

叶酸受体介导的载顺铂磁性纳米 pH 敏感药物的制备及性能

陈帅君¹, 张宏征¹, 万良财¹, 江珊珊¹, 许熠铭¹, 刘芳¹, 张涛¹, 马栋², 谢民强^{1*}
(1.南方医科大学珠江医院耳鼻咽喉头颈外科,广东广州 510282; 2.暨南大学生命科学技术学院,广东广州 510632)

摘要:【目的】制备具有叶酸受体靶向、磁靶向及 pH 敏感释放的载顺铂磁性纳米药物(FA-PEG-NH-N=MNPs-CDDP),为进一步研发智能靶向头颈部肿瘤药物载体奠定基础。【方法】采用化学共沉淀法制备醛基化海藻酸钠改性的四氧化三铁纳米粒(MNPs),海藻酸钠表面的羧基通过配位络合作用与顺铂连接,制备的偶联叶酸的双胍基 PEG,其胍基端与海藻酸钠的醛基通过胺键连接包裹载药纳米粒,经纯化获得叶酸修饰的载顺铂磁性纳米 pH 敏感靶向抗癌药物(FA-PEG-NH-N=MNPs-CDDP),采用紫外分光光度计、透射电镜(TEM)、振动样品磁强计(VSM)、激光动态粒径仪等对其理化性状等进行表征,同时采用细胞铁染色、透射电镜和体外实验来评估其细胞靶向性和 pH 敏感释药特征。【结果】该纳米药物顺铂含量为 0.773 mg/mL,铁含量约为 1.908 mg/mL;透射电镜下磁核平均粒径约为(10.2 ± 1.5)nm,激光粒度仪测得平均水动力学直径(176.6 ± 1.1)nm,zeta 电位为(-20.91 ± 1.76)mV,最大饱和磁化强度为(16.3 ± 0.2)emu/g,能被叶酸受体阳性细胞摄取,并在低 pH 值下释放药物。【结论】该磁性纳米药物具有良好的稳定性、叶酸受体靶向性和 pH 敏感释药功能,为肿瘤的药物靶向转运奠定了基础。

关键词:鼻咽癌;叶酸;磁性纳米粒子;靶向治疗;顺铂

中图分类号:R917 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2014)05-0657-10

Preparation and Characterization of pH Sensitive Carried Cisplatin Magnetic Nano Intelligent Targeting Drug Decorated by Folate

CHEN Shuai-jun¹, ZHANG Hong-zheng¹, WAN Liang-cai¹, JIANG Shan-shan¹, XU Yi-ming¹, LIU Fang¹,
ZHANG Tao¹, MA Dong², XIE Min-qiang^{1*}

(Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282;
2. College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract:【Objective】Preparing magnetic nanoparticles loaded cisplatin with folate receptor targeted, magnetic targeting and pH sensitive release character (FA-PEG-NH-N=MNPs-CDDP), which lays the foundation for the further development of intelligent drug carrier targeting head and neck tumor.【Methods】Adopting chemical coprecipitation method to prepare Ferroferric oxide nanoparticles (MNP)modified by aldehyde sodium alginate, coordination complexation of sodium alga acid and Cisplatin on the surface of nano particles is carried on chemotherapeutic drug Cisplatin,meanwhile it prepares out double hydrazino-poly PEG,the carboxyl group of hydrazino-folate on one side of double hydrazino-poly PEG,obtaining folate-hydrazino poly PEG- diazanyl, then folate-hydrazino poly PEG- diazanyl connects the aldehyde group of sodium alga acid on MNP to wrap up drug,making Cisplatin to be hidden within carrier,obtaining PH sensitive carried Cisplatin magnetic nano intelligent targeting drug connecting folate decoration. Finally obtain Cisplatin carried magnetic nano drug targeted by folate receptor (FA-PEG-NH-N=MNPs-CDDP). Using ultraviolet spectrophotometer,transmission electron microscopy,vibrating sample magnetometer and dynamic laserparticle size instrument their physicochemical properties were characterized while the cell targeting and pH sensitive release property were evaluated respectively by cells iron staining, transmission electron microscopy and vitro experiments.【results】The average magnetic nuclei particle size of pH sensitive Cisplatin-carried magnetic nano intelligent targeting drug connecting folate decoration is about (10.2 ± 1.5)nm, the average hydrodynamic diameter detected by laser particle size instrument is (176.6 ± 1.1)nm, Zeta electric potential is (-20.91 ± 1.76)mV,

收稿日期:2014-02-27

基金项目:广东省自然科学基金(S2013010016730)与国家自然科学基金(81372477)联合项目;教育部高等学校博士点基金(20114433110001)

作者简介:陈帅君,博士,主治医师,E-mail:abeautymoon@163.com; * 通信作者:谢民强,教授,E-mail:min_qiang_x@hotmail.com

the content of Cisplatin is $0.773 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, content of iron is about $1.908 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, maximum saturated magnetization intensity is $16.3 \pm 0.2 \text{ emu} \cdot \text{g}^{-1}$. It is can be being uptaked by HNE-1 cells and respanded by lew pH. 【Conclusion】 This drug has drug has excellent stability and magnetic responsiveness ,and releasing drug under low pH value while having pH sensitiveness.

Key words: nasopharyngeal carcinoma; folate ; magnetic nanoparticles; targeted therapy; cisplatin

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2014,35(5):657-666]

顺铂(Cisplatin, CDDP),是目前临床最常用的广谱抗肿瘤药物之一^[1]。据统计,在我国抗癌化疗治疗方案中以顺铂为主或有顺铂参加配伍的占有化疗方案的 70% ~ 80%。但是顺铂存在靶向性低,毒副作用大的缺点,因此临床应用受到了一定的限制。为了减少顺铂的毒副作用同时能够增加其疗效,靶向给药,选择性聚集于肿瘤靶区或进入肿瘤细胞内释药,降低正常组织的药物浓度是目前可行的方法。肿瘤具有快速消耗和增殖的病理特点,使其内部呈弱酸性^[2]。pH-敏感型纳米制剂,正是利用正常组织与病理组织的生理 pH 值的不同,靶向给药于病灶部位,正常情况下配体和受体的结合,不仅能使配体导入到特定的位置,而且它们还能生物所分解,无毒、无免疫原性。如果将磁性纳米粒与肿瘤细胞过度表达的低分子受体的配体(如叶酸^[3]、维生素 B1、糖类)等连接修饰更可实现磁性纳米粒的主动靶向。研究中我们在既往研究基础上,采用酸敏载体和酸敏化学键相结合的方法,同时通过表面修饰叶酸,针对叶酸表达阳性的大部分恶性肿瘤细胞,构建出一种新型具有复合功能的 pH 响应型纳米药物载体,通过高效入胞、靶向给药、pH 响应性释药等相结合的策略,实现真正的细胞内靶向给药。本研究将 pH 敏感特性引入载体,对制备工艺进行优化,并对其基本物理化学性质进行表征,并通过肿瘤细胞的药物摄取实验和体外实验,了解药物的相关靶向性和 pH 感染释药特性。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

