

以聚乳酸-*b*-聚乙二醇-*b*-聚乳酸二丙烯酸酯为交联剂的 pH 响应型水凝胶的制备及药物控制释放研究

徐 亮 赵 景 陈泽旭 李松彦 盛 扬 孙一新 张 嵘*

(常州大学材料科学与工程学院,常州 213164)

摘 要 采用开环聚合的方法合成了两种不同分子量的聚乙二醇-聚乳酸嵌段共聚物二醇,用丙烯酸酯封端后得到大分子交联剂聚乳酸-*b*-聚乙二醇-*b*-聚乳酸二丙烯酸酯(PELAMA)。它们与 *N*-异丙基丙烯酰胺(NIPAM)、丙烯酸(AA)及光引发剂混合后由紫外光引发聚合生成了可生物降解的水凝胶聚乙二醇聚乳酸二丙烯酸酯-丙烯酸-*N*-异丙基丙烯酰胺(PELAMA-AN)。并对 PELAMA-AN 进行了表征。研究表明:PELAMA-AN 在 pH=7.4、pH=1.2 的条件下,溶胀率分别为 1000%~2000%、400%~500%,盐酸阿霉素释放 10h 的累积释放率分别为 20%~40%、50%~60%,并且可以随着 pH 的变化反复切换。PELAMA-AN 具有应用于口服药物载体的潜力。

关键词 pH 响应型水凝胶,平衡溶胀率,可生物降解,药物缓释,聚乳酸嵌段共聚物

Preparation of pH-responsive hydrogel based on triblock copolymer of polyL-lactate and polyethylene glycol for controlled drug release

Xu Liang Zhao Jing Chen Zexu Li Songyan Sheng Yang Sun Yixin Zhang Rong

(Material Chemistry Department, School of Materials and Engineering, Changzhou University, Changzhou 213164)

Abstract Two kinds of triblock copolymer diols of poly *L*-lactate (PLLA) and polyethylene glycol (PEG) were synthesized by ring-opening polymerization. The copolymers were end-capped with methacrylate to form macro-crosslinker poly (*L*-lactide)-*b*-polyethylene glycol-*b*-poly (*L*-lactide) dimethacrylates (PELAMA) for preparation of pH-responsive hydrogel poly (PELAMA-Acrylic acid-*N*-isopropylacrylamide) (PELAMA-AN) through photopolymerization using *N*-isopropylmethacrylamide (NIPAM), acrylic acid (AA) as monomers. PELAMA was characterized with FT-IR and ¹H-NMR. The swelling ratio of hydrogels in PBS at various pH values was studied. Simultaneously degradation property and the controlled drug release behavior of hydrogels were also investigated. The results showed that PELAMA-ANs were typical pH-responsive hydrogels. The swelling ratio (1000%~2000%) of hydrogels in pH=7.4 PBS was two times bigger than that in acidic environment (pH=1.2) (400%~500%). Meanwhile, the periodically swelling/deswelling property of the hydrogels was observed by switching the pH values. It was found that the release rate of the doxorubicin hydrochloride at acidic condition (20%~40%) was smaller than that in a neutral environment (50%~60%) with in 10h. Also, the hydrogel released drug killed HeLa cells, which indicated that the PELAMA-AN hydrogels had the potential to be used as anticancer drug carriers.

Key words pH-responsive hydrogel, equilibrium swelling ratio, biodegradation, controlled drug release, PLLA block copolymer

刺激响应型水凝胶特别是 pH 响应型水凝胶受到科研人员广泛关注的重要功能材料之一。研究表明, pH 响应型水凝胶随着 pH 的变化,其侧链的基团会发生离子化,使得水凝胶带上固定的电荷,在离

子间静电作用下导致水凝胶的平衡溶胀率发生显著变化,或者通过改变溶剂离子强度来引起链段的聚集,使其溶胀率发生变化^[1-2]。盐酸阿霉素是一种广谱抗肿瘤药物,主要通过抑制癌细胞遗传物质核酸

基金项目:国家自然科学基金(21374012);江苏省自然科学基金(BK20160278)

