

聚天冬氨酸-甲硝唑纳米前药制备、表征及 抗虫活性的初步研究*

戚晓红^{1,2)} 陈汐敏¹⁾ 冯振卿^{1,2)} 管晓虹^{1)**} 吴军³⁾ 陈强³⁾ 阚延静⁴⁾ 童华⁴⁾

(¹⁾南京医科大学卫生部抗体技术重点实验室, 南京 210029; (²⁾南京医科大学病理与病理生理学系, 南京 210029;

(³⁾南京大学表面和界面化学工程技术研究中心, 南京 210093; (⁴⁾南京市妇幼保健院, 南京 210004)

摘要 实验以聚天冬氨酸(PASP)为载体, 以甲硝唑为模型药物, 用较温和简便的方法制备了新型聚天冬氨酸-甲硝唑(PASP-MTI)纳米前药。采用红外光谱及核磁氢谱分析、透射电镜观察、激光粒度、透析和紫外分光光度测定、MTT 比色、荧光显微镜和流式细胞术等方法, 观察到甲硝唑以酯键方式键合于聚天冬氨酸高分子链上。PASP-MTI 纳米前药呈球形, 平均粒径 404.8 nm, 载药量 30%, 体外释药明显延缓; MTT 结果显示, PASP-MTI 显著提高甲硝唑对滴虫的抑杀作用, 经纳米甲硝唑作用后, 部分滴虫细胞核出现染色质浓集、核固缩、核碎裂等一系列凋亡改变。流式细胞术检测可见凋亡峰, 凋亡率由对照组的 11.5%上升到纳米前药组的 35.69%。上述实验结果表明: PASP 是一种非常有潜力的前药载体, 制得的新型 PASP-MTI 纳米前药具有载药量高、缓释和杀虫作用强等特点, 可能的杀虫机制除与高聚物纳米前药促吞噬作用有关外, 还与诱导滴虫凋亡有关。

关键词 聚天冬氨酸, 甲硝唑, 纳米粒, 前药, 缓释, 阴道毛滴虫, 凋亡

学科分类号 R94

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00863

滴虫性阴道炎是一种呈世界性分布的性传播疾病, 全世界每年约有 1.6 亿患者, 在我国该病的感染率和发病率也相当高。此病可引发多种并发症, 如不育及死胎、低体重出生儿、子宫颈癌等^[1], 还可增加人群对 HIV 病毒的易感性^[2]。临床治疗首选甲硝唑, 但该药溶解性差, 口服和静脉注射胃肠道反应重, 大量使用还可致畸、致癌、致突变等。阴道黏膜局部给药虽能减轻上述副作用, 但多数制剂在使用过程中因基质溶化连同药物流失, 或因材料为非生物降解(如聚醚型聚氨酯泡沫塑料)影响疗效^[3]。近年来随着耐药滴虫的出现^[4,5], 临床治疗时间更加延长, 用药剂量更大, 患者依从性更差。解决上述问题的有效方法之一是将小分子药物接入大分子载体, 制成大分子前药, 特别是纳米级聚合物粒子, 由于其小尺寸效应和表面、界面效应等, 不仅可提高药效, 减轻不良反应, 且方便患者使用, 因而倍受国内外学者们的关注。目前对大分子载体的一般要求和发展主流是生物可降解性^[6,7]。聚氨

基酸由于含有蛋白质样的酰胺键结构, 在体内可自行降解为水和二氧化碳, 易被机体吸收和排泄, 通过同种氨基酸均聚或不同氨基酸共聚制得主链, 主链两侧还可键入功能性侧链基, 提供多个药物结合位点, 在众众多的高分子材料中独树一帜^[8,9]。其中, 聚天冬氨酸因合成线路简单, 产物得率高, 易于功能化等, 尤其适合作大分子前药载体^[10,11]。本课题组以往探索了聚天冬氨酸共聚物纳米前药的合成^[12], 但载药量偏低, 药效未达最佳。在前期研究基础上, 我们进一步摸索了聚天冬氨酸均聚物的合成, 键合甲硝唑后, 对其结构进行了表征, 完成了体外药效实验。结果表明, 大分子纳米前药的杀虫活性明显提高。

* 南京市卫生局科技发展专项基金资助 (D:ZKX 0103)。

** 通讯联系人。

Tel: 025-86863100, Fax: 025-86663100, E-mail: xhguan@163.com

收稿日期: 2009-01-12, 接受日期: 2009-03-25

1 材料和方法

1.1 材料

DL-天冬氨酸(张家港市氨基酸厂);甲硝唑原料药(山西晋新双鹤药业有限公司生产,纯度>99%,批号:021025);N,N-二甲基甲酰胺(DMF)(国药集团化学试剂有限公司);1,3,5-三甲苯(上海试剂一厂);1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)(Sigma公司);噻唑蓝(MTT)购自怡成生物公司(Amresco分装);二甲基亚砷(分析纯)(上海凌峰化学试剂有限公司,批号:030510);小牛血清购自杭州四季青生物工程有限公司(批号:040210);DAPI购自Roche公司(Cat No. 236276),其余试剂均为分析纯。

