

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学号: 24520101153374

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

载药乙酰化普鲁兰纳米粒子的制备及性能  
评价

Preparation and evaluation of drug-loaded pullulan acetate  
nanoparticles

杨向瑞

指导教师姓名: 张其清 教授

侯振清 副教授

专业名称: 药物化学

论文提交日期: 2013 年 月

论文答辩日期: 2013 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2013 年 月

---

双载药乙酰化普鲁兰粒子的制备及性能评价	2.5cm
杨向瑞	
指导教师	
张其清	
教授	
侯振清	
副教授	
厦门大学	2.5cm

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ ）课题（组）的研究成果，获得（ ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ ）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于     年   月   日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年        月

## 摘 要

目前,恶性肿瘤正在严重威胁着人类的健康,而化疗药物存在抗肿瘤选择性及靶向性差和毒副作用大等缺点,治疗效果不理想,并给患者带来极大的痛苦。因此,如何提高抗癌药物的靶向性及治疗效果,减少毒副作用,进而提高肿瘤患者的生活质量,成为如今肿瘤治疗的首要命题。细胞膜表面普遍存在叶酸受体,肿瘤细胞膜表面上的叶酸受体的数量及活性显著高于一般正常细胞,而且叶酸与该受体的结合具有高度特异性和选择性。因此,可以利用叶酸介导靶向给药系统来介导药物靶向。甲氨蝶呤是一种叶酸拮抗剂,与叶酸有着极其相似的结构,其与叶酸受体的也有一定的亲和力,因此同样可以利用甲氨蝶呤修饰的纳米给药系统来介导药物靶向。而且甲氨蝶呤作为临床常用药,还具有很好的抗癌治疗效果。

本研究目的在于开发一种甲氨蝶呤修饰的、粒径可控的纳米粒,载药后使其成为一种双载药、可主动靶向肿瘤组织的抗肿瘤给药系统。

研究内容:(1)利用乙酸酐疏水化修饰普鲁兰多糖,合成不同取代度的乙酰化普鲁兰多糖衍生物(PA);(2)将叶酸(FA)或甲氨蝶呤(MTX)连接到取代度较低的PA上,使其具有主动靶向性,通过红外光谱法及核磁共振法进行结构验证;(3)透析法制备空白纳米粒子以及包裹多西紫杉醇的载药纳米粒子;(4)通过细胞毒性试验(MTT),验证普鲁兰纳米粒子对肿瘤的抑制作用。

研究结果:(1)成功合成了双亲性的、叶酸或甲氨蝶呤修饰的PA。(2)利用透析法成功制备出了粒径在200~500 nm的纳米粒子。(3)经叶酸修饰,并载有多西紫杉醇的PA纳米粒子载药量为1.9%、包封率为20.6%。(4)经甲氨蝶呤修饰,并载有多西紫杉醇的PA纳米粒子,多西紫杉醇的载药量为2.3%,包封率为24.4%,MTX的载药量为30.4%。(4)MTT结果显示,双载药的PA纳米粒子的细胞毒性明显高于载有相同量的甲氨蝶呤和多西紫杉醇的纳米粒子之和。

**关键词:** 主动靶向; 抗肿瘤; 乙酰化普鲁兰纳米粒; 双载药系统

## Abstract

Presently, malignant tumor is a serious threat to human health. Chemotherapy is usually impotent in effectible treatment according to its unfavorable specificity towards tumors and great side effects which leading to great pain to the patients. As a result, the most important challenge for researchers is to improve the specificity and safety of anti-cancer drugs, reduce side effects, to ameliorate the quality of patients' life. FA receptor, a specific and high affinity receptor for FA, has been found to be widely distributed on the cancer cell and generally overexpressed on the membrane surface of cancer cell, while it is highly restricted in the normal cell in a proof-of-principle experiment. As such, one pivotal strategy to develop the effective nanoparticle-based drug delivery system is the functionalization of a targeting ligand such as FA on the surface of nanoparticles via FA receptor mediated endocytosis. MTX is an analogue of FA because of chemical structure of MTX analogous to that of FA, regardless the key features that MTX has an amino group whereas FA has a hydroxyl group at the 4-position of pteridine ring. Despite the lower affinity of FA receptor for MTX compared to FA, MTX can specifically bind to FA receptor. And, MTX is a widely effective anticancer drug in clinic application by virtue of its inhibition of enzymatic activity of dihydrofolate reductase (DHFR) protein localized in the cytosol in cellular FA metabolism. For this reason, MTX exhibits not only an apoptosis-inducing effect but also a potentially targeting effect. So, one would wonder whether it is possible to take advantage of its novel dual-acting role to develop the targeted nanoparticle-based drug delivery system.

