

新型谷胱甘肽响应三嵌段聚前药两亲分子的 构筑与纳米结构调控

魏亦军^{1,2}, 殷刘岳^{1,2}, 胡祥龙³

(1. 安徽大学化学化工学院, 安徽合肥 230601; 2. 淮南师范学院化学与化工系, 安徽淮南 232038;
3. 华南师范大学激光生命科学研究所, 激光生命科学教育部重点实验室, 生物光子学研究院, 广东广州 510631)

摘要: 针对肿瘤组织的还原性微环境, 设计了一种基于谷胱甘肽(GSH)还原性响应的三嵌段聚前药两亲分子, 聚喜树碱-嵌段-聚乙二醇-嵌段-聚喜树碱(PCPTM-*b*-PEG-*b*-PCPTM), 具有很高的载药量(质量分数大于50%)。采用大分子自组装的方法, 通过调节共溶剂种类, 实现了两种不同纳米结构组装体的构筑。利用透射电镜(TEM)和扫描电镜(SEM)进行表征, 采用1,4-二氧六环(1,4-dioxane)作为共溶剂组装得到错列堆积片层结构, 改变共溶剂为N,N-二甲基甲酰胺(DMF)时, 得到了大复合胶束结构。进一步的细胞实验表明, 错列堆积片层结构和大复合胶束结构纳米粒子都具有较快的肿瘤细胞内吞速率和较好的抗肿瘤效果。

关键词: 聚前药两亲分子; 自组装; 还原性响应; 纳米结构; 抗肿瘤

中图分类号: O631 **文献标识码:** A **doi:** 10.3969/j.issn.0253-2778.2014.11.003

引用格式: Wei Yijun, Yin Liuyue, Hu Xianglong. Fabrication and nanostructural tuning of a novel GSH-responsive triblock polyprodrug amphiphiles[J]. Journal of University of Science and Technology of China, 2014, 44(11): 893-903.

魏亦军, 殷刘岳, 胡祥龙. 新型谷胱甘肽响应三嵌段聚前药两亲分子的构筑与纳米结构调控[J]. 中国科学技术大学学报, 2014, 44(11): 893-903.

Fabrication and nanostructural tuning of a novel GSH-responsive triblock polyprodrug amphiphiles

WEI Yijun^{1,2}, YIN Liuyue^{1,2}, HU Xianglong³

(1. Department of Chemistry, Anhui University, Hefei 230601, China;
2. Department of Chemistry, Huainan Normal University, Huainan 232038, China;
3. Ministry of Education Key Laboratory of Laser Life Science and Institute of Laser Life Science,
College of Biophotonics, South China Normal University, Guangzhou, 510631, China)

Abstract: Based on the feature of tumor's reduction-responsive milieu, a novel type of glutathione (GSH)-responsive polyprodrug amphiphiles, PCPTM-*b*-PEG-*b*-PCPTM triblock copolymers was fabricated, with CPT loading content higher than 50% (mass fraction). It is found that aqueous self-assembly of PCPTM-*b*-PEG-*b*-PCPTM is strongly dependent on common solvent compositions, affording two kinds of distinct

收稿日期: 2014-06-12; 修回日期: 2014-10-17

基金项目: 安徽省教育厅自然科学研究重点项目(KJ2010A308), 国家自然科学基金(51403042)资助。

作者简介: 魏亦军, 男, 1968年生, 教授。研究方向: 高分子化学与物理。E-mail: weiyijun@163.com

通讯作者: 胡祥龙, 博士/讲师。E-mail: xlhu@senu.edu.cn

nanostructures, staggered lamellae and large compound micelles determined by TEM and SEM analysis with the common solvent to be 1,4-dioxane and DMF, respectively. Further cellular experiments reveal that both staggered lamellae and large compound micelles possess relatively high rates of tumor cellular internalization and effective anticancer performance.

Key words: polyprodrug amphiphile; self-assembly; reduction-response; nanostructure; anticancer

0 引言

喜树碱(camptothecin, CPT)及其衍生物是一类具有细胞毒性的喹啉类生物碱分子,可以通过内酯环上 20-位羟基与 DNA 链形成氢键,从而抑制 DNA 拓扑异构酶活性,导致肿瘤细胞凋亡^[1]. 但其水溶性差、内酯环不稳定、不具有特异性等因素限制了它的医学应用. 另一方面,如果将 20-位羟基化学改性,可以短暂性屏蔽喜树碱分子的药物活性^[2-3]. 基于上述讨论,设想羟基通过化学反应连接上对肿瘤微环境发生刺激响应性断裂^[4-7]的结构单元(如酸碱碱性、光照、氧化还原性、酶响应性等),这种智能响应型前药体系可以克服临床使用的小分子化疗药物的缺点,同时解决物理包埋法医药载体所易产生的爆释突释和载药量低等弊端. 最近,我们设计了一种具有两亲性且含有药物重复单元的功能高分子,即聚前药两亲分子(*polyprodrug amphiphiles*),实现高载药量和多级纳米结构调控^[8].

本工作中我们通过对抗肿瘤药物喜树碱 20-位的羟基进行改性,引入二硫键和碳酸酯键基元,制备了一种在肿瘤病灶组织高浓度谷胱甘肽(GSH)条件下,可以实现可控释放原药的喜树碱前药单体(CPTM). 采用聚乙二醇(PEG)两端改性的大分子链转移试剂,利用可逆加成-断裂链转移(RAFT)聚合技术,成功制备了中间为亲水的聚乙二醇、两端疏水链为聚喜树碱前药分子的三嵌段聚前药两亲分子,聚喜树碱-嵌段-聚乙二醇-嵌段-聚喜树碱(PCPTM-*b*-PEG-*b*-PCPTM). PEG 是一种常见的亲水高分子,分子量小于 50 kDa 的 PEG 可以通过肾脏排出体外,是 FDA 批准的医用高分子材料^[9-10]. 本体系中亲水性 PEG 嵌段可以很好地稳定组装体,减少颗粒间的聚集,避免免疫蛋白对其非特异性吸附以及网状内皮系统(RES)的自清除作用,提高载体血液循环时间. 通过纳米沉淀的方法,改变共溶剂的种类,PCPTM-*b*-PEG-*b*-PCPTM 可以组装得大复合胶束(large compound micelles)和错列堆积片层结构(staggered lamellae).

1 实验

1.1 试剂

聚乙二醇(HO-PEG₄₅-OH, 数均分子量 $M_n = 2.0$ kDa, 分子量分布 $M_w/M_n = 1.06$, Sigma-Aldrich), 喜树碱(CPT, Sigma-Aldrich), 三光气(BTC, Sigma-Aldrich), 二羟乙基二硫醚(Sigma-Aldrich), 4-二甲氨基吡啶(DMAP, 国药集团化学试剂有限公司), 偶氮二异丁腈(AIBN, Acros), 二硫苏糖醇(DTT, Sigma-Aldrich), 绿色溶酶体定位探针(Lysotracker Green, 分子探针公司)等试剂使用前未经处理,直接使用;甲基丙烯酰氯购自国药集团化学试剂有限公司,使用前蒸馏纯化;偶氮二异丁腈(AIBN, Acros)采用重结晶纯化,冰箱上层储存.