海藻酸钠(分子质量约 60 000 u,粘度 2 cps,青岛晶岩生物科技有限公司),聚乙二醇(分子质量 2 000 u,分析纯,上海晶纯试剂有限公司),叶酸(分析纯,广东光华化学厂有限公司),三乙胺(分

析纯,上海晶纯试剂有限公司),对硝基氯甲酸苯酯(萨恩化学技术(上海)有限公司),二环己基碳二亚胺(比利时 Acros 公司),N-羧基琥珀酰亚胺(分析纯,比利时 Acros 公司),水合肼(上海晶纯试剂有限公司),CDDP(山东齐鲁制药厂,208019CF)]。

1.2 主要仪器和设备

透射电子显微镜(JEOL 公司,日本),Zeta potential analyzer(Brook Haven 公司,美国),MPMS XL-7 振动样品磁强计(Quantum Design 公司,美国),Alpha 1-2LD 真空冷冻干燥机(Matrin Christ 公司,德国),DZF-6201 型真空干燥箱(上海一恒科技有限公司,中国),THZ-100 恒温培养摇床(上海一恒科技有限公司,中国),UVIKON923 紫外-可见光分光光度计(BIO-TEK 公司,美国)等。

1.3 叶酸修饰的双胍基 PEG 的制备

根据文献[4]报道聚 PEG 引入胍基的方法,将已干燥好的 PEG 20 g 溶于 60 mL 无水二氯甲烷中,然后在冰水浴条件下逐滴加入含 6.05 g 对硝基氯甲酸苯酯的无水二氯甲烷溶液 40 mL 和 12.5 mL 的无水三乙胺混合液,PEG、对硝基氯甲酸苯酯、三乙胺的摩尔比为 1:3:9。体系在避光条件下反应 12 h 后旋蒸除去大部分二氯甲烷溶剂,加入无水乙醚沉淀。将沉淀物真空干燥,即得对硝基氯甲酸苯酯活化的 PEG。将上述产物溶于 100 mL 二氯甲烷中,然后滴加 29.1 mL 的水和胍溶液,PEG 与胍的摩尔比为 1:30。室温条件下反应后,旋蒸除去大部分二氯甲烷溶剂,加入无水乙醚沉淀。将沉淀物真空干燥,即得胍修饰的 PEG。按我们之前报道的方法^[5]制备 FA-PEG-NHNH₂, 0.88 g 叶酸(FA)溶于 30 mL 无水二甲基亚砜(DMSO)中,室温、搅拌条件下加入二环己基碳二亚胺(DCC)0.84 g 及 N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)0.44 g,搅拌反应 4 h。然后加入双胍聚乙二醇[PEG2000 (NHNH₂)₂]4 g,继续搅拌反应 8 h。反应结束后加入双蒸水 120 mL,过滤除去不溶物后,产

物冷冻干燥。

1.4 载顺铂醛基化海藻酸钠改性 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒的制备

首先按 Laurienzoa 等^[6]报道的方法略加改良制备醛基化海藻酸钠 (aldehyde sodium alginate, ASA) 备用, 然后按照既往我们采用的共沉淀法^[7]制备出醛基化海藻酸钠改性 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒。按照我们以前报道的方法^[8], 将 CDDP 与上述载体连接, 制备出载顺铂醛基化海藻酸钠改性磁性纳米颗粒, 产物在蒸馏水中透析 3 d (截留分子量 14 000 u) 以除去游离的 CDDP。

1.5 叶酸脒基 PEG 修饰的载顺铂醛基化海藻酸钠改性磁性纳米颗粒的制备

取 0.3 g FA-PEG-NHNH₂, 溶解于 10 mL 双蒸水中, 然后再缓慢滴入含 0.5 g 醛基化海藻酸钠改性的载顺铂磁性纳米粒子的 30 mL 磁性液体, 根据文献^[9]中脒键形成条件, 采用酸性条件, 以冰乙酸调节 pH 至 5。氮气保护条件下将反应液室温搅拌 48 h, 然后在蒸馏水中透析 3 d (截留分子量 5 000 ~ 14 000 u), 然后冷冻干燥。

1.6 磁核粒径、形状及分散度测定

制样方法为将 FA-PEG-NH-N=MNPs-CDDP 稀释至一定浓度, 然后滴在衬有高分子膜的铜网上成膜, 缓慢干燥后于样品上蒸镀一层约 10 ~ 20 nm 厚的碳膜, 透射电镜 (JEOL-TEM 100) 观察并摄片。

1.7 饱和磁化强度的测定和磁响应性评定

25 °C 条件下, -10 KOe~10 KOe 范围内扫描样品的磁滞曲线。分别取两个 5 mL 离心管, 取叶酸修饰的载顺铂磁性纳米药物 FA-PEG-NH-N=MNPs-CDDP 8 mL, 分装到两个离心管中, 每管 4 mL, 其中一个放置到恒定磁场中, 2 h 后观察磁性粒子分布情况。

1.8 流体力学直径与 Zeta 电位的测定

高分辨 Zeta 电位及激光粒度分析仪 (Zeta PALS Brook Haven Instruments Co.USA) 上进行, 测试之前将 ASA-MNPs、CDDP-MNPs、FA-PEG-NH-N=MNPs-CDDP 稀释到一定浓度 (Fe 含量均为 0.02 mg/mL)。测试参数为: 散射角 90°, 温度 25 °C, 测试数遍取平均值。重点考察制备过程纳米粒径变化。

1.9 纳米粒稳定性考察

将载药纳米粒密封存放于 4 °C 冰箱下静置 2 个月, 考察其形态, 载药量的变化。

1.10 铁含量和载药量测定

采用邻二氮菲法^[10]测定产物中铁含量, 采用邻苯二胺 (o-pHenylenediamine, OPDA) 比色法测定 FA-PEG-NH-N=MNPs-CDDP 中顺铂的含量^[11]。

