

# Study of Multifunctional Nano-Drug Loading System and Its Properties Based on the Doxorubicin-Block Copolymer

Chengkun Han<sup>1</sup>, Huijuan Yan<sup>1\*</sup>, Yufei Liu<sup>1</sup>, Chunyan Li<sup>2</sup>, Wenjun Li<sup>1</sup>, Yajie Li<sup>1</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmacy, Xinxiang Medical University, Xinxiang Henan

<sup>2</sup>Pharmaceutical Comprehensive Laboratory, Sanquan College of Xinxiang Medical University, Xinxiang Henan

Email: [yanhuijuan2013@126.com](mailto:yanhuijuan2013@126.com)

Received: Jul. 6<sup>th</sup>, 2018; accepted: Jul. 25<sup>th</sup>, 2018; published: Aug. 1<sup>st</sup>, 2018

## Abstract

**Purpose:** A novel multifunctional nano-drug loading system based on the doxorubicin-block copolymer was developed and its properties were also studied. **Methods:** Based on the principle of self-assembly of PMMA-co-MAA in aqueous solution to form "hydrophilic and hydrophobic" nano-micelles. After all, the morphology and surface charge of nano-drug loading system were investigated by TEM, DLS and zeta potential. At the same time, the properties were also investigated by UV and fluorescence spectroscopy. **Results:** The average diameter and surface charge of nanoparticles were about 50 nm and -36.9 mV, respectively. The maximum absorption wavelength is 478 nm and the maximum fluorescence emission wavelength is 563 nm. It has excellent optical properties and good optical stability in buffer and serum. **Conclusion:** In this experiment, the optical properties and biocompatibility of drug were improved obviously by means of the encapsulation of hydrophobic DOX by copolymers, reducing side effects and it is expected to be used in the fields of fluorescence imaging at the cell level.

## Keywords

Doxorubicin, Block Copolymer, Nano-Drug Loading System, Biocompatibility, Cell Imaging

# 基于阿霉素 - 嵌段共聚物的多功能纳米载药体系及其性能研究

韩成坤<sup>1</sup>, 闫慧娟<sup>1\*</sup>, 刘宇飞<sup>1</sup>, 李春燕<sup>2</sup>, 李文俊<sup>1</sup>, 李亚洁<sup>1</sup>

<sup>1</sup>新乡医学院药学院, 河南 新乡

<sup>2</sup>新乡医学院三全学院药学综合实验室, 河南 新乡

\*通讯作者。

**文章引用:** 韩成坤, 闫慧娟, 刘宇飞, 李春燕, 李文俊, 李亚洁. 基于阿霉素 - 嵌段共聚物的多功能纳米载药体系及其性能研究[J]. 纳米技术, 2018, 8(3): 24-30. DOI: [10.12677/nat.2018.83004](https://doi.org/10.12677/nat.2018.83004)

Email: yanhuijuan2013@126.com

收稿日期: 2018年7月6日; 录用日期: 2018年7月25日; 发布日期: 2018年8月1日

## 摘要

目的: 以阿霉素(DOX)为模型药物, 嵌段共聚物(PMMA-co-MAA)为纳米载体, 构建一种新型的多功能纳米载药体系, 并对其性能进行研究。方法: 基于PMMA-co-MAA在水溶液中自组装形成“外亲水, 内疏水”纳米胶束的原理, 采用共沉淀-自组合法来制备DOX@PMMA-co-MAA纳米载药体系。通过TEM、DLS和zeta电位等进行形貌和表面电荷的表征。同时, 采用紫外和荧光光谱法对其性能进行考察。结果: 纳米颗粒平均粒径约为50 nm, 表面电荷为-36.9 mV。在470 nm处具有较强的紫外吸收, 最大发射波长为563 nm。同时, 在缓冲液和血清中具有优良的荧光特性和光学稳定性。结论: 本实验通过共聚物PMMA-co-MAA对疏水性药物DOX的包裹, 明显地改善了药物的光学性能和生物利用度, 减少其毒副作用, 从而实现了细胞水平上的荧光成像研究。

