

DiR-PEG-PLGA 荧光纳米囊的制备、表征及体外生物相容性评价^Δ

程欣^{1,2*}, 柯瑾¹, 陈烁³, 谢薇⁴, 邵长丽⁵, 侯安国¹, 张昆¹, 邓林¹, 陈艳五¹, 马云淑^{1,2#} (1. 云南中医药大学中药学院, 昆明 650500; 2. 云南中医药大学/云南省傣医药与彝医药重点实验室, 昆明 650500; 3. 云南省中医医院超声科, 昆明 650011; 4. 云南中医学院基础医学院, 昆明 650500; 5. 云南中医学院针灸推拿康复学院, 昆明 650500)

中图分类号 R94;R283.6;Q2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)08-1031-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.08.05

摘要 目的:制备并表征包载荧光染料1,1'-二十八烷基-3,3',3'-四甲基吲哚三碳花青碘(DiR)的聚乙二醇-聚乳酸-羟基乙酸共聚物(DiR-PEG-PLGA)纳米囊,评价其体外生物相容性。方法:以聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)、聚乙二醇(PEG)-PLGA共混物为载体,采用改良的超声乳化法制备DiR-PEG-PLGA纳米囊样品。对样品的粒径、Zeta电位、形貌、稳定性、体外荧光特性等进行检测;采用MTT试验评价样品对人源性HL7702肝细胞的体外细胞毒性,采用体外溶血试验考察其对健康Wistar大鼠血细胞的溶血作用。结果:所制备的DiR-PEG-PLGA纳米囊呈圆球形,具有明显核壳结构,平均粒径为(507.53±7.87)nm,粒径的多分散系数为0.3061±0.0015,Zeta电位为(-35.20±0.92)mV;4℃条件下保存6个月,稳定性较好;体外荧光信号强度(y)随DiR质量浓度(x)呈线性增加,线性方程为 $y=0.3452x+0.4334$ ($R^2=0.9973$)。所制纳米囊对HL7702细胞的毒性为0~1级(即无细胞毒性),对大鼠血细胞无体外溶血作用。结论:本研究成功制备了具有荧光特性的DiR-PEG-PLGA纳米囊;所制纳米囊体外生物相容性较好,有望成为一种安全的药物光学示踪载体。

关键词 纳米囊;超声乳化法;荧光;表征;生物相容性;DiR;聚乙二醇;聚乳酸-羟基乙酸共聚物

Preparation, Characterization and Biocompatibility Evaluation *in vitro* of DiR-PEG-PLGA Fluorescent Nanocapsules

CHENG Xin^{1,2}, KE Jin¹, CHEN Shuo³, XIE Wei¹, SHAO Changli⁵, HOU Anguo¹, ZHANG Kun¹, DENG Lin¹, CHEN Yanwu¹, MA Yunshu^{1,2} (1. College of TCM, Yunnan University of TCM, Kunming 650500, China; 2. Yunnan University of TCM/Yunnan Key Lab of Dai and Yi Medicines, Kunming 650500, China; 3. Ultrasound Department, Yunnan Hospital of TCM, Kunming 650011, China; 4. College of Basic Medicine, Yunnan University of TCM, Kunming 650500, China; 5. College of Acupuncture Massage and Rehabilitation, Yunnan University of TCM, Kunming 650500, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare and characterize Fluorescent dye 1,1'-octacosyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine iodide (DiR) -loading polyethylene glycol-poly lactic-co-glycolic acid (DiR-PEG-PLGA) nanocapsules, and to evaluate its biocompatibility *in vitro*. METHODS: Using PLGA and PEG-PLGA as carrier, DiR-PEG-PLGA nanocapsules were prepared by