1.2 仪器与表征

核磁共振谱(NMR)均用 Bruker AV300 核磁共振仪表征(共振频率为 300 MHz, CDCl₃ 为氘代试剂). 聚合物的分子量及分子量分布用配有 3 根 Styragel HR2, HR4, HR5 柱的 Waters2414 凝胶渗透色谱仪测定,窄分布聚苯乙烯为标样, Waters2414 折光指数检测器检测(设定为 30 °C), DMF 为流动相,流速为 1.0 mL/min,柱箱的温度为 45 °C. 光散射仪(ALV/DLS/SLS-5022F)装配有 ALV5000 数字相关器和 632.8 nm, 22 mW UNIPHASE 的 He-Ne 激光光源. 动态光散射都在 90°散射角下测量. 所有数据均测试 3 次以上,溶液在光散射实验前用 1.2 mm PTFE Millipore 膜除尘. 透射电子显微镜(TEM)测试在 JEOL 2010 电子显微镜上完成,加速电压 200 kV,样品制备方式为吸取 10 μL 样品溶液滴在 Formvar 薄膜和碳膜的铜网上,然后快速液氮冷却,冷冻干燥以保持其在溶液态的形貌. 扫描电子显微镜(SEM)测试在高分辨率 JEOL JSM-6700 场发射电子显微镜上完成,制样方式与 TEM 测试相同,测试前样品蒸金处理. 紫外-可见光谱用 Unico UV/vis 2802PCS 紫外可见分光光度计测试. 细胞荧光成像是采用激光共聚焦显微镜 Leica TCS SP5 型显微镜系统完成.

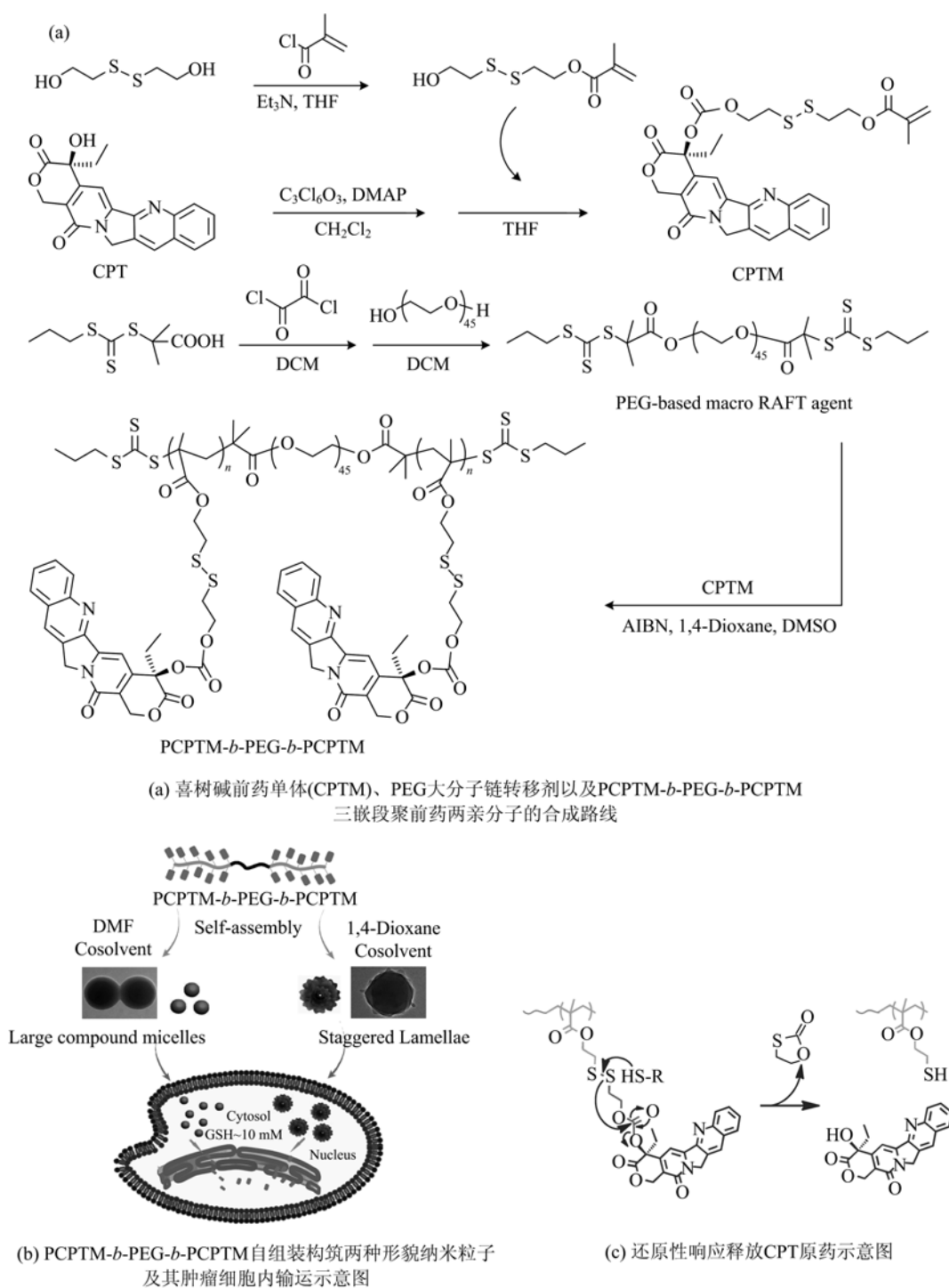


图 1 新型谷胱甘肽响应三嵌段聚前药两亲分子药物传输体系

Fig. 1 A novel GSH-responsive triblock polyprodrug amphiphiles for drug delivery

2 结果与讨论

2.1 喜树碱前药单体 CPTM 的合成

本文采用二羟乙基二硫醚、甲基丙烯酰氯、喜树碱和三光气为主要起始原料，两步法合成了含有二硫键和碳酸酯键基元的喜树碱前药功能单体

CPTM,详细的分离、纯化、表征参考文献[8]方法.