## 关键词

阿霉素, 嵌段共聚物, 纳米载药体系, 生物利用度, 细胞成像

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

阿霉素(简称 DOX)属于蒽醌类抗生素, 是广谱的抗肿瘤药物, 其药理研究一直备受关注[1] [2] [3] [4]。目前, DOX 的临床使用方法大多是静脉滴注给药, 静脉滴注后 DOX 会迅速分布全身, 毒副作用较大, 如会引起骨髓抑制、心脏毒性、脱发等。同时, DOX 在血液中的半衰期较短, 达到病灶部位的很低, 药效较差。因此, 为了进一步实现 DOX 的低毒副作用, 高生物利用度和药效, 寻求一种有效的载药方法已成为研究热点。

近年来, 国内外提出了一系列基于不同材料的载药体系, 如纳米粒、脂质体、微乳和胶束等[5] [6]。其中, 聚合物纳米载药体系由于其独特的性能而被广泛应用于聚合物载药体系的构建[7]。聚(甲基丙烯酸甲酯-共-甲基丙烯酸(简称: PMMA-co-MAA), 作为一种嵌段共聚物, 在水溶液中能够自组装形成“外亲水, 内疏水”的核-壳状纳米胶束结构[8]。基于此, 本文以自身具有荧光性质的 DOX 为研究对象, 利用共沉淀-自组合法成功制备出 PMMA-co-MAA 包裹 DOX 的纳米载药体系(简称: DOX@PMMA-co-MAA)。该纳米胶束载药体系具有优良的光学性质、高生物适应性、良好的水分散性和光学稳定性等, 有望实现在中药制剂和生物医药领域的潜在应用。

## 2. 实验部分

### 2.1. 仪器与试剂

紫外-可见分光光度计(UV-2700 型, 日本岛津公司); 荧光分光光度计(RF-5301PC 型, 岛津企业管理有限公司); 电子天平(万分之一, MS204S 型, 瑞士 Mettler Toledo 公司); 微量高速离心机(TG-16W 型,

长沙湘仪); 上海雷磁公司 pH-25 型 pH 计; 超声仪(SK3310HP 型, 上海科导超声仪器有限公司); 离心机(Ix-800 型, 海门其林贝尔仪器制造有限公司); 纳米粒径电位分析仪(Nano-ZS90 型, 英国 Malvern 公司); 扫描电子显微镜(JSM-6700F); Mili-Q 超纯水机(LX2-XSJCCSXT 型, 美国密理博公司)。

共聚物 PMMA-co-MAA(分子量为 34,000, PMMA 和 MAA 的摩尔比为 1:0.016)购自希恩思生化科技有限公司(天津, 中国); 阿霉素(DOX)购自 Sigma-Aldrich 公司; 磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), 磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )购自阿拉丁公司; 其余试剂均为分析纯; 实验所用均为超纯水(18.2 MD)。

## 2.2. DOX@PMMA-co-MAA 纳米载药体系的制备及表征

### 2.2.1. 共沉淀 - 自组装法制备纳米胶束

共沉淀 - 自组装法的具体操作步骤如下: 分别量取 1 mL 0.1 mM 阿霉素溶液和 2.0 mg PMMA-co-MAA, 在室温搅拌下, 将两者逐个加入到 9 mL 水中, 继续搅拌混合液 10 min, 即可得到浅黄色溶胶溶液。在 35°C 下旋转蒸发以除去丙酮, 然后在 6000 r/min 转速下离心 15 min, 弃去上清液, 冷冻干燥得到固体, 4°C 条件下保存备用。

### 2.2.2. 纳米载药体系的表征

通过 SEM、DLS、zeta 电位等对纳米胶束进行表征。具体操作过程如下: 精密量取 PMMA-co-MAA 和 DOX@PMMA-co-MAA 水溶液 1 mL, 在室温条件下测定其粒径和电位。同时, 取适量用于 SEM 表征。

