

# 乳腺癌微环境响应的透明质酸纳米粒的构建及其体外功能评价

龙凯花<sup>1</sup>, 王春柳<sup>2</sup>, 李晔<sup>2\*</sup>, 张红<sup>2</sup>, 刘洋<sup>2</sup>, 孙婷婷<sup>2</sup>, 宗时宇<sup>2</sup> (1. 西安培华学院, 西安 710125; 2. 陕西省中医药研究院, 西安 710003)

**摘要:**目的 探讨透明质酸修饰的乳腺癌微环境响应纳米粒的制备方法, 并对其理化性质, 体外功能进行评价。方法 首先通过脲键将透明质酸(HA)与聚天冬氨酸(PASP)连接, 制备聚合物 HA-PASP, 并且采用聚乙二醇(PEG)制备对照聚合物 PEG-PASP。以多柔比星(DOX)为模型药物, 采用透析法制备纳米粒 HA-PASP-NPs@ DOX 和 PEG-PASP-NPs@ DOX。采用粒度测定仪和透射电镜(TEM)观察纳米粒粒径、形态及 Zeta 电位; 纳米粒的理化性质从包封率、载药量、稳定性、释药能力等方面进行评价; 体外功能从乳腺癌细胞靶向性、肿瘤微环境响应性进行评价。结果 HA-PASP-NPs@ DOX 呈球形大小均一, 平均粒径为  $(143 \pm 21)$  nm, 平均 Zeta 电位  $(-27.8 \pm 3.8)$  mV, 包封率和载药量为 58.3% 和 5.2%; 在 pH 7.4 条件下纳米粒结构稳定超过 30 d, 在 pH 6.5 条件下药物释放高达 96%; HA-PASP-NPs@ DOX 对 MDA-MB-231 细胞具有靶向性, 提高肿瘤细胞对 DOX 的摄取。结论 透析法制备的 HA-PASP-NPs@ DOX 粒径均一, 能有效包裹 DOX, 实现对乳腺癌细胞的靶向以及在肿瘤酸性的环境中高效释放药物, 从而提高抗肿瘤活性。

**关键词:** 乳腺癌; 抗肿瘤活性; CD44; 酸敏; 纳米粒

doi:10.11669/cpj.2019.16.006 中图分类号:R944 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2019)16-1311-06

## Construction of Hyaluronic Acid Nanoparticles Responsive to Breast Cancer Microenvironment and Evaluation of Its Function *In Vitro*

LONG Kai-hua<sup>1</sup>, WANG Chun-liu<sup>2</sup>, LI Ye<sup>2\*</sup>, ZHANG Hong<sup>2</sup>, LIU Yang<sup>2</sup>, SUN Ting-ting<sup>2</sup>, ZONG Shi-yu<sup>2</sup> (1. Xi'an Peihua University, Xi'an 710125, China; 2. Shaanxi Academy of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710003, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To prepare hyaluronic acid (HA)-modified breast cancer microenvironment respond nanoparticles and investigate their physicochemical properties as well as *in vitro* function. **METHODS** The polymer HA-PASP was prepared by linking HA with polyaspartic acid (PASP) through a hydrazone bond. Polyethylene glycol (PEG) was used as contrast material for PEG-PASP. Using Doxorubicin (DOX) as a model drug, HA-PASP-NPs@ DOX and PEG-PASP-NPs@ DOX were prepared by dialysis method. Particle size, morphology and Zeta potential of nanoparticles were observed by particle size tester and transmission electron microscope (TEM). The physical and chemical properties of nanoparticles were evaluated including encapsulation efficiency, drug loading, stability and drug release ability. *In vitro* function was evaluated including breast cancer cell targeting and tumor microenvironmental response. **RESULTS** HA-PASP-NPs@ DOX was spherical and uniform, size was  $(143 \pm 21)$  nm and Zeta potential was  $(-27.8 \pm 3.8)$  mV, encapsulation efficiency was 58.3% and drug loading was 5.2%. Under pH 7.4, the structure of nanoparticles was stable for more than 30 d, but under pH 6.5 the drug release up to 96%. HA-PASP-NPs@ DOX was targeted to MDA-MB-231 cells, which increased DOX uptake by tumor cells. **CONCLUSION** The HA-PASP-NPs@ DOX could be successfully prepared by dialysis method, which target breast cancer cells and release drugs efficiently in an acidic environment, what's more, increase cytotoxicity activity. **KEY WORDS:** breast cancer; anti-tumor activity; CD44; acid sensitivity; nanoparticle

