

# 基于磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡的药物载体

宗 薇, 柴云鹤, 邵小桐, 李 军, 张旭男\*

(齐齐哈尔大学 化学与化学工程学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

**摘要:** 由聚甲基丙烯酸胆固醇酯 (pCMA)-嵌段-聚甲基丙烯酸 *N,N*-二甲氨基乙酯 (pDMAEMA) 共聚物 (pCMA-*b*-pDMAEMA) 和磷脂组装磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡。通过荧光电子显微镜、动态光散射仪对磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡进行了测试。使用 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞开展细胞毒性和内化实验, 并考察了磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡内药物体外释放。结果表明, 1-棕榈酰-2-油酰磷脂酰胆碱 (POPC)-嵌段共聚物 P2 [ $m(\text{pCMA}) : m(\text{pDMAEMA}) = 1 : 5$ ] 杂化囊泡 (POPC<sub>0.3</sub>P2<sub>0.7</sub>, A<sub>3</sub>, 其中 0.3 和 0.7 分别代表 POPC 和嵌段共聚物 P2 的质量, mg, 下同) 和 POPC<sub>0.1</sub>POEPC<sub>0.2</sub>P2<sub>0.7</sub> (A<sub>8</sub>, 其中 POEPC 为 1,2-二棕榈酰-*sn*-甘油-3-磷酸胆碱) 分别与 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞培养 5 h 后, 细胞存活率分别为 93.4%±1.1% 和 92.1%±0.8%, 均高于其他样品。POPC<sub>0.1</sub>POEPC<sub>0.2</sub>P3<sub>0.7</sub> [P3 为  $m(\text{pCMA}) : m(\text{p}[\text{DMAEMA-co-荧光素 } O\text{-甲基丙烯酸酯 (FIMA)]) = 1 : 5$  嵌段共聚物] 比 POPC<sub>0.3</sub>P3<sub>0.7</sub> 更易被 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞吸收。用磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡 A<sub>8</sub> 负载阿霉素 (DOX) (DOX@A<sub>8</sub>) 对人肾癌细胞 OS-RC-2 进行治疗, 发现当 DOX 终浓度为 3.00 μmol/L 时, DOX@A<sub>8</sub> 对人肾癌细胞 OS-RC-2 的抑制率为 75.0%±1.1%。

**关键词:** 磷脂; 共聚物; 自组装; 磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡; 药物载体; 生物工程

**中图分类号:** TQ460.4      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1003-5214 (2022) 11-2290-07

## Drug carrier based on phospholipid-block copolymer hybrid vesicles

ZONG Wei, CHAI Yunhe, SHAO Xiaotong, LI Jun, ZHANG Xu'nan\*

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006, Heilongjiang, China)

**Abstract:** Phospholipid-block copolymer hybrid vesicle was assembled from polycholesterol methacrylate (pCMA)-block-*N,N*-dimethylaminoethyl methacrylate copolymer (pDMAEMA) (pCMA-*b*-pDMAEMA) and phospholipids and characterized by fluorescent electron microscope and dynamic light scatterometer. The cytotoxicity and internalization assays were then carried out on RAW 264.7 mouse macrophages, followed by *in vitro* drug release analysis. The results showed that the cell survival rate of macrophages, cultured in a medium containing 1-palmitoyl-2-oleoyl phosphatidylcholine (POPC)-block-copolymer P2 [ $m(\text{pCMA}) : m(\text{pDMAEMA}) = 1 : 5$ ] hybrid vesicles (POPC<sub>0.3</sub>P2<sub>0.7</sub>, A<sub>3</sub>, where 0.3 and 0.7 represent the mass of POPC and block copolymer P2, mg, the same below) and POPC<sub>0.1</sub>POEPC<sub>0.2</sub>P2<sub>0.7</sub> (A<sub>8</sub>, where POEPC is 1, 2-dipalmitoyl-*sn*-glycerol-3-phosphocholine phosphatidylcholine) for 5 h, was 93.4%±1.1% and 92.1%±0.8%, respectively, higher in comparison with other samples prepared. Meanwhile, POPC<sub>0.1</sub>POEPC<sub>0.2</sub>P3<sub>0.7</sub> {P3 is block copolymer with a mass ratio of pCMA to p[DMAEMA-co-fluorescein *O*-methacrylate (FIMA)] of 1 : 5} was more easily absorbed by the RAW 264.7 mouse macrophages than POPC<sub>0.3</sub>P3<sub>0.7</sub>. Moreover, the proliferation inhibition rate of human kidney cancer cells OS-RC-2 treated with doxorubicin (DOX) loaded in phospholipid-block copolymer hybrid vesicles A<sub>8</sub> (DOX@A<sub>8</sub>) was 75.0%±1.1% when at a final DOX concentration of 3.00 μmol/L.

**Key words:** phospholipids; copolymers; self-assembly; phospholipid-block copolymer hybrid vesicles; drug delivery; biological engineering

收稿日期: 2022-04-27; 定用日期: 2022-06-02; DOI: 10.13550/j.jxhg.20220405

基金项目: 黑龙江省省属本科高校基本科研业务费科研基金 (135409212)

作者简介: 宗 薇 (1987—), 女, 副教授, E-mail: viahit@126.com. 联系人: 张旭男 (1987—), 男, 讲师, E-mail: isaachit@163.com.

