



叶酸聚合物胶束给药系统制备及其评价

韩雪, 刘婧, 刘敏, 潘俊, 陆伟跃*
(复旦大学药学院药剂学教研室, 上海 201203)

摘要: 将叶酸-聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (FA-PEG-DSPE) 与甲氧基聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (MPEG-DSPE) 的混合物 (摩尔比 1 : 100) 作为载体材料, 采用成膜水化法, 分别制成载疏水性抗肿瘤药物 9-硝基喜树碱及紫杉醇的聚合物胶束。体外抗 HeLa 和 SGC7901 肿瘤细胞活性的试验表明, 叶酸修饰的聚合物胶束能提高难溶性抗肿瘤药物体外抗肿瘤细胞活性。

关键词: 叶酸偶联聚合物胶束; 9-硝基喜树碱; 紫杉醇; 抗肿瘤细胞活性

中图分类号: R944.9 文献标志码: A 文章编号: 1001-8255 (2009) 08-0584-04

Preparation and Evaluation of Folate-conjugated Polymer Micelles

HAN Xue, LIU Jing, LIU Min, PAN Jun, LU Wei-yue*

(Dept. of Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203)

ABSTRACT: Folate-conjugated polymer micelles loaded with 9-nitro-camptothecin and paclitaxel respectively were prepared by film-forming and hydration method with the mixtrure of folate-poly(ethylene glycol)-distearoylphosphatidylethanolamine (FA-PEG-DSPE) and methoxy-poly(ethylene glycol)-distearoylphosphatidylethanolamine (MPEG-DSPE) (molar ratio=1 : 100) as the carrier. The results of *in vitro* cytotoxicity test showed that the anti-tumor activity of poorly water-soluble anticancer agents could be significantly enhanced by folate-conjugated polymer micelles.

Key Words: folate-conjugated polymer micelle; 9-nitro-camptothecin; paclitaxel; anti-tumor activity

喜树碱及其衍生物是以 DNA 拓扑异构酶 I (Topo I) 为作用靶标, 抑制生物体 DNA 合成而产生

抗肿瘤作用^[1]。研发喜树碱抗肿瘤新药成为药学工作者的关注热点。美国 SuperGen 公司研发的 9-硝基喜树碱 (9-NC) 是半合成衍生物, 合成工艺简单、稳定性好, 对多种癌细胞有较强抑制活性^[2], 尤其是对胰腺癌疗效显著, 已于 2004 年完成胰腺癌的 III 期临床研究, 但由于其体内毒性较大, 限制了临床应用, 目前我国尚无 9-NC 产品。

紫杉醇 (paclitaxel, PCL) 是从红豆杉属植物紫杉中提取得到的一种抗肿瘤药, 临床主要用于卵

收稿日期: 2008-12-03

基金项目: 中国高技术研究发展计划 (863 计划) (编号 2006AA03Z325)、上海市重点科技攻关项目 (编号 074319117)

作者简介: 韩雪 (1983-), 女, 硕士研究生, 专业方向: 叶酸介导靶向淋巴转移肿瘤的纳米胶束给药系统研究。

通信联系人: 陆伟跃 (1960-), 男, 教授, 从事靶向传释系统研究。

Tel: 021-54237040; Fax: 021-64178790

E-mail: wylu@shmu.edu.cn

参考文献:

- [1] 毕跃峰, 刘宏民. 马尾松松针化学成分的研究[J]. 药学报, 2001, 36 (11): 832-835.
- [2] 马廉举, 刘新. 反相离子对色谱法测定马尾松松针中莽草酸的含量[J]. 中药材, 2008, 31 (1): 63-65.
- [3] 李利军, 陈甜, 朱晓勇, 等. 离子交换树脂对莽草酸粗提液的脱色研究[J]. 广西工学院学报, 2006, 17 (4): 1-4.
- [4] 马廉举, 刘新, 卓玉娟, 等. 717 阴离子交换树脂吸附分离莽草酸的研究[J]. 中药材, 2008, 31 (7): 1065-1067.

