研究论文

DOI:10.3969/j.issn. 1673–1689.2017.04.011

pH 响应型透明质酸–棉酚纳米粒子的制备及其性能研究

施 瑜， 王丽娟， 徐珊珊， 刘 潇， 许菲格，
张曼悦， 朱栋琪， 陈荆晓， 陈敬华 *

（江南大学 药学院，江苏 无锡 214122）

摘要： 制备了基于硼酸酯键的 pH 响应型透明质酸–棉酚缀合物，用于治疗前列腺癌。其在水溶液中可自组装形成纳米粒子，透射电镜观测表明其平均粒径 40 nm，可均匀分散。体外药物释放实验证明，其具有 pH 响应的释药行为。体外细胞毒性结果显示其对前列腺癌细胞的半数抑制浓度(IC50)较正常细胞低，表现出治疗靶向性。该纳米粒子在棉酚的靶向传递及前列腺癌治疗方面具有一定的应用潜力。

关键词： pH 响应；硼酸酯键；棉酚；纳米粒子；细胞毒性

中图分类号：R 944.9　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1673—1689(2017)04—0400—05

Preparation and Characteristics Study of the pH–Responsive Hyaluronic Acid–Gossypol Nanoparticles

SHI Yu， *WANG Lijuan*， *XU Shanshan*， *LIU Xiao*， *XU Feige*，
ZHANG Manyue， *ZHU Dongqi*， *CHEN Jingxiao*， *CHEN Jinghua**

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

Abstract： A pH-responsive hyaluronic acid-gossypol conjugate was prepared based on boronate ester，which could be used as prostate cancer therapy. The conjugate could self-assemble into nanoparticle which morphology was observed by transmission electron microscopy. The nanoparticles were well-dispersed with 40 nm diameter. The pH responsible drug release behavior was confirmed by in vitro drug release study. In vitro cytotoxicity study illustrated a favorable selectivity，since the half maximal inhibitory concentration （IC50） of the nanopaticles against prostate cancer cells was lower than that of normal cells.The designed nanoparticle showed great potential for targeted delivery of gossypol and treatment of prostate cancer.

Keywords： pH-responsive，boronate ester，gossypol，nanoparticles，cytotoxicity

收稿日期： 2015–05–12

基金项目： 江苏省自然科学基金项目(BK2012557)；江苏省普通高校研究生科研创新计划项目(KYLX_1172)；江南大学大学生创新训练计划项目(2015315Y)；安徽大学现代生物制造协同创新中心开放课题(BM2015008)。

* **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，主要从事生物制药及活性大分子研究。
E–mail：jhchenwhut@126.com

引用本文： 施瑜，王丽娟，徐珊珊，等. pH 响应型透明质酸–棉酚纳米粒子的制备及其性能研究[J]. 食品与生物技术学报，2017，36(04)：400–404.

前列腺癌是常见的老年男性癌症，随着人口老龄化其发病率日趋增高[1-2]。棉酚(Gossypol，GP)这种常用作避孕药的天然化合物可直接作用于前列腺，具有抑制前列腺癌细胞增殖、促其凋亡的作用[3-4]。不过，棉酚水溶性不佳，且不具有选择性易产生副作用而应用受限。由于肿瘤组织具有 pH 偏低的性质，用具有 pH 响应功能的纳米药物传递系统能提高疏水性药物的生物利用度，同时改善其靶向治疗效果[5]。因而，构建新型 pH 敏感药物传递系统受到研究人员的关注。

有研究表明，苯硼酸在 pH 大于其 pKa 时，可与具有二醇结构的化合物结合形成硼酸酯键，当介质 pH 小于 pKa 时，硼酸酯键则会断裂，表现出 pH 响应行为[6-8]。由于 GP 分子具有邻二醇基团，可利用其与苯硼酸形成硼酸酯键，制备受 pH 调控的 GP 药物传递系统。透明质酸(Hyaluronic acid，HA)作为天然大分子，其生物相容性良好并可特异性识别肿瘤细胞表面过量表达的 CD44 受体[9-11]，因此可构建基于 HA 的药物传递系统来改善 GP 的生物相容性并提高其肿瘤靶向性。

