一种肿瘤与热双重靶向的异丙基丙烯酰胺胶束的制备、表征与体内应用

金靖[†], 陈海燕[†], 田俊梅, 崔思思, 李洋, 顾月清^{*}

中国药科大学生命科学与技术学院生物医学工程研究室, 南京 210009

[†] 同等贡献

^{*} 联系人, E-mail: cpuyueqing@163.com

2012-07-16 收稿, 2012-11-30 接受, 2013-01-29 网络版发表

国家自然科学基金(81220108012, 81211140243, 30970776, 81000666, 81071194, 81171395)资助

摘要 利用自由基随机共聚反应原理, 合成了 P(FAAn-co-NIPA-co-AAm-co-ODA) 聚合物, 该聚合物兼具温度响应性和叶酸介导肿瘤主动靶向能力, 并在水中自主装形成胶束. 通过紫外光谱、红外光谱、核磁共振谱对聚合物的结构、胶束的临界相变温度(LCST)及水合粒径进行了考察, 并利用透射电子显微镜考察胶束的粒径及形貌. 胶束粒径为 80 nm, LCST 为 43 °C. MTT 实验结果显示, 胶束载体对 A549 和 Bel-7402 肿瘤细胞基本无毒性. 装载近红外荧光探针(ICG-Der-01)的胶束在 MDA-MB-231 和 HCT116 荷瘤裸鼠体内的动态分布研究证实, 该胶束载体具有明显的叶酸靶向能力与热靶向能力.

关键词

异丙基丙烯酰胺
胶束
叶酸
温度敏感性
肿瘤靶向
热靶向

具有疏水段和亲水段键合的两亲性共聚物在低浓度时独立存在, 当浓度增加到一定值以后, 在分子间的氢键、静电相互作用和范德华力等推动下, 自发组装形成胶束^[1-3]. 疏水段成为胶束的内核, 在疏水性内核上可以上载疏水性抗肿瘤药物, 如紫杉醇等; 而亲水段形成胶束的外壳, 可以隔离血液中蛋白和其他成分对胶束内部载药的影响, 并且可以增加药物在血液中的循环时间, 提高药物的生物利用度, 减少药物的毒副作用. 当纳米胶束粒径小于 200 nm 时, 可以减少网状内皮系统(RES)的非选择性摄取, 同时通过肿瘤组织部位血管的增强渗漏与保留作用(EPR效应), 实现对肿瘤的被动靶向^[4-7].

传统的胶束不具有肿瘤主动靶向能力, 并且无法对外界环境做出响应. 近年来, 具有温度敏感性、pH 敏感性或者磁场等环境刺激响应的胶束已被大量报道用作抗肿瘤药物的智能载体^[8-15]. 同时, 聚合物胶束可以偶联靶向配体, 进而实现药物靶向传递. 因

此, 将肿瘤靶向配体和环境敏感性配体引入胶束可以得到具有主动靶向和环境敏感性的智能胶束.

聚 N-异丙基丙烯酰胺(PNIPA)是目前研究最为广泛的温度敏感性聚合物之一^[16-20]. 在水溶液中, 其低临界相变温度(LCST)在 33 °C 左右; 当温度低于 LCST 时, PNIPA 聚合物呈水溶性, 高于 LCST 时, 则会在水中析出. 通过掺入亲水性更好的单分子聚合物单体丙烯酰胺(AAm), 其相变温度可以调节至 43 °C 左右. 修饰后聚合物载体在正常人体体温 37 °C 下可以正常传递药物; 而局部的加热可以触发胶束结构的崩塌, 从而导致包载药物短时间内大量释放. 通过对加热时间的控制, 可以实现对药物的控释作用. 由于这种温度敏感性, PNIPA 聚合物被广泛地用于温敏胶束的制备^[20-26].

本文利用自由基随机共聚反应, 将聚合单体 N-异丙基丙烯酰胺(NIPA)、AAm、丙烯酸十八烷酯(ODA)以及叶酸靶向聚合单体叶酸-丙烯酰胺(FAAn)按照一定

引用格式: 金靖, 陈海燕, 田俊梅, 等. 一种肿瘤与热双重靶向的异丙基丙烯酰胺胶束的制备、表征与体内应用. 科学通报, 2013, 58: 545-555

Jin J, Chen H Y, Tian J M, et al. Preparation, characterization and *in vivo* application of tumor and thermal dual-targeting isopropyl acrylamide micell (in Chinese). Chin Sci Bull (Chin Ver), 2013, 58: 545-555, doi: 10.1360/972012-699

投料比进行聚合反应,制备了具有叶酸介导的肿瘤主动靶向能力并且对温度敏感的 P(FAAn-co-NIPA-co-AAm-co-ODA)胶束,表征了胶束的 LCST、粒径、形貌及其化学结构,考察了胶束载体的细胞毒性及在荷瘤裸鼠体内的肿瘤靶向特性.

