

二硫键优化透明质酸介导的肝癌靶向纳米探针的制备及体外靶向作用

刘国顺¹ 杨惠康¹ 李雯曦² 熊炜烽¹ 黎蕾³ 湛丹丹¹ 郭媛¹ 江新青¹

¹华南理工大学第二附属广州第一人民医院放射科 510180; ²华南理工大学第二附属广州第一人民医院老年病科 510180; ³解放军184医院放射科, 江西省鹰潭市 335000

通信作者: 江新青, Email: jiangxqw@163.com

【摘要】 目的 探讨二硫键优化透明质酸介导的肝癌靶向纳米探针的构建方法和理化性质, 并评价对肝癌细胞治疗作用的体外生物学特性及MRI的可行性。方法 利用点击化学反应将含二硫键的端炔基聚己内酯(alkyne-SS-PCL)与端叠氮基透明质酸(HA-N₃)合成透明质酸-二硫键-聚己内酯(HA-SS-PCL), 再通过透析方法将阿霉素(DOX)及超顺磁性氧化铁(SPIO)包载于HA-SS-PCL内核中, 制成透明质酸-二硫键-聚己内酯@阿霉素/超顺磁性氧化铁(HA-SS-PCL@DOX/SPIO), 测量其粒径、DOX及SPIO负载率。利用四唑盐比色法(MTT), 以碱性磷酸盐(PBS)为对照组, 评价HA-SS-PCL对人肝癌细胞HepG₂及正常肝细胞LO₂的安全性, 透明质酸-聚己内酯@阿霉素/超顺磁性氧化铁(HA-PCL@DOX/SPIO)及HA-SS-PCL@DOX/SPIO对人肝癌细胞HepG₂的细胞毒性。采用免疫荧光及流式细胞术观察HA-PCL@DOX/SPIO及HA-SS-PCL@DOX/SPIO组人肝癌HepG₂细胞表面CD44受体表达情况。通过体外MRI成像, 以PBS为对照组, 观察SPIO浓度为10、20、40、80 μg/ml时, HA-PCL@DOX/SPIO及HA-SS-PCL@DOX/SPIO纳米探针T₂WI信号强度变化情况。两组间计量资料的比较采用*t*检验, 多组间计量资料的比较采用单因素方差分析。结果 成功构建纳米探针HA-SS-PCL@DOX/SPIO, 其粒径为(126.9±6.3)nm, 呈大小均一的球形结构, 该纳米探针对于DOX及SPIO负载率分别为61.4%、58.7%。MTT试验显示, HA-SS-PCL即使在浓度为500 μg/ml时, HepG₂及LO₂细胞存活率仍>80%; 当DOX浓度为10.00 μg/ml时, HA-PCL@DOX/SPIO组HepG₂细胞存活率为66.6%, HA-SS-PCL@DOX/SPIO组HepG₂细胞存活率为55.2%。免疫荧光及流式细胞检测HA-PCL@DOX/SPIO及HA-SS-PCL@DOX/SPIO组均具有较强的荧光, 后者荧光强度更强, 分别为139.70±8.52、245.06±13.21。体外MRI成像示HA-PCL@DOX/SPIO及HA-SS-PCL@DOX/SPIO较对照组其T₂信号强度均有明显下降(*F*值分别为613.591、569.234, *P*均<0.01), 后者下降率更为显著。结论 经二硫键优化透明质酸介导的肝癌靶向纳米探针理化性质优良, 在体外细胞水平对人肝癌细胞HepG₂具有较好的靶向性及MRI显像功能。

【关键词】 磁共振成像; 二硫键; 透明质酸; 纳米探针

基金项目: 国家自然科学基金(81271665)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-1201.2019.07.015

Synthesis and its targeting effect in vitro of disulfide-bonded hyaluronic acid-functionalized sodium-meter probe for hepatocellular carcinoma

Liu Guoshun¹, Yang Huikang¹, Li Wenxi², Xiong Weifeng¹, Li Lei³, Chen Dandan¹, Guo Yuan¹, Jiang Xinqing¹

¹Department of Radiology, Guangzhou First People's Hospital, the Second Affiliated Hospital of South China University of Technology, Guangzhou 510180, China; ²Department of Geriatrics, Guangzhou First People's Hospital, the Second Affiliated Hospital of South China University of Technology, Guangzhou 510180, China; ³Department of Radiology, the 184th Hospital of PLA, Yingtan 335000, China