阴道毛滴虫:取自10名南京市妇幼保健院门诊镜检阴道毛滴虫阳性患者的阴道分泌物,分离培养得到。

1.2 方法

1.2.1 聚天冬氨酸-甲硝唑纳米前药(PASP-MTI)的制备

参照文献[13],稍加改进。取16.0 g DL-天冬氨酸,85%浓磷酸1.3 g,1,3,5-三甲苯16 ml,环丁砜6 ml,充分混合,在160℃通N₂的条件下搅拌反应3 h。冷却后,加入DMF,充分溶解后过滤。将滤液滴加到400 ml蒸馏水中,产生大量白色沉淀。再次过滤后,得白色粉末状固体即为聚丁二酰亚胺(PSI),产率98%。

将上述方法制得的PSI 8.0 g溶于100 ml水中,并将0.1 mol/L NaOH溶液600 ml滴加到PSI水溶液中,搅拌至pH为8.0,待水中PSI全部溶解后进行蒸馏,至溶液为50 ml时,用乙醇150 ml进行沉淀至黏糊状固体,真空烘干得聚天冬氨酸盐,再次溶于100 ml水中,用盐酸酸化至pH为2左右时,进行渗析浓缩,最后沉淀真空干燥得聚天冬氨酸(PASP)无色水溶性固体。

称取PASP 0.57 g溶于5 ml水中,甲硝唑(MTI) 0.85 g溶于10 ml水中,同时将EDC 1.0 g溶于10 ml水中,分2次滴加到上述混合溶液中,滴加时使用冰浴及磁力搅拌。滴加完后撤去冰浴,常温下反应24 h,将溶液渗析后用乙醇进行沉淀,过滤得黏糊状固体,真空干燥即得聚天冬氨酸-甲硝唑(PASP-MTI)纳米前药。

1.2.2 聚天冬氨酸-甲硝唑纳米前药的表征。采用KBr压片法,在Bruker IFS66V红外光谱仪上测定

红外光谱;使用Bruker DPX300型核磁共振谱仪,以D₂O为溶剂,室温下测定PASP-MTI纳米前药的¹H-NMR谱;用JEM1010型透射电镜观察纳米前药的微观形貌;用Malvern Zetasizer 3000 HSA激光粒度分析仪测定纳米前药的粒径分布,测试角度90°,测试温度20℃;用Shimadzu UV-3100紫外分光光度计测定PASP-MTI中甲硝唑含量,根据公式计算载药量;采用透析法,通过pH 5.8磷酸盐缓冲液测定PASP-MTI体外释药速率。

1.2.3 稳定性考察

a. 温度试验。分别称取一定量PASP-MTI纳米前药置于10 ml小烧杯中,平铺为≤5 mm厚的薄层,60℃恒温箱中放置10天,于第5、10天分别取出称重,考察其性状、含量等指标的变化。

b. 湿度试验。取室温真空干燥至恒重的PASP-MTI纳米前药置于25℃,相对湿度为75%的密闭容器中放置10天,于第5、10天分别取出称重,考察其性状、含量等指标的变化。

c. 光照试验。分别称取一定量PASP-MTI纳米前药置于10 ml小烧杯中,用4 500 lx的光照度照射,于第5、10天分别取出称重,考察其性状、含量等指标的变化。

1.2.4 MTT法检测聚天冬氨酸-甲硝唑纳米前药的抑虫作用

将转种48 h生长旺盛期的滴虫1 500 r/min离心10 min,浓集虫体,加入新鲜肝浸汤培养基并用血细胞计数板记数,调整虫浓度约为4×10⁵个/ml。将混匀的虫液置于96孔培养板,每孔200 μl。设PASP-MTI组、甲硝唑原料药MTI组、聚天冬氨酸载体PASP组及不加药物处理的对照组,并以空白培养液作为调零孔。药物以无菌水稀释成不同浓度,MTI组和PASP-MTI组加相应药液10 μl/孔,使甲硝唑终浓度为40、20、10、5.0、2.5、1.25、0.75、0.5 mg/L。聚天冬氨酸载体组加相应的PASP溶液10 μl/孔,不加药物处理的对照组加无菌水10 μl/孔。各孔做4个平行孔,重复3次。分别经37℃培养6、12、24 h,实验终止前4 h,每孔加入1%的MTT 10 μl,继续培养4 h后,3 000 r/min离心10 min,小心吸去上清165 μl/孔,再加入二甲基亚砷200 μl/孔,震荡10 min后,以空白培养液调零,用Multiskan Spectrum酶标仪测各孔A₄₉₀值,并按以下公式计算相对抑制率。

相对抑制率=(对照孔A值-加药孔A值)/对照孔A值×100%

同时检测了不同粒径 PASP-MTI 纳米前药对滴虫的抑杀作用。

1.2.5 荧光显微镜观察. 取药物有效浓度为 20 mg/L 的 PASP-MTI 处理 5 h 的滴虫及未处理的对照组, 加终浓度为 0.5 mg/L 的 4, 6- 联脒 -2- 苯基吡啶(DAPI), 避光孵育 20 min, PBS 洗涤并悬浮细胞, 取 20 μ l 细胞悬液滴在载玻片上, 盖上盖玻片, 用 RX250 型荧光显微镜(激发波长 340~380 nm, 阻隐波长 435~485 nm, EV 340~380 nm, BF 435~485 nm)观察药物作用后滴虫胞核的形态变化。

