

研究简报

聚谷氨酸基双重响应性纳米胶束的制备及药物控释性能

杨期颐,刘 明,奚 林,陶 蕾,谭 骏,石 刚,倪才华*

(江南大学食品胶体与生物技术教育部重点实验室,江南大学化学与材料工程学院,无锡 214122)

摘要:首先制备端氨基聚(*N*-异丙基丙烯酰胺-*co*-聚乙二醇)大分子引发剂,再通过端氨基引发 *L*-谷氨酸- γ -苄酯-*N*-羧酸酐开环聚合,制备了聚(*N*-异丙基丙烯酰胺-*co*-聚乙二醇)与聚(*L*-谷氨酸- γ -苄酯)的嵌段共聚物,将其中的 γ -苄酯基团转化为酰肼基团后与阿霉素(DOX)共价结合,最后在水溶液中自组装成纳米胶束,制备了温度和 pH 值双重响应性纳米胶束。胶束外层由亲水性聚(*N*-异丙基丙烯酰胺-*co*-聚乙二醇)组成,具有温敏性,低临界溶液温度为 38℃;胶束内层由聚(*L*-谷氨酸- γ -酰肼-阿霉素)组成。该胶束对于药物的释放具有温度和 pH 双重敏感性。

关键词:*L*-谷氨酸; *N*-异丙基丙烯酰胺; 阿霉素; 胶束; 脲键

引言

传统的化疗药物在正常组织和肿瘤细胞之间缺乏特异性,因而其在临床上的应用受到很大限制^[1]。如何有效减少非靶向器官的药物浓度,增强药物疗效,减小药物的毒害作用已经成为抗癌药物研究的热点。用高分子材料制备纳米胶束作为新型抗癌药物载体,为实现靶向控制释放带来了希望^[2~3]。双重响应性药物载体具有精确调控药物释放的能力,温度和 pH 是体内两个重要的环境因素,如何有效利用体内的环境变化进行靶向控制释放,是药物载体在体内应用需要解决的根本问题^[4~5]。

近年来,聚 *L*-谷氨酸由于良好的生物相容性、低免疫原型和易降解性等优点作为药物载体的研究备受关注^[6]。同时 *L*-谷氨酸侧链有悬挂的羧基,容易被功能化修饰,这为共价负载药物提供了可能性。目前已有文献报道用 *L*-谷氨酸制备的载药胶束^[7~10],但是均不具备温度和 pH 双重响应性。聚 *N*-异丙基丙烯酰胺(PNIPAm)具有优异的温敏性,被广泛用于药物载体的研究^[11]。但是 PNIPAm 的低临界溶液温度(LCST)为 32℃,在体内温度(37℃)下发生相变,无法作为注射剂型的药物载体通过血管内施药。

本文制备了一种双重响应性聚合物纳米胶束,通过聚 *L*-谷氨酸的侧基共价负载阿霉素,并以此作为胶束的内层,以 PNIPAm 与聚乙二醇共聚物作为胶束外壳,调节其 LCST 温度到 37℃,以克服其低温不稳定的弊端;研究了胶束的结构及其对药物的控制释放,从而探讨该纳米胶束在体内使用的可行性问题。

1 实验部分

1.1 主要原料与试剂

L-谷氨酸- γ -苄酯(BLG)参照文献方法^[12~13]制备,*L*-谷氨酸- γ -苄酯-*N*-羧酸酐(BLG-NCA)参照文献方法^[14]制备,烯丙基聚乙二醇(APEG,江苏海安化工),巯基乙胺(AET,国药集团化学试剂有限公司),阿霉素(DOX,湖北省随州天丰化工科技有限公司)偶氮二异丁腈(AIBN)在无水乙醇中重结晶两

10.14028/j.cnki.1003-3726.2015.08.009

收稿:2014-12-08;修回:2015-02-11;

基金项目:基金资助:国家自然科学基金(21401079),江苏省科技支撑计划-工业部分(BE2012017);

作者简介:杨期颐,女,硕士研究生,研究方向为医用高分子材料,E-mail:Yangqi2014@126.com;

* 通讯联系人,E-mail:nicaihua2000@163.com.

