

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.18.003

还原可降解聚磺酸甜菜碱型纳米水凝胶的制备及载药研究*

李佳佳¹ 孟祥莹² 李 强¹ 祝本菊¹ 曹立梅¹ 陈 旭^{1Δ}

(1 上海市第八人民医院神经内科 上海 200235; 2 复旦大学药学院药剂教研室 上海 201203)

摘要 目的:制备与表征还原可降解的聚磺酸甜菜碱型纳米水凝胶,利用该纳米递药系统包载阿霉素(DOX)并初步评价其抗肿瘤性能。**方法:**利用回流沉淀聚合的方法合成含二硫键的聚磺酸甜菜碱甲基丙烯酸酯(PSBMA)纳米水凝胶及不含二硫键的 PSBMA 纳米凝胶(nd-PSBMA);通过粒度仪和透射电镜考察两种纳米水凝胶的粒径、形态以及稳定性;通过考察谷胱甘肽(GSH)对纳米凝胶溶液相对浊度的影响以评价还原环境对两种纳米凝胶的还原可降解性;利用纳米凝胶包载阿霉素(DOX),考察载药凝胶在 GSH 中的释药行为,并初步评价其对 A549 肿瘤细胞的杀伤作用。**结果:**以 N,N'-双丙烯酰胱胺为交联剂制备了含二硫键的 PSBMA 纳米凝胶,其粒径在 180~200 nm;同时以 N,N'-双丙烯酰胱胺为交联剂制备了不含二硫键的 nd-PSBMA 纳米凝胶。两种纳米凝胶与小鼠血清共孵育 7 天水合粒径仍无明显变化,表明磺酸甜菜碱型纳米凝胶具有良好的抗蛋白吸附能力。此外,PSBMA 纳米凝胶在 GSH 溶液中迅速地降解,且降解速度与 GSH 浓度呈正相关;而 nd-PSBMA 纳米凝胶在 GSH 溶液中几乎不降解。载 DOX 的 PSBMA 纳米凝胶可在 GSH 作用下快速的释放药物而载 DOX 的 nd-PSBMA 纳米凝胶在 GSH 作用下缓慢的释放药物;体外细胞实验显示空白纳米凝胶和载药 nd-PSBMA 对 A549 细胞无明显毒性作用,但载 DOX 的 PSBMA 纳米凝胶可高效地杀死 A549 肿瘤细胞,其药效与游离 DOX 相仿。**结论:**还原可降解的 PSBMA 纳米水凝胶有望成为智能型控释药物载体。

关键词:还原可降解;聚磺酸甜菜碱甲基丙烯酸酯;纳米水凝胶;递药系统

中图分类号:R918;R94 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)18-3410-07

Preparation and Drug Loading Characterization of Redox Biodegradable Nanogels Based on Sulfobetaine*

LI Jia-jia¹, MENG Xiang-ying², LI Qiang¹, ZHU Ben-ju¹, CAO Li-mei¹, CHEN Xu^{1Δ}

(1 Department of Neurology, Shanghai 8th people's hospital, Shanghai, 200235, China;

2 Department of Pharmaceutics, School of pharmacy, Fudan University, Shanghai, 201203, China)

ABSTRACT Objective: A redox biodegradable nanogels based on sulfobetaine were synthesized and characterized. DOX were encapsulated in the nanogels and the in vitro antitumor efficacy of the drug-loaded nanogels was also evaluated. **Methods:** Reflux precipitation polymerization was used to synthesis disulfide-containing poly (sulfobetaine methacrylate) (PSBMA) and nd-PSBMA without disulfide was also prepared as control. Dynamic scattering light (DLS) and transmission electron microscope (TEM) were used to evaluate the size and morphology of the nanogels. The reduction biodegradability of the nanogels was evaluated by the effects of glutathione (GSH) on the relative turbidity of nanogels. DOX was used as model drug to prepare drug-loaded nanogels. The drug release behavior and antitumor efficacy against A549 cells of DOX-loaded nanogels were also evaluated. **Results:** N,N'-bis (acryloyl) cystamine (BAC) was used as cross-linker to prepare PSBMA nanogels containing cleavable disulfide linkage; N,N'-methylenebisacrylamide (MBA) was used to synthesize nd-PSBMA without disulfide. The hydrophilic size of nanogels were 180~200 nm and remained invariable after incubation with mice serum for 7 days, reflecting excellent adsorption resistance capability. PSBMA nanogels degraded rapidly with GSH incubation. However, nd-PSBMA did not degrade with GSH. Consistently, DOX-loaded PSBMA nanogels released their encapsulated drugs fleetly with GSH and drug-loaded nd-PSBMA only slightly released drugs. MTT study showed that DOX-loaded PSBMA nanogels can cause similar cytotoxicity as compared with free DOX, while blank nanogels and DOX-loaded nd-PSBMA did not show significant cytotoxicity against A549 cells. **Conclusions:** Redox biodegradable PSBMA nanogels show great promise for smart stimulus-responsive drug carrier.

Key words: Redox biodegradable; PSBMA; Nanogels; Drug carrier

Chinese Library Classification(CLC): R918; R94 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)18-3410-07

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81870920);上海市徐汇区医学科研项目(SHXX201839)

作者简介:李佳佳(1989-),女,硕士研究生,住院医师,主要研究方向:神经病学,E-mail:jjiajia1989@126.com

Δ 通讯作者:陈旭,男,博士生导师,教授,主要研究方向:神经病学,E-mail:CXWP65@163.com,电话:34284588

(收稿日期:2019-05-09 接受日期:2019-06-03)