1.2.6 流式细胞仪检测. 分别取终浓度为 20 mg/L 的 PASP-MTI 和 MTI 原料药处理 5 h 的滴虫, 及 PASP 载体、无菌水处理的对照组滴虫, 离心, PBS 洗 2 次, 预冷的 70% 乙醇固定过夜。上机前以 PBS 清洗细胞, 调整细胞密度至 5×10^5 个/ml, 碘化丙锭(PI)染色, FACS Vantage SE 流式细胞仪 Cellquest 软件采集数据, 进行 DNA 含量分析, 结果用 Modfit LT 2.0 软件分析数据。

1.3 统计处理

用 SPSS10.0 统计软件进行处理。对各组间数值比较采用单因素方差分析, 两两间比较采用 LSD-*t* 法。根据所得的相对抑制率, 用 Probit 法计算达 50% 相对抑制率时 PASP-MTI 和 MTI 两药的甲硝唑浓度。

2 结 果

2.1 红外光谱分析

聚天冬氨酸-甲硝唑纳米前药(b)红外谱图见图 1, 与聚天冬氨酸(a)的谱图相比, 谱图 b 在 1 716 cm^{-1} , 1 264 cm^{-1} 处出现酯键的特征峰, 3 381 cm^{-1} 左右为 O—H、N—H 的混合峰, 2 857 cm^{-1} 处出现硝基的特征吸收峰, 表明甲硝唑键合到了聚天冬氨酸高分子链上。

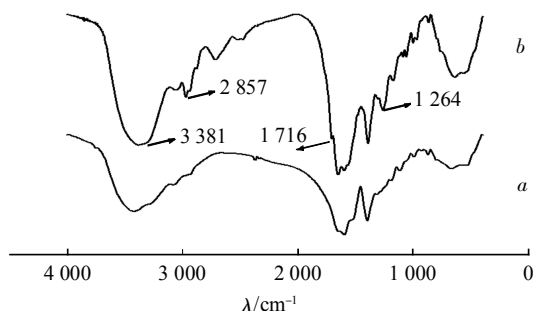


Fig.1 IR spectra of PASP-MTI nanopredrug and PASP
a: PASP; b: PASP-MTI.

2.2 核磁氢谱 (^1H -NMR) 分析

用 D_2O 为溶剂对 PASP 载体及 PASP-MTI 纳米前药进行 ^1H -NMR 检测, 结果如图 2。在 PASP (图 2a) 中 $\delta=2.74$, 2.65, 2.60 处为亚甲基上的氢质子峰, $\delta=4.3$, 4.6 处为次甲基上的氢质子峰。积分面积显示, β 体约占 75%, α 体约占 25%。PASP-MTI 纳米前药的 ^1H -NMR 谱峰发生了位移(图 2b), $\delta=2.51$ 为甲基上的氢质子峰, $\delta=2.9$ 、3.0 为甲硝唑中亚甲基上的氢质子峰。

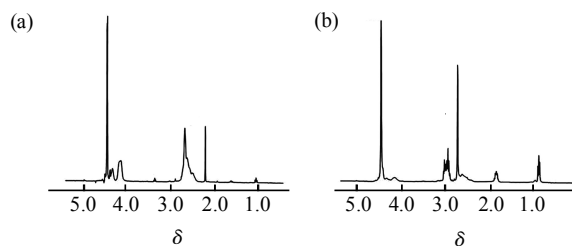


Fig. 2 ^1H -NMR spectrum of PASP-MTI nanopredrug and PASP in D_2O
(a) PASP. (b) PASP-MTI.

元素分析结果如表 1。由于一个甲硝唑分子中含有 3 个氮, 因此 PASP-MTI 中含氮量提高较大, 这从另一个侧面证明甲硝唑被键合在了聚天冬氨酸载体上。

Table 1 The result of elemental analysis

	C	H	N
PASP	30.38	4.50	8.33
PASP-MTI	43.08	7.46	15.67

2.3 电镜及粒径分析

取适量稀释后的 PASP-MTI 溶液, 滴于铜网上, 透射电镜观察结果表明: 制得的 PASP-MTI 纳米粒子呈球形, 分散性好(图 3)。激光粒度分析仪

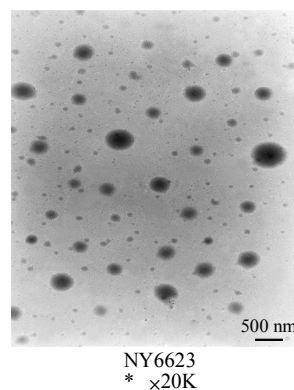


Fig. 3 TEM micrographs of spherical PASP-MTI nanopre drugs with good dispersibility ($\times 20\,000$)

显示: 粒径分布为单峰型, 平均粒径 404.8 nm.

