

# 多孔钽聚合物胶束复合型药物载体的构建及其对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响

福建省福州市第二医院骨科（福州 350007） 郑 萍 吴 星 康荣彬 吴立忠 詹 洋 陈 玲 李炜明<sup>1</sup>

**【摘 要】 目的** 以多孔钽为药物载体，负载聚合物载药胶束，制备多孔钽聚合物胶束复合型药物载体，并考察其负载药物对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响，为临床上药物缓释多孔钽棒治疗早中期股骨头缺血性坏死提供实验依据。**方法** 制备正、反相聚合物胶束，粒径电位测定仪测定正、反相聚合物胶束的粒径、多分散指数，计算包封率和载药率；通过将正、反相聚合物胶束与多孔钽相连接来制备多孔钽聚合物胶束复合型药物载体，考察不同药物载体随时间增长的药物释放量，并采用 MTT 法测定不同组载体对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响。**结果** 多孔钽棒组在 12~48 h 时，药物释放量最多，与其余各组差异均有统计学意义（ $P<0.05$ ）。多孔钽聚合物胶束复合型药物载体携带的正相药物释放与正相聚合物胶束携带的药物比，两组在各个时间点药物释放量比较，差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）。多孔钽聚合物胶束复合型药物载体携带的反相药物释放与反相聚合物胶束携带的药物比，两组在各个时间点药物释放量比较，差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）。正相、复合组较多孔钽棒及反相组显著的提高细胞增殖数量（ $P<0.05$ ），复合组与正相比较，差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）。**结论** 成功构建了多孔钽聚合物胶束复合型药物载体，且该复合载体具有与正、反相聚合物胶束相似的缓释效果，在早期能够降低药物释放量，促进 MC3T3-E1 细胞增殖。

**【关键词】** 多孔钽聚合物；复合型药物；MC3T3-E1 细胞

**【中图分类号】** R68 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1002-2600(2019)03-0120-04

股骨头缺血性坏死作为骨科常见病，其致病原因主要是由于过度饮酒、髋关节创伤、慢性肝病、长期服用激素等造成的股骨头血液供应障碍，从而导致了股骨头塌陷、骨小梁坏死、股骨头表面软骨坏死。然而大多数患者在出现功能障碍时，即股骨头已发生塌陷时才就诊，股骨头塌陷可导致髋关节骨性关节炎，需要患者进行全髋关节置换<sup>[1-2]</sup>。20 世纪 90 年代以来，将聚合物胶束的药物传递系统作为治疗人类重大疾病的有效手段进行研究<sup>[3]</sup>，聚合物胶束这种纳米载药体系，具有优良的组织渗透性、载药范围广、结构稳定、体内滞留时间长、能使药物有效地到达靶点等特点，是具有发展前景的药物载体<sup>[4]</sup>，但同时将正、反相聚合物胶束连接到同一载体上的报道极少。本研究拟制备正、反相聚合物胶束，再将正、反相聚合物胶束与多孔钽相连接来制备多孔钽聚合物胶束复合型药物载体，考察

不同药物载体随时间增长的药物释放量，并采用 MTT 法测定不同组载体对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响，为临床上药物缓释多孔钽棒治疗早中期股骨头缺血性坏死提供实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料：**二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000（DSPE-PEG2000，西安瑞禧生物科技有限公司）；阿仑膦酸钠（石家庄欧意药业有限公司）；TPGS（新昌制药厂）；双氯芬酸钠（didofenac，Dof，美国 Sigma 公司产品）；MC3T3-E1 前成骨细胞系、恒温细胞培养箱（美国热电 Thermo forma）；冻干机（ES-2030，日本 Hitachi 公司）；场发射扫描电镜（日本 JEOL 公司）；真空干燥箱（大连第四仪器厂）；ZetaPlus 粒径电位测定仪（美国 Brookhaven 公司）；电子天平（德国 Sartorius 公司）；TGL—16G 高速离心机（上海安亭科学仪

