

葡聚糖双亲性衍生物修饰 PLA 亚微粒子的制备及其 表面多重生物因子功能化*

顾鸣岐¹ 原续波^{1**} 田恩江² 盛京¹

(¹天津大学材料科学与工程学院 天津 300072) (²天津医科大学内分泌研究所免疫室 天津 300070)

摘 要 以胆固醇半琥珀酸酐氯对 NaIO₄ 氧化的醛化葡聚糖进行疏水改性,制备了醛基化双亲性葡聚糖衍生物 Chol-Dex-CHO;利用醛基与己二酰肼酰肼化反应,实现葡聚糖主链的氨基化;生物素经二环己基碳二亚胺活化后与双亲性葡聚糖衍生物主链上的氨基偶联,形成生物素化(3%)双亲性葡聚糖(Chol-Dex-Biotin).将聚乳酸(PLA)与 Chol-Dex-Biotin 溶液共透析可形成亚微粒子,双亲性多糖可通过疏水基团锚定于 PLA 亚微粒子表面,透射电子显微镜与原子力显微镜测试观察到清晰的球形核壳结构,激光粒度仪测定亚微粒子粒径与粒径分布表明调节 Chol-Dex-Biotin 与 PLA 的配比可以控制亚微粒子的粒径(150 ~ 200 nm),X-射线光电子能谱证明亚微粒表面存在 Chol-Dex-Biotin.在此基础上,以 FITC 标记的转铁蛋白(Tf-FITC)和生物素化兔 IgG 为模型生物功能因子,分别通过共价偶联及生物素-亲合素物理结合两种机理对葡聚糖包覆的 PLA 纳米微粒表面进行多重生物因子功能化修饰,得到表面 Tf 和 IgG 双重修饰的 PLA 亚微粒子(Tf-PLA-IgG submicron particles).亚微粒子表面 Tf 和兔 IgG 的结合分别通过荧光显微镜观测和抗 IgG-辣根过氧化物酶(IgG-HRP)显色反应验证.

关键词 葡聚糖, 聚乳酸, 亚微粒子, 表面, 生物功能化

载药亚微粒子由于其极小的粒径,在体内具有较长的循环时间,可透过生理屏障,易被病变细胞吞噬,是药物的理想载体^[1].然而,理想的疾病治疗——特别是癌症治疗——是药物只作用于病变组织或细胞,而对正常组织没有影响,即药物的靶向释放^[2].药物靶向释放需要将药物载体与靶向功能因子相结合,以聚乳酸(PLA)为基础的亚微粒子虽然具有良好的生物相容性,但其结构上缺乏可反应性基团限制了载体与靶向功能因子结合^[3],而多糖结构中富含可反应性基团,且多糖是人体内重要的生物组份,具有良好的生物相容性、可降解性,表面以多糖修饰的纳米粒子具有与聚乙二醇相似的延长体内循环周期的作用^[4],因此以多糖修饰 PLA 亚微粒子表面不仅有利于生物功能因子的结合,同时也具有重要的生物学意义^[5].

药物载体与靶向功能因子结合方式的设计对靶向制剂的成功实施是十分关键的^[6].以前大部分的研究只局限于纳米颗粒表面的单功能化^[7,8],即只在纳米颗粒表面连接一种对肿瘤表面受体有特异作用的配体.但这些单功能化的亚微粒子在体内的靶向效果受到各种生物屏障(如血脑屏障)的影响,阻碍了它们顺利到达靶向部位,即使他们的表面连有靶向物质.一种有效的解决方法就是

在亚微粒子表面引入多种功能化因子,其中某种因子引导粒子通过诸如血脑屏障等生物屏障,而其它因子则引导亚微粒子顺利到达靶向部位^[9].

