

文章编号: 1006-2858(2013)11-0829-08

pH 敏感聚(2-乙基-2-噁唑啉)-壳聚糖-阿霉素 共聚物胶束的制备及性质考察

胡海洋, 孙 嫣, 康爽明, 赵秀丽, 乔明曦, 陈大为*

(沈阳药科大学 药学院 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 合成 pH 敏感两亲性接枝共聚物聚(2-乙基-2-噁唑啉)-壳聚糖-阿霉素(PEOz-g-CS-Hyz-DOX), 采用透析法制备阿霉素 pH 敏感两亲性共聚物胶束并对其相关的制剂学性质、细胞抑制及细胞摄取行为进行考察。方法 分别利用透射电镜(TEM)、动态光散射法(DLS)和 zeta 电位分析仪对胶束的形态、粒径和表面电位进行表征; 采用透析法考察载药聚合物胶束的体外释放行为; 采用 MTT 法考察聚合物胶束的细胞抑制作用。结果 反应产物使用红外及核磁表征, 确定为目标产物; PEOz-g-CS-Hyz-DOX 聚合物胶束载药量为 4.2%。采用透析法制备的载阿霉素聚(2-乙基-2-噁唑啉)-壳聚糖丁二酸单甲酯胶束(PEOz-g-CSMS/DOX) 载药量可达 5.62%, 包封率为 59.35%; 两种胶束的粒径均较小且粒径分布很窄, 胶束粒子为球形且分散良好; 两种胶束释药行为体现 pH 敏感性; PEOz-g-CS-Hyz-DOX 聚合物胶束体外细胞毒作用及细胞摄取均优于 PEOz-g-CSMS/DOX 胶束和阿霉素溶液。结论 以壳聚糖为载体的化学键释药胶束作为抗肿瘤药物的药物传递系统具有可行性及良好的应用前景。

关键词: 阿霉素; pH 敏感; 聚(2-乙基-2-噁唑啉); 壳聚糖; 两亲性共聚物胶束; 细胞摄取

中图分类号: R 94 **文献标志码:** A

阿霉素(doxorubicin, DOX) 具有很强的抗肿瘤活性, 由于其水溶性差、半衰期短、对心脏、骨髓毒性大等缺点限制了其在临床上的应用^[1]。采用两亲性壳聚糖共聚物胶束作为载体, 可以增加阿霉素的溶解度, 降低毒性, 提高生物利用度并延长体内滞留时间^[2]。壳聚糖具有良好的生物相容性和可降解性, 由于其分子中富含游离的羟基和氨基, 可以将亲水性或亲脂性基团通过酰化和羟化反应与其连接, 从而生成具有不同性能的两亲性衍生物。通过化学、物理以及静电作用等途径形成具有核-壳结构的囊腔来包裹药物。其中化学键合载药方式的优势尤为突出^[3], 它主要通过引入可以在肿瘤组织细胞酸性环境下酸解的连接臂来实现。肿瘤内部存在不同的酸性环境, 包括细胞间质中的弱酸性环境(extracellular pH, pH_E)、癌细胞中内涵体和溶酶体中更强的酸性环境。正常组织的 pH 值一般为 7.4。肿瘤内部的缺氧状态使肿瘤细胞无氧糖酵解产生乳酸, 而肿瘤内部血管系统的缺乏使产生的乳酸不能充分排

出, 导致肿瘤内呈酸性^[4]。用电子及化学探针等方法测量肿瘤内 pH 值在 5.7 ~ 7.8, 均值为 7.06^[5]。肿瘤细胞中早期内涵体的 pH 值在 6.0 左右^[6], 有的甚至低于 5.4^[7], 而晚期内涵体的 pH 值一般在 5.0 左右^[8]。溶酶体的 pH 值更低(4.0 ~ 5.0)^[9]。肿瘤中的这些酸性环境可以作为信号, 用于触发载药胶束的药物快速释放、细胞内吞及其细胞器靶向。PEOz 是由 2-乙基-2-噁唑啉(EOz) 阳离子开环聚合得到的乙烯亚胺类聚合物。自从上个世纪六十年代被合成出来, PEOz 已被证明具有良好的亲水性、生物相容性以及分子链柔性, 可作为 PEG 的潜在替代品^[10]。

作者设计并合成了能够对肿瘤细胞内溶酶体 pH 值有响应的键结合聚(2-乙基-2-噁唑啉)-羧甲基壳聚糖-阿霉素(PEOz-g-CS-Hyz-DOX), 使其所制备的聚合物胶束能够在内溶酶体内释药, 降低阿霉素对正常组织的毒性。采用透析法制备 PEOz-g-CS-Hyz-DOX 聚合物胶束及 PEOz-g-CSMS/DOX 聚合物胶束并对其制剂学性质、细胞

收稿日期: 2013-03-20

基金项目: 辽宁省教育厅青年基金资助项目(L2010528)

作者简介: 胡海洋(1977-), 男(汉族), 辽宁大连人, 讲师, 博士, 主要从事现代靶向给药系统的研究, Tel. 024-23986308, E-mail haiyang_hu@hotmail.com; * 通讯作者: 陈大为(1959-), 男(汉族), 辽宁海城人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事现代新剂型的研究, Tel. 024-23986306, E-mail chendawei@syphu.edu.cn。

