

【基础研究】

通信作者:丁波(1964-),男,河南南阳人,学士,主任医师,研究方向:肿瘤综合治疗;E-mail:982473340@qq.com

higher than that in the blank control group ($P < 0.01$). There was no significant difference in apoptotic index between the control group and the PNPs group ($P > 0.05$); the apoptotic index in the DTX group and DTX/PNPs group was higher than that in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Covalently self-assembled DTX/PNPs nanoparticles can not only enhance the ability to enter cells under the action of receptors, but also can quickly respond to the acidic environment in tumor cells. These can achieve the purpose of efficient drug delivery with good pH sensitivity and *in vitro* antitumor effect.

Key words: phenylboronic acid; docetaxel; acid sensitivity; antitumor effect

多西紫杉醇(docetaxel, DTX)是临床上常用的化学治疗药物,DTX作为一种小分子药物,由于半衰期短,缺乏肿瘤靶向性,限制了其在临床中的应用^[1-2]。苯硼酸(phenylboronic acid, PBA)能够与1,2-或1,3-二羟基化合物(如糖类、儿茶酚等)形成苯硼酸酯键^[3-5]。唾液酸(sialic acid, SA)是分布在细胞膜表面糖基最末端的单糖,在多种肿瘤细胞表面高表达^[6-7]。含有PBA结构的纳米粒能够与肿瘤细胞表面高表达的SA相结合,并通过受体介导进入肿瘤细胞。当纳米粒进入细胞后,能够快速释放药物,这对化学治疗药物发挥抗肿瘤作用至关重要^[3,8-9]。肿瘤微环境响应性药物释放已经被广泛应用于纳米药物递送系统,且已达到增强疗效、降低毒副作用的目的^[10]。苯硼酸酯在中性或碱性环境中相对稳定,在酸性环境中发生裂解,能够对肿瘤部位的弱酸性环境产生快速响应^[11-12]。DTX/苯硼酸酯纳米粒(phenylboronic acid-based self-assembly nanoparticles, PNPs)可以通过受体介导,增强其进入细胞的能力,并快速响应肿瘤细胞内的酸性环境,从而达到高效递送药物、增强DTX抗肿瘤效果的目的。本研究将DTX装载于共价自组装PNPs中,制备DTX/PNPs系统,并探讨其体外抗肿瘤活性。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂与仪器 人肝癌 HepG2 细胞(中国科学院细胞库);DTX(大连美仑生物技术有限公司),对苯二胺和3,4-二羟基苯甲醛(阿拉丁生化科技股份有限公司),4-甲酰基苯硼酸(山东西亚化学工业有限公司),泊洛沙姆188(德国BASF公司);WSJB-03 恒温磁力搅拌器(河南中良科学仪器有限公司),H1850R 高速离心机(湖南湘仪科学仪器厂),AB135-S 型分析天平(瑞士Mettler Toledo公司),Waters e2695 高效液相色谱仪(美国Waters公司),Nano-ZS 90 型激光粒度分析仪(英国Marvin公司),Mili-Q 超纯水器(美国Millipore公司),实验所用其他试剂均为分析纯;缓冲溶液和样品溶液配制用水均为超纯水。

1.2 DTX/PNPs 的制备

1.2.1 B, B'-[1,4-亚苯基双(亚硝基甲基炔-1,4-亚苯基)]苯硼酸(Im-Ba)的合成 合成路线见图1。称取50 mg 对苯二胺、15 mg 4-甲酰基苯硼酸

置于圆底烧瓶中,加入20 mL 甲醇,得到黄色透明溶液。室温搅拌,溶液逐渐由澄清变浑浊,12 h 后结束反应,12 000 × g 离心5 min,弃上清液;沉淀用冰甲醇洗涤3次,得到的黄色固体即为Im-Ba,真空干燥备用^[13]。

1.2.2 4,4'-[1,4-亚苯基双(亚甲氧基甲基)]1,2-苯二醇(Im-Ca)的合成 合成路线见图1。称取150 mg 对苯二胺、400 mg 3,4-二羟基苯甲醛溶于10 mL 无水乙醇中,室温、氩气保护、避光条件下搅拌12 h。反应结束后,12 000 × g 离心5 min,弃上清液;沉淀用预冷无水乙醇洗涤3次,得到的棕色固体即为Im-Ca,真空干燥备用^[13]。