在过去一个世纪中, 人类在基因或肿瘤生物学的基础研究方面取得了许多优异成绩<sup>[1-4]</sup>, 聚合物胶粒、脂质体、水凝胶颗粒和介孔 SiO<sub>2</sub> 等是作为药物载体的最佳选择, 与较大尺寸的药物载体(直径>1 μm)相比, 纳米级药物载体更适合在血管中顺畅运输药物直达病灶部位, 而不会引起血栓等副作用<sup>[5-8]</sup>。

磷脂分子具有两亲性质, 在水溶液中可自组装成闭合囊泡结构, 即脂质体。脂质体具有生物相容性、可生物降解性、无毒性等优点, 但其不具备长时间在血液循环中稳定的特性。为了有效地解决脂质体在稳定性方面存在的缺陷, 科学家们将目光转移到聚合物上, 利用聚合物在稳定性方面具有的优势来弥补脂质体在药物载体领域存在的不足。目前, 部分科学家在制备具有长效循环特性的磷脂-共聚物杂化药物载体方面取得了进展, 如以聚乙二醇-聚(乳酸-羟基乙酸)共聚物(PEG-PLGA)<sup>[9]</sup>、二油酰基磷脂酰胆碱-聚(*N*-异丙基丙烯酰胺)-聚(胆固醇丙烯酸酯)-异丙基丙烯酰胺共聚物(DOPC-PNIPAAm-PChA-PNIPAAm)<sup>[10]</sup>、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-*N*(甲氧基聚乙二醇 2000)-聚 ε-己内酯-聚乙二醇-聚 ε-己内酯(DSPE-PEG2000-PCL-PEG-PCL)<sup>[11]</sup>等磷脂-共聚物杂化材料作为原料制备药物载体, 该类药物载体的制备将脂质体和纳米粒子制备技术有效结合起来, 有助于生物医学研究领域发展。具有两亲性共聚物和磷脂分子自组装杂化囊泡的研究吸引了众多化学家和生物物理学家的关注, 20 世纪 90 年代末, 由于两亲性聚合物分子能够形成闭合球形囊泡形貌而被命名为聚合物囊泡<sup>[12]</sup>, 如使用聚赖氨酸(PLL)、聚甲基丙烯酸 *N,N*-二甲基氨基乙酯(pDMAEMA)成功构建出聚合物囊泡作为药物载体<sup>[13-16]</sup>。其中, pDMAEMA 由于较低的细胞毒性和可生物降解性而备受关注, pDMAEMA 共聚物与脂类分子共混能够形成超分子的组装体, 磷脂-聚合物杂化囊泡将具备聚合物膜所具有的结构稳定性和机械韧度, 同时杂化囊泡又具备磷脂膜所特有的生物相容性与生物功能性<sup>[12,17-21]</sup>。因此, 由磷脂和嵌段共聚物组成的囊泡结合了脂质体和多聚体的优点, 可以克服各自的不足。

基于上述背景, 本研究拟以磷脂和聚甲基丙烯酸胆固醇酯(pCMA)-嵌段-pDMAEMA 嵌段共聚物(pCMA-*b*-pDMAEMA)为原料, 利用脂质体挤出器来制备纳米级磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡, 通过荧光电子显微镜、动态光散射仪、冷冻透射电子显微镜优化实验条件; 随后, 考察该磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡的细胞毒性、内化作用、体外释放情况、对癌细胞生长抑制能力及实际负载药物后对药物活性的影响, 为磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡应用于药物载

体领域提供理论基础。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

氯仿(CP)、无水乙醇(CP)、磷酸盐缓冲液(PBS, pH=7.4, AR)、噻唑蓝(MTT, AR)、阿霉素(DOX, AR), 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; 1-棕榈酰-2-油酰磷脂酰胆碱(POPC)、1,2-二棕榈酰-*sn*-甘油-3-磷酸胆碱(POEPC)、1-棕榈酰-2-油酰基磷脂酰丝氨酸(POPS)、1,2-双十六烷酰基-*sn*-甘油-3-磷酸乙醇胺、三乙基铵盐(TR-DHPE), 以上磷脂均为 GR, 美国 AvantiPolar Lipids 公司; 人肾癌细胞 OS-RC-2、RAW 264.7 小鼠巨噬细胞, 日本理化学研究所(RIKEN)细胞库(日本); 嵌段共聚物 P1 [ $m(\text{pCMA}) : m(\text{pDMAEMA}) = 1 : 1$ ], P2 [ $m(\text{pCMA}) : m(\text{pDMAEMA}) = 1 : 5$ ], P3 [ $m(\text{pCMA}) : m(\text{p}[\text{DMAEMA-co-荧光素 } O\text{-甲基丙烯酸酯(FIMA)]) = 1 : 5$ ], 其中, 嵌段共聚物 P3 是在嵌段共聚物 P2 结构基础上修饰发绿色荧光的基团, 以便于在荧光电子显微镜下观察, 由丹麦奥胡斯大学细胞模拟研究实验室提供。

本文用到两种不同 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)缓冲溶液, 即 HEPES1 缓冲溶液(10 mmol/L HEPES, pH=7.4)和 HEPES2 缓冲溶液(10 mmol/L HEPES, 150 mmol/L NaCl, pH=7.4)。

Nikon 80i 荧光电子显微镜, 日本尼康公司; Glacios 冷冻透射电子显微镜、i160 CO<sub>2</sub> 培养箱(24 孔板、96 孔板), 美国赛默飞世尔科技公司; A VESTINLF-1 脂质体挤出器, 加拿大奥威斯丁公司; DG1032Z 信号发生器, 普源精电科技有限公司; SuPerMax-3000M2 酶标仪, 上海闪谱科技有限公司; XH-2000-1 涡旋混合器、CJ-2D 净化工作台, 天津市泰斯特仪器有限公司; Zetasizer Nano ZS 动态光散射仪(DLS), 英国马尔文仪器有限公司。

