还原响应型 K5 多糖胶束药物载体的研究

张 苗， 刘 文， 陈荆晓， 陈敬华 *
（江南大学 药学院，江苏 无锡 214122）

摘要：为了解决传统抗肿瘤药物阿霉素水溶性不佳，对机体选择性差的情况，设计了一种还原敏感的 K5 胶束药物载体。将脱氧胆酸（DOCA）通过双硫键与 K5 多糖连接，制备两亲性 K5PS-SS-DOCA （KSD） 缀合物。该缀合物在水溶液中可自组装形成胶束并包载模型药物阿霉素（DOX）。胶束形貌通过透射电镜进行观测， 并进一步通过动态光散射测定其水合粒径及 ζ-电位。胶束为球形，其水合粒径和 ζ 电位在载药前分别为 225 nm 与 -31 mV，载药后为 241 nm 与 -31 mV，具有较好的稳定性。该胶束在谷胱甘肽（GSH）存在条件下，可表现出明显的还原响应药物释放行为。细胞实验结果证实，载体材料有良好的生物相容性，含药胶束对肿瘤细胞的半数抑制浓度（IC50）低于正常细胞，对肿瘤细胞有明显选择性。

关键词：K5 多糖；胶束；还原响应；药物传递；阿霉素
中图分类号：R 944.9　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689（2015）01—0034—06

Preparation and Properties of the Redox-Sensitive K5 Polysaccharide Micelles as Drug Carrier

ZHANG Miao， *LIU Wen*， *CHEN Jingxiao*， *CHEN Jinghua**
（School of Pharmaceutical Science，Jiangnan University，Wuxi 214122，China）

Abstract：To overcome the poor water solubility or lack of tumor-targeting of Doxorubicin（DOX），we designed and fabricate the redox-sensitive K5 polysaccharide micelles as drug carrier，methods：An amphiphilic K5PS-SS-DOCA （KSD） conjugate was designed and prepared by covalently coupling deoxycholic acid （DOCA） with K5 polysaccharide （K5PS） via disulfide bonds. The conjugate could self-assemble into micelles in aqueous solution and encaspulate model drug DOX. The morphology of the micelles was observed by TEM，and the size and ζ-potential were measured by DLS. Results：The micelles were of spherical shape. The average size and ζ-potential was 225 nm and -31 mV for the micelles，and 241 nm and -31 mV for the DOX-loaded micelles，showing favorable stability. The DOX-loaded micelles could behave redox-sensitive drug release behavior in the solution containing 10 mM GSH. In vitro cytotoxicity showed that the bare micelles were biocompatible and DOX-loaded KSD micelles were more cytotoxic against tumor cells than normal

收稿日期：2014-04-09
基金项目：国家自然科学基金项目（51303068）；教育部博士点基金项目（20110093110008）；江苏省自然科学基金项目（BK2012557）；武汉大学生物医用高分子材料教育部重点实验室开放基金项目（20110401）。
* **通信作者**：陈敬华（1971—），男，湖北黄石人，理学博士，教授，博士研究生导师，主要从事生物大分子和生物功能材料研究。
E-mail：jhchenwhut@126.com

cells.
Keywords: K5 polysaccharide, micelles, redox sensitive, drug delivery, doxorubicin

聚合物胶束作为常用的药物载体,可包载药物并提高药物的水溶性、稳定性,改善药物的体内分布和靶向性[1-2],引起了广泛的关注。通常,制备胶束的材料多为合成型高分子。这些材料在体内难以降解,长期使用会引起肾脏毒性[3]。同时,合成材料还会因免疫原性而在体内被清除,降低了药物的利用度。近年来,天然来源的多糖类物质因其良好的生物相容性、生物可降解性等优点而广泛应用于药物载体的研究[4-6]。

K5 多糖是动物体内肝素和硫酸乙酰肝素的生物合成前体[7],可从大肠杆菌 K5 菌株的荚膜中分离得到[8]。K5 多糖未经硫酸化,可避免产生肝素使用中出现的诸多副作用,如出血、血小板减少症。由于 K5 多糖带有负电荷,在血液中不会非特异性吸附血浆蛋白而沉淀[9]。除不具有免疫原性外,K5 多糖还具有良好的进胞能力[10]。基于这些特点,K5 多糖可用于提高药物在体内的循环时间,其作为药物传递系统具有较大的潜力。

