

新型树状大分子-多烯紫杉醇纳米粒的制备、表征及体外细胞毒作用

王 婷^{1,2}, 赵燕娜², 王向涛², 王艳宏¹, 郭一飞²

1. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193

摘要: 目的 新型树状大分子(PAMAM-co-0.25OEG, PGD)作稳定剂制备多烯紫杉醇(Docetaxel, DTX)纳米粒, 提高多烯紫杉醇的溶解度和生物利用度。方法 将多烯紫杉醇(DTX)、PGD按药载比8:1, 采用超声沉淀联合高压均质法制备DTX-PGD纳米粒, 动态光散射测定载药纳米粒粒径及电位; 考察37℃条件下, DTX-PGD纳米粒在生理盐水、5%葡萄糖、PBS及血浆中的稳定性及DTX-PGD纳米粒的溶血性。X射线粉末衍射法测定DTX在纳米粒中的晶型形式。透析法测定DTX-PGD纳米粒的体外释放度, MTT法检测DTX-PGD纳米粒对4T1细胞的杀伤作用。结果 多烯紫杉醇在水中的溶解度提高到1.6 mg/mL(原药在水中几乎不溶), 纳米粒载药量达65.7%。DTX-PGD纳米粒粒径270.7 nm, PDI值为0.112, 电位28.6 mV。DTX-PGD纳米粒在5%葡萄糖及血浆中稳定存在。扫描电镜观察纳米粒为片状, XRD图谱显示, 多烯紫杉醇在纳米粒中以晶体形式存在。DTX-PGD纳米粒在PBS缓冲液中释放缓慢, 有较好的缓释效果。溶血实验得知, DTX-PGD纳米粒无溶血现象, 可采用静脉注射法给药。MTT结果表明, DTX-PGD纳米粒对4T1细胞较多烯紫杉醇溶液具有更强的杀伤作用。结论 PGD树状大分子可以作为一种有效的稳定剂应用到多烯紫杉醇纳米粒的制备中, DTX-PGD纳米粒有望作为一种新型的药物输送系统应用到癌症的临床治疗中。

关键词: 树枝状大分子; 多烯紫杉醇; 纳米粒; 体外特性

中图分类号: R965

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2016)05-0741-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.05.007

Preparation, characterization, and *in vitro* cytotoxicity of docetaxel nanoparticles with a novel codendrimer as stabilizer

WANG Ting^{1,2}, ZHAO Yan-na², WANG Xiang-tao², WANG Yan-hong¹, GUO Yi-fei²

1. Heilongjiang University of traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College The Institute of Medicinal Plant Development, Beijing 100193, China

Abstract: Objective To prepare docetaxel (DTX) nanoparticles with the codendrimer PGD as a stabilizer in order to enhance the solubility and bioavailability of DTX. **Methods** The DTX-PGD nanoparticles were prepared via the method of ultrasound precipitation combined high-pressure homogenization using codendrimer PAMAM-co-0.25OEG (PGD) as a stabilizer. The particle size and Zeta potential of DTX-PGD nanoparticles were measured by dynamic light scattering; The stability of DTX-PGD nanoparticles in normal saline solution, 5% glucose, PBS, and plasma were investigated at 37℃, along with the hemolysis rate of the nanoparticles. X-ray powder diffraction was used to detect the state of DTX in DTX-PGD nanoparticles. The *in vitro* release behavior of DTX-PGD nanoparticles was measured via dialysis method. MTT assay was employed to investigate the cytotoxicity of DTX-PGD nanoparticles towards 4T1 cells. **Results** The drug loading capacity (DL%) of DTX-PGD nanoparticles was 65.7%, the solubility of DTX was increased to 1.6 mg/mL. The mean diameter of nanoparticles was 270.4 nm, the PDI was 0.128, and the Zeta potential was 28.6 mV. The DTX-PGD nanoparticles were stable in glucose and plasma. The nanoparticles exhibited schistose morphology in SEM. The XRD spectra of DTX-PGD nanoparticles showed that DTX was present as crystal morphology in the nanoparticles. The release of DTX from nanoparticles was detected in PBS + 0.5%SDS release medium and presented obvious controlled release behavior.

