

不同结构 PEG-PCL 共聚物纳米粒的 制备及质量评价

李环¹, 刘晓乐¹, 王萌熙¹, 杨亚星², 尚青¹, 史永利²

(1.河北科技大学化学与制药工程学院,河北石家庄 050018;2.新乡医学院药学院,河南新乡 453003)

摘要:为了比较聚乙二醇-聚己内酯(PEG-PCL)不同结构共聚物纳米粒的性质,采用开环聚合反应制备 PCL-PEG-PCL 和 mPEG-b-PCL 共聚物,通过 FT-IR, ¹H-NMR 和 GPC 进行结构确证,利用分子自组装技术分别形成了“蘑菇”结构和“刷”结构载姜黄素(CUR)纳米粒共聚物,对其性质进行了研究。结果表明:CUR 以无定型态存在于纳米粒中,纳米粒形貌为球形核壳结构且分布均匀;受共聚物结构的影响,“蘑菇”结构纳米粒具有较小的平均粒径(105.71±3.20)nm、较高的载药量和包封率;PCL-PEG-PCL 纳米粒表面形成了致密的 PEG 层,能有效防止蛋白质吸附,在体内具有良好的稳定性;“刷”结构纳米粒具有较低的临界胶束浓度(CMC)和良好的缓释性能,对 HepG-2 细胞增殖有较高的抑制作用。因此,研究载药纳米粒可为药物递送系统的选择以及不同结构纳米粒的临床应用提供参考。

关键词:高分子合成化学;聚乙二醇-聚己内酯;两亲性共聚物;自组装;纳米粒;CUR

中图分类号:TQ311 文献标志码:A

Preparation of PEG-PCL copolymer nanoparticles with different structures and their quality evaluation

LI Huan¹, LIU Xiaole¹, WANG Mengxi¹, YANG Yaxing², SHANG Qing¹, SHI Yongli²

(1.School of Chemical and Pharmaceutical Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang, Hebei 050018, China; 2. College of Pharmacy, Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453003, China)

Abstract: In order to compare the properties of polyethylene glycol-polycaprolactone(PEG-PCL)with different structures, the PCL-PEG-PCL and mPEG-b-PCL copolymers are obtained by ring-opening polymerization method and characterized by FT-IR, ¹H-NMR and GPC. The curcumin-loaded nanoparticles of "mushroom" and "brush" are prepared via self-assembly method, and the properties of the two structural nanoparticles are studied. The results show that CUR is encapsulated into the nanoparticles with an amorphous state; the nanoparticles show a smooth surface with core-shell structures and good dispersibility. Influenced by the structure of the copolymer, the "mushroom" nanoparticles have a smaller average particle size of (105.71±

收稿日期:2018-12-26;修回日期:2019-03-21;责任编辑:张士莹

基金项目:河北省自然科学基金(H2018201807, H2016208058);河北省高等学校科学技术研究项目(ZD2016009)

第一作者简介:李环(1993—),女,河北石家庄人,硕士研究生,主要从事药物制剂方面的研究。

通信作者:史永利副教授。E-mail:shiyongli2005@163.com

李环,刘晓乐,王萌熙,等.不同结构 PEG-PCL 共聚物纳米粒的制备及质量评价[J].河北科技大学学报,2019,40(3):215-225.

LI Huan, LIU Xiaole, WANG Mengxi, et al. Preparation of PEG-PCL copolymer nanoparticles with different structures and their quality evaluation[J]. Journal of Hebei University of Science and Technology, 2019, 40(3): 215-225.

3.20)nm, a higher drug loading and encapsulation efficiency. Since the surface of the PCL-PEG-PCL nanoparticles forms a dense PEG-layer, protein resistance studies show that the "mushroom" nanoparticles are good in vivo stability. "Brush" nanoparticles have a lower CMC date and better sustained release properties, and have a higher inhibitory effect on HepG-2 cancer cell proliferation. The study of drug-loaded nanoparticles can provide reference for drug delivery system selection and clinical application of nanoparticles with different structures.

Keywords: polymer synthesis chemistry; PEG-PCL; amphiphilic copolymer; self-assembly; nanoparticle; CUR

聚己内酯(PCL)是 CAROTHERS 小组在 1930 年合成的最早的聚合物之一,具有良好的生物相容性、对疏水性物质的渗透性和一定的微生物降解能力,目前已获得美国 FDA 批准生产^[1-3]。但 PCL 在体内的生物降解速率较慢,致使其在药物递送方面的应用受到限制。通过对 PCL 进行改性,添加亲水性嵌段制备成两亲性共聚物,可获得更多的可降解材料,使 PCL 得到了有效应用。例如:两嵌段 PCL 共聚物制备方面,DEBONE 等^[4]以开环聚合法合成了 3 种不同嵌段比的 mPEG-co-PCL 共聚物。研究表明,随着疏水链的增加,共聚物直径由 78.82 nm 增大到 141.8 nm,16 h 后甲氨蝶呤释放行为受 PCL 降解过程的影响,PCL 含量越高释放越慢。三嵌段 PCL 共聚物制备方面,HU 等^[5]制备了不同质量比的 PCL-PEG-PCL 共聚物,分别形成聚合物胶束和聚合物囊泡。研究结果表明,随着 PCL 嵌段长度的增加,共聚物粒径增大,载药量也随之增加,并且都对 EMT-6 细胞有较高的摄取率。

从文献来看,PCL 改性只有关于两嵌段共聚物(如 mPEG-co-PCL)或三嵌段共聚物(如 PCL-PEG-PCL)不同亲水-疏水嵌段比的研究,尚未见同时对 PCL 改性的两嵌段和三嵌段共聚物之间进行比较的报道^[6-14]。不同结构的共聚物会形成不同形态的纳米粒,从而影响其制剂学性质。笔者利用开环聚合法制备三嵌段共聚物 PCL-PEG-PCL 和两嵌段共聚物 mPEG-b-PCL,采用分子自组装方法制备了具有“蘑菇”结构和“刷”结构的纳米粒,研究了具有不同结构的 PCL 共聚物纳米粒对理化性质、体外释放、抗蛋白吸附和细胞毒性等方面的影响。

1 实验部分

1.1 主要原料及试剂

姜黄素(AR 级,北京奥科鼎盛生物技术有限公司提供);聚乙二醇单甲醚、聚乙二醇、辛酸亚锡(AR 级,萨恩化学技术有限公司提供); ϵ -己内酯(AR 级,阿拉丁生化科技股份有限公司提供);二氯甲烷(AR 级,天津市北辰方正试剂厂提供);四氢呋喃(AR 级,国药集团化学试剂有限公司提供);乙醚(AR 级,天津市科密欧化学试剂有限公司提供);HepG-2 肝癌细胞、L929 鼠肾上皮细胞(天津市医药科学研究所提供)。

