

Pluronic F127/聚乳酸纳米粒子的药物作用*★

李资玲¹, 黄优生², 熊向源¹, 龚妍春¹, 李玉萍¹

文章亮点: ①采用透析法制备 Pluronic F127/聚乳酸纳米粒子, 以粒度观测法比较纳米粒子在水及磷酸盐缓冲液中的稳定性。②实验考察了温度对纳米粒子稳定性的影响, 以高效液相色谱法证实包埋紫杉醇的 Pluronic F127/聚乳酸纳米粒子的体外释放行为。③试验以 MTT 法考察和说明了 Pluronic F127/聚乳酸共聚物的细胞毒性。

关键词: 聚乳酸; Pluronic F127; 纳米粒子; 药物载体; 细胞毒性; 紫杉醇; 体外释放; 生物相容性; 缓释药物; 嵌段共聚物

摘要

背景: 国内关于纳米粒子在水及磷酸盐缓冲液中稳定性的研究报道较少。

目的: 考察 Pluronic F127/聚乳酸纳米粒子在水及磷酸盐缓冲液中的稳定性及 Pluronic F127/聚乳酸聚合物作为药物载体的可行性。

方法: 采用透析法制备 Pluronic F127/聚乳酸纳米粒子, 通过高效液相色谱研究该纳米粒子作为药物载体包埋紫杉醇及体外释放行为, 同时采用 MTT 法考察该聚合物的细胞毒性。

结果与结论: Pluronic F127/聚乳酸纳米粒子在水中的稳定性优于磷酸盐缓冲液, 其次, 温度对于纳米粒子的稳定性影响较大, 无论是磷酸盐缓冲液还是水中, 37 °C 条件下粒径变化均较大, 因此纳米粒子在低温下稳定性较好。包埋紫杉醇的 Pluronic F127/聚乳酸纳米粒子的释放曲线在前 20 h 内呈现快速释放, 此后表现为缓慢释放, 约有 20% 的紫杉醇释放出来, MTT 测试结果表明 Pluronic F127/聚乳酸嵌段共聚物具有很好的生物相容性。综合以上结果表明, Pluronic F127/聚乳酸适合用作药物载体。

Pluronic F127/poly(lactic acid) nanoparticles as drug carriers

Li Zi-ling¹, Huang You-sheng², Xiong Xiang-yuan¹, Gong Yan-chun¹, Li Yu-ping¹

Abstract

BACKGROUND: Few reports about the stability of nanoparticles in the water and PBS have been published in China.

OBJECTIVE: To investigate the stability of pluronic/poly(lactic acid) nanoparticles in the water and PBS and feasibility of pluronic F127/poly(lactic acid) block polymer as drug carriers

METHODS: Pluronic poly(lactic acid) nanoparticles were prepared by a dialysis method. *In vitro* high performance liquid chromatography, and the cytotoxicity of pluronic F127/poly(lactic acid) block polymer was investigated by MTT.

RESULTS AND CONCLUSION: Pluronic /poly(lactic acid) nanoparticles had better stability in the water than in the PBS. In addition, pluronic /poly(lactic acid) nanoparticles were influenced greatly by the temperature, which had a good stability in low temperature. At 37 °C, pluronic/poly(lactic acid) nanoparticles had a greater change in the particle size. The release curve of paclitaxel-loaded pluronic F127/poly(lactic acid) nanoparticles showed a rapid release within 20 hours, and then presented with a slow release. Approximately 20% paclitaxel was released from the nanoparticles. MTT test results revealed that pluronic F127/poly(lactic acid) block polymer had a good biocompatibility. These findings indicate that pluronic/poly(lactic acid) nanoparticles can be used as drug carriers.

Li ZL, Huang YS, Xiong XY, Gong YC, Li YP. Pluronic F127/poly(lactic acid) nanoparticles as drug carriers. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(51): 9529-9532.