2.2 聚乙二醇大分子链转移剂的制备

在 50 mL 圆底烧瓶中加入 2 g 数均分子量为 2 000 Da 的聚乙二醇 HO-PEG-OH, 甲苯 20 mL, 共沸除水 2 次. 在 100 mL 圆底烧瓶中加入三硫酯 (1.19 g), 草酰氯 (3.17 g), 二氯甲烷 30 mL, 搅拌

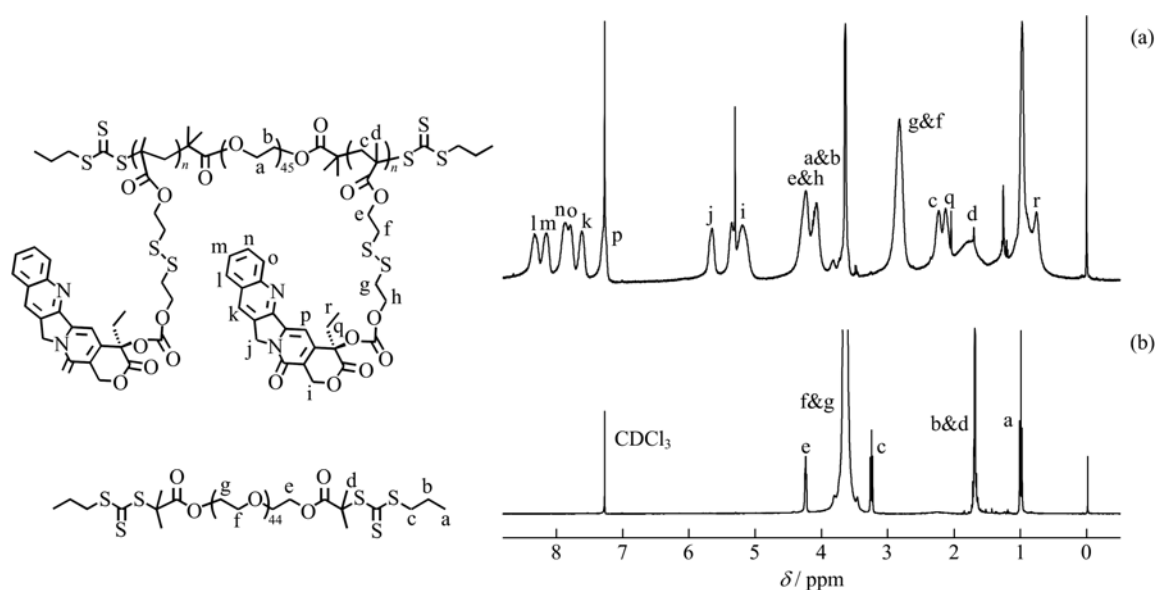


图 2 PCPTM₃₇-*b*-PEG₄₅-*b*-PCPTM₃₇ (a) 和 PEG 大分子链转移剂 (b) 在 CDCl₃ 中的核磁氢谱图

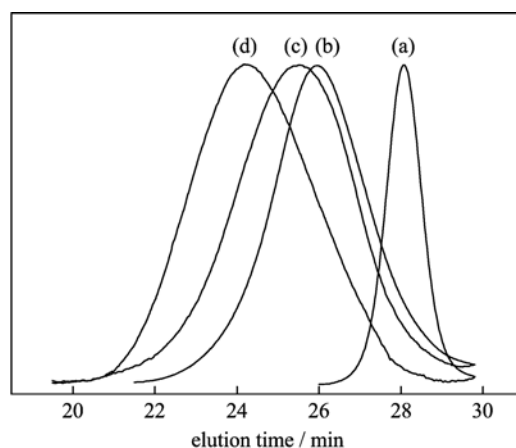
Fig. 2 ¹H NMR spectra recorded for PCPTM₃₇-*b*-PEG₄₅-*b*-PCPTM₃₇ (a), and PEG-based macro RAFT agent (b), in CDCl₃

反应约 2 h, 直到无气体生成. 旋干后加入干燥后的聚乙二醇, 反应 24 h. 浓缩后在乙醚中沉淀 3 次 (1.53 g). 根据¹H NMR (图 2(b)) 分析酯键相邻的仲碳氢的特征核磁共振信号 e 与 PEG 的特征峰 f&g 的积分强度比, 计算得到 PEG 的官能团改性率达 96 %.

2.3 三嵌段聚前药两亲分子 PCPTM-*b*-PEG-*b*-PCPTM 的制备

采用可逆加成断裂链转移法 (RAFT) 聚合喜树碱前药单体 CPTM. 将聚乙二醇大分子链转移剂 (12.2 mg, 5 μmol), CPTM (238.3 mg, 400 μmol) 和 AIBN (0.164 mg, 1 μmol), 1 mL 1,4-二氧六环和二甲基亚砜 (体积比为 1:1) 加入到玻璃封管中溶解. 将混合物脱气冷冻-融解循环 3 次, 然后在真空下密封, 70 °C 下搅拌反应 24 h 后用液氮中止聚合反应, 打开封管, 将反应后混合物在乙醚中沉淀, 离心, 再溶解在氯仿中用大量乙醚沉淀, 反复 3 次, 最后产物在真空干燥箱中室温干燥 24 h, 得到灰色粉末 (154.9 mg, 产率约为 82.5 %). 相关产物的¹H NMR 谱图^[6]中, δ 5.61 和 6.14 处 CPTM 单体的双键氢核磁特征信号消失, 表明 CPTM 单体在大分子 RAFT 试剂的存在下发生自由基聚合. 聚合物的凝胶渗透色谱 (GPC) 表征结果如图 3(c) 和表 1 所示, 得到分子量分布 PDI=1.32, 并且 GPC 信号呈对称形态分布的单峰, 表明 CPTM 单体的聚合

为活性 RAFT 聚合. 聚合产物的¹H NMR 谱图如图 2(a) 所示, 通过 PEG 嵌段上亚甲基的特征核磁共振信号 a&b 与 CPTM 重复单元多元环上氢的特征核磁共振信号 k~o 的积分强度比, 计算得到聚喜树碱 (PCPTM) 嵌段的平均聚合度 (DP) 约为 37. 采用类似合成方法, 制备得到其他聚合度聚前药两亲分子 PCPTM₁₄-*b*-PEG₄₅-*b*-PCPTM₁₄ 和 PCPTM₅₃-*b*-PEG₄₅-*b*-PCPTM₅₃. GPC 表征如图 3 所示, 相应的分子量和载药量参数总结见表 1.



(a) PEG₄₅ 链转移试剂, (b) PCPTM₁₄-*b*-PEG₄₅-*b*-PCPTM₁₄,
(c) PCPTM₃₇-*b*-PEG₄₅-*b*-PCPTM₃₇,
(d) PCPTM₅₃-*b*-PEG₄₅-*b*-PCPTM₅₃

图 3 系列高分子样品的 GPC 淋洗曲线

Fig. 3 GPC traces recorded for a series of polymer samples

表 1 聚乙二醇大分子链转移剂和系列 PCPTM-*b*-PEG₄₅-*b*-PCPTM 样品分子量、分子量分布以及载药量

Sample	$M_{n,NMR}^a$ /(g · mol ⁻¹)	$M_{n,GPC}^b$ /(g · mol ⁻¹)	M_w/M_n^b	DLC/% ^c
CTA-PEG ₄₅ -CTA	2400	2500	1.06	/
PCPTM ₁₄ - <i>b</i> -PEG ₄₅ - <i>b</i> -PCPTM ₁₄	19100	20700	1.28	50.9
PCPTM ₃₇ - <i>b</i> -PEG ₄₅ - <i>b</i> -PCPTM ₃₇	46600	48500	1.32	52.6
PCPTM ₅₃ - <i>b</i> -PEG ₄₅ - <i>b</i> -PCPTM ₅₃	65700	68300	1.30	56.2

【注】 a Number averaged molecular weights and average degrees of polymerization for the PCPTM CPT block were evaluated by ¹H NMR; b Molecular weights and their distributions M_w/M_n were evaluated by DMF GPC with polystyrene standards; c Drug loading content (DLC) was calculated as the ratio of weight of the conjugated drug to the weight of the polyprodrug conjugates.

