

壳聚糖修饰的聚乳酸-羟基乙酸共聚物 纳米颗粒在控制释放抗人类免疫缺陷病毒 药物传递中的应用

朱晓红¹ 周诗梦² 朱晓霞² 邹美银¹

【摘要】目的 开发抗人类免疫缺陷病毒(HIV)纳米药物递送系统和释放方式,改善抗HIV药物的生物利用度,并减少不良反应。**方法** 通过水油水乳化和蒸发技术,抗病毒药物依非韦伦、替诺福韦酯和拉米夫定(重量比2:1:1)与聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)及壳聚糖混合制备PLGA和聚乳酸-羟基乙酸共聚物-壳聚糖(PLGA-CS)载药纳米颗粒。PLGA和PLGA-CS载药纳米颗粒的粒径、多分散性分布指数和 ζ -电位等进行表征,应用高效液相色谱(HPLC)探讨PLGA和PLGA-CS药物载量、包封率和药物释放,体外细胞试验分析生物相容性和细胞毒性。**结果** PLGA-CS和PLGA颗粒粒径均一性好,经CS修饰PLGA-CS粒径由 (198.2 ± 2.3) nm增加至 (219.8 ± 6.5) nm,且与扫描电子显微镜(SEM)结果一致。经CS修饰后 ζ -电位由 (-25 ± 1.6) mV增加至 (23.5 ± 1.9) mV。抗病毒药物包封效率由49%~52%增加至68%~77%。4℃和25℃下存储2个月PLGA-CS纳米颗粒药物保持量均>90%,提示PLGA-CS载药纳米颗粒稳定性好。PLGA-CS初始暴发性释放减少,24 h内释放不足20%,与PLGA相比PLGA-CS的释放更长久。MTT实验发现,与PLGA-CS共培养的细胞活力均>91.2%,且不依赖纳米颗粒浓度,提示PLGA-CS细胞毒性低生物相容性高。**结论** PLGA-CS对抗HIV药物封装率高、稳定性好、无毒,且具有持续释放药物和增强药物疗效的优点,这为HIV感染者临床给药提供了一种新思路。

【关键词】 获得性免疫缺陷综合征;聚乳酸-羟基乙酸-壳聚糖;抗病毒药物;药物递送载体控制释放

Application of chitosan-modified poly (lactic-co-glycolic acid) polymeric nano carriers on anti-human immuno-deficiency virus drug encapsulation Zhu Xiaohong¹, Zhou Shimeng², Zhu Xiaoxia², Zou Meiyin¹.

¹Infection Department of Nantong Third Hospital Affiliated to Nantong University, Nantong 226000, China;

²School of Public Health, Nantong University, Nantong 226007, China

Corresponding author: Zou Meiyin, Email: zoumeiyin@126.com

【Abstract】Objective To develop a new nano-drug delivery system, to improve bioavailability and reduce adverse effect of antiretroviral drugs for human immunodeficiency virus (HIV). **Methods** Nano-drug delivery system produced by a water-oil-water emulsion and solvent evaporation technique was prepared by mixing anti-viral drug: efavirenz (EFV), tenofovir (TDF) and lamivudine (LAM) (weight ratio of 2:1:1) with poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and PLGA-chitosan (PLGA-CS). The drug-loaded nanoparticles were characterized for their particle size, poly-dispersity index and ζ -potential. The drug loading, encapsulation efficiency and drug release of PLGA and PLGA-CS nanoparticles were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC). In vitro, cell viability was performed to evaluate biocompatibility and cytotoxicity. **Results** Both PLGA-CS and PLGA nanoparticles exhibit good uniformity in particle size. Due to be coated with CS, the particle size of PLGA-CS nanoparticle was increased from (198.2 ± 2.3) nm to (219.8 ± 6.5) nm; the ζ -potential was increased from (-25.0 ± 1.6) mV to (23.5 ± 1.9) mV.

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2023.02.008

基金项目:南通市市级科技计划项目(No. MSZ20172);南通市卫生健康委员会科研立项课题(No. MA2019007)

作者单位:226006 南通市,南通大学附属南通第三医院感染二科¹;226019 南通市,南通大学公共卫生学院²

通信作者:邹美银, Email: Zoumeiyin@126.com

1.9) mV; drug encapsulation efficiency was increased from 49%-52% to 68%-77%. After a 2-month storage at 4 °C or 25 °C, the drug retention of PLGA-CS nanoparticles remained above 90%. These results confirmed the excellent stability of PLGA-CS nanoparticles. The initial burst release of the antiretroviral drug from PLGA-CS nanoparticles exhibited a significant reduction, with the drug release remaining below 20% within 24 hours. The results in vitro studies pointed to the prolonged antiviral activity of AR-PLGA-CS. The stability of PLGA-CS was better than PLGA. Regardless of the concentration of PLGA-CS nanoparticles, the MTT assay showed that the cell viability was higher than 90%. This result indicated that PLGA-CS nanoparticles have low toxicity and excellent biocompatibility. **Conclusions** PLGA-CS nanoparticles exhibited high drug encapsulation efficiency, excellent stability, and the capacity of sustained drug release and enhanced therapeutic efficacy. This provides a new way for the clinical administration of antiretroviral drugs to patients with HIV infection.

