

医药与日化原料

基于葡萄糖响应的胰岛素与环磷腺苷 双重载药系统的构筑及释药性能

余传明¹, 区嘉雨¹, 邓翠儿², 杨惠林¹, 麦敏敏¹,
邱心妮¹, 田丽芬¹, 李泳^{1*}, 陈洪^{1*}

(1. 广东海洋大学 化学与环境学院, 广东 湛江 524088; 2. 重庆师范大学 化学学院, 重庆 400047)

摘要: 以 *N*-十六烷基三甲基溴化铵为模板, 硅酸四乙酯经水解和缩聚反应制备了介孔二氧化硅 (MSN) 纳米球, 其经表面氨基丙基化、苯硼酸化、环磷腺苷负载、荧光标记葡萄糖酸修饰的胰岛素 (Flu-G-Ins, Flu 为异硫氰酸荧光素) 封盖制备了一种双重载药系统 Flu-G-Ins-MSN。通过 TEM、FTIR、XRD、N₂ 吸附-脱附、表面 Zeta 电位对材料进行了表征。考察了负载时间对载药量的影响, 探究了不同糖源、糖浓度、pH 对 Flu-G-Ins 和环磷腺苷释放效果的影响。结果表明, 当 MSN 纳米球质量浓度为 10 g/L、环磷腺苷浓度为 0.10 mmol/L 时, 经 24 h 避光负载, Flu-G-Ins-MSN 对环磷腺苷的载药量可达 25.9 μmol/g; 糖触发 Flu-G-Ins 和环磷腺苷的释放具有明显的 pH 依赖性, pH 越高, 释药量越大; 在人体正常生理 pH 7.4 环境中, 果糖和葡萄糖对载药粒子的刺激响应效果最佳; 质量浓度 2 g/L 的载药粒子在 50 mmol/L 葡萄糖溶液刺激下, Flu-G-Ins 0.5 h 的释放量可达 8.35 μmol/L, 环磷腺苷 20 h 的释放量可达 75%。葡萄糖能实现对载药粒子的反复刺激解封, 进而实现对 Flu-G-Ins 和环磷腺苷的持续控释。

关键词: 葡萄糖; 胰岛素; 环磷腺苷; 响应释放; 介孔二氧化硅; 医药原料

中图分类号: TQ469; TQ460.4

文献标识码: A

文章编号: 1003-5214 (2023) 02-0322-08

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Fabrication and drug release performance of glucose-responsive double drug delivery system for insulin and cyclic adenosine monophosphate

YU Chuanming¹, QU Jiayu¹, DENG Cuier², YANG Huilin¹, MAI Minmin¹,
QIU Xinni¹, TIAN Lifen¹, LI Yong^{1*}, CHEN Hong^{1*}

(1. Faculty of Chemistry and Environmental Science, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, Guangdong, China; 2. College of Chemistry, Chongqing Normal University, Chongqing 400047, China)

Abstract: A dual drug delivery system Flu-G-Ins-MSN (Flu represents for fluorescein isothiocyanate) was prepared by surface aminopropylation, phenylboration, cyclic adenosine monophosphate (cAMP) loading and fluorescein-labeled gluconate insulin (Flu-G-Ins) capping of mesoporous silica nanospheres (MSN), which was prepared by hydrolysis and polycondensation of tetraethyl orthosilicate (TEOS) using *N*-hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) as template. The samples obtained were then characterized by TEM, FTIR, XRD, N₂ adsorption-desorption, Zeta potential analysis, followed by investigation on the effect of loading time on drug loading capability and the effect of sugar sources, sugar concentration and pH on the release of Flu-G-Ins and cAMP. The results demonstrated that, when the mass concentration of Flu-G-Ins-MSN was 10 g/L and the concentration of cAMP was 0.10 mmol/L, the drug loading capability could reach 25.9 μmol/g after stirring for 24 h with no light irradiation. The release of Flu-G-Ins and cAMP trigger by glucose was significantly pH-dependent and enhanced as pH increased. In the normal human physiological pH=7.4 environment, fructose and glucose exhibited the strongest

收稿日期: 2022-06-16; 定用日期: 2022-08-26; DOI: 10.13550/j.jxhg.20220559

基金项目: 广东省教育厅青年创新人才项目 (2017KQNCX093); 湛江市科技计划项目 (2018A01042); 广东海洋大学科研启动项目 (R18018); 广东海洋大学大学生创新创业训练计划 (CXXL2020294, CXXL2020301)

作者简介: 余传明 (1990—), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, E-mail: yucmingdou@163.com。联系人: 李泳 (1968—), 男, 教授, E-mail: yongli6808@126.com; 陈洪 (1965—), 女, 教授, E-mail: huangsq2005@163.com。

stimulatory effect on drug-loaded particles. Flu-G-Ins release from 2 g/L drug-loaded particles stimulated with 50 mmol/L glucose solution for 0.5 h was up to 8.35 $\mu\text{mol/L}$, while cAMP release was up to 75% in 20 h. Glucose could repeatedly stimulate and unseal drug-loaded particles, thus achieving sustained controlled release of Flu-G-Ins and cAMP.

Key words: glucose; insulin; cyclic adenosine monophosphate; response release; mesoporous silica; drug materials

以纳米材料为药物载体构建刺激响应型药物控释系统, 可以实现药物在病灶的靶向释放, 有利于提高药效、降低药物的毒副作用^[1-3]。研究表明, 表面功能化、末端封闭的介孔二氧化硅 (MSN) 是一种高效的刺激响应型控释载体, 不仅具有“零提前释放”特性, 而且在体内体外均具有良好的生物相容性, 在体内生物医学应用及器官特异性治疗等方面具有广阔的应用前景^[4-6]。

糖尿病是由于人体内胰岛素分泌缺陷或受阻所引发的一种高血糖疾病。目前, 患者主要依靠皮下注射胰岛素来控制血糖, 但是长期注射会导致皮肤萎缩, 注射过量则可能引发低血糖、休克甚至危及生命。因此, 维持平稳的血糖水平对于糖尿病的治疗至关重要。利用 MSN 内部丰富的孔穴来装载药物分子, 并通过功能化改性封堵表面孔道可构筑基于葡萄糖浓度响应的“开-关”式载药系统。该系统可以根据血糖浓度智能“打开/关闭”通道, 控制药物释放, 进而调节血糖水平趋于平稳。然而, 传统的葡萄糖响应型胰岛素 (Ins) 载药系统会随着胰岛素的释放而导致储药量迅速下降, 缩减药物作用时长^[7-8], 不利于血糖的长期平稳调控。因此, 需引入第二药物来协助调控血糖水平以解决这一难题。