次, *N*-异丙基丙烯酰胺(NIPAm, 上海物竞化工有限公司)在甲苯/正己烷中重结晶两次。

1.2 端氨基聚(*N*-异丙基丙烯酰胺-*co*-聚乙二醇)的合成

在三口烧瓶中加入 APEG 0.16g 和 NIPAm 4.00g, 添加 0.165g AIBN 和 0.115g AET, 无水乙醇为溶剂, 在氮气保护下 60℃ 反应 12h, 减压蒸馏除去大部分溶剂并缓慢滴入到大量无水乙醚中得到白色沉淀, 过滤后在 35℃ 下真空干燥得粗产物。将粗产物溶于二次蒸馏水中, 升温后出现沉析, 用热水多次洗涤, 室温下真空干燥得白色产物, 为端氨基聚(*N*-异丙基丙烯酰胺-*co*-聚乙二醇), 产率为 76%, 简写: PNE-NH₂。

1.3 聚(*N*-异丙基丙烯酰胺-*co*-聚乙二醇)-聚 *L*-谷氨酸-γ-苄酯嵌段共聚物的合成

在预先用氮气置换过的三口烧瓶中依次加入不同投料比(见表 1)的 PNE-NH₂ 和 BLG-NCA, 以 40mL CH₂Cl₂ 为溶剂, 氮气保护下室温反应 72h, 反应液滴加到无水乙醚中沉淀, 有白色固体析出, 过滤后真空干燥产物, 得到聚(*N*-异丙基丙烯酰胺-*co*-聚乙二醇)-聚 *L*-谷氨酸-γ-苄酯嵌段共聚物, 简写为 PNN。

1.4 空白胶束及载药胶束的制备及其载药量和包封率的测定

采用共溶剂挥发法制备胶束。将 5mg 共聚物 PNN 加入到 1mL 的 THF 中磁力搅拌 5min 使其完全溶解, 缓慢滴加 12mL 蒸馏水继续搅拌 24h 使胶束稳定, 胶束溶液转移到透析袋(MWCO=3500)中室温(25℃)下透析 24h。

在三口烧瓶中依次放入 1.5g 共聚物 PNN-2、8.0g 水合肼和无水乙醇, 40℃ 冷凝回流 5h 后得白色浑浊液体, 用无水乙醇洗涤、过滤、真空干燥 48h 得米白色产物。称取一定量该产物溶于 2mL THF 中, 加入已除盐酸的阿霉素溶液, 缓慢滴加蒸馏水直到溶液有淡红色且有明显丁达尔效应为止, 避光磁力搅拌 12h 使载药胶束稳定, 将载药胶束溶液转移到截留分子量为 3500 的透析袋内, 室温(25℃)下避光透析 24h 后于容量瓶中定容避光保存, 载药胶束简写为 PNN-DOX, 合成路线见图 1。