2.4 载药量分析

通过紫外分光光度法检测, PASP-MTI 的 0.5 mol/L NaOH 溶液在 320 nm 处有最大吸收, 对照甲硝唑的 NaOH 溶液标准曲线, 得 PASP-MTI 中甲硝唑的质量, 计算得 PASP-MTI 纳米前药的载药量为 30%, 计算公式: 载药量=(测得的 PASP-MTI 中甲硝唑质量 /PASP-MTI 大分子前药质量)×100%.

2.5 体外释放实验

紫外分光光度法测得甲硝唑 pH 5.8 磷酸盐缓冲溶液在 320 nm 处具有最大吸收峰, 吸光值与甲硝唑浓度符合标准曲线 $A = 0.059C + 0.0219$ (A : 吸光度

值, C : 甲硝唑浓度(mg/L), $r=0.9994$, $n=3$). 根据标准曲线计算出各时间点的甲硝唑累计释放百分比.

根据目标药物甲硝唑的使用环境, 选取 37℃、pH 5.8 作为测试甲硝唑在聚天冬氨酸高分子聚合物中的控(缓)释条件. 测得释放情况见图 4. 从图 4a 中可以看出, 开始 7 天曲线上升较快, 10 天以后药物释放变缓, 持续释放达 30 天以上. 释放 24 h 时, PASP-MTI 体外累计释放百分率为 38.01%, 30 天为 86.64%, 而作为对照的 MTI 原料药, 释放 1 h 为 57.30%, 6 h 为 95.15%, 24 h 已接近 100% (图 4b). 表明键合有甲硝唑的 PASP-MTI 明显延缓了药物在体外的释放速率.

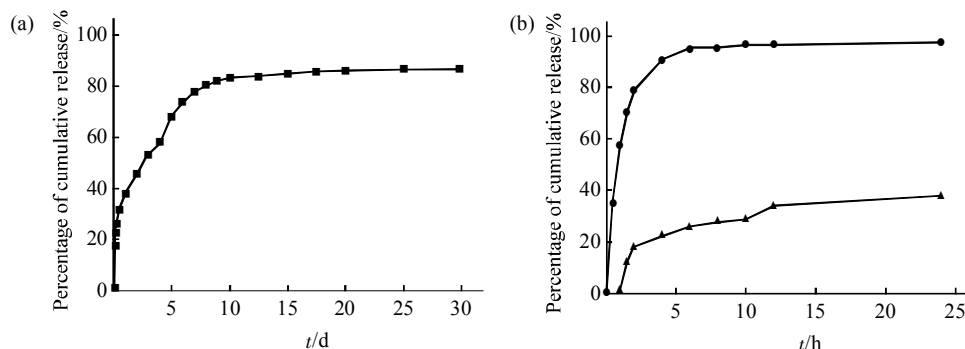


Fig. 4 The cumulative release curve of PASP-MTI and MTI in phosphate buffer pH 5.8

(a) PASP-MTI release in 30 d. (b) PASP-MTI and MTI release in 24 h. ●—●: MTI; ▲—▲: PASP-MTI.

2.6 稳定性实验

稳定性实验结果见表 2.

实验结果表明: PASP-MTI 经高温(60℃)、高

湿(75%RH)、光照(4 500 lx)考察 10 天, 各项指标均无明显变化, 说明材料在实验环境下基本稳定.

Table 2 Results of PASP-MTI nanoprodrug stability

Condition	0 day			5 day			10 day		
	Aspect	Weight	Drug loading	Aspect	Weight	Drug loading	Aspect	Weight	Drug loading
60℃	White	5.5 mg	31.8%	White	5.0 mg	33.5%	White	4.8 mg	34.9%
25℃ RH75%	White	5.3 mg	32.5%	White	5.7 mg	30.7%	White	5.9 mg	31.5%
4500 lx	White	5.0 mg	33.4%	White	4.9 mg	35.6%	White	5.3 mg	34.2%

2.7 MTT 检测结果

MTT 结果显示, PASP-MTI 和 MTI 原药均有抑杀滴虫的作用, 且明显高于对照组($P < 0.05$), 而 PASP 载体组与对照组之间 A 值没有显著差异($P > 0.05$), 说明聚天冬氨酸载体本身没有抑杀滴虫作用. 当甲硝唑浓度相同时, PASP-MTI 抑杀滴虫作用较 MTI 原药强($P < 0.05$), 达 IC_{50} (50%抑制率)时: MTI 原药为 2.85 mg/L, PASP-MTI 为 1.22 mg/L (图 5), 随着处理时间延长, 同一药物浓度抑杀滴虫的作用也逐渐增强, 表明 PASP-MTI 抑杀滴虫的作用呈现浓度依赖性和时间依赖性.

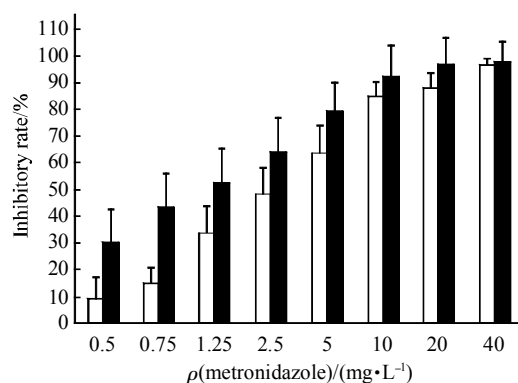


Fig. 5 The relative inhibitory rate of PASP-MTI and MTI on trichomonas

□: MTI; ■: PASP-MTI.