收稿日期: 2016-05-18

基金项目: 国家自然科学基金(NO. 21444003); 北京协和医学院青年基金(NO. 33320140184)资助项目

作者简介: 王 婷(1991—), 女, 黑龙江伊春人, 硕士研究生, 主要从事药物新剂型研究。Tel: (010)57833264 E-mail: shangzhiwushu123@163.com

*通信作者 郭一飞(1982—), 女, 河南郑州人, 副研究员, 博士, 主要从事药物新型传递系统研究。Tel: (010)57833264 E-mail: ffguo@163.com

There was no hemolytic phenomenon which means they were suitable for iv administration. MTT results showed that the nanoparticles exhibited higher cytotoxicity for 4T1 cells compared with DTX solution. **Conclusion** In summary, PGD may be an effective stabilizer for the preparation of DTX-PGD nanoparticles and DTX-PGD nanoparticle is a promising drug delivery system for DTX application in clinic.

Key words: codendrimer; docetaxel; nanoparticles; *in vitro* characteristic; cytotoxicity

多烯紫杉醇 (docetaxel, DTX) 是紫杉烷类的新一代半合成抗癌药, 结构见图 1 (a)。在临床试验中, 多烯紫杉醇已经被成功应用, 主要是用于治疗卵巢癌、乳腺癌后期, 肺癌和头/颈癌^[1-4]。但是多烯紫杉醇亲脂性高, 不溶于水, 口服吸收效果不佳, 且不稳定, 生物利用度低。纳米粒具有易制备、载体材料多样性、载药量高、生物利用度高、缓控释、可靶向给药等特点, 受到越来越多的关注^[5-6]。因此, 可以将多烯紫杉醇制备成纳米粒, 以期提高其溶解度和生物利用度。载体材料的选择是制备纳米粒的关键, 其通常由天然高分子材料和合成高分子材料两大类组成, 合成高分子载体材料更能接近应用要求, 越来越受人们的青睐。研究发现, 以四代的聚酰胺-胺 (polyamidoamine, PAMAM) 树形分子为内核, 以 25% 的偶联效率接枝的二代三乙二醇树枝化基元寡聚乙二醇 (OEG) 为外壳[图 1 (b)] 的新型两亲性树状大分子 (PAMAM-co-0.25OEG, PGD) 具有稳定性高、载药空腔大的优点, 对于多种难溶性药物均有较好的装载能力^[7-8]。此新型树状大分子不仅可以用于制备载药胶束, 还可作为稳定剂制备纳米粒。由此, 选用这一新型载体材料作为稳定剂制备多烯紫杉醇纳米粒, 以期提高多烯紫杉醇溶解度和生物利用度, 并对其进行体外特征及细胞毒作用的研究。

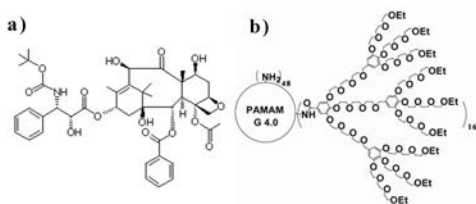


图 1 多烯紫杉醇 (a) 及 PGD (b) 分子结构

Fig.1 Molecular structure of DTX (a) and PGD (b)

1 仪器与试剂

1.1 仪器

KQ3200DB 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); DGG-9030AD 型电热恒温鼓风干燥箱 (上海森信实验仪器有限公司); Meppler Toledo AL204 电子天平 (梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限

公司); Purelab Classic 综合纯水仪 (英国 ELGA 公司); Zetasizer Nano ZS 90 (马尔文仪器有限公司); Ultimate 3000 Series 高效液相色谱仪 (Dionex); Waters Symmetry C18 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm, 美国 Waters 公司); S-4800 场发射扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) (日本日立公司); Mettler TGA/DSC 1 SF/1382 热重分析仪 (梅特勒-托利多仪器有限公司); DX-2700 型 X-射线衍射仪 (日本理学电机株式会社); NanoGenizer 高压均质机 (苏州微流纳米生物技术有限公司); 水浴恒温振荡器 (金坛国旺实验仪器厂); 细胞培养箱 (日本 Sanyo 公司); UQuant 酶标仪 (美国 Biotek 仪器公司)。

