

文章编号: 1005-8982(2009)19-2946-05

·论著·

多西紫杉醇 PLGA/nHA 复合微球的制备及体外释放研究*

李 像¹ 魏 坤¹ 罗 云² 高 新² 赵 娜¹ 郭武生¹

(1. 华南理工大学材料科学与工程学院, 广东 广州 510641;

2. 中山大学附属第三医院 泌尿外科, 广东 广州 510630)

摘要:目的 制备多西紫杉醇(DTX)聚乳酸羟基乙酸(PLGA)/纳米羟基磷灰石(nHA)复合微球,研究纳米羟基磷灰石对复合微球的载药量,包封率和体外释放等性质的影响,以及抑制前列腺癌细胞的生长效应。方法 以疏水性抗癌药物多西紫杉醇作为模型药物,采用单乳化溶剂挥发法(S/O/W)制备 PLGA/nHA-DTX 复合微球,对载药前后的纳米羟基磷灰石进行透射电子显微镜观察和 FTIR 分析,并采用扫描电镜、激光粒度仪和高效液相色谱对微球的载药量、包封率、粒径及体外释药性质进行研究。结果 FTIR 结果表明纳米羟基磷灰石对多西紫杉醇有较强的吸附作用。PLGA/nHA-DTX 复合微球的载药量和包封率分别为 3.92%和 88.7%,较之单纯的 PLGA-DTX 微球均有很大的提高。经过体外释放药物突释后,复合微球比单纯 PLGA 微球的药物释放慢。在第 30 d 时,复合微球和单纯的 PLGA 微球累积药物释放率分别为 62.40%和 72.70%。MTT 实验结果显示 PLGA/nHA 复合微球对癌细胞增长的抑制效果优于单纯 PLGA 微球和药物。结论 与单纯的 PLGA-DTX 微球相比,由于纳米羟基磷灰石对多西紫杉醇存在较强的吸附作用,使 PLGA/nHA-DTX 复合微球的载药量和包封率得到了较大的提高,具有更好的药物缓释效果,抑制癌细胞增长的作用更有效。

关键词:多西紫杉醇;乳酸-羟基乙酸共聚物;羟基磷灰石;复合微球;药物释放

中图分类号: R943

文献标识码: A

Preparation and in vitro release of Docetaxel loaded PLGA/nHA microspheres*

LI Xiang¹, WEI Kun¹, LUO Yun², GAO Xin², ZHAO Na¹, GUO Wusheng¹

(1. College of Materials Science and Engineering, Materials, Ministry of Education, South China University of Technology, Guangzhou 510640; 2. Department of Urology of Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou Guangdong, 510630 P.R.China)

Abstract:【Objectives】To prepare docetaxel (DTX) loaded PLGA/nHA microspheres, research the effect of nHA on drug loading, encapsulation efficiency, in vitro of composite microspheres and inhibiting the growth of prostate cancers. 【Method】PLGA/nHA-DTX composite microspheres were prepared by a single-emulsion solvent evaporation method (S/O/W), with hydrophobic anticancer docetaxel as model drug. nHA and drug-loaded nHA were analyzed by TEM and FTIR, and drug loading, encapsulation efficiency, size and in vitro release of microspheres were studied with SEM, laser particle size analyzer and HPLC, etc. 【Results】The results show that nHA have a strong adsorption with DTX. Drug loading and encapsulation efficiency of PLGA/nHA-DTX composite microspheres were 3.92% and 88.7%, and have greatly improved compared to neat PLGA-DTX microspheres. After initial burst, composite microspheres released more slowly than neat PLGA microspheres. At the 30d after in vitro release, the cumulative release rate of composite microspheres and neat PLGA microspheres were respectively 62.40% and 72.70%. Cytotoxicity test results showed that PLGA/nHA composite microspheres had better effect than PLGA microspheres and

收稿日期 2009-08-03

* 基金项目 中国高新技术计划(No 2007AA021807)、(No 2007AA021908),中国自然科学基金重点项目(No 50732003)

[通信作者] 魏 坤, E-mail weikun@scut.edu.cn

· 2946 ·

DTX to inhibit cancer cell growth. **【Conclusion】** Because nHA has a strong adsorption with DTX, PLGA/nHA-DTX composite microspheres compared to neat PLGA-DTX microspheres enhance drug loading and encapsulation efficiency, and have better drug delivery effect. The effect of inhibiting the growth of cancers of the composite microspheres is also better.