粒径大小对滴虫抑杀作用的影响见表 3。从表 3 可见，不同粒径 PASP-MTI 对滴虫抑杀没有统计学意义。

Table 3 Influence of PASP-MTI particle size on the *Trichomonacidal* activity by MTT

Size/nm	Drug loading	A_{490}
184.8 ± 58.6	29.8 ± 2.7	1.38 ± 0.18
434.2 ± 106.7	33.2 ± 3.3	1.55 ± 0.23
735.6 ± 256.3	32.5 ± 1.8	1.43 ± 0.25

$\bar{x} \pm s$.

2.8 荧光显微镜观察结果

DAPI 染色后，细胞核发淡蓝色荧光。正常滴虫细胞核椭圆形，染色质弥散均匀、荧光较弱。PASP-MTI 处理后，滴虫细胞核出现一系列凋亡样变，胞核肿胀变圆，核中出现折光率极强的颗粒，染色质浓缩，部分胞核边移呈小结节状、新月状或戒指状，典型的可见核碎裂，核物质扩散到胞质中(图 6)。

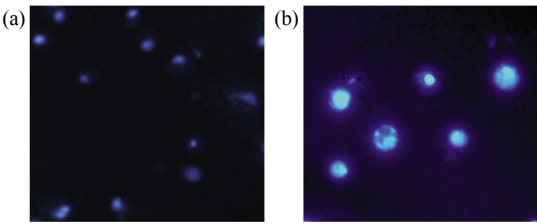


Fig. 6 Nuclear fluorescence of trichomonas stained with 0.5 mg/L DAPI

(a) Trichomonas untreated control, displaying its oval nuclei and slightly weaker fluorescence. (b) Trichomonas treated with PASP-MTI for 5 h, A rounded nucleus, stronger fluorescence, peripheral masses of nuclear chromatin and nuclear fragmentation are seen (×400).

2.9 流式细胞检测结果

4 组滴虫标本均见有亚 G1 期细胞形成的凋亡峰。根据凋亡峰的面积计算凋亡细胞在整个细胞群中的比例，结果无菌水对照组滴虫凋亡率为 11.5%，PASP 载体组滴虫凋亡率为 13.03%，MTI 原药组滴虫凋亡率为 19.27%，PASP-MTI 组滴虫凋亡率则高达 35.69% (图 7)。

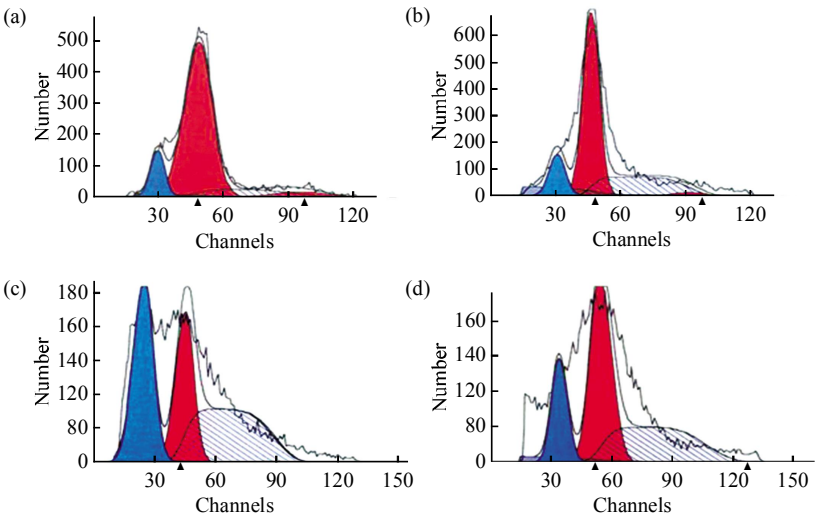


Fig. 7 Effect of different groups on apoptosis of trichomonas by flow cytometry

(a) Untreated control. (b) Treated with PASP carrier. (c) Treated with PASP-MTI. (d) Treated with MTI.

3 讨 论

随着现代医药学的发展，大分子前药 (macromolecular prodrugs) 的研究和应用日益受到人们的重视^[14]。特别是生物可降解高分子纳米粒因其释放速率的可控性和良好的生物相容性，得到越来越多的关注。开发新的聚合物纳米载药系统，制成新的纳米前药，也就成为克服小分子药物诸多弊

端，更好地应用于临床治疗的有力手段之一^[15]。

目前，对大分子前药载体的基本要求是生物可降解性。因此我们选取毒性低，生物相容性好，易于功能化、产业化、环境好的聚天冬氨酸为载体，以甲硝唑为模型药物，制备了聚天冬氨酸甲硝唑纳米前药。由于高分子化学反应本身固有的困难，使小分子药物借助氨基、羧基等基团与高分子主链相联时，接枝率一般较低 (< 30%)，载药量不高。以

