

叶酸-聚乙二醇-聚乳酸纳米粒子的稀释稳定性和对乳腺癌细胞的靶向选择性研究*

王素军, 罗彦凤, 张寅星, 张茂兰, 王远亮

(重庆大学 生物工程学院生物材料与仿生工程中心, 生物流变科学与技术教育部重点实验室, 重庆 400030)

摘要: 叶酸受体在实体瘤组织细胞表面的过度表达使得叶酸介导的靶向释药系统成为治疗癌症的研究热点; 纳米粒子能够逃避网状巨噬细胞(RES)的捕获并加强渗透和滞留效应(EPR)是其应用于药物控释系统的主要原因。以聚乳酸、氨基封端的聚乙二醇和叶酸为原料, 采用活性酯的方法合成了聚乳酸-聚乙二醇-叶酸偶合物, 并以此为载体, 采用溶液挥发自组装的方法制备具有主动靶向性的纳米微粒。采用¹H NMR, 对材料结构进行表征; 采用荧光探针法对微粒的稳定性进行检测; 采用人乳腺癌细胞(MCF-7)和成纤维细胞(CCL-110)对微粒的细胞靶向选择性进行实验。结果表明, 在成功合成材料的基础上, 制备的纳米粒子具有很好的细胞选择性, 和同类材料相比具有较好的稀释稳定性, 有望成为叶酸受体介导的靶向药物控释系统的载体材料。

关键词: 两亲聚合物; 叶酸受体; 受体介导; 药物控释系统

中图分类号: O631.6; O648.14; Q71 文献标识码: A
文章编号: 1001-9731(2012)19-2642-05

1 引言

在生理条件下, 人体内所需的叶酸是从外界环境中摄取, 而叶酸末端的两个羧基使其很难自由地通过细胞膜。因此, 生物体引入了两种机制: 一种是利用低亲和力的跨膜蛋白直接将叶酸转入胞浆; 另一种是通过高亲和力的糖蛋白受体(即叶酸受体), 经过细胞的内吞作用, 将叶酸以氧化物的形式转入细胞内, 这也是介导叶酸进入细胞的主要途径^[1,2]。

在过去 20 年, 肿瘤组织表面叶酸受体的过度表达成为临床诊断和治疗癌症的新靶点^[1,3]。综合分析, 其研究主要集中在以下几个方面: (1) 利用叶酸受体的抗体, 单抗片断或嵌合小分子进行肿瘤的诊断及治疗; (2) 利用效应分子, 如发射射线的放射性核素, 反以寡核苷酸(ASON)及抗肿瘤药物等与叶酸类似物进行偶联, 并通过受体介导进入细胞内进行受体显像和靶向治疗; (3) 叶酸受体介导的药物靶向载药系统。以上 3 种方法相比较而言, 前两种技术中存在^[4]。单抗技术具有免疫原性, 价格昂贵和分子量大, 循环周期长影响诊断准确性, 肿瘤组织与非靶向性组织的放射性核素之

比(T:NT)未达到标准的情况。在受体介导的药物靶向载药系统中, 与其它受体介导的基因载体相比, 有其独特优势: (1) 不需合成和纯化配体蛋白, 无配体所致的潜在免疫原性; (2) 结构简单, 容易合成; (3) 体积较小, 可重复给药; (4) 仅在肿瘤细胞高表达, 具有很好的肿瘤组织靶向性。