1.2 试剂

多烯紫杉醇 (docetaxel, DTX), 相对分子质量 807.88, 购自北京偶合科技有限公司; PGD 聚合物, 相对分子质量 4.6×10^4 , 由实验室合成; 乙腈 (批号 A3889, Fisher, 色谱纯); 其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 多烯紫杉醇含量测定方法学建立

2.1.1 HPLC 色谱条件^[9] Waters Symmetry C18 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.1% 的冰醋酸-乙腈 (35:65); 体积流量 0.8 mL/min; 检测波长 230 nm; 温度 25℃; 进样量 20 μL。

2.1.2 标准曲线的制备 配制 DTX 的甲醇溶液, 质量浓度分别为 100、50、25、10、5、1、0.5 μg/mL, 在 2.1.1 色谱条件下测定峰面积。以峰面积对质量浓度 (μg/mL) 进行线性回归, 得 DTX 标准曲线。

2.2 DTX-PGD 纳米粒的制备及表征

2.2.1 DTX-PGD 纳米粒的制备 纳米粒的制备采用溶剂沉淀法联合高压均质法。室温下, 称取聚合物 PGD (2 mg) 与 DTX (16 mg) 共同溶解于 *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF) (1 mL) 中, 25℃、250 W 超声条件下注入去离子水 (10 mL) 中, 继续超声 10 min, 室温条件下用去离子水透析 4 h (1 L/h), 1.8×10^5 kPa 高压均质 20 次, 得到 DTX-PGD 纳米粒。

2.2.2 DTX-PGD 纳米粒的粒径、电位及载药量测定 动态光散射测定载药纳米粒粒径及电位,以平均粒径及 Zeta 电位记录测定结果,并以 HPLC 测定其载药量 (drug loading capacity, DL%)。

测定方法:取纳米粒 5 mL,冷冻干燥后称质量,质量记为 W_1 。用甲醇溶解并定容到 25 mL,按照 2.1.1 的色谱条件测定 DTX 浓度,计算纳米粒中 DTX 总量,记为 W_2 。根据载药量公式计算 DL%。

$$DL\% = W_2 / W_1$$

2.2.3 DTX-PGD 纳米粒的粒径稳定性考察 DTX-PGD 纳米粒分别与等体积 0.9%生理盐水、5%葡萄糖、PBS 及血浆混合,37 °C 孵育,于 0、2、4、6 h 测其粒径大小,观察有无沉淀或浑浊,并以不同时间点的粒径大小对时间作图,评价 DTX-PGD 纳米粒在 0.9%生理盐水、5%葡萄糖、PBS 及血浆中的粒径稳定性。

2.2.4 DTX-PGD 纳米粒的扫描电镜观察 制备纳米粒后,冻干,涂覆金 6 min 后,通过扫描电镜观察并拍照,加速电压为 30 mV。

2.2.5 DTX-PGD 纳米粒的晶型分析 使用 DX-2700 型 X 射线衍射仪,在管压 40 kV,管流 40 MA, Cu 靶,扫描速度为 10 °C/min,扫描范围为 3~40 °C,步宽 0.02。分别检测 DTX、DTX 与 PGD 物理混合物、DTX-PGD 纳米粒冻干粉的晶型。

2.3 DTX-PGD 纳米粒的体外释放

精密吸取 1 mL 将制备好的 DTX-PGD 纳米粒 (1 mg/mL 满足漏槽条件),装入经蒸馏水浸泡处理过的透析袋 (相对分子质量 14 000) 内,将袋口扎紧,以 50 mL 的 PBS+0.5%十二烷基硫酸钠 (SDS) 组成的释放介质,在 37 °C 水浴恒温搅拌 (100 r/min)。在预设时间点 (0.5、1、2、4、6、8、10、12、24、48、72、96、120、144、168 h) 取样 5 mL,按照 2.1.1 的色谱条件, HPLC 法测其中的药物含量,同时补加同体积的释放外液,每 24 h 换液 1 次。将所取样品 10 000 r/min 离心 10 min 后,取上清液相测定释放介质中 DTX 的含量,计算累计释放率 (实验平行 3 份),绘制体外释放曲线。

