基于 Poly(A)/二氧化硅纳米颗粒的 pH 可控释放 抗肿瘤药物载体

何晓晓^{①†}, 陈素叶^{①†}, 陈冕^{①②}, 王柯敏^{①②*}, 邹振^①, 王玉双^①, 杨淑娜^①

① 湖南大学生物学院, 化学生物传感与计量学国家重点实验室, 生物纳米与分子工程湖南省重点实验室, 长沙 410082;

② 湖南大学化学化工学院, 长沙 410082

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: kmwang@hnu.edu.cn

2012-12-12 收稿, 2013-01-29 接受, 2013-06-13 网络版发表

国家自然科学基金重大项目(21190044)、国家自然科学基金(21175039)、湖南省自然科学基金创新研究群体(10JJ7002)、湖南省科技计划(2012TT1003)、国家高技术研究发展计划(2011AA02A114)和高等学校博士学科点专项科研博导类基金(20110161110016)资助

摘要 利用异喹啉类生物碱小分子化合物与腺嘌呤(A 碱基)在酸性条件结合力下降的特点, 以具有良好生物相容性、DNA 酶切保护性以及易于生物修饰的二氧化硅纳米颗粒为载体, 发展了一种基于聚 A 链(Poly(A))/二氧化硅纳米颗粒(Poly(A)/SiNPs)的 pH 可控释放抗肿瘤药物体系. 在该体系中, 选择了甲氧槲因(coralyn)作为药物模式分子, 通过共价修饰方法在二氧化硅纳米颗粒表面修饰 Poly(A), 获得 Poly(A)/SiNPs 颗粒, 通过 A 碱基-甲氧槲因-A 碱基结合方式构建了甲氧槲因载药体系. 采用琼脂糖凝胶电泳、透射电子显微镜以及荧光光谱等方法对载药体系进行了表征, 考察了载药体系的稳定性和在不同 pH 缓冲液中的释放情况, 并采用激光共聚焦成像技术和 MTT 方法分别考察了该体系在 Hela 细胞内的定位以及杀伤效果. 结果表明: Poly(A)被成功修饰在二氧化硅纳米颗粒上后能很好地与甲氧槲因结合, 构建甲氧槲因载药体系, 该体系在中性条件具有较好的稳定性, 而在酸性条件下(pH<6), 由于甲氧槲因与 A 碱基的结合力减弱而被释放出来, 实现 pH 的控制释放. 细胞成像结果显示, 该载药体系能被细胞内吞并聚集于溶酶体内, 通过利用溶酶体的酸性环境释放药物, 实现了对肿瘤细胞的杀伤. 该体系较好地实现了甲氧槲因抗肿瘤药物的装载和释放, 为发展这一类抗肿瘤药物的载体提供了新方法.

关键词

甲氧槲因

聚 A 链(Poly(A))

二氧化硅纳米颗粒

pH 可控释放药物载体

纳米药物载体由于具有延长药物循环时间、减少非特异性吸附、提高药物治疗针对性、减少用药量、降低毒副作用等优点, 在生物医学领域具有广泛的应用前景^[1,2]. 纳米药物载体主要通过胶囊式包裹和形成纳米级复合物实现药物的装载. 胶囊式包裹纳米载药体系是指将药物包载在有机或无机纳米材料内, 通过一定的封堵机制形成核壳结构的载药纳米颗粒^[3,4], 如脂质体^[5,6]、溶胀性凝胶^[7,8]、介孔二氧化

硅^[9-11]和金纳米笼^[12]等. 这种胶囊式包裹通过把药物装载在纳米颗粒内部, 可以保护药物不被降解, 但同时药物也较难释放出来, 需要一些复杂的释放机制如溶胀作用、断裂作用以及其他一些门控释放机制^[13,14]. 纳米级复合物载药体系是以纳米材料或聚合物为支撑载体, 药物通过共价结合、范德华力、亲疏水键、偶极-偶极、静电吸附等^[15-17]作用力结合在支撑载体上后形成的纳米颗粒载药体系. 相对于胶

引用格式: 何晓晓, 陈素叶, 陈冕, 等. 基于 Poly(A)/二氧化硅纳米颗粒的 pH 可控释放抗肿瘤药物载体. 科学通报, 2014, 59: 181-187

