

基于聚乳酸空间立构复合的多柔比星纳米载药胶束的制备

郭兆元¹ 赵科¹ 刘荣² 任静^{1,*}

(1 四川抗菌素工业研究所, 抗生素研究与再评价四川重点实验室, 成都 610052; 2 成都大学, 医学院, 成都 610106)

摘要: **目的** 制备了一种新型多柔比星纳米载药胶束。**方法** 通过开环聚合合成两亲性高分子聚合物聚乳酸-甲氧基聚乙二醇(PLA-mPEG); 通过左旋的聚乳酸(PLLA)与右旋的聚乳酸(PDLA)之间的空间立构复合作用形成空间立构复合物mPEG-PLLA/mPEG-PDLA。并由两亲性分子的自组装作用形成胶束, 包载阿霉素并在体外模拟载药胶束在体内的释放情况。**结果** PLA-mPEG聚合物由¹H NMR和红外波谱表征, 通过差示扫描量热法(differential scanning calorimetry, DSC)与X射线衍射(X-ray diffraction, XRD)确证立构复合结构的形成。通过动态光散射测定空白胶束为(80±28)nm与载药胶束的粒径(160±63)nm, 通过茚三酚法测定胶束的临界胶束浓度(critical micelle concentration, CMC)为6.6mg/L。测得阿霉素立构复合纳米胶束的载药量为4.54%。**结论** 通过空间立构复合作用形成的胶束, 比单一聚乳酸均聚物形成的胶束的CMC更低, 载药量更高, 稳定性更好。

关键词: 聚乳酸; 阿霉素; 空间立构复合; 胶束

中图分类号: R978.1 **文献标志码:** A

Preparation of doxorubicin-loaded nano micelles based on PLA stereocomplexation

Guo Zhao-yuan, Zhao Ke, Liu Rong and Ren Jing

(1 Antibiotics Research and Re-evaluation Key Laboratory of Sichuan Province, Sichuan Industrial Institute of Antibiotics, Chengdu University, Chengdu 610052; 2 School of Nursing, Chengdu University, Chengdu 610106)

Abstract Objective To prepared a novel doxorubicin-loaded micelles. **Methods** Amphiphilic polymer PLA-mPEG was synthesized via ring-opening polymerization. The stereocomplexation of mPEG-PLLA/mPEG-PDLA was formed by stereocomplexing between PLLA and PDLA. The micelles were formed through self-assembly with amphiphilic polymer. Then doxorubicin was loaded into micelles and the drug release experiment was executed in different conditions which simulated the human body's physiological environment. **Results** The structure of PLA-mPEG was confirmed by ¹H NMR and FTIR. The stereocomplexation mPEG-PLLA/mPEG-PDLA was confirmed by X-ray diffraction (XRD) and differential scanning calorimetry (DSC). The sizes of blank micelles were 80±28nm and doxorubicin loaded micelles were 160±63nm measured by DLS. The critical micelle concentration (CMC) of PLLA/mPEG-PDLA was 6.6mg/L and the drug-loading content was 4.54%. **Conclusion** The stereocomplexation of mPEG-PLLA/mPEG-PDLA had more stable structures. The micelles of stereocomplexation had lower CMC and higher drug-loading contents than PLLA and PDLA.

Key words Polylactide; Doxorubicin; Stereocomplex; Micelles

恶性肿瘤是当今人类死亡率最高的疾病之一^[1]。中国的癌症发病率和死亡率一直在上升, 从2010年开始, 恶性肿瘤已经成为主要的致死原因, 成为了中国的一个主要公共卫生问题^[2]。据世界卫生组织预

测, 2020年全球癌症新发病例将达到2000万, 因癌症死亡高达1200万人^[3]。控制癌症已成为全球性卫生战略重点之一。阿霉素(doxorubicin, Dox)通过插入DNA相邻碱基对之间, 产生活性自由基, 干扰转录

收稿日期: 2017-10-11

基金项目: 四川省教育厅科研项目(No. 17ZB0118); 四川省科技厅(No. 2016JY0256)

作者简介: 郭兆元, 男, 生于1991年, 在读硕士研究生, 主要从事药物新剂型与新技术研究, E-mail: xiaoguo333@foxmail.com

*通讯作者, E-mail: renjing98@tom.com

过程, 阻止mRNA合成^[4-5]。同时也可引起细胞膜破裂, 对各种生长周期的肿瘤细胞都有杀灭作用。阿霉素作为广谱抗肿瘤药, 在临床应用时毒副作用较大^[6], 因此开发高效低毒的阿霉素新型传输系统是药学研究者的当务之急。