1.2 嵌段共聚物 PCL-PEG-PCL 和 mPEG-b-PCL 的合成

PCL-PEG-PCL 的合成路线如图 1 a) 所示。在反应管中加入 4.0 g 聚乙二醇(PEG,相对分子质量为 4 000,1 mmol)和 8.0 mL(72 mmol)的 ϵ -己内酯。采用雪茄枪加热熔融,待自然冷却至室温后加入 117 μ L 的辛酸亚锡($\text{Sn}(\text{Oct})_2$),密封反应管。用液氮除氧,抽真空,充氮气,反复操作 3 次后,将反应管置于 140 $^{\circ}\text{C}$ 油浴加热 6 h。将粗产物用 3 mL 二氯甲烷溶解,经冰乙醚沉淀,抽滤,得到白色固体。放入真空干燥箱常温干燥 24 h,得到 9.19 g 的 PCL-PEG-PCL 固体,收率为 75.3%。

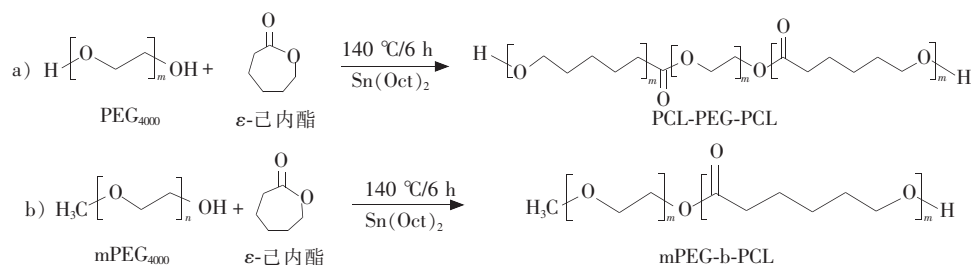


图 1 PCL-PEG-PCL 和 mPEG-b-PCL 的合成路线

Fig.1 Synthetic route of PCL-PEG-PCL and mPEG-b-PCL

mPEG-b-PCL 的合成路线如图 1 b) 所示。在反应管中加入 4.0 g 聚乙二醇单甲醚(mPEG, 相对分子质量为 4 000, 1 mmol) 和 4.0 mL (36 mmol) 的 ϵ -己内酯。其余操作同上述方法, 得到 6.43 g 的 mPEG-b-PCL 固体, 收率为 79.4%。

1.3 PCL-PEG-PCL 和 mPEG-b-PCL 的表征

1.3.1 FT-IR

采用 STS-135 型红外光谱仪(美国 Perkin Elmer) 进行红外扫描, 范围为 $400 \sim 4\,000\text{ cm}^{-1}$, 对特征峰进行分析, 判断是否为预期产品。

1.3.2 $^1\text{H-NMR}$

采用 Bruker Avance AV400 核磁共振波谱仪, 氘代氯仿(CDCl_3) 为溶剂, 四甲基硅烷(TMS) 作内标, 进行氢谱检测。

PCL-PEG-PCL 单体物质的量比由 PEG 单元 3.69×10^{-6} (f) 特征峰和 PCL 单元 4.18×10^{-6} (a) 特征峰的积分来计算, PEG 和 PCL 的聚合度(DP) 及共聚物的 M_n 可按式(1) 计算:

$$\begin{cases} DP_{\text{PEG}} = M_{n,\text{PEG}} / 44, \\ DP_{\text{PCL}} = DP_{\text{PEG}} \times \left(\frac{A(a)}{m} / \frac{A(f)}{n} \right), \\ M_{n,\text{PCL-PEG-PCL}} = M_{n,\text{PEG}} + DP_{\text{PCL}} \times 114. \end{cases} \quad (1)$$

式中: $A(a)$ 为 a 特征峰的积分面积, m 为相应氢个数; $A(f)$ 为 f 特征峰的积分面积, n 为相应氢个数; 114 为 PCL 重复单元的摩尔质量。

mPEG-b-PCL 单体物质的量比由 PEG 单元 3.53×10^{-6} (a+b) 特征峰和 PCL 单元 4.02×10^{-6} (g) 特征峰的积分来计算, PEG 和 PCL 的聚合度及共聚物的 M_n 也按式(1) 计算。

1.3.3 GPC

采用 Waters e2695 凝胶色谱仪, 以四氢呋喃(THF) 为流动相, 聚苯乙烯(PS) 为标样, 温度为 $30\text{ }^\circ\text{C}$, 流速为 1.0 mL/min , 测定相对分子质量及分布。

1.4 载药纳米粒的制备

称取 15 mg 的 CUR 和 100 mg 的 PCL-PEG-PCL, 溶于 4 mL 的 THF 中。在 600 r/min 转速下将上述溶液缓慢滴入 100 mL 超纯水中, 持续搅拌挥发 THF。共聚物在水溶液中形成纳米粒, 疏水性药物姜黄素自发地被包裹在疏水 PCL 层^[15-16], 从而得到 CUR-PCL-PEG-PCL-NPs 悬浮液, 再经冷冻干燥后得到 CUR-PCL-PEG-PCL-NPs 固体。CUR-mPEG-b-PCL-NPs 的制备方法与之相同。CUR-PCL-PEG-PCL-NPs 的 PEG 两端固定在核壳界面, 在表面形成致密“蘑菇”结构。CUR-mPEG-b-PCL-NPs 的 PEG 一端固定在核壳界面, 在表面形成相对疏松的“刷”状结构。图 2 是具有“蘑菇”结构和“刷”结构载药纳米粒的自组装制备过程。

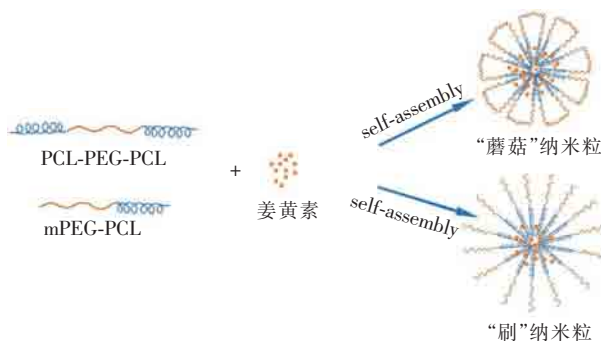


图 2 CUR-PCL-PEG-PCL-NPs 和 CUR-mPEG-b-PCL-NPs 自组装制备

Fig.2 Preparation scheme of CUR-PCL-PEG-PCL-NPs and CUR-mPEG-b-PCL-NPs by self-assembly

1.5 载药纳米粒的表征

1.5.1 粒径及形貌

采用马尔文 ZS90 激光粒度仪对纳米粒的粒度进行表征, 采用 JEM-100CX II 型扫描电镜观察形貌。取适量纳米粒混悬液, 滴在碳膜铜网上, 停留 2 min, 用磷酸钨染色后检测。

1.5.2 DSC 分析

采用 DZ3335 型差示扫描量热仪测定样品的热性能, 升温速率为 $10\text{ }^\circ\text{C/min}$, N_2 (40 mL/min) 保护。

