****

**本科生毕业论文**

****

**题 目**  还原敏感聚合物Py-ss-PEG-ss-Py作为药物缓释载体的胶束化研究

**学 院 化学工程学院**

**专 业 制药工程**

**学生姓名 何雨航**

**学 号**  **2013141492047**  **年级** **2013级**

**指导教师 李赛 教授**

**二Ο一七 年 五 月 十六 日**

**还原敏感聚合物Py-ss-PEG-ss-Py作为药物缓释载体的胶束化研究**

专业：制药工程

学生：何雨航 指导老师：李赛 教授

摘要：癌症，一直是人类文明心中永远挥之不去的阴影。还原敏感聚合物Py-ss-PEG-ss-Py就是一个优秀的具有对癌变组织特异性的药物缓释载体胶束的单体。该单体因其具有还原敏感性的二硫键，可以特异性地在癌细胞或其组织中的强还原性环境分解，释放出胶束中包含的药物，同时，载体两端的芘也会同时脱落变为游离态从而对相应位置的癌细胞产生与药物协同性的破坏。该单体也因其两端的疏水基团中的芘具有大π键，可以与大量的具有π键的药物产生共轭效应，提高载药量。本课题成功地合成了Py-ss-PEG-ss-Py单体并制成了胶束，并且通过与相似单体Py-PEG-Py进行参照，对胶束的包括还原敏感性在内的各项性质进行了检测和评估。本课题还对其作为药物载体的相关基本性质进行了探究。

关键词：还原敏感；缓释；药物载体；胶束

**XXXX**

Major: Pharmaceutical Engineering

Undergraduate: Yuhang He Surpervisor: Prof. Sai Li

**Abstract:** XXXXXXXXXXXXXXXXX.

**Keywords:** X; X; X; X

**目 录**

1 前言 1

1.1 癌症治疗方法及其特点 1

1.2 化学疗法及其特点 1

1.3 纳米载药系统 2

1.3.1 纳米颗粒及其分类 2

1.4 聚合物胶束及其特点 2

1.5 光动治疗 3

1.6 芘的衍生物及其自组装 3

1.7 Py-ss-PEG-ss-Py的结构与性质 4

1.8 研究内容 4

1.1.1 □□□□ 5

1.1.2 □□□□ 6

1.1.3 □□□□ 6

1.2 □□□ 6

1.2.1 □□□□ 6

1.2.2 □□□□ 7

2 实验部分 7

2.1 Py-ss-PEG-ss-Py的合成与表征 7

2.1.1 实验仪器 7

2.1.2 实验方法 7

2.1.2.1 Py-PEG-Py的合成 7

2.1.2.2 Py-ss-PEG-ss-Py的合成 7

2.2 Py-ss-PEG-ss-Py的体外的聚集行为研究 8

2.2.1 实验仪器 8

2.2.2 实验方法 8

2.2.2.1 胶束的制备 8

2.2.2.2 临界胶束浓度的测定 8

2.2.2.3 DLS（动态光散射）测量胶束粒径 8

2.3 Py-ss-PEG-ss-Py胶束的刺激响应性测试 8

2.3.1 实验仪器 8

2.3.2 实验方法 8

2.4 Py-ss-PEG-ss-Py的DOX载药胶束的制备与表征 9

2.4.1 实验仪器 9

2.4.2 实验方法 9

2.4.2.1 使用透析法制备载药胶束 9

2.4.2.2 测量载药胶束的载药量 9

2.4.2.3 进行载药胶束的药物释放实验 10

3 结论 11

3.1 Py-ss-PEG-ss-Py的合成与表征 11

3.2 Py-ss-PEG-ss-Py的体外的聚集行为研究 12

3.3 Py-ss-PEG-ss-Py胶束的刺激响应性测试 12

3.4 Py-ss-PEG-ss-Py的DOX载药胶束的制备与表征 12

4 结论及展望 13

参考文献 14

致谢 16

附录 17

1 前言

癌症，一直是人类文明心中永远挥之不去的阴影。目前，癌症的预防、诊断与治疗已经成为世界卫生相关领域中最为火热的话题之一。但是这种疾病因其症状不明显，癌细胞繁殖能力强，变异能力强且极易产生抗药性，而为癌症的治疗设置了许多的障碍。而近年来，随着我国老龄化社会的情况在逐年地加剧，癌症的发病率也为我国现有的公共卫生环境施加了极大的压力。攻克癌症成为了我们的必由之路。