本研究合成了生物素化的胆固醇疏水改性葡聚糖(Chol-Dex-Biotin),由于胆固醇的疏水性和葡聚糖主链的亲水性,Chol-Dex-Biotin 具有双亲特性,利用其可在生理盐水中自聚集的特点,制备了 Chol-Dex-Biotin 修饰的 PLA 亚微粒子.以生物素化兔 IgG(biotin-IgG)和转铁蛋白(Tf)为模型生物功能因子,研究了通过共价偶联及生物素-亲合素物理结合两种机理对葡聚糖包覆 PLA 纳米微粒表面进行多生物功能化修饰.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

葡聚糖(Dextran 40000)、异硫氰酸荧光素(FITC),Sigma 公司;转铁蛋白(Tf)、亲和素、生物素化兔免疫球蛋白(Biotin-IgG)和抗 IgG-辣根过氧化物酶(IgG-HRP),北京拜尔迪生物技术公司;胆固醇,分析纯,上海化学试剂有限公司,乙醇重结晶后使用;D, L 聚乳酸(PLA, 30Kda),山东医疗器械研究所;琥珀酸酐、NaIO₄,分析纯,天津市化学试剂一厂;生物素(+D-Biotin)、二环己基碳二

亚胺(DCC)、*N*-羟基琥珀酸亚胺(NHS), 上海吉尔生物有限公司;己二酰肼按文献方法[10]自制;吡啶、氯仿、二甲基亚砜(DMSO)、*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)、三乙胺,分析纯,天津大学科威试剂公司,均经干燥重蒸处理;甲醇、乙醇、二氯亚砷(SOCl_2),分析纯,天津大学科威试剂公司,直接使用;透析袋,MWCO 14000,天津德宇公司。

MR18.22 型冷冻离心机,法国 Jouan;LGJ-II 型冷冻干燥机,北京四环科学仪器厂;BIO-Rad FTS

135 FT-IR 光谱仪;Varian UMTY plus400 NMR;Jeol 透射电子显微镜,日本电子光学(Jeol LTD.);Nanoscope IIIa 型原子力显微镜,美国数字仪器公司;90Plus/BI-MAS 多角粒径测试仪,美国 Brukliven;970CRT 荧光分光光度计,上海科学仪器有限公司。