2014. DOI: 10.1016/j.talanta.2014.03.020.
- [8] 李国良,姚伟,孟斌,等. 葡萄球菌肠毒素B分子印迹聚合物的制备及其与蛋白质的结合性能[J]. 化学研究, 2013,24(5): 470-474.
- [9] 文永佳,张峰,杜幸洁,等. 吡喃唑酮代谢物分子印迹聚合物的合成及其酶联免疫吸附检测方法的建立[J]. 应用化工, 2013,42(7): 1347-1350.
- [10] YIN X, LIU Q, JIANG Y, et al. Development of andrographolide molecularly imprinted polymer for solid phase extraction[J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2011, 79(1): 191-196.
- [11] 冯蕾,马雅倩,谭婷,等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定生物样品中酪氨酸及其代谢产物[J]. 南昌大学学报:理科版, 2014,38(4): 363-367.
- [12] 王车礼,赵兴丽,方磊,等. 对羟基苯甲酸分子印迹聚合物合成功能单体选择与分子识别性能[J]. 化工学报, 2011,62(7): 1938-1943.
- [13] CHEN L, XU S, LI J. Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications[J]. *Chem Soc Rev*, 2011, 40(5): 2922-2942.
- Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81673682); 云南省科技计划项目[No.2015FB205(-003),2017FF117(-017)]; 云南省重点实验室培育计划项目(No. 2017DG006); 云南省教育厅大学生创新创业训练计划项目(No. 2016013)
- * 讲师,博士。研究方向:药剂学、纳米医药、药物新剂型。电话:0871-65918232。E-mail:chengxin920@126.com
- # 通信作者:教授,博士。研究方向:药剂学、生物药剂学、药理学。电话:0871-65918232。E-mail:yunshuma2@126.com
- (收稿日期:2017-06-05 修回日期:2018-02-23)
(编辑:张元媛)

modified ultrasonic emulsification method. The particle size, Zeta potential, morphology, stability and fluorescence *in vitro* of nanocapsules were detected respectively. MTT assay was used to evaluate cytotoxicity *in vitro* of nanocapsules to human-derived HL7702 hepatocytes, and hemolysis test was carried out to investigate its hemolysis effects. RESULTS: Prepared DiR-PEG-PLGA nanocapsules were spherical with a clear core-shell structure. The average particle size was (507.53 ± 7.87) nm, polydispersity coefficient of particle size was 0.3061 ± 0.0015 and Zeta potential was (-35.20 ± 0.92) mV with good stability within 6 months under 4 °C. Fluorescence signal intensity (y) of nanocapsules was increased linearly with DiR mass concentration (x) *in vitro*. The linear equation was $y=0.3452x+0.4334$ ($R^2=0.9973$). The toxicity of nanocapsules to HL7702 cells was between 0-1 degree, and no hemolytic effect was observed. CONCLUSIONS: The study successfully prepare fluorescent DiR-PEG-PLGA nanocapsules with high biocompatibility *in vitro*, which is further expected to become a safe optical drug carrier.

KEYWORDS Nanocapsules; Ultrasonic emulsification; Fluorescence; Characterization; Biocompatibility; DiR; PEG; PLGA

纳米载药系统(Nano-drug delivery system)是指药物与载体材料一起构成的粒径为1~1 000 nm的纳米级药物输送系统,包括纳米囊、纳米粒、纳米球、纳米乳等^[1]。其中,纳米囊是一种药库膜壳型载体,由高分子材料外壳与液状内核构成,药物分散于外壳材料或溶解于液状内核中,其稳定性好,对亲水或亲脂性药物均适用。但纳米囊进入血液循环后大部分被肝、脾等器官快速摄取,在循环系统中停留时间较短^[2]。而在纳米级尺寸下,对载体材料进行表面修饰后,所制得的载药系统可呈现长循环效果,具有靶向给药、缓/控释释药、提高生物利用度、降低毒副作用等特点^[3-5]。

聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)具有毒性小、生物相容性好的特点,是被美国FDA批准的注射剂药用辅料,广泛用于抗肿瘤药物的载药系统中^[6]。聚乙二醇(PEG)是一种无毒的水溶性聚合物,具有高度亲水性、良好的生物相容性及血液相容性;与PLGA共聚后,能够有效阻止调理素在PLGA纳米粒表面的吸附,使纳米粒不被网状内皮系统(RES)识别为异物,从而实现长循环^[7]。PEG-PLGA用于静脉注射给药,可以调节纳米粒的生物降解行为和释药方式^[8]。1,1'-二十八烷基-3,3',3'-四甲基吲哚三羰花青碘(1,1'-dioctadecyl-3,3',3',3'-tetramethylindotricarbocyanine,简称DiR)是一种亲脂性的羰花青荧光染料,常用于细胞或亚细胞的染色及结构成像;其光吸收在近红外区域,且荧光强度较大、光稳定性好、可穿透动物组织、背景干扰小,因此目前也用于动物活体成像的示踪^[9]。但DiR疏水性较强限制了其在生物活体内的广泛应用,近年来以其作为纳米示踪剂的研究还较少;而采用纳米技术可以增强DiR的水溶性,制成纳米制剂后注射给药可对载药系统进行吸收分布的示踪研究^[9]。鉴于此,本研究以PLGA、PLGA-PEG共混物为载体材料,采用超声乳化法制备包载荧光染料DiR的纳米囊,并对纳米囊的形貌、体外荧光特性、稳定性等进行表征,考察其体外生物相容性,为将来作为安全的药物光学示踪载体应用提供基础。

1 材料

1.1 仪器

WINNER-801型纳米激光粒度仪(济南微纳颗粒技术有限公司);Zetasizer Nano ZS90型激光粒度仪(英国

Malvern公司);BT25S型电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];JEM-1400 PLUS型透射电子显微镜(日本电子株式会社);FS-300N型超声波处理器(上海生析超声仪器有限公司);DMIL-LED型荧光倒置显微镜(德国Leica公司);TDL-60B型台式离心机(上海安亭科学仪器厂);IVIS LuminaLT Series III型小动物活体成像系统(美国Caliper Life Sciences公司);Multiskan FC型酶标仪(上海赛默飞世尔仪器有限公司);CCL-170B-8型CO₂培养箱(昆明倍捷科技有限公司);细胞培养瓶(美国Costar公司)。

1.2 试剂

PLGA[分子量(M_w):20 kDa,乳酸-羟基乙酯(LA-GA)聚合质量比:75:25,批号:20140921]、PEG-PLGA[M_w (PEG):4 kDa, M_w (PLGA):20 kDa,PEG-PLGA聚合质量比:1:5,批号:20140918]均由济南岱刚生物科技有限公司提供;聚乙烯醇(PVA,美国Sigma公司, M_w :89~98 kDa,水解度:99%);DiR(美国Biotium公司);DMEM培养基、胎牛血清(以色列BioInd公司);MTT(大连美仑生物技术有限公司);二甲基亚砜(DMSO,美国Sigma公司);0.9%氯化钠注射液(以下简称“生理盐水”,昆明南疆制药有限公司,批号:C170503);其余试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

1.3 细胞与动物

人源性HL7702肝细胞由中国科学院上海细胞生物研究所提供;Wistar大鼠[动物许可证号:SCXK(湘)2016-0002]由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 DiR-PEG-PLGA荧光纳米囊的制备

参照文献[10-11],采用改良的超声乳化法制备DiR-PEG-PLGA纳米囊。精密称取PLGA 25 mg,溶于含有0.5 mg DiR的乙酸乙酯3 mL中,加水200 μ L,在避光冰浴条件下,超声(功率:105 W,频率:20 kHz)处理32 s,形成油包水(W_1/O_1)初乳;将初乳加入含有75 mg PEG-PLGA的乙酸乙酯2 mL中,超声(功率:90 W,频率:20 kHz)处理4 s,形成 W_1/O 乳液;将乳液加入0.5% PVA溶液25 mL中,超声(功率:75 W,频率:20 kHz)处理56 s,形成水包油包水($W_1/O/W_2$)复乳;将复乳以75 mL水稀释,于通风橱内避光搅拌过夜,挥去乙酸乙酯;