传统的两亲性聚合物胶束由于体积小, 分布窄等优点能够有效的滞留在靶向部位, 提高累积量, 从而成为一种很有前景的药物载体^[7]。然而, 传统的聚合物胶束在体内的稳定性成为制约其更好发展的障碍^[8]。空间立构复合物是一种由两个互补的有规立构聚合物之间的立体选择性相互作用而形成的复合物^[9], 如图1(A), 它与其母体对映物有着显著的优点, 比如熔点更高, 机械性能更好以及稳定性更好等^[10-13]。这些优点使其在生物材料中有着巨大的应用潜力, 尤其是药物传输系统中^[14-15]。聚乳酸作为一种天然高分子材料^[16], 由于其良好的生物降解性能^[17], 优良的生物相容性, 从而受到科研工作者的广泛关注^[18-19]。本文以聚乳酸空间立构复合物为载体, 制备一种新型的阿霉素药物传输系统。

1 试剂与仪器

丙内酯单体(LA, 99%)购于德国ABCR公司; 辛酸亚锡(Sn(Oct)₂, 95%)购于美国Sigma-Aldrich公司; 甲氧基聚乙二醇(mPEG)购于阿拉丁试剂(上海)有限公司; 阿霉素盐酸盐(DOX·HCl, 99%)购于北京中研医药科技有限公司; 二氯甲烷、二甲亚砜以及乙醚等其它试剂溶剂购于成都科龙化工试剂厂。

核磁共振波谱仪(Varian INOVA-400, Oxford); 傅立叶红外波谱仪(Nicolet560, Nicolet); 荧光分光光

度计(Fluorescence-7000, HITACHI); 动态光散射仪(Nano ZS, Malvern Instruments Ltd); pH计(PHS, 上海雷磁仪器厂)。

2 实验部分

2.1 聚乳酸-甲氧基聚乙二醇(PLA-mPEG)的合成

mPEG的纯化: 称取25g甲氧基聚乙二醇溶于50mL二氯甲烷中, 搅拌约10min后, 以8~10倍乙醚沉淀, 过滤抽干待用。

将纯化过的mPEG通过开环聚合将甲氧基聚乙二醇(mPEG)和左旋丙交酯(LLA)共聚。称取mPEG 1g在聚合管中于100℃去除水分。取LLA 2g于聚合管中, 并加入0.1%的辛酸亚锡作为催化剂。封管后于130℃反应48h。用适量三氯甲烷(CHCl₃)溶解产物, 以冰甲醇沉淀, 真空干燥得到固体产物, 产率为90%。

右旋聚乳酸-甲氧基聚乙二醇(PDLA-mPEG)的合成与之相同。采用BrukerAvance 500MHz核磁共振仪在25℃测定聚合物的氢原子核磁共振谱图。以氘代氯仿(CDCl₃)溶解样品, 四甲基硅烷(TMS, δ=0)作为内标, 化学位移以内标为参照。并采用压片法制样(基底为溴化钾), 然后进行红外光谱测试分析。

2.2 空白胶束的制备及其表征

2.2.1 空白胶束的制备及形态表征

用透析法制备空白胶束: 将20mg PLLA-mPEG溶于2mL的二甲亚砜, 以100μL/min注入20mL蒸馏水中。搅拌过夜后, 用蒸馏水透析1d, 期间换3次水, 得到1mg/mL的非空间立构复合胶束, 冷冻干燥备用。

将10mg PLLA-mPEG和10mg PDLA-mPEG分别溶于1mL的二甲亚砜, 混合后搅拌10h, 然后以100μL/min注入20mL蒸馏水中。搅拌过夜后, 用蒸馏水透析1d, 期间换3次水, 得到1mg/mL的空间立构复合胶束, 冷冻干燥备用。将制得的胶束溶液用激光粒度仪测定其粒径及粒径分布。另取少量胶束溶液滴加到硅片上, 待溶液挥干后, 置于扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)下观察其形貌。

2.2.2 临界胶束浓度的测定

聚合物胶束的临界胶束浓度(CMC)通过荧光光谱法测定。具体方法如下: 将冻干的胶束用少量二甲亚砜溶解后, 剧烈搅拌下加入适量芘水, 避光敞口搅拌过夜制备得到一定浓度的胶束溶液。将该胶束母液用芘水稀释得到一系列浓度梯度的胶束溶液, 然后用荧光光度计检测样品的荧光光度值。设定激发光为390nm, 测定波长范围在300~360nm。