1.2 生物素化胆固醇疏水改性葡聚糖(Chol-Dex-Biotin)的合成

其合成路线如图 1 所示。

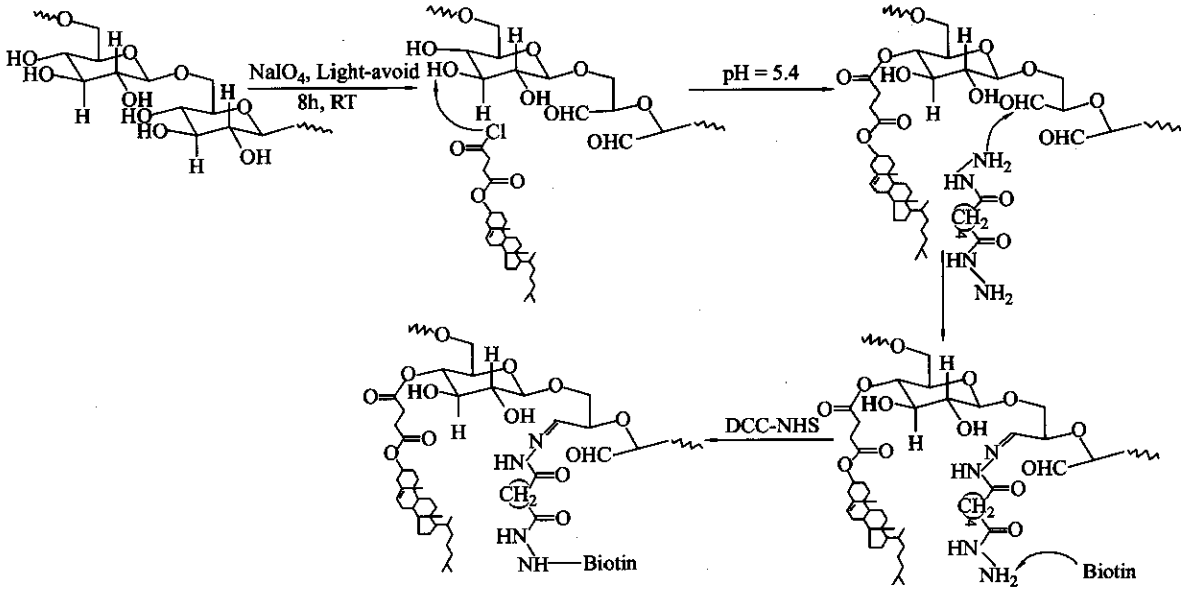


Fig. 1 Synthetic route of Chol-Dex-Biotin

1.2.1 胆固醇-3-半琥珀酸酐氯(Chol-Succ-COCl)的制备 1 mmol 胆固醇(Chol)溶于 20 mL 吡啶中,加入 5 mmol 琥珀酸酐,70℃下反应 6 h,减压蒸出吡啶,粗产品在水/无水甲醇(1:10)中结晶,再于乙醇中重结晶提纯得胆固醇-3-半琥珀酸酯 Chol-COOH。

将 Chol-COOH 溶于干燥 CHCl_3 中,按 $-\text{COOH}/\text{SOCl}_2(\text{mol/mol}) = 1:2$ 量取氯化亚砷溶于 10 mL 干燥 CHCl_3 ,缓慢滴加到反应体系中,将体系升温到至 60℃,反应 4 h,得黄绿色溶液。旋蒸除去溶剂和未反应 SOCl_2 ,得胆固醇-3-半琥珀酸酐氯(Chol-Succ-COCl),产物复溶于无水 CHCl_3 ,密封备用。

1.2.2 胆固醇-醛化葡聚糖(Chol-Dex-aldehyde)的制备 0.5 g 葡聚糖(0.0125 mmol)溶于 20 mL 去离子水中,按 IO_4^- 糖单元 $(\text{mol/mol}) = 1:3$ 向该葡聚糖溶液加入 NaIO_4 ,体系在冰浴下避光搅拌 8 h,对去离子水透析 $(\text{cut-off} = 1.4 \times 10^4 \text{ g/mol})$ 48 h,将透析后产物冷冻干燥,产率 91.6%。以盐

酸羟胺滴定法测定醛化葡聚糖的醛基含量为 $2.21 \text{ mmol/g}^{[11]}$ 。

将上述冻干醛化葡聚糖溶于 40 mL 干燥 DMSO 中,滴加适量三乙胺,按 $-\text{COCl}/\text{糖单元}(\text{mol/mol}) = 1/10$ 量取 Chol-Succ-COCl 滴加入醛化葡聚糖溶液中,氮气保护,80℃反应 8 h,产物对去离子水透析 $(\text{cut-off} = 1.4 \times 10^4 \text{ g/mol})$ 48 h,透析液冷冻干燥,得 Chol-Dex-CHO,称重计算产率为 89.5%。

1.2.3 胆固醇-葡聚糖-酰肼(Chol-Dex-NH-NH₂)和胆固醇-葡聚糖-生物素(Chol-Dex-Biotin)的制备^[12,13] 取一定量 Chol-Dex-CHO 溶于 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)中,缓慢滴加到己二酰肼的 Na_2AC (5%, pH = 5)缓冲溶液中,室温反应 24 h 后以甲醇沉淀,冷冻干燥得 Chol-Dex-NH-NH₂。按 Biotin:NHS:DCC = 1:1.5:1.5 的比例加料至干燥 DMF 中^[14],室温反应 24 h,过滤,将滤液滴加至溶有 Chol-Dex-NH-NH₂ 的干燥 DMSO 体系中,反应过

夜,将反应液对去离子水透析($\text{cut-off} = 14 \times 10^4$ g/mol)48 h,透析液冷冻干燥,得 Chol-Dex-Biotin. 控制 Biotin 与 Chol-Dex-NH-NH₂ 的配比控制 Biotin 的取代度.

上述各步产物结构以 FT-IR 和 ¹H-NMR 表征.

