

壳聚糖基纳米载药微粒的研究进展

王春, 杨连生, 扶雄

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

摘要: 多肽、蛋白质、核苷酸及质粒等复杂高分子的粘膜释放给药是当前最受关注的研究课题之一。壳聚糖作为一种天然高分子多糖, 已经被认为是一种最具希望的高分子药物的跨膜输送载体。而壳聚糖纳米微粒是主要的载体形式之一。本文综述了壳聚糖纳米微粒药物载体的制备方法以及输送高分子药物的作用机制。现已表明壳聚糖可通过离子交联、共价交联、沉淀析出、大分子复合及自组装等方法获取负载大分子药物的壳聚糖纳米胶体粒子。结尾阐述了这种新型载药系统的存在的问题及应用前景。

关键词: 壳聚糖; 纳米; 多肽; 蛋白质; 药物释放

中图分类号: R944.9; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)04-0089-05

Research Progress in the Drug-loaded Nanoparticles Derived from Chitosan

WANG Chun, YANG Lian-sheng, FU Xiong

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou, 510640, China)

Abstract: Mucosal delivery of complex molecules such as peptides, proteins, oligonucleotides, and plasmids is of increasing interest in recent years. Using a hydrophilic polysaccharide (chitosan) as colloidal carriers has become a promising alternative for improving the transport of such macromolecules across biological surfaces. This article reviews the approaches to prepare drug-loaded nanoparticles derived from chitosan and the action mechanism of their efficacy in improvement of the transport of the associated molecule through biological surfaces. Chitosan can form colloidal particles and entrap macromolecules through a number of mechanisms, including ionic crosslinking, covalent crosslinking, desolvating, supramolecular complexation, or self-assemblies. The potential applications and prospects of these new systems for mucosal delivery of macromolecules are also highlighted.

Key words: chitosan; nanoparticles; peptide; protein; drug delivery

壳聚糖是一类由 2-氨基-2-脱氧葡萄糖通过 β -1,4 糖甙键连接而成的带正电荷直链多糖。近年来, 人们已将其用于生物制药和药物控释研究, 进而发现壳聚糖基纳米微粒是一类极具应用前景的药物控释载体。

壳聚糖基纳米粒子比微米粒子具有更多的优越性, 可使大分子顺利通过上皮组织, 促进药物的渗透吸收, 适当的表面修饰使它对特定器官或病灶具有靶向作用。尤其适用于口服或粘膜等更为方便的给药途径, 可延长药物在体内的循环时间, 有效地提高药物的利用度, 减少副作用。制备壳聚糖基纳米药物载体的方法有多种。本文对其制备方法及与生物体之间的作用机制进行了综述。

1 壳聚糖基纳米载药微粒的制备研究

1.1 共价交联法

一般是先将壳聚糖醋酸溶液加入到含司盘的油

收稿日期: 2006-12-19

作者简介: 王春 (1977-), 男, 在读博士, 研究方向为功能碳水化合物材料理论与技术

相中制成乳剂, 再用戊二醛、甲醛等作为交联剂制备壳聚糖基纳米粒子。Tanima 等^[1]交联制备了超细壳聚糖纳米粒子, 粒子尺寸与交联剂的用量相关。经静脉注射, 纳米粒子可避开网状类皮的吞噬, 在血液中保留时间长, 用放射性元素 (99 m Tc) 示踪壳聚糖纳米粒子在老鼠体内的分布, 2 h 后可在血液中检测到, 粒子还分布到心脏、肝脏、肾脏、膀胱、脊柱和骨骼中, 说明这种纳米粒子可用于骨骼的成像和靶向传输。以上研究都证实了合成稳定、可再生的并能负载和包封药物的壳聚糖纳米微粒的可行性。然而, 有文献报道戊二醛对细胞生长发育和生物药物的完整性有不良影响^[2]致使研究者对该种交联法逐渐失去了兴趣。

1.2 离子交联法

这是目前在壳聚糖载药纳米粒子的研究中使用最多的制备方法。壳聚糖除了能够与带有负电荷高分子物质复合外, 还能与一些特别的聚阴离子物质发生凝胶反应, 这是由于聚阴离子的作用下发生分子内、外交联的结果。一般采用三聚磷酸钠 (TPP) 作为离子

