

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.02.0155

· 论 著 ·

高载药诱导的聚 2-噁唑啉胶束形态变化研究

徐敏¹, 邹豪¹, 高静^{1,2*}

1. 第二军医大学药学院药剂学教研室, 上海 200433

2. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850

[摘要] **目的** 制备载紫杉醇的聚 2-噁唑啉纳米胶束, 通过改变投药量考察药物引起的胶束形态变化, 以期构建新型的高荷载嵌段共聚物胶束递药系统。**方法** 采用薄膜水化法制备聚 2-噁唑啉载药胶束, 以粒径、包封率和载药量等评价其理化性质, 采用膜透析法考察其体外释药特性, 利用 CCK-8 法测定其细胞毒性。**结果** 随着投药比由 80 : 100 (紫杉醇与聚 2-噁唑啉质量比) 增加至 110 : 100, 胶束逐渐由球形延长, 变为蠕虫状。投药比为 80 : 100 时, 球形胶束的平均粒径为 (43.17 ± 0.95) nm, 包封率为 (88.81 ± 2.93)%, 载药量为 (40.49 ± 2.03)%; 投药比增加至 110 : 100 后, 所得蠕虫状胶束的平均粒径为 (107.83 ± 1.51) nm, 包封率为 (77.08 ± 0.97)%, 载药量为 (40.34 ± 0.51)%。球形和蠕虫状胶束在磷酸盐缓冲液中 24 h 的累积释放量分别达到 (76.58 ± 3.07)% 和 (77.66 ± 1.00)%, 在含 2% 小牛血清白蛋白的 PBS 溶液中 24 h 的累积释放量高达 (100.31 ± 1.80)% 和 (99.73 ± 2.56)%。球形胶束和蠕虫状胶束对人肺腺癌细胞 A549 的杀伤 IC₅₀ 值分别为 0.336 和 0.342 μg/mL。**结论** 成功制备了高荷载的球形和蠕虫状载药胶束, 体外细胞毒性实验证明其具备抗肿瘤活性。

[关键词] 紫杉醇; 聚 2-噁唑啉; 球形胶束; 蠕虫状胶束

[中图分类号] R 943.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)02-0155-06

Study of morphological changes of poly(2-oxazoline) micelles induced by high loading of drugs

XU Min¹, ZOU Hao¹, GAO Jing^{1,2*}

1. Department of Pharmaceutical Science, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

[Abstract] **Objective** To prepare the paclitaxel-loaded poly(2-oxazoly) nano-micelles and to investigate the morphological changes of nano-micelles after changing drug dosage, so as to establish a novel block copolymer micelles delivery system with high loading capacity. **Methods** The paclitaxel-loaded poly(2-oxazoly) nano-micelles were prepared using filming-rehydration method. The physical and chemical properties of the prepared nano-micelles, including particle size, encapsulation efficiency and drug loading efficiency, were characterized. The *in vitro* release characteristics of the prepared nano-micelles were investigated by membrane dialysis method, and the cytotoxicity was determined by CCK-8 method. **Results** The morphology of micelles gradually extended from spherical to worm-like when the mass ratio of paclitaxel and poly(2-oxazoline) increased from 80 : 100 to 110 : 100. The particle size, encapsulation efficiency and drug loading efficiency of spherical micelles were (43.17 ± 0.95) nm, (88.81 ± 2.93)% and (40.49 ± 2.03)%, respectively, while those of worm-like micelles were (107.83 ± 1.51) nm, (77.08 ± 0.97)% and (40.34 ± 0.51)%, respectively. The 24 h cumulative release rates of spherical micelles and worm-like micelles in PBS were (76.58 ± 3.07)% and (77.66 ± 1.00)%, respectively; meanwhile, those in PBS with 2% bovine serum albumin were up to (100.31 ± 1.80)% and (99.73 ± 2.56)%, respectively. The IC₅₀ values of sphere micelles and worm-like micelles on human lung adenocarcinoma cell line A549 were 0.336 μg/mL and 0.342 μg/mL, respectively. **Conclusion** Paclitaxel-loaded spherical micelles and worm-like micelles with high loading capacity have been successfully prepared. *In vitro* cytotoxicity results have found that both micelles have anti-tumor activities.

