

基于聚(谷氨酸-酪氨酸-丙氨酸)嵌段共聚物的纳米药物载体制备与药物释放行为研究

徐孝旭,陈启凡*,路艳华,顾盼盼

(辽东学院 化工与机械学院,丹东 118003)

摘要:双亲性聚合物以其独特的物理结构和化学性质在生物医学,尤其在药物缓释领域具有重要的应用前景。本文首先设计并合成了具有亲疏水性的聚(天冬氨酸-酪氨酸-丙氨酸)嵌段聚合物,其结构通过红外光谱(FT-IR)与核磁共振氢谱(^1H NMR)的表征;其次,基于该嵌段聚合物通过自组装的方式对模型药物阿霉素进行了包载,构建了具有 pH 响应的药物纳米载体,采用扫描电子显微镜(SEM)与采用激光粒度仪(DLS)表征了载药纳米粒子的形貌、粒径大小及分布。研究表明,载药纳米粒子在溶液中呈现球形,其粒径小于 220nm,且具有明显的 pH 响应性,在酸性条件下的释放效果明显高于中性和碱性条件。此外,体外细胞毒性实验表明,该聚氨基酸材料对 L-929 细胞无毒性。

关键词:氨基酸;嵌段共聚物;纳米载体;阿霉素;药物释放

纳米医学是利用纳米技术预防和治愈各种疾病的医学分支,是将传统的抗肿瘤药物通过物理包封、静电吸附、化学键合等方式负载到纳米载体中以构建纳米载药系统^[1,2]。纳米载药系统可以改善药物的溶解和释放,且具有稳定性好、可塑性强等特点,进而提高药物生物利用度、增强药物疗效,并降低毒副作用,在药物递送和癌症治疗领域备受关注。纳米载药系统的种类繁多,根据纳米材料的属性可以概括为脂质类纳米载体、无机纳米载体和高分子纳米载体。高分子聚合物具有生物相容性好、低毒性等优点,许多天然高分子和合成聚合物都被用来制备纳米药物载体,如聚合物纳米粒、聚合物胶束、树状高分子等,以实现药物的准确递送,提高药效^[3~5]。

双亲性聚合物具有亲水和疏水两种不同的链段,可通过分子自组装制备具有拓扑结构形貌的功能纳米粒子,作为抗肿瘤纳米药物载体而备受关注。研究表明,两亲性共聚物自组装胶束的形态取决于其核-链伸展、界面能以及冠内链相互作用之间的平衡,可呈现球状^[6]、囊泡^[7]、管状^[8]、棒状^[9]及碟状^[10]等不同形态,通过控制聚合物共聚比例、选择性溶剂性质等获得相应的形态。双亲性聚合物的粒径、动力学稳定性等因素也受聚合物的分子量以及亲、疏水链段比例影响^[11~13]。因此,在合成双亲性聚合物时,就需要调控聚合物的分子量及其分布。

聚氨基酸具有良好的生物可降解性、生物相容性以及无毒性,可通过结构调控来构建双亲性嵌段共聚物,因此,其在药物控释、药物载体、组织工程等领域有着广泛的应用前景。大量文献报道表明,聚氨基酸纳米胶束可用作具有控释性的药物载体,且可溶解、包覆多种活性组分小分子,其胶束尺寸与病毒的极为接近,在血液中可稳定存在一定的时间,因此聚氨基酸胶束可用作药物运输、靶向载体^[14~18]。阿霉素是一种蒽环类的抗肿瘤药物,可通过其结构上的特征官能团氨基或羰基与其它化合物反应而实现化学交联式载药,或通过大分子的自组装而得到物理包覆式载药,且其特征官能团具有在特定波长下的荧光吸收,因此可以通过紫外分光光度法研究其在不同温度或 pH 条件下的释放效果^[19,20]。我们研究的目的是开发新型双亲性聚氨基酸共聚物载体及其应用,在本文中首先设计了以天冬氨酸为亲水端,酪氨酸为敏感段,丙氨酸为疏水段,通过开环聚合的方法合成出嵌段共聚物,其次通过自组装制备包载模型药物

10.14028/j.cnki.1003-3726.2021.12.007

收稿:2021-08-07;修回:2021-08-27;

基金项目:国家自然科学基金(51873084),辽宁省教育厅科学研究项目(LNSJYT202014);

作者简介:徐孝旭(1972-),男,博士,教授,主要从事功能高分子材料的研究;

* 通讯联系人:陈启凡,女,博士,教授,主要从事有机高分子材料的研究。E-mail: qifan_c405@163.com.