研究显示, 环磷腺苷 (cAMP) 可以调节体内多种酶催化反应, 是很多激素的媒介物质^[9-10]。现

已证明, cAMP 可以激活胰腺 β 细胞的 Ca^{2+} 通道, 刺激胰岛素分泌^[11-12]。因此, 通过调节 cAMP 的控释可以间接调控血糖水平, 是治疗糖尿病的辅助途径。此外, cAMP 还与细胞内蛋白质合成、脂肪分解、类固醇合成有关^[13-15], 对癌细胞也具有控制作用^[16], 临床上常用于治疗心源性疾病, 副作用小, 是一种较为理想的多病症治疗药。但是, cAMP 作为一种典型的细胞内信号介导物质, 其膜渗透性较差^[17], 导致其口服给药效果不理想。因此, 利用 MSN 装载 cAMP 有望提高其给药效果。

目前, 葡萄糖响应型载药系统的糖敏感基元主要有葡萄糖氧化酶^[18]、伴刀豆蛋白^[19]和苯硼酸^[20]。其中, 葡萄糖氧化酶和伴刀豆蛋白都是蛋白质, 稳定性较差, 可能引发人体免疫反应, 而苯硼酸结构稳定性好、易功能化, 是一种理想的糖敏感基元。苯硼酸水解后产生的阴离子可以与邻二羟基化合物反应生成硼酸酯盐。硼酸酯盐的形成是可逆的, 因此可以与其他邻二羟基化合物 (如葡萄糖) 发生竞争反应, 生成另一种硼酸酯盐, 并使原硼酸酯盐中的邻二羟基化合物游离出来。基于此, 本文设计了一种 MSN 基载药粒子, 在其介孔内储存小分子药物 cAMP, 对其表面进行苯硼酸改性后与荧光标记葡萄糖酸改性的胰岛素 (Flu-G-Ins) 反应, 以封堵其孔道, 进而构筑了一种含有 cAMP 和胰岛素的双重载药系统, 如图 1 所示。

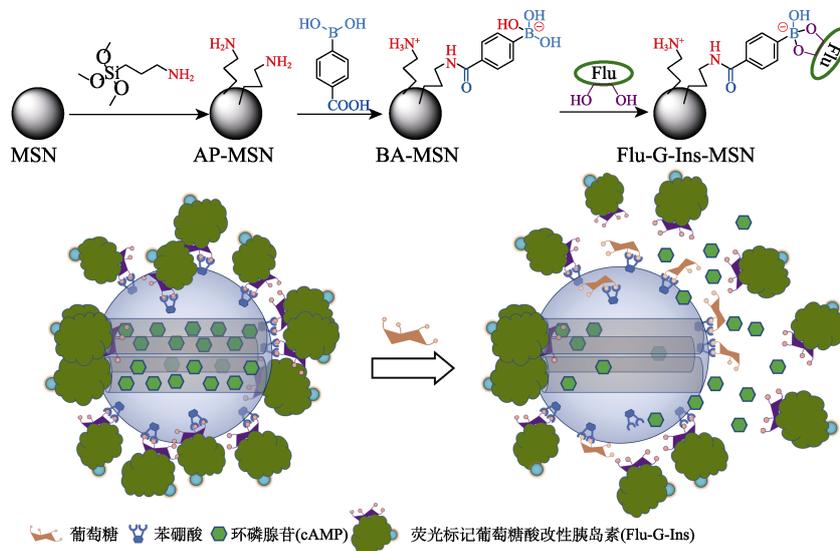


图 1 基于葡萄糖响应的 MSN 载药系统的构筑及释放 Flu-G-Ins 和 cAMP 示意图

Fig. 1 Schematic diagrams of fabrication of glucose-responsive MSN based delivery system and controlled release of Flu-G-Ins and cAMP

该系统能通过感应血糖浓度实现药物的智能释放,既可以利用 SiO₂ 良好的膜渗透性^[21-22]实现 cAMP 的细胞内给药,也可以利用胰岛素和 cAMP 的协同作用提高系统自主调节血糖的能力,增加维持正常血糖的时间,减少给药次数,提高患者的用药依从性。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

N-十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 (EDC)、4-羧基苯硼酸、*N*-羧基琥珀酰亚胺、cAMP、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、葡萄糖、果糖、麦芽糖 (质量分数 95%)、甘露糖、乳糖、半乳糖、异硫氰酸荧光素 (质量分数 90%), 上海麦克林生化科技股份有限公司; 硅酸四乙酯 (TEOS)、3-氨丙基三甲氧基硅烷、氯化铵, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 二甲基亚砷 (DMSO)、甲苯、NaOH、浓盐酸、甲醇, 成都市科隆化学品有限公司; 葡萄糖酸改性的胰岛素 (G-Ins), 中国科学院广州化学研究所。以上试剂均为分析纯, 除甲苯外使用前均未经纯化, 甲苯使用前需用活化的 4A 分子筛于室温下干燥 24 h 以除水。

Fei Tecnai G20 透射电子显微镜、Nicolet460 傅里叶变换红外光谱仪、LS45/55 型荧光-磷光-发光分光光度计、TSQ Quantum Ultra 三重四极杆高效液相色谱-质谱联用仪, 美国 Thermo Fisher 公司; ZetaPALS Zeta 电位及粒度分析仪, 美国 Brookhaven 仪器公司; ASAP2020M+C 全自动微孔物理化学吸附仪, 美国 Micromeritics 公司; 756S 紫外-可见分光光度计, 上海棱光技术有限公司; D8 Advance X 射线粉末衍射仪, 德国 Bruker 公司。

