

双亲性多糖胶束的制备及作为纳米药物载体应用研究进展

郑 荣¹, 李 珍¹, 闵 洁¹, 吴昌强², 支云飞¹, 陕绍云¹, 苏红莹^{1*}

(1. 昆明理工大学化学工程学院, 昆明 650500; 2. 川北医学影像四川省重点实验室, 南充 637000)

摘要:天然高分子纳米胶束由于具有优良的生物相容性及内核疏水、外壳亲水的独特结构,作为载体材料可以对脂溶性药物及影像探针进行包裹增加其溶解性和稳定性,在生物医学领域得到了广泛应用。多糖具有优良的水溶性、来源广泛易得及容易进行化学修饰等优点,通过疏水化改性获得的双亲性多糖衍生物在水溶液中可以自组装形成天然高分子胶束纳米粒子。双亲性多糖的制备是构建多糖胶束的关键步骤。因此,本文对目前常用的多糖疏水化改性方法,包括侧链酯化反应、侧链开环聚合、末端还原胺化、疏水药物接枝等进行了详细介绍,并对双亲性多糖胶束的进一步功能化修饰及作为生物医用载体材料的应用研究现状进行了概述。

关键词:多糖; 聚合物胶束; 疏水化改性; 药物载体

引言

随着纳米技术的进一步发展,纳米材料具有可提高药物吸收利用率,可从诊断、治疗到愈后的各个环节寻找合适的方式来实现精准医疗等优势,已经成为生物医学材料研发的新领域^[1]。聚合物胶束^[2]是两亲性聚合物在水相体系中自发组装形成的壳/核纳米结构,其内核疏水、外壳亲水的独特性质,使其疏水内核在包裹脂溶性药物时,具有增加药物稳定性或活性成分增溶、靶向运输、控制释放、提高生物活性、稳定化等优异性能,在医学、营养学、食品科学等具有广泛的应用前景^[3~5]。

天然高分子胶束作为药物载体具有良好的生物相容性及稳定性,目前已经被广泛应用于医学领域和临床诊疗研究,受到国内外众多研究者的青睐。多糖是一种由糖苷键结合的糖链形成的天然高分子材料(来自动物、植物、藻类)^[6],具有良好的生物相容性、水溶性和可降解性能,容易进行疏水改性,被广泛用于制备作为生物材料应用的聚合物胶束。目前,常用于药物载体制备的天然多糖包括葡聚糖^[7]、壳聚糖^[8]、淀粉^[9]、纤维素^[10]等。多糖的分子结构中含有多种反应性基团,包括羟基、氨基和羧酸基团^[11],可通过特定化学修饰获得疏水改性的多糖衍生物。双亲性多糖衍生物可进一步通过透析法^[12,13]和溶剂挥发法^[14,15]等方法在水溶液中自组装形成胶束纳米团聚体^[16,17],作为载体材料可通过疏水内核对油溶性药物及纳米探针进行包裹,提高药物及纳米探针的生物相容性并实现装载物的可控递送^[1,3,18]。

天然多糖的疏水化改性方法较多,本文对目前常用的侧链酯化反应、侧链开环聚合、还原末端的还原胺化、疏水药物接枝等方法进行了详细介绍,并对双亲性多糖胶束的进一步功能化修饰及作为载体的应用进行了概述,并简要讨论了多糖胶束的研究进展和在生物医学领域的研究前景,希望对今后胶束在药物载体领域的研究和发展提供借鉴。

1 双亲性多糖的疏水改性

1.1 侧链酯化反应

分子结构中含有大量游离反应性羟基的多糖,如直链淀粉^[19]、普鲁兰多糖^[20]、壳聚糖^[21,22]、葡聚

10.14028/j.cnki.1003-3726.2021.12.001

收稿:2020-10-21; 修回:2021-08-18;

基金项目:医学影像四川省重点实验室(川北医学院)开放课题(编号:SKLMI201902,主持人:苏红莹),国家自然科学基金(编号:51963013,主持人:苏红莹);

作者简介:郑荣(1994-),男,硕士研究生,从事多糖胶束作为药物载体的研究。E-mail:1345340547@qq.com;

* 通讯联系人:苏红莹(1986-),女,副教授,研究方向为天然高分子的改性及应用。E-mail:hongyingsu@kust.edu.cn.

糖^[23]、肝素多糖^[24,25]等,可通过与疏水性脂肪酸上的羧基成酯,生成双亲性多糖衍生物,实现多糖的疏水化改性,并在水中通过自聚集成形成聚合物胶束^[26,27]。此方法的优点是反应容易发生且副产物较少,是常用的多糖疏水化改性方法之一。

高盼等^[28]利用亚油酸(LA)上的羧基通过酯化反应接枝到普鲁兰多糖(Pullulan)的羟基上,获得两亲性聚合物 PULA,并用透析法透出有机溶剂后,在水溶液中自组装形成纳米胶束。该纳米胶束为粒径分布在 125nm 左右且大小比较均匀的球形结构,作为药物载体可以对疏水性药物阿霉素进行有效负载。郭延柱等^[29]分别使用具有优良生物可降解性和生物相容性的聚乳酸、聚己内酯和聚对二氧环己酮作为疏水链段,通过酯化反应对纤维素及其水溶性衍生物进行疏水化改性,制备了三种纤维素基双亲性聚合物衍生物。这种纤维素基双亲性共聚物在水溶液中可自组装形成壳/核结构的纳米胶束。作者将获得的纤维素基纳米胶束作为载体用于包埋、保护荧光共轭聚合物,有效地解决了荧光共轭聚合物不溶于水的问题。

葡聚糖是一种具有优良生物安全性的电中性天然多糖,作为血浆替代品在临床上得到了广泛的应用,另外,其分子结构上带有大量游离羟基,容易进行化学修饰,作为生物材料具有较高的应用价值^[30~32]。本课题组^[33]通过羧基二咪唑活化的硬脂酸(SA)与葡聚糖主链上的羟基发生酯化反应获得了侧链硬脂酸接枝的双亲性葡聚糖 Dex-g-SA,其在水溶液中自组装形成的纳米胶束结构作为载体,可在其疏水内核中同时负载疏水性药物阿霉素及超顺磁性氧化铁纳米探针(如图 1 所示)。这种超顺磁性胶束纳米复合物具有良好的生物相容性及磁共振显影效果,并且能够有效地标记肿瘤细胞。

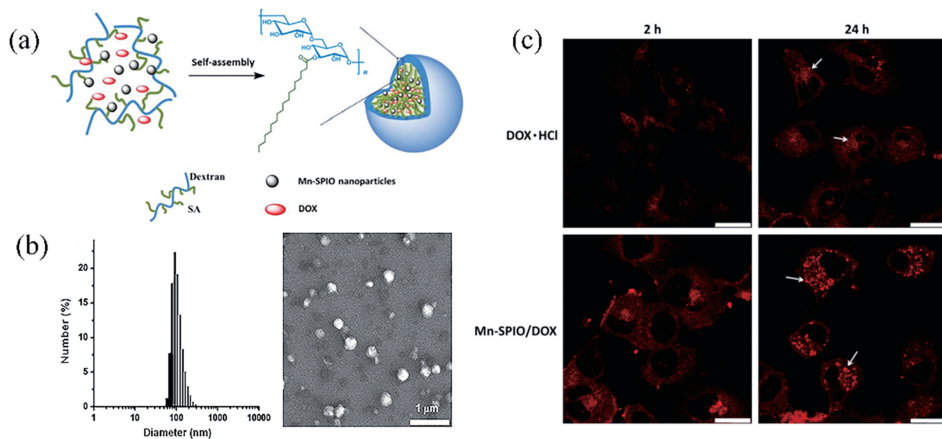


图 1 (a)双亲性葡聚糖 Dex-g-SA 自组装疏水内核负载抗癌药物 DOX 和 Mn-SPIO 纳米晶体形成

Dex-g-SA/Mn-SPIO/DOX 胶束纳米复合物示意图;(b)粒径和扫描电镜图;(c)MCF-7/Adr 细胞与 DOX-HCl 和

Dex-g-SA/Mn-SPIO/DOX 胶束在 $6\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ DOX 浓度下孵育 2h 和 24h 后,DOX 的荧光图像,比例尺 $20\mu\text{m}$ 。