巢癌、乳腺癌及非小细胞肺癌的治疗^[3]，对顺铂耐药或未控制的卵巢癌及食道癌、肺癌也有一定疗效^[4]。PCL难溶于水($< 6 \text{ mg/L}$)，不稳定，口服生物利用度差^[5]。上市的紫杉醇注射液采用的增溶溶媒聚氧乙烯蓖麻油(Cremophor EL)易产生过敏性、神经毒性、肾毒性、心脏毒性等不良反应，且在给药过程中能使静脉注射输液管中的增塑剂溶出^[6]，加之PCL本身对心脏和肾脏等组织亦有不良反应^[7]，限制了PCL在临床上的应用。

聚合物胶束作为药物载体发展于20世纪90年代，它是由两亲性聚合物在水溶液中自发形成的一种自组装结构。亲水性片段[如聚乙二醇(PEG)]形成外壳，疏水性片段[如二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE)]形成内核，构成的独特核-壳结构可将难溶性药物包载于内核中。聚合物胶束粒径一般小于100 nm，具有载药量高、载药范围广、稳定性好、体内滞留时间长等特点，可提高药物稳定性和生物利用度，减轻不良反应，还可在表面连接具有特异性识别功能的靶向分子，实现主动靶向给药^[8,9]。

叶酸受体是一种糖蛋白膜受体，在多数实体肿瘤细胞膜表面高表达，而在正常组织低表达。因此，将叶酸连接到聚合物胶束表面，赋予聚合物胶束对肿瘤细胞的靶向性，可提高药物在肿瘤组织中的浓度，减轻不良反应^[10]。

本研究将叶酸(FA)-PEG-DSPE(1)与甲氧基聚乙二醇(MPEG)-DSPE(2)(摩尔比1:100)的混合物作为载体材料，采用成膜水化法分别包载难溶性抗肿瘤药物9-NC和PCL，制成载药叶酸修饰聚合物胶束(FA-M-drug)，并对其特性进行表征、评价抗肿瘤细胞活性。

1 仪器与材料

1100型高效液相色谱仪(美国Agilent公司); PowerWave XS型酶标仪(美国Bio-Tek公司); NicompTM 380ZLS型粒度仪(美国PSS公司); CM120型透射电镜(Philips公司); FACSCalibur型流式细胞仪(美国Becton Dickinson公司)。

FA-PEG 3350-DSPE、MPEG 2300-DSPE(照文献^[11]自制); 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、小牛血清(bovine calf serum, BCS)、RPMI 1640培养基、无叶酸RPMI 1640培养基(Gibco公司); *N*-2-羟乙基哌嗪-*N'*-2-乙磺酸(HEPES, 含量 $\geq 99.7\%$, 上海爱紫特生物科技有限公司); 甲酸(分析纯, 含量 $> 88\%$, 中国医药集团化学试剂有限公司); 乙腈、三氯甲烷等均为色谱纯。

HeLa细胞株、SGC7901细胞株(中国科学院细胞库)。

2 方法与结果

2.1 载体材料临界胶束浓度(CMC)测定

采用芘荧光探针法^[12]。配制系列浓度1(或2)和芘的无水氯仿溶液，置试管中，用氮气吹干氯仿，并减压避光干燥过夜。各加入一定量的10 mmol/L、pH 7.4的HEPES缓冲液(HBS, 下同)，使1(或2)浓度为 0.27×10^{-5} 、 0.53×10^{-5} 、 0.93×10^{-5} 、 1.07×10^{-5} 、 1.2×10^{-5} 、 1.28×10^{-5} 、 1.33×10^{-5} 和 $2.67 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ，芘的浓度为0.014 mg/ml。置25℃水浴中避光振荡24 h，经0.22 μm 微孔滤膜过滤除去游离的芘，并采用荧光光谱法检测包载于胶束中芘的浓度，激发波长350 nm，发射波长440 nm。