1.2 SiO₂ 基载药系统的制备

1.2.1 MSN 纳米球的合成

取 CTAB (1.00 g, 2.74 mmol) 溶于 480 mL 蒸馏水中, 加入 3.50 mL 2 mol/L NaOH 溶液, 升温至 80 °C, 剧烈搅拌下加入硅酸四乙酯 (5.00 mL, 密度 0.934 g/mL, 22.4 mmol), 反应 24 h, 生成白色沉淀, 过滤, 依次用 20 mL 蒸馏水和甲醇分别洗涤 3 次, 60 °C 下真空干燥 10 h, 得 SiO₂ 实心球。取该实心球 1.50 g 加入到含 1.50 mL 浓盐酸 (质量分数 35%~38%) 的甲醇 (150 mL) 中, 回流 6 h, 过滤, 依次用 20 mL 蒸馏水和甲醇分别洗涤 3 次, 100 °C 下真空干燥 12 h 以脱除 CTAB 模板, 即得 MSN 纳米球。

1.2.2 AP-MSN 的合成

取上述制得 MSN 纳米球 (1.00 g) 于 80 mL 含有

3-氨丙基三甲氧基硅烷 (1.00 mL, 5.67 mmol) 的无水甲苯中, 回流反应 20 h, 冷却后过滤, 用 20 mL 甲醇洗涤 3 次, 并于 60 °C 下真空干燥 12 h 即得氨丙基化 MSN, 记为 AP-MSN。

1.2.3 BA-MSN 的合成

取 400 mg AP-MSN 纳米球分散于 20 mL DMSO 中, 制得 DMSO 分散液。另取 4-羧基苯硼酸 (0.15 g, 0.90 mmol)、*N*-羧基琥珀酰亚胺 (0.10 g, 0.87 mmol) 和 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 (0.20 g, 1.04 mmol) 于 5 mL DMSO 中, 室温反应 15 min 后, 将其加入上述含 AP-MSN 的 DMSO 分散液中, 室温搅拌反应 24 h, 过滤, 分别先后用 20 mL DMSO、蒸馏水、甲醇洗涤 3 次, 并于 60 °C 下真空干燥 10 h 即得硼酸化的 MSN, 记为 BA-MSN。

1.2.4 G-Ins 的荧光标记

取 G-Ins 200 mg 溶于 50 mL 2 mol/L 碳酸钠溶液 (pH=9) 中, 避光搅拌, 并逐滴加入 2.5 mL 含有 1 g/L 异硫氰酸荧光素的 DMSO 溶液, 室温搅拌 2 h 后, 加入 2.5 mL 1 mol/L 氯化铵溶液淬灭反应, 继续搅拌 1 h, 将溶液倒入透析袋 (截留相对分子质量 3500) 中, 并于 PBS 缓冲液 (pH=7.4) 内透析 48 h, -40 °C 下冷冻干燥 48 h 后得荧光标记的 G-Ins, 记为 Flu-G-Ins。

1.2.5 Flu-G-Ins 封盖 MSN

取 100 mg BA-MSN 4 份, 分别分散于 10 mL 含 0.01、0.02、0.05、0.10 mmol/L cAMP 的 PBS 缓冲液 (pH=7.4) 中, 避光搅拌 24 h 后加入 200 mg Flu-G-Ins, 并继续搅拌 24 h, 过滤, 20 mL PBS 缓冲液洗涤除去杂质, 收集固渣, 60 °C 下真空干燥 10 h, 得 Flu-G-Ins 封盖的 MSN, 即目标载药系统, 记为 Flu-G-Ins-MSN。

1.3 表征与测试

利用透射电子显微镜观察样品的微观结构; 通过全自动微孔物理化学吸附仪测试样品的氮气吸附-脱附等温线以及孔径分布; 用 X 射线粉末衍射仪以 Cu K_α 为辐射源, 以 4 (°)/min 速度测试样品的 X 射线衍射图; 通过 Zeta 电位及粒度分析仪测试样品的 Zeta 电位; 通过傅里叶变换红外光谱仪测试样品的红外光谱。

1.4 载药量测定

在 1.2.5 节基础上, 改变避光搅拌时间分别为 0、1、2、5、10 h, 重复该步骤并收集 PBS 缓冲液洗涤后的滤液, 通过 HPLC 检测滤液中 cAMP 浓度, 按式(1)计算 cAMP 载药量 (K_{cAMP} , μmol/g)。

$$K_{cAMP} = \frac{c_0 V_0 - c_1 V_1}{m_{MSN}} \times 1000 \quad (1)$$

式中: c_0 为载药前 PBS 缓冲液中 cAMP 的浓度, 即 0.1 mmol/L; V_0 为载药前 cAMP 溶液的体积, 即 0.010 L; c_1 为洗涤后滤液中 cAMP 的浓度, mmol/L; V_1 为滤液的体积, L; m_{MSN} 为干燥后载药粒子的质量, g。

1.5 糖触发 cAMP 和 Flu-G-Ins 的释放研究

取 10.0 mg 载有 cAMP 的 Flu-G-Ins-MSN 粒子分散于 5.0 mL 含不同浓度糖源 (葡萄糖、果糖、甘露糖、乳糖、半乳糖、麦芽糖) 的 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 中, 分别于室温下避光搅拌 0.5、1.5、3、5、8、20、25、30、40 h 后取样, 将试样等分为两份, 同时经 4000 r/min 离心 20 min 后, 一份通过 HPLC 检测 cAMP 的释放情况; 另一份通过荧光-磷光-发光分光光度计检测 Flu-G-Ins 的释放情况 (激发光波长 $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$, 荧光最大发射波长 $\lambda_{\text{em}} = 512 \text{ nm}$)。其中, Flu-G-Ins 释放量 ($\mu\text{mol/L}$) 依据 λ_{em} 处峰强度, 通过标准曲线法得到。cAMP 释放量 $R_{\text{cAMP}} (\%)$ 按式(2)计算。

$$R_{\text{cAMP}} / \% = \frac{c_2 V_2}{K_{\text{cAMP}} m_{\text{MSN}}} \times 100 \quad (2)$$

式中: c_2 为 HPLC 检出的 cAMP 浓度, $\mu\text{mol/L}$; V_2 为等分前的分散液体积 (忽略加入载药粒子后带来的体积变化), 即 0.005 L; K_{cAMP} 为 Flu-G-Ins-MSN 粒子对 cAMP 的载药量, $\mu\text{mol/g}$; m_{MSN} 为 Flu-G-Ins-MSN 粒子的质量, 即 0.010 g。

