

· 论著 ·

双配体修饰聚合物泡囊的制备及细胞摄取

解方园, 俞媛, 耿雯倩, 钟延强(第二军医大学药学院药剂学教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的** 构建一种主动靶向的新型纳米药物载体——聚合物泡囊(polymer vesicles, PVs), 并考察其细胞摄取。**方法** 以马来酰亚胺-聚乙二醇-聚乳酸-羟基乙酸共聚物(MAL-PEG-PLGA)为载体材料, 通过自组装制备PVs, 用转铁蛋白(Tf)与Tet-1对PVs进行修饰, 构建纳米药物载体(Tf/Tet-1-PVs)。以香豆素-6作为荧光探针包载于药物载体, 考察脑微血管内皮细胞(BCEC)及神经细胞(Neuro-2a)对载体系统的摄取。**结果** PVs粒径约80 nm, 形态圆整, 电镜观察具有明显膜层结构。BCEC细胞和Neuro-2a细胞对Tf/Tet-1-PVs的摄取均显著优于空白对照组和单配体修饰对照组。**结论** PVs经双配体Tf及Tet-1修饰后可促进脑微血管内皮细胞和神经细胞的摄取。

[关键词] 脑靶向; 聚合物泡囊; 血脑屏障

[中图分类号] R943 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2015)01-0044-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.01.011

The preparation and the cell uptake of polymer vesicles modified with dual ligands

XIE Fangyuan, YU Yuan, GENG Wenqian, ZHONG Yanqiang (Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To construct an active targeting drug delivery system- polymer vesicles(PVs), and examined the cellular uptake. **Methods** Maleimide- polyethylene glycol-poly(lactic-co-glycolic acid) (MAL-PEG-PLGA) was used as carrier materials to prepare PVs by self-assembling. And then PVs was modified by Tf and Tet-1(Tf/Tet-1-PVs). To evaluate its active targeting, coumarin-6 was used as a fluorescent probe to analyze cellular uptake of PVs for both BCEC and Neuro-2a cells. **Results** PVs was about 80 nm with rounded shape and had obvious film structure. Tf/Tet-1-PVs exhibited a significant role in promoting cellular uptake for both BCEC and Neuro-2a cells compared with control and single ligand-modified group. **Conclusion** PVs modified with dual ligands could promote the cell uptake for both brain capillary cells and nerve cells.

[Key words] brain targeting; polymer vesicles; blood-brain barrier(BBB)

中枢神经系统(central nervous system, CNS)疾病, 包括神经退行性疾病及脑部肿瘤等, 严重危害着人类的健康^[1]。然而, 由于血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)的存在, 绝大多数治疗药物无法通过BBB转运至脑内^[2]。因此, 构建一种新型的具有脑内靶向递药作用的载药系统至关重要。

纳米药物载体, 包括纳米粒、脂质体、聚合物胶束、树形分子复合物等, 对改善药物的体内稳定性、缓释给药以及靶向给药均起到非常重要的作用。脂质体是其中应用最为广泛的纳米载体, 目前上市的药物中, 有阿霉素脂质体、紫杉醇脂质体和顺铂脂质

体等^[3-6]。这些脂质体药物具有精确的靶向性和较强的缓释作用, 使药物作用明显增强, 并解决了很多药物所伴有的毒性以及特殊部位给药难的问题。但是, 脂质体在应用中存在的最大问题是稳定性差, 包括药物易泄漏、磷脂易氧化和降解等。

聚合物泡囊(polymer vesicles, PVs)^[7]是一种新型的纳米药物载体, 由嵌段聚合物通过自组装制备, 外层为双分子膜层结构, 类似脂质体, 但是稳定性大大优于脂质体, 其水性内核可以包封亲水性药物, 外膜层可以包载脂溶性药物。因此在客分子的包封中具有很大的潜在应用价值。此外, 通过调节聚合物的比例及修饰靶向配体, 可以构建主动靶向于特定组织和细胞的PVs。

本研究合成了可生物降解的嵌段聚合物马来酰亚胺-聚乙二醇-聚乳酸-羟基乙酸共聚物(MAL-PEG-PLGA), 以其作为载体材料, 通过自组装制备了PVs, 在PVs表面通过共价键连接Tf与Tet-1肽, 构建纳米药物载体(Tf/Tet-1-PVs)。从而增加