1.11 铁染色观察细胞的靶向性

铁染色其原理是 Fe^{3+} 在酸性条件下与亚铁氰化钾 [$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$] 通过普鲁士蓝反应生成蓝色的亚铁氰化铁沉淀, 定位于含铁的部位, 可反映组织细胞内摄取的氧化铁纳米粒子的情况。实验步骤: 取生长状态良好的鼻咽癌细胞 CNE-2 [FR (-)] 和 HNE-1 [FR (+)], 消化离心后用的 RPMI-1640 全培养基制成单细胞悬液, 调整细胞浓度至 2×10^4 个/mL 接种于 24 孔板内, 每孔体积 500 μL , 其中 HNE-1 用无叶酸 RPMI-1640 全培养基; 贴壁生长 24 h 后吸弃所有孔内的培养基, 分别加入以无叶酸 RPMI-1640 稀释的 FA-CDDP-FA-PEG-NH-N=MNPs-CDDP、MNPs 共培养 6 h, 药物浓度按 Fe 含量计依次为 5, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 吸弃全部培养液体, PBS 液充分洗涤去除未被摄取的药物粒子; 40 g/L 多聚甲醛溶液室温下固定 10 min, 双蒸水充分洗涤, 加入普鲁士蓝液染色, 室温避光作用 30 min; 双蒸水洗涤后加入中性红作核对比染色, 倒置显微镜观察并摄片。

1.12 透射电镜观察细胞靶向性

将 HNE-1 细胞分别与 MNPs、FA-PEG-NH-N=MNPs-CDDP 共培养后通过透射电镜观察细胞摄取纳米药物的情况。实验步骤: 取生长状态良好的 HNE-1 细胞, 消化离心后用无叶酸 RPMI-1640 全培养基制成单细胞悬液, 调整细胞浓度至 5×10^4 个/mL 接种于 6 孔板内, 每孔体积 2 mL; 贴壁生长 24 h 后, 吸弃所有孔内的培养基, 分别加入以 RPMI-1640 稀释的 FA-PEG-NH-N=MNPs-CDDP、MNPs 和不含药物的培养基共培养 6h, 药物浓度按 Fe 含量计为 5、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 其中实验组 FA-PEG-NH-N=MNPs-CDDPs 药物以无叶酸 RPMI-1640 全培养基稀释; 吸弃全部培养液体, PBS 液充分洗涤去除未被摄取的药物粒子; 各孔内加入胰蛋白酶消化后轻柔吹打成单细胞悬液, 1

500 r/min ($r=13.5$ cm) 离心 5 min 后弃去上清液, 小心收集沉淀的细胞块, 加入 25 mL/L 戊二醛在 4 °C 下固定; 低速离心弃去固定液后再用 10 mL/L 锇酸固定, 梯度丙酮脱水, 环氧树脂包埋。常规超薄切片, 醋酸双氧铀及枸橼酸铅染色通过透射电镜观察细胞摄取纳米粒子的情况。

1.13 MTS 法检测 FA-PEG-NH-N=MNPs-CDDP 的细胞毒性

实验步骤: ①接种细胞: 将处于对数生长期的 HNE-1 细胞用胰酶消化后, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基配成单细胞悬液 (其中实验组 FA-PEG-NH-N=H-MNPs-CDDP (pH=6.5) 组和实验组 (pH=7.4) 以无叶酸的 RPMI-1640 全培养基配制单细胞悬液), 以每孔 3×10^4 /mL 密度接种于 96 孔细胞培养板, 每孔体积为 200 μ L, 在 37 °C, 体积分数为 5% CO₂ 的饱和水汽二氧化碳培养箱培养过夜。②每块培养板设实验孔、对照孔及调零孔。实验孔分为单纯 CDDP 治疗组、FA-PEG-NH-N=MNPs-CDDPs 实验组 (pH=6.5) 组、实验组 (pH=7.4) 组和 MNPs 组; 每个治疗组按照培养体系中 COOP 最终含量设置 0.25、0.5、1、2、4、8 μ g/mL 共 6 个梯度浓度 (其中 MNPs 组按铁浓度分阶梯浓度), 每个浓度设 3 个复孔; 待细胞贴壁培养 24 h 后吸弃原培养基, 每孔加入 200 μ L 药液 (其中实验组 (pH=6.5)、实验组 (pH=7.4) 组药物以无叶酸 RPMI-1640 全培养基稀释, 余均以 RPMI-1640 全培养基配制)。对照孔只加培养基 (细胞悬液)、不加药液, 调零孔不含细胞仅含培养基。③加药完毕后将各培养板置于细胞培养箱内, 设置两个作用时间分别培养 24 和 48 h; ④实验终点前每孔加 20 μ L MTS/PMS 混合液培养 3 ~ 4 h 显色。检测前摇晃培养板 10 s 钟混匀颜色。在酶联检测仪上波长 490 nm 处检测。⑤计算不同浓度药物作用 24、48 h 对 HEN-1 细胞生长的抑制率: 抑制率 = (对照组调零后 A_{490} - 实验组调零后 A_{490}) / 对照组调零后 A_{490} 。

1.14 统计学分析

数据分析和统计学处理: 数据以均数 \pm 标准差表示 ($\bar{x} \pm s$), 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。采用析因分析, 如果各组之间均有统计学意义, 在多组均数比较在方差齐性检验之后比, 较采

用单因素方差分析, 满足方差齐性时采用 LSD 法和 SNK 法进行多重比较, 不满足方差齐性时进行 Dunnett's 法, $P < 0.05$ 为有统计学意义。计量资料以均数 \pm 标准差表示, 采用 SPSS 13.0 软件包对实验数据进行统计分析。药物的稳定性分析采用配对样本的 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 产物的确证

紫外可见吸收光谱 (图 1): PEG (NHNH₂)₂ 基本无吸收峰, 叶酸在 280 nm 处有吸收峰, 而 FA-NH₂NH-PEG-NHNH₂ 在 310 nm 处可见共轭吸收峰, 可见叶酸是被连接到 PEG (NHNH₂)₂ 上的。而两个批次的吸收曲线是相同的, 代表同一个方法合成出来的样品结果相同, 提示了此方法的可行性。有关 FA-PEG-NH-N=MNPs-CDDP 的紫外图谱中, 吸收曲线显示较乱, 考虑由于磁性纳米呈黑色, 在 200 ~ 300 nm 较多干扰导致。