【Key words】 Human immunodeficiency virus; Poly (lactic-co-glycolic acid)-chitosan; Antiviral drugs; Drug delivery vehicle

人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)为主要感染人类免疫系统,并可导致获得性免疫缺陷综合征(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)的一种慢病毒^[1]。HIV特异性攻击和破坏人体免疫系统的重要细胞,破坏免疫系统,使感染人群更易发生各种机会性感染和肿瘤,最后进展为AIDS。联合国艾滋病规划署(Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, UNAIDS)报道,截止2020年底,全球现存活HIV/AIDS患者3 770万例,当年新发HIV感染者150万例,有2 750万人正在接受抗病毒治疗(antiretroviral, ART)^[2]。

高效联合抗反转录病毒治疗(high active antiretroviral therapy, HAART)是目前治疗AIDS唯一有效的方法,极大地改善了HIV感染者和AIDS患者的生活质量,延长了HIV/AIDS患者生存时间^[3]。目前我国临床上抗HIV免费药物有拉米夫定、替诺福韦酯和依非韦伦等,但以上药物不良反应较多,故导致患者服药依从性差,从而影响了药效^[4]。不仅如此,传统给药方式使药物难以准确到达靶部位,药物的生物利用度低且对正常器官具有各种不良反应,最终导致非靶位点的用药量过量,而感染位点用药量不足^[5]。加之HIV易变异从而导致耐药,药物剂量加大导致不良反应加重,影响临床抗HIV药物的疗效。

近年来,随着纳米材料的迅速发展,聚乳酸-羟基乙酸共聚物[Poly (lactic-co-glycolic acid), PLGA]纳米颗粒因其生物相容性和生物可降解性而被公认为理想的药物递送载体。通过一定手段组装成纳米级别的载体,再将药物包载进去。药物纳米

载体具有明显的优势,主要包括以下几个方面:①可以将疏水性药物包载进去,将其载到靶向部位,增加靶向位点的药物浓度^[6-7];②血液循环可影响药物活性,纳米载体可减少药物与体内环境的接触,延长了药物载血液循环中的半衰期;③具有独特尺寸效应的纳米粒子能跨过许多生物屏障和组织间隙到达目标组织部位,目标组织部位的细胞间质压高和淋巴管缺失导致这些纳米载体无法有效地从靶向部位被外排出去,从而实现了纳米粒子靶向位点的被动富集,从而达到对特定器官、组织进行靶向给药^[8];④可以实现多种药物的同时输运,达到协同治疗的效果^[9]。

基于上述抗HIV药物存在溶解性差、易降解以及耐药性等问题,本研究通过水油水乳化和蒸发技术制备PLGA-CS纳米载体,将常用免费HIV抗病毒药拉米夫定、替诺福韦酯和依非韦伦包载到PLGA-CS纳米载体中,系统研究PLGA-CS纳米载体的理化特性、生物相容性、稳定性、包封率、释放能力、稳定性及细胞毒性等,为临床抗HIV给药方法提供新思路,现报道如下。

材料与方法

一、试剂

拉米夫定(lamivudine, LAM)、替诺福韦酯(tenofovir dipivoxil, TDF)、依非韦伦(efavirenz, EFV)、聚乳酸-羟基乙酸共聚物[Poly (lactic-co-glycolic acid) PLGA]50/50, 相对分子质量(MV) = 5 000)、壳聚糖(Chitosan, CS, 去乙酰度(degree of deacetylation, DD) = 90%)购自国

药集团; 噻唑蓝 (thiazolyl blue tetrazolium bromid, MTT), 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA), 考马斯亮蓝购自碧云天生物技术有限公司; 胰蛋白酶、DMEM (高糖) 液体培养基购自美国Hyclone公司; 二氯甲烷, 冰醋酸、乙醇、盐酸、氢氧化钠等其他试剂均为分析纯。

二、细胞及培养

本文所使用的TZM-B1细胞由上海公共卫生研究中心张晓燕教授友情提供, 用含有10%胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和1%青霉素-链霉素的DMEM培养基在37℃、5% CO₂、95%饱和湿度下培养。TZM-B1细胞每两天则采用0.25%胰酶 (含1 mmol/L EDTA) 处理后1:10传代1次。