透明质酸(HA)是一种天然存在的非硫酸化黏多糖,是细胞外基质重要的组成部分,一半以上分布在皮肤,因此 HA 具有良好的生物相容性,安全无毒<sup>[1]</sup>。CD44 是存在于细胞膜表面的一种跨膜糖蛋白,调控细胞基质和细胞与细胞间的相互作用,由于 CD44 有 10 种不同的外显子,所以在细胞外的表达

形式分为 CD44v6-15,它们是肝癌、乳腺癌、肺癌、胰腺癌、结肠癌、淋巴瘤等发生转移的蛋白标记物,并且与肿瘤侵袭和转移具有显著相关性<sup>[2]</sup>。HA 是 CD44 的主要配体,其中必要结合位点为两个 BX7B 结构(X7 为任意 7 个非酸性氨基酸,B 为赖氨酸或精氨酸)<sup>[3]</sup>。肿瘤细胞表面表达的 CD44 远高于正

**基金项目:** 陕西省科技统筹创新工程计划项目资助(2016KTCL03-14); 陕西省创新药物研究中心资助(2017YWZX-02)

**作者简介:** 龙凯花,女,硕士研究生 研究方向: 中药新型给药系统 \* 通讯作者: 李晔,女,研究员,硕士生导师 研究方向: 中药新型给药系统 Tel: (029)87251837 E-mail: liyelsj@163.com

常细胞,使得 HA 高效靶向于肿瘤细胞。因此,将药物或纳米药物载体(脂质体、微囊、胶束)与 HA 结合后可靶向 CD44 特异性表达的肿瘤细胞,实现药物在肿瘤细胞的富集<sup>[4]</sup>。

利用对肿瘤微环境或外界刺激响应的聚合物组装载体包裹抗肿瘤药物是选择性释放药物的重要策略,它们在体内循环过程中保持稳定,到达肿瘤部位后,经过刺激响应,物理化学性质发生变化,高效的释放负载药物,提高肿瘤组织和细胞内的药物浓度,从而提高疗效<sup>[5]</sup>。在所有的刺激中,酸性 pH 被视为纳米粒选择性释放抗肿瘤药物的理想“触发器”,因为在体内存在明显的 pH 梯度,原发性和转移性肿瘤中 pH 值(6.8)均低于正常组织和血液的 pH 值(7.4)<sup>[6]</sup>。基于以上研究背景,本实验以乳腺癌细胞 MDA-MB-231 为模型,设计一种 HA 修饰的酸敏纳米粒,实现对肿瘤细胞的主动靶向,并且在酸性的肿瘤细胞中高效快速释放抗肿瘤药物,提高纳米粒的抗肿瘤活性,为纳米递药系统的临床应用奠定基础。

## 1 材料

### 1.1 试剂

聚天冬氨酸(PASP,百灵威有限公司,相对分子质量 5 000),HA(山东福瑞达有限公司,相对分子质量 35 000),多柔比星(DOX,浙江海正有限公司),二甲基亚砜(DMSO,天津富宇有限公司),透析袋(截留相对分子质量 1 000 和 5 000)、肝素、生理盐水(科昊生物科技有限公司),4%多聚甲醛、hoechst(碧云天生物科技有限公司),DMEM 培养液(Sigma 公司),MTT(北京鼎国生物科技有限公司)。

### 1.2 仪器

S-4800 型透射电镜(日本日立公司),ZF-2 型三用紫外仪(北京六一仪器厂),Pipetman 加样枪(Effendorf 公司),INOVA-400 MHz 型超导核磁共振仪(美国 Varian 公司),冷冻干燥机(美国 SIM 公司),Zeta 电位及纳米粒度分析仪(美国贝克曼库尔特仪器有限公司),L3-5RK 离心机(上可成仪器分析厂),970CRT 荧光分光光度计(上海精密仪器有限公司),HH.CP-01 二氧化碳恒温培养箱(上海和呈仪器制造有限公司),Leica TCS SP2-激光共聚焦显微镜(德国 LEICA 公司),酶标仪(美国 Bio-Rad Laboratories 公司)。