作者简介:徐亮(1990-),男,硕士,主要从事功能性高分子材料及生物材料的研究。

联系人:张嵘(1969-),男,博士,教授,硕士生导师,主要从事功能性高分子材料及生物材料的研究。

的合成达到杀灭肿瘤细胞的功效^[3]。在临床医疗中,由于分子链结构中存在酯键、肽键(酰胺键)等,生物可降解水凝胶在体内环境中能够发生水解降解、酶降解等,因而不用经过二次手术取出植入物^[4-5]。生物可降解的 pH 响应型水凝胶可以通过环境中 pH 的变化控制药物的释^[6],以达到更好的治疗效果。本研究通过开环聚合合成了一种可光固化的含有聚乳酸的大分子单体作为交联剂聚乳酸-*b*-聚乙二醇-*b*-聚乳酸二丙烯酸酯(PELAMA),以 *N*-异丙基丙烯酰胺、丙烯酸为单体,利用紫外光引发聚合制备了生物可降解并且具有 pH 响应性的水凝胶聚乙二醇聚乳酸二丙烯酸酯-丙烯酸-*N*-异丙基丙烯酰胺(PELAMA-AN),并对其平衡溶胀率、动态溶胀/消溶胀行为、磷酸盐缓冲溶液(PBS)中的降解情况和药物释放等特性进行了测试和分析。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

聚乙二醇(PEG, M_w 4000, 分析纯), 上海凌峰化学试剂有限公司; *L*-丙交酯(分析纯), 长春圣博玛生物材料有限公司; 三乙胺、二氯甲烷, 均为分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 甲基丙烯酸酐、*N*-异丙基丙烯酰胺(NIPAM)、丙烯酸(AA)、盐酸阿霉素、艾科试剂[辛酸亚锡、2-羟基-4-(2-羟乙氧基)-2-甲基苯丙酮], 均为分析纯, 天津希恩思生化科技有限公司。

傅里叶红外光谱测试仪(FT-IR, Nicolet Avatar 370 型), 美国尼高力公司。核磁共振仪(¹H-NMR, Avance III-400 型), 德国布鲁克公司。

1.2 PELAMA 制备

称取 20g PEG(M_w 4000)置于 100mL 圆底烧瓶中, 110℃ 抽真空。PEG(M_w 4000)与 *L*-丙交酯摩尔配合比为 1:2 或 1:5, 催化剂辛酸亚锡的用量为单体的 0.5%(wt, 质量分数, 下同), 按比例加入 *L*-丙交酯和催化剂后在 130℃ 反应 12h, 将得到的产物溶解在二氯甲烷中, 在过量的正己烷和冰乙醚的混合溶液中沉淀, 离心分离出的产物采用真空干燥箱(DZF-6210 型, 上海一恒科技有限公司)50℃ 干燥 24h, 将产物置于 4℃ 冰箱中备用。将得到的两种聚乳酸和聚乙二醇的嵌段共聚物(PELA)分别记为 PELA-2, PELA-5, 产率分别为 91%, 93%。称取 20g PELA 单体, 溶解于 200mL 二氯甲烷, 置于冰水浴中。根据化学反应当量配合比(下同)采用

PELA: 甲基丙烯酸酐: 三乙胺为 1:4:4, 用恒压滴液漏斗逐滴依次加入三乙胺和甲基丙烯酸酐, 搅拌 2h, 采用恒温油水浴锅(XMTE-7000 型, 上海申顺生物科技有限公司)30℃ 条件下反应 48h。产物于冷的无水乙醚: 无水甲醇: 正己烷混合溶液(10:1:1, 体积配合比)中沉淀, 抽滤, 如此反复提纯 3 次, 即制得 PELAMA^[7-8]。将产物在常温下真空干燥 24h, 产率分别为 85%、82%。产物置于 4℃ 冰箱中保存备用。

1.3 pH 响应型生物可降解水凝胶的制备

水凝胶采用紫外光固化的方法制得。以 PELAMA 为大分子交联剂, NIPAM、AA 为活性稀释剂, 制备生物可降解水凝胶 PELAMA-AN。PELAMA-AN 制备配方见表 1。根据表 1 制备配方, 依次称取一定质量的 PELAMA、AA 及 NIPAM 溶解在三蒸水中, 加入 1%(相对于单体质量)的光引发剂 I_{2959} , 搅拌均匀, 通 N₂ 5min, 以除去体系中的 O₂。称取 120μL 混合均匀的单体溶液至聚四氟乙烯(PTFE)模具中(直径 12mm, 深度 1mm), 紫外固化 10min, 即制得 PELAMA-AN。将制得的 PELAMA-AN 置于蒸馏水中浸泡 24h, 以除去未反应的单体。然后将浸泡后的 PELAMA-AN 置于 50℃ 真空干燥箱干燥至恒重, 备用。不同配方制得的样品分别记为 S1、S2、S3、S4 和 S5。