基金项目：福建省自然科学基金资助项目（2016J01480）；福州市 2015 年市级临床重点专科建设项目（骨科）

<sup>1</sup> 通信作者

器厂)。

## 1.2 方法:

1.2.1 正相聚合物胶束的制备和表征: 称取一定量的 TPGS 和阿仑膦酸钠溶于二氯甲烷, 充分溶解后, 除去残余的有机溶剂, 真空干燥过夜。加入去离子水, 振荡超声, 形成聚合物胶束。胶束经粒径电位测定仪测定粒径、多分散指数。高速离心除去胶束中的游离药物, 细胞粉碎仪破碎上清液, 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 滤液即为载药胶束。适量的无水乙醇与离心前的 1 mL 胶束溶液和载药胶束溶液混溶, 超声破坏胶束结构后, 稀释至 10 mL, 精密吸取 0.1 mL 用无水乙醇稀释至 10 mL, 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 测定胶束中双氯芬酸钠的含量, 计算包封率; 在  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下预冻载药胶束溶液 24 h, 冻干机冻干 12 h, 得到胶束冻干品。称取胶束冻干品, 加入无水乙醇, 超声后, 测双氯芬酸钠的质量, 计算载药量。包封率及载药量计算公式如下: 包封率 (%) = 胶束中的阿仑膦酸钠的含量 / 阿仑膦酸钠的投药量  $\times 100\%$ ; 载药率 (%) = 胶束中的阿仑膦酸钠的质量 / 载阿仑膦酸钠胶束的总质量  $\times 100\%$ 。

1.2.2 反相聚合物胶束的制备和表征: 分别称取一定量的 DSPE-PEG2000、双氯芬酸钠、三氯甲烷置于 25 mL 茄形瓶中, 充分溶解后, 真空干燥 6 h, 除去残余的三氯甲烷, 置于冰箱中  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。用粒径电位测定仪测定胶束的粒径、多分散指数。取 50 mL 量瓶中, 加入精密称取双氯芬酸钠 1.0 mg, 二甲基亚砜 1.0 mL, 等双氯芬酸钠完全溶解后, 加入去离子水, 并超声震荡, 使其形成均一相, 配置成制成质量浓度为 20  $\mu\text{g/mL}$  的色胺酮母液。基于母液, 配置质量浓度不等的双氯芬酸钠溶液, 并建立双氯芬酸钠标准曲线。取双氯芬酸钠纳米胶束 10 mg, 加入 400  $\mu\text{L}$  二甲基亚砜溶液, 使用上述方法测定其质量浓度。包封率及载药量计算与正相聚合物胶束相同。

1.2.3 多孔钽棒的表面处理: 采用化学阳极氧化法制备多孔钽棒, 能在钽金属表面形成具有纳米级孔的多孔五氧化二钽层。将多孔钽棒氧化后, 然后取出多孔钽棒, 用大量的去离子水冲洗, 再用超声清水器震荡 10 min, 取出烘干备用。

1.2.4 多孔钽棒与正反相聚合物胶束的连接: 实验分为多孔钽棒、正相聚合物胶束、反相聚合物胶束、多孔钽棒聚合物胶束复合型药物载体 4 组。多孔钽棒聚合物胶束复合型药物载体: 将消毒好的多孔钽

棒和配制好的正、反相聚合物胶束溶液混合放入无菌离心管中, 于振荡器上  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  过夜, 冷冻干燥备用。

1.2.5 不同组药物载体对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响: 4 组药物载体与 MC3T3-E1 细胞共培养 84 h, 并用 MTT 法测量并计算多个时间点细胞增殖率的变化。MTT 法测量细胞增殖率的具体步骤: 1) 先用灭菌 PBS 配制 MTT 溶液,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  冷藏保存; 2) 用胰酶消化细胞; 3) 离心细胞后培养液重悬; 4) 统计细胞并调整细胞密度, 在 96 孔板中每孔加入 200  $\mu\text{L}$  细胞悬液; 5) 每组每个时间点均为 3 复孔检测; 6) 记数时间点前 4 h 完全吸除待记数孔中的培养液, 加入 100  $\mu\text{L}$  相应的条件培养液和 20  $\mu\text{L}$  MTT 溶液; 7)  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下孵育 4 h; 8) 加入 100  $\mu\text{L}$  DMSO, 震荡 10 min, 完全溶解蓝紫色结晶物; 9) 在酶联免疫检测仪上测定各孔吸收值, 并记录结果; 10) 分别在第 12、24、48、60、72、84 h 记录, 每孔记数 3 孔, 取平均值。