前言

小分子药物是目前临床上最常用的药物类型,但在使用中仍存在明显的缺陷,主要表现为药物剂型单一、药物的病灶靶向性不强、长期使用会引发全身毒副作用以及出现药物耐药等^[1]。纳米医学的发展为解决上述缺陷提供了新的手段。大量研究证实纳米粒子可以实现对药物增溶、提高药物的病灶靶向性同时降低药物的毒副作用,并有助于拮抗药物耐药,提高药物疗效^[2]。但研究发现,单纯将小分子药物递送至病灶部位可能还不足以显著提高药物疗效,因为很多小分子药物需要在细胞质内甚至细胞核内才能发挥作用,因此需要设计能够在病变部位或病变细胞内特异性释放药物的纳米载体。环境刺激响应性的智能纳米载体能够对内源性或者外源性的 pH 值、离子强度、氧化还原性、光照、电流、温度等的变化发生响应,在病变部位有效释放其包载的治疗药物,近年来引起越来越多研究者的关注^[3]。

纳米凝胶一般是指直径在 200 nm 以下的水凝胶,同时具有水凝胶和纳米材料的性质^[4]。纳米凝胶可通过化学或者物理相互作用形成三维网状结构,具备载药能力高、稳定性好且尺寸可调等优势,在药物控释领域具有较大潜在应用价值^[5]。细胞外的谷胱甘肽(GSH)浓度在 2~20 μM ,而细胞内的 GSH 含量可达 2~10 mM^[6]。此外,一些病变部位比如肿瘤组织微环境中的 GSH 浓度可为正常组织的 4 倍^[3]。利用这些差别设计的可响

应 GSH 的还原响应性纳米粒子逐渐成为药物载体领域研究的热点^[7,8]。研究中常通过含二硫键的交联剂将凝胶单体结合在一起以形成 GSH 敏感性的纳米凝胶载体^[9,10],以实现所载药物的响应性释放^[11]。但目前主流的纳米凝胶在制备过程中常需加用大量表面活性剂,而且难以降解,因而限制了其在生物医学领域的进一步应用。

本文选择生物安全性优异的两性离子聚合物磺基甜菜碱甲基丙烯酸酯(SBMA)为单体^[12],以含二硫键的 N,N'-双丙烯酰肼(BAC)为交联剂,采用回流沉淀聚合法合成具有还原响应性的聚磺基甜菜碱甲基丙烯酸酯(PSBMA)纳米凝胶,该纳米凝胶可在外源性 GSH 和肿瘤细胞内的 GSH 的刺激下释放出所包载的药物而发挥作用(Fig. 1)。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 磺基甜菜碱甲基丙烯酸酯单体(SBMA, 纯度>98%,美仑生物);N,N'-双(丙烯酰)肼(BAC, 纯度>98%,国药集团化学试剂有限公司);N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(MBA, 纯度>98%,国药集团化学试剂有限公司);偶氮二异丁腈(AIBN, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司);乙腈(分析纯, Merck Corp., Germany),阿霉素盐酸盐(DOX, 纯度 98%,美仑生物);MTT 试剂盒(美仑生物);所有细胞培养相关物质来自阿拉丁

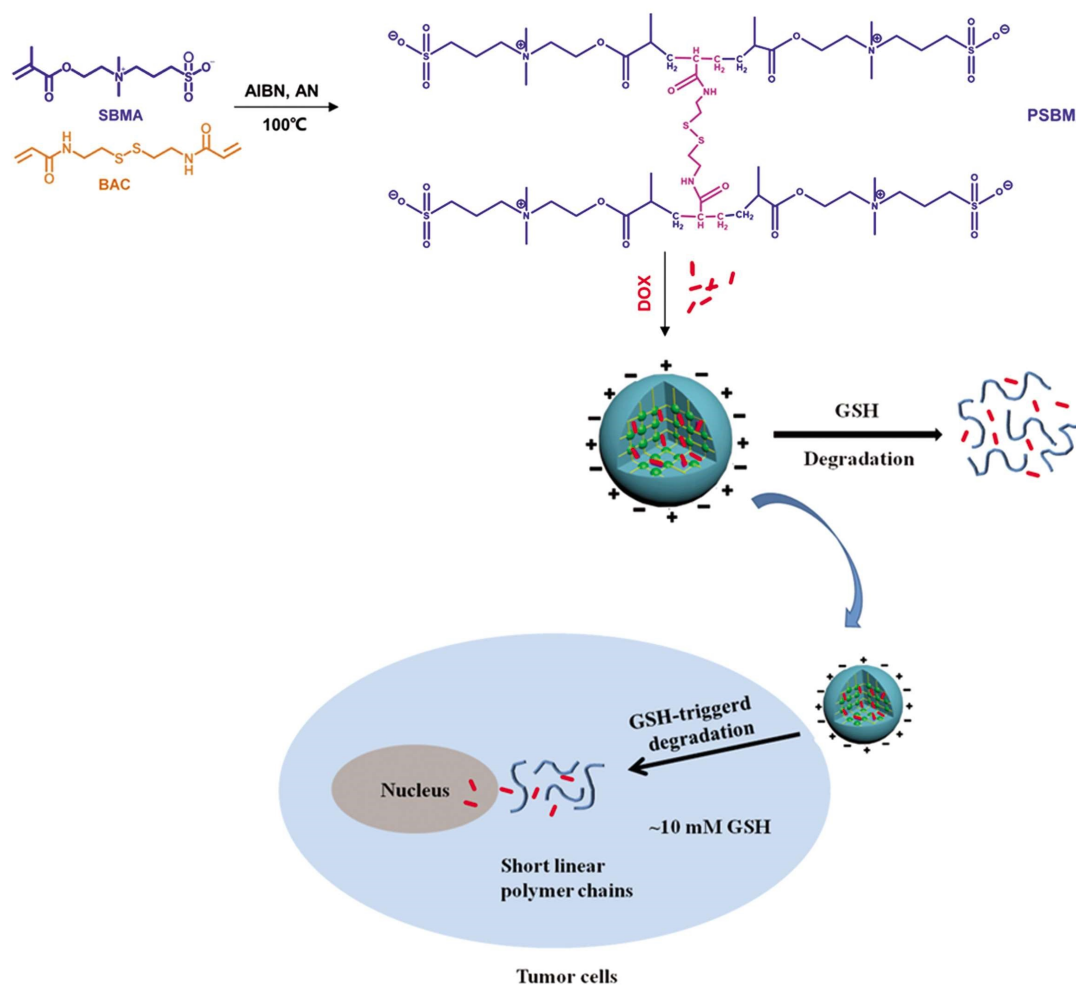


图 1 载阿霉素纳米凝胶的构建及药物释放行为示意图

Fig.1 Schematic illustration of the construction and drug release behavior of DOX-loaded PSBMA nanogels

