

pH/葡萄糖双响应载药胶束的制备及性能研究

陈凤娇, 张佳颖, 戴范佳, 赵玲玲*

(宁波大学 材料科学与化学工程学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 针对肿瘤部位低 pH 值、高葡萄糖浓度的微环境特点, 设计并制备了 pH/葡萄糖双响应载药胶束对葡聚糖进行改性, 先通过酯化反应与苯硼酸结合, 再通过葡萄糖响应的苯硼酸酯键与具有二醇结构的维生素 B₂ 偶联, 形成两亲性聚合物, 该聚合物在水溶液中能够自组装形成胶束, 包封疏水药物阿霉素. 用核磁共振氢谱和动态光散射等对该载药胶束进行表征, 并模拟人体生理环境进行药物体外释放行为研究. 结果表明, 阿霉素在载药胶束内能够持续释放, 且能降低环境 pH 值、增大葡萄糖浓度, 从而加快药物释放速度. 由于肿瘤部位的 pH 值低于正常组织、葡萄糖浓度高于正常组织, 而具有四面体结构的苯硼酸可以与顺式二醇化合物(如葡萄糖)形成稳定的苯硼酸酯, 使平衡向亲水形式增加、疏水形式减少的方向改变. 因此, 以苯硼酸为基底的材料具有葡萄糖响应性, 使其成为治疗肿瘤相关疾病的理想材料.

关键词: 阿霉素; 胶束; pH 敏感; 葡萄糖敏感; 药物递送

中图分类号: TQ937

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2023) 02-0102-06

葡萄糖(Glucose)是一种单糖, 在自然界分布最广, 也是最重要的一种单糖, 还是细胞代谢的中间体, 在生物领域的地位极为重要. 葡萄糖浓度是区别正常组织和肿瘤组织的一项重要参数, 由于肿瘤细胞的异常增殖, 因此其新陈代谢比正常细胞更为旺盛, 需要获取更多的葡萄糖, 使得肿瘤细胞外的葡萄糖浓度比正常细胞外的葡萄糖浓度高 3~10 倍^[1-2]. 根据这一特点, 关于葡萄糖敏感的高分子针对肿瘤部位的载体特异性释放研究潜力巨大. 具有葡萄糖响应的药物递送系统能够根据血液中葡萄糖浓度的变化控制药物释放, 并调控血糖水平.

以苯硼酸(PBA)为构筑单元的高分子材料具有葡萄糖敏感的特点, PBA 体系具有稳定且可以长期保存的优点, 同时用于药物的自调式控制释放的含 PBA 载体具有可逆的葡萄糖响应性优势^[3-4], 因此 PBA 作为一种路易斯酸在药物传递领域得到了极为广泛的应用. PBA 的 pK_a 值为 8.2~8.6^[5], 在水溶液中 PBA 有未电离的平面三角形的疏水形式和

电离的立体正四面体的亲水形式, 且这 2 种形式之间存在可逆的动态平衡^[6-7]. 这 2 种形式均能够与具有二醇结构的维生素 B₂(VB₂)通过苯硼酸酯键特异性结合, 形成具有五元环的苯硼酸酯复合物.

苯硼酸酯键具有在碱性和中性环境中相对稳定, 而在酸性条件发生裂解的特点, 表明苯硼酸酯键非常适合作为酸敏感的药物载体的内部单元^[8], 但是具有四面体结构的 PBA 与葡萄糖形成的苯硼酸酯具有更高的亲水性和稳定性. 当溶液 pH 值大于 PBA 的 pK_a 时, PBA 主要以带负电的相对亲水的构型存在, 此时 PBA 修饰的聚合物载体与葡萄糖特异性结合后可以形成亲水性较强的苯硼酸酯, 使得 PBA 的电离平衡正向移动^[9]. 这种电离平衡向正向移动的方式使得由 PBA 改性的载体亲水性提高, 且 PBA 空间立体构型的改变能增大载体材料的空间体积. 这 2 种作用均使得药物载体在葡萄糖浓度变化的刺激下释放出负载的药物, 并且葡萄糖浓度越大药物释放速度越快, 释放总量也越大^[10], 这给 PBA 以及 PBA 衍生物在葡萄糖敏感的

收稿日期: 2022-05-05.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journal.g.nbu.edu.cn/>

基金项目: 省属高校基本科研业务费项目(理)(SJLY2021002).