表 1 PELAMA-AN 制备配方^①

样品	PELAMA-2:AA:NIPAM	PELAMA 用量/%
S1(PELAMA-AN-2-70)	70:30:0	70
S2(PELAMA-AN-2-55)	55:25:20	55
S3(PELAMA-AN-2-40)	40:20:40	40
样品	PELAMA-5:AA:NIPAM	PELAMA 用量/%
S4(PELAMA-AN-5-55)	55:25:20	55
S5(PELAMA-AN-5-40)	40:20:40	40

注:①PELAMA-AN-2-70 是含有 70% PELAMA-2 的水凝胶; PELAMA-AN-5-55 是含有 55% PELAMA-5 的水凝胶。其余类推。

1.4 pH 响应型样品性能表征

1.4.1 溶胀率测试

分别将 PELAMA-AN 浸在 pH=7.4 和 pH=1.2 的缓冲溶液(PBS)中(37℃), 溶胀 48h, 取出 PELAMA-AN, 并用滤纸除去表面的 PBS 溶液, 称重, 记为 W_t 。PELAMA-AN 的动态溶胀/消溶胀的

测定是通过将其先浸在 pH=7.4 的 PBS 中,在规定的时间内,计算 PELAMA-AN 溶胀率的变化,浸 48h 后,取出并转移到 pH=1.2 的 PBS 中,12h 后,称取溶胀后 PELAMA-AN 的质量,重复上述操作 3 次。溶胀率计算见式(1)。

$$\text{溶胀率} = \frac{W_t}{W_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中, W_t 为样品溶胀后的质量, g; W_0 为样品原来的质量, g。

1.4.2 生物可降解性能测试

将 PELAMA-AN 置于 PBS 溶液中进行水解降解(0.01mol PBS, pH=7.4)。将每一种 PELAMA-AN 样品分别置于对应的六孔板中,每个孔板中加入 8mL 的降解液,采用气浴恒温振荡器(THZ-82B 型,常州申光仪器有限公司)37℃, 90r/min,模拟体液进行降解。在预定的时间内取出 PELAMA-AN,在三蒸水中洗涤 3 次以除去盐溶液,再将 PELAMA-AN 采用真空干燥箱(DZF-6210 型,上海一恒科技有限公司)50℃干燥至恒重。称取干燥后 PELAMA-AN 的质量(M_t),失水率计算见式(2)。

$$\text{失水率} = \frac{M_0 - M_t}{M_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中, M_0 为样品干燥前的质量, g; M_t 为样品干燥后的质量, g。

1.4.3 药物控制释放测定

将包载有盐酸阿霉素药物的水凝胶分别置于六孔板中,加入 8mL 的释放介质(pH=1.2 的 PBS 模拟胃液, pH=7.4 的模拟肠液),置于气浴恒温振荡器(THZ-82B 型,常州申光仪器有限公司)中(37℃, 90r/min),模拟其在体内的药物释放行为。分别在预定的时间取出 4mL 的释放液,并且补充同等体积的新鲜模拟液。采用紫外-可见分光光度计(UV-Vis, UV-mini 1240 型,日本岛津公司)测定药物释放的含量。盐酸阿霉素药物释放的累计百分数计算见式(3)。

$$Q = C_n V_t + V_s \sum C_{n-1} \quad (3)$$

式中, Q 为药物释放的质量, g; C_n 是在预定的时间内释放的盐酸阿霉素的浓度, mg/mL; V_t 是药物释放介质的体积($V_t=8\text{mL}$), mL; V_s 为取出的药物体积($V_s=4\text{mL}$), mL。

