

pH 响应型苯硼酸酯连接嵌段聚合物的合成及药物控释

何文涛^{1,2}, 刘燕^{2,3}, 施萍¹, 彭立聪¹, 祁芊芊¹, 袁建超¹

(1.西北师范大学化学化工学院, 甘肃省高分子材料重点实验室, 兰州 730070;

2.河西学院医学院, 甘肃 张掖 734000;

3.兰州大学基础医学院病理生理学研究所 兰州 730000)

摘要: 以含苯硼酸酯(PBE)的聚乙二醇(mPEG)大分子(mPEG-PBE-OH)为引发剂, 引发 ϵ -己内酯(ϵ -CL)开环聚合, 制备了以硼酸酯结构连接的pH 敏感两亲性聚合物(mPEG-PBE-PCL)。该聚合物在水相环境中自组装形成“核-壳”结构纳米胶束, 并将阿霉素(DOX)负载在胶束内核中。通过核磁共振氢谱(¹H-NMR)、红外光谱(IR)和凝胶渗透色谱(GPC)对聚合物结构进行了表征, 通过透射电镜(TEM)和动态光散射(DLS)等对胶束的形貌和粒径进行了表征, 通过紫外吸收光谱分析了胶束载药量和载药效率, 并对胶束的pH敏感释药性能与体外细胞毒性进行了验证。结果表明: 聚合物自组装形成粒径约127 nm的球形胶束, 对DOX具有较高的负载能力; 聚合物具有良好的pH响应性和生物相容性, 负载的DOX能在肿瘤细胞弱酸性环境中释放, 有效递送至细胞核; 与游离的DOX·HCl相比, 负载DOX的胶束(DOX@mPEG-PBE-PCL)对鼠源黑色素瘤B16F10细胞具有相近的抗肿瘤活性。

关键词: 苯硼酸酯键; 纳米胶束; DOX; pH响应; 药物递送

中图分类号: O632

文献标志码: A

Synthesis and Drug Controlled Release of pH-Responsive Phenylborate-Linked Block Polymers

HE Wentao^{1,2}, LIU Yan^{2,3}, SHI Ping¹, PENG Licong¹, QI Qianqian¹, YUAN Jianchao¹

(1. Key Laboratory of Gansu Polymer Materials, College of Chemistry and Chemical Engineering, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China; 2. School of Medicine, Hexi University, Zhangye 734000, China; 3. Department of Pathophysiology, Basic Medical College, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract: A pH-sensitive amphiphilic polymer Poly(ethylene glycol)-phenylborate-poly(ϵ -caprolactone) (mPEG-PBE-PCL) linked by a borate structure was prepared by ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone

收稿日期: 2018-10-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21364011, 20964003)

作者简介: 何文涛(1983-), 男, 甘肃高台人, 硕士, 讲师, 主要研究方向为: 靶向抗肿瘤高分子药物、生物高分子材料。E-mail: zyyzhwt@163.com

通信联系人: 袁建超, E-mail: jianchaoyuan@nwnu.edu.cn.

(ϵ -CL) which was initiated by a benzene-borate-containing polyethylene glycol macromolecule (mPEG-PBE-OH). The polymer was self-assembled and formed a "core-shell" nanomicelles structure in aqueous environment and loaded doxorubicin (DOX) in the micellar core. The structure of polymer was characterized by ^1H -NMR, IR spectra and Gel permeation chromatography (GPC). The morphology and particle size of the prepared micelles were observed by transmission electron microscopy (TEM) and dynamic light scattering (DLS), and the micelle drug loading and drug loading efficiency were analyzed by ultraviolet absorption detection. The pH-sensitive release properties of micelles and *in vitro* cytotoxicity were verified. The results showed that the polymer micelles had a low critical micelle concentration, self-assembly forms spherical micelles of about 127 nm, and a high loading capacity for DOX, the polymer had good pH response and biocompatibility. The loaded DOX was released in weak acidic environment of tumor cells and was delivered effectively to nucleus. DOX@mPEG-PBE-PCL had a similar antitumor activity against murine melanoma B16F10 cells to free DOX·HCl. Therefore, smart micelles containing pH-responsive boronate bonds hold great potential in efficient intracellular delivery of antitumor drugs.

Key words: phenyl boronate bond; nanomicelle; DOX; pH response; drug delivery

化疗是癌症最常见的治疗方法之一^[1], 其中阿霉素 (DOX) 作为一种最有效的抗肿瘤化疗药物, 可以抑制脱氧核糖核酸 (DNA) 和核糖核酸 (RNA) 的合成而广泛应用于临床^[2]。但DOX在体内循环中的水溶性、稳定性差, 缺乏肿瘤特异性活性, 肿瘤部位富集量小、较高剂量下产生心脏毒性等^[3~5]缺点, 限制了其在治疗中的应用。相比人体正常组织, 恶性肿瘤组织的异常代谢诱导其具有如高胞吞率^[6]、弱酸性^[7,8]、氧化还原性^[9,10]、高糖^[11]、缺氧^[12]和过表达的酶^[13]等不同的特性。可对肿瘤组织微环境进行智能响应的自组装聚合物胶束成为最有前景的药物递送系统之一^[14], 它具有提高药物在水中的溶解度, 延长血液循环时间, 血液循环中具有抗稀释特性, 并通过增强的渗透性和滞留效应(EPR)^[15,16]被动靶向到肿瘤组织, 从而增强其治疗效力, 同时降低全身毒性。