目前, 在受体介导的靶向药物控释系统研究中, 纳米粒子由于能够逃避网状内皮系统的捕捉并加强渗透和滞留作用, 因此被广泛的作为药物控释系统的载体。而在众多的纳米载体材料中, 聚乳酸(PLA)因为其良好的生物相容性和生物可降解性而被用作载体的主要原料, 聚乙二醇(PEG)因为其良好的柔韧性而常作为微粒的保护层。只是在对其作为纳米载体材料的层出不穷的研究中, 发现对于微球的动态稳定性研究极少^[5,6]。当线性高分子作为微球载体材料时, 只有在大于临界胶束浓度(CMC)时才可形成热力学稳定的高分子微粒。而当浓度低于 CMC 时, 粒子将解离为链分子。因此, 在实际的应用过程中, 当这种微粒进入机体后, 必将面临严重的稀释, 从而呈现出热力学不稳定, 导致微粒的破坏。而微粒结构破坏的结果将直接导致包埋药物的释放, 潜在的大幅度的药物浓度的波动将直接导致严重的中毒问题^[7]。针对这种情况, 本文采用活化酯的方法将叶酸和十二烷醇封端的聚乳酸-聚乙二醇(DoI-PLA-PEG-FA)进行偶合, 在对材料进行结构鉴定的同时, 进行了微球的临界胶束浓度与稀释稳定性检测, 并对纳米粒子的体外细胞靶向性进行了实验, 以期为该类材料的临床应用提供实验依据。

2 实验

2.1 材料

Dodecanoled-PLA(DoI-PLA): $\bar{M}_n = 14700$, 医用级, 济南岱罡生物科技有限公司; H₂N-PEG-NH₂ 1900 与叶酸(FA): sigma-aldrich; N, N-二环己基碳酰亚胺(DCC)和 N-羟基丁二酰亚胺(NHS): 国药集团化学试剂有限公司; 二甲基亚砷(DMSO), 4-二甲氨基吡啶(DMAP), 吡啶, 二氯甲烷和丁二酸酐(SCA): 成都市科龙化工试剂厂; DMEM/F12; HyClone®; 10%牛胚

* 基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目(11032012); 重庆市自然科学基金资助项目(2010BB5225)

收到初稿日期: 2012-03-25

收到修改稿日期: 2012-05-20

通讯作者: 王远亮

作者简介: 王素军 (1976-), 女, 河南平顶山人, 在读博士, 师承王远亮教授, 主要从事生物医用材料和药物控释系统研究。

胎血清与青霉素-链霉素:碧云天;成纤维细胞株(CCL-110)(第七代)和乳腺癌细胞株(MCF-7)(第六代);西南医院肿瘤研究中心馈赠。

2.2 DoI-PLA-PEG-FA 的制备和纯化

采用三步法合成:(1)称取适量的 DoI-PLA,溶于干燥的二氯甲烷中,加入微量吡啶后,依次加入 SCA、DCC、DMAP,四者量之比为 1:1:1.2:1,经间或超声 25min 后,在低于 35℃ 的环境,均匀搅拌,持续反应 15h 后,过滤除去二环己基脲(DCU),制得琥珀酸封端的聚乳酸(DoI-PLA-SCA-COOH)溶液;(2)将 DoI-PLA-SCA-COOH 溶液加入 H₂N-PEG-NH₂ 中,待其溶解完全后,依次加入 NHS 与 DCC,四者的量之比为 1:1:1.05:1.2,间或超声 25min 后,均匀搅拌下室温持续反应 24h。反应液经有机微孔滤膜过滤除去 DCU,得氨基封端的聚乳酸-聚乙二醇(DoI-PLA-PEG-NH₂)溶液;(3)将经 NHS 活化的叶酸二氯甲烷溶液加入到 DoI-PLA-PEG-NH₂ 溶液中,并加入 DCC,三者量之比为 1:1:1.1,均匀搅拌,持续反应 24h 后;采用二氯甲烷-水体系,将制取聚合物反复纯化 3 次,40℃ 真空干燥至恒重,制得偶合叶酸的聚乳酸-聚乙二醇(DoI-PLA-PEG-FA)。

2.3 DoI-PLA-PEG-FA 的表征

以氘代氯仿(Fluka Chemica,重氢含量不低于 99.8%)为溶剂,四甲基硅烷(TMS)为内标,用 AV-500 型核磁共振波谱仪(瑞士,Bruker 公司)检测 DoI-PLA-PEG-FA 的¹H NMR。

2.4 以 DoI-PLA-PEG-FA 为载体的纳米粒子的 CMC 以及稀释稳定性检测

通过荧光法^[8-10]测试 DoI-PLA-PEG-FA 纳米粒子在去离子水中的 CMC,以芘为荧光探针。方法简述如下:将一定体积的芘-丙酮溶液加入试管中,待丙酮挥