Key words: Docetaxel; PLGA; hydroxyapatite; composite microsphere; drug delivery

多西紫杉醇又名紫杉特尔(Taxotere)或泰索帝,可抑制微管解聚和纺锤体形成,通过干扰细胞的有丝分裂使其停止于分裂中期而抑制细胞增殖。该药对卵巢癌、乳腺癌、肺癌和前列腺癌具有良好的疗效^[1,2]。因为其水溶性很差,目前注射剂泰索帝浓溶液中含有大量的吐温 80,临床应用易引发严重过敏反应。另外由于单用药物治疗毒副作用大,因而有必要研发新的多西紫杉醇药物输送系统。国内外载多西紫杉醇的药物载体的报道很少,主要集中在 PLA、PLGA、glycol chitosan、脂质体和白蛋白等纳米粒子作为载体。虽然这些纳米粒载体系统具有独特的靶向性和提高药物稳定性、减少毒副作用等特点,但是这些载体释放药物时间都比较短,最短的 1、2 d,最长的为 15 d 左右^[3,4]。因此,需要研究更长释药时间的载体。

无机材料羟基磷灰石(HA)由于具有良好的生物相容性和生物活性而被广泛用作药物控释载体研究^[5-8],然而这种载体只是通过吸附或机械混合的方式载药,释放时总是在初始阶段造成大量的突释,随后的释放速度很慢甚至没有,不能满足长效局部给药的目的。而聚合物微球具有方便的控制药物释放的优势,另外还能在一定程度上增强无机材料的机械性能^[9-11]。因此,无机材料/聚合物材料的复合微球能综合两种材料的长处,为长效控释给药提供新的途径。

PLGA 由于具有良好的生物相容性和生物降解性而被广泛用作药物载体,但其有一个缺点是因降解产物呈酸性,pH 值降低而易致发炎。生物陶瓷羟基磷灰石(HA)在水溶液中释放碱性离子,可以用来中和 PLGA 降解产物的酸性,另外还可以提高材料的生物活性。因此,可以用在 PLGA 载体材料中引入 HA 解决酸性问题^[12]。最近关于 PLGA 和 HA 共同作为载体报道很多^[12-20],但都是以水溶性药物为模型研究。本文以脂溶性抗癌药多西紫杉醇为模型,采用单乳液挥发法制备 PLGA 和 PLGA/nHA 微球,利用纳米羟基磷灰石对药物吸附作用,提高药物的包封率,起到长效缓释给药的效果。

1 实验

1.1 微球的制备

1.1.1 PLGA 微球的制备(O/W) 称取 0.9 g PLGA (50:50, Mw 3 万,济南岱罡生物有限公司)溶于 6 mL 二氯甲烷,再加入 50 mg Docetaxel(北京益康思达医药科技有限公司)作为油相,将上述溶液迅速倒入相对于二氯甲烷体积大得多含 0.4%(W/V)乳化剂甲基纤维素(M450)的去离子水溶液中,形成 W/O 乳液,以一定速度搅拌,挥发溶剂二氯甲烷直至挥发完全,静置 4 h 后以 10 000 r/min 的速度离心,分离出沉淀,以去离子水洗涤 3 次,然后置于冷冻机中真空状态下冷冻干燥 36 h 以上至完全脱水,所得微球颗粒干燥状态下保存。