He X X, Chen S Y, Chen M, et al. pH controlled release anticancer drug delivery based on poly(A)/SiO₂ nanoparticles(in Chinese). Chin Sci Bull (Chin Ver), 2014, 59: 181-187, doi: 10.1360/972012-1770

囊式包裹, 纳米级复合物载药体系不需要复杂的封堵和释放机制, 如 Chau 等人^[18]以高分子聚合物右旋糖酐为载体, 通过多肽的桥接作用将抗肿瘤药物甲氨蝶呤与聚合物共价交联形成纳米级复合物载药体系, 多肽共价键在人体纤维瘤细胞过度表达的矩阵金属蛋白酶作用下断裂, 药物得到释放; He 等人^[19]以聚酰胺-胺型树枝状高分子(PAMAM)为载体, 将阿霉素通过静电吸附作用结合在 PAMAM 上, 形成纳米级复合物载药体系, 实现较好的抗肿瘤效果. 当然, 目前报道的大部分纳米级复合物载药体系依然存在一些不足, 如共价结合药物的方式可能因交联步骤复杂影响药物的构型进而影响药效等, 而静电吸附的结合方式易受到其他离子的影响. 因此, 发展一种稳定性好, 制备简便, 生物相容性好, 不影响药物分子理化药效, 易于实现定点可控释放的智能载药体系具有非常重要的意义.

氢键是自然界中常见的作用力, 其作用力介于共价交联和分子间作用力之间, 比静电吸附的方式更稳定, 而释放条件比共价交联温和, 具有动态可逆特点^[20], 因此通过氢键作用力结合有望实现药物装载、富集及释放. 异喹啉类生物碱小分子化合物通过氢键作用与肿瘤细胞内 mRNA 末端过度表达的聚 A 结合, 从而抑制 mRNA 翻译和蛋白质的表达, 最终达到抗肿瘤的效果^[21]. 利用聚 A 核酸链结合异喹啉类生物碱小分子构建氢键自组装体系, 同时结合二氧化硅纳米颗粒的一些特点, 如易于被细胞吞噬, DNA 酶切保护, 以及易于修饰、分离纯化等^[22-24], 进一步拓展核酸在体内载药运输的应用. 基于此, 我们发展了一种基于 Poly(A)/二氧化硅纳米颗粒(Poly(A)/SiNPs)的 pH 可控释放抗肿瘤药物体系. 该体系在中性条件下, 修饰在二氧化硅纳米颗粒表面的 Poly(A)和甲氧槲因通过氢键的结合方式具有较好的稳定性, 而在肿瘤细胞内酸性环境下, 氢键结合力下降, 从而实现药物的释放并达到抗肿瘤效果.

1 实验

1.1 试剂与仪器

羧基硅烷化试剂(*N*-(三甲氧基硅丙基)乙二胺三乙酸钠盐, CPTES)、LysoTracker Green 指示探针(鼎国公司, 中国); MES 缓冲液、PBS 缓冲液、D-Hank's 液均为自配; 甲氧槲因(coralyn, Acros 公司, 美国);

Poly(A)(5'-NH₂-(A)₅₉)由上海生物生工有限公司合成; 1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)-碳化二亚胺(EDC, Sigma 公司, 美国); *N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS, Sigma 公司, 美国); RPM11640 培养基、胰蛋白酶(GIBCO 公司, 美国); 实验用水为超纯水(18.2 MΩ); 其他试剂均为国产分析, 宫颈癌细胞系(Hela)由本实验室提供.

高速离心机(Hitachi 公司, 日本); 恒温摇床(Grant 公司, 美国); 透射电子显微镜(电子光学研究所, 日本); 凝胶成像系统(泰亚赛福公司, 中国); 荧光分光光度计(Hitachi 公司, 日本); 紫外-可见分光光度计(Beckman 公司, 英国); 扫描激光共聚焦显微镜(Olympus 公司, 日本); 酶标仪(Bio-Rad 公司, 美国); 细胞培养箱(Nuair 公司, 美国).