试剂。

1.1.2 实验仪器 分析天平(BT25S, Sartorius, Germany); 高速离心机(H-1650, 长沙湘仪离心机仪器有限公司); 超声波清洗器(SK7210HP, 上海科导超声仪器有限公司); IKA 磁力搅拌器(RH digital, 上海右一仪器有限公司) MILLPO A-10 纯水仪(Millipore, Germany); pH 计 (PB-10, Sartorius, Germany); Malvern nano-ZS 电位 / 粒度分析(nano-ZS, USA); 紫外分光光度计 (UV-2401PC, Shimadzu, Japan); 倒置荧光显微镜(DMI 4000B, Leica, Wetzlar, Germany); 透射电子显微镜(Tecnaï G2 F20-TWIN, FEI, USA)。

1.2 方法

1.2.1 纳米水凝胶的制备 采用回流沉淀聚合的方法^[9]制备二硫键交联的 PSBMA 纳米凝胶。具体操作步骤如下: 称取 160 mg 的磺基甜菜碱甲基丙烯酸酯(SBMA)单体和 40 mg 的 BAC 交联剂, 4 mg AIBN 引发剂, 溶解于 40 mL 分析纯乙腈溶液中, 超声震荡 5 min, 然后置于容量 100 mL 的三颈烧瓶中, 维持搅拌速度 200 rpm, 并持续通入氮气, 另一个瓶口接冷凝管, 持续冷水循环, 随后将反应温度逐渐升高至 100 °C, 并维持反应 1 小时, 然后停止加热保持氮气及自来水循环直至冷凝至室温。将产物分离离心(12000 rpm, 15 min), 并用去离子水水洗三遍, 得到由二硫键交联成的纳米水凝胶(PSBMA)。为了比较研究, 我们还制备了不含二硫键的 MBA 交联的不可降解的聚磺基甜菜碱纳米凝胶(non-degradable PSBMA, nd-PSBMA)。制备过程同上, 只是交联剂由原来的 BAC 替换为 MBA。

1.2.2 纳米凝胶的粒径和 Zeta 电位 新鲜制备的 PSBMA 和 nd-PSBMA 纳米水凝胶溶液, 采用粒度 / zeta 电位测定仪, 测定纳米水凝胶的水合粒径和 zeta 电位值。DLS 纳米粒度仪光源采用 He-Ne 激光器, 散射角度 90°, 波长 632.8 nm, 温度 37 °C。

1.2.3 纳米凝胶透射电镜表征 将上述制备得到的纳米凝胶(1 mg/mL), 移液枪吸取 10 μL 加入 1 mL 去离子水中稀释, 超声波震荡 10 min, 混匀。然后再吸取 10 μL 滴入碳纤维膜铜网之上, 室温条件下自然风干。注意避免强光及高温, 纳米凝胶的浓度不可过高。透射电镜 (Transmission electron microscope, TEM) 上样, 观察并拍摄。

1.2.4 纳米凝胶的稳定性研究 为了探究 PSBMA 纳米凝胶的稳定性, 我们采用 PBS 配制的 10 % 小牛血清 (Fetal bovine serum, FBS) 溶液模拟体内的外周循环微环境。将 1 mg/mL 的纳米凝胶(PSBMA 与 nd-PSBMA) 分别分散溶于中 PBS 配置的 10% FBS 溶液中, DLS 测定不同孵育时间点的样品的水合粒径, 通过纳米凝胶水合粒径的变化情况反映其胶体稳定性。

1.2.5 纳米凝胶的还原降解研究 将上述制备的 PSBMA 纳米凝胶置于 0 mM、5 mM 和 10 mM GSH 溶液中, 利用动态光散射法(Dynamic Light Scattering, DLS)追踪样品的水合粒径、散射强度随时间的变化, 以评价纳米凝胶的降解过程。用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)配置浓度为 0, 5, 10 mM 的 GSH 溶液, 将 1 mg/mL 的纳米凝胶取 100 μL 分散溶于 1 mL 的上述不同浓度的 GSH 溶液中, 然后置于 DLS 样品池中, 设置仪器测定温度为 37 °C, 并设定不同时间点对样品的散射光强度和水合粒径进行测试。定义不同时间点的样品散射强度与初始的

样品散射强度之比为样品的相对浊度, 纳米凝胶的降解程度通过样品的相对浊度的变化的来反映。同时, 我们也研究了 MBA 交联的 nd-PSBMA 纳米凝胶在 10 mM GSH 条件下的降解情况。实验步骤同上述。

1.2.6 纳米凝胶的载药研究

1.2.6.1 载药纳米水凝胶的制备 以盐酸阿霉素(DOX)为模型药物, 进一步研究 PSBMA 纳米凝胶的载药情况。首先, 配制浓度为 1 mg/mL 的 DOX 水溶液, 并用 0.1 M 的氢氧化钠溶液调整 pH 至 8.0, 取 10 mg 制备好的 PSBMA 或 n-PSBMA 分散于 3 mL 上述 DOX 溶液体系中, 超声震荡仪分散 10 分钟。室温避光搅拌 24 小时, 然后收集上述溶液体系, 水洗离心三遍, 以去除纳米凝胶表面吸附的 DOX。

收集洗脱过程中的上清液, 通过紫外分光光度仪测定上清液中的 DOX 含量, 以计算载入纳米凝胶的 DOX 的量。药物的载药量可由以下公式计算得到:

$$\text{载药量}(\%) = \frac{\text{负载的 DOX 含量}}{\text{纳米凝胶的总重量}} \times 100\%$$

DOX 含量的测定方法: 配制不同浓度的 DOX 标准溶液, 测定其在 488 nm 处的吸光度并绘制 DOX 吸光度 -DOX 浓度标准曲线, 测定待测释药介质在 488 nm 处的吸光度, 通过标准曲线计算出释药介质中所含的 DOX 量。