往国内外众多学者研究报道的聚天冬氨酸大分子前药,大多利用其衍生物——聚天冬酰胺侧链上的羟基与药物的羧基结合^[16~20],而与带羟基药物的结合较少见。为此我们采用较温和的热缩聚方法,先将单体 DL-天冬氨酸通过浓磷酸催化聚合生成聚琥珀酰亚胺,再在强碱溶液作用下,端基发生开环羧基化,产生带羧酸侧链的聚天冬氨酸,最后经过水溶性缩合剂 EDC 缩合,将甲硝唑通过羟基与聚天冬氨酸链上的羧基发生酯化反应,促使甲硝唑键合至聚天冬氨酸高分子载体上。经红外光谱、核磁氢谱和元素分析证明:甲硝唑确以酯键方式键合到了聚合物高分子链上。整个反应过程简便,低毒,产物转化率高,合成的大分子前药载药量可达 30%,基本达到设计要求。

前药是一种可逆性衍生物,进入体内后需转化为原药才能发挥治疗作用,因此前药的释药速率是评价其性能的重要指标之一。我们通过模拟人体环境的 pH 5.8、(37 ± 1)℃ 的磷酸盐缓冲液,利用动态透析系统和紫外分光光度法观察了聚天冬氨酸甲硝唑纳米前药的释药情况。结果显示,开始 7 天曲线上上升较快,10 天以后药物释放变缓,持续释放 30 天以上,累计释放百分率达 86.64%。说明合成的大分子前药在水性环境中,依靠酯键的断裂和高分子链本身的降解重新释放甲硝唑^[21,22],表现出明显的缓释效果。但释药初期仍可观察到一定的“速释现象”,其原因可能是:大分子前药制备过程中,会包裹一些小分子药物,或因载体本身的性质所致^[23]。从分子结构看,聚天冬氨酸是一种水溶性大分子多肽链,在水中易水解释出甲硝唑,所以释药初期表现为一定的“速释”现象。有文献报道,一个理想的抗菌长效制剂应包括两个部分:一是快速释药的速释部分,使药物尽快达到有效血药浓度而发挥治疗作用;另一个是恒速释药的缓释部分,以维持平稳、均匀的有效血药浓度,起到长效作用^[24]。我们合成的大分子纳米前药基本符合抗菌长效制剂的要求。此外,合成的纳米前药在实验室环境下性能稳定,表明其进入体内后能够按照预定的模式释放药物并发挥作用,从而保证了用药的安全性。

药效评价是药物研究的关键所在。体外 MTT 实验结果显示:制备的纳米前药抑杀滴虫的作用优于甲硝唑原药,二者相比差异显著($P < 0.05$),而纳米载体 PASP 组与空白对照组比较,差异不显著($P > 0.05$),说明载体本身没有抑杀滴虫的作用。

以往实验表明,甲硝唑抑杀滴虫的机制主要与其硝基氧化还原产生氧自由基致使的细胞毒作用有关^[25]。前述 PASP-MTI 合成过程中,甲硝唑以自身羟基与聚天冬氨酸链上的羧基反应形成酯键,保留了硝基,因而不影响药物的药理活性。而 PASP 载体本身没有抑杀滴虫的作用,说明纳米前药中甲硝唑被有效释放出来,对滴虫产生了抑杀作用。另有研究提示,大分子前药进入机体后,主要经内吞作用进入细胞,再经溶酶体酶水解释放出活性药物成分^[26]。由于异养型原生动物的滴虫具有很强的吞噬能力,故而我们推测甲硝唑与聚天冬氨酸键合后,分子质量明显增大,可促进滴虫对前药的吞噬,使甲硝唑被动靶向至滴虫增多,或因高分子聚合物纳米粒具有一定的附着力,可粘附于滴虫微丝上,使其运动及变形能力降低,最终导致细胞骨架整体结构破坏^[27],因而纳米前药杀虫作用明显优于甲硝唑原药。确切的机制我们正在研究中。如前所述,前药本身不显示药理活性,只有其中的原药才具疗效,所以前药的载药量是一项非常重要的指标。课题组前期通过混合溶剂法合成的聚天冬氨酸-谷氨酸共聚物纳米前药载药量仅 12%^[12],缓释后药量不足以抑杀滴虫,因而 MTT 及 ³H-TdR 结果均显示共聚物纳米前药 IC_{50} 仅为甲硝唑原药的一半左右,所以我们认为载药量是影响抗菌长效制剂有效药物浓度的重要因素之一。

细胞凋亡可在形态学和生物学等方面表现出特征性改变。本实验发现:PASP-MTI 纳米前药作用后,荧光显微镜下可见滴虫细胞核出现染色质凝聚、边集,最终核裂解的特征性改变;流式细胞术检测 DNA 含量显示,在 G1 期前出现亚二倍体的凋亡峰,且纳米甲硝唑组的凋亡峰明显高于甲硝唑原药组。这与 Chose 等^[28]用诱导凋亡药物引起滴虫发生凋亡样的形态学改变一致。因此,不含线粒体的原核生物阴道毛滴虫同样存在凋亡改变^[29],PASP-MTI 纳米前药抑杀滴虫的机制可能还与诱导滴虫凋亡有关。

本实验结果表明,PASP 作为大分子纳米前药的载体具有良好的应用潜能,合成的纳米前药性能稳定,载药量较高,体外具有缓释作用,抗滴虫效果优于甲硝唑原药。下一步我们将对 PASP-MTI 的体内抗虫效果进行深入研究。

参 考 文 献

- 1 Gulmezoglu A M. Interventions for trichomoniasis in pregnancy.