Figure 1 (Color online) (a) Schematic illustration of Dex-g-SA/Mn-SPIO/DOX micelle formation with anticancer drug

DOX and Mn-doped SPIO nanocrystal inside the hydrophobic core; (b) DLS and SEM characterizations of

Dex-g-SA/Mn-SPIO/DOX micelle; (c) Fluorescence images of DOX after MCF-7/Adr cells incubated with DOX-HCl

and Dex-g-SA/Mn-SPIO/DOX micelles at DOX content of $6\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for 2h and 24h. Scale bar: $20\mu\text{m}$.

1.2 侧链开环聚合反应

多糖侧链中的羟基基团($-\text{OH}$)也可以作为活性基团引发环状单体发生开环聚合反应(ROP),生成疏水直链聚合体,实现多糖的疏水聚合物接枝改性,获得的两亲性多糖可在水溶液中自组装形成胶束^[34]。与其它方法相比,此方法制备出的胶束结构更紧密,但也存在疏水链段的结构难以控制等缺点。刘亚栋等^[35]通过 ROP 反应同时将 *N*-异丙基丙烯酰胺(NIPAM)和丙交酯(L-LA)单体聚合接枝到纤维素侧链上,“一步法”合成了 ONIPAM 和 OLLA 修饰的天然高分子纤维素梳型接枝共聚物,并通过核磁共振(NMR)和热分析技术(TGA)等手段研究了梳型接枝共聚物的结构,为纤维素的化学改性提供了一

种新的实验方法。另外,本课题组^[36]通过葡聚糖分子主链的游离羟基引发 ϵ -己内酯(ϵ -CL)发生 ROP 反应,制备了 PCL 接枝的双亲性葡聚糖(Dex-*g*-PCL),其在水溶液中自组装形成的纳米胶束用来包裹疏水 SPIO 纳米颗粒获得了一种磁共振成像(MRI)纳米造影剂,可用于肝脏小病变的早期肿瘤诊断。类似的,Guo 等^[37]通过使用己内酯与软木溶解纸浆基材发生 ROP 反应,合成了纤维素-接枝-聚(ϵ -己内酯)(纤维素-*g*-PCL)共聚物,制备了新型的可生物降解的两亲性纤维素衍生物。通过向纤维素衍生物水溶液中搅拌同时,滴加二甲基亚砜,使其自组装形成胶束,SEM 观察证明了该纤维素-*g*-PCL 纳米胶束颗粒尺寸分布均匀且具有明确的球形结构。此项研究表明了来自生物物质的新型两亲共聚物可以由可生物降解的可再生材料组成,在生物医学和纳米技术中具有一定的应用前景。

通过侧链开环聚合反应得到的两亲性聚合物结构大多具有梳状结构,可在一定的环境中通过疏水相互作用自聚集形成胶束,是一种常用的改性方法。与其它方法相比,此方法制备出的胶束结构更紧密,但也存在疏水链段的结构难以控制等缺点。

1.3 末端还原胺化反应

大部分多糖含有还原末端,具有游离的半缩醛结构,可以与含有氨基的疏水链段发生还原胺化反应,实现多糖还原末端的疏水化改性^[38]。此方法获得的嵌段型双亲性多糖具有接枝的链段链长较为均匀、容易控制,且可以形成粒径较小的纳米胶束等特点。

2014 年 Marieta Nichifor 课题组^[39]首先通过葡聚糖分子的还原末端与氨基修饰的疏水链段(烷基、二烷基、胆酸钠)发生还原胺化反应,获得的一系列双亲性葡聚糖嵌段聚合物能团聚形成疏水内核尺寸在 20~30nm 的胶束结构;作者进一步在葡聚糖侧链修饰阳离子基团(季铵盐),对该胶束聚集体的临界团聚浓度及疏水内核极性进行了调控,且通过壳层交联可以获得稳定性较高的胶束结构。这种含有阳离子基团的胶束作为抗菌药物、基因传递载体或生物化合物的载体具有一定应用价值。

2020 年 Lu 等^[40]使用羟丙基甲基纤维素(HPMC)和氨基封端聚(L-丙交酯)(PLLA)或聚(L-丙交酯-co-DL-丙交酯)(PLA),通过 ROP 和还原胺化反应,合成了疏水嵌段长度不同的两亲性 HPMC-PLLA 和 HPMC-PLA 二嵌段共聚物。反应过程由三步进行,首先用 3-(Boc(叔丁氧羰基)-氨基)-1-丙醇引发丙交酯发生 ROP 反应,生成 Boc-NH-PLA。然后,用三氟乙酸处理去除链端 Boc 基团,得到含有端氨基的聚乳酸。最后,在三乙酰氧基硼氢化钠($\text{NaBH}(\text{OAc})_3$)存在条件下,通过还原胺化反应将亲水性 HPMC 嵌段的半缩醛端基与疏水性 PLA 嵌段的氨基偶联,得到两亲性 HPMC-PLA 嵌段共聚物[图 2(a)]。论文通过 NMR、DOSY-NMR 和 FT-IR 等手段对具有不同疏水嵌段长度的 HPMC-PLLA 和 HPMC-PLA 的自组装过程及形貌进行了表征,发现形成的胶束形状为球形,且尺寸范围在 150~180nm[图 2(b)],分布较窄,其临界胶束浓度随着 PLA 嵌段长度的增加而降低。

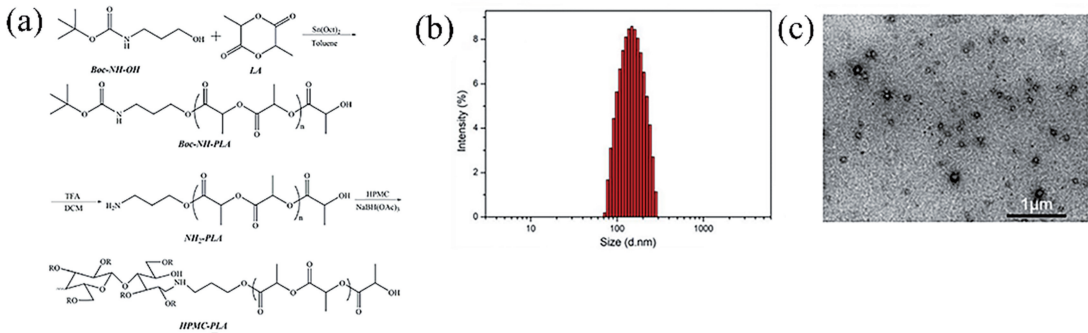


图 2 (a)还原胺化法合成 HPMC-PLA 嵌段共聚物反应过程;(b)HPMC-PLLA 和 HPMC-PLA 胶束的粒径;
(c)透射电镜图

Figure 2 (a) Synthesis route of HPMC-PLA block copolymers by reductive amination; (b) size distribution;
(c) TEM image of HPMC-PLA micelles