[Key words] paclitaxel; poly(2-oxazoline); spherical micelle; worm-like micelle

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(2): 155-160]

[收稿日期] 2016-10-10 **[接受日期]** 2016-11-25

[基金项目] 国家“重大新药创制”专项(2013ZX09J13109-04B). Supported by National Major Project for “Significant New Drug Development” (2013ZX09J13109-04B).

[作者简介] 徐敏, 硕士生. E-mail: 18521082076@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 010-66874665, E-mail: gjsmmu@126.com

紫杉醇(paclitaxel, PTX)是从红豆杉植物树皮中提取的四环二萜类,具有抗癌活性,作为微管稳定剂与 β -微管蛋白结合可促进微管蛋白聚集,使细胞停止在有丝分裂的 G_2/M 期,从而引起细胞凋亡以达到抗肿瘤目的^[1]。临床上主要用于治疗转移性乳腺癌、晚期卵巢癌和非小细胞肺癌等恶性肿瘤^[2]。PTX 现有制剂主要为 Taxol(泰素)、Abraxane(凯素)和注射用紫杉醇脂质体(力扑素)。Taxol 中 PTX 含量仅为 1%,其余 99%均为辅料,而其辅料聚氧乙烯蓖麻油会导致严重的过敏反应、低血压和神经毒性;Abraxane 的载药量有所增加,但也低于 10%,且主要辅料为白蛋白,给药同期不可进行放射治疗^[3-4]。注射用紫杉醇脂质体为南京绿叶思科药业有限公司研制,目前临床应用较少^[5]。基于现状,我们需要寻找安全的载体,构建适宜的递药系统,增加 PTX 的溶解度,提高载药量,减小药物毒副作用。

聚合物胶束基于两亲性嵌段聚合物,通过自组装形成具有壳核结构的纳米粒子,实现对疏水性药物的荷载,显著提高抗肿瘤药物的溶解度^[6]。胶束利用其纳米尺度和实体瘤高通透性和滞留(enhanced permeability and retention effect, EPR)效应经血管渗透到肿瘤细胞;表面的亲水性基团可避免网状内皮系统的识别和吞噬,延长药物的体内循环时间,使得药物成功递送至肿瘤部位^[7-8]。值得注意的是,聚合物胶束的形态对胶束的体内分布和药动学行为等具有重要影响^[9]。Geng 等^[10]证实蠕虫状胶束的体内循环时间长达 1 周,是相同材料球形胶束的 10 倍。Christian 等^[11]报道圆柱体胶束相对球形胶束可以延长药物血液循环时间,提高药物抗肿瘤效果同时降低药物毒性。

聚 2-噁唑啉[poly(2-oxazoline), POx]具备相对分子量分布范围窄、性质可调范围广以及优越的生物相容性等优点。本研究采用(聚 2-甲基-2-噁唑啉)₂₉-*b*-(聚 2-丁基-2-噁唑啉)₁₇-*b*-(聚 2-甲基-2-噁唑啉)₂₁三嵌段共聚物作为载体,构建了载 PTX 的高荷载聚合物胶束递药系统,探索了 PTX 的投药量与胶束形态变化之间的关系,并对所得胶束的理化性质及体外抗肿瘤活性等进行了表征测定和考察。

1 材料和方法

1.1 仪器 BP211D 电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);DL-360A 超声波清洗器(上海之信仪