这里我们使用 RAFT 聚合方法,采用聚乙二醇两端改性的大分子链转移剂,偶氮二异丁氰为引发剂,成功聚合 CPTM 前药,获得多种聚合度的三嵌段聚前药两亲分子 PCPTM-*b*-PEG₄₅-*b*-PCPTM,载药量非常高,均超过 50%(质量分数)(表 1)。值得一提的是,喜树碱前药单体的聚合过程中实现了 CPTM 单体的高转化率聚合(>80%)。聚前药两亲分子通过二硫键共价接药的方式,不但提高了药物的稳定性,同时也赋予了其在肿瘤微环境还原条件下响应释放活性原药的特征。

2.4 PCPTM-*b*-PEG-*b*-PCPTM 组装体的制备

分别采用 1,4-二氧六环和 N,N-二甲基甲酰胺作为共溶剂,称取 1.0 mg PCPTM₃₇-*b*-PEG₄₅-*b*-PCPTM₃₇ 聚合物,溶解在 1.0 mL 共溶剂中,恒温 25 °C,快速搅拌(1 000 r/min),然后用流动泵将 5 mL 去离子水以 8 mL/h 速度加入其中。水加完后,组装体溶液继续搅拌 3 h,然后将溶液转移到透析膜,透析 10 h 除去相应的有机共溶剂(截留分子量为 3 500 Da),多次换水,得到相应的聚前药两亲分子组装体分散液,标定浓度用于后续分析测试。

2.5 三嵌段聚前药两亲分子 PCPTM-*b*-PEG₄₅-*b*-PCPTM 的分级自组装

为了进一步研究三嵌段聚前药两亲分子 PCPTM-*b*-PEG₄₅-*b*-PCPTM 的自组装行为,本文分别以 1,4-二氧六环和 N,N-二甲基甲酰胺作为三嵌段聚合物的共溶剂,采用 Eisenberg 等^[11-14]发展的纳米沉淀法,研究聚前药两亲分子的自组装以及溶液聚集行为。通过动态光散射法(DLS)研究聚集体的平均粒径及其分布,如图 4 所示。错列堆积片层结构的粒子直径约为 270.0 nm,粒径分布 PDI=0.147;大复合胶束粒子直径约为 334.9 nm,PDI=0.028。

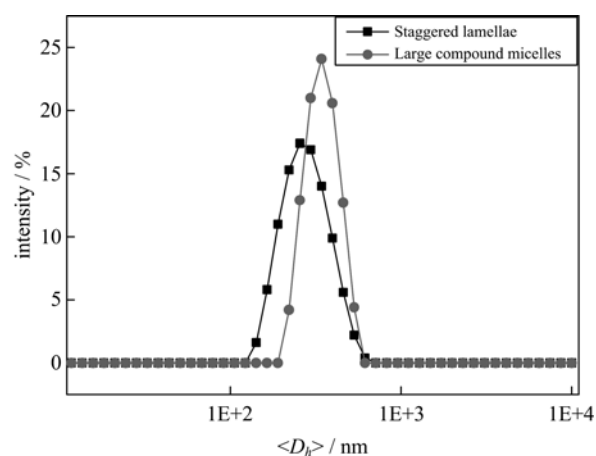


图 4 PCPTM₃₇-*b*-PEG₄₅-*b*-PCPTM₃₇ 组装体的流体动力学直径与分布

Fig. 4 Hydrodynamic diameter distributions recorded for polymeric assemblies of PCPTM₃₇-*b*-PEG₄₅-*b*-PCPTM₃₇

PCPTM₃₇-*b*-PEG₄₅-*b*-PCPTM₃₇ 组装体的 TEM 和 SEM 图像如图 5 所示。利用 DMF 共溶剂,组装得到大复合胶束(large compound micelles),而 1,4-二氧六环中则制备得到错列堆积片层结构(staggered lamellae)。聚集体的尺寸比光散射测试结果略小,考虑到光散射测量的是溶液中纳米粒子的尺寸,反映了溶液态中 PEG 链的伸展以及溶剂化作用,而 TEM 和 SEM 得到的是干态下的测试数据,因此两种测试手段得到的结论是基本符合的。

2.6 聚前药两亲分子分级自组装的理论研究

三嵌段聚前药两亲分子 PCPTM-*b*-PEG₄₅-*b*-PCPTM 溶解在有机溶剂中,然后缓慢地向其滴加选择性溶剂水,随着含水量的升高,PCPTM 嵌段渐渐不溶解,混合溶液的浊度不断上升,发生组装行为。有趣的是,在保持温度、聚合物初始浓度、有机溶

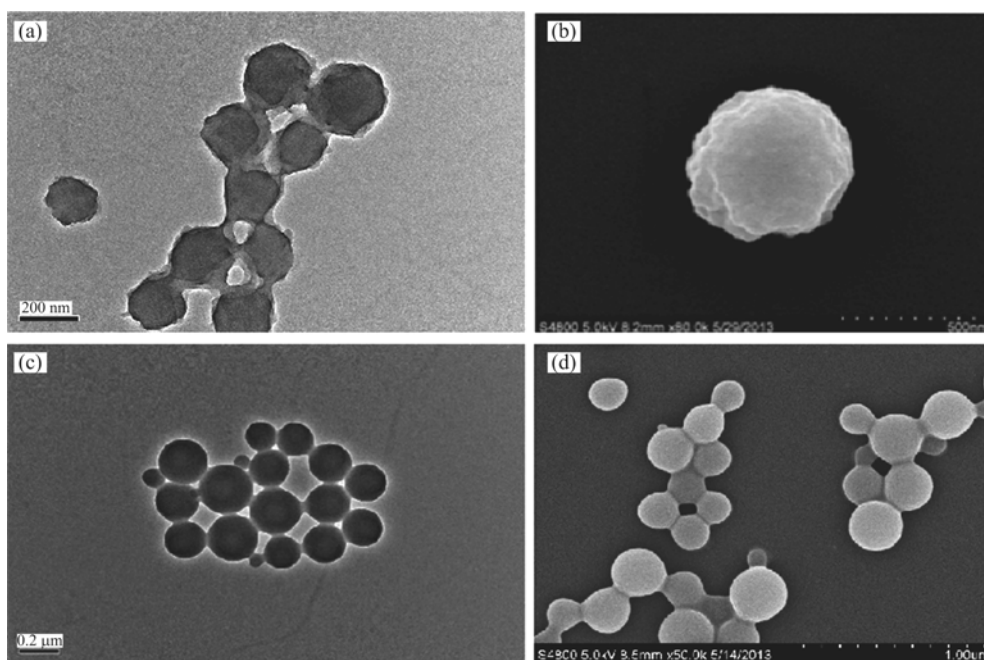


图 5 PCPTM₃₇-*b*-PEG₄₅-*b*-PCPTM₃₇ 组装体 TEM 照片(a),(c),以及 SEM 照片(b),(d),
共溶剂分别为 1,4-二氧六环(a),(b)和 DMF(c),(d)