1.2.6.2 载药纳米凝胶的药物释放研究 我们采用 0.01 M 的 pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液配制 0 mM, 5 mM 及 10 mM GSH 溶液作为药物控制释放的介质, 研究载药 PSBMA 纳米凝胶的释药行为。以 MBA 交联剂制备的 nd-PSBMA 纳米凝胶负载 DOX 作为实验对照组。称量 1 mg 载药 PSBMA 分散于 1 mL 相应的缓冲溶液中, 然后转移至截留分子量为 14000 Da 的透析袋中, 将透析袋浸入 100 mL 0 mM, 5 mM 或 10 mM GSH 且 pH 为 7.4 的缓冲溶液中, 设置温度为 37 °C 并轻微震荡。称取 1 mg 载药的 nd-PSBMA 分散于 1 mL 缓冲溶液中, 转移至截留分子量 14000 Da 的透析袋中, 然后将透析袋浸没于 100 mL 浓度为 10 mM GSH pH 7.4 的缓冲溶液中, 设置条件同上述。在特定时间点间隔从介质中取出 2 mL 溶液, 并向释放介质中重新添加 2 mL 新鲜的对应该缓冲溶液, 以保持总的释放介质的体积不变。然后, 将取出的释放介质采用紫外分光光度仪测量介质中的 DOX 含量, 以释放介质中的 DOX 的量与纳米凝胶中载入的总的 DOX 含量之比作为累积释药率。重复三次实验取平均值计算。

1.2.6.3 载药纳米凝胶对肿瘤细胞的杀伤作用研究 采用 MTT 法对两性离子纳米凝胶载药体系对肿瘤细胞的杀伤效果进行评价。

首先评估空白纳米凝胶对肿瘤细胞的毒性。采用人肺腺癌细胞(A549)细胞系, 以每孔 1×10^4 个的密度接种于 96 孔板上, 培养过夜以使细胞牢固贴壁。次日, 弃去上层培养基, 分别加入 0, 10, 50, 100, 200, 500 及 1000 μg/mL 浓度的空白凝胶 PSBMA 与 nb-PSBMA, 37 °C, 5 % CO₂ 细胞培养箱中继续孵育 24 h, 随后取出 96 孔板, 吸出培养基, PBS 缓冲液冲洗细胞, 每孔加入新鲜不含小牛血清的培养基 100 μL, 然后每孔加入 20 μL MTT 溶液(5 mg/mL), 继续培养 4 小时。轻轻吸取孔板中的上

清液,加入 150 μL 的 DMSO 溶液,充分溶解孔板底部的甲臍结晶,摇床避光温和震荡 15 分钟,酶标仪测定 490 nm 处的吸光度值。通过与对照孔以及空白孔比较,计算得到存活率。对照组细胞仅用不含小牛血清的细胞培养基培养,不加入样品,空白孔仅加入 100 μL PBS 缓冲溶液。试验组吸光度 OD 值减去空白孔 OD 值与对照孔 OD 值减去空白孔 OD 值之比定义为细胞存活率。每个孔均设定 5 个副孔,所得结果均为 6 个孔的平均值。

接着,再次将 A549 细胞以每孔 1×10^4 个的密度接种于 96 孔板上,培养过夜以使细胞牢固贴壁。次日,弃去上层培养基,加入等效的 DOX 浓度为 0.001,0.01,0.1,1.0,5.0 及 10.0 $\mu\text{g/mL}$ 的载药 PSBMA-DOX、载药 nd-PSBMA-DOX 以及游离 DOX,余步骤同上以评价载药凝胶对肿瘤细胞的杀伤作用。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,数据以均数 $\pm$ 标准差表示,统计方法采用方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 纳米水凝胶的制备及粒径表征

目前制备两性离子聚合物纳米凝胶主要采用反向乳液聚合,需要加入大量表面活性剂,但表面活性剂在后处理中难以清除干净,因此影响了纳米凝胶在生物体内的应用^[14,15]。而本研究中采用了回流沉淀聚合法^[13]来制备纳米水凝胶,不需要加入任何添加剂,而且反应过程迅速,这极大地降低了 PSBMA 纳米凝胶的潜在毒性。此外,该方法能够精细调控

纳米粒子的形态和结构,并能非常容易地在纳米凝胶体系中共载药物或者对纳米体系进行修饰以构建满足多种不同需求的多功能载药体系^[16]。

DLS 测定 PSBMA 纳米凝胶的水合粒径为 180 nm 左右(PDI=0.164),与既往报道的同样比例的 SBMA 单体和 BAC 制备成的 PSBMA 相比(DLS 粒径 ~ 250 nm)^[13],本研究制备的 PSBMA 纳米凝胶粒径更小(< 200 nm)。既往研究还显示通过增加反应体系中交联剂 BAC 的比例,可以提高纳米凝胶内部的聚集能力,使得纳米粒的水合粒径变小^[13],但该研究中将 BAC 的比例提高至 40% 时获得的纳米凝胶水合粒径仍在 231 nm,仍高于本研究所得纳米粒粒径,这提示除了改变原料比例,单纯通过精细控制回流沉淀聚合法的反应过程和反应条件,也能够进一步控制纳米凝胶的粒径,制备出更小粒径的 PSBMA 纳米凝胶,这有助于提高该纳米粒子逃避网状内皮系统摄取的能力,从而提高其长循环效应以及在病灶内聚集的能力^[17,18]。将新鲜制备的纳米凝胶用去离子水稀释后用 TEM 观察纳米凝胶呈圆球状,大小较均匀(Fig. 2C),测得的纳米凝胶粒径在 ~ 140 nm,小于 DLS 所测得的粒径,这可能是由于 TEM 下测定的纳米粒子粒径是在干燥真空的条件下测得而 DLS 测定的则是粒子在水溶液中的水合粒径。纳米凝胶在水溶液中膨胀,故其水合粒径大于 TEM 所测得的粒径。由 Fig. 2C 可见,各个纳米粒子均由中心的实心区和周边的阴影区组成,推测阴影区主要由两性离子聚合物的亲水链向外伸展形成亲水外壳所致,而实心区则为交联剂与疏水链相互缠绕形成网状交联结构。不含二硫键的 nd-PSBMA 纳米水凝胶 DLS 测得的粒径与 PSBMA 均相近。

