升温能力不变甚至略微减弱^[15,20],如 ICG 负载到 PLGA NPs 后,光照升温能力反而较游离 ICG 有所降低,作者认为这是由于 PLGA 基质阻隔了热传递^[20]. 而对 TMC-PCL 胶束来说,ICG 主要通过静电吸附作用固定在胶束表面,这有利于热传导.

2.5 DOX 负载胶束体外释放行为的研究

本文采用 O/W 乳化法包载 DOX,不同 DOX/

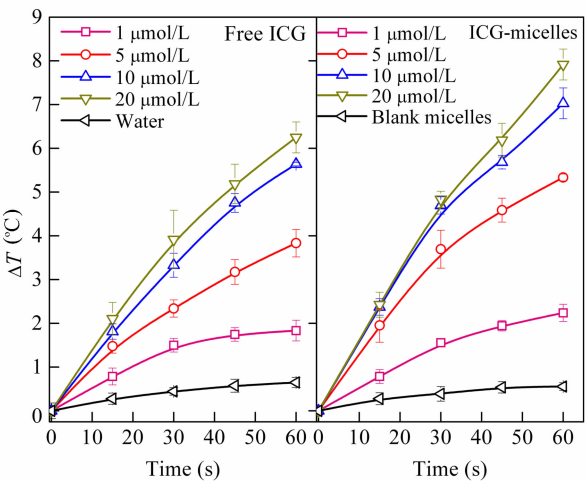


Fig. 6 Photothermal behaviors of free ICG and ICG-micelles after 1 min irradiation with varied ICG concentrations

胶束投料比下,DOX 的理论负载量、实际负载量和包封率如表 2 所示. TMC-PCL 胶束对 DOX 的负载有很高的 LC 和 EE,当 DOX 理论投药量为 5.30 wt% 时,负载后 LC 和 EE 分别为 4.92 wt% 和 92.32%;当理论投药量增大到 23.08 wt% 时,LC 仍可达 20.52 wt%. 本文以 DOX LC 为 20.52 wt% 的胶束(DOX-micelles 和 DOX-ICG-micelles)为典型,测定了 DOX 在 50 mmol/L, pH 7.4 PBS 中的释放行为(图 7). DOX 从 2 种胶束中的释放行为类似,表明 ICG 的存在对 DOX 释放几乎不产生影响. 为了考察温度对 DOX 释放的影响,我们还测定不同温度下的释放行为. 结果表明,升高温度能加速 DOX 释放,这可以归结为较高的温度提高了 DOX 在胶束中的扩散系数.

Table 2 The dependence of the loading content of DOX in DOX-micelles on the theoretical loading content

Theoretical loading content (wt%)	Actual loading content (wt%)	Entrapment efficiency(%)
5.30	4.92	92.32
10.71	9.49	87.42
23.08	20.52	86.03

2.6 细胞毒性研究

本文选取肝癌细胞 HepG2 为肿瘤细胞模型,比较了不同胶束体系在不同条件下对其细胞毒性(图 8). HepG2 是一种对 DOX 作用相对不敏感的细胞,文献表明 DOX 与 HepG2 共孵育 36 h 后,DOX 对 HepG2 的半致死量(IC₅₀)为 16.2 μg/mL^[21],而一般 DOX 敏感细胞的 IC₅₀ 小于 1 μg/mL. HepG2 对 DOX 的不敏感性或许是由该细胞

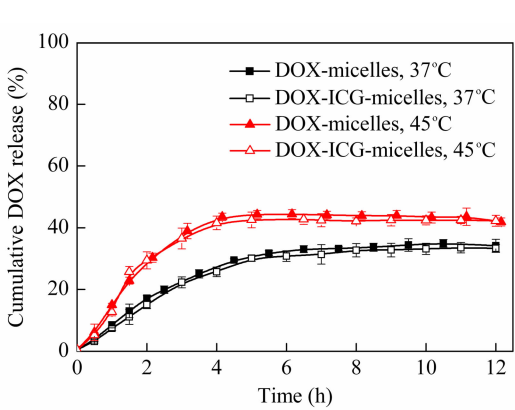


Fig. 7 DOX release profiles from DOX-micelles and DOX-ICG-micelles in pH 7.4, 50 mmol/L PBS at 37°C and 45°C ($\text{SO}_3^-/\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ ratio in DOX-ICG-micelles was 0.05.)

