

温敏型透明质酸纳米靶向药物传递系统

陈荆晓, 曹璐娟, 孟照敏, 刘伯政, 陈敬华

(江南大学 药学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 通过“Click”反应连接透明质酸与普朗尼克 F127, 制备两亲性材料(HA-F127), 其结构通过 ^1H NMR 确认, 接枝率为 13%。材料在水溶液中可自组装形成纳米粒子, 并能够包载抗肿瘤模型药物阿霉素。体外药物释放实验显示, 其具有温度敏感释药特性。透明质酸可识别肿瘤细胞外过度表达的 CD44 受体, 纳米粒子可靶向传递药物进入肿瘤细胞, 且表现出良好的治疗效果。

关键词: 透明质酸; 纳米粒子; 温敏性; 普朗尼克; 靶向性

中图分类号: R 944.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2014)12—1294—06

Study of Temperature Sensitive Nano Drug Delivery System Based on Hyaluronic Acid

CHEN Jingxiao, CAO Lujuan, MENG Zhaomin, LIU Bozheng, CHEN Jinghua

(School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: An amphiphilic material (HA-F127) was prepared by conjugating hyaluronic acid(HA) and pluronic (F127) via "Click" chemistry. The chemical structure of HA-F127 was identified through ^1H NMR spectrum, and the degree of substitution was 13%. HA-F127 could self-assemble into nanoparticles in aqueous solution and load model anticancer drug doxorubicin. In vitro drug release assay showed the nanoparticle behaved temperature sensitive drug release profile. Since hyaluronic acid could recognize CD44 receptor, which over-expressed on cancer cell surface, the nanoparticles could targetedly deliver drug into cancer cells and obtain promoted therapeutic effect.

Keywords: hyaluronic acid, nanoparticle, temperature sensitivity, pluronic, targeting

纳米药物传递系统因其特有的增强渗透滞留效应(EPR effect), 可提高药物在肿瘤区域的蓄积, 因而受到生物医学领域科研人员的广泛研究^[1-2]。为提高纳米药物载体在体内的可降解性, 降低肝、肾代谢的远期毒性, 同时能够进一步增强材料的生物活性, 蛋白质、多肽、多糖等生物大分子被用于替代

传统的合成型高分子材料^[3-4]。利用这些天然大分子的生物学特性, 可显著改善纳米粒子在体内的分布, 提高药物传递的靶向性。在这之中, 透明质酸(Hyaluronic acid, HA) 因可特异性识别肿瘤细胞表面过度表达的 CD44 受体, 因而被广泛用于构建纳米靶向药物传递系统^[5]。

收稿日期: 2014-07-04

基金项目: 教育部博士点基金项目(20110093110008); 江苏省自然科学基金面上项目(BK2012557)。

作者简介: 陈荆晓(1982—), 男, 湖北荆州人, 理学博士, 讲师, 主要从事生物医用高分子材料研究。E-mail: tomchenjx@jiangnan.edu.cn

尽管透明质酸可提高药物传递的靶向作用,但由于人体内存在透明质酸酶,导致材料在体内易受酶作用而降解^[6]。这既会降低材料在血液中的循环时间,也有可能造成药物的泄露而降低药物传递的效率。有研究发现,通过连接聚乙二醇可有效抑制蛋白质吸附,防止酶对透明质酸的降解作用,提高其在体内的稳定性^[7]。这主要是由于聚乙二醇可以有效抑制血浆蛋白质、酶等物质在材料表面的粘附。另外,聚乙二醇还具有一定的温敏性能,这也为药物载体的开发提供了新的策略^[8]。