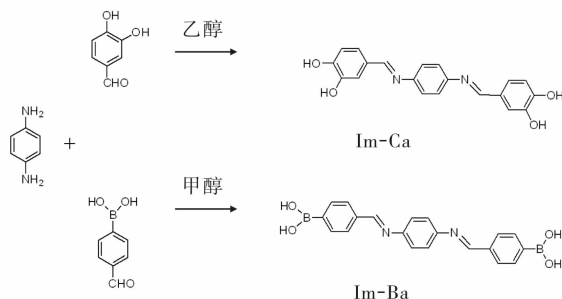


图1 Im-Ba、Im-Ca 的合成路线

Fig.1 Synthesis routes of Im-Ca and Im-Ba

1.2.3 DTX/PNPs 的制备 采用乳化溶剂挥发法制备DTX/PNPs。称取10 mg Im-Ca 和400 mg 泊洛沙姆188置于15 mL EP管中,加入10 mL 超纯水,60 ℃水浴10 min 使其溶解,冷却至室温,转移到圆底烧瓶中。称取10 mg Im-Ba 和20 mg DTX 置于15 mL EP管中,加入10 mL 甲醇,超声使其溶解,然后在搅拌过程中滴加到Im-Ca 和泊洛沙姆188 水溶液中,室温、避光、敞口搅拌24 h。反应结束后,将反应液在超纯水中透析8 h 以除去游离的DTX,所用透析袋截留相对分子量为8 000 000 ~ 14 000 000。

1.3 DTX/PNPs 的质量评价

1.3.1 制剂外观 取1.5 mL DTX/PNPs 的水溶液于小玻璃瓶中,拍照观察其外观。

1.3.2 形态观察 取200 mg · L⁻¹ DTX/PNPs 水溶液适量,滴加到铜网超薄碳膜上,自然晾干,用透射电镜(TEM-1400)观察其形态特征。

1.3.3 粒径和电位表征 配置200 mg · L⁻¹ DTX/PNPs 水溶液适量,用Nano-ZS90 型激光纳米粒度仪测定其粒径和Zeta 电位。

1.3.4 稳定性考察 将 DTX/PNPs 稀释至 $200\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 室温保存, 每日测量其粒径及电位, 连续测量 1 周。

1.4 高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 测定 DTX 含量

1.4.1 色谱条件 色谱柱为 Inertex C18 柱 ($250.0\text{ mm} \times 4.6\text{ mm}, 5\text{ }\mu\text{m}$), 流动相为甲醇: 乙腈 ($36:65, \text{V/V}$), 检测波长为 230 nm , 柱温为 $(30 \pm 5)\text{ }^{\circ}\text{C}$, 进样量为 $20\text{ }\mu\text{L}$, 流速为 $1.0\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测时间为 12 min 。

1.4.2 标准曲线建立 精密称取 DTX 对照品 10 mg , 用甲醇溶解定容至 50 mL 容量瓶中, 得到浓度为 $200\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DTX 储备液, 并依次稀释成 $0.1, 0.5, 2.5, 5.0, 10.0, 50.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列浓度溶液, 分别进样 $20\text{ }\mu\text{L}$, 以峰面积 (A) 为纵坐标, 浓度 (C) 为横坐标, 进行线性回归, 得回归方程 $A = 10\,384 \times C - 4\,404.9$ ($R^2 = 0.999\,8$), 线性范围为 $0.10 \sim 50.00\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.4.3 载药量测定 将 $300\text{ }\mu\text{L}$ DTX/PNPs 溶液分散到 2.7 mL 甲醇溶液中, 并将该混悬液在冰浴条件下超声处理 30 min , 确保 DTX 完全溶解于甲醇中, $15\,000 \times g$ 离心 10 min , 按公式计算载药率。载药率 = 荷载的 DTX 量 / (荷载的 DTX 量 + 所投 PNPs 量) $\times 100\%$ 。

1.5 体外释药 分别以 pH 值为 5.0 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS)、pH 值为 6.0 PBS、pH 值为 7.4 PBS 作为释放介质。取 2 mL 的 DTX/PNPs 溶液置于透析袋中, 再向透析袋中加入 2 mL 透析介质, 透析袋两端用绳子系紧, 浸入 30 mL 释放介质中, 置于摇床上, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温, 转速为 $100\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下释药。分别在 $0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36\text{ h}$ 时, 取释放介质 $500\text{ }\mu\text{L}$, 再加入 $500\text{ }\mu\text{L}$ 相应空白释放介质。按照“1.4.1”项中的色谱条件检测样品, 然后根据标准曲线计算不同时间点释放介质中 DTX 浓度, 并按照公式计算 DTX 的累计释放百分数, 绘制释放曲线。

$$\text{累计释放百分数} = \frac{C_n \times 30 + \sum_{i=1}^{n-1} c_i \times 0.5}{m} \times 100,$$

其中 C_n 为第 n 个时间点释放介质中 DTX 浓度, c_i 为第 $i(n-1)$ 个时间点释放介质中 DTX 浓度, m 为释放体系同 DTX 的质量。