1.5.3 临界胶束浓度

纳米粒的 CMC 用芘荧光探针法测定, CMC 值越低, 溶液越稳定。配制浓度为 $6 \times 10^{-4}\text{ mol/L}$ 的芘-丙

酮溶液 100 mL,以 1.0 mg/mL 载药纳米粒溶液作为母液,稀释配制成 11 个不同浓度的纳米粒溶液,备用。准备 11 个 10 mL 容量瓶,分别加入 10 μ L 的苾-丙酮溶液,于 50 $^{\circ}$ C 鼓风干燥挥发丙酮,并用上述不同浓度的纳米粒溶液分别定容,苾的终浓度保持为 6×10^{-7} mol/L。在 65 $^{\circ}$ C 恒温水浴下振荡 1 h(转速为 110 r/min),于室温避光过夜。用 RF-5301pc 荧光光度计测定荧光强度,激发波长为 333 nm,检测范围为 350~450 nm,记录 373 nm 和 384 nm 的荧光强度 I_{373} 和 I_{384} ,以 I_{373}/I_{384} 为纵坐标,浓度对数为横坐标作图。

1.5.4 包封率和载药量

称取 0.01 g 的 CUR,放入 10 mL 的容量瓶中,用无水乙醇溶解定容为 1.0 mg/mL 的母液,将母液稀释成不同浓度 CUR 的无水乙醇溶液,测定荧光度(激发波长为 442 nm,检测范围为 455~700 nm),绘制标准曲线。

精密量取用母液溶剂无水乙醇配制的纳米粒混悬液(1 mg/mL),放入离心管中,离心沉淀。取上清液 1.0 mL,放入 10 mL 的容量瓶内,用配制母液时的溶剂无水乙醇稀释定容,0.22 μ m 滤头过滤。取滤液测其荧光度,计算游离 CUR 的量,记为 W_1 。洗涤离心沉淀物,真空冷冻干燥,称定质量,记为 W 。另取无水乙醇纳米粒溶液 1.0 mL,放入 10 mL 的容量瓶内,用配制母液时的溶剂无水乙醇稀释定容,超声,0.22 μ m 滤头过滤。取滤液测定其荧光度,计算总药量,记为 W_0 ,按式(2)计算包封率和载药量。

$$\begin{cases} \text{包封率} = (W_0 - W_1)/W_0, \\ \text{载药量} = (W_0 - W_1)/W. \end{cases} \quad (2)$$

1.5.5 载药纳米粒体外释放

分别称取 15 mg 的 CUR 原料药与 2 种载药纳米粒冻干粉,分散于 15 mL 释放介质(pH 值为 7.4 的磷酸缓冲溶液/乙醇,二者体积比为 2:1)中。取上述溶液各 5 mL,分别放入 3 个透析袋中,扎好后分别放入含有 30 mL 释放介质的离心管中,放入恒温水浴(100 r/min, $(37 \pm 0.5)^{\circ}$ C)中,在不同时间取样(每次取 15 mL 透析液,0.22 μ m 滤头过滤,补液 15 mL),采用荧光光度计测定 CUR 含量,计算累积释放度。

1.5.6 抗蛋白吸附

将 20 mg 纳米粒冻干粉加入至 20 mL pH 值为 7.4 的磷酸缓冲液中,超声分散成透明悬浮液,检测其 0 h 的初始粒径。加入 2 mL 小牛血清超声 30 s,混匀后测量不同时间的粒径分布,观察载药纳米粒的抗蛋白吸附情况。

1.5.7 细胞毒性

取 HepG-2 和 L929 细胞,经胰酶消化、洗涤、离心后制备成 2.0×10^5 个/mL 的细胞悬液,接种于 96 孔板中,在 37 $^{\circ}$ C 含有 5% CO_2 的 100 μ L DMEM 培养基中培养 24 h 后移除培养基,添加 100 μ L 不同浓度的 CUR-PCL-PEG-PCL-NPs 和 CUR-mPEG-b-PCL-NPs 溶液。将培养在 DMEM 中的细胞作为对照组。继续培养 48 h 后移除培养基,添加 100 μ L DMEM 培养基和 20 μ L MTT 溶液,继续培养 4 h 后除去培养基,加入 150 μ L DMSO 待其完全溶解,振荡培养板均匀染色。采用 Bio-RAD 680 酶联检测仪在 492 nm 波长处测定吸收值,计算细胞存活率。

2 结果与讨论

2.1 合成产物的表征

2.1.1 FT-IR

PCL-PEG-PCL 和 mPEG-b-PCL 的红外光谱图见图 3。

由图 3 可知,2 种聚合物表现出类似的特征峰,3 537 cm^{-1} 为 ϵ -己内酯开环聚合后末端—OH 吸收峰,1 724 cm^{-1} 为 PCL 嵌段—C=O 吸收峰,1 120 cm^{-1} 为 PEG 嵌段中—O—吸收峰,不同的是 mPEG-b-PCL 在 1 380 cm^{-1} 处有一—CH₃ 吸收峰。由红外初步确定, ϵ -己内酯开环聚合和 PEG 生成两亲性嵌段共聚物。

2.1.2 PCL-PEG-PCL 和 mPEG-b-PCL $^1\text{H-NMR}$ 分析

PCL-PEG-PCL 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图见图 4, mPEG-b-PCL

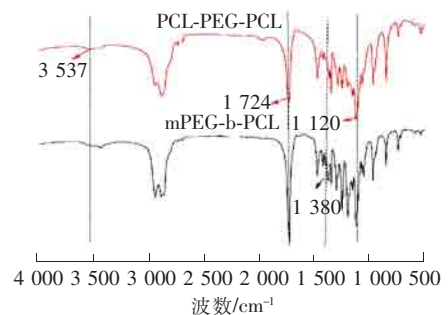


图 3 PCL-PEG-PCL 和 mPEG-b-PCL 的红外光谱图

Fig.3 Infrared spectra of PCL-PEG-PCL and mPEG-b-PCL

的¹H-NMR 谱图见图 5。

图 4 中 b 是 ϵ -己内酯开环聚合后形成的 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 特征峰, 2.39×10^{-6} (c), 4.18×10^{-6} (a) 分别是 PCL 嵌段的 $-\text{O}-\text{CH}_2-$ 和 $-\text{CH}_2-\text{CO}-$ 特征峰; 3.69×10^{-6} (f) 是 PEG 嵌段中的 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ 特征峰; 而 4.25×10^{-6} (d) 和 3.80×10^{-6} (e) 是由 PCL 和 PEG 两嵌段衔接处的 $-\text{CO}-\text{O}-\text{CH}_2$ (d) $-\text{CH}_2$ (e) $-\text{O}-\text{CH}_2-$ 特征峰, 说明 ϵ -己内酯发生开环聚合, 并和 PEG 生成 PCL-PEG-PCL 三嵌段共聚物。PCL 与 PEG 单体物质的量比为 0.59, 聚合度 DP_{PEG} 为 91, DP_{PCL} 为 54, 共聚物的 M_n 为 10 156, 共聚物嵌段为 PCL27-PEG91-PCL27。