本研究中拟通过“Click”反应连接透明质酸和普朗尼克 F127,构建两亲性材料 HA-F127,其化学结构如图 1 所示。

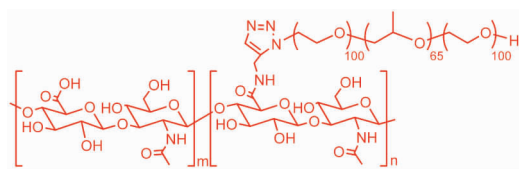


图 1 HA-F127 的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of HA-F127

利用透明质酸的亲水性稳定纳米粒子,同时利用其与 CD44 受体的识别作用,提高对肿瘤细胞的靶向作用。另外,利用 F127 与聚乙二醇类似的生物惰性,提高透明质酸纳米粒子的稳定性。由于 F127 为两亲性物质,由其提供的疏水作用力可以用于包载疏水性抗肿瘤药物,其温敏特性还能赋予材料智能“开/关”的药物释放行为。期望这一纳米粒子可有效实现抗肿瘤药物的靶向传递,降低药物的毒副作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

透明质酸,普朗尼克 F127,炔丙胺,抗坏血酸钠,购于生工生物工程(上海)股份有限公司;叠氮化钠,购于上海晶纯生化科技股份有限公司;盐酸阿霉素,购于浙江海正药业公司;对甲苯磺酰氯,乙基[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺盐酸盐(EDC),N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),购自国药集团化学试剂有限公司;DMEM 细胞培养基,噻唑蓝(MTT),胎牛血清(FBS),双抗(penicillin-streptomycin),磷酸盐缓冲液干粉(PBS),分别从 Gibco 和 Invitrogen 公司购得;分子探针 DAPI,购于 Sigma-Aldrich 公司;其他

溶剂及试剂购于国药集团化学试剂公司,使用前纯化。人类宫颈癌细胞(HeLa)和非洲绿猴肾成纤维细胞(COS7),购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.2 主要仪器

FreeZone 2.5 型冷冻干燥机,美国 Labconco 公司制造;JEM-2100 型透射电子显微镜,日本 JEOL 公司制造;Avance III 型核磁共振波谱仪,德国 Bruker 公司制造;Nano ZS 型粒径测试仪,英国 Malvern 公司制造;RF-5301PC 型荧光分光光度计,UV-2550 型紫外可见分光光度计,日本岛津公司制造;DMIL LED 型倒置荧光显微镜,德国徕卡公司制造。

1.3 实验方法

1.3.1 单叠氮化普朗尼克 (F127-N₃) 的制备 将 12.5 g 的 F127(1 mmol)溶于 50 mL 二氯甲烷中,加入 25 mL 吡啶,之后在冰浴下缓慢加入 285 mg (1.5 mmol)对甲苯磺酰氯,避光并在 N₂ 保护,25 °C 条件下反应 24 h。反应结束后用浓盐酸萃洗,有机层用质量分数 5% NaHCO₃ 洗涤,然后用无水硫酸钠干燥,无水乙醚中沉淀得 F127-对甲苯磺酸酯。之后将其用新蒸的 DMF 溶解,加入 650 mg(10 mmol)叠氮化钠于 60 °C 搅拌反应,48 h 后于截留分子量 10 kDa 的透析袋去离子水中透析 2 d,冷冻干燥得产物 F127-N₃,产品经凝胶渗透色谱进行检测并提纯。

1.3.2 炔基化透明质酸 (HA-alkynyl) 的制备 将 190 mg(0.5 mmol 双糖单元)透明质酸溶于 100 mL 去离子水中,加入 192 mg(1 mmol)EDC 及 115 mg (1 mmol)NHS。活化 30 min 后,加入 68 μL(1 mmol)炔丙胺后继续于室温下反应 24 h。结束后于截留分子量 10 kDa 透析袋去离子水中透析 2 d,冷冻干燥得产物 HA-alkynyl。

1.3.3 F127 功能化透明质酸 (HA-F127) 的制备 将 600 mg(0.05 mmol)F127-N₃ 及 90 mg(0.2 mmol)HA-alkynyl 溶于去离子水中,搅拌溶解后加入 7.6 mg(0.03 mmol)CuSO₄·5H₂O 及 50 mg(0.25 mmol)抗坏血酸钠,于 40 °C, N₂ 保护下反应 48 h。反应结束后于截留分子量 25 kDa 的透析袋去离子水中透析 2 d,冷冻干燥得产物 HA-F127,产物经 ¹H NMR 确认结构。