第一作者: 陈凤娇(1997-), 女, 湖北十堰人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 生物医用材料. E-mail: 2371166460@qq.com

*通信作者: 赵玲玲(1986-), 女, 湖南会同人, 副教授, 主要研究方向: 生物医用材料. E-mail: zhaolingling@nbu.edu.cn

药物递送系统中应用带来广阔前景。VB₂也称核黄素,是B族维生素的一种,具有多羟基结构,与PBA通过葡萄糖响应的苯硼酸酯键形成偶联物,将其作为两亲性聚合物的疏水端。

本文以疏水药物阿霉素(DOX)为模型药物,对葡聚糖(Dex)进行改性,以Dex亲水端苯硼酸酯键连接的VB₂为疏水端,形成一端亲水一端疏水的两性聚合物(Dex-CPBA-VB₂)。Dex-CPBA-VB₂在溶液中能够自组装形成胶束,将疏水药物DOX包裹在胶束内核中,形成具有疏水性内核和亲水性外壳的聚合物胶束。苯硼酸酯键具有pH敏感性,在酸性条件下断裂^[11],会释放DOX药物分子。DOX是一种广谱抗肿瘤抗生素,可以抑制RNA和DNA的合成,属于周期非特异性药物,对各种生长周期的肿瘤细胞都有杀灭作用^[12]。DOX通过嵌入DNA而抑制核酸的合成^[13]。同时,PBA能够与1,2或1,3-顺式二醇特异性结合形成的苯硼酸酯复合物,使得载体能够在高葡萄糖浓度条件下释放出药物分子。

1 实验部分

1.1 试剂与原料

葡聚糖相对分子质量为10 kDa、1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯(DBU)购于麦克林化学试剂有限公司。VB₂购于源叶生物有限公司。3-羧基苯硼酸(CPBA)、二甲基亚砜(DMSO)、盐酸阿霉素(DOX·HCl)、三乙胺(TEA)购于阿拉丁化学试剂有限公司。1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺(EDC·HCl)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)、碳酸氢钠(NaHCO₃)、磷酸氢二钠(Na₂HPO₄)、磷酸二氢钠(NaH₂PO₄)购于国药集团化学试剂有限公司。

1.2 苯硼酸-葡聚糖偶联物(Dex-CPBA)的合成

Dex-CPBA通过酯化反应制备得到^[14]。具体操作步骤为:将CPBA(165.9 mg, 1 mmol)、EDC·HCl(383.4 mg, 2 mmol)和DMAP(146.6 mg, 1.2 mmol)在20 mL DMSO中依次溶解,混合后保持温度为50℃,搅拌2 h,以激活CPBA的羧基;然后将Dex(162.1 mg, 1 mmol)的DMSO 10 mL加入上述溶液中,常温磁力搅拌24 h;再将混合溶液转移到透析袋(8 000~14 000 Da)中透析3 d,每4 h换一次水,将保留液冷冻干燥,获得白色絮状产物(产率57.1%)。

1.3 VB₂-苯硼酸-葡聚糖偶联物(Dex-CPBA-VB₂)的合成

Dex-CPBA与VB₂络合通过苯硼酸酯键连接^[15]。将Dex-CPBA(310.0 mg, 1 mmol)、VB₂(376.36 mg, 1 mmol)、DBU(1 mL, 7 mmol)在60 mL干燥DMSO中与无水硫酸钠(5 g)搅拌36 h;反应完成后,抽滤除去过量的无水硫酸钠,将滤液转移至透析袋中(8 000~14 000 Da),在pH=8(用NaHCO₃调节)的去离子水中透析3 d,然后转移至去离子水中透析2次,每4 h换一次水,整个过程需避光。冻干得到黄色絮状产物(产率66.3%)。

