紫杉醇自组装核壳型纳米胶束的制备与性能

余　巧[1]，潘仕荣[1,2*]，杜　卓[1]

（中山大学 1. 药学院，2. 附属第一医院，广东 广州 510080）

摘要：本文合成了聚乙二醇-聚谷氨酸苄酯（polyethylene glycol-polybenzyl-*L*-glutamate，PEG-PBLG）两亲嵌段共聚物，并采用超微透析法制备了紫杉醇/PEG-PBLG 核壳型纳米胶束。通过高效液相色谱测定了胶束的载药量及药物包封率；采用动态光散射法测定了胶束的粒径及分布；通过体外试验研究了紫杉醇/PEG-PBLG 胶束的释药特性；采用四噻唑蓝法考察了紫杉醇/PEG-PBLG 胶束的体外细胞毒性；通过裸鼠的抑瘤试验评价了紫杉醇胶束对人肝癌细胞的疗效。结果表明，PEG-PBLG 胶束能包埋疏水性药物紫杉醇；紫杉醇/PEG-PBLG 胶束的粒径为 80 ~ 265 nm，且随着载体共聚物 PBLG 嵌段相对分子质量的升高而增大；紫杉醇/PEG-PBLG 胶束的体外释放具有缓释特性；当紫杉醇浓度大于 20 μg · mL^{-1}时，紫杉醇/PEG-PBLG 胶束的细胞毒性低于相应浓度的紫杉醇/聚氧乙烯蓖麻油注射剂（$P<0.05$），紫杉醇/PEG-PBLG 胶束具有与紫杉醇/聚氧乙烯蓖麻油注射剂相似的抑制肿瘤作用。综上所述，紫杉醇/PEG-PBLG 纳米胶束具有较均匀的粒径及粒径分布、缓释特性、低毒和较好的抗肿瘤作用。

关键词：紫杉醇；聚乙二醇-聚谷氨酸苄酯嵌段共聚物；纳米胶束；细胞毒性；抑瘤试验

中图分类号：R934.4　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0513 -4870(2008)04 -0408 -07

Preparation and properties of self-assemble paclitaxel-loaded core-shell type nano-micelles

YU Qiao[1], PAN Shi-rong[1,2*], DU Zhuo[1]

(*1. School of Pharmaceutical Sciences, 2. The First Affiliate Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China*)

Abstract: Polyethylene glycol-polybenzyl-*L*-glutamate copolymer (PEG-PBLG) was synthesized and paclitaxel-loaded core-shell type nano-micelles with amphiphilic copolymer PEG-PBLG was prepared by the dialysis method. The drug loading content and entrapment efficiency were determined by HPLC. The average size and its distribution were determined by dynamic light scattering method. The paclitaxel release rate *in vitro* from micelles was measured by HPLC. The cell cytotoxicity *in vitro* was observed with MTT assay. The anti-tumor activity of paclitaxel-loaded micelles were evaluated in tumor-inhibiting test of nude mice using human liver cancer HepG-2. The results indicated that paclitaxel could be entrapped in PEG-PBLG copolymer micelles and its size was in the range of 80 - 265 nm which increased with an increase in molecular weight of PBLG in copolymer; *in vitro* the paclitaxel could be released sustainably from the micelles. In high concentration of paclitaxel (>20 μg · mL^{-1}) the paclitaxel-loaded PEG-PBLG micelles displayed much less cell cytotoxicity than paclitaxel injections with Cremophor EL ($P<0.05$); the tumor inhibiting activity of paclitaxel-loaded PEG-PBLG micelles was similar to that of paclitaxel injections with Cremophor EL in the same paclitaxel concentration. It was concluded that the paclitaxel-loaded PEG-PBLG micelles had more uniform size and size distribution, excellent drug sustainable-release behavior, less cytotoxicity, good anti-tumor activity similar to paclitaxel injections with Cremophor EL. So paclitaxel-loaded PEG-PBLG micelles would be a novel paclitaxel preparation in clinic for the treatment of tumor.

收稿日期：2007-09-04.

