

## PEG 修饰的大黄酸偶联物的合成及紫杉醇纳米胶束的制备

王夏英, 邱梁桢, 李青卓, 徐伟, 王晓颖\*

(福建中医药大学, 福州 350122)

**摘要** 抗肿瘤药物紫杉醇 (PTX) 在水中的溶解度低, 其临床制剂 Taxol<sup>®</sup> 所使用的增溶剂 Cremophor EL 毒副作用大, 影响其临床治疗效果。本研究设计 PEG 修饰羧甲基壳聚糖并接枝大黄酸, 合成了两亲性 mPEG-羧甲基壳聚糖-大黄酸 (CRmP) 偶联物, 作为 PTX 的递送载体材料, 并制备了载 PTX 的 CRmP 纳米胶束 (PTX/CRmP 纳米胶束)。利用红外光谱 (FT-IR) 和核磁共振氢谱 (<sup>1</sup>H NMR) 对 CRmP 偶联物进行结构表征。通过动态激光粒径仪 (DLS) 和原子力显微镜 (AFM) 对 PTX/CRmP 纳米胶束的粒径与形态进行表征。通过 MTT 法评估 CRmP 偶联物和 PTX/CRmP 纳米胶束对 MCF-7 细胞的细胞毒性, 结果显示, CRmP 偶联物具有良好的安全性; 随给药时间的延长, PTX/CRmP 纳米胶束在相同药物浓度下表现出优于 Taxol<sup>®</sup> 的体外抗肿瘤活性。

**关键词** 紫杉醇; 羧甲基壳聚糖; 聚乙二醇; 大黄酸; 聚合物胶束; 抗肿瘤; 表征

**中图分类号** R944 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2018)05-0596-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20180512

**引用本文** 王夏英, 邱梁桢, 李青卓, 等. PEG 修饰的大黄酸偶联物的合成及紫杉醇纳米胶束的制备[J]. 中国药科大学学报, 2018, 49(5): 596–602.

**Cite this article as:** WANG Xiaying, QIU Liangzhen, LI Qingzhuo, et al. Synthesis of PEGylated carboxymethyl chitosan-rhein conjugate and preparation of paclitaxel-loaded polymeric micelles[J]. *J China Pharm Univ*, 2018, 49(5): 596–602.

## Synthesis of PEGylated carboxymethyl chitosan-rhein conjugate and preparation of paclitaxel-loaded polymeric micelles

WANG Xiaying, QIU Liangzhen, LI Qingzhuo, XU Wei, WANG Xiaoying\*

Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

**Abstract** Paclitaxel (PTX), an effective anti-tumor drugs, is water-insoluble. And Cremophor as a solubilizer in its commercial formulation, Taxol<sup>®</sup>, often causes side-effects which limit its antitumor effect. We designed and synthesized PEGylated carboxymethyl chitosan-rhein (CRmP) conjugate, and further prepared PTX-loaded CRmP polymeric micelles (PTX/CRmP). CRmP conjugate was characterized by fourier transform infrared spectrum (FT-IR) and nuclear magnetic resonance spectroscopy (<sup>1</sup>H NMR). The particle size and surface morphology of PTX/CRmP were characterized by dynamic laser particle size analyzer (DLS) and atomic force microscope (AFM), respectively. The cytotoxicity of CRmP conjugate and PTX/CRmP against MCF-7 cells were evaluated by MTT assay. The results showed that CRmP conjugates displayed very low cytotoxicity and that PTX/CRmP exhibited better *in vitro* anti-tumor activity than Taxol<sup>®</sup> at the same drug concentration after a long-term administration.

**Key words** paclitaxel; carboxymethyl chitosan; PEG; rhein; polymer micelles; anti-tumor; characterization

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81603301); the Project Program of Fujian Provincial Department of Science and Technology (No. 2015Y0064); the Personnel Training Fund of Fujian Provincial Department of Public Health (2016-ZQN-69), and Program for New Century Excellent Talents in Universities in Fujian Province ([2016] No. 23)

**收稿日期** 2018-08-15 \*通信作者 Tel: 0591-22861135 E-mail: wangxy623@yeah.net

**基金项目** 国家自然科学基金资助项目 (No. 81603301); 福建省科技厅资助项目 (No. 2015Y0064); 福建省卫计委中青年骨干人才培养资助项目 (No. 2016-ZQN-69); 福建省高校新世纪优秀人才支持计划资助项目 (闽教科[2016] No. 23)