2.3 载药胶束的制备及其表征

将8mg去盐酸阿霉素溶于800μL二甲亚砜中, 并

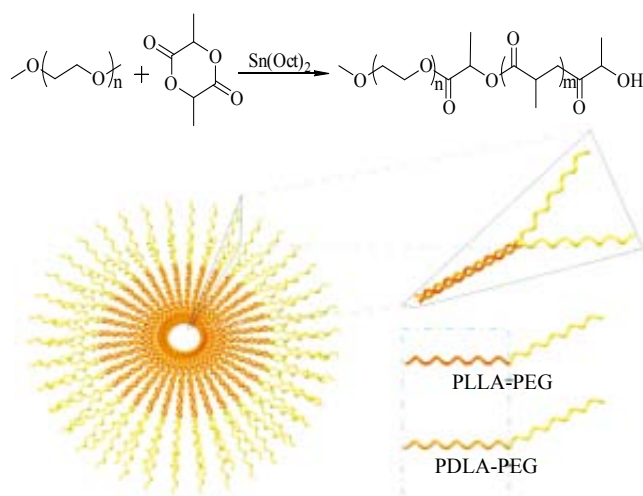


图1 聚合物的合成路线(A)及胶束的空间立构复合作用示意图(B)

Fig. 1 Synthesis route of copolymer mPEG-PLA (A) and diagram of stereocomplexation (B)

将其滴入溶有20mg PLLA-mPEG的2mL二甲亚砜。充分搅拌后将上述溶液以100 μ L/min注入20mL蒸馏水中。搅拌过夜后,用蒸馏水透析1d,期间换3次水,得到1mg/mL的非空间立构复合载药胶束,冷冻干燥备用。

将8mg去盐酸阿霉素溶于800 μ L二甲亚砜中,并其滴入2mL溶有10mg PLLA-mPEG和10mg PDLA-mPEG的二甲亚砜溶液中,充分搅拌后,然后以100 μ L/min注入20mL蒸馏水中。搅拌过夜后,用蒸馏水透析1d,期间换3次水,得到1mg/mL的空间立构复合载药胶束,冷冻干燥备用。用激光粒度仪测定载阿霉素聚合物胶束的粒径。

称取适量载药胶束,用二甲亚砜充分溶解,超声。于荧光分光光度计测试其在480nm激发下,530~650nm波段的发射光谱,取550nm处的荧光强度值。根据阿霉素的标准曲线计算溶液中阿霉素的浓度,进而换算出阿霉素的质量。并按照公式(1)和(2)计算阿霉素的载药量(drug loading content, DLC)和药物包封率(drug entrapment efficiency, DEE)。

载药量(%)=实际包载药物的质量/(聚合物质量+载入药物质量) \times 100% (1)

包封率(%)=实际包载药物的质量/投入药物的质量 \times 100% (2)

2.4 载药胶束的药物释放

将3mL载药胶束平均分为3份,分别加入透析袋(截留分子量1000)中,再将透析袋放入装有25mL不同透析介质(pH=7.4, pH=5.5的磷酸缓冲液)的棕色瓶中,然后在37 $^{\circ}$ C摇床中震荡,模拟体内环境释放药物。在特定的时间点,从棕色瓶中取出1mL,然后加入1mL的新鲜透析介质。用荧光分光光度计测得阿霉素的含量。按公式(3)计算阿霉素的释放率。以时间为横坐标,释放率为纵坐标,绘制阿霉素的释放曲线。

释放率(%)=累计释放药物的质量/释放前载入药物的质量 \times 100% (3)

3 结论与讨论

3.1 聚乳酸-甲氧基聚乙二醇(PLA-mPEG)的合成

两嵌段共聚物mPEG-PLLA与mPEG-PDLA均由mPEG引发丙交酯开环聚合形成。其共聚物的结构进一步由 ^1H NMR以及FTIR验证。如图2在共聚物中聚乳酸嵌段中的-CH₃出现在 δ 1.57ppm, -CH=出现在 δ 5.16ppm,而其末端的-CH=出现在 δ 4.31ppm;同时 δ 3.64ppm归属为聚乙二醇嵌段的-CH₂-,并且其端基-OCH₃出现在 δ 3.38ppm。为了进一步确证化合物的结构,对产物进行了FTIR表征,如图3在3460cm⁻¹

