

纳米有机金属框架与精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸序列短肽偶联最佳工艺

许婷¹, 李秀妍², 李琳¹, 李永吉^{2*}

1. 黑龙江中医药大学 药剂实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: 目的 优选纳米有机金属框架(IRMOF-3)与精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp)序列组成的短肽(RGD)偶联的最佳制备工艺。方法 通过RGD对IRMOF-3进行修饰得到RIR纳米粒,并对得到的RIR纳米粒通过红外光谱(IR)、质谱(MS)和扫描电镜(SEM)等手段进行定性分析,以RGD与IRMOF-3的质量比、反应时间、反应温度为考察对象,以偶联率为评价指标,寻找最佳工艺条件。结果 IR、MS和SEM显示RGD成功偶联到IRMOF-3表面,并获得RIR最佳工艺为A₁B₂C₁,即RGD与IRMOF-3的质量比为1:1、反应时间为4 h、反应温度为-20 ℃时,可以得到最大偶联率的RIR纳米粒。结论 IR、MS、SEM可以强有力地说明RIR纳米粒的成功偶联,且正交试验优化出的RGD与IRMOF-3偶联的最优工艺,值得推广使用。

关键词: IRMOF-3; RGD; 正交试验; 偶联率; 最佳工艺

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)10-1460-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.10.010

Nanometer organic metal framework IRMOF-3 connection with RGD best preparation process

XU Ting¹, LI Xiu-yan², LI Lin¹, LI Yong-ji²

1. Laboratory of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. School of Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To optimize nano metal organic framework IRMOF-3 and RGD peptide by connecting the optimum preparation process. **Methods** To modify IRMOF-3 by RGD to obtain RIR nanoparticles, and to qualitatively analyze the obtained RIR nanoparticles by infrared spectroscopy (IR), mass spectrometry (MS), scanning electron microscopy (SEM), etc. To find the optimum process conditions by taking IRMOF-3 and RGD mass ratio, reaction time at low temperature, low reaction temperature as the object of study and the coupling rate as the evaluation index. **Results** The analyses by IR, MS, and SEM showed that RGD was successfully coupled to the IRMOF-3 surface, and the best process for the obtained RIR was A₁B₂C₁. The mass ratio of folic acid and carrier is 1:1, the reaction time is 4 h, and the reaction temperature is -20 ℃, the RIR with maximum coupling rate of could be obtained. **Conclusion** IR, MS, and SEM could strongly suggest that RIR nanoparticles could be successfully coupled, the optimal process of RGD and IRMOF-3 coupling by orthogonal test is worthy to be popularized.

Key words: IRMOF-3; RGD; orthogonal test; coupling rate; optimal process

RGD 是一类广泛存在于生物体内各组织细胞外基质以及血液中的一类由精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp)序列组成的短肽,是整合素与其配体蛋白相互识别的位点,是主动靶向传递系统研

究的热点之一^[1-5]。IRMOF-3 是以 Zn²⁺为金属原子的纳米金属有机骨架结构^[6-7],其孔径、表面积、性状可以根据载入的药物进行自我调节,具有载药量大的优点;其不具有细胞靶向性的特点可以通过表

收稿日期: 2015-01-15

基金项目: 国家自然科学基金——中药纳米缓释有机金属框架载药体系的构建(2014bs06)

作者简介: 许婷(1980—),女,黑龙江哈尔滨人,讲师,博士,研究方向为纳米载药系统肿瘤主动靶向研究。

Tel: 13945075761 E-mail: toeflcherry@163.com

*通信作者 李永吉(1957—),男,黑龙江哈尔滨人,现任黑龙江中医药大学教授,博士研究生导师,博士学位,主要从事经皮给药、中药注射剂及新药开发研究工作。Tel: 13904513257 E-mail: liyongji2009@163.com

面携带的官能团与肿瘤细胞表面受体的特异性配体发生反应,使其成为具有靶向性的药物载体,如结构中的氨基基团可以与RGD表面的羧基发生反应,得到具有靶向作用的RGD偶联IRMOF-3的RIR,可以直接定位于肿瘤细胞表面高度表达的整合素受体,达到直接快速有效地抑制肿瘤细胞的作用^[8-9]。本实验对得到的RIR纳米粒通过红外光谱(IR)、质谱(MS)和扫描电镜(SEM)等手段进行定性分析,并采用正交试验法优化偶联的最佳制备条件^[10-11]。

