

# 多西他赛 PELGE 纳米粒的处方优化、表征及其体外释放和抗肿瘤活性的初步评价<sup>Δ</sup>

廖龙飞<sup>1\*</sup>, 杨青青<sup>2</sup>, 漆婷婷<sup>1</sup>, 邱悦<sup>1</sup>, 肖洪涛<sup>1#</sup> (1. 四川省肿瘤医院/四川省癌症防治中心/电子科技大学医学院附属肿瘤医院临床药学部, 成都 610041; 2. 国家知识产权局专利局专利审查协作四川中心, 成都 610200)

中图分类号 R943; R944.9 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)20-2492-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.20.10



**摘要** 目的: 优化多西他赛(DTX)-聚乙二醇-(聚乳酸-羟基乙酸)-聚乙二醇三嵌段共聚物(PELGE)-纳米粒(NPs)的处方, 对其进行表征, 并评价其体外释放特性及抗肿瘤活性。方法: 采用开环共聚法合成 PELGE, 采用乳化溶剂挥发法制备 DTX-PELGE-NPs; 采用高效液相色谱法测定 DTX-PELGE-NPs 中 DTX 的含量; 以 DTX 用量、PELGE 用量、泊洛沙姆 188 浓度为自变量, 包封率为因变量, 采用 Box-Behnken 设计-响应面法优化处方; 采用激光粒度仪和透射电镜测定 DTX-PELGE-NPs 的粒度和 Zeta 电位; 以 DTX 注射液为参照, 采用离心超滤法测定体外释放率; 以 DTX 注射液不含 DTX 的 PELGE-NPs 为参照, 采用噻唑蓝法考察体外细胞毒性。结果: 最优处方为 DTX 用量 2.80 mg, PELGE 用量 20.60 mg, 泊洛沙姆 188 浓度 6%。优化所得 DTX-PELGE-NPs 的包封率为  $(86.79 \pm 1.32)\%$ , 载药量为  $(10.21 \pm 0.78)\%$ , 平均粒度为  $(78.4 \pm 2.9)$  nm, 多分散性指数(PDI)为  $(0.187 \pm 0.018)$ , Zeta 电位为  $(-20.6 \pm 1.5)$  mV; 电镜下 DTX-PELGE-NPs 呈类球形, 分布均匀。相较于 DTX 注射液(4 h 时的累积释放率约为 92.3%), DTX-PELGE-NPs 有明显的缓释效果(36 h 时的累积释放率约为 78.6%)。0.1~50  $\mu$ g/mL 的 PELGE-NPs 对人乳腺癌细胞 MCF-7 无明显细胞毒性( $P > 0.05$ ), 而 0.5~10  $\mu$ g/mL 的 DTX-PELGE-NPs 能够显著抑制人乳腺癌细胞 MCF-7 的生长, 且作用(DTX-PELGE-NPs 10  $\mu$ g/mL 组除外)显著强于同浓度 DTX 注射液( $P < 0.05$ )。结论: 优化所得处方工艺稳定、可行; 所得 DTX-PELGE-NPs 粒度均匀, 包封率较高, 缓释效果明显, 体外抗肿瘤活性强于 DTX 注射液。

**关键词** 多西他赛; 聚乙二醇-(聚乳酸-羟基乙酸)-聚乙二醇三嵌段共聚物; Box-Behnken 设计-响应面法; 高效液相色谱法; 处方优化

## Formulation Optimization and Characterization of Docetaxel PELGE Nanoparticles and Preliminary Evaluation of Its Drug Release and Antitumor Activity *in vitro*

LIAO Longfei<sup>1</sup>, YANG Qingqing<sup>2</sup>, QI Tingting<sup>1</sup>, QIU Yue<sup>1</sup>, XIAO Hongtao<sup>1</sup> (1. Dept. of Clinical Pharmacy, Sichuan Cancer Hospital/Sichuan Cancer Prevention and Control Center/the Affiliated Cancer Hospital of University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610041, China; 2. Patent Examination Cooperation Sichuan Center, the Patent Office of CNIPA, Chengdu 610200, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize the formulation of docetaxel (DTX)-mPEG-PLGA-mPEG (PELGE)-nanoparticles (NPs), and to characterize it and evaluate its *in vitro* drug release and antitumor activity. METHODS: PELGE were synthesized by ring-opening polymerization. DTX-PELGE-NPs were prepared by using emulsion solvent evaporation method. The content of DTX in DTX-PELGE-NPs was determined by HPLC. Box-Behnken design-response surface methodology was applied to optimize the formulation of the nanoparticles using the amount of DTX, PELGE and poloxamer 188 as independent variable, using entrapped efficiency as dependent variable. The particle size and Zeta-potential of DTX-PELGE-NPs were characterized by laser particle size analyzer and transmission electron microscope. The *in vitro* release of the DTX-PELGE-NPs was investigated by ultra-filtered centrifugation, using DTX injection as reference. *In vitro* cytotoxicity of the DTX-PELGE-NPs was investigated by MTT assay, using DTX and PELGE-NPs without DTX as reference. RESULTS: The optimal formulation included 2.80 mg DTX, 20.60 mg PELGE and 6% poloxamer 188. The entrapped efficiency of optimized DTX-PELGE-NPs was  $(86.79 \pm 1.32)\%$ ; drug-loading amount was  $(10.21 \pm 0.78)\%$ , and average particle size was  $(78.4 \pm 2.9)$  nm; polydispersity coefficient was  $(0.187 \pm 0.018)$  and Zeta potential was  $(-20.6 \pm 1.5)$  mV. Furthermore, DTX-PELGE-NPs showed a regular spherical and uniform distribution under scanning electron microscopy. Compared with DTX injection (accumulative release rate of 92.3% at 4 h), DTX-PELGE-NPs had a significant sustained-release effect (accumulative release rate of 78.6% at 36 h). 0.1-50  $\mu$ g/mL PELGE-NPs had no obvious cytotoxicity to human breast cancer cells

