

Heparosan 多糖聚合物胶束的制备及体外抗肿瘤活性

葛璐, 邱立朋, 单晓甜, 毛静, 李志超, 陈敬华*

(江南大学药学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 聚合物胶束作为新型药物传递系统可以提高疏水性药物的溶解性并具有良好的生物相容性和稳定性。本研究通过合成 heparosan 多糖-维生素 E 琥珀酸酯 (heparosan-adipic dihydrazide-vitamin E succinate, KV) 载体, 利用核磁共振氢谱 (^1H NMR) 对其进行结构确证。以疏水性抗肿瘤药多柔比星 (doxorubicin, DOX) 为模型药物, 制备载 DOX 的 KV 聚合物胶束 (DOX/KV), 并对其表征。结果表明, 胶束形貌为球形, 粒径为 140~150 nm, zeta 电位为 -20 mV 左右, 包封率为 80% 左右, 载药量在 10%~15% 之间, 并且具有良好的缓释行为。选择 MGC80-3 肿瘤细胞和 COS7 正常细胞考察体外细胞毒性和细胞摄取情况。体外细胞毒性结果显示, 空白胶束对两种细胞几乎没有毒性, 载药胶束对 MGC80-3 细胞的细胞毒性要大于 COS7 细胞。从细胞摄取考察也可以看出, 载药胶束对 MGC80-3 细胞的摄取量更高。综上, KV 可以很好地包载 DOX, 并且可以提高其对癌细胞的选择性, 具有良好的抗肿瘤活性。

关键词: Heparosan 多糖; 维生素 E 琥珀酸酯; 聚合物胶束; 多柔比星

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 04-0621-09

Preparation and properties of heparosan polysaccharide-vitamin E succinate polymer micelles

GE Lu, QIU Li-peng, SHAN Xiao-tian, MAO Jing, LI Zhi-chao, CHEN Jing-hua*

(School of Pharmaceutical Sciences, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Due to the advantages of polymer micelles and the anticancer activity of doxorubicin (DOX), the polymer micelle of DOX is expected to be used for drug delivery in anticancer applications. As a biocompatible and biodegradable polymer, amphiphilic copolymer heparosan-adipic dihydrazide-vitamin E succinate (KV) can be self-assembled to form micelles with core-shell structure in aqueous phase. In this article, KV conjugates with two different degrees of substitution (DS) were synthesized to load DOX and were characterized by ^1H NMR. The size distribution, morphology, zeta potential and release behavior *in vitro* of the DOX-loaded micelles were studied. *In vitro* cytotoxicity was investigated by MTT assay against MGC80-3 and COS7 cells. The cellular uptake of the DOX-loaded micelles was observed by fluorescence microscopy and flow cytometry. The ^1H NMR spectra results confirmed the KV polymers were successfully conjugated and the degree of VES grafted on heparosan polysaccharide were 12% and 25%. Briefly, the micelles with two different DS were expressed as KV₁₂ and KV₂₅. The DOX-loaded micelles could resist serum adsorption because of the negative charge on the surface. The average particle size measured by dynamic light scattering (DLS) method was 140–150 nm and the TEM results indicated that the morphology of DOX-loaded micelles were spherical. The encapsulation efficiency and drug loading were 80% and 10%–15%, respectively. The DOX-loaded micelles had sustained

收稿日期: 2017-11-03; 修回日期: 2017-12-05.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81503007).

*通讯作者 Tel: 86-13-861704096, E-mail: chenjinghua@jiangnan.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-1083

release behavior and the cumulative release of DOX/KV₁₂ was slightly higher than DOX/KV₂₅. Moreover, the viabilities of cells which were co-incubated with blank micelles were greater than 90%. It is clear that the blank micelles almost non-toxic to both cells. The IC₅₀ of drug-loaded micelles against COS7 cells was much higher than that of MGC80-3 cells and the DOX/KV₁₂ exhibited greater cytotoxicity. The cellular uptake of DOX/KV on MGC80-3 was greater than COS7 cells. In this study, KV polymer micelles have a sustained drug release activity and have a good selectivity to tumor cells, so it would be a potential carrier in drug delivery.

Key words: heparosan polysaccharide; vitamin E succinate; polymer micelles; doxorubicin

目前, 化疗是临床上治疗恶性肿瘤最常见的方式之一。多柔比星 (doxorubicin, DOX) 是抗生素类抗癌药物, 作为最常用的化疗药物之一, 可用于多种癌症的治疗^[1, 2], 但其靶向性差, 毒副作用强, 而且长期使用会产生耐药性^[3–5]。药物传递系统靶向治疗癌症受到了人们的广泛关注。聚合物胶束作为一种常用的药物载体, 有很好的发展前景, 尤其是在药剂学和生物学领域^[6]。这类载体一般是两亲性嵌段共聚物在浓度大于临界胶束浓度 (critical micelle concentration, CMC) 时在水溶液中自组装形成的具有壳核结构的纳米粒^[7–9], 疏水性内核可以包载亲脂性药物, 亲水性外壳使载体在静脉注射后有效地避免网状内皮系统的清除, 增加载体在体内的稳定性, 达到长循环的效果^[10, 11]。作为一种纳米粒, 聚合物胶束还可以通过渗透与滞留效应 (EPR) 使药物优先累积到肿瘤组织, 实现被动靶向, 减少毒副作用^[12–14]。