1.3 Chol-Dex-Biotin 表面修饰的 PLA 亚微粒子制备

如图 2,将 Chol-Dex-Biotin 与 PLA 按不同配比共溶于 5 mL DMSO 中,对 pH = 5.0 Na₂AC 缓冲溶液透析($\text{cut-off} = 1.4 \times 10^4$ g/mol)48 h 形成稳定的带蓝光的半透明溶液.溶液离心并超声清洗,去除未结合 Chol-Dex-Biotin,得表面 Chol-Dex-Biotin 修饰的 PLA 亚微粒子(Chol-Dex-Biotin/PLA 亚微粒子).以 90Plus/BI-MAS 多角度粒径测试仪测试粒子的粒径与粒径分布;TEM、AFM 观察亚微粒子的形貌,并通过 X 光电能谱(XPS)验证修饰微粒表面多糖的存在,采用滴样方法制备 XPS 样品.

1.4 Chol-Dex-Biotin 修饰 PLA 亚微粒子表面多重生物功能化因子的组装

FITC 标记的 Tf 及兔 IgG 在上述制备微球表面的组装流程如图 2 所示.

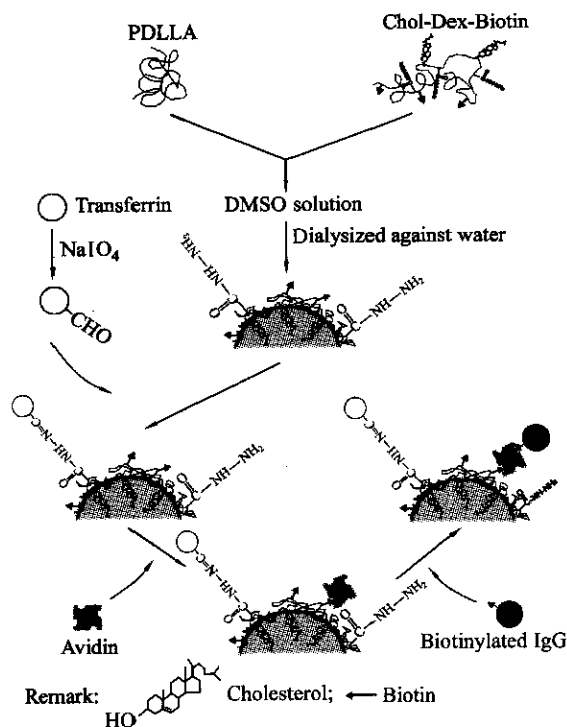


Fig. 2 Schematic representation of the forming of PLA nanoparticle and its bi-functionalization

将 NaIO₄ 氧化的 FITC 标记转铁蛋白(FITC-Tf)加入 Chol-Dex-Biotin/PLA 亚微粒子分散液中,室温孵化 12 h,高速离心后沉淀以缓冲液超声清

洗 3 次以除去未结合的 Tf.将沉淀超声分散于 pH = 7.6 的缓冲溶液,加入亲和素,37℃孵化 1 h, 1.8×10^4 r/min 下离心并超声清洗 3 次以除去未结合亲和素,再分散于 pH = 7.6 的缓冲溶液,加入生物素化的兔 IgG,37℃孵化 1 h, 1.8×10^4 r/min 下离心并超声清洗 3 次以除去未结合兔 IgG,得表面双功能化的葡聚糖修饰 PLA 亚微粒子.

利用荧光显微镜观察上述制备的胶束粒子,可以验证胶束表面 FITC 标记 Tf 的存在;而用抗 IgG-辣根过氧化物酶(IgG-HRP)标记染色法则可验证生物功能化组装后胶束表面 IgG 的存在.

2 结果与讨论

2.1 生物素化胆固醇疏水改性葡聚糖(Chol-Dex-Biotin)的结构表征

对酰肼化胆固醇接枝葡聚糖的进行红外表征,在 1733、1658、1550、1462 cm⁻¹ 处出现吸收峰,其中 1733 cm⁻¹ 为胆固醇-3-半琥珀酸结构酯键中 $\gamma(\text{C}=\text{O})$ 的振动吸收峰;1658、1550、1462 cm⁻¹ 分别为酰胺结构 I 带、II 带及 III 带吸收峰,证明改性 Dextran 主链上偶联有胆固醇和己二酰肼.