毒性和细胞摄取进行初步研究。

1 仪器与材料

Bruker vector 22 红外光谱仪(瑞士 Bruker 公司), AVANCE-600 核磁共振波谱仪(TMS 为内标, 瑞士 Bruker 公司), Waters 1515 凝胶渗透色谱仪(美国 Waters 公司), JEM-1200EX 透射电子显微镜(日本电子公司): Nicomp380 Z3000 纳米粒径与 Zeta 电位分析仪(苏州微流纳米生物技术有限公司), UV-9100 紫外可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司), DFY-5L/

30 低温冷阱(河南巩义英峪予华仪器有限公司), JY92-2D 超声波细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所), FA1104 电子天平(上海民桥精密仪器科技有限公司), DF-401B 集热式恒温磁力搅拌器(浙江乐清乐成电器厂), ZRD6-B 药物溶出仪(上海黄海药检仪器厂)。

2-乙基-2-噁唑啉(EOz, 北京百灵威科技有限公司), 对甲基苯磺酸甲酯(MeOTs, 美国 Sigma 公司), 羧甲基壳聚糖(重均相对分子质量为 0.50×10^5 , 95% 脱乙酰度, 羧基取代度大于 60%, 国药集团化学试剂有限公司), 盐酸阿霉素(含量质量分数 > 98.0%, 北京华奉联博科技有限公司, 批号 HF070312, 本研究中使用三乙胺进行脱盐酸处理), EDC(吉尔生化上海有限公司), 透析袋(上海绿鸟科技发展有限公司进口分装, 批号 081008, 截留相对分子质量 3 500), DMEM 培养基(GIBCO, Grand Island, NY, USA), 其他试剂(分析纯, 市售)。

2 方法与结果

2.1 脰键结合聚(2-乙基-2-噁唑啉)-羧甲基壳聚糖-阿霉素的合成与表征

2.1.1 聚(2-乙基-2-噁唑啉)的合成

采用活性阳离子开环聚合法合成聚(2-乙基-2-噁唑啉)(PEOz-NH₂)。将干燥的三颈圆底烧瓶、球形冷凝管、三通阀和恒压漏斗组装成反应体系。油泵抽真空, 然后充氮气。向体系中注入 2-乙基-2-噁唑啉(EOz) 单体 10 mL, 再注入适量溶有引发剂 MeOTs 0.202 5 g 的无水乙腈溶液, 80 °C 下反应 24 h, 待反应体系冷却到室温后, 加入适量含饱和 NH₃ 的乙腈溶液, 在低温冷阱(4 °C)中反应 24 h 终止聚合反应。旋蒸除尽溶剂, 并以适量氯仿溶解产物, 硅胶柱过滤, 滤液滴至冰乙醚中

得到沉淀。静置, 倾去上清液, 沉淀在真空干燥器里干燥 48 h, 得到产物为白色粉末。PEOz-NH₂ 的红外谱图中(溴化钾压片), 3 496 cm⁻¹ 为—NH 的伸缩振动峰位, 1 637 cm⁻¹ 为单体 EOz 开环聚合后所产生的叔酰胺上羰基的伸缩振动峰位, 1 547 cm⁻¹ 为—NH 的面内弯曲振动峰位。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) 谱中, 给出 δ 3.4 (m, PEOz-NH₂ 主链的—CH₂CH₂—), 2.1 ~ 2.4 (br s, PEOz-NH₂ 侧链的—CH₂—) 和 1.1 (s, PEOz-NH₂ 中侧链的—CH₃) 质子信号。凝胶渗透色谱法(GPC)测定相对分子质量为 5 296, 分散系数为 1.17。

2.1.2 壳聚糖丁二酸单甲酯(CSMS)的合成

将丁二酸单甲酯(MS) 0.4 g (3 mmol)、*N*-羟基琥珀酰亚胺 0.3 g (4.5 mmol) 溶于 30 mL DMSO 中, 再加入 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC) 0.86 g (4.5 mmol), 室温反应 8 h。抽滤除去反应沉淀。将反应液于搅拌下缓慢加入到羧甲基壳聚糖(CS) 5 g (约 0.1 mmol) 的水溶液中, 室温反应 48 h, 加入过量丙酮沉淀产物, 过滤, 50 °C 减压干燥。所得产物的产率为 87.2%。CSMS 的红外谱图中(溴化钾压片), 3 427 cm⁻¹ 为 O—H 的伸缩振动峰, 2 876 cm⁻¹ 为 C—H 伸缩振动峰, 1 741 cm⁻¹ 为酯羰基峰, 1 659 cm⁻¹ 为酰胺羰基峰, 1 601 cm⁻¹ 和 1 323 cm⁻¹ 为氨基和羟基取代的羧基, 1 154 cm⁻¹ 为 C—O—C 伸缩振动峰, 1 079 cm⁻¹ 为 C—O 伸缩振动峰。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) 谱中, 给出 δ 2.06 (s, 丁二酸单甲酯的—COCH₃), 3.22 (s, 糖环的 CH), 3.40 (s, CH, 糖环氨基上取代的甲基) 和 4.05 ~ 4.55 (br s, CH₂, 糖环羟基上取代的羧亚甲基) 质子信号。

2.1.3 聚(2-乙基-2-噁唑啉)-壳聚糖丁二酸单甲酯(PEOz-g-CSMS)的合成

将羧甲基壳聚糖丁二酸单甲酯(CSMS) 5 g (约 0.1 mmol)、*N*-羟基琥珀酰亚胺 0.26 g (3.74 mmol) 溶于 30 mL 水中, 再加入 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 0.72 g (3.74 mmol), 室温反应 24 h。加入 PEOz-NH₂ 0.6 g (0.12 mmol) 室温反应 72 h。反应产物透析后, 冷冻干燥。经计算 PEOz 取代度约为 6.5%。