1 仪器与材料

UV-2000型紫外分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司;TGL-16C型离心机,上海安亭科学仪器厂;DHJF-2005型低温恒温反应浴,郑州世纪双科仪器有限公司;FA2004型电子分析天平,上海良平仪器仪表有限公司;FTNIR型红外光谱仪,瑞士菲克光公司;Quanta 200F型扫描电镜,日本日立公司;GC-MS6800型质谱分析仪,天津天瑞仪器股份有限公司。

RGD小肽,上海翱博生物科技有限公司,质量分数98%;无水吡啶,天津市富宇精细化工有限公司;三氯氧磷(POCl_3),江苏常余化工有限公司;IRMOF-3(由黑龙江中医药大学药剂实验室合成,质控指标为合成后的IRMOF-3的红外光谱、X射线衍射图谱与标准的IRMOF-3红外图谱、X射线衍射图谱的比较;SEM电镜扫描图谱确定合成后IRMOF-3的粒径范围;氮气吸附实验证明合成后IRMOF-3是否有孔隙存在,以上指标暂处于保密阶段,涉及合成方法),黑龙江中医药大学实验室;二氯甲烷(DCM)、二甲基亚砜(DMSO)、盐酸(HCl),天津市富宇精细化工有限公司。

2 方法与结果

2.1 RGD标准曲线的制备

精密称取RGD 25 mg,用磷酸盐缓冲液(PBS)溶解于50 mL量瓶中并稀释至刻度,分别取0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.1、0.12 mL于10 mL量瓶中,用PBS稀释至刻度,配制成质量浓度为0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 $\mu\text{g/mL}$ 的系列标准液,以PBS为空白,在220 nm波长下测定吸光度值,以吸光度值对RGD的质量浓度做标准曲线,得到回归方程为 $Y=7.7813X+0.028$, $R^2=0.9995$,表明RGD在0.5~6.0 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.2 RGD偶联IRMOF-3的正交试验

2.2.1 RIR的制备 精密称取适量IRMOF-3和

RGD,5 mL无水吡啶溶解后,1 500 r/min低温搅拌,待温度达到足够低后加入0.12 mL POCl_3 。低温搅拌一定时间,然后转入室温反应过夜12 h。全程氮气保护,防止水分进入。取出,旋蒸干燥,用DCM清洗,离心3次,风干,得到的RGD偶联IRMOF-3的RIR通过IR、MS、SEM等方法进行表征。

2.2.2 正交试验设计 精密称取1.0 mg RIR加入到500 μL DMSO和100 μL HCl的混合溶液中,超声溶解后,取50 μL 溶液,用PBS稀释到10 mL,紫外220 nm处测定吸光度,根据所建立的标准曲线计算RGD质量,计算偶联率。对一些影响RGD与IRMOF-3偶联的因素进行初筛,以RGD与IRMOF-3的质量比(A)、搅拌反应时间(B)、反应温度(C)为考察对象,每个因素选择3个水平,按 $L_9(3^4)$ 正交表设计试验^[11-13],计算偶联率。

偶联率=被偶联RGD的质量/载体IRMOF-3的质量

2.2.3 统计学处理 采用SPSS 17.0软件包,通过正交试验分析方法对实验结果进行方差分析, $P<0.05$ 为有显著性差异。

2.2.4 正交试验结果 根据表1的分析结果可知,RGD和IRMOF-3质量比对偶联率的影响最大,其次为反应温度和反应时间。方差分析表2表明,各因素均无显著性影响。通过正交试验优选的最佳工艺为 $A_1B_2C_1$,即RGD和载体的质量比为1:1,反应时间为4 h,反应温度为-20 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.3 IR分析

仪器参数:分辨率0.5 cm^{-1} ;光谱范围为4 000~

表1 正交试验设计与结果

Table 1 Design and results of orthogonal test

试验号	A	B/h	C/ $^{\circ}\text{C}$	D(误差)	偶联率/%
1	1:1(1)	2(1)	-20(1)	(1)	70.5
2	1:1(1)	4(2)	0(2)	(2)	51.2
3	1:1(1)	6(3)	20(3)	(3)	53.6
4	2:1(2)	2(1)	0(2)	(3)	49.8
5	2:1(2)	4(2)	20(3)	(1)	68.5
6	2:1(2)	6(3)	-20(1)	(2)	51.2
7	3:1(3)	2(1)	20(3)	(2)	48.7
8	3:1(3)	4(2)	-20(1)	(3)	50.7
9	3:1(3)	6(3)	0(2)	(1)	41.8
K_1	175.3	169.0	172.4	180.8	
K_2	169.5	170.4	142.8	151.1	
K_3	141.2	146.6	170.8	154.1	
R	34.1	23.8	29.6	29.7	