图 3 为 Chol-Dex-NH-NH₂ 在 DMSO-d₆ 中的 ¹H-NMR 谱图,图中 δ 0.6 ~ 1.1 对应于胆固醇甾环骨架上 18、19、21、26 和 27 位的 5 个角甲基的质子,这进一步证实有胆固醇偶联到葡聚糖骨架上; δ 4.9 和 4.88 附近的信号对应于葡聚糖骨架的质子, δ 4.6 和 4.5 对应于 $(\alpha)1 \sim 6$ 糖苷键连接的甲基质子, δ 3.7, 3.4 和 3.2 对应于羟基质子;而 δ 7.7 为酰肼结构中 H 的化学位移,也进一步证明有己二酰肼偶联在葡聚糖主链上.通过计算,胆固醇的接枝率为 9.2%.

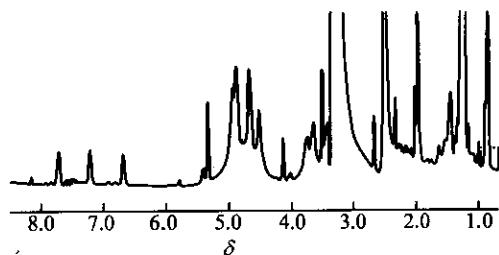


Fig. 3 ¹H-NMR spectrum of Chol-Dex-NH-NH₂

图 4 为 Chol-Dex-Biotin 在 DMSO-d₆ 中的 ¹H-NMR 谱图.对应于未接 Biotin 的 Chol-Dex-NH-NH₂ 的 ¹H-NMR 谱图(图 3),在 δ 6.4 处出现一对双峰,对应于 Biotin 上两个 NH 的化学位移;同时 δ 7.7 处酰肼结构中的 H 含量下降,是由于部分 H 被

Biotin 取代的原因. 经计算, Biotin 的接枝率为 3.2%.

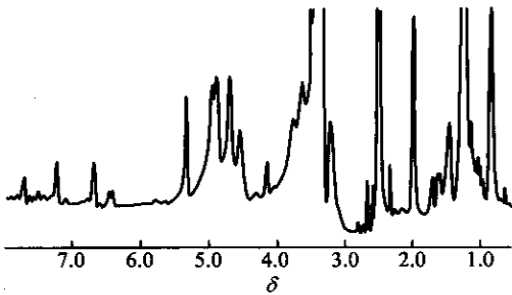


Fig. 4 ¹H-NMR spectrum of Chol-Dex-Biotin

2.2 Chol-Dex-Biotin 修饰 PLA 亚微粒子的制备

图 5 是 Chol-Dex-Biotin 在水溶液中自聚集形成的纳米粒子,由图可见自聚集纳米粒子的粒径为 30~90 nm.当将 PLA 与 Chol-Dex-Biotin 对水共透析时,形成的粒子 TEM 和 AFM 照片如图 6(a)和 6(b),由图可见共透析可形成表面光滑的球形微粒.

用激光粒度仪测试微粒的粒径大小与粒径分布,结果表明 Chol-Dex-Biotin/PLA 微粒具有较窄的粒径分布(图 7),且微粒的粒径大小随 PLA 加

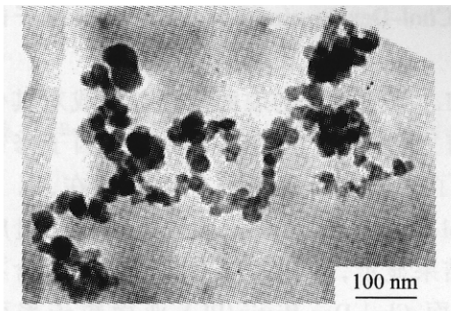


Fig. 5 The morphology of Chol-Dex-Biotin self-aggregated submicron particles observed by TEM
Concentration of Chol-Dex-Biotin = 3 mg/mL

入量的增大而增大(图 8),这一结果说明可以通过调整 PLA 与 Chol-Dex-Biotin 的比例方便地控制纳米微粒的粒径大小.值得指出的是当以纯 PLA 的 DMSO 溶液透析制备亚微粒时,虽然最终可得到平均粒径为 250 nm 的亚微粒,但其产率不足 10%,大多数 PLA 形成絮状团块.而以 Chol-Dex-Biotin 与 PLA 共透析形成的亚微粒其产率达 70%~95%,且具有良好的稳定性,在水溶液中放置 4 周并不出现团聚.