1 材料与方法

(i) 试剂. NIPA, 巯基丙酸(3-mercaptopropionic acid, MPA, 99%), AAm, ODA, 叶酸(folate), ICG-Der-01(近红外荧光染料, 95%), 丙烯胺(allylamine, AA, 99%), 二环己基碳二亚胺(DCC, 99%), N-羟基琥珀酰亚胺(NHS, 99%), 偶氮二异丁腈(AIBN, 分析纯), 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO), N,N-二甲基甲酰胺(dimethyl formamide, DMF), 丙酮(acetone), 二氯甲烷(dichloromethane)等均为分析纯,合成及透析用水均为双蒸水.

(ii) 仪器. S2000 型八通道光纤光谱(美国 Ocean Optics 公司); NL-FC-2.0-763 型半导体激光器($\lambda=765.9$ nm, 上海恩耐激光器有限公司); 85-2 型恒温磁力加热搅拌器(江苏金坛); HH-4 数显恒温水浴(国华电器); 高精密度电子天平(北京赛多利斯); pH-25 型数显 pH 计(上海雷磁仪器厂); RE-52A 型旋转蒸发仪(上海亚荣); 再生纤维素透析袋(截留分子量 3500, 10000, 江苏华康); WH-3 微型涡旋混合仪(上海沪西分析仪器厂); 1612-1 型高速离心机(上海医疗器械); 96 孔细胞培养板(美国 Corning Costar 公司); Model 580 酶联免疫检测仪(美国 Bio-Rad 公司); Lambda 35 型紫外-可见分光光度计(上海分析仪器厂); Brookhaven 粒径仪(美国 Brookhaven 公司); HH-4 数显恒温水浴(国华电器); 高精密度电子天平(北京赛多利斯); 1612-1 型高速离心机(上海医疗器械); H-100 型超声清洗器(昆山禾创); 超声细胞破碎仪(宁波新芝 JY92-II N); 恒温水浴摇床(EYEL4, NTS-4000A, TOKYO RIKAKIKAI Co., LTD, Japan); 透射电子显微镜(JEOL JEM-2100 和 Philips FEI Tecnai G2 20S-TWIN); 近红外成像系统(near infrared imaging system).

(iii) Folate-AAAn 的合成与表征. 叶酸分子缺少产生自由基的官能团,因此将叶酸 γ -COOH 共价偶联上丙烯胺分子,得到叶酸-丙烯胺复合物(FAAn),从而利用复合物结构中的活性双键来参与自由基聚合反应.具体反应步骤如下:精确称取叶酸(441.0 mg)

置于圆底烧瓶中,加入 7.0 mL DMSO 溶解.加入 DCC(226.0 mg),常温磁力搅拌 20 min 后加入 NHS(126.0 mg),室温活化 4 h,活化液 12000 r/min 离心 10 min,除去不溶副产物 DCU.取上清液,缓慢滴加到含有 60 μ L 丙烯胺的 DMSO 溶液中,加入 25 μ L 三乙胺作为缚酸剂,室温磁力搅拌 6 h.将反应液按 1:4 量加入丙酮中沉淀,12000 r/min 离心 10 min.取沉淀产物经过高效液相纯化后进行质谱、紫外吸收光谱鉴定.合成路线如图 1 所示.

(iv) P(FAAn-co-NIPA-co-AAm-co-ODA)胶束的制备.通过对文献[20,27]方法的改进,选择 30 mg 引发剂 AIBN 及 15 μ L 链转移剂(MPA)进行胶束的合成.投料比如表 1 所示.精确称取 NIPA, AAm, ODA, FAAn 和 15 μ L MPA 至 250 mL 三颈烧瓶中,加入 15 mL DMF 将其溶解,氮气除氧,70 $^{\circ}$ C 恒速搅拌,加入 30 mg AIBN 引发聚合反应,恒温反应 24 h.为了便于 LCST 与粒径的研究,我们固定 FAAn 聚合单体投料量 100 mg 不变,其他各原料投料比如表 1 所示.

反应结束后,产物装入截留分子量为 3500 Da 的透析袋中,分别在纯水、非等渗磷酸盐缓冲液(PBS 中不加 NaCl)、PBS(pH 7.4)、Hanks 溶液中透析 4 d,每天换水 4 次^[24].将制得的胶束纯水溶液置于培养皿

图 1 叶酸-丙烯胺复合物(FAAn)的合成

表 1 P(FAAn-co-NIPA-co-AAm-co-ODA)胶束合成原料投料比

试样	NIPA (mg)	AAm (mg)	ODA (mg)	FAAn (mg)
FAAnM01	1500.0	100.0	80.0	100.0
FAAnM02	1500.0	150.0	80.0	100.0
FAAnM03	1500.0	200.0	80.0	100.0
FAAnM04	1500.0	250.0	80.0	100.0
FAAnM05	1500.0	300.0	80.0	100.0
FAAnM06	1500.0	250.0	0	100.0
FAAnM07	1500.0	250.0	40.0	100.0
FAAnM08	1500.0	250.0	60.0	100.0
FAAnM09	1500.0	250.0	100.0	100.0
FAAnM10	1500.0	250.0	120.0	100.0
FAAnM11	1500.0	250.0	100.0	0