¹ 江西科技师范学院生命科学院, 江西省南昌市 330013; ² 江西省分析测试中心, 江西省南昌市 330029

李资玲★, 女, 1982年生, 江西省资溪县人, 汉族, 2006年南昌大学毕业, 硕士, 主要从事材料科学方面的研究。
lzlowen2010@gmail.com

通讯作者: 熊向源, 博士, 教授, 江西科技师范学院生命科学院, 江西省南昌市 330013
xyxiong@gmail.com

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344
(2012)51-09529-04

收稿日期: 2012-08-26
修回日期: 2012-10-20
(20111126005/D - W)

¹School of Life Science, Jiangxi Technology Normal University, Nanchang 330013, Jiangxi Province, China; ²Analytical and Testing Center of Jiangxi Province, Nanchang 330029, Jiangxi Province, China

Li Zi-ling★, Master, School of Life Science, Jiangxi Technology Normal University, Nanchang 330013, Jiangxi Province, China lzlowen2010@gmail.com

Corresponding author: Xiong Xiang-yuan, Doctor, Professor, School of Life Science, Jiangxi Technology Normal University, Nanchang 330013, Jiangxi Province, China xyxiong@gmail.com

Supported by: the Scientific Research Program of Jiangxi Provincial Education Bureau, No. GJJ10594*

Received: 2012-08-26
Accepted: 2012-10-20

0 引言

聚乳酸是生物可降解及生物相容性聚酯, 聚乳酸嵌段共聚物是新型合成聚合材料之一, 美国食品药品监督管理局(FDA)已批准其在食品添加剂及药物当中的应用^[1-5]。生物相容两亲性聚合物能在水中自聚集形成不同形态的纳米粒子, 在药物控制释放体系中的应用越来越广^[6-9]。纳米粒子分散到液体介质得到粒度小而均匀、稳定的分散体系, 但纳米粒子在液体介质中仍具有团聚倾向。因此了解纳米粒子在液体介质中的分散稳定性很有必要^[10]。

实验采用透析法制备Pluronic F127/聚乳酸纳米粒子, 通过粒度观测法比较了纳米粒子在水及磷酸盐缓冲液中的稳定性, 并考察了温度对纳米粒子稳定性的影响, 通过高效液相色谱法研究包埋紫杉醇的Pluronic F127/聚乳酸纳米粒子的体外释放行为。此外, 通过MTT法考察Pluronic F127/聚乳酸共聚物的细胞毒性。

1 材料和方法

设计: 细胞毒性体外观察。

时间及地点: 于2010年12月至2011年5月在生命科学医药材料实验室完成。

材料: Pluronic F127/聚乳酸在本实验室合成; 其余试剂均为分析纯。四甲基偶氮唑盐购于Solarbio公司; 人卵巢癌细胞OVCAR-3由中国医学科学院肿瘤医院提供; NICOMP 380/ZL S纳米粒度分析仪为美国PSS公司生产。

方法:

Pluronic F127/聚乳酸的合成: 在Pluronic F127两端接上聚乳酸链以制备Pluronic F127/聚乳酸嵌段共聚物。具体合成方法为: 在氩气条件下, 往圆底烧瓶中加入一定量的丙交酯和F127, 加热使这两种物质熔融混合均匀; 然后加入少量的催化剂辛酸亚锡, 并进行抽真空-通氩气的多次循环, 以除去烧瓶中的氧气; 在此步骤后, 将反应物加热至160℃, 搅拌反应15 h; 然后, 将反应物冷却至室温, 并加入二氯甲烷, 接着将此溶液沉入甲醇中, 有白色物质沉出, 过滤; 然后

再用二氯甲烷溶解聚合物, 并沉入乙醚中, 过滤, 干燥, 最终得到Pluronic F127/聚乳酸嵌段共聚物。

Pluronic F127/聚乳酸纳米粒子的制备: 取一定量的Pluronic F127/聚乳酸用少量的四氢呋喃溶解, 再将此溶液缓慢滴加至超纯水中, 接着将其装入截留相对分子质量为12 000-14 000的透析袋中透析, 得到Pluronic F127/聚乳酸纳米粒子。

纳米粒子在水中的稳定性: 采用纳米粒子配制方法配制Pluronic F127/聚乳酸纳米粒子水溶液3份, 分别放置于4℃、25℃、37℃环境中, 并分别间隔2 h, 6 h, 10 h, 24 h, 48 h, 4 d, 8 d, 15 d, 30 d测定纳米粒子大小。

纳米粒子在磷酸盐缓冲液中的稳定性: 采用纳米粒子配制方法配制Pluronic F127/聚乳酸纳米粒子, 采用磷酸盐缓冲液进行最后一次透析, 分别放置于4℃、25℃、37℃环境中, 并分别间隔2 h, 6 h, 10 h, 24 h, 48 h, 4 d, 8 d, 15 d, 30 d测定纳米粒子大小。

包埋紫杉醇Pluronic F127/聚乳酸纳米粒子的制备与体外释放: 称取一定量Pluronic F127/聚乳酸和紫杉醇用少量的四氢呋喃溶解, 再将此溶液缓慢滴加至超纯水中, 装入透析袋中透析24 h, 即得到包埋紫杉醇Pluronic F127/聚乳酸纳米粒子溶液。