1.3.4 HA-F127 纳米粒子的制备及形貌表征 根据文献报道方法^[9],通过荧光探针法测定室温 15 °C

下 HA-F127 的临界聚集质量浓度为 0.07 mg/mL。HA-F127 纳米粒子的制备为直接将其溶解于水溶液中,质量浓度为 0.1 mg/mL。通过粒径仪测定纳米粒子的大小,并通过透射电子显微镜观测纳米粒子的形貌。

1.3.5 载药纳米粒子的制备 载药纳米粒子通过透析法制备^[10]。将 2 mg 盐酸阿霉素溶于 2 mL DMF 中,加入 3 当量于盐酸阿霉素的三乙胺于避光条件下搅拌过夜,之后加入 3 mL 溶有 10 mg HA-F127 的甲酰胺溶液,搅拌均匀后加入到 3 500 Da 透析袋中,于室温下对去离子水透析 12 h,得到载药纳米粒子,将溶液冻干,用紫外可见分光光度计于 480 nm 处测定阿霉素的载药量及包封率。

1.3.6 体外药物释放实验 取上述透析得到的载药纳米粒子溶液 2 mL,装入 3 500 Da 透析袋中,然后浸入装有 10 mL PBS(pH 7.4)的离心管中,分别于 15 °C 及 37 °C 条件下进行体外药物释放实验,每隔一段时间取出 PBS 溶液,并补充 10 mL 新鲜的 PBS 至离心管。用紫外可见分光光度计于 497 nm 测定阿霉素的释放情况,每组 3 个平行样。

1.3.7 体外细胞毒性测试 HA-F127 及载药纳米粒子的细胞毒性分别采用 HeLa 和 COS7 两种细胞通过 MTT 法进行测定。将生长至对数期的两种细胞以 5×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板,之后将 HA-F127 和载药纳米粒子分别溶于含有体积分数 10% 胎牛血清的培养基中,配制成设定浓度梯度的溶液,然后加入到细胞培养板中,培养 48 h 后吸除溶液,加入 DMEM 培养基,然后加入 20 μ L MTT 的磷酸盐缓冲溶液(5 mg/mL),用酶标仪测定其在 570 nm 处的光密度值。阿霉素作为阳性对照对比载药纳米粒子的细胞毒性,溶液中加入体积分数 5% DMSO 助溶。

1.3.8 纳米粒子的细胞内摄取实验 载药纳米粒子的细胞摄入情况采用 HeLa 及 COS7 两种细胞进行测定。首先将对数生长期的 HeLa 及 COS7 两种细胞以 2×10^4 个/孔的密度接种在 24 孔板中,培养至贴壁后,弃去孔板中培养基,分别加入灭菌处理后的阿霉素及载药 HA-F127 纳米粒子,使 DOX 的终质量浓度为 2 μ g/mL,之后在 37 °C 湿润环境下培养,1 h 后弃去孔内含药培养基,用 PBS 溶液小心洗涤 3 次。之后,用质量分数 4% 多聚甲醛溶液固定细胞 15 min,再用蓝色荧光探针 DAPI(0.2 μ g/mL)对

细胞核进行染色,15 min 后小心移除溶液,并用 PBS 溶液轻轻润洗数次以除去过量的染料。用倒置荧光显微镜观测并拍照。之后,为验证透明质酸靶向肿瘤细胞的作用,先将 HeLa 细胞与 0.5 mg/mL 的透明质酸溶液共培养 2 h,之后再加入载药纳米粒子共培养 1 h,然后用上述同样方法观测纳米粒子的细胞内摄行为。