然而, 合成型的聚合物胶束材料显现出在体内难以被降解甚至会引起肾脏毒性等缺点^[15], 故生物可降解性和生物相容性成为在研究过程中需要考虑的关键性因素^[16]。天然多糖作为一种聚合物材料, 因其生物相容性好、生物可降解、无免疫原性被广泛的应用于纳米载体中^[17]。Heparosan 多糖是硫酸乙酰肝素和肝素的前体, 可通过发酵大肠杆菌 heparosan 菌株再从其荚膜中分离获得^[18, 19]。Heparosan 多糖的非硫酸化性质使其与肝素相比有更高的细胞摄取效率^[20], 并且没有凝血活性也可以避免肝素在使用中出现的血小板减少症等不良反应, 有更好的生物安全性^[21]。另外, heparosan 多糖可被肿瘤细胞中过表达的 β -葡萄糖醛酸酶降解^[22–24]。由于 heparosan 多糖呈负电性, 可避免在血液中聚集也可防止非特异性吸附到血浆蛋白上^[25]。Heparosan 多糖亲水骨架上也有很多官能团可以进行疏水性修饰, 故适于作为聚合物胶束的亲水性材料。

维生素 E 琥珀酸酯 (*D*- α -tocopheryl succinate, vitamin E succinate, VES) 是维生素 E 的酯类衍生物, 作为一种有潜力的预防药物而受到广泛的关注。

VES 不仅具有抗肿瘤作用, 而且对正常组织无毒副作用^[26–28]。VES 可以抑制肿瘤细胞的迁移并且还可以从多种途径诱导肿瘤细胞的凋亡^[29–31], 抑制肿瘤的浸润、转移, 所以越来越多的研究者将其应用于抗肿瘤药物的传递。

本实验利用疏水性的 VES, 通过己二酸二酰肼 (adipic dihydrazide, ADH) 连接修饰亲水性的天然 heparosan 多糖合成了两种取代度的两亲性共聚物, 在水溶液中自组装形成聚合物胶束包载抗癌药物 DOX, 并对载体胶束的制剂学性质及体外抗肿瘤活性进行了考察。

材料与方法

仪器 Aduance III 核磁共振波谱仪 (德国 Bruker 公司); JEM-2100 透射电子显微镜 (日本 Jeol 公司); UV-2550 紫外可见分光光度计 (日本岛津仪器有限公司); Zetasizer Nano ZS 纳米粒度仪 (英国 Malvern 仪器有限公司); DMIL LED 倒置荧光显微镜、DMIL LED 型荧光显微镜 (德国 Leica 公司); Multiskan GO 酶标仪 (美国 Thermo 公司); FreeZone 2.5L 冷冻干燥机 (美国 Labconco 公司); FACSCalibur 型流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

试剂 维生素 E 琥珀酸酯 (阿拉丁试剂有限公司); 己二酸二酰肼 (ADH)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐 (EDC·HCl)、*N*-羟基丁二酰亚胺 (NHS) (安耐吉化学试剂有限公司); 多柔比星盐酸盐 (DOX·HCl, 浙江海正制药有限公司); 甲酰胺、*N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF)、二氯甲烷 (DCM)、三乙胺 (TEA)、乙醇、四氢呋喃 (THF) (国药集团上海试剂公司)。

细胞与菌株 COS7 和 MGC80-3 细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库; Heparosan 多糖为实验室自制, 相对分子质量为 5.108×10^4 。

Heparosan 多糖-己二酸二酰肼-维生素 E 琥珀酸酯 (heparosan-adipic dihydrazide-vitamin E succinate, KV) 的合成 Heparosan 多糖 (50 mg, -COOH 摩尔

数 1.25×10^{-4} mol) 溶于超纯水溶液中, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 油浴加热磁力搅拌使其溶解, 冷却至室温。ADH (21.75 mg/108.75 mg) 加入到反应混合物中。加入 EDC (40 mg, 2.5×10^{-4} mol) 和 NHS (30 mg, 2.5×10^{-4} mol), 用 0.1 mol HCl 时反应液的 pH 维持在 4.75, 反应 1 h, 用 0.1 mol NaOH 调节反应液 pH 至 7.0 来终止反应, 反应结束后得到反应液在蒸馏水中透析 (MWCO 3500), 得到聚合物溶液用 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 水系的膜过滤除去不溶性杂质, 冷冻干燥, 得白色粉末 heparosan-ADH。

VES (79.56 mg, 1.5×10^{-4} mol) 溶解于 20 mL DMF 中。EDC (28.6 mg, 3×10^{-4} mol) 和 NHS (17.1 mg, 3×10^{-4} mol) 加入溶液中, 避光冰浴下磁力搅拌 2 h 活化羧基。将 heparosan-ADH 50 mg 溶于甲酰胺溶液中, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 油浴加热磁力搅拌使其溶解, 冷却至室温。将 heparosan-ADH 溶液加入到 VES 溶液中混合液氮气环境下搅拌反应 24 h。反应结束后得到反应液用蒸馏水透析 (MWCO 3500) 2 天, 离心, 得白色粉末。采用 $^1\text{H NMR}$ 法检测 KV 结构, 并计算取代度。

临界胶束浓度的测定 将芘溶于丙酮中得浓度为 $6 \times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 溶液, 在 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温和氮气流下将丙酮充分蒸发, 配制质量浓度范围为 $5 \times 10^{-4} \sim 2.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 胶束溶液, 将溶液加入芘中, 得到芘的终浓度为 $6 \times 10^{-7}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 超声处理 30 min, 静置过夜, 利用荧光分光光度计测定芘的激发光谱, 发射波长为 375 nm, 激发波长为 280~400 nm。

载药胶束的制备 将 DOX·HCl 溶于甲醇中得到 $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 溶液, 每 10 mL 溶液中加入 TEA 200 μL , 室温下磁力搅拌 24 h 旋蒸除掉溶剂得到脱盐 DOX, 再将其溶于 THF 中避光保存。

溶剂挥发超声法制备载药胶束。将 KV 共聚物溶于 pH 7.4 磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 中, 室温下磁力搅拌配制成 $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 胶束溶液, 10 mL 胶束溶液中缓慢滴加 DOX 的 THF 溶液 2 mL, 室温下避光磁力搅拌 12 h 至 THF 挥发完全。冰浴下超声 30 min, 离心除去未包入或吸附在表面的药物, 最后用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 的滤膜过滤得载药胶束 DOX/KV。

