

载阿霉素透明质酸聚合物纳米粒的构建及其体外性质研究

冯旭晨¹, 武毓琦¹, 郭琳², 付慧¹, 王阳¹, 李英鹏^{1*}, 孙玉姣^{1*}

1. 天津中医药大学, 天津 301617

2. 天津医科大学, 天津 300070

摘要:目的 合成透明质酸(HA)接枝单油酸甘油酯(GMO)两亲性聚合物HGO,并研究其所制备载阿霉素(DOX)纳米粒的理化性质及体外抗肿瘤效果。方法 HA与GMO通过酯化反应制得载体聚合物HGO,通过核磁共振波谱法及红外光谱法对其进行结构表征;采用芘荧光探针法测定聚合物临界聚集浓度(CAC)。采用透析法制备聚合物HGO载阿霉素(DOX@HGO)纳米粒,并对其粒径分布、Zeta电位及微观形态的表征;通过检测其在不同离子强度、不同pH条件下的粒径变化考察纳米粒的体外稳定性;考察DOX@HGO纳米粒在不同pH条件下的体外释放行为;CCK-8法考察DOX@HGO纳米粒对MDA-MB-231细胞的体外抑瘤效果;并通过荧光显微镜研究MDA-MB-231细胞对DOX溶液、DOX@HGO纳米粒的摄取能力,以及HA预处理对DOX@HGO纳米粒摄取的影响。结果 成功制得两亲性聚合物HGO,聚合物HGO中GMO的取代度为15.8%,CAC为0.023 mg·mL⁻¹。DOX@HGO纳米粒呈规则的球形,平均粒径为(130.800±1.709) nm,平均电位为(-32.600±0.153) mV,包封率和载药量分别为(98.65±0.74)%和(33.03±0.17)%,在不同离子强度下、模拟胃肠液中表现出良好的稳定性;DOX@HGO纳米粒的体外释放表现出pH依赖性。体外抗肿瘤活性实验表明,DOX@HGO纳米粒对MDA-MB-231细胞的生长具有较好的抑制作用;与DOX溶液比较,DOX@HGO纳米粒显著增加肿瘤细胞对于DOX的摄取($P<0.05$),HA预处理显著减少肿瘤细胞对DOX@HGO的摄取($P<0.05$)。结论 所构建的DOX@HGO纳米粒具有良好的理化性质,并且具有一定的pH敏感性及靶向抗肿瘤细胞的能力,是具有应用潜力的药物载体。

关键词: 透明质酸; 单油酸甘油酯; 阿霉素; 自组装纳米粒; 抗肿瘤

中图分类号: R943 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)06-1232-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.06.009

Construction and *in vitro* study of hyaluronic acid polymeric nanoparticles loaded with doxorubicin

FENG Xuchen¹, WU Yuqi¹, GUO Lin², FU Hui¹, WANG Yang¹, LI Yingpeng¹, SUN Yujiao¹

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: Objective To prepare an amphiphilic polymer HGO of hyaluronic acid (HA) grafted glyceryl monooleate (GMO), study the physicochemical properties of doxorubicin (DOX) loaded nanoparticles and determine the physicochemical properties as well as *in vitro* antitumor effect. **Methods** HA and GMO were esterified to prepare the carrier polymer HGO, and the structure of the polymer was characterized by ¹H-NMR and FT-IR. The critical aggregate concentration (CAC) was determined by pyrene fluorescence method. The hyaluronic acid grafted glyceryl monooleate loaded DOX nanoparticles (DOX@HGO) were prepared by dialysis method, and their particle size distribution, Zeta potential and micromorphology were characterized. The *in vitro* stability of the nanoparticles was investigated by the particle size changes under different ionic strengths and pH conditions. The drug release behaviors of the nanoparticles were examined under different pH. The *in vitro* antitumor effect of drug loaded nanoparticles were evaluated by CCK-8 method. The cellular uptake of DOX and DOX@HGO and effect of HA pre-treatment on DOX@HGO nanoparticle uptake was investigated under fluorescence microscope. **Results** The amphiphilic polymer HGO was successfully prepared, and the substitution degree of GMO in polymer HGO was 15.8%, the CAC was 0.023 mg·mL⁻¹. DOX@HGO

收稿日期: 2022-12-04

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82074030);国家自然科学基金青年项目(82104568);天津市教委科研计划项目(2020KJ195)