最后将所得乳液以 6 000 r/min(离心半径:13 cm,下同)离心 10 min,收集沉淀,再以水洗涤并同法离心 2 次,收集得 10 mL 的蓝绿色乳液,即为 DiR-PEG-PLGA 纳米囊。依法制备 4 批纳米囊样品(批号:20160811、20160812、20160813、20160814),于 4 ℃ 保存。

2.2 DiR-PEG-PLGA 纳米囊的表征

2.2.1 粒径与 Zeta 电位测定 取 4 批纳米囊样品(批号:20160811、20160812、20160813、20160814)适量,以水稀释后采用 WINNER-801 型激光粒度仪测定粒径的多分散系数(PDI),采用 ZS90 型激光粒度仪测定 Zeta 电位,每个样品重复测定 3 次。结果显示,4 批样品的平均粒径为 (507.53 ± 7.87) nm, RSD 为 1.55% (粒径分布见图 1); PDI 为 $0.306 1 \pm 0.001 5$; Zeta 电位为 (-35.20 ± 0.92) mV。

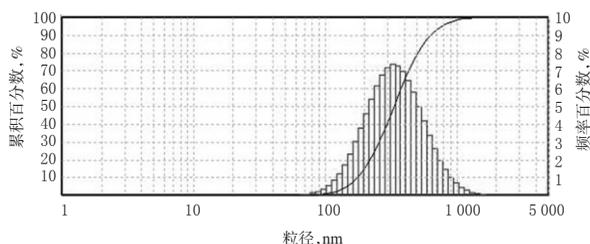


图 1 DiR-PEG-PLGA 纳米囊粒径分布图

Fig 1 Particle size distribution of DiR-PEG-PLGA nanocapsules

2.2.2 形貌表征 取纳米囊样品(批号:20160813)适量,以水稀释后滴于载玻片上,采用倒置显微镜观察纳米囊显微形态(见图 2)。结果,显微镜视野内可见大量囊泡状纳米粒子均匀分布,未见明显聚集或融合现象。将样品滴于细胞计数板上,按照细胞计数方法估算纳米囊浓度,得样品浓度约为 7.68×10^{12} mL⁻¹。将样品滴于透射电镜专用铜网上,滤纸吸于多余样品,室温干燥后,以 2% 磷钨酸溶液染色,采用透射电镜(加速电压:120 kV)观察纳米囊形貌(见图 3)。结果,透射电镜下可见纳米囊分布均匀,呈圆球形,边缘较光滑圆整,核壳结构明显,而且内核水层未被磷钨酸染色,表明纳米囊外壳结构完整,具有较强的包封药物的能力;纳米囊粒径约 300 nm 左右,略小于激光粒度仪测定结果,这可能由于激光粒度仪测定的是纳米囊在液体状态下的水合粒径,而透射电镜测定的是干燥状态下的粒径造成的差异^[12]。

2.2.3 体外稳定性考察 取纳米囊样品(批号:20160813)适量,以水稀释后在 4 ℃ 条件下保存,每隔 30 d 测量一次粒径和 PDI,考察纳米囊 6 个月内的稳定性。结果显示,纳米囊 6 个月内粒径变化很小,在 480~530 nm 之间,平均粒径为 (509.19 ± 15.55) nm, RSD 为 3.05%;平均 PDI 为 $0.255 6 \pm 0.018 7$, RSD 为 7.32%,详见图 4。结果表明,所制纳米囊稳定性较好,具有作为载药体系的潜力。

2.2.4 体外荧光成像特性考察 按照“2.1”项下方法,分别称取 PLGA 25 mg,溶于含有 0、0.1、0.2、0.3、0.5 mg

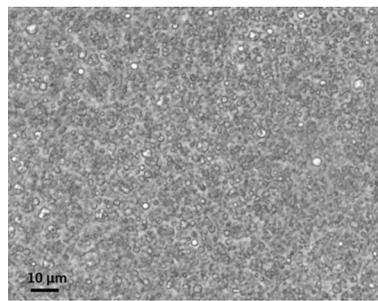


图 2 DiR-PEG-PLGA 纳米囊显微镜图(×400)

