

基于苯甲酰亚胺的高分子药物载体与支架材料

屈小中^{1*}, 黄一宁², 杨振忠^{3*}

(1. 中国科学院大学材料科学与光电技术学院, 北京 100049; 2. 北京大学第一医院, 北京 100034;
3. 清华大学化学工程系, 北京 100084)

摘要: 苯甲酰亚胺(Benzoic-imine)是近期被报道的少数能够响应由重大疾病引起的体内内源性 pH 改变的化学结构之一。由于苯环与碳氮双键共轭作用, 使其在正常生理 pH 值(~ 7.4)稳定, 在弱酸性 pH 值(< 6.8)水解。基于苯甲酰亚胺基团的高分子输送体系, 能够高效响应实体肿瘤、脑卒中半暗带等由病变组织内部无氧酵解导致的细胞外弱酸性环境, 及因细胞内化所形成的内涵体、溶酶体等酸性环境, 赋予该类载体被动靶向效应。另一方面, 苯甲酰亚胺是一类重要的动态化学结构, 由苯甲醛基团与氨基反应键合, 反应条件温和。利用该反应能够在生理环境条件下构筑原位交联体系, 获得具有注射能力的高分子水凝胶, 用于生物活性物质输送或作为组织工程支架。亚胺形成与水解过程可逆, 基于苯甲酰亚胺的生物医用体系不需永久改变材料化学结构, 具有明确的代谢途径, 为载体设计和材料选择提供方便。目前, 苯甲酰亚胺结构已被用于制备环境响应性高分子组装体系、有机/无机杂化体系及高分子水凝胶。本文将介绍最近几年来基于苯甲酰亚胺基团的高分子药物输送体系和组织工程支架材料制备等方面的研究进展。

关键词: 苯甲酰亚胺; pH 响应; 可注射水凝胶; 药物输送; 支架

高分子在生物医学领域的应用日益广泛。用于药物输送、组织工程的高分子材料仍是本领域的研究热点。近年来, 人们已将此类工作的重点从基础科学向实际应用转变^[1~4]。然而, 为了满足对生物医用材料安全性和有效性的多重要求, 使用新合成单体制备的高分子药物载体与支架材料在工业转化过程中将面临巨大考验。相比而言, 通过对已知高分子材料进行改性可以在一定程度上降低风险。一直以来, 人们在追求输送体系“智能化”同时, 同样也关注其设计的“简洁化”(Facile design)。因此, 利用动态共价键或动态相互作用来构筑生物医用载体的方法逐渐受到重视^[5]。动态共价键仍属于化学键, 其化学平衡能够通过外部信号进行调控。利用这种特性可以控制高分子间或高分子与小分子间形成超分子结构, 实现对功能物质的装载, 也可以通过动态键的形成原位制备交联高分子材料, 用于组织工程^[6,7]。在生物体内, 局部生理环境的差异性 or 组织中体液的稀释作用可以导致动态共价键的分解, 从而改变载体的超分子聚集态结构或者破坏其交联结构, 使载体内所包封的活性物质加速释放。重要的是, 与通过永久化学键构筑的载体不同, 由于动态共价键分解是键合的逆过程, 这种因动态键分解而导致的载体结构的改变或降解不会产生与所用材料不同的新的代谢产物, 大大简化了对所合成载体的安全性评价^[8]。

在众多的动态共价键结构中, 亚胺即席夫碱, 结构简单, 反应条件温和, 其形成与水解可由环境 pH 值调控^[9,10]。亚胺由醛/胺反应生成, 其中氨基广泛存在于生物分子(如蛋白、多肽)、天然高分子(如壳聚糖及其衍生物)、合成高分子(如聚乙烯基胺)和药物分子(如阿霉素)中, 通过亚胺键合(席夫反应)构筑基于上述大分子的输送体系无疑是简便可行的方法。自 2008 年以来, 我们在前人工作的基础上^[11], 提出并证明了使用苯甲醛基团与氨基反应得到的苯甲酰亚胺结构(Benzoic-imine)在生理 pH 下稳定, 在弱酸性 pH 下(< 6.8)水解, 水解动力学与环境 pH 值相关^[12,13]。由于上述弱酸性 pH 值范围(如 6.3~6.8)对应于实体肿瘤和脑卒中等重大疾病组织的细胞外 pH 值(pH_e)^[14,15], 使我们能够利用苯甲酰亚胺结构建立对上述信号具有响应性的输送体系。相较于其它种类的低 pH 水解结构, 苯甲酰亚胺形成与分解可

10.14028/j.cnki.1003-3726.2019.02.004

收稿: 2018-11-24; 修回: 2018-11-29;

作者简介: 屈小中, 博士, 教授, E-mail: quxz@iccas.ac.cn; 黄一宁, 主任医师, 教授;

* 通讯联系人: 杨振忠, 博士, 教授, 研究领域为高分子科学与材料。E-mail: yangzhenzhong@tsinghua.edu.cn.

在水溶液中进行,具有可逆性和快的动力学过程^[16]。据此,人们已利用该动态键在研究高分子或超分子聚集态结构的动态演变方面开展诸多工作^[17~19],通过形成苯甲酰亚胺结构还能够获得在生理环境条件下(25~37℃,pH~7.4)的可逆交联体系^[20,21]。不同于传统席夫碱交联所需要的多胺对多醛反应,苯甲酰亚胺在中性 pH 下具有较好的稳定性。故带有双苯甲醛端基的线形高分子能够与带有多个氨基的线形或枝化高分子在水溶液中交联,实现凝胶转变,也可进行蛋白分子间交联,为凝胶材料选择和功能化带来了便利^[22]。在本文中,我们将对最近几年基于苯甲酰亚胺结构的运输体系、原位交联体系以及其在肿瘤和脑卒中治疗、组织工程领域中的研究进展进行综述。