一般认为，癌症是因为正常体细胞在分裂分化的过程中由于产生了基因突变导致细胞开始不受控制地快速分裂增殖。并且由于其细胞表面大多缺乏糖蛋白，而容易在体内扩散，最后变成难以根治的病症。据调查[World Cancer Report 2014.. World Health Organization. 2014: Chapter1.1. ISBN 9283204298. 14.0 14.1]，在2012年仅一年中，就有大约1400万的新增病例和800万次与癌症有关的死亡记录，这种疾病影响着所有国家和地区的人民。几乎每一年的每一万个人里面，就有约18.2人被新确诊为癌症，同时有10.2人死于癌症。从以上数据中可以看出，癌症不仅影响极大，而且会呈现出逐年上升的趋势。

本文阐述了一种用于癌症治疗的具有还原敏感性的新型靶向高分子胶束药物载体的合成、表征、胶束化及载药相关性能探究。

* 1. 癌症治疗方法及其特点

目前来说，治疗癌症常用的方法[胡舜华. "癌症治疗进展." 今日应用医学 2.1 (1997): 19-20.]有外科手术治疗，放射性治疗（放疗），化学治疗（化疗）等，然而这些疗法各有各的优缺点。外科手术比较简单，但是不容易完全清除体内的癌变组织，而且也没办法资料已扩散的癌症；放射性治疗和化学疗法都能够对癌细胞的快速分裂起到阻碍作用。但他们都有一个共同的缺点：对身体伤害极大。

除去以上的几种常用癌症治疗方法之外，近几年也有几种新型治疗技术崭露头角，如免疫疗法（生物治疗）、基因疗法、激素治疗等。这几种在传统的癌症治疗方法之上，具有自己独特的优点。而当前，化学治疗因其疗法对未转移、转移中以及转移后的癌细胞都具有很好的适用性，而备受临床治疗的青睐。

* 1. 化学疗法及其特点

化学疗法即化疗，是通过让癌症患者摄入具有细胞毒性的特殊药物来杀灭癌细胞，它对处于癌症的各个时期的患者均有较好的治疗效果。但其在杀灭癌细胞的同时，也有极大的几率杀灭正常的体细胞或是免疫细胞，同样也会引起患者出现一系列的副反应，如恶心、呕吐、高烧、脱发、免疫力下降等。常用的化疗药物有：阿霉素、柔红霉素等。由于化学疗法对癌细胞的特异性十分低下，造成体细胞的普遍杀伤，副作用很大，有“两害相交取其轻”的无奈，所以近年来科学家在增加化疗药物特异性和减少不良反应的方向上进行了大量的研究。本课题在选择包埋药物时，决定使用常用的、具有代表性的模板药物阿霉素作为本实验的载药胶束包埋的药物。其结构见图1-1。



图1-1 阿霉素（Doxorubicin，DOX）的结构式

Figure 1-1 The structural formula of DOX

* 1. 纳米载药系统
     1. 纳米颗粒及其分类

纳米颗粒（nanoparticle，NP），指纳米量级的微观颗粒。它被定义为至少在一个维度上，其直径要满足不大于100nm的条件的颗粒。纳米颗粒具有非常重要的科学研究价值，它具有在更大粒径的物质和原子、分子之间中不具有的特别的性质。常见的纳米颗粒有：纳米脂质体，固体脂质纳米粒，树枝状大分子，纳米囊和纳米球，聚合物胶束，纳米药物等[梁尔光, 王玉丽, and 高春生. "纳米粒疗法: 一种新兴的癌症治疗方法." 国际药学研究杂志 36.1 (2009): 71-75.]。其中，聚合物胶束就因其具有不可替代的优秀性能而成为当前纳米颗粒缓释药物载体的研究热点。

* 1. 聚合物胶束及其特点

胶束（polymeric micelles）是两亲性嵌段聚合物在溶液中的浓度高于CMC（临界胶束浓度）后，其分子或离子自动聚集并有序结合生成的粒径大小彼此相似的微粒。这种微粒与溶剂之间处于平衡状态。胶束因其同时拥有亲脂性和亲水性两种嵌段聚合物的单体结构而具有以下特别的特点：

制备简单。胶束的单体一般是两亲性聚合物，即同时具有亲脂性的部分和亲水性的部分。它可以在单体浓度超过临界胶束浓度的水溶液中自发地组装成为粒径大小较为均一的胶束，并且能够在水溶液的环境中形成亲脂性的微环境，从而具有可以包埋亲脂性药物的性质。