取适量该溶液装入透析袋中, 置于500 mL广口瓶中, 瓶中放入10倍体积的磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4), 于37℃恒温振荡仪中进行释放, 在指定时间内取袋外透析液, 同时加入磷酸盐缓冲液进行置换以保持袋外释放液的体积。用高效液相色谱测定释放的紫杉醇浓度, 色谱条件: 流动相(乙腈:磷酸盐缓冲液=50:50), 流速1.0 mL/min, 检测波长227 nm, 柱温30℃。

细胞毒性研究: 以MTT法考察Pluronic F127/聚乳酸纳米粒子的生物相容性。OVCAR-3细胞用含2.0 mmol/L谷氨酰胺、体积分数10%小牛血清、100 U/mL青霉素和100 U/mL链霉素的DMEM培养基于37℃, 体积分数5%恒温CO₂培养箱中培养。

取对数生长的细胞分别接种于3块96孔培养板中, 每孔细胞悬液(2.5×10⁵ L⁻¹)200 μL, 培养8 h后, 再分别用200 μL质量百分比为1×10⁻⁷

至0.01%的Pluronic F127/聚乳酸纳米粒子溶液取代培养基进行再培养, 经过4, 12, 24 h的培养后, 加入10 μ L MTT溶液(5 g/L), 置培养箱反应4 h, 吸弃孔内培养上清液后, 每孔加入150 μ L DMSO, 振荡10 min, 用酶标仪测定492 nm处的吸光度值。

细胞存活率的计算方法如下:

$$\text{存活率}(\%) = \frac{\text{试验组吸光度值}}{\text{对照组吸光度值}} \times 100\%$$

试验组吸光度值和对照组吸光度值分别是用纳米粒子处理和未用纳米粒子处理存活细胞的吸光度值。

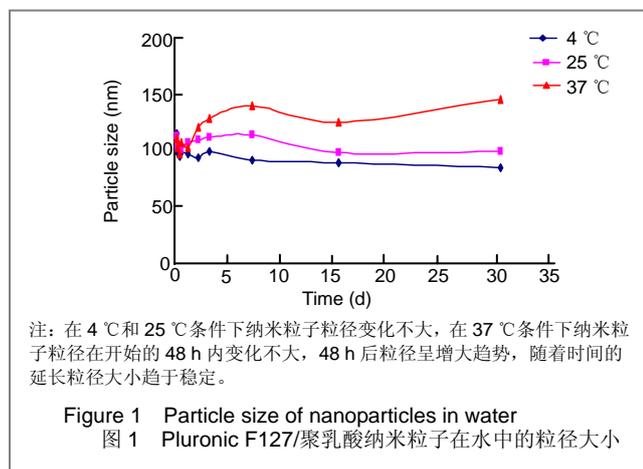
主要观察指标: 通过测定细胞存活率观察Pluronic F127/聚乳酸纳米粒子对OVCAR-3细胞的毒性。