[基金项目] 国家自然科学基金(81302714); 上海市科委纳米专项(11nm0504400)

[作者简介] 解方园, 硕士研究生. Tel: (021) 81871288; E-mail: xiefangyuan2013@163.com

[通讯作者] 钟延强, 教授, 博士生导师. 研究方向: 生物大分子药物的控缓释靶向给药系统研究. Tel: (021) 81871285; E-mail: yqzhong68@163.com

BBB的转运及神经细胞的摄取,实现中枢神经系统的主动靶向性。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 磁力搅拌器(国华电器有限公司);R系列旋转蒸发器(上海申生科技有限公司);万分之一电子天平 AL104、十万分之一电子天平 BP211D(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司);核磁共振仪 Avance II 600(美国 Bruker 公司);Zeta Sizer Nano ZS 激光粒度分析仪(英国 Malvern 公司);透射电镜 JEM-2010(日本 JEOL 公司);激光共聚焦扫描显微镜(德国 Leica 公司)

1.2 试剂 DL-丙交酯、乙交酯(济南岱罡生物科技有限公司);MAL-PEG₃₅₀₀-OH(北京键凯科技有限公司);辛酸亚锡、转铁蛋白、Traut 试剂、香豆素-6、DAPI(美国 Sigma 公司);Tet-1(杭州中肽生化有限公司);葡聚糖凝胶(Sephacrose CL-4B)(瑞典 Pharmacia 公司);硼酸钠、乙二胺四乙酸钠盐(EDTA)、多聚甲醛、丙酮、氯仿、氘代氯仿(CDCl₃)(中国医药集团上海化学试剂分公司);BCA 试剂盒(上海碧云天生物科技研究所);胆酸钠(日本东京化学工业有限公司);DMEM 培养基、Hank 缓冲液、胰酶(美国 Hyclone 公司);胎牛血清、双抗(美国 Gibco 公司)

2 实验方法

2.1 PVs 的制备和表征

2.1.1 高分子材料 MAL-PEG-PLGA 的合成 称取一定量 DL-丙交酯、乙交酯、MAL-PEG₃₅₀₀-OH,按物质的量比为 75:25:50 加入到三颈瓶中,适量辛酸亚锡甲苯溶液催化,抽真空充氮气保护,油浴 150℃,搅拌 48 h,自然静置至室温,以氯仿溶解产物,滴加到过量的甲醇溶液中使产物析出,以过量冷的甲醇溶液反复洗涤、沉淀 3 次,真空干燥 72 h, -20℃ 保存。称取少量上述终产物溶于 CDCl₃ 中,通过¹H NMR 鉴定,对产物结构进行分析^[8]。

2.1.2 PVs、Tet-1-PVs、Tf-PVs 及 Tf/Tet-1-PVs 的制备 取适量的 MAL-PEG-PLGA 溶解于 1 ml 丙酮,缓慢滴加到 PBS(pH7.4)溶液中,低速搅拌 30 min,静置 4 h,旋转蒸发除去丙酮,即得 PVs。载香豆素-6 的 PVs 则将香豆素-6 同时溶于丙酮中。

取适量 Tet-1 溶解于去离子水中,之后加入到 PVs 溶液中,调整 pH 到 8.0,避光,充氮气保护,室温搅拌 2 h,过 Sepharose CL-4B 填充柱,除去游离 Tet-1,收集带有白色乳光的 Tet-1-PVs。

将 Tf 溶解于 EDTA(pH8.5)的缓冲液中,按 Tf:Traut 试剂摩尔比 1:40 混合,避光充氮气保护,室温搅拌 1 h,采用 PBS 为洗脱液,脱盐除去 Traut 试剂,即得巯基化的 Tf。将上述巯基化的 Tf 加入到 PVs 或 Tet-1-PVs 溶液中,避光,充氮气保护,室温搅拌 6 h,过 Sepharose CL-4B 填充柱,除去游离 Tf,收集带有白色乳光的 Tf-PVs 或 Tf/Tet-1-PVs。