## 2.3. DOX@PMMA-co-MAA 纳米载药体系的光学性能考察

### 2.3.1. 实验条件优化

首先, PMMA-co-MAA 浓度: 取不同量的 PMMA-co-MAA 加入到含有 DOX 的水溶液中(浓度范围 0~300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 制备纳米胶束, 室温下测定光谱。其次, 温度的优化: 在不同温度条件下(分别为 20°C, 22°C, 25°C, 30°C, 32°C, 35°C), 取适量纳米胶束溶液测定光谱。最后, pH 的优化: 配制不同 pH 范围的 20 mM PBS 缓冲溶液(6.0, 6.5, 7.0, 7.4, 8.0, 8.5), 按上述优化好的浓度和温度条件, 测定荧光光谱。

### 2.3.2. 光学稳定性考察

在最佳反应条件下, 将一定量的 DOX@PMMA-co-MAA 纳米胶束溶液加入到 400  $\mu\text{L}$  反应缓冲液(pH 7.4, 20 mM PBS)或血清中, 25°C 测定荧光光谱。

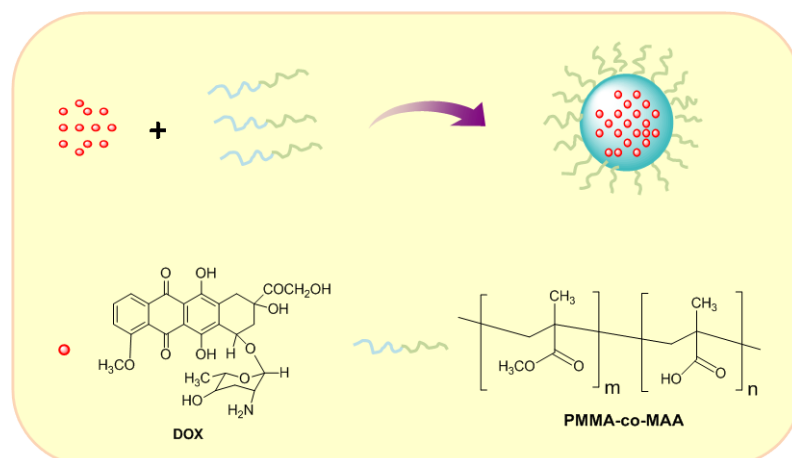
### 2.3.3. 细胞成像研究

对于细胞成像实验, HeLa 细胞接种到培养皿中, 过夜培养细胞至约 90%时, 用 PBS 冲洗 3 次。然后将 1 mL 含有 DOX@PMMA-co-MAA 纳米探针的细胞培养基溶液加入到每个培养皿中, 37°C 孵育 2 h。用 PBS 洗涤 3 次, 通过激光共聚焦成像系统进行活细胞成像。

## 3. 结果与讨论

### 3.1. 设计原理

本论文利用共沉淀 - 自组装法将 DOX 包裹在共聚物 PMMA-co-MAA 中, 形成水溶性较好的 DOX@PMMA-co-MAA 纳米载药体系。该体系可以明显提高 DOX 的生物相容性, 降低其毒副作用。具体设计机理如图 1 所示: DOX 是一种疏水性药物, 将其溶解在良溶剂丙酮中, 然后将其加入到 PMMA-co-MAA 的水溶液中(此处水为 DOX 的不良溶剂), 随着丙酮溶剂的扩散, DEAS 所处微环境的改变, 使得 DOX 在较短时间内进入 PMMA-co-MAA 胶束的疏水空腔中聚集成核, 进而晶核生长成纳米颗粒。这样, DOX 和 PMMA-co-MAA 通过共沉淀 - 自组装法形成纳米载药体系。



**Figure 1.** Schematic representation of the DOX@PMMA-co-MAA nano-drug system formation by coprecipitation and self-assembled method