作者以发酵制备得到的 K5 多糖为原料,通过双硫键连接脱氧胆酸构建两亲性缀合物,用于抗肿瘤药物阿霉素的包载和传递。利用肿瘤细胞内部还原型谷胱甘肽(GSH)过量表达的特性[11-12],实现载体在肿瘤细胞内的崩解及药物的快速释放。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与细胞 K5 菌株:购自 ATCC;COS7 与 HeLa 细胞:购自中国科学院保藏中心(上海)。

1.1.2 试剂 脱氧胆酸、丙酮、乙酸乙酯、三乙胺(TEA)、二甲基甲酰胺(DMF)、甲酰胺:购自国药上海试剂公司;反应用的溶剂使用前均重蒸纯化;N,N-二异丙基碳二亚胺(DIC)、N-羟基丁二酰亚胺(NHS):购自阿拉丁试剂有限公司;胱胺·盐酸盐:购自百灵威;阿霉素·盐酸盐(DOX·HCl):购自浙江海正制药有限公司。

1.1.3 仪器 核磁共振波谱仪:德国 Bruker 公司产品;JEM-2100 透射电镜:日本 JEOL 公司产品;Micromass platform LCZ 质谱仪:美国 Waters 公司产品;Zetasizer Nano ZS 纳米粒度仪:英国 Malvern 公司产品;MULTISKAN GO 酶标仪:美国 Thermo 公司产品。

1.2 KSD 的合成

1.2.1 胱胺修饰的脱氧胆酸(DOCA-CYS)的合成 将 5 g DOCA 溶于 10 mL DMF,在冰浴状态下加入 1.96 mL DIC 与 1.46 g NHS 之后,称取 4.2 g 胱胺盐酸盐溶于 10 mL 甲酰胺,并加入 2 mL 三乙胺,再将溶液滴加入 DOCA 溶液中,氮气保护下于 25 ℃搅拌反应 12 h。反应结束后用水沉淀,并反复洗涤,真空干燥。粗产物溶于乙酸乙酯,将溶解部分充分干燥,获得 DOCA-CYS。

1.2.2 KSD 的合成 根据文献所述[13-14],经发酵、醇沉与离子交换等方法纯化获得了 K5 多糖。

将 100 mg K5 多糖溶于 10 mL 甲酰胺,之后置于冰浴中,并加入 0.3 mL DIC 与 0.22 g NHS,搅拌 15 min 后,加入 10 mL 含有 1 g DOCA-CYS 的 DMF 溶液,氮气保护下,于 25 ℃搅拌反应 36 h[15]。反应结束后,将浓缩溶液用冰丙酮沉淀 3 次,除去未反应的 DOCA-CYS。之后将沉淀溶于蒸馏水,用截留相对分子质量(MWCO)3 500 的透析袋对水透析提纯,冻干收集产品。

1.3 载药 KSD 胶束的制备与形态表征

称取 5 mg 阿霉素盐酸盐溶于 1 mL DMF,并加入 1 mL TEA,避光搅拌过夜脱去盐酸盐。之后将其加入到 5 mL 含有 20 mg KSD 的甲酰胺溶液中,于 25 ℃避光搅拌过夜。之后将液体装入透析袋(MWCO=3 500)避光对水透析 24 h,得载药 KSD 胶束,并将其用于药物释放实验,另取样冻干,测定载药量。

1.4 载药率与包封率测定

称取一定量冻干的载药胶束,溶于 v(DMF):v(甲酰胺)=1:1 溶液中,配成质量浓度为 1 mg/mL 的溶液,测定其在 480 nm 下的吸光值,并计算载药量与包封率。其中,载药量(%)=胶束中包载的阿霉素的量/载药胶束的总质量×100;包封率(%)=胶束中包载的阿霉素的量/阿霉素投入量×100

1.5 体外释放行为的研究

载药 KSD 胶束的体外药物释放分别在 PBS

(pH=7.4)及含有 10 mmol/L GSH 的 PBS(pH=7.4)中进行,取 1 mL 步骤 1.3 中所制备的载药胶束溶液装入透析袋(相对分子质量为 3 500)中并浸没于 10 mL 上述 PBS 中,在 37 ℃,100 r/min 摇床震荡下进行药物释放实验,每隔一段时间取样并更换 PBS,测定阿霉素累积释放量。