1.2 实验方法

(i) Poly(A)/二氧化硅纳米颗粒(Poly(A)-SiNPs)的制备. 首先采用反向微乳法^[25]合成羧基化二氧化硅纳米颗粒(COOH-SiNP), 具体合成法如下: 将环己烷 7.5 mL、正己醇 1.6 mL 和表面活性剂 Triton X-100 1.8 mL 混合均匀后, 加入 480 μL 超纯水于常温下搅拌 30 min, 再将 100 μL 氨水和 100 μL TEOS 加入到微乳液体系中, 连续搅拌 24 h. 然后加入 60 μL 羧基硅烷化试剂(CPTES), 于室温下继续搅拌反应 24 h 后, 破乳、离心分离颗粒, 获得 COOH-SiNP 颗粒. 采用 EDC/NHS 交联方法^[26]将 Poly(A)修饰到 COOH-SiNP 表面, 具体操作程序为: 取 2 mg COOH-SiNP 分散于 1 mL MES 缓冲液中, 加入 3.5 mg NHS 和 1.2 mg EDC, 在上述混合液中再加入 1.2 nmol Poly(A), 于室温下振荡 8 h 后离心收集颗粒, 用超纯水洗涤 3 次, 即得到 Poly(A)-SiNPs, 采用琼脂糖凝胶电泳法考察 Poly(A)是否成功修饰在二氧化硅纳米颗粒表面.

(ii) 甲氧槲因-Poly(A)/SiNPs 复合物的制备. 取 2 mg Poly(A)/SiNPs 颗粒分散在 1 mL 500 μmol/L 甲氧槲因水溶液中, 于室温中振荡 1 h 后离心收集颗粒, 用超纯水洗涤 3 次, 即得到甲氧槲因-Poly(A)/SiNPs. 因为甲氧槲因在 420 nm 处激发后可以发出很强的荧光^[27], 为了考察甲氧槲因是否通过与 SiNPs 表面修饰的 Poly(A)相结合而成功富载在 Poly(A)/SiNPs 上, 采用荧光方法测量了 Poly(A)/SiNPs 在修饰甲氧槲因前后的荧光光谱.

(iii) 甲氧槲因-Poly(A)/SiNPs 复合物性能考察.

采用标准曲线法, 首先配置一系列已知浓度的甲氧槲因溶液, 分别测其紫外-可见吸光度, 以浓度-吸光度作甲氧槲因的标准曲线, 并拟合标准方程. 取 2 mg COOH-SiNP 颗粒进行修饰 Poly(A) 后装载药物, 分散在 1 mL 超纯水里, 测定紫外-可见吸收强度, 根据标准方程得到甲氧槲因的浓度, 分别按照下面公式计算获得甲氧槲因-Poly(A)/SiNPs 的包载量和包封率. 重复实验 3 次, 取平均值. 甲氧槲因-Poly(A)/SiNPs 复合物稳定性考察, 即把 2 mg 甲氧槲因-Poly(A)/SiNPs 分散在 1 mL PBS(pH 7.4) 缓冲液中, 连续 3 天每隔一段时间离心取上层清液测其紫外-可见吸收强度.

包载量 = 颗粒中药物的分子数 / 加入的二氧化硅纳米颗粒个数, (1)

包封率(%) = (颗粒上的药物量 / 实际投入的药物量) × 100%. (2)

(iv) 甲氧槲因-Poly(A)/SiNPs 复合物的 pH 响应释放行为研究. 取 1 mg 甲氧槲因-Poly(A)/SiNPs 分散在 300 μ L pH 分别为 2, 4, 5, 6, 7 的缓冲液中, 每隔一段时间离心取上层清液在 420 nm 处检测甲氧槲因紫外-可见吸收强度. 以时间-释放百分比为横纵坐标作不同 pH 下甲氧槲因-Poly(A)/SiNPs 的释放动力学曲线.

(v) 甲氧槲因-Poly(A)/SiNPs 复合物的细胞实验. 为了考察甲氧槲因-Poly(A)/SiNPs 复合物是否能被细胞吞噬以及在细胞内的定位, 选取对数生长期的 HeLa 细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 以每孔 10^4 个细胞接种于激光共聚焦皿内, 将接种了细胞的培养皿放入 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 的培养箱中培养 12 h 后, 将甲氧槲因-Poly(A)/SiNPs 加入皿内, 继续孵育 7 h 后清洗颗粒溶液上层清液, 利用 LysoTracker Green 指示探

针实现细胞中的溶酶体标记, 用 PBS 漂洗后, 然后采用扫描激光共聚焦显微镜对细胞进行成像, 随后将皿放入培养箱继续培养 24 h 后, 再进行激光共聚焦成像. 为了考察甲氧槲因-Poly(A)/SiNPs 对癌细胞的杀伤作用, 首先考察未载药的 Poly(A)/SiNPs 载体的毒性, 选取对数生长期的 HeLa 细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 以每孔 3000 个细胞的浓度接种于 96 孔细胞培养板内, 将 96 孔板放入 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 的培养箱中培养 12 h 后, 将不同浓度(0~280 μ g/mL)的 Poly(A)/SiNPs 加入 96 孔培养板中, 在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 的培养箱中继续孵育 48 h, 采用 MTT 法检测细胞的存活率; 同时, 采用相同的方法分别考察了不同载药浓度(0~10 μ g/mL)的甲氧槲因-Poly(A)/SiNPs 复合物以及游离甲氧槲因的细胞毒性情况, 以上实验均重复 3 次.