上 p53 基因变异导致^[21]. 选取 HepG2 为细胞模型,可更好地评价 DOX 和 ICG 在 TMC-PCL 胶束中的共负载,对肿瘤细胞的联合杀灭作用.

图 8(a)显示不同浓度的游离 DOX,空白胶束 + 游离 DOX, DOX-micelles 以及空白胶束对 HepG2 的细胞毒性. 不同组 DOX-micelles 的 LC 均为 16.7%,且每个 DOX 浓度组内 micelle 的含量相同. 由于 HepG2 对 DOX 的不敏感性,即使 DOX 含量从 2 μg/mL 提高到 10 μg/mL,游离 DOX 仍表现出较小的细胞毒性. 相同 DOX 含量,DOX-micelles 的细胞毒性比游离 DOX 增大许多,当 DOX 含量为 10 μg/mL 时,细胞毒性可提高 25% 左右. 而空白胶束 + 游离 DOX 组含有空白胶束,因此对细胞杀灭作用强于游离 DOX,但该组中 DOX 进入细胞的方式仍为扩散作用,因此细胞毒性小于 DOX-micelles 组.

图 8(b)显示游离 ICG 和 ICG-micelles (± 1 min 光照)对 HepG2 的细胞毒性. 为消除载体胶束所产生的细胞毒性的影响,不同组 ICG-micelles 中载体 TMC-PCL 胶束的含量均为 50 μg/mL. ICG 溶液和纯光照组的细胞存活率均接近 100%,而 ICG 或 ICG-micelles 溶液经过光照后,ICG 的光热效应使培养环境温度提升,对细胞造成一定损伤,从而导致细胞毒性增大. ICG 含量也能影响光照组的细胞毒性,ICG 含量越多,光热效应产生的热量越多,细胞毒性就越大,特别是当 ICG 含量为 5 μmol/L 时,ICG-micelles 光照前后细胞毒性可增大 13% 左右.