### 1.2 方法

以 L<sub>*x*</sub>Py<sub>*z*</sub> 代表磷脂-嵌段共聚物杂化组装体, 其中, L 代表磷脂成分; *x* 代表加入的磷脂质量(mg); Py 代表嵌段共聚物 P1、P2 或 P3; *z* 代表加入嵌段共聚物质量(mg)。TR-DHPE 作为磷脂分子的荧光标记物, 其使用量为磷脂总质量的 4%; 如果制备带有电荷的样品, 需要使用带有电荷的 POEPC(带正电荷)/POPS(带负电荷)磷脂代替 0.2 mg 的 POPC 磷脂。样品的命名如表 1 所示。

由于微米级磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡 A<sub>16</sub> 样品中 POPC 成分和嵌段共聚物 P3 成分被分别标记为红色和绿色荧光, 该微米级尺寸利于荧光电子显微镜

下观察囊泡是否被成功制备,为进一步制备纳米级磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡用于药物载体奠定基础。现以微米级 A<sub>16</sub>的制备方法为例介绍样品制备方法,其他样品制备方法与其相同,只是原料混合比例不同。

表 1 样品的命名  
Table 1 Naming of samples

样品	命名	样品	命名
POPC <sub>0.3</sub> P1 <sub>0.7</sub>	A <sub>1</sub>	POPC <sub>0.8</sub> POEPC <sub>0.2</sub>	A <sub>10</sub>
POPC <sub>0.7</sub> P1 <sub>0.3</sub>	A <sub>2</sub>	POPC <sub>0.1</sub> POPS <sub>0.2</sub> P1 <sub>0.7</sub>	A <sub>11</sub>
POPC <sub>0.3</sub> P2 <sub>0.7</sub>	A <sub>3</sub>	POPC <sub>0.5</sub> POPS <sub>0.2</sub> P1 <sub>0.3</sub>	A <sub>12</sub>
POPC <sub>0.7</sub> P2 <sub>0.3</sub>	A <sub>4</sub>	POPC <sub>0.1</sub> POPS <sub>0.2</sub> P2 <sub>0.7</sub>	A <sub>13</sub>
POPC <sub>1.0</sub>	A <sub>5</sub>	POPC <sub>0.5</sub> POPS <sub>0.2</sub> P2 <sub>0.3</sub>	A <sub>14</sub>
POPC <sub>0.1</sub> POEPC <sub>0.2</sub> P1 <sub>0.7</sub>	A <sub>6</sub>	POPC <sub>0.8</sub> POPS <sub>0.2</sub>	A <sub>15</sub>
POPC <sub>0.3</sub> POEPC <sub>0.2</sub> P1 <sub>0.3</sub>	A <sub>7</sub>	POPC <sub>0.3</sub> P3 <sub>0.7</sub>	A <sub>16</sub>
POPC <sub>0.1</sub> POEPC <sub>0.2</sub> P2 <sub>0.7</sub>	A <sub>8</sub>	POPC <sub>0.7</sub> P3 <sub>0.3</sub>	A <sub>17</sub>
POPC <sub>0.3</sub> POEPC <sub>0.2</sub> P2 <sub>0.3</sub>	A <sub>9</sub>	POPC <sub>0.1</sub> POEPC <sub>0.2</sub> P3 <sub>0.7</sub>	A <sub>18</sub>

### 1.2.1 微米级磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡 A<sub>16</sub>的组装

首先,使用无水乙醇和蒸馏水分别超声清洗 ITO 玻璃电极(25 mm×45 mm)15 min;随后,在室温下 N<sub>2</sub>吹拂 ITO 玻璃电极使其干燥。将带有红色荧光 TR-DHPE(0.012 mg)的 POPC(0.288 mg)和 0.7 mg 带有绿色荧光嵌段共聚物 P3 溶于 200 μL 氯仿中,记作 POPC(TR-DHPE)-P3 混合溶液。在 ITO 玻璃电极表面滴加 5 μL POPC(TR-DHPE)-P3 混合溶液,同时迅速将混合溶液平铺于 ITO 玻璃电极表面,将处理后的 ITO 玻璃电极置于真空干燥箱中 40 °C 抽真空干燥至少 2 h。利用真空脂将聚四氟乙烯材质制备的矩形框架固定在 ITO 玻璃电极表面,在矩形框架内注满蒸馏水,调节交流电电压为 5 V、频率 10 Hz,在 40 °C 下,对样品施加 4 h 交流电处理以获得样品 A<sub>16</sub>。利用荧光电子显微镜观察 A<sub>16</sub> 形貌,确认囊泡膜表面荧光物质是否存在。

### 1.2.2 纳米级磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡 A<sub>1</sub>的制备

将 0.3 mg POPC 和 0.7 mg 嵌段共聚物 P1 混合置于圆底烧瓶底部,在 37 °C 下,向圆底烧瓶中加入 1 mL HEPES2 缓冲溶液,对烧瓶内混合溶液进行涡旋搅拌处理。室温下,在脂质体挤出器的帮助下,将上述磷脂和嵌段共聚物的混合溶液通过孔径为 200 nm 的聚碳酸酯过滤膜,从而获得纳米级 A<sub>1</sub> 样品。

囊泡的粒径、多分散性指数(PDI)及 Zeta 电位使用动态光散射仪测量,其中材料折光率设为 1.590,分散剂指数为 1.33,当样品的 PDI>0.4 时,代表样品不合格,需舍弃。对于测量 Zeta 电位的样品需要在 HEPES1 缓冲溶液中制备。