苯硼酸(PBA)及其衍生物可以与具有邻二醇或间二醇结构的多羟基化合物形成共价复合物, 基于PBA与二醇类物质可逆结合, 早期有关PBA在生物医学领域的研究主要集中在胰岛素投递、血糖检测和葡萄糖传感器等^[17~19]。PBA及其衍生物具有较高的解离平衡常数 pK_a 值(7.8~8.6), 在正常生理条件下PBA与具有邻二醇或间二醇结构的多羟基化合物难以形成稳定的共价复合物^[20,21]。为降低其 pK_a 值, 常采用在PBA苯环对位上引入羧基或间位引入卤素、硝基等拉电子基团^[22,23], 或在PBA苯环邻位引入氨基或羟基等配位基团等方法^[24]。近年来, 发现另外一些方法能够有效降低含PBA载体的 pK_a , PBA和多元醇形成的苯硼酸酯结构显示出比硼酸本身更低的 pK_a ^[25]。1,2-二醇或1,3-二醇之间与PBA在生理pH和碱性环境下形成较为稳定的苯硼酸酯^[26,27], 但是在弱酸性环境下PBA与二元醇的结合力变弱容易发生解离。由于肿瘤细胞代谢过于旺盛, 需要大量的能量来加强生物合成功能, 除了氧化磷酸化之外还会产生大量的糖酵解, 使乳酸含量增加, 从而导致实体瘤的细胞外pH呈现弱酸性 (pH 6.0~7.0)^[28,29], 更重要的是肿瘤细胞内pH更低 (内涵体pH 5.5~6.0和溶酶体pH 4.0~5.0)^[30~32], 苯硼酸酯在肿瘤溶酶体弱酸性环境中呈现出很明显的pH响应性。因此含有硼酸酯结构的材料在抗肿瘤药物的递送系统中具有重要的研究价值。

基于以上研究现状和理论分析, 本文设计并制备了以苯硼酸酯 (PBE) 结构连接的pH敏感聚 (乙二醇)

-苯基硼酸酯-聚(ϵ -己内酯)(mPEG-PBE-PCL)。如图1所示, 该聚合物在水相环境中自组装形成“核-壳”结构纳米胶束, 并将小分子药物DOX包埋在胶束的“核”中合成DOX/mPEG-PBE-PCL载药胶束。以美国食品和药物管理局(FDA)批准能作为体内注射药用聚合物聚乙二醇(PEG)为壳, 减少网状内皮系统(RES)的消除, 延长小分子药物DOX的循环时间^[33,34]。纳米胶束通过EPR效应增加肿瘤部位的积累并被细胞内吞, 在内涵体和溶酶体的弱酸性环境下释放出DOX。该具有pH响应性能的纳米胶束, 有望在肿瘤微环境起到协同作用, 实现药物的可控释放, 提高药物治疗效果。

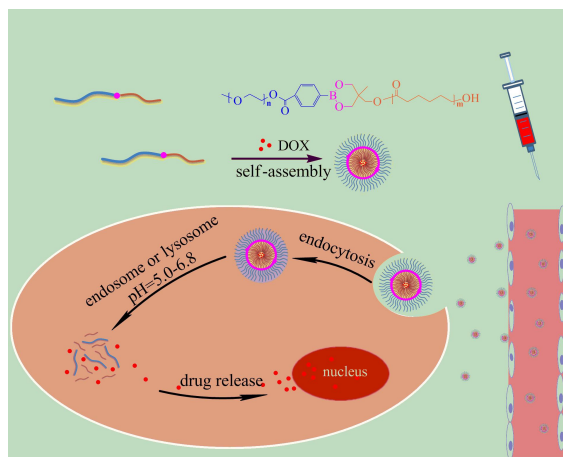


图1 肿瘤细胞中的微酸性介质触发的DOX@mPEG-PBE-PCL胶束的形成和DOX释放的示意图

Fig.1 Schematic diagram of the formation DOX@mPEG-PBE-PCL micelles and DOX release which was triggered by the slightly acidic media in tumor cells

1 实验部分

1.1 原料与试剂

聚乙二醇单甲醚 (mPEG, $M_n=5.0 \times 10^3$)、 ϵ -己内酯(ϵ -CL, 99%)、苾(97%)、盐酸阿霉素(DOX·HCl, 98%)、二环己基碳二亚胺(DCC)(99%)、4-二甲氨基吡啶(99%)、异辛酸亚锡(95%): 分析纯, 购于Aladdin 公司; 1,1,1-三(羟甲基)乙烷(TME, 97%)、4-羧基苯硼酸(PBA)(98%): 分析纯, 购于北京百灵威科技有限公司; 其他常用试剂均为分析纯, 购于天津市化学试剂二厂。B16F10 鼠源黑色素瘤细胞: 中国医学科学院药物研究所; 2-(2-甲氧基-4-硝基苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2,4-二磺酸苯)-2H-四唑单钠盐(CCK-8)试剂盒、二苯甲亚胺, 三氯化氢 2-(4-乙基苯基)-5-(4-甲基-1-哌嗪基)-2,5-二-1H-苯并咪唑(Hoechst 33342)(95%): 购于北京索莱宝科技有限公司; 5-乙炔基-20-脱氧尿苷(EdU)细胞增殖检测试剂盒: 购于广州市锐博生物科技有限公司。达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM 培养基)、胎牛血清(FBS): 购于Sigma-Aldrichdmem 公司。

1.2 两亲性聚合物的合成

将mPEG(0.50 g, 0.10 mmol)和PBA(0.09 g, 0.54 mmol)溶于二氯甲烷(DCM)和四氢呋喃(THF)(体积比50:50)混合液中。然后加入4-二甲氨基吡啶(0.025 g, 0.2 mmol), 使用冰-盐浴冷却至0℃。滴加已制备好的二环己基碳二亚胺(0.21 g, 0.10 mmol)的DCM溶液5 mL, 在30 min内滴加完毕。反应继续在

室温下持续48 h后, 滤出二环己基脲(DCU), 浓缩反应液并用石油醚、乙酸乙酯沉淀, 重复操作3次后真空干燥至恒重, 即得白色固体mPEG-PBA。

称取mPEG-PBA(0.66 g, 0.13 mmol), 1,1,1-三(羟甲基)乙烷(TME)(0.08 g, 0.67 mmol)及120 mL无水甲苯置于Dean-Stark除水装置中, 在120 °C回流加热10 h。将冷却至室温后的浓缩反应液加入到冰乙醚中, 过滤、洗涤数次后真空干燥得到白色粉末mPEG-PBE-OH。

称取mPEG-PBE-OH (0.23 g, 0.04 mmol), ϵ -CL (0.26 g, 2.3 mmol), 异辛酸亚锡(20 mg, 0.05 mmol)置于Schlenk瓶中, 溶于5 mL甲苯中, 抽真空充氮气循环3~4次, 于110 °C搅拌反应24 h后冷却至室温, 用冰甲醇沉淀、过滤、真空干燥得到淡黄色固体mPEG-PBE-PCL。合成路线如图2所示:

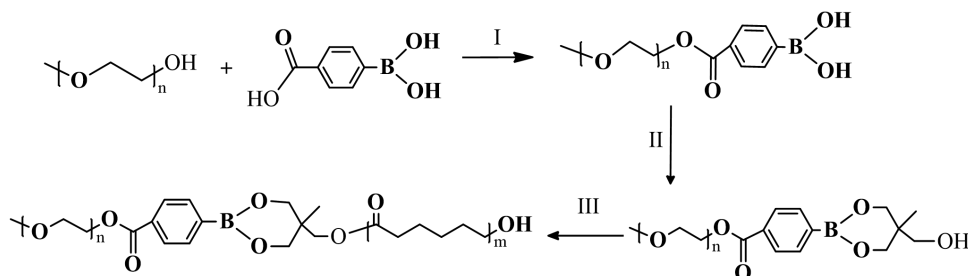


图2 mPEG-PBE-PCL嵌段聚合物的合成路线

Fig.2 Synthesis route of mPEG-PBE-PCL block polymer

1.3 测试与表征

1.3.1 样品表征 采用美国Agilent公司DD2 600 MHz 型核磁共振波谱仪测定聚合物的核磁共振氢谱, 溶剂为 CDCl_3 , 测试温度为室温; 采用美国RFS100/S 型的傅里叶红外光谱仪测定聚合物的红外吸收曲线, 溴化钾压片法。采用美国Alliance GPCV 2000型凝胶渗透色谱仪(GPC)测定聚合物的数均分子量及其分布。流动相为THF, 流速1 mL/min, 以单分散的聚苯乙烯为标样。

1.3.2 聚合物胶束的制备及形态测试 将10 mg聚合物加入到1 mL 丙酮中, 超声至溶解, 在磁力搅拌作用下以每15 s滴加1滴的速率缓慢加入10 mL蒸馏水中, 室温搅拌下直至丙酮挥发完, 形成具有淡蓝色乳光的液体, 即制得聚合物的空白胶束溶液。采用英国 Malvern Ltd Nano-ZS90型动态光散射纳米粒度仪(DLS)测量聚合物胶束的粒径及粒径分布。另取少量透析得到的聚合物胶束滴在铜网上, 待溶液挥发完全后, 置于美国Tecnai G2 F20 JEM-2100F型透射电镜(TEM)下观察其形貌。

1.3.3 临界胶束浓度(CMC)的测定 将1 mL浓度为 6×10^{-6} mol/L 芘的丙酮溶液加入到 10 mL容量瓶中, 黑暗放置24 h使丙酮完全蒸发。将不同浓度的聚合物溶液加入到容量瓶中使芘的浓度均为 6×10^{-7} mol/L, 超声30 min, 然后将溶液在黑暗条件下放置24 h。利用上海棱光F97Pro型荧光分光光度计以373 nm为发射波长, 在300~350 nm扫描样品溶液的激发光谱(狭缝宽10 nm), 将芘激发光谱的强度 I_{339}/I_{336} 比值与聚合物质量浓度对数作图。

1.3.4 聚合物胶束 pH 敏感性的考察 将聚合物胶束溶液分别加入到等量的pH为7.4的磷酸缓冲液(0.01 mol/L)、pH为5.0的醋酸盐缓冲液(0.01 mol/L)中。然后在恒温震荡器中孵育一定时间(4 h、12 h、24 h)后(37 °C, 100 r/min) 用DLS测定聚合物胶束的粒径。

1.3.5 载药胶束体外药物释放 将10 mg聚合物mPEG-PBE-PCL和4 mg DOX·HCl溶于2 mL N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中, 超声至溶解, 然后以每15 s滴加1滴的速率缓慢滴加到10 mL pH为7.4的磷酸盐缓冲溶

液 (0.01 mol/L), 室温下搅拌24 h。将载药胶束溶液转移至截留分子量为3000的透析袋中, 并且在去离子水透析24 h, 去除游离DOX和盐 (透析介质改变5次), 测量透析后液体的准确体积, 用日本岛津公司SolidSpec-3700/3700DUV型紫外可见分光光度计(UV/Vis)检测其在485 nm处的吸光度, 并带入标准曲线方程中计算负载DOX的质量。包封率 (DLE, wt%) 和载药量 (DLC, wt%) 的计算公式如下:

$$DLE = \frac{m_{(\text{loaded DOX})}}{m_{(\text{original DOX})}} \times 100\% \quad (1)$$

$$DLC = \frac{m_{(\text{loaded DOX})}}{m_{(\text{micelles})}} \times 100\% \quad (2)$$

其中, $m_{(\text{loaded DOX})}$ 为负载到药物中的DOX的质量, $m_{(\text{original DOX})}$ 为投入DOX的总质量, $m_{(\text{micelles})}$ 为载药胶束的质量。

将载药胶束溶于5 mL pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液(1 mg/mL)中, 置于截留分子量为3000的透析袋后, 将其分别置于100 mL pH 7.4 (0.01 mol/L) 磷酸盐的缓冲溶液和pH 5.0 (0.01 mol/L) 的醋酸盐缓冲溶液中透析。在预定的时间间隔, 取出外部缓冲液并用相同体积的新鲜缓冲液替换。最后通过标准曲线法, 利用UV/Vis在485 nm条件下测试释放的DOX量。

1.4 细胞内吞及药物释放

将B16F10细胞在每孔 5×10^4 个细胞的24孔板中37 °C下培养24 h。去除培养基后, 分别加入DOX·HCl, DOX@mPEG-PBA-PCL胶束 (等效DOX·HCl质量浓度: 25 µg/mL) 将细胞分别培养4 h和12 h后, 用PBS (pH 7.4) 洗涤3次, 并用Hoechst 33342 (10 µg/mL) 处理30 min, PBS洗涤3次。然后, 将细胞在室温下每孔用2 mL多聚甲醛($\omega = 4\%$)固定15 min, 用PBS洗涤细胞, 并在相同条件下用德国LEICA TCS SP2型共焦显微镜观察并拍照记录。