处为端羟基的特征吸收峰;2995cm⁻¹和2886cm⁻¹处为聚乳酸甲基与亚甲基(C-H的伸缩振动)红外吸收峰,2945cm⁻¹处为聚乳酸C-H(C-H的伸缩振动)吸收峰;1460cm⁻¹, 1343cm⁻¹处为甲基与亚甲基的C-H弯曲振动峰,1383cm⁻¹处聚乳酸C-H(C-H的弯曲振动)吸收峰;1757cm⁻¹处的强吸收峰是聚乳酸酯基中C=O特征吸收峰。1110cm⁻¹处的强吸收峰是mPEG链段的醚键C-O-C的伸缩振动峰。

3.2 空间立构复合物的形成

从XRD图(图4)中可以看到所有样品在19.2 $^{\circ}$ 和23.2 $^{\circ}$ 都出现了聚乙二醇嵌段的衍射峰,同时也在16.5 $^{\circ}$ 位置出现了聚乳酸嵌段的衍射峰。并在mPEG-PLLA/mPEG-PDLA立构复合物中可以看到11.7 $^{\circ}$ 和20.5 $^{\circ}$ 位置较强的特征峰,说明了空间立构复合结构的形成。此结论与热差示量扫描法一致,图5中,35~40 $^{\circ}$ C的熔点为mPEG-PLA中的mPEG熔点,110~120 $^{\circ}$ C的熔点为聚乳酸熔点。而165 $^{\circ}$ C为

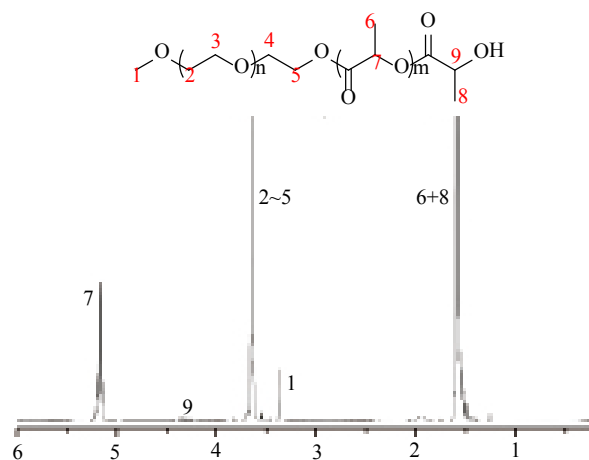


图2 mPEG-PDLA的核磁共振谱
Fig. 2 ^1H NMR spectra of mPEG-PDLA false

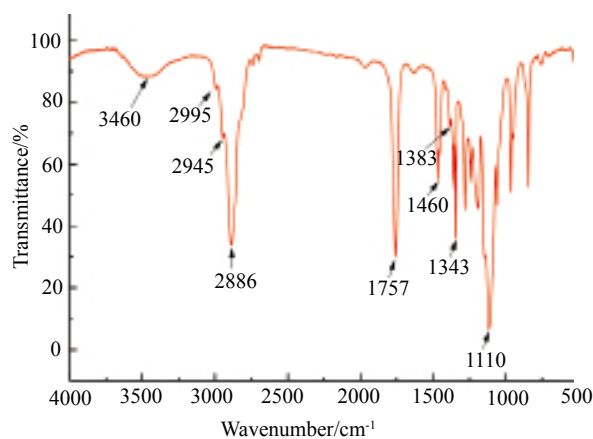


图3 mPEG-PDLA的红外图谱
Fig. 3 FTIR spectra of mPEG-PDLA

mPEG2k-PLLA/mPEG2k-PDLA立构复合物中聚乳酸熔点。由图可知立构复合物的聚乳酸熔点比单型聚乳酸高约50℃，与相关文献报道一致^[10]。

3.3 空白胶束的制备及其表征

采用透析法制得空白胶束，使用DLS和SEM分别观察看所得胶束的大小粒径以及形貌。由图6可知，PLLA-mPEG/PDLA-mPEG立构复合空白胶束的水化半径为80±28nm，且胶束的粒径均一。而此结果也与扫描电镜所获得情况基本一致：胶束呈现类球状，粒径较小。