1.6 体外抗肿瘤实验

1.6.1 细胞培养 采用人肝癌 HepG2 细胞^[14] 为实验细胞株。将人肝癌 HepG2 细胞置于含体积分数 10% 胎牛血清和含 1% 双抗 ($100\text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉

素、 $100\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素) 的达尔伯克改良伊格尔培养基, 在含体积分数 $5\% \text{ CO}_2$ 、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 饱和湿度的培养箱中培养, 隔天换液或传代处理。

1.6.2 四甲基偶氮唑盐 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 法检测 PNPs 对细胞增殖的抑制情况

取对数生长期 HepG2 细胞, 接种于 96 孔板中, 细胞密度调整为每孔 7×10^3 个, 继续培养 24 h 。当细胞贴满孔底时, 弃去原来的培养基, 并加入含 $3.125, 6.250, 12.500, 25.000, 50.000\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PNPs 的完全培养基, 每组设置 3 个复孔。平行做 2 组, 分别培养 $24, 48\text{ h}$ 后, 加入 $1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT。继续培养 4 h , 弃去含 MTT 的培养基, 每孔加入 $150\text{ }\mu\text{L}$ 二甲亚砜, 置于摇床中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ $100\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振摇 10 min ; 于 490 nm 处测量各孔的吸光度值, 计算细胞存活率。细胞存活率 = 实验组吸光度值 / 对照组吸光度值 $\times 100\%$ 。

1.6.3 MTT 法检测纳米药物对细胞增殖的抑制情况

收集对数生长期 HepG2 细胞, 接种于 96 孔板中, 细胞密度调整为每孔 7×10^3 个, 每孔加 $100\text{ }\mu\text{L}$ 细胞悬液, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 24 h 。将细胞分为空白对照组、DTX 组、DTX/PNPs (pH 值为 6.0) 组、DTX/PNPs (pH 值为 7.4) 组。分别使用 pH 值为 $6.0, 7.4$ 的细胞培养基稀释 DTX/PNPs, 使 DTX 浓度分别为 $0.135, 0.270, 0.800, 2.500, 5.000\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。待细胞贴壁后, 弃去原来的培养基, 分别加入空白培养基、含 DTX 培养基、含 DTX/PNPs (pH 值为 6.0) 培养基和含 DTX/PNPs (pH 值为 7.4) 培养基 2 mL , 继续培养 4 h , 弃去含药培养基, 加入等体积的新鲜培养基。每组设置 3 个复孔, 培养 48 h , 按“1.6.2”项下方法, 使用 MTT 法检测其在 490 nm 处的吸光度值, 计算细胞抑制率。细胞抑制率 = $(1 - \text{实验组吸光度值} / \text{对照组吸光度值}) \times 100\%$ 。

1.6.4 流式细胞术检测纳米药物对细胞周期分布的影响

取对数生长期 HepG2 细胞接种于 6 孔板中, 细胞密度调整为每孔 3×10^5 个, 置于恒温培养箱中培养 24 h ; 将细胞分为空白对照组、PNPs 组、DTX 组、DTX/PNPs 组。待细胞贴壁后, 弃去原来的培养基, PNPs 组、DTX 组、DTX/PNPs 组、空白对照组分别加入含 PNPs (pH 值为 6.0)、DTX (pH 值为 6.0)、DTX/PNPs (pH 值为 6.0) 和不含药的新鲜培养基 2 mL , 其中 DTX 浓度为 $3\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 置于培养箱中培养 48 h 。用不含乙二胺四乙酸的胰蛋白酶消化收集细胞, 预冷的体积分数 75% 乙醇在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 固定细胞 24 h 。弃去乙醇固定液, PBS 洗涤 2 次, 然后加

入 $100\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ RNA 酶作用 30 min。弃去 RNA 酶溶液,用 PBS 洗涤 2 次,加入 $50\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 碘化丙啶(propidium iodide, PI) $500\text{ }\mu\text{L}$,避光条件下作用 30 min 后,使用流式细胞仪进行检测各组细胞的细胞周期分布情况。

1.6.5 PI 染色法检测纳米药物诱导细胞凋亡情况

取对数生长期 HepG2 细胞接种于 6 孔板中,细胞密度调整为每孔 3×10^5 个,置于恒温培养箱中培养 24 h;将细胞分为空白对照组、PNPs 组、DTX 组、DTX/PNPs 组。待细胞贴壁后,弃去原来的培养基,并分别加入含 PNPs (pH 值为 6.0)、DTX (pH 值为 6.0)、DTX/PNPs (pH 值为 6.0) 和不含药的新鲜培养基 2 mL,其中 DTX 浓度为 $3\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,置于培养箱中培养 48 h。收集各组细胞, $1\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃上清液;加入 $5\text{ }\mu\text{L}$ Binding Buffer 和 0.5 mL 膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素轻轻吹打重悬细胞,室温避光作用 30 min 后,加入 $5\text{ }\mu\text{L}$ PI 混匀,室温避光作用 15 min 后,使用流式细胞仪进行检测,计算各