2.4 DTX-PGD 纳米粒溶血性考察

分别取不同质量浓度 (1、0.5、0.25、0.125、0.0625 mg/mL) DTX-PGD 纳米粒的葡萄糖等渗液 500 μ L 与 500 μ L 红细胞悬浮液 (红细胞浓度为 4%) 混合后 37 °C 孵育 4 h, 5 000 r/min 离心 5 min, 取上清 150 μ L 于 96 孔板中,用酶标仪在 540 nm 测紫

外吸光度 (A) 值,每个浓度平行 3 份,以葡萄糖为阴性对照,以蒸馏水为阳性对照。计算溶血率。

溶血率 = (实验组的 A 值 - 阴性对照组 A 值) / (阳性对照组 A 值 - 阴性对照组的 A 值)

2.5 DTX-PGD 纳米粒的 MTT 实验

培养 4T1 细胞至对数期,按 8.0×10^3 /孔, 37 °C、5%CO₂ 培养 24 h,质量浓度为 1.6 mg/mL 的 DTX-PGD 纳米粒,用不含胎牛血清的 1640 培养基将纳米粒稀释成 0.1、1、5、10、50 μ g/mL,每个质量浓度平行给药 6 组,孵育 48 h,后加入 MTT 20 μ L/孔,孵育 4 h,吸出各孔液体,每孔加入 DMSO 200 μ L,震荡 15 min,使蓝紫色结晶物充分溶解。在酶联免疫荧光仪上检测 570 nm 下的 A 值,计算细胞存活率。

细胞存活率 = (药物组每孔 A 均值 - 空白组 A 值) / (对照组 A 均值 - 空白组 A 值)

3 结果和讨论

3.1 DTX 含量测定方法的建立

2.1.1 的色谱条件下,DTX 保留时间在 5.84 min 左右。其含量测定的最低检测限为 0.1 μ g/mL,最低定量限为 0.5 μ g/mL。以峰面积为纵坐标,以质量浓度为横坐标,得到标准曲线方程: $A = 0.4104C + 0.0196$ ($R^2 = 0.9999$)。结果表明,DTX 在 0.5~100 μ g/mL 内峰面积与质量浓度的线性关系良好。

3.2 DTX-PGD 纳米粒的制备及表征

3.2.1 DTX-PGD 纳米粒的粒径、电位及载药量测定 采用溶剂沉淀法联合高压均质制备得到的 DTX-PGD 纳米粒为乳白色溶液, DLS 测得粒径为 (270.7 ± 3.0) nm (PDI 值为 0.112 ± 0.070), 电位 (28.6 ± 2.8) mV。由图 2 的粒径分布图可以看出,

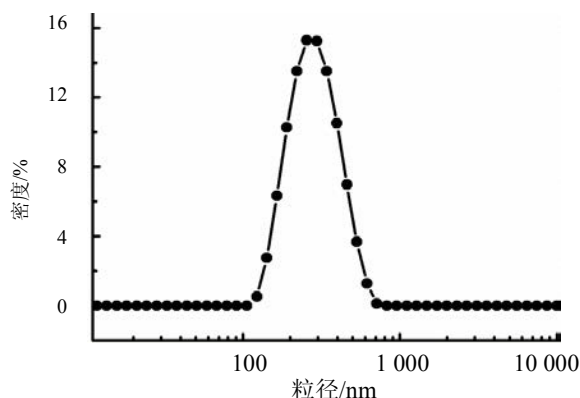


图2 DTX-PGD 纳米粒的粒径

Fig.2 Particle size distribution of DTX-PGD nanoparticles

DTX-PGD 纳米粒粒径分布为单峰,说明纳米粒粒径分布较为集中,分散较为均匀。DTX-PGD 纳米粒载药量高达 $(65.7 \pm 1.9)\%$, DTX 药物溶解度增加至 1.6 mg/mL ,即将 DTX 制备成纳米粒,有助于提高 DTX 在水中的溶解度。