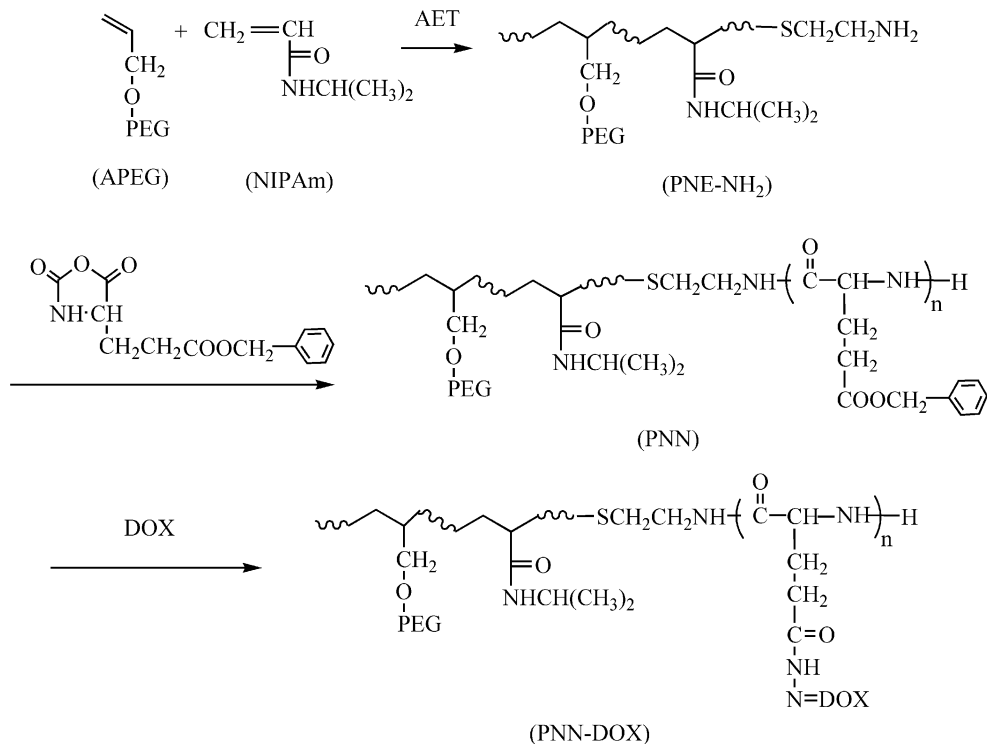


图 1 载药胶束合成路线

Figure 1 Synthesis of the drug loaded micelles

精确量取上述制备好的载药胶束 5mL,采用 0.01mol/L 的 HCl 溶液调节其 pH 为 6.0 左右,6000r·min⁻¹ 超速离心 20min 后取上层清液,利用紫外分光光度计测定该上清液在 483nm 处的吸光度,平行该实验三次,根据标准曲线计算得到载药率为 15.3%,包封率为 79.8%。

1.5 共聚物性能测试及表征

分别采用红外光谱仪(FTLA2000-104 型,加拿大 ABB 公司)、核磁共振波谱仪(AVANCE Digital 400Mz 型,美国 VARIAN 公司)对共聚物结构进行测定;采用 GPC(GPC1515/2414 型,美国 Waters 公司)和纳米粒度仪(DB-525 型,美国 Brookhaven 公司)分别对共聚物的分子量分布及其胶束粒径分布进行表征。

1.6 药物释放的测定

温度控制释放:取 5mL 载药胶束溶液于透析袋内,置于 pH=4.0 的缓冲溶液中,在不同温度下进行释放,定时取 4mL 袋外缓冲溶液,利用紫外分光光度计检测药物浓度,计算累积释放率,每次取样后补充同体积缓冲溶液。pH 值控制释放时操作步骤同上,但温度恒定为 37℃。

1.7 空白胶束及载药胶束的细胞毒性测试

采用 MTT 法对聚谷氨酸基纳米胶束(PNN-2)进行细胞毒性评估测试,选取处于对数生长期的 3T3 细胞为模型,用含有 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基(即 RPMI-1640 完全培养基)将其稀释成浓度为 6×10^4 /mL 的细胞悬液,将该悬液接种至 96 孔培养板,每孔接种 100 μ L,放置环境温度为 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,24h 后去培养基。每孔均注入 100 μ L 完全培养基、含质量浓度为 0.64%苯酚的完全培养基、含质量浓度梯度为 0.1、0.25、0.5、0.75、1.0mg/mL 的 PNN-2 完全培养基,每组平行设置 3 个复孔,三组分别设定为阴性对照组、阳性对照组和实验组。继续放置上述培养箱中培养,采用 MTT 法计算 48h 后细胞相对增值率 RGR。