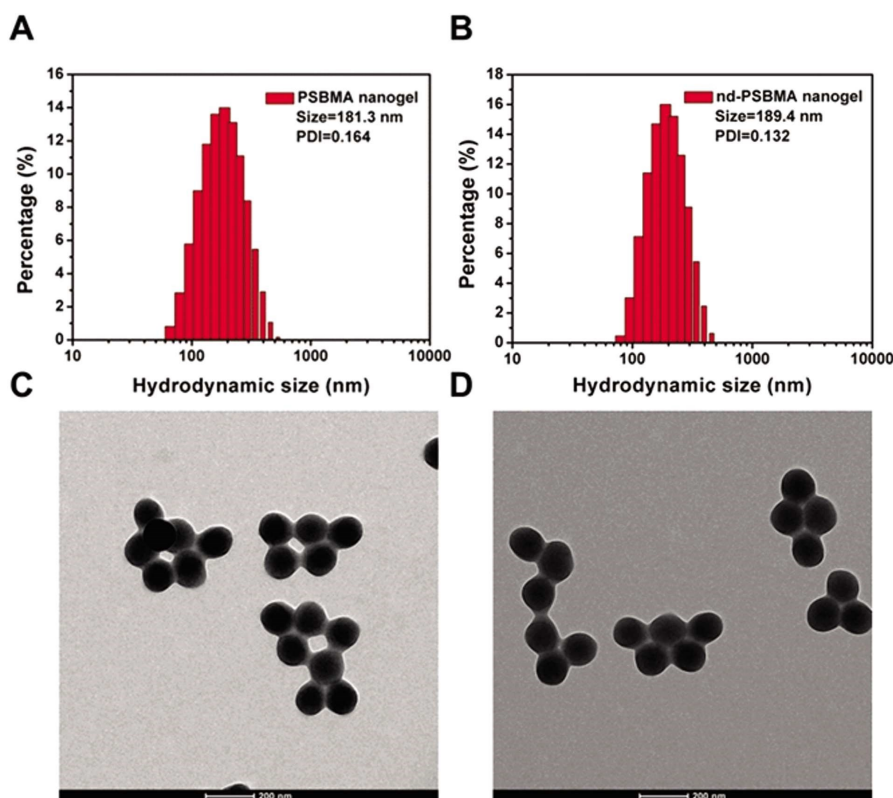


图 2 PSBMA(A)和 nd-PSBMA(B)粒径及其分布;PSBMA(C)和 nd-PSBMA(D)的透射电镜图

Fig. 2 Particle size and size distribution of empty PSBMA (A) and nd-PSBMA (B);

Transmission electron microscope image of PSBMA (C) and nd-PSBMA (D)

2.2 纳米水凝胶的稳定性

纳米粒子的体内稳定性不仅与纳米粒本身的性质有关,还与纳米粒进入血循环后是否吸附血浆中的蛋白而形成蛋白冠密切相关^[19,21]。表面形成蛋白冠的纳米粒更容易被内皮网状系统识别并清除^[22]。为考察 PSBMA 纳米凝胶的体内稳定性,我们采用 PBS 配置的含 10% FBS 溶液在体外模拟体内循环微环境。由 Fig. 3 可以看出,在溶于含 10% FBS 的溶液中 7 天后,PSBMA 的水合粒径仍无明显变化,提示所制备的纳米凝胶具备良好的对抗蛋白吸附能力,预示该载体在体循环中具有良好的稳定性及循环时间^[23]。此外,研究还显示不含二硫键的 nd-PSBMA 在溶液中的水合粒径也可保持稳定,这提示该纳米凝胶的抗蛋白吸附能力主要与 SBMA 材料本身所形成的纳米粒外壳有关,而与交联剂无关。

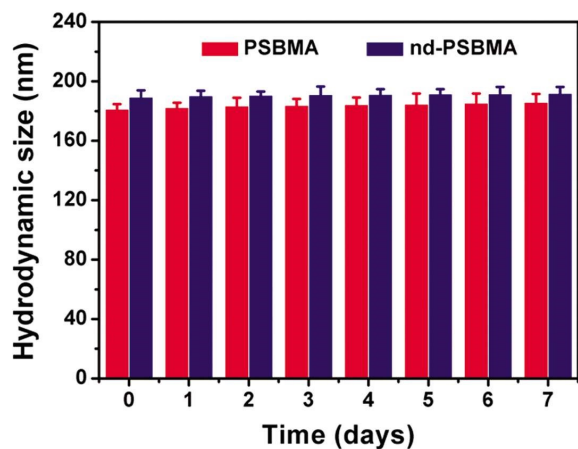


图 3 PSBMA 纳米水凝胶的稳定性

Fig. 3 Stability of PSBMA nanogels (1 mg/mL) in 10% FBS

2.3 纳米水凝胶的还原响应性

为了考察纳米凝胶的还原响应性,我们将 1 mg/mL 的纳米凝胶溶于不同浓度的 GSH 中。如 Fig. 4A 所示,在 10 mM 的 GSH 溶液中 120 min,纳米凝胶降解而变得澄清。为了定量比较不同浓度 GSH 刺激下 PSBMA 及 nd-PSBMA 纳米凝胶的降解程度和速度,我们采用了相对浊度这一概念^[13]。在 GSH 作用下,响应型纳米凝胶 PSBMA 由于降解而变得澄清,所以相对浊度明显下降,且下降速度与 GSH 浓度呈正相关(Fig. 4B)。在 10 mM 的 GSH 刺激下,PSBMA 在 10 分钟内即可降解 40%左右,在 1 小时左右即几乎完全降解,显示出良好的响应性。而在没有 GSH 的情况下,由于 PSBMA 的良好稳定性,其相对浊度也无明显变化。而不含二硫键的交联剂所制备的 nd-PSBMA 由于无法对 GSH 产生响应,即使在 10 mM 的 GSH 刺激下其相对浊度也无明显变化。以上结果提示二硫键的存在是 PSBMA 纳米凝胶产生还原响应的主要原因。在含有巯基的化合物 GSH 的作用下,二硫键通过硫醇二硫化交换反应还原成巯基而发生断裂,从而使得纳米凝胶结构降解^[6,11]。