中-20℃冷冻 4 h, 置于冻干机冻干 60 h, -20℃冰箱保存备用。

(V) P(FAAn-co-NIPA-co-AAm-co-ODA)胶束的紫外、红外、核磁谱图表征。将制得的 P(FAAn-co-NIPA-co-AAm-co-ODA)胶束溶于 PBS 溶液中, 紫外-可见分光光度计测定其吸收光谱。将叶酸、FAAnM11 胶束与 FAAnM04 胶束样品冻干粉末用 KBr 制片后, 在红外光谱仪上测定样品的红外谱图。将 FAAnM11 与 FAAnM04 胶束样品溶于氘代 DMSO 中, 配制浓度为 2 mg/mL 的胶束溶液, 在 500 MHz 核磁共振仪上测定胶束的核磁波谱。

(VI) P(FAAn-co-NIPA-co-AAm-co-ODA)胶束的 LCST 测定。利用紫外分光光度计测定 P(FAAn-co-NIPA-co-AAm-co-ODA)纳米胶束水溶液在不同温度下(30~50℃)的透光率, 检测波长为 500 nm。样品(5 mg/mL)及参比空白均在恒温水浴中恒温 10 min 使样品温度达到恒温, 温度间隔为 1℃。在温度上升曲线中的某个温度狭窄区间内, 透明的纳米胶束溶液将逐渐变浑浊, 样品的透光率将从最大降为最小。将样品的透光率降为初始值一半时的温度定义为相变温度(或相变点), 即 LCST。

同时, 实验中为了使体外实验数据能更好地与体内情况保持一致, 还考察了纳米胶束在纯水、非等渗磷酸盐缓冲液(PBS 中不加 NaCl)、PBS(pH 7.4)、Hanks 溶液(一种生理模拟液, 离子强度为 0.1605)中的 LCST。在所有溶液中, 胶束的浓度均为 5 mg/mL。

(vii) P(FAAn-co-NIPA-co-AAm-co-ODA)胶束的

粒径及形貌。通过 Brookhaven 粒径仪考察 FAAnM04, FAAnM06~FAAnM10 胶束样品的水合粒径分布, 从而明确不同 ODA 投料量对胶束水合粒径的影响。

利用透射电子显微镜(TEM)观察 P(FAAn-co-NIPA-co-AAm-co-ODA)胶束表面形态, 具体操作如下: 胶束的 PBS 溶液滴在 200 目铜网上, 充分干燥, 在加速电压为 80 kV 的透射电子显微镜下观察纳米粒形态。

(viii) P(FAAn-co-NIPA-co-AAm-co-ODA)胶束的细胞毒性考察。选用人肺癌细胞系(human lung carcinoma cell line, A549 cells)、人肝癌细胞系(Human hepatoma cell line, Bel-7402 cells), 采用 MTT 比色法对 FAAnM04 胶束样品的细胞毒性进行检测。于 96 孔板中加入 200 μL RPMI 1640 培养基培养的细胞(5×10^3 cells/mL), 于 5%二氧化碳浓度的 37℃环境下孵育 48 h。随后, 加入不同浓度(0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 mg/mL)纳米载体的 RPMI 1640 培养基替换, 不含有纳米载体的新鲜培养基替换原有孔中的培养基作空白对照组, 继续培养 4 h。然后将所有孔中的培养基用 180 μL 新鲜 RPMI 1640 和 20 μL MTT 溶液(5 mg/mL)替换并培养 4 h。最后, 移除所有孔中的培养基, 每孔加入 200 μL DMSO, 室温下轻轻振摇, 在 490 nm 处用酶标仪测定吸光值。各组的细胞相对存活率(实验组相对空白组)可通过如下公式进行计算: 细胞存活率(%)=($A_{\text{sample}} - A_{\text{medium}}$)/($A_{\text{control}} - A_{\text{medium}}$)×100%, 其中 A_{sample} 表示加入一定浓度胶束样品的实验组吸光度, A_{control} 表示空白组(未加入胶束样品)的吸光度, A_{medium} 为培养基调零组的吸光度。

(ix) P(FAAn-co-NIPA-co-AAm-co-ODA)胶束的体内叶酸靶向验证。将 200 μL 包载 ICG-Der-01 的 FAAnM04 胶束溶液通过尾静脉注射入荷 MDA-MB-231 肿瘤的裸鼠体内, 并于注射后的 5 min, 1 h, 4 h, 8 h, 16 h, 24 h, 42 h, 72 h 在近红外荧光成像系统下进行荧光图像采集。

(X) P(FAAn-co-NIPA-co-AAm-co-ODA)胶束的体内热靶向验证。将 200 μL 载有 ICG-Der-01 的 P(FAAn-co-NIPA-co-AAm-co-ODA)胶束溶液通过尾静脉注射入荷 HCT 116 肿瘤的裸鼠体内。在注射 3 h 后开始在小鼠右前肢肿瘤处使用 43℃恒温水袋进行肿瘤局部加热, 并使用微创温度检测器检测裸鼠肿瘤部位皮下温度。加热方式为: 加热 10 min, 间隔 20 min 后继续加热。在注射后 5 min, 30 min, 1 h, 6 h,

20 h, 30 h 时于近红外荧光成像系统下进行观察.