<sup>Δ</sup> 基金项目: 四川省医学重点学科(实验室)及重点专科立项建设项目(No. 川卫发[2019]30号); 四川省预防医学会静脉药物配制科研(孵化)项目(No. 川预学[2020]135号)

\* 主管药师, 硕士。研究方向: 药剂学。电话: 028-85420987。E-mail: 799583718@qq.com

# 通信作者: 研究员, 博士。研究方向: 医院药学。电话: 028-85420338。E-mail: xht927@163.com

MCF-7 ( $P>0.05$ ). 0.5-10  $\mu\text{g/mL}$  DTX-PELGE-NPs could significantly inhibit the growth of human breast cancer cells MCF-7, and its inhibitory effect (except for DTX-PELGE-NPs 10  $\mu\text{g/mL}$  group) was significantly stronger than that of DTX injection ( $P<0.05$ ). CONCLUSIONS: The optimized formulation is stable and feasible. The obtained DTX-PELGE-NPs not only have uniform particle size, high encapsulation rate obvious slow-release effect, but also have stronger anti-tumor effect *in vitro* than DTX injection.

**KEYWORDS** Docetaxel; mPEG-PLGA-mPEG; Box-Behnken design-response surface methodology; HPLC; Formulation optimization

多西他赛(docetaxel, DTX)为紫杉烷类微管抑制型抗肿瘤药物,主要作用于处在有丝分裂阶段的肿瘤细胞<sup>[1]</sup>。DTX所具有的抗肿瘤作用使其成为激素难治性前列腺癌、乳腺癌和非小细胞肺癌等的一线治疗药物<sup>[2]</sup>。但DTX水溶性较差,其注射剂中常添加吐温-80和乙醇作为增溶剂,而增溶剂易导致患者发生严重过敏等不良反应<sup>[3]</sup>。此外,吐温-80还会改变DTX的体内行为,导致DTX呈非线性药动学特征,大大限制了该药的临床应用<sup>[3]</sup>。因此,有研究者尝试利用脂质体、胶束、纳米粒等新型给药系统作为DTX的载体,以提高其靶向性、减轻不良反应,并取得了一定成果,但这些纳米材料包载药物易导致其相关制剂具有毒性大、不稳定等缺点<sup>[4-5]</sup>。

聚乳酸-羟基乙酸共聚物[poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA]可在体内分解、吸收,具有良好的生物相容性,但表面的疏水性易导致其纳米粒在血液中被识别和清除,滞留时间较短<sup>[6]</sup>。而将聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)接枝于PLGA两端而合成的新型高分子降解材料[聚乙二醇-(聚乳酸-羟基乙酸)-聚乙二醇三嵌段共聚物(mPEG-PLGA-mPEG, PELGE)]不仅具有PLGA的生物相容性,而且强亲水性的PEG外层能够有效地减少巨噬细胞的识别与摄取,从而增加药物在血液中的循环时间<sup>[7]</sup>。PELGE避免了其他纳米载体毒性大、不稳定等缺点,增加了药物的溶解度和稳定性,延长了药物的循环时间,降低了不良反应的发生风险,是一种优良的药物载体材料<sup>[7]</sup>。基于此,本研究以PELGE为DTX的载体材料,采用乳化溶剂挥发法制备紫杉醇-聚乙二醇-(聚乳酸-羟基乙酸)-聚乙二醇三嵌段共聚物-纳米粒(DTX-PELGE-NPs);采用高效液相色谱(HPLC)法测定DTX含量;以包封率为考察因素,采用Box-Behnken设计-响应面法对方剂进行优化,同时对其药剂学性质及体外释放规律进行考察,并初步评价其体外抗肿瘤活性,旨在为相关制剂用于体内抗肿瘤研究提供依据。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有 Nicolet 20 SXB 型红外光谱(IR)仪、Varioskan Flash 型荧光化学发光分析仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司), Unity 500 MHz 型核磁共振(NMR)仪(美国 Varian 公司), 1260 型 HPLC 仪及配套

的四元溶剂混合系统、多功能泵、InfinityLab Benchtop 液相色谱系统(美国 Agilent 公司), Nano ZS90 型激光粒度分析仪(英国 Malvern 公司), H-600 型透射电镜(日本 Hitachi 公司), UPH- II -10T 型优普超纯水仪(成都超纯科技有限公司), Nanosep<sup>®</sup>超滤管(截留分子量为 300 000, 美国 Pall Life Science 公司), 透析袋(截留分子量为 8 000~12 000, 美国 Sigma 公司)等。