粒径优势。聚合物胶束的颗粒大小一般会小于100nm，且粒径分布的离散度较小。十分容易穿透血管壁进入组织，并分布在病变部位。同时，这种特性也相对有效地降低了高浓度胶束溶液在刚注射时在血管内的滞留时间。因此，载药胶束能够有效地降低肾小球的滤过作用，延长了载药药物载体在体内保留的时间，更有利于药性的发挥。同时，其合适的尺寸利于病变细胞通过胞吞的方式吸收载药纳米载体进入其胞内，从而为药物的特异性是方提供了前提条件，克服了药物释放所引起的多药耐药。

有效载药量更多。聚合物胶束与小分子表面活性剂相比，因为其疏水链段部分相对分子量较大，在水溶液中各单体间的疏水部分间相互作用力更强，同时，单体在水溶液中的溶解度也相对下降，这两个因素共同造成其临界胶束浓度更低，更能够抵御稀溶液的稀释，稳定性相对更强。同时，其疏水部分相对较大还有其他优点，如增加其载药潜力等。本实验所探究的两种单体，其分子两端均带有含大π键共轭体系的芘，可以与同样具有相似结构的药物（如本实验中所用到的模板药物DOX）形成共轭体系，降低系统能量，提升稳定性，从而增加胶束的有效载药量。且因其分解速率相对较低，所以其所包药物就能够获得相对更长的体内滞留时间，就更能够提升被相关细胞吞入的概率，从而提升药物地有效量。

易进行化学修饰。与小分子表面活性剂相比，其较大的分子量为胶束单体的结构修饰提供了更大的修改潜力，从而我们可以通过对单体或胶束进行官能团的增添，结构的修改，为聚合物胶束赋予新的功能，如光敏/磁敏性，对氧化或还原环境的敏感性，特异性吸收等性质，通过增添这些性质，我们可以让载药胶束拥有靶向给药等新功能。

生物兼容性。聚合物胶束的单体常使用生物兼容性好的材料。现在比较常用的单体链段有PEG（聚乙二醇），PEO（聚氧乙烯），PCL（聚己内酯）等等。其具有安全，无毒，非过敏源，生物可降解等特性，为药物载体的临床应用提供了前提条件。

* 1. 光动治疗

光动治疗，也称光动力疗法（Photodynamic therapy，PDT），具有一段悠久的治疗历史，在公元400年前，古埃及就通过光动力疗法，来治疗皮肤病[王梅兰. "光动力疗法." 厦门科技 4 (2015): 28-30.]。其原理为通过向具有光敏性的化学物质照射一定波长的光线，该物质就会与环境中的氧分子发生电子转移，生成对细胞具有杀伤作用的活性氧。这样，通过对特定组织照射特定波长的光线，就可以特异地杀灭该环境中的细胞[李黎波, et al. "光动力疗法在中国的应用与临床研究." 中国激光医学杂志 21.5 (2012): 278-307.]。根据这个原理，医学上通过注射光敏性药物并照射癌变组织以获得杀灭癌细胞的效果。

光动治疗由以下三个十分重要的部分组成。光敏剂，即当特定波长照射时，会吸收能量并跃升至激发态的一种化学物质；激发光，即为发生的光化学反应提供能量的具有或含有特定波长的光；分子氧，即为人类体细胞和癌变部位都具有的溶解氧。我们可以通过一些手段（如靶向、选择性释放等）让光敏剂在癌变组织环境下集中分布，然后通过特定波长的光线照射该部位，光敏剂即会吸收能量，跃升到激发态，并与环境周围的分子氧结合发生光化学反应，生成具有能够破坏细胞生长、复制所必须的各种生物大分子的自由基。最后导致在该环境下临近细胞的坏死[林佳钿, and 陈俊辉. "光动力疗法在食管癌治疗中的作用." 中国肿瘤临床与康复 1 (2012): 038.]。

光动治疗在若干癌症治疗方法中，具有以下一些突出的优点[徐辉, 仇萌, and 邹先彪. "光动力疗法在真菌感染性疾病中的应用." 中国真菌学杂志 9.3 (2014): 189-192.]：

对正常细胞杀伤小，副作用低，安全高效。由于活性氧在内环境中可以与多种物质反应，所以其从生成到失活的平均作用距离较短，意味着活性氧所造成的细胞杀伤只分布在光敏剂的附近，所以光敏剂附近的癌细胞则会受到强烈的影响，而较远处的正常体细胞又因为光照强度不够而收到了保护。所以降低了副作用。

特异性强。该类药物要起到杀伤作用，有且只有满足上述的三个条件才可以成功。即该部位含有光敏剂，受到激发光的照射并且环境中含有分子氧。所以，我们通过特殊的、集中于癌症组织的光敏剂，加上在病变部位照射的光线，才能够构成杀伤条件。这使得癌细胞很难产生抗药性，因此该方法可以用来重复治疗。