2 结果与讨论

2.1 Folate-AAAn 的合成与表征

由于胶束分子表面没有可供化学键合的化学基团, 所以我们直接将叶酸和丙烯胺通过酰胺键连接从而引入双键基团, 通过自由基聚合反应将叶酸偶联到聚合分子链中. 实验选用 DCC/NHS 催化体系完成酰胺键的连接. 由于 FAAn 和 folate 在丙酮中的溶解度都非常低, 将制备 FAAn 体系在丙酮中沉淀即可得到 FAAn 的粗品, 并进一步通过硅胶柱分离得到纯品. FAAn 的质谱鉴定结果($m/z=479$ [M-1]⁻)与 FAAn 的理论分子量完全一致. 由于硅胶柱分离的产物纯度未达到分析纯, 所以纯化后的样品中仍有少量叶酸及酸酐的残留. 图 2 中 $m/z=440.2$ 处是残留的叶酸质谱峰; 而 $m/z=959.6$ 处是两分子叶酸聚合产生的酸酐质谱峰.

2.2 P(FAAn-co-NIPA-co-AAAm-co-ODA) 胶束的制备

本文利用自由共聚法成功制备了一系列具有不同粒径和相变温度的温敏性纳米胶束 P(FAAn-co-NIPA-co-AAAm-co-ODA). 由于氧气对自由基具有灭活作用, 因此反应体系需要严格除氧. 合成原料中, 引发剂 AIBN 可在 70℃ 下裂解产生自由基, 自由基通过进攻单体分子上的碳碳双键从而引发聚合反应. 被进攻的单体分子形成次级自由基, 可继续进攻其他含有碳碳双键单体, 实现链增长, 最后可通过耦合/歧化两种方式终止聚合物链的增长. 反应体系中聚

合物链自由基可夺取链转移剂 MPA 上的活泼氢, 使得聚合反应停止, 从而聚合物分子量得到一定控制.

胶束的水合粒径取决于聚合物分子的分子量大和聚合物分子中疏水链与亲水链的比例. 链转移剂 MPA 过多会导致聚合反应过早终止, 而过少又会导致聚合物分子量过大. ODA 作为疏水段, 与 NIPA 和 AAm 链的比例会极大影响聚合物在水中形成胶束后的粒径大小; 并且作为载药核心, ODA 的量对胶束的载药能力、相变能力以及药物释放能力都有极大的影响. 引发剂 AIBN 的含量决定了聚合反应的进行程度, 过少会导致聚合物产量过低. 本实验根据文献研究基础, 对不同量的 AIBN, MPA 及 ODA 对形成的胶束粒径的影响进行了考察. 根据文献经验, 引发剂 AIBN 投料比控制在 0.5%~1% 之间为最佳. 不同量的 MPA 参与聚合反应, 最终所得产物的粒径大小不同. 当 ODA 为 120.0 mg, MPA 为 10 μ L 时, 所得胶束粒径分散较差; 而 MPA 为 30 μ L 时, 所得胶束粒径小于 20 nm; MPA 为 20 μ L 时, 反应条件最佳(实验数据略). 以下所述胶束均用此引发剂和链转移剂条件制备. 实验表明, 在无叶酸标记的空白胶束合成中, 当 ODA 为 120.0 mg, NIPA 为 1500.0 mg, AAm 为 250.0 mg 时, 所制备的无叶酸标记空白胶束粒径为 60 nm, LCST 为 43℃ 左右.

由于自由基聚合过程十分迅速, 从引发自由基形成到链终止只有约 10^{-6} s, 所以要求反应体系的温度和搅拌速度都要保持稳定, 否则得到的产品性能差异较大. 聚合完成后, 需要用透析袋透析除去未反应的低分子量聚合物及小分子. 透析是否完成可通过透析液的紫外吸收图谱鉴定, 当透析液中无任何小分子特征吸收峰时, 表明透析完成. 此时样品进行

图 2 FAAn 的质谱图

冻干保存,作后续实验用。

在实验设计中,首先用 NIPA, AAm, ODA 和 AAn 通过自由基聚合法进行随机共聚反应得到 P(AAn-co-NIPA-co-AAm-co-ODA)纳米胶束;然后将 γ 羧基活化的叶酸连接至胶束中的 AAn 氨基上。但实验中 AAn 在此聚合体系里的竞聚率非常低,并且 AAn 末端氨基的存在使得 AIBN 产生的自由基几乎完全被灭活。因此,我们首先制备了 FAAn 叶酸聚合单体,使用叶酸聚合单体来参与最终的自由基随机共聚反应。