1.5 体外细胞毒性

采用B16F10细胞, 通过2-(2-甲氧基-4-硝基苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2,4-二磺酸苯)-2H-四唑单钠盐 (CCK-8) 研究空载体、DOX·HCl及DOX@mPEG-PBE-PCL胶束的细胞毒性。在100 µL含有体积分数为15% 胎牛血清 (FBS) 的达尔伯克改良伊格尔培养基 (DMEM培养基) 中, 将细胞接种在96孔板 (每孔 5×10^3 个细胞) 中, 并保持37 °C且体积分数为5% 的CO₂潮湿气氛中培养24 h。除去培养基并用180 µL含有体积分数为10% FBS的新鲜DMEM培养基补充, 并将20 µL的空载体 (0.5, 1, 2.5, 5, 10 mg/mL)、DOX·HCl和DOX@mPEG-PBE-PCL (DOX质量浓度为0.5, 1, 5, 50, 100 µg/mL) 分别加入到不同孔中并孵育48 h。然后, 每孔加入10 µL的CCK-8试剂, 并将细胞进一步孵育2 h, 使用美国BioRad X-mark型酶标仪在450 nm处测量光密度 (OD) 作为吸光度。所有实验重复3次, 按照以下公式计算细胞存活率:

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{(\text{OD}_{450\text{sample}} - \text{OD}_{450\text{blank}})}{(\text{OD}_{450\text{control}} - \text{OD}_{450\text{blank}})} \times 100\% \quad (3)$$

1.6 细胞增殖检测

取对数生长期B16F10细胞以每孔 5×10^3 个细胞接种在96孔板中并孵育24 h (37 °C, 体积分数5% CO₂)。除去培养基并用180 µL含有体积分数为10% FBS的新鲜DMEM培养基补充, 并分别加入20 µL负载DOX质量浓度为0.5、1、5 µg/mL的DOX@mPEG-PBA-PCL/胶束溶液。将细胞孵育48 h, 按照5-乙炔基-20-脱氧尿苷 (EdU) 细胞增殖检测试剂盒说明书方法用EdU孵育2 h, 多聚甲醛($\omega = 4\%$)固定30 min, 用Apollo488染细胞,

并用Hoechst 33342处理15 min, 在相同条件下用日本 OLYMPUS IX71 型倒置荧光显微镜观察拍照, 使用 Image J软件将同一视野的照片进行叠加。

2 结果与讨论

2.1 聚合物的结构表征

从图(3a) mPEG-PBA 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱中可以看到, 3.37 处的质子峰归属于 mPEG 的甲基氢吸收峰, 3.64 处的质子宽峰归属于 mPEG 上亚甲基氢的吸收峰, 6.5~8.0 处的质子峰归属于苯环上氢的吸收峰。其积分面积比为 3: 492: 2: 2, 与理论值吻合, 说明酯化程度完全。mPEG-PBE-OH 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱中 3.18 处的亚甲基吸收峰与苯环上氢的吸收峰积分面积比为 1: 1, 说明硼酸酯化程度完全。从 mPEG-PBE-PCL 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱中可以看到, 1.37、1.64、2.29 和 4.05 处的质子宽峰为 PCL 亚甲基氢的吸收峰, 且相应的峰面积比为 2: 4: 2: 2, 表明以 mPEG-PBE-OH 引发 $\epsilon\text{-CL}$ 开环成功合成了聚合物 mPEG-PBE-PCL。此外, 通过 mPEG 的亚甲基吸收峰与 PCL 亚甲基吸收峰的积分面积可推算出聚合物中 PCL 聚合度为 45, 数均分子量 ($M_{n,\text{NMR}}$) 为 1.02×10^4 。GPC 测得聚合物 mPEG-PBE-PCL 的数均分子量 ($M_{n,\text{GPC}}$) 为 8.6×10^3 , 分子量分布系数 (M_w/M_n) 为 1.29。

从图(3b) mPEG-PBA 的红外光谱可以看出 1 466、1 540、1 640 cm^{-1} 处为苯环骨架振动吸收峰, 3 024 cm^{-1} 处为 $=\text{C-H}$ 伸缩吸收峰, 2 884 cm^{-1} 处为 PEG 的 C-H 伸缩振动峰、1 109 cm^{-1} 处为 C-O-C 的伸缩振动峰^[35], 说明已将 PBA 官能团成功引入到 mPEG 大分子链上。从 mPEG-PBE-OH 红外谱图可以看出 3 340 cm^{-1} 处的吸收带为羟基上 O-H 键的特征吸收峰, 归属于末端为羟基的聚乙二醇大分子。从 mPEG-PBE-PCL 红外谱图可以看出, 除了 2 800~3 000 cm^{-1} 处的 C-H 伸缩振动峰外, 1 730 cm^{-1} 处出现聚己内脂羰基特征吸收峰。综上, 进一步说明成功合成了 mPEG-PBA-PCL。

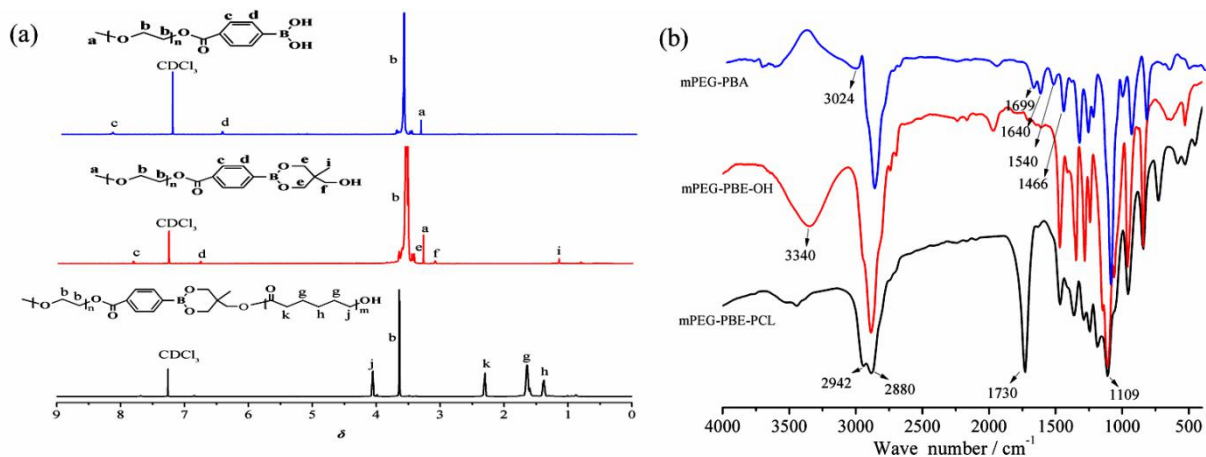


图3 样品的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图 (a) 和红外光谱图(b)

