

细胞内氧化还原响应型肝靶向嵌段聚合物的合成及纳米自组装性能

赵军强, 闫彩霞, 陈泽, 杨宁, 冯霞, 赵义平, 陈莉

(天津工业大学材料科学与工程学院, 分离膜与膜过程国家重点实验室, 天津 300387)

摘要 通过两步可逆加成-断裂链转移自由基聚合(RAFT)和缩醛脱保护反应合成了一种亲水段含半乳糖侧基和疏水段含吡啶环二硫键侧基的两亲性嵌段聚合物 PMAI_gGP-b-PPDSMA (PMgPP), 用核磁共振氢谱(¹H NMR)和凝胶渗透色谱(GPC)分析验证了目标产物的化学结构. 利用纳米沉淀技术和巯基氧化自交联反应制备内核二硫键交联的PMgPP纳米粒(PMgPP-CC NPs). 动态光散射(DLS)和透射电子显微镜(TEM)测定结果表明, PMgPP-CC NPs 粒径较小(<30 nm), 且粒径分布较窄. 在谷胱甘肽(GSH)还原环境下, PMgPP-CC NPs 粒径不断增大, 发生解组装. 以阿霉素(DOX)为模型药物制备了PMgPP-CC/DOX NPs, 载药量可达12.5%, 对应包封率为83.3%, 其粒径与空白PMgPP-CC NPs 粒径大小相近, 且粒径分布均匀. 体外药物释放实验表明, PMgPP-CC/DOX NPs 在体液条件下46 h释放了4.47%的DOX, 而在10 mmol/L GSH条件下累积释放量达到了50.6%. 细胞胞吞实验进一步验证了PMgPP-CC/DOX NPs 可高效入胞并在胞内快速释放DOX. 体外细胞毒性(MTT)实验表明, PMgPP-CC/DOX NPs 对肝癌HepG-2细胞表现出良好的增殖抑制活性. 因此, 多功能PMgPP-CC NPs 在实现肝靶向纳米精准给药上呈现出良好的应用前景.

关键词 半乳糖; 氧化还原敏感; 核交联嵌段聚合物; 可逆加成-断裂链转移自由基聚合(RAFT); 药物递送
中图分类号 O631; TQ463 **文献标志码** A

刺激响应性纳米药物递送系统是解决传统肿瘤化疗药物临床应用的最具前景的技术手段之一, 在提高抗癌药物溶解性、有效性和安全性等方面具有优势^[1-4]. 刺激响应性纳米药物递送系统可通过响应肿瘤细胞内的独特微环境: 内涵体和溶酶体的弱酸性(pH=4.5~6.5)、高浓度还原性物质谷胱甘肽(GSH, 2~10 mmol/L)和高活性生物酶等, 实现胞内的药物可控快速释放, 提高了治疗效果^[5-8].

尽管如此, 刺激响应性药物递送系统在系统给药上仍需克服血液长循环稳定性、肿瘤组织高效富集及快速入胞等问题. 对纳米药物递送载体的壳或核进行交联常作为一种有效策略, 不仅可以提高纳米载体在血液循环过程中的稳定性, 而且可以减少药物提前释放, 降低毒副作用^[9,10]. 二硫键是一种常用的氧化还原型官能团, 常用于制备还原刺激响应型的纳米前药、壳或内核交联的刺激响应性纳米载体^[11-14]. 基于二硫键可逆交联的纳米药物除了可提高长循环稳定性之外, 还能响应肿瘤细胞内高浓度GSH刺激, 快速解组装, 实现药物胞内快速释放^[15]. 聚甲基丙烯酸2-(吡啶基-2-二硫烷基)乙酯(PPDSMA)因无毒、良好生物相容性和氧化还原响应性等优点, 广泛应用于氧化还原响应性纳米载体的构建^[16].

在纳米药物表面修饰主动靶向配体是提高刺激响应性纳米药物递送系统在肿瘤组织高效富集和快速入胞的有效策略. 通常使用的靶向配体包括半乳糖(GAL)、乳糖、叶酸、抗体或多肽等^[17,18]. 其中, 半乳糖残基或乙酰半乳糖胺残基与去唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)具有特异性识别能力, 常用于肝主动靶向的配体. GAL侧基亲水性好, 含有GAL基团的聚合物所组装的纳米载体具有良好生物相容性, 广泛用于既具有肝靶向基因又具有良好分散性纳米药物载体的构建^[19]. 曹阿民等^[20]利用可逆加成断

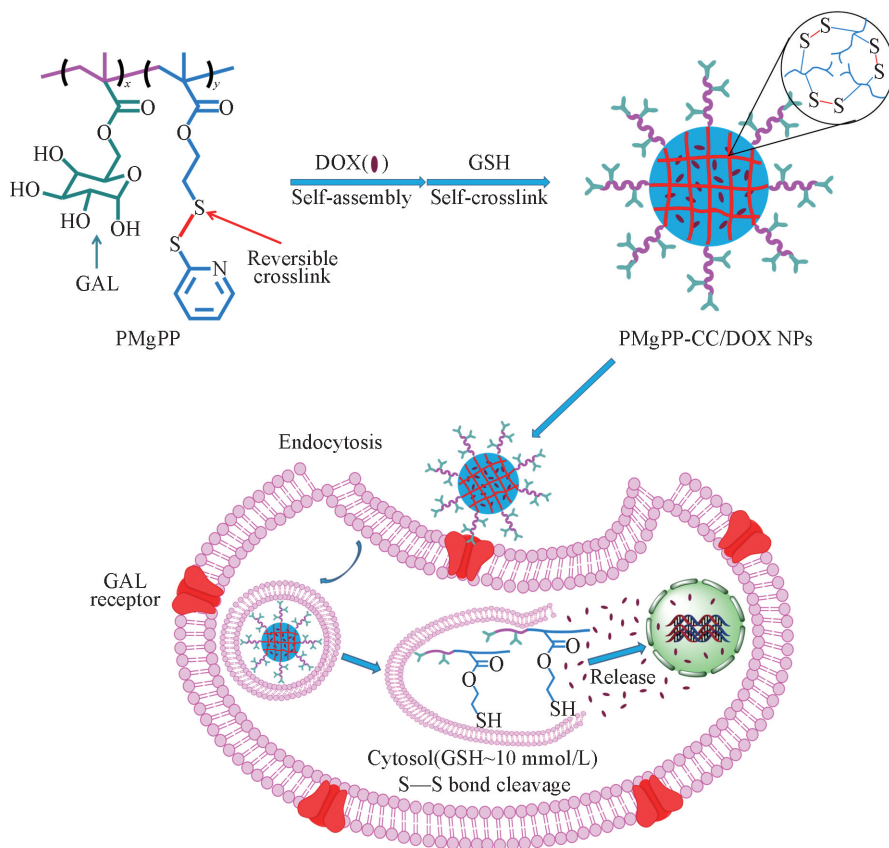
收稿日期: 2017-11-09. 网络出版日期: 2018-06-01.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 81502624 和 31200719)、天津市教委科研项目(批准号: 2017KJ071)和天津市应用基础与前沿技术研究计划面上项目(批准号: 15JCYBJC17900, 14JCTPJC00515)资助.