2.1.4 脰键结合聚(2-乙基-2-噁唑啉)-基壳聚糖-阿霉素(PEOz-g-CS-Hyz-DOX)的合成

将聚(2-乙基-2-噁唑啉)-壳聚糖丁二酸单

甲酯(PEOz-g-CSMS) 6.2 g(约 0.1 mmol)溶于 30 mL 水中,加入水合肼 0.22 g(4.5 mmol),室温反应 12 h。反应产物透析后,冷冻干燥。称取反应产物 2.1 g(约 30 μ mol)、EDC 0.29 g(1.5 mmol)溶于 30 mL DMSO 中,加入阿霉素 0.54 g(1 mmol),室温反应 24 h。反应产物透析后,冷冻干燥。最终反应产物通过透析法纯化后,冷冻干燥并使用 IR(溴化钾压片)和核磁(DMSO- d_6)进行结构表征。红外光谱(溴化钾压片)表明: 3 300 cm^{-1} 、2 400 ~ 3 400 cm^{-1} 、1 530 cm^{-1} 分别为—NH、—OH 的伸缩振动峰位和—NH 的面内弯曲振动峰位, 1 734 cm^{-1} 为—C=N(阿霉素羰基)的伸缩振动峰, 1 630 和 1 640 cm^{-1} 为酰胺键中—C=N 吸收峰, 1 154 cm^{-1} 为 C—O—C 的伸缩振动峰, 1 079 cm^{-1} 为 C—O 的伸缩振动峰。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6)谱中,给出 δ 3.4 (m, PEOz—NH₂ 主链的—CH₂CH₂—)、2.1 ~ 2.4 (br s, PEOz—NH₂ 侧链的—CH₂—)、1.1 (s, PEOz—NH₂ 侧链的—CH₃)、1.12 和 2.65 (s, DOX 的 C-5' 上的—CH₃)、3.22 (s, 糖环的—CH—)、3.97 (s, DOX 上的 4—CH₃)、4.05 ~ 5.0 (br s, 羟基上取代的羧甲基的—CH—)、5.28 (s, DOX 上的 H-1')、7.63 (s, DOX 的 H-2) 和 7.9 (br s, DOX 上的 H-1, 3) 质子信号。经 IR 和核磁的检测,证明最终反应产物为目标产物。反应过程如图 1 所示。

2.2 载阿霉素聚合物胶束的制备

分别将一定量 PEOz-g-CS-Hyz-DOX(药物化学键合)、阿霉素与 PEOz-g-CSMS(药物物理包埋)溶于 2 mL DMSO 并装入透析袋中,透析过夜, 0.45 μm 微孔滤膜过滤,分别制备 PEOz-g-CS-Hyz-DOX 聚合物胶束及 PEOz-g-CSMS/DOX 聚合物胶束。

2.3 胶束包封率与载药量的测定

药物物理包埋: 将载药胶束溶液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,精密量取滤液 3 mL,用 DMSO 破坏并定容至 10 mL,于波长 480 nm 处测定其吸光度,带入标准曲线计算胶束溶液中阿霉素的含量。包封率(entrapment efficiency, EE)和载药量(loading content, LC)计算公式如下: 包封率 = $m_1/m_2 \times 100\%$; 载药量 = $m_1/(m_1 + m_3) \times 100\%$ 。式中: m_1 为胶束中药物的质量(mg), m_2 为加入的药物的质量(mg), m_3 为聚合物载体的质量(mg)。

药物化学键合: 将载药胶束溶液用 0.45 μm

微孔滤膜过滤,精密量取滤液 3 mL,使用 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液定容至 10 mL, 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床振荡 2 h。于波长 480 nm 处测定其吸光度,带入标准曲线计算胶束溶液中阿霉素的含量。载药量计算公式如下: 载药量 = $m_1/m_2 \times 100\%$ 。式中: m_1 为胶束中药物的质量(mg), m_2 为载药聚合物的质量(mg)。

作者选用透析法制备胶束聚合物胶束,结果见表 1。在聚合物量一定的情况下,随着投药量逐渐增加至 1 mg,载药量增加,而包封率下降;继续增加至 2 mg,包封率下降较大。包封率下降较大的原因可能是过多的难溶性固体药物干扰胶束的形成和稳定性,导致胶束聚沉。同时,疏水性药物游离在胶束外面,增加了药物与疏水内核之间、疏水内核与疏水内核之间相互接触的机会,易使胶束发生再聚集,导致溶液中产生较大的粒子,加剧了胶束的聚沉。根据以上结果,最后确定实验的最优处方为以 DMSO 为分散介质,载体材料 20 mg,投药量为 1 mg,在蒸馏水中透析法制备载药共聚物胶束。对于通过化学键结合载药的聚合物,测得 PEOz-g-CS-Hyz-DOX 聚合物胶束载药量为 4.2%。

Table 1 Influence of DOX amount on the encapsulation of DOX in polymeric micelles

表 1 阿霉素用量对载阿霉素聚合物胶束包封率的影响

$m(\text{DOX})/\text{mg}$	EE/%	LC/%
0.5	80.82	3.84
1.0	59.35	5.62
2.0	26.34	5.01

2.4 胶束的形态观察、粒径以及 zeta 电位的测定

取少量胶束溶液滴至载玻片上,用体积分数 1% 磷钨酸进行负染,再滴至专用铜网上,自然挥干,使粒子在铜网上浓缩沉积,通过透射电子显微镜观察胶束的形态并照像。利用 Nicomp380 粒度测定仪测定胶束的粒径及粒度分布。利用 JEM-1200EX 透射电子显微镜观察载药胶束的形态。