### 1.3 细胞与动物

人乳腺癌细胞 MDA-MB-231(中科院上海细胞

库),SD 大鼠(SPF 级,西安交通大学医学院实验动物中心)。

## 2 方法

### 2.1 纳米粒的制备

**2.1.1 HA-PASP 的合成** 20 mL 蒸馏水中加入 PASP(800 mg,0.1 mmol),用 EDCI(573 mg,3 mmol),NHS(345 mg,3 mmol)和 TEA 100  $\mu$ L 室温搅拌 12 h 活化 PASP 上的部分羧基,随后加入  $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1.2 mL,2 mmol)搅拌 12 h。反应混合物在透析袋(截留相对分子质量 1 000)中透析 6 h,每 3 h 换 1 次水,透析结束后在  $1\ 000 \times g$  离心 10 min 取上清液,冻干,得到 PASP-CONHNH<sub>2</sub>。HA(35 mg,0.01  $\mu$ mol)溶于 20 mL 蒸馏水后,加 PASP-CONHNH<sub>2</sub>(86 mg,0.172 mmol)和 20  $\mu$ L TFA 室温搅拌 12 h。反应混合物在透析袋(截留相对分子质量为 5 000)中对水透析 6 h,每 3 h 换 1 次水,冻干透析袋内的液体,得到终产物 HA-PASP。

**2.1.2 PEG-PASP 的合成** 20 mL 蒸馏水中加入 PASP(800 mg,0.1 mmol),用 EDCI(174 mg,1 mmol),NHS(103 mg,1 mmol)和 TEA 50  $\mu$ L 室温搅拌 12 h 活化 PASP 上的部分羧基,随后加入 PEG-NH<sub>2</sub>(400 mg,0.1 mmol)搅拌 12 h。反应混合物在透析袋(截留相对分子质量 1 000)中透析 6 h,每 3 h 换 1 次水,透析结束后在  $1\ 000 \times g$  离心 10 min 取上清液,冻干,得到 PEG-PASP。

**2.1.3 HA-PASP 和 PEG-PASP 的安全性评价** 通过红细胞溶血实验评价材料的安全性。大鼠眼眶取血 4 mL,加一定量的肝素防止凝血,用 5 mL 的生理盐水稀释。将聚合物 HA-PASP 和 PEG-PASP 分别用 pH 7.4 的 PBS 配制成 500  $\mu$ L 浓度为  $1\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液,加入 500  $\mu$ L 的上述稀释血液,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 60 min 后, $12\ 000 \times g$  离心 5 min。将 1 mL 上清液加入到 2 mL 体积分数 99% 乙醇-盐酸(37%,W/V)为 39:1 的混合溶液中,离心 5 min,取 3 mL 上清液,紫外分光光度计在 398 nm 处测吸光度值(A)。计算公式如下:

溶血率  $\text{HR}(\%) = (A_{\text{样}} - A_{\text{阴}}) / (A_{\text{阳}} - A_{\text{阴}}) \times 100\%$ 。其中阳性为蒸馏水与稀释的血液孵育,阴性为 0.9% 生理盐水与稀释的血液孵育。

**2.1.4 纳米粒 HA-PASP-NPs@DOX 和 PEG-PASP-NPs@DOX 的制备** 3 mg DOX  $\cdot$  HCl 溶于 6 mL DMSO 中,加入 3  $\mu$ L TEA,80  $^{\circ}\text{C}$  油浴避光搅拌 0.5 h,得到游离的 DOX。加入 10 mg HA-PASP 或 PEG-

PASP 继续搅拌 3 h, 然后缓慢滴加 30 mL 蒸馏水持续搅拌 3 h, 上述混合液避光对水透析(截留相对分子质量为 5 000) 3 h, 冻干透析袋中的液体, 得到 HA-PASP-NPs@ DOX 和 PEG-PASP-NPs@ DOX。

## 2.2 纳米粒的理化性质

**2.2.1 粒径和 Zeta 电位** 称取 1 mg 的冻干纳米粒溶于 3 mL 蒸馏水中, 用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤, 用粒度测定仪测定纳米粒粒径分布和 Zeta 电位。

**2.2.2 形态表征** 称取 1 mg 冻干纳米粒溶于 1 mL 蒸馏水中, 用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后, 取 1 滴滴于铜网上, 待溶剂快干时, 加一滴磷钨酸复染, 干燥后用透射电镜进行观察。

**2.2.3 载药量和包封率** 以 DMSO 为溶剂分别配制含 DOX 0.1、1、2、3、5、10、15  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的标准溶液, 采用荧光分光光度法在激发波长为 470 nm, 发射波长为 597 nm 处测定上述溶液的荧光强度, 以质量浓度为横坐标, 荧光强度为纵坐标绘制标准曲线, 得到线性范围在 0.1 ~ 15  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  之间的标准曲线回归方程为  $y = 23.625\rho + 1.043$ ,  $r^2 = 0.9981$ 。