第一作者: 冯旭晨(1998—),女,硕士研究生,研究方向为中药药剂学。E-mail: fengxc31@163.com

*共同通信作者: 李英鹏(1987—),男,副教授,博士,研究方向为中药制剂靶向递药系统。E-mail: liyingpeng@tjutcm.edu.cn

孙玉姣(1988—),女,讲师,博士,研究方向为中药药剂学。E-mail: yjsharon@163.com

nanoparticles showed a regular spherical shape, with an average particle size of (130.800 ± 1.709) nm, an average potential of (-32.600 ± 0.153) mV, an encapsulation efficiency of $(98.65 \pm 0.74)\%$ and a drug loading capacity of $(33.03 \pm 0.17)\%$, respectively. The polymeric nanoparticles showed good stability under different ionic strengths and simulated gastrointestinal fluid dilution. Moreover, the *in vitro* release of DOX@HGO nanoparticles indicated pH dependent behavior. *In vitro* antitumor activity experiments showed that DOX@HGO nanoparticles had a good inhibitory effect on the growth of MDA-MB-231 cells and could significantly improve the cellular uptake of DOX by tumor cells. Compared with DOX solution, DOX@HGO nanoparticle significantly increased the uptake of DOX by tumor cells ($P < 0.05$), and HA pretreatment significantly reduced the uptake of DOX@HGO by tumor cells ($P < 0.05$). **Conclusion** The DOX@HGO nanoparticles prepared in this study have good physicochemical properties, excellent pH sensitivity and great anti-tumor targeting effects, which exhibited great application potential in drug delivery systems.

Key words: hyaluronic acid; glyceryl monooleate; doxorubicin; self-assembled nanoparticles; antitumor

透明质酸(HA)是广泛存在于人及动物结缔组织中的酸性黏多糖大分子物质,也是人体细胞外基质的主要成分。HA由D-葡萄糖醛酸和N-乙酰氨基葡萄糖构成,具有良好的生物相容性和可生物降解性,且无免疫原性和无毒性,已广泛应用于皮肤护理产品、关节炎治疗、组织工程和药物输送等领域^[1-4]。HA能与多种蛋白特异性结合并影响其功能,包括CD44、HA结合蛋白1(HABP1)、肿瘤坏死因子诱导蛋白6(TSG-6)、HA介导细胞游走受体(RHAMM)、淋巴内皮透明质酸受体-1(Lyve-1)等^[5]。其中,CD44是研究最广泛的HA结合受体,大多分布于造血细胞、成纤维细胞和众多肿瘤细胞表面^[6]。研究表明,CD44的多种亚型与肿瘤的转移、侵袭和耐药相关,并且在肺癌、胰腺癌、乳腺癌等多种实体瘤中显著过表达^[5]。肿瘤细胞表面高表达的CD44使得HA可高效靶向于上述肿瘤细胞。然而,由于HA的直链高分子多糖水溶性结构,使其在体内容易被酶解、氧自由基裂解或肝脏代谢,导致稳定性差、生物半衰期短,一定程度上限制了HA在药物领域的应用^[7]。通过修饰HA的羧基、羟基与酰胺等结构,改变其水溶性与空间构型是提高体内稳定性的可行途径。HA与疏水性分子的偶联衍生物还可利用表面活性自组装形成纳米粒,作为纳米抗癌药物递送载体,提高药物的载药量、稳定性及靶向分布^[8-9]。

单油酸甘油酯(GMO)是一种长链疏水性分子,水相中与其他表面活性分子混合可自发成立方相液晶用于药物递送^[10]。另外,其脂肪酸链能与细胞膜中的磷脂分子相互作用,增加递药载体细胞膜通透能力^[11]。同时,GMO可以抑制P-糖蛋白,从而提高药物生物利用度及逆转抗癌药物的多药耐药^[12]。

依据以上2种材料在抗肿瘤领域的广泛应用与优势互补,本研究设计了一种HA酯化接枝GMO的

两亲性聚合物(HGO)作为纳米递送载体。该载体材料可通过自组装方式包载蒽环类抗肿瘤药物阿霉素(DOX)。本研究对DOX@HGO的理化性质、细胞毒性与细胞摄取进行了初步研究,为HA的抗肿瘤应用及抗癌药物的高效靶向递送提供参考。

1 材料

1.1 细胞

人乳腺癌细胞MDA-MB-231(购自美国典型培养物保藏中心)。

1.2 药物及主要试剂

盐酸阿霉素(批号HF190916,质量分数99.52%),北京华联博科科技有限公司;HA,相对分子质量 5×10^4 ,山东华熙生物科技有限公司;GMO,大连美仑生物技术有限公司;环己基碳二亚胺(DCC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),Solarbio公司;DMEM培养基,美国Gibco公司;胎牛血清(FBS),杭州四季青生物技术有限公司;青霉素-链霉素溶液、胰酶细胞消化液,碧云天生物技术研究;其余试剂均为分析纯。

1.3 主要仪器

AL104型精密电子天平,梅特勒托利多仪器(上海)有限公司;84-1A磁力搅拌器,上海司乐仪器有限公司;透析袋(相对分子质量8 000~14 000),Solarbio公司;UV-2000型紫外可见分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司;冻干机,北京四环科学仪器厂有限公司;核磁共振仪(ARX-300),瑞士Bruker公司;JEM-2100型透射电镜,日本JEOL公司;Zetasizer Nano ZS纳米粒度仪,英国马尔文仪器有限公司;荧光倒置显微镜,Olympus公司。