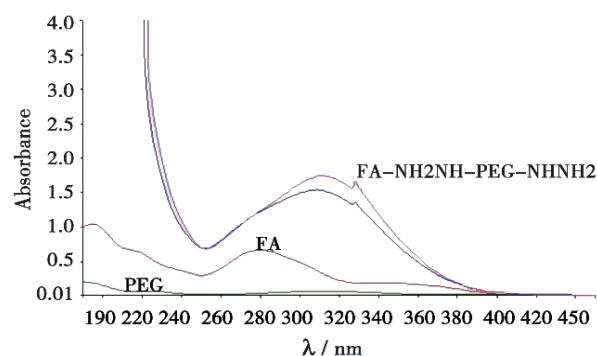


图 1 紫外可见吸收光

Fig.1 uv-vis absorption of light

2.2 载体药物中顺铂和铁含量的测定

采用邻苯二胺法测定顺铂含量, 其标准曲线如图 2 所示, 回归方程为 $\hat{y}=0.0956x+0.0805$, $R^2=0.9901$, 计算得到顺铂含量为 0.773 mg/mL。邻二氮菲法测定铁含量, 其标准曲线如图 3 所示, 回归方程为: $\hat{y}=0.1963x+0.0053$, $R^2=0.9992$, 根据标准曲线计算出纳米药物中铁含量为 1.908 mg/mL。

2.3 磁性纳米药物的形态结构

取叶酸修饰的载顺铂磁性纳米 pH 敏感靶向

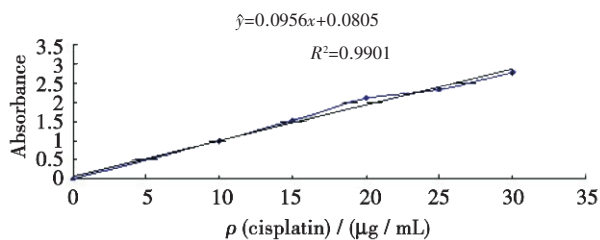


图 2 顺铂含量标准曲线
Fig.2 The standard curve of cisplatin

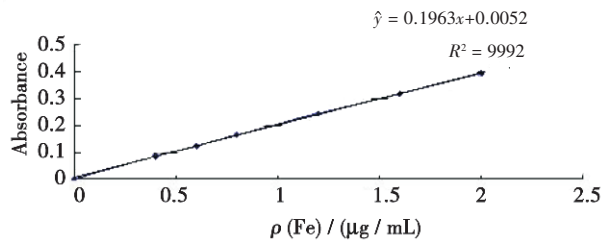


图 3 铁含量标准曲线
Fig.3 The standard curve of iron

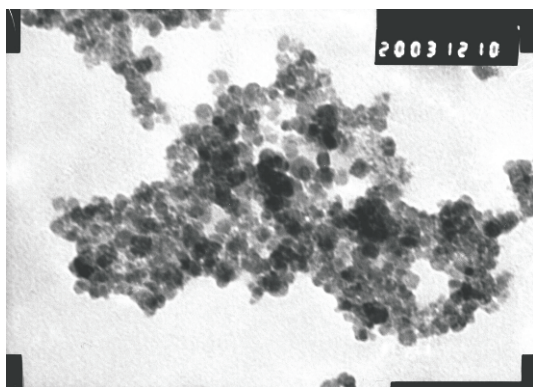


图 4 载顺铂磁性纳米药物
Fig.4 The magnetic nanomedicine loaded cisplatin
 2×10^4 times

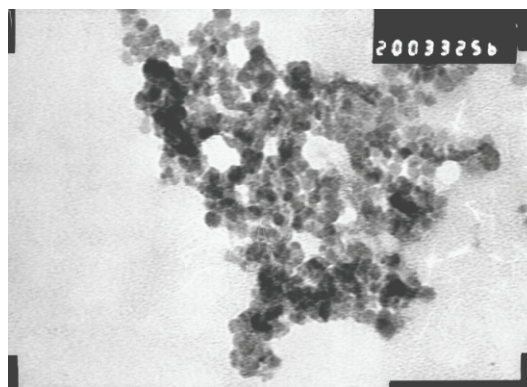


图 5 FA-PEG-NH-N=MNPs-CDDP
Fig.5 FA-PEG-NH-N=MNPs-CDDP
 2×10^4 times

药物冻干粉末,肉眼观察,药物粉末状,外观饱满,呈黑色,色泽均匀。另取该药物粉剂,加双蒸水分散,经超声后为均匀的黑色胶体溶液,药物再分散性良好。透射电镜下观察制备出的叶酸修饰的载顺铂磁性纳米 pH 敏感靶向药物形态如图 4、5

所示,透射电镜下,见两者均呈球形分散分布,平均粒径约为 (10.2 ± 1.5) nm。

2.4 饱和磁化强度

制备出的叶酸修饰的载顺铂磁性纳米 pH 敏感靶向药物最大饱和强度为 (16.3 ± 0.2) emu/g,矫

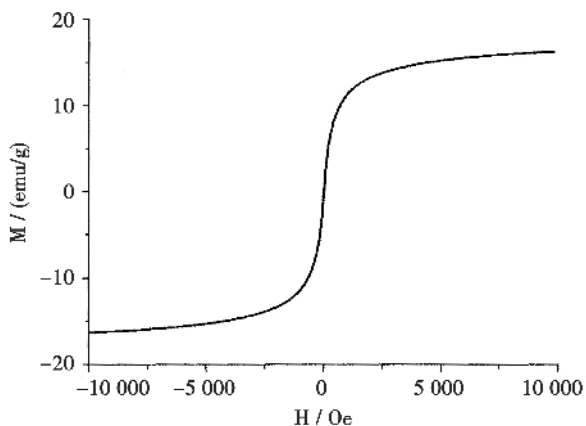


图 6 FA-PEG-NH-N=MNPs-CDDP 磁滞曲线
Fig.6 The hysteresis curve of FA-PEG-NH-N=MNPs-CDDP

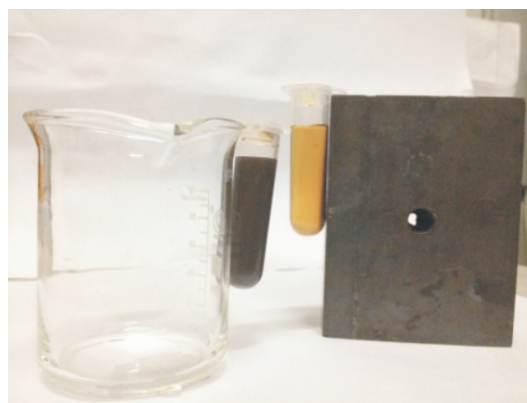


图 7 FA-PEG-NH-N=MNPs-CDDP 的磁性
Fig.7 The magnetism of FA-PEG-NH-N=MNPs-CDDP

顽力为 0(图 6),结果示该磁性纳米药物具有良好的超顺磁性和磁响应性。

两支装有叶酸修饰的载顺铂磁性纳米 pH 敏感靶向药物的离心管中,在磁场的作用下可见到磁性纳米粒子集中吸附到靠磁场的管壁上,离心管中液体呈透明,略带褐色,但时间越长,液体透明度越高,未放置磁场的离心管中磁性纳米粒子仍为均匀分散液体,液体呈黑色。但在磁场作用下聚集到靠磁场的管壁的纳米粒子,在去除磁场后可见磁性纳米粒子迅速分散,并在 5 s 之内可见液体变黑,如同放置磁场前。结果显示该磁性纳米药物具有很好的磁场响应性和超顺磁性(图 7)。

