

甘草次酸修饰 PEG-PLGA 纳米粒的制备 及与肝癌细胞的亲和性

黄 微, 王 平, 王 蔚, 张 玥, 张 闯年, 田 秦, 王秀华, 刘 媛, 袁 直
(南开大学高分子化学研究所, 功能高分子材料教育部重点实验室, 天津 300071)

摘要 将肝靶向分子甘草次酸偶联至聚乙二醇-聚(乳酸-羟基乙酸)(PEG-PLGA)嵌段共聚物上. 以聚乙二醇维生素 E(TPGS)为稳定剂, 采用溶剂挥发法制备肝靶向纳米粒子, 通过核磁共振、红外光谱、激光光散射及透射电镜等方法对共聚物及纳米粒子的理化性质进行表征; 运用噻唑蓝(MTT)比色法评价纳米粒子作为药物载体的安全性, 并通过荧光显微镜初步考察了纳米粒子与肝癌细胞的亲和能力. 结果表明, 纳米粒子粒径为 128.2 nm, 电势为 -16.2 mV, 在电解质溶液中具有较高的稳定性. 细胞实验结果显示, 该纳米粒子无明显细胞毒性, 且甘草次酸的引入能显著增加肝癌细胞对纳米粒子的摄取几率, 显示出其作为肝靶向药物载体的潜在价值.

关键词 甘草次酸; 聚乙二醇-聚(乳酸-羟基乙酸); 聚乙二醇维生素 E; 肝靶向药物载体

中图分类号 O631; O629.6⁺1 文献标识码 A 文章编号 0251-0790(2011)02-0416-05

肝靶向给药系统可将药物有效地输送至肝脏病变部位, 减少对其它脏器的损伤, 是药剂学领域的研究热点. 当在药物载体上修饰能与肝细胞发生特异亲和作用的配体后, 可进一步促进肝细胞对药物的胞吞, 从而增加细胞内药物浓度, 提高药物生物利用率.

甘草次酸(Glycyrrhetic acid, GA)是五环三萜类化合物, 为甘草根部的主要成分, 无毒且廉价, 在传统中药处方中的应用极其广泛. 1991年, Negishi等^[1]发现鼠肝实质细胞表面存在大量 GA 结合位点, 这些位点具有高度特异性. 随后的一些研究结果表明, GA 修饰的高分子载体材料具有明显趋肝性. 毛声俊等^[2]采用乙醇注入法制备了表面修饰 GA 的脂质体纳米粒子(CaHLP-GLA), 大鼠肝细胞胞吞实验显示其对 CaHLP-GLA 的胞吞能力是未经 GA 修饰组的 3.3倍.

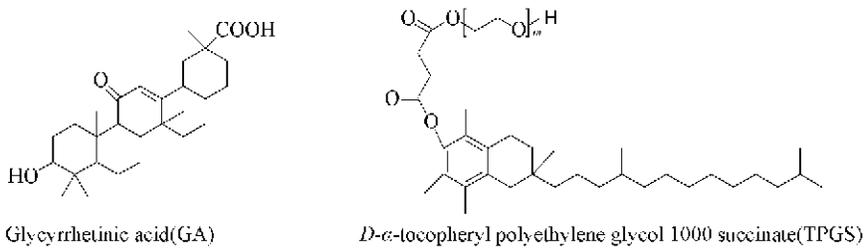
在我们的前期工作中, 主要围绕 GA 修饰的高分子材料在肝靶向给药领域的应用开展了大量研究. Cha等^[3,4]成功制备了端基修饰 GA 的聚谷氨酸苄酯以及侧链偶联 GA 的壳聚糖纳米粒子. Tian等^[5]制备了甘草次酸-聚乙二醇-壳聚糖复合纳米粒子, 其可在肝脏持续高度富集(富集率为 51.3%), 并显著增加肝细胞对粒子的胞吞. 由此可见, GA 是一种高效、特异的肝靶向配体, 具有广阔的应用前景. 其中壳聚糖类载体主要用于对水溶性抗癌药物的包封, 而聚谷氨酸苄酯类载体则主要用于包载疏水性抗癌药.