治疗效率高，患者依从性强。光动治疗耗时短，光敏剂分布较快，而且光动治疗进行的过程中可以同时进行其他种类的癌症治疗方法，彼此之间互不影响。

* 1. 芘的衍生物及其自组装

分子自组装是在近期的药物载体，纳米颗粒，高分子材料等领域出现的一个新的研究方向[林娟, 周庆翰, and 赵晓军. "荧光光谱对自组装多肽作为药物载体的初步研究." 光谱学与光谱分析 29.10 (2009): 2792-2797.]，分子的自组装的含义是若干分子个体之间通过弱分子间作用力（如氢键、π-π共轭作用等）进行有序的聚集，形成一个紧密、规则的整体。是一种复杂的分子团协同作用。

以具有大π键的分子苯为例，其自组装的方式有以下几种类型[王宇宙,吴安心. 芳环超分子体系中的π-π作用[J]. 有机化学,2008,(06):997-1011.]：

而本实验研究的物质中具有同样大π键的芘的部分，游离的芘在溶液中的自组装的方式主要是偏移堆积[Doxtader, M. M.; Mangle, E. A.; Bhattacharya, A. K. Chem.Phys. 1986, 101, 413.]。这种堆积方式会导致大π键的离域范围增加，使物质的发射荧光波长变长。这是我们在本实验中检测苯的自组装原理。

* 1. Py-ss-PEG-ss-Py的结构与性质

本课题所要研究的聚合物胶束的单体即为Py-ss-PEG-ss-Py，其结构如下：



图1-1 Py-ss-PEG-ss-Py的结构式

Figure 1-1 The structural formula of Py-ss-PEG-ss-Py

是PEG与芘通过二硫键进行连接，这种结构具有如下性质：

单体两端连接有带有大π键的芘，能够与具有双键等结构的药物产生共轭效应降低体系能量，从而提高胶束的稳定性，提升药物的载药量。

芘与聚乙二醇通过二硫键进行连接，从而能够使聚合物胶束具有与二硫键相似的还原敏感特性，这一特性可用于载药胶束的选择性释放等相关用途。而且在癌变组织中，其环境也是具有还原性的，所以该胶束可以特异性地在癌变组织处分解释放出抗癌药物并且载体分解时产生的游离芘也会对癌变细胞产生协同性的杀伤效果，进一步地提高药物的药效。以上的这些性质与其他其他纳米颗粒药物载体相比及其有研究价值。

单体的两端为亲脂性基团，其中的芘具有π-π共轭结构，这对于药物的包埋性有很大的加强。中间的PEG长链则具有较强的亲水性。在水溶液中缔合形成胶束的时候，两端的亲脂性基团会包埋在胶束的中心，而中间的亲水性PEG长链则会暴露在胶束的表面，与水溶液直接接触。

本课题通过把Py-ss-PEG-ss-Py和其相似聚合物单体Py-PEG-Py进行各项性质的比照，来具体说明Py-ss-PEG-ss-Py所具有的还原敏感等多项特性。Py-PEG-Py的分子结构如下：



图1-1 Py-PEG-Py的结构式

Figure 1-1 The structural formula of Py-PEG-Py

该结构与Py-ss-PEG-ss-Py相比，相同点有：两个疏水端都带有大π键的芘，中间的亲水端则都是由PEG组成，两者都具有脂键；不同点有Py-ss-PEG-ss-Py的疏水端和亲水端是由二硫键连接起来的，并且还具有额外的酰胺键。所以，本课题在研究Py-ss-PEG-ss-Py的时候，通过使用Py-PEG-Py作为对照，两相比较，能够较为直观地说明Py-ss-PEG-ss-Py的在还原敏感方面的特性。

* 1. 研究内容

本课题包括以下几个方面：

Py-ss-PEG-ss-Py与Py-PEG-Py的合成与表征：

Py-ss-PEG-ss-Py与Py-PEG-Py的体外的聚集行为研究：通过挥发法制备Py-ss-PEG-ss-Py和Py-PEG-Py胶束，分别测定它们的 CMC（临界胶束浓度）并通过 DLS（动态光散射）和 AFM（原子力扫描镜）来分别研究Py-ss-PEG-ss-Py与Py-PEG-Py的纳米粒子粒径大小和粒子形貌。