1.6 间歇性触发实验

取 10.0 mg 载药粒子两份, 分别分散于 5 mL 含有 50、100 mmol/L 葡萄糖的 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 中, 避光搅拌 1 h, 经 4000 r/min 离心 20 min 后, 取上清液经荧光-磷光-发光分光光度计检测 Flu-G-Ins 的释放量, 下层固渣分别经 10 mL PBS 缓冲液洗涤、4000 r/min 离心 20 min 后, 加入新的 5 mL 含有 50、100 mmol/L 葡萄糖的 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 中, 并重复以上步骤。

1.7 纳米粒子晶格参数计算

利用 X 射线衍射仪对 AP-MSN、BA-MSN 和 Flu-G-Ins-MSN 进行小角度 X 射线衍射测试, 衍射源为 Cu 靶 K_{α} 线, 衍射范围为 $0.7^{\circ} \sim 10.0^{\circ}$, 利用布拉格公式计算 (100) 晶面间距 (d_{100} , nm)。 d_{100} 计算公式见式 (3)。

$$d_{100} = \frac{\lambda}{2 \sin \theta} \quad (3)$$

式中: λ 为 X 射线的入射波长, 以 0.1541 nm 计算; θ 为衍射角, $^{\circ}$ 。

利用式 (4) 计算晶胞常数 (a_0 , nm)。

$$a_0 = \frac{2d_{100}}{\sqrt{3}} \quad (4)$$

利用式(5)计算孔壁厚度 (d_p , nm)。

$$d_p = a_0 - W_{\text{BJH}} \quad (5)$$

式中: W_{BJH} 为 BJH 法测得的孔径, nm。

2 结果与讨论

2.1 形貌表征

采用 HRTEM 对 BA-MSN 的微观形貌结构进行观察, 结果如图 2 所示。

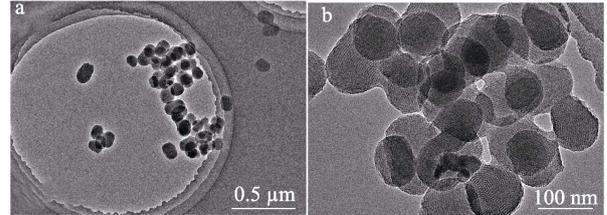


图 2 不同放大倍数下 BA-MSN 的 TEM 图

Fig. 2 TEM images of BA-MSN at different magnifications

由图 2 可以看出, MSN 主要呈球状或椭球状, 经测量, 其平均粒径约为 128 nm, 具有 MCM-41 型通道状介孔结构, 即介孔呈六边形有序分布, 孔径分布大小均匀、排列紧密。进一步地, 测试了 AP-MSN、BA-MSN 和 Flu-G-Ins-MSN 的氮气吸附-脱附等温曲线, 结果如图 3 所示。

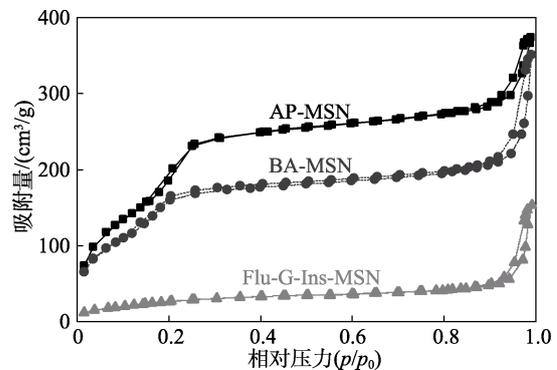


图 3 AP-MSN、BA-MSN 和 Flu-G-Ins-MSN 的氮气吸附-脱附等温线

Fig. 3 N_2 adsorption-desorption isotherms of AP-MSN, BA-MSN and Flu-G-Ins-MSN

由图 3 可以看出, MSN 经氨丙基化和硼酸化改性后, 依然保持着介孔结构, 其吸附-脱附曲线形状基本符合 IUPAC 分类中的 IV 型等温曲线特征, 即在相对压力较低时吸附较快并迅速达到单分子层吸附饱和的临界点, 随着相对压力的增加, 缓慢形成多层吸附, 在接近饱和蒸汽压时形成无穷层吸附, 同时在高压脱附的小区域内出现了 H1 型滞后环, 且当相对压力下降至 0.9 以下时, 脱附滞后几乎消失。这主要是由毛细凝聚现象所致。上述结果表明, AP-MSN 和 BA-MSN 的孔径分布比较集中。从图 3 还可以看出, 在 AP-MSN 上进行苯硼酸改性后, 介

孔硅球的氮气吸附量略有降低,可能是由于部分改性基团堵塞了 MSN 表面的介孔所致。当介孔硅球载有 cAMP,且用 Flu-G-Ins 封盖后,在较低的相对压力下,硅球未出现明显的氮气吸附,这显然也是介孔被大量堵塞所致。因此,在相对压力达到 0.9 之前,Flu-G-Ins-MSN 的氮气吸附-脱附曲线几乎为一条水平线。以上结果表明,本文制备的 MSN 可以通过 Flu-G-Ins 实现封盖。

根据吸附-脱附曲线,利用 BJH 理论计算了材料的孔径分布,相关结果如图 4 及表 1 所示。由图 4 可知,AP-MSN 和 BA-MSN 的孔径分布峰相近,分别为 2.3 和 2.1 nm,而 Flu-G-Ins-MSN 则未发现明显的孔径峰。这主要是由介孔封闭所致。利用 BET 理论计算了材料的比表面积和孔体积。AP-MSN、BA-MSN 和 Flu-G-Ins-MSN 的比表面积分别为 708.2、634.6 和 93.8 m²/g(表 1)。可见,Flu-G-Ins 的封盖作用使得大量氮气无法被介孔吸附,因而导致比表面积显著降低,同时也导致 Flu-G-Ins-MSN 的孔容未检出,而 AP-MSN 和 BA-MSN 的孔容则分别为 0.65 和 0.52 cm³/g。