2 结果与分析

2.1 HA-F127 的合成及结构表征

首先制备单叠氮化 F127,之后在透明质酸分子上引入炔基,通过经典的“Click”化学反应连接 F127 和透明质酸分子,制备得到具有两亲性的材料 HA-F127,其化学结构见图 1。通过 ^1H NMR 对产物的结构及 F127 的接枝率进行表征,结果如图 2 所示。

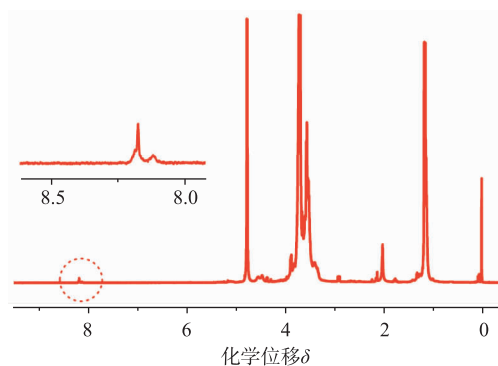


图 2 HA-F127 在 D_2O 中的 ^1H NMR 谱图

Fig. 2 ^1H NMR spectrum of HA-F127 in D_2O

从核磁谱图中可以看出,除透明质酸糖环上氢在 2~5 ppm 的峰以外,在 1.15 ppm 处出现了 F127 上烷基上氢的峰,同时在 8.17 ppm 处出现了五元氮杂环上氢的峰,这说明 F127 已通过“Click”反应与 HA 分子连接起来。通过将 8.17 ppm 处峰面积积分与 2.01 ppm 处透明质酸 N-乙酰氨基葡萄糖上甲基氢峰面积积分相比较,可以计算出 F127 的接枝率为 0.13,即每百个透明质酸双糖单元上连接有 13 个 F127 分子。

2.2 HA-F127 纳米粒子的形貌

由于 HA-F127 分子具有两亲性,因而其在水溶液中具有一定的自组装能力。以芘为荧光探针,测定材料 HA-F127 的临界聚集质量浓度为 0.07 mg/mL,之后在制备 HA-F127 纳米粒子时,溶液质量浓度均高于此值,采用 0.1 mg/mL。HA-F127

纳米粒子的形貌通过透射电子显微镜进行观测,结果如图3所示。从图3可以看出,在15℃时,纳米粒子的粒径约为200 nm;而当温度升高至37℃时,纳米粒子的粒径约为60 nm。纳米粒子为形貌规整、大小均一的完整球形结构。这一粒径变化行为主要是由于F127分子链段两端含有亲水的聚乙二醇(PEG)单元,而中间为疏水的聚丙二醇(PPG)单元。当温度升高以后,PEG与水分子之间的氢键被破坏,其转变为疏水性链段。此时,材料的亲疏水比发生变化,由于疏水性增强,材料会向内收缩,形成粒径更小的纳米粒子。

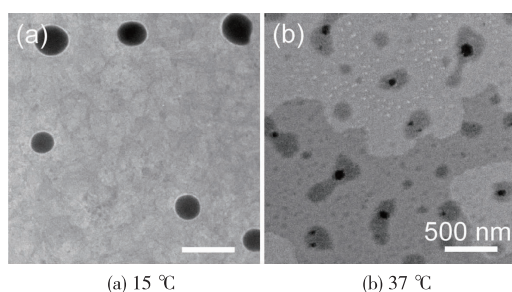


图3 HA-F127纳米粒子在15℃和37℃的透射电镜照片
Fig. 3 TEM images of HA-F127 nanoparticles at 15℃ and 37℃

此后,通过动态光散射测定纳米粒子在水溶液中不同温度下的粒径,结果如表1所示。

表1 HA-F127纳米粒子不同温度下的粒径

Table 1 Average size of HA-F127 nanoparticles at different temperature

温度/℃	粒径/nm
15	275.2
37	80.8

在15℃时,测得的粒径为275.2 nm,而在37℃时的粒径为80.8 nm,结果大于通过透射电镜观测到的粒径。这主要是由于透射电镜观测的是纳米粒子干态下的粒径,而通过动态光散射测定得到的是粒子的水合粒径,由于亲水层中含有一定的水分子,亲水性分子会向外伸展,因而粒径比电镜测得的结果要更大些。