Py-ss-PEG-ss-Py与Py-PEG-Py的胶束的刺激响应性测试：为了探究Py-ss-PEG-ss-Py的还原敏感特性，本实验通过设置具有不同的还原性强度的恒温环境，通过检测Py-ss-PEG-ss-Py与Py-PEG-Py在该环境下分解时不同时间点胶束的荧光强度，得到胶束分解的时间-分解率曲线，来研究药物还原敏感特性。还原敏感实验结果表明，Py-ss-PEG-ss-Py胶束具有在还原性环境条件下胶束分解速度加快的特性，且还原性越强，分解速度越快。表明了该胶束材料本身具有针对癌症组织的高还原性环境的敏感性，为我们后面对该材料进行药物包埋并进行体外的载药胶束释放实验提供了前提条件支持。

Py-ss-PEG-ss-Py的DOX 载药胶束的制备与表征：通过透析法制备Py-ss-PEG-ss-Py和Py-PEG-Py的阿霉素（DOX）载药胶束，通过紫外分光光度法作标准曲线研究胶束的载药量，并在不同的pH条件和不同的还原性条件组合出的恒温环境中，通过荧光研究在不同还原强度和不同的pH环境下药物载体中药物的释放特性。

1.1.1 □□□□

1.1.1.1 □□□

□□□□□□□□□□□，□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□。

N, N-二甲基甲酰胺二甲基



图1-1 □□□□

Figure 1-1 □□□

□□□□□

1.1.1.2 □□□

□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□[3,6-9]。□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□。

1.1.2 □□□□

□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□。

表1-1 □□□

Table 1-1 □□□

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| □□□ |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |

[a] □□□□

□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□

1.1.3 □□□□

□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□。

(1-1)

式中：a为□□□□；b为□□□□□；c为□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□。

□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□。

1.2 □□□

1.2.1 □□□□

1.2.1.1 □□□

□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□。

1.2.1.2 □□□

□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□。

1.2.2 □□□□

□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□。

1. 实验部分
   1. Py-ss-PEG-ss-Py的合成与表征
      1. 实验仪器

100 mL支口瓶；真空油泵；布氏漏斗；磁力搅拌器

* + 1. 实验方法
       1. Py-PEG-Py的合成

称取0.8g 芘丁酸，放入100 mL支口瓶中。加入1.6g 的PEG2000。抽真空，并用氮气充填，重复三次。

加入30 mL的DCM与四氢呋喃比例为2:1的混合溶剂，振摇并观察使其全部溶解。

称取6.6g 的DCC与0.004g的DMAP溶解于20 mL DCM中。缓慢滴加到上述的溶剂中，全程冰浴。保证该操作在一小时左右完成。

滴加完毕使其自然升到室温后继续反应48 h；

反应结束后低温滤去不溶物，浓缩用乙醚沉淀三次，室温真空干燥至恒重。

* + - 1. Py-ss-PEG-ss-Py的合成

准确称取预处理好的HOOC-ss-PEG2000-ss-COOH 1.5000

g（0.6mmol）与1-芘甲胺盐酸盐0.6600 g（2.5 mmol）于100 mL支口瓶中，抽真空充氮气3次；加入10 mL DCM与15 mL DMSO混合溶剂使其全部溶解；在剧烈搅拌下将0.1950

g（2.5mmol）吡啶用10 mL DMSO稀释后在冰浴条件下滴入到上述体系中反应2 h；称取6.2000 g（30.1 mmol）DCC与0.0040 g（0.03 mmol）DMAP并用20 mL DCM溶解后在冰浴剧烈搅拌的条件下逐滴滴加到体系中，整个滴加过程在1 h左右；滴加完毕使其自然升到室温后继续反应48h；反应结束后低温滤去不溶物，浓缩用乙醚沉淀三次，室温真空干燥至恒重。

* 1. Py-ss-PEG-ss-Py的体外的聚集行为研究
     1. 实验仪器

动态光散射光谱仪（Malvern ZetasizerNano ZS90）

* + 1. 实验方法
       1. 胶束的制备

为了制得Py-ss-PEG-ss-Py和Py-PEG-Py的胶束，根据这两者都易溶于有机溶剂的特点，选择使用挥发法。

使用挥发法制备胶束溶液：分别称取适量的Py-ss-PEG-ss-Py和Py-PEG-Py粉末，完全溶于约400μl色谱纯级别的四氢呋喃中以后，以每秒1滴的速度滴加到装有超纯水的烧杯中，滴加的同时对溶液进行剧烈搅拌。滴加完毕之后避光通风放置隔夜，当溶液中的四氢呋喃挥发完全（即没有散发出类似于乙醚的气味时）之后收集起来。即制得Py-ss-PEG-ss-Py和Py-PEG-Py的胶束溶液。由于Py-ss-PEG-ss-Py和Py-PEG-Py在光照条件下会十分不稳定，故收集后应注意避光保存。