阿霉素的响应性载药纳米粒子,并研究了其细胞毒性与在不同 pH 下的药物释放行为。

1 实验

1.1 药品与原料

六甲基二硅氮烷 (HMDS), AR, 由国药集团化学试剂沈阳有限公司提供; L-天冬氨酸-4-苄酯-*N*-羧基环内酸酐 (L-Asp-NCA), L-丙氨酸-*N*-羧基-环内酸酐 (L-Ala-NCA), L-酪氨酸-*N*-羧基环内酸酐 (L-Tyr-NCA), AR, 从安徽泽升科技有限公司购买; 无水乙醚, *N,N*-二甲基甲酰胺, 二甲基亚砜, 均为分析纯, 由国药集团化学试剂沈阳有限公司提供; 氢化钙, 透析袋 (3500Da) 及其他实验所用的试剂及耗材均由天津博迪化工有限公司提供。实验室所用的水均为去离子水。

1.2 测试仪器

红外光谱分析 (FT-IR, Shimadzu 8400S); 核磁共振氢谱 (^1H NMR, 德国 Bruker ARX 600MHz); 扫描电镜分析 (SEM, HITACHI S-3400N); 激光粒度仪 (DLS, Bettersize 3000); 双光束紫外可见分光光度计 (UV, TU-1901)。

1.3 聚(谷氨酸-酪氨酸-丙氨酸)嵌段共聚物的合成

1.3.1 开环聚合 该聚合反应需要在严格无水环境下进行, 实验前对所用溶剂进行干燥处理, 通过添加适量氢化钙, 减压蒸馏得到的溶剂用活化过的 4A 分子筛进行保存备用。聚(谷氨酸-酪氨酸-丙氨酸)嵌段共聚物的合成示意图见图 1。称取 L-天冬氨酸-4-苄酯-*N*-羧基环内酸酐 0.5g (0.002mol) 溶于 5mL DMF 中, 抽真空, 惰性气体保护置换三次。微量进样器量取引发剂 HMDS 0.0211mL (0.0001mol) 注射到反应体系中, 室温下持续搅拌 72h 后, 称取 L-酪氨酸-*N*-羧基环内酸酐 0.207g (0.001mol) 溶于 5mL DMF 并缓慢滴加到反应体系内, 继续搅拌 72h; 最后称取 L-丙氨酸-*N*-羧基-环内酸酐 0.23g (0.002mol) 溶于 5mL DMF 并缓慢滴加到反应体系内, 继续搅拌 72h 后, 终止反应。体系用冰乙醚沉降, 以除去未反应的单体, 沉淀出的聚合物再用无水乙醚洗涤三次, 在真空干燥箱 40℃ 下烘干, 得白色固体, 在封闭的容器内保存。