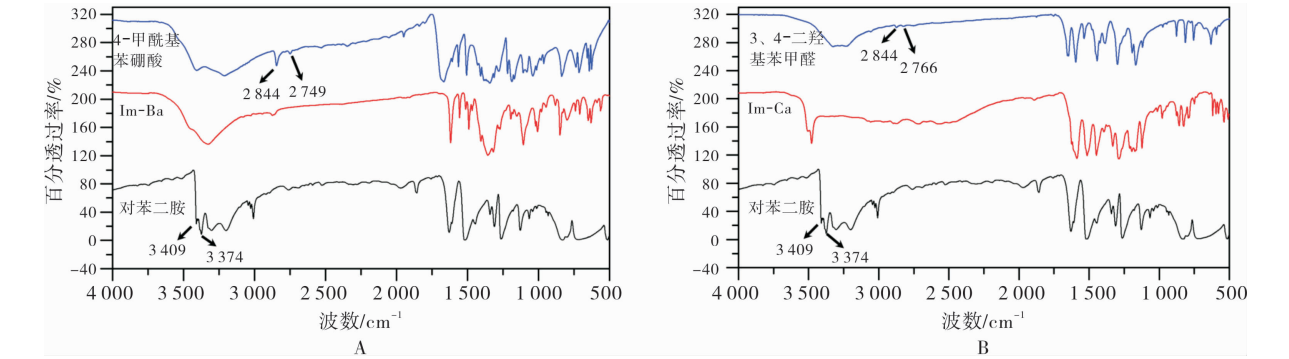
组细胞的凋亡指数,凋亡指数 = (早期凋亡细胞数 + 晚期凋亡细胞数) / 细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组比较采取单因素方差分析,组间比较采取最小显著性差异法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DTX/BNPs 纳米粒质量评价

2.1.1 DTX/PNPs 的制备 Im-Ba 和 Im-Ca 的红外光谱如图 2 所示, $3\,409\text{ cm}^{-1}$ 和 $3\,374\text{ cm}^{-1}$ 为对苯二胺中伯胺 N-H 的伸缩振动峰,在合成的 Im-Ba 和 Im-Ca 中,叔胺无 N-H,故无 N-H 伸缩振动峰。4-甲酰基苯硼酸在 $2\,844\text{ cm}^{-1}$ 和 $2\,749\text{ cm}^{-1}$ 出现羰基 C-H 伸缩振动峰,3,4-二羟基苯甲醛在 $2\,872\text{ cm}^{-1}$ 和 $2\,766\text{ cm}^{-1}$ 出现羰基 C-H 伸缩振动峰;二者在分别形成 Im-Ba 和 Im-Ca 后,羰基 C-H 伸缩振动峰消失。证明成功制备前体化合物 Im-Ba 和 Im-Ca。