3.2.2 DTX-PGD 纳米粒在生理盐水、葡萄糖、PBS 及血浆中的径稳定性考察 DTX-PGD 纳米粒在 0.9% 生理盐水及 PBS 中不稳定,在 5% 葡萄糖及血浆中稳定。考察结果见图 3,6 h 之内,DTX-PGD 纳米粒在葡萄糖和血浆中的粒径无明显变化。肉眼观察,DTX-PGD 纳米粒溶液在葡萄糖和血浆中也无明显沉淀或浑浊现象。证明纳米粒在葡萄糖中能稳定存在。纳米粒必须以等渗状态入血才可选择静脉注射给药方式,因此,DTX-PGD 纳米粒在葡萄糖等渗溶液中的稳定性为其静脉注射给药提供了可能。

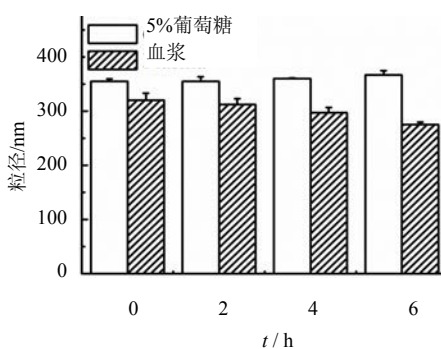


图3 DTX-PGD 纳米粒在葡萄糖及血浆中的粒径稳定性考察 ($n=3$)

Fig.3 Particle size stability of DTX-PGD nanoparticles in glucose and plasma ($n=3$)

3.2.3 DTX-PGD 纳米粒的扫描电镜观察 DTX 原粉和 DTX-PGD 纳米粒冻干粉喷金后在扫描电子显微镜下观察形态见图 4 (a 为 DTX 原粉, b 为 DTX-PGD 纳米粒)。由电镜照片可见,DTX 原粉为微米级片状,粒径约 $1 \mu\text{m}$; DTX-PGD 纳米粒呈规则的片状,分布较为均匀,粒径在 200 nm 左右。由于 SEM 中测得为干粒子的粒径,而马尔文粒度仪测得的是粒子的水化半径,故 SEM 中显示的粒径较马尔文测得值偏小,此差异是由于测定方法不同造成的^[10]。

3.2.4 DTX-PGD 纳米粒的晶型分析 图 5 为 DTX 原药、DTX 与 PGD 物理混合物和 DTX-PGD 纳米粒的 X 射线衍射结果,DTX 与 PGD 物理混合物和 DTX-PGD 纳米粒的 X 射线衍射曲线中均出现了

DTX 原药的 8° 、 14° 及 26.5° 位置的衍射峰。说明 DTX 药物是以晶型形式存在于 DTX-PGD 纳米粒中的。与无定形态相比,纳米粒中多烯紫杉醇以晶型形式存在,可能更有助于药物的缓慢释放。

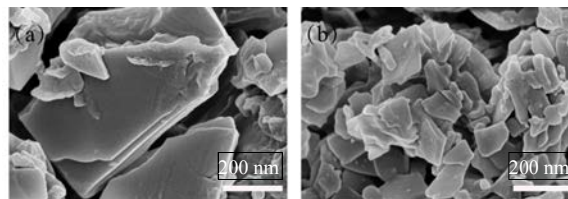


图4 SEM 观察 DTX (a) 和 DTX-PGD 纳米粒 (b) 的照片

Fig.4 SEM images of DTX bulk powders (a) and DTX-PGD nanoparticles (b).