粒径、zeta 电位及微观形态观察 取适量胶束溶液于测量杯中, 利用 Zetasizer Nano ZS 纳米粒度仪测量胶束的粒径和 zeta 电位。配制质量浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 胶束溶液, 将溶液滴在镀碳膜的铜网上, 待液滴自然挥发干后用 2% 磷钨酸钠溶液进行负染色, 干燥后利用 JEM-2100 透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 进行观察。

载药量和包封率测定 利用紫外分光光度法测定载药胶束的包封率 (encapsulation efficiency, EE) 和载药量 (drug loading, DL)。取 DOX/KV 溶液 500 μL , 用甲酰胺定容至 10 mL, 避光超声 10 min 破坏胶束结构释放出药物, 通过紫外分光光度计检测其在 481 nm 处吸光度, 计算总药量。另取 DOX/KV 溶液 2 mL 于超滤杯中 (MWCO 3000), $5200\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 min 截留载药胶束, 通过紫外分光光度计测定滤出液在 481 nm 处吸光度, 计算游离 DOX 的量。最后通过总药量和游离药量分别计算 DL 和 EE。

体外药物释放实验 考察载药胶束的体外释放行为的释放介质为 pH 7.4、pH 5.0 和 β -葡萄糖醛酸酶降解的 PBS 溶液, 分别模拟正常组织与肿瘤组织内的微环境。取 DOX/KV₁₂ 载药胶束溶液 2 mL 装入透析袋中 (MWCO 3500), 将透析袋完全浸没于 20 mL pH 7.4 和 pH 5.0 PBS 中。为了评估 β -葡萄糖醛酸酶对药物释放行为的影响, 将 β -葡萄糖醛糖苷酶 1 mg 加入到含有载药胶束的透析袋中, 降解 30 min。 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $100\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床中避光进行, 在设计的时间点吸出 1 mL 释放介质并补充等量的相同的释放介质以保证漏槽环境。通过测定不同时间点所取 PBS 中 DOX 的含量计算 DOX 的累积释放量。

体外细胞毒性的考察 通过 MTT 法对体外毒性进行考察, 选择 MGC80-3 与 COS7 细胞作为体外细胞模型, 将细胞以每孔 7000 个铺于 96 孔板中, 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 环境中孵育 24 h 使其贴壁生长后, 加入含药培养基 100 μL , 孵育 48 h 后吸出培养基加入 MTT 孵育 4 h 后吸出 MTT, 加入 DMSO 100 μL , 测定 570 nm 处吸光度, 计算细胞存活率。

荧光显微镜定性观察细胞摄取 将对数生长期的细胞以每孔 10^4 个铺于 24 孔板中, 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 环境中孵育 24 h 使其贴壁生长后, 加入 DOX 终质量浓度为 $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 100 μL 含药培养基孵育 1、2 和 4 h 后, 弃去培养基, 用 PBS (pH 7.4) 洗掉残留培养基, 加入 4% 多聚甲醛 200 μL 固定 15 min, 加入 PBS (pH 7.4) 洗掉多聚甲醛, 加入细胞核染色剂 DAPI 200 μL 染色 30 min, 吸去染色剂并用 PBS (pH 7.4) 洗掉多余残留染色剂后, 每孔加入 PBS 300 μL , 利用荧光显微镜进行观察。

流式细胞仪定量观察细胞摄取 将对数生长期的细胞以每孔 4×10^5 个铺于 6 孔板中, 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 环境中孵育 24 h 使其贴壁生长后, 加入 DOX 终质量浓度为 $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 100 μL 含药培养基孵育 1、

2 和 4 h 后, 弃去培养基, 用 PBS (pH 7.4) 洗掉残留培养基, 加入胰酶 300 μ L 消化细胞, 加入培养基终止消化, 收集细胞, 离心去除培养基, 将细胞用 PBS (pH 7.4) 吹散, 转移至流式管中, 利用流式细胞仪进行定量观察。

统计学方法 实验数据表示为 $\bar{x} \pm s$ 。统计分析采用 one-way ANOVA (SPSS 17.0, Chicago, IL, USA)。统计学的显著、非常显著和极非常显著差异分别表示为 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 和 $P < 0.001$ 。

结果与讨论

1 KV 的合成

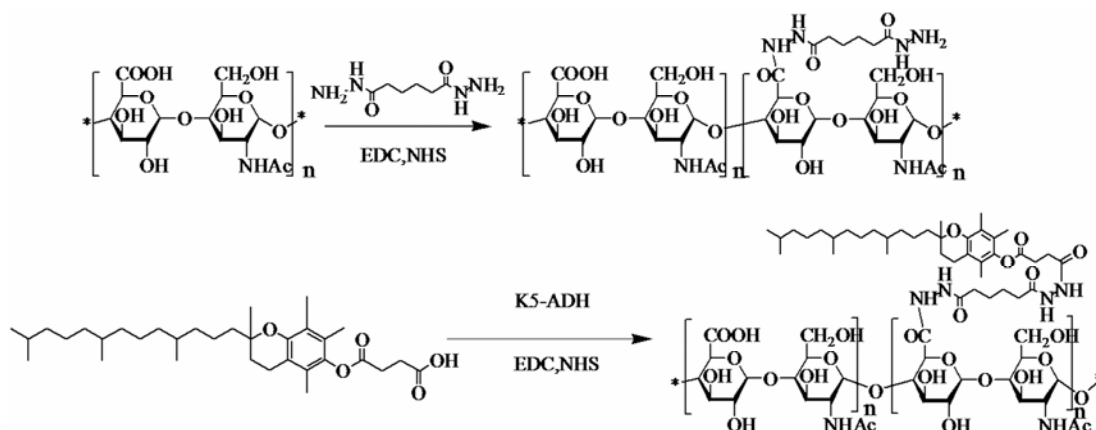
两亲性共聚物 KV 的合成如合成路线 1 所示, 通过 $^1\text{H NMR}$ 确证其结构, 由图 1 可知, KV 图谱中 δ 3.63、3.83 和 5.31 处出现了 heparosan 多糖氨基葡萄糖上 H 的特征吸收峰, 1.98 处为 heparosan 多糖氨基葡萄糖甲基 (-CO-CH₃) 的特征吸收峰, 3.29、3.72 和 4.54 处出现了 heparosan 多糖葡萄糖醛酸上 H 的特征