Fig.3 $^1\text{H-NMR}$ (a) and FT-IR (b) spectra of samples

2.2 聚合物纳米粒子粒径、形貌及CMC分析

图4为 mPEG-PBE-PCL 胶束的 TEM 形貌图(图 4(a))和粒径分布图 4(b), 可以看出胶束呈球形, 粒径大约为 127 nm。由于肿瘤脉管系统的快速发展导致异常血管生成, 与正常组织中的血管相比, 肿瘤血管具有不连续的内皮, 其具有许多孔 (尺寸从 200 nm 至 2 μm , 平均孔径 ≥ 400 nm) ^[15,16], 因此纳米胶束可以通过 EPR 效应在肿瘤部位富集。

如图 4(c)所示为芘激发光谱的强度 I_{339}/I_{336} 比值与聚合物质量浓度对数作图的结果。图中两条直线的交点为 CMC, mPEG-PBE-PCL 的 CMC 为 4.79×10^{-4} mg/mL。结果表明聚合物即使在体内高度稀释的条件下, 也很容易形成胶束。

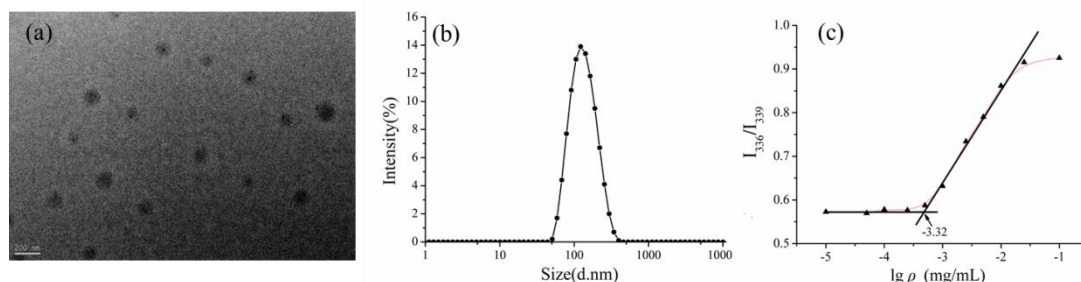


图 4.由 mPEG-PBE-PCL 胶束的 TEM 图像 (a) 和粒径分布 (b); mPEG-PBE-PCL 的芘激发光谱的强度比 I_{339}/I_{336} 与 $\lg \rho$ 的函数图 (c)

Fig 4. TEM images (a) and The particle size (b) of mPEG-PBE-PCL micelles; Plot of the intensity ratio I_{339}/I_{336} from pyrene excitation spectra of mPEG-PBE-PCL as a function of $\lg \rho$ (c).

2.3 聚合物纳米胶束的 pH 响应性

mPEG-PBE-PCL 胶束对 pH 的响应的 DLS 分析结果见图 5(a), mPEG-PBE-PCL 胶束在 pH 5.0 下 8 h 内平均直径从 127 nm 膨胀至约 670 nm, 在 24 h 内膨胀至 900 nm 以上。相比之下, 在 pH 7.4 下 24 h 内未观察到胶束尺寸明显发生变化。胶束在弱酸性 (pH 5.0) 的条件下粒径随时间迅速增大可能是由于聚合物中 pH 敏感的硼酯键逐渐断裂, mPEG-PBA 从组装胶束外围分离而导致疏水性 PCL 链段聚集^[36]。由此可见: 制备的胶束在生理条件 (pH 7.4) 下稳定, 而在肿瘤细胞内弱酸性^[30-32]环境下呈现出 pH 响应性, 适合作为肿瘤细胞内 pH 响应的纳米药物载体。

2.4 载药胶束体外释放性能

如图 5(b) 所示, DOX@mPEG-PBE-PCL 呈现出 pH 依赖性释放行为: DOX 释放在 pH 7.4 的溶液释放缓慢但在 pH 5.0 溶液中释放显著加速, 药物释放 48 h 后, 在 pH 7.4 溶液中负载 DOX 的 DOX@mPEG-PBE-PCL 的总 DOX 释放量只有约 20%, 而在 pH 5.0 的溶液中, 负载 DOX 的 DOX@mPEG-PBE-PCL 在最初 8 h 内显示出快速释放, DOX 释放量已达到 47% 左右, 48 h 后总 DOX 释放量达到 83.4%。以上分析表明: 负载 DOX 的 DOX@mPEG-PBE-PCL 在血液中循环 (pH 值为 7.4) 中, 可以降低药物的泄漏, 但纳米胶束被肿瘤细胞内吞并进入酸性内体/溶酶体 (pH 4.5-6.5) 将解体, 可实现药物的有效释放。

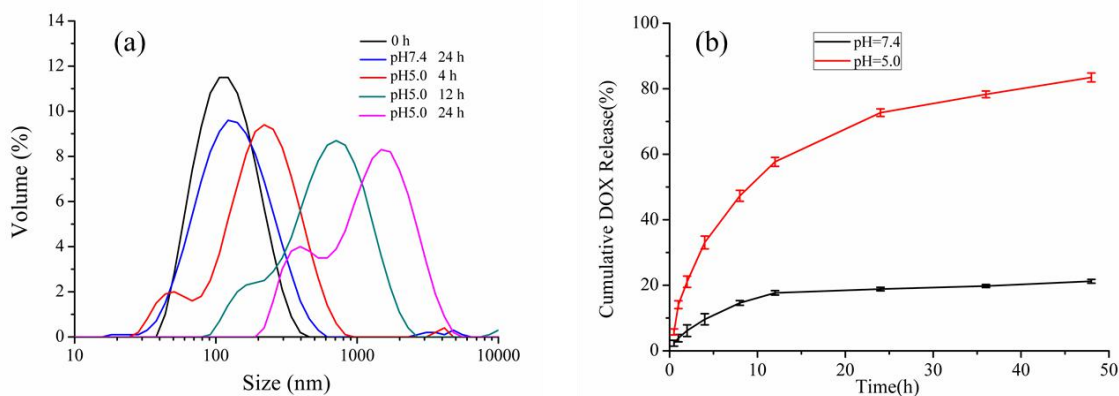


图 5 mPEG-PBE-PCL 胶束粒径分布 (a); DOX@mPEG-PBE-PCL 胶束的体外释放曲线 (b)