聚(乳酸-羟基乙酸)(PLGA)和聚乙二醇(PEG)具有良好的生物相容性, 无免疫原性, 由两者形成的嵌段共聚物目前已被广泛用作药物载体材料^[6,7], 并且 PLGA 和 PEG 均已商品化, 来源广泛. 与基于聚谷氨酸苄酯的合成高分子材料相比, PLGA 和 PEG 更有利于实现载体材料的临床应用. 本文从材料设计角度出发, 将 GA 的高效肝靶向性和 PEG-PLGA 的优异生物学性能相结合, 制得 GA 修饰的 PEG-PLGA 嵌段共聚物. 以聚乙二醇维生素 E(TPGS)为稳定剂, 通过溶剂挥发法制备纳米粒子. 对材料的理化性质、聚集形貌、粒径、稳定性及细胞毒性进行了表征, 初步考察了 7703 肝癌细胞与纳米粒子的亲和力. Scheme 1 为 GA 和 TPGS 的结构示意图.

收稿日期: 2010-03-16

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 50873048)和天津市自然科学基金(批准号: 07JCZDJC00700)资助.

联系人简介: 袁 直, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事生物医用材料的研究. E-mail: zhiy@nankai.edu.cn



Scheme 1 Structures of GA and TPGS

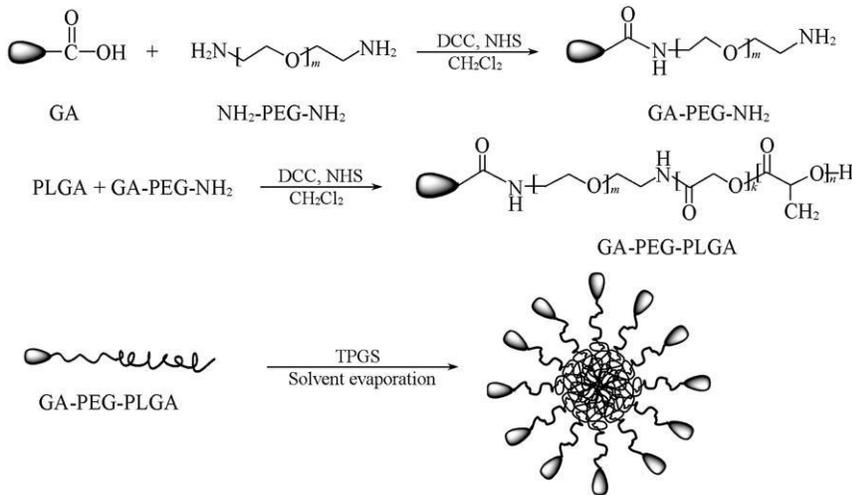
1 实验部分

1.1 试剂与仪器

甘草次酸 (GA, 西安富捷药业有限公司); 双氨基聚乙二醇 ($\text{NH}_2\text{-PEG-NH}_2$, $M_w = 3350$ Sigma公司); 端羧基聚(乳酸-羟基乙酸) (PLGA-COOH, RG502H, $\eta = 0.27$) 及聚乙二醇-聚(乳酸-羟基乙酸) (PEG-PLGA, $\eta = 0.30$) (济南岱罡生物科技有限公司); 聚乙二醇-维生素 E (TPGS, 海门慧聚药业有限公司). Nicolet 5DX 型红外光谱仪 (IR); Varian UNITY Plus-400MHz 核磁共振谱仪 (NMR); Waters 515 型凝胶渗透色谱仪 (GPC); Brookhaven 电位及粒度分析仪.

1.2 甘草次酸修饰共聚物的合成与表征

参照文献 [5] 方法合成甘草次酸修饰的氨基聚乙二醇 (GA-PEG-NH₂). 取 0.46 g GA-PEG-NH₂ 和 1.5 g PLGA 溶解于 20 mL 二氯甲烷 (CH_2Cl_2) 中, 加入 0.02 g N,N' -二环己基碳二亚胺 (DCC) 和 0.03 g N -羟基琥珀酰亚胺 (NHS), 在 N_2 气保护下室温反应 2 d 过滤, 浓缩, 无水乙醚沉淀, 得到甘草次酸修饰的聚乙二醇-聚(乳酸-羟基乙酸) 嵌段共聚物, 记为 GA-PEG-PLGA. 合成路线见 Scheme 2 通过 NMR, IR 和 GPC 对产品进行了表征.