1.4 疏水性药物接枝

聚合物胶束类载体通过疏水内核包载抗癌药物存在载药量和载药率较低、药物释放过程存在“突释”现象等问题。部分研究学者提出将油性药物通过共价键修饰在胶束内核中,可有效改善其水溶性,延长体内半衰期,得到理想的药物转运系统^[41]。此方法的优点在于通过疏水端基与油性药物键合的同时,亦可以物理包封更多的药物入核,提高了胶束的载药量,对药物具有良好的缓释效果,不会出现“突释”现象^[42]。张海涛等^[41]使用马来酰化普鲁兰多糖接枝阿霉素,并通过与被 *N*-羟基丁二酰亚胺活化后的叶酸反应,得到了叶酸-普鲁兰多糖-阿霉素胶束。通过胶束体外药物释放行为和生物学实验研究发现:释药环境 pH 越小(酸性越强),药物释放速度越快;对细胞吸收速率监测研究发现该胶束可以明显提高细胞的内存效率。以上结果表明,叶酸-普鲁兰多糖-阿霉素胶束可以作为一种具有阿霉素可控释放和靶向性能的聚合物前药体系。

疏水药物胶束体系可能存在因疏水性药物与共聚物共价结合而难以解离,无法被有效释放,从而达到药效的问题。此外,因与多糖进行接枝,经历了化学反应过程,可能会改变药物本身的药理活性^[43]。

1.5 其它

针对于一些水溶性不好的多糖,比如纤维素、壳聚糖等,需对其进行增溶改性^[3],使其具备亲水性之后再对其进行疏水化改性,从而得到具有双亲性的多糖衍生物,并在水溶液中自组装形成胶束。Wu 等^[44]合成了一种具有亲水性磷酸胆碱(PC)和疏水性脱氧胆酸(DCA)二元侧基的双亲性壳聚糖衍生物。首先,采用 PC 对壳聚糖进行修饰,合成了具有可生物降解性能的仿生 PC-壳聚糖共轭物,通过在 PC-壳聚糖结合物中进一步引入 DCA 来调节其亲水性/疏水性平衡,在 DCA 和 PC-壳聚糖结合物的残基氨基之间形成酰胺键,从而获得脱氧胆酸-磷酸胆碱-壳聚糖共轭物(DCA-PCCs),并在水溶液中自组装形成胶束。由于生成的胶束具有仿生的磷酸胆碱外壳,使其具有较低的细胞毒性和良好的血液相容性,所以这种新型仿生 DCA-PCCs 胶束具有作为载体应用于生物医学领域的潜力。

纤维素分子内和分子间存在较强的氢键,使得纤维素溶解度和改性敏感度较低,阻碍了纤维素在生物医学领域的应用。Li 等^[45]利用离子液体基反应系统合成了一种可生物降解的纤维素衍生物胶束,揭示了纤维素纳米胶束在抗肿瘤药物递送和传感方面的巨大潜力。该论文将纤维素溶解在 1-丁基-3-甲基咪唑氯化盐溶液中,并用二甲基氨基吡啶作为催化剂,合成了双亲性纤维素接枝聚对二氧环己酮共聚物(MCC-*g*-PPDO),如图 3(a)所示,这种双亲性 MCC-*g*-PPDO 在水溶液中自组装形成的胶束结构可作为载体包裹硒化镉和硫化锌等油性量子点(QDs),形成的纤维素胶束/QDs 纳米复合物可以作为一种纳米荧光探针应用于肿瘤细胞成像领域。

2 环境响应型多糖胶束作为药物载体的应用

传统聚合物胶束作为药物载体应用时可能存在封装的抗癌药物释放剂量低、释放速率慢等问题,使得癌细胞内抗癌药物的数量达不到足以杀死癌细胞的有效浓度,这成为制约胶束作为药物载体的重要因素之一^[46]。

近年来,对载体材料结构进行多功能化设计以实现药物的病变组织靶向输送及环境响应性按需释放已成为药物控释领域的研究热点。在双亲性多糖的分子结构中引入特殊化学基团构建的环境响应型多糖胶束作为药物载体能够对外界刺激(如温度、磁场、超声、氧化、pH 等)产生快速和精确的应答,使得胶束结构发生改变,从而实现控制药物释放和传递。

2.1 pH 响应型多糖胶束

大量研究结果表明,人体正常组织环境的 pH 值(7.4)明显高于病变部位(如肿瘤细胞外 pH 值为 6.8 左右,细胞核内则为 5.5~6.5)^[47]。含有酸性可降解基团的多糖基胶束在酸性环境中时,其酸可降解基团发生质子化或解离,会导致胶束结构松散甚至解体并释放活性物质^[8,48~51]。

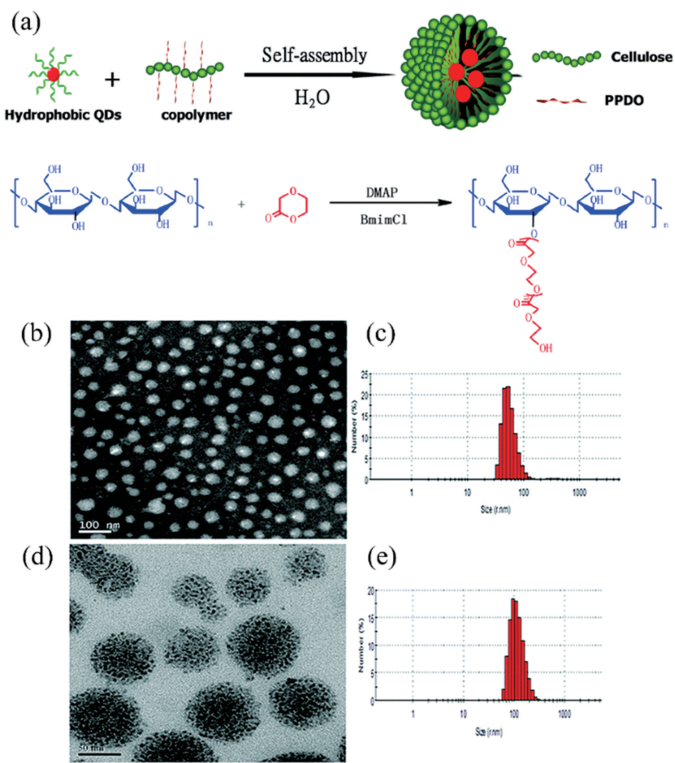


图 3 (a)MCC-g-PPDO 自组装纳米胶束的合成和疏水量子点的包封示意图;(b 和 c)空白 MCC-g-PPDO 胶束;
(d 和 e)QDs 封装的 MCC-g-PPDO 胶束的 TEM 图像和粒径图

Figure 3 (a) Synthesis of MCC-g-PPDO self-assembled nanomicelles and the encapsulation of hydrophobic QDs;
(b and c) the TEM images and size histogram of blank MCC-g-PPDO micelles; (d and e) QDs-encapsulated
MCC-g-PPDO micelles