Fig.5 Size distribution of mPEG-PBE-PCL micelles (a); In vitro release profile of DOX@mPEG-PBE-PCL (b)

2.5 细胞胞吞与响应性能

如图6所示为DOX和DOX@mPEG-PBA-PCL胶束分别与B16F10细胞孵育4 h和12 h的CLSM图像。培养4 h后,在DOX@mPEG-PBE-PCL组B16F10细胞的细胞核中观察到明显的DOX的荧光,与DOX•HCl组相比荧光强度略弱,可能是因为DOX可以通过直接扩散容易进入细胞,而对于DOX@mPEG-PBE-PCL胶束是通过内吞进入细胞内,并在细胞酸性内体/溶酶体胶束解体,释放出DOX是一个耗时的过程^[32,37]。随着培养时间的增长,12 h后细胞核中观察到DOX的荧光明显增强,这是由于载药胶束被包裹的DOX释放量增大,并穿透内体/溶酶体膜并转移至细胞核,导致B16F10细胞核中的DOX浓度更大。结果表明:mPEG-PBE-PCL纳米胶束能够包裹DOX并且在肿瘤细胞弱酸性环境中释放,将DOX有效递送至细胞核。

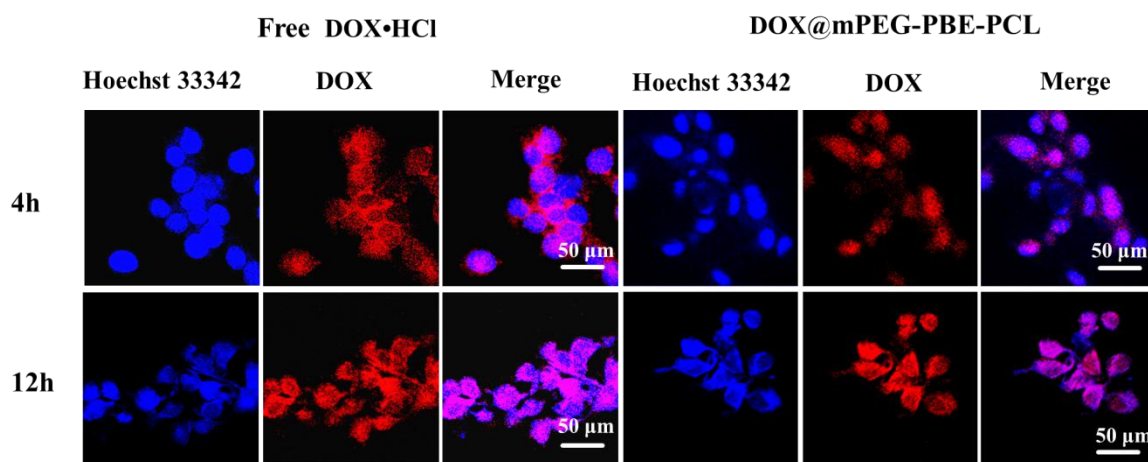


图6 样品的B16F10细胞CLSM图像

Fig.6 CLSM images of B16F10 cells of Samples

2.6 细胞毒性

mPEG-PBE-TME对B16F10细胞的体外细胞毒性分析结果如图7(a)所示,空白胶束在B16F10细胞中表现出较低的细胞毒性,即使在最高质量浓度(1.0 mg/mL)时共同孵育48 h后细胞活力也在93%左右,结果说明聚合物胶束基本无毒,具有良好的生物相容性,可以作为安全的纳米药物载体材料。

游离DOX与DOX@mPEG-PBE-PCL胶束的细胞毒性如图7(b)所示,两组样品对B16F10细胞的增殖抑制效果呈现明显的药物浓度依赖性。孵育48 h后,在低的质量浓度范围(0.05 $\mu\text{g/mL}$)下对细胞增殖没有显著的影响,但当DOX质量浓度超过1 $\mu\text{g/mL}$ 时,胶束中的DOX可以剂量依赖的方式有效降低B16F10细胞的存活率。游离DOX和DOX@mPEG-PBE-PCL胶束对B16F10细胞产生50%细胞死亡的抑制质量浓度(IC_{50})值分别为0.87 $\mu\text{g/mL}$ 和1.15 $\mu\text{g/mL}$,DOX@mPEG-PBE-PCL胶束的细胞活性与游离DOX值接近。

EdU是一种胸腺嘧啶核苷类似物,在细胞增殖时期代替胸腺嘧啶(T)渗入正在复制的DNA分子中,EdU上的乙炔基与Apollo488荧光标记的叠氮化物来检测细胞DNA复制活性^[38,39]。EdU测定显示图(c,d,e):DOX@mPEG-PBE-PCL胶束溶液与B16F10细胞孵育48 h后,在低质量浓度0.05 $\mu\text{g/mL}$ (图7c)和0.1 $\mu\text{g/mL}$ (图7d)共同孵育48 h后,药物抑制细胞增殖并不明显,但随着质量浓度的增加(0.5 $\mu\text{g/mL}$)增殖细胞显著下降(图7e),药物抑制了细胞的增殖。EdU测试结果与CCK-8毒性试验结果一致,表明DOX@mPEG-PBE-PCL在细胞酸性环境释放出DOX,并进入细胞核抑制细胞增殖。