吸收峰。1.05~1.35 和 2.85 处出现了 VES 烷基链上亚甲基 (-CH₂-) 的特征吸收峰, 2.63 出现了 VES 苯环上甲基 (-CH₃) 的特征吸收峰。8.05~8.11 之间出现了酰胺基团 (-CONH-) 的吸收峰, 由此确定两亲性共聚物 KV 已成功合成。

通过峰面积的积分计算 heparosan 多糖上 VES 分子的取代度 (degree of substitution, DS), 即平均每个 heparosan 多糖双糖单元所接枝 VES 分子的个数, 2.63 为 VES 分子中 -CH₃ 中氢原子化学位移, 5.31 处为 heparosan 多糖氨基葡萄糖 1 号碳上 1 个氢原子化学位移, 利用峰积分面积比值计算 VES 的取代度。利用不同的投料比合成了两种取代度的 KV 共聚物, 取代度为 12% 与 25%, 分别用 KV₁₂ 和 KV₂₅ 表示。

2 载药胶束的性质表征

采用溶剂挥发超声法制备载药胶束, 分别利用动态光散射法 (dynamic light scattering, DLS) 和 TEM 对胶束的大小和形态进行考察, 胶束的粒径大小如表 1 所示, 空白胶束水化半径在 120~130 nm 之



Scheme 1 Synthetic scheme of heparosan-adipic dihydrazide-vitamin E succinate (KV) copolymers

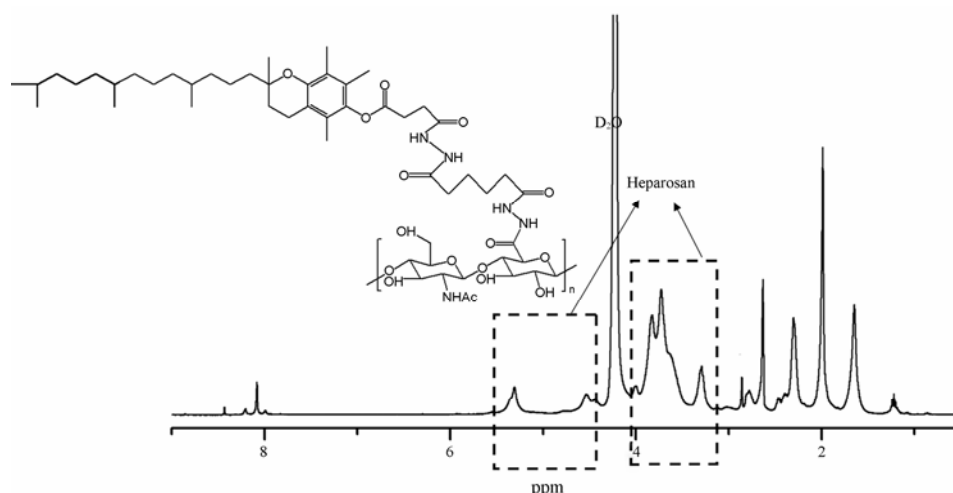


Figure 1 $^1\text{H NMR}$ spectra of KV in D₂O

Table 1 Characterization of blank micelles and drug-loaded micelles. ^aDetermined by dynamic light scattering (DLS); ^bThe rate of doxorubicin (DOX) to polymers was 2/10 (mg/mg); ^cPyrene probe method was used to determined micellar critical micelle concentration (CMC). KV: Heparosan polysaccharide-vitamin E succinate; PDI: Polydispersity index; EE: Encapsulation efficiency; DL: Drug loading

	Micelles size ^a /nm	PDI ^a	δ -Potential ^a /mV	EE ^b /%	DL ^b /%	CMC ^c /mg·mL ⁻¹
KV ₁₂	128.6 ± 4.6	0.222 ± 0.012	-24.3 ± 2.3	-	-	20.56 ± 1.58
KV ₂₅	123.4 ± 7.8	0.204 ± 0.003	-20.4 ± 2.3	-	-	17.43 ± 1.25
DOX/KV ₁₂	153.4 ± 6.3	0.147 ± 0.006	-25.7 ± 3.4	78.22 ± 1.67	12.53 ± 1.34	-
DOX/KV ₂₅	145.1 ± 5.6	0.128 ± 0.015	-22.5 ± 3.6	89.94 ± 2.57	14.67 ± 0.85	-

间, 而载药胶束在 140~160 nm 之间, 比空白胶束略有增加, 随着疏水端取代度的增加, 疏水内核形成更加紧密, 粒径略有减小。载药胶束 DOX/KV₁₂ 粒径分布图见图 2a, TEM 形貌见图 2b, 可以看到载药胶束呈均匀球形, 且粒径较为均一。这样的特性可以使胶束在体内有效躲避网状内皮系统的吞噬, 并可通过 EPR 蓄积到肿瘤组织中^[32]。