Corresponding author: Jiang Xinqing, Email: jiangxqw@163.com

【Abstract】 Objective To explore the construction method and physicochemical properties of disulfide-bonded hyaluronic acid-functionalized sodium-meter probe for hepatocellular carcinoma, and its biological evaluation in vitro and feasibility of MRI. **Methods** Synthesis of hyaluronic acid-disulfide-bonded-poly ε-caprolactone (HA-SS-PCL) by disulfide-bonded alkynyl-terminated polycaprolactone (alkyne-SS-PCL) and azido-terminated hyaluronic acid (HA-N₃) by clicking chemical reaction, then doxorubicin (DOX) and superparamagnetic iron oxide (SPIO) were encapsulated in

HA-SS-PCL core by dialysis method. HA-SS-PCL@DOX/SPIO was prepared and its particle size, DOX and SPIO loading rate were measured. With PBS as control group, the safety of HA-SS-PCL on human hepatocellular carcinoma cells HepG₂ and normal liver cells LO₂ was evaluated by the methylthiazolyl tetrazolium (MTT) assay, and the cytotoxicity of HA-PCL@DOX/SPIO and HA-SS-PCL@DOX/SPIO on human hepatocellular carcinoma cells HepG₂ was evaluated. Immunofluorescence and flow cytometry were used to observe the expression of CD44 receptor on the surface of HepG₂ cells in HA-PCL@DOX/SPIO and HA-SS-PCL@DOX/SPIO groups. Through in vitro MRI, PBS was used as the control group to observe the changes of T₂ signal intensity of HA-PCL@DOX/SPIO and HA-SS-PCL@DOX/SPIO groups when SPIO concentration was 10, 20, 40, 80 μg/ml. One way ANOVA test and *t* test were used. **Results** HA-SS-PCL@DOX/SPIO sodium-meter probes were successfully constructed. The particle size of HA-SS-PCL@DOX/SPIO was (126.9±6.3) nm, and they were spherical with uniform size. The loading rates of DOX and SPIO were 61.4% and 58.7%. MTT assay showed that the survival rate of HepG₂ and LO₂ cells was more than 80% even at 500 μg/ml of HA-SS-PCL, 66.6% in HA-PCL@DOX/SPIO group and 55.2% in HA-SS-PCL@DOX/SPIO group. Immunofluorescence and flow cytometry showed that HA-PCL@DOX/SPIO and HA-SS-PCL@DOX/SPIO groups all have strong fluorescence, and the latter has stronger fluorescence intensity the former fluorescence intensity was 139.70±8.52, less than the latter 245.06±13.21. In vitro MRI showed that the T₂ signal intensity of HA-PCL@DOX/SPIO and HA-SS-PCL@DOX/SPIO was significantly lower than that of the control group (*F* values were 613.591 and 569.234, *P*=0.000), the latter decline rate was more significant. **Conclusion** The disulfide-bonded hyaluronic acid-functionalized sodium-meter probe for hepatocellular carcinoma has excellent physicochemical properties, good targeting and MRI functions on human hepatoma cell HepG₂ at the cellular level in vitro.

【Key words】 Magnetic resonance imaging; Disulfide; Hyaluronic acid; Sodium-meter probe

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81271665)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-1201.2019.07.015

纳米探针越来越多地被用于肿瘤的靶向治疗中,不仅可以提高肿瘤的治疗效果,还可通过分子影像手段对其疗效进行早期监测^[1]。因此,找到一种合适的纳米探针对于肿瘤的靶向治疗起着至关重要的作用。优良的纳米探针必须具备良好的生物安全性、靶向性、亲水性、疏水性及快速释放抗癌药物的能力^[2]。透明质酸(hyaluronic acid, HA)具有良好的亲水性,并可与人体肿瘤细胞表面的CD44靶向结合,可用作纳米探针的亲水片段^[3]。聚己内酯(poly ε-caprolactone, PCL)具有良好的生物安全性及疏水性,常被用于纳米探针的疏水片段。二硫键(SS)作为人体内特殊的化学键,当其处于还原性介质中,则会断裂生成巯基基团^[4-5]。基于以上思路,笔者试图利用HA的靶向性及亲水性,PCL的疏水性及二硫键的还原性构建一种高效抗癌载体透明质酸-二硫键-聚己内酯@阿霉素/超顺磁性氧化铁(HA-SS-PCL@DOX/SPIO),并在体外细胞水平对其生物学行为及MRI的可行性进行评价。