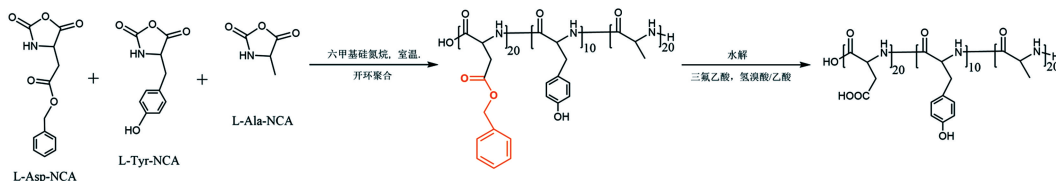


图 1 氨基酸聚合物的合成

Figure 1 Synthesis of amino acid polymer

1.3.2 脱保护反应 通过在酸性条件下水解反应脱去聚氨基酸分子侧链上的保护基团, 称取所得到的三嵌段共聚物 0.5g, 放入 25mL 圆底烧瓶中, 加 5mL 三氟乙酸搅拌至溶解, 在惰性气体保护下缓慢滴加 5mL 氢溴酸的乙酸溶液 (33%), 连续反应 20h 后, 旋转蒸发浓缩反应体系, 然后将溶液缓慢滴加至冰乙醚沉降后, 抽滤, 无水乙醚洗涤三次, 在真空干燥箱 40℃ 下烘干, 得白色固体。

1.4 载药纳米粒子的制备

通过纳米沉淀法来制备纳米载药粒子。称取盐酸阿霉素 (DOX·HCl) 5mg 溶于 20mL 二甲基亚砜 (DMSO) 中, 用微量进样器加入三乙胺 10μL 以脱去化合物上的 HCl 从而使得大量具有响应性的氨基得以暴露, 体系在避光条件下持续搅拌 4h。称取聚合物 20mg 溶于 10mL DMSO 中, 缓慢转移至活化后的阿霉素溶液中, 继续避光下反应 4h。待体系稳定后, 缓慢向溶液中滴加去离子水, 每次 0.2mL, 累积滴加 5mL 使聚合物在溶液中充分自组装。后将反应体系转移至透析袋 (截留分子量 3500Da) 中, 在缓冲溶液中透析 24h, 每隔 6h 更换一次溶液, 去除 DMSO 溶液及多余的阿霉素。将透析后的溶液冷冻干燥, 即可

10.14028/j.cnki.1003-3726.2021.12.007

得到载药纳米粒子的粉末状固体。

1.5 载药率与包封率的测试

为了测定载药纳米粒子的载药量(LC)和药物包封效率(EE),取 3mL 载药纳米粒子溶液冻干,并将所得粉末重新溶解在 DMSO 中。通过紫外-可见光谱法获得 480nm~490nm 处吸光度光强,并根据标准校准曲线,计算载药纳米粒子的 LC 和 EE,计算公式如下:

$$LC(\%(\text{wt})) = \left(\frac{W_{\text{负载上的药物}}}{W_{\text{载药纳米粒子}}} \right) \times 100\% \quad (1)$$

$$EE(\%(\text{wt})) = \left(\frac{W_{\text{负载上的药物}}}{W_{\text{载药纳米粒子}}} \right) \times 100\% \quad (2)$$

1.6 模型药物的体外释放

通过对不同时间段缓释溶液的紫外吸收测试,计算药物的累积释放量,从而研究 pH 对模型药物的整体释放效果。将制备的载药纳米粒子溶液超滤浓缩至 DOX 浓度为 1mg/mL,取 3mL 浓缩液转移到截留分子量为 3500Da 的透析袋中,将其浸没在 50mL 不同 pH 值(pH=5.0、pH=7.4、pH=8.5)但温度均为 37℃的缓冲溶液中,在恒温条件下,以 90rpm 恒定转速避光摇动 72h。在预定的时间(0.5h、1.5h、3.5h、6.5h、10.5h、16h、24h、30h、36h、48h、60h、72h),取 3mL 的药物释放溶液,同时补充相同体积新鲜的缓冲溶液。通过紫外分光光度计测量 480nm 处溶液的吸光度以计算 DOX 的浓度。每个数据测定三次,取平均值。

1.7 体外细胞毒性实验

用于药物载体的材料,其细胞毒性是检验材料安全性的重要指标。为了考察所制备的双亲性聚氨基酸材料的体外细胞毒性,本实验采用 CCK-8 法测定了不同浓度的纳米粒子对正常细胞(小鼠成纤维细胞 L-929)的抑制作用。在特定培养皿中培养数量相同的成纤维 L-929 细胞,培养 24h 后分别加入浓度为 7.815μg/mL、15.63μg/mL、31.25μg/mL、62.5μg/mL、125μg/mL、250μg/mL、500μg/mL 的自组装后的纳米粒子溶液,再过 24h 后检测其存活情况。整个实验在无菌实验室进行。