交联剂,对壳聚糖进行了离子诱导凝胶化,可在一定条件下制备出基于壳聚糖的纳米给药载体。Bodmeier等^[3]先报道了壳聚糖与TPP交联用作药物载体,但其方法旨在获得壳聚糖-TPP复合物,而非纳米微粒。Huang等^[4]方法合成了包埋人类细胞A549的壳聚糖纳米微粒;De Campos等^[5]备出壳聚糖纳米粒子用于治疗外眼疾病药物CyA,通过眼球粘膜的输送提高了药效。Xu等^[6]讨论了壳聚糖分子量、脱乙酰度、壳聚糖用量以及药物浓度对含牛血清白蛋白(BSA)壳聚糖纳米粒子释放行为的影响,发现当壳聚糖分子量从 1.0×10^4 提高到 2.1×10^5 时,BSA的包埋率增加约2倍,而在pH值为7.4的磷酸盐缓冲溶液中放置8d后包埋的BSA的总释放率则从74%下降到17%;当脱乙酰度从75%增加到92%,BSA在壳聚糖纳米粒子中的包埋率有所增加,但其释放率则有所降低;此外,增加壳聚糖用量和BSA浓度均导致BSA包埋率的下降。

为进一步提高壳聚糖纳米载体的血液相容性及其缔合和输送蛋白质药物的多样性以及与生物表面相互作用的敏感性,Calvo等^[7]用离子交联法制备壳聚糖纳米粒子过程中引入第二聚合物组分——聚氧乙烯(PEO)与环氧丙烷的二嵌段共聚物(PEO-PPO),发现所得纳米微粒的大小和 ζ 电位可通过原料壳聚糖与第二聚合物组分的用量比进行有效调控;而微粒粒径的增加和 ζ 电位的减少则表明第二聚合物组分已进入壳聚糖纳米粒子结构中,并通过氢键形成了半互穿网络。另一种改善壳聚糖纳米粒子表面性能的途径,则是将聚乙二醇(PEG)共价键合到已形成的纳米粒子表面,所形成的亲水覆盖层被发现显著降低了壳聚糖纳米粒子表面的正电荷和增强了其生物相容性。研究指出^[7]对于一种特定的蛋白质,仅在pH值高于其等电点下才可获得最大的负载量,而且还观察到随着蛋白质结合量的增加,壳聚糖纳米微粒表面趋于电中性,以及蛋白质与PEO-PPO之间对壳聚糖存在竞争性吸附,这都表明蛋白质与壳聚糖的结合主要是(或部分为)两种大分子间阴、阳离子反应的产物。

由于该合成条件温和,粒径大小、表面电荷、药物释放速率可方便地通过改变条件和粒子组分进行调控,而且它通常具有较高的药物包埋率及可保留药物的活性和完整性,因此,该法所制得的壳聚糖纳米微粒在一些敏感性大分子药物控释、缓释上呈现良好的应用前景。

1.3 沉淀析出法

在搅拌及超声波分散情况下借助硫酸钠的去溶剂化作用使壳聚糖以纳米级微粒形式析出。

以上是使用去溶剂剂(desolvating agent)使壳聚糖从溶液中以微粒形式沉淀析出。另一种途径则是基于乳化溶剂扩散(emulsification solvent diffusion)作用。实验时,以壳聚糖溶液作为水相,亲水性有机溶剂和疏水性有机溶剂组成混合溶剂作为油相,同时将要包载的药物溶于其中。在卵磷脂等乳化剂存在下,将水相分散于油相,由于亲水性有机溶剂会自动从油相扩散到水相,导致两相之间界面产生湍流,从而使壳聚糖分子发生沉降析出,形成具有纳米尺度微粒^[8]。

相比较而言,沉淀析出法需在较苛刻的制备条件如存在乳化剂、有机溶剂和超声振荡下进行,且不易通过反应条件的优化调控壳聚糖微粒的大小,因而这种方法在实际应用上也受到一定程度的限制^[9]