2 方法与结果

2.1 HA与GMO的聚合物HGO的合成及结构确证

精密称取HA(0.26 mmol)溶于5 mL甲酰胺中,

加入DCC(0.52 mmol)和NHS(0.26 mmol),冰浴下搅拌2 h,以活化HA的羧基。称取0.26 mmol GMO溶于*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)中,并在氮气的保护下,缓慢加入到上述HA中,混合物在室温下搅拌

反应48 h。反应结束后,将反应液转移到透析袋中,用二甲亚砜(DMSO)透析24 h,蒸馏水透析72 h。透析结束后,将透析液冷冻干燥制得聚合物HGO,反应式见图1-A。

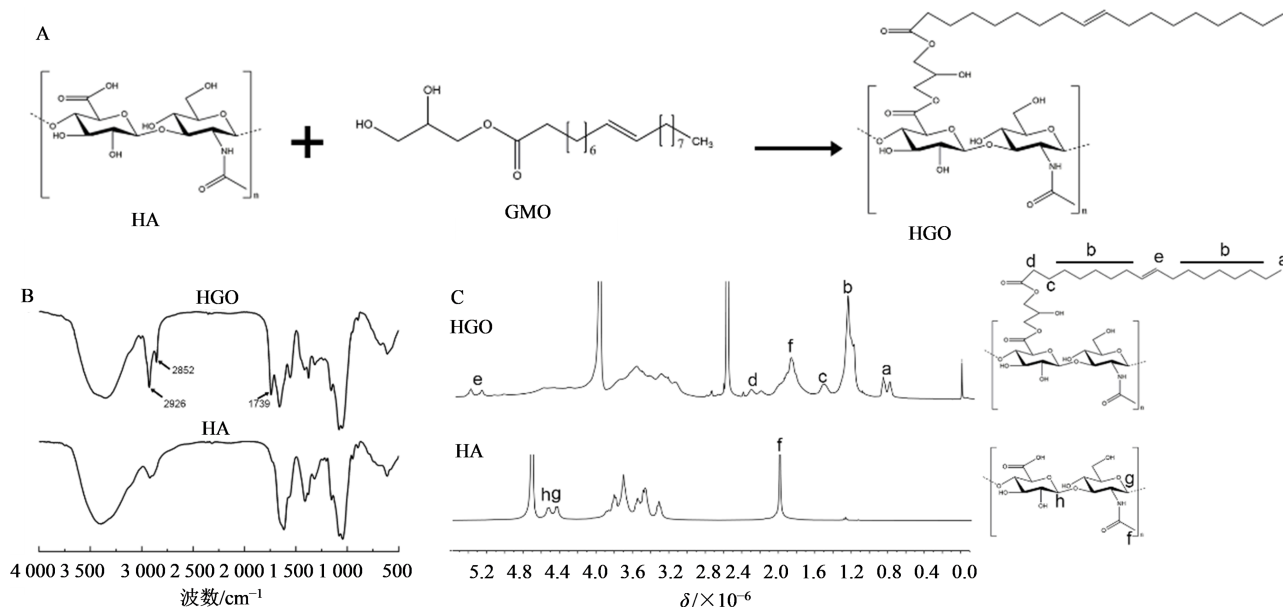


图1 聚合物HGO的合成公式(A)以及HA、HGO的结构表征FT-IR图谱(B)、¹H-NMR图谱(C)
Fig. 1 Synthesis formula (A) of polymer HGO and structural characterization of HA and HGO using FT-IR spectra (B) and ¹H-NMR spectra (C)

用核磁共振波谱(¹H-NMR)及红外光谱(FT-IR)确定其结构。HGO、HA的FT-IR图谱如图1-B所示,与HA相比,HGO在波数1 739 cm⁻¹处出现新吸收峰,该吸收峰为HA上的羧基与GMO上羟基形成的酯键特征峰。另外,在波数2 926 cm⁻¹、2 852 cm⁻¹处的吸收峰由于GMO上大量甲基和亚甲基的引入,碳氢键伸缩振动吸收峰强度增加。红外图谱结果表明,GMO成功结合到HA上。

为进一步对HGO聚合物进行结构鉴定,使用¹H-NMR进行分析。HA、HGO的¹H-NMR结果如图1-C所示。 δ 1.98 $\times$ 10⁻⁶处为HA中[—NHCOCH₃]的特征峰。与HA相比,HGO在 δ 8.5 $\times$ 10⁻⁷处出现GMO的[—CH₃]特征峰,进一步表明HGO聚合物成功合成。GMO结合HA的量[取代度(DS)]由特征峰积分面积计算,聚合物HGO的DS为15.8%。