1.1.2 PLGA/nHA 微球的制备(S/O/W) 取 50 mg Docetaxel 溶于 30 mL 二氯甲烷中,再加入 0.25 g nHA 纳米粒子超声 10 min,再磁力搅拌 24 h 混合均匀,形成半透明的乳液,然后 40℃干燥,除去 DCM。将载 Docetaxel 的 nHA 干粉加入到有 0.9 g PLGA 的 6 mL 二氯甲烷溶液中,10 000 r/min 高速搅拌 1 min,充分混合分散后,形成 S/O 乳液,将上述混悬液迅速倒入相对于二氯甲烷体积大得多的含 0.4%(W/V)乳化剂甲基纤维素的去离子水溶液中,得到 S/O/W 乳液,剩下的处理过程与 1.1.1 相同^[21]。

1.2 纳米羟基磷灰石的结构表征

载药前后纳米羟基磷灰石形貌和微观结构通过透射电子显微镜(TEM, H-7650 型,日立公司)对样品进行观察。药物与 nHA 相互作用通过傅里叶变换红外光谱仪(FTIR, Nexus 型,美国 Nicolet 公司)分析。

1.3 微球的物化性质表征

用扫描电子显微镜(SEM, Nova NanoSEM 430, FEI 公司)观察所得微球的外观形貌及分散性。采用激光散射粒度分布测试仪(LA-950 型,日本 Hortiba 公司)分析所得微球的平均粒径和粒径分布。

1.4 载药量及包封率测定

精密称取一定量的载药微球,加 1 mL 二氯甲烷溶解,然后加入 5 mL 乙腈与磷酸溶液(2 mmol/L)的

混合溶液(50:50, V/V), 在通氮气的条件下旋涡搅拌 5 min, 使二氯甲烷蒸发完全至溶液澄清, 采用 HPLC 法(HPLC LC-10A 型, 日本岛津公司)测定其中多西紫杉醇的含量。色谱条件如下: Diamonsil C18 (200 nm×4.6 mm, 5μm) 流动相乙腈/水=65/35 流速: 1.0 mL/min 柱温: 30℃ 检测波长: 230 nm。以峰面积(Y)对对照溶液浓度(X, mg/L)回归得到标准曲线: $Y=16.531X-6.3176$ $r^2=0.9999$ 。

1.5 体外释放

称取微球 15 mg, 用 5 mL 释放介质(pH 为 7.4 的 PBS 和 0.1% W/V 吐温 80)分散, 置透析袋内, 精密封口后混悬于 15 mL 释放介质中, 在 37℃ 恒温水浴振荡器上以 80 r/min 速度振荡, 定时取出 10 mL 释放液, 并补充 10 mL 新鲜的释放介质。取出的释放液的检测与测包封率相同。

1.6 细胞培养及体外毒性实验(MTT 法分析)

前列腺癌细胞系 PC-3 (american type culture collection)加入培养基, 在 37℃、5% 二氧化碳和 95% 的湿度下培养, 细胞的汇合度大于 90% 后, 用含有 EDTA 的 0.25% 的胰蛋白酶消化后传代。细胞毒性实验使用 cck8 法进行评价。人前列腺癌细胞系 PC-3, 接种于 96 孔细胞培养板, 细胞密度为 5×10^3 cells/孔。培养 24 h 待细胞贴壁后, 去除培养基, 加入 200 μL 稀释于培养基中的不同浓度的微球(PLGA/nHA-DTX、PLGA-DTX、DTX 和 PLGA/nHA), 浓度从 0.4 ng/mL 到 32.0 ng/mL 培养 96 h 后小心吸取培养基, 用 PBS 洗涤 2 次, 加入 100 μL 新鲜培养基和 10 μL cck8 溶液, 培养 2 h, 在酶标检测仪上 450 nm 处测 OD 值。每孔做 3 个复孔, 重复 3 次。细胞抑制率的计算公式: 细胞抑制率(%) = $(A_c - A_s) / (A_c - A_b) \times 100\%$ 。A_s 实验孔, 含细胞 + 培养基 + cck8 + 毒性物质; A_c 对照孔, 含细胞 + 培养基 + cck8; A_b 空白孔, 含培养基 + cck8。使用 GraphPad Prism 5.01 软件拟合曲线, 计算各种微球的 IC₅₀。