Wang 等^[13]利用组氨酸(His)和硬脂酸(SA)对白芡多糖(BSP)进行功能化修饰,构建了一种新型共聚物胶束(His-SA-BSP)。通过将 DOX 溶解到有机溶剂二甲基亚砜(DMSO)中,超声条件下滴入到共聚物胶束中后,使用透析法透出多余的 DMSO 和 DOX,制备了含有 DOX 的共聚物胶束。在不同 pH 下对胶束的形貌进行观察,发现 pH 越低,胶束的粒径越大,表明胶束大小对 pH 值具有很强的依赖性[图 4 (a)]。此外,当环境 pH 值从 7.4 降至 4.0 时,其 Zeta 电位从 -13mV 增加至 19mV[图 4(b)]。组氨酸由咪唑基团、羧基和氨基组成,在咪唑环的不饱和氮位点上的质子-去质子化可以使组氨酸两性化,因此,该胶束结构的 pH 敏感性机制可能归因于表面电荷的逆转和组氨酸段的质子化/去质子化转换导致两亲性结构破坏。肿瘤环境中弱酸性条件(pH 值 6.5)通过咪唑电离引发胶束电荷转换,从而使其膨胀(210nm),胶束表面电荷发生了逆转(由负向正)。当 pH 值降至 5.0 时,相同极性的电离态相互强烈排斥,导致胶束膨胀到较大的粒径并发生解离。通过 TEM 表征发现,在 pH=6.5 时,纳米粒子比 pH=7.4 时略微增大,在 pH=5.0 时,微胶束已经分解[图 4(c)]。

除了可质子化基团外,在双亲性多糖中引入 pH 敏感可降解化学键也是获得 pH 响应性胶束的常用方法。例如,席夫碱键的水解断裂具有 pH 敏感性,酸性越强其降解断裂程度越高,因此,含有席夫碱键的多糖胶束在正常生理组织细胞中可以保持相对稳定的状态,而在肿瘤或病变组织的酸性微环境下,席夫碱键发生断裂降解会导致胶束结构破坏,进而释放药物。Ying 等^[52]通过氧化枸杞多糖(LBP)和 DOX 之间发生醛-胺席夫碱反应,组装形成新的天然多糖-抗癌药物递送系统,并在水溶液中自组装形成胶束。之后通过 DOX 的体外药物释放实验发现,在实验初始阶段 DOX 的释放迅速,随着 pH 值的降低,LBP-DOX 纳米颗粒中 DOX 的 pH 响应性显著增强。72h 后,pH 7.4 时 LBP-DOX 纳米颗粒仅释放 10% 的

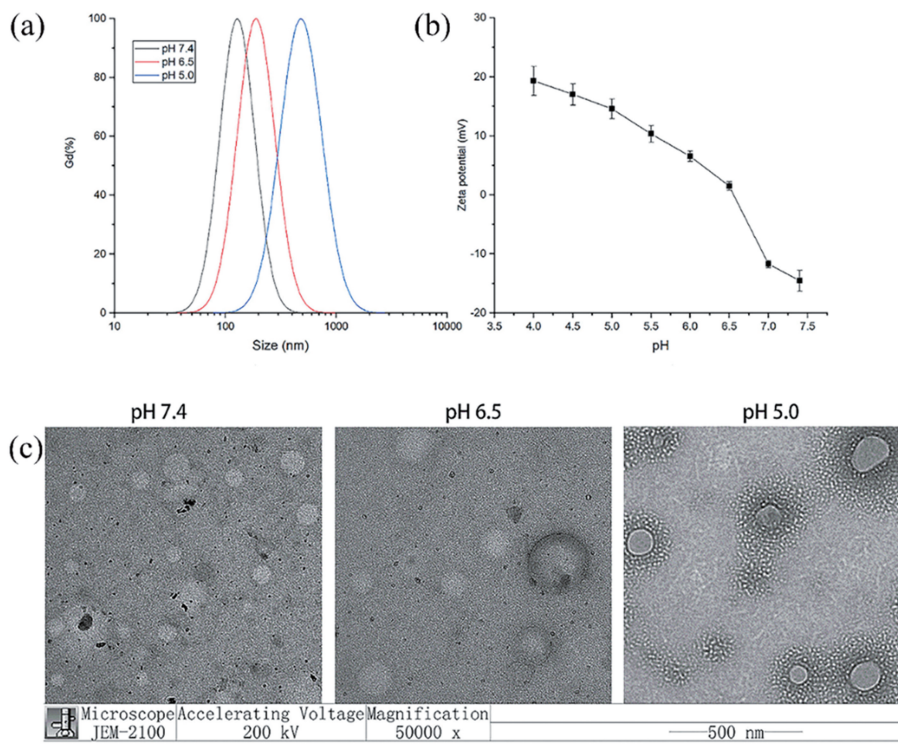


图 4 不同 pH 下 His-SA-BSP 胶束的(a)粒径图;(b)电位图;(c)的 TEM 图像
Figure 4 pH-Dependent (a) size distribution; (b) Zeta potential of His-SA-BSP micelles;
(c) TEM images of the micelles at different pH values

DOX,但在 pH 6.5、5.0 和 4.0 时,释放量分别增加至约 27%、53%和 90.0%。这些数据表明 LBP-DOX 纳米粒子在中性溶液中保持相对稳定的状态,当暴露于弱酸性微环境(如肿瘤、吞噬细胞的内体或炎症部位)时,席夫碱键断裂,导致 DOX 释放加快,LBP-DOX 纳米颗粒具有 pH 敏感药物释放特性。

为了进一步提高 pH 敏感性多糖胶束药物载体的肿瘤靶向功能,在含有 pH 敏感降解化学基团的双亲性多糖分子上同时修饰靶向配体,可以获得具有主动靶向和肿瘤微环境 pH 敏感性药物释放机制的多功能胶束载体,能够更有效地实现药物的肿瘤靶向和可控递送。

2.2 氧化还原响应型多糖胶束

据文献报道^[53~57],肿瘤细胞中的谷胱甘肽(GSH)浓度(约 2~10mM)远高于细胞外液中的 GSH 浓度(约 2~20μm)。因此,细胞内外环境的 GSH 浓度差异也被广泛作为内源性刺激信号用于肿瘤微环境敏感药物载体的结构设计,对应的环境敏感胶束载体则被称为氧化还原响应型胶束药物载体。其中,二硫键(—S—S—)是目前最为常用的氧化还原敏感化学键,将其引入多糖纳米胶束中,可以使其在肿瘤还原性条件下发生降解,导致胶束结构分解实现药物的环境敏感释放^[58~62]。

Zhang 等^[63]采用 3,3'-二硫代二丙酸对聚谷氨酸苄酯(PBLG)修饰的双亲性葡聚糖(PBLG-*b*-dextran)胶束壳层进行交联,获得了一类具有良好稳定性的壳交联氧化还原响应型葡聚糖胶束(shell-crosslinked polypeptideblock-polysaccharide micelles,简称 SCM),如图 5 所示,该纳米胶束壳层的二硫键在模仿细胞内还原性环境下容易发生降解断裂导致胶束解离。该研究进一步通过透析法,将 DOX 作为抗癌药模型进行了负载,体外药物释放行为研究发现:在 GSH 存在的条件下,胶束结构的降解加速了 DOX 的体外释放。另外,通过使用谷胱甘肽单酯预处理人类宫颈癌细胞对 GSH 介导的细胞内药物传递过程进行了研究,结果表明,采用含有二硫键的分子对胶束壳层进行交联,不仅可以改善胶束载体的细胞外稳定性,同时也有效促进了细胞内药物的释放。