1.4 载药胶束(Dex-CPBA-VB₂/DOX)的合成

Dex-CPBA-VB₂能在水中自组装形成胶束,封装疏水药物DOX。具体操作步骤为:称取10 mg DOX·HCl置于小棕瓶中,加入5 mL甲醇搅拌溶解;在剧烈搅拌条件下,将20 μL三乙胺逐滴加入上述甲醇溶液中,常温下避光搅拌12 h;称取20 mg的Dex-CPBA-VB₂完全溶解于10 mL水中,使其终质量浓度为2 mg·mL⁻¹,在搅拌条件下,缓慢将疏水化DOX的甲醇溶液逐滴加入聚合物水溶液中,常温避光搅拌24 h;然后将其转移到透析袋(8 000~14 000 Da)中透析24 h,每4~6 h换一次水。整个过程需避光,再冷冻干燥,得到暗红色载药胶束(产率70.7%)。对照DOX标准曲线,计算疏水药物DOX的载药率(R_{DLC})和包封率(R_{DLE})。

$$R_{DLC} = \frac{m_1}{m_2} \times 100\%,$$

$$R_{DLE} = \frac{m_1}{m_3} \times 100\%,$$

式中: m_1 是载药胶束聚集体中DOX质量; m_2 是冻干胶束总质量; m_3 是投入DOX总量。

1.5 结构及性质表征

1.5.1 核磁共振氢

用Bruker Advance 400 MHz的核磁共振仪对Dex-CPBA和Dex-CPBA-VB₂结构进行表征。将待测样品分散在氘代DMSO中,配成终质量浓度为20 mg·mL⁻¹溶液,最后放入核磁共振仪中采集。

1.5.2 临界胶束浓度测定

用芘作为荧光探针,用荧光光谱法分析测定聚合物临界胶束浓度(CMC)^[16]。具体操作步骤为:首先称取一定量芘溶于丙酮中,定容其终浓度为

$10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 静置一段时间后, 分别取 $400 \mu\text{L}$ 上述溶液移至 9 个 10 mL 的小棕瓶中, 将丙酮完全吹干. 聚合物样品分散于 $\text{pH}=7.4$ 的 PBS 中, 配置成质量浓度为 $0.000 1 \sim 0.500 0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液各 2 mL , 依次加入上述处理后的小棕瓶中, 震荡摇匀, 37°C 恒温避光搅拌 24 h . 设置激发波长为 335 nm , 发射波长范围 $350 \sim 500 \text{ nm}$. 荧光强度由 F-2700 荧光分光光度计在发射波长为 335 nm 处记录, 在 372 nm 和 383 nm 处荧光强度的比值(I_{372}/I_{383})与所处溶液环境的极性有关. 2 个荧光强度的比值对聚合物浓度(C)的对数($\log C$)作图, 曲线的突变点所对应的浓度即为聚合物的临界胶束浓度.

1.5.3 聚合物胶束粒径分布测试

采用动态光散射(DLS)方法测量空白胶束和载药胶束的平均胶束尺寸及其分布. 具体操作步骤为: 待测样品超声 30 min , 使其在介质中分散均匀. 测试中配置样品质量浓度为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 用英国马尔文 Zetasizer Nano 纳米粒度仪对其进行 DLS 分析, 每次测量重复 3 次, 取平均值.

1.5.4 体外药物释放

采用透析方式研究载药胶束的体外药物释放行为. 将 9.0 mg 的载药胶束(Dex-CPBA-VB₂/DOX)超声分散于 9 mL 的 PBS 缓冲液中($\text{pH}=7.4$), 移取 1 mL 上述溶液置于透析袋中($8\ 000 \sim 14\ 000 \text{ Da}$), 将两端扎好的透析袋置于 10 mL 不同条件缓冲液中, 37°C 水浴孵育. 在预设时间间隔里, 从棕瓶里取 2 mL 释放液, 并补加 2 mL 新鲜的 PBS 缓冲液. 用荧光光谱法测定取出的 2 mL 释放液中 DOX 含量. 设定激发波长为 494 nm , 发射波长为 $505 \sim 630 \text{ nm}$, 选择发射波长为 594 nm 处的荧光强度 I_{594} 值对照 DOX 标准曲线, 计算释放液中 DOX 含量, 激发和发射的狭缝宽度均为 5 nm , 电压为 600 V , 扫描速度为 $2\ 000 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$.