2 结果和讨论

2.1 pH 响应的甲氧槲因-Poly(A)/SiNPs 复合物制备与控制释放原理

以具有生物亲和性好的二氧化硅纳米颗粒为载体, 通过共价修饰的方法在二氧化硅纳米颗粒表面修饰 Poly(A), 利用 A 碱基-甲氧槲因-A 碱基结合方式构建甲氧槲因载药体系, 由于 A 碱基与甲氧槲因结合的稳定性随 pH 的变化而改变, 从而控制药物的装载和释放. 原理如图 1 所示, 首先合成 COOH-SiNP, 再通过 EDC/NHS 法将 Poly(A) 修饰到 COOH-SiNP 表面, 甲氧槲因通过氢键作用与修饰在二氧化硅纳米颗粒表面的 Poly(A) 以 A 碱基-甲氧槲因-A 碱基结合的方式形成复合物, 从而使药物甲氧槲因装载在二氧化硅纳米颗粒上, 构建甲氧槲因载药体系. 在低 pH 条件下, 氢离子浓度增大, 给质子能力增强,

图 1 pH 响应载药体系的制备及可控释放原理图

打破了氢键平衡, 甲氧槲因和 A 碱基间氢键作用不稳定, A 碱基-甲氧槲因-A 碱基复合物解离, 甲氧槲因释放出来.

2.2 Poly(A)/SiNPs 的表征

采用透射电子显微镜对制备的 COOH-SiNP 形貌进行了观察, 如图 2(A)所示, COOH-SiNP 为规则球形, 颗粒尺寸大小比较均一(50 ± 5 nm). 通过琼脂糖凝胶电泳法对颗粒表面的 Poly(A)修饰情况进行了表征, 如图 2(B)所示, COOH-SiNP 颗粒通过 EDC/NHS 交联方法与 Poly(A)反应后, 点样孔中可以明显观察到 DNA 的显色信号, 而没有与 Poly(A)反应的 COOH-SiNP 颗粒, 在点样孔和凝胶中都没有观察到 DNA 的显色信号, 说明 Poly(A)已成功修饰在二氧化硅纳米颗粒上, 但由于 Poly(A)-SiNPs 复合物比较大, 所以不容易跑出点样孔.

2.3 甲氧槲因-Poly(A)/SiNPs 复合物的性能

(i) 甲氧槲因-Poly(A)/SiNPs 复合物的表征. 采用荧光测定方法考察了甲氧槲因是否被成功装载在 Poly(A)/SiNPs 上, 如图 2(C)示, Poly(A)/SiNPs 颗粒在 420 nm 处激发后没有观察到荧光发射; Poly(A)/SiNPs 颗粒与药物甲氧槲因结合后, 在 420 nm 处激发, 在 520 nm 附近有很强的荧光发射, 荧光光谱测定结果表明甲氧槲因成功结合上 Poly(A)/SiNPs 颗粒.

(ii) 甲氧槲因-Poly(A)/SiNPs 复合物的载药量. 配置一系列浓度的甲氧槲因溶液, 用紫外-可见分光

光度计测其吸光度. 根据浓度-吸光度的对应关系作标准曲线, 并拟合得到标准方程: $Y=0.0032X$, 相关系数为 $R=0.994$. 测定颗粒中载上甲氧槲因的紫外-可见吸光度, 利用标准曲线计算出甲氧槲因的浓度. 根据载药量和包封率的定义, 计算得出甲氧槲因-Poly(A)/SiNPs 的载药量为每个二氧化硅纳米颗粒能载上 1362 个甲氧槲因分子; 包封率为 36.2%.