Fig 2 Microscope photograph of DiR-PEG-PLGA nanocapsules (×400)

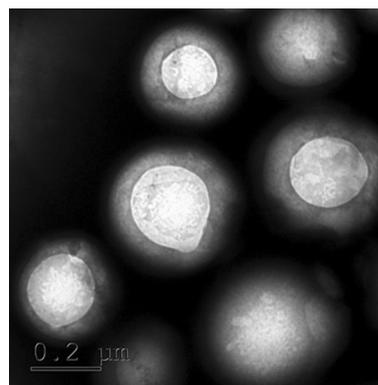


图 3 DiR-PEG-PLGA 纳米囊透射电镜图(×80 000)

Fig 3 TEM photograph of DiR-PEG-PLGA nanocapsules (×80 000)

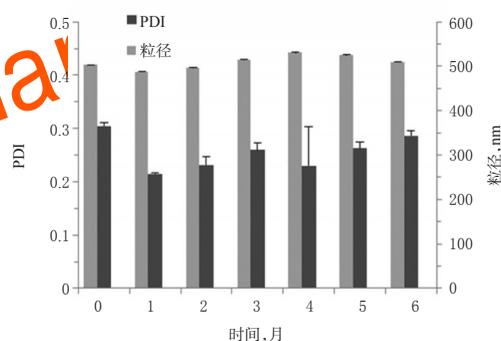


图 4 DiR-PEG-PLGA 纳米囊 6 个月内的稳定性

Fig 4 Stability of DiR-PEG-PLGA nanocapsules within 6 months

DiR 的乙酸乙酯 3 mL 中,制备含不同量 DiR 的纳米囊样品(样品中 DiR 最终质量浓度分别为 0、10、20、30、50 μg/mL),加于 96 孔细胞培养板中,每孔 100 μL。采用小动物活体成像系统进行扫描(参数设置:激发波长为 745 nm,发射波长为 780 nm,曝光时间为 3 s)。结果显示,纳米囊样品具有明显的荧光信号,且信号强度随着荧光染料 DiR 质量浓度的增加而明显增强,并呈现浓度依赖性,详见图 5。

将所得图像选取相同大小的感兴趣区域(Region of interest, ROI),经 IVIS Lumina III 4.3.1 版小动物成像系统软件分析处理,以荧光信号强度为纵坐标(y)、纳米囊中 DiR 质量浓度为横坐标(x)进行线性拟合,得线性方

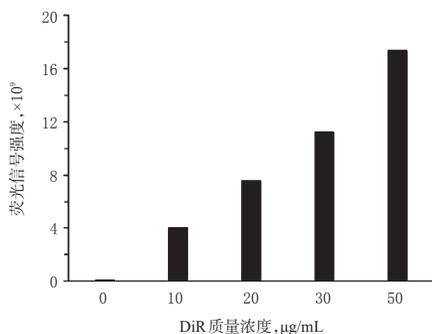


图5 DiR-PEG-PLGA 纳米囊体外荧光信号强度

Fig 5 Fluorescence signal intensity of DiR-PEG-PLGA nanocapsules *in vitro*

程为 $y=0.345 2x+0.433 4 (R^2=0.997 3)$ 。结果表明, 纳米囊荧光信号强度与 DiR 质量浓度的线性关系较好, 呈明显的正相关性, 提示 DiR-PEG-PLGA 纳米囊具有作为荧光成像对比剂的能力, 同时可用于后续活体动物体内成像过程中的实时半定量研究。