资料与方法

一、HA-SS-PCL@DOX/SPIO的制备

(一)纳米探针的制备

1. 制备含二硫键的端炔基聚己内酯

(alkyne-SS-PCL):在干燥的具有磁力搅拌器的玻璃烧瓶中加入引发剂炔丙基氨基甲酸乙基二巯基乙胺(0.028 g, 0.15 mmol)、ε-己内酯(1.28 g, 11.5 mmol)以及5 ml无水甲苯。真空下除去约3.0 ml甲苯以带走微量水分,后将辛酸亚锡(0.1 ml, 0.1 mol/L甲苯)注入上述反应混合物中,并将空气与氮气交换3次。将玻璃烧瓶浸入110℃的油浴中,搅拌以开始聚合。24 h后,将反应混合物快速冷却至室温,然后用四氢呋喃(tetrahydrofuran, THF)稀释,将粗产物在过量的石油醚中沉淀。最后收集沉淀物并在真空中干燥48 h直至恒重(1.24 g,产率95.2%,凝胶渗透色谱Mn为6.4 kDa,聚合物分散性指数1.26)。

2. 合成端叠氨基透明质酸(HA-N₃):在20 ml、pH为5.6的醋酸盐缓冲溶液中溶解3.0 g(0.2 mmol)透明质酸钠,添加1.7 g(20.0 mmol)叠氮丙胺,再加入1.3 g(20.0 mmol)氰基硼氢化钠,在50℃下连续搅拌7 d,其间每天添加20 mg氰基硼氢化钠。反应结束后用透析的方法进行提纯,冷冻干燥得到白色产物2.7 g,产率为91%。由于透明质酸钠不能在二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)中溶解,为了能够进行点击反应,需要先用盐酸对透明质酸钠进行酸化处理。

3. 合成两亲性嵌段聚合物HA-SS-PCL:首先将0.22 g HA-N₃(0.54 mmol)与0.1 g alkyne-SS-PCL溶

于 10 ml DMSO 中,并通入氩气驱走氧气。加入 15 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$,继续通入氩气 10 min,后加入 30 mg 抗坏血酸钠(NaAsc)。然后,将烧瓶在氩气下密封,并在 40℃的油浴中浸泡 3 d后将反应介质转移至截留分子量为 3.5 kD 的透析膜,首先针对乙二胺四乙酸(EDTA)透析 3 d,然后针对纯水透析 3 d,以除去铜和抗坏血酸盐及过量 HA-N_3 。得到白色固体的最终产物 HA-SS-PCL (产量 0.146 g, 82%)。

4. 通过透析方法将疏水性阿霉素(doxorubicin, DOX)和超磁性氧化铁(superparamagnetic iron oxide, SPIO)装载到胶束 HA-SS-PCL 的疏水内核中:将 HA-SS-PCL 10 mg、2 mg $\text{DOX} \cdot \text{HCl}$ 、等摩尔量的三乙胺(TEA)和 1.5 mg SPIO 溶解在 2 ml DMSO 中。然后,在温和搅拌下,将去离子水 5 ml 缓慢加入到上述混合溶液中。将混合溶液装进截留分子量为 3.5 kD 的透析袋中,在常温下用去离子水透析 24 h,并且每 8 小时更换透析水以去除 DMSO,最后的透析液用 0.45 μm 的针式过滤器过滤,以除去未包封的 DOX 与 SPIO。最终形成载有 DOX/SPIO 的聚合物胶束 $\text{HA-SS-PCL@DOX/SPIO}$ 。

(二)纳米探针的表征

使用日本 Tokyo JEM-2100F 透射电子显微镜测定 $\text{HA-SS-PCL@DOX/SPIO}$ 纳米探针的尺寸和形态学图像;采用荧光分光光度法及原子吸收分光光度计测定 $\text{HA-SS-PCL@DOX/SPIO}$ 纳米探针中的 DOX 及 SPIO 负载率。

二、细胞存活率的检测

采用 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐比色法(MTT)检测细胞存活率。首先评价 HA-SS-PCL 纳米探针对人肝癌细胞 HepG_2 及正常肝细胞 LO_2 细胞的安全性,其浓度配置成 10、25、50、100、250、500 $\mu\text{g/ml}$ 。将对数生长期的人肝癌细胞 HepG_2 及正常肝细胞 LO_2 按 1×10^4 个/孔分别接种于 96 孔板中。以碱性磷酸盐(PBS)组处理的细胞作为对照组,在 96 孔培养板中加入上述浓度样品,常温孵育 48 h 后,加入检测液,继续孵化 4 h 后,采用酶标仪读板,读取吸光度(A)值,计算细胞存活率。细胞存活率 = (实验组 A 值/对照组 A 值) $\times 100\%$ 。然后再评价 $\text{HA-SS-PCL@DOX / SPIO}$ 及 HA-PCL@DOX/SPIO 纳米探针对人肝癌细胞 HepG_2 的细胞毒性,将其配置成 DOX 浓度分别为 0.25、0.50、1.00、2.50、5.00 及 10.00 $\mu\text{g/ml}$,以 PBS 组处理的细胞作为对照组,计算细胞存活率。实验均重复 3 次,每浓度设 3 复孔,取其平均值。