联系人简介: 赵军强, 男, 博士, 讲师, 主要从事刺激响应高分子方面的研究. E-mail: junqiangzhao@163.com

裂链转移自由基聚合(RAFT)方法制备了亲水段含 GAL 侧基、疏水段含有羧基和胆固醇侧基的两亲性嵌段聚合物,其纳米组装体对抗癌药物阿霉素(DOX)表现出高效的负载性能(包封率高达91.2%),并实现了肿瘤细胞 H1299 内的 pH 响应释放、载药纳米粒和等剂量裸药 DOX 对肿瘤细胞的增殖抑制活性基本一致.洪春雁等^[21]利用 GAL 的靶向性,制备了含 GAL 侧基的聚甲基丙烯酸二甲氨基乙酯型阳离子共聚物为亲水段,PPDSMA 为疏水段的两亲性嵌段共聚物,构建了基因药物共负载载体,以 GAL 靶向作用促进了 DOX 和基因的高效入胞,并响应细胞内 GSH 促进 DOX 释放.但上述纳米载体内核未交联,理论上缺乏长循环稳定性,而且对 DOX 的负载能力不佳(包封率为28.2%,载药量为7.2%).

本文以含有 GAL 基团的聚合物为亲水段,PPDSMA 为疏水段,制备了外壳含 GAL 侧基靶向配体和内核二硫键交联的氧化还原敏感型核交联纳米粒(CC NPs),利用已合成的含 GAL 的 6-*O*-甲基丙烯酸酰基-1,2,3,4-双-*O*-异亚丙基-*D*-比喃半乳糖(MAIPGP)和 2-(吡啶基-2-二硫烷基)甲基丙烯酸乙酯(PDSMA)为功能聚合单体,通过两步可逆加成-裂解链转移自由基聚合(RAFT)和酸诱导缩醛脱保护反应,制备两亲性嵌段聚合物 PMAIPGP-*b*-PPDSMA(PMgPP),并用核磁共振氢谱(¹H NMR)和凝胶渗透色谱(GPC)对 PMgPP 进行化学结构表征.以 DOX 为模型药物,通过纳米沉淀技术和巯基氧化自交联反应制备空白和载药 PMgPP-CC/DOX NPs(见 Scheme 1),测试载药性能.用纳米粒径电位分析仪(DLS)、透射电子显微镜(TEM)等对其粒径大小和分布进行测试,并在细胞水平上研究 PMgPP-CC/DOX NPs 的氧化还原响应性和在肝癌肿瘤细胞(HepG-2)内的药物控释行为,最后用体外细胞毒性(MTT)法考察了空白材料的生物相容性和 PMgPP-CC/DOX NPs 对 HepG-2 细胞的增殖抑制活性.



Scheme 1 Schematic illustration of PMgPP-CC/DOX NPs with intracellular redox-responsive properties for GAL-mediated targeted delivery of DOX

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

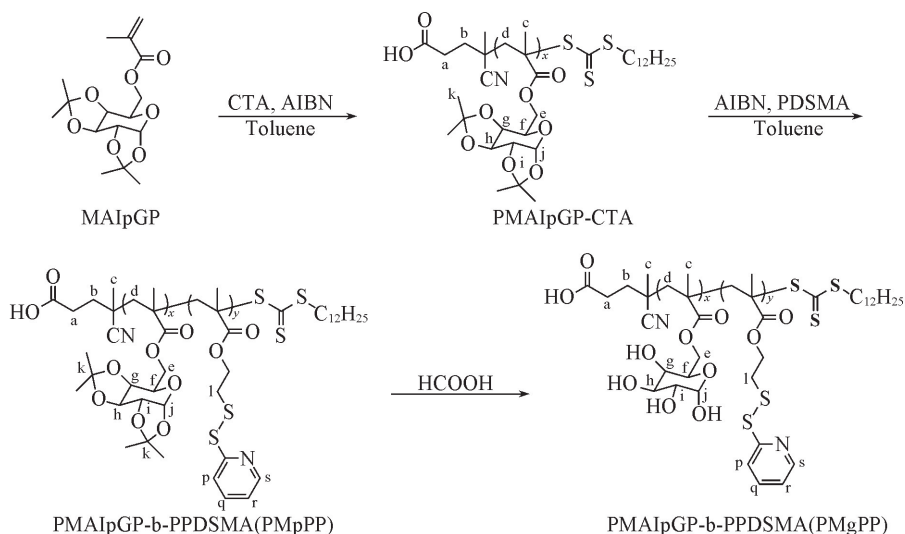
参照文献^[16]方法制备 PDSMA,参照文献^[21]方法制备 MAIPGP,并对其化学结构进行 ¹H NMR

测试; 参照文献[22]方法制备三硫代十二烷酰-2-氰基异丙酸酯(CTA); *D*-(+)-半乳糖(GAL, 纯度 95%)、甲基丙烯酰氯(纯度 95%)、2,2'-二硫二吡啶(纯度 98%)及谷胱甘肽(GSH, 纯度 97%), 天津希恩思生化科技有限公司; β -巯基乙醇(纯度 99%)、盐酸阿霉素(DOX · HCl, 纯度 98%)及 DMEM 培养基, 美国 Sigma-Aldrich 公司, DOX · HCl 经脱盐冻干之后得到疏水性的 DOX; 正己烷(纯度 98%)、乙酸乙酯(纯度 99%)、甲醇(纯度 99%)、冰醋酸(纯度 99%)、甲苯(纯度 99%)、甲酸(纯度 85%)、氢氧化钠(纯度 96%)及无水硫酸镁(纯度 99%), 天津风船化学试剂科技有限公司; 丙酮(纯度 98%)、三乙胺(Et₃N, 纯度 99%)、四氢呋喃(THF, 纯度 99%)及二氯甲烷(DCM, 纯度 99%), 天津科密欧化学试剂有限公司, 经常压蒸馏得到无水丙酮, Et₃N, THF 和 DCM; 无水乙醚(纯度 99%), 天津禹源科技试剂有限公司; 浓硫酸(H₂SO₄, 纯度 98%), 天津化学试剂一厂; 偶氮二异丁腈(AIBN, 纯度 99%), 上海四赫维化工有限公司, 经无水乙醇重结晶, 得到高纯度的 AIBN; 二甲基亚砜(DMSO, 纯度 99%), 天津科密欧化学试剂有限公司; 氯化钠(纯度 99%), 天津光复科技发展有限公司; 二甲基喹啉-二苯基溴化四唑(MTT, 纯度 98%)及胎牛血清(FBS, 纯度 99%), 美国 Amresco 公司; 肝癌 HepG-2 细胞取自中国医学科学院放射医学研究所。