### 1.2.3 细胞摄取实验

RAW 264.7 小鼠巨噬细胞在体积分数为 95%空

气和 5% CO<sub>2</sub> 培养箱及 37 °C 条件下铺于 96 孔板内保持 12 h,使用 100 μL PBS 冲洗 2 遍,将 10 μL 磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡样品与 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞共培养保持 5 h,使用细胞培养液冲洗细胞 2 次,随后每个孔内加入 110 μL 细胞培养液,再加入 10 μL 细胞计数试剂盒溶液,将 96 孔板放回 37 °C 培养箱中保持 2 h,取一新的 96 孔板,将上一个孔板中液体依次移除 100 μL 按顺序滴加到新 96 孔板中,最后使用酶标仪在波长 570 nm 下进行测试,根据式(1)计算出细胞存活率,RAW 264.7 小鼠巨噬细胞对磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡的内化效果利用荧光电子显微镜获得。

$$\text{细胞存活率}/\% = \frac{A_s - A_b}{A_c - A_b} \times 100 \quad (1)$$

式中: A<sub>s</sub> 为实验组吸光度(含 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞、培养基、细胞计数试剂盒溶液、磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡); A<sub>b</sub> 为空白组吸光度(含培养基、细胞计数试剂盒溶液); A<sub>c</sub> 为对照组吸光度(含 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞、培养基、细胞计数试剂盒溶液)。

### 1.2.4 磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡载体内药物的体外释放实验

磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡载体内药物的体外释放实验以抗癌药物 DOX 为例。磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡负载 DOX 溶液过程参照 1.2.1 节实验过程,只是将矩形框架内注满蒸馏水换成质量浓度为 1 mg/L DOX 水溶液。负载 DOX 磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡载体的释放曲线由透析法测定<sup>[22]</sup>。将负载 DOX 的磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡载体置入截留相对分子质量为 14000 的透析袋内,通过磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡载体外部游离的 DOX 含量随时间的变化关系获得磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡载体药物释放曲线。首先,吸取 0.5 mL 负载 DOX 的磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡载体溶液封入处理后的透析袋内,随后将装有磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡载体溶液的透析袋置于 20 mL PBS 缓冲溶液中,在 37 °C 下进行磁力搅拌处理。每隔 1 h 取出 2 mL 上清液,测试该上清液的紫外吸收,同时向母液中补充等量的 PBS 缓冲溶液。当磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡载体不再向外释放药物后,加入聚乙二醇辛基苯基醚(TritonX-100)以破坏磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡载体的双分子层结构,使载体内部的 DOX 全部释放出来,在 232 nm 波长下测其吸光度。根据式(2)计算,即可得到磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡载体内药物释放率:

$$\text{杂化囊泡载体内药物释放率}/\% = \frac{A_x}{A_{\text{总}}} \times 100 \quad (2)$$

式中: A<sub>x</sub> 为任意一个时间点测得的吸光度; A<sub>总</sub> 为所

有时间点紫外吸光度的总和。

### 1.2.5 细胞毒性的评价

使用的人肾癌细胞 OS-RC-2 细胞培养液为含有体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 将处于对数生长期的细胞以  $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$  个/孔密度铺于 96 孔细胞培养板中, 并置于恒温培养箱中培养 12 h, 设置恒温培养箱的参数为 37 °C, 气体环境为体积分数 95% 空气和 5% CO<sub>2</sub>, 在空白组中加入同体积培养液, 实验组中加入不同浓度的样品, 每个实验组设定 3 个平行组, 空白组和阴性对照组内加入培养基, 分别培养不同时间, 当孵育结束后, 移除培养孔中液体, 向 96 孔板培养板的每个孔中加入 20 μL 含有质量浓度为 5 g/L MTT 的 PBS 溶液继续培养 4 h, 然后吸掉孔中的培养基, 再加入 150 μL 二甲基亚砜 (DMSO), 在使用酶标仪测试前, 轻轻振荡样品管 3 min 充分溶解晶体, 使用酶标仪在 570 nm 波长下测试样品的吸光度。样品对细胞生长的抑制率按式 (3) 进行计算:

$$\text{抑制率} / \% = \frac{A_c - A_s}{A_c - A_b} \times 100 \quad (3)$$

式中:  $A_s$  为实验组吸光度 (含人肾癌细胞 OS-RC-2、

培养基、MTT 溶液、磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡);  $A_b$  为空白组吸光度 (含培养基、MTT 溶液);  $A_c$  为对照组吸光度 (含人肾癌细胞 OS-RC-2、培养基、MTT 溶液)。

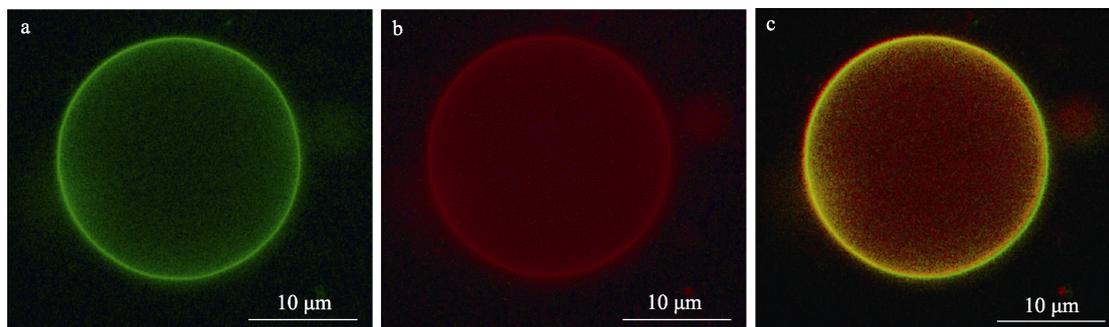
### 1.2.6 数据处理与分析

所有实验数据均用“平均值±标准差”来表示, 统计学分析采用  $t$  检验,  $p < 0.05$  表明结果具有显著性差异, 并用\*表示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 微米级磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡组装与表征