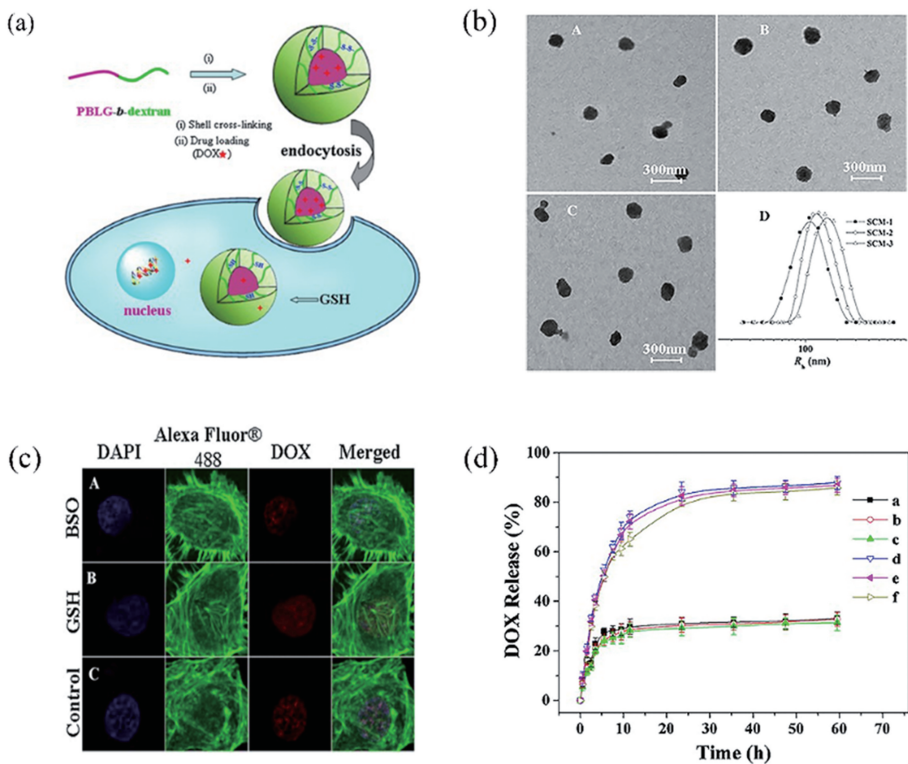


图 5 (a)壳交联的胶束形成和细胞内药物释放的示意图;(b)胶束的流体动力学半径和 TEM 图像;(c)装载 DOX 的 SCM-2 胶束孵育的 *HeLa* 细胞在的共聚焦激光扫描显微镜(CLSM)图像;(d)不同分子量的 PBLG-b-dextran 载药胶束在不同 GSH 浓度下体外累计药物释放曲线图

Figure 5 (a) Schematic illustration of the formation of shell-crosslinked micelles and intracellular drug release; (b) TEM images of SCM-1, SCM-2 and SCM-3, and hydrodynamic radii (R_h) of SCMs; (c) CLSM images of *HeLa* cells incubated with DOX-loaded SCM-2; (d) *in vitro* DOX release from DOX-loaded SCM-1, -2, and -3 without GSH, and SCM-1, -2, and -3 with 0.010M GSH in PBS at pH=7.4, 37 °C

基于肿瘤微环境的低 pH 及高 GSH 浓度,通过在双亲性多糖衍生物中同时引入酸敏感性基团和二硫键,制备出具有 pH/氧化还原双重响应性的多糖胶束,作为药物载体在药物递送系统的研究中受到广泛关注,这种双/多重刺激响应性纳米胶束载体具有能够更好地控制药物释放行为的优势。

2.3 温度响应型多糖胶束

通过在胶束分子结构中引入具有温度敏感性的化学键或聚合物,可以获得具有温度响应性的胶束结构,实现药物的温敏性释放。李虹等^[64]以亲水性羟丙基纤维素(HPC)作为主链,通过在 HPC 主链上的羟基与疏水性的 *N*-二甲基-*N*-甲基丙烯酰胺基丙基-*N,N*-二甲基-*N*-丙烷磺酸内盐聚合物(PMAPSA)进行自由基聚合,获得的接枝共聚物 HPC-*g*-PMAPSA 在 pH6.0 的磷酸缓冲溶液中透析 24h,得到了 HPC-*g*-PMAPSA 胶束溶液。通过对胶束的温度响应性研究发现,随着环境温度由 20℃ 升高到 55℃,HPC-*g*-PMAPSA 胶束外层的 HPC 主链出现由亲水性向疏水性改变的趋势,部分氢键被破坏,胶束结构稳定性降低并发生大面积聚集和沉降,形成了以 PMAPSA 支链为壳、HPC 主链为核的胶束结构。根据这种特性,可以将此类胶束作为温度敏感型药物载体用于负载油溶性药物。Chen 等^[65]通过开环反应合成了 mPEG(甲氧基聚乙二醇)-*b*-PLA 和 mPEG-*b*-P[HPMA-Lac(乳酸)]二嵌段共聚物,将制备好的两种二嵌段共聚物混合,溶于磷酸盐缓冲液中,并将混合后的聚合物水溶液快速加热使其形成胶束,形成胶束的粒径约为 50nm。通过热休克方法将 DOX 装载入胶束内核中,制备出具有 pH/温度双重响应性胶束。如图 6 所示,乳酸侧基的水解速率在较高的温度下会增加,胶束结构会随着乳酸侧基的水解而解离,

从而释放药物,故较高的温度有助于药物释放。温度敏感胶束作为药物输送应用的关键在于控制胶束结构在体温范围发生相变,从而更好地实现对癌细胞的靶向治疗。

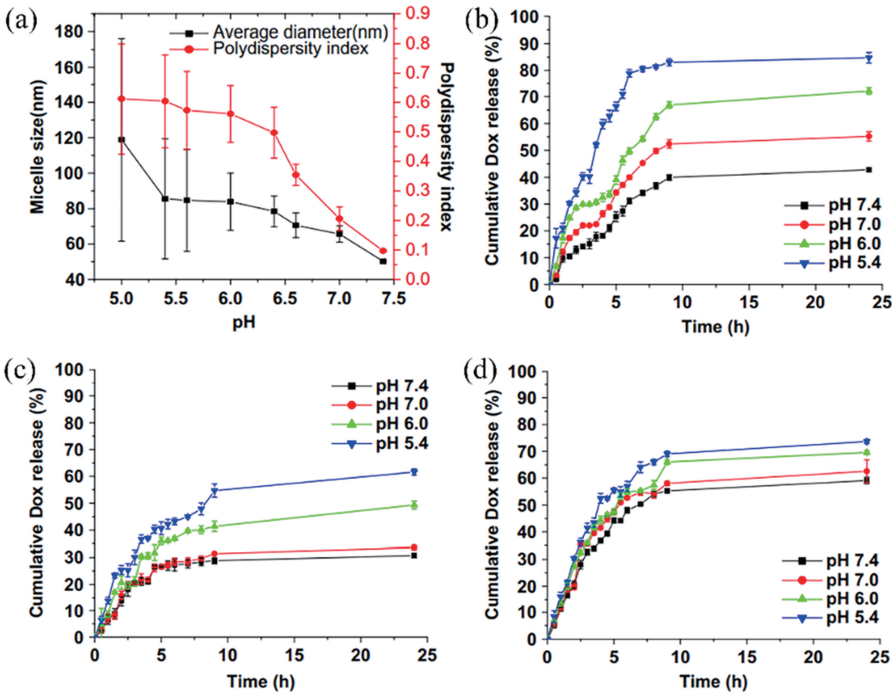


图 6 (a)不同 pH 的磷酸盐缓冲液中混合胶束的粒径图和分散性指数;(b)37℃;(c)25℃中混合胶束在不同 pH 缓冲液中累计药物释放量;(d)37℃下 mPEG-*b*-P(HPMA-Lac)胶束在不同 pH 缓冲液中累计药物释放($n=3$)