测得1和2的CMC为 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 和 $0.97 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ，结果见图1。由于CMC较低，表明这两种载体材料均有较好的稳定性。

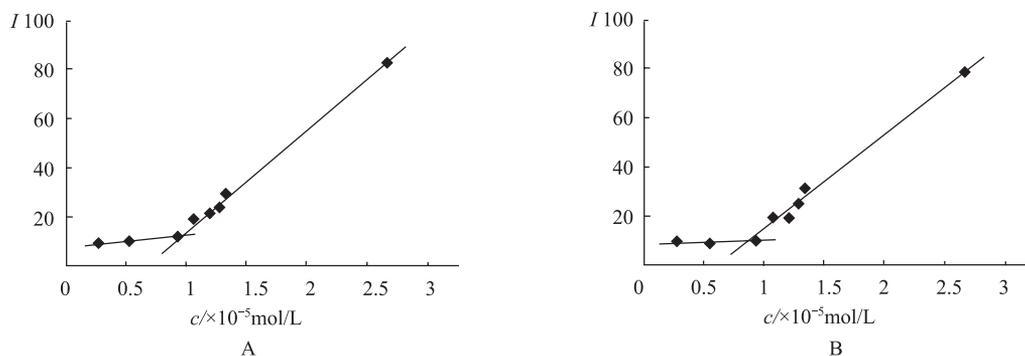


图1 1(A)和2(B)的CMC测定曲线($n=3$)

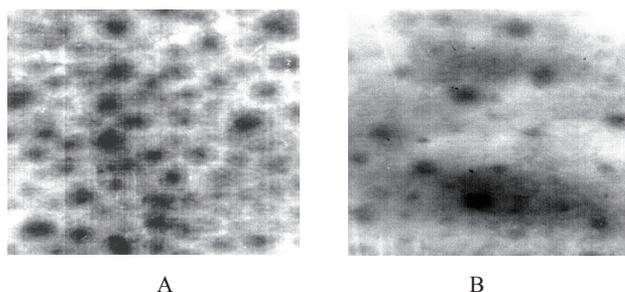
2.2 载药胶束的制备

分别取 **1** 和 **2** 的混合物 (摩尔比 1 : 100) 10 和 20 mg 溶于无水氯仿, 加入含 9-NC 或 PCL 0.5 mg 的乙腈溶液, 旋转蒸发成膜后减压干燥过夜, 分别加入 10 mmol/L、pH 5.5 或 pH 7.4 的 HBS 缓冲液 5 ml, 37 °C 水浴振荡 20 min, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除去未包载药物, 分别得包载 9-NC 或 PCL 的叶酸修饰聚合物胶束 (FA-M-9-NC、FA-M-PCL)。

空白叶酸聚合物胶束和叶酸未修饰聚合物胶束 (即未加入 FA-PEG-DSPE 的 MPEG-DSPE 胶束) 的制备也采用成膜水化法, 方法同上。

2.3 粒径、ζ 电位和形态

取适量胶束溶液, 用 HBS 缓冲液稀释至 0.5 mg/ml, 用粒度仪测定粒径分布及 ζ 电位; 并取适量滴加在铜网上, 置透射电镜下观察胶束形态 (见图 2)。



A: FA-M-9-NC, B: FA-M-PCL

图 2 载药胶束透射电镜照片 (×40 000)

结果表明, 两种胶束的粒径分布窄, 平均粒径为 21 ~ 24 nm。透射电镜观察表明, 空白胶束与载药胶束均呈球形, 表面未见药物晶体析出。空白胶束和聚合物胶束的 ζ 电位为 -13.2 和 -15.7 mV, 负载 9-NC 和 PCL 后胶束的 ζ 电位负电性略有减少, 9-NC 的叶酸修饰和未修饰聚合物胶束的 ζ 电位为 -13.0 和 -15.4 mV, PCL 则为 -13.0、-15.5 mV, 无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.4 包封率和载药量