标记红色荧光的 POPC 与嵌段共聚物 P3 按照质量比为 7 : 3 混合, 在交流电场 5 V、10 Hz 条件下, 制备微米级 A<sub>17</sub> 磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡, 结果如图 1 所示。由图 1a 可见, 绿色荧光为嵌段共聚物 P3 显示, 其激发波长为 463 nm; 图 1b 红色荧光为 POPC 膜轮廓, 其激发波长为 595 nm; 图 1c 为图 1a 和 b 叠加后效果图。由图 1 可知, POPC 分子和嵌段共聚物 P3 分子能够共同组装出尺寸为 20 μm 左右磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡, 且分子均匀分散于囊泡膜表面。



a—嵌段共聚物 P3 膜层; b—POPC 膜层; c—图 a 和 b 叠加

图 1 样品的显微镜照片

Fig. 1 Microscopic images of samples

### 2.2 纳米级磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡组装

使用 DLS 对制备的纳米级磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡尺寸、PDI 和 Zeta 电位进行了测量, 当直径 > 300 nm 或 PDI > 0.4, 表明样品发生了聚集, 被舍弃, 结果如表 2 所示。由表 2 可知, 由于共聚物带正电荷, 导致磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡中随着磷脂含量所占比例的减少, 杂化物的 Zeta 电位增大。A<sub>3</sub> 可以成功组装, 但对于 A<sub>4</sub>, 其在制备后的 2 h 内就会形成大块的聚集体, 该现象的出现可能是因为磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡膜的不稳定性和相分离因素导致膜上分子不受控地重排成磷脂-嵌段共聚物聚集体。A<sub>3</sub> 比 A<sub>1</sub> 具有更高的 Zeta 电位, 该结果的出现暗示 A<sub>3</sub> 中存在具有高相对分子质量亲水链的

DMAEMA 单元数量多。同样, 当带有正电荷的 POEPC 被加入到组装体中时, A<sub>6</sub>、A<sub>7</sub> 和 A<sub>8</sub> 可以成功组装成囊泡, 而 A<sub>9</sub> 囊泡发生聚集。A<sub>10</sub> 的 Zeta 电位比 A<sub>7</sub> 大, 证明了磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡中嵌段共聚物的成功加入。当带有负电荷的 POPS 被加入到杂化物中时, 在含有嵌段共聚物 P1 条件下均未能形成质量较好的组装体。在制备 A<sub>14</sub> 组装体时, 出现样品黏附玻璃表面现象, 样品不能够顺利地圆底烧瓶内部脱离到溶液中, 只有 A<sub>13</sub> 能制备出质量较好的组装体。出现以上结果是由于嵌段共聚物和脂类含有相反的电荷。A<sub>13</sub> 的 Zeta 电位为正值, 可能由该组装体中含有较高比例带正电荷嵌段共聚物所引起。但 A<sub>13</sub> 稳定性较差, 样品保存 3 d 就会出

现聚集体。因此，该样品也不考虑为后续实验所使用。在所有样品中，A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub>、A<sub>5</sub>、A<sub>6</sub>、A<sub>7</sub>、A<sub>8</sub>、A<sub>10</sub>、A<sub>15</sub> 组合可以成功制备出囊泡，其中，考虑囊泡下一步将应用于药物载体，表面带正电荷更容易与带负电荷的细胞融合。因此，A<sub>15</sub> 样品被放弃作进一步研究。

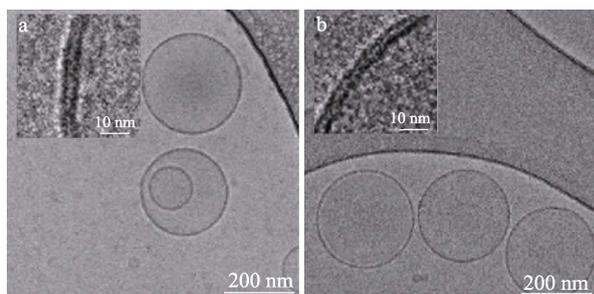
表 2 不同成分磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡直径、PDI 及 Zeta 电位

Table 2 Diameter, PDI and Zeta potential of different phospholipid-block copolymer hybrid vesicles

样品	直径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
A <sub>1</sub>	184.6±8.6	0.08±0.01	11.7±3.2
A <sub>2</sub>	208.9±14.2	0.11±0.01	0.5±1.3
A <sub>3</sub>	217.0±9.6	0.09±0.02	18.4±5.4
A <sub>4</sub> <sup>a</sup>	1214.0±230.9	0.84±0.31	—
A <sub>5</sub>	239.1±10.2	0.15±0.01	-3.8±1.3
A <sub>6</sub>	193.6±11.3	0.11±0.01	24.2±1.8
A <sub>7</sub>	212.0±11.7	0.08±0.01	53.2±2.3
A <sub>8</sub>	192.0±12.8	0.16±0.03	29.5±1.1
A <sub>9</sub> <sup>a</sup>	399.0±21.7	0.73±0.23	—
A <sub>10</sub>	173.4±11.0	0.11±0.01	55.0±2.4
A <sub>11</sub> <sup>a</sup>	1154.9±347.5	0.87±0.14	—
A <sub>12</sub> <sup>a</sup>	1085.6±247.9	0.69±0.27	—
A <sub>13</sub> <sup>a</sup>	185.4±13.5	0.21±0.14	15.6±1.5
A <sub>14</sub> <sup>a</sup>	—	—	—
A <sub>15</sub> <sup>a</sup>	225.4±14.8	0.23±0.11	-45.8±8.3