器有限公司);LS-D202 恒温金属浴(美国 Fisher Scientific 公司);UltiMate[®] 3000 高效液相色谱仪(美国 Thermo Fisher 公司);Centrifuge 5418 高速离心机(德国 Eppendorf 公司);Nano-ZEN3600 激光粒度分析仪(英国 Malvern 公司);透射电子显微镜(日本 JEOL 公司);Multiskan MK3 酶标仪(美国 Thermo 公司)。

1.2 药品和试剂 PTX(纯度>98.0%,江苏红豆杉药业有限公司,批号:20131002);聚 2-噁唑啉(Advanced Polymer Materials Inc,批号:1601014);色谱纯乙腈、分析纯乙醇(国药集团化学试剂有限公司);人肺癌细胞系 A549 细胞(中国科学院上海细胞库);DMEM 培养基、胎牛血清(英国 Gibco 公司);CCK-8 试剂盒(日本同仁化学研究所)。

1.3 聚合物胶束的制备 PTX 胶束的制备工艺采用薄膜水化法^[12]。精密称取适量的 PTX 和 POx,分别加入乙醇溶解制得 10 mg/mL 的储备液,将二者按一定质量比(PTX : POx = 40 : 100, 80 : 100 或 110 : 100)混匀,空气流下挥干溶剂形成均匀薄膜,用去离子水/盐水水化即得胶束溶液粗品。将该粗品 8 609×g 高速离心 5 min 除去不溶物,取上清即得 PTX 胶束。

1.3.1 投药量对聚合物胶束形态和载药量的影响 考察 PTX 理论投药量(0.4、0.8 和 1.1 mg)对聚合物胶束形态和载药量的影响。固定载体量为 1 mg,观察投药量从 0.4 mg 增加至 1.1 mg 时胶束形态的变化。

1.3.2 盐浓度对聚合物胶束形态的影响 固定水化溶液的量,分别以 0%、0.9%和 2.0%的 NaCl 溶液水化薄膜,制备胶束,考察 NaCl 浓度对聚合物胶束形态的影响。

1.4 聚合物胶束表征的测定

1.4.1 粒径及分布 采用激光粒度分析仪考察胶束的粒径及分布,将新制备的 PTX-POx 胶束溶液加入适量生理盐水稀释。由于胶束溶液的浓度对粒径测定结果有影响,稀释倍数以 POx 质量浓度 1 mg/mL 为准计算,稀释后取 80 μ L 置于微量样品池中进行粒径及分布测定。

1.4.2 胶束形态 采用透射电子显微镜观察胶束的形态。取不同制备条件下 PTX 聚合物样品滴至铺有碳膜的铜网上,2.0%磷钨酸染色,自然干燥,待粒子在铜网上沉积后观察并拍照。

1.4.3 包封率和载药量 采用高效液相色谱法(HPLC)测定包封率和载药量。色谱条件为^[13]: 色谱柱 Agilent C₁₈ 反相色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈-水(体积比 55 : 45), 流速: 1.0 mL/min, 柱温: 30℃, 进样量: 20 μL, 检测波长: 227 nm。精密移取上述制备胶束溶液 100 μL, 加流动相定容至 1 mL, 微孔滤膜过滤后进样测定。按公式计算包封率(entrapment efficiency, EE): $EE(\%) = \text{胶束包载药物量} / \text{投药量} \times 100\%$ 。按公式计算载药量(drug loading capacity, LC): $LC(\%) = \text{胶束包载药物量} / \text{载药胶束总质量} \times 100\%$, 其中载药胶束总质量指投入的药物质量与辅料质量之和。

1.4.4 体外释放度 采用膜透析法考察载药胶束的体外释放行为, 释放介质分别为 pH=7.4 的 PBS 和含 2% 小牛血清白蛋白(BSA)的 PBS。利用释放介质将胶束溶液稀释成 0.1 mg/mL, 取 1 mL 置于截留相对分子质量为 3 500 的透析袋中, 两端封好, 将含药透析袋置于含 100 mL 释放介质的烧杯中, 在 37℃、100 r/min 摇床条件下进行释放, 分别于 1、2、3、4、6、8、10、12、24 h 时吸取适量透析液, 并及时补充等量同温释放介质。PBS 释放介质中取出的样品微孔滤膜过滤后 HPLC 进样检测, 含 BSA 的释放介质中取出的样品用甲醇沉淀蛋白后 HPLC 进样检测。计算不同时间点时药物的累积释放百分率, 绘制时间-累积释放率曲线。