**图 1.** 利用共沉淀 - 自组装法形成 DOX@PMMA-co-MAA 纳米载药体系的示意图

### 3.2. 纳米载药体系的表征

本实验采用 DLS 和 zeta 电位对所制备的 DOX@PMMA-co-MAA 纳米载药体系进行表征, 如图 2 所示, 纳米胶束是一种粒径在 50 nm 左右的球形颗粒, DLS 测得水合半径约为 77 nm。这两种方法测定结果不一致的主要原因是样品中大颗粒的光散射比较强所造成的。DEAS@PMMA-co-MAA 纳米胶束的表面电位为 -45.7 mV, 负电荷主要来源于纳米颗粒表面的羧基离子化。这些数据进一步表明, DEAS@PMMA-co-MAA 纳米颗粒的形成, 以及在水溶液中具有很好的分散性和稳定性。

### 3.3. 实验条件的优化和稳定性考察

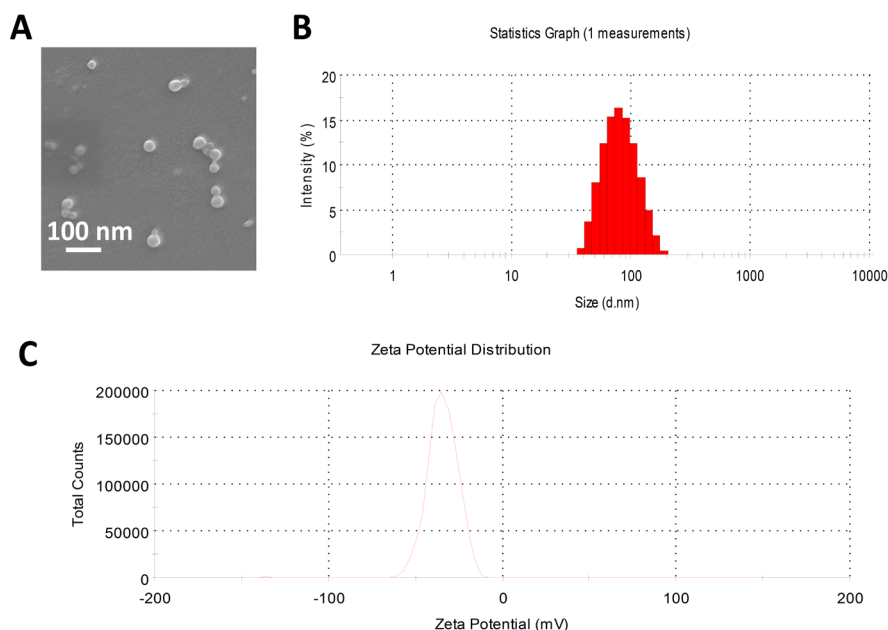
为了考察纳米胶束的荧光性能, 本论文考察了不同浓度的 PMMA-co-MAA 对 DOX 荧光强度的影响, 如图 3 所示, DOX 的最大发射峰位在 560 nm 左右。随着 PMMA-co-MAA 浓度的增加, DOX 的荧光强度逐渐增强, 当 PMMA-co-MAA 浓度达到 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 荧光强度达到最强(即两者的浓度比最佳, 胶束溶液达到平衡, 即使继续增加至 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 对其荧光增强效果也不明显), 故选用 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  作为最佳浓度。结果表明, 纳米胶束的形成成为 DOX 提供一个封闭环境, 减少 DOX 的扭曲分子内电荷转移过程 (TICT), 减少非辐射跃迁的能量损失, 大大提高了其荧光强度。

纳米载药体系的稳定性是在复杂体系中生物应用的基础, 首先, 考察了温度、pH、缓冲液和血清对探针荧光强度的影响。如图 4A, 图 4B 所示, 温度在 25 $^{\circ}\text{C}$ ~35 $^{\circ}\text{C}$  范围内, 荧光强度较稳定; 同时, 在生理 pH 范围内(6.0~8.5)其荧光强度也较稳定。其次, 进一步考察了探针在缓冲液(pH 7.4)和血清中的稳定性, 如图 5 所示, 每间隔一段时间测定一次样品, 通过对纳米胶束和游离 DOX 荧光强度的测定, 发现在缓冲液(pH 7.4)和血清中, DOX 在一定时间范围内荧光强度明显降低, 而 DOX@PMMA-co-MAA 纳米胶束的荧光强度没有随时间的延长而降低。因此, 实验结果均表明纳米胶束在不同反应体系中具有较高的光学稳定性, 为后续复杂生物样品中的实际应用提供了保障。