注：a 均被放弃开展进一步相关研究；“—”代表没有检测出结果。

通过测试磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡的 DLS、PDI 和电荷，从表 1 优化出 8 组囊泡样品，根据进一步研究需要，选择 A<sub>6</sub> 和 A<sub>8</sub> 分别作为 POPC-P1 磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡和 POPC-P2 磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡的代表，对其囊泡结构利用冷冻透射电子显微镜进行了观察，结果如图 2 所示。



a—A<sub>6</sub>; b—A<sub>8</sub>

图 2 磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡冷冻 TEM 图

Fig. 2 Cryo-TEM images of different phospholipid-block copolymer hybrid vesicles

由图 2a 可见，由于电荷的存在，导致 A<sub>6</sub> 磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡部分出现相分离现象。由图 2b 可知，A<sub>8</sub> 磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡尺寸均一，结构清晰可见，单层膜厚度在 6 nm 左右。由此证明，磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡已被成功组装。

### 2.3 细胞摄取实验分析

为了考察磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡是否适合作为药物载体，分别将磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡 A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub>、A<sub>5</sub>、A<sub>6</sub>、A<sub>7</sub>、A<sub>8</sub>、A<sub>10</sub> 与 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞共培养 5 h，结果如图 3a 所示。

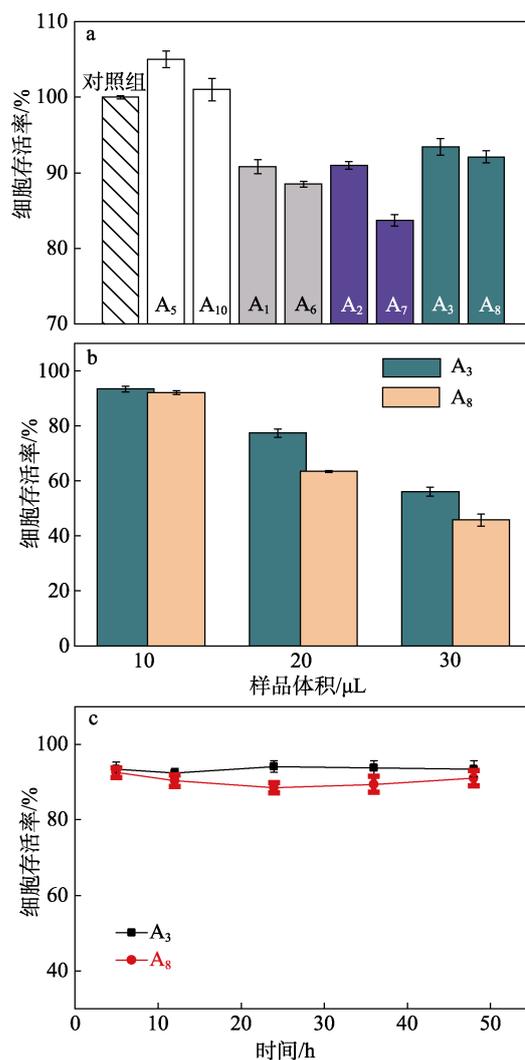


图 3 磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡与 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞共培养后细胞存活率柱状图 (a); 不同含量磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡与 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞共培养后细胞存活率柱状图 (b); 磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡与 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞共培养后细胞存活率随时间变化曲线 (c)

Fig. 3 Column diagrams of cell viability after co-culture of phospholipid-block copolymer hybrid vesicles and macrophages (a); Column diagrams of cell viability after co-culture of different amount phospholipid-block copolymer hybrid vesicles and macrophages (b); Curves of cell viability over time after co-culture of phospholipid-block copolymer hybrid vesicles and macrophages (c)

由图 3a 可见, 磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡  $A_5$  和  $A_{10}$  对 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞存活率影响不大, 其细胞存活率均约 100%, 而其他样品明显降低了 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞的存活率, 该现象是由于嵌段共聚物 P1 或 P2 的加入引起的。其中, 磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡  $A_3$  和  $A_8$  与 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞共培养后细胞存活率分别为  $93.4\% \pm 1.1\%$  和  $92.1\% \pm 0.8\%$ , 与其他磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡样品相比, 其细胞存活率相对较高, 该结果证明了嵌段共聚物 P2 更适合制备成磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡, 作为药物载体。为考察细胞存活率对样品体积含量的依赖性, 不同用量样品, 即 10、20、30  $\mu\text{L}$  磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡  $A_3$  和  $A_8$  分别与 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞共培养 5 h, 细胞存活率柱状图如图 3b 所示。由图 3b 可见, 随着样品体积的增加, RAW 264.7 小鼠巨噬细胞存活率逐渐降低。随后, 进一步考察 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞存活率对培养时间的依赖性, 将 10  $\mu\text{L}$  磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡  $A_3$  和 10  $\mu\text{L}$  磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡  $A_8$  分别与 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞共培养 5、12、24、36、48 h 后, 结果如图 3c 所示。由图 3c 可知, 细胞存活率变化幅度不大, 均能保持在 90% 左右, 结果表明, 由 POPC 和嵌段共聚物 P2 制备的磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡适合作为药物载体。