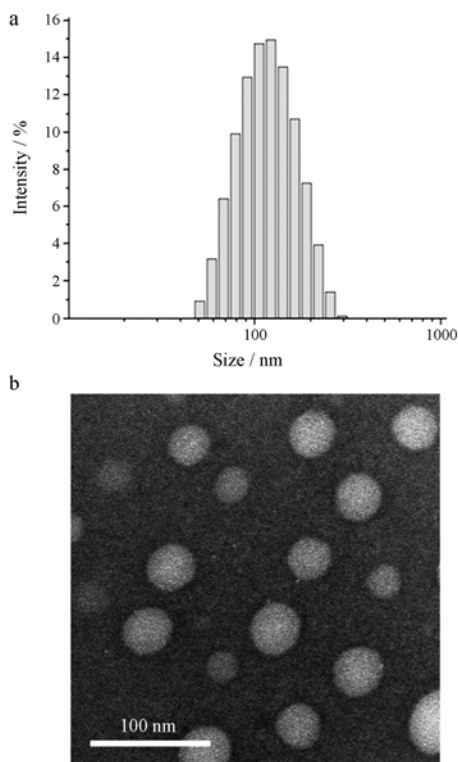


Figure 2 Size distribution (a) and TEM image (b) of KV₁₂

利用芘探针法测定了两种取代度聚合物形成胶束的 CMC, 从表 1 可以看到, 两种取代度的聚合物均有较小的 CMC 值, 说明形成聚合物胶束有较好的热力学稳定性^[33], 疏水端的取代度越高, 其 CMC 值越低, 这是因为随着疏水性分子 VES 量的增多, 亲水-疏水作用增强, 故 KV₂₅ 相较于 KV₁₂ 可形成更稳定的胶束, 表现为更低的 CMC 值, 说明取代度是影响 heparosan 多糖胶束 CMC 的重要因素。

Heparosan 多糖结构中含有羧基, 故其本身带有负电荷, 在对 heparosan 多糖进行疏水化修饰时, 羧基并非全部被修饰, 形成的以 heparosan 多糖为亲水外壳的聚合物胶束表面含有大量羧基, 故测得胶束的 zeta 电位为 -20 mV 以上 (表 1) 的负电位, 随着取代度的增大, heparosan 多糖链上接枝的 VES 增多, 链上的羧基含量变少, 从而使胶束表面电荷减少。带有负电荷的聚合物胶束相互排斥不仅可以保证其在体内不会产生聚集, 还可以避免血浆蛋白对其产生吸附^[24], 可以使胶束在体内保持稳定且在血液中有更好的循环能力^[34]。

由表 1 可以看出 DOX/KV₂₅ 和 DOX/KV₁₂ 的封装率在 80% 左右, 载药量在 10%~15% 之间, 有较好的载药量和封装率。疏水端的取代度增加, 胶束的疏水内核与药物的亲和力增强, 故 DOX/KV₂₅ 的载药量和封装率略大。

3 体外释放行为

选择使用 pH 7.4 PBS 模拟血液和 pH 5.0 PBS 模拟肿瘤部位的环境, 加入葡糖醛酸糖苷酶以模拟肿瘤细胞的溶酶体环境, 考察载药胶束 DOX/KV₁₂ 的体外释放行为, 如图 3 所示。从图中可以看到, 在释放的初始阶段释放速率稍快, 在 10 h 时 pH 7.4、pH 5.0 和 β -葡糖醛酸酶组释放率分别为 40.36%、49.10% 和 58.13%, 之后是较长时间的缓释阶段, 最终在 3 组中分别释放了 55.32%、68.24% 和 69.33%。总体而言, 在 pH 5.0 PBS 中 DOX 的释放速率和释放量高于在 pH 7.4 PBS 中的释放速率和释放量, 表明在肿瘤部位促进药物释放行为。由于 DOX 从胶束中的释放主要是通过自由扩散的方式, 故这种区别可能是由于 DOX 在不同 pH 值下的溶解度不同以及 heparosan 多糖与 DOX 之间的静电相互作用。已知, DOX 在离子化状态和低 pH 下溶解性较好。因此, 低 pH 促使封装的 DOX 从内壳迁移到外壳, 导致释放速率的增加。Heparosan 多糖的羧基在低 pH 环境中为非电离状态, 使得其与 DOX 之间的静电作用减弱, 药物得到更充分的释放, 故表现出一定的 pH 敏感药物释放

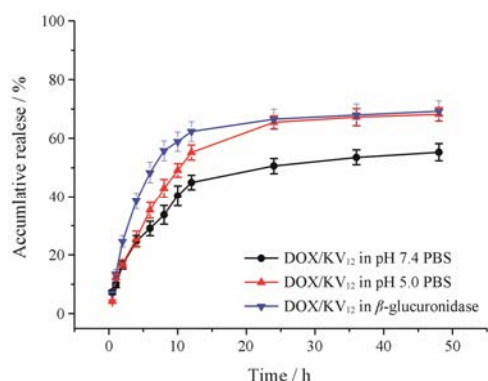


Figure 3 *In vitro* drug release behavior of drug-loaded micelles in pH 7.4 phosphate buffered solution (PBS), pH 5.0 PBS and β -glucuronidase. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

行为。另外，载有 DOX 的胶束加入 β -葡糖醛酸糖苷酶后还显示出加速释放行为。由于 heparosan 多糖降解，在最初 10 h 内，超过 58% 的 DOX 释放出来。肿瘤部位微环境特征包括低 pH 和各种过表达的酶等，且药物释放研究中的现象表明载药胶束可能在肿瘤环境中较好的释放行为。

4 体外细胞毒性

4.1 空白胶束毒性 利用 MTT 法检测空白胶束的细胞毒性，分别考察了载体对正常细胞 COS7 (图 4a) 和肿瘤细胞 MGC80-3 (图 4b) 两种细胞的毒性，从图中可以看到，细胞存活率均在 90% 以上，说明空白胶