1.4.4 负载药物水凝胶的细胞毒性表征

将包载盐酸阿霉素的 PELAMA-AN 置于 8mL 高糖细胞培养基(H-DMEM)溶液中,收集 PELAMA-

AN 在 12h 的释放液。用含有药物释放液的 H-DMEM[分别为 0% (wt, 质量分数, 下同)、10%、20%、50%、100%]为培养液在细胞培养箱中培养 HeLa 细胞 24h(48 孔板)。移除培养液,在每孔中分别加入 200 μL 含有细胞活性检测试剂(CCK-8)(10 μL)的 H-DMEM,在细胞培养箱中培养 2h 后,从每孔中依次取出 100 μL 液体移至 96 孔板中,用酶标仪(EPOCH 型、美国 BioTek 公司)测量在 450nm 处的吸收值,以比较 HeLa 细胞的生存率,从而评估水凝胶的药物缓释性能以及杀灭癌细胞的能力。细胞生存率计算见式(4)。

$$\text{细胞生存率} = \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}}{A_0 - A_{\text{blank}}} \times 100\% \quad (4)$$

式中, A_{sample} 表示含有药物释放液的 H-DMEM 在培养细胞后测得的吸光度; A_{blank} 是空白孔(没有细胞)的 H-DMEM 的吸光度; A_0 是不含药物释放液的 H-DMEM 培养 HeLa 细胞后的培养液的吸光度。

2 结果与讨论

2.1 FT-IT 分析

PEG、PELA、PELAMA 的 FT-IR 谱图见图 1。从图可以看出,在 PELA 谱图中,在 1741 cm^{-1} 以及 1110 cm^{-1} 的特征吸收峰对应于酯键以及醚键,说明成功合成了 PELA 三嵌段二醇共聚物;对比 PELAMA 谱图,在 1600 cm^{-1} 的吸收峰强度增加,这主要是由于甲基丙烯酸酐封端三嵌段二醇 PELA 后,分子链两端接上了碳碳双键,形成大分子交联剂。

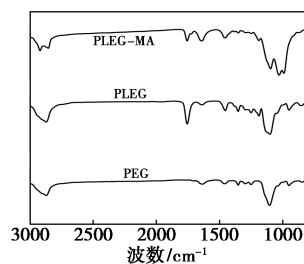


图 1 PEG、PELA、PELAMA 的 FT-IR 谱图

2.2 $^1\text{H-NMR}$ 分析

PELA(a)、PELAMA(b)的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图见图 2。从图可以看出,PELA 的特征位移: 3.6×10^{-6} (PEG 亚甲基质子)、 1.45×10^{-6} [$\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$ PLLA 末端甲基质子]、 1.5×10^{-6} (CHCH_3 PLLA 链段甲基质子)、 5.1×10^{-6} (CHCH_3 PLLA 链段次甲基质子)、 $4.3 \sim 4.4 \times 10^{-6}$ [$\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$]、

4.2~4.3(CH₂OCO,连接 PEG 与 PLLA 链段上亚甲基质子);对比 PELAMA 的特征位移:1.9×10⁻⁶[C(CH₃)=CH₂ 甲基丙烯酸酐上甲基质子]、5.6×10⁻⁶和 6.2×10⁻⁶[C(CH₃)=CH₂ 甲基丙烯酸酐上末端亚甲基顺反质子],说明成功合成了甲基丙烯酸酐封端的大分子单体 PELAMA。

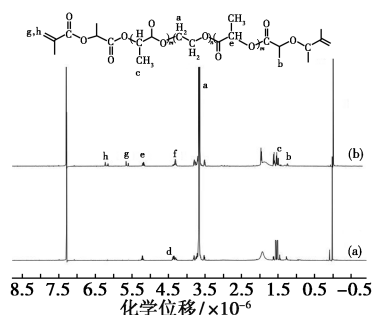


图 2 PELA(a)、PELAMA(b)的¹H-NMR 谱图

2.3 动态溶胀/消溶胀行为分析

pH 的周期性变化使得 PELAMA-AN 的溶胀率呈现动态可逆的变化。PELAMA-AN 周期性动态溶胀/消溶胀变化图见图 3。从图可以看出,在中性环境中(pH=7.4),PELAMA-AN 的溶胀率显著增加,溶胀 48h 后,S5 样品达到 2300%,溶胀率相对较少的 S1 样品也达到 1000%;在酸性环境中(pH=1.2)溶胀 12h 后,5 种 PELAMA-AN 样品的溶胀率下降至 400% 左右;周期性变化 pH,PELAMA-AN 的溶胀率呈现出溶胀/消溶胀的动态变化。主要是由于在酸性环境中,盐酸阿霉素分子中的—COOH 与水凝胶链段上—COOH 以及 PEG 链段中氧原子形成氢键相互作用,水凝胶的溶胀率较小;在中性环境中,由于—COOH 电离产生—COO⁻,含负电荷的链段之间相互排斥,导致三维网状结构变得松散,有利于水分子的进入,导致溶胀率显著增大。