* 通讯作者　Tel：86 -20 -87755766 -8163，E-mail：gzpshr@163.com

Key words: paclitaxel; polyethylene glycol-polybenzyl-*L*-glutamate block copolymer; nano-micelle; cell cytotoxicity; tumor inhibiting text

紫杉醇(paclitaxel)是从红豆杉属植物中提取出来的一种具有高效抗肿瘤活性的天然物质[1]。紫杉醇在水中的溶解性差,临床应用的主要是紫杉醇/聚氧乙烯蓖麻油注射剂,即由乳浮 EL(Cremophor EL,含聚氧乙烯蓖麻油)/无水乙醇(50∶50)制成的无色黏稠状溶液。但研究显示聚氧乙烯蓖麻油在体内可促使大量组织胺释放,产生过敏反应;还可溶解聚氯乙烯输液器中的二乙烯己基邻苯二甲酸盐,带来严重的毒性反应[2~4]。目前学者对紫杉醇的剂型改造研究很关注。梅林等[5]制备了表面修饰的紫杉醇/聚乳酸-乙醇酸共聚物纳米粒。辛胜昌等[6]制备了紫杉醇磁性脂质体纳米粒。霍美蓉等[7]利用紫杉醇与壳聚糖不同的荷电性,制备的紫杉醇/壳聚糖胶束。Jeong 等[8]以半乳糖修饰的 PEG-PBLG 为载体,制备了紫杉醇纳米胶束给药系统,探讨了药物传递系统与肝细胞之间的靶向性关系。聚乙二醇-聚谷氨酸苄酯(polyethylene glycol-polybenzyl-*L*-glutamate,PEG-PBLG)两亲型嵌段共聚物,其亲水段为 PEG,在人体内不产生毒副作用,无免疫原性[9];其疏水段为均聚肽 PBLG,在体内可发生降解,降解产物为蛋白质的组分谷氨酸,不会产生蓄积和毒副作用。利用这两组分形成的两亲嵌段共聚物,在水溶液中与药物能自组装形成核-壳结构的载药纳米胶束,这种载药胶束热力学稳定。PEG-PBLG 的疏水嵌段 PBLG 构成内核,可作为微药库通过物理包埋方式结合疏水性药物如紫杉醇,增加疏水性药物的水溶性。亲水性的 PEG 形成外壳,保护胶束免受网状内皮系统的捕获,延长药物在血液循环中的存在时间[9~11]。PEG 与 PBLG 的共聚物具有优良的血液相容性[12]和生物降解性[13]。

本文以自合成 PEG-PBLG 为载体,制备紫杉醇/PEG-PBLG 纳米胶束,重点讨论制备条件对紫杉醇/PEG-PBLG 胶束载药量、包封率和粒径的影响,研究紫杉醇/PEG-PBLG 胶束体外释药特性、细胞毒性和体内抑瘤活性,并与临床应用的紫杉醇/聚氧乙烯蓖麻油注射剂进行比较。

材料与方法

材料　PEG-PBLG:采用文献[14]方法合成。谷氨酸在 60% 硫酸催化下先进行 γ-苄酯化、再与二(三氯甲基)碳酸酯作用生成谷氨酸苄酯羧酸酐,最后在端氨基聚乙二醇单甲醚的引发下聚合,生成 PEG-PBLG 共聚物。

紫杉醇:福建南方生物技术股份有限公司,批号 JP050901,纯度 99.2%。紫杉醇/聚氧乙烯蓖麻油注射剂(6 mg·mL^{-1}×5 mL):北京四环医药科技股份有限公司。甲醇和乙腈:色谱醇,美国 TEDIA 公司。MTT:美国 Sigma 公司。透析袋(截留相对分子质量 3 500~5 000):上海绿鸟科技发展有限公司进口分装。其他试剂均为分析纯。

HeLa 细胞株(人宫颈癌上皮细胞):中山大学实验动物中心。HepG-2 细胞株:中山大学实验动物中心。BABL/c 裸鼠:4~6 周鼠龄,广州中医药大学实验动物中心。

体外释药介质　pH 1.1 盐酸溶液:0.2 mol·L^{-1} HCl 52.8 mL 加入 0.2 mol·L^{-1} KCl 25 mL,用蒸馏水稀释至 100 mL。pH 7.4 磷酸盐缓冲溶液(PBS):广州威佳科技有限公司,将已定量的试剂溶解并用蒸馏水稀释至 100 mL。pH 10.0 四硼酸钠缓冲溶液:0.25 mol·L^{-1} $Na_2B_4O_7$ 50 mL 加入 0.1 mol·L^{-1} NaOH 18.3 mL,用蒸馏水稀释至 100 mL。

仪器　高效液相色谱仪:510-2487-717 型,美国 Waters 公司。纳米粒度分析仪:Zetasizer Nano ZS90 型,英国马尔文仪器有限公司。倒置相差显微镜:CKX41 型,日本 Olympus。酶联免疫检测仪:Bio-RAD Model450 型,美国 Microplate Reader 公司。