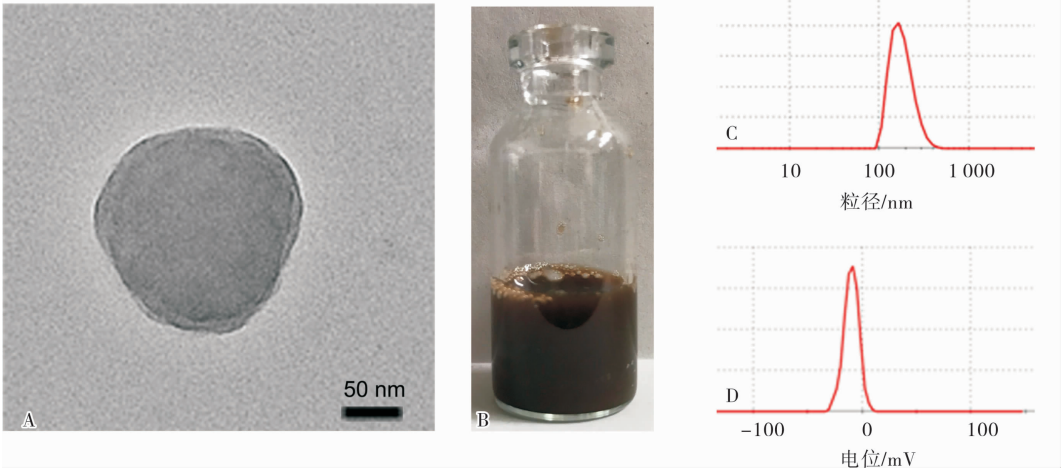
A: Im-Ba; B: Im-Ca。

图 2 Im-Ba、Im-Ca 的傅里叶红外光谱图

Fig.2 Fourier infrared spectroscopy of Im-Ba, Im-Ca

2.1.2 DTX/BNPs 的外观及粒径电位 结果见图 3。DTX/PNPs 为球形,且在水溶液中稳定,纳米粒

平均粒径为 $(180.0 \pm 1.7)\text{ nm}$,多分散系数为 0.18,电位为 $(-20.0 \pm 0.9)\text{ mV}$ 。



A: DTX/PNPs 的透射电镜图; B: DTX/PNPs 的外观图; C: DTX/PNPs 的粒径图; D: DTX/PNPs 的电位图

图 3 DTX/PNPs 的 TEM、外观、粒径和电位图

Fig.3 TEM image, appearance, size and zeta of DOX/PNPs

2.1.3 载药量测定 DTX 的载药量为 $(45.4 \pm 2.5)\%$ 。

2.1.4 稳定性考察 室温条件下,DTX/PNPs 在第 1、2、3、5、7 天的粒径分别为 (211.6 ± 3.8) 、 (219.1 ± 2.7) 、 (218.4 ± 4.1) 、 (226.5 ± 1.9) 、 (224.4 ± 3.2) nm;电位分别为 (-21.7 ± 1.1) 、 (-21.9 ± 1.4) 、 (-22.0 ± 1.2) 、 (-21.8 ± 9.9) 、 (-22.1 ± 1.6) mV。

2.2 DTX/BNPs 体外释药 结果见表 1。在 pH 值为 5.0、pH 值为 6.0、pH 值为 7.4 的 PBS 溶液中,36 h 时 DTX 累积释放百分率分别为 $(80.61 \pm 3.09)\%$ 、 $(55.81 \pm 3.05)\%$ 、 $(11.88 \pm 1.90)\%$ 。DTX 在 pH 值为 5.0、pH 值为 6.0 的 PBS 溶液中的累计释放百分数高于 DTX 在 pH 值为 7.4 的 PBS 溶液中的累计释放百分数,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 DTX/PNPs 体外抗肿瘤实验

2.3.1 PNPs、DTX、DTX/PNPS 对细胞增殖的抑制作用 结果见表 2 和表 3。培养 24、48 h 后,浓度为 3.125、6.250、12.500、25.000、50.000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

表 2 不同浓度 PNPs 作用后的细胞存活率

Tab.2 Cell survival rate after PNPs intervening by different concentrations (x̄±s)

时间	细胞存活率/%				
	3.125 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	6.250 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	12.500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	25.000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	50.000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
24 h	99.51±2.51	98.66±2.44	97.84±4.61	95.67±3.82	96.00±5.11
48 h	98.92±3.90	98.81±3.05	97.98±2.99	95.37±4.61	95.89±3.72

表 3 不同 DTX 浓度作用 48 h 空白对照组、DTX 组、DTX/PNPs (pH 值为 6.5) 组、DTX/PNPs (pH 值为 7.4) 组细胞抑制率比较

Tab.3 Comparison of cell inhibition rates intervened by different concentration DTX for 48 hours in the blank control group,DTX group,DTX/PNPs (pH 6.5) group,and DTX/PNPs (pH 7.4) group (x̄±s)

组别	细胞抑制率/%				
	0.135 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0.270 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0.800 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	2.500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	5.000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
空白对照组	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
DTX 组	20.01±3.32	35.54±2.46	42.93±1.18	53.59±1.93	58.96±3.71
DTX/PNPs (pH 6.5) 组	52.44±3.58 ^a	64.16±2.65 ^a	72.81±2.29 ^a	80.73±2.14 ^a	89.06±1.52 ^a
DTX/PNPs (pH 7.4) 组	39.29±3.97 ^{ab}	50.66±3.25 ^{ab}	57.15±2.92 ^{ab}	63.80±2.11 ^{ab}	73.36±1.67 ^{ab}

注:与 DTX 组比较^a $P < 0.001$;与 DTX/PNPs (pH 7.4) 组比较^b $P < 0.01$ 。

2.3.2 各组细胞周期比较 结果见表 4。PNPs 组 G_0/G_1 、S 和 G_2/M 期细胞所占百分比与空白对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),DTX、DTX/PNPs 组 G_0/G_1 期细胞所占百分比显著低于空白对照组,S 期细胞所占百分比显著高于空白对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.3.3 PNPs、DTX、DTX/PNPs 诱导细胞凋亡比较

空白对照组、PNPs 组、DTX 组、DTX/PNPs 组细胞凋亡指数分别为 $(4.6 \pm 1.3)\%$ 、 $(4.6 \pm 1.7)\%$ 、 $(38.1 \pm 2.1)\%$ 和 $(44.2 \pm 1.9)\%$;空白对照组与 PNPs 组细胞凋亡指数比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。DTX 组、DTX/PNPs 组细胞凋亡指数高于空