2 结果与讨论

2.1 聚合物的表征

2.1.1 FT-IR 分析 对载药前的嵌段共聚物进行了红外光谱表征,见图 2。根据红外谱图,在 3290cm⁻¹ 处的吸收峰是由肽链上 N—H 的伸缩振动产生的;2930cm⁻¹、2860cm⁻¹ 归属于丙氨酸中甲基的 C—H 的伸缩振动吸收峰;在 1730cm⁻¹ 处的吸收峰是羧酸中羰基的伸缩振动吸收峰;在 1650cm⁻¹ 处的吸收峰为酰胺键羰基的吸收峰;在 1625cm⁻¹、1550cm⁻¹ 处的吸收峰对应结构中苯环骨架;在 1454cm⁻¹、1388cm⁻¹ 处的吸收峰对应于 C—H 的面内弯曲振动,在 1120cm⁻¹ 的吸收峰是 C—H 的面外弯曲振动造成的。

2.1.2 ¹H NMR 分析 以 DMSO 作为溶剂,TMS 作为内标,对脱保护后的共聚物进行了¹H-NMR 的表征,见图 3。8.07ppm 处的化学位移归属于羧基质子氢,证明脱保护反应成功进行,7.33ppm 处为苯环上氢原子的化学位移;对应于 4.95ppm 处的化学位移归属于肽链上的 C—H;3.66ppm 和 2.98ppm 处的化学位移分别是天冬氨酸和酪氨酸侧链上亚甲基的氢原子,1.46ppm 处表示丙氨酸侧链甲基上的氢。

2.2 纳米粒子的 SEM 分析

载药纳米粒子的形貌见图 4,从图中可以看出,载药后的纳米微粒在溶液中具有较好的分散,其粒径小于 220nm,符合生物医学领域应用的标准,其整体形貌以球形或椭球形为主,有利于纳米粒子在体内的循环以及通过实体瘤的高通透性和滞留效应(EPR 效应)在肿瘤处富集。通过对比可以看出,pH 值对聚合物微球的形貌并未产生明显的影响,但影响其粒径,在酸性条件下会有少量粒子表现出较大的尺寸,而碱性条件下粒子的直径相对小一些,这是因为聚合物中酪氨酸部分侧链上含有羟基,在酸碱条件下存在

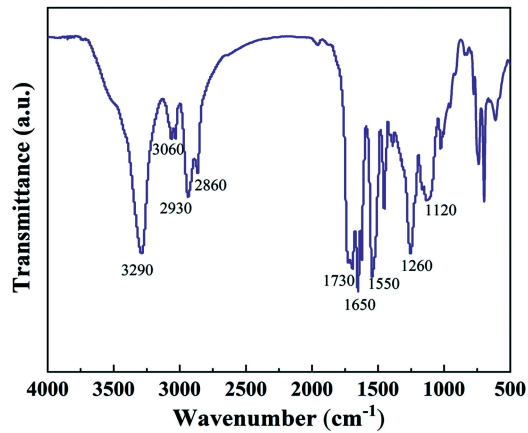


图 2 嵌段聚合物的红外光谱图
Figure 2 FT-IR spectra of block polymer

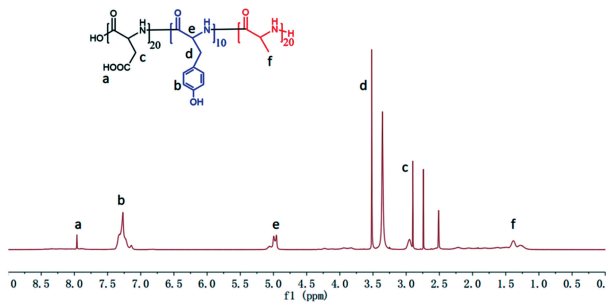


图 3 嵌段聚合物的核磁共振图
Figure 3 ¹H NMR spectra of block polymer

不同的电离平衡,这与内部阿霉素分子上氨基存在不同的静电效应,同时天冬氨酸侧链上的羧基也会因为质子化效应而使大分子的自组装表现出特异性改变,但纳米粒子的整体尺寸呈现出均匀稳定的排列。