Folate-AAAn 在聚合反应体系中的竞速率比较高,能完全参与聚合反应,反应与无叶酸组的胶束合成条件相同。由于 Folate-AAAn 在 DMF 中的溶解度不是很高,会降低叶酸的聚合效率,最终我们选择 50℃ 条件下反复超声的方法使其充分溶解,从而提高了聚合效率。

由于引入的叶酸聚合单体具有一定的疏水性,这将导致聚合物链中亲水段和疏水段比例的改变,从而影响自组装胶束的粒径大小、形态及 LCST^[25]。因此还考察了不同 W_{AAm}/W_{NIPA} % 以及不同 ODA 的投料比对胶束的影响,从而确定了最优的亲水段和疏水段比例控制方法。

2.3 P(FAAn-co-NIPA-co-AAm-co-ODA)胶束的紫外、红外、核磁谱图表征

(i) 紫外光谱。如图 3 所示,FAAnM11 胶束分子骨架中没有生色基团,所以没有紫外可见波段的特征吸收峰。而 Folate-AAAn 引入聚合体系后,聚合物

图 3 叶酸、FAAnM04 和 FAAnM11 样品在 PBS 溶液中的紫外吸收光谱

样品的紫外可见光谱即出现与叶酸相似的紫外吸收峰,这也进一步验证了叶酸标记胶束的构建成功。

(ii) 红外光谱。由于 P(NIPA-co-AAm-co-ODA) 分子链上的官能团与叶酸的官能团基本一致,所以多数特征峰都一致,只有 2973 cm^{-1} 与 2930 cm^{-1} 发生了变化(图 4)。 973 cm^{-1} 是 CH_3 的碳氢伸缩振动峰,而 2930 cm^{-1} 是 CH_2 的碳氢伸缩振动峰。由于叶酸聚合单体的加入,这两种峰的比例有所变化,进一步验证了叶酸单体的成功偶联。

(iii) 核磁共振氢谱。对两种纳米胶束载体的冻干样品进行了 500 MHz 核磁共振氢谱分析(图 5)。与红外光谱的分析结果相似,在核磁共振氢谱中,化学位移 1.3 与 1.0 在叶酸聚合单体的加入之后都发生了明显的变化。

2.4 P(FAAn-co-NIPA-co-AAm-co-ODA)胶束的 LCST 测定

如图 6 所示,当 ODA 投料量为 80.0 mg, W_{AAm}/W_{NIPA} % 分别为 6.7%, 10.0%, 13.3%, 16.7% 和 20% 时,测得的胶束 LCST 分别为 35℃, 37℃, 40℃, 42.5℃ 和 46℃。

由于叶酸聚合单体的掺入,整个聚合物链分子的亲水链与疏水链的比例发生了变化,这种变化导致所合成胶束的 LCST 与粒径也随之发生变化。为了更深入地研究叶酸聚合单体的引入对胶束 LCST 的影响,我们也考察了当 W_{AAm}/W_{NIPA} % 固定为 16.7% 时,ODA 的量对 LCST 的影响。如图 7 所示,ODA 投料量为 120.0 mg 时,所得胶束的 LCST 为 37℃,比 ODA 投料量为 40.0 mg 时所得胶束的 LCST 降低了近 10℃。这种情况的出现是因为当 ODA 投料量增加时,整个聚合物分子中的亲水链比例减少,水分子与胶束亲水链的氢键作用减弱,因而 LCST 随着 ODA 的增加而逐渐降低。

本实验还考察了 P(FAAn-co-NIPA-co-AAm-co-ODA)胶束在不同离子强度溶液中的 LCST。FAAnM04 纳米胶束在纯水中(离子强度最低)的 LCST 最高,为 45.5℃;其次为在非等渗磷酸盐缓冲液中(PBS 中不加 NaCl),为 43.5℃;PBS 溶液中为 42.5℃;而 Hank 模拟液的离子强度最大,LCST 最高,为 43℃。

2.5 P(FAAn-co-NIPA-co-AAm-co-ODA)胶束的粒径及形貌

本实验考察了不同 ODA 投料量对胶束粒径的影

图4 叶酸(a)、FAAnM04(b)和FAAnM11(c)的红外光谱

图 5 FAAnM11(a)和 FAAnM04(b)胶束的核磁共振氢谱

图6 (a) 不同 wt% 胶束样品透光率随温度的变化; (b) LCST 随 wt% 的变化

$$\text{wt}\% = (W_{\text{AAm}}/W_{\text{NIPA}}) \times 100\%$$

图7 (a) 不同 ODA 投料量胶束样品的透光率随温度的变化; (b) 胶束样品的 LCST 随 ODA 投料量的变化

响, 图 8(a)所示为反应体系中疏水性单体 ODA 的单一因素影响下胶束的粒径变化. 当 ODA 的量为 40.0 mg 时, 所得样品的粒径高达 175 nm; 而当 ODA 的投料量增加至 120.0 mg 时, 样品的粒径仅为 20 nm (PBS 溶液). 当 ODA 的投料量为 80 mg 时, 所得胶束粒径约为 80 nm (79.21 ± 16.20 nm, 平均值 $\pm$ 标准偏差, PBS 溶液) 粒径分布经 Brookhaven 粒径仪测定如图 8(b)所示, 样品呈较为典型的正态分布, 且高度单分散. 根据本实验室以往对 NIPA 水凝胶的研究经验, 该样品比较有利于其体内应用.