Scheme 2 Synthetic routes of GA-PEG-PLGA copolymer and the preparation of nanoparticles

1.3 纳米粒子的制备及表征

以 TPGS 为稳定剂, 采用溶剂挥发法制备 GA-PEG-PLGA 纳米粒子. 配制 1 mL GA-PEG-PLGA 丙酮溶液 (10 mg/mL), 在搅拌下滴加至 10 mL TPGS 水溶液 (0.10%) 中. 旋除丙酮, 20000 r/min 离心 30 min 收集纳米粒子, 用水分散. 通过 ζ 电位、粒度分析仪和透射电镜进行表征.

1.4 纳米粒子稳定性评价

参考文献 [8] 方法, 将 0.5 mL 纳米粒子溶液 (10 mg/mL) 加至 2.5 mL 不同浓度 (0~1.0 mol/L) 的 Na_2SO_4 溶液中, 于 37 °C 静置 10 min, 紫外检测样品在 560 nm 处的吸光度, 用于稳定性评价.

1.5 纳米粒子细胞毒性评价

参考文献 [9] 方法, 以 7703 肝癌细胞为研究对象, 利用噻唑蓝 (MTT) 比色法考察纳米粒子对细胞的毒性作用, 从而评价其作为药物载体的安全性.

1.6 纳米粒子与肝癌细胞亲和实验

异硫氰基荧光素 (FITC) 标记的 PLGA 参考文献 [10] 方法制备. 荧光标记纳米粒子的制备步骤与空白纳米粒子相似, 仅将 GA-PEG-PLGA 替换为其 (或 PEG-PLGA) 与 FITC 标记 PLGA 的混合物 (质量比为 4:1), 得到的体系分别记为 FITC-labeled GA-PEG-PLGA 和 FITC-labeled PEG-PLGA. 以 4×10^4 细胞/孔的密度接种 7703 细胞, 于 37°C , 5% CO_2 孵化 24 h, 加入用 RM I1640 培养基分散的纳米粒子溶液 ($250 \mu\text{g}/\text{mL}$), 培养 2 h 后用 PBS 洗涤 3 次, 用荧光显微镜观测.

2 结果与讨论

2.1 GA-PEG-PLGA 的表征

图 1 为 GA-PEG-PLGA 的核磁共振氢谱, 其中 δ 5.2 和 1.6 分别为 PLA 的次甲基 ($-\text{CH}-$) 和甲基 ($-\text{CH}_3$) 质子峰; δ 4.8 为 PGA 的亚甲基 ($-\text{CH}_2-$) 质子峰; δ 3.6 为 PEG 的亚甲基 ($-\text{CH}_2-$) 质子峰. 此外高场部分明显出现了 GA 的角甲基 ($-\text{CH}_3$) 和亚甲基 ($-\text{CH}_2-$) 质子峰 (δ 1.5~0.8).

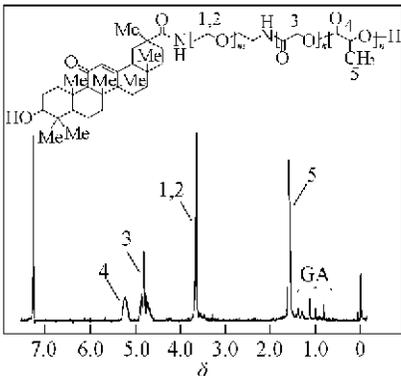


Fig 1 ^1H NMR spectrum of GA-PEG-PLGA

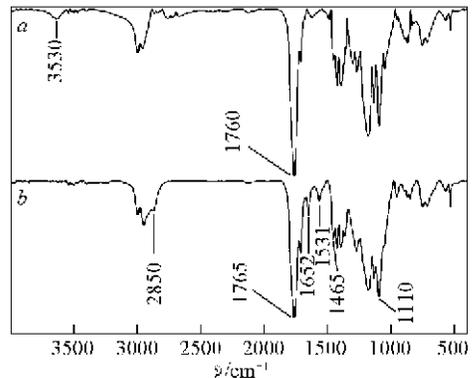


Fig 2 IR spectra of PLGA (a) and GA-PEG-PLGA (b)