称取 1 mg 的冻干纳米粒, 避光条件下在 3 mL DMSO 中超声溶解, 待测。先用 DMSO 在激发波长为 470 nm, 发射波长为 597 nm 处将荧光分光光度计调零, 将上述溶解好的纳米粒稀释到 0.1 ~ 15  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 测定荧光强度。根据以下公式乘以稀释倍数测定载药量和包封率: 载药量% = (胶束中的药量/胶束的量)  $\times 100\%$ ; 包封率% = (胶束中的药量/投入的药物总量)  $\times 100\%$ 。

**2.2.4 稳定性研究** 称取 1 mg 的冻干 HA-PASP-NPs@ DOX 和 PEG-PASP-NPs@ DOX。分别分散于蒸馏水中, 用 0.45  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤, 每 3 d 用激光粒度分析仪测定胶束粒径和 PDI 的变化。

**2.2.5 释药行为** 称取 5 mg 的 HA-PASP-NPs@ DOX 和 PEG-PASP-NPs@ DOX 分别溶于 5 mL 的 pH 6.5 和 pH 7.4 的 PBS 缓冲液中, 待充分溶解后装入截留相对分子质量为 5 000 的透析袋中, 分别置于 50 mL pH 6.5 和 pH 7.4 的磷酸缓冲液中, 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温震荡避光透析, 分别在 0.5、1、3、7、12、24、36、48、72 h 取 3 mL 透析袋外的液体, 在激发波长为 470 nm 发射波长为 597 nm 处测量荧光强度值, 并补加 3 mL 相应的 PBS 缓冲液。根据 DOX 标准曲线计算累积释药量, 以时间为横坐标, DOX 释放量为纵坐标绘制释药曲线。

## 2.3 纳米粒的体外功能评价

### 2.3.1 不同 pH 条件下 MDA-MB-231 对纳米粒的

摄取 将 MDA-MB-231 细胞接种于放有盖玻片的 24 孔板中(细胞浓度为  $1 \times 10^4$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$ , 每孔 2 mL), 孵育过夜待细胞贴壁, 弃去培养液, 将 HA-PASP-NPs@ DOX 和 PEG-PASP-NPs@ DOX 分别溶于 pH 6.5 和 pH 7.4 的培养液中(折合 DOX 质量浓度为 20  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 以每孔 2 mL 加入 24 孔板中, 孵育 20 min 和 3 h, 弃去培养液, 取出盖玻片, PBS 清洗 2 次每次 2 min, 然后用 hoechst (1:10 000) 避光染色 10 min, 再用 PBS 清洗 2 次每次 2 min。用 4% 多聚甲醛固定盖玻片上的细胞 15 min, 甘油封片, 激光共聚焦显微镜下观察细胞对纳米粒的摄取。

**2.3.2 抗乳腺癌细胞活性研究** 利用 MTT 测定 DOX、HA-PASP-NPs@ DOX 和 PEG-PASP-NPs@ DOX 对 MDA-MB-231 细胞的毒性。将 MDA-MB-231 细胞接种于 96 孔板中(细胞浓度为  $1 \times 10^4$  个  $\cdot 200 \mu\text{L}^{-1}$ , 每孔 200  $\mu\text{L}$ ), 孵育过夜待其贴壁, 弃培养液, 加入分别含有 DOX、HA-PASP-NPs@ DOX 和 PEG-PASP-NPs@ DOX (折合 DOX 8  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) pH 为 6.5 和 pH 7.4 的培养液, 孵育 24 h。加入质量浓度为 5  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 20  $\mu\text{L}$  MTT 再孵育 4 h, 将 96 孔板中的培养液弃去, 加入 200  $\mu\text{L}$  DMSO, 并置于摇床振摇 15 min, 酶标仪在 492 nm 处测定吸光度值, 每个实验设 5 个复孔, 细胞生存率% = (给药后的吸光度值/对照吸光度值)  $\times 100\%$ , 以药物浓度为横坐标, 以生存率为纵坐标绘制生存率曲线。