### 1.2 主要药品与试剂

DTX 原料药(批号 20180412, 纯度 $>99\%$ )、DTX 对照品(批号 M0308AS, 纯度 $>99\%$ )均购自大连美仑生物技术有限公司; DTX 注射液(批号 190815AN, 纯度 $>99\%$ )购自江苏恒瑞医药有限公司; 乙酸乙酯(批号 20190809)、丙酮(批号 20180120)均购自天津市进丰化工有限公司; 泊洛沙姆 188(批号 190323)购自德国 BASF 公司; 吐温-80(批号 20190112)购自成都科龙化工试剂厂; 胎牛血清(批号 20190722)购自上海复蒙基因生物科技有限公司; 注射用青霉素钠(批号 190620, 规格 0.48 g/支)购自华北制药股份有限公司; RPMI 1640 培养基(批号 20190508)购自美国 Hyclone 公司; 噻唑蓝(MTT)购自美国 Sigma 公司; 乳酸(LA, 批号 20190124)、乙醇酸(GA, 批号 20190205)、PEG(批号 20190130, 相对分子质量为 550, 纯度 5%)均购自山东医疗器械研究所; 乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为纯化水。

### 1.3 细胞

人乳腺癌细胞 MCF-7 购自中国科学院上海细胞生物研究所。

## 2 方法与结果

### 2.1 PELGE 的合成与表征

根据本课题组前期实验结果并参考文献[8-9], 按 LA:GA 为 7:3(摩尔比), 采用开环共聚法制得 PELGE(纯度 $>99\%$ )。

通过 IR 光谱和 <sup>1</sup>H-NMR 对 PELGE 进行化学结构验证。结果见图 1。在图 1A 中, 2 900~3 000  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰为 C—H 的伸缩振动峰, 1 760  $\text{cm}^{-1}$  为酯基中 C=O 的伸缩振动峰, 1 090  $\text{cm}^{-1}$  为 O—CH<sub>2</sub> 的伸缩振动峰; PELGE 呈现出 PEG 与 PLGA 的混合光谱特征, 其不同之处为 PELGE 的光谱中未见 PEG 光谱中羟基拉伸导致的 3 400  $\text{cm}^{-1}$  处的宽吸收带, 表明 PEG 的游离羟基已与羧

基反应<sup>[8]</sup>,由此初步判断PEG已成功接枝于PLGA。在图1B中,1.65、5.10 ppm处的峰来自于PLGA中—CH和—CH<sub>3</sub>的质子;PEG中的—CH<sub>2</sub>—特征峰位于3.65 ppm处,而GA中—CH<sub>2</sub>—的特征峰位于4.78 ppm处,代表了PLGA和PEG的共轭片段。与PEG和PLGA相关特征峰的存在证实了聚合反应后共聚物的结构特征,提示PELGE合成成功。

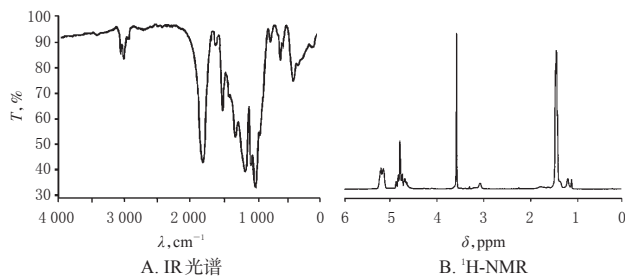


图1 PELGE的鉴定图谱

Fig 1 Identification spectra of PELGE

## 2.2 DTX-PELGE-NPs的制备

采用乳化溶剂挥发法制备DTX-PELGE-NPs。称取DTX原料药2.0 mg、“2.1”项下PELEG 20 mg,加乙酸乙酯-丙酮混合溶剂(5:1, V/V)5 mL使溶解,作为油相,探头超声(功率200 W,工作5 s,间歇5 s,下同)1 min,将水5 mL缓慢均匀加入油相,形成油包水型初乳;将上述初乳加入至含有泊洛沙姆188 0.5 g的水相5 mL中,再次探头超声1 min后,于40 °C真空旋转蒸发1 h以除去乳液中的有机溶剂,经0.22 μm微孔滤膜滤过,即得DTX-PELGE-NPs(含DTX 0.2 mg/mL、PELGE 2 mg/mL、泊洛沙姆188 5%)。同法制备不含DTX的PELGE-NPs。

## 2.3 DTX的含量测定

2.3.1 色谱条件 以Kromasil C<sub>18</sub>(200 mm×4.6 mm, 5 μm)为色谱柱,以乙腈-水(60:40, V/V)为流动相;检测波长为228 nm;流速为1.0 mL/min;柱温为25 °C;进样量为20 μL。

2.3.2 溶液的制备 (1)对照品溶液:精密称取DTX对照品10.15 mg,置于100 mL量瓶中,加入甲醇溶解并定容,制成质量浓度为101.5 μg/mL的对照品溶液。(2)供试品溶液:取“2.2”项下DTX-PELGE-NPs溶液1 mL,加入甲醇稀释并定容至10 mL,超声处理3 min破乳后,经0.22 μm微孔滤膜滤过,取滤液,即得。(3)阴性对照溶液:取“2.2”项下PELGE-NPs溶液1 mL,按上述供试品溶液的制备方法处理,即得。

2.3.3 专属性考察 分别取“2.3.2”项下对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液适量,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果显示,DTX的保留时间约为5.8 min,而阴性对照溶液在对应时间点无色谱峰出现;待测成分峰与相邻色谱峰间的分离度均大于1.5,且