- Cochrane Database Syst Rev, 2002, **3**(1): 20~24
- 2 Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, *et al.* Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. Clin Microbiol Rev, 1998, **11**(2): 300~317
 - 3 徐子猷, 陈纪岳, 李巧云, 等. 甲硝唑明胶海绵阴道栓剂的实验研究. 中国医院药学杂志, 1994, **14**(9): 387~389
Xu Z Y, Chen J Y, Li Q Y, *et al.* Chin J Hospital Pharmacy, 1994, **14**(9): 387~389
 - 4 Dunne R L, Dunn L A, Upcroft P, *et al.* Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. Cell Res, 2003, **13**(4): 239~249
 - 5 Snipes L J, Gamard P M, Narcisi E M, *et al.* Molecular epidemiology of metronidazole resistance in a population of *Trichomonas vaginalis* clinical isolates. J Clin Microb, 2000, **38**(8): 3004~3009
 - 6 Sinha V R, Trehan A. Biodegradable microspheres for protein delivery. J Contr Rel, 2003, **90**(3): 261~280
 - 7 Lev Bromberg. Polymeric micelles in oral chemotherapy. J Contr Rel, 2008, **128**(2): 99~112
 - 8 黄岳山, 赵修华, 吴效明, 等. 氨基酸类聚合物材料及其在药物控释系统中的应用. 中国医学物理学杂志, 2003, **20**(1): 39~42
Huang Y S, Zhao X H, Wu X M, *et al.* Chin J Medical Physics, 2003, **20**(1): 39~42
 - 9 Pitarresi G, Saiano F, Cavallar G, *et al.* A new biodegradable and biocompatible hydrogel with polyaminoacid structure. Int J Pharm, 2007, **335**(1~2): 130~137
 - 10 Lee H J, Yang S R, An E J, *et al.* Biodegradable polymersomes from poly(2-hydroxyethyl aspartamide) grafted with lactic acid oligomers in aqueous solution. Macromolecules, 2006, **39**(15): 4938~4940
 - 11 Xue W H, Diao H J, Chen X, *et al.* An efficient vector for gene delivery: α , β -poly(3-dimethylaminopropyl-D, L-aspartamide). Euro J Pharm Biopharm, 2007, **66**(3): 327~333
 - 12 陈汐敏, 戚晓红, 段磊, 等. 天冬氨酸-谷氨酸共聚物-甲硝唑纳米粒子的制备表征. 南京医科大学学报, 2007, **27**(6): 569~572
Chen X M, Qi X H, Duan L, *et al.* Acta Universitatis Medicinalis Nanjing, 2007, **27**(6): 569~572
 - 13 Kakuchi T, Shibata M, Matsunami S, *et al.* Synthesis and characterization of poly (succinimide-co-6-amino-caproic acid) by acid-catalyzes polycondensation of L-aspartic acid and 6-aminocaproic acid. J Polym Sci Part A, 1997, **35**(2): 285~290
 - 14 Meijuanzou T, Hirokazu O. Synthesis and properties of polysaccharide prodrugs of 5-aminosalicylic acid as potential colon-specific delivery systems. Euro J Pharm Biopharm, 2005, **59**(1): 155~160
 - 15 Chun L, Sidney W. Polymer-drug conjugates: Recent development in clinical oncology. Adv Drug Deli Rev, 2008, **60**(18): 886~898
 - 16 Cavallaro G, Licciardi M, Giammona G, *et al.* Poly (hydroxyethylaspartamide) derivatives as colloidal drug carrier systems. J Contro Rel, 2003, **89**(2): 285~295
 - 17 Cavallaro G, Licciardi M, Caliceti P, *et al.* Synthesis, physico-chemical and biological characterization of a paclitaxel macromolecular prodrug. Euro J Pharm Biopharm, 2004, **58**(1): 151~159
 - 18 Cheng H, Li Y Y, Zeng X, *et al.* Protamine sulfate/poly(L-aspartic acid) polyionic complexes self-assembled *via* electrostatic attractions for combined delivery of drug and gene. Biomaterials, 2009, **30**(6): 1246~1253
 - 19 Zovko M, Zorc B, Lovrek M, *et al.* Macromolecular prodrugs. IX. Synthesis of polymer-fenoprofen conjugates. Int J Pharm, 2001, **228**(1~2): 129~138
 - 20 Zheng Y L, Yang W L, Wang C C, *et al.* Nanoparticles based on the complex of chitosan and polyaspartic acid sodium salt: Preparation, characterization and the use for 5-fluorouracil delivery. Euro J Pharm Biopharm, 2007, **67**(3): 621~631
 - 21 Pitarresia G, Pierroa P, Giammona G, *et al.* Drug release from α , β -poly (N-2-hydroxyethyl)-DL-aspartamide-based microparticles. Biomater, 2004, **25**(18): 4333~4343
 - 22 成大明, 陈强, 吴军, 等. 聚(α , β -N-2-二羟乙基-DL-天冬酰胺)及其共价复合物的制备及体外缓释性能研究. 中国药科大学学报, 2002, **33**(2): 87~92
Cheng D M, Chen Q, Wu J, *et al.* J Chin Pharm Uni, 2002, **33**(2): 87~92
 - 23 Peng T, Cheng S X, Zhuo R X. Synthesis and characterization of poly- α , β -[N-(2-hydroxyethyl)-L-aspartamide]-g-poly (L-lactide) biodegradable copolymers as drug carriers. J Biomed Mater Res A, 2006, **76**(1): 163~173
 - 24 蔡小惠. 缓释控释制剂的释药系统及其指导原则. 海南医学院学报, 2001, **7**(1): 57~60
Cai X H. J Hainan Medical College, 2001, **7**(1): 57~60
 - 25 Upcroft P, Jacqueline A. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. Clin Microbiol Rev, 2001, **14**(1): 150~164
 - 26 Panyama J, Sahoo S K, Prabha S, *et al.* Fluorescence and electron microscopy probes for cellular and tissue uptake of poly (d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles. Int J Pharm, 2003, **262**(1~2): 1~11
 - 27 Madeiro da Costa R F, Benchimol M. The effect of drugs on cell structure of *Trichomonas foetus*. Parasitol Res, 2004, **92**(2): 159~170
 - 28 Chose O, Noel C, Gerbod D, *et al.* A Form of cell death with some features resembling apoptosis in the amitochondrial unicellular organism *Trichomonas vaginalis*. Exper Cell Res, 2002, **276**(1): 32~39
 - 29 Nasirudeen A M A, Hian Y E, Singh M, *et al.* Metronidazole induces programmed cell death in the protozoan parasite *Blastocystis hominis*. Microbiology, 2004, **150**(1): 33~43