Figure 6 (a) The size and PDI of mixed micelle in different pH of PBS buffers by DLS analysis. Effects of pH on doxorubicin release from dual responsive micelle *in vitro* at 37℃ (b); 25℃ (c); (d) effect of pH on doxorubicin release from mPEG-*b*-P(HPMA-Lac) micelle *in vitro* at 37℃ ($n=3$)

3 影像学可视化多糖胶束药物载体

近年来,随着治疗体系的不断完善,肿瘤细胞的抗药性也在逐步提高,一旦肿瘤细胞发生扩散,治疗效果大大降低,所以,准确预测和监测肿瘤细胞的扩散对癌症的治疗具有重要意义。在癌症治疗过程中,借助影像学手段获取药物载体的体内递送路径并对载体的降解、药物释放进行监测是评价药物载体性能及治疗效果的重要步骤。因此,设计和构建具有影像学成像和治疗多功能的智能药物递送系统是实现低毒高效化疗及疗效实时监测的重要措施,并已成为该领域的研究前沿和发展方向^[66,67]。

3.1 磁共振成像

Situ 等^[68]合成了一种归巢肽(A54)官能化的聚乳酸-乙醇酸接枝的葡聚糖(A54-Dex-PLGA)胶束,并将其作为载体对抗癌药物 DOX 及超顺磁性氧化铁(SPIO)纳米影像探针进行了负载。由于 SPIO 纳米粒子是一种常用的磁共振(MRI)造影剂,归巢肽 A54 能特异性识别肿瘤细胞,因此这种 A54-Dex-PLGA/DOX/SPIO 胶束复合体系同时具有肿瘤靶向及 MRI 影像学可视化多功能,作为一种诊疗一体系统可以实现肿瘤的诊断、治疗及疗效监测的目的。Yang 等^[69]通过对 *N*-ε-羧基苄氧基-L-赖氨酸(PZLL)进行 ROP 反应,制备了具有不同聚合度的含二硫键的 α-炔基-聚-(*N*-ε-羧基苄氧基-L-赖氨酸)(α-炔基-SS-PZLL),之后通过铜催化的叠氮化物炔基进行环化反应将 α-炔基-SS-PZLLs 与叠氮化右旋糖酐共轭,合成了具有氧化还原敏感性的双亲性右旋糖酐衍生物(Dex-*g*-SS-PZLL)。通过透析方法,将 DOX 和 SPIO 同时包裹在胶束的疏水内核中,构建了具有 MRI 成像功能的葡聚糖胶束药物载体材料。体外释放

实验研究表明,当环境 GSH 浓度为 10mM 时,与其它不具备氧化还原响应性的胶束相比,Dex-g-SS-PZLL 胶束表现出更快的药物释放速率;同时,体外磁共振显影效果研究表明,该 Dex-g-SS-PZLL/DOX/SPIO 胶束复合物具有较强的 MRI 对比度。因此,将抗癌药物及纳米影像探针同时装载于多糖胶束纳米载体中,可以获得影像学可视化药物载体用于肿瘤的诊断和治疗,而在双亲性多糖分子上修饰靶向分子及环境敏感性化学基团则是实现药物的靶向递送及按需释放的有效手段。

3.2 光声成像

光声成像(PAI)是一种新兴的无创成像方式,它将激光分子激发的光谱选择性与高分辨率超声成像相结合^[70]。作为一种新兴的分析方法,PAI 目前正处于临床前期开发阶段,用于包括癌症在内的各种医疗状况的早期诊断。然而,PAI 技术由于造影剂不具备肿瘤特异性及靶向性,阻碍了其临床应用。Saji 等^[71]利用亲水性透明质酸(HA)主链的羧酸与疏水性十八胺(C18)之间形成酰胺键,合成了两亲性 HA-C18 胶束,利用疏水吲哚菁绿(ICG)加载到 HA-C18 胶束中,实现了胶束的 PAI 成像。胶束具有保护 ICG 在成像完成前不被降解和清除的作用,在体内成像应用中,ICG 必须与稳定存在于胶束内核,直到胶束到达目标组织。该论文研究了 HA-ICG 胶束在体内的 PAI 能力,将 HA-ICG 胶束静脉注射到 SCC-7 荷瘤小鼠体内,通过 PAI 观察每个肿瘤区域内的血管分布。与注射前相比,肿瘤部位血管的 PA 造影对比度显著增加。由于人体中存在不同类型的 HA 受体,CD44 为其中之一。因此,HA-ICG 胶束可通过 CD44 受体特异性靶向肿瘤细胞,具有增强肿瘤血管的光声特征,能实现精确的肿瘤血管成像。HA-ICG 胶束作为载体通过负载荧光染料可以作为医学影像纳米探针用于临床治疗、开发肿瘤靶向治疗药物等领域,具有一定的研究前景。

3.3 近红外成像

波长在 700nm~1000nm 范围内的近红外光具有降低生物物质、水的吸收和散射作用,对生物组织的损害较小,并且具有更深的穿透深度(毫米至厘米量级)等优点^[72]。近红外量子点由于其独特的光稳定性、窄带隙、高发光和长激发特性,在深度组织、静脉和器官光学成像等领域具有一定的研究前景^[73]。镉元素是合成量子点的主要元素之一,但其高毒性使得基于镉元素的近红外量子点作为生物材料应用受到限制^[74]。为了降低镉元素量子点的毒副作用,Khatun 等^[75]通过脱氧胆酸(DOCA)的羟基与低分子肝素(LMWH)的羧基反应,合成了低分子肝素和 DOCA 的化学缀合物(LHD),并在水溶液中自组装形成胶束。该研究将这种胶束用于包裹油溶性近红外量子点 CdTe/CdSe,制备了一种具有近红外成像功能的量子点复合胶束(Q-LHD)。将形成的近红外胶束通过口服给药对小鼠进行了体内成像研究,口服给药 2h 后,在胃周围发现量子点信号。口服给药 8h 后,Q-LHD 进入小肠。给药 36h 后,胶束荧光信号消失,证明胶束从小鼠体内完全降解。无创荧光成像数据表明,此胶束可以用作纳米探针,在无创光学成像领域具有一定研究价值。将显像剂包裹在胶束内核中对生物体进行给药,可在一定程度上减少量子点的毒副作用,在非侵入性光学成像和药代动力学研究中具有一定研究前景。