作者拟在透明质酸分子上连接氨基苯硼酸(3-aminophenylboronic acid，APBA)，得到衍生物 HP，之后通过硼酸酯键与 GP 连接，制备具有两亲性的 HGP 缀合物(如图 1)。期望 HGP 在水溶液中能自组装形成纳米粒子，并利用 HA 可特异性识别肿瘤细胞表面过量表达 CD44 受体以及硼酸酯键的 pH 响应性质，实现 GP 的靶向传递和控制释放。

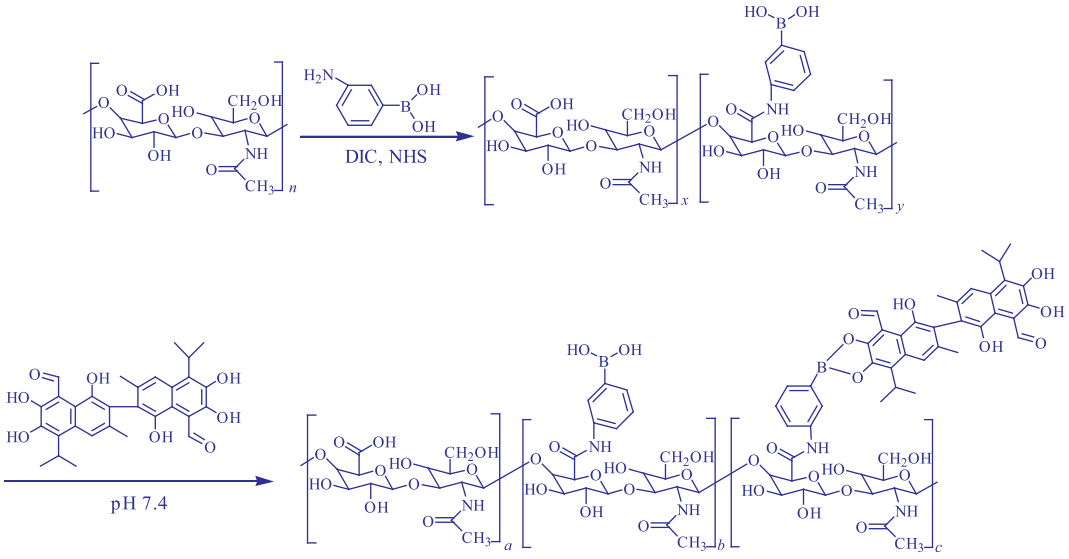


图 1　HGP 的合成路线

Fig. 1　Synthetic route of HGP

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

棉酚由江南大学药学院汤鲁宏教授赠予；HA(*M*w 5 000)：购自山东福瑞达医药集团公司；APBA：购自上海安耐吉化学有限公司；噻唑蓝(MTT)，*N*，*N*'–二异丙基碳二亚胺(DIC)和 N–羟基琥珀酰亚胺(NHS)：购自上海晶纯试剂有限公司；透析袋、胰酶：购自 Sigma–Aldrich 公司；青霉素–链霉素，RPMI 1640，DMEM 细胞培养基：自 Life Technologies 公司；胎牛血清(FBS)：购自 Hyclone 公司；其它试剂均为分析纯，使用前纯化。

1.2　主要仪器

Avance III 型核磁共振波谱仪：德国 Bruker 公司产品；JEM–2100 透射电镜：日本 JEOL 公司产品；Zetasizer Nano ZS 电位及粒度分析仪：英国 Malvern 公司产品；Multiskan GO 酶标仪：美国 Thermo 公司产品。