2.5 粒径和 Zeta 电位

通过激光粒度仪测定 FA-PEG-NH-N=MNPs-CDDP 的动态光散射粒径,制备过程产物 ASA-MNPs、CDDP-MNPs 作为对照。结果显示 FA-PEG-NH-N=MNPs-CDDP 平均水动力学直径和 Zeta 电位分别为 (176.6 ± 1.1) nm 和 (-20.91 ± 1.76) mV, 醛基化海藻酸钠磁性纳米粒子 (ASA-MNPs) 为 (198.9 ± 3.4) nm 和 (-29.04 ± 2.17) mV, 而载顺铂磁性纳米药物 (CDDP-MNPs) 为 (153.4 ± 1.8) nm 和 (-25.08 ± 0.96) mV, 均呈正态对数分布。

2.6 稳定性

叶酸修饰的载顺铂磁性纳米 pH 敏感靶向药物自冰箱里取出后可见瓶底有部分沉淀,跟浓度有关,浓度较大的沉淀多些。经超声后见沉淀完全消失,均匀分散于液体中。叶酸修饰的载顺铂磁性纳米 pH 敏感靶向药物液中顺铂含量仍保持在最初的水平,与 2 个月之前相比载药量无明显变化 ($P > 0.05$),具有较高的稳定性(表 1)。

表 1 FA-PEG-NH-N=MNPs-CDDP 稳定性

Table 1 The stability of FA-PEG-NH-N=MNPs-CDDP

	$(\bar{x} \pm s, \text{mg/mL})$			
	First	Second	t value	P value
Cisplatin	0.191 ± 0.010	0.190 ± 0.002	0.234	0.826
Fe	0.366 ± 0.008	0.376 ± 0.013	-0.906	0.416

2.7 普鲁士兰染色结果

不同浓度的实验组 PEG-NH-N=MNPs-CDDP 和 MNPs 药物分别同 CNE-2 和 HNE-1 两种细胞

共培养 6 h 后染色,其中 HNE-1 细胞表面表达叶酸受体阳性,而 CNE-2 细胞表面叶酸受体表达阴性,结果显示,在上述四种共培养方式中,只有 FA-PEG-NH-N=MNPs-CDDP 与 HNE-1 细胞共培养后,可见细胞出现蓝染,散在分布(图 8)。

2.8 透射电镜结果

在透射电镜下,FA-PEG-NH-N=MNPs-CDDP 与 HNE-1 细胞后共培养 6 h 后可见 HNE-1 细胞内黑色高密度颗粒,高密度影位于吞饮泡内,并可见细胞膜表面伸出的伪足摄取纳米颗粒的现象,是同一个镜下放大不同倍数,而在正常细胞内无法见到该现象,而在 MNPs 与 HNE-1 细胞共培养 6 h 后 HNE-1 细胞内也未见上述高密度颗粒现象(图 9~11)。

2.9 细胞增殖(MTS)检测

单纯顺铂组、实验组(pH 6.5)和实验组(pH 7.4)组细胞抑制率明显不同。用药后不同时间具有显著性差异($F=11325.296, P=0.000$)。如图 12、13 所示,无论 FA-PEG-NH-N=MNPs-CDDP 在 pH 7.4 和 6.5,还是 CDDP 与 HNE-1 细胞共培养 24、48 h 后,均表现出对 HNE-1 细胞的抑制,并随着药物浓度的升高和作用时间的增加,抑制率也呈现出升高的趋势($P < 0.05$),统计学差异性显著。上述结果显示存活率浓度和时间依赖性。而醛基化海藻酸钠磁性纳米(ASA-MNPs)空白载体对 HNE-1 细胞的增值影响很小,基本可以忽略不计,统计学上没有差异性。在培养 24 h 时,图 12 所示对比实验 pH6.5 组和 pH7.4 组对细胞的抑制率均小于单纯顺铂,而 pH6.5 组抑制率大于 pH7.4 组。而在培养 48 h 后,实验 pH7.4 和 pH6.5 组药物引起的抑制率趋于接近,但统计学上仍有显著差异性(图 13)。

3 讨论

顺铂是目前国际公认的头颈部肿瘤化疗最有效的抗肿瘤药物之一。但顺铂存在较多问题,例如血液循环停留时间过短,易与血浆蛋白形成不可逆结合、易发生水解而转化成毒性很大的抗癌活性消失的反式顺铂、毒性大、易耐药等。