用 HPLC 法测定 9-NC^[13] 和 PCL^[14] 的含量。9-NC 含量测定的色谱条件为: 色谱柱 Dikma RP C₁₈ 柱 (4.6 mm×150mm, 5 μm); 流动相 水 - 乙腈 -

甲酸 (55 : 45 : 0.169); 检测波长 368 nm; 流速 1.0 ml/min; 进样量 20 μl。测定 PCL 时流动相改为乙腈 - 水 (52 : 48), 检测波长为 230 nm, 其它条件同上。

精密量取胶束溶液 300 μl, 加入相应的流动相 2.7 ml, 涡旋后取上清液进样测定, 得 9-NC 或 PCL 胶束的总含药量。另取经 0.22 μm 微孔滤膜过滤的 9-NC 或 PCL 胶束溶液 300 μl, 同法测定, 得 9-NC 或 PCL 胶束的包封率为 97.6%, 载药量为 4.6%; 对 PCL 的包封率为 48.4%, 载药量为 1.2%。

2.5 抗肿瘤细胞活性试验

采用噻唑蓝比色法 (MTT 法) 考察载药叶酸修饰和未修饰聚合物胶束及游离药物对 HeLa 和 SGC7901 细胞的抑制作用。将两株肿瘤细胞用 10% 小牛血清 (BCS) 加 90% RPMI 1640 培养液正常传代培养 3 代以上, 置 37 °C、5% CO₂ (相对湿度 95%) 培养箱中。铺板时将细胞按 7.5×10^3 个 / 孔接种于 96 孔培养板中, 置培养箱中培养 24 h 后, 弃去培养液, 每孔加入 10% 胎牛血清 (FBS)、90% 无叶酸 RPMI 1640, 置培养箱中培养 24 h 后弃去培养液, 剩余物中分别加入以 RPMI 1640 倍比稀释的载药叶酸修饰和未修饰聚合物胶束、游离药物, 使 9-NC 浓度为 0.001、0.01、0.1、1、3、5、8 和 10 μg/ml, PCL 浓度为 0.012 5、0.062 5、0.125、0.625、1.25、6.25、12.5 和 25 μg/ml。每个浓度各设 3 个平行孔, 阴性对照孔加血清与 RPMI 1640 培养液, 继续培养 48 h 后再加入 5 mg/ml MTT 溶液培养 4 h。弃去培养液, 剩余物中加入 DMSO 200 μl 并置 37 °C 水浴中振荡至紫色结晶产物溶解, 用酶标仪在 590 nm 测定吸光度。

利用 IC₅₀ 计算器拟合吸光度比值, 分别计算载药叶酸修饰和未修饰聚合物胶束、游离药物的半数抑制浓度 (即 IC₅₀ 值), 结果见表 1。

结果表明, 载 9-NC 的叶酸修饰聚合物胶束作用于 HeLa 细胞 48 h 后, IC₅₀ 降至 0.005 μg/ml, 抑制肿瘤细胞生长的能力分别为叶酸未修饰聚合物胶

束的 30 倍, 游离 9-NC 的 304 倍。同样, 载 PCL 的叶酸修饰聚合物胶束抑制 HeLa 细胞增殖的能力分别为叶酸未修饰聚合物胶束的 8 倍, 游离 PCL 的 81 倍。对 SGC7901 的试验也出现了相似的结果:

载 9-NC 或 PCL 的叶酸修饰聚合物胶束抑制 SGC7901 细胞生长的效果分别为相应的叶酸未修饰聚合物胶束的 28、27 倍, 游离药物的 158、140 倍。

表 1 9-NC 和 PCL 作用于两种肿瘤细胞的 IC₅₀ 值¹⁾/μg·ml⁻¹ (n=3)

药物	叶酸修饰聚合物胶束	叶酸未修饰聚合物胶束	游离药物
9-NC	0.005±0.001 (0.02±0.007)	0.15±0.04 (0.55±0.13)	1.52±0.76 (3.15±0.75)
PCL	0.18±0.06 (0.13±0.035)	1.44±0.29 (3.52±0.47)	14.59±2.16 (18.26±4.04)