Bruker 400 MHz 核磁共振氢谱分析仪(¹H NMR), 德国 Bruker 公司, 溶剂为氘代氯仿(CDCl₃)或氘代二甲基亚砜(DMSO-d₆); Waters 1515 型凝胶渗透色谱(GPC), 美国 Waters 公司, 色谱柱系统为 GPCmaxTM, 流动相为 THF, 流速为 1.0 mL/min, 采用 Model 3580 视差折光指数检测器, 聚苯乙烯为标准物; Brookhaven BI-200SM 型纳米动态光散射(DLS), 美国 Brookhaven 公司; TU-1901 型紫外-可见分光光度计(UV-Vis), 北京普析通用仪器有限责任公司; JEM-1011 型透射电子显微镜(TEM), 日本 JEOL 公司; Leica AF 6500 型共聚焦显微镜(CLSM), 德国 Leica 公司。

1.2 PMgPP 的合成

以 MAIpGP 为单体, CTA 为 RAFT 链转移剂, 通过 RAFT 聚合制备第一嵌段 PMAIpGP-CTA 聚合物; 然后以其为 RAFT 大分子链转移剂, PDSMA 为单体, 通过 RAFT 聚合制备两嵌段 PMAIpGP-b-PPDSMA(PMpPP)聚合物; 最后利用甲酸诱导缩醛脱保护反应制备两亲性嵌段聚合物 PMgPP; 合成路线如 Scheme 2 所示。



Scheme 2 Synthesis routes of PMgPP

1.2.1 大分子引发剂 PMAIpGP-CTA 的合成 在 N₂ 氛围下, 将 MAIpGP(2.5 g, 7.61 × 10⁻³ mol), CTA(0.1 g, 2.48 × 10⁻⁴ mol), AIBN(0.01 g, 0.61 × 10⁻⁴ mol)和甲苯(10 mL)分别加入至 25 mL 带有磁子的 Schlenk 管中, 分散均匀后经冷冻-抽真空-充氮气 3 次循环除氧。在 70 °C 油浴磁力搅拌下, 反应 24 h。反应结束后, 在冰正己烷中沉淀, 过滤。30 °C 真空干燥 24 h, 得到黄色粉末状 PMAIpGP-CTA, 收率 91.5%。

1.2.2 PMpPP 的合成 以 PMAIpGP-CTA 为大分子 RAFT 试剂, PDSMA 为单体, 经过第二步 RAFT 聚合得到具有不同亲疏水比的两嵌段聚合物 PMpPP(I) 和 PMpPP(II). 以 PMpPP(II) 的合成为例, 将 PMAIpGP-CTA(0.8 g, 9.29×10^{-5} mol), PDSMA(0.9 g, 3.62×10^{-3} mol), AIBN(3.8 mg, 2.32×10^{-5} mol) 和甲苯(8 mL) 加入 25 mL 带有磁力搅拌子的 Schlenk 管中, 分散均匀后经冷冻-抽真空-充氩气 3 次循环除氧. 70 °C 油浴磁力搅拌条件下, 反应 24 h. 反应结束后, 在冰正己烷中沉淀, 过滤. 30 °C 真空干燥 24 h, 得到浅黄色粉末 PMpPP, 收率 92.6%.

1.2.3 PMgPP 的合成 将 PMpPP(1.5 g) 和甲酸(15 mL) 加入至 25 mL 带有磁力搅拌子的 Schlenk 管中, 室温磁力搅拌 48 h; 然后, 向反应管中加入 3 mL 蒸馏水, 继续室温磁力搅拌 3 h; 反应结束后, 将反应液置于透析袋(透析袋截留分子量为 3500) 中, 经蒸馏水透析 48 h, 然后冷冻干燥, 得到脱保护后的 PMgPP 粉末.

1.3 PMgPP-CC NPs 的制备及抗稀释稳定性测试

1.3.1 PMgPP 内核未交联(NC) 和 CC NPs 的制备与表征 首先采用纳米沉淀透析法制备 PMgPP-NC NPs. 在室温条件下, 将 PMgPP(10.0 mg) 溶于 DMSO(1 mL) 中, 磁力搅拌 6.0 h; 然后, 将 9.0 mL 磷酸缓冲溶液(PB, pH=7.4, 10 mmol/L) 逐滴加入 DMSO 溶液中, 继续搅拌 12 h. 反应结束后, 用 PB 溶液透析 24 h, 每 4 h 更换 1 次透析介质, 制得空白 PMgPP-NC NPs 溶液.

将 PMgPP-NC NPs 溶液除氧, 在 N_2 氛围下, 将 GSH(GSH 与聚合物中吡啶环二硫键的摩尔比为 0.7:1) 加入到 PMgPP-NC NPs 溶液中, 搅拌 8 h. 将反应完全的 NPs 溶液经无氧 PB 缓冲液透析 8 h, 在空气条件下继续用 PB 缓冲液透析 24 h, 透析过程中 NPs 内核分子链段上的巯基经氧气自交联反应, 制备空白 PMgPP-CC NPs. 用 DLS 测定 PMgPP-NC NPs 和 PMgPP-CC NPs 的粒径及分布.

1.3.2 PMgPP-CC NPs 的抗稀释稳定性测试 分别将 1.0 mg/mL PMgPP-NC NPs 和 PMgPP-CC NPs 溶液用 PB 稀释 1000 倍, 磁力搅拌分散均匀后, 用 DLS 测定 PMgPP-NC NPs 和 PMgPP-CC NPs 的粒径及分布, 评价抗稀释性能.

1.4 PMgPP-CC NPs 氧化还原刺激响应性能表征

在 N_2 氛围下, 向 4 mL PMgPP-CC NPs 溶液中加入适量 GSH(GSH 的浓度为 10 mmol/L, 模拟肿瘤细胞内还原微环境), 然后在恒温振荡器(37 °C, 110 r/min) 中, 分别放置 5, 10 和 24 h 后, 用 DLS 跟踪 PMgPP-CC NPs 粒径变化, 考察 PMgPP-CC NPs 的氧化还原敏感性.

1.5 PMgPP-CC/DOX NPs 的制备与表征

PMgPP-CC/DOX NPs 的制备方法与空白 PMgPP-CC NPs 相似, 通过 UV-Vis 测试, 计算载药量(DLC) 和包封率(DLE). 将 PMgPP(10 mg) 和 DOX(2.5 mg) 溶于 DMSO(2.0 mL) 中, 室温避光条件下磁力搅拌 6.0 h; 然后, 将 9.0 mL PB 逐滴加入 DMSO 溶液中; 滴加结束后, 继续磁力搅拌 12 h, 用 PB 透析 24 h, 透析过程中每间隔 4 h 更换 1 次透析介质, 制得 PMgPP-NC/DOX NPs.