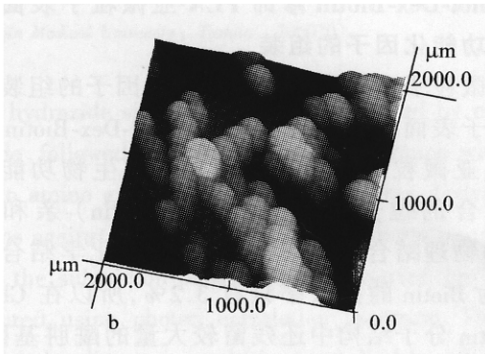
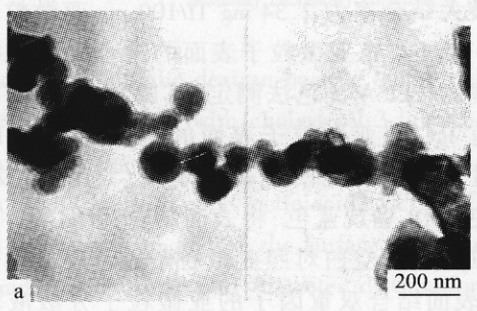


Fig. 6 Morphology of Chol-Dex-Biotin/PLA submicron particles observed by (a) TEM and (b) AFM (Chol-Dex-Biotin/PLA = 1:2)

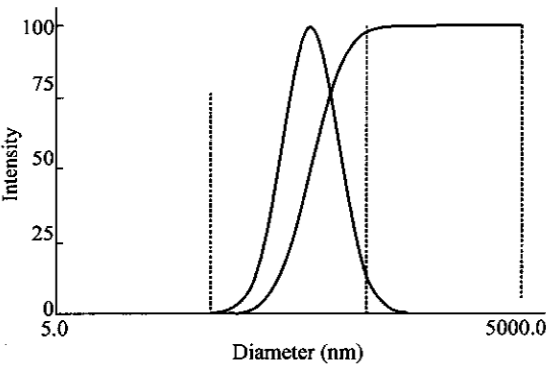


Fig. 7 Diameter and diameter distribution of Chol-Dex-Biotin/PLA submicron particles measured by PCS

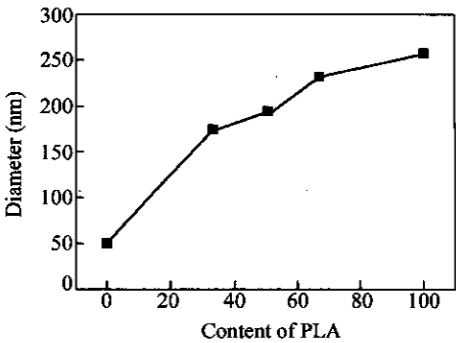
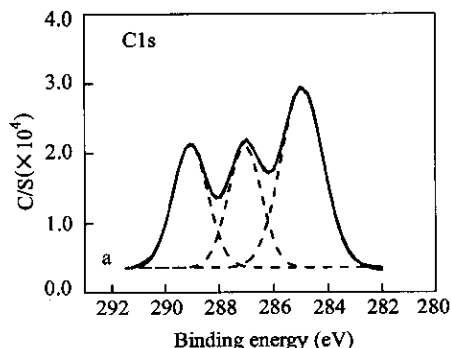


Fig. 8 Effect of the PLA content on the average diameter of Chol-Dex-Biotin/PLA submicron particles

2.3 Chol-Dex-Biotin 修饰 PLA 亚微粒子的表面特征

PLA 亚微粒子的表面结构与组成对其体内分布具有重要影响,也是表面功能化因子修饰的关键.为了验证表面多糖衍生物的存在,以 XPS 测定 Chol-Dex-Biotin/PLA 亚微粒子的表面组成. XPS 全谱结果显示,纯 PLA 亚微粒子表面只含有 C、O 元素,而 Chol-Dex-Biotin/PLA 亚微粒子表面则出现了 N 元素,其原子百分含量达 1.5%.进一步分