主峰与杂质峰均能达到基线分离,阴性对照对测定无干扰。结果见图2。

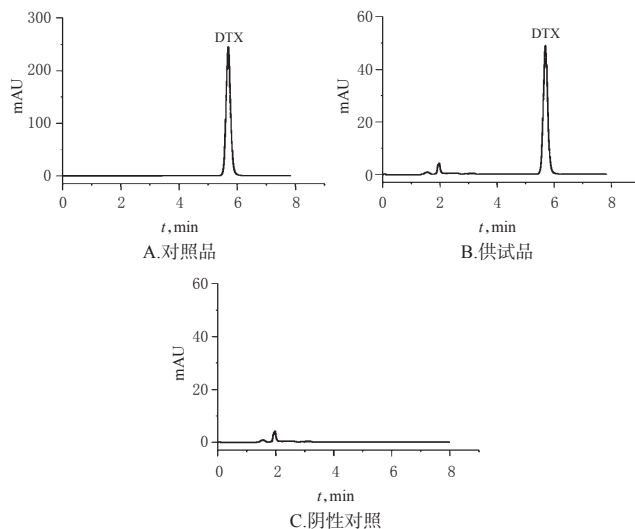


图2 DTX对照品、供试品及阴性对照的HPLC图

Fig 2 HPLC chromatograms of DTX control, test sample and negative control

2.3.4 线性关系考察 精密量取“2.3.2(1)”项下对照品溶液,加甲醇稀释,制得DTX质量浓度分别为2.5、5、10、20、40、50 μg/mL的系列线性溶液,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以DTX质量浓度(C)为横坐标,峰面积(A)为纵坐标进行线性回归。结果显示,DTX的回归方程为 $A=17.626C-8.354$ ( $R^2=0.9996$ ),表明DTX在2.5~50 μg/mL线性范围内与峰面积成良好的线性关系。

2.3.5 精密度的试验 精密量取“2.3.2(1)”项下对照品溶液,加甲醇稀释,制得DTX质量浓度分别为5、20、40 μg/mL的样品溶液,按“2.3.1”项下色谱条件于1 d内分别重复进样测定6次,记录峰面积,考察日内精密度的;再连续3 d共6次进样测定,记录峰面积,考察日间精密度的。结果显示,3个质量浓度样品溶液的日内RSD分别为1.73%、1.56%、1.13%( $n=6$ ),日间RSD分别为1.01%、0.97%、1.21%( $n=6$ ),表明仪器精密度的良好。

2.3.6 重复性的试验 取“2.2”项下DTX-PELGE-NPs溶液,共6份,按“2.3.2(2)”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按标准曲线法计算含量。结果显示,DTX含量的RSD为1.36%( $n=6$ ),表明方法重复性的良好。

2.3.7 稳定性的试验 精密量取“2.3.2(2)”项下供试品溶液,分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,DTX峰面积的RSD为0.61%( $n=6$ ),表明供试品溶液于室温条件下放置24 h内稳定性的良好。

2.3.8 回收率的试验 精密量取“2.3.2(1)”项下对照品溶

液,加甲醇释释,制得DTX质量浓度分别为5、20、40 μg/mL的样品溶液,分别加入“2.3.2(3)”项下质量浓度分别为50、200、400 μg/mL的阴性对照溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算回收率。每个浓度测定3次。结果显示,3个质量浓度溶液的回收率分别为(99.2 ± 1.5)%、(98.9 ± 0.9)%、(100.1 ± 1.3)%,RSD分别为1.51%、0.91%、1.30%(n=3),表明方法准确度良好。

2.3.9 样品含量测定 取“2.2”项下DTX-PELGE-NPs溶液,按“2.3.2(2)”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按标准曲线法计算含量。

## 2.4 包封率和载药量的测定

取“2.2”项下DTX-PELGE-NPs溶液1 mL,加入超滤管中,以6 500 r/min离心50 min,取上清液适量,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定3次,记录峰面积,按标准曲线法计算DTX含量并按公式计算DTX-PELGE-NPs的包封率和载药量:包封率(%)=( $W_{总}-W_{游离}$ )/ $W_{总}$ ×100%,载药量(%)=( $W_{总}-W_{游离}$ )/ $W_{制剂}$ ×100%。式中, $W_{总}$ 表示DTX-PELGE-NPs溶液中DTX的总含量, $W_{游离}$ 表示超滤液中游离的DTX含量, $W_{制剂}$ 表示DTX-PELGE-NPs溶液中DTX-PELGE-NPs的含量<sup>[9]</sup>。结果显示,包封率和载药量分别为(72.45 ± 2.72)%、(6.92 ± 0.53)%,RSD分别为3.75%、7.66%(n=3)。

## 2.5 处方的Box-Behnken设计-响应面法优化

2.5.1 Box-Behnken设计 在前期预实验结果的基础上,本研究选择对DTX-PELGE-NPs包封率影响较大的3个因素:DTX用量(A)、PELGE用量(B)、泊洛沙姆188浓度(C)为自变量,包封率(Y)为因变量,采用Design-Expert V8.0.6软件进行3因素3水平设计。DTX-PELGE-NPs处方的因素与水平见表1,其实验方案与结果见表2。

表1 DTX-PELGE-NPs处方的因素与水平

Tab 1 Factors and levels of DTX-PELGE-NPs formulation

水平	A,mg	B,mg	C,%
-1	0.5	5	1
0	2.75	27.5	6
1	5	50	10

2.5.2 模型拟合与方差分析 采用Design-Expert V8.0.6软件建立拟合方程。结果显示,二次多元方程为 $Y=7.93-0.60\times A+2.08\times B+0.22\times C-0.15\times A\times B-0.85\times A\times C-0.35\times B\times C-3.39\times A^2-2.59\times B^2-2.74\times C^2$ ( $R^2=0.9572$ ),模型显著( $P=0.0063<0.01$ ),失拟项不显著( $P=0.0766>0.05$ ),表明模型成立,能满足实验要求;