The present work includes: (1) Synthesize pullulan acetate (PA) with acetic anhydride. (2) Folate and MTX were coupled to pullulan acetate (PA). The product was characterized by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. The degree of folate and MTX substitution (DS) calculated by ultraviolet spectrometry is 0.243 and 0.261 per sugar residues of PA. (3) Folate (or MTX) conjugated pullulan acetate nanoparticles and DTX-loaded nanoparticles were prepared by dialysis method. (4) Cytotoxicity test,

were performed to study the behavior of the drug system

The main findings are as follows: (1) Successful synthesis of folic conjugated acetate pullulan and methotrexate conjugated acetate pullulan; (2) The folate acid modified DTX-loading nanoparticles (DTX-FPA-NPs), MTX modified nanoparticles (MPA-NPs) and MTX modified DTX-loading nanoparticles (DTX-MPA-NPs) were prepared. DTX-FPA-NPs' drug-loading and entrapment efficiency respectively were 1.9% and 20.6%. MPA-NPs' MTX-loading efficiency were 31.1%. DTX-MPA-NPs's MTX-loading and DTX-loading efficiency respectively were 2.3% and 30.4%. (3) It's shown by Cytotoxicity test, DTX-MPA-NPs is higher cytotoxic than DTX-FPA-NPs and MPA-NPs.

**Key words:** Pullulan nanoparticles; active targeting; double drug loading

# 目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
<b>第一章绪论 .....</b>	<b>1</b>
1.1 肿瘤的危害.....	1
1.2 纳米给药系统.....	1
1.3 纳米给药系统的载体材料.....	3
1.4 普鲁兰多糖及其衍生物作为纳米药物载体的研究概况.....	7
1.5 叶酸的概述.....	8
1.6 甲氨蝶呤.....	12
1.7 多西紫杉醇.....	13
1.8 课题的提出和研究内容.....	16
参考文献.....	18
<b>第二章乙酰普鲁兰的合成与修饰 .....</b>	<b>24</b>
2.1. 前言.....	24
2.2. 材料与方法.....	25
2.3. 结果与讨论.....	30
2.3.1 PA 的合成及取代度测定.....	30
2.3.2 PA 的红外光谱分析.....	30
2.3.3 核磁共振波谱分析.....	31
2.3.4 最低乙酰取代度的普鲁兰的合成.....	33
2.3.5 FPA 的合成及叶酸取代度测定.....	33
2.3.6 MPA 的合成及叶酸取代度测定.....	36
2.3.7 结论.....	38
参考文献.....	39
<b>第三章乙酰普鲁兰叶酸/甲氨蝶呤偶合体纳米粒子和载药纳米粒子的 制备及表征 .....</b>	<b>42</b>

3.1. 前言 .....	42
3.2. 材料与方法 .....	43
3.3. 结果与讨论 .....	46
3.3.1 纳米粒子的制备 .....	46
3.3.3 FPA-NPs 和 DTX-FPA-NPs 的表征 .....	49
3.3.4 MPA-NPs 和 DTX-MPA-NPs 的表征 .....	51
3.3.5 MTT 实验 .....	53
3.3.6 结论 .....	54
参考文献 .....	56
<b>全文总结及展望 .....</b>	<b>59</b>
<b>硕士期间科研成果 .....</b>	<b>61</b>
<b>致谢 .....</b>	<b>62</b>

# Table of Contents

<b>Abstract in Chinese</b> .....	I
<b>Abstract in English</b> .....	II
<b>Chapter 1 Introduction</b> .....	1
1.1 Risk of Tumors.....	1
1.2 Drug-loaded Nanosystem .....	1
1.3 Carrier material of drug-loaded Nanosystem.....	3
1.4 The research of pullulan as drug carry material.....	7
1.5 Folate.....	8
1.6 Methotrexate .....	12
1.7 Docetaxel .....	13
1.8 Main Focus of This Thesis .....	16
Reference .....	18
<b>Chapter 2 the synthesis and modification of acetyl pullulan</b> .....	24
2.1. Introduction.....	24
2.2. Experiments.....	24
2.3. Results and Discussion.....	30
2.3.1 Synthesis of acetyl pullulan .....	30
2.3.2 FT-IR of acetyl pullulan.....	30
2.3.3 <sup>1</sup> H NMR .....	31
2.3.4 Synthesis of PA with minimum degree of substitution.....	33
2.3.5 Synthesis of FPA.....	33
2.3.6 Synthesis of MPA.....	36
2.3.7 Conclusion .....	38
Reference .....	39
<b>Chapter 3 Preparation and characterization of nanoparticles</b> .....	42
3.1. Introduction.....	42