三、载药纳米颗粒的制备与表征

PLGA纳米载药颗粒: 采用乳化和溶剂挥发法制备纳米粒^[10-11]。2 mg抗病毒药物粉末 (质量比: LAM:TDF:EFV = 1:1:2) 于1 ml二氯甲烷充分溶解, 与等体积PLGA (10 mg/ml, 溶于二氯甲烷) 充分混合超声1 min, 随后混合有机相中逐滴加1 ml聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol, PVA) [重量体积比 (W/V): 2.5%] 溶液中, 冰浴超声2 min, 将上述乳液迅速逐滴加至10.25 ml PVA (W/V: 0.025%) 水溶液中, 37℃搅拌4 h, 待有机溶剂挥发后, 13 000 r/min离心30 min (离心半径r = 32 cm), 弃去上清收集PLGA纳米粒, PLGA载药纳米粒也可加入10%蔗糖冻干保存备用。

聚乳酸-羟基乙酸共聚物-壳聚糖 (PLGA-CS) 载药纳米颗粒: 制备方法同上, 将抗病毒药物与PLGA形成的有机相加入1 ml PVA (2.5%, W/V) 溶液和500 μg壳聚糖溶于醋酸[体积比 (V/V): 1%] 溶液中, 冰浴下超声2 min形成油包水乳液, 将上述乳液迅速逐滴滴加到10.25 ml PVA (0.025%, W/V) 超声3 min形成水油水乳液。37℃搅拌4 h待有机溶剂完全挥发, 13 000 r/min离心30 min (离心半径r = 32 cm), 弃去上清收集即得PLGA-CS纳米粒, PLGA-CS加入10%蔗糖冻干保存备用。

扫描电子显微镜 (scanning electron microscopy, SEM) 对载药纳米颗粒样品的粒径和微观形态进行表征, 马尔文激光粒度仪测量载药纳米颗粒样品的ζ-电位值、水合动力学粒径和多分散性分布指数。

四、抗病毒药物装载和封装效率

通过高效液相色谱 (high performance liquid

chromatography, HPLC) 测定EFV、TFV和LAM 3种抗病毒药物在纳米颗粒中载药量 (%) 和包封率 (%)。2 mg新鲜制备的PLGA或PLGA-CS载药纳米颗粒13 000 r/min离心30 min (离心半径r = 32 cm), 弃去上清液, 加入0.5 ml二氯甲烷溶解纳米颗粒, 超声5 min后用氮气干燥, 最后加入HPLC级水, 测定载药量和包封率, 具体计算方法如下: 包封率 (encapsulation efficiency, EE) = 载药纳米颗粒中药物量/药物投入总量 × 100%; 载药量 (loading efficiency, LD) = 载药纳米颗粒中药物量/载药纳米颗粒总量 × 100%。

五、稳定性和体外药物释放动力学研究

采用HPLC法测定PLGA和PLGA-CS纳米载药颗粒的稳定性和体外释放情况, 具体操作参照Bienvenu等^[12-13]研究方法。取2 mg新鲜制备的PLGA和PLGA-CS用蒸馏水洗涤2次, 超声分散于1 ml磷酸盐缓冲液 (PBS, 10 mmol/L、pH: 7.2) 中4℃和25℃搅拌; 在预定时间点离心弃上清, 用蒸馏水洗2次后, 加入0.5 ml二氯甲烷溶解, 通过HPLC对药物随时间的释放进行计算累计释放度, 确定释放机制。

六、生物相容性

1. BSA的吸附: 1.0 mg/ml新鲜制备的纳米悬浮液与0.1 mg/ml BSA等体积混合, 37℃振荡孵育1 h、6 h、12 h和24 h后, 4℃下12 000 r/min离心20 min (离心半径r = 32 cm), 收集上清, 用考马斯亮蓝法测定上清595 nm处吸光值^[14], 分析纳米颗粒对BSA的吸附情况。

2. 红细胞溶血试验: 将健康绵羊的新鲜血液收集到含有肝素钠的试管中, 将血液用等体积0.9%生理盐水稀释。取100 μl稀释血液分别加到1 ml新鲜制备的PLGA或PLGA-CS纳米 (1 mg/ml) 悬浮液中。蒸馏水作为阳性对照, 生理盐水作为阴性对照。37℃振荡孵育1 h后, 2 500 r/min离心10 min, 以纳米颗粒悬浮液为空白对照, 紫外分光光度计检测545 nm处的吸光值。该实验设3个平行。纳米颗粒的溶血 (%) 根据以下等式计算^[15]:

$$\text{溶血}(\%) = \frac{A - A_n}{A_p - A_n} \times 100\%$$

A代表红细胞与纳米载药颗粒孵育后离心上清的吸光值, A_p代表阳性对照组离心上清的吸光值, A_n代表阴性对照组离心上清的吸光值。

3. 细胞毒性研究: MTT比色法检测纳米载药

颗粒对T2M-B1细胞的细胞毒性,按 5×10^4 /孔接种96孔细胞板,培养24 h后弃去培养上清,每孔加入200 μ l含PLGA (0 mg/ml、0.1 mg/ml、0.2 mg/ml和0.3 mg/ml)或PLGA-CS (0 mg/ml、0.1 mg/ml、0.2 mg/ml和0.3 mg/ml)和10% FBS的DMEM,200 μ l含10% FBS的DMEM作对照。培养24 h后,每孔加入20 μ l MTT (5 mg/ml)溶液继续培养4 h,弃去上清后每孔再加入150 μ l二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)。细胞培养板震荡20 min后检测565 nm处的吸光值,所有实验设置5个重复,细胞活力计算公式如下:

$$\text{细胞活力}(\%) = \frac{\text{检测孔平均}A\text{值}}{\text{阴性对照孔}A\text{值}} \times 100\%$$

七、数据处理

采用SPSS 25.0软件对数据进行分析,计量资料中纳米颗粒的平均粒径、多分散性指数和 ζ -电位呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。药物载药率和封装率,溶血率等均采用百分比表示。

结 果

一、载药纳米颗粒的形态和大小

载药纳米颗粒的合成是在Prabhuraj等^[10]研究基础上稍作修改,PLGA和CS作为聚合物材料,PVA作为稳定剂,将疏水性抗病毒药物通过乳化和有机溶剂蒸发技术包封到PLGA和PLGA-CS纳米颗粒里。马尔文粒度仪测量纳米载药粒子的粒径大小、多分散性指数及 ζ -电位如表1所示:PLGA和PLGA-CS纳米粒子的 ζ -电位分别为 (-25.0 ± 1.6) mV和 (23.5 ± 1.9) mV,PLGA平均粒径从198.2 nm增加至219.8 nm;多分散性指数(polydispersity index, PDI)分布指数均 < 0.3 。扫描电镜结果(图1)

与粒度仪检测一致:PLGA-CS由180.4 nm增加至226.5 nm。

二、纳米颗粒的载药量和包封率

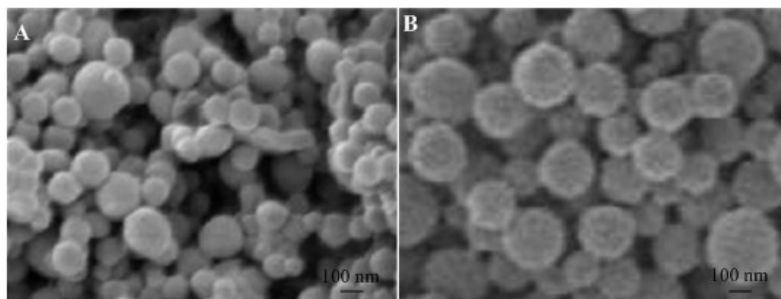
HPLC对LAM、TDF和EFV 3种药物的定量检测,C-18反向色谱柱分离药物,每种药物设置不同的流动相,所有样品上样前经0.2 μ m滤膜过滤。TDF的流动相是甲醇:乙酸铵:二辛基磺基琥珀酸钠(体积比为60:40:4),流动相流速为设置为1 ml/min注入,检测波长为265 nm^[18]。EFV的流动相由25%溶液A(Milli-Q水用0.1%乙酸调节pH至3.2)和75%溶液B(丙酮)组成,检测波长247 nm,检测方法参照^[19];LAM流动相由50 mmol/L NaH₂PO₄:TEA(体积比为996:4),用浓磷酸调节pH至3.2,设置流速1.5 ml/min,检测波长278 nm^[20]。根据公式计算3种药物的载药率和封装率如图2所示,PLGA中LAM、TDF和EFV 3种药物的载药率分别为4.4%、5.8%和8.2%,封装率为49%~52%,而PLGA-CS中LAM、TFN和EFZ 3种药物载药率分别为5.4%、6.3%和10%,封装率为68%~77%。

三、纳米颗粒的稳定性

有效的载药纳米颗粒必须具备一定的稳定性和药物保持量,室温是药物常用的存储条件。本研究分析不同存储温度(4 $^{\circ}$ C和25 $^{\circ}$ C)和存储时间(1个月和2个月)下PLGA和PLGA-CS的药物保持量。PLGA和PLGA-CS在4 $^{\circ}$ C和25 $^{\circ}$ C存储1个月均表现良好的稳定性,抗病毒药物的保持量无显著差异。随着存储时间的延长,PLGA-CS中抗病毒

表1 纳米颗粒的平均粒径、多分散性指数和 ζ -电位($\bar{x} \pm s$)

指标	PLGA	PLGA-CS
平均粒径(nm)	198.2 \pm 4.9	219.8 \pm 6.9
多分散性指数	0.23 \pm 0.02	0.27 \pm 0.04
ζ -电位(mV)	-25.0 \pm 1.6	23.5 \pm 1.9