将 PMgPP-NC/DOX NPs 溶液除氧, 在 N_2 氛围下, 将 GSH 加入 PMgPP-NC/DOX NPs 溶液中, 搅拌 8 h. 首先在无氧 PB 中透析 8 h, 然后在空气条件下继续用 PB 透析 24 h, 制备 PMgPP-CC/DOX NPs. 用 DLS 测定 PMgPP-NC/DOX NPs 和 PMgPP-CC/DOX NPs 的粒径大小及分布. 将少量 PMgPP-NC/DOX NPs 和 PMgPP-CC/DOX NPs 溶液滴加到铜网上, 待溶液挥发干燥后, 用 TEM 观察 PMgPP-NC/DOX NPs 和 PMgPP-CC/DOX NPs 的微观形貌.

将 PMgPP-NC/DOX NPs 和 PMgPP-CC/DOX NPs 溶液冻干后制成冻干粉, 分别将 0.5 mg 冻干粉加入到 5.0 mL 容量瓶中, 用 DMSO 定容到刻度线, 用 UV-Vis 测试 PMgPP-NC/DOX NPs 和 PMgPP-CC/DOX NPs 溶液吸光度(检测波长为 500 nm), 根据 DOX 在 DMSO 中的紫外标准曲线计算 DLC 和 DLE.

1.6 体外药物释放

将 PMgPP-NC/DOX NPs 和 PMgPP-CC/DOX NPs 溶液分别装入透析袋中, 用 UV-Vis 测定 PMgPP-NC/DOX NPs 和 PMgPP-CC/DOX NPs 在非氧化还原和氧化还原条件下的释放. 将 30 mL PMgPP-CC/DOX NPs 溶液平均分为 6 份, 在 N_2 氛围下分别加入透析袋中, 将其中 3 份分别放入 20 mL 非氧化还

原介质(PB, pH=7.4, 10 mmol/L)中, 另外3份分别放入同等体积的2种氧化还原释放介质(PB, pH=7.4, 10 mmol/L; GSH 10 mmol/L)中, 在水浴恒温振荡器(37 °C, 100 r/min)中进行释放DOX研究. 每隔一段时间取出4 mL释放液取样后补加4 mL释放介质, 用UV-Vis检测, 计算出浓度和药量, 绘制累积释放量随时间的变化曲线.

1.7 细胞吞实验

以含10%(体积分数)FBS的DMEM为基础培养液, 将HepG-2细胞以 1×10^5 Cell/mL细胞浓度接种于6孔板中, 置于37 °C, 5%CO₂及饱和湿度条件下培养24 h. 然后分别加入等剂量浓度(10 μg/mL)的裸药DOX, PMgPP-NC/DOX NPs和PMgPP-CC/DOX NPs溶液, 继续培养8 h. 待到达指定培养时间后, 加入1.0 mL PB冲洗DOX和NPs, 重复2次. 在25 °C条件下, 用4%多聚甲醛溶液固定15 min, 然后用DAPI对细胞核进行染色, 用CLSM进行观察, 拍照记录.

1.8 细胞毒性实验

用MTT法评价空白及PMgPP-NC/DOX NPs和PMgPP-CC/DOX NPs的细胞毒性. 以含10%(体积分数)FBS的DMEM为基础培养液, 将HepG-2细胞以 1×10^5 Cell/mL接种于96孔板中, 置于37 °C, 5%CO₂及饱和湿度条件下培养24 h. 用DMEM稀释裸药DOX, PMgPP-NC/DOX NPs和PMgPP-CC/DOX NPs溶液, 得到药物浓度为0.1~20 μg/mL的溶液, 取100 μL各浓度的上述溶液分别加到接种过细胞的孔板中替代原培养液, 继续培养24 h. 用100 μL DMEM取代上述培养液, 加入20 μL MTT溶液, 培养4 h. 培养结束后, 取出培养基, 加入150 μL DMSO, 待其完全溶解, 使用Bio-Rad 680微孔检测570 nm处的吸光度, 计算细胞存活率.

2 结果与讨论

2.1 单体和聚合物的化学结构表征

含有GAL缩醛保护和吡啶二硫键功能基团的MAIpGP和PDSMA 2种单体的¹H NMR见图1. 由图1可见, 2种单体化学结构中所含有的H质子均出现了对应的特征峰, 峰面积和各H质子数之比相等, 表明合成了MAIpGP和PDSMA功能单体.

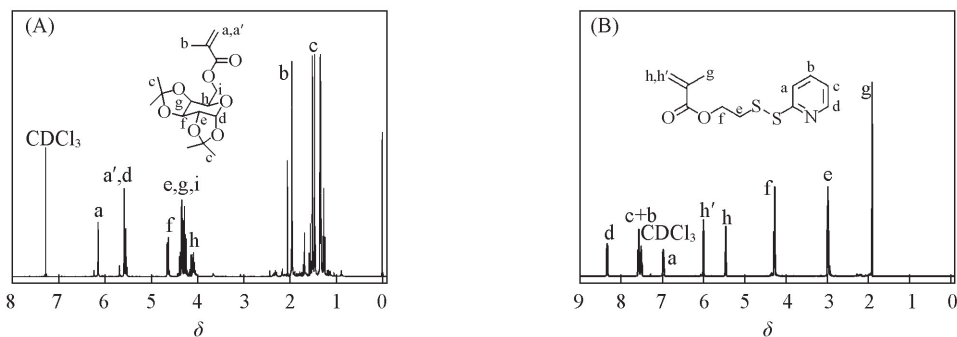


Fig.1 ¹H NMR spectra of MAIpGP(A) and PDSMA(B) monomers

图2(A)为PMAIpGP-CTA的¹H NMR谱图. 可以看出, δ 5.52(j)处的吸收峰为糖环中异头碳相连氢质子特征峰, δ 2.24(a)处的吸收峰为CTA的亚甲基氢质子特征峰. 通过2个特征峰峰面积之比可以计算PMAIpGP-CTA中MAIpGP单体的聚合度为25.0. 以PMAIpGP-CTA为大分子RAFT链转移剂, 通过控制PDSMA投料量制备了疏水PPDSMA不同链长的2种嵌段聚合物PMpPP(I)和PMpPP(II). 图2(B)为PMpPP(II)的¹H NMR谱图. 与图2(A)对比可以发现, δ 3.75~4.75(e, f, g, h, i)处的吸收峰归属于PMAIpGP-CTA, δ 7.13(p), 7.74(q, r)和8.49(s)处的吸收峰归属于PPDSMA中的吡啶环所对应的氢质子特征峰. 根据PMAIpGP特征化学位移δ 5.48(j)和PPDSMA特征化学位移δ 8.49(s)处的峰面积可以计算出PMpPP中PDSMA的聚合度和和聚合物分子量, 结果列于表1.

