

· 工艺与制剂 ·

## 喜树碱核壳型纳米胶束的制备及体外性能评价

杜卓<sup>1</sup>, 潘仕荣<sup>2</sup>, 余巧<sup>3</sup>, 谭银合<sup>4</sup>, 杨海云<sup>5</sup>, 卢碧玉<sup>1</sup>, 万学勤<sup>1</sup>, 吴剑峰<sup>1\*</sup>

- (1. 佛山科学技术学院医学院药理学系, 广东 佛山 528000; 2. 中山大学附属第一医院, 广州 510080;  
3. 惠州卫生职业技术学院药理学系, 广东 惠州 516025;  
4. 中山大学药学院药剂学与制药工程实验室, 广州 510006;  
5. 中山大学孙逸仙纪念医院, 广州 510120)

**[摘要]** 目的: 制备喜树碱/聚乙二醇-聚谷氨酸苄酯(CPT/PEG-PBLG)纳米胶束并考察其载药特性及体外性能。方法: 采用膜透析结合冷冻干燥法制备CPT/PEG-PBLG纳米胶束, 通过体外试验研究其释药特性, 并考察胶束对HepG-2癌细胞的细胞毒性。结果: PEG-PBLG纳米胶束能包埋疏水性药物喜树碱, BLG嵌段摩尔比为35%的EG-5载药率达11.13%; CPT/PEG-PBLG纳米胶束的体外释放具有突释与缓释特性并在碱性介质中释放速度加快, EG-5载药胶束在pH 1.1累计释药率60.34%, 而在pH 10.0时则为73.72%; 当喜树碱质量浓度 $\leq 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, CPT/PEG-PBLG胶束对HepG-2癌细胞的毒性远低于相应浓度的喜树碱阳性组( $P < 0.01$ )。结论: CPT/PEG-PBLG纳米胶束制备工艺简单, 安全无污染, 可降低喜树碱的细胞毒性, 具有较好的临床应用价值。

**[关键词]** 喜树碱; 聚乙二醇-聚谷氨酸苄酯; 嵌段共聚物; 纳米胶束; 体外释药; 细胞毒性

**[中图分类号]** R283.6; R944.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)04-0001-04

**[doi]** 10.11653/syjf2014040001

## Preparation and *in vitro* Characteristics Evaluation of Camptothecin-loaded Core-shell Type Nano-micelles

DU Zhuo<sup>1</sup>, PAN Shi-rong<sup>2</sup>, YU Qiao<sup>3</sup>, TAN Yin-he<sup>4</sup>, YANG Hai-yun<sup>5</sup>,  
LU Bi-yu<sup>1</sup>, WAN Xue-qin<sup>1</sup>, WU Jian-feng<sup>1\*</sup>

- (1. Pharmacy Department, Medical College, Foshan University, Foshan 528000, China;  
2. The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;  
3. Department of Pharmacy, Huizhou Health Vocational College, Huizhou 516025, China;  
4. Laboratory of Pharmacy and Pharmaceutical Engineering, School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China; 5. Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

**[Abstract]** **Objective:** To prepare camptothecin-loaded core-shell type nano-micelles (polyethylene glycol-poly benzyl-L-glutamate, PEG-PBLG) and investigate its drug-loaded characteristics and *in vitro* properties. **Method:** Camptothecin-loaded (CPT) nano-micelles with PEG-PBLG was prepared by dialysis and freeze-drying method, *in vitro* release characteristics of CPT/PEG-PBLG nano-micelles was measured by UV, and its cytotoxicity for HepG-2 cell was investigated. **Result:** Camptothecin could be entrapped in PEG-PBLG nano-

**[收稿日期]** 20130721(004)

**[基金项目]** 广东省自然科学基金项目(S2012040007298); 广东高校优秀青年创新人才培养计划项目(2012LYM\_0130); 广东省医学科研基金项目(A2013688)

**[第一作者]** 杜卓, 博士, 讲师, 从事天然药物靶向纳米制剂与新药开发研究, Tel: 0757-82836985, E-mail: duzhuo@mail3.sysu.edu.cn

**[通讯作者]** \* 吴剑峰, 博士, 教授, 从事天然药物的活性筛选与新药开发研究, Tel: 0757-82836985, E-mail: jianfeng839@sina.com

micelles, drug loading content of EG-5 was 11.13%, whose molar ratio of BLG block was 35%; CPT/PEG-PBLG nano-micelles had *in vitro* burst and sustained release profile, it could accelerate release speed in alkaline medium, cumulative release rate of EG-5 micelles was 60.34% at pH 1.1, but it was 73.72% at pH 10.0; When the concentration of camptothecin  $\leq 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , CPT/PEG-PBLG nano-micelles displayed much less cell cytotoxicity than the same concentration of camptothecin positive group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Preparation technology of CPT/PEG-PBLG nano-micelles was simple and safe without pollution for environment, it would reduce cytotoxicity of camptothecin for clinic treatment value of tumor.