聚合物胶束作为一种纳米药物载体,近年来受到广泛的关注。聚合物胶束的疏水内核可作为疏水性药物的存储空间,将难溶性药物包载于其中;其亲水性外壳能提高胶束在水溶液中的稳定性,并能保护胶束,避免其在体内被网状内皮系统识别而被快速清除<sup>[1-3]</sup>。聚合物胶束粒径较小,能通过增强渗透滞留效应(EPR)提高抗肿瘤药物向肿瘤部位递送的效果<sup>[4-5]</sup>。

羧甲基壳聚糖(carboxymethyl chitosan, CMCS)为壳聚糖水溶性衍生物,具有良好的生物相容性,生物活性,抗菌活性及稳定性。CMCS上具有多种官能团,例如-NH<sub>2</sub>和-COOH,具有良好的可修饰性。因此,CMCS作为药物载体被广泛应用于医药领域<sup>[6-7]</sup>。大黄酸(rhein, R)为中药大黄的主要成分之一,具有抗炎、抗肿瘤细胞增殖、抗肿瘤血管生成等作用<sup>[8-9]</sup>,并与抗肿瘤药物紫杉醇(paclitaxel, PTX)具有协同抗肿瘤作用<sup>[10]</sup>。

聚乙二醇(PEG)由重复的氧乙烯基组成,其具有高度的亲水性。研究人员于上世纪70年代首次提出将PEG用于药物的修饰<sup>[11]</sup>。经PEG化的药物能增加水溶性,降低酶降解和肾小球滤过率,下调免疫原性或抗原性,保护其免遭体内环境破坏<sup>[12-15]</sup>。目前,许多PEG化的化疗制剂已被FDA批准上市<sup>[16-18]</sup>。

本研究以PEG修饰的羧甲基壳聚糖为骨架,接枝小分子大黄酸合成两亲性mPEG-羧甲基壳聚糖-大黄酸偶联物(CRmP偶联物)作为药物递送载体材料,并制备了载抗肿瘤药物PTX的CRmP纳米胶束(PTX/CRmP纳米胶束),该胶束能增加PTX的水溶性,并提高PTX抗肿瘤的效果。

## 1 材料

### 1.1 试剂

O-羧甲基壳聚糖(相对分子质量 $1 \times 10^5$ ,青岛弘海生物技术有限公司);大黄酸(陕西澳源生物技术有限公司,纯度 $\geq 98\%$ );紫杉醇(上海中西三维药业有限公司);透析袋(MWCO14000,上海绿鸟科技发展有限公司);N-羟基琥珀酰亚胺(NHS,纯度 $\geq 98\%$ );1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl,纯度 $\geq 98\%$ )(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);羧基化聚乙二醇单甲醚(mPEG-COOH,相对分子质量

2 000,纯度 $\geq 98\%$ ,上海金穗生物科技有限公司);RPMI Medium Modified,磷酸盐缓冲液( $1 \times$ ),0.25%胰蛋白酶( $1 \times$ ),青霉素链霉素溶液(美国HyClone公司)。

### 1.2 仪器

MS105DU十万分之一电子天平[特勒-托利多仪器(上海)有限公司];JY92-2D超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);Alpha1-2 LD冷冻干燥机(德国Christ公司);NICOMPTM380ZLS激光粒径测定仪(美国Santa Bbarbara公司);Avance III 500核磁共振波谱仪(瑞士Bruker公司);原子力显微镜5500(美国Agilent公司);Nicolet iS50傅里叶变换红外光谱仪(美国Thermo Fisher公司);Infinite M200 PRO多功能酶标仪(瑞士Tecan公司)。

## 2 方法

### 2.1 PEG修饰的羧甲基壳聚糖-大黄酸(CRmP)偶联物的合成

称取适量的CMCS置反应瓶中,加入蒸馏水10 mL溶胀30 min。取反应量的大黄酸置广口瓶中,加入1%NaHCO<sub>3</sub>溶液10 mL,加热使溶解,冷却至室温。取反应量的mPEG-COOH粉末置广口瓶中,加入蒸馏水5 mL溶解。将mPEG-COOH溶液加入到已冷却至室温的大黄酸溶液中,加入EDC·HCl,活化20 min,再加入NHS,将此混合液搅拌下加入CMCS溶液中,避光搅拌24 h。反应结束后,用丙酮沉淀反应物,静置后抽滤(0.45 μm的滤膜)。将抽干后的反应产物溶解于水中,冰水浴条件下探头超声至澄清后过0.8 μm的滤膜,滤液转置于透析袋中透析3 d。

透析结束后,将产物水溶液再次在冰水浴条件下探头超声20 min后,取上清液过膜(0.8 μm),滤液-20℃冰箱预冻,冷冻干燥,即得CRmP偶联物。

### 2.2 CRmP偶联物的结构表征

2.2.1 红外光谱(FT-IR)表征 采用溴化钾(KBr)压片法。取适量CMCS、大黄酸、mPEG-COOH、CRmP偶联物,分别加适量KBr,于红外灯下研磨混合,压片,进行红外检测,记录FT-IR光谱。