如图 9 所示, TEM 结果显示纳米胶束单分散性好, 且近球形. TEM 测得的粒径数据还可以和 Brookhaven 粒径仪测定的结果相互验证. TEM 图中粒子的粒径略微小于水相中, 这是因为胶束里是高度溶胀的弹性粒子, 在 TEM 点样过程中, 随着水分的蒸发, 粒子出现一定程度的收缩^[19,20]. 图 9 中粒子有一定的聚集, 并且粒子周围有水迹残留. 这是由于点样时间

较短, 仪器真空并未抽干, 导致 TEM 照片中有水分的痕迹, 这并不影响胶束粒子粒径形貌的表征.

2.6 P(FAAn-co-NIPA-co-AAm-co-ODA)胶束的细胞毒性考察

本实验选取了 A549 和 Bel-7402 两种肿瘤细胞, 考察了不同浓度的 FAAnM04 叶酸标记胶束对细胞的增殖抑制作用. 图 10 结果表明, FAAnM04 叶酸标记的胶束载体生物毒性很低, 即使在 10 mg/mL 高浓度下, 两种细胞的相对活性基本没有下降; 而且由于叶酸是营养物质, 低浓度下细胞的增殖率也略有升高. 实验证明了 FAAnM04 叶酸靶向胶束的安全性, 适合于进一步的体内应用研究.

2.7 P(FAAn-co-NIPA-co-AAm-co-ODA)胶束的体内叶酸靶向验证

近红外荧光图像显示了载有 ICG-Der-01 的

图 8 (a) 胶束粒径随 ODA 投料量的变化; (b) FAAnM04 胶束样品的粒径分布

图 9 FAAnM04 胶束样品的透射电子显微镜照片

图 10 A549 与 Bel-7402 肿瘤细胞存活率随加入胶束浓度的变化

P(FAAn-co-NIPA-co-AAm-co-ODA)胶束在荷瘤裸鼠体内的动态分布过程. ICG-Der-01 是本实验室常用的近红外染料, 已证实 MDA-MB-231 与 HCT 116 肿瘤没有主动靶向能力, 所以本研究没有单独对 ICG-Der-01 的靶向能力进行考察. 从图 11 可以看到, 注射 5 min 后包载 ICG-Der-01 的胶束载体便会迅速分布进入肝脏, 并且部分进入肠道. 1 h 后肠道分布更

图 11 上载 ICG-Der-01 近红外荧光染料的 FAAnM04 胶束载体在荷 MDA-MB-231 肿瘤裸鼠体内分布

多, 而肝脏逐渐减少, 同时在肿瘤部位出现较强的近红外荧光信号. 4 h 后肠道和肝脏代谢逐渐减少, 肿瘤部位的信号更为明显, 可以体现很强的靶向能力. 而到 8 h 时, 肝脏和肠道还有部分近红外荧光信号, 而此时肿瘤部位的靶向非常明显. 当 16 h 时, 稍微增加激光器的功率, 可以明显看到只有肝脏与肿瘤部位信号强度最高, 这证明了纳米载体出色的肿瘤靶向能力. 当 24 h 时, 肝脏的代谢已经基本完成, 整个小鼠体内除了肿瘤部位已经基本没有荧光信号. 肿瘤部位的荧光信号直到 72 h 时才有所减弱, 但是仍然能看出靶向的效果. 虽然纳米载体存在一定的被动靶向能力, 但是根据文献[28]的报道, 被动靶向能力无法提供如此强烈并且持久的肿瘤聚集效果, 这也进一步验证了偶联叶酸的胶束具有主动靶向能力.