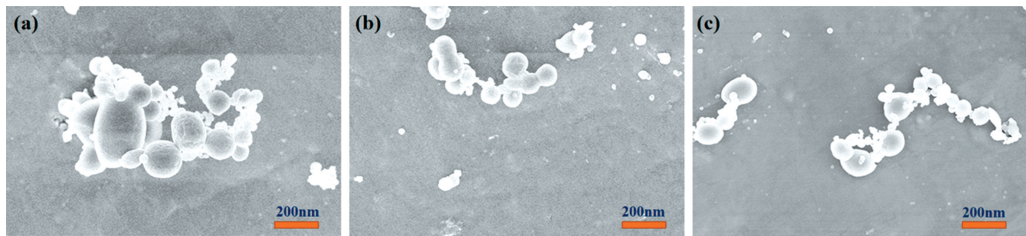


图 4 载药纳米粒子的扫描电镜图片
(a) pH=5.0; (b) pH=7.4; (c) pH=8.5
Figure 4 SEM images of drug-loaded nanoparticles
(a) pH=5.0; (b) pH=7.4; (c) pH=8.5

2.3 纳米粒子的粒径测试

纳米粒子的粒径通过 DLS 进行了测试。从图 5 中可以看出,载药后纳米粒子的粒径均呈现单峰分布,分布较窄,且在不同 pH 下的平均粒径在 200nm 左右,符合纳米粒子在医学应用领域的要求。酸性条件下粒子的平均直径略大于碱性环境,这是因为嵌段共聚合物中酪氨酸分子段的解自组装效应造成分子体积稍有变大。粒径分布图与扫描电镜结果相吻合。

