

载阿霉素 PLGA-PLL-PEG 纳米粒的制备及抑瘤作用研究

刘 炜^{1*}, 王晓彤¹, 王建华^{2#} (1.首都医科大学附属北京世纪坛医院药剂科, 北京 100038; 2.解放军总医院老年医学研究所, 北京 100853)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)16-2262-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.16.28

摘要 目的:制备载阿霉素聚乳酸羟基乙酸-聚赖氨酸-聚乙二醇(PLGA-PLL-PEG)纳米粒,并研究其抑瘤作用。方法:应用 PLGA-PLL 和活化 PEG 聚合而成的 PLGA-PLL-PEG 为载体包载阿霉素,制得载阿霉素 PLGA-PLL-PEG 纳米粒。检测纳米粒的形态大小、粒径分布、阿霉素的含量,计算载药量和包封率,比较纳米粒和阿霉素在 144 h 内的累积释放率(Q)和对乳腺癌 HeLa 细胞的增殖抑制率,计算半数抑制率(IC_{50})。结果:所制载阿霉素 PLGA-PLL-PEG 纳米粒为规则圆形,分散性良好,无黏连,平均粒径为 (136.7 ± 9.3) nm ($n=5$),平均包封率为 $(76.67 \pm 8.63)\%$,平均载药量为 $(3.86 \pm 0.55)\%$ ($n=3$);阿霉素的 Q_{12h} 达 100%,载阿霉素 PLGA-PLL-PEG 纳米粒的 Q_{24h} 为 52.9%、 Q_{144h} 为 81.2%。载阿霉素 PLGA-PLL-PEG 纳米粒对 HeLa 细胞的增殖抑制率较阿霉素增长缓慢,二者的 IC_{50} 分别为 1.844、0.345 $\mu\text{g/mL}$ 。结论:成功制得载阿霉素 PLGA-PLL-PEG 纳米粒,其具有良好的缓释效果,其抑瘤作用强于阿霉素。

关键词 阿霉素;聚乳酸羟基乙酸-聚赖氨酸;聚乙二醇;纳米粒;肿瘤细胞;抑制

Study on Preparation and Antitumor Activity of Adriamycin-loaded PLGA-PLL-PEG Nanoparticles

LIU Wei¹, WANG Xiaotong¹, WANG Jianhua² (1.Dept. of Pharmacy, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China; 2.Institute of Geriatrics, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare adriamycin-loaded PLGA-PLL-PEG nanoparticles, and study its antitumor activity. METHODS: PLGA-PLL-PEG with the polymerization of PLGA-PLL and activated polyethylene glycol was used as carrier for adriamycin, and adriamycin-loaded PLGA-PLL-PEG nanoparticles were prepared. The shape size, particle size distribution, adriamycin content of nanoparticles were detected, drug loading and encapsulation efficiency were calculated. Cumulative release rate (Q) of nanoparticles and adriamycin within 144 h and its proliferation inhibition rate on breast cancer HeLa cells were compared, and half inhibitory rate (IC_{50}) was calculated. RESULTS: Prepared adriamycin-loaded PLGA-PLL-PEG nanoparticles were regular circular with good dispersion and no adhesion. The average particle size was (136.7 ± 9.3) nm ($n=5$), average encapsulation efficiency was $(76.67 \pm 8.63)\%$, average drug loading was $(3.86 \pm 0.55)\%$ ($n=3$). Q_{12h} of adriamycin had reached 100%; Q_{12h} of adriamycin-loaded PLGA-PLL-PEG nanoparticles was 52.9%, Q_{144h} was 81.2%. The inhibitory rate of adriamycin-loaded PLGA-PLL-PEG nanoparticles on HeLa cells increased slowly than adriamycin; IC_{50} were 1.844, 0.345 $\mu\text{g/mL}$, respectively. CONCLUSIONS: Adriamycin-loaded PLGA-PLL-PEG nanoparticles are prepared successfully, showing good sustained-release effect and more significant inhibitory effect than adriamycin.