2.2.2 核磁共振氢谱(<sup>1</sup>H NMR)表征 分别称取CMCS、mPEG-COOH和CRmP偶联物各10 mg,

CMCS、mPEG-COOH 以  $D_2O$  为溶剂, CRmP 偶联物以  $D_2O$ -DMSO<sub>d6</sub>, 1:1 比例为溶剂, 溶解后加入核磁管中, 四甲基硅烷为内标, 采用核磁共振仪测定样品的  $^1H$  NMR。

### 2.3 取代度的测定

2.3.1 大黄酸取代度的测定 CRmP 偶联物上大黄酸的取代度采用紫外分光光度法测定。精密称取大黄酸对照品适量, 以甲醇为溶剂配制系列浓度, 于 229 nm 波长处检测, 绘制大黄酸的标准曲线。将供试品溶液所测的吸收度, 代入标准曲线中, 得到大黄酸的浓度, 根据公式(1)计算大黄酸在 CRmP 偶联物上的取代度( $DS_R$ ):

$$DS_R(g/g) = \frac{m_R}{m_{CRmP}} \quad (1)$$

式中,  $m_R$  为大黄酸接枝在 CRmP 偶联物上的量(g);  $m_{CRmP}$  为测定时所称取的 CRmP 偶联物的量(g)。

2.3.2 mPEG-COOH 取代度的测定 mPEG-COOH 取代度通过  $^1H$  NMR 谱计算而得。CRmP 偶联物完成  $^1H$  NMR 谱图分析后, 根据特征峰面积的比值计算得到 mPEG-COOH 的取代度。

### 2.4 PTX/CRmP 纳米胶束的制备

称取 CRmP 偶联物 18 mg, 加蒸馏水适量, 室温下搅拌溶解后冰水浴探头超声 10 min, 将 PTX 溶于无水乙醇中, 然后逐滴加至 CRmP 纳米胶束溶液中, 剧烈搅拌 20 min, 冰水浴探头超声 30 min, 透析 24 h 后, 冰水浴探头超声 20 min 后用 0.8  $\mu m$  滤膜滤过, 即得 PTX/CRmP 纳米胶束溶液, 冻干后得 PTX/CRmP 纳米胶束冻干粉末。

### 2.5 PTX/CRmP 纳米胶束载药量和包封率的测定

2.5.1 色谱条件的建立 色谱柱为 Inertsil ODS-SP(4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu m$ ), 流动相为甲醇-水(69:31), 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 30  $^{\circ}C$ , 检测波长为 227 nm, 进样量为 20  $\mu L$ 。

2.5.2 标准曲线的制备 取 PTX 3 mg, 精密称定, 置 10 mL 的量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得质量浓度为 307  $\mu g/mL$  的储备液。取此储备液, 以甲醇为溶剂, 逐步稀释配制质量浓度分别为 92.1, 61.4, 30.7, 24.56, 15.35, 2.456, 1.535  $\mu g/mL$  的 PTX 溶液, 按“2.5.1”项下色谱条件测定, 记录峰面积, 绘制标准曲线,

2.5.3 测定方法 精密称定适量的 PTX/CRmP

纳米胶束冻干粉末, 加水溶解, 0.8  $\mu m$  滤膜滤过。取适量的滤过液置 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 破坏胶束结构, 使得 PTX 从胶束中游离出来溶解在甲醇溶液中, 用 0.22  $\mu m$  滤膜滤过, 取续滤液按“2.5.1”项下色谱条件测定, 记录峰面积, 计算 PTX 含量, 并计算该纳米胶束的包封率(EE)和载药量(DL)。

### 2.6 PTX/CRmP 纳米胶束的表征

2.6.1 PTX/CRmP 纳米胶束的粒径分布与电位 称取适量 PTX/CRmP 纳米胶束冻干粉末, 冰浴探头超声溶解, 过 0.8  $\mu m$  滤膜, 制备得到 PTX/CRmP 纳米胶束溶液, 用动态激光粒径仪(DLS)测定胶束粒径分布及 Zeta 电位。

### 2.6.2 PTX/CRmP 纳米胶束的形态学分析

PTX/CRmP 纳米胶束的形貌研究采用原子力显微镜(atomic force microscopy, AFM)观察。新剥离的云母片预先用双面胶贴在金属基片上, 吸取载药 PTX/CRmP 纳米胶束溶液适量, 滴加到云母表面上, 用氮吹仪使其干燥完全。待云母片上的溶液干燥形成薄膜后, 将云母片置 AFM 中进行观察进行扫描观察, 显微镜探头采用轻敲模式(tapping mode)探测胶束形貌。