1.4 与DNA等大分子复合

利用大分子复合原理,将壳聚糖与DNA等阴离子聚合物进行复合,借助两种聚离子间的相互作用也可在一定条件下形成壳聚糖基载药纳米微粒,进而将其用作蛋白药物或基因药物的载体。Mao等^[10]合胶凝技术制备了DNA-壳聚糖纳米微粒,运载免疫和抗肿瘤蛋白质,壳聚糖纳米微粒比明胶纳米微粒效果更佳。当氨基/磷酸基(N/P)比例在3~8,壳聚糖浓度为100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,最优化的粒子大小为100~250 nm。壳聚糖-DNA纳米微粒表面在pH 6.0以下环境带正电;在pH 7.2环境中呈现中性。壳聚糖纳米粒子能部分保护囊化质粒DNA不被核酸酶降解。其连接PEG后经真空冷冻干燥不致凝聚,贮存1个月DNA不失去活性。

1.5 化学改性自组装法

利用化学改性后两亲性壳聚糖在溶液中的自聚集组装特性制备出壳聚糖基载药纳米微粒。Ohya等^[11]过壳聚糖分子链上酰胺基将聚乙二醇(PEG)接枝到壳聚糖骨架链上,发现在碱性条件下壳聚糖骨架链表现出疏水性而接枝上的PEG支链表现出亲水性,两亲性的改性壳聚糖可在溶液中发生胶束化作用形成自聚集组装结构、进而得到纳米粒子。可能由于所得壳聚糖纳米微粒表面存在未改性壳聚糖残基与蛋白,胰岛素、多肽、蛋白质等一类亲水性较强的大分子药物,便容易通过氢键或静电相互作用结合在该微粒表面。根据PEG接枝支链的长短,所得纳米微粒的粒径大小可在50 nm~150 nm范围内进行调控,且随着亲水支链的增加,壳聚糖纳米粒子的粒径逐渐减小。Fei等^[12]一步法合成有机硅-壳聚糖纳米药物载体。有机硅核是由氧硅烷基-3-(三甲硅烷基)丙基异丁烯酸(TMSPM)的水解和缩合作用形成,而TMSPM同时是使用壳聚糖/叔丁基化过氧化氢(TBHP)作为氧化还原引发剂。

制备的纳米粒子可调整粒径到 100 nm 以下, 可用作包含-NH₂ 的蛋白质等生物高分子药物的载体。此法中有机硅成核的过程也是壳聚糖纳米微粒形成的过程, 因此减少了硅-聚合物微球制备过程中成核这一步。

2 壳聚糖基纳米载药微粒的作用机制及应用

研究

就目前的研究而论, 药物传输系统中的纳米粒及相关技术主要用于促进药物溶解、改善吸收、提高靶向性以及有效性等, 近年来更专注于研究纳米系统对生物大分子药物传输的作用^[13]

壳聚糖自身具有生物相容性、无毒性 and 生物粘附性, 可使药物在局部保持高浓度, 且可打开上皮粘膜的紧密连接, 增强药物在粘膜的渗透作用。

2.1 生物粘附性

壳聚糖分子中的氨基、羧基可与粘液中的糖蛋白形成氢键而产生粘附作用。且粘膜中粘蛋白带有负电荷, 壳聚糖与粘膜之间的电荷相互吸引能延长药物在体内特定区域的滞留时间, 连续释放, 从而提高了药物的生物利用度。Illum 等^[14]了壳聚糖在溶胀状态下, 在猪的胃粘膜上具有很好的粘附性, 可反复粘附。体外试验说明壳聚糖比羟丙基纤维素和羧甲基纤维素更具多粘性, 分子量较高的多粘性 (1400 kDa 比 500 和 800 kDa) 好, 而分子量相对较低的壳聚糖谷氨酸盐 (从 25 至 50 kDa) 也有很好的粘性。壳聚糖与 EDTA 共价结合后, 其粘附性有很大的提高^[15]

2.2 促渗作用

Illum 等^[14]的研究表明壳聚糖在浓度 0.5% (w/v) 时, 在鼠和绵羊体内, 可很好地提高胰岛素的鼻粘膜吸收, 其机制为壳聚糖的生物粘附性和暂时性的打开上皮粘膜的紧密连接。壳聚糖在粘膜表面打开细胞间紧密连接接口一般能持续 15 min^[16], 许多分子量为 20 kDa 的生长因子通过鼻腔粘膜进入体循环, 对分子量为 10 kDa 左右的生物大分子药物, 壳聚糖能使其生物利用度提高 5~10 倍。高脱乙酰度的壳聚糖, 不论分子量高低, 促渗作用都很强, 毒性与剂量相关; 低脱乙酰度的壳聚糖只有分子量高的才有促渗作用, 毒性较低。各种分子量和脱乙酰度的壳聚糖都可在上皮 Caco-2 细胞紧密粘附, 引起 Factin 和 TI 蛋白质 ZO-1 的再分布, 提高渗透性。