选择 HeLa 细胞为模型考察 PNN-2 载药胶束的细胞毒性,同上操作每孔分别加入 100 μ L 含阿霉素浓度为 0.1、0.5、1.0、5.0、10、20、30、40 μ g/mL 载药胶束的完全培养基(PNN-DOX)、含对应浓度的自由阿霉素的完全培养基(Free DOX)以及含 PNN-2 聚合物胶束的完全培养基(Blank),每组设定 3 个复孔。将孔板放入培养箱中培养 48h 后取出,采用 MTT 法计算细胞存活率(%)。

2 结果与讨论

2.1 红外和核磁分析

与图 2 中(a)曲线相比,(b)曲线在 3330cm⁻¹处吸收峰加强,这是 PNE-NH₂ 与 BLG-NCA 开环聚合后生成—NH—吸收峰所致;位于 1750cm⁻¹处有新的吸收峰,这是 BLG 上的—C=O—吸收峰,1675cm⁻¹和 1553cm⁻¹处吸收峰明显加强,且 770cm⁻¹和 695cm⁻¹处有两个新的吸收峰,这是 BLG 上苯环的单取代特征峰。与图 2(b)相比,图 2(c)位于 1750cm⁻¹、770cm⁻¹和 695cm⁻¹的吸收峰消失,说明 PNN 中- γ -苄酯基团经酰肼化反应已转化为- γ -酰肼基团,与图 2 中(b)曲线的 1680cm⁻¹吸收峰相比,其向低波数移动至曲线 2(c)处 1665cm⁻¹,这是共聚物 PNN 中 BLG 链段经酰肼化后结合 DOX 产生 p- π 共轭作用的结果,说明 DOX 经胺键与共聚物结合。

图 3 显示样品 PNN-2 的¹HNMR 核磁谱图, δ =3.53ppm 对应 APEG 上乙氧基质子峰(CH₂CH₂O, 4H); δ =1~2ppm 对应亚甲基 CH₂ 和次甲基 CH 质子峰; δ =1.01ppm 对应 PNIPAm 异丙基上的 2 个甲基质子峰(—CH₃, 6H); δ =7.2ppm 对应 PBLG 上苄基的苯环质子峰(—C₆H₅, 5H); δ =8~8.4ppm 对应 PBLG 两端的氨基 NH 质子峰; δ =5.0ppm 为 PBLG 苄基上的亚甲基 CH₂ 和 PNIPAm 上酰胺键的氨基 NH 重叠峰。综合 IR 和¹HNMR 的分析,推断产物为 PNN 共聚物。根据 PNIPAm 异丙基上的甲基质子峰与 PBLG 苄基上的苯环质子吸收峰积分面积,可以确定共聚物的组成。

2.2 共聚物相对分子量的测定

将样品溶于 THF 中,以 PEG 为标样,测定共聚物的分子量(M_n)及分布(PDI)。从表 1 可以看出,随

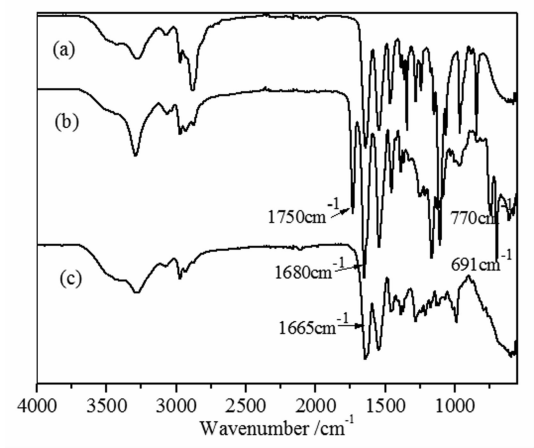


图 2 聚合物的红外谱图
a. PNE-NH₂; b. PNN-2; c. PNN-DOX
Figure 2 FTIR spectra of copolymers
a. PNE-NH₂; b. PNN-2; c. PNN-DOX