2.3 体外药物释放

用HA-F127构建纳米粒子并包载疏水性抗肿瘤药物阿霉素,通过紫外检测可知药物的包载量可达到10.6%,药物的包封率为52.9%。载药HA-F127纳米粒子的药物释放行为分别在15℃和37℃条件

下测试,结果如图4所示。

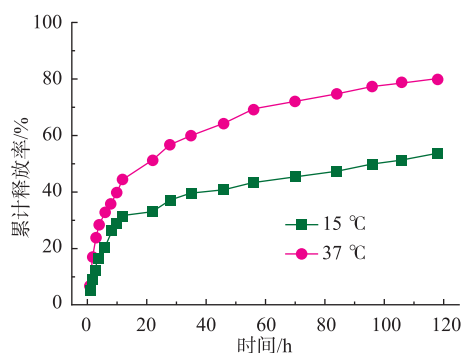


图4 HA-F127纳米粒子在不同温度的体外药物释放曲线
Fig. 4 In vitro drug release profiles of HA-F127 nanoparticles at different temperatures

从图4可以看出,在两种温度条件下,HA-F127纳米粒子均可以表现出对药物阿霉素良好的控制释放行为,而37℃下药物的释放速率和累计释放率均快于15℃下的药物释放行为。这主要是由于HA-F127纳米粒子具有如上所述的温敏性质,在37℃条件下会发生体系的收缩,此时药物的释放速率会明显增快,药物的累积释放率也有所增加。

2.4 HA-F127细胞毒性

材料HA-F127的细胞毒性通过MTT法分别对HeLa肿瘤细胞和COS7正常细胞进行测试,结果如图5所示。

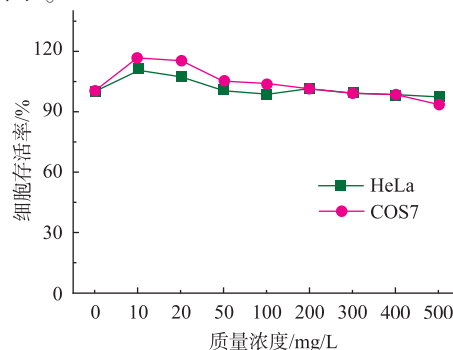


图5 HA-F127对HeLa和COS7细胞的细胞毒性
Fig. 5 Cytotoxicity of HA-F127 against HeLa and COS7 cells

从图5可以看出,HA-F127对于两种细胞均未表现出明显的细胞毒性,甚至当材料质量浓度达到500 mg/L,两种细胞的存活率仍可维持在90%以上。这一结果说明材料本身不具有明显细胞毒性。这主要是由于HA本身来源于动物体内,具有良好的生物相容性。而F127分子为FDA批准可注射进入人

体的药物辅料,其同样具有良好的生物相容性。因而所制备的材料及构建的纳米粒子可用于后续测试。

2.5 载药纳米粒子的细胞毒性

载药纳米粒子对两种细胞的毒性同样通过MTT法进行,同时以等当量的药物阿霉素作为阳性对照,结果如图6所示。从图6(a)中可以看出,对于HeLa肿瘤细胞药物阿霉素的半致死质量浓度(IC_{50})为0.3 mg/L,载药纳米粒子的 IC_{50} 值为0.6 mg/L。由于HA-F127纳米粒子本身不具有明显的细胞毒性,这一毒性主要来自于药物阿霉素。载药纳米粒子比药物阿霉素对细胞的 IC_{50} 略大,这主要是由于一部分药物被包裹在纳米粒子内部,难以完全释放进入细胞核,因而毒性有所降低。而从图6(b)可以看出,药物对于COS7细胞的 IC_{50} 为3 mg/L,而载药纳米粒子对细胞的 IC_{50} 则大于8 mg/L。对比HeLa细胞的结果可知,材料能明显提高治疗的选择性。这主要是由于HA可识别HeLa肿瘤细胞表面过度表达的CD44受体,因而可介导更多药物进入HeLa细胞。