紫杉醇/PEG-PBLG 胶束的制备　将紫杉醇与 PEG-PBLG 以一定比例溶于 *N*,*N*-二甲基甲酰胺(*N*,*N*-dimethylformamide,DMF)/四氢呋喃(tetrahydrofuran,THF)的混合溶剂中,超声 10 min,充分溶解后转移至透析袋内,置于蒸馏水(2 L)中透析 24 h,在 12 h 更换新鲜蒸馏水,24 h 后将透析袋中胶束溶液离心,除去未包埋药物,上清液冷冻干燥得紫杉醇胶束。

载药量和包封率的测定　使用 HPLC 测量不同浓度紫杉醇/DMF 溶液的峰面积,制备紫杉醇的标准曲线和拟合回归方程。称取紫杉醇/PEG-PBLG 胶束 5 mg 用 DMF 5 mL 溶解,HPLC 测定胶束溶液中紫杉醇的峰面积,结合标准曲线,根据(1)(2)式计算胶束载药量和包封率。考察了 PEG-PBLG 相对分子质量、投药量对载药量和包封率的影响。

$$载药量(\%)=\frac{胶束中紫杉醇的质量}{紫杉醇胶束的总质量}\times 100\% \quad (1)$$

$$包封率(\%)=\frac{胶束中紫杉醇的质量}{紫杉醇的投药量}\times 100\% \quad (2)$$

粒径的测定 用纳米粒度分析仪测定紫杉醇胶束的粒径及其分布。

体外释药试验 取含紫杉醇 0.070 0 mg 的胶束溶液 2 mL 倒入透析袋中,密封后放进装有释药介质溶液 20 mL 的锥形瓶中,置于振荡器以(94 ± 4) min^{-1}频率振荡,温度恒定(37 ± 1) ℃。到取样时间点即倒出全部释药介质,换上相同体积的新鲜介质继续释药。用 HPLC 测定释药介质中紫杉醇浓度,方法同载药量测定。计算释药量和累积释药百分比,每时间点两样品,取平均值,绘制体外释药曲线。

细胞毒性测定 取对数生长期的 HeLa 细胞接种于 96 孔培养板中,每孔接种 1.5×10^4 · mL^{-1}的细胞悬液 200 μL。实验共设 11 组,每组 6 孔:对照组为 RPMI 1640 培养液、阳性组为紫杉醇/聚氧乙烯蓖麻油注射剂、实验组为紫杉醇/PEG-PBLG 胶束溶液,阳性组和实验组分别设 100、50、20、10 和 5 μg · mL^{-1}浓度。细胞贴壁 24 h 后,将上述各组培养液覆盖在细胞上,24 h 后更换新鲜培养液继续培养,于 67 ~ 72 h 每孔加入 5 mg · mL^{-1} MTT 20 μL培养 4 h,吸尽培养液,每孔再加入二甲亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO)溶液 150 μL,放置 15 ~ 20 min 后振摇 15 min,用酶标仪测定 570 nm 处的吸收度(A)。根据(3)式计算细胞相对增殖百分率(relative growth rate,RGR),评定细胞毒性级别[15]。

$$RGR=\frac{A_{试验组}}{A_{对照组}}\times 100\% \quad (3)$$

抑瘤试验 取对数生长期的 HepG-2 细胞,配成 5×10^6 · mL^{-1}单细胞悬液,裸鼠背部皮下接种 0.2 mL/只。接种 3 天后,将动物随机分为 3 组给药,每组 5 只。对照组为注射灭菌生理盐水,阳性组为注射紫杉醇/聚氧乙烯蓖麻油注射剂,治疗组注射紫杉醇/PEG-PBLG 胶束溶液腹腔注射给药,剂量 10 mg · kg^{-1},隔天给药 1 次,共给药 8 次。接种肿瘤后 d 20 处死动物,取肿瘤称重,测量瘤块长、短径,根据(4) ~ (6)式计算肿瘤体积、药物制剂对肿瘤的重量抑制率和体积抑瘤率。

$$肿瘤体积\ V=1/2\times 长径\times 短径^2 \quad (4)$$

$$重量抑瘤率\%=\left(1-\frac{实验组平均瘤重}{对照组平均瘤重}\right)\times 100\% \quad (5)$$

$$体积抑瘤率\%=\left(1-\frac{实验组平均体积}{对照组平均体积}\right)\times 100\% \quad (6)$$

统计学方法 所有统计的实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,对比较的样本进行 t 检验,$P<0.05$ 具有统计学意义。