### 2.7 PTX/CRmP 纳米胶束的体外细胞毒性

PTX/CRmP 纳米胶束的体外细胞毒性通过 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)法评价。

2.7.1 细胞培养 将 MCF-7 细胞(ATCC)加入含有 10% FBS、1% 青链霉素的 RPMI-1640 培养液, 置于 37  $^{\circ}C$ , 5%  $CO_2$  培养箱中, 隔天换液。当细胞贴壁达到约为 80%~90%, 细胞单层贴壁生长时即可进行传代培养。

2.7.2 细胞种板 取对数生长期的细胞, 按常规方法消化细胞制备单细胞混悬液, 将细胞混悬液以 1200 r/min 离心 3 min, 弃除上清液, 加入新鲜的 RPMI-1640 完全培养液, 调整浓度为每毫升  $5 \times 10^4$  个细胞的悬浮液, 接种于 96 孔板中, 每个孔加入细胞悬浮液 100  $\mu L$ , 培养箱中孵育 24 h 使其贴壁。

2.7.3 细胞毒性试验 待细胞孵育 24 h 后, 吸弃培养液。设置不同分组, 包括 Taxol<sup>®</sup>组、Cremophor EL: 无水乙醇混合溶剂(1:1)组、CRmP 偶联物组、PTX/CRmP 纳米胶束组、空白组和对照组。将上

述各组受试液向96孔板中各加入150  $\mu\text{L}$ ,分别含PTX浓度为1 000, 500, 100, 50, 10, 5, 1 nmol/L 6种不同浓度的培养液,每个浓度平行6个孔,以不含细胞的培养基和MTT溶液为空白组,含细胞不给药物的细胞为正常组,37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中孵育。分别于加药后24, 48, 72 h,将培养板取出,每孔加入0.5 mg/mL MTT溶液100  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中继续孵育4 h后取出,小心吸取上清液。每孔加入DMSO 150  $\mu\text{L}$  溶解蓝紫色结晶物。用酶标仪在570 nm处测定吸收度。并根据各孔的吸收度计算细胞的存活率。

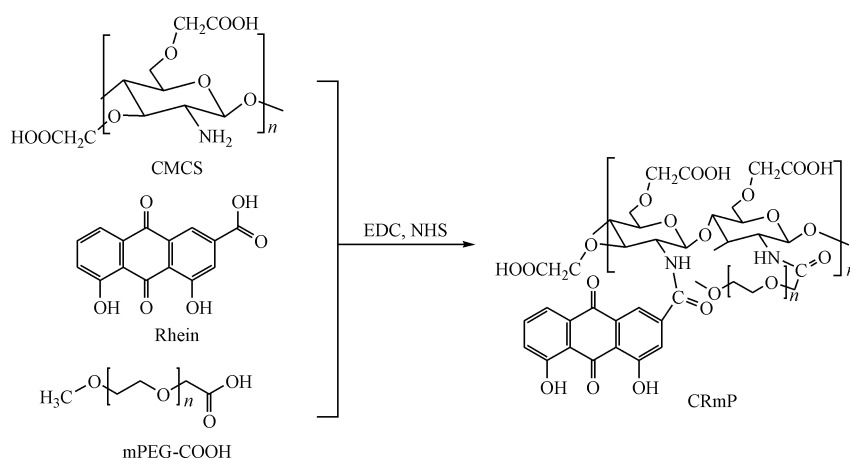


Figure 1 Synthesis of CRmP conjugate

CMCS; Carboxymethyl chitosan; CRmP; PEGylated carboxymethyl chitosan-rhein

### 3.2 FT-IR 图谱解析

图2-d为mPEG-COOH的FT-IR谱图,可以观察到3 455  $\text{cm}^{-1}$ 处的-OH的伸缩振动峰,2 889  $\text{cm}^{-1}$ 处的-C-H的伸缩振动峰,1 742  $\text{cm}^{-1}$ 处的C=O的伸缩振动峰,以及1 115  $\text{cm}^{-1}$ 处的-C-O-C-键的伸缩振动峰。图2-c为大黄酸的FT-IR谱图。3 061  $\text{cm}^{-1}$ , 1 693  $\text{cm}^{-1}$ 为-COOH的振动峰。图2-b为CMCS的FT-IR谱图,3 423  $\text{cm}^{-1}$ 处是-NH和-OH的伸缩振动峰,2 922  $\text{cm}^{-1}$ 处吸收峰为-CH的伸缩振动峰,1 594  $\text{cm}^{-1}$ 处为羧基上的-C=O伸缩振动吸收峰,1 410  $\text{cm}^{-1}$ 处峰为-OH和-CH的环变形振动吸收峰,1 067  $\text{cm}^{-1}$ 处峰为-C-O伸缩振动吸收峰。图2-a为CRmP偶联物的FT-IR谱图,与CMCS谱图相比,3 455  $\text{cm}^{-1}$ 处-NH和-OH的伸缩振动吸收峰变窄,这是由于CMCS主链上的氨基接枝mPEG-COOH和大黄酸的影响结果,2 881  $\text{cm}^{-1}$ 处为mPEG-COOH的重复单元(-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-)中