1 生理 pH 响应的药物输送体系

肿瘤化疗药物大多具有毒副作用,实现药物的靶向输送是减少副作用、提高药物生物利用度的有效手段^[23]。目前,除使用靶向配体外,大量工作聚焦于制备纳米、亚微米尺度的 pH 响应载体,充分利用细胞内化形成的内涵体、溶酶体中的低 pH 值环境(4.0~6.5)实现药物可控释放,促进药物的细胞内转运,降低溶酶体迁移,改善药物对肿瘤细胞的抑制作用,延缓细胞的耐药行为^[24,25]。然而,经系统性给药的载体在到达肿瘤部位前还需克服多重生物屏障,特别是需要避免生物体本身的免疫响应。另一方面,高效细胞内输送需要载体识别肿瘤组织和肿瘤细胞,这一过程又要求载体表面对肿瘤细胞具有特异性的识别能力。为解决肿瘤药物载体在输运过程中“隐蔽”性(对免疫系统)和“特异”性(对肿瘤细胞)间的矛盾,对载体表面性能的“开-关”式控制是肿瘤药物载体设计时需重点考虑的问题。其关键是实现载体表面结构或性能对肿瘤细胞外环境的响应。考虑表面 PEG 化是对药物载体进行“隐蔽化”改性的主要方法^[26],苯甲酰亚胺是能够在肿瘤 pH_e 下水解的少数化学结构之一^[27],我们将甲氧基 PEG(mPEG)一端修饰对醛基苯甲酸基团,将其接枝在带有胆酸侧基的多聚赖氨酸残余氨基上,制备了肿瘤 pH_e 响应聚合物胶束,实现了对胶束表面电荷性能的可逆控制^[12]。在肿瘤 pH_e 条件下,该胶束表面性能由中性转变为正电性,促进了胶束与细胞膜的相互作用,提高了细胞内吞效率,实现了在肿瘤弱酸环境下胶束对肿瘤细胞的被动靶向作用。进一步,利用环境 pH 值对苯甲酰亚胺水解动力学的影响,制备了对肿瘤 pH_e、细胞内涵体 pH 值具有连续响应能力的聚合物胶束,完成了抗肿瘤药物从肿瘤组织到肿瘤细胞的“接力”式输送^[13]。在后续工作中,人们又设计在输送过程中将苯甲酰亚胺与靶向配体作用相结合,制备了具有主、被动靶向联合作用的药物输送载体^[28]。在肿瘤区域,苯甲酰亚胺水解使载体表面 PEG 链脱落,“显露”出隐藏在 PEG 层下方的 Arg-Gly-Asp 片段,由其继续介导载体进入肿瘤细胞。最近几年,这种通过动态共价键的水解作用脱除载体表面 PEG 暴露内层功能基团,提高药物跨膜输送的途径已经广泛地应用于高分子组装体系、有机/无机杂化体系等肿瘤药物输送系统,在多功能药物载体的研究中展现出潜在价值^[29]。人们合成了由苯甲酰亚胺连接的 PEG 与聚 L-天冬氨酸-4-苄酯/聚 1-乙基咪唑的嵌段共聚物,用于紫杉醇和姜黄素的联合输送^[30]。该聚合物组装胶束表面性能和颗粒尺寸在肿瘤组织环境中同时改变,使之能够深入肿瘤组织,获得更好的肿瘤抑制效果。将苯甲酰亚胺和二硫键同时引入多嵌段共聚物(见图 1),在其所形成聚集体中包载磁性颗粒,使该输送体系具有对肿瘤 pH_e 和外场的多重响应性,还兼具诊断和治疗的双重效用^[31]。

高分子与无机粒子杂化体系也有望用于生物医学领域。介孔二氧化硅纳米颗粒是优良的载体^[32],对其进行高分子修饰不仅能够提高其生物相容性,还可使其具有响应性、控制释放能力或靶向性,提升其对药物的输送能力^[33]。人们合成了中空结构的介孔二氧化硅纳米颗粒,利用苯甲酰亚胺和苯硼酸酯两种动态化学键对其表面进行高分子修饰,使颗粒能够在肿瘤 pH_e 下去除表面 PEG 保护,提高细胞摄取效率。待颗粒细胞内化后,苯硼酸酯键能够在内涵体 pH 值下水解,促进药物(阿霉素)在细胞内释放^[34]。动物实验表明,该颗粒能够安全有效地控制体内肿瘤的生长。这种通过双 pH 响应基团制备表面 PEG 化的 MSN,实现分步介导,提高肿瘤药物细胞内输送的方法被人们广泛采用^[35,36]。不同于表面高分子修饰,利用苯甲酰亚胺键在包载阿霉素的多孔二氧化硅纳米颗粒表面连接肿瘤靶向肽(tLyP-1)修饰的二硫

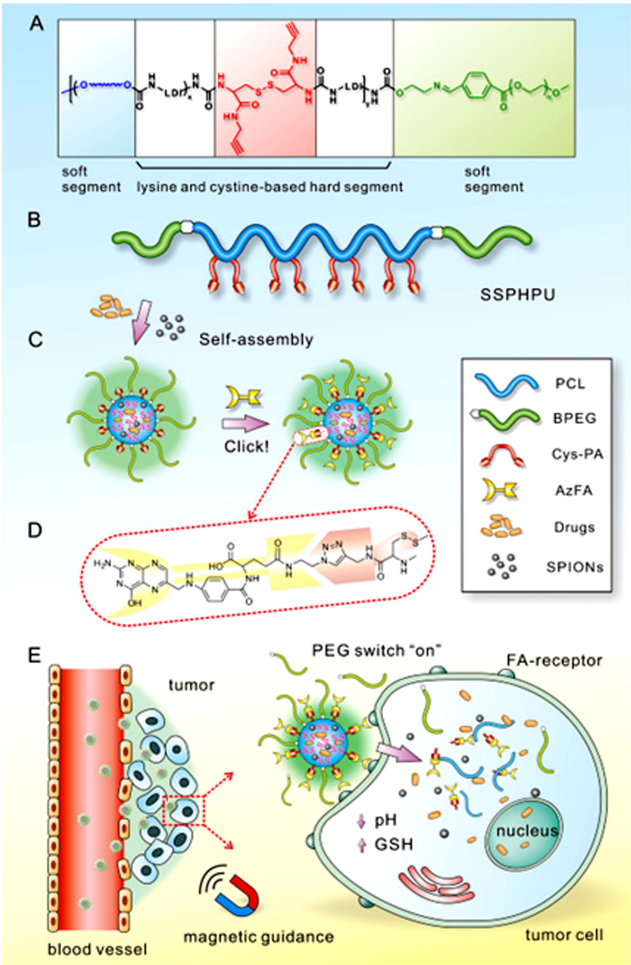


图 1 通过多嵌段聚合物制备响应性高分子胶束的示意图^[31]