1.3　菌株与细胞株

人前列腺癌细胞(PC–3)，非洲绿猴 SV40 转化的肾细胞(COS7)：购自中国科学院保藏中心(上海)。

1.4　实验方法

1.4.1　HP 的制备　将 100 mg 的 HA (0.248 mmol 双糖单元)溶于10 mL 新蒸甲酰胺中，加入 0.12 mL

DIC(0.75 mmol,3 eq)和 87.5 mg NHS(0.75 mmol,3 eq)，于冰浴下活化羧基 2 h，之后将 50 mg APBA (0.38 mmol,1.5 eq)加入上述溶液,氮气保护下反应 48 h。反应结束后,用 V(醋酸缓冲溶液):V(甲醇)=1:1 透析 2 d,之后用去离子水透析 2 d,冷冻干燥得 HP。产物通过核磁共振氢谱(^{1}H NMR)确认结构。

1.4.2 HGP 的制备 称取 50 mg 的 HP 溶于 5 mL PBS (pH 7.4)，将 2 mL GP 的甲酰胺溶液 (10 mg/mL)缓慢滴加入上述溶液,并于室温下搅拌 6 h。反应结束后用 V(PBS):V(甲醇)=1:1 透析 1 d,之后用 PBS(pH 7.4)透析 1 d,冷冻干燥得 HGP。产物通过核磁共振氢谱(^{1}H-NMR)确认结构,并根据 GP 标曲测定其含量。GP 质量分数(%)=(m_{GP}/m_{HGP})×100%。

1.4.3 HGP 纳米粒子的制备及表征 将 HGP 溶于 PBS(pH 7.4,1 mg/mL)中,于 25 ℃下静置 1 h,待纳米粒子形成并稳定后测定其粒径分布和 ζ-电位,并通过透射电子显微镜观测其形貌。

1.4.4 体外药物释放实验 采用透析法测定 GP 的释放行为,将 2 mL HGP(1 mg/mL)溶液装入透析袋中，然后分别浸入装有 10 mL 不同 pH (pH 5.0 和 pH 7.4)的缓冲溶液中,放入摇床,37 ℃条件下于预设时间取样,同时补充新鲜缓冲液。用紫外分光光度计于 368 nm 处测样品紫外吸收,并根据 GP 标曲计算累积释放率,每组实验 3 个平行。药物累积释放率(%)=(M_t/M)×100(M_t 为 t 时刻 GP 的累积释放量;M 为 HGP 中 GP 总质量)

1.4.5 体外细胞毒性实验 PC-3 细胞用含质量分数 10% FBS、1% 双抗的 RPMI 1640 细胞培养基，COS7 细胞用含质量分数 10% FBS、1% 双抗的 DMEM 细胞培养基，在 37 ℃下，含体积分数 5% CO_2 及饱和湿度的培养箱中培养。

待细胞长满后，按 8 000 个/孔的细胞密度,将细胞接种于 96 孔板同时培养过夜。之后弃去培养基，将不同浓度的 HP、HGP、GP (溶于含质量分数 10% FBS 的细胞培养基中,其中 GP 用质量分数 5% 的 DMSO 助溶)溶液加入孔板中,并预留只含 10% FBS 的细胞培养基作为空白对照。继续培养 48 h 后每孔加入 0.5 mg/mL MTT 溶液 100 μL,37 ℃培养 4 h,吸出上清液,用 100 μL DMSO 溶解沉淀物,采用酶标仪于 570 nm 处检测 OD 值。细胞存活率(%)=($OD_{加药组}/OD_{空白组}$)×100