壳聚糖的 N 位被烷基取代可增加其水溶性而不影响其阳离子特征, 部分被羧基取代使其具有两性电解质特征。羧甲基壳聚糖 (MCC), DS 为 87%~90%,

在中性和碱性下易形成凝胶和溶液, 可与聚阴离子如肝素相容^[17]aco2 肠粘膜细胞作模型, 高、低粘度 MCC 都可提高肝素 (4500 Da; LMWH) 渗透性, 浓度要足以使上皮粘膜跨电阻减小 50% 时, 两性聚电解质的壳聚糖才可导致 TJ 开放, 效果比 TMC 高出几倍, 取代度低促渗性高, 并对细胞膜无损伤。MCC 打开 TJ 的时间较 TMC 长^[17] MCC 更适合在中碱性条件下应用, 适合于阴离子药物的渗透性, 壳聚糖与 L-半胱氨酸共价结合形成的衍生物, 也具有较强的促渗作用。

2.3 与酶抑制剂的协同作用

酶屏障是生物大分子药物口服生物利用度低的另一个重要原因。壳聚糖可作为蛋白酶抑制剂载体, 可制备微粒制剂、混合胶体和包衣制剂, 还可形成自身聚集体, 这些形式都能在一定程度上避免胃肠道 pH 环境和酶对生物大分子药物的降解, 提高生物利用度。酶抑制的应用常常被其局部甚至全身性毒性所限制, 而将酶抑制剂与某些生物粘附性聚合物共价结合, 可改善这一状况。如将胰蛋白酶抑制剂抗痛素和壳聚糖共价结合形成共轭物, 聚合物所具有的生物粘附性并不受影响, 显示出明显的胰蛋白酶抑制活性。

3 存在的问题

近年来对载药壳聚糖纳米微粒的研究取得了重大进展, 成为载体药物技术领域的重要发展方向。但此类载体仍存在下列问题。

首先, 壳聚糖的溶解性较差, 不溶于水和有机溶剂, 仅在稀酸中少量溶解, 而酸性条件制备壳聚糖纳米药物载体势必对大分子药物活性产生影响, 也在很大程度上限制纳米药物产业化制备。因此, 对壳聚糖予以改性, 改善壳聚糖水溶性, 在适宜 (不影响药物活性) 条件下制备纳米药物载体, 是急需研究的课题。

其次, 还需考虑到壳聚糖在体内降解性问题。有学者发现壳聚糖虽然具有生物降解性^[18]但与经溶菌酶催化的壳聚糖降解相比, 壳聚糖与氨甲蝶呤结合物的降解速度非常缓慢且不完全。这说明壳聚糖的生物可降解性并不高, 可能产生体内积蓄等问题。因此, 进一步研究壳聚糖在生物体内的降解行为及改善其降解性是十分重要的课题。

此外, 壳聚糖是一种亲水性多糖, 仅能包裹一些亲水性大分子, 而对于疏水性药物, 壳聚糖要作为载体还存在难度。

为了解决上述问题, 有研究采用低分子量壳聚糖 (low molecular weight chitosan, MWC) 和壳寡糖 (chitosan oligosaccharides, COSs) 替代高分子量的

壳聚糖制备纳米药物载体。一般粘均分子量小于12,000左右的壳聚糖具有较好的水溶性,因此,COSs等作为纳米载体,一方面可以解决壳聚糖的水溶性问题;另一方面,笔者认为在一定程度上能降低高分子量壳聚糖体内降解的难度。Kim等^[19]采用水溶性较好的低分子量壳聚糖制备DNA纳米载体微粒,不但可提高壳聚糖水溶液中的稳定性,而且能降低因乙酸引起的细胞毒性。又有人^[20]采用了水溶性很好的COSs替代水溶性很差的高分子壳聚糖制备基因药物纳米载体。COSs经脱氧胆酸(DOCA)化学改性具有两性亲性,而自组装成了粒径在200~240之间的纳米微粒,负载基因后获得了较好的效果。