用芘作荧光探针分别测试PLLA-mPEG、PDLA-mPEG和PLLA-mPEG/PDLA-mPEG的胶束CMC值，结果如图7所示：PLLA-mPEG和PDLA-mPEG胶束的CMC值均为 $10.7\times 10^{-3}\text{g/L}$ ，而PLLA-mPEG/PDLA-

mPEG立构复合胶束为 $6.6\times 10^{-3}\text{g/L}$ ，也就是立构复合胶束呈现了更低的CMC值，这说明立构复合胶束比非立构复合胶束的稳定性好。

3.4 载药胶束的制备及其表征

载药胶束的粒径和粒径分布如图8所示，包载阿霉素后胶束的粒径为(160±63)nm，相比空白胶束的粒径较大，这可能是由于药物包载于胶束的疏水核后使胶束的体积变大。同时依据阿霉素的标准曲线(图9)和测得阿霉素载药胶束的荧光强度值，计算出立构复合载药胶束的载药量(DLC)和包封率(DEE)分别为4.54%和11.35%，远高于非立构复合胶束的2.67%和6.68%，说明立构复合物可以明显增加影响阿霉素的载药量。

3.5 载药胶束的体外释放

载阿霉素胶束的体外释放曲线如图10所示，从图中可以得知，在pH=7.4的条件下，即人体的血液中和正常细胞外液中，立构复合胶束在一定程度上要有更好的缓释能力，这与其稳定的核结构有着必然关系。在pH=5.5的条件下，立构复合载药胶束的释药速度明显低于非立构复合载药胶束，说明空间立构复合物在酸性条件下仍能保持较好的结构、有着较好的稳定性。也正因此导致同pH值情况下，立构复合载药胶束的总释药率略低于非立构复合载药胶束。而在更低的pH值时(pH=5.5)，总体载药胶束