2.8 P(FAAn-co-NIPA-co-AAm-co-ODA)胶束的体内热靶向确证

由于该温敏胶束在高于 LCST 之后不再形成胶束形态,并且在溶液中沉淀下来,因此具有一定的热靶向能力.如图 12 所示,当载有近红外探针的胶束通过尾静脉进入小鼠体内后,短时间内小鼠全身出现荧光信号;30 min 后荧光信号主要分布于肝脏,并且小鼠左前肢肿瘤部位出现荧光信号;1 h 时小鼠的右前肢也出现荧光信号.这说明纳米胶束在不加热的情况下,依靠叶酸的主动靶向能力已经在左前肢两侧肿瘤部位开始聚集.在注射后 3 h 对小鼠右前肢肿瘤部位进行 45℃ 加热,6 h 时右前肢加热部位的荧光信号明显强于左前肢肿瘤部位;当到 20 h 时,右前肢的荧光信号更强.到 30 h 时,肝脏中的载 ICG-Der-01 胶束已经代谢接近完全,而右前肢由于局部加热的原因荧光信号达到最强,而左前肢由于并未加热,虽然也能体现出叶酸的靶向能力,但是相比右前肢加热的部位荧光明显减弱.其结果表明,在同样的小鼠体内代谢环境下,右前肢的肿瘤部位因为加热而聚集了更多的载 ICG-Der-01 纳米胶束,这也证实了制备的 P(FAAn-co-NIPA-co-AAm-co-ODA)具有很好的热靶向的能力.

3 结论

通过自由基随机共聚反应方法合成了具有热与叶酸双重靶向的 P(FAAn-co-NIPA-co-AAm-co-ODA)纳米胶束.通过紫外光谱、红外光谱、核磁共振氢谱、质谱等测试方法对胶束的物理化学性质进行了表征,

图 12 上载 ICG-Der-01 近红外荧光染料的 FAAnM04 胶束载体在荷 HCT116 肿瘤裸鼠体内热靶向

并对胶束的 LCST 与粒径的影响因素进行了详细的研究,同时利用 MTT 细胞实验的基础上证明了该载体的低毒性.通过装载近红外荧光探针 ICG-Der-01,对胶束在荷瘤小鼠体内的分布进行了研究,验证了该胶束具有叶酸导向的肿瘤主动靶向特性;通过局部加热处理方法,进一步验证了纳米胶束的热靶向能力.综上所述,这种新型胶束具有合适的粒径大小与 LCST,生物相容性高,具有良好的叶酸靶向能力与热靶向能力,可以进一步装载药物应用于体内抗肿瘤研究.同时由于 NIPA 的温敏性能,该胶束在药物靶向传递以及智能控释药方面具有非常广阔的应用前景.

参考文献

- 1 Kedar U, Phutane P. Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting. *Nanomedicine*, 2010, 6: 714–729
- 2 Acharya S, Sahoo K S. PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumor delivery by EPR effect. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011, 63: 170–183
- 3 Stuart A C, Huck T S, Genzer J, et al. Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials. *Nat Mater*, 2010, 9: 101–113
- 4 Wei H, Cheng S X, Zhang X Z, et al. Thermo-sensitive polymeric micelles based on poly(N-isopropylacrylamide) as drug carriers. *Prog Polym Sci*, 2009, 34: 893–910
- 5 Ganta S, Devalapally H, Shahiwala A, et al. A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery. *J Control Release*, 2008, 126: 187–204
- 6 Peng C L, Tsai H M, Yang S J, et al. Development of thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide-co-((2-dimethylamino)ethylmethacrylate))-based nanoparticles for controlled drug release. *Nanotechnology*, 2011, 22: 265608
- 7 Wei H, Chang C. Synthesis and applications of shell cross-linked thermoresponsive hybrid micelles based on poly(N-isopropylacrylamide-co-3-(trimethoxysilyl)propylmethacrylate)-b-poly(methylmethacrylate). *Langmuir*, 2008, 24: 4564–4570