TMC-PCL 胶束共负载 DOX 和 ICG 的细胞毒

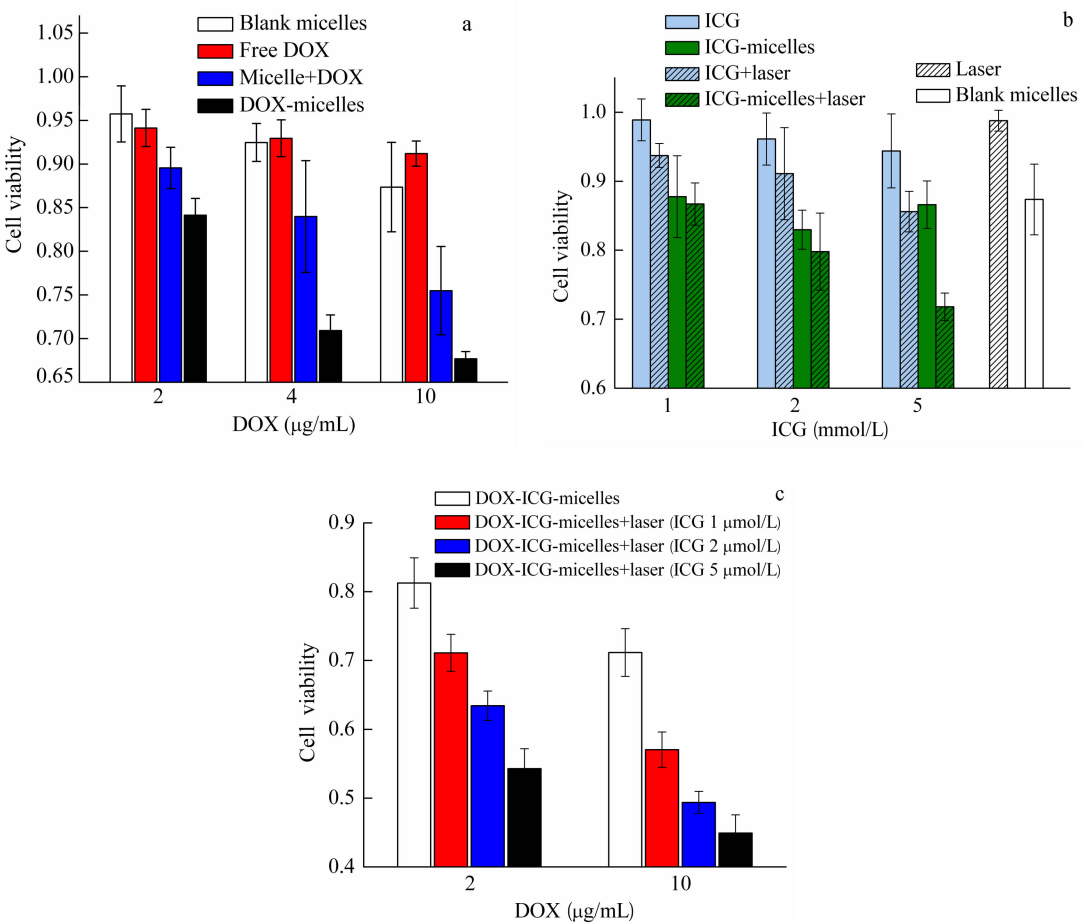


Fig. 8 (a) Cytotoxicity of blank micelles, free DOX, micelle + DOX and DOX-micelles towards HepG2 cells (LC of DOX for DOX-micelles was 16. 67% .), (b) Cytotoxicity of free ICG and ICG-micelles towards HepG2 cells (Content of TMC-PCL copolymers was fixed to 50 $\mu\text{g/mL}$ for each group of ICG-micelles. Irridiation lasted for 1 min.) and (c) Cytotoxicity of dual-agent-loaded micelles towards HepG2 (LC of DOX was fixed to 16. 67% , ICG content was varied from 1 $\mu\text{mol/L}$ to 5 $\mu\text{mol/L}$. Irridiation lasted for 1 min.)

性如图 8(c) 所示. 未施加激光辐照时, DOX-ICG-micelles 细胞毒性和相同 DOX 含量的 DOX-micelles 类似, ICG 的负载对 DOX-ICG-micelles 细胞毒性的贡献很小; 但施加辐照 1 min 后, DOX-ICG-micelles 的细胞毒性则大大增加, 且随着 ICG 含量的增加, 细胞毒性随之增大. 当 DOX 负载浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$, ICG 负载量为 5 $\mu\text{mol/L}$ 时, 光照前后细胞存活率从 0. 71 降低到 0. 44, 远低于单一载药胶束体系.

3 结论

TMC-PCL 阳离子胶束能同时负载 DOX 与 ICG, 且两者都有着很高的载药量和包封率. ICG 负载到 TMC-PCL 胶束后, 其光、热稳定性得到显著改善, 同时其光热效应也有提升. 在生理环境下, ICG 从 TMC-PCL 胶束中渗漏量较少. 共负载胶束经 1 min 近红外光照后, 表现出比两种单组分胶束更强的细胞毒性.

REFERENCES

- 1 Gaucher G, Dufresne MH, Sant VP. J Control Release, 2005, 109(1-3) : 169 ~ 188
- 2 Langer R. Nature, 1998, 392S(6679) : 5 ~ 10
- 3 Hamaguchi T, Kato K, Yasui H, Morizane C, Ikeda M, Ueno H. Brit J Cancer, 2007, 97(2) : 170 ~ 176
- 4 Yoo H S, Park T G. J Control Release, 2001, 70(1-2) : 63 ~ 70
- 5 Satoh T, Higuchi Y, Kawakami S. J Control Release, 2009, 136(3) : 187 ~ 195
- 6 Zhang H W, Cai G Q, Tang G P, Wang L Q, Jiang H L. J Biomed Mater Res Part B, 2011, 98B: 290 ~ 299