Fig. 5 TEM (a),(c) and SEM (b),(d) images recorded for self-assembled nanostructures, formed
by adding water into triblock copolymers(DP=37) in 1,4-Dioxane (a),(b) or in DMF (c),(d)

剂体积和加水量恒定的条件下,组装形貌强烈依赖于有机共溶剂的组成。

当选用 N,N-二甲基甲酰胺作为共溶剂,加水速度为 8 mL/h 时,获得了尺寸比较均匀的球形粒子状结构,胶束的直径约为 270 nm(图 5(c),(d)). 而将 DP=37 的 PCPTM 嵌段完全拉直的长度约为 52 nm,这说明聚集体疏水微区里存在许多不完全伸直、错综排列的小胶束粒子. 因此我们认为该组装体是由多个小胶束构成的大复合胶束。

有趣的是,当采用 1,4-二氧六环作为共溶剂时,组装得到的片层结构呈错列堆积状,且周围存在很多片层突起,直径约 330 nm(图 5(a)). 据了解,尚未有三嵌段聚合物组装得到这种纳米形貌的报道. SEM 照片进一步验证了这种纳米结构的堆积特点,以及尺寸和结构的均一性(图 5(b)). 如文献所述^[14],高分子自组装中共溶剂的种类对组装体的纳米结构影响非常显著,因为共溶剂直接影响组装体疏水微区和亲水壳层尺寸,从而影响自组装结构;本文中分别采用 1,4-二氧六环和 N,N-二甲基甲酰胺为共溶剂,组装得到具有显著差异的纳米结构,我们推测这主要是三嵌段聚前药两亲分子在两种溶剂中的溶度参数差异、亲水链 PEG 与溶剂的相互作用差异

以及溶剂的介电常数差异等因素综合作用的结果。

在三嵌段聚合物体系中,PCPTM 嵌段由于有大的侧基分子(分子量约为 600 Da),具有大的位阻效应,因此我们设想疏水嵌段采取一种比较刚性的链堆积构象. 此外,聚合物的侧链 CPT 药物苯环之间还存在强的 π - π 堆积作用. 因此,上述两种因素促使形成的双层膜结构刚性非常强,同时具有较高的曲面能,从而有利于形成片层结构. 前期差示扫描量热法(DSC)研究显示^[8],CPTM 单体在 141.5 °C 附近有一个吸热峰,但是其均聚物 PCPTM 仅在 50.2 °C 处存在玻璃化转变,没有吸热峰,这说明 CPTM 的均聚物在该条件下不结晶. ABA 三嵌段是以弯曲“Loop”^[15]形式的方式堆积,由于 PCPTM 嵌段具有较高的玻璃化转变温度(T_g),当向嵌段聚合物的 1,4-二氧六环溶液中缓慢加入选择性溶剂去离子水时, T_g 不断降低,已经溶解的疏水性链段 PCPTM 运动能力不断减弱,将发生迅速冻结,形成片状初级组装体,进一步加入去离子水后,1,4-二氧六环不断由疏水内核向外抽提,初级聚集体与聚合物单链之间或初级聚集体之间发生明显的粘附,融合,形成较大的纳米结构,当含水量进一步升高时, T_g 升高到组装温度(25 °C)以上,链段运动完全冻结,形成

了稳定的错列堆积片层结构。

在同样加水的条件下,短疏水嵌段的 PCPTM₁₄-*b*-PEG₄₅-*b*-PCPTM₁₄ 组装也能得到大复合胶束和错列堆积片层结构(图 6(a)). PCPTM₅₃-*b*-PEG₄₅-*b*-PCPTM₅₃ 组装时,由于疏水作用太强,部分组装体发生沉淀(图 6(b)). 这些结构差异反映了 CPTM 嵌段长度^[16]对组装体结构的影响. 另外,采用 DMF 为共溶剂,这两种嵌段比的聚前药两亲分子都可以组装得到大复合胶束结构(图 6(c),(d)).

我们推测,丰富的组装形貌源于聚前药两亲分子刚性侧基喜树碱结构之间强的手性堆积和 π - π 相互作用对多种分级组装体的形成和稳定起到重要作用^[3,17].

2.7 聚前药两亲分子组装体的体外药物释放实验

分别取 200 μ L 0.1 g/L 聚合前药两亲分子大复合胶束和错列堆积片状结构组装体装入透析管中,然后将透析管浸入含有不同二巯苏糖醇(DTT)浓度(0, 2 μ mol/L, 5 mmol/L 和 10 mmol/L)的磷酸盐(PBS)缓冲液(0.01 mmol/L)中,设定条件为 pH 7.4, 温度 37 $^{\circ}$ C, 搅拌速度 1 000 r/min. 定时取 10 mL 透析液测试,并补充等体积的新鲜缓冲液到试剂瓶中. 采用紫外来定量药物释放的速率.

载药量(DLC/%)定义为

$$DLC = W_{\text{conjugated}} / W_{\text{polyprodrug}} \times 100\%$$

式中, $W_{\text{conjugated}}$ 和 $W_{\text{polyprodrug}}$ 分别为聚前药两亲分子上通过化学键连接的药物总质量和聚前药两亲分子的总质量. 系列三嵌段聚合物分子的载药量总结见表 1.

聚前药两亲分子载药体系呈现出高载药的特点(载药量大于 50% 质量分数, 比普通的物理包埋载药体系的载药量提高近 5 倍, 载药效率提高近 10 倍), 并且在体内肿瘤微环境下, 呈自触发释放 CPT 原药^[8]; 另外由于其粒子表面是亲水性的 PEG 嵌段, 所以纳米组装体可以稳定地存在于水溶液中.

如图 7 所示, 错列堆积片层结构纳米粒子和大复合胶束纳米粒子的 24 h 药物累计释放量分别达 40% 和 66%; 大复合胶束粒子的降解速度和药物释放速度更快, 我们推测复合胶束内部的亲水空腔更有利于自由巯基的扩散, 因而二硫键断裂释放原药的速度更快. 同时, 二硫键交换是一个平衡反应, 所以原药不能 100% 释放.