3.2. Experiments .....	43
3.3. Results and Discussion .....	46
3.3.1 Preparation of nanoparticles .....	46
3.3.3 Characterization of FPA-NPs and DTX-FPA-NPs .....	49
3.3.4 Characterization of MPA-NPs and DTX-MPA-NPs .....	51
3.3.5 MTT .....	53
3.3.6 Conclusion .....	54
Reference .....	56
<b>Conclusions and Future Works .....</b>	<b>59</b>
<b>Publications .....</b>	<b>61</b>
<b>Acknowledgements .....</b>	<b>62</b>

# 第一章 绪论

## 1.1 肿瘤的危害

近些年来,恶性肿瘤已经在全球范围内严重威胁着人类的生命和健康,成为人类健康的头号杀手。各国政府都在肿瘤的防治研究方面投入了巨额资金,各国科学家也在积极地进行着大量的研究工作,但至今,其仍然是当今生命科学领域的一个难题。所以,开展恶性肿瘤的防治研究工作,对于预防恶性肿瘤的发生、降低发生率、减少死亡率、指导临床以及提高肿瘤患者的生存质量等都具有十分重要的现实意义<sup>[1]</sup>。对于恶性肿瘤的治疗,目前是以化疗、放疗和手术切除为主;其中,化学药物治疗经历了半个多世纪的发展,迄今为止依然是肿瘤综合治疗的主要手段。而目前临床使用的绝大多数抗肿瘤化学药物均有不同程度的毒副作用。它们在杀伤肿瘤细胞的同时,对正常组织的细胞有着很强的毒副作用,尤其是杀伤人体中生长发育旺盛的血液、淋巴等组织细胞,这不仅给患者带来了极大的痛苦,而且破坏了人体重要的免疫防御系统,因此其在临床上的应用收到了很大限制。现阶段,人们希望找到一种既能杀死肿瘤细胞又不会引起严重毒副作用的药物释放体系。因此,纳米药物载体以及靶向给药体系成为了现今抗肿瘤药物研究领域的热点之一<sup>[2]</sup>。

## 1.2 纳米给药系统

对于疾病的治疗,不仅要根据治疗机制和治疗效果选择不同的药物,而且还要根据药物的性质选择一个合适的药物运载系统,能够将药物有效的运达病灶,从而有效地发挥其功能并得到良好的治疗效果。因此,必须选择合适的药物释放体系(包括药物剂型、药物载体及给药途径等),已达到更高的治疗效果<sup>[3]</sup>。

### 1.2.1 纳米给药系统的定义

纳米给药系统(nanoparticle drug delivery system, NDDS)是指使用药物与辅料或直接使用药物,采取特殊的处理方法,制备的粒径为1-1000nm的纳米级

药物传输系统。广义的 NDDS 包括微乳(microemulsions)、纳米粒(nanopartieles)、纳米囊(nanocapsules)、纳米球(nanospheres)、纳米脂质体(nanoliposomes)、固体脂质纳米粒(solidlipidnanparticle, SLN)、聚合物胶束(polymeric micelles)以及药物纳米粒混悬液等。

### 1.2.2 纳米给药系统的优点

药物经纳米化后具有特殊的物理及化学性质,例如表面效应、小尺寸效应、体积效应、量子隧道效应等,使其在药物输送方面具有许多优越性<sup>[4]</sup>。

#### (1) 增加药物吸收

由于纳米粒具有高度分散性,表面积大,并且具有特殊的表面性能(如生物粘附性、亲和性、电性等),有利于增加药物在吸收部位的滞留时间和接触面积,加之纳米粒子对药物具有明显的保护作用,故可明显提高人体对药物的吸收效率和药物的生物利用度。