PNPs 组的细胞存活率均大于 90%。药物作用 48 h 后,DTX 浓度为 0.135、0.270、0.800、2.500、5.000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,DTX/PNPs (pH 值为 6.5) 组、DTX/PNPs (pH 值为 7.4) 组细胞抑制率高于 DTX 组,差异有统计学意义($P < 0.01$);DTX/PNPs (pH 值为 6.5) 组细胞抑制率高于 DTX/PNPs (pH 值为 7.4) 组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 1 不同 pH 条件下 DTX 累积释放百分数比较

Tab.1 Comparison of the DTX cumulative release percentage under different pH conditions (x̄±s)

时间/h	DTX 累计释放百分数/%		
	pH 7.4	pH 6.0	pH 5.0
0.25	3.74±1.51	15.46±2.44	14.74±3.61
0.50	5.64±2.09	20.61±2.50	29.33±2.00
1.00	8.21±2.30	29.62±2.18	43.18±3.06
2.00	10.61±2.62	42.17±2.90	57.81±4.32
4.00	12.82±1.89	50.10±3.49 ^a	75.77±2.64 ^a
8.00	11.64±2.50	52.72±2.95 ^a	78.86±3.36 ^a
12.00	11.54±1.78	54.78±3.40 ^a	80.99±4.27 ^a
24.00	11.83±2.46	55.00±3.27 ^a	79.02±3.11 ^a
36.00	11.88±1.90	55.81±3.05 ^a	80.61±3.09 ^a

注:与 pH 值为 7.4 条件下比较^a $P < 0.05$ 。

白对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。
表 4 空白对照组、PNPs 组、DTX 组、DTX/PNPs 组细胞周期比较

Tab.4 Comparison of cell cycles in the blank control group, PNPs group,DTX group,and DTX/PNPs group (x̄±s)

组别	细胞周期时相分布/%		
	G_0/G_1 期	S 期	G_2/M 期
空白对照组	66.8±2.3	30.7±3.5	2.5±1.2
PNPs 组	63.6±3.1	23.1±2.8	13.3±1.8
DTX 组	41.7±1.2 ^a	48.7±2.9 ^a	9.5±2.3
DTX/PNPs 组	26.3±1.9 ^a	59.6±2.3 ^a	14.1±4.2

注:与空白对照组比较^a $P < 0.01$ 。

3 讨论

癌症是威胁人类生命健康的重大疾病,发病率和病死率逐年上升。目前临床上癌症的治疗方法主要有化学治疗、放射治疗、手术治疗等,其中化学治疗是临床上最常用的治疗手段或者辅助治疗的手段。小分子化学治疗药物 DTX 由于其选择性较差,所以毒副作用较强。为了改善化学治疗药物的毒副作用,将纳米技术应用于抗肿瘤药物的递送,不仅能降低药物的毒副作用,还能够有效克服药物递送屏障,提高肿瘤治疗效果。本研究利用苯硼酸酯能够响应肿瘤微环境弱酸性的特点,以苯硼酸儿茶酚酯键为连接键,以泊洛沙姆 188 为稳定剂,以 DTX 为化学治疗药物模型,成功构建具有细胞识别作用和肿瘤微环境响应特性的共价自组装纳米粒。本研究所制备的 DTX/PNPs pH 双响应行为可描述为:在肿瘤弱酸性的微环境中,纳米粒表面的泊洛沙姆层脱落,纳米粒结构改变,暴露出能与 SA 结合的 PBA;通过受体介导的细胞内吞,纳米粒进入细胞内部,由于肿瘤内部酸性环境更强,酯键快速断裂,纳米粒分崩离析,实现酸响应性药物快速释放^[15-17]。

本研究首先对 DTX/PNPs 的性质进行了考察。纳米粒的形貌及粒径、电位等参数是评价纳米粒质量的重要标准,利用透射电镜对纳米粒的形貌进行了考察,利用动态光散射对 DTX/PNPs 的粒径分布和电位大小进行分析,发现 DTX/PNPs 纳米粒分散性好,粒形态均一,而且其粒径大小符合肿瘤深层渗透的条件。1 周内纳米粒的电位和粒径变化结果表明,泊洛沙姆 188 的存在能够有效的维持了纳米粒的稳定性。体外释放实验表明,DTX/PNPs 的酸敏感性良好,酸性环境能够有效地促进苯硼酸酯键的断裂,进而纳米粒崩解,实现定位释药。