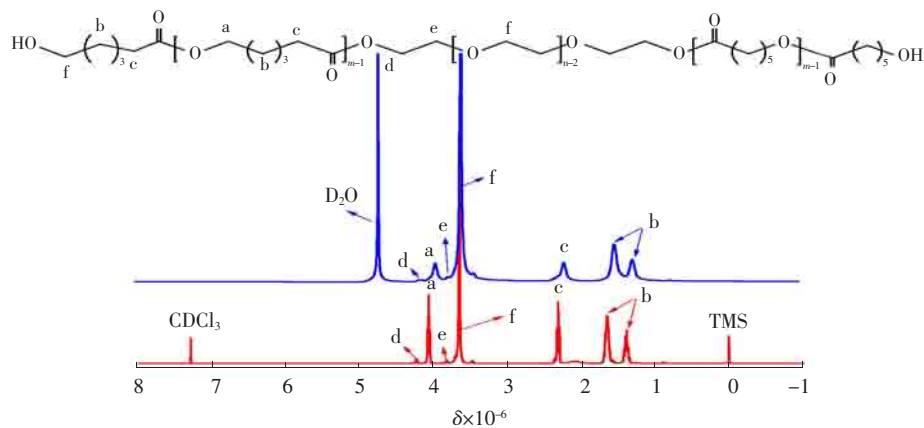


图 4 PCL-PEG-PCL 的¹H-NMR 谱图

Fig.4 ¹H-NMR spectrum of PCL-PEG-PCL

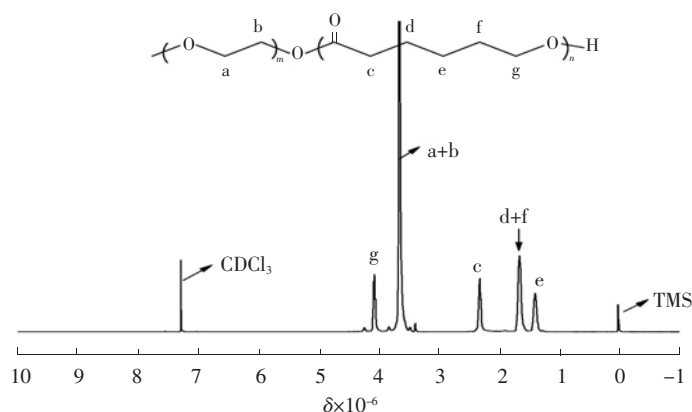


图 5 mPEG-b-PCL 的¹H-NMR 谱图

Fig.5 ¹H-NMR spectrum of mPEG-b-PCL

从图 4 可以看出,以重水为溶剂和以氯仿为溶剂的核磁共振氢谱呈现的特征峰基本一致,但以重水为溶剂的核磁共振氢谱中 a, c, b 处的峰强度有所减弱。因为 PCL-PEG-PCL 在水中形成了纳米粒,疏水端 (PCL) 自组装成了内核,被亲水端 (PEG) 包裹,而使强度减弱。这也说明了 PCL-PEG-PCL 在水中具有良好的自组装成纳米粒的性质。

图 5 为 mPEG-b-PCL 的核磁共振氢谱, 1.34×10^{-6} (e), 1.58×10^{-6} (d+f), 2.39×10^{-6} (c) 和 4.02×10^{-6} (g) 峰分别是 PCL 嵌段 $-\text{CO}-\text{CH}_2$ (c) $-\text{CH}_2$ (d) $-\text{CH}_2$ (e) $-\text{CH}_2$ (f) $-\text{CH}_2$ (g) $-\text{O}-$ 特征峰; 3.53×10^{-6} (a + b) 是 mPEG 的 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 特征峰。由图 5 可知,氢谱表现出的特征峰与 mPEG-b-PCL 结构一致,说明 ϵ -己内酯发生了开环聚合,生成 mPEG-b-PCL。PCL 与 PEG 单体物质的量比为 0.33, 聚合度 DP_{mPEG} 为 91, DP_{PCL} 为 30, 共聚物的 M_n 为 7 420, 共聚物为 mPEG91-b-PCL30。由 GPC 测定的聚合物的数均分子量 $M_{n,\text{GPC}}$ 比较接近于由核磁测定的分子量。

2.1.3 PCL-PEG-PCL 和 mPEG-b-PCL GPC 凝胶色谱分析

从图 6、图 7 可以看出,聚合物呈单峰分布且分布较窄,说明纯化后已除去所有杂质,不是 PEG/PCL 和

mPEG/PCL 的共混物,证明制得了目标嵌段共聚物。其分子质量及分子质量分布如表 1 所示。

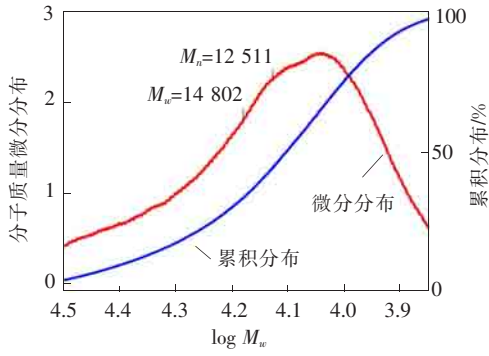


图 6 PCL-PEG-PCL 的 GPC 曲线

Fig.6 GPC chromatogram of PCL-PEG-PCL

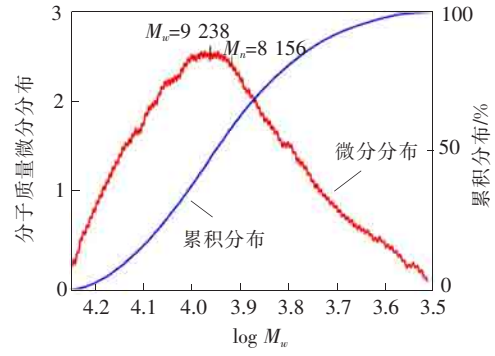


图 7 mPEG-b-PCL 的 GPC 曲线

Fig.7 GPC chromatogram of mPEG-b-PCL

表 1 PCL-PEG-PCL 和 mPEG-b-PCL 的分子质量与分子质量分布

Tab.1 Molecular weight and polydispersity (M_w/M_n) of PCL-PEG-PCL and mPEG-b-PCL