注: A: PLGA, B: PLGA-CS

图1 纳米载药颗粒的SEM图

药物的保持量基本不变。存储2个月, 25 °C条件下PLGA中抗病毒药物的保持量显著降低, 见图3。

四、体外药物释放动力学和机制

PLGA-CS纳米粒子的制备与PLGA纳米离子制备方法类似。纳米颗粒体外药物释放研究发现4 °C条件下PLGA-CS中初始期LMV和TDF释放缓慢, 在24 h内释放不足20%, 在随后100 h缓慢且几乎稳定地释放, 而EFZ最初的释放水平超过LMV和TDF, 24 h内释放接近35%, 在随后100 h内释放量为55%。较PLGA, PLGA-CS释放更持久。与4 °C相比, 37 °C条件下3种抗病毒药物均释放较快, 见图4。

五、生物相容性

将1 mg/ml纳米颗粒与BSA共孵育, 96 h内载药纳米颗粒对BSA的吸附均< 7%, 纳米颗粒对蛋白吸附性低进一步表明PLGA和PLGA-CS纳米颗粒的生物相容性好, 见图5。

不同浓度PLGA和PLGA-CS纳米颗粒对红细胞损伤如图6所示, 随着载药纳米颗粒浓度的增加溶血程度均未发生改变, 且溶血率< 3%, 一般认为溶血百分率低于5%即为无毒^[25], 提示PLGA-CS和PLGA的细胞毒性低, 且生物相容性好。

六、PLGA-CS纳米载药的细胞毒性

为评估载药纳米颗粒的细胞毒性, 应用MTT实验分析载药纳米颗粒在37 °C经24 h孵育后TMZ-B1细胞的生存能力。24 h共培育后, 0 mg/ml、0.1 mg/ml、0.2 mg/ml和0.3 mg/ml PLGA-CS的细胞生存能力均> 91.2%, 且细胞活力不依赖纳米颗粒浓度。0 mg/ml、0.1 mg/ml、0.2 mg/ml和0.3 mg/ml PLGA的细胞生存能力均> 85.6%, 细胞活力随PLGA纳米颗粒浓度增加而降低, 见图7。提示PLGA-CS纳米颗粒的细胞毒性未表现出明显的时间依赖性和浓度依赖性, 表明CS修饰PLGA纳米颗粒可提高纳米颗粒的生物相容性。

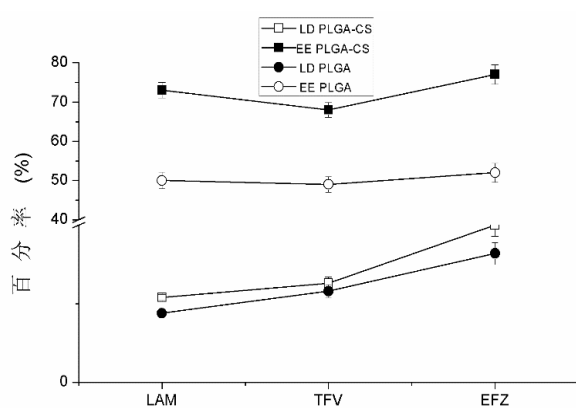


图2 纳米颗粒的载药率和封装率

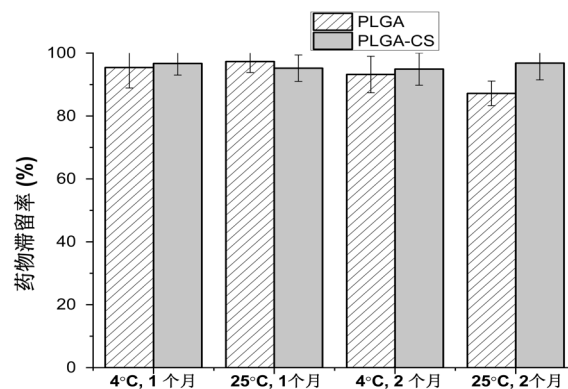
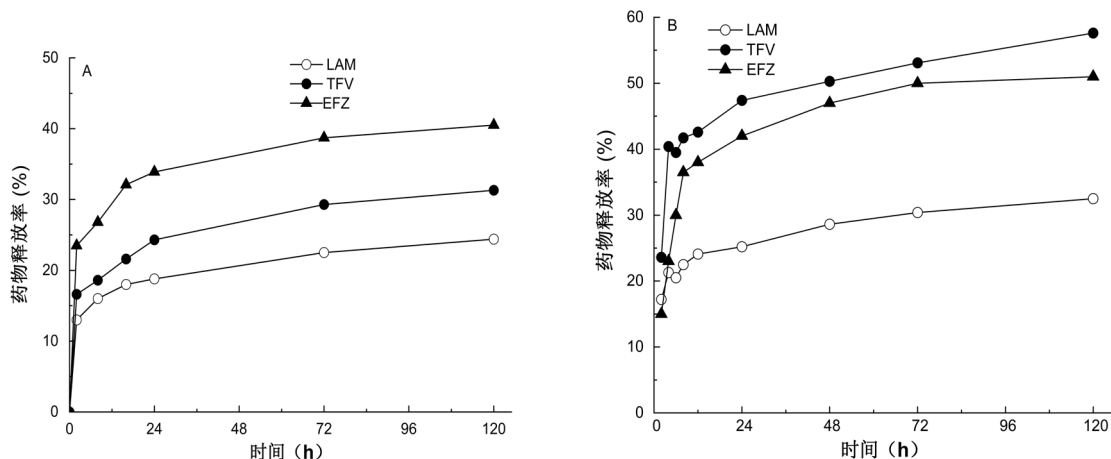