结果显示(图 2): PEOz-g-CSMS/DOX 胶束粒径主要分布为(132.1 $\pm$ 6.9) nm, PEOz-g-CS-Hyz-DOX 胶束粒径主要分布为(129.4 $\pm$ 3.4) nm,两种胶束粒径均较小,且分布范围较窄。利用 PSS-NICOMP380 ZLS 测定 PEOz-g-CSMS/DOX 胶束的 zeta 电位平均值为 -16.15 mV,与未载药 PEOz-g-

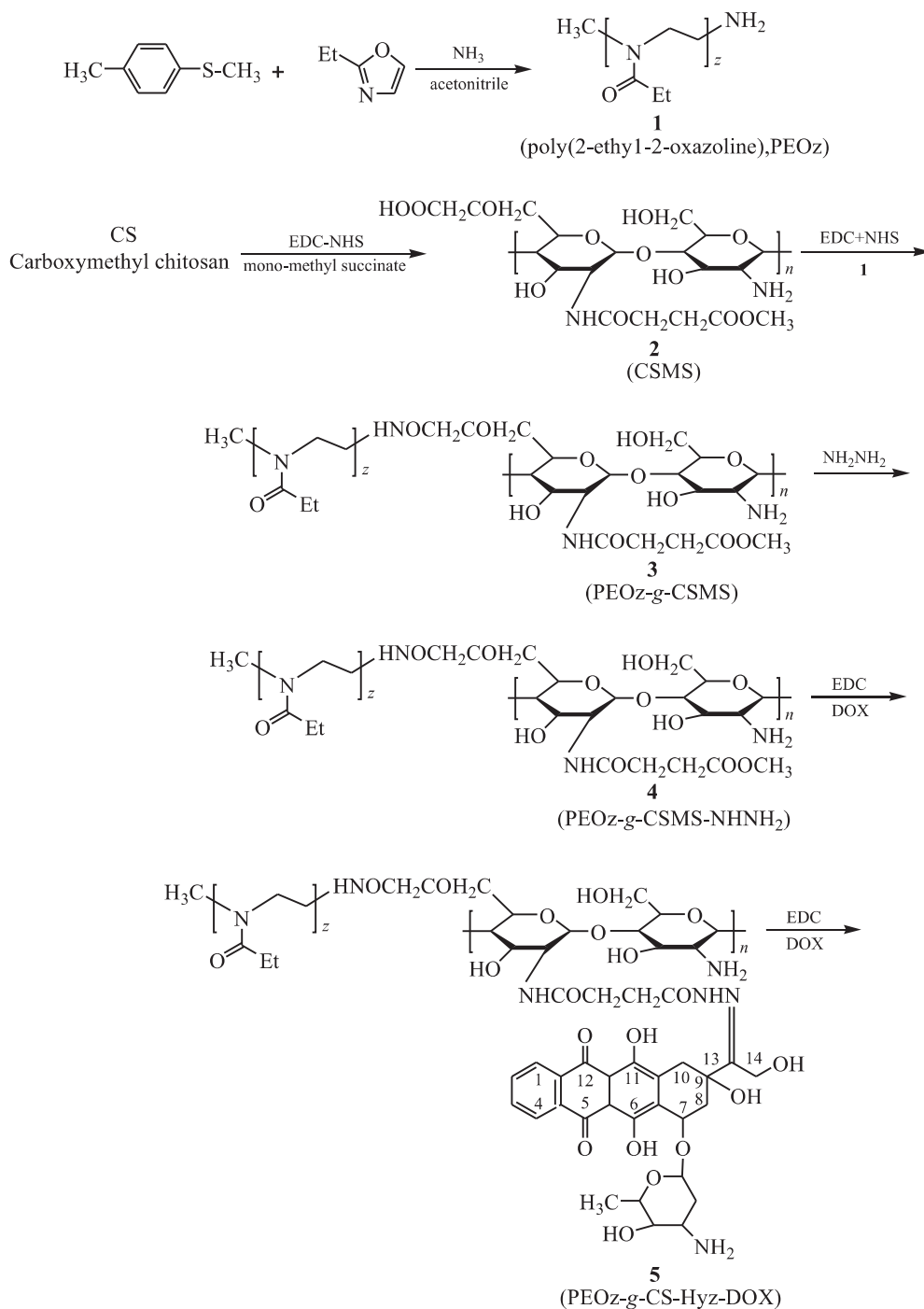


Fig. 1 The synthetic route of PEOz-*g*-CS-Hyz-DOX

图1 PEOz-g-CS-Hyz-DOX 的合成路线

-CSMS 胶束相比, 聚合物胶束载药后其 zeta 电位的绝对值略大, 可能是由于未被包裹至 PEOz-*g*-CSMS 内腔中的 DOX 的影响。PEOz-*g*-CS-Hyz-DOX 聚合物胶束 zeta 电位平均值为 -2.52 mV 。以透射电镜观察 PEOz-*g*-CSMS/DOX 胶束和

PEO g - g -CS-Hyz-DOX 胶束样品,结果如图 3。两种胶束由电镜图片可见,聚合物胶束的粒径在 120 nm 左右,与动态光散射法测定粒径数据相近。共聚物胶束具有规则的类球形结构,大小均一。