2.4 载药纳米水凝胶的制备和体外释放特性

为了考察纳米凝胶的载药性能,选取 DOX 作为模型药物制备载药纳米凝胶,采用超声分散法将 DOX 将 PSBMA 或 nd-PSBMA 纳米凝胶溶于分散于 DOX 水溶液中,结果显示该方法制备的载药纳米凝胶载药量分别为 12.8%及 13.2%,与既

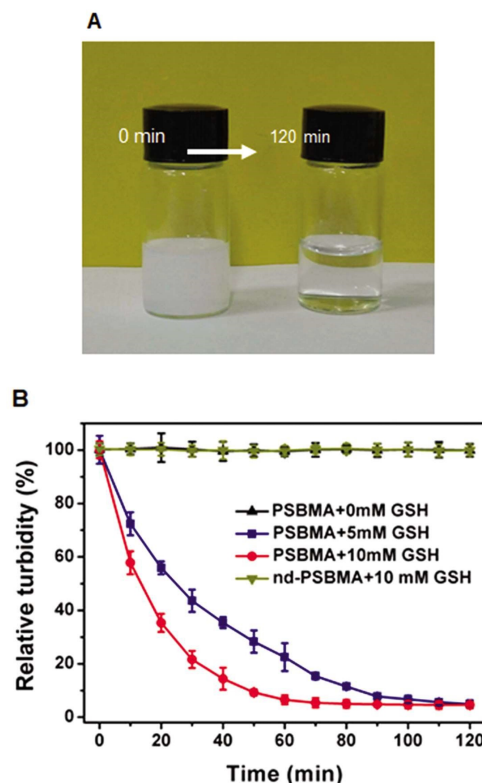


图 4 在 GSH 刺激下 PSBMA 纳米凝胶的降解情况。

(A)加入 GSH 前及加入 GSH 之后 120 min 的比较。

(B)不同 GSH 浓度下 PSBMA 和 nd-PSBMA 的降解情况

Fig. 4 Degradation of PSBMA nanogels by GSH. (A) Comparison of

PSBMA before and after adding GSH (10 mM) for 120 min.

(B) The degradation of PSBMA and nd-PSBMA nanogels with different concentrations of GSH measured by relative turbidity.

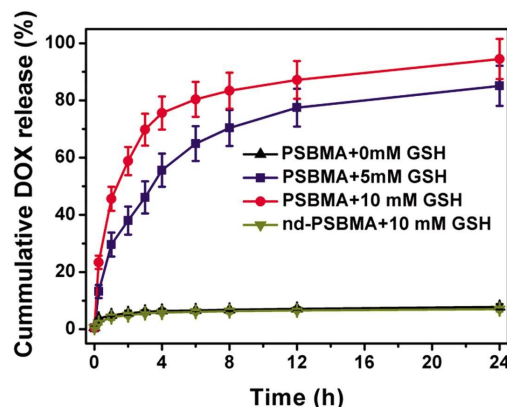


图 5 载 DOX 纳米凝胶的释放行为

Fig. 5 The drug release profiles of DOX-loaded nanogels. The PSBMA and nd-PSBMA nanogels were in phosphate buffer (pH 7.4) with GSH of different concentrations at 37°C

往文献报道的相仿^[13],载药量明显高于其他纳米材料^[3]。

接着又评估了载药凝胶在体外的释放行为。将 1 mg/mL 负载 DOX 纳米凝胶 PSBMA 置于分子量为 14000 Da 的透析袋中,再将透析袋浸入含有不同 GSH 浓度的 pH 为 7.4 的 PBS 缓冲溶液(释放介质)中。作为对照,将载药 nd-PSBMA 置于透析袋后浸入含 10 mM GSH 的释放介质中,结果如 Fig. 5 所示。与前面的结果(Fig. 3)一致,在没有加入 GSH 时,PSBMA 纳米凝胶在释放介质中非常稳定,24 小时的累积释放率只有 4%左

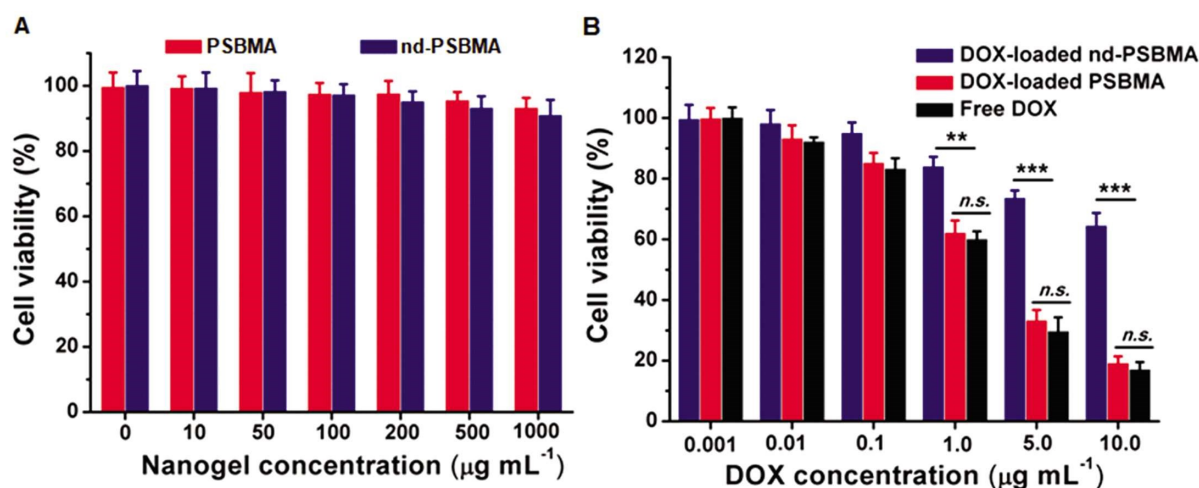


图 6 (A)未载药 PSBMA 和 nd-PSBMA 纳米凝胶的抗 A549 肿瘤细胞的能力;