发后,将 10mL 浓度分别为 5.0×10^{-6} 、 1.0×10^{-5} 、 5.0×10^{-5} 、 1.0×10^{-4} 、 5.0×10^{-4} 、 1.0×10^{-3} 、 5.0×10^{-3} 、 1.0×10^{-2} 和 5.0×10^{-2} mg/mL 的纳米微球乳液分别加入试管中,使之具有相同的芘浓度,超声 30min,40℃ 静置 24h。参数设置:激发和发射狭缝 5nm,速率 500nm/min,发射波长为 395nm,用 LS-50B 荧光分析仪在 300~360nm 范围进行荧光激发光谱扫描。相对于芘在 336.5nm 的激发波长,DoI-PLA-PEG-FA 的芘溶液的激发波长出现红移,其 CMC 为 338.5 与 336.5nm 波长处强度的比值出现突变点的 DoI-PLA-PEG-FA 浓度。

对纳米粒的稀释稳定性进行检测时,将 1.0mg/mL 的纳米粒稀释设定的倍数后,观察芘溶液光谱偏移情况。

2.5 DoI-PLA-PEG-FA 纳米粒的体外细胞靶向性检测

取一定量新鲜制备的经无菌处理的纳米粒-培养基溶液,加入到细胞铺展良好的 96 孔板中,培养设定时间后,采用 Leica-SP5 激光共聚焦显微镜观察细胞-微粒的相互作用情况。

3 结果与讨论

3.1 偶合叶酸的聚乳酸-聚乙二醇制备与结构分析

在材料制备过程中,分别采用了酰化和活性酯法,具体过程如图 1 所示。

为了确认叶酸是否偶合,对材料做了核磁共振氢谱分析,结果如图 2 所示。在图谱中除了 PLA、PEG 的特征峰 a、b、c 与 d 外,在 $\delta=(6.8 \sim 7.5) \times 10^{-6}$ 范围之间出现了叶酸的峰(图中 FA 标记部分的小峰),这和有关文献结果相吻合^[11]。