$$DS = A_{(-CH_3)} / A_{(-NHCOCH_3)}$$

 $A_{(-CH_3)}$ 是GMO中—CH₃的峰面积, $A_{(-NHCOCH_3)}$ 是HA甲基酰胺中—CH₃的峰面积

2.2 临界聚集浓度(CAC)的测定

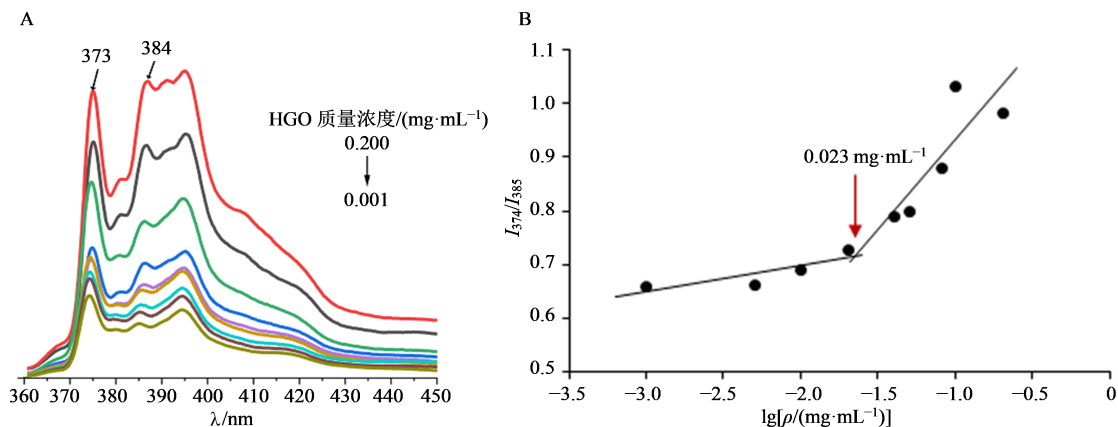
利用芘作为荧光探针,测定HGO聚合物的CAC。在100 mL量瓶中加入等量芘的丙酮溶液,自然挥干后,加入系列浓度的聚合物溶液,使芘的终

浓度为6 $\times$ 10⁻⁶ mol·L⁻¹,将含有芘-聚合物载体溶液超声30 min,25 °C水浴震荡2 h后,避光过夜。采用荧光分光光度计扫描不同样品的发射光谱,激发波长设置为342 nm,获得352~674 nm波长的芘的激发光谱,结果如图2-A所示。

在形成纳米粒的过程中,随着周围极性变化,疏水性的芘分子从水环境中向聚合物的疏水端组成的疏水内核迁移,进入聚合物纳米粒,造成第一与第三发射峰强度比值 I_1/I_3 (即 I_{373}/I_{384})发生改变,当聚合物达到一定浓度时, I_{373}/I_{384} 会显著降低,这个浓度即为CAC。CAC值越小,表明纳米粒抗稀释能力越强,其自身越稳定^[13]。以 I_{373}/I_{384} 为纵坐标,聚合物浓度的对数为横坐标绘制曲线,曲线拐点处即为聚合物的CAC值。由图2-B可以看出,本研究所制备的HGO聚合物的CAC值是0.023 mg·mL⁻¹,表明其具有较强的抗稀释能力,进入体循环后,能有效保持纳米粒的稳定性和结构的完整性。

2.3 DOX@HGO纳米粒的制备与表征

2.3.1 DOX@HGO纳米粒的制备 精密称取HGO 20 mg溶解于2 mL甲酰胺中,称取10 mg盐酸阿霉素,用含有三乙胺(TEA)的DMF溶液溶解(TEA:



A-芘在不同HGO浓度中的荧光发射光谱; B-不同HGO浓度所对应的 I_{373}/I_{384} 值
A-fluorescence emission spectra of pyrene at different HGO concentrations; B- I_{373}/I_{384} values corresponding to different HGO concentrations

图2 HGO聚合物CAC值的测定

Fig. 2 Determination of CAC value of HGO

DOX=3:1), 搅拌过夜后将DOX溶液与载体溶液混合, 继续搅拌24 h后转移至透析袋内, 透析24 h, 即得DOX@HGO纳米粒。

2.3.2 粒径、Zeta 电位及形貌表征 取适量DOX@HGO纳米粒, 采用Zetasizer Nano ZS纳米粒度分布仪测定其粒径分布和Zeta 电位大小。由图3-A可知, 所制备的DOX@HGO纳米粒粒径分布均一, 粒径为 $(130.800 \pm 1.709) \text{ nm}$ 、多分散指数为 (0.112 ± 0.016) 、Zeta 电位为 $(-32.6 \pm 0.153) \text{ mV}$ 。结果表明, 纳米粒表面带负电荷, 可防止纳米粒聚集, 有效增加纳米粒的稳定性, 同时可避免血浆蛋白对纳米粒的吸附, 提高纳米粒在血液循环中的稳定性。

取适量DOX@HGO纳米粒, 滴在载有碳膜的铜网上, 待溶液自然挥干后用1%醋酸铀溶液负染, 室温干燥, 用透射电子显微镜观察其外貌特征。结果如图3-B所示, DOX@HGO纳米粒粒径分布较窄, 形貌为球形或类球形。