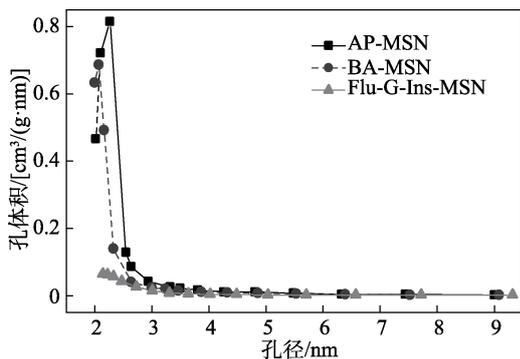


图 4 AP-MSN、BA-MSN 和 Flu-G-Ins-MSN 的孔径分布曲线

Fig. 4 Pore size distribution curves of AP-MSN, BA-MSN and Flu-G-Ins-MSN

为了进一步考察材料的微观结构,测试了样品 AP-MSN、BA-MSN 和 Flu-G-Ins-MSN 的小角 X 射线衍射图谱,结果如图 5 所示。

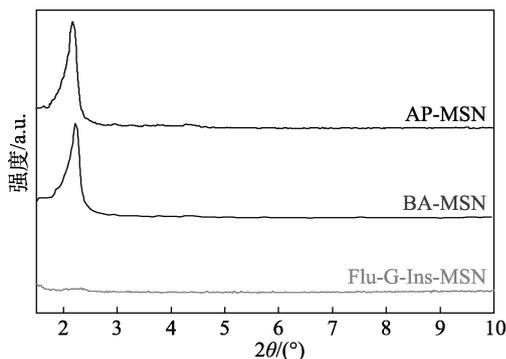


图 5 AP-MSN、BA-MSN 和 Flu-G-Ins-MSN 的 XRD 图谱
Fig. 5 XRD patterns of AP-MSN, BA-MSN and Flu-G-Ins-MSN

由图 5 可见,样品 AP-MSN 和 BA-MSN 分别在 2θ 为 2.17°和 2.23°处有一强衍射峰,归属于二维六方结构的(100)晶面,属于 MCM-41 型 MSN 的特征衍射峰^[23]。样品 AP-MSN 和 BA-MSN 在 2θ 为 3°~10°内未发现其他衍射杂峰,表明样品的孔结构具有高度有序性。样品 Flu-G-Ins-MSN 则因孔隙填充和 Flu-G-Ins 的表面涂覆而未发现明显的(100)晶面衍射峰。根据布拉格方程计算了样品的(100)晶面间距、晶胞常数和孔壁厚度,结果见表 1。由表 1 可知,相较于 AP-MSN,样品 BA-MSN 的(100)晶面衍射峰向大角度略有偏移,晶面间距和晶胞常数略微减小,介孔厚度略微变薄,表明苯硼酸改性对 MSN 的介孔形貌影响不大。

表 1 样品 AP-MSN、BA-MSN 和 Flu-G-Ins-MSN 的孔结构参数

Table 1 Pore structure parameters of AP-MSN, BA-MSN and Flu-G-Ins-MSN

	孔容/ (cm ³ /g)	比表面积/ (m ² /g)	孔径(W _{BJH})/ nm	d ₁₀₀ / nm	a ₀ / nm	d _p / nm
AP-MSN	0.65	708.2	2.3	4.09	4.72	0.63
BA-MSN	0.52	634.6	2.1	3.97	4.58	0.61
Flu-G-Ins-MSN	—	93.8	—	—	—	—

注: Flu-G-Ins-MSN 孔道被封堵,故未测出 Flu-G-Ins-MSN 的孔容、孔径、d₁₀₀、a₀及 d_p。

2.2 红外表征

图 6 为 MSN、AP-MSN、BA-MSN 和 Flu-G-Ins-MSN 的 FTIR 图谱。

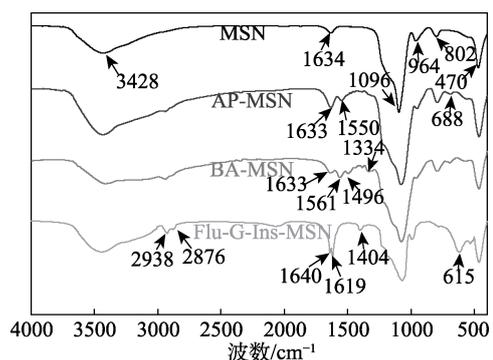


图 6 MSN、AP-MSN、BA-MSN 和 Flu-G-Ins-MSN 的 FTIR 图谱

Fig. 6 FTIR spectra of MSN, AP-MSN, BA-MSN and Flu-G-Ins-MSN

MSN 曲线中,3428 cm⁻¹处宽峰是 MSN 表面 O—H 的伸缩振动峰,1634 cm⁻¹处为吸附水 H—O—H 的弯曲振动峰,1096 cm⁻¹处强峰为 Si—O—Si 的反对称伸缩振动峰,964 cm⁻¹处为 Si—OH 的弯曲振动峰,802 cm⁻¹处为 Si—O 的对称伸缩振动峰,470 cm⁻¹

处强峰为 Si—O—Si 的弯曲振动峰, 该谱峰与湿法制备的 SiO₂ 粒子红外图谱高度一致^[24]。与 MSN 曲线相比, AP-MSN、BA-MSN 和 Flu-G-Ins-MSN 的谱图中 3700~3000 cm⁻¹ 区域内的宽峰为 N—H 的伸缩振动峰, 2938 和 2876 cm⁻¹ 处分别为亚甲基 C—H 的不对称伸缩振动峰与对称伸缩振动峰, 688 cm⁻¹ 处为亚甲基的 C—H 面外弯曲振动峰, 表明硅球表面实现了氨丙基化改性。与 AP-MSN 曲线相比, BA-MSN 谱图中 1496 cm⁻¹ 附近出现了 3 个新峰, 归属于苯环的碳骨架伸缩振动, 1334 cm⁻¹ 处峰对应于 B—OH 键伸缩振动, 表明 MSN 表面实现了硼酸化改性。与 BA-MSN 相比, Flu-G-Ins-MSN 在 1640 和 1619 cm⁻¹ 处峰显著增强, 对应于 Flu-G-Ins 中肽键的 C=O 伸缩振动和 N—H 的变形振动, 1404 cm⁻¹ 处峰对应于肽键的 C—N 伸缩振动, 1334 cm⁻¹ 处峰消失, 这可能是由 Flu-G-Ins 中邻二羟基与 MSN 表面苯硼酸通过共价键结合使得 B—OH 键消失所致。表明 MSN 表面已成功接枝了 Flu-G-Ins。对比改性前后 MSN 的红外光谱曲线可以发现, Flu-G-Ins-MSN 依然保留着与初始 MSN 相同的谱峰特征。表明“后修饰法”改性 MSN 不会对介孔的规整结构造成破坏。