2 结果与讨论

2.1 nHA 载药前后的形貌和粒径分析

从图 1 透射电子显微镜观察, 纳米 HA(模板法制备, 未烧结)的形状是无规则形, 粒径在 20~50 nm, 在 PEG 作用下分散均匀。载药后纳米羟基磷灰石粒径明显变大, 这是因为药物通过吸附, 包裹在纳米 HA 的表面。

2.2 纳米羟基磷灰石的红外分析

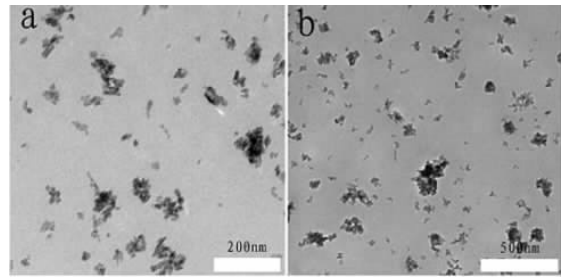


图 1 a 和 b 分别为 nHA 和载药 nHA 的 TEM 图

图 2a HA 的红外光谱中, 472、565、602、962 和 1 035/cm 对应的是 PO₄³⁻ 的振动峰, 在 3 570/cm 和 630/cm 是 O-H 的伸缩振动和弯曲振动峰^[22]。图 2c 中 709/cm 是 DTX 的芳氢面外弯曲振动峰, 峰很尖锐, 为特征峰。图 2c 是载 Docetaxel 的 HA 纳米粒子的红外光谱, 709/cm 虽有所减弱, 但还是清晰可见, 可以证明 HA 纳米粒子已吸附 DTX, 另外与 HA 的红外光谱相比, 3 570/cm 和 630/cm 的峰逐渐减弱或发生位移, 从 HA 和 DTX 的结构式判断, HA 的 OH- 易与 DTX 的 O-H 和 N-H 生成氢键^[21], 归于氢键效应, 也是 HA 纳米粒子吸附 DTX 的主要机制。

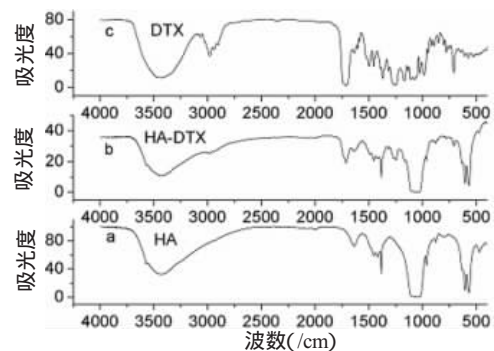


图 2 a、b、c 分别为 nHA、nHA-DTX 和 DTX 的 FTIR 光谱图

2.3 微球表面形貌观察和分析

图 3 显示 PLGA 微球表面光滑, 形态规整, 看不到有明显的孔。与 PLGA 微球相比, 从图 3(c、d) 看出 PLGA/nHA 复合微球表面略显“粗糙”, 粒径分散更均匀, 表面明显吸附有部分晶体颗粒, 同时还有颗粒脱落后形成的孔洞, 图中单个复合微球的 SEM 照片更显示了这种表面形貌。这是由于乳液挥发过程中, nHA 晶体扩散出来而形成的。较多的 nHA 晶体突破球壁在表面形成孔洞, 造成一种多孔性的表面结构。

2.5 微球粒径大小、载药量和包封率

表 1 显示 PLGA-DTX 微球和 PLGA/nHA-DTX 微球的平均粒径分别为 37.40 μm 和 53.88 μm, 这与 SEM 微球结果相吻合。PLGA-DTX 和 PL-