* + - 1. 临界胶束浓度的测定

临界胶束浓度（CMC）是聚合物胶束的重要性质之一，只有当聚合物单体在溶液中的浓度高于临界胶束浓度时，聚合物单体才会有序地聚集起来形成胶束。本实验所研究的Py-ss-PEG-ss-Py胶束，因其可被用来作为药物载体，所以我们希望它的临界胶束浓度应当尽量小。因为只有这样，该胶束才可能更好的抵御溶剂稀释所带来的对于胶束的破坏。

我们使用芘水稀释法来测量该胶束的CMC，其方法如下：用上文提到的方法配制浓度稍大的Py-ss-PEG-ss-Py胶束溶液2ml，并分装到两个2ml的EP管中，从饱和芘水中取出1ml，加入其中的一个EP管中并混匀，然后再从稀释过的EP管中取出1ml到一个空的2mlEP管，再用饱和芘水对半稀释，直到稀释到10000倍以上，另外再用一个1.5mlEP管装1ml的饱和芘水。对以上的样品做好标记，分别用荧光测量其荧光强度，参数为发射波长390nm，激发波长范围：320nm-360nm。

* + - 1. DLS（动态光散射）测量胶束粒径

粒径是载药胶束的重要属性，关系到其在人体内的分布、滞留时间、载药量、胞吞等性质。

使用动态光散射光谱仪对上一个步骤制得的Py-ss-PEG-ss-Py和Py-PEG-Py胶束样品进行检测，测定温度为25°C，结果见图。

* 1. Py-ss-PEG-ss-Py胶束的刺激响应性测试
     1. 实验仪器

傅里叶变换红外光谱仪（Nexus 670FT-IR）；荧光光谱仪（F-7000）

* + 1. 实验方法

根据前文描述的方法制得0.5mg/ml，Py-ss-PEG-ss-Py胶束溶液30ml和0.5mg/ml，Py-PEG-Py胶束溶液15ml。然后用密封容器装足量的超纯水抽真空补充氮气重复三次，得到去除空气并用氮气保护的超纯水。从中每次取出300μl并称取 9.219mg（0.03mol） GSH 溶于其中，并在特定的时间点（0h，1h，2h，3h，4h，6h，10h，24h，48h）分别配制为1ml由以下成分组成的溶液：

#1：Py-PEG-Py，0mM GSH

#2：Py-PEG-Py，15mM GSH

#3：Py-ss-PEG-ss-Py，0mM GSH

#4：Py-ss-PEG-ss-Py，0.5mM GSH

#5：Py-ss-PEG-ss-Py，15mM GSH

配制完成之后放置在37°C恒温摇床中，避光进行反应，待测量时间到时取出1mL溶液，测量其荧光和紫外特征。荧光的参数1为激发波长340nm，发射波长范围为350nm-600nm，参数2为发射波长390nm，激发波长范围为320nm-370nm；紫外的参数为全谱250nm-500nm。分别得到图。

* 1. Py-ss-PEG-ss-Py的DOX载药胶束的制备与表征

为了探究具有还原敏感性的Py-ss-PEG-ss-Py胶束作为药物载体的适用性，本实验对其与起对照作用的Py-PEG-Py胶束进行载药测试，并对其载药量和释放特性进行研究。

* + 1. 实验仪器

傅里叶变换红外光谱仪（Nexus 670FT-IR）；荧光光谱仪（F-7000）

* + 1. 实验方法
       1. 使用透析法制备载药胶束

由于疏水DOX在四氢呋喃中的溶解度不高，所以挥发法不适用于载药胶束制备。而疏水DOX在二甲基亚砜中的溶解度较好，故选择使用透析法制备载药胶束。

称取适量的Py-PEG-Py粉末和相对含量20%的疏水DOX并加入适量的色谱纯的二甲基亚砜（DMSO），经过超声使之完全溶解，然后滴入10ml的超纯水中使其浓度为1mg/ml，超声使之混匀，装入透析袋。同上述步骤，取适量Py-ss-PEG-ss-Py粉末和相对含量20%的疏水DOX并加入适量的色谱纯的二甲基亚砜，加入到15ml的超纯水中使其浓度为1mg/ml。再把透析袋放置于盛有足量去离子水的大烧杯中，缓缓搅拌，并每隔2小时换一次去离子水并时刻保持避光。从而透析出透析袋中的二甲基亚砜，使袋中的胶束单体自组装为胶束。透析一日，待透析袋不再散发二甲基亚砜的气味时，取出透析袋，收集袋中的液体并对其进行低速离心，以除去未包载的疏水DOX。离心参数设置为3500 rpm离心5 min。待低速离心完成，收集两个样品的上清液，并遮光保存。