#### (2) 控制药物释放

由于载体材料、制备工艺以及纳米粒的结构不同等原因,药物会具有不同的释药速度。

#### (3) 改变药物的体内分布

纳米粒进入体内后由于网状内皮系统的吞噬作用,可靶向于吞噬细胞丰富的肝脏、脾脏、肺和淋巴组织等,特别小纳米粒还可进入骨髓组织。纳米粒经抗体介导、配体介导或磁场介导等,可主动靶向靶组织,是抗肿瘤药物的良好载体。

表 1.1 不同粒径的药物载体体内靶向的部位<sup>[5]</sup>

Table 1.1 The function of carrier size and the target location in the body<sup>[5]</sup>

载体粒径	体内靶向
<50 nm	穿过肝脏或通过淋巴传输到脾和骨髓,也可到达肿瘤组织最终进入肝脏
0.1 μm~0.2 μm	被网状内皮系统吸收,最后富集于肝、脾中
1 μm	白细胞吞噬
2 μm~12 μm	毛细血管摄取,不仅可到达肺,也可进入肝、脾
7 μm~12 μm	在肺中富集
>12 μm	阻滞在毛细血管末端

#### (4) 提高药物稳定性

纳米粒载体可以提高药物稳定性,避免药物在到达病灶前被吞噬或降解,这对于基因药物和具有生物活性的药物具有非常重要的意义。

#### (5) 改变药物的膜转运机制

纳米粒子可以增加药物在生物膜的穿透性,从而有利于药物对一些特殊部位的治疗,例如在穿膜肽的作用下,药物能够穿过血脑屏障到达大脑皮层,对大脑内病灶产生作用。

#### (6) 用于抗肿瘤药物的载体

抗肿瘤药物可以通过纳米粒的作用,改变其在体内的分布及药代动力学性质,提高药物对肿瘤部位的靶向性,进而提高疗效,降低毒副作用。另一方面,肿瘤部位的细胞通透性较正常细胞更大,因此抗癌药物在血液循环中存在的时间越长,就越有利于肿瘤的治疗。

鉴于以上优点,纳米给药系统已成为一种非常有前途的,并已引起人们广泛关注的给药体系。目前,将纳米粒子作为抗肿瘤药物的载体研究方面,已经做了大量的工作,所涉及的抗肿瘤药物包括:阿霉素、甲氨喋呤、5-氟尿嘧啶、米托蒽醌、放线菌素 D、阿克拉霉素、长春胺、顺铂和碳铂等等。从各种抗肿瘤药物的载药纳米粒子的动物实验结果来看,在药物与纳米粒子结合后,绝大多数药物的体内过程都能够得到改善,使药物在体内的循环时间延长,提高抑瘤率,可以将药物的治疗效果提高 50% 以上<sup>[6, 7]</sup>。

### 1.3 纳米给药系统的载体材料

药物载体是纳米给药系统的重要组成部分,也是影响药效的最主要的因素之一。为使纳米给药系统具有缓释(控释)、靶向等功能,载体材料起着非常关键的作用。而这就对材料的性质提出了非常严格的要求<sup>[8]</sup>:

(1) 具有良好的生物相容性,不引起血象变化,不产生过敏反应;

(2) 靶向材料应能增加药物的定向性及在靶区的滞留性,这一点要求较高,靶向性可靠偶联抗体或受体分子来实现,因此材料应有可偶联性,理想的靶向材料应对组织具有一定亲和性以增加其在目标区域的滞留性;

(3) 载体进入靶区后,能够按设计要求释放药物,并在释药后可经体内代

谢，变成无毒物质排出体外，即具有良好的生物降解性；

(4) 与药物有足够的亲和力，具有足够大的载药能力；

(5) 能够增加药物稳定性，降低药物毒副作用；

(6) 具有符合要求的其他特性（如黏度、渗透性、亲水性、溶解性等）。

满足以上要求的高分子材料主要有：①天然大分子材料：多糖、明胶、淀粉和天然蛋白等；②合成高分子材料：聚乳酸（PLA）、聚羟基乙酸（PGA）及其共聚物（PLGA）、聚酸酐类、半固态聚原酸酯类等。

### 1.3.1 天然高分子材料

天然高分子材料是指来源于动植物或者人体内天然存在的大分子。天然高分子材料是人类最早使用的医用材料，具有良好的生物相容性，几乎都可以降解，且降解产物无毒。但作为医用的天然材料，除具备以上特性之外，还需具备以下几个条件：