图 2 为 GA-PEG-PLGA 的红外光谱. 与 PLGA (图 2 谱线 a) 相比, GA-PEG-PLGA (图 2 谱线 b) 在 3530 cm^{-1} 处的吸收峰消失 (为 PLGA 端羧基的 $\text{O}-\text{H}$ 伸缩振动), 而在 1652 和 1531 cm^{-1} 分别出现了酰胺 I 带 ($\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动) 和酰胺 II 带 ($\text{N}-\text{H}$ 弯曲振动) 特征峰, 说明 PLGA 与 GA-PEG- NH_2 间发生了酰化反应. 此外, 2850 , 1465 和 1110 cm^{-1} 的峰均较 PLGA 红外谱图中相对应的峰有所增强, 这是由于在 GA-PEG-PLGA 中引入了 PEG, 使 $\text{C}-\text{H}$ 伸缩振动 (2850 cm^{-1}), $\text{C}-\text{H}$ 弯曲振动 (1465 cm^{-1}) 和 $\text{C}-\text{O}$ 伸缩振动 (1110 cm^{-1}) 得以增强. GPC 结果显示, PLGA 的 M_n 为 15.3×10^3 , 修饰 GA-PEG- NH_2 ($M_n = 4.5 \times 10^3$) 后, 聚合物分子量增至 19.9×10^3 , 与理论值 (19.8×10^3) 相近, 并且 PDI 无明显变化. 结合 NMR, IR 和 GPC 结果, 表明成功制备了 GA-PEG-PLGA.

2.2 纳米粒子的表征

图 3(A) 是 GA-PEG-PLGA 纳米粒的粒径分布图. 可见 GA-PEG-PLGA 在 TPGS 作用下形成了单分散纳米粒溶液 (PDI = 0.15), 平均粒径 128.2 nm . 图 3(B) 的透射电镜照片显示, GA-PEG-PLGA 纳米粒子具有规整球形结构, 粒径约 $90 \sim 100 \text{ nm}$, 稍低于水合粒径值. 两种表征方法得到的粒径差异主要

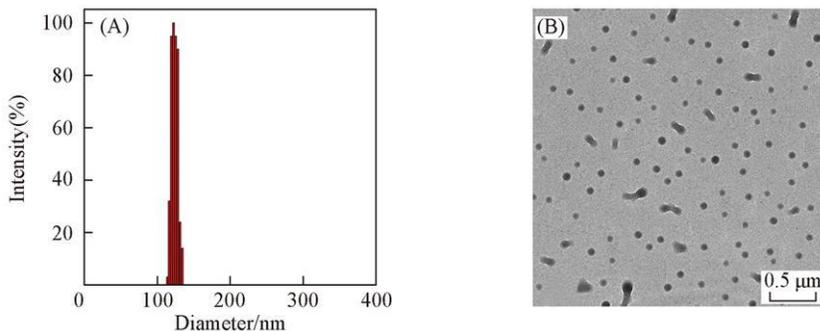


Fig 3 Size distribution (A) and TEM image (B) of GA-PEG-PLGA nanoparticles

由于测定时粒子状态的差别所致. 采用粒度分析仪测定时, 纳米粒子分散在水中, 溶胀较好, 粒径也较大; 而采用透射电镜表征时, 样品需要事先干燥, 此时粒子发生了收缩和塌陷, 导致粒径变小.

表 1 为纳米粒子的粒径和电位数据. 可见, GA 修饰的纳米粒和未经 GA 修饰的纳米粒子具有相似的粒径和表面电势, 说明 GA 的引入不会造成纳米粒子理化性质的差异. 此外, 加入 FITC 标记的 PLGA 后, 体系的粒径和电势没有明显变化.

Table 1 Size and ζ potential of nanoparticles

Nanoparticle	Size/nm	ζ potential/mV
GA-PEG-PLGA	128.2	-16.2
FITC-labeled GA-PEG-PLGA	121.6	-17.3
PEG-PLGA	122.7	-13.1
FITC-labeled PEG-PLGA	115.2	-14.5