2 结果与讨论

2.1 Dex-CPBA-VB₂ 的合成

Dex 与 CPBA 结合通过酯化反应完成, 合成路线如图 1 所示. 通过核磁共振氢谱证实, 在化学位移 7.5 、 7.9 、 8.1 、 8.4 处出现的峰归属于 CPBA 中苯环上的氢, 表明 Dex-CPBA 合成成功^[17]. Dex-CPBA 与 VB₂ 偶联是通过苯硼酸酯键进行, 合成路

线如图 1 所示. 通过核磁共振氢谱证实(图 2(c)), 在化学位移为 11.3 处的峰归属于 VB₂ 上氨基的氢, 在化学位移为 8.0 处的峰归属于 VB₂ 上苯环的氢. 与图 2(a)对比发现, 化学位移为 8.0 处的峰面积明显增大, 表明 VB₂ 已成功接在 Dex-CPBA 上.

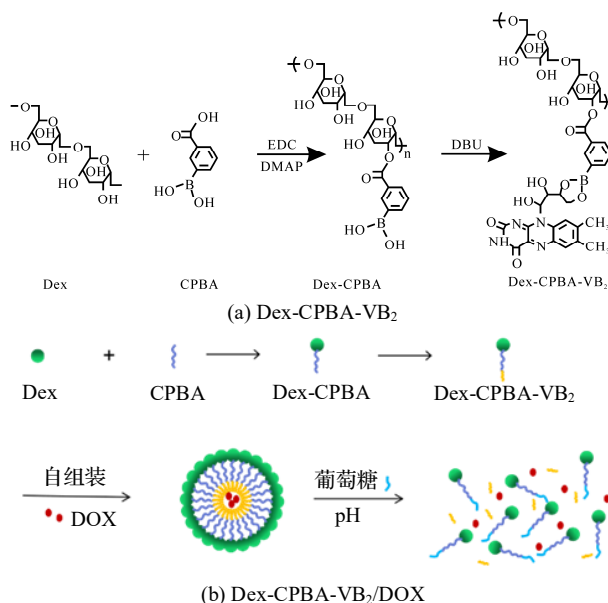
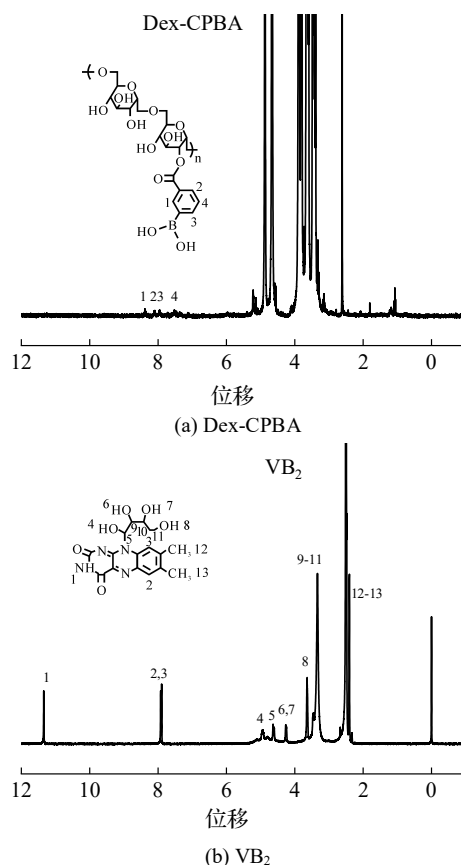


图 1 合成路线及药物释放示意图



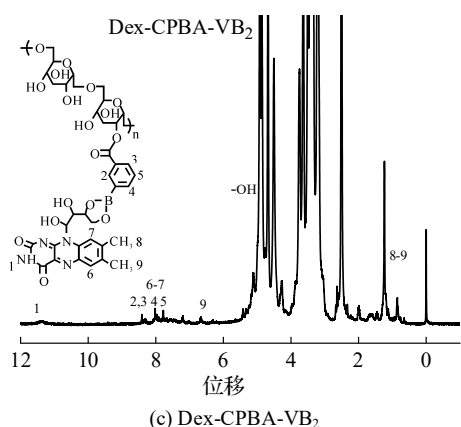
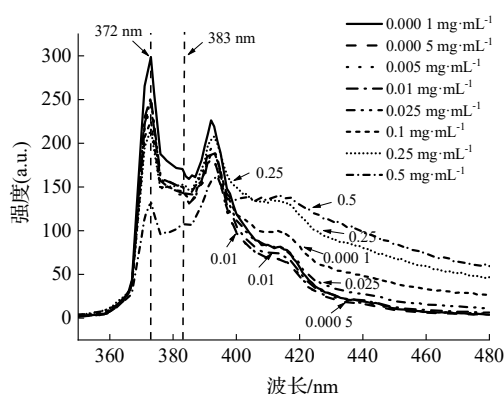
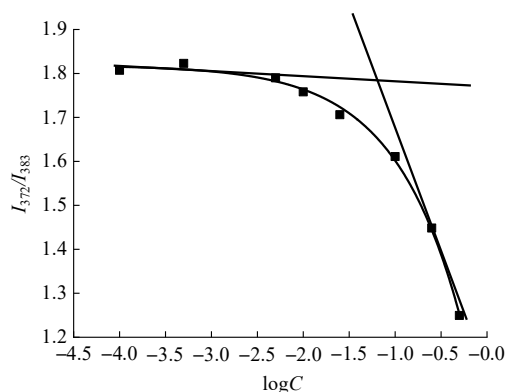