三、二硫键优化透明质酸介导的肝癌靶向纳米探针的体外结合实验

1. 免疫荧光定性检测人肝癌细胞 HepG_2 对纳米微粒的吸收:采用 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色检查 HepG_2 对 $\text{HA-SS-PCL@DOX/SPIO}$ 和 HA-PCL@DOX/SPIO 纳米微粒的吸收情况,DOX 浓度为 10.00 $\mu\text{g/ml}$ 。将对数期 HepG_2 细胞按 1×10^6 个/孔接种 12 孔板中,加入配好的培养液 200 μl ,与 HepG_2 细胞共孵育 4 h。PBS 冲洗 3 次,每孔加入 4% 的多聚甲醛溶液 0.5 ml,37℃ 下固定 10 min,吸除固定液,用 PBS 冲洗 3 次,每孔加入 1 ml 的 DAPI 染液(终浓度为 1×10^{-3} $\mu\text{g/ml}$)对细胞核染色,2 min 后,通过倒置荧光显微镜观察各组荧光强度并拍照。实验重复 3 次,每组设 3 复孔。

2. 流式细胞术定量检测人肝癌细胞 HepG_2 对纳米微粒的吸收:将对数期 HepG_2 细胞按 1×10^6 细胞/孔接种 12 孔板中,以 PBS 处理的细胞为对照组,然后按分组加入 $\text{HA-SS-PCL@DOX / SPIO}$ 及 HA-PCL@DOX/SPIO 溶液 200 μl ,溶液配成 DOX 浓度为 10 $\mu\text{g/ml}$,与 HepG_2 细胞共孵育 4 h。PBS 清洗 3 次,每孔加入 2 ml 0.25% 的胰酶消化 3 min,收集细胞溶液(1 000 转/min, 5 min),弃上清,重悬于 1 ml PBS 中。测量各组几何平均荧光强度。实验重复 3 次,每浓度设 3 复孔,取其平均值。

3. 体外 MR 成像:采用德国 Siemens Erlangen Verio 3.0 T MR 扫描仪及表面线圈对 $\text{HA-SS-PCL@DOX/SPIO}$ 及 HA-PCL@DOX/SPIO 溶液进行 T_2 Map 扫描,测定 T_2 信号强度,将其配成 SPIO 浓度为 10、20、40、80 $\mu\text{g/ml}$ 。将对数期 HepG_2 细胞 1×10^6 个/孔接种 12 孔板中,以 PBS 处理的细胞为对照组,按分组加入 $\text{HA-SS-PCL@DOX/SPIO}$ 及 HA-PCL@DOX/SPIO 溶液 200 μl ,与 HepG_2 细胞共孵育 2 h, PBS 清洗 3 次,加入 0.25% 的胰酶消化 3 min,收集细胞溶液(1 000 转/min, 5 min),弃上清,重悬于 2 ml PBS 中,取 1.5 ml 于 E_p 管行 MRI 扫描,测定其 T_2 信号的强弱。实验重复 3 次,每组设 3 复孔。

扫描采用 SE 序列,TE 80 ms,TR 1 000 ms,反转角 150°,层厚 3 mm,矩阵 444 \times 448。体素 0.5 mm \times 0.5 mm \times 3.0 mm,获取 5 幅 T_2 WI 结构性原始图及 1 幅 T_2 Map 图后,在 T_2 Map 图上测量 E_p 管轴面每个 ROI 的 T_2 信号强度,每个 ROI 测量 3 次,取平均值。

四、统计学分析

应用 SPSS 24.0 统计软件包。Kolmogorov-Smirnov 对计量资料进行正态性检验,符合正态分布的资料

用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间计量资料的比较采用 t 检验, 多组间计量资料的比较采用单因素方差分析, 组内两两比较采用 LSD(方差齐性)或 TamhaneT2(方差不齐)法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、二硫键优化透明质酸介导的肝癌靶向纳米探针的构建与表征