我们使用载体连接顺铂,并包裹保护材料,克

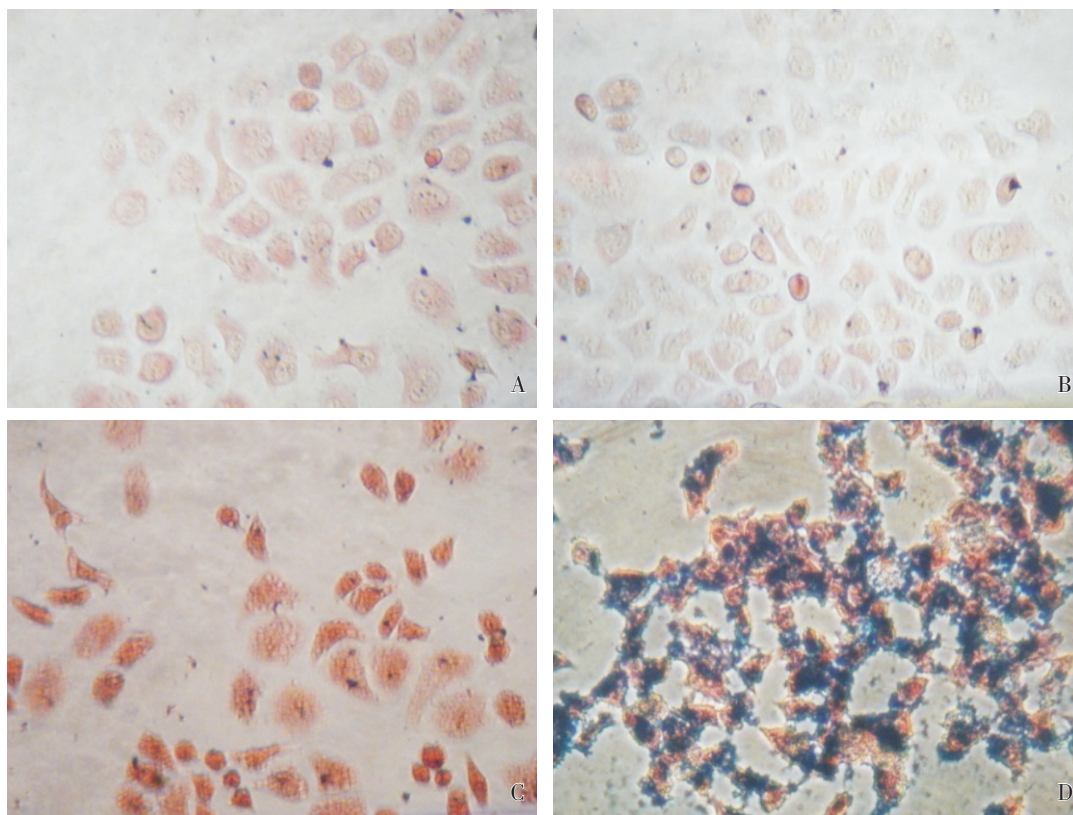


图 8 普鲁士兰染色

Fig.8 The prussion blue

A: The prussian blue staining in CNE - 2 cells treated by MNPs; B: The prussian blue staining in CNE - 2 cells treated by FA-MNP-CDDP; C: The prussian blue staining in HNE-1 cells treated by MNPs; D: The prussian blue staining in HNE-1 cells treated by FA-MNP-CDDP. 200 ×

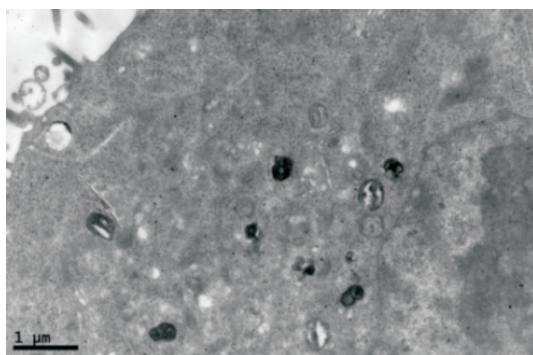


图 9 HNE-1 未加药物处理透射电镜图(5 800 ×)

Fig.9 The TEM figure of HNE-1 cells without medication (5 800 ×)

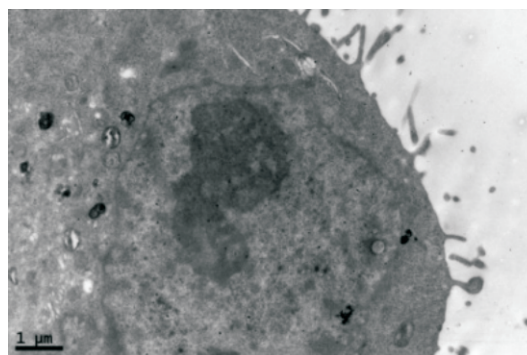


图 10 MNPs 处理 HNE-1 细胞透射电镜图(5 800 ×)

Fig.10 The TEM figure of HNE-1 cells treated by MNPs (5 800 ×)

服上述问题提高治疗效果。本实验制备出了叶酸修饰的载顺铂磁性纳米 pH 敏感靶向药物。我们对叶酸修饰的载顺铂磁性纳米药物进行了各项表征:叶酸修饰的 pH 敏感载顺铂磁性纳米药物冻干

粉末,肉眼观察,药物粉末状,外观饱满,呈黑色,色泽均匀。该药物粉剂,加双蒸水分散,经超声后为均匀的黑色胶体溶液,药物再分散性良好。TEM 下观察显示这种纳米药物颗粒均匀、形态规则,磁

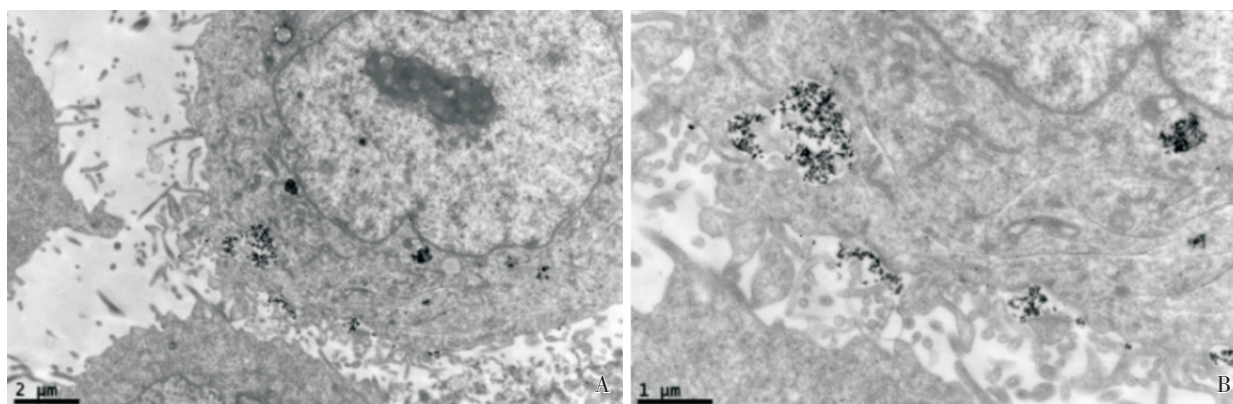


图 11 HNE-1 细胞透射电镜图

Fig.11 The TEM figure of HNE-1 cells

A: The TEM figure of HNE-1 cells treated by FA-PEG-NH-N=MNPs-CDDP (5 800 ×); B: The TEM figure of HNE-1 cells treated by FA-PEG-NH-N=MNPs-CDDP (13 500 ×)

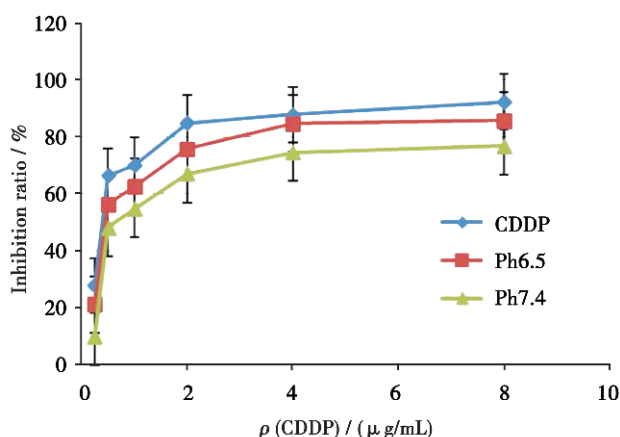


图 12 不同浓度 CDDP 处理 HNE-1 细胞 24 h 的抑制率
Fig.12 The inhibition rate of HNE-1 cells treated by different concentrations CDDP in 24 hours