表2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

误差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	221.927	2	1.245	无
B	118.907	2	0.667	无
C	184.747	2	1.037	无
D (误差)	178.220	2		

400 cm^{-1} ; 信噪比 40 000 : 1; 波数精读为 0.01 cm^{-1} ; 透光率精度为 0.05%T (T 代表透过率)。制片过程: 采用溴化钾压片法检测载体的 IR。称取 1 mg 干燥的载体样品与 5 mg 溴化钾混合, 研磨均匀, 压片, 将混匀的粉末制备薄片。IRMOF-3、RGD 和 RIR 的 IR 图见图 1。从图中可以看出, RGD 和 IRMOF-3 都具有 N-H 伸缩振动和 C=O 的伸缩振动, 但对应的波数区间不同。IRMOF-3 偶联 RGD 后, 仍具有 N-H 伸缩振动和 C=O 的伸缩振动, 通过与 RGD 和 IRMOF-3 图谱进行比较可以看出, 特征吸收峰 N-H 伸缩振动和 C=O 的伸缩振动发生了明显的位移, 其中 N-H 伸缩振动吸收 3 500~3 100 cm^{-1} , C=O 伸缩振动吸收 1 680~1 630 cm^{-1} , N-H 弯曲振动吸收 1 655~1 590 cm^{-1} , C-N 伸缩振动 1 420~1 400 cm^{-1} , 初步推测 RGD 与 IRMOF-3 成功偶联。

2.4 MS 分析

取 RIR 纳米粒, 用 DCM 溶解, 超声, 得到乳白色悬浊液, 将样品溶液加入 1 滴水, 迅速进行仪器分析。为了进一步证实 RGD 和 IRMOF-3 的成功偶联, 进行了质谱分析。IRMOF-3 作为含有金属离子的骨架结构, 不能被电离, 故 MS 不能对其进行测定。RGD 多肽片段的质谱如图 2-A 所示。为了测定 RGD 多肽片段是否与 IRMOF-3 成酰胺键链接, 通过 HCl 消化 RIR 得到了骨架破裂之后的金属盐和链接 RGD 的配体 L (具体见图 2-C 方框内所示) 的混合物。虽然不能测定 RIR 的质谱, 但是测定混合物中消化混合物中是否有配体 L 的质谱峰存在, 能判定金属有机骨架 IRMOF-3 上是否连有 RGD 片段。通过上述方法消化处理后, 测定了溶液的质谱如图 2-B 所示。从质谱图中可以确定 RGD 与 IRMOF-3 已成功偶联。

2.5 SEM 观察

将导电胶剪成小块粘在铝箔上, 将粉碎后的样品用牙签或棉签涂在导电胶上, 喷金既得。加速电压为 15~30 kV; 放大倍数为 4 万~8 万倍。图 3 中可以看出, 偶联前后性状没有发生实质变化, 平

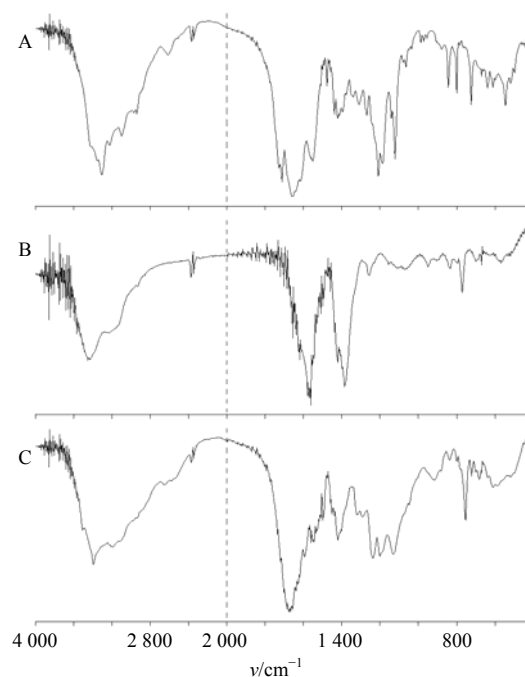


图1 IRMOF-3 (A)、RGD (B) 和 RIR (C) 的 IR 图

Fig. 1 IR spectra of IRMOF-3 (A), RGD peptide (B), and RIR (C)