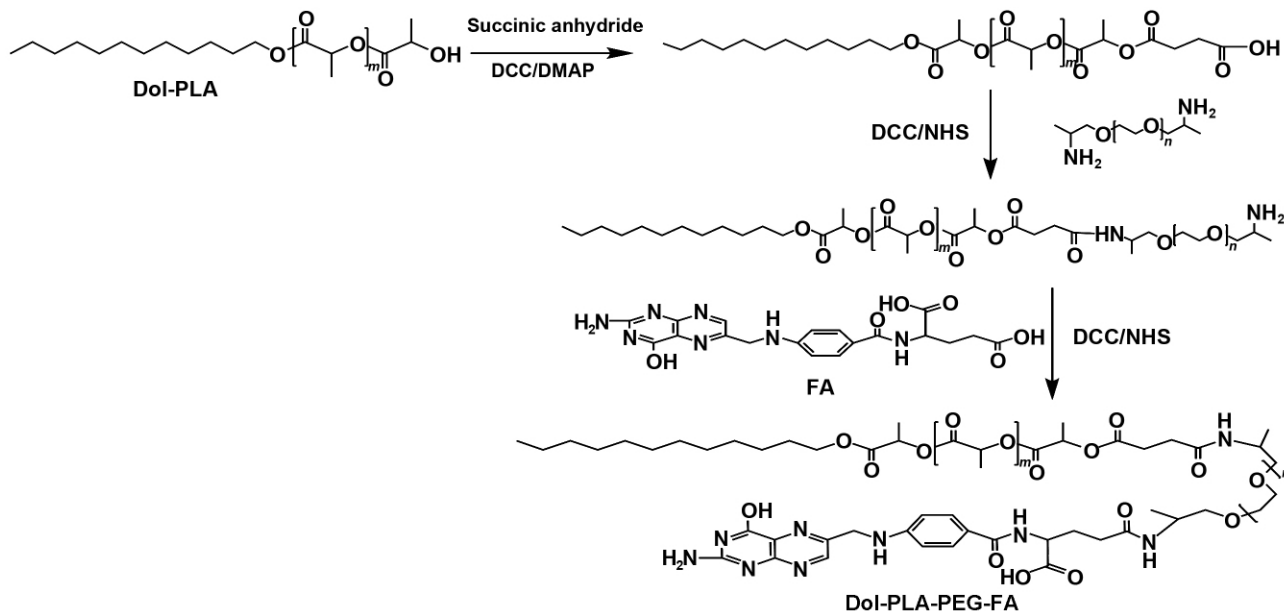


图 1 DoI-PLA-PEG-FA 的制备路线图

Fig 1 Synthesis of DoI-PLA-PEG-FA

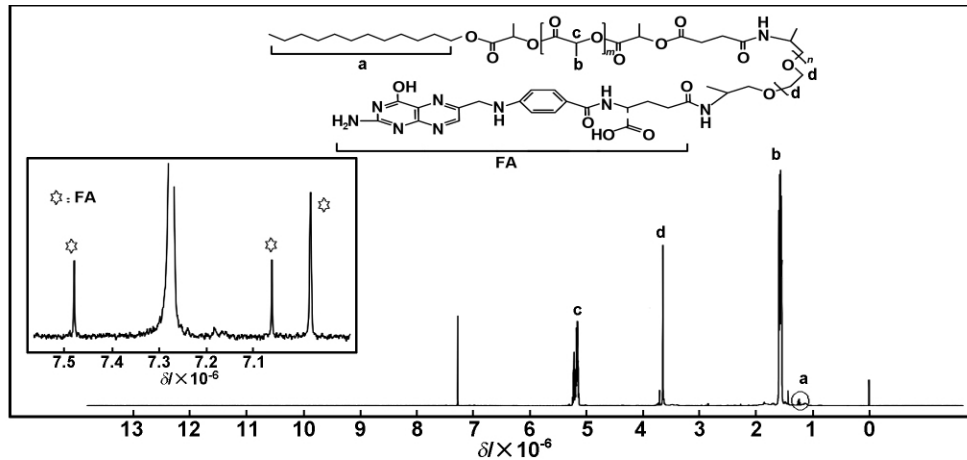


图2 DoI-PLA-PEG-FA的核磁共振氢谱

Fig 2 ^1H NMR of DoI-PLA-PEG-FA

3.2 DoI-PLA-PEG-FA 纳米粒子的 CMC 检测

对于两亲聚合物材料,一般采用溶剂挥发法自组装^[12]制备纳米粒子。简述如下:将溶解过夜的高分子有机溶液,逐滴加入温和搅拌的水溶液中,待有机溶剂完全挥发后,高速离心,冷冻干燥,制得纳米粒。作为衡量粒子稳定性参数,CMC 的检测具有实际应用意义。从图 3 可以看出,本文所制备的纳米粒子的 CMC 为 1.995×10^{-4} g/L(即 1.2×10^{-8} mol/L),该值明显小于嵌段聚合物自组装形成胶束时的临界胶束浓度(CMC)范围内($10^{-7} \sim 10^{-6}$ mol/L),且小于其它类型材料所测得数值^[13-15]。这些对于微粒作为释药载体是非常关键的。

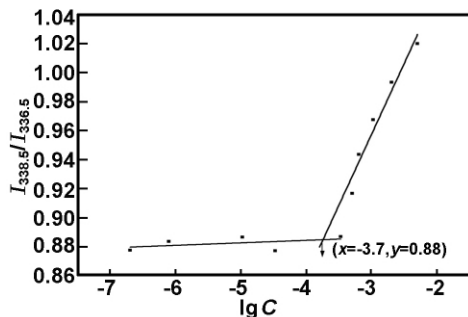


图3 芘在激发波长 338.5 和 336.5nm 处的荧光强度比值随 DoI-PLA-PEG-FA 微粒浓度的变化

Fig 3 The intensity ratio of $I_{338.5}/I_{336.5}$ from excitation spectra of pyrene