本研究选取人肝癌 HepG2 细胞为模型^[14,18],对 DTX/PNPs 的体外抗肿瘤活性进行了考察。PNPs 浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,培养 48 h 细胞存活率仍大于 90%,说明 PNPs 安全性高,分析原因为组成 PNPs 纳米粒的单体化合物安全无毒,而且泊洛沙姆 188 的生物相容性好^[15,19]。DTX/PNPs 在弱酸性环境中能增强 SA 介导的细胞内吞,且在肿瘤内部快速释放药物^[20-21],DTX、DTX/PNPs 作用 48 h 后对 HepG2 细胞的生长抑制均表现出一定的剂量依赖性。DTX/PNPs 对细胞抑制作用要高于 DTX,主要是因为 pH 值为 6.0 的弱酸性环境中,DTX/PNPs 表面的泊洛沙姆脱落,PBA 暴露,SA 介导增强细胞内

吞^[16-17]。为进一步验证这个理论,对 DTX/PNPs 在不同 pH 环境中对细胞的抑制情况进行了研究,结果显示,DTX/PNPs 在 pH 值为 6.0 的环境中对肿瘤的抑制效果强于 pH 值为 7.4 的环境中对细胞的抑制效果。利用化学治疗方法治疗肿瘤的机制之一就是对肿瘤细胞的 DNA 造成损伤^[22-23]。空白对照组细胞主要分布于 G_0/G_1 期,与空白对照组相比,PNPs 组细胞周期时相分布无明显变化,说明载体生物相容性好,无明显毒副作用。DTX 和 DTX/PNPs 明显阻滞细胞周期于 S 和 G_2/M 期。并且,与空白对照组比较,DTX/PNPs 组 G_0/G_1 期细胞所占百分比减少,提示 DTX/PNPs 阻滞作用更明显。凋亡实验结果也表明,相对于空白对照组、DTX 组、DTX/PNPs 组可诱导更多的细胞发生凋亡。DTX/PNPs 能够有效抑制肿瘤细胞的生长,主要是因为纳米粒能够特异性响应肿瘤酸性环境,定点释药,此外,也与脱落的泊洛沙姆 188 抑制了 p-糖蛋白对药物的外排密切相关^[22],综上所述,DTX/PNPs 纳米粒的制备比较简单,靶向性强,生物相容性好,安全性高,能够提高药物的生物利用度,为实现肿瘤高效治疗提供了新途径。

参考文献:

- [1] ZHANG W, SONG Y, ELDI P, *et al.* Targeting prostate cancer cells with hybrid elastin-like polypeptide/liposome nanoparticles[J]. *Int J Nanomedicine*, 2018, 13: 293-305.
- [2] HAO Y, ZHANG B, ZHENG C, *et al.* The tumor-targeting core-shell structured DTX-loaded PLGA@Au nanoparticles for chemophotothermal therapy and X-ray imaging[J]. *J Control Release*, 2015, 220(Pt A): 545-555.
- [3] 徐琰. 以苯硼酸酯为连接单元的两嵌段聚合物纳米胶束研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2016.
- [4] LI Y, XIAO W, XIAO K, *et al.* Well-defined, reversible boronate crosslinked nanocarriers for targeted drug delivery in response to acidic pH values and cis-diols[J]. *Angew Chem Int Edit*, 2012, 51(12): 2864-2869.
- [5] YANG B, JIA H, WANG X, *et al.* Self-assembled vehicle construction via boronic acid coupling and host-guest interaction for serum-tolerant DNA transport and pH-responsive drug delivery[J]. *Adv Health Mater*, 2014, 3(4): 596-608.
- [6] 胡辅华, 刘丽林, 季建, 等. 卡铂联合 MicroRNA-34a 抑制视网膜母细胞瘤细胞增殖和肿瘤生长的作用研究[J]. *眼科新进展*, 2015, 35(6): 528-531.
- [7] ZHANG X, CHEN B, HE M, *et al.* Boronic acid recognition based-gold nanoparticle-labeling strategy for the assay of sialic acid expression on cancer cell surface by inductively coupled plasma mass spectrometry[J]. *Analyst*, 2016, 141(4): 1286-1293.
- [8] FAN B, KANG L, CHEN L, *et al.* Systemic siRNA delivery with a

dual pH-responsive and tumor-targeted nanovector for inhibiting tumor growth and spontaneous metastasis in orthotopic murine model of breast carcinoma[J]. *Theranostics*, 2017, 7(2):357-376.

[9] VARKI A. Sialic acids in human health and disease[J]. *Trends Mol Med*, 2008, 14(8):351-360.

[10] BENNEWITZ M F, LOBO T L, NKANSAH M K, et al. Biocompatible and pH-sensitive PLGA encapsulated MnO nanocrystals for molecular and cellular MRI[J]. *ACS Nano*, 2011, 5(5):3438-3446.

[11] 王志慧,梁文辉,原志庆,等. 缺氧诱导因子 2- α 对乳腺癌细胞多药耐药的影响[J]. *新乡医学院学报*, 2018, 35(11):961-964, 970.