1.3 统计学分析: 采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析。计量资料呈正态分布者以均数  $\pm$  标准差表示, 多组之间的两两比较采用 LSD- $t$  检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 正相聚合物胶束和反相聚合物胶束的表征: 正相聚合物胶束和反相聚合物胶束的载药量、包封率、粒径、多分散指数见表 1。

表 1 正相聚合物胶束和反相聚合物胶束的表征

项目	载药量/%	包封率/%	粒径/nm	多分散指数
正相聚合物胶束	19.61 $\pm$ 0.39	31.25 $\pm$ 1.77	26.48 $\pm$ 0.87	0.24 $\pm$ 0.03
反相聚合物胶束	28.35 $\pm$ 0.25	41.23 $\pm$ 2.12	89.49 $\pm$ 2.36	0.29 $\pm$ 0.03

2.2 多孔钽棒的表征: 在阳极氧化处理后, 显著改善了钽金属的防腐性能, 有助于促进细胞扩散和增殖, 增强蛋白质吸收能力, 多孔钽棒的孔容为 0.286  $\text{cm}^3/\text{g}$ 、平均孔径为 182.35 nm、比表面积为 62.12  $\text{m}^2/\text{g}$ 。

2.3 不同组药物载体缓释性能的检测: 不同组载体随时间变化的药物释放量不同。12 h 时多孔钽棒组释放了 70.34%, 而正相聚合物胶束、反相聚合物胶束及复合型药物载体的正、反相药物释放率分别为 55.45%、61.47%、58.44%、63.43%; 24 h 时多孔钽棒组释放了 82.12%, 正相聚合物胶束、反相聚合物胶束及复合型药物载体的正、反相药物

释放率分别为 77.59%、79.28%、76.38%、78.85%；此后多孔钽棒组释放率显著变缓，其他 3 组依旧保持良好的释放幅度；84 h 时 4 组的药物释放在 92.24% 与 94.44% 之间。

**2.4 多孔钽聚合物胶束复合型药物载体对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响：**由于携带的不同药物，随着时间的推移，正相、复合组较多孔钽棒及反相组显著地提高细胞增殖数量 ( $P < 0.05$ )，复合组与正相组比较，差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ，表 2)。

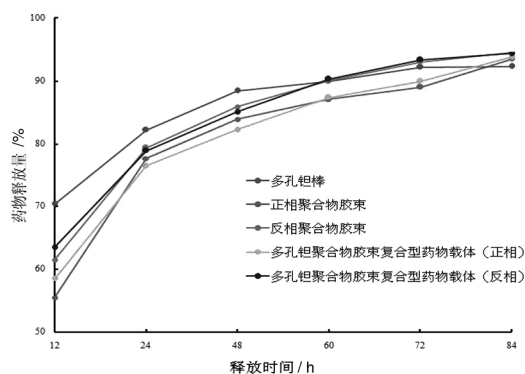


图 1 不同组载体随时间变化的药物释放量

表 2 不同组载体在不同时间对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响 (Abs,  $\bar{x} \pm s$ )

	1 d	3 d	5 d	7 d
多孔钽棒	0.064±0.009	0.176±0.010	0.321±0.025	0.547±0.053
反相聚合物胶束	0.057±0.008	0.182±0.012	0.334±0.031	0.539±0.058
正相聚合物胶束	0.132±0.015 * #	0.323±0.014 * #	0.551±0.047 * #	0.743±0.068 * #
多孔钽聚合物胶束复合型药物载体	0.128±0.016 * #	0.328±0.015 * #	0.549±0.029 * #	0.738±0.057 * #

注：与多孔钽棒比较，\*  $P < 0.05$ ；与反相聚合物胶束比较，#  $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