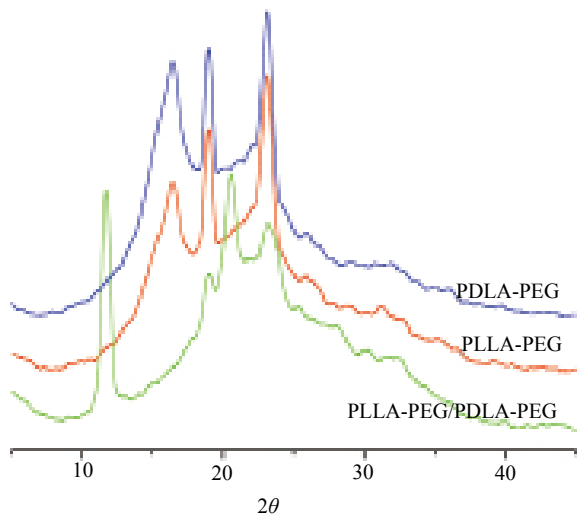


图4 mPEG-PLA的X衍射图谱之间的差别
Fig. 4 X-ray diffraction spectra of PEG-b-PLA

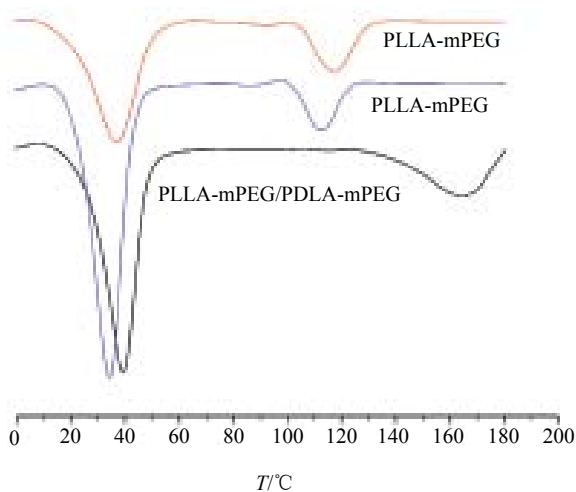


图5 mPEG-PLA的热差分析曲线之间的差别
Fig. 5 DSC diffraction spectra of PEG-b-PLA

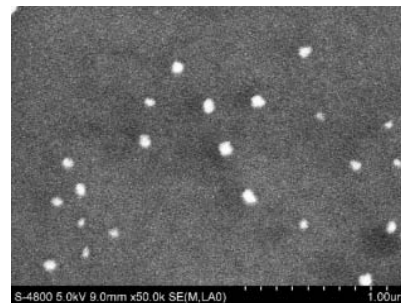
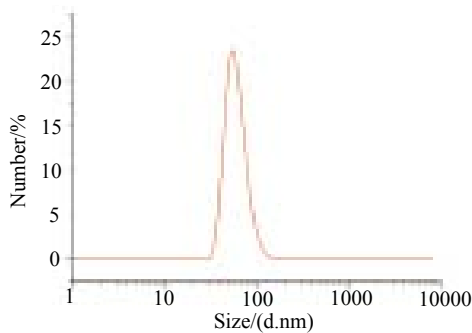
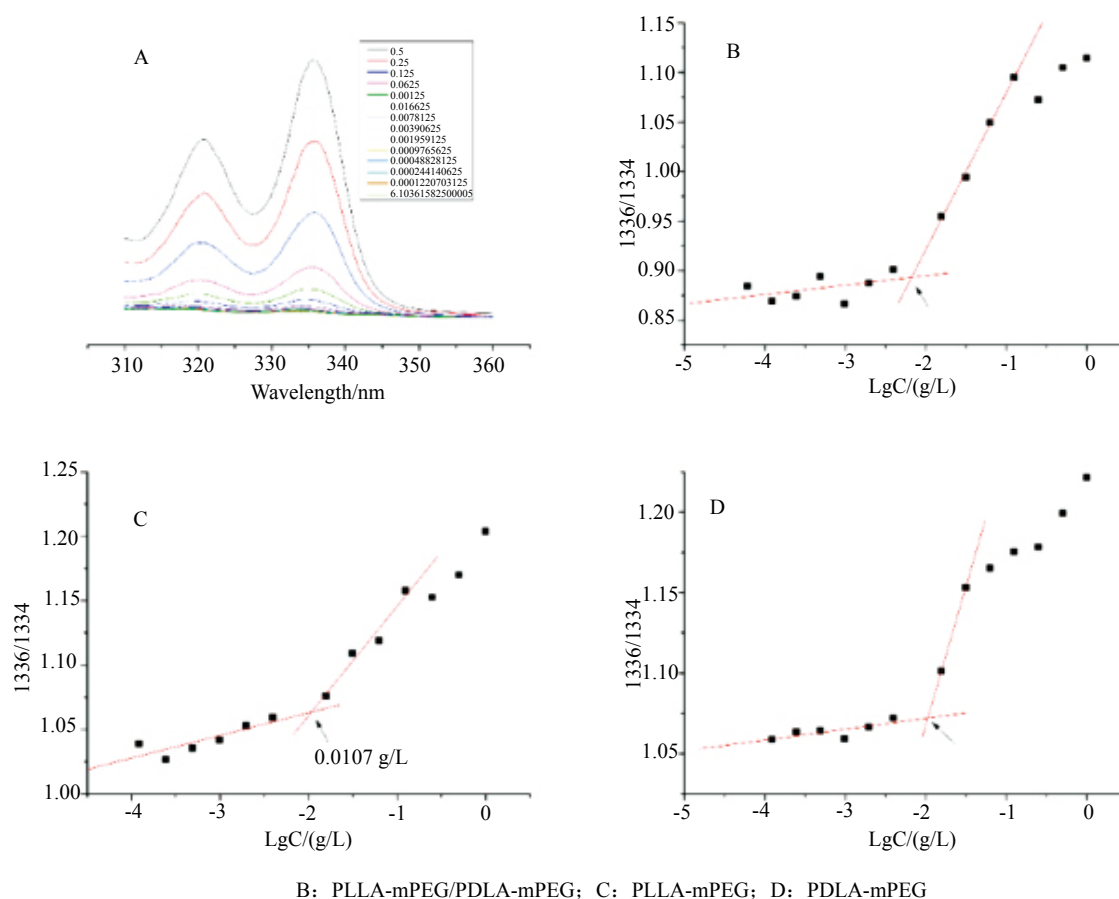


图6 PLLA-mPEG/PDLA-mPEG立构复合胶束的粒径分布以及扫描电镜图
Fig. 6 Particle size distribution of PLLA-mPEG/PDLA-mPEG micelles and SEM image



B: PLLA-mPEG/PDLA-mPEG; C: PLLA-mPEG; D: PDLA-mPEG

图7 空白胶束的荧光吸收值随浓度的变化情况(A)及其CMC值

Fig. 7 Fluorescence excitation spectra of pyrene/PLA-mPEG micelles (A); and plot of I_{336}/I_{334} from pyrene excitation spectra vs $\log C$