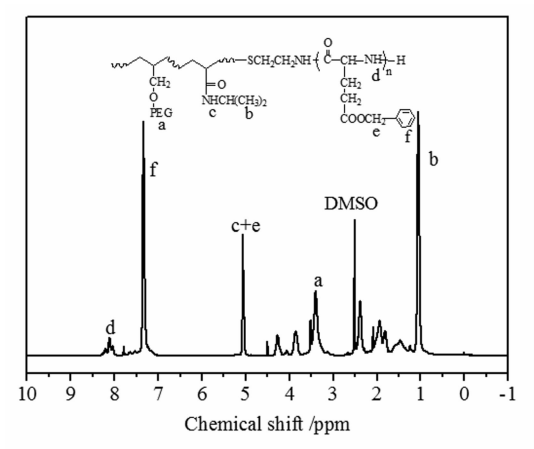


图 3 聚合物 PNN-2 核磁谱图
Figure 3 ¹H-NMR spectra of the PNN-2 copolymers

着 BLG-NCA 投料的增多,所得聚合物 PNN 的分子量增大,分子量分布较窄,表明共聚物 PNN 的分子量可以通过引发剂 PNE-NH₂ 与单体 BLG-NCA 的投料比调控。

表 1 聚合物的分子量
Table 1 Molecular weights of copolymer

共聚物	投料比 ^a	PBLG 聚合度 ^b	分子量 ^c	分布系数
PNN-1	1∶2.0	16	5196	1.17
PNN-2	1∶2.5	22	6367	1.25
PNN-3	1∶3.0	27	7224	1.34
PNN-4	1∶3.5	30	7838	1.32

^a PNE-NH₂ 和 BLG-NCA 质量投料比;^b由核磁测得;^c由 GPC 测得。

2.3 载药前后粒径的变化

配制浓度为 1.0mg/mL 的空白胶束和载药胶束溶液,调节 pH=7.0,在 25℃ 条件下测定该胶束溶液

载药前后粒径的分散情况。从图 4 中可以明显看出胶束载药后平均粒径增大约 68nm,因为 DOX 与 PNN-2 经胺键共价结合形成疏水链段位于胶束内核,由于疏水链段的缔合作用导致胶束粒径增大。图右上角为空白胶束纳米粒子的 SEM 照片,图中看出粒子呈球形,粒子表面光滑,粒径分布均匀。由于纳米粒子干燥后脱水,因此 SEM 显示的粒径小于纳米粒度仪测出的粒径。

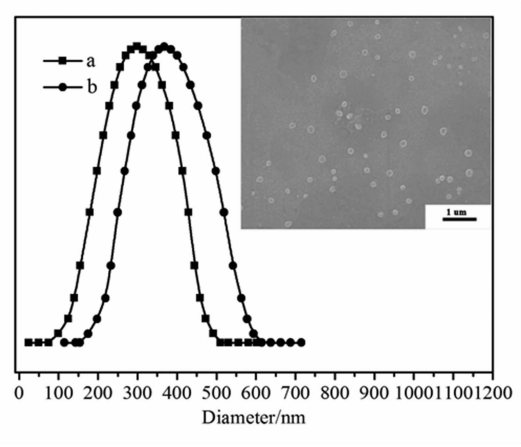


图 4 PNN-2 纳米粒子粒径及空白纳米粒子扫描电镜图
(a)空白粒径;(b)载药粒径
Figure 4 PNN-2 Particle size of particles and SEM images of the Blank micelles
(a) Blank nanoparticles; (b) Doxorubicin nanoparticles