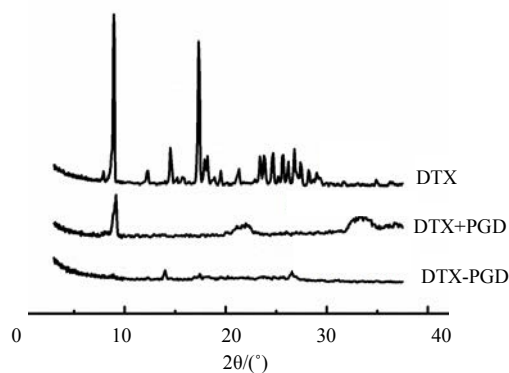


图5 DTX 原药、DTX 与 PGD 物理混合物和 DTX-PGD 纳米粒的 X 射线衍射分析结果

Fig.5 X-ray analysis of DTX bulk powders, mixture of DTX and PGD, and DTX-PGD nanoparticles

3.3 DTX-PGD 纳米粒的体外释放

DTX-PGD 纳米粒在 PBS 缓冲液 (0.01 mol/L , pH 7.4, 含 0.5% SDS) 中能够缓慢释放。从图 6 释放结果说明,DTX-PGD 纳米粒释放分为两个阶段,24 h 之内,纳米粒的释放几乎呈现零级释放状态,累积释放率 45% 左右。24 h 以后,释放开始变慢,168 h 释放 70%。DTX 的 DMSO 溶液 24 h 内释放较快,累积释放率达 82%,24 h 之后,释放变得较为缓慢,96 h 释放完全。DTX 原药的水溶液释放极为缓慢,168 h 释放不到 50%。

相对于 DTX 原溶液和粉末来说,DTX-PGD 纳米粒体外缓释效果明显,这可能与 DTX 药物在纳米粒中以晶型形式存在有关。相对于无定形态,药物以晶型态存在可能更有利于药物的缓慢释放。

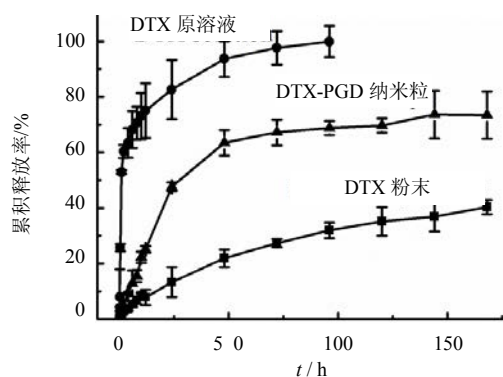


图6 DT X-PGD 纳米粒在 PBS 缓冲液中的释放率

Fig.6 Release of DTX-PGD nanoparticles in PBS buffer

3.4 DTX-PGD 纳米粒溶血性考察

表1所示的溶血实验结果表明, 1 mg/mL 药物质量浓度下, 溶血率为负值, 小于 5%^[11]。表明 DTX-PGD 纳米粒不溶血, 适合静脉注射给药。

表1 DT X-PGD 纳米粒的溶血性考察 (n=3)

Table 1 Hemolysis of DTX-PGD nanoparticles (n=3)

组别	C/(mg·mL ⁻¹)	A 值	溶血率/%
阴性对照	—	0.291	—
阳性对照	—	0.795	—
DTX-PGD 纳米粒	1	0.259	-6.3
	0.5	0.196	-18.8
	0.25	0.181	-21.8
	0.125	0.177	-22.6
	0.0625	0.154	-27.2

3.5 DTX-PGD 纳米粒 MTT 实验

通过 MTT 法评价 DTX-PGD 纳米粒对 4T1 细胞的毒性, 从 IC₅₀ 值来看, 纳米粒组对细胞杀伤作用较大, DTX 溶液组 IC₅₀ 值 (9.498 μg/mL) 是 DTX 纳米粒 (3.862 μg/mL) 的 2.5 倍。图 7 可以看到, 相比游离 DTX, DTX-PGD 纳米粒将会有更好的抗肿瘤效果, 为进一步进行体内抗肿瘤药效实验奠定了基础。