该胶束在肿瘤细胞外环境下表面 PEG 因苯甲酰亚胺键水解脱落, 导致所载活性物质释放, 用于对肿瘤的成像与治疗。

Figure 1 Design of clickable and imageable multiblock polyurethanes (MPU). Schematic chemical structure (A) and molecular architecture (B) of the clickable multiblock polyurethanes (MPU). The waved lines in (A) represent PCL soft segments, (C) Self-assembly of MPU micelles and post-conjugation of folic acid via click chemistry, (D) Schematic FA residues on the interface of polymer micelles, (E) Illustration of magnetic-guided and PEG-switched targeting and release of MPU nanocarriers.

化钨量子点(WS₂-HP)。肿瘤环境下, 动态键断键导致 WS₂-HP 脱落并渗透入肿瘤组织内部, 作为光敏剂进行光热治疗。去掉表面基团的二氧化硅颗粒则通过内吞方式进入细胞释放药物。这是双模式治疗方式可显著提高肿瘤抑制效果^[37]。通过在颗粒表面修饰苯甲醛基团, 以动态共价键合的方式在介孔颗粒表面连接阿霉素分子和带有氨基端基的 PEG 链(见图 2), 可使药物分子在肿瘤环境下快速释放^[38], 还能利用阿霉素分子充当“守门员”, 控制介孔内被吸附生物活性物质的释放行为^[39]。

除了以二氧化硅为基体, 应用苯甲酰亚胺制备 PEI 接枝 PEG, 将之修饰在纳米金颗粒表面形成杂化体系, 用做全反式维甲酸和 siRNA 的载体, 显著提高了活性物质在肿瘤环境的输送效率^[40]。通过苯甲酰亚胺将 PEG 接枝在碳点表面, 不仅用于遮蔽同处于碳点表面的 RGD 靶向基团, 实现了对肿瘤细胞的“主-被动”双重靶向^[41], 还在碳点(CDs)表面结合四价铂前药, 使体系具有成像和治疗的多功能性。在荧光碳点内部引入二硫键和苯甲酰亚胺键负载近红外光敏剂(IR825), 使之在低 pH 值下被触发, 产生荧光发射和 IR825 释放, 实现对肿瘤的诊疗^[42]。

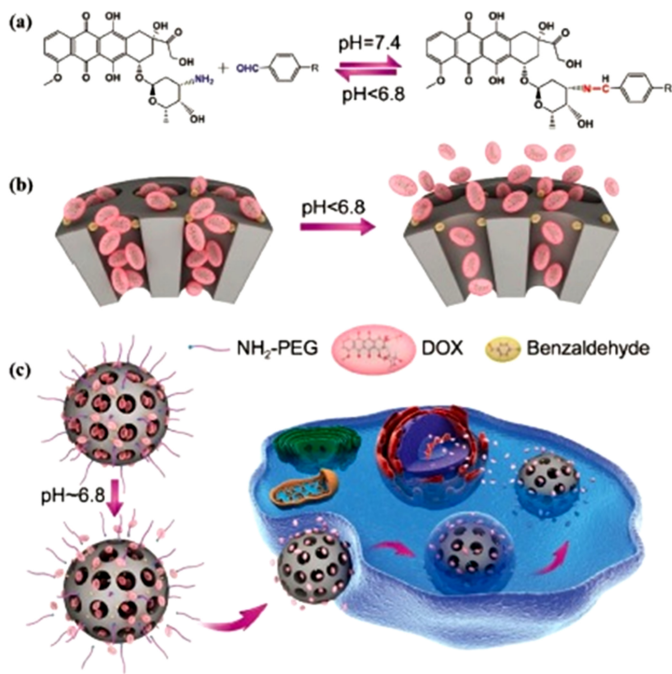


图 2 载药介孔二氧化硅颗粒的制备示意图^[38]

该方法在二氧化硅表面修饰苯甲醛基团,与阿霉素分子形成 pH 响应动态共价键,利用药物分子控制介孔内包封的其它类型生物活性物质的释放行为。

Figure 2 Facile preparation of drug self-gated MSN as anticancer nanoplatform via pH-sensitive dynamic benzoic-imine covalent bond^[38]. (a) The dynamic interaction between doxorubicin (DOX) and benzaldehyde via pH-sensitive benzoic-imine bond. (b) Schematic drug DOX self-gated MSNs with pH-responsive drug release property. (c) Dynamic PEGylated and DOX self-gated MSNs with site-specific drug release and cell uptake at weak acidic tumor tissue/cells.

苯甲酰亚胺不仅用于载体制备,携带的苯甲醛基团的高分子链也可以与带有氨基的药物分子直接反应生成 pH 响应的高分子/药物复合物。以高分子/阿霉素复合物为例,由于阿霉素的氨基在与苯甲醛反应后被占用,该药物分子在复合物中表现为疏水性,由亲水高分子改性的高分子/阿霉素复合物在水溶液中能够自组装形成组装结构。其中,最为简单的结构是端苯甲醛基 PEG 与阿霉素反应得到的 PEG-DOX 复合物。人们研究了将 PEG-DOX 用于肺癌的吸入治疗。他们评价了 PEG 分子量、环境 pH 值等对 PEG-DOX 聚集行为、释放动力学和肿瘤细胞抑制能力等的影响,认为 PEG-DOX 组装形成的纳米颗粒的主要性能指标优于当前商品制剂,还可对其它类型化疗药物进行装载,实现联合化疗^[43]。利用 pH 响应的 PEG-DOX 也可以与 pH 不敏感的两亲性高分子共组制备 pH 响应体系用于肿瘤药物输送。人们将 PEG-DOX 与经疏水基团改性的多聚赖氨酸梳状聚合物共组装,制备了对肿瘤 pH_e 和内涵体 pH 值具有梯次响应能力的聚合物囊泡,其尺寸、囊壁厚度以及透过性均可通过两高分子的组成和疏水基团的接枝率连续调控,使囊泡对包封的小分子和大分子的释放动力学显示出不同的 pH 值依赖性^[44]。进一步,人们将 PEG-DOX 与端基接有环形 RGD 的 PEO-b-PCL 嵌段共聚物共组制备混合胶束,证明当 PEG 链长于 PEO 链时,该胶束在生理 pH 下具有“隐身”能力,pH_e 下 PEG 链水解暴露 PEO 顶端的环形 RGD 端基,使胶束对肿瘤细胞产生靶向,提高 DOX 的输送效率。胶束的疏水微区还可被用来包封紫杉醇,进行联合治疗^[45]。