## 3 结果

### 3.1 CRmP 偶联物的合成

CMCS分子链上有丰富的氨基,大黄酸、mPEG-COOH结构上含有羧基。因此,本反应以活性较高的酰胺反应为基础,在EDC和NHS的催化下,同时活化大黄酸和mPEG-COOH的羧基,使其与CMCS的氨基发生酰胺反应,将大黄酸、mPEG-COOH接枝到CMCS上形成CRmP偶联物。该合成工艺(见图1)简单,反应条件温和,产率较高,操作简便易于重复。

的-C-H的伸缩振动峰,此处的伸缩振动峰变强,表明接上mPEG-COOH后引入更多的碳氢键,1 208  $\text{cm}^{-1}$ 处-C-O-C-键的伸缩振动峰,这些是mPEG主结构的特征吸收峰;与mPEG-COOH红外吸收峰相比较,结合物在1 742  $\text{cm}^{-1}$ 处羧基的伸缩振动峰消失。1 629  $\text{cm}^{-1}$ 、1 569  $\text{cm}^{-1}$ 处出现酰胺键I, II谱带,说明mPEG-COOH、大黄酸上的羧基转变成成为酰胺键上的羧基。

### 3.3 $^1\text{H}$ NMR 图谱解析

mPEG-COOH、大黄酸、CMCS和CRmP偶联物的 $^1\text{H}$  NMR图谱如图3所示。图3-c为CMCS的 $^1\text{H}$  NMR图谱, $\delta$  4.7为溶剂( $\text{D}_2\text{O}$ )峰, $\delta$  2.00壳聚糖上脱乙酰度不完全的乙酰氨基(-NHCOH<sub>3</sub>)的质子峰, $\delta$  3.55~3.85是壳聚糖糖环上的质子峰(H-3, H-4, H-5, H-6),  $\delta$  3.03为CMCS糖环上C2-H质子峰。图3-a为mPEG-COOH核磁氢谱图, $\delta$  4.68为溶剂( $\text{D}_2\text{O}$ )峰, $\delta$  3.34为mPEG-COOH末端甲氧

基(-OCH<sub>3</sub>)质子峰,  $\delta$  3.5 ~ 3.7 为 mPEG-COOH 重复单元(-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-)。与图 3-a、c 相比较, 图 3-d CRmP 偶联物<sup>1</sup>H NMR 图中  $\delta$  3.47 ~ 3.87 处出现了将强的峰, 此为 mPEG-COOH 上的重复单元-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> 的质子峰, 此外在  $\delta$  3.34 出现了 mPEG-COOH 甲氧基-OCH<sub>3</sub> 质子峰, 除了 mPEG-COOH 峰外, 在  $\delta$  8.12、7.84、7.75、7.73、7.41 (图 3 中放大部分) 处出现了大黄酸结构上(-CH, -OH)的质子信号峰, 此为大黄酸的特征信号峰, 由此推断 CRmP 偶联物已成功合成。

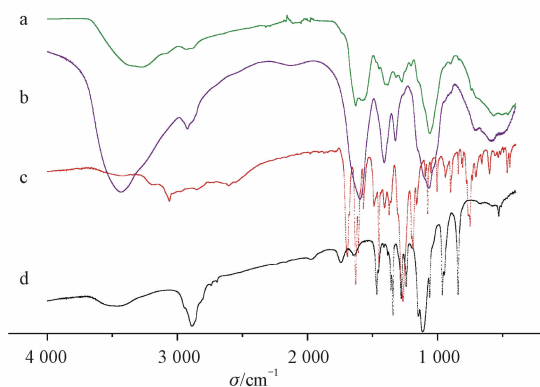


Figure 2 FT-IR spectra of CRmP conjugate (a), CMCS (b), rhein (c), mPEG-COOH (d)