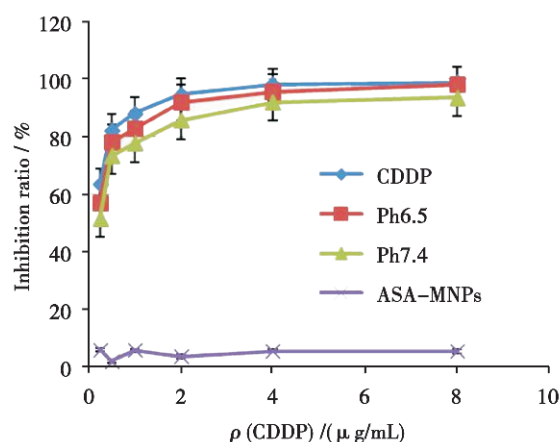


图 13 不同浓度 CDDP 处理 HNE-1 细胞 48 h 的抑制率
Fig.13 The inhibition rate of HNE-1 cells treated by different concentrations CDDP in 48 hours

核平均粒径为 (10.2 ± 1.5) nm; DLS 显示水动力学粒径为 (176 ± 1.1) nm, 符合主动靶向纳米药物的应用要求。其 zeta 电位为 (-20.22 ± 1.36) mV, 该指标提示其稳定性好, 常温下静置连续观察 2 个月未发现药物絮凝或明显沉降, 载药量和含铁量基本变化不大, 性质稳定。在恒定磁场的作用下磁性纳米粒子能很好地吸附到靠磁场的管壁上, 撤去磁场并能重新均匀分散, 具有很好的磁性和超顺磁性, 磁化曲线测定其饱和磁化强度为 (16.3 ± 0.2) emu/g, 剩磁为 0, 结果也显示该药物具有相对较好的磁响应性和超顺磁性。经检测顺铂载药量

为 0.773 mg/mL, 铁含量可达 1.908 mg/mL, 基本能满足我们后续体外和体内实验对药物浓度的要求。另该药物还可通过超滤将水分子滤除, 达到浓缩该药物的目的。

激光粒度仪测得叶酸修饰的载顺铂磁性纳米 pH 敏感靶向药物的动态光散射粒径为 (176.6 ± 1.1) nm, zeta 电位为 (-20.91 ± 1.76) mV, 相比透射电镜粒径 (10.2 ± 1.5) nm, 动态光散射测试得到的纳米粒子的粒子尺寸粒径比透射电镜结果要大。这事由两方面的原因造成的: 第一, 动态光散射对大的粒子比较敏感, 因此测出的粒子的粒径偏大;

第二,因为在制备透射电镜样品时,纳米聚合物粒子由于溶剂的挥发,会有一些的塌陷,而动态光散射测试的是稀溶液状态的纳米复合物流体体积,纳米聚合物出于重分的舒展状态^[12-13]。经激光粒度仪测定 FA-PEG-NH₂N=H-CHO-MNPs-CDDP 的动态光散射粒径结果显示,平均水动力学直径为(176.6 ± 1.1)nm,醛基化海藻酸钠磁性纳米粒子(ASA-MNPs)为(198.9 ± 3.4)nm,而载顺铂磁性纳米药物(CDDP-MNPs)为(153.4 ± 1.8)nm,三者分别是最终产物和制备过程中的产物。CDDP-MNPs 粒径明显小于 ASA-MNPs,可能是 CDDP 与醛基化海藻酸钠表面羧基络合后,伸展的线性分子被圈绕,使得连接 CDDP 后水动力学直径反而比载体小,而叶酸修饰的载顺铂磁性纳米 pH 敏感靶向药物是在 CDDP-MNPs 基础上外面包裹 FA-PEG-NHNH₂ 而形成的,所以粒径再次变大,但仍小于 ASA-MNPs。在 zeta 电位测定结果发现,在中性条件水介质中,叶酸修饰的载顺铂磁性纳米 pH 敏感靶向药物纳米粒子的 zeta 电位为(-20.91 ± 1.76)mV,颗粒之间因带负电相互排斥,表明胶体稳定性好,但比醛基化海藻酸钠磁性纳米粒 ASA-MNPs[(-29.04 ± 2.17)mV]和载顺铂磁性纳米药物 CDDP-MNPs[(-25.08 ± 0.96)mV]的负电位低,可能系 CDDP 结合掉部分羧基后,负电荷减小,外层包裹了 FA-PEG-NHNH₂ 进一步结合掉一部分醛基,负电荷进一步减少,提示我们制备的叶酸修饰的载顺铂磁性纳米 pH 敏感靶向药物,稳定性虽然较 FA-PEG-NHNH₂ 包裹前 CDDP-MNPs 的差,但稳定性尚好,可保持较长时间不聚集。

为了研究我们制备出的药物在细胞内的分布及与细胞相互作用的方式,我们专门设计了体外细胞摄取实验,期望能够了解磁性纳米粒子在细胞内的分布。在体外细胞摄取实验中,结果显示,只有 FA-PEG-NH-N=MNPs-CDDP 与 HNE-1 细胞共培养后,可见细胞出现蓝染,散在分布。其余三种培养方式均未看到上述所谓蓝染现象,由于蓝染的出现是由于三价铁在酸性条件下与亚铁氰化钾通过普鲁士蓝形成的蓝色亚铁氰化铁沉淀,所以可以推断只有 FA-PEG-NH-N=MNPs-CDDP 与 HNE-1 细胞共培养后纳米粒子进入了 HNE-1 细胞,而且进入的方式是由叶酸-叶酸受体介导的

胞吞作用介导的。透射电镜观察细胞摄取的实验结果跟铁染色也是一致的,叶酸修饰的载顺铂磁性纳米 pH 敏感靶向药物与 HNE-1 细胞培养 6 h 后可见 HNE-1 细胞内见到较多高电子密度的纳米药物粒子,粒径与前述制备后基本相同。而单纯 MNPs 与 HNE-1 培养 6 h 后与正常细胞中则均未见上述现象。