**[Key words]** camptothecin; polyethylene glycol-poly benzyl-L-glutamate; block copolymer; nano-micelles; *in vitro* release; cytotoxicity

喜树 *Camptotheca acuminata* Decne. 别名旱莲木、千丈树等, 主要分布于我国长江以南温暖湿润气候的省份。1966 年 Wall 等<sup>[1]</sup> 首次从喜树茎中分离得到了具有较强抗癌活性的喜树碱(CPT)和 10-羟基喜树碱(OH-CPT), 同年由喜树碱衍生化获得的依立替康和拓扑替康被 FDA 批准上市, 喜树碱成为继紫杉醇后的第 2 个具有强抗癌活性的天然产物。临床研究发现 CPT 和 OH-CPT 均难溶于水且毒副作用大, 制成盐后抗肿瘤活性明显降低, 而纳米载药胶束能降低喜树碱类化合物的毒性并增强其疗效<sup>[2-3]</sup>。聚乙二醇-聚谷氨酸苄酯(PEG-PBLG)嵌段共聚物作为难溶性药物载体的研究已取得众多成果<sup>[4-7]</sup>。研究发现 PEG-PBLG 纳米胶束中 PBLG 形成的疏水性内核可作为微药库包裹难溶性药物, 增加药物水溶性; 亲水性 PEG 外壳可保护内核逃避肝脏吞噬细胞的吞噬, 具有缓释和延长药物的体内半衰期等作用<sup>[6,8]</sup>。本实验以自合成的 PEG-PBLG 为载体, 制备包埋喜树碱的载药纳米胶束(CPT/PEG-PBLG), 并考察其胶束性能、释药特性、细胞毒性等, 为 CPT/PEG-PBLG 的药效学评价提供参考。

### 1 材料

Mercury-Plus 300 型核磁共振波谱仪(美国 Varian 公司), TU-1901 型紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司), 1-4/LSC 型冷冻干燥机(德国 Christ Alpha 公司), 510-2487-717 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), Zetasizer Nano ZS90 型纳米粒度分析仪(英国马尔文仪器有限公司), CKX4 型倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司), Bio-RAD Model 450 型酶联免疫检测仪(美国 Microplate Reader 公司)。

喜树碱(四川江源天然产物有限公司, 批号 060212, 纯度 99.25%), 透析袋(截留相对分子质量 3 500~5 000, 上海绿鸟科技发展有限公司), 噻唑蓝(MTT, 美国 Sigma 公司), RPMI1640 培养基、小牛

血清、胰蛋白酶、二甲基亚砜(DMSO)均购自美国 Gibco 公司, HepG-2 肝癌细胞株(中山大学实验动物中心), 水为蒸馏水, 其他试剂均为分析纯。

### 2 方法与结果

**2.1 PEG-PBLG 的合成**<sup>[9]</sup> 谷氨酸在 60% 硫酸催化下进行  $\gamma$ -苄酯化, 与二(三氯甲基)碳酸酯作用生成谷氨酸苄酯羧酸酐(A), 在端氨基聚乙二醇单甲醚(I)的引发阴离子聚合反应, 在不同(A/I)摩尔比下聚合反应, 生成不同相对分子质量的 PEG-PBLG 嵌段共聚物, 分别编号为 EG-5, EG-9, EG-10。利用 <sup>1</sup>H-NMR 测定共聚物的嵌段比, 获得 PEG 嵌段的单位乙氧基质子峰面积和 PBLG 嵌段的单位苄基质子峰面积, 计算 PEG-PBLG 相对分子质量, 结果见表 1。

表 1 不同嵌段比 PEG-PBLG 相对分子质量及其载药量、封装率

聚合物	$M_c$ / $(M_c + M_E)$ /%	$M_n$	载药量 /%	封装率 /%	粒径 /nm
EG-5	35	$1.86 \times 10^4$	11.13	89.1	123
EG-9	52	$3.19 \times 10^4$	6.69	46.8	157
EG-10	56	$3.67 \times 10^4$	3.44	17.2	168