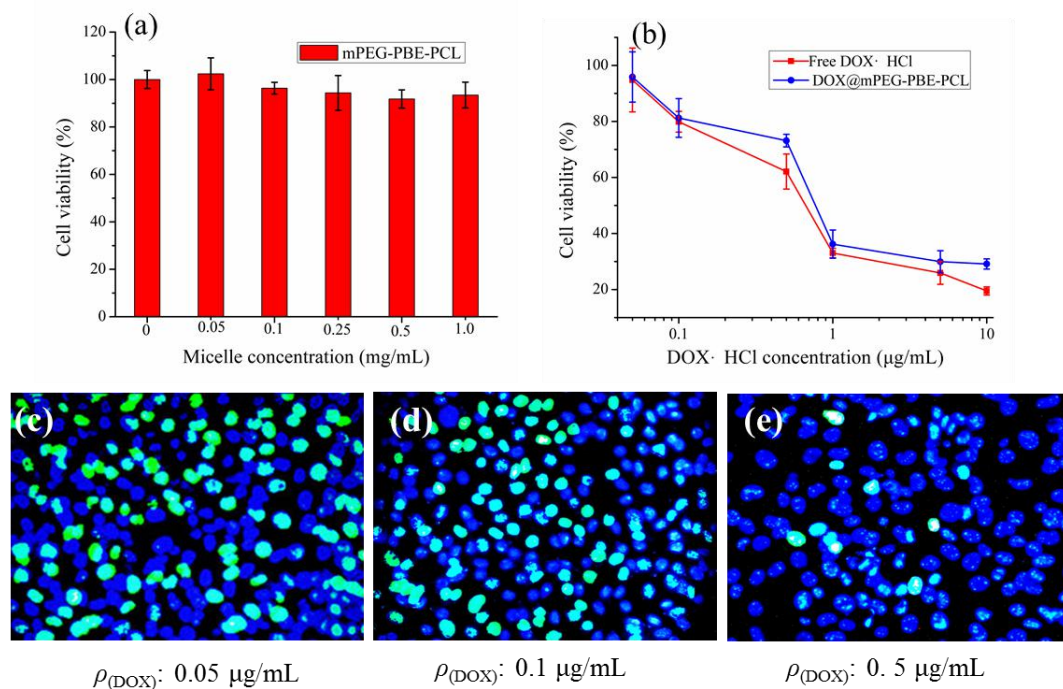


图7 mPEG-PBE-PCL与B16F10共同孵育48 h的细胞毒性(a); 游离DOX和DOX@mPEG-PBE-PCL胶束与B16F10共同孵育48 h的抗肿瘤活性(b); EdU试验检测 DOX@mPEG-PBE-PCL 胶束对B16F10细胞共同孵育48 h增殖影响(c,d,e), (蓝色为Hoechst33342, 绿色为EdU)

Fig.7 Cytotoxicity of mPEG-PBE-PCL incubated with B16F10 cells for 48 h (a); Anti-tumor activity of free DOX and DOX@mPEG-PBE-PCL micelles incubated with B16F10 cells for 48 h (b); The effect of DOX@mPEG-PBE-PCL micelles on the proliferation of B16F10 cells detected by EdU assay for 48 h (c,d,e). (The blue was Hoechst 33342, and green was EdU).

3 结论

(1) 合成了嵌段聚合物mPEG-PBE-PCL, 该聚合物在水中自组装为球形胶束并对DOX呈现出良好的负载能力, 载药量高达23.4%、封装率为58.4%。

(2) DOX@mPEG-PBE-PCL具有良好的pH响应性, 在人体血液环境中结构稳定, 药物累积释放量约20%, 可有效降低DOX的全身毒性; 而在肿瘤内体/溶酶体 (pH 5.0) 微环境中可快速释放, 药物累积释放量达80%以上。

(3) DOX@mPEG-PBE-PCL具有较好的生物相容性, 对鼠源黑色素瘤B16F10细胞具有和游离的DOX·HCl相近的抗肿瘤活性。

(4) mPEG-PBE-PCL自组装纳米胶束可以作为一种新型的肿瘤细胞内pH响应性抗肿瘤药物载体。

参考文献:

- [1] ZHAO D, XU J Q, YI X Q, *et al.* pH-activated targeting drug delivery system based on the selective binding of phenylboronic acid [J]. ACS applied materials & interfaces, 2016, 8(23): 14845-14854.
- [2] BURGESS D J, DOLES J, ZENDER L, *et al.* Topoisomerase levels determine chemotherapy response in vitro and in vivo [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008, 105(26): 9053-9058.
- [3] WANG J, XU W, LI S, *et al.* Polylactide-cholesterol stereocomplex micelle encapsulating chemotherapeutic agent for improved antitumor efficacy and safety [J]. journal of Biomedical Nanotechnology, 2018, 14(12): 2102-2113.
- [4] MENG F, ZHONG Y, CHENG R, *et al.* pH-sensitive polymeric nanoparticles for tumor-targeting doxorubicin delivery: concept and recent advances [J]. Nanomedicine, 2014, 9(3): 487-499.
- [5] 王曦阳, 王灏, 郭和泽, 等. 兼具 MRI 显影增强及 pH 敏感释药性能的载药 Fe_3O_4 纳米颗粒[J]. 功能高分子学报, 2016, 29(2): 193-199.
- [6] PRABHAKAR U, MAEDA H, JAIN R K, *et al.* Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention effect for nanomedicine drug delivery in oncology [J]. Cancer Research, 2013, 73(8): 2412-2417.
- [7] HAAG R, KRATZ F. Polymer therapeutics: concepts and applications [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2006, 45(8): 1198-1215.
- [8] LIU J, HUANG Y, KUMAR A, *et al.* pH-sensitive nano-systems for drug delivery in cancer therapy [J]. Biotechnology Advances, 2014, 32(4): 693-710.
- [9] XU W, DING J, CHEN X. Reduction-responsive polypeptide micelles for intracellular delivery of antineoplastic agent[J]. Biomacromolecules, 2017, 18(10): 3291-3301.
- [10] HE X, DING M, LI J, *et al.* Biodegradable multiblock polyurethane micelles with tunable reduction-sensitivity for on-demand intracellular drug delivery [J]. Rsc Advances, 2014, 4(47): 24736-24746.
- [11] MANNA U, PATIC S. Glucose-triggered drug delivery from borate mediated layer-by-layer self-assembly [J]. ACS applied materials & interfaces, 2010, 2(5): 1521-1527.
- [12] KANNAGI R, SAKUMA K, MIYAZAKI K, *et al.* Altered expression of glycan genes in cancers induced by epigenetic silencing and tumor hypoxia: Clues in the ongoing search for new tumor markers [J]. Cancer Science, 2010, 101(3): 586-593.
- [13] DOHI T, HASHIGUCHI M, YAMAMOTO S, *et al.* Fucosyltransferase - producing sialyl Lea and sialyl Lex carbohydrate antigen in benign and malignant gastrointestinal mucosa [J]. Cancer, 2015, 73(6):1552-1561.
- [14] ULBRICH K, HOLA K, ŠUBR V, *et al.* Targeted drug delivery with polymers and magnetic nanoparticles: covalent and noncovalent approaches, release control, and clinical studies [J]. Chemical Reviews, 2016, 116(9):5338-5431.
- [15] MACEWAN S R, CALLAHAN D J, CHILKOTI A. Stimulus-responsive macromolecules and nanoparticles for cancer drug delivery [J]. Nanomedicine, 2010, 5(5): 793-806.
- [16] TORCHILIN V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect [J]. Advanced drug delivery reviews, 2011, 63(3): 131-135.
- [17] ANZAI J. Recent progress in electrochemical biosensors based on phenylboronic acid and derivatives [J]. Materials Science and Engineering: C, 2016, 67 (2016): 737-746.
- [18] YAO Y, ZHAO L, YANG J, *et al.* Glucose-responsive vehicles containing phenylborate ester for controlled insulin release at neutral pH [J]. Biomacromolecules, 2012, 13(6): 1837-1844.
- [19] ZHANG C, LOSEGO M D, BRAUN P V. Hydrogel-based glucose sensors: Effects of phenylboronic acid chemical structure on response [J]. Chemistry of Materials, 2013, 25(15): 3239-3250.
- [20] HWANG S J, FERNANDEZ C, AMOUREUX J P, *et al.* Structural study of $x \text{Na}_2\text{S}^{+}_{(1-x)} \text{B}_2\text{S}_3$ glasses and polycrystals by multiple-quantum MAS NMR of ^{11}B and ^{23}Na [J]. Journal of the American Chemical Society, 1998, 120(29): 7337-7346.
- [21] MATSUMOTO A, IKEDA S, HARADA A, *et al.* Glucose-responsive polymer bearing a novel phenylborate derivative as a glucose-sensing moiety operating at physiological pH conditions [J]. Biomacromolecules, 2003, 4(5): 1410-1416.