1.5 细胞毒性实验 选取对数生长期的人肺腺癌细胞系 A549 细胞, 胰酶消化制备单细胞悬液, 显微镜计数, 调整细胞密度为 5×10^4 /mL, 以每孔 100 μL 的单细胞悬液量接种于 96 孔板中, 细胞悬液周围外孔需加入 100 μL PBS 防止边缘效应, 在 37℃、5% CO₂ 条件下孵育 12 h。细胞贴壁后, 弃除旧培养基, 加入不同浓度的含药培养基, 每孔 100 μL, 每个处理组每个药物浓度设 3 个复孔, 继续在 37℃、5% CO₂ 条件下孵育 48 h。PTX 注射剂 Taxol 和 PTX 胶束组药物浓度均为 0.001、0.004、0.013、0.04、0.12、0.37、1.11、3.33 和 10 μg/mL。加药处理 48 h 后弃去含药培养基, 每孔加入 100 μL 含 10% CCK-8 的细胞培养基, 孵育 2~3 h, 采用酶标仪于 450 nm 处测定各孔光密度(D)值。计算细胞存活率: $\text{细胞存活率}(\%) = (\text{实验组} D \text{值} - \text{空白组} D \text{值}) / (\text{未处理组} D \text{值} - \text{空白组} D \text{值}) \times 100\%$ 。采用 GraphPad 5.0 软

件绘制药物浓度-细胞存活率图。

2 结果

2.1 胶束制备条件的考察

2.1.1 投药量对聚合物胶束形态和载药量的影响 结果见图 1。固定载体量为 1 mg, 透射电镜观察可知, 投药量为 0.4 和 0.8 mg (即投药比为 40 : 100 和 80 : 100) 时, 胶束呈现球形(图 1A~1F); 投药量增加至 1.1 mg (投药比为 110 : 100) 时, 胶束由球形逐渐延长, 转变成蠕虫状(图 1G~1I)。当投药量为 0.4 mg 时, 胶束载药量为 $(25.62 \pm 0.02)\%$; 增大投药量至 0.8 或 1.1 mg 时, 载药量大幅提升至 $(40.49 \pm 2.03)\%$ 、 $(40.34 \pm 0.51)\%$ 。综合考虑, 我们确定制备球形胶束的投药量为 0.8 mg, 制备蠕虫状胶束的投药量为 1.1 mg。

2.1.2 盐浓度对聚合物胶束形态的影响 结果见图 1。当投药比为 40 : 100 时, 加入 0.9% 或者 2.0% NaCl 溶液水化对胶束的形态没有明显影响(图 1B、1C); 当投药比为 80 : 100 时, 2.0% 的 NaCl 溶液水化后部分胶束逐渐由球形延长成为短棒状(图 1F); 当投药比为 110 : 100 时, 加入 0.9% NaCl 溶液水化, 大量胶束呈现蠕虫状(图 1H), 而 NaCl 浓度继续升至 2.0% 未引起胶束形态的剧烈变化(图 1I)。这显示了在胶束形成的过程中, 决定胶束形态的主因是投药量的增加, 辅因是 NaCl 溶液浓度的提高。考虑到后期的动物实验, 在给药时维持药液生理渗透压可减少对动物的刺激性, 确定后续制备时均采用生理盐水(0.9% NaCl 溶液)水化。