2.1.3 PVs 的表征 取 1 ml PVs 溶液,置于粒径测量皿中,用激光粒度分析仪测定 PVs 的粒径。将一定量 PVs 小心滴加到载有碳膜的铜网上,用红外灯小心缓慢烘干,透射电镜观察 PVs 的形态。

2.1.4 BCA 测定 配制浓度分别为 0、10、20、30、40、50、60 μg/ml 的 BSA 标准品溶液,用 BCA 试剂盒测定吸光度值建立标准曲线。然后取等量的 PVs、Tet-1-PVs、Tf-PVs 及 Tf/Tet-1-PVs,用相同方法测定吸光度值,根据标准曲线计算蛋白浓度。

2.2 细胞培养 脑微血管内皮细胞(BCEC)由第二军医大学药理学教研室芮耀诚教授惠赠,神经细胞(Neuro-2a)购于 ATCC 细胞库,培养基条件为含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基(含双抗),于 37℃,5% CO₂ 孵箱中培养。

2.3 细胞摄取 将 BCEC 和 Neuro-2a 以 4×10⁵/孔分别接种到玻璃底皿中心圆槽内,孵育 24 h,待细胞贴壁后,除去培养基,用 Hank 缓冲液洗涤 3 次。分别加入不同的载有香豆素-6 的聚合物泡囊组(PVs、Tet-1-PVs、Tf-PVs 及 Tf/Tet-1-PVs),在 4℃ 或 37℃ 条件下孵育 2 h,除去 PVs 溶液,用 Hank 缓冲液洗涤 5 次,4%多聚甲醛固定 20 min,DAPI 染色 10 min,Hank 缓冲液再次洗涤 5 次,于激光共聚焦显微镜下观察。

3 结果

3.1 MAL-PEG-PLGA 的合成 ¹H-NMR 对 MAL-PEG-PLGA 各官能团的归属解析如下(图 1):a 为 1.65/100 万属于 LA 结构中的甲基峰,b 为 3.65/100 万属于 PEG 结构中的亚甲基峰,c 为 4.75/100 万属于 LA 结构中的次甲基峰,d 为 5.25/100 万属于 GA 结构中的亚甲基峰,e 为 6.70/100 万属于 MAL 结构中的次甲基峰。

根据 MAL-PEG₃₅₀₀-OH 数均相对分子质量为 3 500,即 Mn(PEG)=3 500,可通过 3.7/100 万左右左右的 PEG 结构中的亚甲基峰,4.8/100 万左右 LA 结构中的次甲基峰、5.2/100 万左右 GA 结构中的亚甲基峰峰面积计算 MAL-PEG-PLGA 的相对分子质量。计算公式如下:

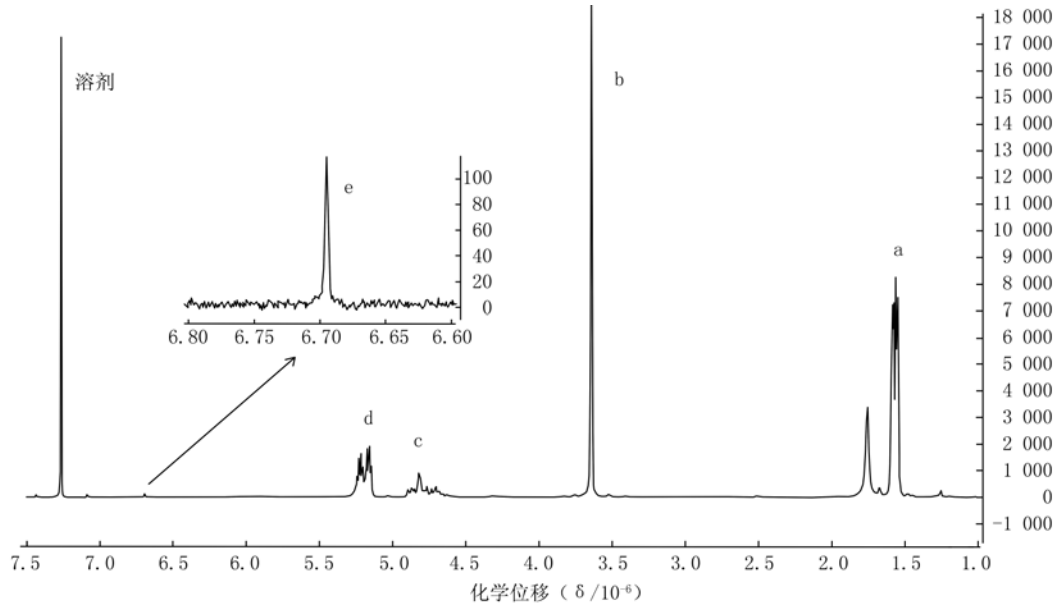


图1 MAL-PEG-PLGA的¹H-NMR图谱

$$\frac{n \cdot 4}{A_1} = \frac{x}{A_2} = \frac{2y}{A_3}$$

$$Mn = \frac{4Mn(PEG) \cdot A_2 \cdot 72}{44 \cdot A_1} + \frac{2Mn(PEG) \cdot A_3 \cdot 58}{44 \cdot A_1} + Mn(PEG)$$

LA : GA = x : y

n = Mn(PEG)/44

A1: PEG 结构中的亚甲基峰峰面积;

A2: LA 结构中的次甲基峰峰面积;

A3: GA 结构中的亚甲基峰峰面积;

44: PEG 单体结构-O-CH₂-CH₂-的相对分子质量;

72: LA 单体结构-O-CO-CH(CH₃)-的相对分子质量;

58: GA 单体结构-O-CO-CH₂-的相对分子质量。

将¹H NMR 中积分结果代入上式,求得MAL-PEG-PLGA相对分子质量为14 648, LA : GA=54 : 46。

3.2 PVs 的粒径及形态 动态光散射法测得PVs粒径为77.71±2.68 nm,见图2。透射电镜观察PVs 粒径分布均匀,形态圆整,具有明显的外部膜层结构,见图3。

3.3 BCA 测定结果 BCA法测得的标准曲线为Y=1.067 X+0.110 2(r=0.999 8)。根据标准曲线计算得到PVs、Tet-1-PVs、Tf-PVs及Tf/Tet-1-PVs的蛋白浓度分别为1.64、26.99、44.80、56.05 μg/ml,如图4所示,与PVs组相比,Tet-1-

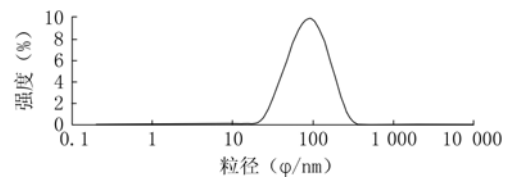


图2 PVs的粒径测量图

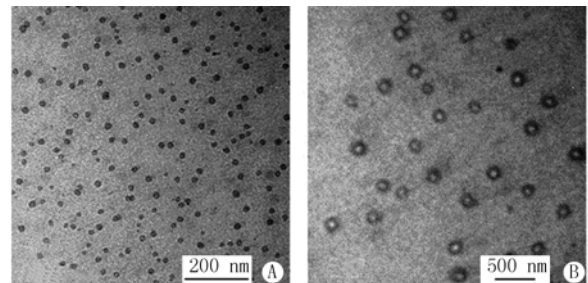


图3 PVs的透射电镜图(A.×20 000;B.×80 000)

PVs和Tf-PVs组蛋白浓度显著增加,而Tf/Tet-1-PVs组最高,表明Tet-1及Tf与PVs成功偶联。

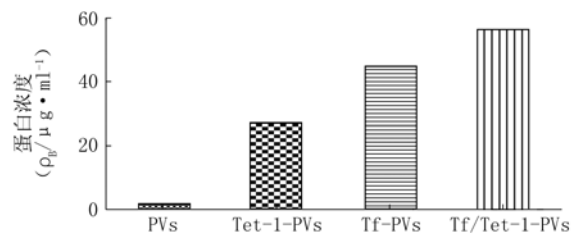


图4 BCA测定的蛋白浓度

3.4 细胞摄取

3.4.1 4℃和37℃条件下BCEC细胞和Neuro-2a细胞摄取 激光共聚焦显微镜观察结果显示,

BCEC 细胞(图 5)在 4 °C 条件下,所有组的荧光强度都较弱,说明温度对细胞的摄取具有影响。在 37 °C 条件下,Tf/Tet-1-PVs 和 Tf-PVs 的荧光强度较强,其次是 Tet-1-PVs 和空白 PVs。说明 PVs 可通过 Tf 介导增加 BCEC 细胞的摄取。