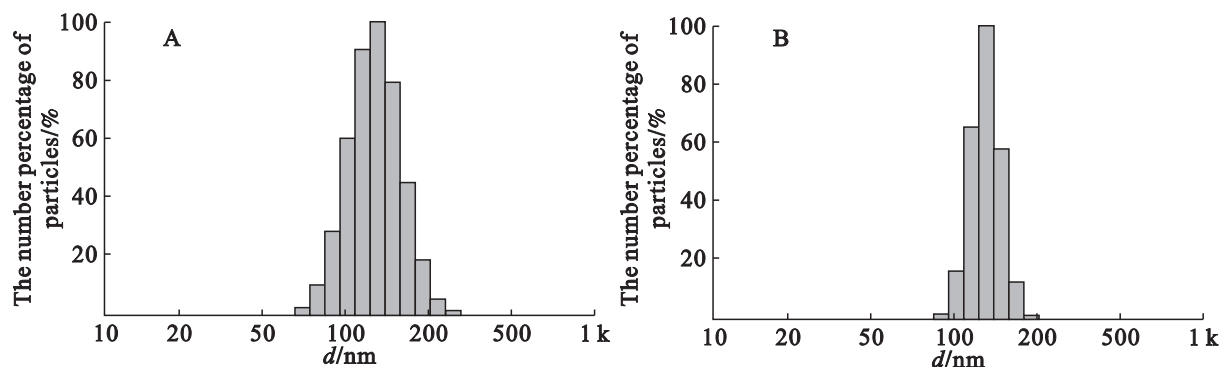


Fig. 2 The size and size distribution of PEOz-g-CSMS/DOX micelles (A) and PEOz-g-CS-Hyz-DOX micelles (B)

图 2 以万计物理包埋阿霉素 PEOz-g-CSMS 聚合物胶束 (A) 和脲键结合阿霉素 PEOz-g-CS-Hyz-DOX 聚合物胶束 (B) 的粒径及粒径分布图

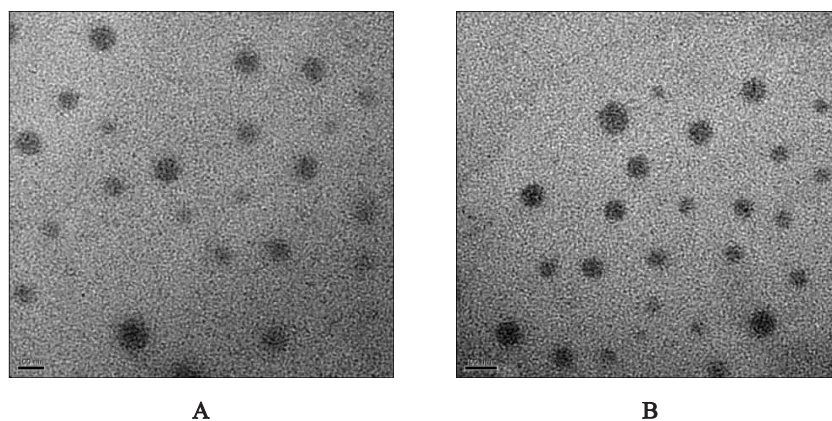


Fig. 3 TEM photograph of PEOz-g-CSMS/DOX micelles (A) and PEOz-g-CS-Hyz-DOX micelles

图 3 物理包埋阿霉素 PEOz-g-CSMS 聚合物胶束 (A) 和脲键结合阿霉素 PEOz-g-CS-Hyz-DOX 聚合物胶束的透射电镜图

2.5 阿霉素聚合物胶束体外释药行为的研究

精密吸取 2 种载药胶束 3 mL 置于透析袋中, 分别置于 80 mL pH 值 7.4、6.5、4.0 和 1.2 的释放介质中, 37 °C 下恒温搅拌, 转速 30 r·min⁻¹, 定时取出释放介质 3 mL, 同时补充等体积等温相应 pH 值的释放介质。高效液相色谱法测定释放介质中的药物含量, 计算累计释放度并绘制释放曲线, 考察释放介质 pH 值对 2 种聚合物胶束释放的影响。

PEOz-g-CSMS/DOX 聚合物胶束在不同释放介质中的释放曲线如图 4 所示。在 pH 值为 7.4 的释放介质中, 胶束释药平稳, 96 h 累积释药量为 58.3%, 表现出一定的缓释效果, 但药物存在一定的突释现象。在 pH 值为 6.5 时, 释药加快, 且有一定的缓释效果, 此 pH 值与肿瘤组织的 pH 值较接近, 便于部分药物在肿瘤组织释放。在 pH 值 4.0 时, 阿霉素胶束突释明显, 释药快速且完全, 96 h 释药近 89%。PEOz-g-CSMS/DOX 聚合

物胶束在体外 pH 敏感释药区域内有利于胶束在肿瘤组织及细胞部位释药, 因此可提高靶组织或靶细胞的药物浓度。

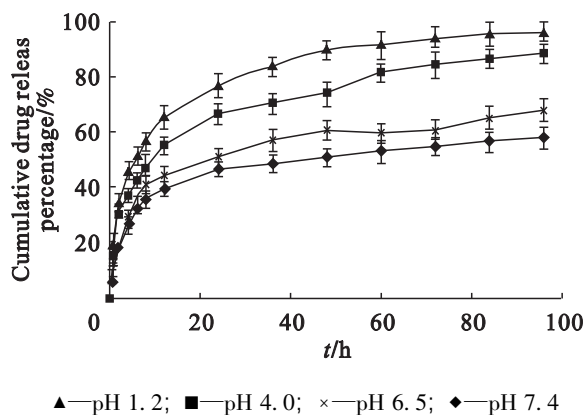


Fig. 4 Release behaviors of DOX from PEOz-g-CSMS/DOX polymeric micelles *in vitro* under different pH conditions