图2 核磁共振氢谱

2.2 聚合物胶束形貌及粒径的表征

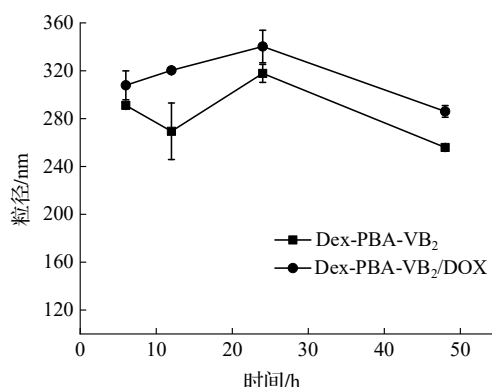
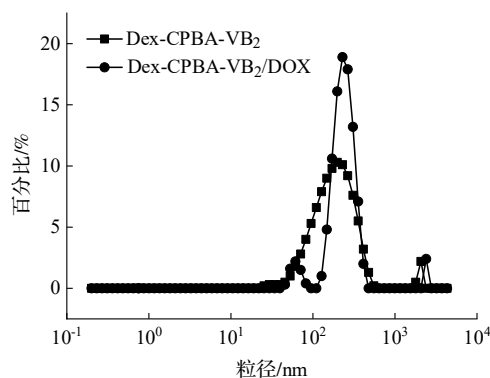
芘荧光探针法测定 Dex-CPBA-VB₂ 的 CMC 值, 结果如图 3 所示. 聚合物水溶液在 372 nm 和 383 nm 处荧光强度比值(I_{372}/I_{383})与聚合物浓度的关系, 如图 4 所示.

图3 Dex-CPBA-VB₂ 溶液中芘的荧光发射光谱图4 荧光强度比值与 Dex-CPBA-VB₂ 浓度对数关系

随着 Dex-CPBA-VB₂ 聚合物浓度的逐渐增大, I_{372}/I_{383} 显著下降, 曲线拐点处切线交点即为 Dex-CPBA-VB₂ 的 CMC 值(图 4), 约为 $0.067 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

由于载药体系注入到体内后, 体液及组织液会对聚合物有一定的稀释作用, CMC 值低对药物载体有重要意义.

用葡萄糖敏感的苯硼酸酯键将 Dex-CPBA 和 VB₂ 键合, 通过自组装形成的 Dex-CPBA-VB₂ 以及载 DOX 胶束, 在 PBS 7.4 条件下 48 h 内粒径分别保持在 $(290.2 \pm 128.9) \text{ nm}$ 和 $(321.7 \pm 141.6) \text{ nm}$ 内稳定(图 5). 聚合物 Dex-CPBA-VB₂ 载 DOX 时粒径明显增大(图 6).