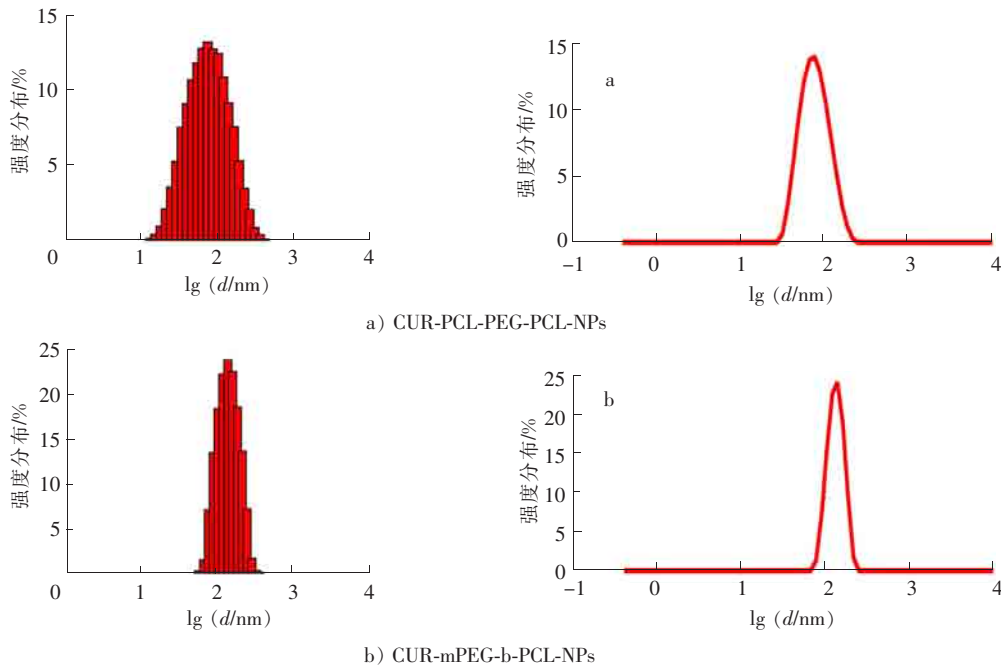
样品	$M_n/(g \cdot mol^{-1})$			M_w/M_n
	M_n^a	M_n^b	M_n^c	
PCL-PEG-PCL	12 208	10 156	12 511	1.18
mPEG-b-PCL	8 104	7 420	8 156	1.13

注: M_n^a 为共聚物的理论分子质量; M_n^b 为 1H NMR 计算得到的聚合物的分子质量; M_n^c 和 M_w/M_n 由 GPC 测得。

2.2 载药纳米粒的表征

2.2.1 粒径及形貌

CUR-PCL-PEG-PCL-NPs 和 CUR-mPEG-b-PCL-NPs 的直径粒径分布图见图 8。由图 8 可知, CUR-PCL-PEG-PCL-NPs 和 CUR-mPEG-b-PCL-NPs 的粒径分布主要在 100 nm 左右, 平均粒径 (d) 分别为 $(105.71 \pm 3.20)nm$ 和 $(122.42 \pm 2.13)nm$, 多分散指数分别为 (0.187 ± 0.66) 和 (0.112 ± 0.07) 。较小的粒径和多分散指数, 可以避过 Kupffer 细胞的吞噬, 降低纳米粒被网状内皮系统 (RES) 识别和摄取的机会, 增强渗



注: a 和 b 为粒度仪检测报告粒径图

图 8 CUR-PCL-PEG-PCL-NPs 和 CUR-mPEG-b-PCL-NPs 的直径粒径分布图

Fig.8 Diameter particle size distribution of CUR-PCL-PEG-PCL-NPs and CUR-mPEG-b-PCL-NPs

透滞留(EPR)效应^[17]。结果表明,三嵌段共聚物纳米粒平均粒径略小,因为三嵌段共聚物自组装过程会经过“弯曲”形成“蘑菇”状纳米粒,而两嵌段纳米粒无此过程,直接形成“刷”状纳米粒,提供的立体结构比较大。

两亲性嵌段共聚物可以在水溶液中进行自组装形成亲水性的壳 PEG 和疏水性的核 PCL。如图 9 所示,TEM 直观显示了 2 种共聚物纳米粒为球形核壳结构,且表面光滑,分散性良好,粒径大小与激光粒度仪测定的数据结果接近。

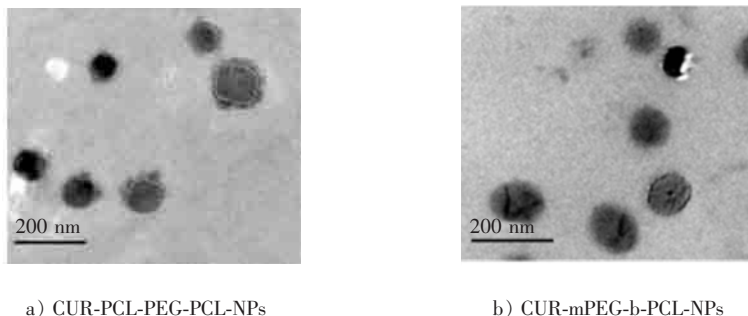


图 9 CUR-PCL-PEG-PCL-NPs 和 CUR-mPEG-b-PCL-NPs 的透射电镜图

Fig.9 TEM photographs of CUR-PCL-PEG-PCL-NPs and CUR-mPEG-b-PCL-NPs

2.2.2 DSC 分析

纳米粒子中药物的结合状态是决定药物释放特性的重要因素。图 10 显示了 CUR、两种聚合物及聚合物载药纳米粒的 DSC 曲线。CUR 在 175 °C 有一个晶体熔融的吸热峰,说明 CUR 是结晶性药物。而 CUR-PCL-PEG-PCL-NPs 和 CUR-mPEG-b-PCL-NPs 在 175 °C 左右并没有出现晶体熔融吸收峰,分别只有一个特征峰,反映的是 PCL-PEG-PCL 和 mPEG-b-PCL 的玻璃化转变过程中的吸热峰,说明 CUR 在聚合物基质中呈无定型状态,无定型药物溶解时不需要克服结晶能,有利于药物释放发挥药效。