2.3 Zeta 电位分析

粒子表面的 Zeta 电位与其表面化学结构紧密相关, 通过表征粒子的 Zeta 电位可以验证每一步改性实验的结果, 如表 2 所示。

表 2 样品在 PBS (PH 7.4) 缓冲液中的平均 Zeta 电位
Table 2 Average Zeta potential of samples in PBS (pH 7.4) solution

样品	平均 Zeta 电位/mV
MSN	-4.57
AP-MSN	5.23
BA-MSN	-13.89
Flu-G-Ins-MSN	-45.07

改性前, 由于 MSN 表面存在大量硅羟基, 其在 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 中的平均 Zeta 电位为 -4.57 mV。通过氨丙基改性后, 氨基的质子化能力使得 AP-MSN 在水中的平均 Zeta 电位提升至 5.23 mV。利用羧酸与氨基的反应接枝上苯硼酸后, 一方面酰基会使氨基的质子化能力减弱导致正电性下降; 另一方面苯硼酸易水解失去质子而显负电性, 因此, BA-MSN 在水中的平均 Zeta 电位会下降为 -13.89 mV。BA-MSN 通过表面的苯硼酸与 Flu-G-Ins 中的邻二醇结构发生脱水反应接枝上 Flu-G-Ins, 即得 Flu-G-Ins-MSN, 该粒子在水中的平均 Zeta 电位下降至 -45.07 mV。以上平均 Zeta 电

位的变化表明改性反应成功进行。最终得到的 Flu-G-Ins-MSN 载药粒子平均 Zeta 电位绝对值大于 40 mV, 表明该粒子在溶液中具有优异的稳定性, 将有利于其在药物传输中的应用^[25]。

2.4 负载时间对载药量的影响

不同负载时间下, Flu-G-Ins-MSN 对 cAMP 的载药结果如图 7 所示。结果显示, 随着 cAMP 用量的增加, 硅球对 cAMP 的载药量迅速上升。同时, 随着载药时间的延长, 载药量也逐渐上升。当 BA-MSN 质量浓度为 10 g/L、cAMP 浓度为 0.1 mmol/L 时, 经 24 h 避光搅拌和 24 h 封盖实验, MSN 对 cAMP 的负载接近扩散平衡, 此时硅球对 cAMP 的载药量为 25.9 μmol/g。

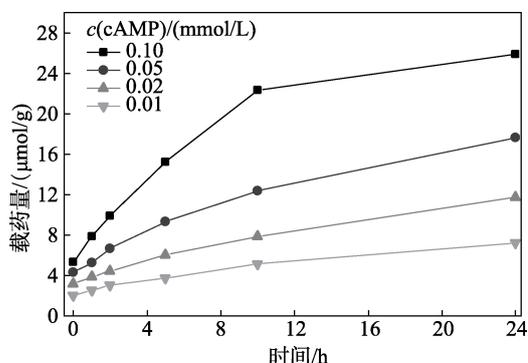


图 7 载药量随负载时间变化曲线

Fig. 7 Change curves of drug loading capacity with load time

2.5 不同糖源对触发 Flu-G-Ins 释放的影响

苯硼酸盐可与糖类结构中的邻二醇通过脱水反应形成环状的苯硼酸酯盐, 且该过程是可逆的, 即脱水与水解在此互相竞争。因此, 在含 Flu-G-Ins-MSN 载药系统的水溶液中, 引入糖分子并利用其与苯硼酸盐的竞争结合可以促使 Flu-G-Ins 的释放。图 8 为 30 min 时载药系统在 pH 7.4 的 PBS 缓冲液中的 Flu-G-Ins 释放量与糖浓度的关系曲线。

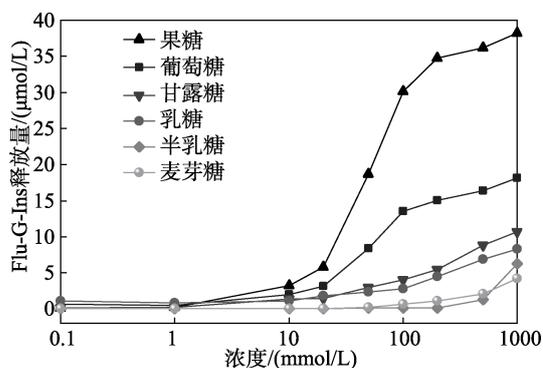


图 8 不同糖浓度下载药粒子中 Flu-G-Ins 的释放行为
Fig. 8 Flu-G-Ins release behavior from drug particles with different sugar concentrations

由图 8 可知,果糖对于 Flu-G-Ins 的释放具有最为显著的刺激效果,其次为葡萄糖,与文献结论一致^[26]。这是由于糖的氧环式结构所形成的环酯比链式结构所形成的环酯更稳定所致^[27]。众所周知,水溶液中的糖总是在开链式、吡喃糖、呋喃糖等异构体之间互相转化,苯硼酸盐又最易与呋喃糖中的邻二羟基结合,而果糖中呋喃糖的摩尔分数为 25%,葡萄糖中呋喃糖摩尔分数仅为 0.14%^[28]。因此,苯硼酸盐对于果糖的反应体现出更高的选择性。研究显示,苯硼酸盐可以与果糖、葡萄糖等单糖同时形成物质的量比为 1:1 和 1:2 的结合物。其中,1:2 的结合物更是被广泛用于设计基于果糖或葡萄糖的传感系统^[29]。反之,乳糖、麦芽糖等二糖不能转化为呋喃糖形式。因此,难以通过竞争反应触发载药系统封盖的解封。尽管果糖触发解封的效果优于葡萄糖,但是本文构筑的 Flu-G-Ins-MSN 载药系统,在实际应用过程中依然可以根据葡萄糖浓度来触发 Flu-G-Ins 的释放,原因主要有两方面:一是葡萄糖有着仅次于果糖的强触发响应能力;二是糖尿病患者体内的葡萄糖水平(浓度 ≥ 10 mmol/L)远高于果糖水平(浓度 ≤ 0.1 mmol/L)。