Neuro-2a 细胞(图 6)在 4 °C 条件下,类似前述 BCEC 细胞对 PVs 的摄取结果。在 37 °C 条件下,Tf/Tet-1-PVs 和 Tet-1-PVs 的荧光强度较强,其次是 Tf-PVs 和空白 PVs。说明 PVs 可通过 Tet-1 介导增加 Neuro-2a 细胞的摄取。

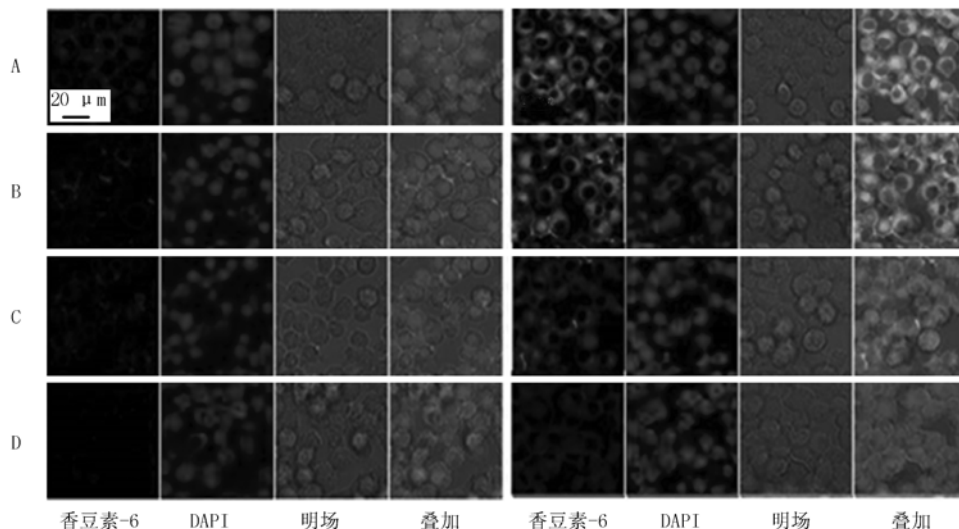


图 5 BCEC 细胞在 4 °C (左)及 37 °C (右)条件下对载香豆素-6 聚合物泡囊的摄取(×630)
A. Tf/Tet-1-PVs 组;B. Tf-PVs 组;C. Tet-1-PVs 组;D. 空白 PVs 组

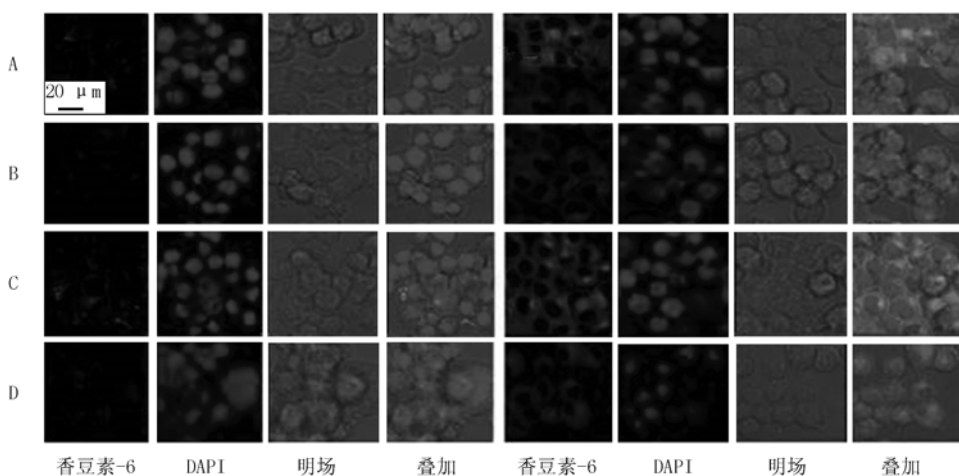


图 6 Neuro-2a 细胞在 4 °C (左)及 37 °C (右)条件下对载香豆素-6 聚合物泡囊的摄取(×630)
A. Tf/Tet-1-PVs 组;B. Tf-PVs 组;C. Tet-1-PVs 组;D. 空白 PVs 组