2.3 DiR-PEG-PLGA 纳米囊的体外生物相容性评价

2.3.1 体外毒性试验 参考文献[6], 采用 MTT 法检测 DiR-PEG-PLGA 纳米囊的体外毒性。将人源性 HL7702 肝细胞在 DMEM 培养基中培养, 正常传代后, 取对数生长期的细胞以每孔 $8 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 的浓度铺于 96 孔培养板内, 每孔 100 μL , 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h; 加入以水稀释的 8 组不同浓度的纳米囊样品(批号: 20160813), 每孔 100 μL , 使纳米囊的终浓度为 $8 \times 10^{10} \sim 77 \times 10^{10} \text{ mL}^{-1}$, 每组 5 个复孔。同时设置对照组和调零组: 对照组仅加入细胞和 DMEM 培养基; 调零组内仅加入不同浓度的纳米囊和 DMEM 培养基。将培养板放入 CO_2 培养箱中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h 后, 每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μL 继续孵育 4 h; 吸弃培养液, 加入 DMSO 150 μL , 于摇床上低速振荡 10 min。采用酶标仪在 492 nm 波长处测定每孔的吸光度 (OD) 值, 计算纳米囊的细胞存活率。细胞存活率 (%) = $(\text{OD}_{\text{test}} - \text{OD}_{\text{zero}}) / (\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{zero}}) \times 100\%$, 式中 OD_{test} 为纳米囊样品的 OD 值, $\text{OD}_{\text{control}}$ 为对照组的 OD 值, OD_{zero} 为调零组的 OD 值, 结果见图 6。参照《医疗器械生物学评价》(GB/T16886-1-1997) 的规定, 一般认为毒性分为 6 级: 当细胞存活率 $\geq 100\%$ 为 0 级, 75% ~ 99% 为 1 级, 50% ~ 74% 为 2 级, 25% ~ 49% 为 3 级, 1% ~ 24% 为 4 级, 0 为 5 级; 其中, 级数越高, 毒性越大, 达到 1 级即为较安全^[13]。由图 6 可见, 细胞存活率均在 75% 以上, DiR-PEG-PLGA 纳米囊对 HL7702 细胞的毒性为 0~1 级。同时, 在倒置显微镜下观察, 结果发现加入纳米囊的各样品组细胞生长状态较好、形态规则, 与对照组细胞相比无明显差异, 因此可判断纳米囊无细胞毒性。