对微粒稀释稳定性的分析,采用浓度稀释的方法,通过检测荧光光谱偏移来表示,结果如图 4 所示。从图 4 看出,当微粒浓度被稀释到 10^4 g/L 时,光谱仍然能够保持稳定,而当其稀释倍数进一步扩大,到达 10^5 g/L 时,光谱开始偏移。这个结果和所测得的 CMC 相一致,即 10^{-4} g/L 这一数量级是一个分界点,当低于该数量级时微粒将发生热动力学不稳定,产生解离形成链分子。所以,从局部注射应用角度而言,这个稀释范围具有十分重要的应用意义。

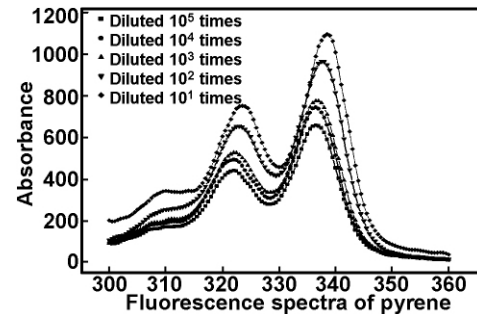


图4 芘在不同浓度 DoI-PLA-PEG-FA 纳米粒水溶液中的激发光谱图

Fig 4 Excitation spectra of pyrene in water solution of DoI-PLA-PEG-FA

3.3 DoI-PLA-PEG-FA 纳米粒的体外乳腺癌细胞靶向检测

在药物控释体系研究中,大量的文献^[16-20]阐述了纳米粒子作为药物载体的重要意义:(1)具有加强渗透滞留效应(RES);(2)延长了药物在血液循环中的时间;(3)可以摆脱网状巨噬细胞吞噬作用(EPR)。究其原因,这是由纳米粒子的纳米特性和粒子表面特性造成的。为此,通过观察载有罗丹明 6G 的纳米粒子和不同细胞间的相互作用来研究这种带有叶酸配体的纳米粒子的靶向选择性,结果如图 5 所示。从图 5 可以看出,在同等时间内,肿瘤细胞内的荧光强度远远高于成纤维细胞,且进入细胞的微粒均匀分布在细胞浆中,细胞核内几乎没有微粒分布;但是,随着时间的延长,成纤维细胞中的荧光稍有加强。我们把细胞的这种作用现象称作亲和性,并把这种亲和性的原始驱动力理解为两种作用机制:细胞的吞噬作用和叶酸配体介导的靶向作用。当含叶酸配体的纳米粒子作用于 MCF-7 时,其除了表现出与成纤维细胞相同的吞噬作用外,细胞表面的叶酸受体也加强了与含叶酸配体的纳米粒子间的亲和力,这和生理环境下机体摄取叶酸时的主要途径——靶向介导起的重要作用理论相一致^[1,2]。