2.6 pH 对触发 Flu-G-Ins 释放的影响

本文构筑的 Flu-G-Ins-MSN 载药系统中,未经修饰的胰岛素蛋白缺少邻二羟基结构,无法与苯硼酸基元结合形成稳定的封堵,因此需用葡萄糖酸对其修饰。有研究显示,胰岛素经葡萄糖酸修饰后,其生物活性与未修饰相当^[30]。因此,该系统中 G-Ins 不仅是可靠的介孔封堵物,也是理想的降血糖药物。正常人体血液的 pH 在 7.4 左右,但是不同组织或器官之间会存在一定的差异。因此,探索载药系统在不同 pH 下的响应行为,对研究这类载药系统在不同组织的释药情况具有重要意义。图 9 为不同 pH 环境下,由 50 mmol/L 果糖或 50 mmol/L 葡萄糖所触发的 Flu-G-Ins 在 30 min 时的释放情况。

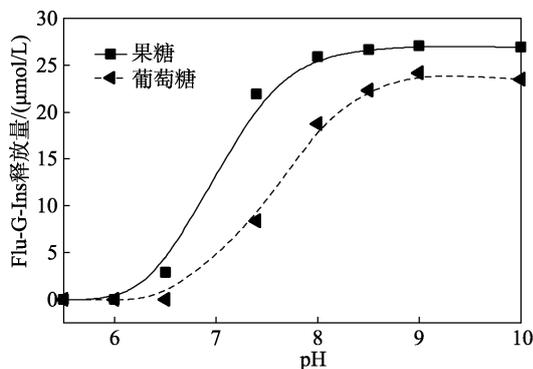


图 9 不同 pH 下果糖或葡萄糖触发 Flu-G-Ins 释放情况
Fig. 9 Release of Flu-G-Ins triggered by fructose or glucose at different pH

由图 9 可知,果糖或葡萄糖通过与苯硼酸的结合触发对 Flu-G-Ins 的释放行为具有明显的 pH 依赖性,Flu-G-Ins 的释放量随着 pH 的增大而上升。这是因为苯硼酸在碱性条件下易水解成具有四面体结构的苯硼酸盐结构,该结构易与邻二醇发生可逆性的结合。一般地,苯硼酸或其衍生物的 pK_a 在 8.2~8.6^[31],远高于人体的生理 pH 7.4。因此,本文采用对位含有吸电子性羧基的苯硼酸来构筑糖基响应的载药系统。在 pH 7.4 时,果糖触发的 Flu-G-Ins 释放量为 21.87 $\mu\text{mol/L}$,超过了最大释放量(27.04 $\mu\text{mol/L}$, pH 9.0)的 80%,葡萄糖触发的 Flu-G-Ins 释放量达 8.35 $\mu\text{mol/L}$,仅为最大释放量(24.19 $\mu\text{mol/L}$, pH 9.0)的 34.5%。只有当 pH 高于 8.0 时,葡萄糖才能刺激 Flu-G-Ins 产生显著释放。这可能是因为苯硼酸的羧基与 MSN 表面的氨基结合后削弱了羧基的吸电子能力,降低了苯硼酸的酸性,进而使得苯硼酸盐的形成需要较强的碱性环境^[32]。

2.7 葡萄糖间歇性触发 Flu-G-Ins 的释放

为了进一步考察该载药系统对葡萄糖的响应可靠性,通过间歇性触发实验测试了该系统在两种不同浓度葡萄糖溶液反复刺激下的释药情况,结果如图 10 所示。由图 10 可以看出,每次糖触发都能引起稳定的 Flu-G-Ins 释放,但从第 3 次以后,释药量显著降低。高浓度的葡萄糖引起的 Flu-G-Ins 释放量明显高于低浓度,且 Flu-G-Ins 的释放量与葡萄糖浓度接近线性正相关。但在第 6 次触发后,两者的释药量基本相当,可能是前期释药量较大导致后期实验中载药不足所致。

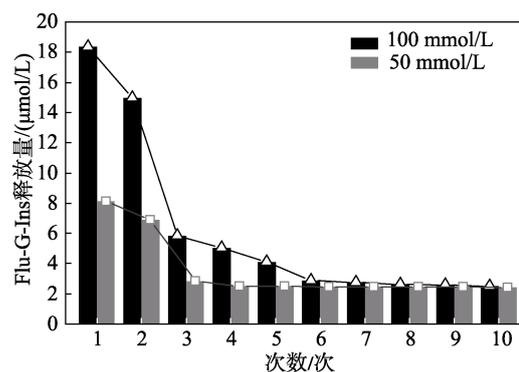


图 10 葡萄糖间歇性触发 Flu-G-Ins 释放
Fig. 10 Intermittent release of Flu-G-Ins triggered by glucose

2.8 pH 对葡萄糖触发 cAMP 释放的影响

在 pH 分别为 7.4 和 8.5 时,通过高效液相色谱测试了载药粒子在含 50 mmol/L 葡萄糖 PBS 缓冲液中 cAMP 的释放情况,结果如图 11 所示。由图 11 可知,在 pH 7.4 时,负载 cAMP 的 Flu-G-Ins-MSN 在没有葡萄糖的触发下释放的 cAMP 总量不足 10%,表明 Flu-G-Ins 对 MSN 具有良好的封盖效果。

在葡萄糖的刺激下, 随着时间延长, cAMP 的释放量逐渐升高。但在 1.5 h 前, 两种 pH 环境下的 cAMP 释放量均不足 5%, 这是因为 cAMP 主要存储于 MSN 的介孔内, 需待 Flu-G-Ins 解封后才会出现显著的 cAMP 释放。8 h 后, 两种 pH 环境下 cAMP 的释放量均在 50% 以上, 20 h 后, cAMP 在 pH 8.5 和 pH 7.4 时的释放量分别为 92% 和 75%, 远高于不含糖的 pH 7.4 环境。在葡萄糖的持续刺激下, cAMP 在 pH 8.5 和 pH 7.4 环境下的连续释放时间分别达到了 25 和 30 h。由图 11 还可以看出, cAMP 的释放具有与 Flu-G-Ins 释放类似的 pH 依赖性, 即 pH 越高, 释放量越大, 这主要是由其释放机制所决定。即碱性条件下, 苯硼酸酯与 OH⁻ 结合后易通过糖触发打开 Flu-G-Ins 封盖, 进而导致 cAMP 从 MSN 内扩散出来。