表2 DTX-PELGE-NPs处方的实验方案与结果

Tab 2 Scheme and results of DTX-PELGE-NPs formulation

实验号	A	B	C	包封率,%
1	1	0	-1	82.25
2	0	-1	1	81.65
3	0	1	1	83.88
4	0	0	0	88.14
5	0	0	0	88.26
6	0	1	-1	84.32
7	-1	1	0	85.95
8	0	-1	-1	80.74
9	-1	0	1	83.12
10	-1	-1	0	80.23
11	1	0	1	81.26
12	1	1	0	83.41
13	-1	0	-1	80.79
14	0	0	0	87.55
15	1	-1	0	78.37

各自变量与因变量之间非简单的线性关系,存在相互作用。对拟合模型进行显著性检验发现,因素B、 $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$ 对包封率有显著影响( $P<0.01$ ),而因素A、C、AB、AC、BC对包封率无显著影响( $P>0.05$ );3个因素对包封率影响的大小顺序为 $B>A>C$ 。结果见表3。

表3 DTX-PELGE-NPs处方的方差分析结果

Tab 3 Results of variance analysis of DTX-PELGE-NPs formulation

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	123.85	9	13.76	12.43	0.0063
A	2.88	1	2.88	2.60	0.1677
B	34.44	1	34.44	31.11	0.0026
C	0.40	1	0.40	0.37	0.5717
AB	0.09	1	0.09	0.081	0.7870
AC	2.89	1	2.89	2.61	0.1671
BC	0.49	1	0.49	0.44	0.5354
$A^2$	42.47	1	42.47	38.36	0.0016
$B^2$	24.80	1	24.80	22.40	0.0052
$C^2$	27.75	1	27.75	25.06	0.0041
残差	5.54	5	1.11		
失拟项	5.25	3	1.75	12.21	0.0766
纯误差	0.29	2	0.14		
总离差	129.38	14			

2.5.3 交互作用的响应面分析 采用Design-Expert V8.0.6软件绘制包封率的响应面三维图。结果见图3。由图3可知,随着DTX用量、PELGE用量和泊洛沙姆188浓度的增加,包封率有明显的上升趋势。当三者到达最佳临界点后,包封率均呈小幅下降。由“2.5.2”项下所建模型预测的最优处方DTX用量为2.81 mg, PELGE用量为20.62 mg,泊洛沙姆188浓度为6%,预测包封率为87.15%。

2.5.4 验证实验 在不影响实验结果的基础上,结合实际操作可行性得到最优处方为DTX用量2.80 mg, PELGE用量20.60 mg,泊洛沙姆188浓度6%。按上述

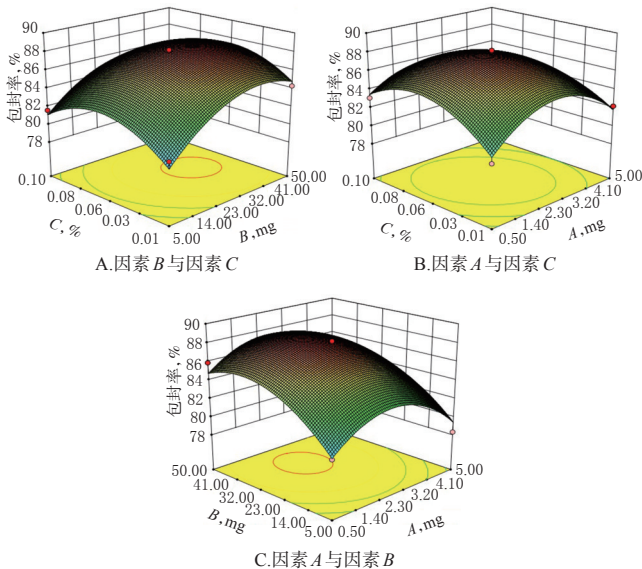
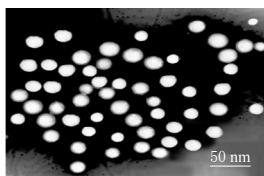
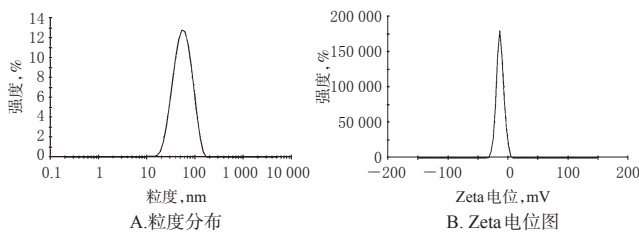


图3 各影响因素交互作用对包封率的三维响应图  
Fig 3 Three-dimensional response plots of influential factors interaction to entrapped efficiency

最优处方制备3批DTX-PELGE-NPs进行验证。结果显示,DTX-PELGE-NPs的包封率为 $(86.79 \pm 1.32)\%$  ( $RSD=1.52\%$ ,  $n=3$ ),载药量为 $(10.21 \pm 0.78)\%$ 。与模型包封率预测值的偏差较小( $0.36\%$ ),表明所得最优处方稳定、可行。

## 2.6 DTX-PELGE-NPs的体外评价

2.6.1 粒度和Zeta电位的测定 按“2.5.4”项下最优处方制备DTX-PELGE-NPs,加水稀释,采用激光粒度分析仪于 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 、测量角 $90^\circ$ 条件下测定粒度和Zeta电位,重复测定3次,并通过多分散性指数(PDI)分析粒度的均匀程度。结果显示,DTX-PELGE-NPs的平均粒度为 $(78.4 \pm 2.9)\text{nm}$ ,PDI为 $(0.187 \pm 0.018)$ ,Zeta电位 $(-20.6 \pm 1.5)\text{mV}$  ( $n=3$ )。粒度和Zeta电位分布图形均为对称单峰,峰形较窄,且PDI值较低,表明纳米粒的粒度和电位分布均匀。结果见图4A、图4B。