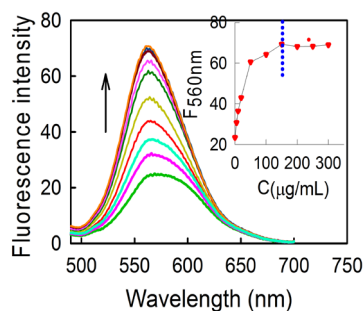
### 3.4. 细胞成像研究

由上述实验可知, DOX@PMMA-co-MAA 纳米胶束具有良好的生物相容性, 因此, 本实验在此基础上考察了该纳米胶束在细胞内的分布情况。如图 6 所示, DOX@PMMA-co-MAA 纳米胶束与细胞孵育 3 h, 通过荧光共聚焦成像图可观察到纳米胶束均匀分布在细胞内, 且具有较强的蓝色荧光。实验数据表明

PMMA-co-MAA 对染料分子的屏蔽和保护作用，降低了染料的非辐射跃迁造成的部分能量损失，使得荧光强度显著增强。

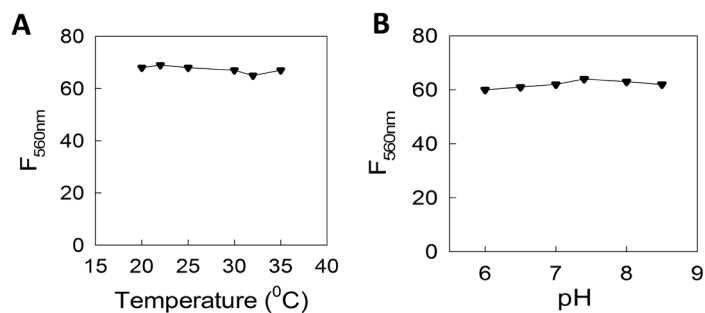


**Figure 2.** The SEM (A), DLS (B) and zeta potential (C) of the nano-drug loading system  
**图 2.** 纳米载药胶束的 SEM (A), DLS (B)和 zeta 电位(C)表征



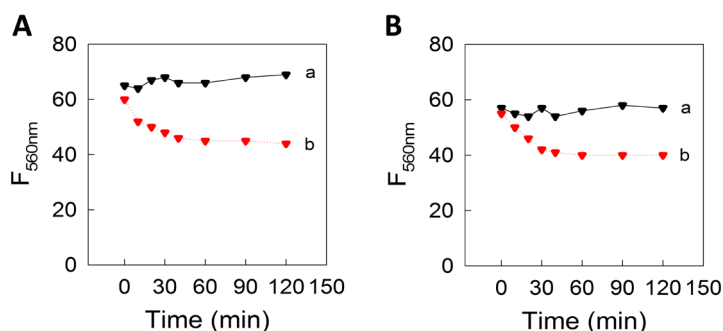
**Figure 3.** Fluorescence emission spectrum of DOX in the presence of different concentrations of PMMA-co-MAA (0, 5, 10, 20, 50, 100, 150, 200, 250 and 300 µg/mL, bottom to top)

**图 3.** 不同浓度 PMMA-co-MAA 对 DOX 荧光强度的影响；(从下到上，浓度依次为：0, 5, 10, 20, 50, 100, 150, 200, 250, 300 µg/mL)

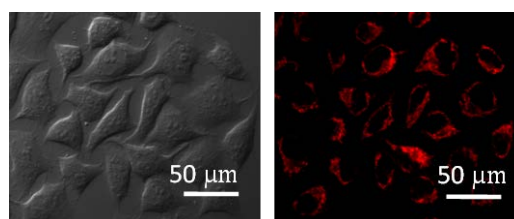


**Figure 4.** The stability of DOX@PMMA-co-MAA nano-drug system at different temperature (A) and pH (B)

**图 4.** (A)温度和(B)pH 对 DOX@PMMA-co-MAA 纳米载药胶束的荧光稳定性考察



**Figure 5.** The stability of DOX@PMMA-co-MAA (a) and DOX (b) in buffer (A) and serum (B)  
**图 5.** DOX@PMMA-co-MAA(a)和 DOX (b)在缓冲体系(A)和血清中(B)的荧光稳定性考察