* + - 1. 测量载药胶束的载药量

分别取出两个样品溶液各1ml，并使用紫外分光光度仪测量其紫外吸光度。另外，额外配置一组具有等浓度梯度的DOX溶液，测量其紫外强度并作出DOX的浓度-紫外吸光度标准曲线。根据测得的两个样品的紫外吸光度，对照DOX的浓度-紫外吸光度标准曲线，求得两个样品胶束的载药量。数据见表。

* + - 1. 进行载药胶束的药物释放实验

为了探究试验样品Py-ss-PEG-ss-Py胶束与其对照组Py-PEG-Py胶束在载药的药物释放方面的相关性质，特别是其在类似于人类体环境和癌变组织环境中的相关性质，现通过配置醋酸/醋酸钠缓冲溶液来进行模拟。

人体正常内环境的pH值大概在7.4左右，而癌变组织的环境偏酸性，其pH值大概在5.0左右。另外，癌变组织的环境中，还原性较强。所以，在进行载药胶束的药物释放实验的时候，我们选择了pH=7.4和pH=5.0来模拟正常体环境和癌变组织环境。另外，我们通过加入一定量的谷胱甘肽（GSH）来模拟癌变组织的强还原性环境。

配制醋酸/醋酸钠缓冲溶液：称取一定量的醋酸钠溶于超纯水中，再另配置400ml，0.01mol/L的醋酸溶液。小心地把醋酸溶液加入到醋酸钠溶液中，在少量多次加入的过程中，实时地通过pH计测量溶液的pH情况。通过这种方法，分别精确配置足量的、pH值分别为5.0和7.4的醋酸/醋酸钠缓冲溶液。

配制载药胶束的释放实验环境：分别配制以下5类实验环境，每类3个平行组，共15组。将每个组的溶液都分别装入容量约30ml的棕色试剂瓶中，并做好标记。

实验组：Py-ss-PEG-ss-Py载药胶束溶液

#1：pH=5.0 无GSH 25ml

#2：pH=5.0 10mM GSH 25ml

#3：pH=7.4 无GSH 25ml

对照组：Py-PEG-Py载药胶束溶液

#4：pH=5.0 无GSH 25ml

#5：pH=7.4 无GSH 25ml

开始载药胶束的释放实验：将透析法制备的Py-ss-PEG-ss-Py载药胶束溶液分三次各取1ml装入三个小透析袋中，并分别装入#1类的三个平行组所在的试剂瓶中，并放入恒温37°C的摇床中，避光保存。同时，对其他四个类别的实验也进行类似操作。完成后开始计时。在1h、2h、4h、6h、8h、10h、12h、24h、36h、48h、60h、72h、96h处进行取样操作。

取样操作：在取样时间点时对每一个样品进行以下的取样操作。对于每一个样品，取出1ml小透析袋外的溶液，装进1ml EP管中保存，并作好详实标记。随后根据原试剂瓶的溶液配制，用1ml相同配置的溶液补充回原试剂瓶。重复以上操作，直到该时间点的15个样品全部取样完成。

样品的检测：用荧光分别测量以上得到的样品，参数为：激发波长480nm，发射波长范围为500nm-600nm。分别得到每个样品的荧光强度。

数据处理：根据荧光强度，计算在每个取样点时样品所含有的DOX浓度，进而计算在各个取样点时透析出来的DOX的浓度，然后进行累积，计算出在每个取样点时药物的累计释放量。再把累计释放量与前面所计算出来的载药胶束的载药量作比较，得到载药胶束的累计释放率，并作图。

1. 结论
   1. Py-ss-PEG-ss-Py的合成与表征

图为制得的两种聚合物材料的红外图谱。

* 1. Py-ss-PEG-ss-Py的体外的聚集行为研究

C:\Users\HYH\AppData\Local\Microsoft\Windows\INetCache\Content.Word\Graph11 - Copy.eps

图1-1 Py-ss-PEG-ss-Py胶束的临界胶束浓度

Figure 1-1 The CMC of Py-ss-PEG-ss-Py micelle

从荧光条件390nm处的Py-ss-PEG-ss-Py胶束的临界胶束浓度对数图可以得出，Py-ss-PEG-ss-Py的临界胶束浓度为0.015mg/ml，这种临界胶束浓度非常小，说明该胶束在水溶液中具有较高的稳定性，适合作为药物载体在人体内环境中使用。