## 3 结果

### 3.1 HA-PASP 和 PEG-PASP 的结构验证

HA-PASP 和 PEG-PASP 的  $^1\text{H-NMR}$  结果( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 Hz) 见图 1,  $\delta = 3.14$  为 PEG 中  $[-\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{O} -]$  的特征峰,  $\delta = 3.28 \sim 3.85$  为 HA 中糖苷键  $[-\text{CH}(\text{CH}_2) -]$  的特征峰,  $\delta = 2.6$  为 PASP 中  $[-\text{OC} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}(\text{NH}) -]$  的特征峰,  $\delta = 3.5$  为胺键的特征峰, 结合图谱可知合成的 2 种聚合物为目标产物。

### 3.2 不同处方对纳米粒理化性质的影响

为了得到粒径更小, 载药量更高的纳米粒, 笔者通过改变药物材料比, 优化纳米粒的载药量和包封率, 通过改变蒸馏水量、搅拌时间优化纳米粒的大小和均一性。随着蒸馏水的不断增多, 纳米粒的粒径不断减小, 并且 PDI 也同时减小, 说明纳米粒的均一性也有所提高; 随着搅拌时间的增加, 纳米粒的粒径也逐渐减少(表 1)。当药物的投放比例不断增加, 载药量与包封率也不断增加, 当这一比例增加到 4:10 时, 载药量减少, 见表 2。

### 3.3 HA-PASP-NPs@DOX 和 PEG-PASP@DOX 的理化性质表征

从 DLS 图可以看到,2 种纳米粒的粒径在 120 nm 左右,通过 TEM 观察为光滑的球形,呈典型的壳核结构(图 2A,2B)。将 2 种纳米粒充分溶解在 pH 为 7.4 的蒸馏水中,30 d 内粒径均没有发生显著的变化,并且没有沉淀析出溶液透亮,说明纳米粒在正常的体液环境中能够稳定存在(图 2C)。聚合物材料 HA-PASP 和 PEG-PASP 与大鼠红细胞共孵育 60 min 后溶血率均 < 5%,根据文献[7]报道可视为安全材料,可作为纳米粒载体,进行后续实验(图 2D)。

### 3.4 纳米粒的乳腺癌细胞靶向性与酸敏性研究

为了验证纳米粒的酸敏性,笔者首先在体外进行了释药实验,纳米粒 PEG-PASP-NPs@DOX 在 pH 6.5 和 pH 7.4 的环境中释药没有显著性差异,72 h 后释药量仍不足 40%(图 3A);图 3B 所示是纳米粒 HA-PASP-NPs@DOX 的释药情况,在 pH 7.4 条件

下 72 h 累计释药量 < 35%,在 pH 6.5 条件下 2 h 的释药量达到 78%,10 h 后释药量高达 95%。其次,通过激光共聚焦实验观察不同 pH 条件下 MDA-MB-231 细胞对 HA-PASP-NPs@DOX 的摄取,实验结果再次印证 pH 6.5 的酸性环境中,由于腺键断裂,大量的 DOX 摄取到细胞核中(图 3C)。我们将 2 种纳米粒与 MDA-MB-231 细胞在 pH 7.4 的条件下,共同孵育 20 min 观察 2 种纳米粒对乳腺癌细胞的靶向性,见图 3D, HA-PASP-NPs@DOX 孵育后细胞中 DOX 的含量明显多于 PEG-PASP-NPs@DOX 组,说明 HA 在纳米粒的表面发挥靶向作用。

### 3.5 纳米粒的体外毒性研究

将 2 种纳米粒在不同 pH 条件下对 MDA-MB-231 的毒性作用进行比较,见图 4。从图 4 中可见, HA-PASP-NPs@DOX 在 pH 6.5 条件下,乳腺癌细胞的存活率最低,这一结果说明,在酸性条件下 HA-PASP-NPs@DOX 中的腺键断裂,彻底释放出 DOX,发挥抗肿瘤作用。