图 4 物理包埋阿霉素 PEOz-g-CSMS 聚合物胶束中阿霉素在不同 pH 值下的释放曲线

PEO z - g -CS-Hyz-DOX 聚合物胶束在不同释放介质中的释放曲线如图5所示。由图5可知,载药胶束在较高 pH 值的释放介质中释药平稳,无明显的突释现象,说明 PEO z - g -CS 与药物分子通过化学键结合牢固,胶束对药物的接载效果较好,基本无泄露情况。累积释放度随释放介质 pH 值的降低而增大。其中,在 pH 值为 7.4 的释放介质中 96 h 的累积释放度为 13.03%,有效减少了药物在体循环过程中的泄漏。而在 pH 值为 4.0 的释放介质中,96 h 的累积释放度分别为 64.39%,明显大于 pH 值为 7.4 的释放介质中的累积释放度。PEO z - g -CS-Hyz-DOX 聚合物胶束在体外 pH 敏感释药区域内有利于胶束在肿瘤内部酸性环境中释药,实现更快的杀伤肿瘤细胞的目的。

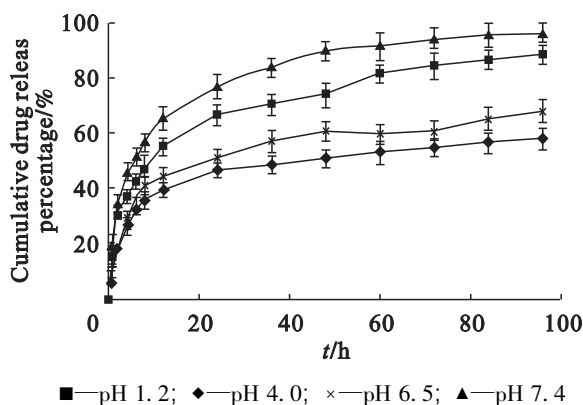


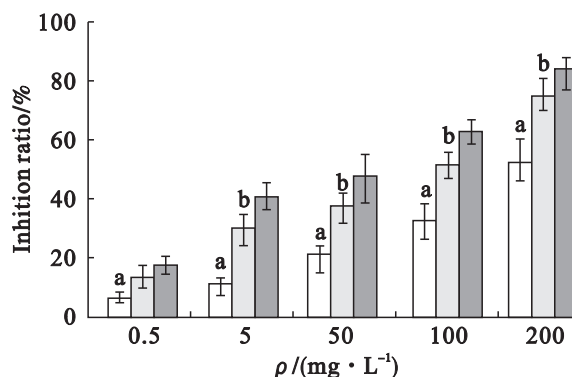
Fig. 5 Release behaviors of DOX from PEO z - g -CS-Hyz-DOX polymeric micelles *in vitro* under different pH conditions

图5 脰键结合阿霉素 PEO z - g -CS-Hyz-DOX 聚合物胶束中阿霉素在不同 pH 值下的释放曲线

2.6 载药聚合物胶束对 MCF-7 细胞的细胞毒作用

取对数生长期 MCF-7 细胞,以 $50 \text{ cells} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的密度接种于 96 孔培养板,于 37°C 、体积分数 5% CO_2 条件下培养 24 h,每孔分别给予 PEO z - g -CSMS/DOX 聚合物胶束、PEO z - g -CS-Hyz-DOX 聚合物胶束和 DOX 溶液 $200 \mu\text{L}$,使 DOX 在培养液中的终质量浓度为: 0.5、5、50、100 和 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。每一质量浓度平行 6 孔,对照组加入 DMEM 培养基 $200 \mu\text{L}$,分别于体积分数 5% CO_2 培养箱、 37°C 培养 24 h 后,每孔加 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT 溶液 $20 \mu\text{L}$,孵箱中培养 4 h 后,去培养液,每孔加 DMSO $150 \mu\text{L}$,震荡 10 min,在波长 492 nm 处测 OD 值,计算细胞抑制率。24 h 的 MTT 结果见

图6。结果表明,在 pH 值 7.4 条件下,PEO z - g -CSMS/DOX 胶束组与 PEO z - g -CS-Hyz-DOX 胶束组均表现出明显的细胞毒作用,且强于 DOX 溶液组,但 3 组都呈明显的质量浓度依赖关系。PEO z - g -CSMS/DOX 胶束组的细胞毒作用小于 PEO z - g -CS-Hyz-DOX 胶束组。



a— $P < 0.05$, PEO z - g -CS-Hyz-DOX vs. DOX (one-way analysis of variance test); b— $P < 0.05$, PEO z - g -CS-Hyz-DOX vs. PEO z - g -CSMS/DOX group; □—DOX; □—PEO z - g -CSMS/DOX; ■—PEO z - g -CS-Hyz-DOX

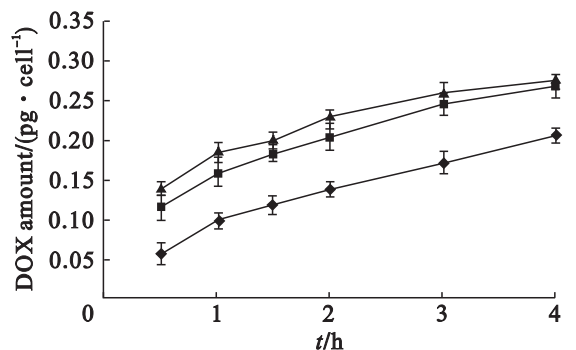
Fig. 6 The cell cytotoxicity of PEO z - g -CSMS/DOX and PEO z - g -CS-Hyz-DOX against MCF-7 cells, the cells were incubated for 24 h