* 1. Py-ss-PEG-ss-Py胶束的刺激响应性测试

由图我们可以看出：Py-PEG-Py胶束受还原性强弱的影响较小，随着时间的推移几乎不怎么反应。理论上具有还原敏感性的Py-ss-PEG-ss-Py胶束的变化就非常明显，在低浓度的还原性条件下Py-ss-PEG-ss-Py胶束反应比较小，这可能是因为还原强度较低，比较容易受到外界空气中的氧对实验进行了干扰所致，而在较强的还原性下，Py-ss-PEG-ss-Py胶束溶液的荧光峰位随着时间出现了一个明显的偏移，这说明在还原性条件下，Py-ss-PEG-ss-Py中的具有还原敏感性的二硫键被破坏而断裂，胶束分解，被包埋在亲脂性环境中的芘进入到了水溶液中，波长发生了改变。这证明了Py-ss-PEG-ss-Py胶束在近似于癌变组织的环境中具有选择性分解、放出包埋的药物和芘的能力。

* 1. Py-ss-PEG-ss-Py的DOX载药胶束的制备与表征

由Py-PEG-Py和Py-ss-PEG-ss-Py的体外释放曲线可以看出，在pH=5.0的酸性条件下，两种载药胶束在同一时间的药物累计释放量均比pH=7.4的正常环境多，且最后的累计释放率都比较接近于100%。这说明该载药胶束在癌变组织的内环境中能够做到药物的全部释放。而另一方面，在pH=7.4的正常环境下，两种载药胶束的累积释放率在50%左右，且当时间经过到40h以后，两种胶束的累计释放率都几乎不再增长，说明两种胶束在正常环境中都能够发挥一定的控释作用，也为其重分布到癌变部位发挥药效提供了基础。

4 结论及展望

纳米颗粒载药胶束是近年来在抗癌药物载体领域的热门研究方向。

本实验合成了两种两亲性聚合物，即具有还原敏感性的Py-ss-PEG-ss-Py和没有还原敏感性的Py-PEG-Py。并并通过核磁图谱、红外图谱，验证了合成的材料的正确性。

通过制备这两种胶束的空白胶束，并测定了其胶束的临界胶束浓度。结果载药品和对照品都显示出较小的临界胶束浓度。这显示出该聚合物胶束具有对溶液稀释较高的抗性。胶束的粒径大约分布在50nm-110nm之间，且Py-ss-PEG-ss-Py胶束粒径普遍比Py-PEG-Py胶束的大，这是因为两者相比Py-ss-PEG-ss-Py胶束单体中的疏水基团相对较大，提高了胶束的粒径。

在模拟人体内环境的药物释放实验证明了，Py-ss-PEG-ss-Py胶束在类似于癌变部位的酸性环境中具有完全释放药品的性质，而在非癌变部位的正常pH环境中，Py-ss-PEG-ss-Py胶束和Py-PEG-Py胶束都能够维持一定程度的控释特性。另一方面，在还原性条件下，胶束确实发生了分解，这进一步证明了其还原敏感特性及其作为药物载体在选择性控释的能力上的优秀。

参考文献

[1] Aygun A, Pindur U. Chemistry and biology of new marine alkaliuds from the indole and annelated indole series[J]. Current Medicinal Chemistry, 2003, 10(13): 1113-1127.

[2] Gupta L, Talwar A, Chauhan P M S. Bis and tris indole alkaloids from marine organisms: new leads for drug discovery [J]. Current Medicinal Chemistry. 2007, 14(16): 1789-1803.

[3] Chen C, Lieberman D R, Larsen R D, *et al*. [Synthesis of the 5-HT1D receptor agonist MK-0462 via a Pd-catalyzed coupling reaction](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0040403994882045) [J]. Tetrahedron Letters, 1994, 35(38): 6981-6984.

[4] Sundberg J R. Indoles, Best Synthetic Methods[M]. San Diego: Academic Press, 1996.

[5] 鲁敏. 生物活性天然产物药物化学的机遇与挑战[J]. 国外科技新书评介, 2012(7): 13-13.

[6] 袁明月. 噻唑类杂环化合物的合成及生物活性研究[D]. 河北农业大学, 2012.

[7] 李松, 肖军海, 蒋宪成, 等. 2, 4, 5 -三取代噻唑类化合物、其制备方法、药物组合物及其制药用途[P]. CN 101096363 B, 2011-08-12.

致谢

□□□□□

附录

附录1

□□□□□