析 C1s(图 9)可以发现,纯 PLA 微球表面 C1s 谱存在 3 个峰,分别为 C—C(285.0 eV), C—O(286.9 eV)和 C=O(289.0 eV),其中 C—O 和 C=O 峰面积比接近 1:1,符合聚乳酸结构中两种基团的化学计量比.而在 Chol-Dex-Biotin/PLA 亚微粒子表面 C1s 谱虽然也存在 3 个峰,但位于 286.9 eV 的峰面积要大于 289.0 eV 的峰面积,这一位置面积的增大是由于 C—N 基团的引入.由 XPS 全谱和 C1s 谱结果可以证明 PLA 表面具有多糖衍生物存在.

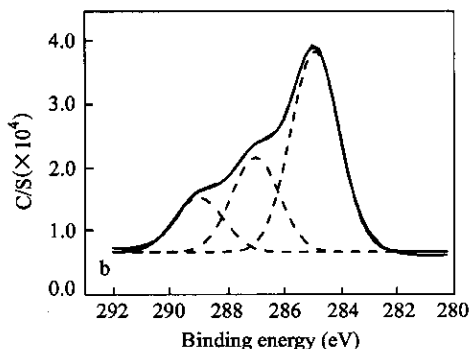


Fig. 9 C1s spectra of (a) PLA submicron particles and (b) Chol-Dex-Biotin/PLA submicron particles

2.4 Chol-Dex-Biotin 修饰 PLA 亚微粒子表面多重生物功能化因子的组装

亚微粒子表面多重生物功能化因子的组装依赖于粒子表面不同的结合位点. Chol-Dex-Biotin 修饰 PLA 亚微粒子表面存在两种可供生物功能化因子结合的位点,一是生物素(biotin)-亲和素(avidin)物理结合位点,二是酰肼基团化学结合位点.因为 Biotin 的接枝率只有 3.2%,所以在 Chol-Dex-Biotin 分子结构中还残留较大的酰肼基团,这些基团可供 NaIO₄ 氧化的 Tf 通过醛基-酰肼的酰肼化反应结合于亚微粒表面.而生物素化兔 IgG 则通过生物素-亲和素物理结合于亚微粒表面.上述两种反应均是生物学实验中常规结合反应,具有反应速率与效率高、结合能力强的特点,其中生物素-亲和素结合常数为 10¹⁵ L/mol,在较宽的温度和 pH 范围内稳定^[6].

Tf 在亚微粒子表面的结合及结合效率的以荧光显微镜和荧光分光光度计测定.由于荧光显微镜放大倍率只有 400 倍,亚微粒子分散液呈现的是一片绿色而不能清晰地分辨出粒子.为了排除游离 FITC-Tf 引起荧光的可能性,采用了微米级的大粒子.粒子清楚的绿色证明了 Tf 在粒子表面

的结合.荧光分光光度计测定表明 Tf 在微粒表面的最大结合率为 2.34 mg Tf/100 mg 亚微粒子.

兔 IgG 在亚微粒子表面的结合则以免疫学中常规的 ELISA 比色法测定.其原理为 HRP 标记的抗兔 IgG 与亚微粒子表面的兔 IgG 结合,HRP 催化过氧化氢氧化四甲基联苯胺(TMB)的反应,最终使 TMB 呈现蓝色.将表面结合兔 IgG 和 Tf 的亚微粒子与对空白对照亚微粒子显色反应后进行对比,表面结合双重因子的亚微粒子分散液清楚地显示出蓝色,而空白对照组则呈色不明显,证明表面兔 IgG 的结合.