- [22] MULLA H R, AGARD N J, BASU A. 3-Methoxycarbonyl-5-nitrophenyl boronic acid: High affinity diol recognition at neutral Ph [J]. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 2004, 14(1): 25-27.
- [23] MATSUMOTO A, ISHII T, NISHIDA J, *et al.* A synthetic approach toward a self - regulated insulin delivery system [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2012, 51(9): 2124-2128.
- [24] KIM K T, CORNELISSEN J J L M, NOLTE R J M, *et al.* Polymeric monosaccharide receptors responsive at neutral pH [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(39): 13908-13909.
- [25] ZHAO L, HUANG Q, LIU Y, *et al.* Boronic acid as glucose-sensitive agent regulates drug delivery for diabetes treatment [J]. *Materials*, 2017, 10(2): 170-184.
- [26] BROOKS W L A, SUMERLIN B S. Synthesis and applications of boronic acid-containing polymers: From materials to medicine [J]. *Chemical Reviews*, 2015, 116(3): 1375-1397.
- [27] LIU H, LI Y, SUN K, *et al.* Dual-responsive surfaces modified with phenylboronic acid-containing polymer brush to reversibly capture and release cancer cells [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(20): 7603-7609.
- [28] CHEN J, DING J, ZHANG Y, *et al.* Polyion complex micelles with gradient pH-sensitivity for adjustable intracellular drug delivery[J]. *Polymer Chemistry*, 2015, 6(3): 397-405.
- [29] WANG M, LIU T, HAN L, *et al.* Functionalized O-carboxymethyl-chitosan/polyethylenimine based novel dual pH-responsive nanocarriers for controlled co-delivery of DOX and genes [J]. *Polymer Chemistry*, 2015, 6(17): 3324-3335.
- [30] ARNOLD A E, CZUPIEL P, SHOICHET M. Engineered polymeric nanoparticles to guide the cellular internalization and trafficking of small interfering ribonucleic acids[J]. *Journal of Controlled Release*, 2017, 259(8): 3-15.
- [31] CASEY J R, GRINSTEIN S, ORLOWSKI J. Sensors and regulators of intracellular pH [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2010, 11(1): 50-61.
- [32] KIM J S, CHOI D K, SHIN J Y, *et al.* Endosomal acidic pH-induced conformational changes of a cytosol-penetrating antibody mediate endosomal escape [J]. *Journal of Controlled Release*, 2016, 235(8): 165-175.
- [33] Park K. To PEGylate or not to PEGylate, that is not the question [J]. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 2010, 142(2): 147-148.
- [34] WU H, ZHU L, TORCHILIN V P. pH-sensitive poly (histidine)-PEG/DSPE-PEG co-polymer micelles for cytosolic drug delivery [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(4): 1213-1222.
- [35] IBUSUKI S, FUJII Y, IWAMOTO Y, *et al.* Tissue-engineered cartilage using an injectable and in situ gelable thermoresponsive gelatin: Fabrication and in vitro performance [J]. *Tissue Engineering*, 2003, 9(2): 371-384.
- [36] JIA H, ZHU J, WANG X, *et al.* A boronate-linked linear-hyperbranched polymeric nanovehicle for pH-dependent tumor-targeted drug delivery [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(19): 5240-5249.
- [37] ZhU Y, ZhANG J, MENG F, *et al.* cRGD-functionalized reduction-sensitive shell-sheddable biodegradable micelles mediate enhanced doxorubicin delivery to human glioma xenografts *in vivo* [J]. *Journal of Controlled Release*, 2016, 233(7): 29-38.
- [38] SALIC A, MITCHISON T J. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(7):2415-2420.
- [39] YAMAKOSHI H, DODO K, OKADA M, *et al.* Imaging of EdU, an Alkyne-Tagged cell proliferation probe, by Raman microscopy[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133(16):6102-6105.