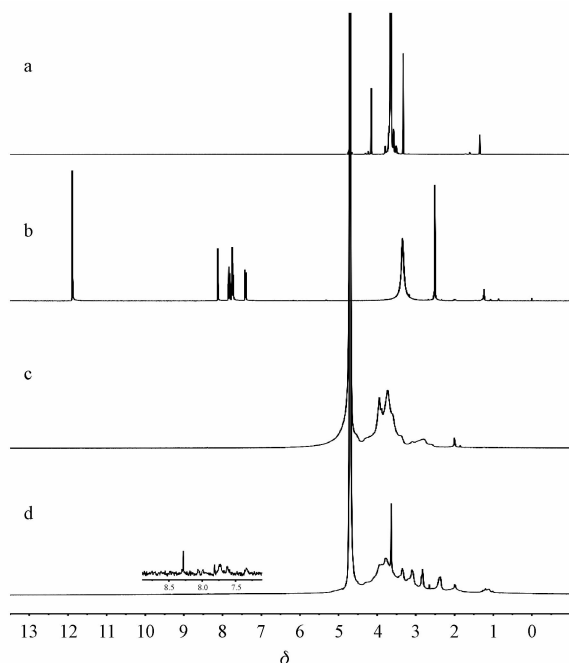


Figure 3 <sup>1</sup>H NMR spectra of mPEG-COOH (a), CMCS (b), rhein (c), and CRmP conjugate (d) in D<sub>2</sub>O/DMSO co-solvent (1:1)

### 3.4 取代度分析

通过紫外分光光度法测得大黄酸的取代度为

7.6%。从 CRmP 的<sup>1</sup>H NMR 谱图中可以看出,  $\delta$  3.03 处 CMCS 糖环上 C2-H 的质子峰与  $\delta$  3.34 处 mPEG-COOH 末端甲氧基(-OCH<sub>3</sub>)的质子峰易于分辨, 故采用  $\delta$  3.03 与  $\delta$  3.34 的峰面积的比值计算得到 mPEG 的取代度为 36%。

### 3.5 PTX/CRmP 纳米胶束的形态分析

经测定, PTX/CRmP 纳米胶束的平均粒径为  $(204.1 \pm 10.7)$  nm (图略), PDI 为  $(0.13 \pm 0.01)$ , Zeta 电位为  $(-30.21 \pm 3.69)$  mV。AFM 图 (图 4) 中可见 PTX/CRmP 纳米胶束形态均一, 近似球形, 粒径在 200 nm 左右, 与 DLS 测定的胶束粒径结果相一致。

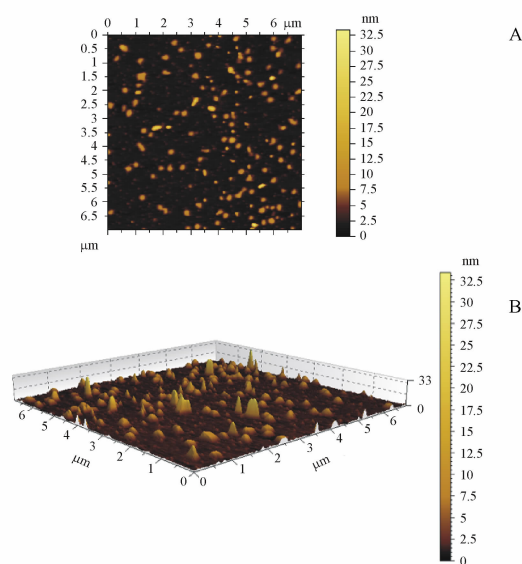


Figure 4 AFM images of PTX/CRmP at the mode of 2D (A) and 3D (B)  
PTX: Paclitaxel

### 3.6 PTX/CRmP 纳米胶束载药量与包封率

PTX 质量浓度在 1.00 ~ 90.0  $\mu$ g/mL 内, 其线性关系良好。线性回归方程为  $A = 35\ 855c - 43\ 558$ , 其相关系数为  $r = 0.999\ 7$ 。分别选取 3 组制备得到的 PTX/CRmP 纳米胶束, 分别测定 PTX 的载药量和包封率。PTX/CRmP 纳米胶束载药量为  $(38.24 \pm 2.78)\%$ , 包封率为  $(79.85 \pm 7.32)\%$ 。