2.4 温度对载药胶束粒径的影响

从图 5 中可以看出,在 25~35℃ 范围内,随着温度的升高,载药胶束的粒径有所减小;当温度继续升高时,胶束的粒径急剧增大,当温度到 40℃ 左右时,粒径增大至 616nm 后趋于不变。作粒径对温度的一阶微商(dD/dT)分析,曲线变化率最大值温度为 38℃,定义为该载药胶束的 LCST(低临界溶液温度)值。温度升高时,胶束外壳 PNIPAm 链段的疏水性增加,壳层部分出现塌陷,同时升高温度使分子热运动加剧,部分壳层水分子被排出,胶束粒径有所减小,当温度升高到共聚物的 LCST 值(38℃)时,PNIPAm 链段蜷缩并且吸附在胶束内核的表面,单个粒子之间因疏水作用倾向于团聚,粒径急剧增大,最后趋于不变。然而在升温过程中,具有良好亲水性的 PEG 位于胶束的外壳,仍然维持胶束体系的稳定性。

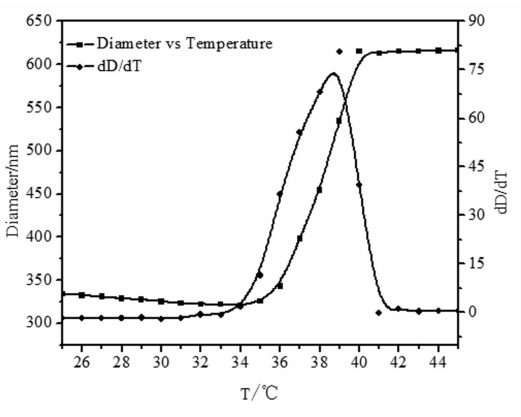


图 5 温度对载药粒子粒径的影响
Figure 5 The effect of temperature on the drug-loaded micelles size

2.5 不同温度和 pH 值下的药物释放

图 6 显示载药胶束在不同温度下药物的累计释放率,可以看出:随着温度的升高,药物的累计释放率

增大,释放速率加快,具有明显的温度响应性。当温度低于壳层的 LCST 时,载药胶束结构稳定,疏水性的药物 DOX 通过物理包埋和共价结合两种方式负载在胶束内。当温度升高时,位于壳层的 PNIPAm 链段发生相转变,链段从自由伸展的状态蜷缩成一团,胶束内部的水分子和部分被包埋的药物也会随着 PNIPAM 链段的蜷缩被排出,温度越高,分子热运动越快,药物的释放速率也快。

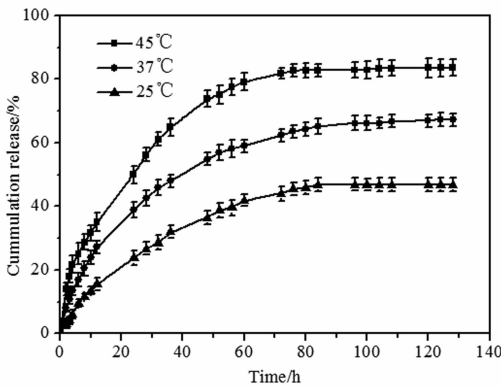


图 6 温度对载药胶束药物释放的影响

Figure 6 The effect of temperature on the release of doxorubicin from Drug loaded-micelles

图 7 为载药胶束在不同 pH 值的 PBS 溶液中的释放规律,由此看出:随着 pH 降低,释放速度和累计释放量增大。在中性或弱碱性条件下(pH=7.0 和 7.4)释放量仅为 10%~15%,释放初期有少量突释,这部分源自于药物的物理包埋;而在 pH=4.0 和 5.0 时,释放明显加快,累计释放率迅速增加,这是因为 DOX 通过胍键与 PNN 共价结合,在酸性介质中, H^+ 渗透到胶束内核,刺激胍键断裂,促使 DOX 从胶束内核中释放出来;从图中可以看出药物在中后期几乎是匀速释放,接近理想的药物释放过程;图中还可以观察到在本实验所考察的条件下,载药胶束最终的累积释放量均没有达到 100%,此原因在于部分药物被负载于载体的内核,该药物的释放还有赖于载体的降解。由此可见该药物载体负载阿霉素可以大大降低药物的毒副作用,增强疗效。