通过GPC表征PMAIpGP-CTA和PMpPP的分子量分布[图2(D)], 可见所有图谱都是单峰分布, 并且PMpPP的图谱随着分子量的增大向高分子量区域移动, 分布指数较小, 符合RAFT活性聚合特

征. 含有缩醛键的 PMpPP 在甲酸中会发生甲酸诱导缩醛脱保护反应生成两亲性嵌段聚合物 PMgPP. 对比图 2(C)和(B)可以看出, δ 1.2~1.6 处吸收峰几乎全部消失, 表明合成了 PMgPP.

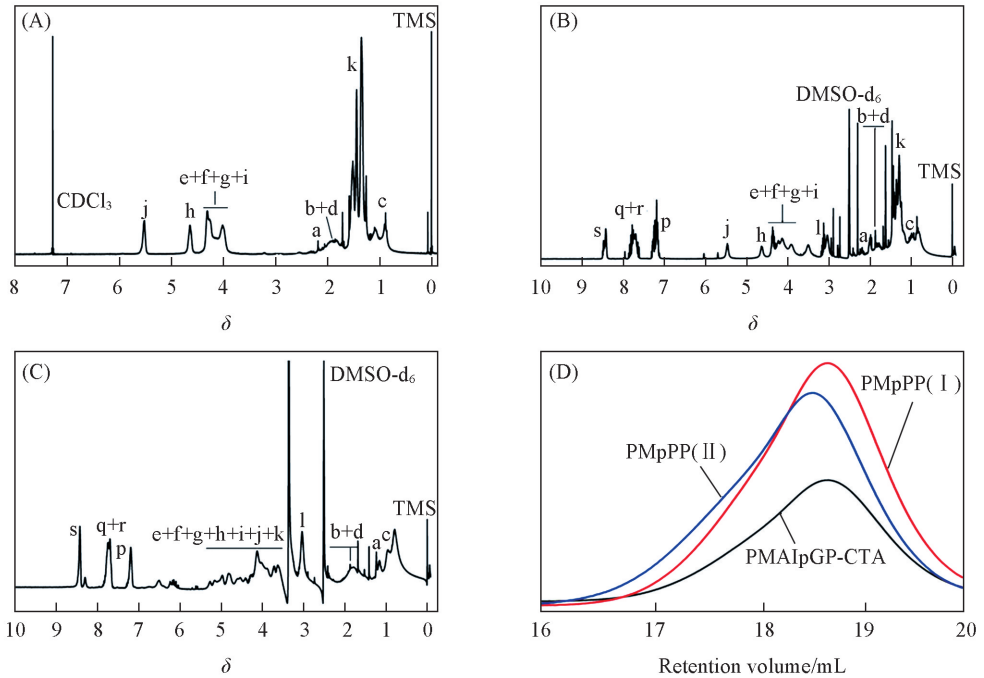


Fig.2 ^1H NMR spectra of PMAIpGP-CTA(A), PMpPP(I) (B) and PMgPP(II) (C) and GPC elution chromatograms of PMAIpGP-CTA and PMpPP(D)

Table 1 Chemical structure and compositions of PMpPP(I) and PMgPP(II)

Sample	Composition(/unit) (^1H NMR)		M_n (^1H NMR)	M_w/M_n (GPC)	$M_n(\text{PMAIpGP})/M_n(\text{PPDSMA})$ (^1H NMR)
	MAIpGP	PDSMA			
PMpPP(I)	25.0	29.0	16013	1.09	0.63
PMpPP(II)	25.0	39.0	18566	1.32	0.50

2.2 NPs 的组装及抗稀释稳定性

嵌段聚合物 PMgPP 亲水段含有 GAL 侧基, GAL 富含羟基和醚键, 易溶于水, 可作为聚乙二醇的替代物^[21]; PMgPP 中 PPDSMA 段疏水, 因此, 两亲性 PMgPP 聚合物可以通过纳米沉淀法制备 PMgPP-NC NPs. PPDSMA 上的部分吡啶环二硫键在适量 GSH 还原条件下被打开, 经无氧 PB 溶液透析后, 形成侧基富含巯基的 PPDSMA, 然后通过巯基-巯基氧化自交联反应制备内核二硫键交联的 PMgPP-CC NPs. 由表 2 可见, PMgPP-NC NPs 和 PMgPP-CC NPs 的粒径大小在 22.7~26.0 nm 之间, 分布指数(PDI=0.14~0.18)较窄. 决定聚合物纳米组装体水化半径的因素有亲疏水段的比例、聚合物的分子量、亲疏水段的分子结构以及形成胶束时的环境条件等多种因素. 2 种 PMgPP-NC NPs 粒径差别不大, 是因为所用的 2 种聚合物的分子量差别不大, 亲疏水段的比例相差较小(表 1). PMgPP-CC NPs 较其对应 PMgPP-NC NPs 的粒径稍有变小, 这是内核二硫键交联所致. 如图 3 所示, 将浓度为 1.0 mg/mL 的 PMgPP-CC NPs 和 PMgPP-NC NPs 溶液分别稀释至 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 发现 PMgPP-NC NPs 稀释后粒径明显变小, 说明 PMgPP-NC NPs 抗稀释稳定性较差; 而 PMgPP-CC NPs 粒径尺寸变化很小, 分布仍较窄, 因此, PMgPP-CC NPs 有利于提高其在体内血液循环过程中的抗稀释稳定性^[23].

Table 2 Characteristics of blank PMgPP-NC NPs and PMgPP-CC NPs

Sample	NC NPs		CC NPs	
	Size/nm	PDI	Size/nm	PDI
PMgPPI	23.9 \pm 0.8	0.14	22.7 \pm 1.5	0.16
PMgPPII	26.0 \pm 1.6	0.15	23.7 \pm 0.2	0.18

2.3 氧化还原响应性

在还原条件下, 氧化还原诱导 PMgPP-CC NPs 内核二硫键断裂有利于 PMgPP-CC NPs 的解组

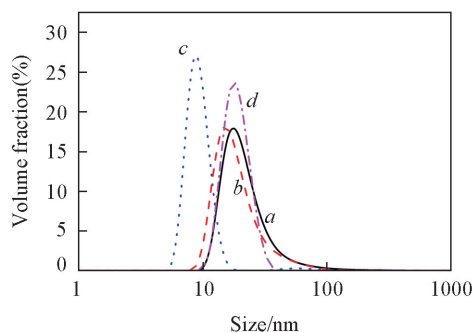


Fig.3 DLS measurements of 1.0 mg/mL PMgPP (II)-NC NPs (*a*), 1.0 mg/mL PMgPP (II)-CC NPs (*b*), 1.0 $\mu\text{g/mL}$ PMgPP (II)-NC NPs (*c*) and 1.0 $\mu\text{g/mL}$ PMgPP (II)-CC NPs (*d*)

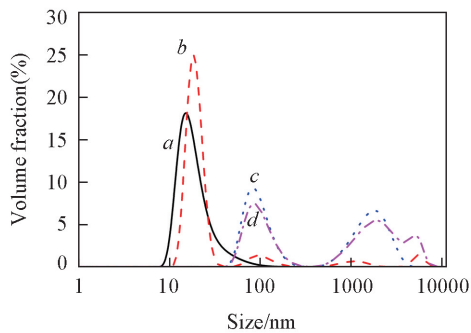


Fig.4 Reduction-induced size changes of PMgPP (II)-CC NPs

Concentration of GSH/($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) and time/h:
a. 0, 0; *b.* 10, 5; *c.* 10, 10; *d.* 10, 24.