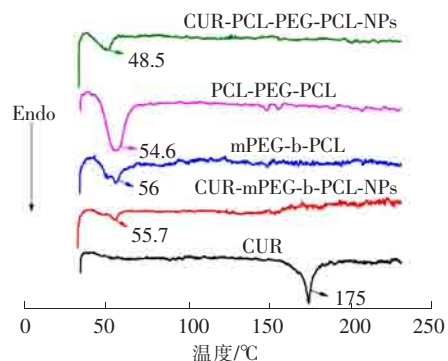


图 10 CUR、聚合物及载药纳米粒的 DSC 曲线

Fig.10 DSC curves of CUR, polymers and CUR-loaded nanoparticles

2.2.3 临界胶束浓度

CUR-PCL-PEG-PCL-NPs 和 CUR-mPEG-b-PCL-NPs 的 CMC 图见图 11。

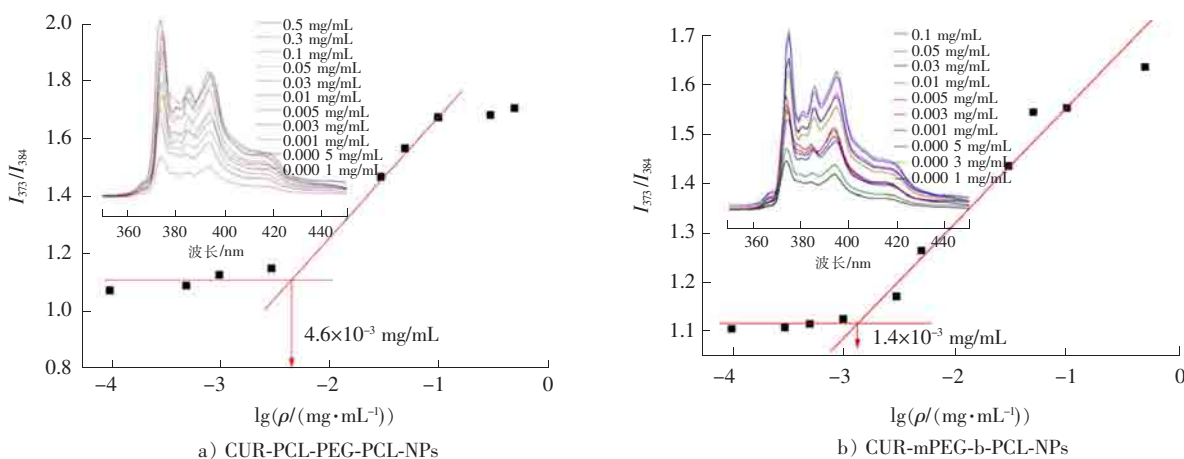


图 11 CUR-PCL-PEG-PCL-NPs 和 CUR-mPEG-b-PCL-NPs 的 CMC 图

Fig.11 CMC value of CUR-PCL-PEG-PCL-NPs and CUR-mPEG-b-PCL-NPs

芑溶液的荧光发射光谱特征峰分别在 373, 379, 384, 394, 480 nm 附近, 第一与第三发射峰强度比值 I_1/I_3 (即 I_{373}/I_{384}) 会随着溶液极性的减小而下降。在超过 CMC 后, I_{373}/I_{384} 曲线会发生突变, 突变点为其 CMC 值。由图 11 可得到 CUR-PCL-PEG-PCL-NPs 的 CMC 为 4.6×10^{-3} mg/mL, CUR-mPEG-b-PCL-NPs 的 CMC 为 1.4×10^{-3} mg/mL。结果显示, 两嵌段共聚物纳米粒具有较低的 CMC 值, CMC 值的大小受疏水链段长度和亲水链段的影响, 疏水链段差异较小时, CMC 主要受亲水基团的影响, 三嵌段共聚物亲水链段处于共聚物中间位置而使得其 CMC 增大, 因此“刷”状纳米粒表现出更优异的抗稀释稳定性。

2.2.4 包封率和载药量测定

将样品的吸光度值与对应的 CUR 质量浓度进行线性回归, 得到姜黄素标准曲线, 如图 12 所示。回归方程为 $y=139.52x+9.86$, $R^2=0.9996$, 说明 CUR 质量浓度在 $0.5 \sim 5.0 \mu\text{g/mL}$ 之间, 质量浓度与吸光度的相关性良好。表 2 列出了 2 种纳米粒在不同投料比下的载药量和包封率。随着投料比的增加, 载药量呈现先增加后减小的趋势。这表明当 CUR 达到聚合物基质中的饱和度后, 过多的药物会影响纳米粒的整体稳定性, 导致载药量降低。实验中选择 15:100 的投料比。三嵌段共聚物纳米粒载药量、包封率要大于两嵌段共聚物纳米粒, 这点与 CMC 契合, 其包含更多的共聚物, 即疏水性嵌段 PCL 的含量越高, 载药量也随之增加, 与文献报道一致。

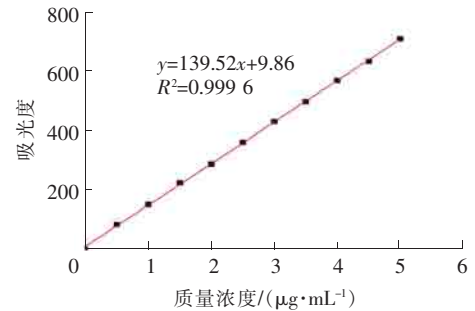


图 12 姜黄素标准曲线

Fig.12 Standard curve of curcumin

表 2 投料比对载药量及包封率的影响

Tab.2 Influence of drug feeding on drug-loading content and encapsulation efficiency

项目	聚合物	投料比		
		5:100	15:100	25:100
载药量/%	PCL-PEG-PCL	17.27 ± 1.72	22.02 ± 0.11	19.08 ± 1.86
	mPEG-b-PCL	8.38 ± 4.33	13.74 ± 0.25	11.92 ± 1.48
包封率/%	PCL-PEG-PCL	87.02 ± 1.63	96.09 ± 1.45	95.86 ± 1.55
	mPEG-b-PCL	83.38 ± 1.28	89.22 ± 1.06	88.73 ± 1.89

2.2.5 负载 CUR 的 NPs 冻干粉体外释放

CUR, CUR-PCL-PEG-PCL-NPs 和 CUR-mPEG-b-PCL-NPs 的体外释放曲线如图 13 所示。

由图 13 可知, 在体外释放研究中, CUR 原料药在释放介质中释放较快, 在 5 h 内几乎完全释放, 累积释放度为 $(94.8 \pm 1.2)\%$ 。CUR-PCL-PEG-PCL-NPs 和 CUR-mPEG-b-PCL-NPs 24 h 后的累积释放度为 $(74.32 \pm 1.98)\%$ 和 $(58.13 \pm 2.70)\%$, 两种结构纳米粒均具有明显的缓释特征。这是因为药物负载到聚合物载体后扩散到溶液的速度变慢, 因而释放周期延长^[18]。“蘑菇”纳米粒 CUR 释放速率要高于“刷”纳米粒, 是因为其具有较小粒径、较高载药量, 因此两嵌段共聚物制备的“刷”纳米粒表现出更持久的释放模式。

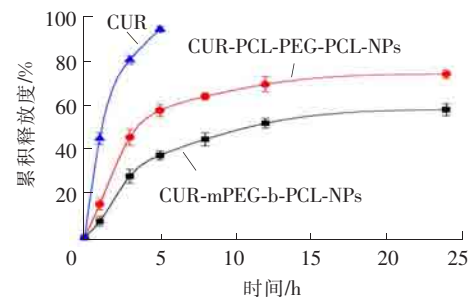


图 13 CUR, CUR-PCL-PEG-PCL-NPs 和 CUR-mPEG-b-PCL-NPs 的体外释放曲线

Fig.13 In vitro release curves of CUR, CUR-PCL-PEG-PCL-NPs and CUR-mPEG-b-PCL-NPs

2.2.6 负载 CUR 的 NPs 冻干粉体外释药模型拟合

按零级、一级、Higuchi 方程对载药纳米粒体外释放进行拟合,以取样时间(t)的平方根为横轴,以累积释药度为纵坐标对 Higuchi 方程进行拟合,结果见图 14。