统计学分析: 第一作者采用Excel 2003软件对数据进行处理。

2 结果

2.1 Pluronic F127/聚乳酸的合成 实验室所合成Pluronic F127/聚乳酸共聚物的相对分子质量(M_n)为33 000, 分子质量分布(M_w/M_n)为1.2。

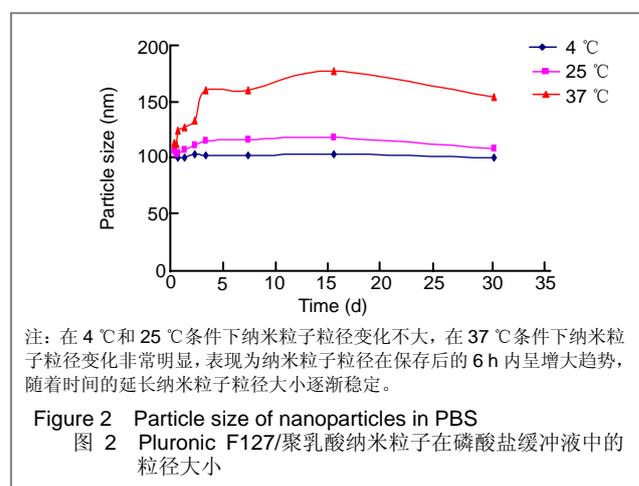
2.2 纳米粒子在水中的稳定性 纳米粒子在水中的粒径大小结果, 见图1。



从图1可以看出, 在4 °C和25 °C条件下纳米粒子的粒径变化不大, 在37 °C条件下纳米粒子粒径在开始的48 h内变化不大, 48 h后粒径呈增大趋势, 随着时间的延长粒径大小趋于稳定, 通过观察纳米粒子水溶液的外观发现, 在4 °C和25 °C条件下保存的纳米粒子水溶液呈乳化状, 无沉淀析出, 在37 °C条件下保存的纳米粒子水溶液在保存15 d后, 有肉眼可见的沉淀析出, 因此可看出, 纳米粒子水溶液在4 °C和25 °C条件下稳定性较好, 能维持纳米粒子的稳定性, 在37 °C条件下保存效

果不佳, 分析其原因可能是因为纳米粒子在37 °C条件下发生降解, 导致纳米粒子的重新聚集。

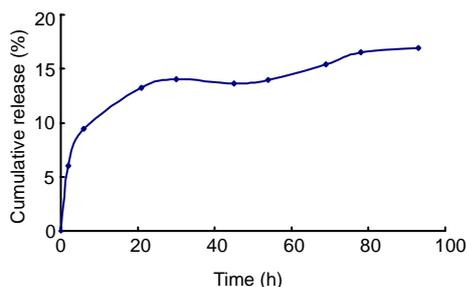
2.3 纳米粒子在磷酸盐缓冲液中的稳定性 在4 °C和25 °C条件下纳米粒子粒径变化不大, 在37 °C条件下纳米粒子粒径变化非常明显, 表现为纳米粒子粒径在保存后的6 h内呈增大趋势, 随着时间的延长逐渐稳定, 通过观察纳米粒子溶液的外观发现, 在4 °C和25 °C条件下保存的纳米粒子溶液呈乳化状, 无沉淀析出, 在37 °C条件下保存的纳米粒子磷酸盐缓冲液中保存3 d后, 有肉眼可见的沉淀析出, 因此可看出, 在磷酸盐缓冲液中, 纳米粒子在4 °C和25 °C条件下稳定性较好, 在37 °C条件下稳定性较差。纳米粒子在磷酸盐缓冲液中的粒径大小结果, 见图2。



综合比较纳米粒子在水和磷酸盐缓冲液环境中的粒径变化发现, 温度对于纳米粒子粒径的影响较大, 无论是在水还是在磷酸盐缓冲液中, 低温对于纳米粒子粒径的稳定性较好, 在37 °C条件下均易发生降解并重新聚集的情况^[6]。

2.4 包埋紫杉醇Pluronic F127/聚乳酸纳米粒子的制备与体外释放 紫杉醇在前20 h呈现快速释放, 接着在长达4 d的时间内呈现缓慢释放, 且只有约20%的紫杉醇释放出来, 这可能与紫杉醇在疏水核内形成聚集体有关。Pluronic F127/聚乳酸纳米粒子中紫杉醇的包封率和载药量54%和7.2%。包埋紫杉醇Pluronic F127/聚乳酸纳米粒子的体外释放曲线, 见图3。

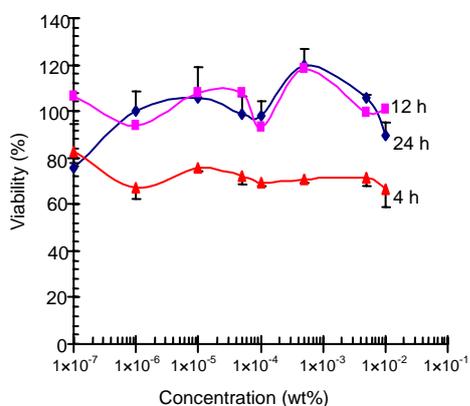
2.5 细胞毒性测定结果 以MTT法考察Pluronic F127/聚乳酸纳米粒子的细胞毒性, 不同培养时间下的细胞存活率与纳米粒子浓度的关系, 见图4。结果表明, 经24 h培养后, 细胞存活率约89%。聚乳酸与聚乳酸本身具有很好的生物相容性, 因此, 合成的Pluronic F127/聚乳酸嵌段共聚物也具有非常好的生物相容性。



注: 紫杉醇在前 20 h 呈现快速释放, 接着在长达 4 d 的时间内呈现缓慢释放, 且只有约 20% 的紫杉醇释放出来, 这可能与紫杉醇在疏水核内形成聚集有关。