二硫键优化透明质酸介导的肝癌靶向纳米探针构建成功。透射电镜下显示其平均粒径为 (126.9 ± 6.3) nm, 呈大小均一的球形结构(图 1)。该纳米探针对于 DOX 及 SPIO 负载率分别为 61.4%、58.7%。

二、细胞存活率

1. HA-SS-PCL 纳米探针安全性评价: HA-SS-PCL 纳米探针浓度从 $10 \mu\text{g/ml}$ 逐渐增至 $500 \mu\text{g/ml}$ 时, 肝癌细胞 HepG₂ 及正常肝细胞 LO₂ 的生存率均维持在 80% 以上, 说明该纳米探针 HA-SS-PCL 对正常肝细胞及肝癌细胞的杀伤力较小, 安全性较高, 可用于接下来的实验研究(图 2)。

2. HA-SS-PCL@DOX/SPIO 纳米探针的细胞毒性: 随着 DOX 浓度的升高, HA-SS-PCL@DOX/SPIO 及 HA-PCL@DOX/SPIO 对人肝癌细胞 HepG₂ 杀伤力逐渐增强, 前者更为明显(图 3)。 t 检验结果显示, 当 DOX 浓度为 0.25 、 0.50 、 1.00 、 2.50 、 $5.00 \mu\text{g/ml}$ 时, 与 HA-PCL@DOX/SPIO 相比, HA-SS-PCL@DOX/SPIO 对肝癌细胞 HepG₂ 杀伤作用差异无统计学意义 (P 均 > 0.05)。当 DOX 浓度为 $10.00 \mu\text{g/ml}$ 时, 与 HA-PCL@DOX/SPIO 相比, HA-SS-PCL@DOX/SPIO 对 HepG₂ 人肝癌细胞杀伤作用差异有统计学意义 ($t = -6.249, P = 0.000$), 前者下降率为 66.6%, 后者下降率为 55.2%。因此, 在后续细胞实验研究中, 将 DOX 浓度设定为 $10.00 \mu\text{g/ml}$ 。

三、HA-SS-PCL@DOX/SPIO 纳米探针的体外结合实验

1. 免疫荧光成像: HA-SS-PCL@DOX/SPIO 及 HA-PCL@DOX/SPIO 纳米探针与肝癌细胞 HepG₂ 共孵育 4 h 后, 细胞膜

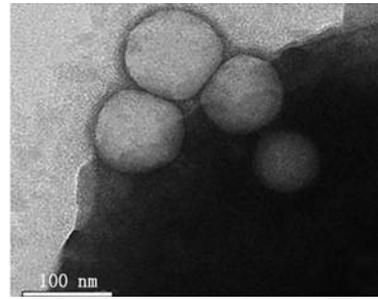


图 1 电子显微镜下显示透明质酸-二硫键-聚己内酯@阿霉素/超顺磁性氧化铁(HA-SS-PCL@DOX/SPIO)纳米颗粒粒径为 126.9 nm, 大小均一, 呈球形($\times 50\,000$)

及细胞质均具有较多的阳性荧光染色, 前者更为显著, 提示经二硫键优化的 HA-SS-PCL@DOX/SPIO 纳米探针作为抗癌药物载体对肝癌细胞 HepG₂ 具有更好的靶向结合作用(图 4, 5)。

2. 流式细胞检测结果: 对照组、HA-SS-PCL@DOX/SPIO 及 HA-PCL@DOX/SPIO 纳米胶束组平均几何荧光强度分别为 65.24 ± 26.04 、 245.06 ± 13.21 、 139.70 ± 8.52 , 各组间荧光强度的差异有统计学意义 ($F = 79.409, P = 0.000$), 其中两两比较的差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01), HA-SS-PCL@DOX/SPIO 组荧光强度最强,

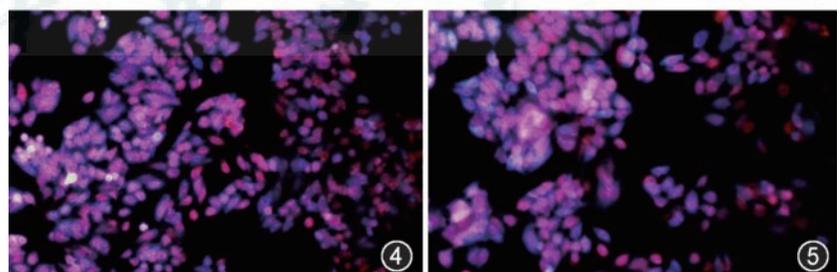
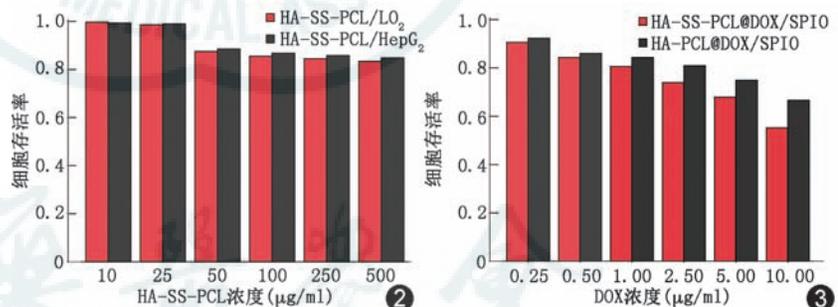