2.2 胶束的表征

2.2.1 粒径及分布 由图 2 可见投药比为 80 : 100 时, 所得球形胶束的粒径为 (43.17 ± 0.95) nm, 多分散性指数(PDI)约为 0.09; 投药比为 110 : 100 时, 制得的蠕虫状胶束的粒径为 (107.83 ± 1.51) nm, PDI 约为 0.226。结果表明薄膜水化法制备的载药胶束粒度分布均匀, 有助于充分利用 EPR 效应向肿瘤内部渗透。

2.2.2 包封率 固定载体量为 1 mg, 当投药量为 0.4 mg 时胶束包封率为 $(89.85 \pm 0.06)\%$; 增加投药量至 0.8 mg 时, 包封率为 $(77.08 \pm 2.93)\%$; 继续增加投药量至 1.1 mg 时, 包封率为 $(77.08 \pm 0.97)\%$, 说明随着投药量的增加包封率降低。

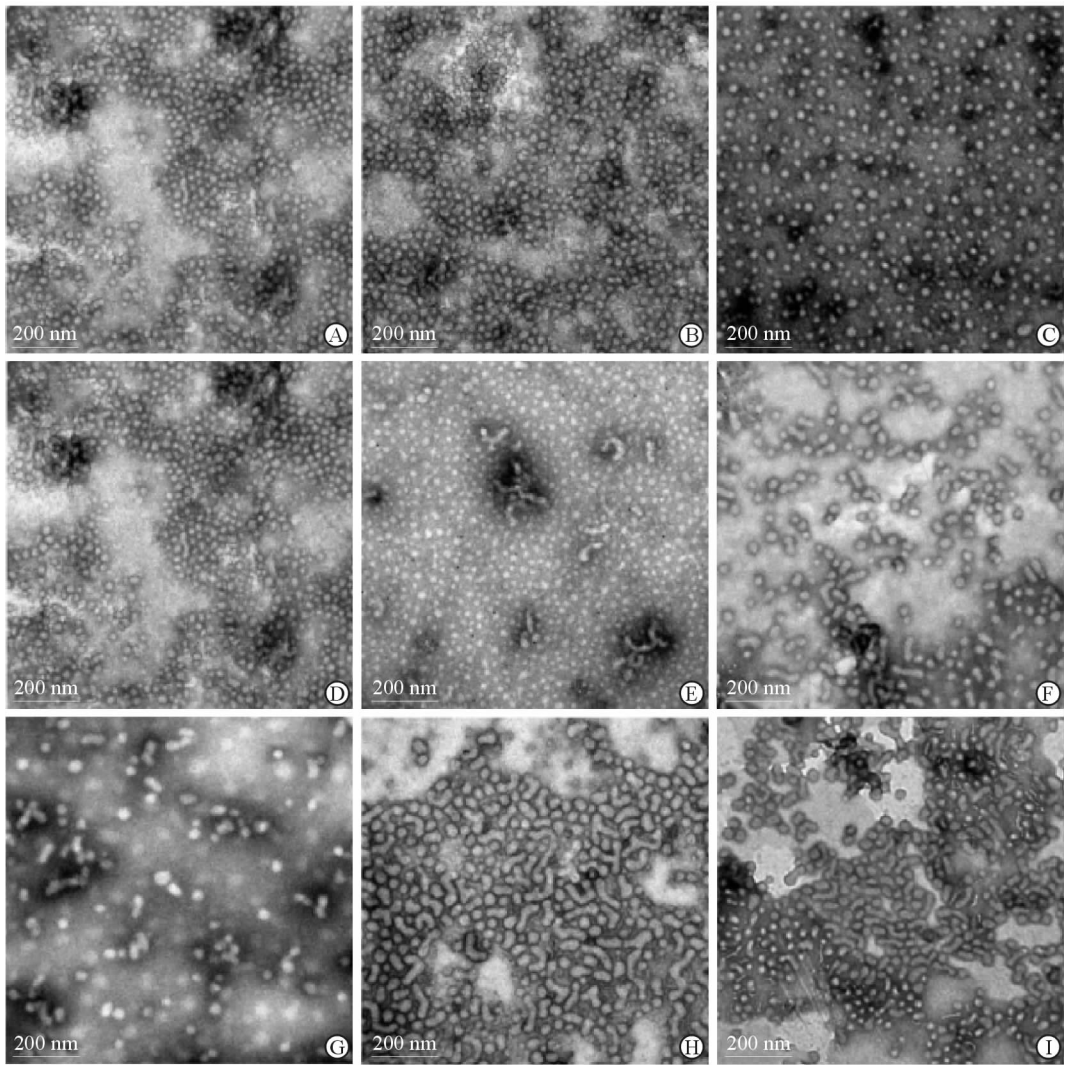


图1 不同制备工艺条件下胶束的透射电镜下形态

Fig 1 Morphologies of micelles with different preparation processes under transmission electron microscope

A-C: 0.4 mg PTX; D-F: 0.8 mg PTX; G-I: 1.1 mg PTX; A, D, G: DI water; B, E, H: 0.9% NaCl; C, F, I: 2.0% NaCl. PTX: Paclitaxel; DI water: Deionized water

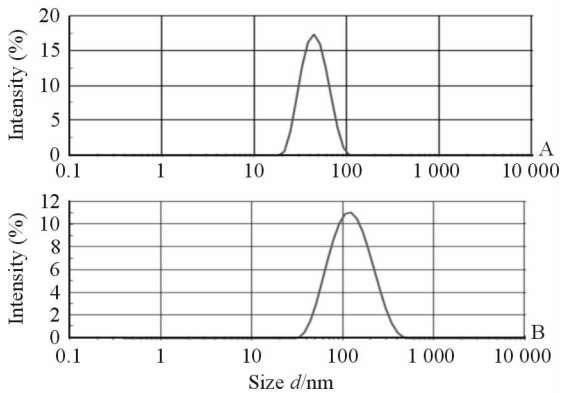