结果与讨论

1 PEG-PBLG 共聚物的相对分子质量

在 PEG-PBLG 的聚合反应中,共聚物的数均相对分子质量 M_n 随反应开始时的单体/引发剂摩尔比(N_A/N_I)的升高而增大(表 1)。

Table 1 Influence of monomer/initiator molar ratio (N_A/N_I) on the molecular weight of copolymer (M_n)

Copolymer No	N_A/N_I	M_n		
		PEG block	PBLG block	PEG-PBLG
GE-5	12.5/1	5 000	1.36×10^4	1.86×10^4
GE-9	25/1	5 000	2.69×10^4	3.19×10^4
GE-10	50/1	5 000	3.17×10^4	3.67×10^4

M_n of PBLG block was determined by ^{1}H NMR, $CDCl_3$ as the solvent. PEG-PBLG: Polyethylene glycol-polybenzyl-*L*-glutamate; GE-5, GE-9 and GE-10 are abbreviation of PEG-PBLG copolymer samples in which 5, 9 and 10 mean the number of preparation, respectively

2 紫杉醇/PEG-PBLG 胶束的载药量和包封率

采用 HPLC 于 227 nm 处测得的紫杉醇峰面积(Y)与紫杉醇浓度(X)的回归方程为:$Y=2\times10^6X+15\ 558$($r=0.999\ 6$,$n=5$)。低、中、高 3 个浓度(10.1、30.3 和 50.5 μg · mL^{-1})回收率分别为(100.7 ± 1.61)%、(97.52 ± 1.49)% 和(98.15 ± 1.94)%($n=3$);日内精密度分别为 2.07%、3.26% 和 2.19%;日间精密度分别为 4.45%、5.18% 和 3.07%($n=3$),说明测定结果具有精确性。

PEG-PBLG 的相对分子质量对载药量的影响见表 2。当投药量相同时[紫杉醇/PEG-PBLG:1∶10 (w/w)],胶束的载药量与 PEG-PBLG 的相对分子质量密切相关。当 PEG-PBLG 相对分子质量为 1.86×10^4 时,包封率达 88.5%,但当 PEG-PBLG 相对分子质量为 3.19×10^4 时,包封率仅为 38.3%。因为 PEG-PBLG 中疏水嵌段 PBLG 相对分子质量越大,所形成的微粒表面上亲水嵌段 PEG 的覆盖程度越小,胶束表面会存在 PBLG 的裸露部位,亲水的 PEG 链不能有效地阻止胶束间疏水性链段的聚集作用,形成的胶束分散体系极不稳定,从而影响药物包埋。

Table 2　Influence of the molecular weight of copolymer on drug-loaded amount and entrapment efficiency

Copolymer No	PEG-PBLG $M_n \times 10^4$	Drug-loaded amount/%	Entrapment efficiency/%
GE-5	1.86	8.13	88.5
GE-9	3.19	3.69	38.3
GE-10	3.67	3.44	35.6

Paclitaxel/PEG-PBLG: 1∶10 (*w*/*w*)

投药量对载药量的影响见表3，胶束的载药量随着紫杉醇投药量的增大而增大，但包封率下降。当投药量超过1.5∶10（*w*/*w*）时，这种趋势大大削弱。这可能与疏水嵌段对药物的包埋能力接近饱和有关。

Table 3　Influence of the paclitaxel-fed amount on drug-loaded amount and entrapment efficiency

Paclitaxel: Copolymer (*w*/*w*)	Drug-loaded amount/%	Entrapment efficiency/%
1∶20	4.31	90.1
1∶10	8.13	88.5
1.5∶10	10.15	75.3
2∶10	10.54	58.9

Copolymer No: GE-5

实验表明，采用PEG-PBLG相对分子质量1.86×10^4（GE-5），紫杉醇/PEG-PBLG比为1∶10（*w*/*w*），得到的载药量和包封率比较合理，可满足本文的细胞毒性测定与抑瘤试验的要求。

3　紫杉醇/PEG-PBLG胶束的粒径及分布

图1为动态散射法测得的紫杉醇/PEG-PBLG胶束粒径分布图。由图可知胶束粒径为（112±26.4）nm，其分布较均匀，跨度窄。

共聚物的相对分子质量对胶束粒径分布的影响见表4。随着PEG-PBLG相对分子质量增大，PBLG链长的增加，胶束粒径逐渐增大。这是因为PBLG嵌段越长，PEG嵌段的相对含量越少，当PEG不能完全覆盖胶束粒子表面，粒子发生缔合的倾向增大，胶束粒径也变大。