(iii) 甲氧槲因-Poly(A)/SiNPs 复合物的稳定性. 由于甲氧槲因是通过与 Poly(A)结合而装载在纳米颗粒表面上, 药物分子与 Poly(A)结合的稳定性是载药体系的关键指标. 我们通过考察在室温中性条件下 (pH 为 7.4) 载药体系的释放情况来衡量它的稳定性, 结果如图 3(A)所示, 载药体系在室温中性条件下放置 66 h 后, 其释放量还只有 9.98%. 这一结果表明甲氧槲因-Poly(A)/SiNPs 复合物在室温中性条件下具有相对较好的稳定性.

2.4 甲氧槲因-Poly(A)/SiNPs 复合物的 pH 响应释放行为

为了验证该甲氧槲因载药体系对 pH 的响应性, 分别考察了甲氧槲因在不同 pH 下的缓释行为. 如图 3(B)所示, 在中性条件下甲氧槲因几乎没有释放, 但随着 pH 降低, 甲氧槲因释放量逐渐增大, 当 pH 为 6 时, 在 1 h 左右, 甲氧槲因的释放量就已达到 43.7%, 而 pH 为 7 时释放量只有 1.34%, 这些结果充分表明了通过本文方法制备的甲氧槲因载药体系具有很好的 pH 响应性, 在异喹啉类药物载体以及药物剂型研究领域中具有潜在的应用价值.

图 2 羧基化二氧化硅纳米颗粒电子显微镜图(A)、琼脂糖凝胶电泳图(B)和荧光光谱图(C)

(B) a: COOH-SiNP; b: Poly(A); c: Poly(A)/SiNPs; (C) a: Poly(A)/SiNPs; b: 甲氧槲因-Poly(A)/SiNPs

图3 载药体系在中性(pH 7.4)条件下的稳定性(A)和载药体系的 pH 响应释放行为(B)

(B) a: pH 7, b: pH 6, c: pH 5, d: pH 4, e: pH 2

2.5 甲氧槲因-Poly(A)/SiNPs复合物在细胞内的定位以及细胞杀伤效果

采用扫描激光共聚焦显微镜观察了该复合物被细胞吞噬以及细胞内定位情况,将该复合物和细胞孵育 6 h 后用 PBS 清洗,如图 4(A)所示,甲氧槲因-Poly(A)/SiNPs 复合物能够被 HeLa 细胞吞噬,采用溶酶体标记物对溶酶体进行标记,结果发现,甲氧槲因-Poly(A)/SiNPs 复合物的荧光信号能够与溶酶体标记物的荧光信号共定位,表明甲氧槲因-Poly(A)/SiNPs 复合物被 HeLa 细胞摄取后,主要分布在溶酶体部位.当将该吞噬了甲氧槲因-Poly(A)/SiNPs 复合物的 HeLa 细胞继续培养 24 h 后进行扫描激光共聚焦显微镜成像,结果如图 4(B)所示,整个细胞都分布了甲氧槲因

的荧光信号,这一结果说明该复合物在溶酶体的酸性环境中能够实现甲氧槲因的有效释放.图 5 是 HeLa 细胞分别在未载药颗粒 Poly(A)/SiNPs、载药颗粒甲氧槲因-Poly(A)/SiNPs 和纯甲氧槲因溶液中培养 48 h 后的细胞活性比较.结果表明,在该图示浓度范围内(0~280 $\mu\text{g/mL}$),Poly(A)/SiNPs 载体本身的细胞毒性很小;而甲氧槲因-Poly(A)/SiNPs 和纯甲氧槲因在 1~10 $\mu\text{g/mL}$ 的药物浓度范围内都显示出明显的细胞毒性,并随着药物浓度的增加而增加.其中甲氧槲因-Poly(A)/SiNPs 和纯甲氧槲因的细胞毒性情况相当,这一结果也进一步表明了甲氧槲因-Poly(A)/SiNPs 在细胞内得到较好释放.

3 结论

以具有生物亲和性好的二氧化硅纳米颗粒为载体,通过共价修饰的方法在二氧化硅纳米颗粒表面修饰 Poly(A),利用 A 碱基-甲氧槲因-A 碱基结合方式构建甲氧槲因载药体系,由于 A 碱基与甲氧槲因结合的稳定性随 pH 的变化而改变,从而控制药物的装载和释放.体外研究表明,该复合物体系在室温中性条件下稳定性好,在酸性条件下不稳定,药物得到释放;细胞实验表明,在一定浓度范围内, Poly(A)/SiNPs 载体系统本身对细胞的影响很小,结合了甲氧槲因的 Poly(A)/SiNPs 载药体系能被细胞内吞并聚集于溶酶体内,通过利用溶酶体的酸性环境释放药物,实现了对肿瘤细胞的杀伤.这些研究结果的获得为异喹啉类生物碱小分子化合物的肿瘤治疗研究与应用提供了新思路.