为了利于在荧光电子显微镜下观察载体被细胞摄入情况, 此时, 将嵌段共聚物 P2 换成被标记荧光的嵌段共聚物 P3。将  $A_{16}$ 、 $A_{18}$  与 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞共培养 5 h 后, 取培养后细胞在荧光电子显微镜下观察其形貌, 结果如图 4a 所示, 其中, 图 4 中绿色荧光为嵌段共聚物 P2 标记荧光基团, 即嵌段共聚物 P3 所显示的荧光, 其最大激发波长为 463 nm; 蓝色荧光为 DAPI 染色 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞的细胞核, 其最大发射波长为 364 nm。图 4ai3 和 aii3 分别为前两列图片的叠加图, 通过该组荧光电子显微镜照片可以清晰地观察到, RAW 264.7 小鼠巨噬细胞对磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡  $A_{18}$  的摄取量更大。通过流式细胞术测量磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡  $A_{16}$  和  $A_{18}$  进入 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞后平均细胞荧光强度 (MCF), 利用 MCF 判断 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞对磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡的摄入量, 结果如图 4b 所示。由图 4b 可见, 磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡  $A_{18}$  在 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞中的荧光强度更大, 该结果说明, 磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡  $A_{18}$  容易被 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞所摄取, 磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡  $A_{18}$  适合作为治疗 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞内缺陷或疾病的药物载体。该实验结果与理论分析一致, 因为从理论角度考虑磷脂-

嵌段共聚物杂化囊泡  $A_{18}$  表面带有正电荷, 与带有负电荷的细胞膜更容易发生正负电荷吸引作用<sup>[23]</sup>, 从而促进细胞融合作用, 为载体内药物传输提供帮助。

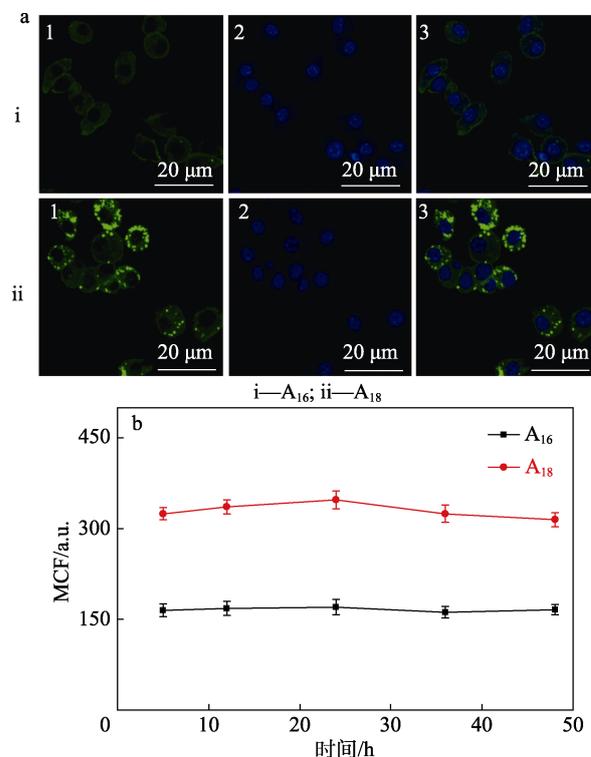


图 4 磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡与 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞共培养后的荧光电子显微镜照片 (a); 磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡与 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞共培养后平均细胞荧光强度 (b)

Fig. 4 Microscopic images of phospholipid-block copolymer hybrid vesicles co-cultured with macrophages (a); MCF after co-culture of phospholipid-block copolymer hybrid vesicles and macrophages (b)

## 2.4 磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡 $A_8$ 内药物体外释放分析

分别选用了 pH=4.2、pH=7.4 的 PBS 缓冲溶液作为刺激负载 DOX 的纳米级磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡  $A_8$  ( $\text{DOX}@A_8$ ) 进行药物释放的微环境溶液, 药物释放曲线如图 5 所示。从图 5 可见,  $\text{DOX}@A_8$  在 pH=7.4 的条件下酸碱稳定性较好, 经过 12 h 循环, 药物的提前释放率为  $5.62\% \pm 0.05\%$ 。当模拟癌细胞内部酸性环境的 pH=4.2 条件下刺激  $\text{DOX}@A_8$  进行药物释放, 药物释放率达到  $73.25\% \pm 0.03\%$ , 磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡  $A_8$  对酸环境敏感而释放药物的原理基于在 pH 降低条件下, 磷脂分子中脂肪酸羧基脂质化成六方晶相的非相层结构, 从而使膜融合, 加速载体内药物释放<sup>[24]</sup>。磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡在血液和正常组织的酸碱环境中可以稳定存在, 磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡  $A_8$  携带着 DOX 药物运输到病变组织, 随后在 3 h 内释放一半以上的药

物总量，达到快速起效的目的。不同 pH 条件下的药物释放曲线均可以用准一级动力学方程〔式(4)〕进行拟合。图 5 中，红色线为拟合曲线，DOX@A<sub>8</sub> 在不同的 pH 条件下的释放规律都遵从简单扩散模型，在整个 12 h 的循环内释放较为平稳，并没有药物突释现象。

$$y = a[1 - \exp(-bx)] \quad (4)$$

式中：y 为药物释放率，%；x 为药物释放时间，h；a 和 b 为拟合方程中系数。

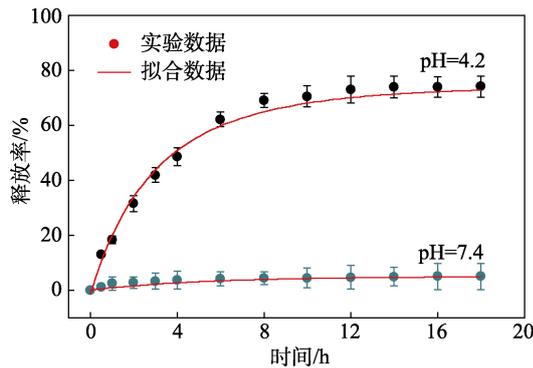


图 5 DOX@A<sub>8</sub> 在不同 pH 条件下的释放曲线

Fig. 5 Cumulative DOX release from DOX@A<sub>8</sub> as a function of time at different pH