胶束的粒径与共聚物在溶剂中的溶解度以及溶剂/水的相混性有密切关系[16]。以DMF/THF混合溶剂制备胶束时，混合溶剂比例对胶束粒径及其分布的影响见表5。DMF/THF体积比为6/4时，胶束的粒径最大，分布幅度也最广，这可能是特定比例的共溶剂产生的协同作用。体积比>6/4，DMF越多，粒径越小，分布越窄；体积比<6/4，THF越多，粒径也越小，分布也越窄；纯DMF制备的胶束粒径大于纯THF制备的粒径。

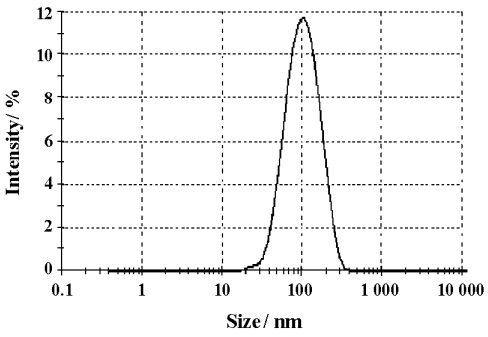

Figure 1　Size and distribution of micelles from GE-5 measured by dynamic light scattering method

Table 4　Influence of the molecular weight of copolymer on the size of micelles ($n=3$)

Copolymer No	$M_n/\times 10^4$	Particle size/nm
GE-5	1.86	112±26.4
GE-10	3.67	185±20.5
GE-15	4.13	230±33.2

Table 5　Influence of the solvent mixing ratio on the size of micelles ($n=3$)

Volume ratio of solvent		Particle size /nm
DMF	THF	
10	0	186±19.4
8	2	206±25.5
6	4	265±65
4	6	195±35.5
2	8	172±33.6
0	10	143±14.9

Copolymer No: GE-5

共聚物浓度对胶束粒径的影响见表6。当选择GE-5制备胶束时，PEG-PBLG浓度减小10倍，胶束粒径减少约一半。这与PEG-PBLG自组装速度有关，PEG-PBLG浓度越高，有机溶剂在相同体积的透析液中的去除速度越快，自组装速度越快，易形成粒径较大的胶束。

紫杉醇/共聚物投放重量比对胶束粒径的影响见表7。紫杉醇/共聚物重量比增加，胶束粒径略有增加，但不显著。说明载药胶束并不是药物与载体

简单的混合体,紫杉醇分子与 PEG-PBLG 分子之间发生相互作用,紫杉醇能进入 PEG-PBLG 分子的螺旋结构内部,使二者的结合更加紧密。

Table 6 Influence of the concentration of copolymer on the size of micelles ($n=3$)

Concentration of copolymer/mg · mL^{-1}	Particle size/nm
1.04	112 ± 26.4
2.07	146 ± 18.6
5.19	182 ± 17.4
10.4	209 ± 60.5

Copolymer No: GE-5

Table 7 Influence of the fed paclitaxel/copolymer ratio on the size of micelles ($n=3$)

Paclitaxel/copolymer ratio (w/w)	Particle size/nm
0:10	86.4 ± 20.2
1:20	91.3 ± 21.4
1:10	98.8 ± 22.75
1:5	102 ± 26.5

Copolymer No: GE-5

4 紫杉醇/PEG-PBLG 胶束的体外释药特性

药物从骨架型载体释放的机制分别是:从载体表面释放;药物从载体空洞自发扩散释放;由于载体的融蚀而释放。通常 3 种机制同时存在。刚开始的快速释药即突释效应很常见,其原因是镶嵌或吸附于粒子表面或近表面的药物在短时间内快速释放。扩散缓释相药物通过载体孔道扩散释放,随着载体的降解,粒子孔道变大,内部药物扩散加快,可弥补后期释药速率的衰减。

图 2 表示紫杉醇/PEG-PBLG 胶束(样品号:T12,以下同)分别在 HCl 溶液(pH 1.1),PBS 溶液(pH 7.4),四硼酸钠缓冲溶液(pH 10.0)中的释药曲线。胶束释药由两相组成:突释相和缓释相。在 pH 1.1 介质中释药最慢,pH 10.0 介质中释药最快。