KEYWORDS Adriamycin; PLGA-PLL; PEG; Nanoparticles; Tumor cells; Inhibitory

阿霉素是蒽环类抗肿瘤药物,通过干扰转录过程,阻止信使 RNA(mRNA)的形成发挥抗肿瘤作用,目前在临床上常用于各种实体肿瘤治疗^[1]。传统的抗肿瘤药物给药方法难以使药物浓度聚集在肿瘤局部,因此临床疗效差,而且对全身组织器官的毒副作用显著。本研究旨在应用具有缓控释特点的骨架型高分子材料,通过改变药物剂型来改变药物的释放特点,并应用于局部肿瘤治疗中,使肿瘤局部持续缓慢地形成高浓度药物,以增强抗肿瘤作用,并降低其对机体的毒副作用。聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)是一类可生物降解的高分子聚合

物,聚赖氨酸(PLL)是具有氨基酸重复单元的多肽,具有带正电的氨基基团,经过 PLL 修饰后的 PLGA 纳米粒,能显著增加细胞的摄取率,再通过聚乙二醇(PEG)修饰可以延长纳米粒在体内的循环时间。本研究应用复乳法,以 PLGA-PLL 和活化的 PEG 聚合而成的 PLGA-PLL-PEG 为载体包载阿霉素,制成载阿霉素 PLGA-PLL-PEG 纳米粒,并观察其体外释放行为和抗肿瘤作用,旨在为研究抗肿瘤药物的局部应用剂型提供依据。

1 材料

1.1 仪器与透析袋

F-7000 荧光分光光度计、JEM-200CX 透射电子显微镜(日本日立公司);Zetasizer-3000 激光粒度分布测量仪(英国 Malvern 公司);ST16 离心机(美国 Thermo 公司);伯乐 680 全自动酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);透析袋(美

* 副主任药师,硕士。研究方向:药剂学。电话:010-63926411。
E-mail:liuwei8090@126.com

通信作者:副研究员,硕士。研究方向:老年医学。电话:010-66876421。E-mail:rambler973@sohu.com

国MFPI公司,截留分子量:7 000)。

1.2 药品与试剂

阿霉素原料药(大连美仑生物技术有限公司,批号:160219,纯度:99.0%);PLGA-PLL(美国Sigma公司,批号:16010785,分子量:2 000);活化PEG(CDI-PEG-CDI,上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:20160317,分子量:2 000);聚乙烯醇(PVA)、二甲基甲酰胺(DMF)、二甲基亚砷(DMSO)、二氯甲烷(国药集团化学试剂有限公司,均为分析纯);MTT(上海碧云天生物技术研究所,分析纯)。

1.3 细胞

乳腺癌HeLa细胞由中国科学院上海细胞库提供。

2 方法

2.1 PLGA-PLL-PEG的制备

取0.5 g CDI-PEG-CDI,溶于无水DMF中,再加入1.0 g PLGA-PLL,搅拌反应48 h。CDI-PEG-CDI带有活泼的酰基咪唑基团,可以酰胺键与PLGA-PLL的氨基酸基团相连,生成PLGA-PLL-PEG。反应结束后,用透析袋透析上述反应液,共24 h,将透析后的产物真空干燥24 h,得PLGA-PLL-PEG。

2.2 载阿霉素PLGA-PLL-PEG纳米粒的制备

取一定量的PLGA-PLL-PEG溶于2 mL二氯甲烷中,作为油相;取阿霉素溶于聚山梨酯80水溶液(质量浓度为60 mg/mL)10 mL中,作为水相;将水相逐滴加至油相中,超声形成乳液。将上述乳液加入至50 mL PVA水溶液(质量浓度为3 mg/mL),搅拌2 h,15 000 r/min(离心半径14 cm)离心30 min,冷冻干燥24 h,得载阿霉素PLGA-PLL-PEG纳米粒。

2.3 纳米粒的特征

取适量的载阿霉素PLGA-PLL-PEG纳米粒,用超纯水稀释,滴在载有碳膜的铜网上,应用透射电子显微镜分析纳米粒的形态大小。同样取稀释的纳米粒应用激光粒度分布测量仪分析其粒径分布。