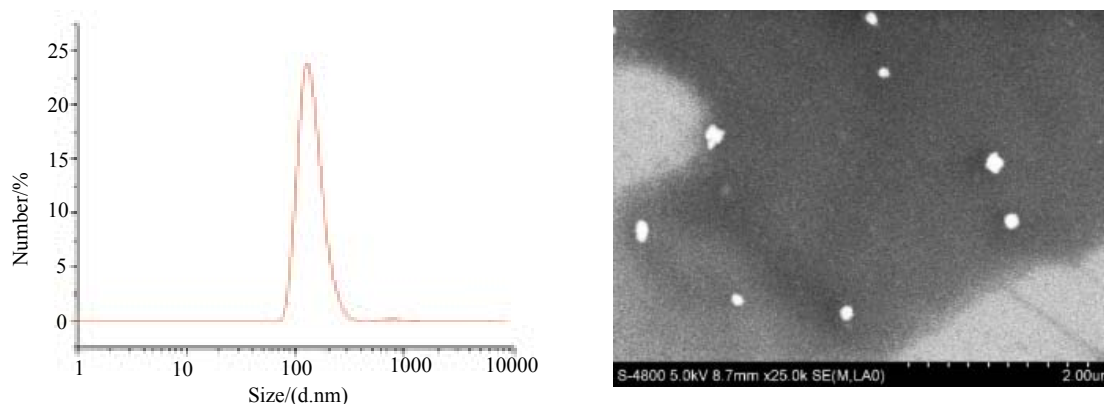


图8 PLLA-mPEG/PDLA-mPEG立构复合载阿霉素胶束的粒径分布以及扫描电镜图

Fig. 8 Particle size distribution of doxorubicin loaded PLLA-mPEG/PDLA-mPEG micelles and SEM image

的释药率有所增加,这一现象正好可以实现在肿瘤的微环境下(弱酸性)药物的高释放量与高效性。

4 结论

由mPEG做引发剂,通过丙交酯开环聚合,合成了两亲性高分子嵌段共聚物,成功自组装形成胶束,并通过空间立构复合作用获得立构复合的胶束。动态光散射以及扫描电镜测得空白胶束和载药

胶束的粒径均小于200nm,由于肿瘤部位的高渗透长滞留(enhanced permeability and retention, EPR)效应,可以实现药物在肿瘤部位的累积,从而更有效的发挥药物作用,减小毒副作用。并且通过CMC以及DSC测定结果表明立构复合的胶束比非立构复合的胶束拥有更好的稳定性,这一点在体外模拟载药胶束在体内的释放实验同样得到论证:立构复合

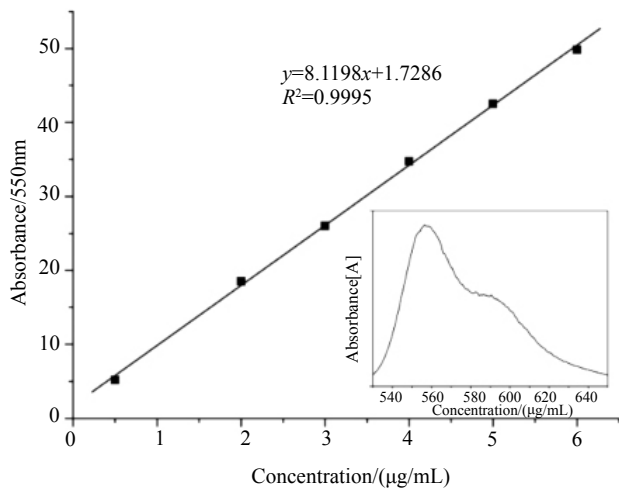


图9 阿霉素的标准曲线及方程
Fig. 9 Standard curve and equation of doxorubicin

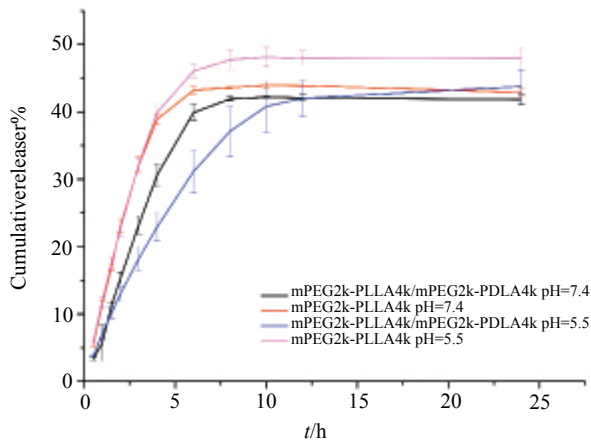


图10 PLA-mPEG载阿霉素胶束在不同条件下的体外药物释放情况

Fig. 10 *In vitro* drug release in different conditions for doxorubicin loaded PLLA-mPEG /PDLA-mPEG micelles