4 结论与展望

多糖胶束是近年来在癌症的诊断及治疗研究中应用最为广泛的一种纳米载体材料,具有载药范围广、效率高、表面容易进行功能基团修饰实现主动靶向功能等优点。因多糖表面具有大量活性羟基,通过对其进行疏水改性可以获得具有良好生物相容性的双亲性多糖衍生物。这种双亲性多糖衍生物在水溶液中自组装形成的纳米胶束作为药物载体在生物医药领域有着广泛应用。目前,基于多糖胶束的纳米药物载体在体内稳定性、降解行为及与细胞之间的相互作用等方面仍需要进一步研究。

(1)多糖基胶束仍存在装载量低、包封率差及稳定性不足等问题,通过疏水内核与亲水外壳之间进行交联可以提高胶束载体的稳定性,但交联过于紧密可能造成胶束装载物质的释放受到束缚,因此,仍需对胶束结构疏水/亲水片段之间的交联方法进行深入探究,以获得具有更高体外、体内稳定性的胶束纳米

载体;

(2)多糖胶束作为药物载体与血液中的血浆蛋白存在非特异性吸附,使得药物载体生物利用度偏低,因此,如何对多糖胶束的表面进行修饰,提高多糖胶束的组织靶向效率和环境敏感性药物释放仍然是该领域的研究重点。

参考文献:

- [1] Liu Y, Sun C, Zhang G Y, Wu J, Huang L, Qiao J, Guan Q X. *Int J Biol Macromol*, 2020, 142: 277~287.
- [2] Shin D H, Tam Y T, Kwon G S. *Front Chem Sci Eng*, 2016, 10(3): 348~359.
- [3] 肖丽, 叶发银, 赵国华. *食品科学*. 2017, 1: 269~274.
- [4] Tan Y B, Li R Y, Liu C Z, Mundo J M, Zhou H L, Liu J N, Mcclements D J. *Food Funct*, 2020, 11(1): 187~199.
- [5] Lu X, Chen J H, Guo Z B, Zheng Y F, Rea M C, Su H, Zheng X H, Zheng B D, Miao S. *Trends Food Sci Tech*, 2019, 86: 311~327.
- [6] Shukla R K, Tiwari A. *Carbohydr Polym*, 2012, 88(2): 399~416.
- [7] Zeng X L, Cheng X, Zheng Y, Yan G Q, Wang X, Wang J, Tang R P. *Carbohydr Polym*, 2020, 237: 116139.
- [8] Chen H, Ye Z, Sun L, Li X, Shi S, Hu J J, Jin Y Y, Xu Q W, Wang B L. *Carbohydr Polym*, 2018, 189: 65~71.
- [9] Jie L Y, Lang D, Kang X Q, Yang Z X, Du Y Z, Ying X Y. *J Nanosci Nanotechno*, 2019, 19(9): 5456~5462.
- [10] Du H, Han R T, Tang E, Zhou J, Liu S J, Guo X F, Wang R H. *J Polym Res*, 2018, 25(9): 205.
- [11] Andrade R J, Azevedo A G, Musampa R M, Maia J M. *Rheol Acta*, 2010, 49(4): 401~410.
- [12] Gu C H, Le V, Lang M D, Liu J W. *Colloid Surface B*, 2014, 116: 745~750.
- [13] Wang C X, Zhu J X, Ma J F, Yang Y, Cui X M. *Int J Pharmaceut*, 2019, 567.
- [14] Li L B, Tan Y B. *J Colloid Interf Sci*, 2008, 317(1): 326~331.
- [15] Sant V P, Smith D, Leroux J C. *J Control Release*, 2004, 97(2): 301~312.
- [16] Nam J, Yeo W S. *Appl Biol Chem*, 2016, 59(4): 579~584.
- [17] Sabra S, Abdelmoneem M, Abdelwakil M, Mabrouk M T, Anwar D, Mohamed R, Khattab S, Bekhit A, Elkhodairy K, Freag M. *Curr Pharm Design*, 2017, 23(35): 5213~5229.
- [18] Putro J N, Ismadji S, Gunarto C, Soetaredjo F E, Ju Y H. *Colloid Surface A*, 2019, 578: 123618.
- [19] Hong J, Zeng X A, Buckow R, Han Z. *Food Hydrocolloid*, 2018, 83: 419~429.
- [20] Chen L L, Ji F L, Bao Y M, Xia J, Guo L Y, Wang J Y, Li Y C. *Sci Eng Compos Mater*, 2017, 70: 418~429.
- [21] Serrano-Sevilla I, Artiga Á, Mitchell S G, De Matteis L, De La Fuente J M. *Molecules*, 2019, 24(14): 2570.
- [22] Senra T D, Campana-Filho S P, Desbrières J. *Eur Polym J*, 2018, 104: 128~135.
- [23] Wu Y, Wang X Y. *Int J Food Prop*, 2017, 20(12): 3295~3307.
- [24] Qiu L P, Shan X T, Long M M, Ahmed K S, Zhao L, Mao J, Zhang H J, Sun C L, You C Z, Lv G Z. *Int J Biol Macromol*, 2019, 130: 755~764.
- [25] Qiu L P, Ge L, Long M M, Mao J, Ahmed K S, Shan X T, Zhang H J, Qin L, Lv G Z, Chen J H. *Asian J Pharm Sci*, 2020, 15(1): 83~94.
- [26] 李玮. 新葡聚糖衍生物自聚集胶束制备及抑瘤药载体应用研究. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2016.
- [27] Liu Z H, Jiao Y P, Wang Y F, Zhou C R, Zhang Z Y. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60(15): 1650~1662.
- [28] 高盼. 亚油酸修饰的普鲁兰自组装胶束作为药物载体的研究. 大连: 大连理工大学, 2014.
- [29] 郭延柱. 两性纤维素及其自组装纳米胶束的制备与应用研究. 广州: 华南理工大学, 2013.
- [30] Mocanu G, Nichifor M, Sacarescu L. *Curr Drug Deliv*, 2017, 14(3): 406~415.
- [31] Yang W Y, Guo L, Li F F, Liu X, Nie S P, Xie M Y, Huang D F. *Molecules*, 2019, 24(20): 3747.
- [32] Wu Z, Zhao C Y, Li R H, Ye F Y, Zhou Y, Zhao G H. *J Agr Food Chem*, 2019, 67(26): 7416~7427.
- [33] Lin B B, Su H Y, Jin R R, Li D Y, Wu C Q, Jiang X, Xia C C, Gong Q Y, Song B, Ai H. *Sci Bull*, 2015, 60(14): 1272~1280.
- [34] 于坤, 韩晓东, 何丽华, 贾庆明, 陕绍云, 苏红莹. *材料导报*, 2019, 33(3): 141~147.
- [35] 刘亚栋, 邱比特, 韩苗苗, 季生象. 2015 年全国高分子学术论文报告会, 2015.
- [36] Wang Q Y, Su H Y, Xia C C, Sun J Y, Liu C, Wang Z Y, Gong Q Y, Song B, Gao F B, Ai H, Gu Z W. *Chin Sci Bull*, 2009, 54(17): 2925~2933.
- [37] Guo Y Z, Wang X H, Shen Z G, Shu X C, Sun R C. *Carbohydr Polym*, 2013, 92(1): 77~83.
- [38] Lu A J, Petit E, Li S M, Wang Y D, Su F, Monge S. *Int J Biol Macromol*, 2019, 135: 38~45.