**Figure 6.** Confocal FL microscopy images of HeLa cells incubated with DOX@PMMA-co-MAA nanomicelle  
**图 6.** DOX@PMMA-co-MAA 纳米胶束的细胞成像研究

#### 4. 结论

本论文构建了一种基于共沉淀 - 自组装法构建 DOX@PMMA-co-MAA 荧光纳米载药体系, 通过嵌段共聚物 PMMA-co-MAA 对疏水性药物 DOX 的包裹, 改善了其荧光强度和光学稳定性, 降低其毒副作用, 提高生物利用度。同时实现了在细胞水平上的荧光成像研究。在此基础上, 本实验可以进一步将带氨基的靶向基团(核酸适配体, RGD 多肽和抗体等)通过酰胺反应与纳米胶束表面的带羧基共价结合, 形成靶向纳米载药胶束, 实现对靶细胞的特异性结合和特定部位的荧光成像研究。因此, 该纳米载药体系的构建为进一步实现在生物医药领域提供强有力的实验基础。同时, 在医药领域、生化分析、肿瘤治疗等方面的存在潜在的应用前景。

#### 基金项目

本研究由国家级大学生创新训练项目(批准号: 201610472034), 国家级大学生创新训练项目(批准号: 201610472068), 国家自然科学基金(批准号: 21605127), 化学生物传感与计量学国家重点实验室(湖南大学)开放课题(批准号: 2015018)和新乡医学院博士科研启动基金支持。

#### 参考文献

- [1] 王欢欢, 付之光, 温宁, 等. 阿霉素 - 光动力联合治疗在恶性肿瘤中的应用及展望[J]. 中华老年口腔医学杂志, 2018, 16(1): 51-54.
- [2] Zhu, D.W., Wu, S.J., Hu, C.Y., Chen, Z., *et al.* (2017) Folate-Targeted Polymersomes Loaded with Both Paclitaxel and Doxorubicin for the Combination Chemotherapy of Hepatocellular Carcinoma. *Acta Biomaterialia*, **58**, 399-412. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.06.017>
- [3] 马鸿云, 庄新明, 许维国, 等. 载阿霉素和顺铂的透明质酸纳米粒子对小鼠移植性乳腺癌的抑制作用[J]. 吉林大学学报(医学版), 2018, 44(2): 243-248.
- [4] Wu, J.J., Zhang, H.J., Hu, X., *et al.* (2018) Reduction-Sensitive Mixed Micelles Assembled from Amphiphilicpro Drugs for Self-Codelivery of DOX and DTX with Synergistic Cancer Therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*,

161, 449-456. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.11.011>

- [5] 林春莲, 吴文婷, 关志宇, 等. 聚合物胶束递药系统逆转肿瘤多药耐药性的研究进展[J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(8): 885-890.
- [6] 阚默, 陈锡俊, 兰兴成, 等. 聚合物胶束靶向给药系统的研究[J]. 长春中医药大学学报, 2018, 34(2): 384-386.
- [7] 宋晓婉. pH 响应性两亲性嵌段共聚物的制备及胶束行为研究[D]: [硕士学位论文]. 合肥: 安徽大学, 2016.
- [8] Shao, G.S., Han, R.C., Ma, Y., *et al.* (2010) Bionanoprobes with Excellent Two-Photon-Sensitized Eu<sup>3+</sup> Luminescence Properties for Live Cell Imaging. *Chemistry—A European Journal*, **16**, 8647-8651. <https://doi.org/10.1002/chem.201001367>

#### 知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2161-086X, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: [nat@hanspub.org](mailto:nat@hanspub.org)