2.3.3 载药量和包封率 精密量取载药纳米粒0.5 mL置于10 mL量瓶中, 加入DMSO超声破坏后

定容。利用紫外分光光度法在480 nm处测定吸光度(A)值^[14], 计算纳米粒加载的药量。计算载药纳米粒的包封率与载药量。

$$\text{包封率} = W_m / W_f$$

$$\text{载药量} = W_m / (W_m + W)$$

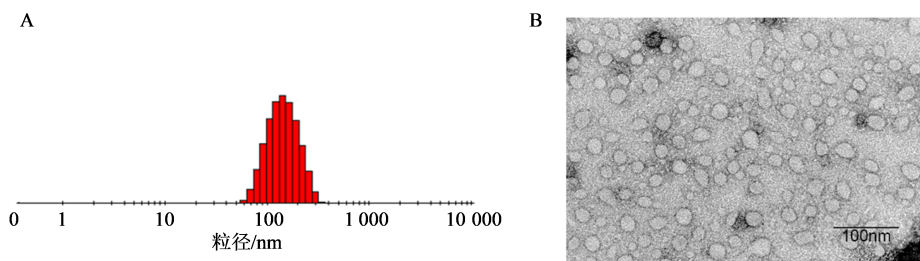
W_m 、 W_f 和 W 分别为纳米粒加载的药量、理论投药量和聚合物载体的量

DOX@HGO纳米粒的包封率和载药量分别为 $(98.65 \pm 0.74)\%$ 和 $(33.03 \pm 0.17)\%$, 表明HGO聚合物具有较高的包封率和载药量, 可很好地包载抗肿瘤药物DOX。

2.4 DOX@HGO纳米粒稳定性研究

分别用NaCl溶液稀释载药纳米粒, 使NaCl终浓度为0、0.05、0.10、0.15、0.20 mol·L⁻¹, 37 °C气浴振荡孵化6 h后, 测定载药纳米粒的粒径变化, 由图4-A可知, 随着离子强度的增加, 纳米粒粒径无显著变化, 表明DOX@HGO纳米粒具有较好的离子强度稳定性。

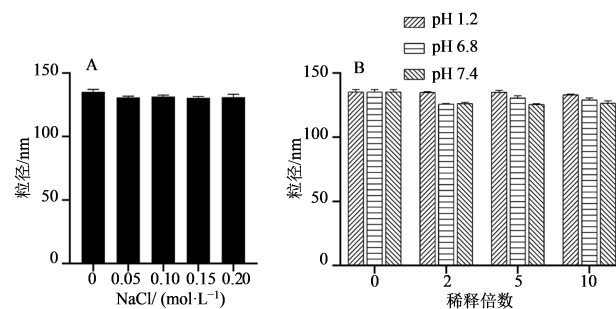
将载药纳米粒分别用模拟胃肠液稀释后, 于37 °C孵化6 h, 考察载药纳米粒的粒径变化。如图



A-DOX@HGO纳米粒粒径分布图; B-DOX@HGO纳米粒透射电镜图
A-size distribution of DOX@HGO nanoparticles; B-TEM micrograph of DOX@HGO nanoparticles

图3 DOX@HGO纳米粒的粒径表征

Fig. 3 Particle size characterization of DOX@HGO nanoparticles



A-离子强度对于DOX@HGO纳米粒粒径影响;B-DOX@HGO纳米粒在模拟胃肠液中的稀释稳定性

A-effect of ionic strength on particle size of DOX@HGO nanoparticles; B-stability of DOX@HGO nanoparticles upon dilution with SGF and SIF

图4 DOX@HGO纳米粒的稳定性($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Stability study of DOX@HGO nanoparticles ($\bar{x} \pm s, n=3$)

4-B所示,稀释后粒径几乎保持不变。因此,实验结果表明在胃肠道及血浆pH范围内,载药纳米粒具有较好的稀释稳定性。

2.5 DOX@HGO纳米粒体外药物释放

采用动态透析法考察载药纳米粒的体外释放行为。精密量取2 mL载药纳米粒置于透析袋(截留相对分子质量8 000~14 000)内,投入30 mL不同pH值的释放介质中(pH 1.2、6.8、7.4), (37.0±0.5)℃、100 r·min⁻¹避光振摇,分别于0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00、12.00、24.00、36.00、48.00 h取样2 mL,同时补充相同体积和温度的新鲜释放介质。紫外分光光度法测定介质中药物含量,并计算累积释放率。

$$Er = \frac{V_e \sum_{i=1}^{n-1} C_i + V_0 C_n}{W_{DOX}}$$

Er为DOX的累积释放量; V_e 为介质的置换体积; V_0 为释放介质总体积; W_{DOX} 为纳米粒中药物的含量; C_i 为第*i*次置换取样时释放出的药物浓度; C_n 为第*n*次取样时测得的药物浓度

如图5所示,载药纳米粒释放初期均无明显的突释效应,表明DOX被全部包载于纳米粒中,这与测定的较高包封率结果一致。随着时间的延长,纳米粒缓慢释放。在pH为1.2时,纳米粒释放稍快,在pH为6.8、7.4时纳米粒释放相对较慢,具有明显的缓释效应。这种药物释放机制对于肿瘤部位的微酸环境,有利于药物在到达肿瘤后快速释放,发挥抗肿瘤作用。