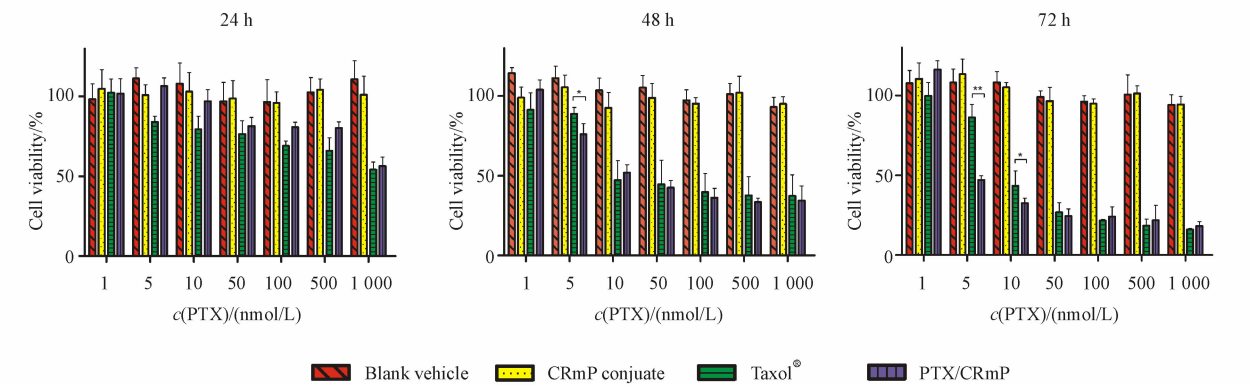
### 3.7 细胞毒性实验

通过 MTT 法分别考察 Taxol® 的溶剂 Cremophor EL-无水乙醇混合溶剂 (1:1) 和载体材料 CRmP 偶联物对 MCF-7 细胞的杀伤作用。结果 (图 5) 显示, 对于空白载体材料, MCF-7 细胞在培养 24、48、72 h 后, 载体材料 CRmP 偶联物具有良

好的安全性,即使孵育浓度为 1 mmol/L 时,对细胞的存活率也并无显著影响,细胞存活率均在 95% 以上。对于 PTX 制剂,Taxol<sup>®</sup> 及 PTX/CRmP 纳米胶束均对 MCF-7 细胞有一定的抑制率。在药物作用 24、48、72 h 时,Taxol<sup>®</sup> 及 PTX/CRmP 纳米胶束对 MCF-7 细胞的抑制作用均随着 PTX 浓度的增加,表明 Taxol<sup>®</sup> 及 PTX/CRmP 纳米胶束对 MCF-7 细胞均有时间依赖性和浓度依赖性。

PTX 市售注射剂 Taxol<sup>®</sup> 与 PTX/CRmP 纳米胶束均显示出较强的细胞毒性。Taxol<sup>®</sup> 与 PTX/

CRmP 纳米胶束 24 和 48 h 孵育浓度小于 5 nmol/L 时,没有显著的细胞毒性,而 PTX/CRmP 纳米胶束在 72 h 孵育浓度为 5 nmol/L 时表现出了显著的细胞毒性,说明 PTX/CRmP 纳米胶束在低浓度并长时间给药后显示出优于 Taxol<sup>®</sup> 对 MCF-7 细胞的杀伤作用。表 1 中,Taxol<sup>®</sup> 与 PTX/CRmP 纳米胶束对 MCF-7 的 IC<sub>50</sub> 数据中可以看出,随作用时间延长,PTX/CRmP 纳米胶束显示出比 Taxol<sup>®</sup> 更好的细胞杀伤效果。



**Figure 5** *In vitro* cytotoxicity of CRmP conjugate and PTX/CRmP against MCF-7 cells  
Blank vehicle; Cremophor EL; ethanol (1:1)  
\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

Formulations	IC <sub>50</sub> /(nmol/L)		
	24	48	72 h
Taxol <sup>®</sup>	2 038	67. 16	17. 62
PTX/CRmP	2 286	50. 49	9. 358

4 讨 论

在本研究中,通过 PEG 修饰 CMCS 并接枝大黄酸成功合成 CRmP 偶联物,高分子 CMCS 和 PEG 具有亲水性,小分子大黄酸为疏水性,因此,该偶联物具有两亲性,能够在水中自组装成聚合物胶束。PTX 为疏水性药物,能够被包载于 CRmP 胶束的疏水内核中,形成载 PTX 的纳米胶束。CRmP 作为 PTX 的递送载体,既增强了 PTX 的水溶性,同时可避免 PTX 直接与正常组织细胞接触而产生的毒副作用。

PTX/CRmP 纳米胶束具有出色载药能力,载药量达 38%;并且粒径较小,粒径分布均匀,能够有效避免载药胶束被体内网状内皮系统吞噬而清除,也能更多地通过 EPR 效应递送药物到达肿瘤

部位<sup>[19]</sup>;载药胶束呈电负性,避免了对人体正常组织细胞的杀伤作用;PEG 修饰后,可以降低胶束在体内递送药物过程中与蛋白质的结合率<sup>[20]</sup>,避免在体内被快速清除。实验初步结果表明 PTX/CRmP 纳米胶束具体对 PTX 具有较好的负载和递送能力,相关体内实验有待进一步研究。