2 结果与分析

2.1 HGP 的合成

HP 以及 HGP 的化学结构通过核磁共振氢谱进行确认,结果如图 2 所示。从 HP 的核磁图谱可以看出，在 7.3×10^{-6}~8.0×10^{-6} 处出现了 APBA 苯环上氢的峰,这说明 APBA 成功与 HA 相连,并且通过其与 2.1×10^{-6} 处的 N-乙酰氨基葡萄糖单元上甲基氢峰面积比较，算出 APBA 的取代度为 28%。另外，HGP 的核磁图谱在 10.2×10^{-6} 处出现了 GP 醛基上氢的峰,同样通过其与 2.1×10^{-6} 处的 N-乙酰氨基葡萄糖单元上甲基氢峰面积比较，可以算出 GP 的取代度为 10%。此外通过 368 nm 处 GP 的标曲计算得到的 GP 质量分数为 11.2%,与积分计算所得结果相吻合。

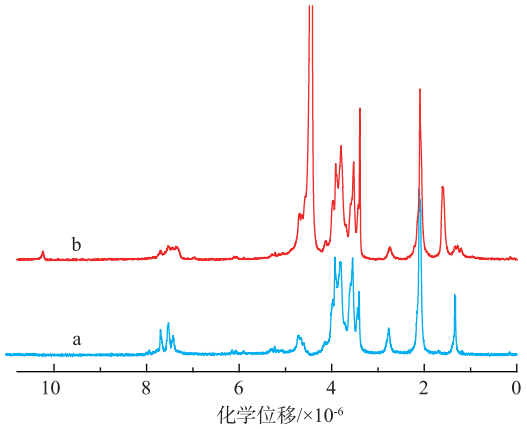


图 2 HP(a)与 HGP(b)在 D_2O/CD_3OD(体积比为 1/1)中的核磁共振氢谱

Fig. 2 ^{1}H NMR spectra of HP (A) and HGP (B) in D_2O/CD_3OD(1/1)

2.2 纳米粒子的表征

将疏水性药物 GP 连接于 HA 亲水性骨架上,得到的 HGP 具有两亲性,因而其在水溶液中能够自组装形成纳米粒子。通过透射电镜观察其形貌(图 3),所形成的纳米粒子均匀分散,具有球形结构,粒径约为 40 nm。此外,通过动态光散射测定纳米粒子在水溶液中的粒径分布及 ζ-电位(如图 4),其平均粒径为 60.5 nm,比由电镜观测得到的粒径略大,这主要是因为电镜观察的纳米粒子是在干燥状态下,因而尺寸略小。另外测得的 ζ-电位值为-13.6 mv,这说明该纳米粒子具有良好的稳定性。

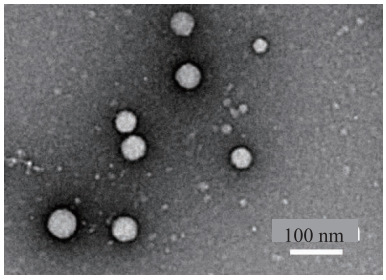


图 3　HGP 纳米粒子的透射电镜图

Fig. 3　TEM image of HGP nanoparticles

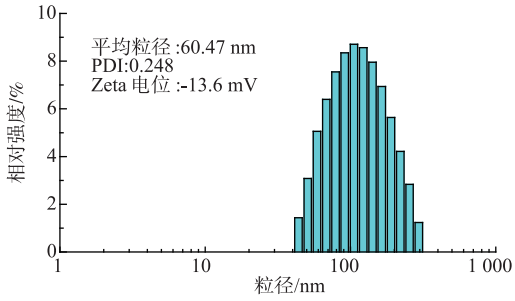


图 4　HGP 纳米粒子的粒径分布及 ζ–电位

Fig. 4　Size distribution and ξ–potential of HGP nanoparticles

2.3　体外药物释放

HGP 在 pH 7.4 和 pH 5.0 条件下的药物释放结果如图 5 所示。在 pH 5.0 条件下，GP 具有较快的释放速率，在开始 4 h 内可达 32%，12 h 后累积释放量为 60%。而在 pH 7.4 条件下，GP 释放缓慢，12 h 内的积累释放量仅有 24.2%，3 d 后也只达到了 28.5%。这主要是因为在 pH 5.0 环境下，硼酸酯键不稳定，GP 与 HA 的结合发生破坏，随即导致纳米粒子解离，加快了药物的释放。这一结果证明了 HGP 受 pH 调控，可在酸性环境下实现 GP 的刺激–响应释放。