2 蛋白输送体系

pH 响应体系已被广泛用于蛋白输送^[46]。蛋白表面带有多个赖氨酸残基位点,可以利用苯甲醛官能

化高分子对蛋白表面进行修饰,制备高分子/蛋白复合物,以改变蛋白的生物活性和代谢特性。通过苯甲酰亚胺将 PEG 接枝细胞色素 C(CytC)制备了 nCytC-bPEG 纳米颗粒,使其具有肿瘤 pH_i 响应能力和更高的跨膜输运效率^[47]。

脑卒中是心脏病之后的人类第二大死亡原因,导致死亡人数约占约 9%,其中缺血性脑卒中占卒中类型的四分之三^[48]。溶栓治疗是国际上公认的缺血性卒中急性期的有效治疗方式。目前临床使用的药物主要为静脉滴注型重组组织型纤溶酶原激活物(rt-PA)和尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA)。我们使用羟乙基壳聚糖(GC)与两端带有苯甲醛基的 PEO(OHC-PEO-CHO)的水溶液,通过气动喷雾制备了亚微米水凝胶,实现对尿激酶分子的原位包载。该水凝胶具有对 2MHz 超声的响应性,超声场中 uPA 加速释放,导致凝胶制剂的溶栓效果优于等当量的裸尿激酶^[49]。进一步,采用线栓法构建大鼠持续性大脑中动脉堵塞模型,证明装载 uPA 的凝胶可以延长尿激酶半衰期,提高尿激酶的溶解度和稳定性。另一方面,也证实了超声联合 uPA 凝胶溶栓可以利用超声机械力对血栓的松解作用和超声产生的“空化效应”对 uPA 的加速释放作用,促进 uPA 向血块内部渗透,作用于微循环微小血栓,缩小持续性大脑中动脉缺血(MCAO)模型梗死体积,改善神经功能评分^[50]。

我们发现,尿激酶分子的表面氨基(赖氨酸残基)可以与 OHC-PEO-CHO 中的苯甲醛基在水溶液中直接反应形成纳米交联结构,即 uPA 纳米凝胶^[51]。体外研究表明,仅仅通过改变高分子分子量就可以高效控制交联 uPA 的蛋白活性(见图 3)。当交联高分子分子量较低时,蛋白纳米凝胶的网格密度大,底物难与酶接触,uPA 纳米凝胶的表观活性下降。反之,高分子链较长时底物能够透过,显示酶活性。更重要的是,由于 uPA 与 OHC-PEO-CHO 形成的交联结构能够在弱酸性 pH 下水解,不影响释放 uPA 的高级结构,使得在弱酸性环境中 uPA 纳米凝胶的酶活性完全恢复。当组织的供血动脉发生堵塞时,由于远端组织缺乏有效的能量供应,细胞能量代谢发生变化,无氧酵解增加,乳酸堆积,引起组织局部的 pH 值下降。结果显示,外周静脉血的平均 pH 值为 7.27,而 MCA 闭塞 1h 会后相应供血区域的脑组织平均 pH 值下降至 6.73^[15]。因此使用 uPA 纳米凝胶能够溶解缺血半暗带区域微循环内的纤维蛋白性血栓,明显减轻大鼠模型中永久性大脑中动脉闭塞动物的临床症状和梗死体积,改善脑梗死大鼠的长期预后,效果优于裸尿激酶^[15]。上述结果预示,pH 敏感的 uPA 纳米凝胶体系可能选择性地在缺血远端微循环的部位靶向释放尿激酶,有效溶解微血栓,恢复微循环的血流,同时不增加出血风险,为设计新型蛋白药物递送体系提供了新思路。

3 可注射水凝胶

通过苯甲酰亚胺可以构筑不同类型的纳米或亚微米尺寸的高分子交联体系,作为抗肿瘤药物和基因的载体^[52,53]。与组装体系相似,在肿瘤 pH_i 下,亚胺键水解可以改变微凝胶的大小、内部结构和表面性能,促进肿瘤治疗物质释放,提升对制备细胞生长的抑制,改善对动物模型的治疗效果。

在本体凝胶的制备方面,可注射水凝胶是一种在加工过程中凝胶化的体系。在生物医学领域,注射凝胶作为植入材料具有填充不规则空间、原位 3D 装载生物活性物质的能力,且能够减小使用过程中对生物体的损伤。因此,期望能将这类体系用于局部给药和组织损伤的修复治疗^[54,55]。由于苯甲酰亚胺的形成在生理环境条件下具有较快的动力学过程,为构筑注射型(通过注射器、混药器等)植入材料提供了条件。我们最早将苯甲酰亚胺动态键用于可注射水凝胶的制备。只需在线形水溶性高分子(如 EO/PO 嵌段共聚物)的两端引入苯甲醛端基,在水溶液中与壳聚糖衍生物混合,即可在室温或 37℃、中性 pH 值条件下制备水凝胶,其流变性能与化学键交联水凝胶接近^[56]。这种凝胶转变也可通过改变壳聚糖与线形高分子混合溶液的 pH 值(如从酸性调整至中性)获得,过程中不需要加入引发剂或引入外场刺激(如紫外光),其产物除凝胶外仅为碳氮双键形成时所产生的 H₂O。基于苯甲酰亚胺在中性 pH 下稳定,这种制备可注射凝胶的方法使用线形大分子交联剂,具有通用性,可通过改变线形高分子结构调控凝胶的物