C.透射电镜图( $\times 20000$ )

图4 DTX-PELGE-NPs的表征

Fig 4 Characterization of DTX-PELGE-NPs

2.6.2 形态观察 按“2.5.4”项下最优处方制备DTX-PELGE-NPs,取1 mL,加水稀释50倍后,滴加在覆盖碳膜的铜网上,静态吸附10 min,用2%磷钨酸溶液染色40 s,用滤纸吸干多余液体后,采用透射电镜观察其形态。结果显示,DTX-PELGE-NPs呈类球形,大小均一,表面光滑,且粒度在80 nm左右,与“2.6.1”项下粒度测定结果基本一致。结果见图4C。

2.6.3 体外释放度的考察 采用离心超滤法进行考察。取DTX注射液和按“2.5.4”项下最优处方制备的DTX-PELGE-NPs各1 mL,分别置于透析袋中并扎紧袋子两端,将透析袋置于含有0.5%且浓度为1 mol/mL吐温-80的磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)400 mL中,于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下持续振荡(100 r/min),分别于0、0.5、1、2、4、6、8、12、24、36、48 h时取透析液1 mL(同时补加同温等量上述PBS)。实验重复3次,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按公式计算累积释放率:累积释放率

$(\%) = [c_n \times V + \sum_{i=1}^{n-1} c_i \times V_i] / W_{\text{DTX}} \times 100\%$ 。式中, $W_{\text{DTX}}$ 表示透析袋中DTX的总含量; $V_i$ 表示每次吸取透析液的体积; $V$ 表示缓冲液的总体积; $c_i$ 、 $c_n$ 表示DTX的浓度,其中 $i$ 、 $n$ 为取样次数。结果显示,DTX-PELGE-NPs的释放速率比DTX注射液慢:DTX注射液在4 h时的累积释放率约为92.3%,已接近完全释放;DTX-PELGE-NPs在36 h时的累积释放率约为78.6%,趋近完全释放,之后逐渐到达稳定。可见,两者的释药行为存在明显差异,DTX-PELGE-NPs的释放曲线平缓,无突然释放现象;相比于DTX注射液,DTX-PELGE-NPs显示出了明显的缓慢释放效果。结果见图5。

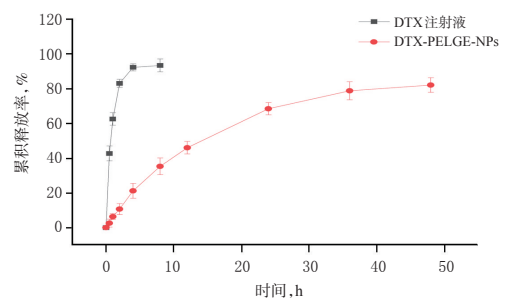


图5 DTX注射液和DTX-PELGE-NPs的体外释放曲线

Fig 5 Release curves of DTX injection and DTX-PELGE-NPs *in vitro*

## 2.7 体外抗肿瘤活性的评价

采用MTT法考察DTX注射液、PELGE-NPs和DTX-PELGE-NPs对人乳腺癌细胞MCF-7的细胞毒性作用。选取处于对数生长期的人乳腺癌细胞MCF-7,用含10%胎牛血清和1%青霉素的RPMI 1640培养基(以

下简称“完全培养基”)制成悬液,计数后按 $5 \times 10^4$ 个/mL以 $100 \mu\text{L}$ 接种于96孔板中,于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$ 条件下培养24 h(培养条件下同)。将细胞随机分为空白对照组和给药组,空白对照组加入完全培养基 $100 \mu\text{L}$ ,给药组分别加入含PELGE-NPs 0.1、0.5、1、5、10、20、50  $\mu\text{g/mL}$ (以PELGE-NPs计,质量浓度设置参考前期实验结果<sup>[10]</sup>)或含DTX、DTX-PELGE-NPs 0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10  $\mu\text{g/mL}$ (均以DTX计,根据PELGE-NPs组浓度结合最优处方比例换算而得)的完全培养基 $100 \mu\text{L}$ ,每组设3个复孔。培养24 h后,弃去上清液,加入500 ng/mL MTT溶液 $50 \mu\text{L}$ ;继续孵育4 h,弃去MTT溶液,用PBS清洗后加入二甲基亚砜 $100 \mu\text{L}$ ,采用酶标仪于570 nm波长处测定各孔的光密度(OD)值。实验重复3次,按公式计算细胞存活率:细胞存活率( $\%$ )= $\text{OD}_n/\text{OD}_0 \times 100\%$ 。式中, $\text{OD}_n$ 为给药组细胞的OD值, $\text{OD}_0$ 为空白对照组细胞的OD值。采用SPSS 19.0软件对结果进行单因素方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。结果显示,PELGE-NPs组细胞的存活率较高,且其值与质量浓度无关,与空白对照组比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),即PELGE-NPs对人乳腺癌细胞MCF-7的生长几乎无影响,表明PELGE-NPs作为载体的毒性较低、安全性较高。当DTX质量浓度 $<0.05 \mu\text{g/mL}$ 时,DTX 0.01 mg/mL组和DTX-PELGE-NPs 0.01  $\mu\text{g/mL}$ 组细胞的存活率均接近90%;随着DTX质量浓度的增加,DTX和DTX-PELGE-NPs组细胞的存活率逐步降低,呈明显的浓度依赖趋势。当DTX质量浓度 $\geq 0.05 \mu\text{g/mL}$ 时,DTX和DTX-PELGE-NPs各浓度组细胞的存活率均较空白对照组显著降低( $P<0.05$ ),且DTX-PELGE-NPs各浓度组(除 $10 \mu\text{g/mL}$ 组外)细胞的存活率均显著低于同浓度DTX组( $P<0.05$ )。这表明将DTX包载于PELGE-NPs中可增强DTX对人乳腺癌细胞MCF-7的体外抑制作用。结果见表4。