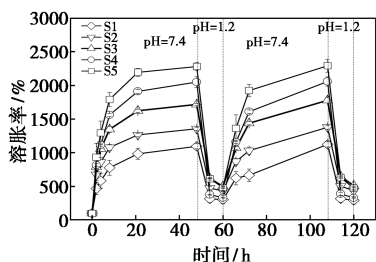


图 3 PELAMA-AN 周期性动态溶胀/消溶胀变化图

2.4 生物可降解性能分析

PELAMA-AN 在 PBS 溶液(pH=7.4)中发生水解降解的情况见图 4。从图可以看出,PELAMA-

AN 在 PBS 溶液中发生明显的降解,样品 S4 和样品 S5 的降解速率比样品 S1、样品 S2 及样品 S3 的大,这主要是由于与交联剂 PELAMA-5 相比,交联剂 PELAMA-2 大分子的相对分子量较小,在加入相同用量交联剂条件下,由于小分子量的交联剂能够引入更多的碳碳双键,因而制得的样品交联密度较大,导致三维网络结构较紧密,降解液进入 PELAMA-AN 内部较困难,降解速率相对较缓慢;同时对比以 PELAMA-2 为交联剂制得的样品 S1、样品 S2 以及样品 S3,当 PELAMA-2 用量不断降低时,单体预聚液中的双键含量减少,制得的 PELAMA-AN 内部结构较疏松,有利于降解液的进入,导致 PELAMA-AN 降解速率不断加快。

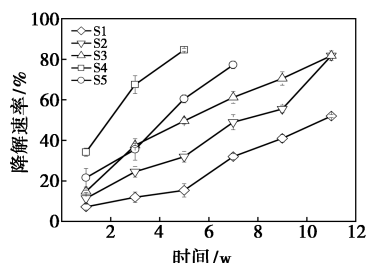


图 4 PELAMA-AN 降解速率变化图

2.5 释放性能分析

PELAMA-AN 在 pH=7.4(a)、pH=1.2(b)条件下盐酸阿霉素的累计释放率见图 5。从图可以看出,PELAMA-AN 在 pH=1.2 的酸性条件下的释放盐酸阿霉素的速率更加缓慢,没有明显的突释,并且释放时间长达 10h 以上;样品 S1 与样品 S2 的累积释放率为 20%,样品 S3、样品 S4 和样品 S5 的累积释放率为 40%,10h 后基本达到平衡,大量的盐酸阿霉素药物储存在 PELAMA-AN 中没有释放出来,这主要是由于在酸性环境下,盐酸阿霉素分子中的—COOH 与 PELAMA-AN 链段上的—COOH 以及 PEG 链段中氧原子形成氢键相互作用,PELAMA-AN 的溶胀率较小,导致盐酸阿霉素分子释放速率较缓慢;相反,在 pH=7.4 的中性环境下,释放 1h 后,5 种 PELAMA-AN 中盐酸阿霉素的累积释放率达 15%~20%。释放 10h 后,样品 S1、样品 S2 及样品 S4 的累积释放率达到 50%,样品 S3 以及样品 S5 的累积释放率达到 60%左右,并且还有持续释放的趋势。这主要是由于在中性环境下,—COOH 电离变成—COO⁻,产生了离子间的相互排斥作用,导致 PELAMA-AN 内部结构变得松散,溶胀率增加,所以药物的释放速率加快。因而

PELAMA-AN 具有应用于口服药物载体的潜力,可以将包载有盐酸阿霉素的 PELAMA-AN 通过口服载入,在进入胃部 1~3h, PELAMA-AN 呈收缩状态,药物释放速率小,在进入肠部前能保存大量药物,随后在肠部中性环境中进行持续较快的药物释放。