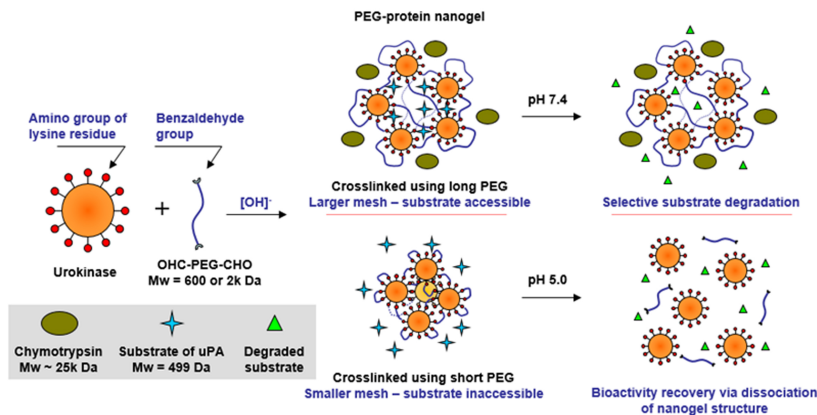


图 3 高分子-尿激酶纳米凝胶的制备过程及结构演变示意图^[51]

利用双苯甲醛端基的线形 PEO 与蛋白表面氨基反应制备 PEO-uPA 纳米凝胶，其表观活性可以由 PEO 的分子量和环境 pH 控制。

Figure 3 Synthesis of PEG-protein conjugated nanogel^[51]. PEO-uPA nanogels exhibit a size exclusion effect, which can prevent larger substrates/enzymes (than the nanogels mesh size) from approaching, thus prohibiting the protein reaction. This strategy can be utilized to tailor bioactivity of proteins through changing length or molecular weight of the crosslinker for the nanogel synthesis. The inclusion of a benzoic-imine linkage in the protein nanogels gives rise to the reversible bioactivity of the protein in mild acidic conditions such as in infarct brain tissue.

理性能。例如,PO/EO 嵌段共聚物具有温敏性,该体系的交联过程可以通过 pH 值和温度双重调控,所得凝胶具有 pH 和温度双重响应性。人们用苯甲醛与端氨基的嵌段共聚物 poly(L-alanine)-*b*-poly(L-glutamic)反应,在分子的两端引入苯甲酰亚胺基团,使高分子的亲疏水性能发生改变,能够自组装形成高分子水凝胶,且凝胶具有可注射性。该体系对环境 pH 的响应非常灵敏,其溶胶-凝胶转化可以在很窄的 pH 范围内发生(6.5~7.4)^[57]。除环境响应性外,凝胶的注射能力有助于其在 3D 打印方面的应用^[58~60]。动态交联体系大都具有自修复能力。对于通过苯甲酰亚胺交联的高分子凝胶也不例外^[61]。

含苯甲酰亚胺的可注射凝胶具有理想的 3D 包覆性能,已经被用来进行药物输送研究。主要工作聚焦于抗肿瘤药物输送,即制备肿瘤内或肿瘤旁给药途径的抗肿瘤药物制剂^[62]。人们开发了一种具有 pH 响应性的还原氧化石墨烯/苯甲醛官能团化聚乙二醇(CMC-rGO/PEG-CHO)水凝胶,可以在酸性 pH 条件(6.5)下有效释放药物(DOX);石墨烯的引入使其具有光热转换能力,可对肿瘤进行局部双模式治疗^[63]。人们利用两种席夫碱结构制备了载阿霉素的注射水凝胶,其中氧化葡聚糖与羧甲基壳聚糖通过亚胺键形成交联网络,再在聚糖主链通过苯甲酰亚胺结构接枝阿霉素,使凝胶具有可注射性和 pH 响应释放能力^[64]。

除肿瘤治疗外,动态交联高分子凝胶也被用做组织工程材料。使用苯硼酸改性壳聚糖,将改性产物与 PVA 以及 OHC-PEO-CHO 混合,制备了包含两种动态键(苯硼酸酯和苯甲酰亚胺)的双响应可注射水凝胶^[65]。该凝胶能够在基体中 3D 包载胰岛素和小鼠成纤维细胞(L929),大鼠模型证明制剂作为敷料时可加速糖尿病动物伤口愈合。使用带有聚苯胺侧基的季铵盐化壳聚糖与苯甲醛官能化的聚乙二醇-癸二酸甘油酯反应制备了具有抗菌能力、凝血能力的多功能可注射水凝胶敷料,显著提高了动物模型中全层皮肤缺损的修复速度^[66]。

水凝胶一直被认为是理想的细胞外基质,可注射凝胶的原位凝胶化特性使其在细胞的 3D 包封方面具有优势。人们研究了基于多苯甲醛官能化的聚乙二醇衍生物(poly(EO-co-Gly)-CHO)和 GC 组成的高分子凝胶体系凝胶时间、吸水率、机械性能等随醛基浓度的变化规律,证明在该水凝胶基质中包封软骨细胞可以获得较高的存活率和持续增殖,具有生物安全性^[67]。我们使用羟乙基壳聚糖(GC)与双官能化 PEO(OHC-PEO-CHO)原位交联制备了 GC/OHC-PEO-CHO 水凝胶膜,在凝胶过程中原位负载 L929

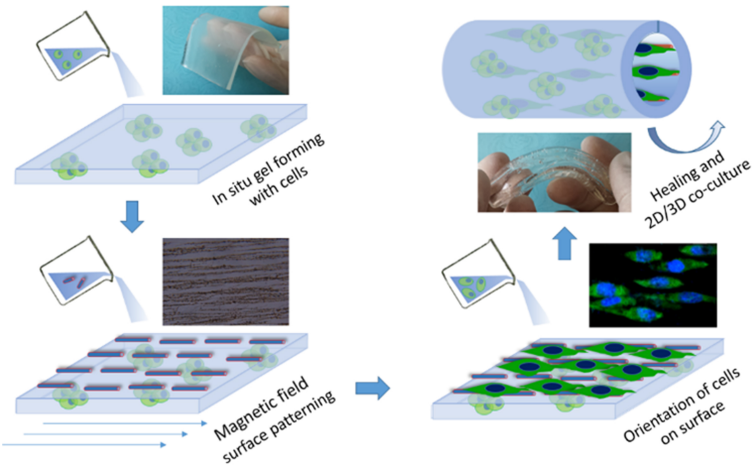


图 4 以动态水凝胶原位 3D 包载细胞,其后利用动态相互作用在水凝胶表面引入 Janus 结构磁性纳米管,进行图案化处理,黏附细胞,实现不同种类细胞的 2D/3D 有序共培养^[68]。