多孔钽作为局部用药的载体，具有高孔隙率、开放式结构的特点；为了控制药物的释放，延缓药物的释放速度，在将药物负载到多孔钽载体之前，先用聚合物胶束封装药物，然后再将聚合物胶束负载到多孔钽载体内部。用于载药体系的聚合物胶束一般通过由憎水链段和亲水链段构成的两亲嵌段聚合物自组装形成。亲脂性的核能够有效地溶解脂性药物，亲水性的壳层可使胶束溶于水，因此这种方法可有效增溶憎水性药物。目前，聚合物载药胶束是最具应用前景的载药体系之一<sup>[5-6]</sup>。

有研究表明，阿仑膦酸钠对成骨细胞的增殖影响有促进作用<sup>[7]</sup>，当阿仑膦酸钠浓度为  $1 \times 10^{-6}$ 、 $1 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-8}$  mol/L 时，能促进成骨细胞的增殖。而非甾体类抗炎药（双氯芬酸钠）具有良好的镇痛、抗炎、抑制细胞活性等效果。本研究成功制备了正、反相聚合物胶束及复合型药物载体，粒径电位测定仪测定正、反相聚合物胶束的粒径、多分散指数，计算包封率和载药率；通过将正、反相聚合物胶束与多孔钽相连接来制备多孔钽聚合物胶束复合型药物载体，考察不同药物载体随时间增长的药物释放量，并采用 MTT 法测定不同组载体对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响。结果表明，多孔钽聚合物胶束复合型药物载体携带的正相药物释放与正相聚合物胶束携带的药物比，两组在各个时间点药

物释放量差异无统计学意义。多孔钽聚合物胶束复合型药物载体携带的反相药物释放与反相聚合物胶束携带的药物比，两组在各个时间点药物释放量差异无统计学意义。正相、复合组较多孔钽棒及反相组显著地提高细胞增殖数量，复合组与正相组差异无统计学意义。因此说明通过对多孔钽棒进行阳极氧化处理后，不仅显著增加了多孔钽棒的防腐性能，还促进细胞的扩散和增殖，表现了良好的生物相容性。复合型药物载体同时携带正、反相药物，不仅在治疗股骨头缺血性坏死时具有消炎作用，还能够同时促进 MC3T3-E1 细胞，加快患者康复。

总之，目前国内外尚少见多孔钽棒与正、反相聚合物胶束联合运用于 MC3T3-E1 细胞的报道，本文将通过将多孔钽棒、正、反相药物 3 者结合运用，为临床上药物缓释多孔钽棒治疗早中期股骨头缺血性坏死提供实验依据，在后续研究中将进一步在小鼠模型上进行实验，使之能更好运用于临床。

### 参考文献

- [1] Aaron R K, Gray R L. Osteonecrosis: etiology, natural history, pathophysiology, and diagnosis [M] // Callaghan J J, Rosenberg A G, Rubash J E. The adult hip. Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins, 2007: 463-476.
- [2] Steinberg D R, Steinberg M E. Osteonecrosis: an overview [J]. Techniques in Orthopaedics, 2008, 23 (1): 2-10.

(下转第 141 页)

(上接第 122 页)

- [3] 李伟, 段晓, 范黎, 等. 叶酸介导的聚乙二醇-聚苹果酸-喜树碱聚合物前药的制备和性质初探 [J]. 西北药学杂志, 2013, 28 (4): 396-399.
- [4] 郭松岩, 崔明凤, 周青, 等. PMLA-PEG-TAT 纳米接枝物的合成和生物活性研究 [J]. 西北药学杂志, 2015, 30 (2): 176-181.
- [5] 康爽明, 胡海洋, 胡婵娟, 等. pH 敏感释药两亲性壳聚糖共聚

物胶束的制备及其性质考察 [J]. 沈阳药科大学学报, 2011, 28 (1): 6-11.

- [6] Han N R, Moon P D, Kim H M, et al. Tryptanthrin ameliorates atopic dermatitis through down-regulation of TSLP [J]. Arch Biochem Biophys, 2014 (542): 14-20.
- [7] 吴宗键, 王继芳, 卢世璧, 等. 阿仑膦酸钠对人成骨细胞增殖的影响 [J]. 中国矫形外科杂志, 2002, 9 (5): 464-466.