2.8 组装体细胞内分布荧光成像

先把 HepG2 细胞种在专用的四孔共聚焦成像培养皿中, 培养过夜贴壁后, 分别加入两种形貌的聚前药两亲分子组装体(复合胶束和错列堆积片层结构), CPT 的等效浓度为 10 mg/L, 分别培养 30 min,

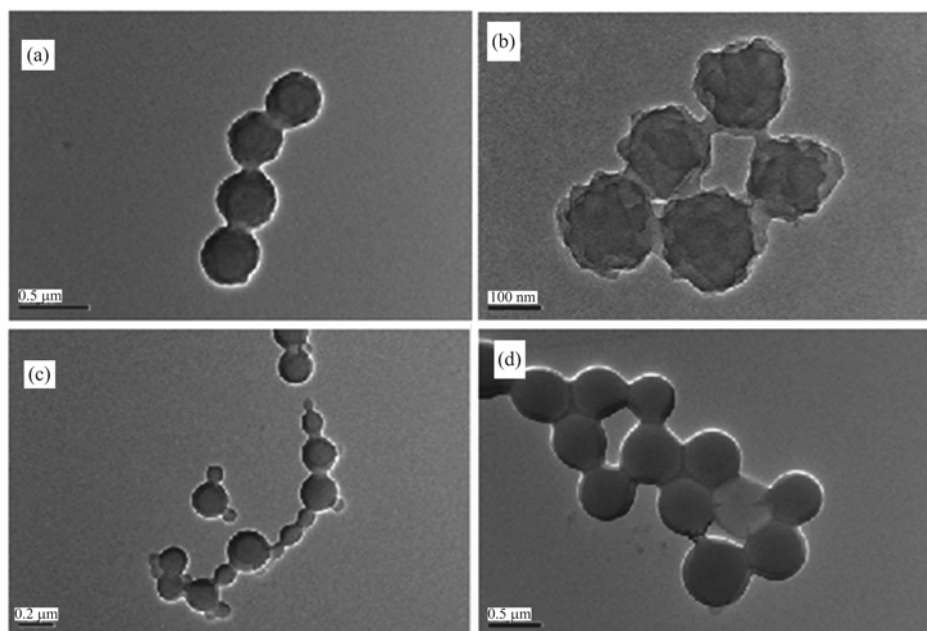
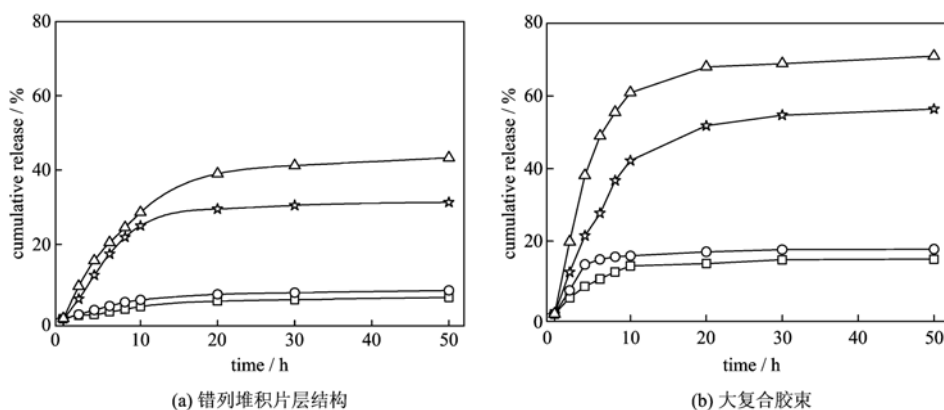


图 6 PCPTM₁₄-*b*-PEG₄₅-*b*-PCPTM₁₄ (a), (c) 和 PCPTM₅₃-*b*-PEG₄₅-*b*-PCPTM₅₃ (b), (d) 组装体的 TEM 照片, 共溶剂分别为 1,4-二氧六环(a), (b) 和 DMF(c), (d)

Fig. 6 Typical TEM images recorded for multiple assemblies of PCPTM₁₄-*b*-PEG₄₅-*b*-PCPTM₁₄ (a), (c) and PCPTM₅₃-*b*-PEG₄₅-*b*-PCPTM₅₃ (b), (d) polyprodrug amphiphiles, formed by adding water into triblock copolymers in 1,4-dioxane (a), (b) or in DMF (c), (d)



(□) 0 μmol/L DTT; (○) 2 μmol/L DTT; (☆) 5 mmol/L DTT; (△) 10 mmol/L DTT

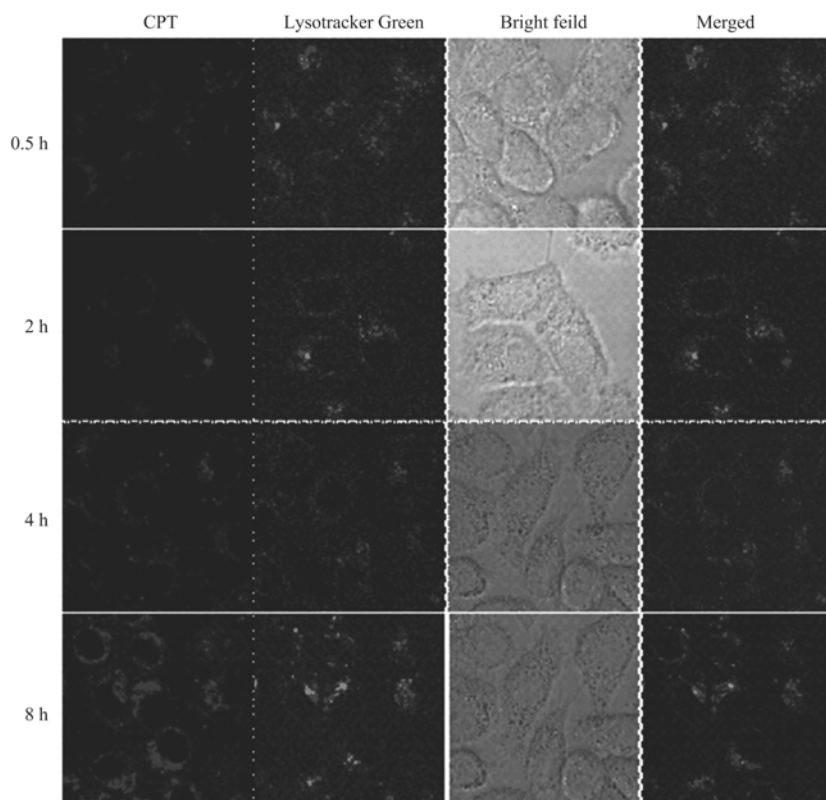
图 7 PCPT₃₇-b-PEG₄₅-b-PCPT₃₇ 组装体在 pH 7.4, 37 °C 的含不同浓度 DTT 的 PBS 缓冲液(0.01 mol/L)中的 CPT 释放曲线

Fig. 7 In vitro CPT release profiles recorded for the aqueous solution of PCPT₃₇-b-PEG₄₅-b-PCPT₃₇ polyprodrug amphiphiles with different morphologies in 0.01 mol/L PBS at pH 7.4, 37 °C under different content of DTT

2 h, 4 h 和 8 h, 然后用冷的 PBS 轻轻冲洗 5 次以上, 并加入少许新鲜的无血清 DMEM 培养基, 在线培养成像. 组装体所发出的荧光来源于喜树碱基元, 激发光源选取 405 nm 激发, 信号接收通道波长设置为 420~470 nm. 为共定位研究组装体在细胞内的分布, 在成像前 30 min, 每孔加入 0.5 μL 细胞器染色探针. 用绿色溶酶体探针定位溶酶体和晚期内

涵体, 采用 488 nm 激光光源激发, 收集 500~560 nm 发射信号, 荧光表示为绿色.