- 8 Wei H. Preparation of shell cross-linked thermoresponsive micelles as well as hollow spheres based on P(NIPAAm-co-HMAAm-co-MPMA)-b-PCL. *J Phys Chem C*, 2008, 112: 15329–15334
- 9 Chang C, Wei H, Quan C Y, et al. Fabrication of thermosensitive PCL-PNIPAAm-PCL triblock copolymeric micelles for drug delivery. *J Polym Sci A Polym Chem*, 2008, 46: 3048–3057
- 10 Zhou C, Hillmyer A M, Lodge P T. Micellization and micellar aggregation of poly(ethylene-altpropylene)-b-poly(ethylene oxide)-b-poly(N-isopropylacrylamide) triblock terpolymers in water. *Macromolecules*, 2011, 44: 1635–1641
- 11 Xu X W, Flores J D, McCormick L C. Reversible imine shell cross-linked micelles from aqueous RAFT synthesized thermoresponsive triblock copolymers as potential nanocarriers for “pH-triggered” drug release. *Macromolecules*, 2011, 44: 1327–1334
- 12 Cai Y, Aubrecht B K, Grubbs B R. Thermally induced changes in amphiphilicity drive reversible restructuring of assemblies of ABC triblock copolymers with statistical polyether blocks. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 1058–1065
- 13 Wu T, Ge Z S, Liu S Y. Fabrication of thermoresponsive cross-linked poly(N-isopropylacrylamide) nanocapsules and silver nanoparticle-embedded hybrid capsules with controlled shell thickness. *Chem Mater*, 2011, 23: 2370–2380
- 14 Li Y Y, Zhang X Z, Cheng H. Novel stimuli-responsive micelle self-assembled from Y-shaped P(UA-Y-NIPAAm) copolymer for drug delivery. *Biomacromolecules*, 2006, 7: 2956–2960
- 15 Li L Y, He W D, Li J, et al. Shell-cross-linked micelles from PNIPAM-b-(PLL)₂ Y-shaped miktoarm star copolymer as drug carriers. *Biomacromolecules*, 2010, 11: 1882–1890
- 16 Wei H, Zhang X Z, Cheng C, et al. Self-assembled, thermosensitive micelles of a star block copolymer based on PMMA and PNIPAAm for controlled drug delivery. *Biomaterials*, 2007, 28: 99–107
- 17 Wei H, Chen W Q, Chang C, et al. Synthesis of star block, thermosensitive poly(L-lactide)-star block-poly(N-isopropylacrylamide-co-N-hydroxymethylacrylamide) co-polymers and their self-assembled micelles for controlled release. *J Phys Chem C*, 2008, 112: 2888–2894
- 18 Chen W Q, Wei H, Li S L, et al. Fabrication of star-shaped, thermo-sensitive poly(N-isopropylacrylamide)-cholic acid-poly(epsilon-caprolactone) copolymers and their self-assembled micelles as drug carriers. *Polymer*, 2008, 49: 3965–3972
- 19 Li X J, Qian Y F, Liu T, et al. Amphiphilic multiarm star block copolymer-based multifunctional unimolecular micelles for cancer targeted drug delivery and MR imaging. *Biomaterials*, 2011, 32: 6595–6605
- 20 Pang X C, Zhao L, Akinc M, et al. Novel amphiphilic multi-arm, star-like block copolymers as unimolecular micelles. *Macromolecules*, 2011, 44: 3746–3752
- 21 Topp M D C, Dijkstra P J, Talsma H, et al. Thermosensitive micelle-forming block copolymers of poly(ethylene glycol) and poly(N-isopropylacrylamide). *Macromolecules*, 1997, 30: 8518–8520
- 22 Virtanen J, Holappa S, Lemmetyinen H, et al. Aggregation in aqueous poly(N-isopropylacrylamide)-block-poly(ethylene oxide) solutions studied by fluorescence spectroscopy and light scattering. *Macromolecules*, 2002, 35: 4763–4769
- 23 Rao J Y, Xu J, Luo S Z, et al. Cononsolvency-induced micellization of pyrene end-labeled diblock copolymers of N-isopropylacrylamide and oligo(ethylene glycol) methyl ether methacrylate. *Langmuir*, 2007, 23: 11857–11865
- 24 Neradovic D, Van Nostrum C F, Hennink W E. Thermoresponsive polymeric micelles with controlled instability based on hydrolytically sensitive N-isopropylacrylamide copolymers. *Macromolecules*, 2001, 34: 7589–7591
- 25 Neradovic D, Soga O, Van Nostrum C F, et al. The effect of the processing and formulation parameters on the size of nanoparticles based on block copolymers of poly(ethylene glycol) and poly(N-isopropylacrylamide) with and without hydrolytically sensitive groups. *Biomaterials*, 2004, 25: 2409–2418
- 26 Li Y T, Lokitz B S, Armes S P, et al. Synthesis of reversible shell cross-linked micelles for controlled release of bioactive agents. *Macromolecules*, 2006, 39: 2726–2728
- 27 Taillefer J, Jones M C, Brasseur N, et al. Preparation and characterization of pH-responsive polymeric micelles for the delivery of photosensitizing anticancer drugs. *J Pharm Sci*, 2000, 89: 52–62
- 28 Guo J, Du C, Shan L, et al. Comparison of near-infrared fluorescent deoxyglucose probes with different dyes for tumor diagnosis *in vivo*. *Contrast Media Mol Imaging*, 2012, 7: 289–301

Preparation, characterization and *in vivo* application of tumor and thermal dual-targeting isopropyl acrylamide micelle

JIN Jing, CHEN HaiYan, TIAN JunMei, CUI SiSi, LI Yang & GU YueQing

Department of Biomedical Engineering, School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

The polymers containing folate, isopropyl acrylamide and octadecyl acrylate were formed through free radical random copolymerization, and then micelles were formed in aqueous solution by self assembly. The micelles were provided with the advantages of temperature sensitivity and active tumor targeting capability. The micelles were characterized by UV-vis spectra, FTIR spectra, NMR spectra, lower critical solution temperature (LCST) and TEM. The size and LCST of the micelles were 80 nm and 43°C, respectively. MTT assays demonstrated the low biotoxicity of the micelles on A549 cells and Bel 7402 cells. The *in vivo* experiments verified the dual tumor-targeting efficacy of the micelles based on MDA-MB-231 and HCT 116 tumor-bearing mice models.

isopropyl acrylamide, micelle, folate, temperature sensitivity, tumor-targeting, temperature-targeting

doi: 10.1360/972012-699