图 3 表示粒径分别为 81.9 nm (T11) 和 154.0 nm (T15) 的载药胶束在 PBS 溶液(pH 7.4)中释药曲线。在载药量相差不大的条件下,粒径减小,释药相对加快。根据 Hguchi 方程,释药速率与微粒的总表面积成正比,而总表面积与粒径的平方成反比。粒径越小,相同质量的胶束的表面积越大,释药速率越快。

图 4 表示载药量分别为 4.31% (T11) 和 8.13% (T12) 的载药胶束在 PBS 溶液(pH 7.4)中释药曲线。载药量增加,胶束表面吸附的药物增加,突释效应增强,T12 在释药初期的累积释药百分比大于 T11。8 h 后 T11 的累积释药百分比超过 T12,120 h 时 T11 和 T12 的累积释药百分比分别为 80.7% 和 70.1%,两者比例为 1:0.87。因为 T11 和 T12 的粒径和内核组成相似,药物释放孔道大小相差不大,而 T12 的载药量比 T11 大得多,药物分子的堵塞造成释药中后期 T12 累积释药百分比略低于 T11。由于 T11 与 T12 药含量比为 1:1.89,两者在 120 h 药物释放的绝对量之比为 1:1.64,这意味着 T12 释放到释药介质的紫杉醇绝对量仍为 T11 的 1.64 倍。

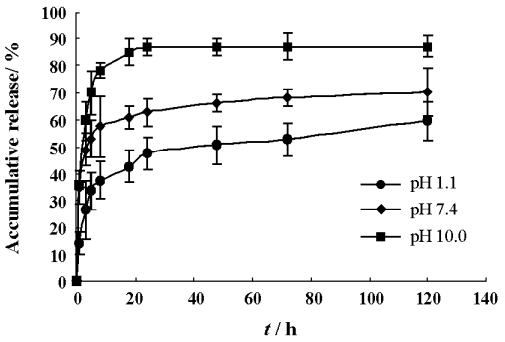

Figure 2 *In vitro* release profiles of paclitaxel from micelles of different pH solutions. $n=2$. T12: drug load amount 8.13%; particle size (77.5 ± 14.6) nm

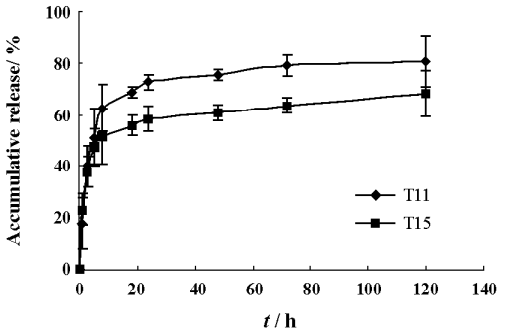

Figure 3 Influence of the size of micelles on release profiles of paclitaxel from micelles *in vitro*. $n=2$. T11: drug-load amount 4.31%, particle size (81.9 ± 16.7) nm; T15: drug-load amount 4.56%, particle size (154.0 ± 28.9) nm

上述结果表明,选择粒径小和载药量大的胶束,才能获得较大的紫杉醇释放量。本文选用了 T12 样品作为体外细胞毒性和动物抑瘤试验的样品。T12 的制备条件为:GE-5 共聚物(M_n 1.86 × 10^4)为载

体，紫杉醇/共聚物为1∶10（*w*/*w*），胶束的包封率为88.3%，紫杉醇含量为8.13%，胶束粒径为77.5 nm。

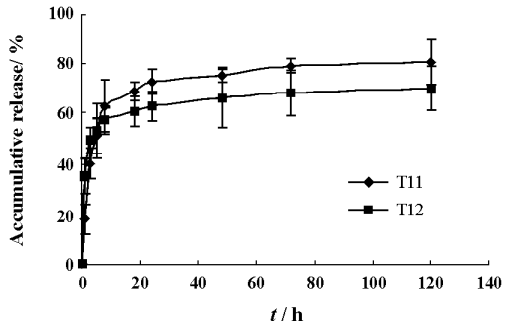

Figure 4　Influence of the paclitaxel-loaded amount on release profiles of paclitaxel from micelles *in vitro*. $n=2$