因此,通过铁染色和透射电镜实验验证了我们之前的设想,即我们制备出的叶酸修饰的载顺铂磁性纳米 pH 敏感靶向药物能够通过 HNE-1 表面高表达的叶酸受体的介导进入细胞。进入细胞才可以在细胞内低 pH 值下进一步释放药物,从而实现分子靶向性和 pH 敏感释药特性。

pH 敏感药物释放系统已经被证明对癌症治疗具有很好的疗效。该载药磁纳米粒在 pH = 7.4 环境中基本不释放,将能够极大地降低药物对正常组织的副作用。在磁靶向的作用下到达肿瘤组织后进入细胞后,内涵体的 pH 值为 4.5 ~ 6.5,药物会加速释放,从而提高治疗效果。由于胍基 PEG 与醛基化海藻酸钠之间形成的胍键的作用,低 pH 的酸性条件下胍键水解,叶酸胍基 PEG 从纳米粒子上脱落,暴露顺铂,由于顺铂与海藻酸钠通过配位络合作用结合,在顺铂与细胞中 DNA 结合后反应平衡打破后,顺铂自海藻酸钠表面脱离而引起药物释放。而在血液循环时和正常组织时 pH 值为 7.4 左右时,胍键稳定不利于包裹的药物释放。

本研究采用叶酸修饰的载顺铂磁性纳米 pH 敏感靶向药物对鼻咽癌细胞 HNE-1 进行体外抑制试验,经过 MTS 检测结果发现无论叶酸修饰的载顺铂磁性纳米 pH 敏感靶向药物还是单纯顺铂,HNE-1 细胞生长均不同程度受到抑制,并有随药物剂量增加,抑制率增高趋势,呈现明显的剂量依赖性。每种药物抑制率均随时间的延长而增加,呈现出明显的时间依赖性。作用 24 h 后,单纯顺铂药物组抑制率明显高于叶酸修饰的载顺铂磁性纳米 pH 敏感靶向药物实验组(包括 pH=6.5 和 7.4 两组),而实验组 pH=6.5 组抑制率则大于 pH=7.4 组,则上述结果则提示实验组(包括 pH=6.5 和 7.4 两组)药物均具有缓释作用,药物与肿瘤细胞表面的叶酸受体结合后需要一定的时间才能解离出来,这种缓释作用使载体所含药物没有释放出来,

作用于细胞的顺铂药物浓度达不到单纯顺铂药物组的浓度,因此抑制率均低于单纯顺铂药物组。而实验组 pH=6.5 组抑制率则大于 pH=7.4 组现象则提示了叶酸修饰的载顺铂磁性纳米 pH 敏感靶向药物在 pH=6.5 时有顺铂释放较 pH=7.4 组多,进一步证实了该药物在低 pH 值 6.5 时,腺键水解,具有 pH 敏感的特性。而在 48 h 后,单纯顺铂药物组抑制率与叶酸修饰的载顺铂磁性纳米 pH 敏感靶向药物实验组(包括 pH=6.5 和 7.4 两组)接近,其原因可能是随着时间延长,载体组的药物虽然 pH 值有高有低,但在叶酸受体胞吞作用之后,在吞饮泡内都是较低的 pH 值,甚至有的已经遇到 pH 值更低的溶酶体,药物大部分释放,真正与细胞内 DNA 结合而抑制 DNA 的复制的顺铂基本接近,因此三者的差别减小,从而出现了抑制率接近的现象。而同样浓度的空白磁性纳米载体 MNPs 无论作用 24 h 还是 48 h 对 HNE-1 细胞的生长均无影响,提示磁性纳米载体本身无细胞毒性。

该叶酸受体分子靶向的载顺铂磁性纳米药物具有良好的稳定性、磁响应性和超顺磁性,并能在低 pH 值下腺键断裂,暴露药物进而释放药物,为恶性肿瘤尤其是鼻咽癌的靶向治疗奠定了基础。

参考文献

- [1] Kuang Y, Liu J, Liu Z, et al. Cholesterol-based anionic long-circulating cisplatin liposomes with reduced renal toxicity[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(5): 1596-1606.
- [2] Yu S, Wu G, Gu X, Wang J, et al. Magnetic and pH-sensitive nanoparticles for antitumor drug delivery [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2013, 103(9): 15-22.
- [3] Kolhatkar R, Lote A, Khambati H. Active tumor targeting of nanomaterials using folic acid, transferrin and integrin receptors [J]. *Curr Drug Discov Technol*, 2011, 8(3): 197-206.
- [4] Hu X, Liu S, Huang Y, et al. Biodegradable block copolymer-doxorubicin conjugates via different linkages: preparation, characterization, and in vitro evaluation [J]. *Biomacromolecules*, 2010, 11(8): 2094-2102.
- [5] Ohguchi Y, Kawano K, Hattori Y, et al. Selective delivery of folate-PEG-linked, nanoemulsion-loaded aclacinomycin A to KB nasopharyngeal cells and xenograft: effect of chain length and amount of folate-PEG linker[J]. *J Drug Target*, 2008, 16(9): 660-667.
- [6] Lanrienza P, Malinconico M, Motta A, et al. Synthesis and characterization of a novel alginate-poly(ethylene glycol) graft copolymer [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2005, 62(3): 274-282.
- [7] 刘洁, 谢民强, 张涛, 等. 叶酸分子靶向载顺铂磁性纳米药物制备及表征[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(25): 4631-4637.
Liu J, Xie MJ, Zhang T, et al. The preparation and characterization of cisplatin magnetic nanomedicine targeted by folic acid molecular [J]. *China Tissue Engineering Res Clin Rehabil*, 2011, 15(25): 4631-4637.
- [8] Xie M, Chen S, Xu X, et al. Preparation of two kinds of superparamagnetic carriers supported cisplatin complexes and the comparison of their characteristics [J]. *Chin Sci Bull*, 2006, 51(2): 151-157.
- [9] Nguyen R, Huc I. Optimizing the reversibility of hydranzone formation for dynamic combinatorial chemistry[J]. *Chem Commun*, 2003, 9(8): 942-943.
- [10] 邱小香. 分光光度法测定水中全铁的含量[J]. *西南民族大学学报:自然科学版*, 2011, 37(1): 111-113.
Qiu XX. Spectrophotometry determination of total iron content in water [J]. *J Southwest Univ National(Nat Sci Ed)*, 2011, 01(9): 111-113.
- [11] Dody A, Bilha S, Ruth A. Functional polymers in drug delivery: carrier-supported CDDP (cis-platin) complexes of polycarboxylates-effect on human ovarian carcinoma[J]. *Reactive & Functional Polymers*, 1998, 36(9): 59-69.
- [12] Azzam T, Eisenberg A. Control of vesicular morphologies through hydrophobic block length [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2006, 45(44): 7443-7447.
- [13] 江明, 艾森伯格, 刘国军, 等. 大分子自组装[M]. 北京: 科技出版社, 2006.
Jiang M, Eisenberg A, Liu GJ, et al. *Macromolecular self-assembly* [M]. Beijing: Science Press, 2006.

(编辑 徐杰)