- 7 Kean T, Thanou M. *Adv Drug Deliver Rev*, 2010, 62(1): 3 ~ 11
- 8 Park J H, Saravanakumar G, Kim K, Kwon I C. *Adv Drug Deliver Rev*, 2010, 62(1): 28 ~ 41
- 9 Zhang K, Zhao M, Cai L, Wang Z K, Sun Y F, Hu Q L. *Chinese J Polym Sci*, 2010, 28(4): 555 ~ 561
- 10 Oshrat H F, Rozentur E, Benita S, Altschuler Y. *Biomacromolecules*, 2008, 9: 435 ~ 443
- 11 Landsman M L J, Kwant G, Mook G A, Zijlstra W G. *J Appl Phys*, 1976, 40: 575 ~ 583
- 12 Saxena V, Sadoqi M, Shao J. *J Pharm Sci*, 2003, 92: 2090 ~ 2097
- 13 Yaseen M A, Yu J, Wong M B, Anvari B. *J Biomed Optics*, 2007, 12: 064031
- 14 Kataoka K, Matsumoto T, Yokoyama M, Okano T, Sakurai Y, Fukushima S, Okamoto K, Kwon G S. *J Control Release*, 2000, 64: 143 ~ 153
- 15 Yu J, Yaseen M A, Anvari B, Wong M S. *Chem Mater*, 2007, 19: 1277 ~ 1284
- 16 Kirchherr A K, Briel A, Maeder K. *Mol Pharm*, 2009, 6: 480 ~ 491
- 17 Manchanda R, Fernandez-Fernandez A, Nagesetti A, McGoron A J. *Colloid Surface B*, 2010, 75: 260 ~ 267
- 18 Rodriguez V B, Henry S M, Hoffman A S, Stayton P S, Li X D, Pun S H. *J Biomed Optics*, 2008, 13: 014025
- 19 Hahn G M, Braun J, Har-Kedar I. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1975, 72: 937 ~ 940
- 20 Tang Y, Lei T J, Manchanda R, Nagesetti A, Fernandez-Fernandez A, Srinivasan S, McGoron A J. *Pharm Res*, 2010, 27: 2242 ~ 2253
- 21 Lee T K W, Lau T C M, Ng I O L. *Cancer Chemo Pharm*, 2002, 49: 78 ~ 86

CHITOSAN-BASED CATIONIC MICELLES FOR CO-INCORPORATION OF TWO TYPES OF DRUGS WITH DISTINCT HYDROPHILICITY

Hai-wen Zhang¹, Li-qun Wang^{1, 2}, Hong-liang Jiang^{1, 2}

(^a Department of Polymer Science and Engineering

^b Key laboratory of Macromolecular Synthesis and Functionalization, MOE, Hangzhou 310027)

Abstract Trimethylated chitosan-O-poly(ϵ -caprolactone) (TMC-PCL) micelles were used as nanocarriers for co-loading of two types of drugs with distinct hydrophilicity, including FDA-approved near-infrared (NIR) photosensitizer, indocyanine green (ICG) and a first-line anti-cancer drug, doxorubicin (DOX). Both two agents could be incorporated within the micelles with entrapment efficiency of more than 85% and loading content of up to 20%. The loading content could be adjusted by varying feed ratio of the agents to the micelles. A red-shift in absorption peak of ICG from 780 nm to 800 nm was observed upon incorporation in to the micelles. The competitive binding of the micelles to ICG molecules also increased the monomer/dimer ratio of ICG. TMC-PCL micelles showed an excellent ICG retention ability, and only 18.18% of ICG was leaked from micelles after 48 hours incubation in physiological media. In addition, the incorporation of ICG within the micelles enhanced its thermal and optical stability. ICG-loaded micelles (ICG-micelles) exhibited higher heating capacity than free ICG. DOX release behavior was affected by the temperature, while the presence of ICG within the micelles had little effect on DOX release. The cytotoxicity of the dual-agent-loaded micelles towards HepG2 cells was found to be higher than that of single-agent-loaded counterparts.

Keywords Chitosan, Cationic micelle, Co-incorporation, Tumor targeting.