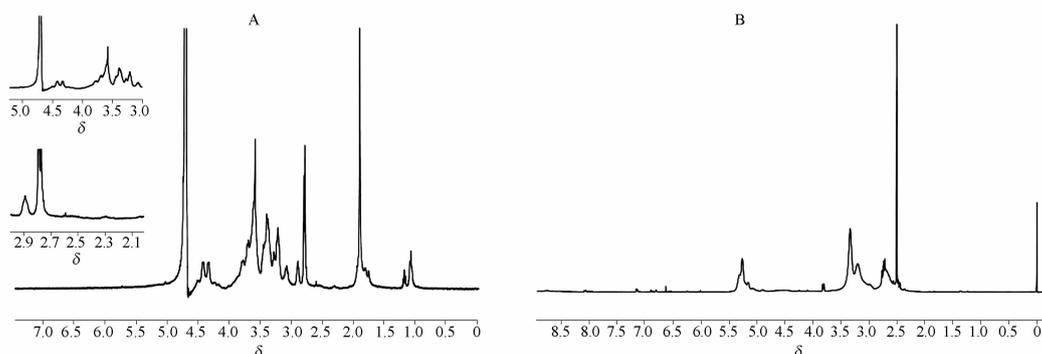


图 1 透明质酸-聚天冬氨酸聚合物(HA-PASP)(A)和聚乙二醇-聚天冬氨酸聚合物(PEG-PASP)(B)的核磁图谱

Fig. 1 NMR of HA-PASP(A) and PEG-PASP(B)

表 1 蒸馏水量和搅拌时间对纳米粒理化性质的影响.  $n = 5, \bar{x} \pm s$

Tab. 1 The effect of water and stirring time on nanoparticle physicochemical property.  $n = 5, \bar{x} \pm s$

Parameters	V(Water)/mL			Time/h		
	10	20	30	1	2	3
Size	215 ± 27	189 ± 21	159 ± 17	301 ± 34	257 ± 29	199 ± 21
PDI	0.34 ± 0.12	0.18 ± 0.11	0.06 ± 0.02	0.27 ± 0.12	0.23 ± 0.16	0.26 ± 0.12
Zeta	-17.4 ± 3.5	-23.4 ± 3.6	-25.3 ± 5.2	-24.3 ± 4.2	-25.2 ± 5.2	-28.3 ± 4.2

表 2 药物-材料对纳米粒理化性质的影响.  $n = 5, \bar{x} \pm s$

Tab. 2 The effect of different polymers on nanoparticle physicochemical property.  $n = 5, \bar{x} \pm s$

Drug-material	DL/%	EE/%
1:10	2.4 ± 0.9	26.3 ± 3.5
3:10	5.1 ± 1.1	39.5 ± 2.4
4:10	4.8 ± 1.5	55.8 ± 3.1

## 4 讨论

DOX 是一种作用于 DNA 化学结构的广谱抗肿瘤药物,对于急性白血病、恶性淋巴瘤、乳腺癌、肺癌、卵巢癌等恶性程度较高的癌症均有较好的作用<sup>[8]</sup>。但由于心脏毒性作用,使其在临床中的应用受到极大的限制,并且当药物进入到体内后缺乏

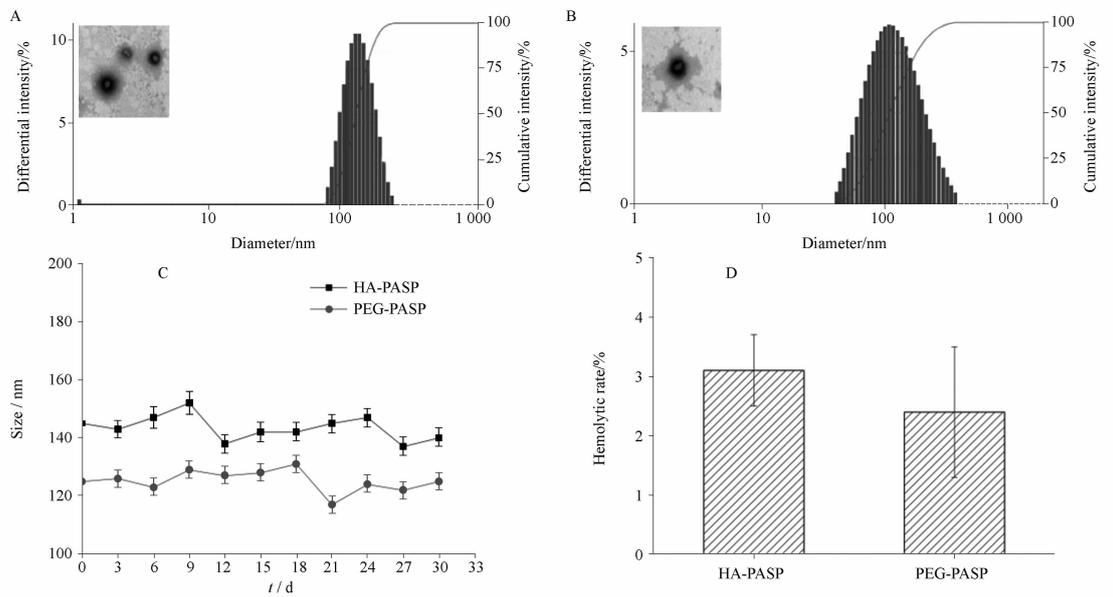


图2 纳米粒的理化性质评价.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

A, B - 2 种纳米粒的 TEM 和 DLS 图; C - 2 种纳米粒的稳定性示意图; D - 2 种材料对红细胞的溶血率

Fig. 2 The evaluation of nanoparticle physicochemical property.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