图2 球形胶束粒径分布(A)和蠕虫状胶束粒径分布(B)

Fig 2 Particle size distributions of spherical micelles (A) and worm-like micelles (B)

A: PTX : PO_x = 80 : 100; B: PTX : PO_x = 110 : 100. PTX: Paclitaxel; PO_x: Poly(2-oxazoline)

2.2.3 体外释放度 图3为球形和蠕虫状胶束在PBS (pH=7.4)和含2% BSA溶液中的释放曲线。结果显示,在PBS介质中,两种形态的胶束12 h累积释放量达75%;在含2% BSA的介质中,蠕虫状胶束较球形胶束释放速率减缓,24 h药物均可完全释放。胶束在4 h释药50%左右,表明在释放初始阶段均存在突释现象;但随后释放缓慢,有利于维持体内药物浓度。

2.3 细胞毒性实验 如图4A所示,PO_x载体对细胞几乎无毒性。如图4B所示,PTX注射剂Taxol和载PTX胶束对A549细胞均存在浓度依赖性杀伤作用。Taxol、球形胶束和蠕虫状胶束对A549细胞的IC₅₀值分别为0.568、0.336和0.342 μg/mL,

均能杀伤 A549 肺癌细胞株。

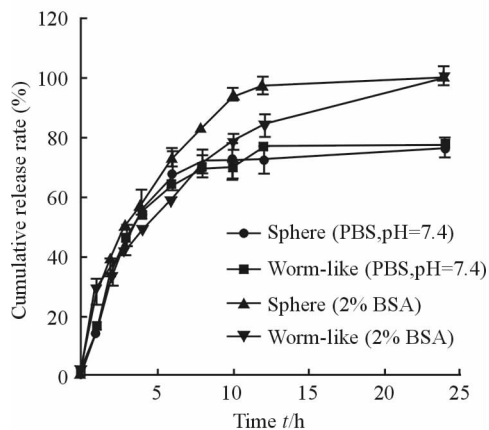


图3 球形胶束和蠕虫状胶束在不同介质中体外释放的时间-累积释放率曲线

Fig 3 *In vitro* time-cumulative release curve of spherical micelles and worm-like micelles in different media