图5 Dex-CPBA-VB₂ 和 Dex-CPBA-VB₂/DOX 在 PBS 7.4 下的粒径随时间变化关系图6 Dex-CPBA-VB₂ 和 Dex-CPBA-VB₂/DOX 的粒径分布

2.3 Dex-CPBA-VB₂/DOX 载药及其体外药物释放行为

实验测得, 由 DOX 在 DMSO 中的紫外标准曲线得 Dex-CPBA-VB₂/DOX 的载药率为 41.6%, 包封率为 88.9%. 为了检测胶束的可行性, 在 37 °C 条件下进行模拟释放过程(图 1(b)), 释放介质分别为 PBS 6.5、PBS 6.5(含 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的葡萄糖)和 PBS 7.4. 考察 Dex-CPBA-VB₂/DOX 的胶束在不同 pH 值和不同葡萄糖浓度下 DOX 的体外药物释放行为, 其累积释药曲线如图 7 所示. 从图 7 可见,

疏水药物 DOX 能从聚合物胶束中缓慢且持续释放, 没有突然释放现象. 降低释放液 pH 值或增加葡萄糖浓度均会导致释放加快, 这是因为在有葡萄糖存在条件下 PBA 能够和葡萄糖结合形成亲水性较好的化合物, 从而导致 Dex-CPBA-VB₂/DOX 胶束聚集体的溶胀或瓦解, 加快了所负载 DOX 的释放, 实现药物的葡萄糖响应性. 在生理 pH 7.4 条件下, DOX 在 96 h 时的累积释放量为 13.1% (图 7). 将释放介质 pH 值降至 6.5 时, DOX 在 96 h 时的累积释放量为 14.7%, 与此同时将释放介质的葡萄糖浓度升至 50 mmol·L⁻¹ 时, DOX 在 96 h 时的累积释放量为 27.7%.

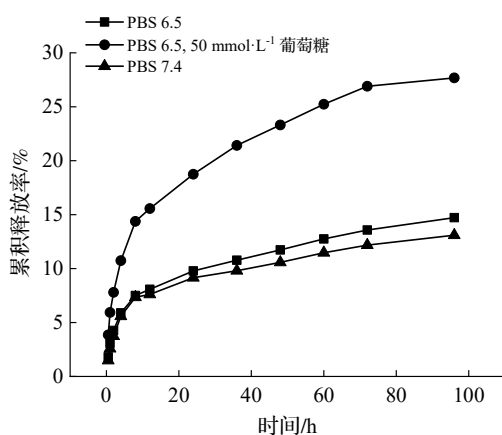


图 7 不同 pH 及葡萄糖浓度下 DOX 的体外释放曲线

此外, 由于某些疾病可能导致病灶区生理微环境发生微小改变, 如固态肿瘤细胞外 pH 值较血液和正常组织细胞外 pH 值低, 而其葡萄糖浓度较正常组织高. 这些生物体内的生理微环境差异为构筑智能药物释放体系提供了促发机制, 所以抗癌药物 DOX 释放的 pH 响应性和葡萄糖响应性对肿瘤治疗具有重要意义.

3 结语

本文以 Dex 为基础材料, 制备了 pH 响应和葡萄糖响应的双响应胶束. 通过酯化反应将 CPBA 与 Dex 偶联, 然后通过葡萄糖响应的苯硼酸酯键将 VB₂ 与 PBA 偶联. 该聚合物在水溶液中能够自组装形成胶束, 并能有效包封疏水药物 DOX. 体外药物释放实验表明, 其体外药物释放行为持续可控, 且具有葡萄糖响应性和 pH 响应性. 当释放介质的 pH 值处于正常生理条件时, 药物释放较慢,

降低释放介质 pH 值可以加快药物释放速度. 当释放介质中没有葡萄糖存在时药物释放速度缓慢, 而有葡萄糖存在时药物释放速度明显加快(96 h 的累积释放率约是前者的 2 倍). 由于肿瘤部位具有低 pH 值、高葡萄糖浓度的特殊微环境, 该载药胶束的这种低 pH 值、高葡萄糖浓度触发的药物释放行为对于肿瘤的治疗具有积极意义, 可用于发展新型抗肿瘤药物体系.