2.3 纳米粒子稳定性评价

人体环境复杂, 体液中含有大量电解质, 因此考察纳米粒子在电解质中的稳定性显得尤为重要. 目前临界絮凝浓度是衡量纳米粒子稳定性的一个重要参数, 临界絮凝浓度是指纳米粒子的浊度突然增加时所需的电解质浓度. 图 4 为 GA-PEG-PLGA 纳米粒子与不同浓度的 Na_2SO_4 溶液作用后的吸光度变化曲线. 当 Na_2SO_4 浓度低于 0.4 mol/L 时, 体系吸光度几乎不变, 继续增加电解质浓度, 吸光度急剧增大, 其临界絮凝浓度为 0.4 mol/L, 远高于人体血液中电解质浓度 (主要成分为 0.14 mol/L Na^+ 和 0.10 mol/L Cl^-), 说明纳米粒子具有高度稳定性. 这是因为在纳米粒子形成过程中, 亲水的 PEG 和 TPGS 吸附大量水分子, 在粒子表面形成一疏松的水分子保护层, 起到稳定纳米粒子的作用. 向体系中加入电解质后, PEG 和 TPGS 的溶剂化程度均有所降低, 导致部分水分子被挤出粒子表面, 从而在聚合物链段间产生吸引而引起凝聚. 随着电解质浓度的进一步增加, 纳米粒子最终沉淀析出, 使体系吸光度发生突变.

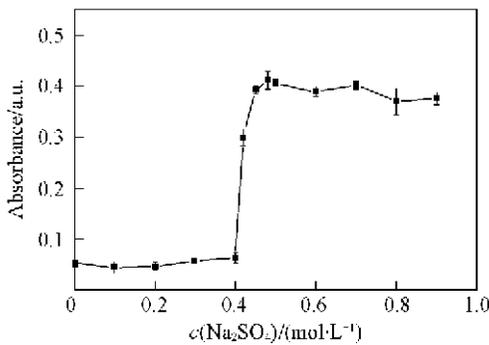


Fig 4 Turbidity evolution of nanoparticles with different concentrations of Na_2SO_4 ($n=3$)

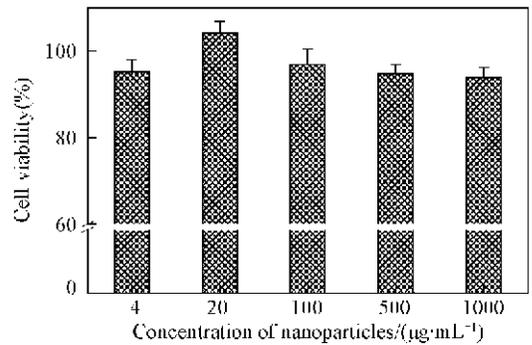


Fig 5 *In vitro* cytotoxicity evaluation of nanoparticles on 7703 cells ($n=3$)

2.4 纳米粒子细胞毒性评价

图 5 为 7703 细胞与不同浓度 GA-PEG-PLGA 纳米粒子孵育 72 h 后的细胞存活率结果. 由图 5 可知, 与不同浓度纳米粒子 (4~1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 作用后的细胞存活率并无显著差异 ($P > 0.1$), 均在 93.4%~104.3% 之间. 上述结果说明, GA-PEG-PLGA 纳米粒子无明显细胞毒性, 表明该载体材料具有良好的生物相容性.

2.5 纳米粒子与肝癌细胞的亲和力

以 7703 肝癌细胞为研究对象, FITC 为荧光标记物, 比较了 7703 细胞对 GA-PEG-PLGA 纳米粒子及 PEG-PLGA 纳米粒子的亲和力. 图 6 为荧光显微镜的观察结果. 在相同作用时间内, GA 修饰组的细胞内荧光强度 [图 6(A)] 要明显高于未经 GA 修饰的对照组 [图 6(B)], 说明有较多的 GA 修饰纳米粒子进入肝癌细胞. 由于两组纳米粒子的粒径和表面电势相似, 因此细胞对纳米粒子摄取程度的差异是由

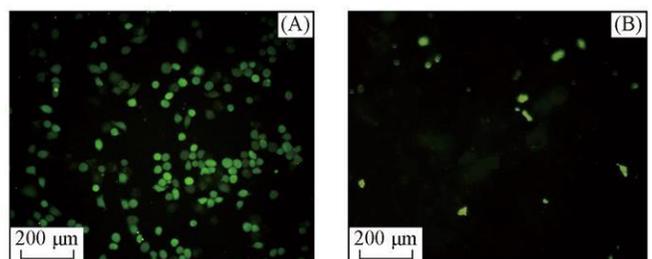


Fig 6 Fluorescence images of 7703 cells incubated with FITC-labeled GA-PEG-PLGA (A) and PEG-PLGA (B) nanoparticles for 2 h

其结构的不同所引起。上述结果说明,在纳米粒子上修饰 GA 后,能显著提高其与肝癌细胞的亲和力,促进粒子被肝癌细胞摄取的几率,进而有利于药物在细胞内的释放,提高药物生物利用率。