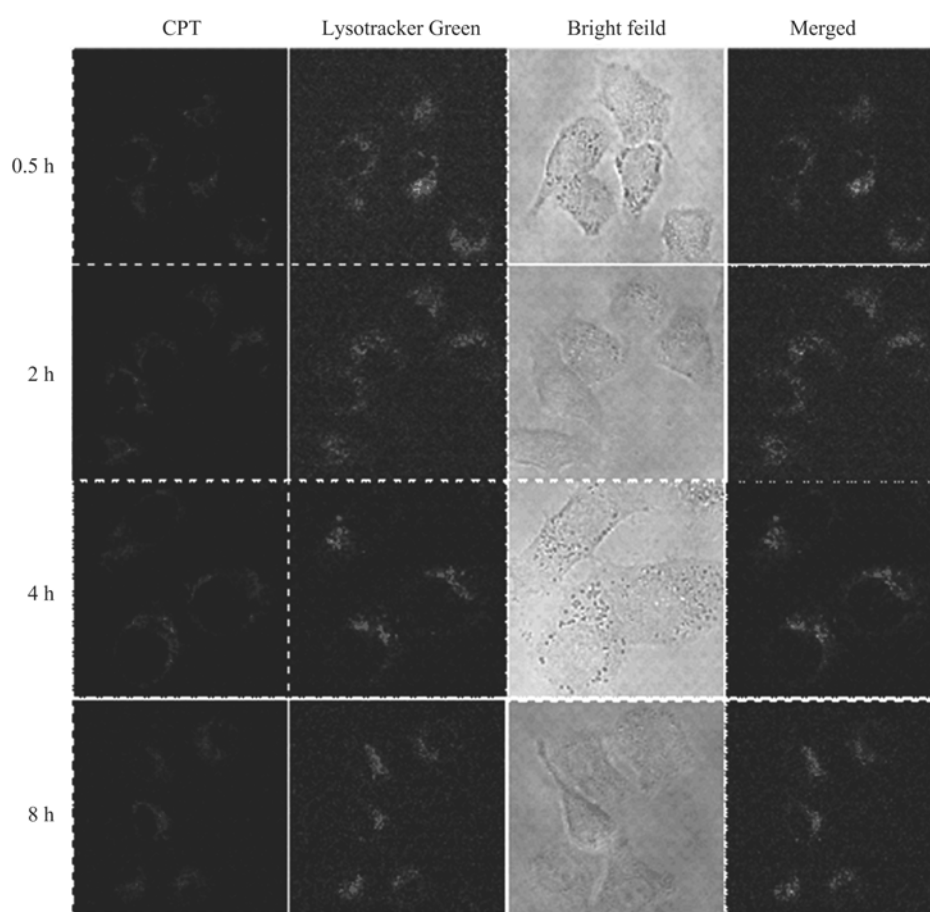
针对 PCPTM₃₇-b-PEG-b-PCPTM₃₇ 错列堆积片层和大复合胶束两种纳米结构, 我们采用 HepG2 细胞与组装体共培养观察细胞内吞过程. 采用共聚焦显微镜 (CLSM) 在线跟踪肿瘤细胞内吞 30 min 到 8 h 的荧光强度变化和分布 (图 8 和图 9). 同时采



The endolysosomes were stained with LysoTracker Green (green channel), and blue channel fluorescence was originated from CPT moieties

图 8 PCPT₃₇-b-PEG₄₅-b-PCPT₃₇ 错列堆积片层结构组装体细胞内吞照片

Fig. 8 Cellular internalization analysis for staggered lamellae nanostructure of PCPT₃₇-b-PEG₄₅-b-PCPT₃₇



The endolysosomes were stained with Lysotracker Green (green channel), and blue channel fluorescence was originated from CPT moieties

图 9 PCPT₃₇-b-PEG₄₅-b-PCPT₃₇大复合胶束组装体细胞内吞照片。

Fig. 9 Cellular internalization analysis for large compound micelles nanostructure of PCPT₃₇-b-PEG₄₅-b-PCPT₃₇

用绿色溶酶体探针定位晚期内涵体和溶酶体。研究发现,大复合胶束和错列堆积片层组装体都可以在较短的时间内进入细胞。另外,从蓝色荧光和绿色荧光的共定位程度可以判断药物在肿瘤细胞内的位置,培养 8 h,两种纳米结构中的 CPT 的蓝色荧光都明显游离出绿色荧光范围,进入细胞质中,该结果表明药物载体可以很快进入细胞质的还原性环境,细胞质内的大量 GSH 促使药物解离释放,从而提高发挥药效。

对比蓝色通道荧光强度发现,错列堆积片层结构比大复合胶束结构纳米粒子进细胞快。已有大量研究表明,纳米粒子的形状、大小和表面性质显著影响纳米粒子与细胞膜的相互作用,进而影响细胞内吞^[18-21]。且粒子表面的突起和凹陷等特征显著影响粒子与细胞膜的相互作用,从而影响细胞内吞。增加粒子表面纳米级粗糙程度,可以显著降低粒子与细

胞膜之间的排斥作用(包括亲水排斥和静电排斥),从而促进纳米粒子粘附和细胞摄取。根据电镜照片可以看出错列堆积片层结构表面粗糙,存在纳米级的凹陷和突起等(图 5(a),(b)),而大复合胶束纳米粒子表面则比较光滑(图 5(c),(d)),因此内吞速率的差异性可以归结于纳米粒子形貌的差异性。

2.9 体外毒性实验

选用 HepG 2 细胞系,通过 MTT 法检测三嵌段聚前药两亲分子纳米粒子的抗癌药效。将细胞接种在 96 孔板上,每个孔加 100 μ L 培养基,初始密度约为每孔 8 000 个细胞,培养过夜至细胞贴壁,再用换取新鲜的培养基替代,分别加入用不同形貌、浓度的组装体培养 24 h。另设细胞空白对照组和培养基空白组,每孔设 5 复孔。每孔加入 20 μ L MTT 试剂(PBS 溶液, 5 g/L),继续培养 5 h 后,吸出 DMEM 培养基,加入 180 μ L DMSO,酶标仪检测 570 nm 的

吸光度值(A). 每次实验条件均采集 4 组数据, 所得到的最终数据是 4 组平行试验的平均值及标准偏差(\pm SD), 以培养基空白组调零, 计算细胞存活率. 如图 10 所示, 从聚合物纳米粒子与 HepG2 细胞共培养 24 h 后的细胞存活率结果可以看出, 两种纳米结构的粒子都具有明显的抗肿瘤效果. 肿瘤细胞的胞质具有显著的还原性特征, GSH 含量可达 ~ 10 mM; 因此, 聚前药两亲分子纳米粒子进入肿瘤细胞以后会发生还原性响应药物释放, 释放出来活性抗癌药物 CPT, 从而抑杀肿瘤细胞, 表现出良好的抗癌活性. 另外, 由于大复合胶束组装体更易降解, 药物释放速率较快, 所以细胞毒性相对较大, 但并不显著, 可能是由于错列堆积片层结构纳米粒子具有更快的细胞内吞速率, 在相同的时间内进入细胞内的大分子药物较多, 从而抵消了药物释放速率慢的影响.