Preparation, Characterization and Preliminary Trichomonacidal Effect of Poly Aspartic Acid-metronidazole Nanoprodug*

QI Xiao-Hong^{1,2)}, CHEN Xi-Min¹⁾, FENG Zhen-Qing^{1,2)}, GUAN Xiao-Hong^{1)**},
WU Jun³⁾, CHEN Qiang³⁾, KAN Yan-Jing⁴⁾, TONG Hua⁴⁾

¹⁾The Key Laboratory Antibody Technology of State Ministry of Health, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China;

²⁾Department of Pathology and Pathophysiology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China;

³⁾Center of Research on Surface and Interface Chemical Engineering and Technology, Nanjing University, Nanjing 210093, China;

⁴⁾Nanjing Maternal and Child Health Hospital, Nanjing 210004, China)

Abstract Poly aspartic acid or its salts is a kind of newly innocuous, environmental friendly biodegradable polymer, recognized as green material, and widely applied in such areas as agriculture, medicine, commodity, water treatment. In order to prepare new poly aspartic acid-metronidazole (PASP-MTI) nanoprodug, observe its trichomonacidal effect *in vitro*, and explore its probable mechanism, the nanoprodug PASP-MTI was synthesized by DL-aspartic acid and metronidazole in a relatively mild condition. Its structural characteristics were attested by means of infrared spectrum (IR), ¹H nuclear magnetic resonance (¹H-NMR), transmission electron microscope (TEM) etc measurements. The release behavior of metronidazole in PASP-MTI nanoprodug was investigated by the dialysis method. The MTT assay was employed to test PASP-MTI's trichomonacidal effect *in vitro* and the apoptotic-like processes of trichomonas were detected by fluorescence microscope and flow cytometer (FCM). The IR and ¹H-NMR showed that the metronidazole was conjugated to poly aspartic acid high molecular chains by ester bonds. Synthesized PASP-MTI nanoprodug was globular and had a mean diameter 404.8 nm with favorable dispersity. The drug loading was about 30% and the cumulative release profile was delayed (about 38.01% of MTI loading in the PASP-MTI nanoprodug was released within the first 24 h and 86.64% in 30 d, while the release of free metronidazole was almost complete by 24 h). The trichomonacidal activity of PASP-MTI nanoprodug increased remarkably {*IC*₅₀ of PASP-MTI and free metronidazole was 1.22 mg/L and 2.85 mg/L, respectively}. Observed by fluorescence microscope, the nuclei of trichomonas presented a series of changes similar to apoptosis such as chromatin agglutination, nuclear fragmentation, etc. The FCM study indicated that the apoptotic rate in the PASP-MTI group was the highest of all groups, up to 35.69%. It is concluded that PASP can be effectively used in drug delivery systems, the synthetic novel poly aspartic acid-metronidazole nanoprodug has higher drug loading, better the role of prolonged-release and higher trichomonacidal effect *in vitro*. Its mechanism may be related with enhancing the polymer produg's internalization and inducing the apoptosis of trichomonas.

Key words poly aspartic acid, metronidazole, nanoparticle, produg, prolonged release, *T. vaginalis*, apoptosis

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00863

*This work was supported by a grant from The Medical Key Science and Technology Development Foundation of Nanjing Health Administration (D:ZKX 0103).

**Corresponding author.

Tel: 86-25-86863100, Fax: 86-25-86663100, E-mail: xhguan@163.com

Received: January 12, 2009 Accepted: March 25, 2009