### 2.5 磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡 A<sub>8</sub> 载药对癌细胞的生长抑制

DOX@A<sub>8</sub> 在 pH 环境刺激下能够很好地进行药物释放，为了进一步验证 DOX@A<sub>8</sub> 具有抗癌疗效，将 DOX@A<sub>8</sub> 与人肾癌细胞 OS-RC-2 共培养进行体外实验，使用 MTT 法检测细胞存活和生长情况。图 6 分别为不含药物的 DOX@A<sub>8</sub>、不同浓度纯 DOX 药物和负载不同浓度 DOX 的 DOX@A<sub>8</sub> 与人肾癌细胞 OS-RC-2 共培养 24 h 后，人肾癌细胞 OS-RC-2 存活率情况。图 6 中黑色柱体代表阴性对照组 (NC)，灰色柱体代表没有负载药物的磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡 A<sub>8</sub> 载体 (FC)，该载体与人肾癌细胞 OS-RC-2 共培养后细胞存活率在 94% 以上，由此可见，该磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡载体对人肾癌细胞 OS-RC-2 没有明显抑制作用。在实验设计中分别选用了 DOX 药物终浓度为 0.75、1.50、2.25 和 3.00 μmol/L 4 组不同条件，紫色柱体和黄色柱体分别代表纯 DOX 和 DOX@A<sub>8</sub> 与人肾癌细胞 OS-RC-2 共培养 24 h 后细胞存活情况。通过对比，发现在同一 DOX 浓度下，DOX@A<sub>8</sub> 具有比纯 DOX 更高的对人肾癌细胞 OS-RC-2 生长抑制能力，该结果证实了缓释比直接用药疗效更好。DOX@A<sub>8</sub> 在 DOX 药物终浓度为 0.75、1.50、2.25 和 3.00 μmol/L 条件下对人肾癌细胞 OS-RC-2 生长的抑制率 (抑制率/%=100%-细胞存活率) 分别为 47.0%±0.3%、

54.0%±1.5%、61.0%±1.3% 和 75.0%±1.1%，经过计算得知，其半抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 值为 0.61 μmol/L。而纯药 DOX 组的 IC<sub>50</sub> 值为 1.35 μmol/L，DOX@A<sub>8</sub> 对人肾癌细胞 OS-RC-2 的抑制能力约为纯药 DOX 的 2.2 倍。由此可见，磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡 A<sub>8</sub> 非常适合作为癌症药物载体。

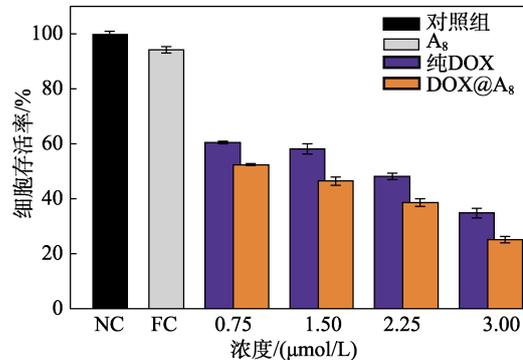


图 6 不同浓度的 DOX 和负载不同浓度 DOX 的 DOX@A<sub>8</sub> 经过 24 h 共培养对人肾癌细胞 OS-RC-2 生长的抑制

Fig. 6 Viability of human renal carcinoma cells OS-RC-2 after 24 h treatment with pure DOX and DOX@A<sub>8</sub> with different concentrations

### 3 结论

本研究成功构建了 POPC-pCMA-b-pDMAEMA 杂化囊泡，根据磷脂与共聚物之间种类、混合比例不同共计制备了 15 种囊泡样品，其中，样品编号为 A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub>、A<sub>6</sub>、A<sub>7</sub>、A<sub>8</sub> 的磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡已成功制备。根据细胞毒性和细胞内在化作用评价样品性能，最终确定 POPC<sub>0.1</sub>POEPC<sub>0.2</sub>P2<sub>0.7</sub> (A<sub>8</sub>) 组装体适合作为药物载体，其中，磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡 A<sub>8</sub> 与 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞共培养 5 h 后的细胞存活率为 92.1%±0.8%，当 DOX 终浓度为 3.00 μmol/L 时，负载 DOX 的磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡 A<sub>8</sub> (DOX@A<sub>8</sub>) 对人肾癌细胞 OS-RC-2 的抑制率为 75.0%±1.1%。以磷脂-嵌段共聚物杂化囊泡作为药物载体应用于药物递送系统将为生物医学发展提供有利帮助。

### 参考文献：

- [1] HAAG R, KRATZ F. Polymer therapeutics: Concepts and applications[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2006, 45: 1198-1215.
- [2] TORCHILIN V. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2005, 4: 145-160.
- [3] BOAS U, HEEGAARD P. Dendrimers in drug research[J]. Chemical Society Reviews, 2004, 33: 43-63.
- [4] VIVERO E, SLOWING I, TREWYN B, et al. Mesoporous silica nanoparticles for intracellular controlled drug delivery[J]. Small, 2010, 6: 1952-1967.
- [5] CHENG Z L, AI Z, HUI J, et al. Multifunctional nanoparticles: Cost versus benefit of adding targeting and imaging capabilities[J]. Science, 2012, 338: 903-910.

(下转第 2336 页)