注:  $M_c, M_E$  分别为嵌段共聚物中 BLG 与乙氧基单元摩尔数,  $M_n$  为嵌段共聚物的相对分子质量, 透析制备载药胶束的投料比为喜树碱:PEG-PBLG = 2:10。

### 2.2 CPT/PEG-PBLG 胶束的制备

**2.2.1 自组装过程** 按一定比例称取 PEG-PBLG 和 CPT, 溶解于 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)中, 转移至两端封闭透析袋中, 置于水 4 L 中搅拌透析 5 h, 透析袋内纳米胶束溶液过滤以除去不溶物, 用 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 冷冻干燥, 即得 CPT/PEG-PBLG 胶束的固体样品。

**2.2.2 粒径的测定** 采用氩离子激光器利用动态光散射法测定。将 CPT/PEG-PBLG 胶束溶液沿样品池壁注入样品池, 尽量避免气泡及杂质的引入, 检测波长 670 nm, 温度 25  $^{\circ}\text{C}$ , 动态光散射角 90  $^{\circ}$ , 结

果见表 1。

### 2.3 CPT/PEG-PBLG 胶束的载药性能考察

**2.3.1 PEG-PBLG 胶束对药物喜树碱的包埋** 配制  $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  喜树碱 DMF 溶液为样品 1;采用透析法制备  $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 CPT/PEG-PBLG 胶束水溶液(喜树碱质量浓度  $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )为样品 2;通过透析法制备  $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的空白 PEG-PBLG 胶束水溶液为样品 3。在  $240 \sim 400 \text{ nm}$  进行紫外扫描,样品 1 以 DMF 溶剂为对照溶液,样品 2 以样品 3 为对照溶液,样品 3 以水为对照溶液。结果显示喜树碱 DMF 溶液在  $367, 383 \text{ nm}$  处有最大吸收峰,PEG-PBLG 空白胶束在相关波长吸收值较低;而当喜树碱被 PEG-PBLG 胶束包埋后, $367 \text{ nm}$  处的峰大大削弱,故可根据特征吸收峰变化证实喜树碱被 PEG-PBLG 胶束包埋,选择  $367 \text{ nm}$  作为喜树碱含量分析的检测波长。

**2.3.2 方法学考察** 精密称取喜树碱对照品  $16.0 \text{ mg}$ ,用 DMF 溶解并定容至  $50 \text{ mL}$ 。用 DMF 将喜树碱对照品溶液稀释配制成  $1.28, 2.56, 6.40, 10.24, 12.80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  系列质量浓度,以空白 DMF 为对照溶液,于  $367 \text{ nm}$  处测定吸光度( $A$ ),以  $A$  为横坐标,质量浓度( $C$ )为纵坐标,得回归方程  $C = 16.528 2A + 0.006 21 (r = 0.999 9, n = 5)$ ,方法回收率与精密度的测定结果见表 2。

表 2 CPT/PEG-PBLG 胶束中喜树碱含量测定的

方法回收率与精密度 ( $n = 3$ )

喜树碱质量 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	方法回收率 ( $\bar{x} \pm s$ )/%	日内精密度 RSD/%	日间精密度 RSD/%
1.28	$97.01 \pm 1.01$	2.82	3.45
6.40	$97.99 \pm 1.29$	3.17	4.89
12.80	$98.50 \pm 1.54$	3.09	4.20

**2.3.3 载药量及包封率的测定** 精确称取一定量的 CPT/PEG-PBLG 胶束的冻干粉,用 DMF 超声溶解并定容至  $25 \text{ mL}$  量瓶中,于  $367 \text{ nm}$  处测定  $A$ ,计算载药量及包封率,结果见表 1。

**2.3.4 投药量对载药量及包封率的影响** 因表 1 中 EG-5 的 CPT 载药量最高,故选择其作为胶束载体。按不同投料比例制备 CPT/PEG-PBLG 载药胶束,测定载药胶束的载药量和包封率,结果见表 3。EG-5 载药胶束的载药量随喜树碱投药量的增大而升高,当投药量比超过  $1.5 \text{ mg} : 10 \text{ mg}$  后,载药量并未继续提高,同时包封率却不断下降;原因可能跟载体的疏水嵌段 PBLG 对药物包埋能力接近饱和有关,当过载不能包埋的喜树碱沉淀时亦会将部分载