GA/nHA-DTX 微球的包封率分别是 83.50% 和 88.70% ,这说明 HA 纳米粒子的加入 ,提高了微球对药物的包封率。

表 1 微球粒径大小、载药量和包封率

微球	平均粒径(μ m)	跨距	载药量(%)	包封率(%)
PLGA-DTX	37.40	1.3485	4.68	83.50
PLGA/nHA-DTX	53.88	1.3728	3.92	88.70

2.6 体外释放

图 4 是微球的体外释放曲线,在药物释放第 1 天 ,PLGA-DTX 微球释药 11.13% ,无明显突释效应,而 PLGA/nHA-DTX 释放达 19.67% ,存在突释。这可能是由于 PLGA-DTX 微球表面吸附的 DTX 较少,而 PLGA/nHA-DTX 微球表面有较多的吸附药物的 nHA ;另一个原因是复合微球表面有多孔 ,微球内一部分药物可能扩散出来。突释过后 ,PLGA/nHA-DTX 微球的药物释放速率小于 PLGA-DTX 微球 这主要是 HA 纳米粒子对 DTX 较强的吸附作用 ,使得复合微球的药物释放较慢。第 30 天时 ,PLGA-DTX 微球药物释放 72.70% ,PLGA/nHA-DTX 为 62.40% ,这说明两种微球都能达到长期缓释效果,但复合微球药物释放速度慢于单纯 PLGA 微球。