图 2 为肝癌细胞 HepG₂ 及正常肝细胞 LO₂ 与透明质酸-二硫键-聚己内酯(HA-SS-PCL)纳米颗粒孵育 48 h 后的细胞存活率情况。即使在 HA-SS-PCL 浓度很高 ($500 \mu\text{g/ml}$) 时, 其细胞存活率仍 $> 80\%$ 。图 3 为 HA-SS-PCL@DOX/SPIO、透明质酸-聚己内酯@阿霉素/超顺磁性氧化铁(HA-PCL@DOX/SPIO)与 HepG₂ 孵育 48 h 后的细胞存活率情况。随着阿霉素(DOX)浓度增高, 细胞存活率逐渐下降, HA-SS-PCL@DOX/SPIO 组下降更为明显。图 4, 5 为 HA-SS-PCL@DOX/SPIO、HA-PCL@DOX/SPIO 与肝癌细胞 HepG₂ 共孵育 4 h 后的荧光图($\times 100$)。HepG₂ 细胞膜及细胞质中均具有较多的阳性荧光染色, 前者更为显著。

HA-PCL@DOX/SPIO组次之。

3. 体外细胞MRI成像：无论是HA-SS-PCL@DOX/SPIO还是HA-PCL@DOX/SPIO组，与肝癌细胞HepG₂共同孵育2 h后，与对照组比较，T₂信号强度差异均有统计学意义(*F*值分别为613.591、569.234, *P*均<0.01)；另外，同一SPIO浓度下，HA-SS-PCL@DOX/SPIO组的T₂信号强度较HA-PCL@DOX/SPIO组下降更为明显(表1)。随着SPIO浓度的增加，无论是HA-SS-PCL@DOX/SPIO还是HA-PCL@DOX/SPIO组与HepG₂共同孵育2 h后，其T₂信号强度呈逐渐下降趋势，HA-SS-PCL@DOX/SPIO组下降更为明显(图6)。

讨 论

一、二硫键优化透明质酸介导的纳米探针主动

表1 各组纳米探针T₂信号强度及下降率的比较结果(*n*=9)

组别	T ₂ 信号强度 ($\bar{x} \pm s$)	T ₂ 信号强度下降率(%)
对照组	915.33±10.21	—
HA-SS-PCL@DOX/SPIO组		
SPIO为10 μg/ml	772.33±15.19	15.6
SPIO为20 μg/ml	545.78±4.46	40.3
SPIO为40 μg/ml	459.56±5.78	49.7
SPIO为80 μg/ml	341.22±7.53	62.7
HA-PCL@DOX/SPIO组		
SPIO为10 μg/ml	803.78±6.04	12.1
SPIO为20 μg/ml	615.33±12.95	32.8
SPIO为40 μg/ml	497.00±6.29	45.7
SPIO为80 μg/ml	370.22±9.15	59.6

注：HA：透明质酸；PCL：聚己内酯；DOX：阿霉素；SPIO：超顺磁性氧化铁；SS：二硫键；—：无数据

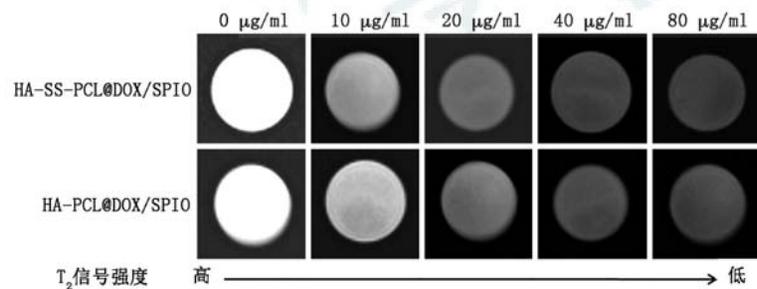


图6 为透明质酸-二硫键-聚己内酯@阿霉素/超顺磁性氧化铁(HA-SS-PCL@DOX/SPIO)、透明质酸-聚己内酯@阿霉素/超顺磁性氧化铁(HA-PCL@DOX/SPIO)纳米探针与肝癌细胞HepG₂共同孵育2 h后体外MRI图像。随着超顺磁性氧化铁(SPIO)浓度的增加，无论是HA-SS-PCL@DOX/SPIO还是HA-PCL@DOX/SPIO组的T₂信号强度呈逐渐下降趋势，HA-SS-PCL@DOX/SPIO组下降更明显