药胶束一起从胶束体系中析出,从而导致喜树碱的包封率下降。

表 3 在不同投料比时 EG-5 载药胶束的载药量及包封率

CPT: PEG-PBLG/ $m : m$	载药量/%	包封率/%
0.5 : 10	5.86	95.6
1.0 : 10	9.83	82.7
1.5 : 10	10.19	38.4
2.0 : 10	10.25	25.6
2.5 : 10	10.15	20.5

**2.4 体外释药试验** 取含 CPT/PEG-PBLG 胶束溶液  $2 \text{ mL}$  装入透析袋中,两端密封后放进装有释药介质溶液  $20 \text{ mL}$  的锥形瓶中,置于振荡器以  $(94 \pm 4)$  次/min 频率振荡,温度恒定  $(37 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ ,在设定的取样时间点倒出全部释药介质并换上相同体积的新鲜介质继续释药,于  $367 \text{ nm}$  处测定  $A$ ,计算释药量和累积释药率 ( $n = 3$ ),绘制体外释药曲线见图 1,2。

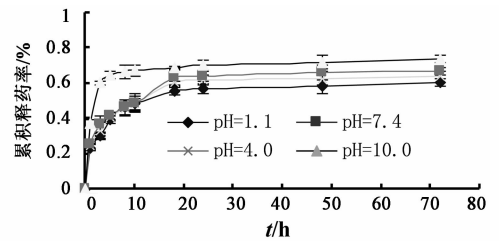


图 1 EG-5 的喜树碱载药胶束在不同 pH 介质中释药曲线

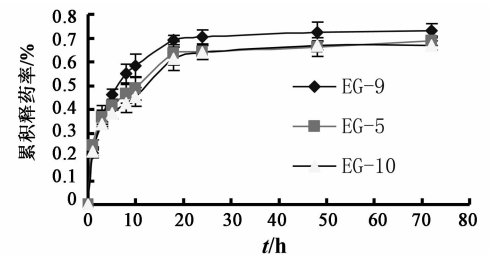


图 2 EG-5,EG-9 和 EG-10 的喜树碱载药胶束在 pH 7.4 介质中释药曲线

由图 1 可知,pH 1.1 时喜树碱的释药相对最慢,在 pH 10.0 时喜树碱的释药相对最快。这可能是由于在碱性介质中,CPT 结构中内酯环在碱性条件下易打开呈离子状态,导致胶束内核的 CPT 离子化从而释放速度加快。由图 2 可知,不同载药胶束在前 8 h 均释药相对较快,累计释药率均  $> 50\%$ ,形成一个突跃阶段;之后释药速率明显减慢,形成一个平台阶段;至 72 h 后胶束的累计释药率仍有所提高,说明 PEG-PBLG 胶束可长时间释药,具有缓释作用。确定 CPT/PEG-PBLG 胶束释药行为由突释相

和缓释相组成。

**2.5 细胞毒性试验** 将处于指数生长期的 HepG-2 细胞消化调整为细胞密度 15 000 个/mL, 每孔 200  $\mu\text{L}$  接种于 96 孔板中。阴性对照组用新鲜 RPMI1640 培养液交换; 阳性对照组加入 10  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  喜树碱 DMSO 母液, 用 RPMI1640 培养液稀释成喜树碱质量浓度为 50, 20, 10, 5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的系列阳性组溶液 (内含 DMSO 为 5, 2, 1, 0.5  $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ ); 溶媒对照组加入用 RPMI1640 培养液稀释的增溶剂 DMSO (体积分数依次为 5, 2, 1, 0.5  $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 的系列溶液; 试验组加入用 RPMI1640 培养液分散 CPT/PEG-PBLG 冻干粉样品, 配制喜树碱质量浓度为 50, 20, 10, 5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的系列纳米胶束溶液, 每个试样复种 4 孔。于 5%  $\text{CO}_2$ , 37  $^\circ\text{C}$  培养箱培养, 24 h 后加入 MTT, 用酶标仪测定 570 nm 处吸光度值 ( $A$ )<sup>[7]</sup>, 计算细胞相对增殖率 (RGR), 结果见图 3, 评定细胞毒性级别<sup>[10]</sup>。