装^[15]. 由图 4 可见, 在 10 mmol/L GSH(模拟肿瘤细胞内还原微环境)的条件下, PMgPP(II)-CC NPs 处理 5 h 后, 粒径尺寸由 23.7 nm 膨胀到 25.0 nm, 10 h 时出现了部分粒径大小为 2 μm 的组装体, 这是因为还原条件下, PMgPP(II)-CC NPs 内核二硫键断裂而解体并组装成大粒子. 这种变化将有利于负载在 PMgPP-CC NPs 内核中的疏水性抗癌药物的释放^[5], 因此, PMgPP-CC NPs 可用于氧化还原敏感性纳米药物载体.

2.4 药物负载与表征

DOX 作为一种常用的抗癌化疗药物, 以其为模型药物, 研究 PMgPP 聚合物作为一种氧化还原性纳米药物载体对 DOX 负载和体外释放性能. 表 3 给出 PMgPP-NC/DOX NPs 和 PMgPP-CC/DOX NPs 的 DLC, DLE 和粒径大小及其分布的结果. 从表 3 可以看出, 当 PMgPP-NC/DOX NPs 的 DLC 为 12.0% 时, DLE 为 80.0%, 说明 PMgPP-NC NPs 对 DOX 呈现出较好的负载能力. 当 PMgPP-CC/DOX NPs 的 DLC 为 12.5% 时, DLE 为 83.3%, 与 PMgPP-NC NPs 相比, PMgPP-CC NPs 对 DOX 表现略强的负载效

Table 3 Characteristics of PMgPP-NC/DOX NPs and PMgPP-CC/DOX NPs*

Sample	NC/DOX NPs				CC/DOX NPs			
	Size/nm	PDI	DLC(%)	DLE(%)	Size/nm	PDI	DLC(%)	DLE(%)
PMgPP(I)	21.5 \pm 4.8	0.16	11.9	79.3	20.1 \pm 4.8	0.19	11.7	78.0
PMgPP(II)	25.0 \pm 3.2	0.19	12.0	80.0	24.8 \pm 3.9	0.18	12.5	83.3

* Theoretical DLC: 15.0%.

果, 可能是由于以下 2 个原因协同作用而导致的: (1) PMgPP-CC NPs 内核中吡啶环与 DOX 分子中的芳香环存在 π - π 共轭作用和疏水作用^[16]; (2) PMgPP-CC NPs 内核二硫键的交联, 使内核结构更加稳定, 有利于对 DOX 的物理包覆. 另外 PMgPP-NC/DOX NPs 和 PMgPP-CC/DOX NPs 的粒径大小比较接近, 均呈现粒径低分布指数. 图 5 给出 PMgPP(II)-NC/DOX NPs 和 PMgPP(II)-CC/DOX NPs 的 TEM 图. 可以看出, 2 种载药 NPs 均呈近似球形, 粒径大小分布均匀.

2.5 体外药物释放性能

PMgPP-NC/DOX NPs 与 PMgPP-CC/DOX NPs 均具有 GSH 敏感性, 以 PMgPP(II)-CC/DOX NPs 为研究对象, 利用透析法测试不同氧化还原条件下 DOX 的体外释放行为(图 6). 在不含 GSH 的缓冲液中(模拟血液), 46 h 时 PMgPP(II)-CC/DOX NPs 的累积药物释放量为 4.47%, 低于 PMgPP(II)-NC/DOX NPs 的 5.26%, 说明在类似体液条件下, PMgPP(II)-CC/DOX NPs 比较稳定, 有利于降低毒副作用. 在 10 mmol/L GSH 缓冲液中, 46 h 时 PMgPP(II)-CC/DOX NPs 的累积释放量为 50.6%, 高于

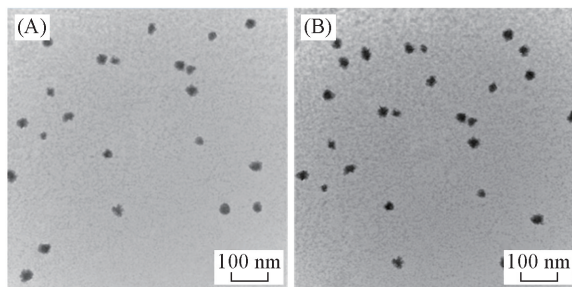


Fig.5 TEM images of PMgPP(II)-NC/DOX NPs (A) and PMgPP(II)-CC/DOX NPs (B)

PMgPP(II)-NC/DOX NPs 的累积释放量 41.8%。这是由于在相同 GSH 浓度下, 当 GSH 作用于 PMgPP-CC/DOX NPs 时, 打开 1 个由 2 个重复结构单元末端巯基所形成的二硫键将生成 2 分子的亲水性巯基; 而 GSH 作用于 PMgPP-NC/DOX NPs 时, 打开 1 个吡啶环二硫键生成 1 分子巯基和 1 分子巯基吡啶; PMgPP-CC/DOX NPs 受 GSH 作用后, 内核具有更强亲水性, 所以 PMgPP-CC/DOX NPs 与 PMgPP-NC/DOX NPs 相比 GSH 敏感性略强。在正常体液环境中 GSH 浓度非常低, 一般细胞外基质中 GSH 浓度为 2~20 $\mu\text{mol/L}$, 如此低浓度的 GSH 不能快速实现对 PMgPP-CC/DOX NPs 的解组装, 因此, PMgPP-CC/DOX NPs 在体液环境中结构稳定, 药物累积释放量很低。上述结果表明, PMgPP-CC/DOX NPs 不仅在生理条件下具有优异稳定性, 而且在模拟肿瘤细胞氧化还原刺激条件下快速地释放药物, 有利于降低 DOX 毒副作用, 提高生物利用度。