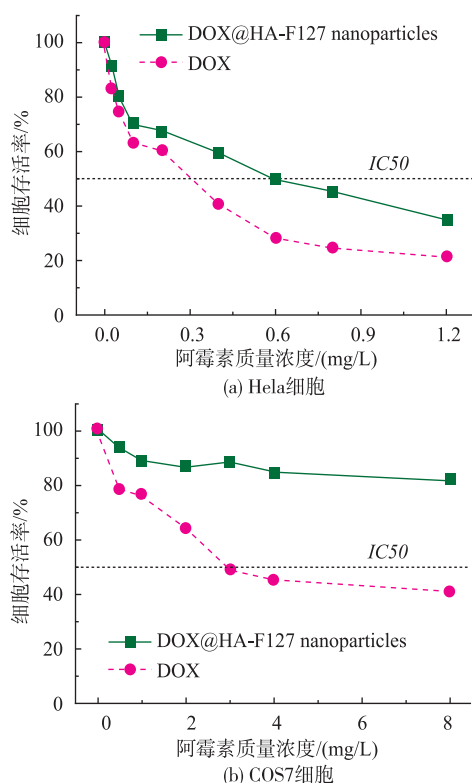


图6 载阿霉素 HA-F127 纳米粒子对 HeLa 和 COS7 细胞的细胞毒性

Fig. 6 Cytotoxicity of DOX-loaded HA-F127 nanoparticles against HeLa and COS7 cells

2.6 细胞内摄化行为

细胞对 HA-F127 载药纳米粒子的内摄化行为通过倒置荧光显微镜进行观测,照片如图7所示。图7(a)显示,红色荧光的药物阿霉素可进入 HeLa 细胞并进入经蓝色荧光探针 DAPI 标记的细胞核,因而表现出对 HeLa 细胞的显著毒性。图7(b)说明,载药纳米粒子同样可介导阿霉素快速进入 HeLa 细胞,并且可以观测到有药物进入细胞核。而在经过 HA 预处理 2 h 之后,由于 HA 已经与 HeLa 细胞表面的 CD44 受体相结合,此时载药纳米粒子进入细胞的效率降低,从图7(c)可看出,红色荧光明显减弱,这也说明 HA-F127 纳米粒子进入细胞的途径主要是由配体-受体介导的。而对于图7(d)COS7 正常细胞,由于其表面并不含有过度表达的 CD44 受体,因而 HA-F127 纳米粒子也难以在短时间内进入细胞。利用这一优势,HA-F127 纳米粒子可包载抗肿瘤药物特异性进入肿瘤细胞,提高药物传递的靶向性。