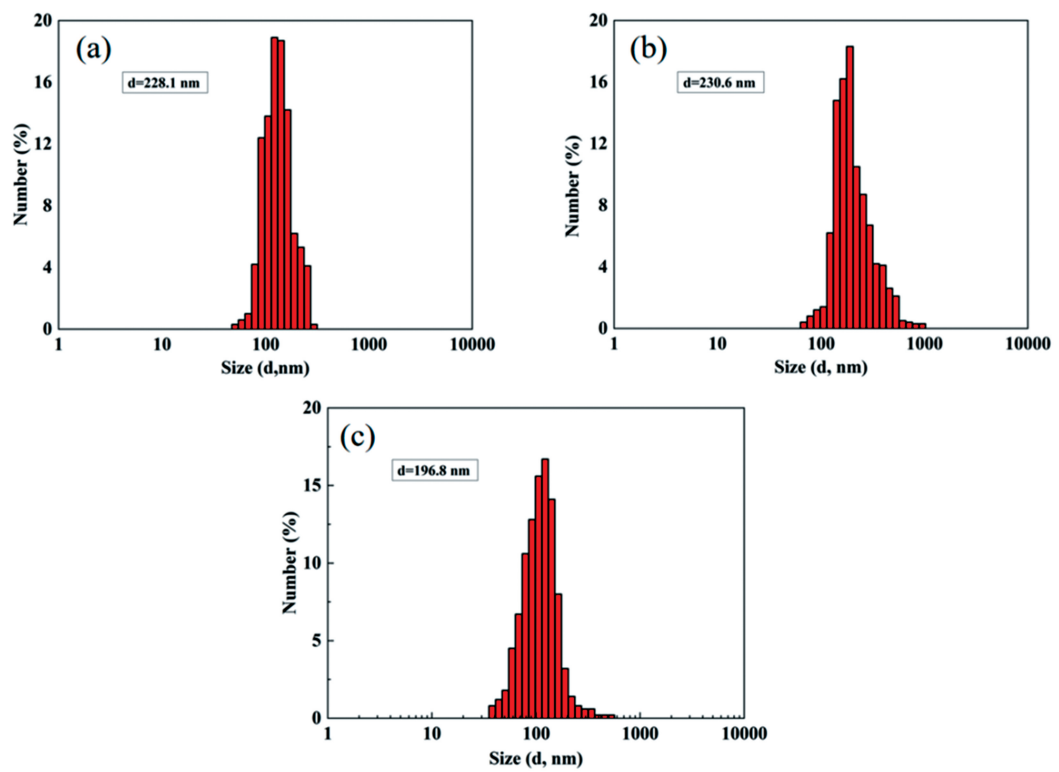


图 5 载药纳米粒子的粒径分布图

(a) pH=5.0; (b) pH=7.4; (c) pH=8.5

Figure 5 Particle size distribution of drug-loaded nanoparticles

(a) pH=5.0; (b) pH=7.4; (c) pH=8.5

2.4 体外释放效果

将配置好的含量为 2mg/L、4mg/L、8mg/L、12mg/L 及 16mg/L 的阿霉素溶液进行光谱扫描,以超纯去离子水溶液作为参比溶液,在扫描范围为 200nm~600nm。定量测定中选择波长为 480nm 下,进行紫外可见光谱扫描,并记录下吸光度,根据 Lambert-Beer 定律绘制标准溶液曲线如图 6 所示。经测定,聚氨基酸纳米粒子的载药量为 2.6%,包封率为 26.4%。图 7 中显示了在不同 pH 下的模型药物释放曲线,可以看出 pH=7.4 时,药物的释放效果不明显,持续释放 72h 后,药物的累积释放率达 36%;pH=8.5 时药物的累积释放率更低,释放效果更差,这表明中性和碱性条件有利于保持微球结构的稳定性,使得纳米粒子难以解自组装从而实现模型药物的释放。在 pH=5.0 的环境下,药物的累积释放率明显高于后两者,且在 12h 内出现了暴释现象,这是因为酸性条件下酪氨酸中羟基的质子化作用造成了纳米微球的结构发生改变,疏水段弯曲的大分子结构转变为直链结构,使得大量通过物理包埋的阿霉素被释放出来,同时酸性条件造成了酰胺键的水解,并破坏了一定的氢键结构,从而实现大量模型药物被释放出来。材料通过不同酸碱度的改变使得大分子侧链发生特异性响应,从而使得“亲水尾”的分子链与“疏水头”中的阿霉素发生静电相互作用,从而造成模型药物的释放效果不同。

2.5 纳米粒子的细胞毒性

通过 CCK-8 法测定药物载体材料对细胞的毒性是验证其能否用于临床应用的一项重要指标,结果如图 8 所示。从中可以看出,随着体系内聚氨基酸含量的增加,L-929 细胞的存活率有略微下降的趋势,但 24h 后的细胞存活率均在 90% 以上,且浓度达到 500μg/mL 时存活率升至 95%,这表明所制备的纳米粒子的细胞毒性并未表现出浓度依赖性,证明该材料对细胞是无毒的。