2.6 细胞吞性能

PMgPP 中 GAL 侧基对肝癌肿瘤细胞 HepG-2 具有特异性靶向作用, 通过 CLSM 可以监测 HepG-2 细胞对 PMgPP(II)-CC/DOX NPs 的胞吞和胞内药物释放行为。图 7 给出在同等 DOX 剂量 (10 $\mu\text{g/mL}$) 条件下, HepG-2 细胞对裸药 DOX, PMgPP(II)-NC/DOX NPs 和 PMgPP(II)-CC/DOX NPs 的 CLSM 图。从图 7 可以看出, 对于裸药 DOX 处理的 HepG-2 细胞, 因被动扩散机理细胞核内出现了强红色荧光; 当 HepG-2 细胞经 PMgPP(II)-NC/DOX NPs 和 PMgPP(II)-CC/DOX NPs 处理后, 细胞质和细胞核中出现了较强的红色荧光, 但经 PMgPP(II)-CC/DOX NPs 处理的细胞内荧光强度要高于 PMgPP(II)-NC/DOX NPs 处理的细胞。这种红色荧光强度和出现区域的区别主要是因为 PMgPP(II)-NC/DOX NPs 和 PMgPP(II)-CC/DOX NPs 是通过 GAL 介导主动靶向的内吞作用进入细胞。由于细胞质中高浓度 GSH 的存在, PMgPP(II)-CC/DOX NPs 较 PMgPP(II)-NC/DOX NPs 药物释放速度更快, 释放出的 DOX 可快速进入到细胞核, 所以 PMgPP(II)-CC/DOX NPs 处理的细胞核中荧光强度较强。这些结果证明 GAL 介导的 PMgPP-CC/DOX NPs 较 PMgPP-NC/DOX NPs 更有利于抗肿瘤纳米药物在肿瘤细胞内的高效快速释放。

2.7 细胞毒性

空白 PMgPP(II)-CC NPs 和 PMgPP(II)-NC NPs 对 HepG-2 细胞的生物相容性可以用 MTT 法进行评估 (图 8), HepG-2 细胞经浓度高达 1.0 mg/mL 的 PMgPP(II)-CC NPs 和 PMgPP(II)-NC NP 处理 48 h, 细胞存活率仍然在 95% 以上, 说明 2 种 NPs 对肿瘤细胞的增殖没有明显抑制活性, 因而

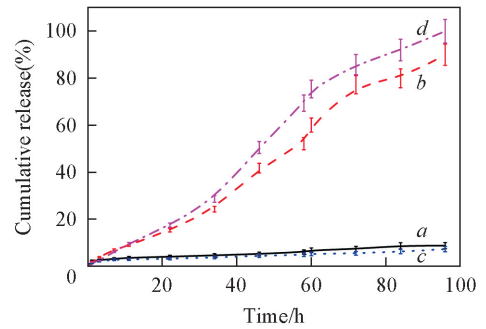


Fig.6 GSH-triggered DOX release profiles from PMgPP(II)-NC/DOX NPs (a, b) and PMgPP(II)-CC/DOX NPs (c, d)

Concentration of GSH ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): a, c, 0; b, d, 10.

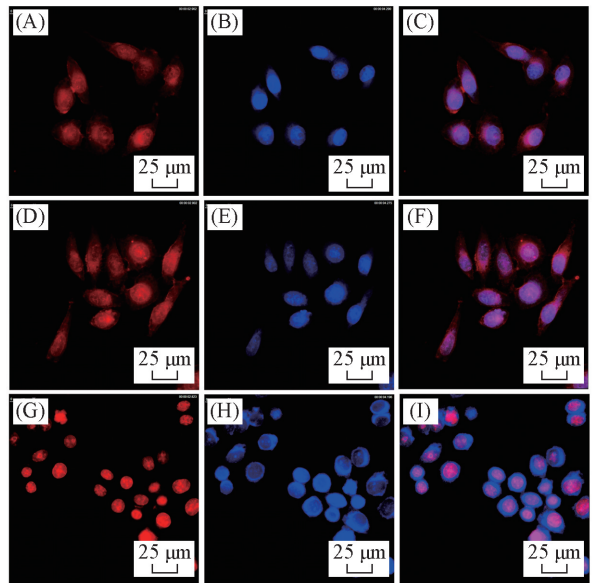


Fig.7 CLSM images of HepG-2 cells after incubated with PMgPP(II)-NC/DOX NPs (A—C), PMgPP(II)-CC/DOX NPs (D—F) and free DOX (G—I) at equivalent DOX concentration of 10.0 $\mu\text{g/mL}$ for 8 h. Images from left to right show DOX fluorescence in cells (red) and cell nuclei stained by DAPI (blue) and overlays of two images.

PMgPP聚合物具有良好的生物相容性, 可以作为一种安全的纳米药物载体材料.

PMgPP-CC/DOX NPs 对 HepG-2 细胞的增殖抑制活性可以进一步用 MTT 法进行研究. 以 PMgPP (II)-NC/DOX NPs 和裸药 DOX 为对比, 测试结果见图 9, PMgPP (II)-NC/DOX NPs 和 PMgPP (II)-CC/DOX NPs 以及裸药 DOX 对 HepG-2 细胞增殖抑制效果呈现明显的药物浓度依赖性. 对比可以发现, PMgPP (II)-CC/DOX NPs 对 HepG-2 细胞增殖抑制活性略强于 PMgPP (II)-NC/DOX NPs, 这是由于 GAL 介导的主动靶向高效入胞后 PMgPP (II)-CC/DOX NPs 有较快的药物释放, 与 CLSM 结果一致.

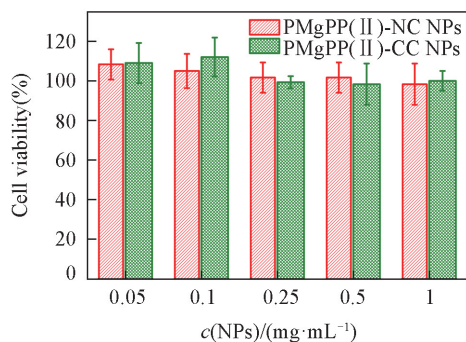


Fig.8 *In vitro* cytotoxicity of blank PMgPP (II)-NC NPs and PMgPP (II)-CC NPs towards HepG-2 cells

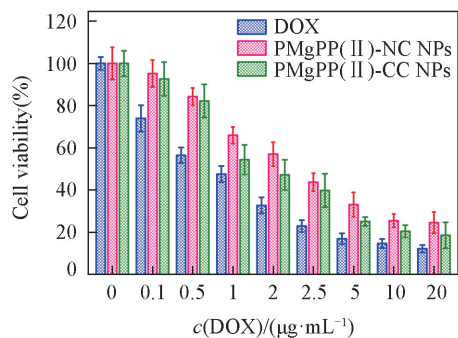


Fig.9 Cell growth inhibition activity of free DOX, PMgPP (II)-NC/DOX NPs and PMgPP (II)-CC/DOX NPs as a function of DOX dosages towards HepG-2 cells

3 结 论

通过两步 RAFT 聚合和缩醛脱保护反应制备了亲水段含有 GAL 和疏水段含有可二硫键交联的两亲性嵌段聚合物 PMgPP, 并对其化学结构进行了测试表征. 以其为 DOX 药物载体, 构建了带有 GAL 靶向基团和氧化还原响应可解组装的内核交联 PMgPP-CC/DOX NPs. PMgPP 对 DOX 呈现出良好的负载能力, 载药量高达 12.5%, 包封率为 83.3%. PMgPP-CC/DOX NPs 在体液环境中结构稳定, 药物累积释放量很低, 而在 10.0 mmol/L GSH 下交联内核解体, 实现药物快速释放, 对肝癌 HepG-2 细胞呈现出较强的增殖抑制活性. 合成的 PMgPP 两亲性嵌段聚合物可作为药物载体, 其对疏水性抗癌药物呈现良好负载性能和良好的入胞能力, 并且针对肿瘤部位特殊的生理微环境具有氧化还原刺激响应性, 因此, PMgPP-CC/DOX NPs 在肝靶向肿瘤药物精准医疗领域具有潜在的应用前景.