(B)载药 PSBMA 和 nd-PSBMA 纳米凝胶的抗 A549 肿瘤细胞的能力

Fig. 6 (A) Cell viability of blank PSBMA and nd-PSBMA nanogels against A549 tumor cells;

(B) Cell viability of DOX-loaded PSBMA and nd-PSBMA against A549 cells.

Note: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, n.s. not statistically significant compared with free DOX.

右,进一步证实该纳米凝胶具有良好的稳定性。而当在释放介质中加入 GSH 后,DOX 的释放速度明显加快。当释放介质中加入 5 mM 的 GSH 后,DOX 在 4 小时内即可快速释放 55% 的药物;而释放介质中 GSH 浓度改为 10 mM 时,在相同时间内 DOX 的释放率可达到 75%。4 小时后,药物释放速度明显减慢。在 24 小时后,累积的药物释放率可达到 80%~90%。而在对照凝胶 nd-PSBMA 的释放介质中加入 10 mM 的 GSH 后,没有引发明显的药物释放。以上结果提示 GSH 所诱发的 PSBMA 纳米凝胶降解能够有效促进所包载药物的释放,且初始释放速度呈现一定的浓度依赖性,显示其作为药物控释载体的潜在价值。同时研究还显示药物载体的初始释放速率与 GSH 浓度呈正相关,但后续释放速度逐渐减缓,且不同浓度的 GSH 刺激下它们 24 小时的累积释放量相近,这提示该载体响应 GSH 较为快速,并且具有饱和效应。

2.5 载药纳米凝胶的抗肿瘤特性

为了考察纳米凝胶的潜在应用价值,我们进一步考察了纳米凝胶对 A549 肿瘤细胞的毒性杀伤作用。首先我们评估了空白纳米凝胶的毒性作用。我们直接采用了 A549 肿瘤细胞进行评估,发现即使将凝胶浓度增高到 1000 $\mu\text{g/mL}$,肿瘤细胞也没出现明显杀伤(Fig. 6A)。既往在人咽喉癌细胞(FaDu)的研究也发现,在纳米凝胶增高到 200 $\mu\text{g/mL}$ 时也未出现明显的损伤^[10]。以上结果提示所制备的纳米凝胶具备良好的生物相容性。此外,从图中还可以发现由 MBA 交联的 nd-PSBMA 对细胞的毒性也极小,这证明纳米凝胶所选择的 SBMA 单体安全性良好,而且制备过程中也未混入有毒杂质。

接着用纳米凝胶载抗肿瘤药物 DOX 进行评价。当所载 DOX 浓度达到 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 时,载药 PSBMA 纳米凝胶开始对细胞出现明显杀伤,其杀伤作用与游离 DOX 相仿,且呈现剂量-效应关系(Fig. 6B)。而载药 nd-PSBMA 只有在所载 DOX 浓度达到 10 $\mu\text{g/mL}$ 才有一定的抗肿瘤效应,与在 FaDu 细胞上得到的结果类似,显示出该药物载体的普适性。以上研究结果提

示 PSBMA 包载的 DOX 在肿瘤细胞内能够充分释放从而发挥作用,而不含二硫键的 nd-PSBMA 所包载的 DOX 因为难以有效释放出药物而影响了药物疗效,提示 PSBMA 具有成为抗肿瘤药物的控释性载体的潜力。

3 结论

采用回流沉淀聚合法可以得到 PSBMA 纳米水凝胶,制备过程可以无需加入任何表面活性剂,反应快速且不带入其他杂质,生物相容性良好。所制备的 PSBMA 纳米凝胶粒径在 200 nm 以内,具有潜在的靶向优势。此外,由于纳米凝胶内二硫键的存在而具有还原响应性,体外研究显示其药效与游离药物效果相仿,提示其可在还原环境中完全释放出其包载的药物,显示出良好的应用前景,因此该纳米凝胶有望成为治疗多种疾病特别是肿瘤性疾病的潜在药物载体,下一步有必要利用该载体在多种疾病模型上进行在体研究。

参考文献(References)

- [1] 邵望. 靶向聚合物胶束用于小分子药物的脑内递送[D]. 复旦大学, 2013
- [2] Pelaz B, Alexiou C, Alvarez-Puebla RA, et al. Diverse Applications of Nanomedicine[J]. ACS Nano, 2017, 11(3): 2313-2381
- [3] Karimi M, Ghasemi A, Sahandi Zangabad P, et al. Smart micro/nanoparticles in stimulus-responsive drug/gene delivery systems[J]. Chemical Society Reviews, 2016, 45(5): 1457-1501
- [4] Plamper FA, Richtering W. Functional Microgels and Microgel Systems[J]. Accounts of Chemical Research, 2017, 50(2): 131-140
- [5] Hashimoto Y, Mukai SA, Sawada S, et al. Nanogel tectonic porous gel loading biologics, nanocarriers, and cells for advanced scaffold [J]. Biomaterials, 2015, 37: 107-115
- [6] Cheng R, Feng F, Meng F, et al. Glutathione-responsive nano-vehicles as a promising platform for targeted intracellular drug and gene delivery [J]. Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society, 2011, 152(1): 2-12
- [7] Koo AN, Lee HJ, Kim SE, et al. Disulfide-cross-linked PEG-poly(amino