2.4 阿霉素的含量测定

参考文献[2]方法,应用荧光分光光度计对阿霉素的含量进行测定,激发波长为485 nm,发射波长590 nm。

2.5 纳米粒的载药量与包封率

取一定量冷冻干燥的载阿霉素PLGA-PLL-PEG纳米粒粉末,溶于定量DMSO溶液中,稀释至一定浓度,按照“2.4”项下方法测定纳米粒中阿霉素的含量,计算纳米粒的载药量和包封率。载药量(%)=纳米粒中阿霉素的质量/纳米粒的质量×100%,包封率(%)=纳米粒中阿霉素的质量/阿霉素的加入质量×100%。

2.6 纳米粒的体外释放试验

精密量取适量的载阿霉素PLGA-PLL-PEG纳米粒,分散于pH 7.4磷酸盐缓冲液(PBS)中,置于透析袋中,再将透析袋置于200 mL释放介质(pH 7.4 PBS)中,在

37 °C恒温摇床中进行释放试验。分别于2、4、6、8、10、12、24、48、72、96、120、144 h取样,取样同时补加等量等温释放介质,测定样品中阿霉素含量,计算累积释放率(Q)。另取阿霉素原料药作为对照,按上述方法测定其Q,比较载阿霉素PLGA-PLL-PEG纳米粒和阿霉素在不同时间点的Q。

2.7 纳米粒的抑瘤作用

调整HeLa细胞密度为 2×10^4 个/mL,接种在96孔板上,试验分为阿霉素组和纳米粒组,分别加入阿霉素质量浓度为0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的阿霉素原料药或载阿霉素PLGA-PLL-PEG纳米粒,每个浓度设5个复孔。作用12、24、48、72、96 h后,移除含药培养基,每孔加入200 μL 含10% MTT(0.5 mg/mL)的达尔伯克氏改良伊格格培养基(DMEM培养基),继续培养4 h后,弃含MTT的培养基,每孔加入200 μL 的DMSO。用酶标仪测定490 nm波长下的光密度(OD),计算细胞增殖抑制率,细胞增殖抑制率(%)=(1-加药孔OD值)/空白对照孔OD值×100%。应用SPSS 18.0软件计算细胞半数抑制浓度(IC₅₀)。

3 结果

3.1 纳米粒的表征

所制载阿霉素PLGA-PLL-PEG纳米粒为规则圆形,分散性良好,无粘连,平均粒径为(136.7 ± 9.3) nm(n=5)。载阿霉素PLGA-PLL-PEG纳米粒的透射电镜图见图1,粒径分布见图2。

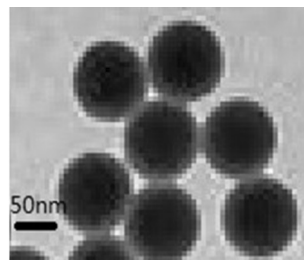


图1 载阿霉素PLGA-PLL-PEG纳米粒的透射电镜图
Fig 1 TEM images of adriamycin-loaded PLGA-PLL-PEG nanoparticles

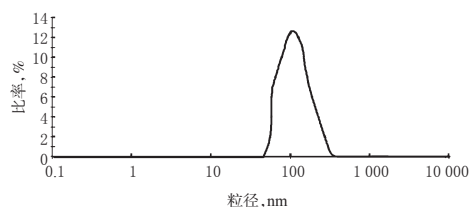


图2 载阿霉素PLGA-PLL-PEG纳米粒的粒径分布
Fig 2 Particle size distribution of adriamycin-loaded PLGA-PLL-PEG nanoparticles

3.2 纳米粒的包封率与载药量

所制3批载阿霉素PLGA-PLL-PEG纳米粒的包封率分别为77.6%、74.9%、77.5%,平均值为(76.67 ± 8.63)%;载药量分别为3.85%、3.78%、3.95%,平均值为