3.4.2 游离 Tf、Tet-1 的竞争性抑制作用 在 37 °C 条件下,BCEC 细胞中分别加入游离 Tf 与 Tet-1 混合物、游离 Tf 及游离 Tet-1 的 Hank 溶液,随后加入载香豆素-6 的 Tf/Tet-1-PVs 孵育。摄取结果如图 7 所示,加入游离 Tf、Tet-1 混合物及游离 Tf 组的荧光强度相比游离 Tet-1 及空白 Hank 溶液组明显降低,说明 Tf 与 BCEC 细胞上的受体结合竞争性抑制了载药系统的摄取,而游离 Tet-1 组的竞争抑制作用不明显。

在 Neuro-2a 细胞中(图 8),加入游离 Tf 和

Tet-1 混合物及游离 Tet-1 组的荧光强度相比游离 Tf 及空白 Hank 溶液组明显降低,说明 Tet-1 与 Neuro-2a 细胞上的受体结合竞争性抑制了载药系统的摄取,而游离 Tf 组的竞争抑制作用不明显。

4 讨论

本研究以 MAL-PEG-PLGA 为载体材料,通过自组制备 PVs,制备方法温和,有利于药物的包载而且不影响其性质,所得粒子结构圆整、粒径均一。在脑微血管内皮细胞的腔侧具有 Tf 受体,Tf 能够

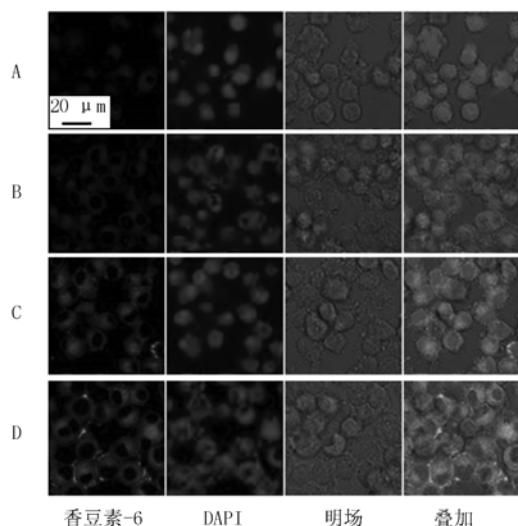


图7 游离 Tf、Tet-1 对 BCEC 细胞摄取
聚合物泡囊的竞争性抑制作用(×630)

- A. 细胞同游离 Tf、Tet-1 共孵育然后加入 Tf/Tet-1-PVs;
B. 细胞同游离 Tf 共孵育然后加入 Tf/Tet-1-PVs;
C. 细胞同游离 Tet-1 共孵育然后加入 Tf/Tet-1-PVs;
D. 细胞同 Hank 溶液共孵育然后加入 Tf/Tet-1-PVs

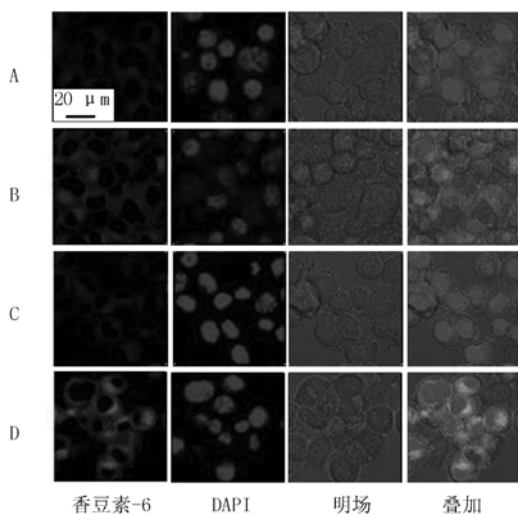


图8 游离 Tf、Tet-1 对 Neuro-2a 细胞摄取
聚合物泡囊的竞争性抑制作用(×630)