A, B - the TEM and DLS of two nanoparticles; C - the stability of two nanoparticles; D - the red blood cells hemolysis rate of two polymer

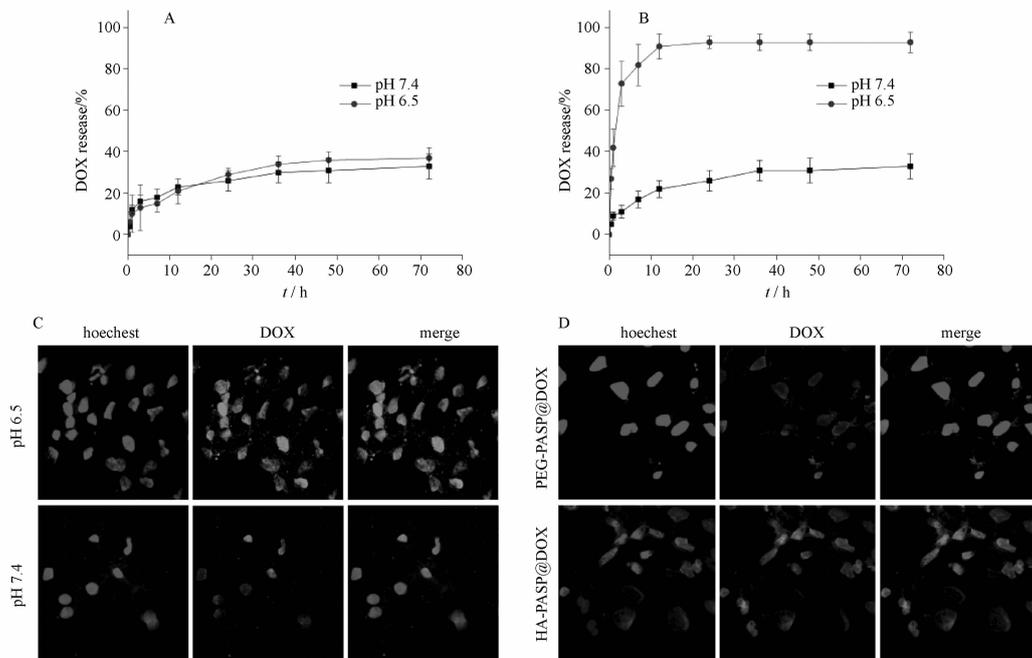


图3 纳米粒的乳腺癌细胞酸敏性与靶向性.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

A - PEG-PASP-NPs@DOX 在不同 pH 条件下的释药; B - HA-PASP-NPs@DOX 在不同 pH 条件下的释药; C - 激光共聚焦观察在不同 pH 条件下 HA-PASP-NPs@DOX 的摄取; D - 在 pH 7.4 条件下共聚焦观察 2 种纳米粒的靶向性

Fig. 3 Acid sensitivity and targeting of nanoparticles.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

A - PEG-PASP-NPs@DOX; B - HA-PASP-NPs@DOX; C - the cellular uptake of HA-PASP-NPs@DOX by LSCM under different pH; D - the targeting of two nanoparticles by LSCM under pH 7.4

靶向性,在破坏肿瘤组织的同时对正常组织也产生了损害<sup>[9]</sup>。纳米技术是 21 世纪世界各国经济发展

的驱动力之一。纳米技术在医药领域的应用极为广泛,其中最引人注目的是纳米递药系统,据不完全

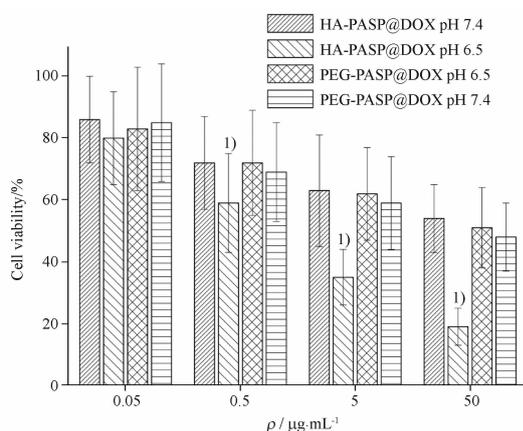


图4 2种纳米粒在不同pH条件下对MDA-MB-231细胞的抗肿瘤活性作用。n=5,  $\bar{x} \pm s$

Fig. 4 The antitumor activity of two nanoparticles to MDA-MB-231 cells under different pH. n=5,  $\bar{x} \pm s$