图4 载药体系的细胞吞噬及释放行为研究

(A) HeLa 细胞与颗粒孵育 6 h 清洗颗粒溶液的激光共聚焦图;
(B) HeLa 细胞与颗粒孵育 6 h 后清洗颗粒溶液后加培养基继续孵育 24 h 的激光共聚焦图. 绿色是甲氧槲因的荧光信号; 红色是溶酶体标记物 LysoTracker Green 的荧光信号; 黄色是甲氧槲因和 LysoTracker Green 重叠信号

图 5 MTT 实验图

(A) Poly(A)/SiNPs 对 HeLa 细胞的毒性; (B) 甲氧紫因(a)和甲氧紫因-Poly(A)/SiNPs(b)对 HeLa 细胞的毒性

致谢 感谢刘煜研究员的有益讨论.

参考文献

- 1 Aryal S, Hu C M J, Zhang L F. Polymeric nanoparticles with precise ratiometric control over drug loading for combination therapy. *Mol Pharm*, 2011, 8: 1401–1407
- 2 何晓晓, 刘丹, 王柯敏, 等. 纳米技术在干细胞研究中的应用. *科学通报*, 2010, 55: 637–655
- 3 Mitra S, Gaur U, Ghosh P C, et al. Tumour targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugates using chitosan nanoparticles as carrier. *J Controll Release*, 2001, 74: 317–323
- 4 何晓晓, 海罗, 王柯敏, 等. 基于磷酸化修饰的核/壳硅纳米颗粒药物缓释体研究. *高等学校化学学报*, 2009, 30: 283–288
- 5 郑楠, 郑玉斌. 纳米抗癌药物载体的研究进展. *高分子通报*, 2011, 9: 176–183
- 6 Salafasky B, He Y X, Li J. Short report: Study on the efficacy of a new long-acting formulation of *N, N*-diethyl-*m*-toluamide (DEET) for the prevention of tick attachment. *Am J Trop Med Hyg*, 2000, 62: 169
- 7 Hamidi M, Azadi A, Rafiei P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Adv Drug Delivery Rev*, 2008, 60: 1638–1649
- 8 Gao D, Xu H, Philbert M A, et al. Bioeliminable nanohydrogels for drug delivery. *Nano Lett*, 2008, 8: 3320–3324
- 9 Liu J W, Jiang X M, Ashley C, et al. Electrostatically mediated liposome fusion and lipid exchange with a nanoparticle-supported bilayer for control of surface charge, drug containment, and delivery. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 7567–7569
- 10 Neetu S, Amrita K, Luo G. Bioresponsive mesoporous silica nanoparticles for triggered drug Release. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 19582–19585
- 11 Li Z X, Barnes J C, Bosoy A, et al. Mesoporous silica nanoparticles in biomedical applications. *Chem Soc Rev*, 2012, 41: 2590–2605
- 12 Chen J G, Wang D L, Xi J F, et al. Immuno gold nanocages with tailored optical properties for targeted photothermal destruction of cancer cells. *Nano Lett*, 2007, 7: 1318–1322
- 13 Griset A P, Walpole J, Liu R, et al. Expansile nanoparticles: Synthesis, characterization, and *in vivo* efficacy of an acid-responsive polymeric drug delivery system. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 2469–2471
- 14 Liu R, Zhang Y, Zhao X, et al. pH-responsive nanogated ensemble based on gold-capped mesoporous silica through an acid-labile acetal linker. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 1500–1501
- 15 Thomas T P, Choi S K, Li M H, et al. Design of riboflavin-presenting PAMAM dendrimers as a new nanoplatform for cancer-targeted delivery. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20: 5191–5194
- 16 刘丽娟, 赵学玲, 李强. 磷脂复合物形成机理探讨. *黑龙江医药*, 2009, 22: 146–147
- 17 Allen C, Maysinger D, Eisenberg A. Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. *Colloid Surf B*, 1999, 16: 3–27
- 18 Chau Y, Dang N M, Tan F E, et al. Investigation of targeting mechanism of new dextran-peptide-methotrexate conjugates using biodistribution study in matrix-metalloproteinase-overexpressing tumor xenograft model. *J Pharm Sci*, 2006, 95: 542–552
- 19 He H, Li Y, Jia X R, et al. PEGylated Poly(amidoamine) dendrimer-based dual-targeting carrier for treating brain tumors. *Biomaterials*, 2011, 32: 478–487