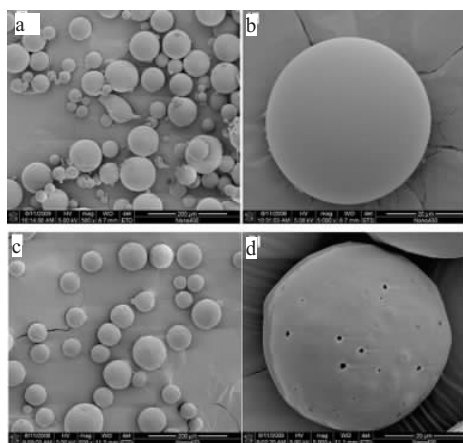


图 3 PLGA-DTX 微球(a)(b)和 PLGA/nHA-DTX(c)(d)微球的 SEM 图

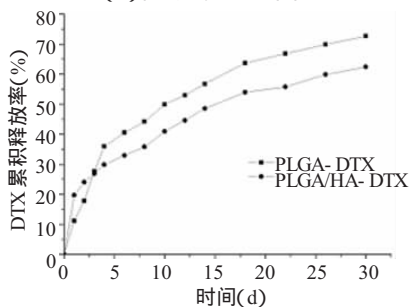


图 4 微球体外释放曲线

2.7 MTT 实验

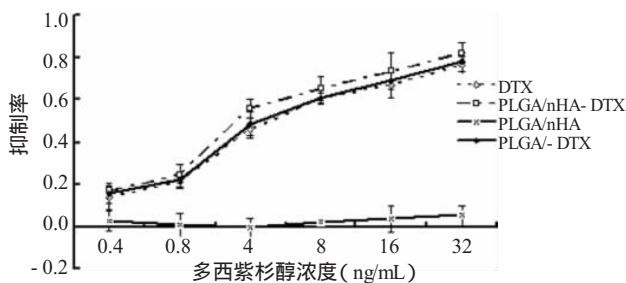


图 5 不同浓度的 PLGA/nHA-DTX、PLGA-DTX、DTX 和 PLGA/nHA 对 PC-3 细胞增值的影响

图 5 显示含有等量 Docetaxel 的 PLGA/nHA-DTX、PLGA-DTX 和 DTX 均可显著抑制前列腺癌细胞 PC-3 细胞的增殖 ,且随着浓度的增高 ,抑制作用更明显 ;而对应浓度的 PLGA/nHA 对前列腺癌细胞的增殖影响较小 ,说明 PLGA/nHA 对前列腺癌细胞的增殖影响很小。表 2 所示 PC-3 细胞与各种 PLGA 微球及 DTX 共培养 96 h 后 ,与单用 DTX 相比 ,PLGA-DTX 的 IC₅₀ 轻度减少 ,由 5.459 ng/mL 减少到 4.994 ng/mL ,但是差异无显著性 (P > 0.05) ;而 PLGA/nHA-DTX 复合微球的 IC₅₀ 显著减少 ,由 5.459 ng/mL 减少到 3.686 ng/mL ,差异有显著性 (P < 0.05) ;PLGA-DTX 微球与复合微球 PLGA/nHA-DTX 相比较 ,IC₅₀ 由 4.994 ng/mL 减少到 3.686 ng/mL ,差异有显著性 (P < 0.05) ,说明加入 nHA 后的复合微球比 PLGA-DTX 微球更有效地抑制了前列腺癌细胞的增殖。

表 2 DTX、PLGA-DTX 和 PLGA/nHA-DTX 的 IC₅₀ (x̄ ± s)

组别	孵育 96 h 的 IC ₅₀ (ng/mL)
DTX	5.459 ± 1.099
PLGA-DTX	4.994 ± 1.109
PLGA/nHA-DTX	3.686 ± 1.103 ¹⁾²⁾

注 :1)与 DTX 相比 ,P < 0.05 ;
2)与 PLGA-DTX 相比较 ,P < 0.05。

3 结论

以疏水性抗癌药 Docetaxel 作为模型药物 ,采用 O/W 和 S/O/W 单乳化溶剂挥发法分别制备 PLGA-DTX 微球和 PLGA/nHA-DTX 复合微球。单纯 PLGA 微球形圆整 ,表面光滑 ,而复合微球表面略显“粗糙” ,是由于 nHA 晶体的扩散出球壁形成多孔。

与单纯 PLGA 载药微球相比 ,由于 HA 纳米粒子和 DTX 发生 H 键作用对药物有着较强的吸附 ,在一定程度上提高了 PLGA/nHA-DTX 复合微球对药物的包封率 ,使药物缓释更慢 ,1 个月复合微球的

药物累积释放 62.40%。MIT 实验结果表明 PLGA/nHA-DTX 复合微球对癌细胞增长的抑制效果优于单纯 PLGA-DTX 微球和 DTX。因此, PLGA/nHA 复合微球有希望作为一种新的长效药物释放载体,为 Docetaxel 治疗前列腺癌开辟了一条新途径。

参 考 文 献:

- [1] 李高峰,李桂生,宁四海.国产多烯紫杉醇及联合顺铂治疗小细胞肺癌临床研究[J].中国医学工程,2005,13(6):622-625.
- [1] LI GF, LI GS, NING SH. Clinical research of treatment of non-small-cell lung cancer (NSCLC) results from docetaxel-based chemotherapy [J]. China Medical of Engineering, 2005, 13(6): 622-625. Chinese
- [2] 唐丽萍,徐向英,马 荣,等.多西紫杉醇对宫颈癌细胞系 Hela 细胞毒性和放射增敏作用的研究 [J]. 中国现代医学杂志,2006,16(16): 2419-2422.
- [2] TANG LP, XU XY, MA R, et al. Cytotoxic effects and radiation enhancement of docetaxel in uterine cervical carcinoma cell line Hela [J]. China Journal of Modern Medicine, 2006, 16 (16): 2419-2422. Chinese
- [3] HO-YOUNG HWANG, IN-SAN KIM, ICK CHAN KWON, et al. Tumor targetability and antitumor effect of docetaxel-loaded hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles [J]. Journal of Controlled Release, 2008, 128: 23-31.
- [4] MUSUMECIA T, VENTURA CA, GIANNONE I, et al. PLA/PLGA nanoparticles for sustained release of docetaxel [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2006, 325: 172-179.
- [5] SANTOS C, MARTINS MA, FRANKE RP, et al. Calcium phosphate granules for use as a 5-Fluorouracil delivery system [J]. Ceramics International, 2009, 35: 1587-1594.
- [6] COSIUNSA A, VERVAET C, LUYTEN J, et al. Porous hydroxyapatite tablets as carriers for low-dosed drugs [J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2007, 67: 498-506.
- [7] FAN J, LEI J, YU CZ, et al. Hard-templating synthesis of a novel rod-like nanoporous calcium phosphate bioceramics and their capacity as antibiotic carriers [J]. Materials Chemistry and Physics, 2007, 103: 489-493.
- [8] TSE-YING LIU A, SAN-YUAN CHEN, DEAN-MO LIU, et al. On the study of BSA-loaded calcium-deficient hydroxyapatite nano-carriers for controlled drug delivery [J]. Journal of Controlled Release, 2005, 107: 112-121.
- [9] KIM HW, KNOWLES JC, KIM HE. Hydroxyapatite/poly(ϵ -caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery [J]. Biomaterials, 2004, 25: 1279-1287.
- [10] KIM HW, LEE SY, BAE CJ, et al. Porous ZrO₂ bone scaffold coated with hydroxyapatite with fluorapatite intermediate layer [J]. Biomaterials, 2003, 24: 3277-3284.
- [11] KIM HW, KIM HE, KNOWLES JC. Bioactive porous bone scaffold coated with biphasic calcium phosphates [J]. Key Eng Mater, 2004, 254/256: 1103-1106.
- [12] HO ML, FU YC, WANG G J, et al. Controlled release carrier of BSA made by W/O/W emulsion method containing PLGA and hydroxyapatite [J]. Journal of Controlled Release, 2008, 128: 142-148.
- [13] XU QG, YASUHIRO T, JAN T, et al. Encapsulation and release of a hydrophobic drug from hydroxyapatite coated liposomes [J]. Biomaterials, 2007, 28: 2687-2694.
- [14] SHI XT, WANG YJ, ROHAN R. et al. In-vitro osteogenesis of synovium stem cells induced by controlled release of bisphosphate additives from microspherical mesoporous silica composite [J]. Biomaterials, 2009, 30: 3996-4005.
- [15] NIU XF, FENG QL, WANG MB, et al. Porous nano-HA/collagen/PLLA scaffold containing chitosan microspheres for controlled delivery of synthetic peptide derived from BMP-2 [J]. Journal of Controlled Release, 2009, 134: 111-117.
- [16] SHI XT, WANG YJ, REN L, et al. Enhancing Alendronate release from a novel PLGA/Hydroxyapatite microspheric system for bone repairing applications [J]. Pharmaceutical Research, 2009, 26: 422-430.
- [17] XU QG, JAN T, CZERNUSZKA. Controlled release of amoxicillin from hydroxyapatite-coated poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres [J]. Journal of Controlled Release, 2008, 127: 146-153.
- [18] NIE HM, HO ML, WANG CK, et al. BMP-2 plasmid loaded PLGA/HAp composite scaffolds for treatment of bone defects in nude mice [J]. Biomaterials, 2009, 30: 892-901.
- [19] WON-SHIK HA, SANG-CHUL CHI, SUNG-GEUN KIM. Fabrication of a biodegradable drug delivery system with controlled release made of PLGA/5-FU/hydroxyapatite [J]. Rapid Prototyping Journal, 2008, 14: 293-299.
- [20] YAOWALAK B, HIROYA A, KAZUYOSHI ST, et al. Controlled release of bovine serum albumin from hydroxyapatite microspheres for protein delivery system [J]. Materials Science and Engineering B, 2008, 148: 162-165.
- [21] WANG YJ, WANG XD, WEI K, et al. Fabrication characterization and long-term in vitro release of hydrophilic drug using PHBV/HA composite microspheres [J]. Materials Letters, 2007, 61: 1071-1076.
- [22] PANDA RN, HSIEH M, CHUNG RJ, et al. FTIR, XRD, SEM and solid state nmr investigation of carbonate-containing hydroxyapatite nano-particles synthesized by hydroxide-gel technique [J]. Journal of Physics and Chemistry of Solids, 2003, 64 (2): 193-199.

(曾文军 编辑)