1.6 载药 KSD 胶束细胞毒性研究

将 HeLa 与 COS7 细胞以 8 000 个/孔的密度接种于 96 孔板,培养过夜后将培养基换成 100 μL 含 KSD 胶束的培养基溶液,共培养 48 h 后用 MTT 法测定每孔细胞存活率。每组实验重复 4 组,取平均值。

载药胶束的细胞毒性采用同样的方法测定,以等当量的阿霉素为阳性对照,每组实验重复 4 组,取平均值。

2 结果与分析

2.1 KSD 的合成

经多步纯化获得的 K5 多糖相对分子质量约为 50 000[13]。

通过控制投料量及滴加速度,制备单取代胱胺化 DOCA(DOCA-CYS),其化学结构如图 1 所示。目标产物经沉淀与乙酸乙酯溶解分离后,通过质谱对产品进行鉴定。如图 2 所示,谱图中 527.1 处的峰是产品的分子离子峰 (M+H),与理论相对分子质量(526.3)相吻合,这说明 DOCA-CYS 成功得以制备。

之后,利用胱胺上的氨基与 K5 多糖葡萄糖醛酸结构中的羧基进行反应,制备目标产物 KSD,产品经 ^{1}H NMR 谱图鉴定。如图 3 所示,与 K5 多糖(图 3(a))相比,0.97~1.76 处出现了 DOCA 甾环亚甲基氢的峰(图 3b)。由于未反应的 DOCA-CYS 经丙酮除去,这表明 DOCA-CYS 已经被连接到了 K5 多糖分子上。利用 0.62 处 DOCA 甾环上 18 位-CH3 中氢原子与 5.31 处 K5 多糖氨基葡萄糖 1 位-CH 中氢原子的峰面积比计算 DOCA 的取代度。结果表明,平均每 10 个 K5 多糖单元上接枝了 1 个 DOCA 分子。

2.2 载药 KSD 胶束的制备与形态表征

KSD 胶束载药前后的粒径大小通过动态光散射法进行测定,结果如图 4 与表 1 所示。在水溶液中,KSD 的平均粒径为 225 nm(PDI=0.254),而载药后,胶束的尺寸有所增加,为 241 nm(PDI=0.248)。这主要是因为疏水性的模型药物阿霉素被包裹于胶束内部,导致胶束粒径增大。胶束载药前后均可保持良好的尺寸稳定性。通过透射电子显微镜观测干态下胶束的形貌,结果如图 5 所示。胶束在载药前后均为球形,其平均尺寸分别为 45 nm 与 90 nm。由于电镜观测为干态下胶束,因而小于 DLS 测定的水合直径。未载药的胶束尺寸变化较大,而载药胶束变化较小,这主要是由于载药胶束内部部分空间被阿霉素占据,具有更为紧密的结构,因而体积收