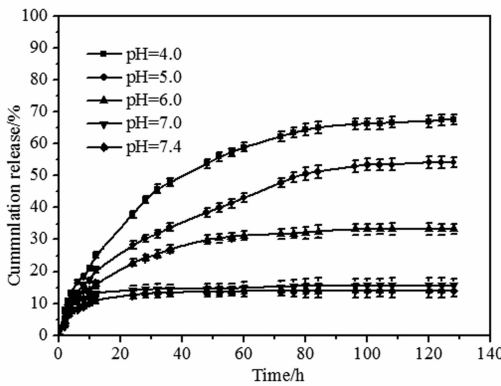


图 7 介质 pH 对载药胶束释放的影响 $T=37^{\circ}\text{C}$

Figure 7 The effect of pH on the release of doxorubicin from Drug loaded-micelles $T=37^{\circ}\text{C}$

2.6 细胞毒性分析

采用 3T3 细胞考察聚谷氨酸基纳米胶束(PNN-2)的细胞毒性,实验测得各浓度梯度的 RGR 均大于 100%,参照表面样品的细胞毒性反应等级为 0 级,表明所制备的纳米胶束无毒。图 8 为含质量浓度为 0.1mg/mL 的 PNN-2 完全培养基中 3T3 细胞的形貌,对比阳性对照组 B,实验组 A 中细胞生长良好,表明所制备的纳米胶束具有良好的生物相容性。

表 2 细胞相对增值率与其活性等级关系

Table 2 The relationship between RGR and cytotoxicity

毒性等级	0 级	1 级	2 级	3 级	4 级	5 级
RGR	≥100	75~99	50~74	25~49	1~24	0

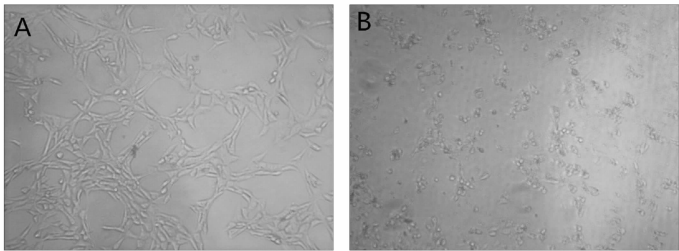


图 8 在不同介质中培养的 3T3 细胞显微镜照片

A 为实验组;B 为阳性对照组

Figure 8 The image of 3T3cell in different medium

A experimental group; B positive control group

采用 MTT 法测定各浓度梯度下的载药胶束(PNN-DOX)所对应的 HeLa 细胞存活率(%)如图 9。图中显示载药胶束的 $IC_{50}=13.6\mu\text{g/mL}$,其要小于自由阿霉素的药效。值得注意的是,高浓度的自由阿霉素不可能长时间与肿瘤细胞发生作用,如图 9 在 48h 内阿霉素浓度均为 $10\mu\text{g/mL}$ 时,载药胶束的细胞存活率约为 55%而自由阿霉素的细胞存活率不到 20%。上述结果表明,在 PNN-2 聚合物中引入酸敏感的腙键共价负载阿霉素能促进药物在细胞内释放,提高载药胶束的抗肿瘤效果,达到药物缓释的目的。

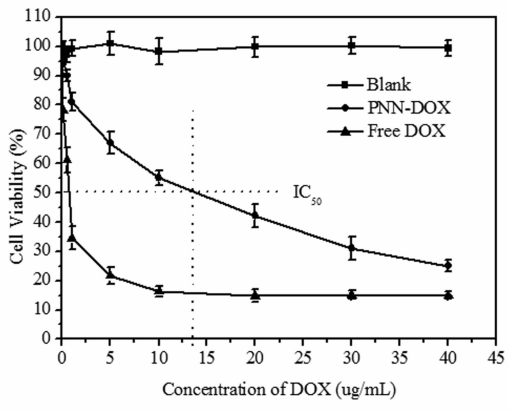


图 9 PNN-2 载药胶束和 PNN-2 聚合物胶束在 HeLa 细胞中孵育 48h 后得细胞毒性

Figure 9 The cell toxicity of PNN-2 drug loaded micelles and PNN-2 copolymer after incubation 48h