图3 载药纳米颗粒不同存储条件下药物保持量



注: A: 4 °C, B: 37 °C

图4 载药纳米颗粒体外释放情况

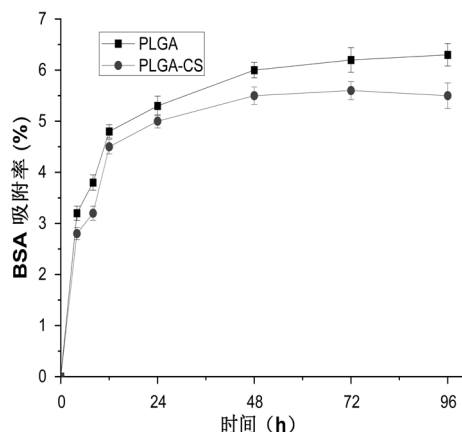


图5 纳米颗粒对BSA的吸附

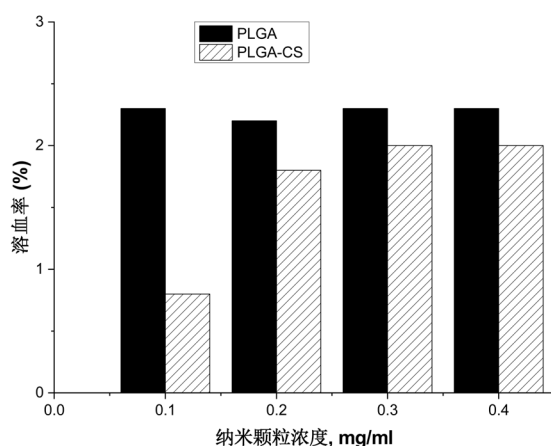


图6 纳米颗粒对红细胞的影响

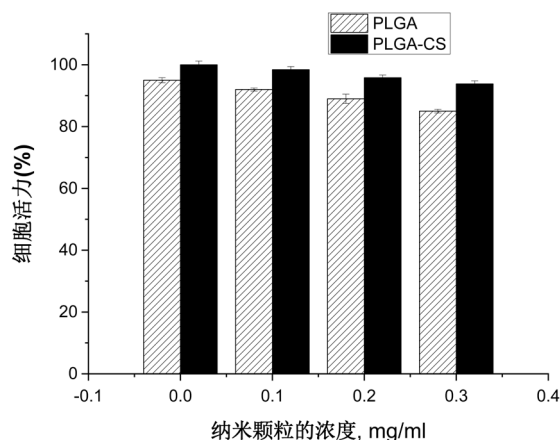


图7 纳米颗粒对TZM-B1的细胞毒性

讨 论

随着纳米技术的发展,纳米材料因其小尺寸效应、体积效应、表面效应和量子效应的独特优势

被广泛应用于靶向药物递送体系、设计及优化纳米载药系统,改善纳米药物递送系统能增加药物的溶解性、改变药物体内分布、提高药物靶向性,从而提高疗效,为临床给药系统提供了新思路,发挥靶向运载药物的优点。PLGA和壳聚糖作为理想的天然聚合物,具有高生物相容性和无毒性,且极易于被吞噬细胞摄取。通过优化PLGA聚合物中乳酸和羟基乙酸聚合物分子量大小、结晶度和玻璃转换温度等可调节PLGA在体内的降解速率,改变pH可改变壳聚糖在体内溶解性,以达到控释和缓释目的,被广泛用于靶向载体用于药物的缓释和控释,成为近年来相关研究的热点。