(1) 原料来源丰富，便宜易得；

(2) 可用常规的方法加工成型；

(3) 具有与合成材料相当的物理力学性能；

(4) 不引起排异反应。

迄今为止能完全满足这些条件的天然高分子材料很少，但一些天然高分子材料经过适当的化学改性或与合成材料复合后，便可广泛应用于临床医学中。它们大多被用作人工皮肤、可吸收缝合线、药物控释载体、组织修复和替代组织隔离膜等。下边简单介绍几种常见的天然高分子材料：

#### (1). 甲壳素和壳聚糖

甲壳素是一种不溶于水的线型多糖，它是目前研究较多的一种多糖类天然生物高分子，它广泛存在于低等动物之中，特别是低等动物（如真菌、藻类、酵母）的细胞壁以及节肢动物的外壳（如昆虫、蜘蛛、甲壳类）中。壳聚糖是目前研究最多的多糖类天然高分子，它由甲壳素经脱乙酰化反应后得到，是生物界中大量存在的唯一的一种呈碱性的多糖。其溶解性较甲壳素大为改善，化学性质也较活泼。这两种多糖均具有良好的生物相容性和生物可降解性，能止血并促进细胞生长，将其植入人体后，引起的生物组织排异反应小，能够避免伤口受细菌感染，并可被组织缓慢吸收。目前已被广泛开发用作手术缝合线、止血试剂、人工皮肤、

诊断膜及药物释放载体等<sup>[9]</sup>。

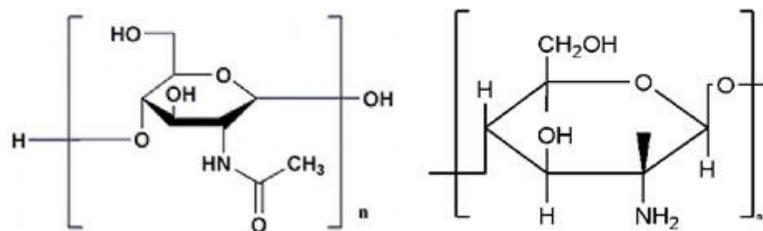


图 1.1 甲壳素和壳聚糖的化学结构

Fig 1.1 Chemical structures of chitin and chitosan

### (2). 明胶

明胶是氨基酸与肽交联而成的直链聚合物，通常为平均相对分子质量在 15000~25000 之间的不同相对分子质量的混合物。根据制备时水解方法的不同，明胶可以分为酸法明胶（A 型）和碱法明胶（B 型）。A 型明胶的等电点为 7~9，B 型明胶等电点为 4.7~5。两者的成囊性或成球性无明显差别，都可被生物降解，几乎无抗原性，可根据药物对酸碱性的要求选用 A 型或 B 型明胶。明胶为淡黄色至黄色的，半透明的，微带光泽的颗粒或薄片状固体；无臭，潮湿后易为细菌分解；在水中久浸会吸水膨胀并软化形成凝胶，重量可增加 5~10 倍；在热水、醋酸或甘油与水的热混合液中溶解后，水溶液的粘度在 0.2~0.75 cPa 之间，在乙醇、氯仿或乙醚等溶剂中不溶。明胶作为一种胶体，其最重要特性是在 35~40℃ 的水中能形成凝胶或胶体，在较高温度下，可以形成溶液。在 40℃ 以上明胶可缓慢解聚并降低成胶力，在 65℃ 以上解聚加快，80℃ 加热 1 h，其成胶力降低 50%，pH2 以下或 pH10 以上，均加速解聚。通常解聚的速率和程度与其相对分子质量有关，相对分子质量愈小的解聚愈快。

### (3). 淀粉

淀粉是一类多糖类的天然高分子，与其它天然高分子相比，淀粉具有来源更加广泛、价格更加低廉、更易被生物降解等特点，在生物降解材料领域具有非常重要的地位。淀粉是由多个脱水葡萄糖单元经糖苷键连接而成，每个葡萄糖单元的 2、3、6 三个位置上各有一个羟基，所以，淀粉分子中存在大量可反应的基团，淀粉的衍生物是通过将其分子中葡萄糖单元上羟基与某些化合物反应而制得的。淀粉基高分子的降解分为两个过程：一是淀粉被真菌、细菌等微生物侵袭后逐渐

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库