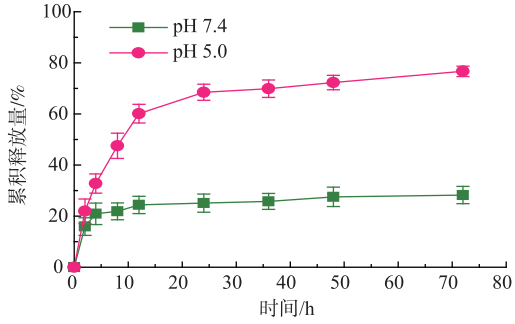


图 5　HGP 在 pH 7.4 和 pH 5.0 环境下的体外药物释放（n=3）

Fig. 5　In vitro drug release profiles of HGP at pH 7.4 and pH 5.0 (n=3)

2.4　HP 和 HGP 的细胞毒性

通过 MTT 法测定 HP 对 PC–3 细胞和 COS7 细胞的细胞毒性，结果如图 6 所示。HP 对 PC–3 细胞和 COS7 细胞均没有表现出明显的细胞毒性，当 HP 浓度达到 300 mg/L 的情况下，细胞存活率依然维持在 80%左右。这一结果说明 HP 维持了 HA 良好的生物相容性，可以作为 GP 的载体用于传递药物。

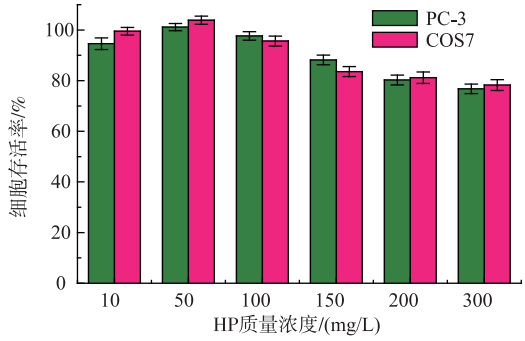
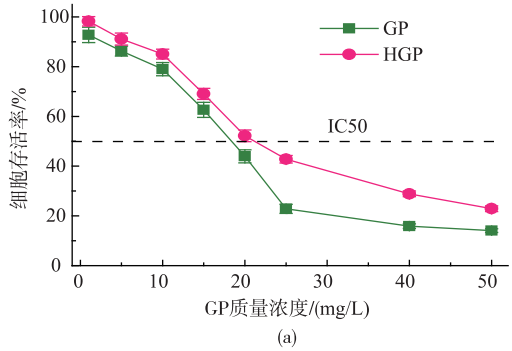


图 6　HP 对 PC–3 细胞和 COS7 细胞 48 h 的体外细胞毒性（n=6）

Fig. 6　In vitro cytotoxicity of HP against PC–3 and COS7 cells after 48 h (n=6)

GP 和 HGP 的细胞毒性同样通过 MTT 法测定，结果如图 7 所示，GP 对 PC–3 细胞和 COS7 细胞均有较大的毒性，其半数致死量分别为 18.9 mg/L 和 22.9 mg/L。这一结果证明了 GP 不具有治疗的特异性，单独使用易对正常细胞产生副作用，降低其治疗效果。形成纳米粒子之后，HGP 对 PC–3 细胞和 COS7 细胞的半数致死量分别为 21.3 mg/L 和 45.0 mg/L。这是因为 HA 能够靶向识别 PC–3 细胞表面过度表达的 CD44 受体，此外当 HGP 进入肿瘤细胞后，较低的 pH 会破坏其硼酸酯键并释放出药物，因此 HGP 能够保持对 PC–3 细胞较高的抑制作用。而 HA 缺乏对 COS7 细胞的靶向选择性，同时 HGP 在 COS7 细胞中能够保持稳定，GP 不会快速泄漏释放，所以 HGP 对 COS7 细胞的毒性较小。