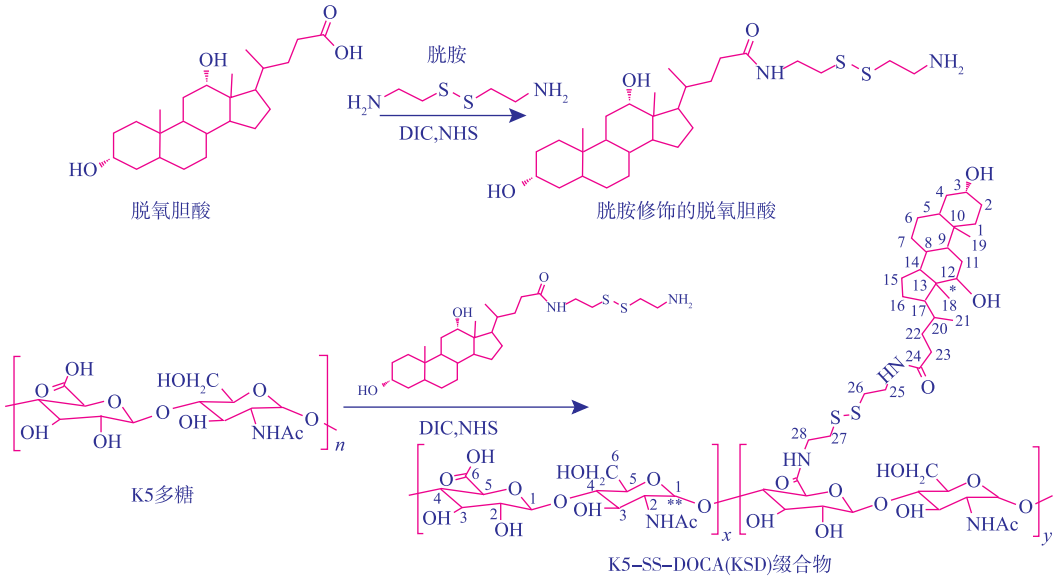


图 1 DOCA-CYS 和 KSD 缀合物的合成路线图

Fig. 1 Synthesis routes of DOCA-CYS and KSD conjugate

缩较小。另外,测定结果还显示载药前后,胶束的 ζ-电位都约为为-31 mV,理论上说明胶束具有良好的稳定性。由于 K5 多糖葡萄糖醛酸上带有羧基,这一结果也表明胶束外层亲水壳由带负电的 K5 多糖构成。胶束表面带有负电荷,可有效避免血浆蛋白在胶束表面的吸附,可提高胶束在血液中的循环能力。

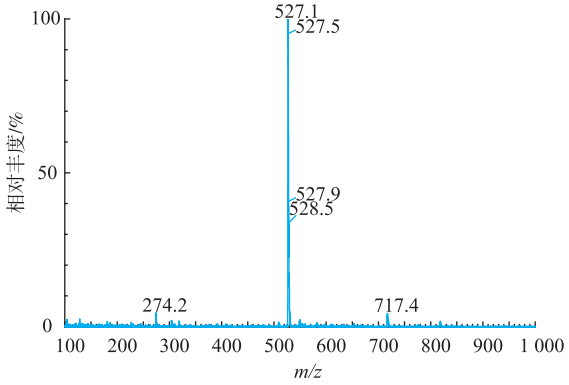
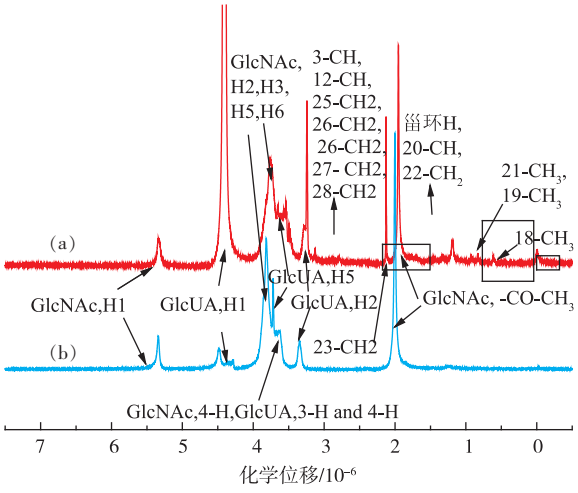


图 2 DOCA-CYS 的质谱图

Fig. 2 Mass spectrum of DOCA-CYS



星号标记的峰用来计算 DOCA-CYS 在 K5 多糖上的缀合度

图 3 K5 多糖在 D_2O (a) 中与 KSD 缀合物在 CD_3OD/D_2O 中(b)的核磁 ^1H 图谱

Fig. 3 ^1H NMR spectra of (a) K5 polysaccharide in D_2O, (b) KSD in CD_3OD/D_2O

2.3 载药与体外释放行为的研究

载药 KSD 胶束的载药量(DL)与包封率(EE)分别为 11.54%与 46.17%如表 1 所示,这一结果表明载体有较好的载药能力,DOX 可分别通过疏水作用和电荷吸附作用被包载在 KSD 胶束疏水性内核以及带负电的外壳上。