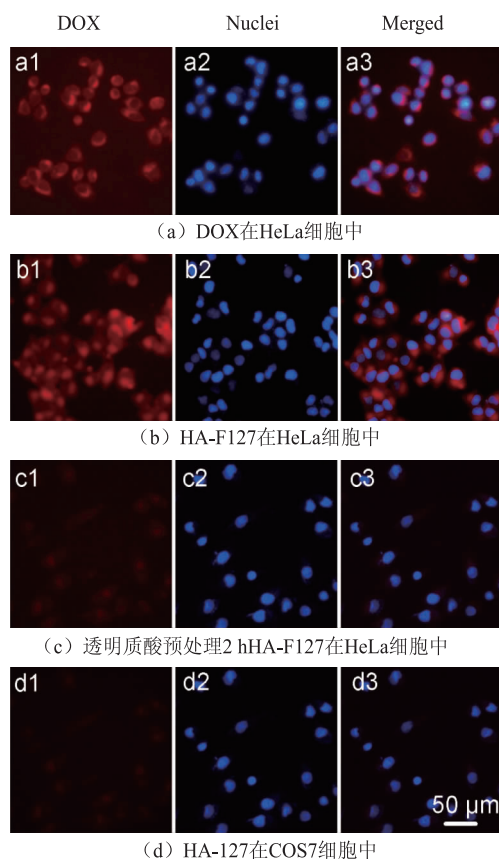


图7 HA-127 纳米粒子的细胞内摄化行为

Fig. 7 Internalization of HA-127 nanoparticles

3 结 语

通过“Click”化学反应成功制备了两亲性材料 HA-F127, 其在水溶液中可自组装形成纳米粒子。由于 F127 所具有的温敏特性, 纳米粒子也可以表现出一定的温敏性。

纳米粒子可以在疏水内核中包载疏水性的抗肿瘤药物阿霉素, 同时利用纳米粒子表面透明质酸对肿瘤细胞表面过度表达的 CD44 受体的识别作用, 靶向传递药物进入肿瘤细胞。材料本身具有良好的生物相容性, 其有望应用于临床抗肿瘤药物的靶向传递和治疗研究。

参考文献:

- [1] Maeda H, Bharate G Y, Daruwalla J. Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect [J]. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2009, 71(3):409-419.
- [2] Fang J, Nakamura H, Maeda H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect [J]. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2011, 63(3):136-151.
- [3] Fonseca S B, Pereira M P, Kelley S O. Recent advances in the use of cell-penetrating peptides for medical and biological applications [J]. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2009, 61(11):953-964.
- [4] Mizrahy S, Peer D. Polysaccharides as building blocks for nanotherapeutics [J]. **Chemical Society Reviews**, 2012, 41(7):2623-2640.
- [5] Choi K Y, Chung H, Min K H, et al. Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles for active tumor targeting [J]. **Biomaterials**, 2010, 31(1):106-114.
- [6] Collins M N, Birkinshaw C. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering—a review [J]. **Carbohydrate Polymer**, 2013, 92(2):1262-1279.
- [7] Choi K Y, Yoon H Y, Kim J H, et al. Smart nanocarrier based on PEGylated hyaluronic acid for cancer therapy [J]. **ACS Nano**, 2011, 5(11):8591-8599.
- [8] Bae K H, Choi S H, Park S Y, et al. Thermosensitive pluronic micelles stabilized by shell cross-linking with gold nanoparticles [J]. **Langmuir**, 2006, 22(14):6380-6384.
- [9] Chen J X, Wang H Y, Li C, et al. Construction of surfactant-like tetra-tail amphiphilic peptide with RGD ligand for encapsulation of porphyrin for photodynamic therapy [J]. **Biomaterials**, 2011, 32(6):1678-1684.
- [10] Chang C, Wei H, Feng J, et al. Temperature and pH double responsive hybrid cross-linked micelles based on P (NIPAAm-co-PMMA)-b-P(DEA):RAFT synthesis and "Schizophrenic" micellization [J]. **Macromolecules**, 2009, 42:4838-4844.

科 技 信 息

欧盟就扩大一种裂殖壶菌海藻油的每日摄入量发布意见

据欧盟食品安全局消息, 10月9日欧盟食品安全局就扩大新型食品配料—富DHA与EPA的裂殖壶菌海藻油的每日摄入量发布了意见。

应欧委会请求, 欧盟食品安全局专家组就扩大这种新型食品配料的使用剂量发布了意见。经过评估欧盟食品安全局认为, 当这种新型食品配料当中EPA和DHA的每日摄入量总和不超过5g时不会对成人构成安全风险。

[信息来源]食品伙伴网. 欧盟就扩大一种裂殖壶菌海藻油的每日摄入量发布意见 [EB/OL]. (2014-10-15). <http://news.foodmate.net/2014/10/279344.html>