参考文献:

- [1] Ganapathy V, Thangaraju M, Prasad P D. Nutrient transporters in cancer: Relevance to Warburg hypothesis and beyond[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2009, 121(1):29-40.
- [2] Manna U, Patil S. Glucose-triggered drug delivery from borate mediated layer-by-layer self-assembly[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2010, 2(5):1521-1527.
- [3] Wu Q, Wang L, Yu H J, et al. Organization of glucose-responsive systems and their properties[J]. *Chemical Reviews*, 2011, 111(12):7855-7875.
- [4] Ma R J, Shi L Q. Phenylboronic acid-based glucose-responsive polymeric nanoparticles: Synthesis and applications in drug delivery[J]. *Polymer Chemistry*, 2014, 5(5):1503-1518.
- [5] Matsumoto A, Ikeda S, Harada A, et al. Glucose-responsive polymer bearing a novel phenylborate derivative as a glucose-sensing moiety operating at physiological pH conditions[J]. *Biomacromolecules*, 2003, 4(5):1410-1416.
- [6] Li D J, Chen Y, Liu Z. Boronate affinity materials for separation and molecular recognition: Structure, properties and applications[J]. *Chemical Society Reviews*, 2015, 44(22):8097-8123.
- [7] Guo H L, Li H M, Gao J T, et al. Phenylboronic acid-based amphiphilic glycopolymeric nanocarriers for *in vivo* insulin delivery[J]. *Polymer Chemistry*, 2016, 7(18): 3189-3199.
- [8] 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.
- [9] 黄琼卫, 赵丽, 宋之明, 等. 葡萄糖敏感苯硼酸基高分子纳米药物传输体系[J]. *应用化学*, 2017, 34(7):733-743.
- [10] Guan Y, Zhang Y J. Boronic acid-containing hydrogels: Synthesis and their applications[J]. *Chemical Society Reviews*, 2013, 42(20):8106-8121.

- [11] Li L X, Bai Z W, Levkin P A. Boronate-dextran: An acid-responsive biodegradable polymer for drug delivery[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(33):8504-8510.
- [12] 李怡飞. 担载顺铂的纳米微粒治疗骨肉瘤的应用研究[D]. 长春: 吉林大学, 2015.
- [13] Frigerio C, Ribeiro D S M, Rodrigues S S M, et al. Application of quantum dots as analytical tools in automated chemical analysis: A review[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2012, 735:9-22.
- [14] Zhang C G, Yang S H, Zhu Y, et al. Formation of bowl-shaped nanoparticles by self-assembly of cinnamic acid-modified dextran[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 133: 637-643.
- [15] Lee S, Stubelius A, Hamelmann N, et al. Inflammation-responsive drug-conjugated dextran nanoparticles enhance anti-inflammatory drug efficacy[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018, 10(47):40378-40387.
- [16] 任霞, 王珏, 孙会敏, 等. 表面活性剂临界胶束浓度测定方法的建立和比较[J]. *中国药事*, 2020, 34(8):916-924.
- [17] Dehghani B, Hosseini M S, Salami-Kalajahi M. Neutral pH monosaccharide receptor based on boronic acid decorated poly(2-hydroxyethyl methacrylate): Spectral methods for determination of glucose-binding and ionization constants[J]. *Microchemical Journal*, 2020, 157: 105112.

Preparation and properties of pH/glucose dual responsive micelles system for drug delivery

CHEN Fengjiao, ZHANG Jiaying, DAI Fanjia, ZHAO Lingling*

(School of Materials Science and Chemical Engineering, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: In view of the microenvironmental characteristics of low pH value and high glucose concentration in tumor site, pH and glucose dual responsive drug loading micelles are designed and prepared accordingly in this study. Dextran is modified and combined with phenylboric acid through esterification reaction, and then coupled with vitamin B₂ with diol structure through glucose response phenylboric acid ester bond to form amphiphilic polymer. The polymer can self-assemble into micelles in aqueous solution, which encapsulate the hydrophobic drug doxorubicin. The drug-loaded micelles are characterized by ¹H NMR and dynamic light scattering, and the drug release behavior in vitro is studied by simulating human physiological environment. The results show that doxorubicin can be released continuously in the loaded micelles, and the release rate can be accelerated by decreasing pH value and increasing glucose concentration. Because tumor sites have lower pH and higher glucose concentrations than normal tissue and tetrahedral phenylboric acid can form stable phenylborate esters with diol compounds such as glucose, this shifts equilibrium in the direction of increasing hydrophilic forms and decreasing hydrophobic forms. As a result, phenylboric acid-based materials are glucose responsive, and the transformation of this material makes them ideal for diagnosing tumor-related diseases.

Key words: DOX; micelles; pH-sensitive; glucose-sensitive; drug delivery

(责任编辑 史小丽)