Figure 4 Illustrative fabrication of the surface patterned GC/OHC-PEG-CHO composite film for 2D and 3D cell co-culture^[68]。

细胞,利用凝胶表面的残余醛基进一步修饰携带 RGD 基团的氨基改性磁性 Janus 二氧化硅纳米管,通过磁场控制纳米管在凝胶表面形成线形图案化结构,在凝胶表面再行黏附 MC3T3-E1 细胞,实现双细胞株共培养,获得了表面生长单层取向 MC3T3-E1 细胞、凝胶内生长 3D 分布 L929 细胞的复合支架^[68]。利用 GC/OHC-PEO-CHO 凝胶的动态交联特性,我们还可以对凝胶膜的宏观结构进行调控(见图 4)。

水凝胶用作细胞载体的主要问题之一是其机械性能较差,难以用做承力组织的支架材料^[69]。制备双网络凝胶是提高凝胶力学性能的有效方法。具有注射能力的双网络水凝胶还鲜有报道^[70],其主要原因在于双网络凝胶的形成需要两个交联结构的次序形成,多数情况需借助原位聚合过程。我们最近使用两种动态交联方式,通过调控两种动态相互作用的动力学,解决了双网络凝胶的注射加工问题^[71]。采用 GC/OHC-PEO-CHO 为第一网络,海藻酸钙为第二网络,在温和条件下(室温、中性 pH 值)使用双联混药器注射制备了双网络凝胶(见图 5)。从凝胶材料选择到制备过程均未破坏体系的细胞相容性,该双网络凝胶具有对细胞的原位包载能力,注射过程不会对细胞活性产生显著影响。这种具有双网络结构的水凝胶较单网络凝胶具有更好的力学性能和更长的降解周期,在凝胶基质中 3D 生长的前软骨细胞(ATDC5)在 4 周内的增殖可高达 1000%。以这种水凝胶为细胞外基质,研究了血管内皮细胞与人骨髓间充质干细胞在同一高分子网络内 3D 共培养细胞间相互作用,证明两种细胞在混养过程中的“沟通”行为可协同促进基质内的血管化和细胞的成骨转化,为使用水凝胶基材料进行骨损伤治疗提供了新依据^[72]。

4 结论与展望

苯甲酰亚胺是一种在生理条件下(37℃、pH~7.4)稳定、在微弱酸性 pH 下水解的动态化学结构,其反应基团为氨基和苯甲醛基。由于氨基存在于众多商品化聚合物、天然高分子及其衍生物、多肽和蛋白等材料,在聚合物和小分子中引入苯甲醛基团的化学方法简单,因此在输送体系和原位凝胶化体系中引入苯甲酰亚胺的过程简单,能够降低生物医用体系设计时对新合成材料的依赖性。基于苯甲酰亚胺的动态共价键特性和水解反应条件,携带该键的高分子体系能够最大限度地保持所用材料体内降解后化学结构的稳定性,为进一步研究其医用体系的代谢行为带来方便。目前,含有该动态化学键的高分子体系已被用于肿瘤药物输送、蛋白药物输送、基因输送和细胞输送的研究,其载体形式包含高分子聚集结构、药物/蛋白复合物结构、有机无机杂化结构和水凝胶结构等,部分体系显示应用潜力。但与此同时,人们还

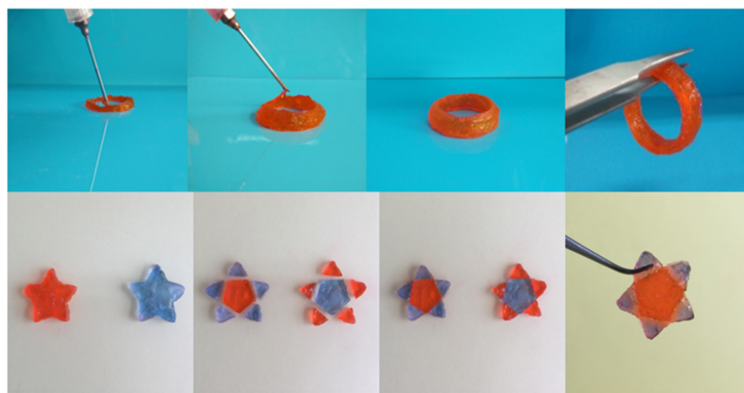


图 5 利用动态共价键和静电相互作用在室温环境下通过双联混药器注射制备双网络
高分子水凝胶(上),以及动态水凝胶的自修复能力(下)演示^[71]。

Figure 5 Demonstration of injectability of GC/Alginate DN hydrogel through a syringe needle (up row), and the adhesion procedure of DN hydrogel pieces after the interface was activated using buffer of pH 6 (bottom row)^[71].

需加强对上述体系的长效安全性评价性研究,尤其是如果引入苯甲醛基团的过程涉及材料化学结构改变,可能导致改性材料的物理、化学性质变化,且苯甲醛基团与体内生物活性物质的结合也有可能引发生物体的应激反应,这些都将是今后需要特别关注的问题。生物体中存在多种动态相互作用和动态调控,可帮助生命体实现复杂的生物功能。因此,采用包括苯甲酰亚胺在内的动态共价键结构和动态相互作用,构筑生物医用输送体系或者用以提升已有输送体系的功能性将提供简便有效方法,有望扩展高分子及其它生物医用材料的应用范围。

参考文献:

- [1] Langer R, Tirrell D A. *Nature*, 2004, 428: 487~492.
- [2] Frey W, Meyer D E, Chilkoti A. *Adv Mater*, 2003, 15: 248~251.
- [3] Chen W, Meng F, Cheng R, Deng C, Feijen J, Zhong Z. *J Control Release*, 2015, 210: 125~133.
- [4] Fathi M, Majidi S, Zangabad P S, Barar J, Erfan-Niya H, Omid Y. *Med Res Rev*, 2018, 38: 2110~2136.
- [5] Wang Y, Xing P, An W, Ma M, Yang M, Luan T, Tang R, Wang B, Hao A. *Langmuir*, 2018, 34: 13725~13734.
- [6] Jin Y, Yu C, Denman R J, Zhang W. *Chem Soc Rev*, 2013, 42: 6634~6654.
- [7] Ni C, Zha D, Ye H, Hai Y, Zhou Y, Anslyn E V, You L. *Angew Chem Int Ed*, 2018, 57: 1300~1305.
- [8] Reuther J F, Dahlhauser S D, Anslyn E V. *Angew Chem Int Ed*, 2018, doi: 10.1002/anie.201808371.
- [9] Rowan S J, Cantrill S J, Cousins G R L, Sanders J K M, Stoddart J F. *Angew Chem Int Ed*, 2002, 41: 898~952.
- [10] Belowich M E, Stoddart J F. *Chem Soc Rev*, 2012, 41: 2003~2024.
- [11] Akiyama Y, Nagasaki Y, Kataoka K. *Bioconjugate Chem*, 2004, 15: 424~427.
- [12] Gu J, Cheng W, Liu J, Lo S Y, Smith D, Qu X, Yang Z. *Biomacromolecules*, 2008, 9: 255~262.
- [13] Ding C, Gu J, Qu X, Yang Z. *Bioconjugate Chem*, 2009, 20: 1163~1170.
- [14] Ge Z, Liu S. *Chem Soc Rev*, 2013, 42: 7289~7325.
- [15] Cui W, Liu R, Jin H, Lv P, Sun Y, Men X, Yang S, Qu X, Yang Z, Huang Y. *J Control Release*, 2016, 225: 53~63.
- [16] Li Y, Gao J, Kwon I C, Lee D S. *Bioinspired and Biomimetic Polymer Systems for Drug and Gene Delivery*, First Edition 2015, pp203~222.
- [17] Shi L, Liu F, Liu T, Chen J, Xu S, Zeng H. *Soft Matter*, 2018, 14: 5995~6000.
- [18] Wang C, Wang G, Wang Z, Zhang X. *Chem Eur J*, 2011, 17: 3322~3325.
- [19] Wang G, Wang C, Wang Z, Zhang X. *Langmuir*, 2011, 27: 12375~12380.
- [20] 屈小中,杨振忠. *高分子学报*, 2011, 1118~1124.
- [21] Qu X, Yang Z. *Chem Asian J*, 2016, 11: 2633~2641.
- [22] Xin Y, Yuan J. *Polym Chem*, 2012, 3: 3045~3055.