Figure 3 The release behaviors of paclitaxel-loaded PLGA-F127-PLA nanoparticles

图 3 包埋紫杉醇的 Pluronic F127/聚乳酸纳米粒子的释放曲线



注: 经 24 h 培养后, 细胞存活率约 89%, 合成的 Pluronic F127/聚乳酸嵌段共聚物也具有非常好的生物相容性。

Figure 4 Cytotoxicity of PLGA-F127-PLA nanoparticles in OVCAR-3 cell lines

图 4 Pluronic F127/聚乳酸纳米粒子处理 OVCAR-3 的细胞毒性

3 讨论

通过对比纳米粒子在水和磷酸盐缓冲液中的稳定性发现, 首先, Pluronic F127/聚乳酸纳米粒子在水中的稳定性优于磷酸盐缓冲液, 其次, 温度对于纳米粒子的稳定性影响较大, 无论是磷酸盐缓冲液还是水中, 37 °C 条件下粒径变化均较大, 因此纳米粒子在低温下稳定性较好。包埋紫杉醇的 Pluronic F127/聚乳酸纳米粒子的释放曲线在前 20 h 内呈现快速释放, 此后表现为缓慢释放, 约有 20% 的紫杉醇释放出来, MTT 测试结果表明 Pluronic F127/聚乳酸嵌段共聚物具有很好的生物相容性。综合以上结果表明, Pluronic F127/聚乳酸适合用作药物载体。

4 参考文献

[1] Otsuka H, Nagasaki Y, Kataoka K. PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003;55(3):403-419.

[2] Xiong XY, Li YP, Li ZL, et al. Vesicles from Pluronic/poly(lactic acid) block copolymers as new carriers for oral insulin delivery. *J Control Release.* 2007;120(1-2):11-17.

[3] Xiong XY, Tam KC, Gan LH. Polymeric nanostructures for drug delivery applications based on Pluronic copolymer systems. *J Nanosci Nanotechnol.* 2006;6(9-10):2638-2650.

[4] Wei Z, Hao J, Yuan S, et al. Paclitaxel-loaded Pluronic P123/F127 mixed polymeric micelles: formulation, optimization and in vitro characterization. *Int J Pharm.* 2009;376(1-2):176-185.

[5] Gaucher G, Satturwar P, Jones MC, et al. Polymeric micelles for oral drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 2010;76(2):147-158.

[6] Zhao LJ, Liu DH, Liu ZH, et al. *Zhongguo Shenghua Yaowu Zazhi.* 2011;32(2):107-111.

赵丽娟,刘东华,刘志红,等.多西他赛 Pluronic F127 聚合物胶束的制备与表征[J].*中国生化药物杂志*,2011,32(2):107-111.

[7] Zhang CB, Cao F, Xiao YY, et al. *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao.* 2011;42(2):119-123.

张传宝,操锋,肖衍宇,等.Pluronic F127 胶束的载药、固化及其片剂的溶出度[J].*中国药科大学学报*,2011,42(2):119-123.

[8] Lee MY, Wong MK, Tang FT, et al. Design and assessment of an adaptive intermittent cervical traction modality with EMG biofeedback. *J Biomech Eng.* 1996;118(4):597-600.

[9] Patil Y, Sadhukha T, Ma L, Panyam J. Anoparticle-mediated simultaneous and targeted delivery of paclitaxel and tariquidar overcomes tumor drug resistance. *J Control Release.* 2009;136(1):21-29.

[10] Zhou XY, Li WH, He L. *Cailiao Baohu.* 2006;39(6):51-55.

周细应,李卫红,何亮.纳米颗粒的分散稳定性及其评估方法[J].*材料保护*,2006,39(6):51-55.

[11] Xiong XY, Tam KC, Gan LH. Release kinetics of hydrophobic and hydrophilic model drugs from pluronic F127/poly(lactic acid) nanoparticles. *J Control Release.* 2005;103(1):73-82.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 江西省教育厅科学技术研究项目 (GJJ10594)。

作者贡献: 实验设计为李资玲、熊向源, 实验实施为李资玲、黄优生、龚妍春, 实验评估为熊向源、李玉萍、资料收集为熊向源。李资玲成文, 熊向源审校, 李资玲对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验没有与相关伦理道德冲突的内容。

本文创新性: 本文关于纳米粒子在水及磷酸盐缓冲液中的稳定性研究结果可为纳米粒子的保存提供理论依据, 且国内关于此研究较少。此外, Pluronic F127/聚乳酸可作为新型的药物载体应用于药物释放体系。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。