表4 各组人乳腺癌细胞MCF-7的存活率( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 4 Cell survival rates of human breast cancer cell MCF-7 in each group ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	细胞存活率, %	组别	细胞存活率, %
空白对照组	100	DTX 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 组	$62.7 \pm 2.9^*$
PELGE-NPs 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 组	$96.6 \pm 3.2^*$	DTX 1 $\mu\text{g/mL}$ 组	$56.6 \pm 3.7^*$
PELGE-NPs 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 组	$98.7 \pm 2.9^*$	DTX 5 $\mu\text{g/mL}$ 组	$48.5 \pm 4.2^*$
PELGE-NPs 1 $\mu\text{g/mL}$ 组	$95.9 \pm 4.9^*$	DTX 10 $\mu\text{g/mL}$ 组	$38.4 \pm 2.1^*$
PELGE-NPs 5 $\mu\text{g/mL}$ 组	$99.2 \pm 3.4^*$	DTX-PELGE-NPs 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 组	$93.3 \pm 2.1$
PELGE-NPs 10 $\mu\text{g/mL}$ 组	$94.8 \pm 4.1^*$	DTX-PELGE-NPs 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 组	$81.3 \pm 2.4^{**}$
PELGE-NPs 20 $\mu\text{g/mL}$ 组	$98.6 \pm 3.6^*$	DTX-PELGE-NPs 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 组	$70.1 \pm 5.4^{**}$
PELGE-NPs 50 $\mu\text{g/mL}$ 组	$95.3 \pm 4.2^*$	DTX-PELGE-NPs 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 组	$49.6 \pm 2.7^{**}$
DTX 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 组	$92.3 \pm 3.7$	DTX-PELGE-NPs 1 $\mu\text{g/mL}$ 组	$43.2 \pm 0.3^{**}$
DTX 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 组	$88.2 \pm 4.1^*$	DTX-PELGE-NPs 5 $\mu\text{g/mL}$ 组	$39.8 \pm 3.3^{**}$
DTX 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 组	$75.6 \pm 5.5^*$	DTX-PELGE-NPs 10 $\mu\text{g/mL}$ 组	$33.5 \pm 2.9^*$

注:与空白对照组比较,  $*P<0.05$ ;与DTX组比较,  $^{\#}P<0.05$

Note: vs. blank control group,  $*P<0.05$ ; vs. DTX group,  $^{\#}P<0.05$

### 3 讨论

DTX于228 nm波长处有最大吸收,但是因其注射液中的辅料吐温-80在此波长处也有吸收,若采用紫外光谱法测定DTX含量会有较大误差,故本研究利用HPLC法的分离功能消除辅料的干扰,并选择228 nm作为DTX含量的检测波长,具有较强的专属性<sup>[11]</sup>。同时,本课题组在综合考虑峰位、柱效、峰对称性、杂质检出及仪器管路清洗等多种因素后,最终确定以乙腈-水(60:40,  $V/V$ )为流动相。

本课题组前期已制备出性质稳定且大小均一的PELGE-NPs,并且通过调节超声频率、时间和次数等条件将粒径控制在理想范围(50~200 nm)内<sup>[7]</sup>。同时,前期预实验证实,超声条件是影响DTX-PELGE-NPs粒度和PDI的关键因素,而粒度和PDI不受DTX用量、PELGE用量和泊洛沙姆188浓度的影响,因此在考察最优处方时未将粒度和PDI作为处方优化的指标。包封率反映了药物被载体包载的程度,是纳米粒质量控制的一个重要指标<sup>[12]</sup>,高包封率对提高纳米制剂疗效、降低药物不良反应具有重要意义<sup>[13]</sup>,故本研究以包封率为衡量处方优化是否成功的标志。

本研究通过Box-Behnken设计-响应面法构建了DTX-PELGE-NPs的参数模型,初步研究并探讨了各因素之间的相互作用。结果显示,随着DTX用量、PELGE用量、泊洛沙姆188浓度的增加,包封率均呈先增后减的趋势。笔者分析其原因为当DTX和PELGE达到一定量时,载体材料包载药物达到饱和,不再继续包载,导致未被包载的游离药物逐渐增多,包封率下降;此外,在乳化溶剂挥发法中,初乳的稳定性是决定包封率的关键因素<sup>[14]</sup>,而高浓度乳化剂会导致制剂的粒度偏小,影响初乳的稳定性,从而降低包封率<sup>[15]</sup>。因此,在达到最优乳化剂浓度后继续增加乳化剂用量,包封率会呈现下降趋势。

体外评价结果显示,DTX-PELGE-NPs呈类球形,大小均一且表面光滑。体外释放度考察结果显示,DTX-PELGE-NPs的释放率比DTX注射液慢,且曲线较为平滑,展现出良好的缓释效果。这些特点是由DTX-PELGE-NPs自身结构所决定的,包裹于内部的药物在纳米表面溶蚀后逐渐释放,其释放率较为稳定,药物突然释放的可能性较低;同时,具有亲水性和柔性的PEG的空间位阻作用可阻止纳米粒之间的摩擦和碰撞,以减少纳米粒聚集所造成的结构破坏,从而达到缓释的效果<sup>[16-17]</sup>。