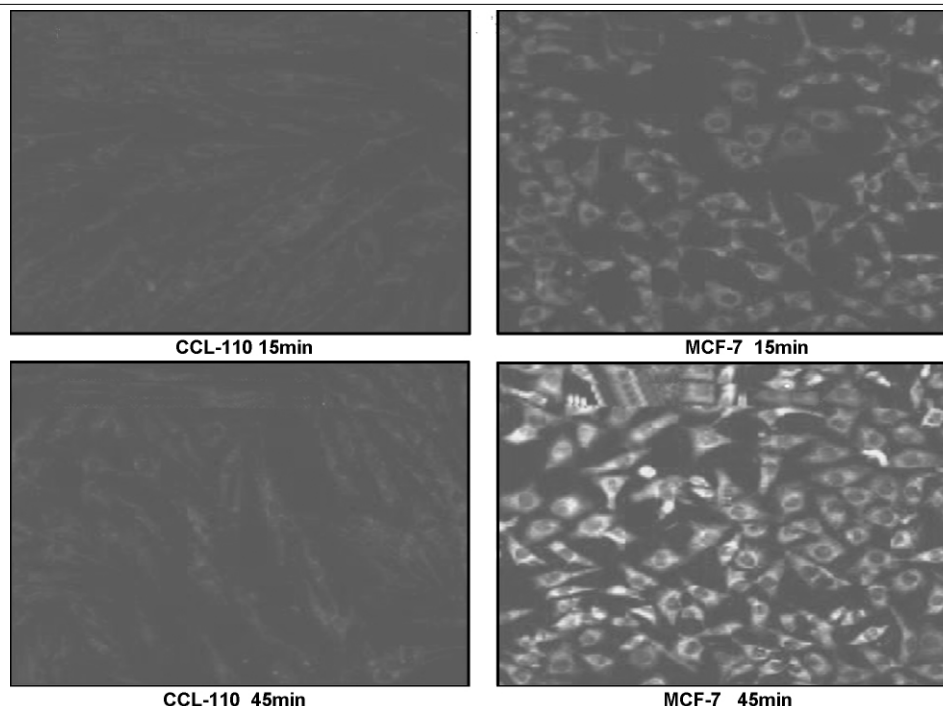


图5 细胞与粒子的作用

Fig 5 Confocal laser scanning microscope images of MCF-7 and CCL-110 incubated with nanoparticles

4 结论

通过酰化与活性酯法将叶酸、聚乳酸与聚乙二醇偶合制备两亲性聚合物,并采用溶剂挥发自组装法制备了具有主动靶向性的纳米粒。通过检测微粒的临界胶束浓度、微粒稀释稳定性以及体外细胞靶向性可获得如下结论:

采用该种材料所制备的纳米粒的 CMC 为 $1.995 \times 10^{-4} \text{ g/L}$,对于稀释具有良好的稳定性,且在体外对 MCF-7 具有显著的靶向性,有望成为主动靶向性药物控释系统的载体材料。

参考文献:

- [1] Sudimack J, Lee R J. Targeted drug delivery via the folate receptor[J]. *Adv Drug Deliver Rev*, 2000, 41(2): 147-162.
- [2] Leamon C P, Reddy J A. Folate-targeted chemotherapy [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56: 1127-1141.
- [3] Kelemen L E. The role of folate receptor a in cancer development, progression and treatment: cause, consequence or innocent bystander [J]. *Int J Cancer*, 2006, 119: 243-250.
- [4] Leamon C P, Low P S. Folate-mediated targeting: from diagnostics to drug and gene delivery [J]. *Drug Discov Today*, 2001, 6(1): 44-51.
- [5] Parveen S, Misra R, Sahoo S K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging [J]. *Nanomed-Nanotechnol*, 2012, 8:147-166.
- [6] Dutta N, Green D. Nanoparticle stability in semidilute and concentrated polymer solutions [J]. *Langmuir*, 2008, 24: 5260-5269.
- [7] Lawrence M J. Surfactant systems: their use in drug delivery [J]. *Chem Soc Rev*, 1994, 23:417-24.
- [8] Lee J, Cho E C, Cho K. Incorporation and release behavior of hydrophobic drug in functionalized poly(D, L-lactide)-block-poly(ethylene oxide) micelles [J]. *J Control Rel*, 2004, 94: 323-335.
- [9] Kwon G, Naito M, Yokoyama M, et al. Micelles based on AB block copolymers of poly(ethylene oxide) and poly(β -benzyl L-aspartate) [J]. *Langmuir*, 1993, 9: 945-949.
- [10] 王彬, 潘君, 刘颖, 等. 聚乙二醇接枝聚乳酸的自组装纳米微球的制备及性能 [J]. *化学学报*, 2008, 66(4):487-491.
- [11] Prabakaran M, Graier J J, Pilla S, et al. Folate-conjugated amphiphilic hyperbranched block copolymers based on Boltorn[®] H40, poly(L-lactide) and poly(ethylene glycol) for tumor-targeted drug delivery [J]. *Biomaterials*, 2009, 30: 3009-3019.
- [12] Endres T K, Beck-Broichsitter M, Samsonova O, et al. Self-assembled biodegradable amphiphilic PEG-PCL-IPEI triblock copolymers at the borderline between micelles and nanoparticles designed for drug and gene delivery [J]. *Biomaterials*, 2011, 32: 7721-7731.
- [13] Hamidreza M A, Mahmud A, Annahita D S, et al. Micelles of methoxy poly(ethylene oxide)-b-poly(ϵ -caprolactone) as vehicles for the solubilization and controlled delivery of cyclosporine A [J]. *J Control Rel*, 2005, 104: 301-311.
- [14] Mi Y, Liu Y T, Feng S S. Formulation of docetaxel by folic acid-conjugated D- α -tocopheryl polyethylene glycol succinate 2000 (Vitamin E TPGS2k) micelles for targeted and synergistic chemotherapy [J]. *Biomaterials*, 2011, 32: 4058-4066.