本研究以PLGA为核壳聚糖为壳通过水/油/水双乳化和有机溶剂蒸发技术,制备获得粒径分布均匀的PLGA-CS纳米颗粒(NPs),具有良好的生物相容性和较高的载药量,表明PLGA-CS NPs是一种潜在的高生物利用度口服递送系统。研究结果显示,PLGA和PLGA-CS纳米粒子的 ζ -电位分别为 (-25.0 ± 1.6) mV和 (23.5 ± 1.9) mV,带正电荷的CS吸附于带负电荷的PLGA纳米粒表面,使PLGA-CS带正电荷,初步表明CS成功包裹于PLGA纳米颗粒外壳。由于CS修饰在PLGA纳米颗粒表面,从而使PLGA的平均粒径从198.2 nm增加至219.8 nm, PDI分布指数均 < 0.3 ,可见PLGA和PLGA-CS的粒径分布均匀,表明通过乳化技术制备PLGA和PLGA-CS纳米颗粒比较成熟。扫描电镜结果与粒度仪检测一致:PLGA-CS由180.4 nm增加至226.5 nm。以上结果不仅提示PLGA和PLGA-CS纳米颗粒制备成功,且PLGA和PLGA-CS均能较好的分散在水中。

HPLC分别分析LAM、TDF和EFV 3种药物在PLGA和PLGA-CS中载药率和封装率,结果表明PLGA-CS与PLGA载药率差异无统计学意义,但PLGA-CS的封装率显著高于PLGA,可能与CS稳定吸附纳米粒表面有关,促进药物的封装,表明通过水/油/水乳化方法可有效提高抗病毒药物的封装,与以往研究一致^[21]。

PLGA-CS和PLGA纳米载药体系稳定性研究结果显示,1个月存储期内PLGA和PLGA-CS载药纳米颗粒的稳定性均较好,但PLGA纳米颗粒的药物保持量在存储2个月有显著降低趋势。导致抗病毒药物保持量变化的主要原因可能是PVA作为表面活性剂,稳定地吸附到纳米粒子的表面形亲水外

层,可短期稳定纳米颗粒。而CS作为稳定剂,在纳米粒子间形成空间位阻,克服纳米颗粒的胶体不稳定性。因此,CS更适合作为长期存储的稳定剂^[22]。

载药纳米颗粒的药物释放研究显示,与PLGA相比,PLGA-CS载药纳米颗粒的体外药物释放更为长久,但37℃条件下3种抗病毒药物均释放较快。这主要因4℃条件下PLGA和CS的吸水性降低,因而抗病毒药物的释放亦随之降低;另外,在纳米载药颗粒制备过程中,部分抗病毒药物LAM、TDF和EFV可能被吸附到纳米颗粒表面,也可能包埋在纳米颗粒内。PLGA纳米颗粒释放药物的初期受扩散控制,而释放的后期受溶解性控制,故抗病毒药物的释放主要取决于PLGA核心的降解和纳米颗粒的弱水溶性。尽管体内药物释放和药物药代动力学可能与体外结果不同,但与其他以报道的双亲核聚合物药物纳米载体相比,PLGA-CS稳定性高、药物泄露量少,因此缓释药物时间更长^[23-24]。

壳聚糖除了对PLGA进行表面水解改性,可进一步提高载药率、延长缓释时间。也提高了PLGA的生物相容性,对红细胞损伤低,溶血率<3%,在TBM-B1细胞中也显示出较高水平的细胞活性。以上表明CS修饰PLGA纳米颗粒不仅细胞毒性低,而且提高了PLGA纳米颗粒的生物相容性,与Herdiana等^[26]研究结果相一致。

综上。本研究使用PLGA-CS纳米颗粒作为HIV抗病毒药物的靶向载体已取得一定的进展。然而,为获得更为详细的药代动力学数据和制定更规范的使用方案,仍需进行动物体内试验研究。