在 $0.05 \sim 5 \mu\text{g/mL}$ 范围内,DTX-PELGE-NPs的细胞毒性显著强于游离的DTX。其主要原因为纳米粒能够通过肿瘤细胞的内吞作用而促进药物被摄取,尺寸较小且PEG成分含量较高的纳米粒进入肿瘤细胞的能力更

强,而游离药物则只能通过细胞膜被动扩散<sup>[18]</sup>。由于体外培养的细胞数量和细胞在固定作用时间(4 h)内摄取纳米粒的能力有限,因此在高质量浓度状态下,DTX-PELGE-NPs和DTX的细胞毒性接近。理论上,在体内环境中,肿瘤细胞处于增殖状态,则可能更有利于DTX-PELGE-NPs被摄取,但需要进一步实验予以验证。

综上所述,优化所得处方稳定、可行,所得DTX-PELGE-NPs粒度均匀,包封率较高,缓释效果明显,体外抗肿瘤活性强于DTX注射液。

## 参考文献

- [1] ZHANG E, XING R, LIU S, et al. Current advances in development of new docetaxel formulations[J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2019, 16(3):301-312.
- [2] FARHAN S M, MUBASHAR R, SHOAIB S H, et al. Advancements in the oral delivery of Docetaxel: challenges, current state-of-the-art and future trends[J]. *Int J Nanomedicine*, 2018, 13:3145-3161.
- [3] ALKEN S, KELLY C M. Benefit risk assessment and update on the use of docetaxel in the management of breast cancer[J]. *Cancer Manag Res*, 2013, 5:357-365.
- [4] ALIBOLANDI M, ABNOUS K, HADIZADEH F, et al. Dextran-poly lactide-co-glycolide polymersomes decorated with folate-antennae for targeted delivery of docetaxel to breast adenocarcinoma in vitro and in vivo[J]. *J Control Release*, 2016, 241:45-56.
- [5] CHEN F, ZHANG J, WANG L, et al. Tumor pH(e)-triggered charge-reversal and redox-responsive nanoparticles for docetaxel delivery in hepatocellular carcinoma treatment[J]. *Nanoscale*, 2015, 7(38):15763-15779.
- [6] AGGARWAL P, HALL J B, MCLELAND C B, et al. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy[J]. *Adv Drug Del Rev*, 2009, 61(6):428-437.
- [7] CHANG C W, CHOI D, KIM W J, et al. Non-ionic amphiphilic biodegradable PEG-PLGA-PEG copolymer enhances gene delivery efficiency in rat skeletal muscle[J]. *J Controlled Release*, 2007, 118(2):245-253.
- [8] ASHJARI M, KHOEE S, MAHDAVIAN A R, et al. Self-assembled nanomicelles using PLGA-PEG amphiphilic block copolymer for insulin delivery: a physicochemical investigation and determination of CMC values[J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2012, 23(4):943-953.
- [9] ZHANG T, ZHENG, PENG Q, et al. A novel submicron emulsion system loaded with vincristine-oleic acid ion-pair complex with improved anticancer effect: in vitro and in vivo studies[J]. *Int J Nanomedicine*, 2013, 8:1185-1196.
- [10] 杨立开,何黎黎,段友容,等. mPEG-PLGA-mPEG系列纳米粒的毒性与其结构的关系[J]. *华西药学杂志*, 2009, 24(3):211-214.
- [11] RAO B M, CHAKRABORTY A, SRINIVASU M K, et al. A stability-indicating HPLC assay method for docetaxel[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 41(2):676-681.
- [12] RAWAL M, SINGH A, AMIJI M M. Quality-by-design concepts to improve nanotechnology-based drug development[J]. *Pharm Res*, 2019, 36(11):1-20.
- [13] SHEN S, WU Y, LIU Y, et al. High drug-loading nanomedicines: progress, current status, and prospects[J]. *Int J Nanomedicine*, 2017, 12:4085-4109.
- [14] ROJAS J, PINTO-ALPHANDARY H, LEO E, et al. A polysorbate-based non-ionic surfactant can modulate loading and release of beta-lactoglobulin entrapped in multiphase poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres[J]. *Pharm Res*, 1999, 16(2):255-260.
- [15] DE G, ROSA, AND, et al. Influence of the co-encapsulation of different non-ionic surfactants on the properties of PLGA insulin-loaded microspheres[J]. *J Controlled Release*, 2000, 69(2):283-295.
- [16] LIAO L, ZHANG M, LIU H, et al. Subchronic toxicity and immunotoxicity of MeO-PEG-poly(D, L-lactic-co-glycolic acid)-PEG-OMe triblock copolymer nanoparticles delivered intravenously into rats[J]. *Nanotechnology*, 2014, 25(24):245705.
- [17] LI Y, ZHANG T, LIU Q, et al. PEG-derivatized dual-functional nanomicelles for improved cancer therapy[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10(808):1-15.
- [18] PHAN Q T, LE M H, LE T, et al. Characteristics and cytotoxicity of folate-modified curcumin-loaded PLA-PEG micellar nano systems with various PLA: PEG ratios[J]. *Int J Pharm*, 2016, 507(1/2):32-40.

(收稿日期:2021-05-17 修回日期:2021-09-02)

(编辑:陈宏)