综上所述,以生物素化胆固醇疏水改性葡聚糖(Chol-Dex-Biotin)和聚乳酸为原料,共透析法制备多糖表面修饰的聚乳酸亚微粒子,透射电子显微镜和原子力显微镜观察表明形成的亚微粒子呈表面光滑的球形,激光粒度仪测定表明亚微粒子粒径为 150 ~ 200 nm,且可由 Chol-Dex-Biotin 和 PLA 的比例控制. XPS 测定证明了亚微粒子表面多糖衍生物的存在.以此为基础,通过生物素-亲和素物理结合和醛-酰肼共价结合可将转铁蛋白和兔 IgG 同时结合于亚微粒子表面,形成双重因子表面修饰的聚乳酸亚微粒子.

REFERENCES

- 1 Jorg K. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 47: 65 ~ 81
- 2 Lu Bin(陆斌). *Pharmaceutical New Medicament and Technology*(药物新剂型与新技术). Beijing(北京): People's Medical Publishing House(人民卫生出版社), 2002. 1 ~ 2
- 3 Leila N, Franz B, Robert G, Eric A. *Int J Pharm*, 2003, 250: 327 ~ 337
- 4 Woddle M C, Lasic D D. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 1113: 171 ~ 199
- 5 Lemarchand C, Gref R, Couvreur P. *Europ J Pharm Biopharm*, 2004, 58: 327 ~ 341
- 6 Ruxandra G, Patrick C, Gillian B, Evgueni M. *Biomaterials*, 2003, 24: 4529 ~ 4537
- 7 Thomas B, Malgorzata K, Robert H, Ralf K, Ernst W. *Bioconjugate Chem*, 2001, 12: 529 ~ 537
- 8 Omelyanenko V, Kopeckova P, Gentry C, Kopecek J. *J Control Release*, 1998, 53: 25 ~ 37
- 9 Zhang Y, Zhang Y F, Bryant J, Charles A, Boado R J, Partridge W M. *Clinical Cancer Research*, 2004, 10: 3667 ~ 3677
- 10 Gu Peiji(顾培基). *Chemical Industry Times*(化工时刊), 1992, 4: 24 ~ 26
- 11 Zhao H, Heindel N D. *Pharm Res*, 1991, 8: 400 ~ 402
- 12 Yang H Y, Douglas J G, Paige Y, William C. *Biomaterials*, 2004, 25: 147 ~ 157
- 13 Kuen Y L, Kamal H B, David J M. *Macromolecules*, 2000, 33: 97 ~ 101
- 14 Wenjin G, Robert J L. *AAPS Pharmsci*, 1999, 1(4): 128 ~ 135

SURFACE MULTI-BIOFUNCTIONALIZATION OF PLA SUBMICRON PARTICLES COATED WITH AMPHIPHILIC DEXTRAN DERIVATES

GU Mingqi¹, YUAN Xubo¹, TIAN Enjiang², SHENG Jing¹

(¹ School of Materials Science & Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072)

(² Immunity Laboratory, Institute of Incretinary, Tianjin Medical University, Tianjin 300070)

Abstract Amphiphilic dextran bearing biotin, cholesterol and hydrazide side groups was synthesized by esterifying of dextran polyaldehyde with cholesterol 3-hemisuccinyl chloride, followed by reacting aldehyde groups with adipic dihydrazide, and then conjugating carbodiimide-activated biotin to amino groups. The resultant dextran derivatives were used to co-dialyze with poly(lactic acid) (PLA) DMSO solutions against water to form PLA submicron particles with dextran derivatives anchored on the surface. The morphologies of the submicron particles were observed by TEM and AFM, and the diameter and diameter distribution were measured using photon correlation spectrum. The results showed that the submicron particles were spherical in shape, and the diameters could be controlled by adjusting the ratio of the Chol-Dex-Biotin to the (PLA). The surface structure of the submicron particles was measured by XPS and the results demonstrated the existing of the dextran derivatives. By conjugating these submicron particles with transferrin through acryl hydrazone reaction and IgG via biotin-avidin mediated physical linking, respectively, PLA submicron particles bearing transferrin and IgG protein simultaneously on the surface were obtained. The conjugation of transferrin and IgG was proved by fluorescence microscope and color development reaction of antiIgG-HRP.

Key words Dextran, Poly(lactic acid), Submicron particles, Surface, Bio-functionalization