- 20 Chen F J, Guo J B, Qu Z J, et al. Novel photo-polymerizable chiral hydrogen-bonded self-assembled complexes: Preparation, characterization and the utilization as a thermal switching reflective color film. *J Mater Chem*, 2011, 21: 8574–8582
- 21 Giri P, Kumar G S. Self-structure induction in single stranded poly(A) by small molecules: Studies on DNA intercalators, partial intercalators and groove binding molecules. *Arch Biochem Biophys*, 2008, 474: 183–192
- 22 He X X, Wang K M, Tan W H, et al. Bioconjugated nanoparticles for DNA protection from cleavage. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 7168–7169
- 23 Dobrovolskaia M A, Aggarwal P, Hall J B, et al. Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution. *Mol Pharm*, 2008, 5: 489–495
- 24 何晓晓, 王柯敏, 谭慰宏, 等. 基于生物荧光纳米颗粒的新型荧光标记方法及其在细胞识别中的应用. *科学通报*, 2001, 46: 1353–1356
- 25 何晓晓, 陈基耘, 王柯敏. 吡啶类菁染料 Cy3 嵌入的核壳荧光纳米颗粒的制备及其性质研究. *高等学校化学学报*, 2006, 27: 1835–1839
- 26 He X X, Hai L, Su J, et al. One-pot synthesis of sustained-released doxorubicin silica nanoparticles for aptamer targeted delivery to tumor cells. *Nanoscale*, 2010, 3: 2936–2942
- 27 Mateos E, Cebolla V L, Membrado L, et al. Coralyne cation, a fluorescent probe for general detection in planar chromatography. *J Chromatogr A*, 2007, 1146: 251–257

pH controlled release anticancer drug delivery based on poly(A)/SiO₂ nanoparticles

HE XiaoXiao¹, CHEN SuYe¹, CHEN Mian^{1,2}, WANG KeMin^{1,2}, ZOU Zhen¹, WANG YuShuang¹ & YANG ShuNa¹

¹State Key Laboratory of Chem/Biosensing and Chemometrics, Key Laboratory for Bio-Nanotechnology and Molecule Engineering of Hunan Province, College of Biology, Hunan University, Changsha 410082, China;

²College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China

In this work, a pH controlled release anticancer drug delivery based on poly(A)/silica nanoparticles has been developed by taking advantage of the weak interaction of isoquinoline alkaloid and adenine at acidic environment. In this design, the poly(A) was firstly modified on the surface of the silica nanoparticles through the EDC/NHS crosslinking. The coralyne was selected as a model drug. Through the adenine-coralyne-adenine binding, the coralyne then can be loaded onto the poly(A)/silica nanoparticles to form coralyne-poly(A)/silica nanoparticles complex. The properties of poly(A)/silica nanoparticles and coralyne-poly(A)/silica nanoparticles complex were characterized by agarose gel electrophoresis, transmission electron microscopy (TEM) and fluorescence spectroscopy. The stability of the coralyne-poly(A)/silica nanoparticles complex and the effect of drug release at different pH buffer were investigated. In addition, the intracellular behavior of coralyne-poly(A)/silica nanoparticles in Hela cells was further studied by using laser confocal scanning microscopy and MTT assay. The results showed that the coralyne-poly(A)/silica nanoparticles exhibited a good stability at neutral pH buffer. At acidic environment (pH<6), the coralyne was released easily from the nanoparticles complex because the hydrogen bonds interaction between coralyne and adenine was getting weak. Therefore, the release of coralyne could be controlled by changing pH. The further cells experiments demonstrated that the coralyne-poly(A)/silica nanoparticles could be endocytosed by the Hela cells and demonstrated highly efficient operation at lysosomal pH, while the poly(A)/silica nanoparticles was relative biocompatible and suitable to use as drug carriers. This research provided a new way for the isoquinoline alkaloid drug delivery system.

coralyne, poly(A), silica nanoparticles, pH controlled drug delivery

doi: 10.1360/972012-1770