靶向性及高效抗癌性

靶向投递系统是近年来肿瘤药物治疗的研究热点，利用受体和配体结合的特异性，可实现对肿瘤的靶向监测和治疗。既往研究制备的纳米探针载体功能多数较单一，仅涉及靶向性研究，在靶向性基础上，如何进一步提高其对抗癌药物的释放，发挥其高效抗癌性涉及较少^[6]。透明质酸广泛存在于结缔组织中^[7]，可与许多上皮来源的肿瘤细胞表面的CD44受体特异性结合，同时可作为是纳米探针的亲水段，对其进行修饰，实现在体内的“隐身”和长循环^[8]。二硫键在细胞外介质及体液循环中能够稳定存在，当进入肿瘤细胞内则会发生断裂^[9-10]。因此，笔者尝试利用纳米制备技术，将HA负载在纳米探针的亲水性外壳上，利用二硫键连接，制备一种二硫键优化透明质酸介导的肝癌靶向纳米探针，以期提高纳米探针作为载体的高效抗癌性。

本研究中，笔者采用高效温和的点击化学反应成功制备由二硫键链接的透明质酸/聚己内酯两亲性嵌段聚合物。以该嵌段聚合物为载体，通过透析法同时包载疏水性的肿瘤药物阿霉素及MR成像对比剂SPIO，得到二硫键优化透明质酸介导的肝癌靶向纳米探针。其粒径为126.9 nm，呈大小均一的球形结构，对DOX及SPIO负载率分别为61.4%、58.7%，表明该纳米探针作为载体具有较好的物理稳定性及发挥高效抗癌的可行性。细胞毒性实验进一步显示未载药纳米探针HA-SS-PCL即使较高浓度下，细胞存活率均维持在80%以上，具有较好的生物安全性及相容性。载药纳米探针HA-SS-PCL@DOX/SPIO，当DOX浓度达到10.00 μg/ml时，HepG₂细胞的存活率在50%以下，其细胞生存率明显低于HA-PCL@DOX/SPIO，表明经二硫键优化的纳米探针在体外细胞水平具有更高效的抗癌性。笔者将HA-SS-PCL@DOX/SPIO、HA-PCL@DOX/SPIO分别与人肝癌细胞HepG₂孵育4 h后，通过免疫荧光法、流式细胞检测从体外细胞水平验证了经二硫键优化透明质酸介导的纳米探针HA-SS-PCL@DOX/SPIO对人肝癌细胞HepG₂细胞具有更好的靶向性。

二、二硫键优化透明质酸介导的纳米探针MRI的可行性

纳米探针作为抗癌药物载体,如何对其疗效进行早期监测是研究关注的焦点^[11]。MRI 多采用的对比剂是 Gd-DTPA,能缩短组织的 T₁ 弛豫时间,对 T₂ 弛豫时间的影响较小,由于 Gd³⁺ 的毒副作用,影响了其应用。SPIO 作为一种 MRI 阴性对比剂,可显著缩短 T₂ 弛豫时间,对 T₁ 时间影响甚微,且 SPIO 颗粒小、穿透力强,弛豫率为同样条件下 Gd³⁺ 的 7~10 倍,同时具有生物可降解性,近年来引起广泛关注^[12]。然而,SPIO 在体内的分布具有明显的特异性,在到达肿瘤细胞之前容易被网状内皮系统的巨噬细胞吞噬。因此,笔者试图利用透析方法将 SPIO 包载于 HA-SS-PCL 的内部,从而避开巨噬细胞的吞噬,到达肿瘤细胞内。本研究中以 PBS 为对照,通过体外细胞 MRI 分别评价了 HA-SS-PCL@DOX/SPIO 及 HA-PCL@DOX/SPIO 成像的可行性,结果显示,HA-SS-PCL@DOX/SPIO 及 HA-PCL@DOX/SPIO 较对照组其 T₂ 信号强度均有明显下降,同等 SPIO 浓度下 HA-SS-PCL@DOX/SPIO 组其 T₂ 信号强度下降更为明显,提示经二硫键优化透明质酸介导的纳米探针 HA-SS-PCL@DOX/SPIO 对人肝癌细胞 HepG₂ 细胞具有更好的靶向性及 MRI 的可行性。