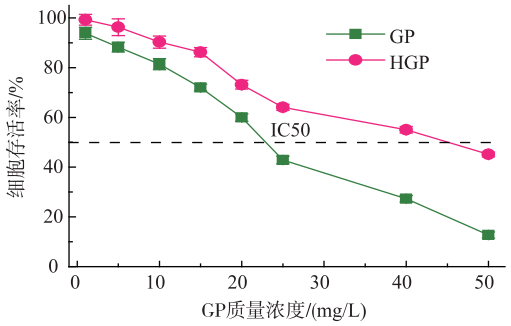


图 7　GP 与 HGP 对 PC-3 细胞(a)和 COS7(b)细胞 48 h 的体外细胞毒性(n=6)

Fig. 7　In vitro cytotoxicity of GP and HGP against PC-3 cells and COS7 cells(n=6) after 48 h

3 结　语

基于硼酸酯键制备了两亲性 HGP 缀合物,其在水溶液中能够自组装形成纳米粒子，并且表现出 pH 响应性,能够在 pH 5.0 的环境下快速释放药物。HA 的肿瘤靶向性提高了 HGP 的治疗选择性,肿瘤细胞低 pH 环境促进了 GP 的释放,因而本研究制备的纳米粒子能够实现 GP 的靶向传递和控制释放,降低对正常细胞的毒副作用，提高抗前列腺癌效果。

参考文献:

[1] XU Jing,YU Jingmou,LIU Yonghua,et al. Advances in active targeting drug delivery system for prostate cancer [J]. **Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy**,2014,31(9):1143-1147.(in Chinese)

[2] ZHANG M,LIU H P,TIAN Z K,et al. Gossypol induces apoptosis in human PC-3 prostate cancer cells by modulating caspase-dependent and caspase-independent cell death pathways[J]. **Life Sciences**,2007,80(8):767-774.

[3] LIU H,LI K,LAN L,et al. Double-layered hyaluronic acid/stearic acid-modified polyethyleneimine nanoparticles encapsulating (-)-gossypol:a nanocarrier for chiral anticancer drugs[J]. **Journal of Materials Chemistry B**,2014,2(32):5238-5248.

[4] JIANG J,SLIVOVA V,JEDINAK A,et al. Gossypol inhibits growth,invasiveness,and angiogenesis in human prostate cancer cells by modulating NF-κ B/AP-1 dependent-and independent-signaling[J]. **Clinical & Experimental Metastasis**,2012,29(2):165-178.

[5] FLEIGE E,QUADIR M A,HAAG R. Stimuli-responsive polymeric nanocarriers for the controlled transport of active compounds:concepts and applications[J]. **Advanced Drug Delivery Reviews**,2012,64(9):866-884.

[6] KIM H,KANG Y J,KANG S,et al. Monosaccharide-responsive release of insulin from polymersomes of polyboroxole block copolymers at neutral pH[J]. **Journal of the American Chemical Society**,2012,134(9):4030-4033.

[7] SU J,CHEN F,CRYNS V L,et al. Catechol polymers for pH-responsive,targeted drug delivery to cancer cells[J]. **Journal of the American Chemical Society**,2011,133(31):11850-11853.

[8] LI L X,BAI Z W,LEVKIN P A. Boronate-dextran:An acid-responsive biodegradable polymer for drug delivery [J]. **Biomaterials**,2013,34(33):8504-8510.

[9] MIZRAHY S,PEER D. Polysaccharides as building blocks for nanotherapeutics [J]. **Chemical Society Reviews**,2012,41(7):2623-2640.

[10] 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.

[11] CHEN Jingxiao,CAO Lujuan,MENG Zhaomin,et al. Study of temperature sensitive nano drug delivery system based on hyaluroIlic acid[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2014,33(12):1294-1299.(in Chinese)