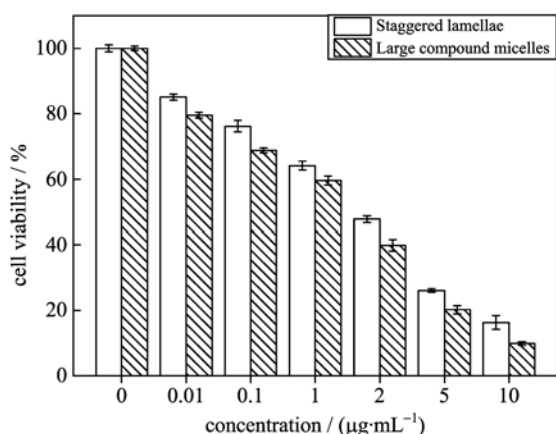


图 10 不同浓度 $\text{PCPT}_{37}\text{-}b\text{-PEG}_{45}\text{-}b\text{-PCPT}_{37}$ 组装体与 HepG2 细胞共培养 24 h 细胞活性示意图 (MTT 法检测)

Fig. 10 HepG2 cells viability after incubation with the $\text{PCPT}_{37}\text{-}b\text{-PEG}_{45}\text{-}b\text{-PCPT}_{37}$ for 24 h at concentrations ranging from 0.01 to 10 mg/L, using the MTT assay

3 结论

本体系中, 三嵌段聚前药两亲分子 $\text{PCPTM}\text{-}b\text{-PEG}_{45}\text{-}b\text{-PCPTM}$ 是一种典型的聚前药两亲分子, 具有极高的载药量 ($>50\%$ 质量分数), 同时提高了药物分子的水溶性、稳定性, 兼具备肿瘤细胞还原性环境响应释放喜树碱原药特点.

早期科学家们的研究表明, 高分子自组装聚集体的形貌特征与两亲性嵌段共聚物的亲水/疏水链嵌段比有直接关系. 当亲水链段较长时, 通常形

成球形胶束粒子; 而当疏水链段足够长时, 易形成棒状、囊泡或其他更复杂的聚集体结构. 为了研究嵌段比对形貌的影响, 我们使用 3 组样品进行组装行为的研究. 其中 PEG 链的长度固定为聚合度 $\text{DP}=45$, 疏水端的聚合度分别为 14, 37 和 53. 3 种聚合度的 $\text{PCPTM}\text{-}b\text{-PEG}\text{-}b\text{-PCPTM}$ 嵌段聚合物均具有高的载药量. 聚前药两亲分子可以组装得到均一、稳定的大复合胶束和错列堆积片层结构. 其中错列堆积片层结构在三嵌段聚合物自组装研究中是首次报道. 两种组装体都可以迅速地进入细胞并到达还原性的细胞质微环境, 对提高抗癌药物的药效具有重要的探索意义.

参考文献 (References)

- [1] Hsiang Y H, Hertzberg R, Hecht S, et al. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1985, 260 (27): 14 873-14 878.
- [2] Shen Y, Jin E, Zhang B, et al. Prodrugs forming high drug loading multifunctional nanocapsules for intracellular cancer drug delivery [J]. Journal of American Chemical Society, 2010, 132 (12): 4 259-4 265.
- [3] Cheetham A G, Zhang P, Lin Y A, et al. Supramolecular nanostructures formed by anticancer drug assembly [J]. Journal of American Chemical Society, 2013, 135(8): 2 907-2 910.
- [4] Ge Z, Liu S. Functional block copolymer assemblies responsive to tumor and intracellular microenvironments for site-specific drug delivery and enhanced imaging performance [J]. Chemical Society reviews, 2013, 42(17): 7 289-7 325.
- [5] Hu J, Liu S. Engineering responsive polymer building blocks with host-guest molecular recognition for functional applications [J]. Accounts of Chemical Research, 2014, 47(7): 2 084-2 095.
- [6] Hu J, Zhang G, Ge Z, et al. Stimuli-responsive tertiary amine methacrylate-based block copolymers: Synthesis, supramolecular self-assembly and functional applications [J]. Progress in Polymer Science, 2014; 39(6): 1 096-1 143.
- [7] Hu X, Tian J, Liu T, et al. Photo-triggered release of caged camptothecin prodrugs from dually responsive shell cross-linked micelles [J]. Macromolecules, 2013, 46(15): 6 243-6 256.
- [8] Hu X, Hu J, Tian J, et al. Polyprodrug amphiphiles: Hierarchical assemblies for shape-regulated cellular

- internalization, trafficking, and drug delivery [J]. Journal of American Chemical Society, 2013, 135(46): 17 617-17 629.
- [9] Alconcel S N S, Baas A S, Maynard H D. FDA-approved poly(ethylene glycol) - protein conjugate drugs [J]. Polymer Chemistry, 2011, 2(7): 1 442-1 448.
- [10] Li W, Zhan P, De Clercq E, et al. Current drug research on PEGylation with small molecular agents [J]. Progress in Polymer Science, 2013, 38(3): 421-444.
- [11] Zhang L, Eisenberg A. Multiple morphologies of “crew-cut” aggregates of polystyrene-*b*-poly(acrylic acid) block copolymers [J]. Science, 1995, 268(5218): 1 728-1 731.
- [12] Zhang L, Eisenberg A. Multiple morphologies and characteristics of “crew-cut” micelle-like aggregates of polystyrene-*b*-poly(acrylic acid) diblock copolymers in aqueous solutions [J]. Journal of the American Chemical Society, 1996, 118(13): 3 168-3 181.
- [13] Zhang L, Yu K, Eisenberg A. Ion-induced morphological changes in “crew-cut” aggregates of amphiphilic block copolymers [J]. Science, 1996, 272(5269): 1 777-1 779.
- [14] Mai Y, Eisenberg A. Self-assembly of block copolymers [J]. Chemical Society Reviews, 2012, 41(18): 5 969-5 985.
- [15] Balsara N P, Tirrell M, Lodge T P. Micelle formation of BAB triblock copolymers in solvents that preferentially dissolve the A block [J]. Macromolecules, 1991, 24(8): 1 975-1 986.
- [16] Choi S H, Lodge T P, Bates F S. Mechanism of molecular exchange in diblock copolymer micelles: Hypersensitivity to core chain length [J]. Physical Review Letters, 2010, 104(4): 047802; doi: 10.1103/PhysRevLett.104.047802.
- [17] Bellomo E G, Wyrsta M D, Pakstis L, et al. Stimuli-responsive polypeptide vesicles by conformation-specific assembly [J]. Nature Materials, 2004, 3(4): 244-248.
- [18] Verma A, Uzun O, Hu Y, et al. Surface-structure-regulated cell-membrane penetration by monolayer-protected nanoparticles [J]. Nature Materials, 2008, 7(7): 588-595.
- [19] Jewell C M, Jung J M, Atukorale P U, et al. Oligonucleotide delivery by cell-penetrating “striped” nanoparticles [J]. Angewandte Chemie, 2011, 50(51): 12 312-12 315.
- [20] Niu Y, Yu M, Hartono S B, et al. Nanoparticles mimicking viral surface topography for enhanced cellular delivery [J]. Advanced Materials, 2013, 25(43): 6 233-6 237.
- [21] Nel A E, Madler L, Velegol D, et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface [J]. Nature Materials, 2009, 8(7): 543-557.