5　紫杉醇/PEG-PBLG 胶束的体外细胞毒性

本实验采用 HeLa 细胞[17]，MTT 法测定 *A* 值（570 nm）用作毒性分级的依据。从表 8 可知，随着样品浓度增加，阳性组和实验组的 *A* 值均降低，RGR 降低，细胞毒性增大。当质量浓度为 5 μg·mL^{-1} 时，阳性组和实验组的 RGR 并无明显差异，毒性评分都为 0；当浓度为 10 μg·mL^{-1}时，实验组的 RGR 虽高于阳性组，但毒性评分仍同为 1 级，属无毒性；当浓度≥20 μg·mL^{-1}时，实验组的 RGR 高于阳性组（$P<0.05$），毒性评分也低于相应浓度的阳性组；当浓度为 100 μg·mL^{-1}时，阳性组的毒性评分为 4，而实验组的评分为 2。说明实验组由于不含聚氧乙烯蓖麻油，又有 PEG 的外层保护，显著减轻该剂型的细胞毒性。

6　紫杉醇/PEG-PBLG 胶束对裸鼠肝癌 HcpG-2 的作用

有报道采用昆明鼠肝癌 H22[18]和人肝癌 SMMC-7721 来研究紫杉醇对肿瘤的作用[19]。本文采用人肝癌 HepG-2 细胞作为抑瘤试验的细胞株。以生理盐水为对照，比较了紫杉醇/聚氧乙烯蓖麻油注射剂和紫杉醇胶束对裸鼠肝癌 HepG-2 的作用，结果见表 9。生理盐水组的荷瘤裸鼠肿瘤增长最快，重量和体积最大；紫杉醇/聚氧乙烯蓖麻油注射剂和紫杉醇/PEG-PBLG 胶束对肿瘤均有抑制作用，给药后肿瘤的重量和体积均明显低于对照组（$P<0.05$），但相同剂量条件下，阳性组和实验组比较差异无统计学意义（$P>0.05$），说明紫杉醇/PEG-PBLG 胶束对裸鼠肝癌 HepG-2 的生长具有与紫杉醇/聚氧乙烯蓖麻油注射剂相似的抑制作用。结合细胞毒性结果，紫杉醇/PEG-PBLG 胶束的体外毒性小于紫杉醇/聚氧乙烯蓖麻油注射剂，而抑瘤作用却相当，说明经过胶束的包埋使紫杉醇的用药达到有效、低毒的目的。

Table 8　Cell cytotoxicity of paclitaxel-loaded micelles *in vitro*（$n=6$）

Group	Concentration /μg·mL^{-1}	*A* $\bar{x}\pm s$	RGR/%	Cytotoxicity Grade
Control group	–	0.914±0.066	100.0	0
Paclitaxel injection	5	0.921±0.077	100.8	0
	10	0.710±0.081	77.7	1
	20	0.636±0.056	69.6	2
	50	0.372±0.050	40.7	3
	100	0.210±0.022	22.9	4
Paclitaxel-loaded micelles	5	0.916±0.079	100.2	0
	10	0.857±0.095	93.8	1
	20	0.737±0.065	80.7*	1
	50	0.671±0.058	73.5*	2
	100	0.464±0.050	50.7*	2

*$P<0.05$ *vs* paclitaxel injection. Paclitaxel injection with Cremophor EL

结论

两亲型嵌段共聚物 PEG-PBLG 可与紫杉醇自组装形成纳米胶束系统。紫杉醇/PEG-PBLG 胶束的载药量主要与 PEG-PBLG 的相对分子质量有关。紫杉醇/PEG-PBLG 胶束的粒径分布较均匀，粒径范围 80～265 nm，胶束粒径与载体聚合物的疏水嵌段比例、聚合物浓度、制备溶剂有关。紫杉醇/PEG-PBLG

Table 9　Anti-tumor activity of paclitaxel-loaded micelles on nude mice liver cancer HepG2（$n=5$）

Group	Animal amount begin/end	Weight of animal/g		Weight of tumor/g	Inhibiting rate of tumor weight/%	Volume of tumor/cm^3	Inhibiting rate of tumor volume/%
		Begin	End				
Control group	5/5	20.37±1.86	19.65±1.11	0.61±0.05	–	0.48±0.09	–
Paclitaxel injection	5/5	20.36±1.19	19.73±1.49	0.14±0.02*	76.57	0.10±0.06*	78.52
Paclitaxel-loaded micelles	5/5	21.12±1.67	19.97±1.50	0.17±0.03*	71.13	0.13±0.03*	73.23

*$P<0.05$ *vs* control group

胶束具有缓释作用。释药介质的 pH 值对药物的释放有很大影响。载药量、胶束粒径对释药也有一定的作用。紫杉醇/PEG-PBLG 胶束的细胞毒性低于相应浓度的紫杉醇/聚氧乙烯蓖麻油注射剂,但对裸鼠肝癌 HepC-2 的肿瘤生长具有与紫杉醇/聚氧乙烯蓖麻油注射剂类似的抑制作用。

References

[1] Mei L, Sun HF, Song CX. Progress in the development of paclitaxel formulation [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2006,41:1366 -1370.