(3.86 ± 0.55)%。

3.3 体外释放行为

阿霉素的 Q_{2h} 为83.6%, Q_{12h} 已达100%;载阿霉素PLGA-PLL-PEG纳米粒的 Q_{12h} 为41.3%, Q_{24h} 为52.9%, Q_{144h} 为81.2%。结果提示阿霉素PLGA-PLL-PEG纳米粒具有缓释作用,可持续释放144 h以上。阿霉素和载阿霉素PLGA-PLL-PEG纳米粒的释放曲线见图3。

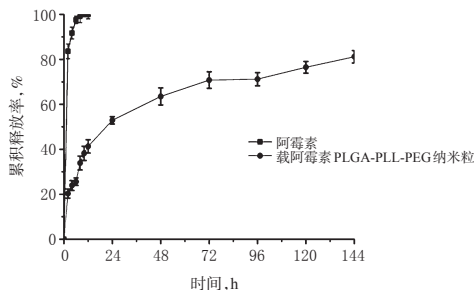


图3 阿霉素和载阿霉素PLGA-PLL-PEG纳米粒的释放曲线

Fig 3 Release curves of adriamycin and adriamycin-loaded PLGA-PLL-PEG nanoparticles

3.4 抑瘤作用

3.4.1 不同作用时间下的抑瘤作用 在阿霉素质量浓度为0.2 μg/mL时,随作用时间延长,阿霉素对HeLa细胞的增殖抑制率增长迅速,作用12 h的增殖抑制率已达56.2%,作用48 h后增殖抑制率逐渐进入平台期,作用96 h的增殖抑制率为96.7%。与阿霉素比较,载阿霉素PLGA-PLL-PEG纳米粒对HeLa细胞的增殖抑制率随作用时间的延长缓慢增长,作用12 h的增殖抑制率为19.6%,作用96 h的增殖抑制率为73.1%,提示载阿霉素PLGA-PLL-PEG纳米粒具有缓释作用。阿霉素和载阿霉素PLGA-PLL-PEG纳米粒对HeLa细胞的增殖抑制率-时间曲线见图4A。

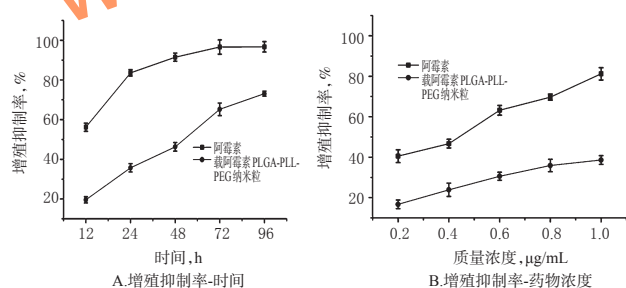


图4 阿霉素和载阿霉素PLGA-PLL-PEG纳米粒对HeLa细胞的增殖抑制曲线

Fig 4 Proliferation inhibition curves of adriamycin and adriamycin-loaded PLGA-PLL-PEG nanoparticles on HeLa cells

3.4.2 不同药物浓度下的抑瘤作用 与阿霉素比较,载阿霉素PLGA-PLL-PEG纳米粒对HeLa细胞的增殖抑制率增加,阿霉素的 IC_{50} 为0.345 μg/mL,载阿霉素PLGA-PLL-PEG纳米粒的 IC_{50} 为1.844 μg/mL,提示载阿霉素

PLGA-PLL-PEG纳米粒比同浓度的阿霉素表现出更强的抑瘤作用。阿霉素和载阿霉素PLGA-PLL-PEG纳米粒对HeLa细胞的增殖抑制率-药物浓度曲线见图4B。

4 讨论

药物缓释系统是将药物负载于可降解或不可降解的载体中,从而降低药物的释放速度。药物的扩散除自身扩散外,还包括通过骨架的生物降解和溶蚀作用、渗透压作用,达到缓释的目的^[3-4]。