参 考 文 献

- [1] Dai Y. L., Xu C., Sun X. L., Chen X. Y., *Chem. Soc. Rev.*, **2017**, 46(12), 3830—3852
- [2] Li R., Xie Y., *J. Controlled Release*, **2017**, 251, 49—67
- [3] Tibbitt M. W., Dahlman J. E., Langer R., *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, 138(3), 704—717
- [4] Shi J. J., Kantoff P. W., Wooster R., Farokhzad O. C., *Nature Reviews Cancer*, **2017**, 17, 20—37
- [5] Blum A. P., Kammeyer J. K., Rush A. M., Callmann C. E., Hahn M. E., Gianneschi N. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, 137(6), 2140—2154
- [6] Karimi M., Ghasemi A., Zangabad P. S., Rahighi R., Moosavi Basri S. M., Mirshekari H., Amiri M., *Chem. Soc. Rev.*, **2016**, 45(5), 1457—1501
- [7] Zhang X. J., Dong H., Fu S. L., Zhong, Z. L., Zhuo R., *Macromol. Rapid Commun.*, **2016**, 37, 993—997
- [8] Li D. W., Bu Y. Z., Zhang L. N., Wang X., Yang Y. Y., Zhuang Y. P., Yang F., Shen H., Wu D. C., *Biomacromolecules*, **2016**, 17(1), 291—300
- [9] Talelli M., Barz M., Rijcken C. J., Kiessling F., Hennink W. E., Lammers T., *Nano Today*, **2015**, 10(1), 93—117
- [10] Xiao W. W., Suby N., Xiao K., Lin T. Y., Awad N. A., Lam K. S., Li Y. P., *J. Controlled Release*, **2017**, 264, 169—179
- [11] Huang M. M., Zhao K. J., Wang L., Lin S. Q., Li J. J., Chen J. B., Zhao C. G., Ge Z. S., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2016**, 8, 11226—11236
- [12] Zhang Q. Q., He J. L., Zhang M. Z., Ni P. H., *J. Mater. Chem. B*, **2015**, 3(24), 4922—4932

- [13] Kong F. P., Liang Z. Y., Luan D. G., Liu X. J., Xu K. H., Tang B., *Anal. Chem.*, **2016**, 88(12), 6450—6456
- [14] Zhang P., Zhang H. Y., He W. X., Zhao D. J., Song A. X., Luan Y. X., *Biomacromolecules*, **2016**, 17, 1621—1632
- [15] Deng B., Ma P., Xie Y., *Nanoscale*, **2015**, 7(30), 12773—12795
- [16] Han H. S., Choi K. Y., Ko H., Jeon J., Saravanakumar G., Suh Y. D., Lee D. S., Park J. H., *J. Controlled Release*, **2015**, 200, 158—166
- [17] Bertrand N., Wu J., Xu X. Y., Kamaly N., Farokhzad O. C., *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2014**, 66, 2—25
- [18] Hu X. L., Liu G. H., Li Y., Wang X. R., Liu S. Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, 137(1), 362—368
- [19] Fu L. Y., Sun C. Y., Yan L. F., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2015**, 7(3), 2104—2115
- [20] Wang Z., Luo T., Sheng R. L., Li H., Sun J. J., Cao A., *Biomacromolecules*, **2016**, 17(1), 98—110
- [21] Wang Y., Hong C. Y., Pan C. Y., *Biomacromolecules*, **2013**, 14(5), 1444—1451
- [22] Moad G., Chong Y. K., Postma A., Rizzardo E., Thang S. H., *Polymer*, **2005**, 46(19), 8458—8468
- [23] Chen W., Meng F. H., Cheng R., Deng C., Feijen J., Zhong Z. Y., *J. Controlled Release*, **2015**, 210, 125—133

Synthesis and Self-assembly Properties of Intracellular Redox Bioresponsive Block Copolymers with Hepatoma-targeting Groups[†]

ZHAO Junqiang*, YAN Caixia, CHEN Ze, YANG Ning,
FENG Xia, ZHAO Yiping, CHEN Li

(School of Material Science and Engineering, Tianjin Polytechnic University, State Key Laboratory of Separation Membranes and Membrane Processes, Tianjin 300387, China)

Abstract The amphiphilic block copolymers PMAIgGP-b-PPDSMA (PMgPP) with a hydrophilic block containing galactose side groups and a hydrophobic segment containing pyridine ring disulfide pendant groups were prepared by two-step reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization and acetal deprotection reaction. Their well-defined chemical structures were confirmed by proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR) and gel permeation chromatography (GPC). Core-crosslinked PMgPP nanoparticles (PMgPP-CC NPs) were prepared by nano-precipitation technology and thiol oxidation self-crosslinking reaction. Dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM) were used to determine the size of PMgPP-CC NPs (<30 nm) and the particle size distribution indexes were narrow. Under the reduction environment of GSH, the particle sizes of PMgPP-CC NPs were increasing with incubation time, indicating the disassembly of PMgPP-CC NPs. PMgPP-CC/DOX NPs were prepared by DOX as the model drug, and drug loading content up to 12.5% and entrapment efficiency of 83.3%. The particle sizes were similar to that of the corresponding blank CC NPs, and the particle size distribution was uniform. Within 46 h *in vitro*, 4.47% of DOX was released from the PMgPP-CC/DOX NPs in normal physiological conditions, whereas 50.6% was released in the presence of 10 mmol/L GSH condition analogous to the reductive microenvironment in cytoplasm. The cell uptake tests further confirmed that PMgPP-CC/DOX NPs could be efficiently released in the HepG-2 cells. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assays show that PMgPP-CC/DOX NPs has good proliferation inhibitory activity against HepG-2 cells. Therefore, multifunctional PMgPP-CC NPs have a good prospect in the field of precise hepatoma-targeting drug delivery.

Keywords Galactose; Redox-sensitive; Core-crosslinked block copolymer; Reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization; Drug delivery

(Ed.: W, Z)

[†] Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos.81502624, 31200719), the Tianjin Education Scientific Research Projects, China (No.2017KJ071) and the Natural Science Foundation of Tianjin, China (Nos.15JCYBJC17900, 14JCTPJC00515).