2.6 DOX@HGO纳米粒抗肿瘤活性

2.6.1 细胞毒性 MDA-MB-231细胞培养于含10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素溶液的DMEM培养基中,当细胞融合达到80%以上时,用胰酶消化,

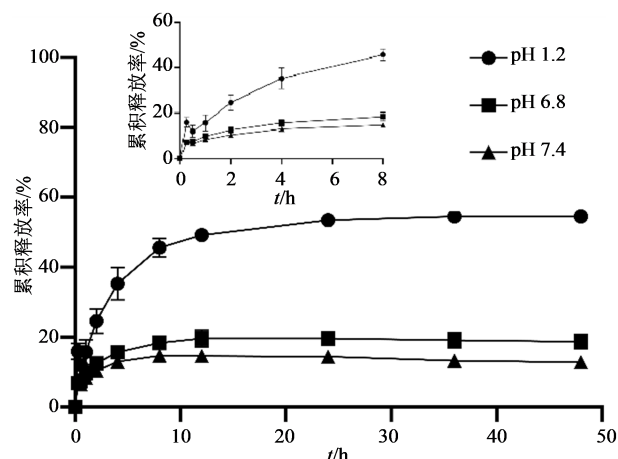


图5 DOX@HGO纳米粒在不同pH条件下的体外释放曲线($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 *In vitro* drug release of DOX@HGO nanoparticles under different pH media ($\bar{x} \pm s, n=3$)

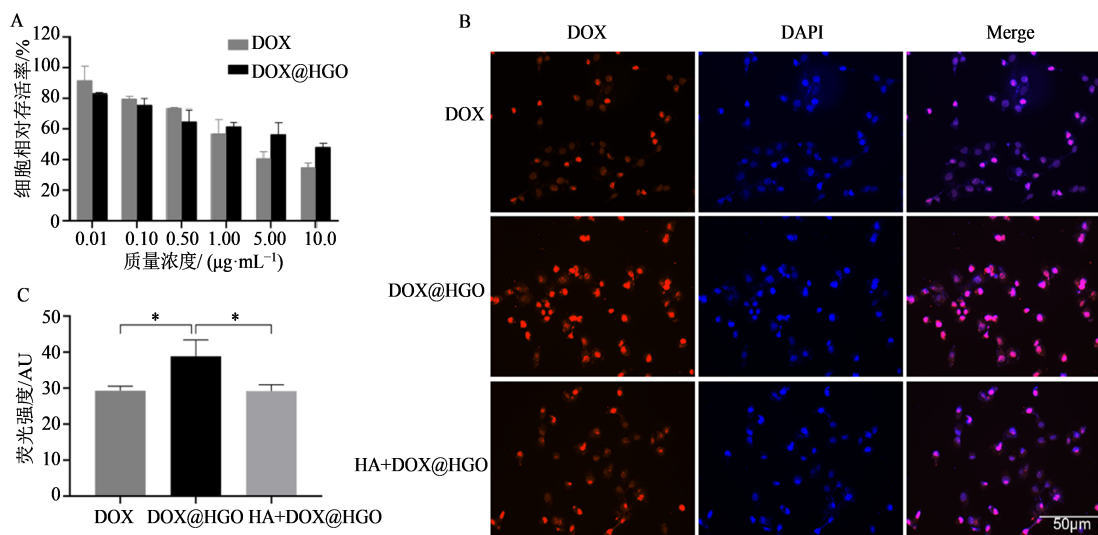
按1:3传代,取对数生长期的细胞进行后续实验。

将MDA-MB-231细胞以每孔 3.0×10^3 的密度接种于96孔培养板中,37℃、5% CO₂条件下孵育24 h,使细胞完全贴壁,分别加入含DOX质量浓度为0.01、0.10、0.50、1.00、5.00、10.00 μg·mL⁻¹的溶液或DOX@HGO纳米粒的培养基100 μL,每个浓度设置5个复孔,对照组加入等体积的完全培养基。培养24 h后,避光加入CCK-8溶液,继续培养2 h后,使用酶标仪测定其450 nm波长处吸光度(*A*)值,并计算细胞相对存活率、半数抑制浓度(IC₅₀),评价其抑制肿瘤细胞生长的活性。

$$\text{细胞相对存活率} = A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

结果如图6-A所示,随着DOX浓度增加,MDA-MB-231细胞相对存活率逐渐降低,表明细胞毒性具有浓度相关性。DOX、DOX@HGO的IC₅₀值分别为2.403、9.082 μg·mL⁻¹。考虑到DOX@HGO纳米粒在24 h内仅有部分药物释放,即在相同的时间内DOX@HGO纳米粒组实际作用于细胞的有效药物浓度低于DOX溶液组,从而导致了较低的细胞毒性。因此,若延长纳米粒与细胞的孵化时间,纳米粒可能对MDA-MB-231细胞的生长表现出更强的抑制作用。