参 考 文 献

- [1] World Health Organization. HIV/AIDS[EB/OL]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>. Accessed [2021-09-05].
- [2] 中华医学会感染病学分会艾滋病丙型肝炎学组,中国疾病预防控制中心. 中国艾滋病诊疗指南(2022年版)[J]. 中国艾滋病性病,2021,27(11):1182-1201.
- [3] 王健,李博. 高效联合抗反转录病毒治疗对艾滋病患者生存质量的影响[J/CD]. 中西医结合心血管病杂志(电子版),2017,5(33):171.
- [4] Capoferri AA, Bale M, Simonetti FR, et al. Phylogenetic inference for the study of within-host HIV-1 dynamics and persistence on antiretroviral therapy[J]. Lancet HIV,2019,6(5):e325-e333.
- [5] Perazzolo S, Shireman LM, Koehn J, et al. Three HIV drugs, atazanavir, ritonavir, and tenofovir, co-formulated in drug-combination nanoparticles exhibit long-acting and lymphocyte-targeting properties in nonhuman primates[J]. J Pharm Sci,2018,107(2):3153-3162.
- [6] Savage AC, Tatham LM, Siccardi M, et al. Improving maraviroc oral bioavailability by formation of solid drug nanoparticles[J]. Eur J Pharm Biopharm,2019,138:30-36.
- [7] Hobson JJ, Al-khouja A, Curley P, et al. Semi-solid prodrug nanoparticles for long-acting delivery of water-soluble antiretroviral drugs within combination HIV therapies[J]. Nat Commun, 2019,14(10):1-10.
- [8] Nabi B, Rehman S, Baboota S, et al. Insights on oral drug delivery of lipid nanocarriers: a win-win solution for augmenting bioavailability of antiretroviral[J]. AAPS Pharm Sci Tech,2019,20:60.
- [9] Walvekar P, Gannamani R, Govender T. Combination drug therapy via nanocarriers against infectious diseases[J]. Eur J Pharm Sci,2019,127:121-141.
- [10] Prabhuraj R, Kartik B, Rohit S, et al. Dual drug delivery of curcumin and niclosamide using PLGA nanoparticles for improved therapeutic effect on breast cancer cells[J]. J Polym Res,2020,27:133.
- [11] Arafa MG, Mousa HA, Afifi NN. Preparation of PLGA-chitosan based nanocarriers for enhancing antibacterial effect of ciprofloxacin in root canal infection [J]. Drug Deliv,2020,27(1):26-39.
- [12] Bienvenu E, Hoffmann KJ, Ashton M, et al. A rapid and selective HPLC-UV method for the quantitation of efavirenz in plasma from patients on concurrent HIV/AIDS and tuberculosis treatments[J]. Biomed Chromatogr,2013,27(11):1554-1559.
- [13] Sathiyaseelan A, Saravanakumar K, Mariadoss AVA, et al. pH-controlled nucleolin targeted release of dual drug from chitosan-gold based aptamer functionalized nano drug delivery system for improved glioblastoma treatment[J]. Carbohydrate Polymer, 2021,262(1):117907-117920.
- [14] Yu L, Xu M, Xu W, et al. Enhanced cancer-targeted drug delivery using precoated nanoparticles[J]. Nano Lett,2020,20(12):8903-8911.
- [15] Mushtaq I, Akhter Z, Farooq M, et al. A unique amphiphilic triblock copolymer, nontoxic to human blood and potential supramolecular drug delivery system for dexamethasone[J]. Sci Report,2021,11(1):1-14.
- [16] 黄振华. 负载姜黄素的海藻酸酯纳米粒的制备、表征及功能评价[D]. 中国海洋大学,2012.
- [17] Chiesa E, Greco A, Riva F, et al. Hyaluronic acid-based nanoparticles for protein delivery: systematic examination of microfluidic production conditions[J]. Pharmaceutics,2021,13(10):1565-1563.
- [18] Mulubwa M, Rheeders M, Du Plessis L, et al. Development and validation of high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method for determination of tenofovir in small volumes of human plasma[J]. J Chromatogr Separ Tech,2015,6(7):1-9.
- [19] Safari M, Shamsipur M, Zohrabi P, et al. Solid-phase extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction/HPLC-UV as a sensitive and efficient method for extraction, pre-concentration and simultaneous determination of antiretroviral drugs nevirapine, efavirenz and nelfinavir in pharmaceutical formulations and biological samples[J]. J Pharm Biomed Anal,2019,166(1):95-104.
- [20] Alebouyeh M, Amini H. Rapid determination of lamivudine in human plasma by high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr B,2015,975:40-44.
- [21] Wang Y, Li P, Kong L. Chitosan-modified PLGA nanoparticles with versatile surface for improved drug delivery[J]. Aaps Pharmscitech, 2013,14(2):585-592.
- [22] Martinez LA, Menezes RJP, Mendes NJ. Efavirenz-loaded polymeric nanocapsules: formulation, development, and validation of an RP-UHPLC-DAD method for drug quantification, determination of encapsulation efficiency, stability study, and dissolution profile[J]. J

- Appl Pharm Sci,2020,11(2):93-101.
- [23] 吴加周. 有缓释作用的巯基壳聚糖纳米载体的缓释效果的研究[D]. 北京工业大学,2019.
- [24] Mahajan K, Rojekar S, Desai D, et al. Efavirenz loaded nanostructured lipid carriers for efficient and prolonged viral inhibition in HIV-infected macrophages[J]. Pharm Sci,2020,27(3):418-432.
- [25] Rotem R, Micale A, Rizzuto MA, et al. Modeling the interaction of amphiphilic polymer nanoparticles with biomembranes to Guide rational design of drug delivery systems[J]. Colloid Surface B,2020,196:111366-111343.
- [26] Herdiana Y, Wathoni N, Shamsuddin S, et al. Drug release study of the chitosan-based nanoparticles[J]. Heliyon,2021:e08674.
- (收稿日期: 2022-09-23)
(本文编辑: 孙荣华)

朱晓红, 周诗梦, 朱晓霞, 等. 壳聚糖修饰的聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米颗粒在控制释放抗人类免疫缺陷病毒药物传递中的应用 [J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志 (电子版), 2023,17(2):125-132.