统计,全世界制药企业作为新型药物制剂开发的纳米药物立项多达270余项,其中已上市和正在进行临床研究的药物共56个<sup>[10-11]</sup>。本实验采用脲键作为纳米粒的骨架,在肿瘤偏酸性的环境中纳米粒快速破裂,释放出DOX,通过体外释药及稳定性实验结果,证明纳米粒在正常环境中稳定存在,在酸性条件下DOX快速高效的释放,释放量大于95%,提高了DOX的利用率。该纳米粒采用HA外壳修饰,通过激光共聚焦观察纳米粒与MDA-MB-231细胞短时间孵育后,HA-PASP-NPs@DOX组的吸附量明显高于PEG-PASP-NPs@DOX组,说明HA与细胞表面CD44的高亲和力,将大量的HA-PASP-NPs@DOX靶向到细胞表面。为了得到载药量高且粒径均一的纳米粒,我们对制备条件进行了优化,增加蒸馏水量和搅拌时间后,有可能是聚合物得到充分自组装,使得纳米粒的粒径明显减小,并且粒径分布更加均一;通过改变药物-材料的投放比,当这一比例为3:10时在保证不浪费原材料的同时载药量与封装率达到最大值。综上所述,本实验以DOX为模型

药物,进一步考察了透明质酸修饰的核壳纳米粒的理化性质和体外功能评价,纳米粒呈现良好的酸敏性和靶向特性,具有良好的抗肿瘤活性。

## REFERENCES

- [1] MIN K H, KIM J H, BAE S M, *et al.* Tumoral acidic pH-responsive MPEG-poly(beta-amino ester) polymeric micelles for cancer targeting therapy[J]. *J Controlled Release*, 2010, 144(2):259-266.
- [2] BAE Y, FUKUSHIMA S, HARADA A, *et al.* Design of environment-sensitive supramolecular assemblies for intracellular drug delivery: polymeric micelles that are responsive to intracellular pH change[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2003, 42(38):4640-4643.
- [3] CUI N, QIAN J, LIU T, *et al.* Hyaluronic acid hydrogel scaffolds with a triple degradation behavior for bone tissue engineering[J]. *Carbohydr Polym*, 2015, 126:192-198.
- [4] ADDISON W N, NELEA V, CHICATUN F, *et al.* Extracellular matrix mineralization in murine MC3T3-E1 osteoblast cultures: an ultrastructural, compositional and comparative analysis with mouse bone[J]. *Bone*, 2015, 71(12):244-256.
- [5] ZHONG Y, GOLTSCHKE K, CHENG L, *et al.* Hyaluronic acid-shelled acid-activatable paclitaxel prodrug micelles effectively target and treat CD44-overexpressing human breast tumor xenografts *in vivo*[J]. *Biomaterials*, 2016, 84(13):250-261.
- [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 Res*, 2013, 73(8):2412-2417.
- [7] MILLER T, BREYER S, VAN COLEN G, *et al.* Premature drug release of polymeric micelles and its effects on tumor targeting[J]. *Int J Pharm*, 2013, 445(1-2):117-124.
- [8] HE Q, ZHANG Z, GAO F, *et al.* *In vivo* biodistribution and urinary excretion of mesoporous silica nanoparticles: effects of particle size and PEGylation[J]. *Small*, 2011, 7(2):271-280.
- [9] SWAMI A, REAGAN M R, BASTO P, *et al.* Engineered nanomedicine for myeloma and bone microenvironment targeting[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(28):10287-10292.
- [10] SHERIDAN C, KISHIMOTO H, FUCHS R K, *et al.* CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis[J]. *Breast Cancer Res*, 2006, 8(5):R59.
- [11] CHOI K Y, SARAVANAKUMAR G, PARK J H, *et al.* Hyaluronic acid-based nanocarriers for intracellular targeting: interfacial interactions with proteins in cancer[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2012, 99(5):82-94.

(收稿日期:2018-09-06)