2.6.2 细胞摄取 将MDA-MB-231细胞按每孔 2.0×10^5 的密度接种于6孔板中,于37℃、5% CO₂细胞孵育箱中孵育24 h,使细胞完全贴壁。细胞分为3组:DOX溶液组、DOX@HGO纳米粒组、竞争抑制组(DOX@HGO纳米粒+HA),DOX终质量浓度均为10 μg·mL⁻¹,对于竞争性抑制组,在保持其他条件相同的情况下,在加入DOX@HGO纳米粒之前,



A-DOX 溶液、DOX@HGO 纳米粒对 MDA-MB-231 细胞相对存活率的影响;B-DOX 溶液、DOX@HGO 纳米粒在 MDA-MB-231 细胞中的摄取情况;C-DOX 溶液、DOX@HGO 纳米粒在 MDA-MB-231 细胞中摄取的荧光强度统计图, * $P < 0.05$

A-effect of DOX solution and DOX@HGO nanoparticles on survival rate of MDA-MB-231 cells;B-uptake of DOX solution and DOX@HGO nanoparticles in MDA-MB-231 cells;C-statistical diagram of fluorescence intensity uptaken by DOX solution and DOX@HGO nanoparticles in MDA-MB-231 cells, * $P < 0.05$

图6 DOX@HGO 纳米粒的抗肿瘤活性

Fig. 6 Antitumor activity of DOX@HGO nanoparticles

在细胞中加入 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 HA 培养基溶液, 孵育 1 h 后, 弃去培养基。各细胞组分别加入相应制剂, 给药后孵育 4 h。孵育结束后, 弃去培养液, 用冷磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 洗涤细胞 3 次, 4% 多聚甲醛溶液固定细胞 10 min 后, 加入 DAPI 溶液染色, 避光反应 10 min, 冷 PBS 洗涤 3 次后, 用倒置荧光显微镜分析 MDA-MB-231 细胞对 DOX 的摄取情况。

细胞摄取结果如图 6-B 所示, DAPI 染色细胞核后显蓝色荧光, DOX 显红色荧光。DOX 荧光强度统计结果如图 6-C 所示, 与 DOX@HGO 纳米粒组相比, DOX 溶液组红色荧光较弱 ($P < 0.05$), 表明游离 DOX 的细胞摄取量较少。这主要是由于游离的 DOX 通过被动扩散进入细胞, 而载药纳米粒可通过 CD44 受体介导的内吞作用大量摄取进入细胞引起的。此外, 用游离 HA 预处理 MDA-MB-231 细胞后, DOX@HGO 纳米粒组的红色荧光强度显著降低 ($P < 0.05$), 进一步证明了纳米粒可通过 CD44 受体介导的内吞作用进入细胞, 有利于 DOX 向肿瘤细胞的靶向递送。

3 讨论

DOX 是广谱、蒽环类抗癌药物, 临床用于治疗乳腺癌、胃癌、卵巢癌、甲状腺癌等多种癌症。因其无选择性, 易导致剂量相关性的心脏毒性、骨髓抑制等副作用^[15-16]。另外, DOX 常规制剂靶向性较差, 制备工艺较为复杂^[17]。

两亲性自组装纳米给药体系是有机分子通过非共价的超分子作用力自发地聚集而形成稳定聚集体。该方法制备简单、稳定性高, 并且两亲性聚合物作为载体材料包载疏水性抗肿瘤药物, 可解决药物溶解度差、生物利用度低等问题^[18-19]。本研究选用亲水性的 HA 和疏水性的 GMO, 通过酯化反应制备得到两亲性聚合物 HGO。该材料可在水性环境中自组装, 用于包载疏水性抗肿瘤药物 DOX; 所制得的 DOX@HGO 纳米粒, 粒径分布均匀、稳定性好且包封率高; 纳米粒的体外释放具有明显的 pH 依赖性, 有利于药物在肿瘤环境下释放。此外, HA 的亲水性外壳在体内可以避免纳米粒被网状内皮系统 (RES) 识别^[20], 延长纳米粒在体内的循环时间; GMO 具有疏水性, 其所具有的脂肪酸链和细胞膜的磷脂成分可以相互作用, 从而提高药物的通透性, 提高药物的生物利用度^[21]。

本研究选用 CD44 高表达的 MDA-MB-231 细胞考察载药纳米粒的体外抗肿瘤活性。摄取实验结果表明, 相较于 DOX 溶液组, HGO 聚合物制备的载药纳米粒可显著增加 DOX 在细胞中的摄取, 载药纳米粒能够通过 MDA-MB-231 细胞表面高表达的 CD44 受体介导药物内化进入细胞。