生物相容性好和生物降解性是缓控释体系载体材料的主要特点,具有良好的生物降解性的高分子材料如明胶、血清蛋白等具有较好的生物相容性^[5-6]。明胶作为一种水溶性高分子材料,可作为药物微球或微胶囊化的载体,然而此类载体制备困难、成本较高,因此近年来由于合成类的可生物降解聚合物载体对药物具有缓释作用,故逐渐开发应用于缓控释体系中,如脂肪族聚酯类、聚氨基酸类^[7-8]。目前研究最广泛的合成类聚合物载体是聚乳酸及其衍生物,已有研究应用复乳法制备了各种药物的聚乳酸微球^[9]。然而聚乳酸具有亲油疏水性,在水溶液中的悬浮性较差,因此常加入带羟基化合物如聚乙二醇单甲醚(mPEG)交联进行改造,mPEG等亲水性物质能调节聚乳酸载体的降解速度^[10-11]。PLGA与mPEG交联形成的mPEG-PLGA为两性聚合物,能够转载亲水性药物或疏水性药物^[12-13]。本研究应用复乳法制备的载阿霉素PLGA-PLL-PEG纳米粒,阿霉素的包封率为(76.57 ± 8.63)%,载药量为(3.86 ± 0.55)% (n=3)。

抗肿瘤药物的缓慢释放,能提高药物的疗效,并降低毒副作用,因此药物的释放速率是考察药物缓释系统的重要指标。本研究结果显示,制备的载阿霉素PLGA-PLL-PEG纳米粒 Q_{12h} 为41.3%, Q_{24h} 为52.9%, Q_{144h} 为81.2%。这提示24 h内为起始突释期,为药物从载体表面的释放或近表面的药物在几小时内快速释放时期;24 h之后药物的释放共包括两种机制,即聚合物载体的溶蚀和载体孔道的扩散,聚合物载体溶蚀后释放出部分药物,载体溶蚀后或形成孔道,药物从孔道扩散释放,构成体外释放的降解缓释期。

本研究通过比较不同浓度载阿霉素PLGA-PLL-PEG纳米粒和阿霉素对HeLa细胞增殖的抑制作用,发现载阿霉素PLGA-PLL-PEG纳米粒对细胞的 IC_{50} 显著高于阿霉素,说明PLGA-PLL-PEG纳米粒提高了阿霉素对肿瘤细胞增殖的抑制作用,具有更强的抗肿瘤作用。

参考文献

- [1] Prylutska SV, Skivka LM, Didenko GV, et al. Complex of C60 fullerene with doxorubicin as a promising agent in antitumor therapy[J]. *Nanoscale Res Lett*, 2015, 10(1): 499.
- [2] 李桂云. 荧光分析法测定注射用盐酸阿霉素的含量[J]. *中国药物与临床*, 2013, 13(S1): 26-27.
- [3] Chiang WL, Hu YC, Liu HY, et al. Injectable microbeads with a thermo-responsive shell and a pH-responsive core

提高脂质体主动靶向性材料的研究进展[△]

周容*,周莉莉,钟思雨,袁礼,周玮,夏新华[#](湖南中医药大学药学院,长沙 410208)

中图分类号 R294 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)16-2265-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.16.29

摘要 目的:为制备高效的脂质体提供参考。方法:以“材料”“脂质体”“Materials modified liposomes”等为关键词,组合查询2000—2016年在PubMed、中国知网、万方、维普等数据库中的相关文献,对修饰脂质体材料的种类、特点及其在制剂中的应用研究进行综述。结果与结论:共检索到相关文献439篇,其中有效文献45篇。目前用于修饰脂质体的材料主要有糖类及其衍生物、配体类、聚合物类及肽类等。其中糖类及其衍生物、配体类和肽类修饰后的脂质体具有主动靶向性,能提高药物的生物利用度;聚合物类修饰后的脂质体可提高药物的稳定性。目前国内修饰脂质体材料还处在研发阶段,临床应用较少,存在经修饰的脂质体在体内外的靶向性是否具有可比性、各类材料是否能广泛用于不同含药脂质体的修饰、修饰后的脂质体能否实现大规模生产、修饰脂质体的设计与制备过程均较普通脂质体复杂等问题,有待今后去攻克。