$$\text{RGR} = \text{试样组 } A / \text{阴性对照组 } A \times 100\%$$

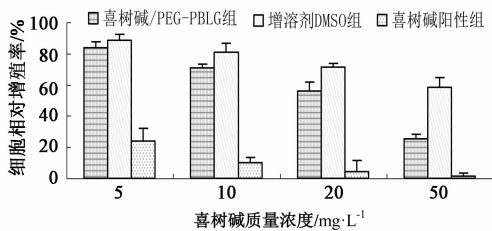


图 3 各试验组对 HepG-2 肝癌细胞的细胞毒性 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

由图 3 可知, 喜树碱阳性组在各质量浓度下均对 HepG-2 癌细胞表现出杀灭效果, 具有明显细胞毒性, 毒性评分均为 4; 增溶剂 DMSO 组随体积分数升高表现出细胞毒性; 因纳米胶束包裹 CPT 仅部分释放, CPT/PEG-PBLG 冻干粉在各质量浓度下其体外细胞毒性均远低于具有增溶剂毒性的喜树碱阳性组 ( $P < 0.01$ ), 说明 CPT/PEG-PBLG 纳米胶束可降低喜树碱的体外细胞毒性。

### 3 讨论

两亲型嵌段共聚物 PEG-PBLG 亲水段为美国 FDA 批准用于人体的 PEG, 无毒副作用和免疫原性; 其疏水段为聚肽 PBLG, 在体内可生物降解为人体所需谷氨酸; 聚合物无蓄积和毒副作用, 故 PEG-PBLG 用于人体具有非常好的生物安全性。

试验发现采用滴加搅拌法制备的胶束粒过大且不稳定, 易聚集后沉淀, 并且还需透析除掉有机溶剂方可冷冻干燥。超声乳化法中超声波处理的聚合物有一部分是 PEG-PBLG 分子聚集体, 无法与水分

子接触自组装形成胶束, 会在水中沉淀而导致胶束制备效率偏低。采用膜透析法自组装 CPT/PEG-PBLG 胶束过程中, 无需加入分散剂及化学稳定剂, 其作为一自发过程而无需其他动力加入, 制备胶束的效率较高且透析过程中可除去 DMF 等有机溶剂。难溶性药物喜树碱经过 PEG-PBLG 纳米胶束包埋后水溶性增加, 避免了因成盐而致使其抗肿瘤活性降低, 亦减轻了其体外细胞毒性。CPT/PEG-PBLG 纳米胶束可在体外试验中可明显降低 CPT 原有制剂的毒副作用, 但能否在肿瘤动物模型中保持或提高喜树碱的抗肿瘤疗效还有待药效试验证实。

### [参考文献]

- [1] Wall M E, Wani M C, Cook C E, et al. Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata* [J]. J Am Chem Soc, 1966, 88 (16): 3888.
- [2] Yao L P, Zhao X H, Li Q Y, et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of camptothecin nanosuspension: A novel formulation with high antitumor efficacy and low toxicity [J]. Int J Pharm, 2012, 423(2): 586.
- [3] 邓亚利, 林芳花, 何秀华, 等. 羧基化碳纳米管负载羧基喜树碱的制备、表征及肠吸收特性考察 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(4): 5.
- [4] 冯敏, 吴伟荣, 潘仕荣. 蔡普生核-壳型共聚物纳米胶束的制备及特性 [J]. 中国药学杂志, 2002, 37 (7): 509.
- [5] 王安训, 李苏, 潘仕荣, 等. 羧基喜树碱纳米微球的制备及体内外释药特性 [J]. 中国肿瘤临床, 2006, 23 (1): 12.
- [6] 李苏, 王安训, 潘仕荣, 等. PEG-PBLG 纳米胶束体外释药及药动学和分布的研究 [J]. 中国药学杂志, 2005, 41(9): 699.
- [7] 余巧, 潘仕荣, 杜卓. 紫杉醇自组装核壳型纳米胶束的制备与性能 [J]. 药学学报, 2008, 43(4): 408.
- [8] Lavasanifar A, Samuel J, Kwon G S. Poly (ethylene oxide)-*block*-poly (L-amino acid) micelles for drug delivery [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2002, 54(2): 169.
- [9] 张国林, 吴秋华, 潘彤, 等. AB 型两亲聚 L-谷氨酸-苄酯-聚乙二醇嵌段共聚物的合成与表征 [J]. 高分子学报, 2004(2): 223.
- [10] 邵英, 路来金, 荣莉, 等. 聚 L-乳酸/聚 L-乳酸接枝的羟基磷灰石复合材料的生物相容性 [C]. 吉林大学学报: 医学版, 2007, 33(1): 57.

[责任编辑 全燕]