本文成功合成了含有肝靶向物质甘草次酸结构的 GA-PEG-PLGA 共聚物。以 TPGS 为稳定剂,采用溶剂挥发法制备得到肝靶向纳米粒子。研究显示,该纳米粒安全无毒,在电解质水溶液中具有较高稳定性;与 PEG-PLGA 纳米粒子相比,该纳米粒子对肝癌细胞呈现明显亲和性,有望作为一类新型的肝靶向药物载体。

参 考 文 献

- [1] Negishi M., Irie A., Nagata N., Nagata N., Ichikawa A. *Biochim. Biophys. Acta* [J], 1991, **1066**(1): 77—82
- [2] MAO Sheng Jun(毛声俊), HOU ShiXiang(侯世祥), JIN Hui(金辉), ZHANG Liang-Ke(张良珂), JIANG Bin(蒋彬). *China Journal of Chinese Materia Medica*(中国中药杂志) [J], 2003, **28**(4): 328—331
- [3] ZHA RuTao(查瑞涛), HE XiaoTing(贺晓婷), DU Tian(杜田), YUAN Zhi(袁直). *Chem. J. Chinese Universities*(高等学校化学学报) [J], 2007, **28**(6): 1098—1100
- [4] ZHA RuTao(查瑞涛), DU Tian(杜田), YUAN Zhi(袁直). *Chem. J. Chinese Universities*(高等学校化学学报) [J], 2006, **27**(2): 885—887
- [5] Tian Q., Zhang C. N., Wang X. H., Wang W., Huang W., Cha R. T., Wang C. H., Yuan Z., Liu M., Wan H. Y., Tang H. *Biomaterials* [J], 2010, **31**(17): 4748—4756
- [6] Zhao H., Lin Y., Yung L. *Int. J. Pharm.* [J], 2008, **339**(1/2): 256—268
- [7] Avgoustakis K., Beletsi A., Panagizos K., Kletsanis P., Karydas A. G., Ithakissios D. S. *J. Control Release* [J], 2002, **79**(1—3): 123—135
- [8] Yang J., Cho E. J., Seo S., Lee J. W., Yoon H. G., Suh J. S., Huh Y. M., Haan S. *J. Biomed. Mater. Res.* [J], 2008, **84A**(1): 273—280
- [9] Zhang C. N., Wang W., Wang C. H., Tian Q., Huang W., Yuan Z., Chen X. S. *Sci. China Ser. B* [J], 2009, **52**(9): 1382—1387
- [10] Tosi G., Rivas I. F., Gostantino L., Vandelli M. A. *Biomaterials* [J], 2005, **26**(19): 4189—4195

Preparation of Glycyrrhetic Acid-modified PEG-PLGA Nanoparticles and the Affinity Evaluation on Hepatoma Cells

HUANG Wei, WANG Ping, WANG Wei, ZHANG Yue, ZHANG Chuang-Nian, TIAN Qin,
WANG Xiu-Hua, LIU Yuan, YUAN Zhi^{*}

(Key Laboratory of Functional Polymer Materials, Ministry of Education, Institute of Polymer Chemistry,
Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract The glycyrrhetic acid-modified PEG-PLGA copolymer was fabricated and was formed into nanoparticles (NPs) via solvent evaporation method with *D*- α -tocopheryl poly(ethylene glycol) succinate (TPGS) as a stabilizer. The physicochemical properties of the present system were investigated by NMR, IR, DLS, ζ potential and TEM measurements. The cytotoxicity against hepatoma cells was studied based on MTT assay and the affinity between the cells and the NPs were preliminarily evaluated by fluorescence microscopy. The results show that the NPs are regularly spherical in shape with a hydrodynamic diameter around 128.2 nm, and the ζ potential of the NPs is about -16.2 mV. Besides, the NPs exhibit good stability against electrolyte solution. MTT result suggest that the NPs almost have no cytotoxicity on cells. Furthermore, the *in vitro* cell uptake result indicate that GA-modified NPs have a high affinity with hepatoma cells and can be a promising liver targeted material.

Keywords Glycyrrhetic acid; PEG-PLGA; *D*- α -tocopheryl poly(ethylene glycol) succinate (TPGS); Liver targeted material
(Ed: W, Z)