[12] WANG C, WANG J, CHEN X, et al. Phenylboronic acid-cross-linked nanoparticles with improved stability as dual acid-responsive drug carriers[J]. *Macromol Biosci*, 2017, 17(3):227-235.

[13] LI L, YUAN C, ZHOU D, et al. Utilizing reversible interactions in polymeric nanoparticles to generate hollow metal-organic nanoparticles[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015, 54(44):12991-12995.

[14] ZHANG Y, ZHAO W, ZHAO Y, et al. Expression of ST3Gal, ST6Gal, ST6GalNAc and ST8Sia in human hepatic carcinoma cell lines, HepG-2 and SMMC-7721 and normal hepatic cell line, L-02[J]. *Glycoconj J*, 2015, 32(1/2):39-47.

[15] SHEN Y, LU F, HOU J, et al. Incorporation of paclitaxel solid dispersions with poloxamer188 or polyethylene glycol to tune drug release from poly(ϵ -caprolactone) films[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2013, 39(8):1187-1196.

[16] 吴迪. 基于肿瘤多药耐药机制构建多孔微球和苯硼酸靶向型小核酸递释体系的研究[D]. 吉林:吉林大学, 2016.

[17] JI M, LI P, SHENG N, et al. Sialic acid-targeted nanovectors with phenylboronic acid-grafted polyethylenimine robustly enhance siRNA-based cancer therapy[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8(15):9565-9576.

[18] MOON J M, ARONOFF D M, CAPRA J A, et al. Examination of signatures of recent positive selection on genes involved in human sialic acid biology[J]. *G3 (Bethesda)*, 2018, 8(4):1315-1325.

[19] CHAI Z, MA L, WANG Y, et al. Phenylboronic acid as a glucose-responsive trigger to tune the insulin release of glycopolymer nanoparticles[J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2016, 27(7):599-610.

[20] 安媛媛,徐祖顺,吴水林. 苯硼酸类糖敏感材料的研究进展[J]. *高分子通报*, 2012(3):98-106.

[21] QIAN R, DING L, YAN L, et al. Fluorescence imaging for *in situ* detection of cell surface sialic acid by competitive binding of 3-(dansylamino) phenylboronic acid[J]. *Anal Chim Acta*, 2015, 894:85-90.

[22] HAO Y, ZHENG C, WANG L, et al. Covalent self-assembled nanoparticles with pH-dependent enhanced tumor retention and drug release for improving tumor therapeutic efficiency[J]. *J Mater Chem B*, 2017, 5(11):2133-2144.

[23] 张金,任思其,李舒婷,等. 儿童恶性脑肿瘤放疗后继发肺损伤的早期诊断及治疗[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2018, 33(23):1807-1810.

(本文编辑:杨 博 英文编辑:杨 博)

(上接第 604 页)

[9] 刘荣霞,杨炳,余丽梅,等. 不同来源间充质干细胞治疗卵巢早衰的作用及机制研究进展[J]. *山东医药*, 2018, 58(40):106-110.

[10] 周政,杜波,范雪,等. 骨髓间充质干细胞外泌体对 SD 大鼠早衰卵巢的影响[J]. *中国科技论文*, 2018, 13(12):1429-1433.

[11] 赵高远. 脂肪间充质干细胞通过旁分泌抑制氧化应激反应缓解急性肝细胞衰竭的研究[D]. 青岛:青岛大学, 2018.

[12] HUAJIANG D, PING W, DINGWEI P, et al. Study on umbilical cord-matrix stem cells transplantation for treatment of acute trauma brain injury in rats[J]. *Turk Neurosurg*, 2019. DOI:10.5137/1019-5149.JTN.25463-18.2. [Epub ahead of print].

[13] 樊志刚,樊红亮. 胚胎干细胞尾静脉注射移植糖尿病肾病大鼠的氧化应激反应[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(14):2199-2204.

[14] DONG H J, ZHAO M L, LI X H, et al. Hypothermia-modulating matrix elasticity of injured brain promoted neural lineage specification of mesenchymal stem cells[J]. *Neuroscience*, 2018, 377(1):1-11.

[15] 刘聪慧. 脐带间充质干细胞来源胞外囊泡在小鼠卵巢功能和生育力重建中的作用[D]. 合肥:安徽医科大学, 2018.

[16] 赵先锋,徐予,朱中玉,等. 脐带间充质干细胞治疗慢性扩张型心肌病合并心力衰竭疗效观察[J]. *新乡医学院学报*, 2017, 34(9):823-826.

[17] 袁春菊. Enalapril 联合人脐血间充质干细胞治疗 AMI 的作用及机制研究[D]. 长沙:中南大学, 2013.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:孟 月)