[2] Weiss RB, Donehower RC, Wiemik PH, et al. Hypersensitivity reaction from Taxol [J]. Clin Oncol, 1990,8:1263 -1268.

[3] Ten Tije AJ, Verweij J, Loos WJ, et al. Pharmacological effects of formulation vehicles: implications for cancer chemotherapy [J]. Clin Pharmacokinet, 2003,42:665 -685.

[4] Gelderblom H, Verweij J, Nooter K, et al. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation [J]. Eur J Cancer, 2001,37:1590 -1598.

[5] Mei L, Song CX, Jin X, et al. Surface-modified paclitaxel-loaded nanoparticles as local delivery system for the prevention of vessel restenosis [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2007,42:81 -86.

[6] Xin CS, Wu XR, Zhou LZ. Preparation of magnetic solid liposome nanoparticles of paclitaxel [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2006,41:933 -938.

[7] Huo MR, Zhou JP, Wei Y, et al. Preparation of paclitaxel-loaded chitosan polymeric micelles and influence of surface charges on their tissue biodistribution in mice [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2006,41:867 -872.

[8] Jeong YI, Seo SJ, Park IK, et al. Cellular recognition of paclitaxel-loaded polymeric nanoparticles composed of poly (gamma-benzyl *L*-glutamate) and poly (ethylene glycol) diblock copolymer endcapped with galactose moiety [J]. Int J Pharm, 2005,296:151 -161.

[9] Lavasanifar A, Samuel J, Kwon GS. Poly (ethylene oxide)-block-poly (*L*-amino acid) micelles for drug delivery [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2002,54:169 -190.

[10] Jeong YI, Nah JW, Lee HC, et al. Adriamycin release from flower-type polymeric micelle based on star-block copolymer composed of poly (γ-benzyl *L*-glutamate) as the hydrophobic part and poly (ethylene oxide) as the hydrophilicic part [J]. Int J pharm, 1999,188:49 -58.

[11] Jeong YI, Cheon JB, Kim SH, et al. Clonazepam release from core-shell type nanoparticles *in vitro* [J]. J Control Release, 1998,51:169 -178.

[12] Wang QM, Teng W, Pan SR, et al. Blood compatibility of block copolymer membranes of poly (benzyl *L*-glutamate)/Poly (ethylene glycol) [J]. J Biomed Eng (生物医学工程杂志), 2005,22:66 -69.

[13] Wang QM, Teng W, Pan SR, et al. The biodegradation of block copolymer membranes of poly (benzyl *L*-glutamate)/poly (ethylene glycol)/poly (benzyl *L*-glutamate) [J]. Beijing Biomed Eng (北京生物医学工程), 2004,23:40 -42.

[14] Feng M, Pang SR, Zhang JX, et al. Synthesis and characterization of PEG-PBLG block copolymer nanoparticles as drug carriers [J]. Guangzhou Chem (广州化学), 2005,30:9 -16.

[15] Shao Y, Lu LJ, Rong L, et al. Biocompatibility of poly (*L*-lactide)/poly (*L*-lactide) surface grafted hydroxyapatite composite [J]. J Jilin Univ (Med Ed) (吉林大学学报·医学版), 2007,33:57 -60.

[16] Chen JH. Polymeric Materials and Modern Pharmaceutics in Drug Delivery Systems [M]. Beijing: Science Press, 2003:267.

[17] Richardson RR Jr, Miller JA, Reichert WM. Polyimides as biomaterials: preliminary biocompatibility testing [J]. Biomaterials, 1993,14:627 -635.

[18] Dong AJ, Deng LD, Sun DX, et al. Studies on paclitaxel-loaded nanoparticles of amphiphilic block copolymer [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2004,39:149 -152.

[19] Wang LQ, Xun LW, Zhou GX, et al. Growth-inhibiting effects of paclitaxel on human liver carcinoma SMMC-7721 *in vitro* and in nude mice [J]. Shanghai Lab Animal Sci (上海实验动物科学), 2004,24:43 -45.