4 结论

本研究以一种新型的树状大分子为载体制备了高载药量的 DTX-PGD 纳米粒, 有效的提高了 DTX 在水中的溶解度, 有助于其生物利用度的提高。DTX-PGD 纳米粒呈片状, 粒子为纳米大小, 分布均匀, 在 5%葡萄糖、血浆中稳定性较好。DTX 药物以晶型形式存在于纳米粒中, 缓释效果明显。此纳米粒无溶血现象, 适于静脉注射给药。DTX-PGD

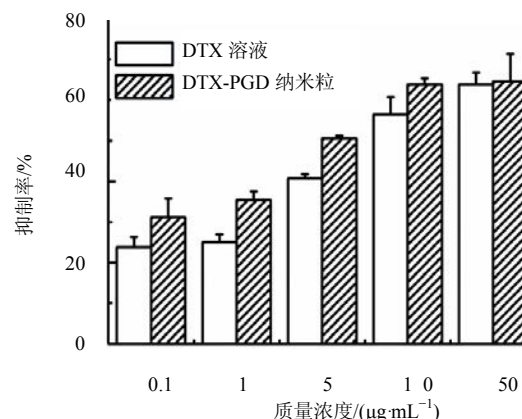


图7 DT X-PGD 纳米粒及 DTX 溶液对 4T1 细胞 48 h 的杀伤作用

Fig.7 Cytotoxicity of DTX-PGD nanoparticles and DTX solution against 4T1 cells for 48 h incubation

纳米粒对 4T1 细胞有较强的杀伤作用, 其抑瘤效果更佳。但药物在动物体内的分布与代谢是一个非常复杂的过程, 体外释放行为并不能完全代表其体内药动学行为, 因此 DTX-PGD 纳米粒的体内代谢过程有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Clarke J, Rivory L P. Clinical pharmacokinetics of docetaxel [J]. *Clin Pharmacokinet*, 1999, 36(2): 99-114.
- [2] Tham Y L, Gomez L F, Mohsin S, *et al*. Clinical response to neoadjuvant docetaxel predicts improved outcome in patients with large locally advanced breast cancers [J]. *Nature*, 2005, 94(3):279-84.
- [3] Takigawa N, Segawa Y, Kishino D, *et al*. Clinical and pharmacokinetic study of docetaxel in elderly non-small-cell lung cancer patients [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2004, 54(3):230-236.
- [4] Nuijen B, Bouma M, Schellens M, *et al*. Progress in the development of alternative pharmaceutical formulations of taxanes [J]. *Int New Drugs*, 2001, 19(2):143-153.
- [5] Ling G, Zhang P, Zhang W, *et al*. Development of novel self-assembled DS-PLGA hybrid nanoparticles for improving oral bioavailability of vincristine sulfate by P-gp inhibition [J]. *J Control Release*, 2010, 148(2): 241-248.
- [6] 王秋实. 纳米粒药物载体在抗癌领域的研究进展 [J]. *生物技术世界*, 2014, (9): 123-124.
- [7] Guo Y, Zhao Y, Han M, *et al*. Codendrimer from polyamidoamine (PAMAM) and oligoethylene dendron as a thermosensitive drug carrier [J]. *Bioconjugate Chem*,

- 2014, 25(1):24-31.
- [8] Guo Y, Zhao Y, Han M, *et al.* A codendrimer of PAMAM decorated with oligoethylene glycol dendrons: synthesis, self-assembly, and application as a drug carrier [J]. *Soft Matter*, 2013, 9(43): 10306-10313.
- [9] Wang Y B, Wang J C, Meng M, *et al.* Preparation and evaluation of docetaxel-loaded albumin nanoparticles for intravenous administration[J]. *J Chin Pharm Sci*, 2010, 19(3): 214-222.
- [10] Sharma G, Wilson K, Van Der Walle C F, *et al.* Microemulsions for oral delivery of insulin: Design, development and evaluation in streptozotocin induced diabetic rats [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2010, 76(2): 159-169.
- [11] 蔡伟惠, 姚成丽, 居敏俐, 等. 丙泊酚纳米注射液中溶血磷脂的含量测定及溶血性评价 [J]. *中国药学杂志*, 2013, 48(3): 212-215.