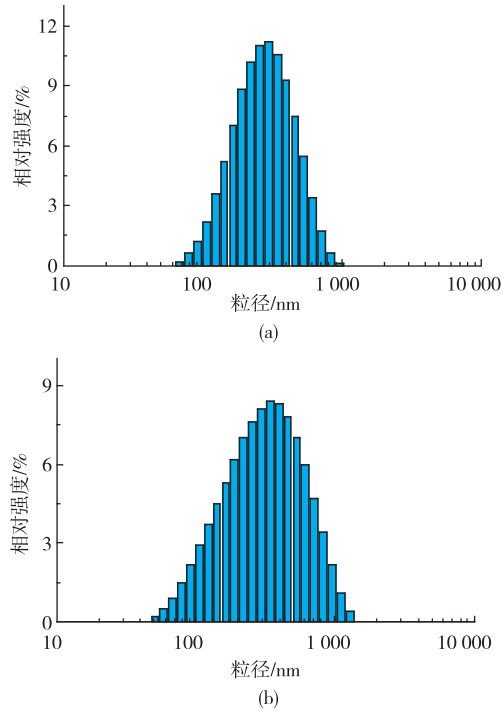
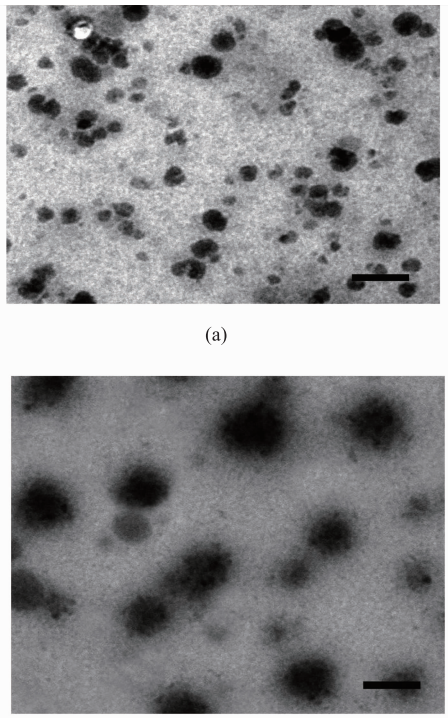


图 4 KSD 胶束(a)与载 DOX KSD 胶束(b)的粒径分布图

Fig. 4 Size distributions of KSD micelles (a) and DOX-loaded KSD micelles(b)



(a)

(b)

图 5 KSD 胶束(a)与载 DOX KSD 胶束(b)的透射电镜图像(标尺为 100 nm)

Fig. 5 TEM images of KSD micelles(a) and DOX-loaded KSD micelles(b),scale bar:100 nm

表 1 KSD 胶束和载药 KSD 胶束的表征

Table 1 Characterization of KSD micelles and DOX-loaded KSD micelles

样品	平均粒径/nm	PDI	ζ-电位/mV	包封率/%	载药量/%*
KSD 胶束	225	0.254	-31	-	-
载药 KSD 胶束	241	0.248	-31	46.17±2.09	11.54±0.52

*:±S.D(n=3).EE 值与 DL 值为平均值±S.D(n=3)

体外药物释放实验分别在 PBS(pH 7.4)和含有 GSH(10 mmol/L)的 PBS(pH 7.4)中进行。PBS 用于模拟体内血液循环 pH 环境,而含有 GSH 的 PBS 则用于模拟肿瘤细胞内部的环境, 结果如图 6 所示。在含有 10 mmol/L GSH 溶液中, 阿霉素 100 h 内的累积释放率可达到 90%。无 GSH 存在时,阿霉素的累积释放率仅为 50%。这一差别主要是由于 GSH 可断开KSD 胶束中用于连接亲水性 K5 多糖和疏水性DOCA 的双硫键,导致胶束解离,因此阿霉素可以快速释放。由于肿瘤细胞中 GSH 含量较高,载药胶束可以实现肿瘤细胞定点的快速药物释放。

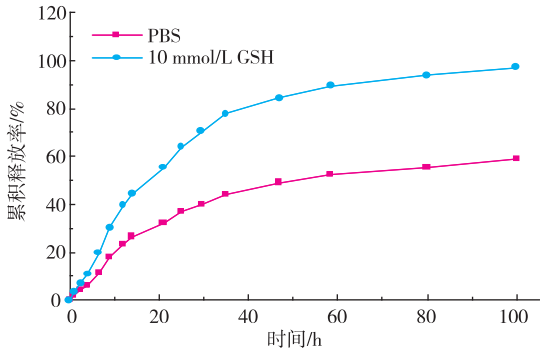


图 6 载药 KSD 胶束在不同介质中的释药曲线图。(a) pH 7.4 PBS;(b) pH 7.4 PBS 含 10 mmol/L GSH

Fig. 6 Drug release profiles of DOX-loaded KSD micelles at different release media