3 结论

制备了大分子引发剂,并由此引发 *L*-谷氨酸- γ -苄酯-*N*-羧酸酐开环聚合,制备了聚(*N*-异丙基丙烯酸酰胺-*co*-聚乙二醇)-聚 *L*-谷氨酸- γ -苄酯嵌段共聚物。该共聚物可以共价负载阿霉素,在水溶液中自组装形成温度和 pH 双重响应性的载药纳米胶束,对药物释放具有温度和 pH 响应性。该纳米胶束有望作为注射剂型药物载体用于肿瘤治疗。

参考文献:

[1] 许金霞,唐建斌,赵鲁杭. 药学报,2009,44:1328~1335.

- [2] 向苗, 芊凤玲, 柳明珠. 高分子通报, 2008, 5: 20~26.
- [3] Lee ES, Na K, Bae YH. J Control Release, 2003, 91: 103~113.
- [4] Yuan Y, Luo K, Yusi Lai A. Molecular Pharmaceutics, 2010, 4: 953~962.
- [5] Zhang Y W, Jiang M, Zhao J X. Langmuir, 2005, 21: 1531~1534.
- [6] Li G Y, Guo L, Meng Y F. Chemical Engineering Journal, 2011, 174: 199~205.
- [7] Luo K, Yin B J, Song Z J. Biomacromolecules, 2008, 9: 2653~2661.
- [8] Sun H L, Meng F H, Aylvin A. Dias. Biomacromolecules, 2011, 12: 1937~1955.
- [9] F Mathot, L. van Beijsterveldt, V. Préat, M. Brewster, A. Ariën. J Control Release, 2006, 111: 47~55.
- [10] Barn J B s, Chen B H. BioresTachn, 2011, 102: 8868~8876.
- [11] Mani P, Jamison J G, Srikanth P. Biomaterials, 2009, 30: 5757~5766.
- [12] 张国林, 吴秋华, 潘彤. 高分子学报, 2004, 2: 223~227.
- [13] 张洁, 伍国林, 王铮, 徐旭, 王亦农. 高分子学报, 2009, 12: 1179~1185.
- [14] Li G, Song S, Guo L, S. Ma. J Polym Sci. Part A: Polym Chem. 2008, 46: 5028~5035.

Synthese of Temperature and pH Dual Responsive Nano Micelles Based on Poly (L-Glutamic Acid) and the Drug Release Profile

YANG Qi-yi, LIU Ming, XI Lin, TAO Lei, TAN Jun, SHI Gang, NI Cai-hua^{*}

(The Key Laboratory of Food Colloids and Biotechnology, Ministry of Education, School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-polyethylene glycol)-*b*-poly(*L*-glutamic acid- γ -benzyl ester) was synthesized by ring opening polymerization of *N*-carboxyl anhydride of γ -benzyl-*L*-glutamate (NCA) using the amino terminal macromolecule as an initiator. The γ -benzyl ester groups in side chain were converted into hydrazide by hydrazine hydrate. Doxorubicin (DOX) was covalently loaded on the terpolymer, yielding nano micelles with DOX-loaded poly(*L*-glutamic hydrazide) as the core, and poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-poly ethylene glycol) as the hydrophilic shell. The micelles could be used as a drug carrier, showing temperature and pH dual responsive behaviors.

Key words: *L*-glutamic acid; *N*-isopropylacrylamide; DOX; Micelles; Hydrazine