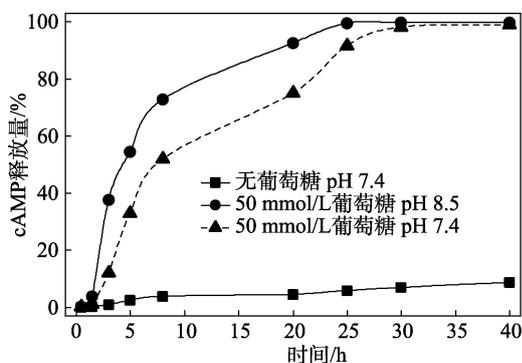


图 11 cAMP 的释放动力学曲线

Fig. 11 Release kinetic curves of cAMP

2.9 载药粒子的毒性评估

为了将上述体外释药结果与潜在的体内应用联系起来, 预估了该载药体系的毒性水平。正常人体内的胰岛素水平会在餐后半小时内上升至 250~300 pmol/L, 以降低血糖含量。但是糖尿病患者体内胰岛素释放受阻, 胰岛素含量一般保持在 20~30 pmol/L 水平甚至更低。研究显示, 为了将糖尿病患者的血糖含量降低至正常水平, 需提供至少 250 pmol/L 的胰岛素^[33]。根据目前的糖尿病诊断标准, 空腹血糖高于 7.0 mmol/L、餐后 2 h 血糖高于 11.1 mmol/L, 即视为糖尿病。本文取中间值 10 mmol/L 为分析标准, 由图 8 可知, 在此浓度下, 2 g/L 的 Flu-G-Ins-MSN 载药粒子可以释放 2.03 μmol/L Flu-G-Ins。因此, 释放 250 pmol/L 的 Flu-G-Ins 仅需约 0.25 mg/L 载药粒子。有研究表明, 质量浓度低于 100 mg/L 的 MSN 粒子对哺乳动物的活力和增殖能力影响很小^[34]。因此, 在体内应用 0.25 mg/L 载药粒子不仅可以提供充分的胰岛素和 cAMP 来调节血糖水平和胰岛素分泌, 而且不会产生急性中毒副作用, 是一种理想的

双重载药系统。

3 结论

(1) 以硅酸四乙酯为硅源, 以 CTAB 为介孔模板制备了 MCM-41 型介孔硅球, 粒径约 128 nm, 通过表面氨丙基化、苯硼酸化、cAMP 负载及 Flu-G-Ins 封盖构筑了一种双重载药系统。

(2) 当介孔硅球质量浓度为 10 g/L、cAMP 浓度为 0.1 mmol/L 时, 经 24 h 避光搅拌和 24 h 封盖, 硅球对 cAMP 的载药量可达 25.9 μmol/g。

(3) 载药系统对果糖和葡萄糖具有优异的响应选择性和 pH 依赖性, 在 pH 7.4 环境中, 2 g/L 的载药粒子在 50 mmol/L 葡萄糖刺激下, 0.5 h 的 Flu-G-Ins 释放量可达 8.35 μmol/L, 20 h 的 cAMP 释放量可达 75%。

(4) 间歇性刺激响应实验表明, 载药粒子对葡萄糖具有可靠的反复响应能力, 可实现对 Flu-G-Ins 和 cAMP 的持续控释, 在糖尿病治疗及刺激响应型多重载药系统的构筑等领域具有积极意义。

参考文献:

- [1] YANG Q L, XU W W, CHENG M, *et al.* Controlled release of drug molecules by pillararene-modified nanosystems[J]. *Chemical Communications*, 2022, 58(20): 3255-3269.
- [2] LIU L, DU P C, ZHAO X B, *et al.* Independent temperature and pH dual-stimuli responsive yolk/shell polymer microspheres for controlled release: Structural effect[J]. *European polymer Journal*, 2015, 69: 540-551.
- [3] ZHAO Y N, VIVERO-ESCOTO J L, SLOWING I I, *et al.* Capped mesoporous silica nanoparticles as stimuli-responsive controlled release systems for intracellular drug/gene delivery[J]. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2010, 7(9): 1013-1029.
- [4] GAO Y H, LIU Y, QIN X Y, *et al.* Dual stimuli-responsive fungicide carrier based on hollow mesoporous silica/hydroxypropyl cellulose hybrid nanoparticles[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 414: 125513.
- [5] QU H N, YANG L R, YU J M, *et al.* A redox responsive controlled release system using mesoporous silica nanoparticles capped with Au nanoparticles[J]. *RSC Advances*, 2017, 7(57): 35704-35710.
- [6] WANG W Q, CHEN L F, WEN Y Q, *et al.* Mesoporous silica nanoparticle-based controlled-release system[J]. *Progress in Chemistry*, 2013, 25(5): 677-691.
- [7] SHIINO D, MURATA Y, KUBO A, *et al.* Amine containing phenylboronic acid gel for glucose-responsive insulin release under physiological pH[J]. *Journal of Controlled Release*, 1995, 37(3): 269-276.
- [8] ZHOU D X, LI S Y, FEI Z X, *et al.* Glucose and pH dual-responsive polymersomes with multilevel self-regulation of blood glucose for insulin delivery[J]. *Biomacromolecules*, 2021, 22(9): 3971-3979.
- [9] SASSONE-CORSI P. The cyclic AMP pathway[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2012, 4(12): a011148.
- [10] MCKNIGHT G S. Cyclic AMP second messenger systems[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 1991, 3(2): 213-317.
- [11] YAMAUCHI K, HASHIZUME K, ICHIKAWA K, *et al.* Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase (A kinase) regulation of insulin receptor function: Phosphorylation of insulin receptor with a kinase decreases the insulin binding activity[J]. *Endocrinologia Japonica*, 1991, 38(2): 175-182.