2.4 KSD 载药体系细胞毒性研究

2.4.1 KSD 载体毒性测定 分别采用肿瘤细胞 HeLa 与正常细胞 COS7 来评价 KSD 的细胞毒性,如图 7 所示,材料对两种细胞的生长均未表现出明显的抑制作用。当 KSD 的质量浓度达到 300 mg/L 时,细胞存活率依然大于 80%,显示该材料生物相容性良好。

2.4.2 含药载体细胞毒性评价 载药 KSD 胶束的细胞毒性如图 8,图 9 所示。结果表明,对于 HeLa 细胞, 载药 KSD 胶束与 DOX 对细胞的半数抑制浓度(IC50)结果分别为 0.89 mg/L 及 0.50 mg/L,这说明 KSD 并未影响 DOX 对于细胞的抑制作用。由于 HeLa 细胞内 GSH 过量表达,载药 KSD 胶束可以有效释放出 DOX,并抑制细胞生长。而对于 COS7 细胞,载药 KSD 胶束与 DOX 对细胞的 IC50 值则分别为 4.60 mg/L 与 0.29 mg/L。与 DOX 相比,载药胶束对 COS7 的 IC50 约提高了 15 倍, 这表明载药胶束对正常细胞生长抑制作用较小,对肿瘤细胞生长有较好的选择抑制效果。在 COS7 细胞中,GSH 并未过量表达,DOX 的释放率偏低, 因而表现出两种细胞中不同的 IC50 值。