- acid)s copolymer micelles for glutathione-mediated intracellular drug delivery[J]. *Chemical Communications*, 2008, (48): 6570-6572
- [8] Li Y, Xiao K, Luo J, Xiao W, et al. Well-defined, reversible disulfide cross-linked micelles for on-demand paclitaxel delivery [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(27): 6633-6645
- [9] Wu J, Zhao L, Xu X, et al. Hydrophobic cysteine poly (disulfide) based redox hypersensitive nanoparticle platform for cancer theranostics[J]. *Angewandte Chemie*, 2015, 54(32): 9218-9223
- [10] Chiang YT, Yen YW, Lo CL. Reactive oxygen species and glutathione dual redox-responsive micelles for selective cytotoxicity of cancer[J]. *Biomaterials*, 2015, 61: 50-161
- [11] Kamaly N, Yameen B, Wu J. Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: mechanisms of controlling drug release [J]. *Chemical Reviews*, 2016, 116(4): 2602-2663
- [12] 许利娜, 马培培, 陈强, 等. 甲基丙烯酸乙基磺基甜菜碱类聚合物的生物应用[J]. *化学进展*, 2013, 26(0203): 366-374
- [13] Men Y, Peng S, Yang P, et al. Biodegradable Zwitterionic Nanogels with Long Circulation for Antitumor Drug Delivery[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018, 10(28): 23509-23521
- [14] Cheng G, Mi L, Cao Z, et al. Functionalizable and ultrastable zwitterionic nanogels [J]. *Langmuir the ACS Journal of Surfaces & Colloids*, 2010, 26(10): 6883-6886
- [15] Zhang L, Xue H, Cao Z, et al. Multifunctional and degradable zwitterionic nanogels for targeted delivery, enhanced MR imaging, reduction-sensitive drug release, and renal clearance[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(20): 4604-4608
- [16] Fan M, Wang F, Wang CC, et al. Reflux Precipitation Polymerization: A New Platform for the Preparation of Uniform Polymeric Nanogels for Biomedical Applications [J]. *Macromolecular Bioscience*, 2018, 18(8): 1800077
- [17] Jo DH, Kim JH, Lee TG, et al. Size, surface charge, and shape determine therapeutic effects of nanoparticles on brain and retinal diseases [J]. *Nanomedicine Nanotechnology Biology & Medicine*, 2015, 11(7): 1603-1611
- [18] Raemdonck K, Demeester J, Smedt SD. Advanced nanogel engineering for drug delivery[J]. *Soft Matter*, 2009, 5(4): 707-715
- [19] Schöttler S, Landfester K, Mailänder V. Controlling the stealth effect of nanocarriers through understanding the protein corona [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2016, 55(31): 8806-8815
- [20] Mahmoudi M, Bertrand N, Zope H, et al. Emerging understanding of the protein corona at the nano-bio interfaces [J]. *Nano Today*, 2016, 11(6): 817-832
- [21] Obst K, Yealland G, Balzus B, et al. Protein corona formation on colloidal polymeric nanoparticles and polymeric nanogels: impact on cellular uptake, toxicity, immunogenicity, and drug release properties [J]. *Biomacromolecules*, 2017, 18(6): 1762-1771
- [22] Zhang HJ, Wu TM, Yu WQ, et al. Gao, interfaces, Ligand size and conformation affect the behavior of nanoparticles coated with in vitro and in vivo protein corona [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018, 10(10): 9094-9103
- [23] Lundqvist M, Stigler J, Elia G, et al. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts[J]. *PNAS*, 2008, 105(38): 14265-14270

(上接第 3404 页)

- [18] Low HB, Zhang Y. Regulatory Roles of MAPK Phosphatases in Cancer[J]. *Immune Netw*, 2016, 16(2): 85-98
- [19] Malemud CJ. Intracellular Signaling Pathways in Rheumatoid Arthritis[J]. *J Clin Cell Immunol*, 2013, 4(4): 160
- [20] Morrison DK. MAP Kinase Pathways[J]. *Cold Spring Harb. Perspect Biol*, 2012, 4(11): a011254
- [21] Keyse SM. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2008, 27(2): 253-261
- [22] Camps M, Nichols A, Gillieron C, et al. Catalytic activation of the phosphatase MKP-3 by ERK2 mitogen-activated protein kinase [J]. *Science*, 1998, 280(5367): 1262-1265
- [23] Slack DN, Seternes O, Gabrielsen M, et al. Distinct Binding Determinants for ERK2/p38 α and JNK MAP Kinases Mediate Catalytic Activation and Substrate Selectivity of MAP Kinase Phosphatase-1[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(19): 16491-16500
- [24] Chen P, Hutter D, Yang X, et al. Discordance between the binding affinity of mitogen-activated protein kinase subfamily members for MAP kinase phosphatase-2 and their ability to activate the phosphatase catalytically[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(31): 29440-29449
- [25] Guan KL, Broyles SS, Dixon JE. A Tyr/Ser protein phosphatase encoded by vaccinia virus[J]. *Nature*, 1991, 350(6316): 359-362
- [26] Magigalluzzi C, Mishra R, Fiorentino M, et al. Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 is overexpressed in prostate cancers and is inversely related to apoptosis[J]. *Lab Invest*, 1997, 76(1): 37-51
- [27] Denkert C, Schmitt WD, Berger S, et al. Expression of mitogen activated protein kinase phosphatase 1 (MKP-1) in primary human ovarian carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2002, 102(5): 507-513
- [28] Wang H, Cheng Z, Malbon CC. Overexpression of mitogen-activated protein kinase phosphatases MKP1, MKP2 in human breast cancer[J]. *Cancer Lett*, 2003, 191(2): 229-237
- [29] Liao Q, Guo J, Kleeff J, et al. Down-Regulation of the Dual-Specificity Phosphatase MKP-1 Suppresses Tumorigenicity of Pancreatic Cancer Cells[J]. *Gastroenterology*, 2003, 124(7): 1830-1845
- [30] Candas D, Lu C, Fan M, et al. Mitochondrial MKP1 Is a Target for Therapy-Resistant HER2-Positive Breast Cancer Cells[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(24): 7498-7509