- A. 细胞同游离 Tf、Tet-1 共孵育然后加入 Tf/Tet-1-PVs;
B. 细胞同游离 Tf 共孵育然后加入 Tf/Tet-1-PVs;
C. 细胞同游离 Tet-1 共孵育然后加入 Tf/Tet-1-PVs;
D. 细胞同 Hank 溶液共孵育然后加入 Tf/Tet-1-PVs

与受体特异性结合。当 Tf 与 Traut 试剂反应发生巯基化后,可以进一步与 MAL-PEG-PLGA 中的马来酰亚胺基发生加成反应,实现对载药粒子的表面修饰,从而能够主动靶向透过 BBB 实现药物的脑内转运^[9]。Tet-1 是最近研究发现的一种可与神经细胞上的 GT1b 受体特异性结合的小肽^[10],其由 12 个氨基酸组成,末端半胱氨酸上的巯基可直接与

MAL-PEG-PLGA 中的马来酰亚胺基反应,将 Tet-1 连接于 PVs 表面,可以实现载药系统透过 BBB 后对神经细胞的二级靶向作用。细胞内摄取实验表明,温度对两种细胞的摄取均有一定的影响。另外, BCEC 细胞对 Tf/Tet-1-PVs 和 Tf-PVs 的摄取量相对较高,而 Neuro-2a 细胞对 Tf/Tet-1-PVs 和 Tet-1-PVs 的摄取量相对较高。游离的 Tf 可与 BCEC 细胞上的受体结合竞争性抑制载药系统的摄取,游离 Tet-1 可与 Neuro-2a 细胞上的受体结合竞争性抑制载药系统的摄取。因此,也验证了载体系统经配体介导实现主动靶向。

本研究制备了一种新型的聚合物泡囊纳米药物载体,并对其进行双配体的修饰,以实现脑部的主动转运。构成 BBB 的脑微血管内皮细胞以及神经细胞对所构建的载体系统均具有较优的摄取。我们将在后续实验中对载药系统的体外及体内脑靶向性进行系统考察。

【参考文献】

- [1] 吴珍,杜士明,董永成. 纳米粒作为脑靶向给药系统的研究进展[J]. 中国药房,2007,18(13):1029-1031.
- [2] Pardridge WM. Blood-brain barrier drug targeting: the future of brain drug development[J]. Mol Interv, 2003, 3(2): 90-105.
- [3] Overmoyer B, Silverman P, Holder LW, et al. Pegylated liposomal doxorubicin and cyclophosphamide as first-line therapy for patients with metastatic or recurrent breast cancer[J]. Clin Breast Cancer, 2005, 6(2): 150-157.
- [4] Vorobiof DA, Rapoport BL, Chasen MR, et al. First line therapy with paclitaxel (Taxol) and pegylated liposomal doxorubicin (Caelyx) in patients with metastatic breast cancer: a multicentre phase II study[J]. Breast, 2004, 13(3): 219-226.
- [5] Boulikas T. Clinical overview on lipoplatin: a successful liposomal formulation of cisplatin [J]. Expert Opin Investig Drugs, 2009, 18(8): 1197-1218.
- [6] Gentile E, Cilirzo F, Marzio LD, et al. Liposomal chemotherapeutics[J]. Future Oncol, 2013, 9(12): 1849-1859.
- [7] 陆彬. 新型给药系统聚合物泡囊及其研究进展(上)[J]. 中国药师, 2009, 12(4): 439-442, 446.
- [8] Cheng JJ, Tepley BA, Sherifi I, et al. Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery[J]. Biomaterials, 2007, 28(5): 869-876.
- [9] Zhang PC, Hu LJ, Yin Q, et al. Transferrin-modified c[RGD-fk]-paclitaxel loaded hybrid micelle for sequential blood-brain barrier penetration and glioma targeting therapy [J]. Mol Pharm, 2012, 9(6): 1590-1598.
- [10] Kwon EJ, Lasiene J, Jacobson BE, et al. Targeted nonviral delivery vehicles to neural progenitor cells in the mouse subventricular zone[J]. Biomaterials, 2010, 31(8): 2417-2424.

[收稿日期] 2014-10-11 [修回日期] 2014-11-25
[本文编辑] 顾文华