综上所述,经二硫键优化的透明质酸介导的纳米探针具有良好的理化性质,在体外细胞实验中对人肝癌细胞 HepG₂ 有较好的靶向标记作用及 MR 显像功能。然而,本研究仍停留在体外细胞实验的基础上,未对纳米微粒最佳给药浓度进行测定,纳米微粒尺寸的控制还不够理想,这是本研究的不足之处。笔者将在后续实验中不断完善改进上述不足,体内动物实验是课题组的下一步计划。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Son GM, Kim HY, Ryu JH, et al. Self-assembled polymeric micelles based on hyaluronic acid-g-poly(D, L-lactide-co-glycolide) copolymer for tumor targeting[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(9): 16057-16068. DOI: 10.3390/ijms150916057.
- [2] 洛小璐,李静,周纯武.磁共振-荧光双模态显像联合光热治疗在人表皮生长因子受体 2 阳性乳腺癌模型中的应用[J]. *中华肿瘤杂志*, 2018, 40(8): 587-593. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2018.08.005.
- [3] Smejkalová D, Nešporová K, Hermannová M, et al. Paclitaxel isomerisation in polymeric micelles based on hydrophobized hyaluronic acid[J]. *Int J Pharm*, 2014, 466(1-2): 147-155. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.03.024.
- [4] Zhang Y, Wu K, Sun H, et al. Hyaluronic acid-shelled disulfide-cross-linked nanopolymerosomes for ultrahigh-efficiency reactive encapsulation and CD44-targeted delivery of mertansine toxin[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10(2): 1597-1604. DOI: 10.1021/acsami.7b17718.
- [5] Zhang Y, Heher P, Hilborn J, et al. Hyaluronic acid-fibrin interpenetrating double network hydrogel prepared in situ by orthogonal disulfide cross-linking reaction for biomedical applications[J]. *Acta Biomater*, 2016, 38: 23-32. DOI: 10.1016/j.actbio.2016.04.041.
- [6] 杨蕊梦,唐文洁,韦敏燕,等.双靶点磁性、荧光双模态分子探针的制备及对乳腺癌体外靶向结合的可行性[J]. *中华放射学杂志*, 2016, 50(1): 41-46. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-1201.2016.01.010.
- [7] Ossipov DA, Piskounova S, Varghese OP, et al. Functionalization of hyaluronic acid with chemoselective groups via a disulfide-based protection strategy for in situ formation of mechanically stable hydrogels[J]. *Biomacromolecules*, 2010, 11(9): 2247-2254. DOI: 10.1021/bm1007986.
- [8] Zhang P, Zhang H, He W, et al. Disulfide-linked amphiphilic polymer-docetaxel conjugates assembled redox-sensitive micelles for efficient antitumor drug delivery[J]. *Biomacromolecules*, 2016, 17(5): 1621-1632. DOI: 10.1021/acs.biomac.5b01758.
- [9] Kellett-Clarke H, Stegmann M, Barclay AN, et al. CD44 binding to hyaluronic acid is redox regulated by a labile disulfide bond in the hyaluronic acid binding site[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0138137. DOI: 10.1371/journal.pone.0138137.
- [10] Liu Y, Sun J, Lian H, et al. Folate and CD44 receptors dual-targeting hydrophobized hyaluronic acid paclitaxel-loaded polymeric micelles for overcoming multidrug resistance and improving tumor distribution[J]. *J Pharm Sci*, 2014, 103(5): 1538-1547. DOI: 10.1002/jps.23934.
- [11] Oros-Peusquens AM, Loucao R, Zimmermann M, et al. Methods for molecular imaging of brain tumours in a hybrid MR-PET context: water content, T₂(*), diffusion indices and FET-PET[J]. *Methods*, 2017, 130: 135-151. DOI: 10.1016/j.ymeth.2017.07.025.
- [12] Kanamoto M, Miyati T, Terashima K, et al. Simultaneous detection of hepatocellular carcinoma and vessel thrombus by using SPIO-enhanced B-TFE with the T₂ preparation pulse technique[J]. *Radiol Phys Technol*, 2017, 10(2): 234-239. DOI: 10.1007/s12194-017-0389-2.

(收稿日期:2018-11-14)

(本文编辑:张晓冬)