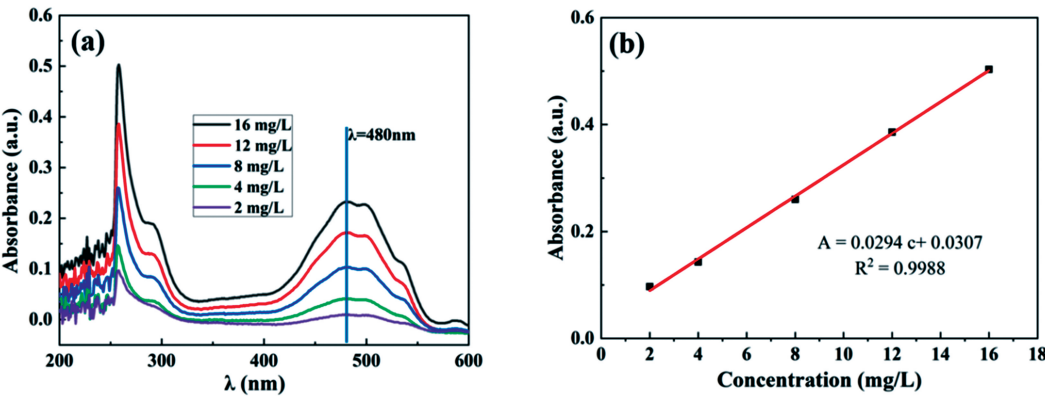


图 6 (a) 阿霉素标准曲线的建立; (b) 模型药物的拟合曲线
Figure 6 (a) The standard curves of adriamycin; (b) fitting curve of the model drug

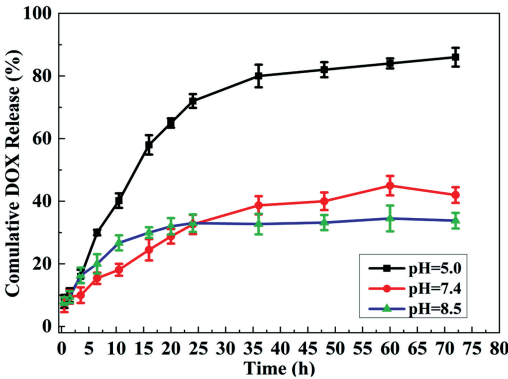


图 7 纳米粒子在不同 pH 下的释放曲线
Figure 7 Release curves of nanoparticles at different pH values

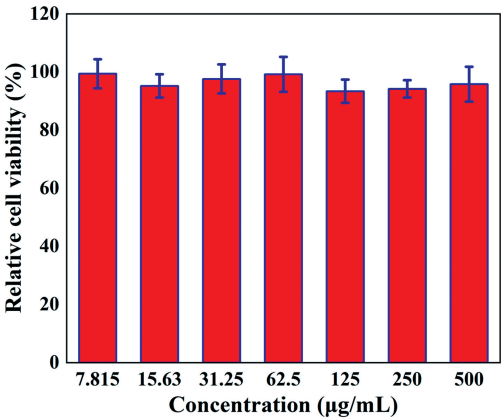


图 8 L-929 细胞在不同浓度聚氨基酸纳米粒子溶液中培养 24h 后的存活率
Figure 8 Relative cell viability of L-929 treated with polyamino acid at different concentrations for 24h

3 结语

本论文以六甲基二硅氮烷为引发剂,通过设计特定比例成功合成出了聚(天冬氨酸-酪氨酸-丙氨酸)嵌段聚合物,其结构符合分子设计;通过自组装实现了对模型药物阿霉素的包载,所制备的载药纳米粒子

在溶液中呈现球形或椭球形,其粒径小于 220nm,这有利于纳米粒子在体内的循环以及通过 EPR 效应在肿瘤处富集;通过对比不同 pH 条件下的累积释放率可以看出,该材料显示出 pH 响应性,酸性条件下的释放效果明显高于中性和碱性条件。此外,该聚氨基酸材料对正常细胞没有毒性。该研究为进一步开发聚氨基酸类化合物在生物医药尤其是药物缓释领域的研究奠定了一定的基础。

参考文献:

- [1] Shi J, Kantoff P W, Wooster R, Farokhzad O C. Nat Rev Cancer, 2017, 17(1): 20~37.
- [2] Overchuk M, Zheng G. Biomaterials, 2018, 156: 217~237.
- [3] Patra J K, Das G, Fraceto L F, Campos E V R, Rodriguez-Torres M D P, Acosta-Torres L S, Diaz-Torres L A, Grillo R, Swamy M K, Sharma S, Habtemariam S, Shin H S. J Nanobiotechnol, 2018, 16: 71~79.
- [4] Oliveira O N, Iost R M, Siqueira J R, Crespilho F N, Caseli L. ACS Appl Mater Inter, 2014, 6(17): 14745~14766.
- [5] El-Sawy H S, Al-Abd A M, Ahmed T A, El-Say KM, Torchilin V P. ACS Nano, 2018, 12(11): 10636~10664.
- [6] Cho S, Heo G S, Khan S, Gonzalez A M, Elsabahy M, Wooley K L. Macromolecules, 2015, 48(24): 8797~8805.
- [7] Discher D E, Eisenberg A. Science, 2002, 297(5583): 967~973.
- [8] Hocine S, Li M H. Soft Matter, 2013, 9(25): 5839~5861.
- [9] Wang X, Guerin G, Wang H, Wang Y S, Manners I, Winnik M A. Science, 2007, 317(5838): 644~647.
- [10] Venkataraman S, Lee A L, Maune H T, Hedrick J L, Prabhu V M, Yang Y Y. Macromolecules, 2013, 46(12): 4839~4846.
- [11] Bray F, Ferlay J. CA-Cancer J Clin, 2018, 68(6):394~424.
- [12] Song G, Chen Y, Liang C, Yi X, Liu J J, Sun X Q, Shen S D, Yang K, Liu Z. Adv Mater, 2016, 28(33):7143~7148.
- [13] Yang H, Fu Y, Li Y, Jang M S, Lee J H, Lee D S. J Mater Chem B, 2018, 6(35):5562~5569.
- [14] Levit M, Zashikhina N, Vdovchenko A, Dobrodumov A, Zakharova N, Kashina A, Ruhl E, Lavrentieva A, Scheper T, Tennikova T, Korzhikova-Vlakh E. Polymers, 2020, 12(1): 183.
- [15] de Carvalho L T, Paula M L D, de Moraes R M, Alves G M, Lacerda T M, dos Santos J C, dos Santos A M, Medeiros S D. Polymers, 2020, 12(11): 2527.
- [16] Milton M, Deng R, Mann A, Wang C Y, Tang D N, Weck M. Acc Chem Res, 2021, 54(10): 2397~2408.
- [17] Sikder A, Chakraborty S, Rajdev P, Dey P, Ghosh S. Acc Chem Res, 2021, 54(11): 2670~2682.
- [18] Brouers F, Al-Musawi T. Adsorption, 2020, 26(6): 843~853.
- [19] Zheng D, Lei Q, Chen S, Qiu W X, Liu M Y, Chen X, Ding, Y X, Li P H, Zhang Q Y, Xu Z S, Zhang X Z, Chu P K. J Mater Chem B, 2015, 3(43):8499~8507.
- [20] Karthik S, Jana A, Selvakumar M, Venkatesh Y, Paul A, Shah S S, Singh N D P. J Mater Chem B, 2017, 5(9):1734~1741.

Preparation and Drug Release Behavior of Nano-drug Carrier Based on Poly(glutamate-tyrosine-alanine) Block Copolymer

XU Xiao-xu, CHEN Qi-fan^{*}, LU Yan-hua, GU Pan-pan

(College of Chemical Engineering and Machinery, Eastern Liaoning University, Dandong 118003, China)

Abstract: Due to the unique physical structure and chemical properties, amphiphilic polymers have an important role in biomedicine, especially in the field of drug release. In this study, a new block copolymer poly (aspartate-tyrosine-alanine) was synthesized by ring-opening polymerization, and its structure was characterized by FT-IR and ¹H-NMR. The model drug doxorubicin was loaded by self-assembly based on the block polymer, and the drug nanocarriers with pH response were constructed. The morphology, particle size and distribution of drug-loaded nanoparticles were characterized by scanning electron microscopy (SEM) and dynamic light scattering (DLS), respectively. The results showed that the particle size of drug-loaded nanoparticles in solution is less than 220nm and had obvious pH response. The release effect of drug-loaded nanoparticles in acidic conditions is obviously higher than that in neutral and alkaline conditions. In addition, in vitro cytotoxicity experiments showed that the polyamino acid material was not toxic to L-929 cells.

Key words: Amino acid; Block copolymer; Nano-carrier; Doxorubicin; Drug release