MTT 法细胞毒实验证明了 CRmP 偶联物具有极低的细胞毒性,因此,其可以作为安全的载体材料应用于水难溶性药物的递送。PTX/CRmP 纳米胶束在 MCF-7 细胞系体现出的时间依赖性的体外细胞毒性,表明 PTX/CRmP 纳米胶束由于载体材料的包载,在短时间内细胞毒性作用并未体现出明显优势,但能够随时间推移而呈现较强的肿瘤细胞杀伤作用,其对肿瘤细胞的杀伤机制是否与载体材料上的小分子大黄酸的抗肿瘤作用相关,有待深入研究。

综合以上实验结果,本研究所合成的 CRmP 偶联物具有较好的纳米载体特征,所制备的 PTX/CRmP 纳米胶束预期能够对 PTX 起到很好的体内

递送作用,其将在通过 EPR 效应的被动靶向肿瘤给药方向具有良好的应用前景。

### 参考文献

- [1] Liu J, Li H, Chen D, *et al.* *In vivo* evaluation of novel chitosan graft polymeric micelles for delivery of paclitaxel [J]. *Drug Deliv*, 2011, **18**(3):181–189.
- [2] Wang Y, Liang X, Tong R, *et al.* Gambogic acid-loaded polymeric micelles for improved therapeutic effect in breast cancer [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2018, **14**(10):1695–1704.
- [3] Chen G, Wang Y, Xie R, *et al.* A review on core-shell structured unimolecular nanoparticles for biomedical applications [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2018, **130**:58–72.
- [4] Cabral H, Kataoka K. Progress of drug-loaded polymeric micelles into clinical studies [J]. *J Control Release*, 2014, **190**:465–476.
- [5] Sabra S, Abdelmoneem M, Abdelwakil M, *et al.* Self-assembled nanocarriers based on amphiphilic natural polymers for anti-cancer drug delivery applications [J]. *Curr Pharm Des*, 2017, **23**(35):5213–5229.
- [6] Jimtaisong A, Saewan N. Utilization of carboxymethyl chitosan in cosmetics [J]. *Int J Cosmetic Sci*, 2014, **36**(1):12–21.
- [7] Sahu SK, Maiti S, Pramanik A, *et al.* Controlling the thickness of polymeric shell on magnetic nanoparticles loaded with doxorubicin for targeted delivery and MRI contrast agent [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, **87**(4):2593–2604.
- [8] Wang DD, A LN, Mao Y, *et al.* Rhein induces apoptosis in L-02 cells via reactive oxygen species-independent endoplasmic reticulum stress pathway [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2016, **47**(2):215–221.
- [9] Du Q, Bian XL, Xu XL, *et al.* Role of mitochondrial permeability transition in human hepatocellular carcinoma Hep-G2 cell death induced by rhein [J]. *Fitoterapia*, 2013, **91**:68–73.
- [10] Lin YJ, Zhen YZ, Shang BY, *et al.* Rhein lysinate suppresses the growth of tumor cells and increases the anti-tumor activity of Taxol in mice [J]. *Am J Chin Med*, 2009, **37**(5):923–931.
- [11] Abuchowski A, McCoy JR, Palczuk NC, *et al.* Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase [J]. *J Biol Chem*, 1977, **252**(11):3582–3586.
- [12] Ginn C, Khalili H, Lever R, *et al.* PEGylation and its impact on the design of new protein-based medicines [J]. *Future Med Chem*, 2014, **6**(16):1829–1846.
- [13] Hoffman AS. The early days of PEG and PEGylation (1970s–1990s) [J]. *Acta Biomater*, 2016, **40**:1–5.
- [14] Vllasaliu D, Fowler R, Stolnik S. PEGylated nanomedicines: recent progress and remaining concerns [J]. *Expert Opin Drug Del*, 2013, **11**(1):139–154.
- [15] Liu Y, Zhou J, Wang W. Advances in PEGylated targeted nanopreparation [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2017, **48**(3):268–275.
- [16] Kolate A, Baradia D, Patil S, *et al.* PEG – a versatile conjugating ligand for drugs and drug delivery systems [J]. *J Control Release*, 2014, **192**:67–81.
- [17] Suk JS, Xu Q, Kim N, *et al.* PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, **99**(Pt A):28–51.
- [18] Shi J, Kantoff PW, Wooster R, *et al.* Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities [J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, **17**(1):20–37.
- [19] Danhier F, Danhier P, De Saeleleer CJ, *et al.* Paclitaxel-loaded micelles enhance transvascular permeability and retention of nanomedicines in tumors [J]. *Int J Pharm*, 2015, **479**(2):399–407.
- [20] Cabral H, Kataoka K. Progress of drug-loaded polymeric micelles into clinical studies [J]. *J Control Release*, 2014, **190**:465–476.