图6 阿霉素、PEO z - g -CSMS/DOX 与 PEO z - g -CS-Hyz-DOX 对 MCF-7 细胞 24 h 的细胞毒作用

2.7 细胞摄取动力学研究

取对数生长期的 MCF-7 细胞,以每孔 1×10^6 个细胞接种于 12 孔板,分别给予含阿霉素质量浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PEO z - g -CSMS/DOX 聚合物胶束、PEO z - g -CS-Hyz-DOX 聚合物胶束和阿霉素溶液 (DMEM 培养液稀释),置于 37°C 的培养箱中分别孵育 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 和 4.0 h。将培养板内的培养液倒出,4 $^\circ\text{C}$ 预冷 PBS (pH 值为 7.2) 并清洗细胞 3 次,每个孔加入消化液 $100 \mu\text{L}$ 进行消化 2、3 min,消化完毕后,加入适量 PBS,将每孔内的细胞转移至离心管内,冰浴下探头超声 (工作 25 s,间歇 35 s,100 W 超声 5 min), $15000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液,在激发波长为 497 nm、发射波长为 555 nm 条件下,利用荧光分光亮度计测定阿霉素的浓度。如图 7 所示,随着时间的延长,3 个实验组的细胞内药物浓度均增加。在 0.5 h 时,PEO z - g -CS-Hyz-DOX 胶束组胞内浓度最高。游离阿霉素溶液组的胞内浓度在整个实验时间段内低于其他 2 个制剂组,但是浓度随时间变化明显,没有出现平台期。PEO z - g -CSMS/DOX 胶束组与 PEO z - g -CS-Hyz-DOX 胶束中胞内药物浓度的增加

速率都较游离阿霉素组快,并且也没有出现平台期,说明这些组的药物进入细胞的速率在 4 h 内要高于药物外排速率,胞内浓度没有达到相对平衡。在实验时间内 PEO z - g -CS-Hyz-DOX 胶束组的摄取快于 PEO z - g -CSMS/DOX 胶束组,分析原因是由于 PEO z - g -CSMS/DOX 胶束存在突释作用,使得通过胶束摄取的药物量减少。



▲—PEO z - g -CS-Hyz-DOX; ■—PEO z - g -CSMS/DOX; ◆—DOX

Fig. 7 Cellular uptake efficiency of DOX mediate by PEO z - g -CSMS/DOX and PEO z - g -CS-Hyz-DOX and free DOX ($n=6$)

图 7 阿霉素、PEO z - g -CSMS/DOX 与 PEO z - g -CS-Hyz-DOX 在 MCF-7 细胞中的摄取 ($n=6$)

3 讨论

a. 聚合反应时易发生氧化反应,一方面使引发剂、催化剂氧化变质,降低其效能,另一方面生成带颜色杂质,增加目标产物分离纯化的难度。本文作者参考国外文献,选择乙腈作为开环聚合反应的溶媒,同时调整温度,使反应体系保持微沸状态。实验结果表明,反应在乙腈沸点温度(80 °C)下进行,转化率较高,可达到 81.5%,同时能够有效地控制氧化变色现象的发生,获得白色较为纯净的产物。

b. 关于聚合物胶束的制备,目前文献报道比较常用的方法是透析法和薄膜分散法。溶解法虽然制备胶束较快且便捷,但由于阿霉素脱盐酸盐过程中过量的三乙胺以及生成的盐很难被除去,影响胶束的稳定性且胶束粒径分布不均。薄膜分散法难以找到既能较好溶解聚合物又具有较好挥发性的良溶剂,因此这些方法都不适合。而透析法效果较好,粒径分布较均匀且稳定性好,且因类似聚合物多采用透析法制备载药胶束,故本研究中物理包埋法选用透析法。以化学键合载药方式与阿霉素进行偶合主要有两种方式:酰胺键和酰

胺键。根据国外文献报道^[11-13],酰胺键对环境 pH 值变化敏感,可以精确响应及定位肿瘤或者病变组织的异常酸性特征。

c. 两种载药聚合物胶束体外释放实验表明,与对照组原料药相比两种共聚物胶束具有明显的缓释效果,且伴随 pH 值的降低,胶束的释药量增加,释药速度加快。其中: PEO z - g -CS-Hyz-DOX 在 pH 值 7.4 条件下释放量非常低,而在 pH 值 4.0 时释放量显著增加,表明胶束的释药行为具有明显的 pH 值敏感性,并能减少药物在体循环过程中的泄露,实现细胞内释药。

d. 大分子的纳米粒如脂质体、聚合物胶束进入细胞是通过内吞的方式^[14-15]。胶束进入细胞后倾向于聚集在酸性细胞器中,然后在溶酶体等细胞器中被降解后释放药物^[16]。PEO z - g -CS-Hyz-DOX 制剂组通过内吞进入细胞后,由于胞内酸性环境(溶酶体),制剂中 pH 值敏感化学键连接的阿霉素会很快从胶束中释放,从而进入细胞核中,有利于减少药物在体循环过程中的泄漏,降低药物对正常组织器官的损害。

参考文献:

- [1] NAKANISHI T, FUKUSHIMA S, OKAMOTO K, et al. Development of the polymer micelle carrier system for doxorubicin [J]. J Control Release, 2001, 74(1/2/3): 295-302.
- [2] NATALYA R. Physical stimuli-responsive polymeric micelles for anti-cancer drug delivery [J]. Prog Polym Sci, 2007, 32(8/9): 962-990.
- [3] TORCHILIN V P. Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems [J]. J Control Release, 2001, 73: 137-172.
- [4] STUBBS M, MCSHEEHY P M J, GRIFFITHS J R, et al. Causes and consequences of tumor acidity and implications for treatment [J]. Mol Med Today, 2000, 6: 15-19.
- [5] MARTIN G R, JAIN R K. Noninvasive measurement of interstitial pH profiles in normal and neoplastic tissue using fluorescence ratio imaging microscopy [J]. Cancer Res, 1994, 54: 5670-5674.
- [6] MURPHY R F, POWERS S, CANTOR C R. Endosome pH measured in single cells by dual fluorescence flow cytometry: rapid acidification of insulin to pH 6 [J]. J Cell Biol, 1984, 98: 1757-1762.
- [7] KILLISCH I, STEINLEIN P, ROMISCH K, et al. Characterization of early and late endocytic compartments of

- the transferrin cycle: transferrin receptor antibody blocks erythroid differentiation by trapping the receptor in the early endosome [J]. *J Cell Sci* ,1992 ,103: 211 – 232.
- [8] SCHMID S ,FUCHS R ,KIELIAN M ,et al. Acidification of endosome subpopulations in wild-type Chinese hamster ovary cells and temperature-sensitive acidification-defective mutants [J]. *J Cell Biol* ,1989 ,108: 1291 – 1300.
- [9] STEINMAN R M ,MELLMAN I S ,MULLER W A ,et al. Endocytosis and the recycling of plasma membrane [J]. *J Cell Biol* ,1983 ,96: 1 – 27.
- [10] MERO A ,PASUT G ,DALLA VIA L ,et al. Synthesis and characterization of poly(2-ethyl 2-oxazoline)-conjugates with proteins and drugs: suitable alternatives to PEG-conjugates? [J]. *J Control Release* ,2008 ,125 (2) : 87 – 95.
- [11] YOO H S ,LEE E A ,TAE G P. Doxorubicin-conjugated biodegradable polymeric micelles having acid-cleavable linkages [J]. *J Control Release* 2002 ,82(1) : 17 – 27.
- [12] HRUBY M ,ULBRICH K. Polymeric micellar pH-sensitive drug delivery system for doxorubicin [J]. *J Control Release* 2005 ,103(1) : 137 – 148 ,242 – 250.
- [13] YOUNG B ,JANG W D ,NISHIYAMA N ,et al. Multifunctional polymeric micelles with folate-mediated cancer cell targeting and pH-triggered drug releasing properties for active intracellular drug delivery [J]. *Molecular Bio Systems* 2005 ,6(1) : 242 – 250.
- [14] BRIGGER I ,DUBERNET C ,COUVREUR P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis [J]. *Adv Drug Deliv Rev* 2002 ,54(5) : 631 – 651.
- [15] PANYAM J ,LABHASETHWAR V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue [J]. *Adv Drug Deliv Rev* 2003 ,55(3) : 329 – 347.
- [16] SHUAI X T ,AI H ,NASONGKLA N ,et al. Micellar carriers based on block copolymers of poly(ϵ -caprolactone) and poly(ethylene glycol) for doxorubicin delivery [J]. *J Control Release* 2004 ,98(3) : 415 – 426.

Preparation and characteristics of poly(2-ethyl-2-oxazoline) -chitosan-doxorubicin polymeric micelles

HU Hai-yang , SUN Yan , KANG Shuang-ming , ZHAO Xiu-li , QIAO Ming-xi , CHEN Da-wei*
(School of Pharmacy , Shenyang Pharmaceutical University , Shenyang 110016 , China)

Abstract: **Objective** To synthesize poly(2-ethyl-2-oxazoline) -chitosan-doxorubicin (PEOz-g-CS-Hyz-DOX) and study the characteristics ,the inhibition effects and cellular uptake of the pH sensitive amphiphilic copolymer micelles. **Methods** The morphology ,diameter and surface potential of the micelles were characterized by transmission electron microscopy(TEM) ,dynamic light scattering(DLS) and zeta potential analyzer ,respectively. The *in vitro* release behavior of DOX from polymeric micelles was investigated using dialysis method. The cellular uptake of polymeric micelles were investigated. **Results** The synthesized polymers were characterized by FT-IR ,¹H-NMR. The results indicated that drug-loaded amount and entrapment efficiency of the PEOz-g-CSMS/DOX micelles was 5. 62% and 59. 35% ,respectively. The drug-loaded amount and grafting rate of PEOz-g-CS-Hyz-DOX were 4% and 61. 5% ,respectively. The micelle was globular-shaped and had small diameter with a narrow size distribution. The pH-sensitive drug release behavior of the micelles was pH dependent. The cytotoxic against MCF-7 cells *in vitro* and cellular uptake of PEOz-g-CS-Hyz-DOX were stronger than the PEOz-g-CSMS/DOX micelles and DOX solution. **Conclusions** It can be concluded that the copolymer micelles using chitosan carrier by chemical acylhydrazone releasing drug may be applied as promising drug delivery system for anti-tumor drugs.

Key words: doxorubicin; pH sensitive; poly(2-ethyl-2-oxazoline) (PEOz) ; chitosan; amphiphilic copolymer micelles; cellular uptake