- [15] Cao Jun, Wu Yao, Chen Yuanwei, et al. Preparation of folate receptor targeted micelles from polylactic acid copolymers and study on their properties[J]. Journal of Functional Materials, 2010, 41(3): 418-424.
- [16] Maeda H, Wu J, Sawa T, et al. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review[J]. J Control Rel, 2000, 65: 271-284.
- [17] Acharya S, Sahoo S K. PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2011, 63: 170-183.
- [18] Stolnik S, Dunn S E, Garnett M C, et al. Surface modification of poly(lactide-co-glycolide) nanospheres by biodegradable poly(lactide)-poly(ethylene glycol) copolymers[J]. Pharm Res, 1994, 11: 1800-1808.
- [19] Owens III D E, Peppas N A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles[J]. Int J Pharm, 2006, 307(1): 93-102.
- [20] Clark P R, Hersh E M. Cationic lipid-mediated gene transfer: current concepts[J]. Curr Opin Mol Ther, 1999, 1: 158-176.

Dodecanoled-poly(D, L-lactic acid)-b-poly (ethylene glycol) – folate(Dol-PLA-PEG-FA) :

the study of dilution stability and targeting selectivity against different cells

WANG Su-jun, LUO Yan-feng, ZHANG Yin-xing, ZHANG Mao-lan, WANG Yuan-liang

(Key Laboratory of Biorheological Science and Technology under Ministry of Education,

Research Center of Bioinspired Material Science and Engineering,

Bioengineering College of Chongqing University, Chongqing 400030, China)

Abstract: Folate has been employed as a targeting moiety of various anticancer agents to increase their cellular uptake within target cells since folate receptors were vastly overexpressed in several human tumors. In this study, dodecanoled-poly(D, L-lactic acid)-b-poly(ethylene glycol)-folate (Dol-PLA-PEG-FA) was synthesized from dodecanoled-poly(D, L-lactic acid), H₂N-PEG-NH₂ and folate by active ester method, whereafter, active-targeting nanoparticles were prepared through solution volatilization and self-assembly. ¹H NMR was employed to characterize the structure of copolymer, and luminescence spectrometer was characterized the diluting stability of nanoparticles, then model cells breast cancer cells (MCF-7) and fibroblasts cells (CCL-110) were to evaluate the targeting-mediated endocytosis pathway. The results showed that the nanoparticles have good diluting stability and targeting selectivity on the basis of successful synthetic materials, and these are potential to become the receptor mediated targeted drug release system carrier material.

Key words: amphiphilic polymer; folate receptor; receptor-mediated; drug delivery system

(上接第 2641 页)

Research of Si anode for lithium-ion batteries prepared by mechanical alloying method

ZHANG Lei, JIANG Xun-yong, ZHANG Rui

(School of Materials Science and Engineering, Tianjin University of Technology, Tianjin 300384, China)

Abstract: In this paper, pure Si was as the main study object, mechanical alloying method for the preparation of materials, and in the latter part of the process of materials preparation graphite added and SP doped. For pure Si materials, with increasing of MA time, the degree of amorphous increased; after MA, size of materials particle changed from 29 to 0.2 μm; and the shape of the particles changed from large block to small round. In the research the charge and discharge results of different MA time materials were discussed. The results showed that Si had a high capacity in first discharge, but had large capacity loss in later cycle and poor cycling performance, after MA, the first discharge capacity of Si had increased. For doped materials, first discharge capacity decreased but cycling performance increased. In dynamic analysis, we found that MA Si had loose structure, which lead to its diffusion coefficient increased.

Key words: pure silicon; carbon-doped; charge and discharge capacity; diffusion coefficient