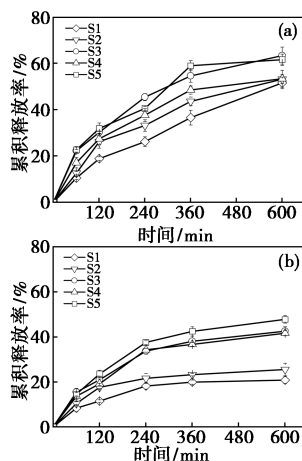


图 5 盐酸阿霉素在 pH=7.4(a)、pH=1.2(b)的累积释放率

2.6 HeLa 细胞生存能力分析

负载有盐酸阿霉素的 PELAMA-AN 在 H-DMEM 培养基中释放 12h 后,得到的释放液按比例加入 H-DMEM 培养基中培养 HeLa 细胞 24h,通过 CCK-8 试剂测定细胞的生存率见图 6。从图可以看出,HeLa 细胞的生存率降低至 60%左右,5 种样品作为载体释放的盐酸阿霉素都具有类似杀死癌细胞的能力。

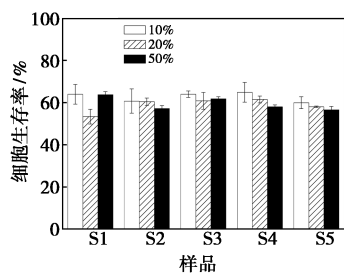


图 6 HeLa 细胞在含有 PELAMA-AN 释放液培养基的生存率

3 结论

以 PEG4000 引发 L-丙交酯开环聚合,制备得到三嵌段二醇 PELA,再利用甲基丙烯酸酐封端,成功合成了大分子单体 PELAMA。

以 PELAMA 为大分子交联剂,N-异丙基丙烯酰胺,丙烯酸作为活性稀释剂,通过紫外光引发聚合制备的 PELAMA-AN 水凝胶在中性环境的 PBS 缓冲液中具有较大的溶胀率,而溶胀率随着 pH 从 7.4 降到 1.2 时发生显著降低,并且随着 pH 的周期性变化呈现可逆的溶胀/消溶胀转换。PELAMA-AN 水凝胶的交联程度对水凝胶的降解速率、压缩模量、药物释放速率都有明显影响。

PELAMA-AN 水凝胶由于具备明显的 pH 响应能力,在酸性环境下释放的盐酸阿霉素的速率比在中性环境下缓慢,因而具有应用于口服药物载体的潜力。

参考文献

- [1] 高青雨,张玉娟,俞贤达.温度及 pH 敏感性 N-乙烯基吡咯烷酮与丙烯酸 β -羟基丙酯共聚物/聚(丙烯酸)互穿网络水凝胶的合成及其性能研究[J].高分子学报,2001(3):329-332.
- [2] Jiang B, Li B. Tunable drug loading and release from polypeptide multilayer nanofilms[J]. Int J Nanomedicine, 2009, 4(1): 37-53.
- [3] Medina S H, Chevliakov M V, Tiruchinapally G, et al. Enzyme-activated nanoconjugates for tunable release of doxorubicin in hepatic cancer cells[J]. Biomaterials, 2013, 34(19): 4655-4666.
- [4] 邓超,王荣,陈维,等.具生物活性的快速光交联生物可降解水凝胶的设计合成[J].高分子学报,2013(5):695-704.
- [5] Hu X, Wang Y, Zhang L, et al. Redox/pH dual stimuli-responsive degradable Salcan-g-SS-poly(1A-co-HEMA) hydrogel for release of doxorubicin[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 155:242-251.
- [6] Pan Y J, Chen Y Y, Wang D R, et al. Redox/pH dual stimuli-responsive biodegradable nanohydrogels with varying responses to dithiothreitol and glutathione for controlled drug release[J]. Biomaterials, 2012, 33(27):6570-6579.
- [7] Hiemstra C, Zhou W, Zhong Z, et al. Rapidly in situ forming biodegradable robust hydrogels by combining stereocomplexation and photopolymerization[J]. Journal of the American Chemical Society, 2007, 129(32):9918-9926.
- [8] 冯学鹏,简鹏,丁琳,等.基于聚丙交酯的光固化型可生物降解聚氨酯丙烯酸酯的合成和表征[J].高分子学报,2016(7):949-958.

收稿日期:2016-12-06

修稿日期:2017-12-24