2.3.2 体外溶血试验 参考文献[12]溶血实验方法, 预先采集健康 Wistar 大鼠血液 4 mL, 加入适量肝素抗凝,

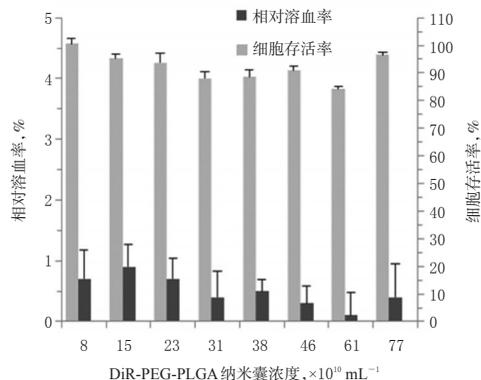


图6 DiR-PEG-PLGA 纳米囊体外生物相容性

Fig 6 Biocompatibility of DiR-PEG-PLGA nanocapsules *in vitro*

并与生理盐水按体积比 1:1 混合, 1 500 r/min 离心 15 min, 收集红细胞沉淀; 沉淀以 10 倍体积量生理盐水混匀, 1 500 r/min 离心 25 min, 洗涤 3 次至上清液无色; 最后将收集的红细胞沉淀以生理盐水制成 2% 红细胞悬液备用, 24 h 内用完。取纳米囊样品(批号: 20160813)适量, 加水稀释至不同浓度(浓度设置同“2.3.1”项), 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中预热 30 min。同时设置阳性对照组和阴性对照组: 阳性对照组以水代替样品液; 阴性对照组以生理盐水代替样品液。每组实验重复 5 次。吸取样品液 150 μL 与 2% 红细胞悬液等体积混合, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中孵育 1 h 后, 3 000 r/min 离心 25 min。观察各管内溶血状态; 吸取每管内上清液 150 μL 置于 96 孔培养板内, 采用酶标仪于 540 nm 波长处测定每孔 OD 值, 计算样品的相对溶血率。相对溶血率 (%) = $(\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{negative}}) / (\text{OD}_{100\%} - \text{OD}_{\text{negative}}) \times 100\%$, 式中, $\text{OD}_{\text{sample}}$ 为纳米囊样品的 OD 值, $\text{OD}_{100\%}$ 为阳性对照组的 OD 值, $\text{OD}_{\text{negative}}$ 为阴性对照组的 OD 值, 结果见图 6。一般认为, 相对溶血率 < 5% 即达到注射用的标准要求^[14]。结果显示, 阳性对照组离心管内呈现红色透明溶液, 管底无完整红细胞沉淀, 相对溶血率为 100%; 阴性对照组红细胞全部沉积于离心管下层, 上清液为无色透明溶液, 相对溶血率为 0; 而不同浓度的纳米囊样品管与阴性对照组现象相似, 即上清液近似无色透明, 红细胞沉于管底, 其相对溶血率均在 1% 以下, 远低于 5% 的标准值, 符合 2015 版《中国药典》(四部) 通则(1148)“溶血与凝聚检查法”项下对相对溶血率检查的规定^[14]。结果表明, DiR-PEG-PLGA 纳米囊的体外生物相容性较好, 具有用于注射剂开发的潜力。

3 讨论

超声乳化法制备纳米囊是借助超声波的机械剪切和空化作用, 将有机相与水相混合, 形成水包油包水(W/O/W)乳液, 再挥发除去有机溶剂, 制得粒径在纳米级范围的均匀分散体系^[11]。超声乳化法多选用二氯甲烷或

氯仿作为油相溶剂^[10-11],但前期研究发现二氯甲烷或氯仿在本体系中并不能很好地分散纳米囊,因此选用与水具有一定亲和性的乙酸乙酯为油相溶剂。DiR是一种光吸收在近红外区的荧光染料,以其为示踪剂有利于后期进行小动物活体成像研究。为了更好地包载DiR,选用PLGA与PEG-PLGA共混物制备纳米囊,即先利用疏水性更强的PLGA包载亲脂性的DiR,外面再包裹PEG-PLGA增强其亲水性。研究中制备的DiR-PEG-PLGA纳米囊虽然PDI较大,但Zeta电位绝对值也较高 $[(35.20 \pm 0.92)\text{mV}]$,Zeta电位与纳米粒的表面电荷有关,能够表征胶体分散体系的稳定性,即使纳米粒粒径很小,但如果Zeta电位的绝对值较高($>15\text{mV}$),则纳米粒子间也不易发生聚集,纳米载药系统就会比较稳定^[11-15]。本研究结果提示,DiR-PEG-PLGA纳米囊稳定性较好,可以完整包载疏水性DiR、增强其水溶性;同时提示,可以利用DiR的体外荧光特性进行后续小动物体内示踪成像,进行载药纳米囊的体内分布研究。

生物相容性是评价纳米载体材料用于临床前研究的最基本要求,是药物制剂生物安全性的保证。细胞毒性试验一般被列为生物安全评价体系中的首选项目之一,MTT法是其中检测细胞生长和存活情况的常用方法,它通过体外细胞培养来评价样品潜在的毒性,操作简便、灵活、重复性好^[16]。本实验结果显示,不同浓度的DiR-PEG-PLGA纳米囊对于细胞存活与生长均无明显影响,细胞存活率均大于75%,细胞毒性分级均为1级,属于无毒生物材料。溶血试验通常被认为是细胞毒性试验的补充,主要考察生物材料与血液直接接触后,是否会导致红细胞溶解或渗透压改变,可灵敏地反映生物材料对红细胞的影响,在生物安全性评价中起重要作用^[13]。PVA作为一种高分子表面活性剂,能够在纳米粒子表面形成交联网状结构,起到稳定纳米粒子的作用,但过多的PVA也会引起溶血反应^[17-18]。本实验结果显示,以PVA稳定的不同浓度的纳米囊符合相对溶血率 $<5\%$ 的注射用标准要求,无溶血作用,表明DiR-PEG-PLGA纳米囊具有良好的体外生物相容性。