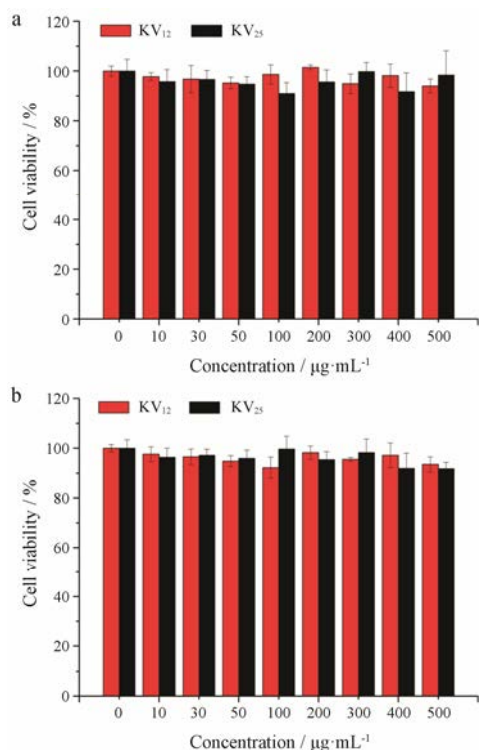


Figure 4 *In vitro* cytotoxicity of the blank micelles on COS7 cells (a) and MGC80-3 cells (b). $n=3$, $\bar{x} \pm s$

束对细胞几乎没有毒性。

4.2 载药胶束毒性 载药胶束的细胞毒性是决定其是否可应用于临床治疗的重要指标之一。为了检测载药胶束的体外抗肿瘤活性，选择游离 DOX 作为阳性对照，同样利用 MTT 法考察了载药胶束对 COS7 细胞 (图 5a) 和 MGC80-3 细胞 (图 5b) 的毒性，从图中可以看到，随着 DOX 的浓度不断增大，细胞毒性也随之增加。游离 DOX 对两种细胞的毒性都大于载药胶束，这是由于游离药物可以通过被动扩散快速进入细胞，发挥作用。

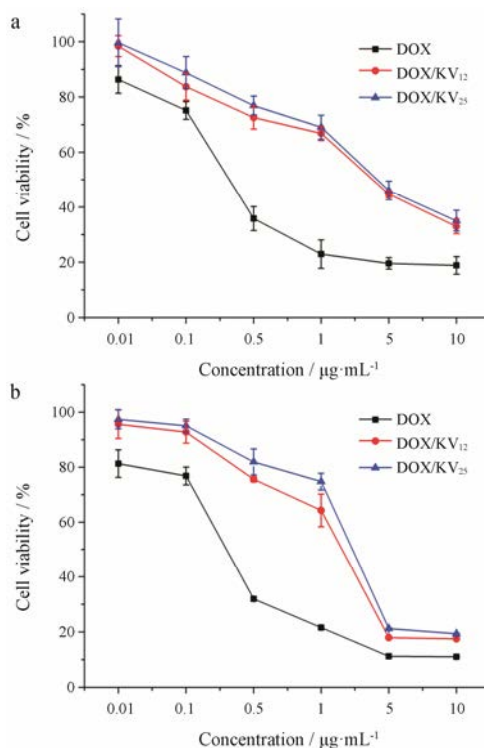


Figure 5 *In vitro* cytotoxicity of the drug-loaded micelles on COS7 cells (a) and MGC80-3 cells (b). $n=3$, $\bar{x} \pm s$

对于 DOX/KV₂₅ 与 DOX/KV₁₂ 胶束而言，它们对 COS7 细胞的半数抑制浓度 (IC_{50} 值) 分别为 3.6 ± 0.2 和 $3.2 \pm 0.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，对于 MGC80-3 细胞 IC_{50} 值分别为 2.03 ± 0.05 和 $1.46 \pm 0.04 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。可以看出，DOX/KV₁₂ 对 MGC80-3 细胞的毒性要大于 DOX/KV₂₅，可能是由于高取代度的衍生物表现出不易水解和聚集的高稳定性^[35]，而 DOX 除了通过自由扩散释放之外还有部分可能是由于胶束的解聚进行释放，故低取代度的载体具有更大的细胞毒性。此外，两种不同取代度的胶束对正常细胞的 IC_{50} 值约为肿瘤细胞的 1.5~2 倍，heparosan 多糖可被肿瘤细胞中过表达的 β -葡糖醛酸酶降解，且细胞内的低 pH 环境也可促进

药物的释放, 故对肿瘤细胞有一定的选择性, 可增强对肿瘤细胞的杀伤作用, 并减少毒副作用。

5 细胞摄取实验

5.1 荧光显微镜定性观察 利用荧光显微镜定性观察两种载药胶束的细胞摄取情况, 对于 COS7 细胞 (图 6a), 随着时间的增加, 细胞摄取量逐渐增加, DOX 进核量也随之增多, 但是两组胶束入胞量远少于 DOX, 且在 4 h 时药物仍基本聚集在细胞质中, 进核量极少。对于 MGC80-3 细胞 (图 6b), 在 1 h 时各组制剂进胞量较少但 DOX 已经进核, 2 h 时后, 细胞内药物的量明显变多, 更多的药物进入到细胞核或聚集在核膜周围, 这说明随着时间的延长, 肿瘤细胞对每组药物的摄取量增加。且从图 6b 中可以看到, 在摄取 2 h 时,

DOX/KV₂₅ 胶束组还有部分药物未从胶束中释放出来而聚集在细胞质中, 而 DOX/KV₁₂ 胶束组的药物基本释放并进入细胞核, 这与前面实验结果一致。

5.2 流式细胞仪定量观察细胞摄取 利用流式细胞仪定量考察载药胶束的细胞摄取情况, COS7 细胞和 MGC80-3 细胞在 4 h 的摄取结果见图 7a, b。从图中可以看出, 游离 DOX 的摄取量要多于胶束组 (图 7c), 可能是由于相对于小分子的游离 DOX 而言, 大分子的载药胶束的摄取方式为胞饮作用, 具有时间、浓度和能量依赖性等^[36], 更不易摄取进入细胞, 但 heparosan 多糖与其他多糖相比有更高的细胞摄取效率^[20]。MGC80-3 细胞对载药胶束的摄取量明显大于 COS7 细胞对其的摄取量 ($P < 0.01$), 与定性观察结果相符。可能的原因是 heparosan 多糖摄取进入 COS7 细胞的途径为能量依赖且仅有少量为巨胞饮途径, 而 heparosan 多糖摄取进入肿瘤细胞为多种途径介导的, 故可选择性地高效摄取进入肿瘤细胞^[37]。