PBS: Phosphate buffer saline; BSA: Bovine serum albumin. $n=3, \bar{x} \pm s$

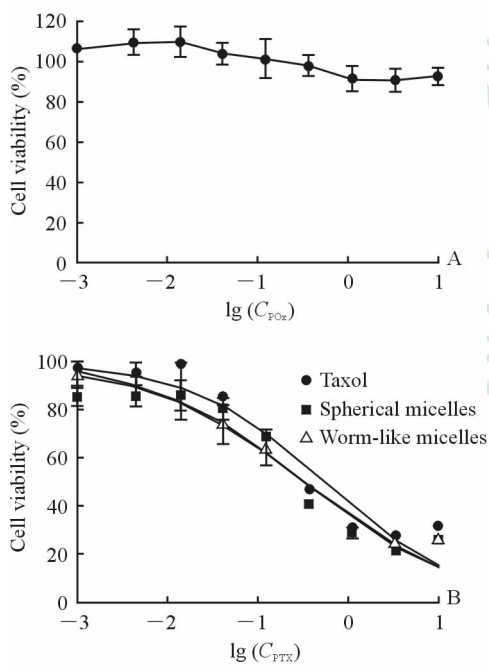


图4 空白载体(A)和不同PTX制剂(B)对A549细胞的活性影响

Fig 4 *In vitro* cytotoxicity of blank micelles (A) and different PTX formulations (B) in A549 cells

C_{POX} : Concentration of POX; C_{PTXX} : Concentration of PTX. POX: Poly(2-oxazoline); PTX: Paclitaxel. $n=3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

聚2-噁唑啉类聚合物在20世纪60年代被首次报道^[14],直至近年来始发现该聚合物亲疏水性可

调,通过活性开环反应可合成系列嵌段共聚物,从而构建纳米聚合物胶束递药系统^[12,15]。本实验选择聚2-噁唑啉类三嵌段聚合物作为递药载体,其对紫杉烷类药物亲和力高、增溶能力强,通过自组装实现了对PTX的高荷载,其载药量高达40%,可有效减小辅料使用量。其中,载药量的测定鉴于PTX的水溶性差(溶解度仅约 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$)^[16],高速离心后胶束外游离PTX浓度极低,故可忽略不计。

与粒径、电荷性质相似,嵌段聚合物胶束的形态对胶束的载药、体内分布和药动学行为具有重要影响。本研究结果显示随着投药量的增加,胶束由球形转变成了蠕虫状。我们猜测这种形态的转变是由于PTX与聚2-噁唑啉载体间存在氢键作用,随着药物量的增大,氢键作用增强,疏水内核体积增大,亲水性外壳变薄,使得部分裸露的内核相互连接,导致球形胶束向蠕虫状转变,后期我们将通过具体实验验证。实验表明投药量是形态变化的主因,水化溶剂中的盐浓度对胶束形态也有重要影响。NaCl的加入使得体系中电解质浓度增强,嵌段聚合物临界聚集浓度减小,聚合物更易生长成蠕虫状。

综上,本实验通过薄膜水化法构建了2种形态的载PTX聚2-噁唑啉胶束,其粒径分布均一,封装率和载药量较高,细胞毒性实验验证其具备抗肿瘤活性。在后续实验中,我们将对不同形态胶束的成形机制和体内抗肿瘤活性作进一步探究。

[参考文献]