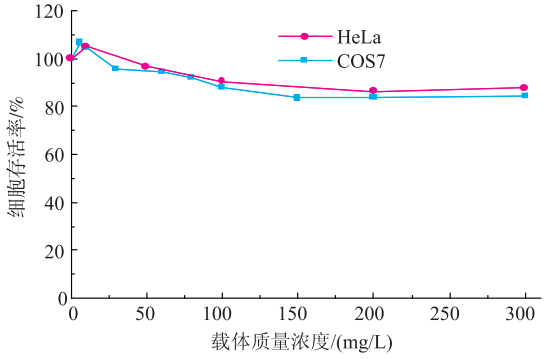


图 7 KSD 载体对 HeLa 与 COS7 的细胞毒性

Fig. 7 In vitro cytotoxicity of KSD against HeLa and COS7 cells

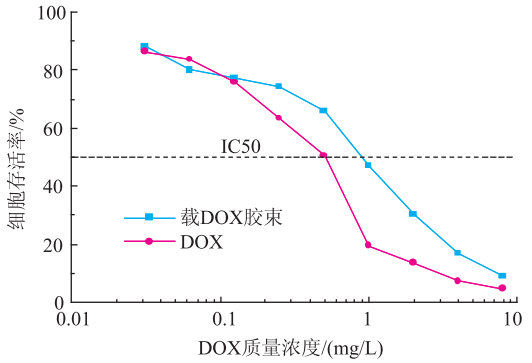


图 8 DOX 与载药 KSD 胶束对 Hela 细胞的毒性

Fig. 8 In vitro cytotoxicity of DOX and DOX-loaded micelles against HeLa cells

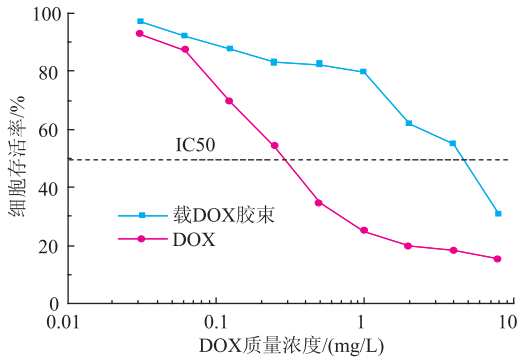


图 9 DOX 与载药 KSD 胶束对 COS7 细胞的毒性

Fig. 9 In vitro cytotoxicity of DOX and DOX-loaded micelles against COS7 cells

3 结 语

利用发酵获得的 K5 多糖制备了含双硫键的 KSD 缀合物,其可在水溶液中自组装形成形态大小均一且分散性良好的胶束。KSD 胶束可在疏水内腔中包裹模型抗癌药物阿霉素,并且在 GSH 存在的环境中表现出了 DOX 的还原敏感释放行为;细胞实验表明 KSD 胶束有良好的生物相容性,在肿瘤细胞中,载药 KSD 胶束可表现出与阿霉素相似的细胞抑制效果,而对正常细胞表现出降低的抑制作用。这种 KSD 胶束对肿瘤细胞具有一定的药物释放选择性,在临床应用方面具有广阔的应用前景。

参考文献:

[1] Kataoka K,Harada A,Nagasaki Y. Block copolymer micelles for drug delivery:design,characterization and biological significance [J]. **Adv Drug Deliver Rev**,2001,47(1):113-131.

[2] Nishiyama N,Kataoka K. Current state,achievements,and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery[J]. **Pharmacol Therapeut**,2006,112(3):630-648.

[3] Richter A W,Akerblom E. Polyethylene glycol reactive antibodies in man:titer distribution in allergic patients treated with monomethoxy polyethylene glycol modified allergens or placebo,and in healthy blood donors [J]. **Int Arch Allergy Imm**,1984,74(1):36-39.

[4] Baldwin A D,Kiick K L. Polysaccharide-modified synthetic polymeric biomaterials[J]. **J Pept Sci**,2010,94(1):128-1240.

[5] Mizrahy S,Peer D. Polysaccharides as building blocks for nanotherapeutics[J]. **Chem Soc Rev**,2012,41:2623-2640.

[6] XU Z P,ZENG Q H,LU G,et al. Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery [J]. **Chem Eng Sci**,2006,61(3):1027-1240.

[7] 赵雷,严子琴,王畅,等. 大肠杆菌产肝素前体 heparosan 的研究进展[J]. 生物技术进展,2011,1(3):195-200.
ZHAO Lei,YAN Ziqin,WANG Chang,et al. Progress of study of heparoson production by *E. coli* K5 [J]. **Current Biotechnology**,2011,1(3):195-200.(in Chinese)

[8] 王小元,宋鸿军. 细菌内毒素的生物合成途径及分子结构多样性[J]. 2013,32(10):1009-1015.
WANG Xiaoyuan,SONG Hongjun. Biosynthesis pathway and structure variability of bacterial endotoxin [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2013,32(10):1009-1015.(in Chinese)

[9] Blundell C D,Roberts I S,Sheehan J K,et al. Investigating the molecular basis for the virulence of Escherichia coli K5 by nuclear magnetic resonance analysis of the capsule polysaccharide[J]. **J Mol Microb Biotech**,2009,17:71-82.

[10] Raman K,Mencio C,Desai U R,et al. Sulfation patterns determine cellular internalization of heparin-like polysaccharides[J]. **Mol Pharm**,2013,10(4):1442-1449.

[11] Ottaviano F G,Handy D E,Loscalzo J. Redox regulation in the extracellular environment[J]. **Circ J**,2008,72(1):1-16.

[12] MENG F H,Hennink W E,ZHONG Z Y. Reduction-sensitive polymers and bioconjugates for biomedical applications [J]. **Biomaterials**,2009,30(12):2180-2198.

[13] ZHANG CY,LIU L,CHEN J H,et al. Metabolic engineering of Escherichia coli BL21 for biosynthesis of heparosan,a bioengineered heparin precursor[J]. **Metab Eng**,2012,14(5):521-527.

[14] Ly M,WANG Z Y,Laremore T N,et al. Analysis of E. coli K5 capsular polysaccharide heparosan [J]. **Anal Bioanal Chem**,2011,399(2):737-745.

[15] LI J,HUO M R,WANG J,et al. Redox-sensitive micelles self-assembled from amphiphilic hyaluronic acid-deoxycholic acid conjugates for targeted intracellular delivery of paclitaxel[J]. **Biomaterials**,2012,33:2310-2320.