载药胶束有更好的缓释能力，避免了以单一构型的mPEG-PLA为载体的共聚物载药胶束在体外释放中存在的突释现象^[20]。综合以上可知，拥有空间立构复合结构的药物载体由于其稳定的内核结构可以很好地解决纳米胶束的稳定性问题，这一研究为构建新型纳米药物传输系统提供了一种新的思路。

参考文献

[1] Finkel T, Serrano M, Blasco M A. The common biology of cancer and ageing[J]. *Nature*, 2007, 448(7155): 767-74.
[2] Chen W, Zheng R, Baade P D, *et al.* Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
[3] 杨俊峰, 冯子健. 2001年中国国民主要死亡原因分析[J]. *中国卫生统计*, 2003, 20(4): 241-243.
[4] 蒋天蓉, 王浴生. 阿霉素和阿克拉霉素A对HeLa细胞DNA

的嵌合作用[J]. *中国抗生素杂志*, 1988, 13(6): 418-420.
[5] Ayla S, Seekin I, Tanriverdi G, *et al.* Doxorubicin induced nephrotoxicity: Protective effect of nicotinamide[J]. *Int J Cell Biol*, 2011, 2011(8): 390238.
[6] 刘小康, 姚伟星. 阿霉素, 阿克拉霉素A及B对豚鼠离体心房的作用[J]. *中国抗生素杂志*, 1990, 15(1): 54-57.
[7] Kedar U, Phutane P, Shidhaye S, *et al.* Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting[J]. *Nanomed[J]. Nanotech Biol Med*, 2010, 6(6): 714-729.
[8] Wakaskar R. Polymeric Micelles for Drug Delivery[J]. *Int J Drug Dev Res*, 2017, 9(3): 1-2.
[9] Ikada Y, Jamshidi K, Tsuji H, *et al.* Stereocomplex formation between enantiomeric poly (lactides)[J]. *Macromolecules*, 2010, 20(4): 904-906.
[10] Cheerarot O, Baimark Y. Thermal and mechanical properties of biodegradable star-shaped/linear polylactide Stereocomplexes[J]. *J Chem*, 2015, 2015: 1-9.
[11] Lim D W, Park T G. Stereocomplex formation between enantiomeric PLA-PEG-PLA triblock copolymers: Characterization and use as protein-delivery microparticulate carriers[J]. *J Appl Polym Sci*, 2015, 75(13): 1615-1623.
[12] Xu H, Wu D, Yang X, *et al.* Thermostable and impermeable "Nano-Barrier Walls" constructed by poly (lactic acid) stereocomplex crystal decorated graphene oxide nanosheets[J]. *Macromolecules*, 2015, 48(7): 2127-2137.
[13] Tan B H, Muiruri J K, Li Z, *et al.* Recent progress in using stereocomplexation for enhancement of thermal and mechanical property of polylactide[J]. *ACS Sustain Chem Eng*, 2016, 4(10): 5370-5391.
[14] Brzeziński M, Biela T. Micro- and nanostructures of polylactide stereocomplexes and their biomedical applications[J]. *Polym Int*, 2015, 64(12): 1667-1675.
[15] Saravanan M, Domb A J. A contemporary review on-polymer stereocomplexes and its biomedical application[J]. *Eur J Nanomed*, 2013, 5(2): 81-96.
[16] Fukushima K, Sogo K, Miura S, *et al.* Production of D-lactic acid by bacterial fermentation of rice starch[J]. *Macromol Biosci*, 2004, 4(11): 1021.
[17] Fundador N G V, Takemura A, Iwata T. Structural properties and enzymatic degradation behavior of PLLA and stereocomplexed PLA nanofibers[J]. *Macromol Mater Eng*, 2015, 295(9): 865-871.
[18] Tsuji H. Poly (lactic acid) stereocomplexes: A decade of progress[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 107: 97.
[19] Tsuji H. Poly(lactide) stereocomplexes: Formation, structure, properties, degradation, and applications[J]. *Macromol Biosci*, 2005, 5(7): 569-597.
[20] 高敏琦, 任恒磊, 谢操, 等. 紫杉醇mPEG-PLA共聚物胶束制备及体外性能[J]. *中国新药杂志*, 2017(16): 1948-1953.