结论

本文所设计的药物传递系统 KV 聚合物胶束采用了天然 heparosan 多糖和 VES, 并考察其制剂学性质及体外抗肿瘤性能结果。体外释放实验表明其具有一定的 pH 响应性和酶敏感性, 可使其在肿瘤组织中释放更多药物。在体外细胞毒性实验中也可以证实, 载药胶束对肿瘤细胞的毒性大于正常细胞, 且相较于正常细胞载药胶束可以更高效地摄入肿瘤细胞, 这样既可保证与游离 DOX 有相似的抗肿瘤活性又可以减小毒副作用。实验结果表明, 疏水端取代度较低的载体 (KV₁₂) 在一定程度上具有更好的体外抗肿瘤活性。本研究所设计的载体仅有被动靶向作用, 后续还可将其设计为环境响应型及主动靶向型聚合物胶束, 并且对 VES 的逆转多药耐药作用进一步研究。

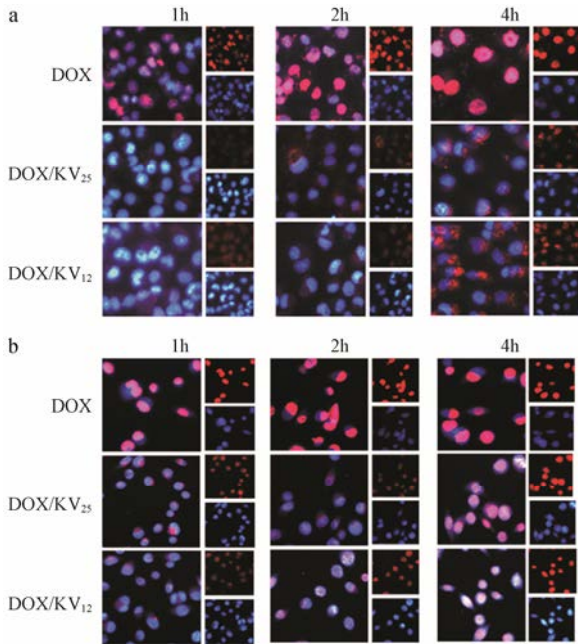


Figure 6 Fluorescence microscopy image of free DOX and drug-loaded micelles incubated with COS7 cells (a), MGC80-3 cells (b) in 1, 2, 4 h, respectively

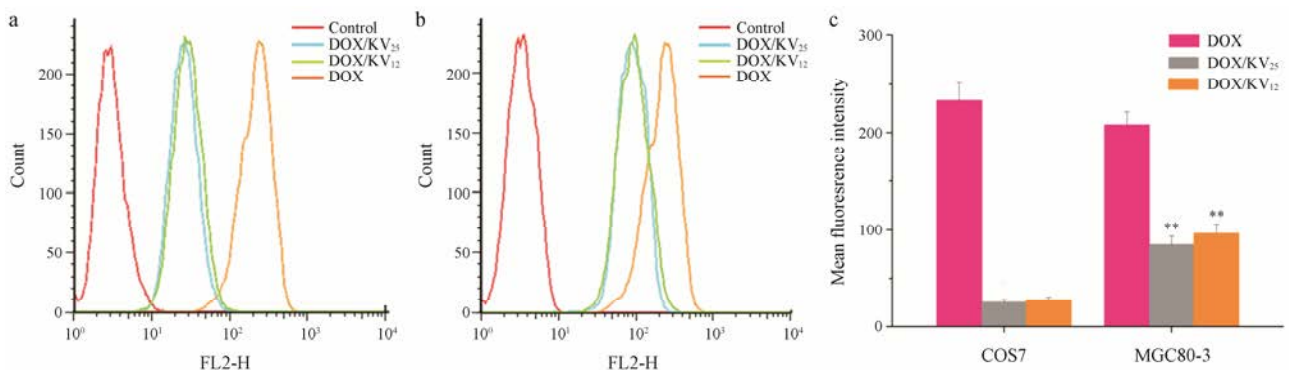


Figure 7 Fluorescence intensity of free DOX and drug-loaded micelles incubated with COS7 cells (a), MGC80-3 cells (b), respectively, and fluorescence intensity histograms (c) ($n = 3$, $\bar{x} \pm s$) in 4 h; ** $P < 0.01$ vs COS7 cells