注: ¹⁾括号内外分别是对SGC7901细胞和HeLa细胞的实验数据

3 讨论

采用成膜水化法将难溶性抗肿瘤药物包载于聚合物胶束中, 可使难溶性药物 9-NC 与 PCL 有效增溶。所得叶酸聚合物胶束体外可显著增强难溶性抗肿瘤药物 9-NC 和 PCL 对肿瘤细胞生长的抑制作用, 显示了叶酸介导聚合物胶束靶向肿瘤细胞的优越性。尽管不同抗肿瘤药的抑制肿瘤细胞生长效果不同, 经叶酸修饰后的载药胶束都不同程度增强了抗肿瘤药物杀伤叶酸受体高表达肿瘤细胞的能力, 为载药叶酸聚合物载药胶束在体内对实体瘤和淋巴转移瘤的药效学研究提供帮助。

参考文献:

[1] Hsiang YH, Hertzberg R, Hecht S, *et al.* Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I [J]. *J Biol Chem*, 1985, **260**(27): 14873-14878.

[2] Amorino GP, Hercules SK, Mohr PJ, *et al.* Preclinical evaluation of the orally active camptothecin analog, RFS-2000 (9-nitro-20(S)-camptothecin) as a radiation enhancer [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2000, **47**(2): 503-509.

[3] Balan G, Timmins P, Greene DS, *et al.* In vitro-in vivo correlation (IVIVC) models for metformin after administration of modified-release (MR) oral dosage forms to healthy human volunteers [J]. *J Pharm Sci*, 2001, **90**(8): 1176-1185.

[4] 金有豫. 药理学[M]. 5版, 北京: 人民卫生出版社, 2001: 398.

[5] Sezgin Z, Yuksel N, Baykara T. Investigation of pluronic and PEG-PE micelles as carriers of meso-tetraphenyl porphine

for oral administration [J]. *Int J Pharm*, 2007, **332**(1-2): 161-167.

[6] Huh KM, Lee SC, Cho YW, *et al.* Hydrotropic polymer micelle system for delivery of paclitaxel [J]. *J Controlled Release*, 2005, **101**(1-3): 59-68.

[7] 周卫, 吕琦. 紫杉醇脂质体在大鼠体内的药动学[J]. 中国药科大学学报, 2000, **31**(6): 443-446.

[8] Park EK, Lee SB, Lee YM. Preparation and characterization of methoxy poly(ethylene glycol)/poly(epsilon-caprolactone) amphiphilic block copolymeric nanospheres for tumor-specific folate-mediated targeting of anticancer drugs [J]. *Biomaterials*, 2005, **26**(9): 1053-1061.

[9] Torchilin VP, Lukyanov AN, Gao Z, *et al.* Immunomicelles: targeted pharmaceutical carriers for poorly soluble drugs [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(10): 6039-6044.

[10] Zhao H, Yung LY. Selectivity of folate conjugated polymer micelles against different tumor cells [J]. *Int J Pharm*, 2008, **349**(1-2): 256-268.

[11] 王昭, 马稳乾, 傅经国, 等. 甲氧基聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺长循环脂质体的制备[J]. 世界最新医学信息文摘, 2003, **2**(5): 817-820.

[12] Sezgin Z, Yuksel N, Baykara T. Preparation and characterization of polymeric micelles for solubilization of poorly soluble anticancer drugs [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2006, **64**(3): 261-268.

[13] 李柯, 钟大放. 高效液相色谱法测定大鼠组织及血浆中 9-硝基喜树碱含量[J]. 药学学报, 2003, **38**(2): 124-128.

[14] Wang Y, Yu L, Han L, *et al.* Difunctional Pluronic copolymer micelles for paclitaxel delivery: synergistic effect of folate-mediated targeting and Pluronic-mediated overcoming multidrug resistance in tumor cell lines [J]. *Int J Pharm*, 2007, **337**(1-2): 63-73.