- [39] Nichifor M, Mocanu G, Stanciu M C. Carbohydr Polym, 2014, 110: 209~218.
- [40] Lu A J, Petit E, Jelonek K, Orchel A, Kasperczyk J, Wang Y D, Su F, Li S M. Int J Biol Macromol, 2020, 154: 39~47.
- [41] 张海涛. 叶酸—普鲁兰多糖—阿霉素聚合物药物载体的制备及其性质研究. 西安: 第四军医大学, 2011.
- [42] Yoo H S, Park T G. J Control Release, 2001, 70(1): 63~70.
- [43] Kataoka K, Matsumoto T, Yokoyama M, Okano T, Sakurai Y, Fukushima S, Okamoto K, Kwon G S. J Control Release, 2000, 64(1): 143~153.
- [44] Wu M M, Guo K, Dong H W, Zeng R, Tu M, Zhao J H. Sci Eng Compos Mater, 2014, 45: 162~169.
- [45] Li Y P, Zhang J M, Guo Y Z, Chen M W, Wang L, Sun R C, Wang X H. J Mater Chem B, 2016, 4(39): 6454~6461.
- [46] Sun D D, Wang M, Ji D Y, Qiao J, He T, Liu X, Guan Q X. Chin Chem Lett, 2018, 29(6): 831~833.
- [47] Guo X, Shi C L, Wang J, Di S B, Zhou S B. Biomaterials, 2013, 34(18): 4544~4554.
- [48] Sudimack J, Lee R J. Adv Drug Deliv Rev, 2000, 41(2): 147~162.
- [49] Gillies E R, Fréchet J M J. Pure Appl Chem, 2004, 76(7/8): 1295~1307.
- [50] Li L B, Gu J, Zhang J, Xie Z G, Lu Y F, Shen L Q, Dong Q R, Wang Y Y. ACS Appl Mater Inter, 2015, 7(15): 8033~8040.
- [51] Yang S C, Tang Z H, Zhang D W, Deng M X, Chen X S. Biomater Sci-UK, 2017, 5(10): 2169~2178.
- [52] Wang Y, Bai F, Luo Q, Wu M L, Song G, Zhang H M, Cao J, Wang Y Q. Int J Biol Macromol, 2019, 121: 964~970.
- [53] Ghassami E, Varshosaz J, Taymouri S. Curr Pharm Design, 2018, 24(28): 3303~3319.
- [54] Meng F, Hennink W E, Zhong Z Y. Biomaterials, 2009, 30(12): 2180~2198.
- [55] Chen W, Zhong P, Meng F H, Cheng R, Deng C, Feijen J, Zhong Z Y. J Control Release, 2013, 169(3): 171~179.
- [56] Zhou G X, Li L S, Xing J, Jalde S, Li Y, Cai J, Chen J Q, Liu P D, Gu N, Ji M. Colloid Surface B, 2016, 148: 518~525.
- [57] Wu Y, Zhang X Y, Li H Q, Deng P F, Li H R, He T Q, Rong J H, Zhao J H, Liu Z. J Mater Chem B, 2018, 6(41): 6646~6659.
- [58] Nguyen D H, Joung Y K, Choi J H, Moon H T, Park K D. Biomed Mater, 2011, 6(5): 055004.
- [59] Xiong D, Zhang X F, Peng S Y, Gu H W, Zhang L J. Colloid Surface B, 2018, 163: 29~40.
- [60] Han H J, Wang H B, Chen Y J, Li Z H, Wang Y, Jin Q, Ji J. Nanoscale, 2016, 8(1): 283~291.
- [61] An S Y, Hong S H, Tang C B, Oh J K. Polym Chem-UK, 2016, 7(29): 4751~4760.
- [62] Li J, Wang J H, Zhang X T, Xia X, Zhang C C. Int J Biol Macromol, 2019, 141: 997~1003.
- [63] Zhang A P, Zhang Z, Shi F H, Xiao C S, Ding J X, Zhuang X L, He C L, Chen L, Chen X S. Macromol Biosci, 2013, 13(9): 1249~1258.
- [64] 李虹. 天然高分子接枝两性离子共聚物的合成与性能研究. 北京: 北京化工大学, 2013.
- [65] Chen Y C, Liao L C, Lu P L, Lo C L, Tsai H C, Huang C Y, Wei K C, Yen T C, Hsiue G H. Biomaterials, 2012, 33(18): 4576~4588.
- [66] Lammers T, Kiessling F, Hennink W E, Storm G. Mol Pharmaceut, 2010, 7(6): 1899~1912.
- [67] Rudin M, Weissleder R. Nat Rev Drug Discov, 2003, 2(2): 123~131.
- [68] Situ J Q, Wang X J, Zhu X L, Xu X L, Kang X Q, Hu J B, Lu C Y, Ying X Y, Yu R S, You J. Sci Rep-UK, 2016, 6: 35910.
- [69] Yang H K, Qi M, Mo L, Yang R M, Xu X D, Bao J F, Tang W J, Lin J T, Zhang L M, Jiang X Q. RSC Adv, 2016, 6(115): 114519~114531.
- [70] Xu M, Wang L V. REV Sci Instrum, 2006, 77(4): 041101.
- [71] Uthaman S, Bom J S, Kim H S, John J V, Bom H S, Kim S J, Min J J, Kim I, Park I K. J Biomed Mater Res B, 2016, 104(4): 825~834.
- [72] Zhang J, Chen H Y, Xu L, Gu Y. J Control Release, 2008, 131(1): 34~40.
- [73] Hoshino A, Hanada S, Yamamoto K. Arch Toxicol, 2011, 85(7): 721~721.
- [74] Wani M Y, Hashim M A, Nabi F, Malik M A. Adv Phys Org Chem, 2011:1687~7985.
- [75] Khatun Z, Nurunnabi M, Cho K J, Lee Y K. ACS Appl Mater Inter, 2012, 4(8): 3880.

Progress of the Preparations of Amphiphilic Polysaccharide Micelles as Nanoparticle Drug Carriers

ZHENG Rong¹, LI Zhen¹, MIN Jie¹, WU Chang-qiang², ZHI Yun-fei¹,
SHAN Shao-yun¹, SU Hong-ying^{1*}

(1. Faculty of Chemical Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China;
2. Sichuan Key Laboratory of Medical Imaging, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China)

Abstract: Due to its excellent biocompatibility and unique structure of hydrophobic core and hydrophilic shell, natural polymer-based nano-micelles have been widely researched in the biomedical field as carriers for lipid-soluble drug or nanoprobe loading to increase their solubility and stability. Polysaccharides have the advantages of excellent water solubility, wide sources and easy chemical modification, and the amphiphilic polysaccharide derivatives after hydrophobic modification can self-assemble into natural polymer micelle nanoparticles in aqueous solution. The preparation of amphiphilic polysaccharides is a key step for the design and formation of polysaccharide micelles. Therefore, in this paper, the commonly used methods for the hydrophobic modification of polysaccharides, including side chain esterification, side chain ring-opening polymerization, terminal reductive amination, and hydrophobic drug grafting were reviewed in detail. And, further functionalization and application of amphiphilic polysaccharide micelles as drug carriers were introduced.

Key words: Polysaccharides; Polymeric micelles; Hydrophobic modification; Drug carrier