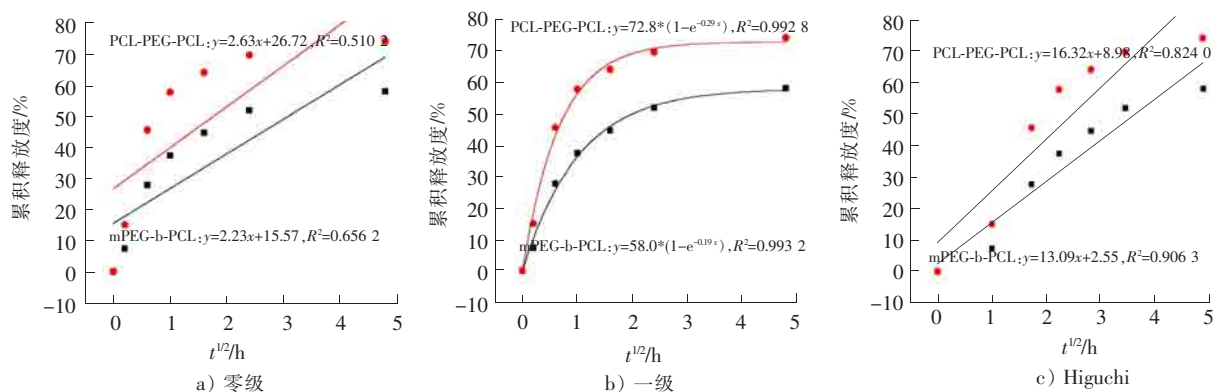


图 14 载药纳米粒释放零级、一级、Higuchi 模型拟合

Fig.14 Fitting of the drug-loaded nanoparticles releasing data to zero-order, first-order and Higuchi model

R^2 越接近于 1,拟合程度越好。由图 14 可知,2 种载药纳米粒的体外释放一级动力学拟合效果最好,表示能持续缓慢释放药物。Higuchi 模型用来衡量缓释性能,由 R^2 可知,两嵌段“刷”纳米粒具有更好的缓释性能。

2.2.7 抗蛋白吸附

载药纳米粒抗蛋白吸附粒径图如图 15 所示。

由图 15 可知,模拟人体微环境中,10 h 内纳米粒的粒径均有明显的增大趋势,但随着时间的延长,这种趋势趋于平缓,说明 CUR-PCL-PEG-PCL-NPs 和 CUR-mPEG-b-PCL-NPs 在体内具有一定的抗蛋白吸附特性,可减少体内系统清除,延长血液循环时间。另外,三嵌段“蘑菇”纳米粒的粒径变化相对平稳,具有更好的抗蛋白吸附特性。研究表明,纳米粒壳层 PEG 的亲水性是具有抗吸附能力的重要原因^[19]。蛋白吸附因疏水基相互靠拢而产生,在蛋白质与疏水基间加入亲水基团而产生排斥作用,从而抑制吸附的产生^[20]。PEG 提供较大的空间位阻,有利于将产生吸附的物质阻隔在距离基质表面较远的位置,进一步控制吸附的发生。PEG 层的抗蛋白能力不仅取决于 PEG 的长度和密度,更取决于纳米粒的结构。与二嵌段“刷”纳米粒相比,三嵌段“蘑菇”纳米粒形成了更致密的 PEG 层,从而具有更优异的抗蛋白吸附特性。

2.2.8 细胞毒性

用 MTT 法检测载药纳米粒对肿瘤细胞和正常细胞的毒性,如图 16 所示。CUR-PCL-PEG-PCL-NPs 和 CUR-mPEG-b-PCL-NPs 对 HepG-2 细胞具有一定细胞毒性(见图 16 a),并呈现良好的质量浓度依赖性,这说明载药纳米粒保持了原有药物的作用机制和药效,给药越多,抑制效果越好,由体外释放可知,该前药具有持续的抗肿瘤效果。质量浓度为 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,2 种纳米粒对 HepG-2 的细胞毒性相似,随着质量浓度的增加,“刷”纳米粒表现出更强的细胞毒性。虽然“蘑菇”纳米粒具有较高的释放量,但其表面存在致密的 PEG 层,高的 PEG 表面密度对细胞吸附的排斥影响比 PEG 链长对细胞吸附的排斥影响大^[21],因此“刷”纳米粒会吸附更多的 HepG-2 细胞,意味着姜黄素被更多的细胞吞噬,从而“刷”纳米粒具有更强的细胞毒性。

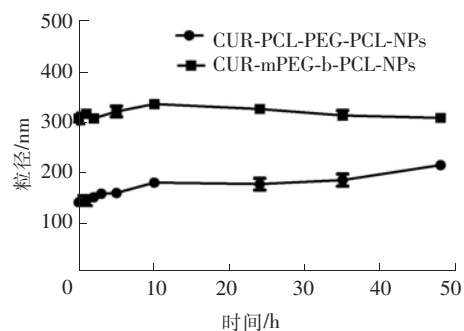


图 15 载药纳米粒抗蛋白吸附粒径图

Fig.15 Particle size of drug-loaded nanoparticles against protein adsorption

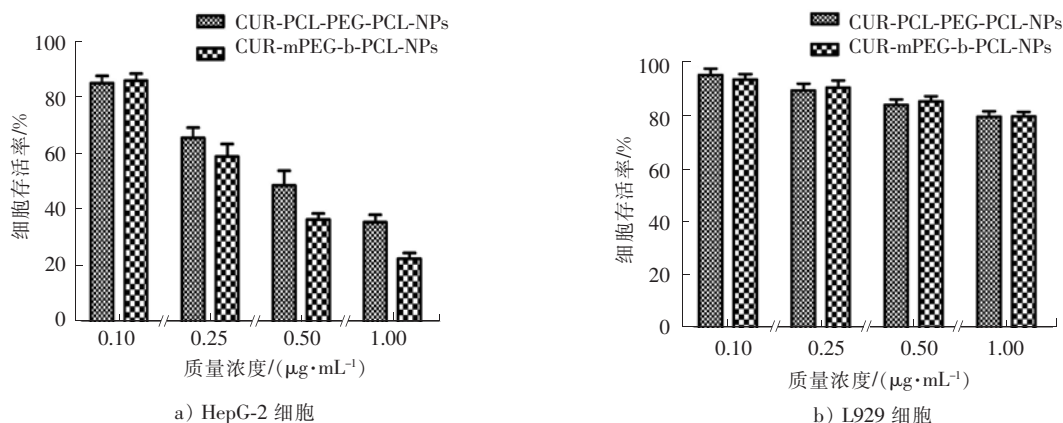


图 16 HepG-2 细胞和 L929 细胞的存活率

Fig.16 Cell viability rates of HepG-2 and L929

与 HepG-2 癌细胞相比,载药纳米粒对 L929 正常细胞的毒性明显降低(见图 16 b))。癌细胞对纳米粒的胞吞能力要优于正常细胞,其生长促进基因、转录基因等表达强烈于正常细胞;而 CUR 纳米粒只对表现异常活跃的基因产生嵌合作用,这种嵌合作用能作用于所有癌细胞,而不会作用于正常细胞。这就是 CUR 纳米粒能准确“识别”癌细胞的原因。