综上所述,本研究制备的包载荧光染料的DiR-PEG-PLGA纳米囊有望成为一种安全的药物光学示踪载体,具有一定的临床应用前景,但其体内荧光示踪及分布情况还有待进一步研究。

参考文献

[1] 方亮,吕万良,吴伟,等.药剂学[M].8版.北京:人民卫生出版社,2016:327-330.
[2] 张阳德,刘美洲,刘东京,等.纳米粒介导的脑靶向给药研究进展[J].中国现代医学杂志,2008,18(10):1394-1398.

[3] 奉建芳.我国纳米给药系统的研究与应用[J].中南药学,2004,2(1):29-33.
[4] 何伟,洪怡.载药纳米粒制备的研究进展[J].中国医药导报,2016,13(14):33-36.
[5] 许莉莉,张俊伟,王杏林.几种纳米载体的应用研究进展[J].中国新药杂志,2013,22(5):561-568.
[6] 薛继杨.新型TPGS乳化紫杉醇-PEG-PLGA纳米粒的制备及其抗卵巢癌活性研究[J].中南药学,2016,14(10):1037-1040.
[7] 曾昭武,肖人钟,王小丽,等.聚乙二醇-聚乳酸嵌段共聚物纳米粒的研究进展[J].现代生物医学进展,2012,12(1):179-182.
[8] 张伟,刘琳婕,何仲贵.聚乙二醇在药物制剂中的应用[J].中国药剂学杂志:网络版,2007,5(2):67-74.
[9] CHO H, INDIG GL, WEICHERT J, et al. In vivo cancer imaging by poly (ethylene glycol) -b-poly (ε-caprolactone) micelles containing a near-infrared probe[J]. *Nanomed: Nanotechnol Biol Med*,2012,8(2):228-236.
[10] 李茂萍.叶酸靶向相变载金高分子超声及光声造影剂的基础研究[D].重庆:重庆医科大学,2014.
[11] 张婵.叶酸靶向羧基丁酸与羧基辛酸共聚物载药纳米粒缓释给药系统的研究[D].太原:山西大学,2011.
[12] CHENG X, LI H, CHEN YC, et al. Ultrasound-triggered phase transition sensitive magnetic fluorescent nanodroplets as a multimodal imaging contrast agent in rat and mouse model[J]. *Plos One*,2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0085003.
[13] 陈道桢,李向东,唐秋莎,等.超顺磁性氧化铁纳米粒子的制备、表征及生物相容性研究[J].山东医药,2012,52(39):1-4.
[14] 黄炜忠,蔡泽府,张清民.紫外分光光度法测定注射剂溶血的方法研究[J].今日药学,2016,26(10):713-720.
[15] XU B, DOU HJ, TAO K, et al. Influence of experimental parameters and the copolymer structure on the size control of nanospheres in double emulsion method[J]. *J Polym Res*,2011,18(1):131-137.
[16] Richardson JR, Miller J, Reichert W. Polyimides as biomaterials: preliminary biocompatibility testing[J]. *Biomaterials*,1993,14(8):627-635.
[17] 秦静雯,王鸿博,蒋岩岩,等.聚乙烯醇-低分子右旋糖酐纳米纤维的制备及其性能研究[J].化工新型材料,2013,41(5):49-57.
[18] 唐敬玉,包露涵,李雪,等.细菌纳米纤维素与聚乙烯醇复合水凝胶管的生物相容性表征[J].中国组织工程研究,2017,21(34):5474-5480.

(收稿日期:2017-11-22 修回日期:2018-02-23)

(编辑:段思怡)