- [23] Torchilin V P. *Nat Rev Drug Discovery*, 2014, 13: 813~827.
- [24] Liu G, Tsai H I, Zeng X, Cheng, W, Jiang L, Chen H, Zhang X, Zhang J, Mei L. *ACS Biomater Sci Eng*, 2018, 4: 1679~1686.
- [25] Zou Y, Zhou Y, Jin Y, He C, Deng Y, Han S, Zhou C, Li X, Zhou Y, Liu Y, *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10: 18585~18600.
- [26] Torchilin V P. *Adv Drug Delivery Rev*, 2006, 58: 1532~1555.
- [27] Tian L, Bae Y H. *Coll Surf B Biointerf*, 2012, 99: 116~126.
- [28] Quan C, Chen J, Wang H, Li C, Chang C, Zhang X, Zhuo R. *ACS Nano*, 2010, 4: 4211~4219.
- [29] Zhao C, Deng H, Xu J, Li S, Zhong L, Shao L, Wu Y, Liang X. *Nanoscale*, 2016, 8: 10832~10842.
- [30] Yang Z, Sun N, Cheng R, Zhao C, Liu Z, Li X, Liu J, Tian Z. *Biomaterials*, 2017, 147: 53~67.
- [31] Wei J, Shuai X, Wang R, He X, Li Y, Ding M, Li J, Tan H, Fu Q. *Biomaterials*, 2017, 145: 138~153.
- [32] Pasqua L, Cundari S, Ceresa C, Cavaletti G. *Curr Med Chem*, 2009, 16: 3054~3063.
- [33] Pang J, Luan Y, Yang X, Jiang Y, Zhao L, Zong Y, Li Z. *Mini Rev Med Chem*, 2012, 12: 775~788.
- [34] Liu J, Luo Z, Zhang J, Luo T, Zhou J, Zhao X, Cai K. *Biomaterials*, 2016, 83: 51~65.
- [35] Chen H, Chen Z, Kuang Y, Li S, Zhang Ma, Liu J, Sun Z, Jiang B, Chen X, Li C. *Coll Surf B Biointerf*, 2018, 167: 407~414.
- [36] Chen H, Kuang Y, Liu R, Chen Z, Jiang B, Sun Z, Chen X, Li C. *J Mater Sci*, 2018, 53: 10653~10655.
- [37] Lei Q, Wang S, Hu J, Lin Y, Zhu C, Rong L, Zhang X. *ACS Nano*, 2017, 11: 7201~7214.
- [38] Zeng X, Liu G, Tao L, Ma Y, Zhang X, He F, Pan J, Mei L, Pan G. *Adv Funct Mater*, 2017, 27: 1605985.
- [39] Cheng W, Liang C, Wang X, Tsai H I, Liu G, Peng Y, Nie J, Huang L, Mei L, Zeng X. *Nanoscale*, 2017, 9: 17063~17073.
- [40] Han X, Li Y, Xu Y, Zhao X, Zhang Y, Yang X, Wang Y, Zhao R, Anderson G J, Zhao Y, Nie G. *Nat Commun*, 2018, 9: 3390.
- [41] Feng T, Ai X, Ong H, Zhao Y. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8: 18732~18740.
- [42] Choi C A, Lee J E, Mazrad Z A I, Kim Y K, In I, Jeong J H, Park S Y. *ChemMedChem*, 2018, 13: 1459~1468.
- [43] Rao K, Zhong Q, Bielski E R, da Rocha S R P. *Mol Pharmaceutics*, 2017, 14: 3866~3878.
- [44] Zhu L, Zhao L, Qu X, Yang Z. *Langmuir*, 2012, 28: 11988~11996.
- [45] Yang S, Zhu F, Wang Q, Liang F, Qu X, Gan Z, Yang Z. *J Mater Chem B*, 2015, 3: 4043~4051.
- [46] Yu M, Wu J, Shi J, Farokhzad O C. *J Control Release*, 2016, 240: 24~37.
- [47] Gu C, Yang Y, Luo M, Tsai H I, Han Y, Zeng X, Liu J, Li B, Mei L, Liu G. *J Biomed Nanotech*, 2017, 13: 1009~1017.
- [48] Donnan G A, Fisher M, Macleod M, Davis S M. *Stroke Lancet*, 2008, 371: 1612~1623.
- [49] Jin H, Tan H, Zhao L, Sun W, Zhu L, Sun S, Hao H, Xing H, Liu L, Qu X, Huang Y, Yang Z. *Int J Pharm*, 2012, 434: 384~390.
- [50] Teng Y, Jin H, Nan D, Li M, Fan C, Liu Y, Lv P, Cui W, Sun Y, Hao H, Qu X, Yang Z, Huang Y. *Bioact Mater*, 2018, 3: 102~109.
- [51] Tan H, Jin H, Mei H, Zhu L, Wei W, Wang Q, Liang F, Zhang C, Li J, Qu X, Shangguan D, Huang Y, Yang Z. *Soft Matter*, 2012, 8: 2644~2650.
- [52] Li Y, Bui Q N, Duy L T M, Yang H Y, Lee D S. *Biomacromolecules*, 2018, 19: 2062~2070.
- [53] Guan X, Guo Z, Lin L, Chen J, Tian H, Chen X. *Nano Lett*, 2016, 16: 6823~6831.
- [54] Tong X, Yang F. *Adv Healthc Mater*, 2018, 1701065.
- [55] Radhakrishnan J, Subramanian A, Krishnan U M, Sethuraman S. *Biomacromolecules*, 2017, 18: 1~26.
- [56] Ding C, Zhao L, Liu F, Cheng J, Gu J, Dan S, Liu C, Qu X, Yang Z. *Biomacromolecules*, 2010, 11: 1043~1051.
- [57] Popescu M T, Lontos G, Avgeropoulos A, Voulgari E, Avgoustakis K, Tsitsilianis C. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8: 17539~17548.
- [58] Guo Z, Ma W, Gu H, Feng Y, He Z, Chen Q, Mao X, Zhang J, Zheng L. *Soft Matter*, 2017, 13: 7371~7380.
- [59] Liu Y, Liu J, Yang H, Liu K, Miao R, Peng H, Fang Y. *Soft Matter*, 2018, 14: 7950~7953.
- [60] Zhao Y, Li M, Liu B, Xiang J, Cui Z, Qu X, Qiu D, Tian Y, Yang Z. *J Mater Chem B*, 2018, 6: 1351~1358.
- [61] Zhang Y, Tao L, Li S, Wei Y. *Biomacromolecules*, 2011, 12: 2894~2901.
- [62] Zhao L, Zhu L, Liu F, Liu C, Shan-Dan, Wang Q, Zhang C, Li J, Liu J, Qu X, Yang Z. *Int J Pharm*, 2011, 410: 83~91.
- [63] Liu W, Zhang X, Zhou L, Shang L, Su Z. *J Colloid Interf Sci*, 2019, 536: 160~170.
- [64] Xiong L, Luo Q, Wang Y, Li X, Shen Z, Zhu W. *Chem Commun*, 2015, 5: 14644~14647.
- [65] Zhao L, Niu L, Liang H, Tan H, Liu C, Zhu F. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9: 37563~37574.
- [66] Zhao X, Wu H, Guo B, Dong R, Qiu Y, Ma P X. *Biomaterials*, 2017, 122: 34~47.
- [67] Cao L, Cao B, Lu C, Wang G, Yu L, Ding J. *J Mater Chem B*, 2015, 3: 1268~1280.

- [68] Zhu F, Chen Y, Yang S, Wang Q, Liang F, Qu X, Hu Z. *RSC Adv*, 2016, 6: 61185~61189.
- [69] Gong J P. *Soft Matter* 2010, 6: 2583~2590.
- [70] Rodell C B, Dusaj N N, Highley C B, Burdick J A. *Adv Mater*, 2016, 28: 8419~8424.
- [71] Yan Y, Li M, Yang D, Wang Q, Liang F, Qu X, Qiu D, Yang Z. *Biomacromolecules*, 2017, 18: 2128~2138.
- [72] Yang C, Han B, Cao C, Yang D, Qu X, Wang X. *J Mater Chem B*, 2018, 10. 1039/c8tb02244e.

Recent Advances on Benzoic-Imine Dynamic Bond Contained Physiological pH Responsive Polymeric Delivery Systems and Injectable Hydrogels

QU Xiao-zhong^{1*}, HUANG Yi-ning², YANG Zhen-zhong^{3*}

(1. *University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*;

2. *Peking University First Hospital, Beijing 100034, China*;

3. *Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China*)

Abstract: The benzoic-imine generated from amine and benzaldehyde groups is an interesting dynamic covalent bond. The bond is stable around neutral pH value (~ 7.4) arising from the existence of aromatic ring nest to the carbon-nitrogen double bond, while starts to hydrolyze at very mild acidic pH, e.g. the extracellular pH value of solid tumors (6.5~6.8). The hydrolysis kinetics can be tunable by the acidity of the environmental conditions, which becomes faster at endosome and lysosome pH values (ca. 4.5~6.5). These merits are promising to design and construct physiological pH responsive materials with tunable morphologies including polymeric aggregates, polymer/inorganic nanocomposites, microgels and bulk injectable hydrogels. Many potential applications have been demonstrated for delivery vehicles and/or scaffolds for tissue engineering. In this review, we summarize the recent progresses in the design and synthesis of benzoic-imine dynamic bond contained polymeric systems for biomedical applications.

Key words: Benzoic-imine; pH Responsible; Injectable hydrogel; Drug delivery; Tissue engineering