3 结 论

1) 采用分子自组装法制备了 PEG-PCL“蘑菇”纳米粒和“刷”纳米粒,结果表明,不同结构的纳米粒对其制剂学性质有不同影响。

2) 纳米粒呈球形核壳结构,粒径分布均匀,药物以无定型态被包裹在共聚物内,有利于药物的释放。

3) 受共聚物结构的影响,三嵌段“蘑菇”纳米粒在自组装中经过“弯曲”过程,具有较小的平均粒径($(105.71 \pm 3.20) \text{nm}$),在载药量和包封率、体外释放方面也表现出更好的效果,其致密的 PEG 层能够有效防止蛋白质吸附。

4) 两嵌段“刷”纳米粒具有较低的 CMC 和更好的缓释性能,对 HepG-2 具有更强的细胞毒性。但由于制备的纳米粒载药量较低,当负载药物达到饱和时,随着投料比的增加载药量反而会降低。今后应进一步研究如何提高纳米粒的载药量,提升载药纳米粒的体内抗肿瘤效果,为不同结构纳米粒的临床应用提供参考。

参考文献/References:

- [1] WOODRUFF M A, HUTMACHER D W. The return of a forgotten polymer: Polycaprolactone in the 21st century[J]. Progress in Polymer Science, 2010, 35(10):1217-1256.
- [2] WEI Xiawei, GONG Changyang, GOU Mali, et al. Biodegradable poly(epsilon-caprolactone)-poly(ethylene glycol) copolymers as drug delivery system[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2009, 381(1):1-18.
- [3] CATAURO M, BOLLINO F, PANALE F, et al. Modulation of indomethacin release from ZrO₂/PCL hybrid multilayers synthesized via sol-gel dip coating[J]. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2015, 26:10-16.
- [4] DEBONE P R, VICTOR B J, GOMIDES G G, et al. mPEG-co-PCL nanoparticles: The influence of hydrophobic segment on methotrexate drug delivery[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2018, 555:142-149.
- [5] HU Chunyan, CHEN Zhuo, WU Shengjie, et al. Micelle or polymersome formation by PCL-PEG-PCL copolymers as drug delivery systems[J]. Chinese Chemical Letters, 2017(9):117-121.
- [6] AZOUA L, DAHMOUNE F, REZGUI F, et al. Full factorial design optimization of anti-inflammatory drug release by PCL-PEG-PCL microspheres[J]. Materials Science and Engineering C, 2016, 58:412-419.

- [7] ALI R, FARAH A, BINKHATHLAN Z. Development and characterization of methoxy poly(ethylene oxide)- block -poly(ϵ -caprolactone) (PEO- b -PCL) micelles as vehicles for the solubilization and delivery of tacrolimus[J]. Saudi Pharmaceutical Journal, 2017, 25(2): 258-263.
- [8] TIWARI A, PRABAHARAN M. An amphiphilic nanocarrier based on guar gum-graft-poly(ϵ -caprolactone) for potential drug-delivery applications[J]. Journal of Biomaterials Science, 2010, 21(6/7):937-949.
- [9] DUAN Kongrong, ZHANG Xiaolan, TANG Xiaoxing, et al. Fabrication of cationic nanomicelle from chitosan-graft-polycaprolactone as the carrier of 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin[J]. Colloids & Surfaces B: Biointerfaces, 2010, 76(2):475-482.
- [10] BARTOLOZZI I, SOLARO R, SCHACHT E, et al. Hydroxyl end-capped macromers of N-vinyl-2-pyrrolidinone as precursors of amphiphilic block copolymers[J]. European Polymer Journal, 2007, 43(11):4628-4638.
- [11] WILSON D R, ZHANG N, SILVERS A L, et al. Synthesis and evaluation of cyclosporine A-loaded polysialic acid-polycaprolactone micelles for rheumatoid arthritis[J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014, 51:146-156.
- [12] LEE Y S, KIM H J, YANG D H, et al. Preparation and anticancer activity evaluation of self-assembled paclitaxel conjugated MPEG-PCL micelles on 4T1 cells[J]. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2019, 71:369-377.
- [13] SHI Chunhuan, ZHANG Zhiqing, SHI Jiaying, et al. Co-delivery of docetaxel and chloroquine via PEO-PPO-PCL/TPGS micelles for overcoming multidrug resistance[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2015, 495(2):932-939.
- [14] 齐旭, 刘佩, 李速明, 等. 聚乳酸-聚乙二醇三嵌段共聚物包载紫杉醇纳米胶束的制备及其体外药物释放行为[J]. 复旦大学学报(自然科学版), 2013, 52(1):1-8.
QI Xu, LIU Pei, LI Suming, et al. Preparation and drug release behavior of paclitaxel loaded polylactide-poly(ethylene glycol) triblock copolymer micelles[J]. Journal of Fudan University(Natural Science), 2013, 52(1):1-8.
- [15] 孙菁, 蒋新国, 李端, 等. 一种包载难溶性抗肿瘤药物的聚合物胶束冻干制剂[P]. 中国专利:CN 102218027, 2011-10-19.
- [16] CARAGLIA M, MARRA M, MISSO G, et al. Tumour-specific uptake of anti-cancer drugs: The future is here[J]. Current Drug Metabolism, 2012, 13(1):4-21.
- [17] TRIOLO D, CRAPARO E F, PORSIO B, et al. Polymeric drug delivery micelle-like nanocarriers for pulmonary administration of beclomethasone dipropionate[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2017, 151:206-214.
- [18] CHEN Shenfu, LI Lingyan, ZHAO Chao, et al. Surface hydration: Principles and applications toward low-fouling/nonfouling biomaterials[J]. Polymer, 2010, 51(23):5283-5293.
- [19] 肖锡峰, 江小群, 周雷激, 等. 聚乙二醇表面改性抑制蛋白质非特异性吸附[J]. 分析化学, 2013, 41(3):445-453.
XIAO Xifeng, JIANG Xiaoqun, ZHOU Leiji, et al. Surface modification of poly(ethylene glycol) to resist nonspecific adsorption of proteins[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2013, 41(3):445-453.
- [20] YANG Y, SHI D, WANG X, et al. Preparation of poly(cyclooctene)-g-poly(ethylene glycol) (PCOE-g-PEG) graft copolymers with tunable PEG side chains via ROMP and its protein adsorption and platelet adhesion properties[J]. Materials Science Engineering C, 2014, 45: 539-545.
- [21] JEON S I, ANDRADE J D. Protein-surface interactions in the presence of poly(ethylene oxide) (PEO): Effect of protein size[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 1991, 142(1):159-166.