本研究结果表明, 所制备的 HGO 聚合物具有两亲性, 可通过自组装包载疏水性抗肿瘤药物。载药纳米粒具有分散均匀、稳定性好、包封率高、pH 依赖

性等优点,同时可通过CD44介导的细胞内吞作用高效进入肿瘤细胞,进而增加抗肿瘤效果。本研究设计的HGO聚合物有望成为新型抗肿瘤药物有效传递的纳米载体。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zhai P S, Peng X X, Li B Q, et al. The application of hyaluronic acid in bone regeneration [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 151: 1224-1239.
- [2] Snetkov P, Zakharova K, Morozkina S, et al. Hyaluronic acid: The influence of molecular weight on structural, physical, physico-chemical, and degradable properties of biopolymer [J]. *Polymers (Basel)*, 2020, 12(8): 1800.
- [3] Ravar F, Saadat E, Gholami M, et al. Hyaluronic acid-coated liposomes for targeted delivery of paclitaxel, *in-vitro* characterization and *in-vivo* evaluation [J]. *J Control Release*, 2016, 229: 10-22.
- [4] Graça M F P, Miguel S P, Cabral C S D, et al. Hyaluronic acid-Based wound dressings: A review [J]. *Carbohydr Polym*, 2020, 241: 116364.
- [5] Chen C, Zhao S J, Karnad A, et al. The biology and role of CD44 in cancer progression: Therapeutic implications [J]. *J Hematol Oncol*, 2018, 11(1): 64.
- [6] Fallacara A, Baldini E, Manfredini S, et al. Hyaluronic acid in the third millennium [J]. *Polymers (Basel)*, 2018, 10(7): 701.
- [7] Huang G L, Huang H L. Hyaluronic acid-based biopharmaceutical delivery and tumor-targeted drug delivery system [J]. *J Control Release*, 2018, 278: 122-126.
- [8] Bayer I S. Hyaluronic acid and controlled release: A review [J]. *Molecules*, 2020, 25(11): 2649.
- [9] Kim K, Choi H, Choi E S, et al. Hyaluronic acid-coated nanomedicine for targeted cancer therapy [J]. *Pharmaceutics*, 2019, 11(7): 301.
- [10] Madheswaran T, Kandasamy M, Bose R J, et al. Current potential and challenges in the advances of liquid crystalline nanoparticles as drug delivery systems [J]. *Drug Discov Today*, 2019, 24(7): 1405-1412.
- [11] Jabłonowska E, Matyszevska D, Nazaruk E, et al. Lipid membranes exposed to dispersions of phytantriol and monoolein cubosomes: Langmuir monolayer and HeLa cell membrane studies [J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2021, 1865(1): 129738.
- [12] Gagliardi A, Cosco D, Udongo B P, et al. Design and characterization of glyceryl monooleate-nanostructures containing doxorubicin hydrochloride [J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12(11): 1017.
- [13] Lu Y, Zhang E S, Yang J H, et al. Strategies to improve micelle stability for drug delivery [J]. *Nano Res*, 2018, 11(10): 4985-4998.
- [14] Hazhir N, Chekin F, Raoof J B, et al. A porous reduced graphene oxide/chitosan-based nanocarrier as a delivery system of doxorubicin [J]. *RSC Adv*, 2019, 9(53): 30729-30735.
- [15] Pugazhendhi A, Edison T N J I, Velmurugan B K, et al. Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems [J]. *Life Sci*, 2018, 200: 26-30.
- [16] Christidi E, Brunham L R. Regulated cell death pathways in doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(4): 339.
- [17] Makwana V, Karanjia J, Haselhorst T, et al. Liposomal doxorubicin as targeted delivery platform: Current trends in surface functionalization [J]. *Int J Pharm*, 2021, 593: 120117.
- [18] 戈伟, 欧昌金, 司伟丽, 等. 自组装纳米粒子在肿瘤诊疗中的研究进展 [J]. *南京工业大学学报: 自然科学版*, 2021, 43(1): 1-12.
- Ge W, Ou C J, Si W L, et al. Advances of self-assembled nanoparticles in tumor therapy [J]. *J Nanjing Univ Technol Nat Sci Ed*, 2021, 43(1): 1-12.
- [19] 胡静雯, 贾国香, 董亚倩, 等. 从中药全过程视角探析纳米颗粒自组装行为及应用 [J]. *中草药*, 2022, 53(22): 7307-7316.
- Hu J W, Jia G X, Dong Y Q, et al. Exploring self-assembly behavior and application of nanoparticles from perspective of whole process of traditional Chinese medicine [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2022, 53(22): 7307-7316.
- [20] Tian G X, Pan R Y, Zhang B, et al. Liver-targeted combination therapy basing on glycyrrhizic acid-modified DSPE-PEG-PEI nanoparticles for Co-delivery of doxorubicin and bcl-2 siRNA [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 4.
- [21] Tian G X, Pan R Y, Zhang B, et al. Liver-targeted combination therapy basing on glycyrrhizic acid-modified DSPE-PEG-PEI nanoparticles for Co-delivery of doxorubicin and bcl-2 siRNA [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 4.
- [22] Jain S, Heeralal B, Swami R, et al. Improved oral bioavailability, therapeutic efficacy, and reduced toxicity of tamoxifen-loaded liquid crystalline nanoparticles [J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2018, 19(1): 460-469.

[责任编辑 兰新新]