4 结语

大量的壳聚糖基胶质系统已经被建立并作为非常具有应用前景的生物活性高分子的载体。这些系统具有一些优良的特征,如粘附性、促渗性、结合及缓释药物的能力,但至今体外研究仍是十分有限的。然而,研究已表明一些载体在通过各种生物粘膜(包括肠粘膜、鼻粘膜、视网膜等)输送多肽、蛋白药物时是很有成效的。对壳聚糖基纳米药物载体作用机制更深入的研究有助于进一步提高此类载体的应用。

参考文献

- [1] Tanima B, Susmita M, Singh K, et al. Preparation, characterization and biodistribution of ultrafine chitosan nanoparticles[J]. *Int J Pharm*, 2002, 243(1-2): 93-102.
- [2] Janes, K. A., Calvo, P., Alonso, M. J., Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules, *Adv. Drug Deliver. Rev.* 2001 (47) 83.
- [3] R. Bodmeier, H. Chen, O. Paeratakul, A. novel approach to the delivery of microparticles or nanoparticles, *Pharm. Res.* 1989 (6):413-417.
- [4] Huang M, MA ZS, Khor E, et al. Uptake of FITC-chitosan nanoparticles by a549 cells[J]. *Pharm Res*, 2002, 19(10): 1488-1494.
- [5] De Campos A M, Sancher A, Alonso M J. Chitosan nanoparticles: A new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A[J]. *Int J Pharm*, 2001, 224(1-2): 159-168.
- [6] Xu Y, Du Y. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles[J]. *Int J Pharm*, 2001, 250(1): 215-226.
- [7] Calvo P, Remunan-Lope C, Vila-Jato J L, et al. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers[J]. *J Appl Polym Sci*, 1997, 63: 125-132.
- [8] El-Shbouri M H. Positively charged nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporin-A[J]. *Int J of Pharm*, 2002, 249(1-2):101-108.
- [9] 黄小龙, 张黎明. 壳聚糖基载药纳米微粒制备研究进展[J]. *功能高分子学报*. 2003, 16(4):594-598.
- [10] H. Q. Mao, K. Ray, S. M. Walsh, et al. DNA-chitosan nanoparticles for the gene delivery. *Proc. Load-Intern. Symp. Control. Release. Bioact. Mater.* 1996 (23):401.
- [11] Y. Ohya, R. Cai, et al. Preparation of PEG-grafted chitosan nanoparticle for peptide drug carrier[J]. *Proc Intl Symp Control Rel Bioact Mater*, 1999, 26: 655~656.
- [12] Fei, H. Lu, J. H. Xin. *Polymer Communication*. 2006, 47: 947-950.
- [13] shiaki Kawashima, Nanoparticulate systems for improved drug delivery, *Advanced Drug Delivey Reviews*, 2001, 47(1): 1~2.
- [14] lum L., Farraj N.F., et al. Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs, *Pharm. Res.* 1994, 11: 1186.
- [15] rmkop-Schnürch A., Chitosan and its derivatives: potential excipients for peroral delivery systems, *Int. J. Pharm.* 2000, 1(94):1
- [16] tze A.F., et al. Chitosan for enhanced intestinal permeability: Prospects for derivatives soluble in neutral and basic environments, *Eur. J. Pharm. Sci.* 1997 (3):145.
- [17] anou M. M., Nihot M. T., et al., MonoN-carboxymethyl chitosan (MCC), a polyampholytic chitosan derivative, enhances the intestinal absorption of low molecular weight heparin across intestinal epithelia in vitro and in vivo, *J. Pharm. Sci.* 2001 (90):38.
- [18] nkop-Schnürch A., Chitosan and it-s derivatives: potenal excipients for peroral peptide delivery systems, *Int. J. Pharm.* 2000 (194)1.
- [19] Nakamura, H. Onishi, Y. MachiDalton et al. Lysozymecat-alyzed degraDaltontion properties of the conjugates between chitosans having some deacetylation degrees and methotrexate. *Yakuzaigaku.* 1992; 52:59-67.
- [20] Hee Kim, In Kyu Park, Jae Woon Nah, et al. Galactosylated chitosan/DNA nanoparticles prepared using water-soluble chitosan as a gene carrier
- [21] Yong Chae, et al. Deoxycholic acid-conjugated chitosan oligosaccharide nanoparticles for efficient gene carrier[J]. *Journal of Controlled Release.* 2005(109):330-344.