关键词 脂质体;表面修饰;靶向性;材料

脂质体是由磷脂、胆固醇组成,并将药物包封在内的磷脂双分子结构^[1]。脂质体具有诸多优点,如靶向性、缓释性、低毒、细胞亲和性等,因此脂质体作为药物载体被广泛研究。近年来,脂质体在药物制剂新技术的研究方面发展迅速,特别是作为抗癌药物的载体^[2]。脂质体进入体内后绝大部分被网状内皮系统吞噬,药物会蓄积在肝、脾、肺和骨髓等组织器官中,而在其他部位游离药

物少,以实现靶向释药。脂质体的发展历经了三代,第一代是普通脂质体(LiP),单纯由磷脂、胆固醇组成,具有被动靶向性。LiP虽然能减少药物毒性,但在许多时候会使药物分子失去生物活性,严重影响其疗效。第二代为长循环脂质体(LP),在脂质体中加入一定比例的糖脂或在磷脂分子上联接多羟基的物质,如聚乙二醇(PEG),能克服LiP容易吸附血浆蛋白及在网状内皮系

as a dual-switch-controlled release system[J]. *Small*, 2014,10(20):4100-4105.

[4] Yao J, Zhang S, Li W, *et al.* Correction: in vitro drug controlled-release behavior of an electrospun modified poly(lactic acid)/bacitracin drug delivery system[J]. *Rsc Advances*, 2015,6(1):515-521.

[5] 余琰,范凌云,高建德,等.盐酸小檗碱微囊的制备及其体外释放研究[J]. *中国药房*, 2015,26(1):109-112.

[6] 张华,张卿,贾运涛,等.紫外分光光度法测定姜黄素白蛋白纳米混悬剂的包封率[J]. *中国药房*, 2012,23(43):4068-4070.

[7] Zhao J, Qiao Y, Zhou M, *et al.* Antitumor efficacy of irreversible electroporation and doxorubicin-loaded polymeric micelles[J]. *Acs Macro Lett*, 2015,4(10):1081-1084.

[8] Langroodi FA, Ghahestani ZH, Alibolandi M, *et al.* Evaluation of the effect of crocetin on antitumor activity of doxorubicin encapsulated in PLGA nanoparticles[J]. *Nan-*

omedicine, 2016,3(1):23-34.

[9] Li RD, Zhang JJ, Chen JF, *et al.* Modified polylactic acid loading docetaxel for anticancer drug delivery[J]. *Ciesc J*, 2014,65(6):2357-2362.

[10] Wang W, Chen S, Zhang L, *et al.* Poly(lactic acid)/chitosan hybrid nanoparticles for controlled release of anticancer drug[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2015, doi:10.1016/j.msec.2014.10.048.

[11] Cummins C, Mokarian-Tabari P, Holmes JD, *et al.* Selective etching of polylactic acid in poly(styrene)-block-poly(d, l) lactide diblock copolymer for nanoscale patterning[J]. *J Appl Polym Sci*, 2014,131(18):9493-9504.

[12] Liu P, Sun Y, Wang Q, *et al.* Intracellular trafficking and cellular uptake mechanism of mPEG-PLGA-PLL and mPEG-PLGA-PLL-Gal nanoparticles for targeted delivery to hepatomas[J]. *Biomaterials*, 2014,35(2):760-770.

[13] Lv W, Cheng L, Li B. Development and evaluation of a novel TPGS-mediated paclitaxel-loaded PLGA-mPEG nanoparticle for the treatment of ovarian cancer[J]. *Chem Pharm Bull: Tokyo*, 2015,63(2):68-74.

△ 基金项目:国家自然科学基金面上项目(No.81573621)

* 硕士研究生。研究方向:中药新制剂及制剂质量标准。电话:0731-88458305。E-mail:1017449839@qq.com

通信作者:教授,博士生导师,博士。研究方向:中药新制剂、新剂型、新技术及制剂质量标准。电话:0731-88458305。E-mail:xiaxinhua001@163.com

(收稿日期:2016-11-03 修回日期:2017-02-17)

(编辑:邹丽娟)