- [1] MAGALHAES L G, MARQUES F B, DA FONSECA M B, ROGÉRIO K R, GRAEBIN C S, ANDRICOPULO A D. Discovery of a series of acridinones as mechanism-based tubulin assembly inhibitors with anticancer activity[J/OL]. PLoS One, 2016, 11: e0160842. doi: 10.1371/journal.pone.0160842. eCollection 2016.
- [2] ZHANG Z, MEI L, FENG S S. Paclitaxel drug delivery systems[J]. Expert Opin Drug Deliv, 2013, 10: 325-340.
- [3] Hennenfent K L, Govindan R. Novel formulations of taxanes; a review. Old wine in a new bottle? [J]. Ann Oncol, 2006, 17: 735-749.
- [4] DESAI N P, TRIEU V, HWANG L Y, WU R, SOON-SHIONG P, GRADISHAR W J. Improved

- effectiveness of nanoparticle albumin-bound (nab) paclitaxel versus polysorbate-based docetaxel in multiple xenografts as a function of HER2 and SPARC status[J]. *Anti-cancer Drug*, 2008, 19: 899-909.
- [5] MARUPUDI N I, HAN J E, LI K W, RENARD V M, TYLER B M, BREM H. Paclitaxel: a review of adverse toxicities and novel delivery strategies [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2007, 6: 609-621.
- [6] SAVIĆ R, EISENBERG A, MAYSINGER D. Block copolymer micelles as delivery vehicles of hydrophobic drugs: micelle-cell interactions [J]. *J Drug Target*, 2006, 14: 343-355.
- [7] RÖSLER A, VANDERMEULEN G W M, KLOK H A. Advanced drug delivery devices via self-assembly of amphiphilic block copolymers[J]. *Adv Drug Deliver Rev*, 2001, 53: 95-108.
- [8] GAUCHER G, DUFRESNE M H, SANT V P, KANG N, MAYSINGER D, LEROUX J C. Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery [J]. *J Control Release*, 2005, 109: 169-188.
- [9] CAI S, VIJAYAN K, CHENG D, LIMA E M, DISCHER D E. Micelles of different morphologies—advantages of worm-like filomicelles of PEO-PCL in paclitaxel delivery[J]. *Pharm Res*, 2007, 24: 2099-2109.
- [10] GENG Y A N, DALHAIMER P, CAI S, TSAI R, TEWARI M, MINKO T, et al. Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery[J]. *Nat Nanotechnol*, 2007, 2: 249-255.
- [11] CHRISTIAN D A, CAI S, GARBUZENKO O B, HARADA T, ZAJAC A L, MINKO T, et al. Flexible filaments for *in vivo* imaging and delivery: persistent circulation of filomicelles opens the dosage window for sustained tumor shrinkage[J]. *Mol pharm*, 2009, 6: 1343-1352.
- [12] LUXENHOFER R, SCHULZ A, ROQUES C, LI S, BRONICH T K, BATRAKOVA E V, et al. Doubly amphiphilic poly(2-oxazoline)s as high-capacity delivery systems for hydrophobic drugs [J]. *Biomaterials*, 2010, 31: 4972-4979.
- [13] BERNABEU E, GONZALEZ L, LEGASPI M J, MORETTON M A, CHIAPPETTA D A. Paclitaxel-loaded TPGS-*b*-PCL nanoparticles: *in vitro* cytotoxicity and cellular uptake in MCF-7 and MDA-MB-231 cells versus mPEG-*b*-PCL nanoparticles and abraxane®[J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2016, 16: 160-170.
- [14] KAGIYA T, NARISAWA S, MAEDA T, FUKUI K. Ring-opening polymerization of 2-substituted 2-oxazolines[J]. *J Polym Sci B Pol Lett*, 1966, 4: 441-445.
- [15] LUXENHOFER R, HAN Y, SCHULZ A, TONG J, HE Z, KABANOV A V, et al. Poly(2-oxazoline)s as polymer therapeutics [J]. *Macromol Rapid Comm*, 2012, 33: 1613-1631.
- [16] LIGGINS R T, HUNTER W L, BURT H M. Solid-state characterization of paclitaxel[J]. *J Pharm Sci*, 1997, 86: 1458-1463.

[本文编辑] 尹 荼