References

- [1] Huan ML, Zhou SY, Teng ZH, et al. Conjugation with α -linolenic acid improves cancer cell uptake and cytotoxicity of doxorubicin [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19: 2579–2584.
- [2] Zhang D, Li JY, Wang XC, et al. Preparation and evaluation of doxorubicin hydrochloride liposomes modified by poly (2-ethyl-2-oxazoline)-cholesteryl methyl carbonate [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)* 2015, 50: 1174–1179.
- [3] Jia N, Ye Y, Wang Q, et al. Preparation and evaluation of poly(L-histidine) based pH-sensitive micelles for intracellular delivery of doxorubicin against MCF-7/ADR cells [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2017, 12, 433–441.
- [4] Peer D, Karp JM, Hong SP, et al. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy [J]. *Nat nanotechnol*, 2007, 2: 751–760.
- [5] Danhier F, Feron O, Pr at V. To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery [J]. *J Control Release*, 2010, 148: 135–146.
- [6] Hu Y, He X, Lei L, et al. Preparation and characterization of self-assembled nanoparticles of the novel carboxymethyl pachyman-deoxycholic acid conjugates [J]. *Carbohydr Polym*, 2008, 74: 220–227.
- [7] Yin XL, Zhang B, Liu YJ, et al. Advances in polymer-drug conjugated micelles in the delivery of anticancer drugs [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 710–716.
- [8] Hehir S, Cameron NR. Recent advances in drug delivery systems based on polypeptides prepared from *N*-carboxyanhydrides [J]. *Polym Int*, 2014, 63: 943–954.
- [9] Li R, Song XN, Zhang H, et al. The integrity study on PEG-PCL micelles transcellular transported across MDCK epithelial cell monolayer using FRET technology [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 1316–1324.
- [10] Mao SR, Tian Y, Wang LL. Research progress on drug nanocontainer-polymeric micelles [J]. *J Shenyang Pharm Univ (沈阳药科大学学报)*, 2010, 27: 979–986.
- [11] Li J, Wang X, Zhang T, et al. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2015, 10: 81–98.
- [12] Zhang Y, Feng J, Jia Y, et al. Development of tetrahydroisoquinoline-based hydroxamic acid derivatives: potent histone deacetylase inhibitors with marked *in vitro* and *in vivo* antitumor activities [J]. *J Med Chem*, 2011, 54: 2823–2838.
- [13] Gao HL, Jiang XG. The development of novel tumor targeting delivery strategy [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 272–280.
- [14] Mishra P, Nayak B, Dey RK. PEGylation in anti-cancer therapy: an overview [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2016, 11: 337–348.
- [15] Richter AW, Åkerblom E. Polyethylene glycol reactive antibodies in man: titer distribution in allergic patients treated with monomethoxy polyethylene glycol modified allergens or placebo, and in healthy blood donors [J]. *Int Arch All Immunol*, 1984, 74: 36–39.
- [16] Rong L, Zhang YT, Hu QH. Progress in the research of natural polymer micelle [J]. *Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学)*, 2010, 27: 1182–1187.
- [17] Baldwin AD, Kiick KL. Polysaccharide-modified synthetic polymeric biomaterials [J]. *Biopolymers*, 2010, 94: 128–140.
- [18] Zhao L, Yan ZQ, Wang C. Progress of study on the heparosan production by *E.coli* K5 [J]. *Curr Biotechnol (生物技术进展)*, 2011, 1: 195–200.
- [19] Wang XY, Song HJ. Biosynthesis pathway and structure variability of bacterial endotoxin [J]. *J Food Sci Biotechnol (食品与生物技术学报)*, 2013, 32: 1009–1015.
- [20] Raman K, Mencio C, Desai UR, et al. Sulfation patterns determine cellular internalization of heparin-like polysaccharides [J]. *Mol Pharm*, 2013, 10: 1442–1449.
- [21] Capila I, Linhardt RJ. Heparin-protein interactions [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2002, 41: 391–412.
- [22] Barzu T, Van Rijn J, Petitou M, et al. Heparin degradation in the endothelial cells [J]. *Thromb Res*, 1987, 47: 601–609.
- [23] DeAngelis PL. HEPTune: a process of conjugating a naturally occurring sugar molecule, heparosan, to a drug for enhanced drug delivery [J]. *Drug*, 2013, 13: 34–38.
- [24] Grinda M, Clarhaut J, Renoux B, et al. A self-immolative dendritic glucuronide prodrug of doxorubicin [J]. *Med Chem Commun*, 2012, 3: 68–70.
- [25] Blundell CD, Roberts IS, Sheehan JK, et al. Investigating the molecular basis for the virulence of *Escherichia coli* K5 by nuclear magnetic resonance analysis of the capsule polysaccharide [J]. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2009, 17: 71–82.
- [26] You H, Yu W, Munoz-Medellin D, et al. Role of extracellular signal-regulated kinase pathway in RRR- α -tocopheryl succinate-induced differentiation of human MDA-MB-435 breast cancer cells [J]. *Mol Carcinog*, 2002, 33: 228–236.
- [27] Gu X, Song X, Dong Y, et al. Vitamin E succinate induces ceramide-mediated apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma *in vitro* and *in vivo* [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14: 1840–1848.
- [28] Ni J, Chen M, Zhang Y, et al. Vitamin E succinate inhibits

- human prostate cancer cell growth *via* modulating cell cycle regulatory machinery [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 300: 357–363.
- [29] Bao Y, Yin M, Hu X, et al. A safe, simple and efficient doxorubicin prodrug hybrid micelle for overcoming tumor multidrug resistance and targeting delivery [J]. *J Control Release*, 2016, 235: 182–194.
- [30] Peng Y, Zhao J, Hou L, et al. Vitamin E succinate induces apoptosis *via* the PI3K/AKT signaling pathways in EC109 esophageal cancer cells [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14: 1531–1537.
- [31] Neuzil J, Dong LF, Ramanathapuram L, et al. Vitamin E analogues as a novel group of mitocans: anti-cancer agents that act by targeting mitochondria [J]. *Mol Aspects Med*, 2007, 28: 607–645.
- [32] Yoo HS, Park TG. Biodegradable polymeric micelles composed of doxorubicin conjugated PLGA-PEG block copolymer [J]. *J Control Release*, 2001, 70: 63–70.
- [33] Du JZ, Tang LY, Song WJ, et al. Evaluation of polymeric micelles from brush polymer with poly(ϵ -caprolactone)-*b*-poly(ethylene glycol) side chains as drug carrier [J]. *Biomacromolecules*, 2009, 10: 2169–2174.
- [34] Lo CL, Huang CK, Lin KM, et al. Mixed micelles formed from graft and diblock copolymers for application in intracellular drug delivery [J]. *Biomaterials*, 2007, 28: 1225–1235.
- [35] Huang Q, Li Y, Zhang H, et al. Environmental-responsive behavior of poly(acrylic acid) [J]. *Acta Chim Sin (化学学报)*, 2009, 67: 2421–2426.
- [36] Xiao L, Xiong X, Sun X, et al. Role of cellular uptake in the reversal of multidrug resistance by PEG-*b*-PLA polymeric micelles [J]. *Biomaterials*, 2011, 32: 5148–5157.
- [37] Peng HH, Li Y, Yuan JY, et al. Endocytosis pathway and intracellular distribution of heparosan [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2017, 52: 474–480.