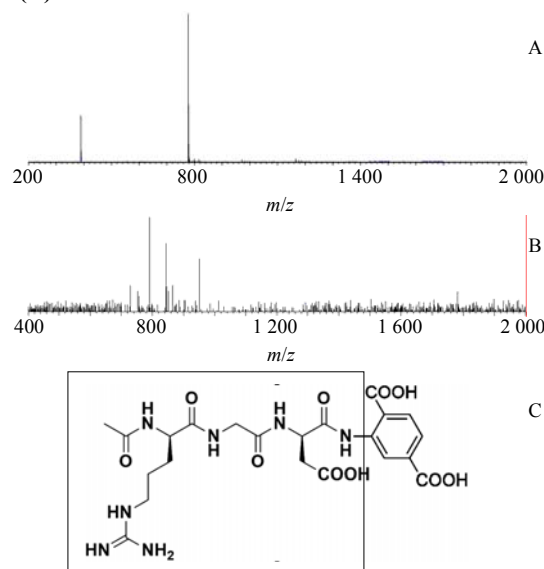


图2 RGD (A)、RIR (B) 的 MS 图和配体 L 的结构 (C)

Fig. 2 MS spectra of RGD (A), RIR (B), and structure of ligand L (C)

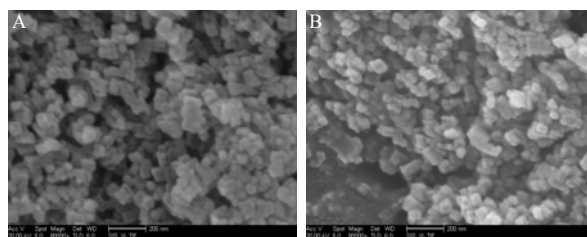


图3 IRMOF-3 (A) 和 RIR (B) 的 SEM 图

Fig. 3 SEM images of IRMOF-3 (A) and RIR (B)

均粒径为 200~300 nm, 说明成功偶联的 RIR 纳米粒仍为分布均匀的圆形或椭圆形粒子, 未对 IRMOF-3 框架本身的结构和孔隙造成影响。

3 讨论

金属有机骨架化合物(MOFs)具有空间拓扑结构、多孔性、比表面积大、易于修饰的特点, 被誉为最具应用前景的药用载体, 其多孔性可以成功装载药物, 如可以将一些有毒且经典的抗肿瘤中药装载于其孔隙中, 可以显著降低中药的毒性作用, 延长药物的作用时间, 提高生物利用度。 Zn^{2+} 为人体内必须的金属元素, 因此以 Zn^{2+} 为中心金属原子合成的 IRMOF-3 为适于人类应用的药用载体^[12-13]。IRMOF-3 表面携带的氨基基团与 RGD 表面的羧基基团发生酰卤反应后得到 RIR 的纳米粒, 在具有 MOFs 的基本特点的同时, 还可以实现肿瘤细胞的主动靶向作用, 若将传统抗肿瘤中药装载于 RIR 纳米粒中, 可以直接定位于肿瘤细胞, 减少对正常细胞的毒害作用, 将最大的药物浓度集中于肿瘤细胞。

在整体的反应过程中, IRMOF-3 与 RGD 的质量比、低温反应时间、低温反应温度是较为重要的影响因素, 通过正交试验的 R 值分析后发现, RGD 和 IRMOF-3 质量比对偶联率的影响最大, 其次为反应温度和反应时间。当 RGD 和载体的质量比为 1:1 时, 低温反应时间为 2 h, RGD 具有较高的偶联率。此种反应条件下, IRMOF-3 表面的大部分氨基与 RGD 表面的羧基发生反应, 且 RGD 自身不存在环化的可能, 因在合成 RGD 时已经将其结构中的氨基进行保护, 使其成为惰性氨基。因此, 增大 IRMOF-3 与 RGD 的质量比和低温反应时间, 偶联率未见提高; $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 为较为适宜的反应温度, 这一温度的控制采用了低温恒温反应浴这一装置, 且全程氮气保护, 减少空气对酰胺键的影响。反应完毕后旋蒸干燥的目的则为除掉残留在 RIR 纳米粒表面的有机溶剂, 用无水 DCM 清洗的目的则为洗去未反应的 IRMOF-3 或吸附在 RGD 小肽表面的 IRMOF-3, 因此, 最终得到 RGD 与 IRMOF-3 偶联

成功的 RIR 纳米粒。此外, RGD 与 IRMOF-3 偶联成功后未对 IRMOF-3 框架本身的结构造成影响。

同时, IR、MS、SEM 可以强有力地说明 RIR 纳米粒的成功偶联, 且正交试验优化出的 RGD 与 IRMOF-3 偶联的最优工艺, 值得推广使用。

参考文献

- [1] 肖 斌, 朱永红, 邹全明. RGD 肽在肿瘤治疗中的研究进展 [J]. 中国肿瘤临床, 2005, 32(19): 1135-1137.
- [2] 李 茜, 杜永忠, 袁 弘, 等. RGD 肽在肿瘤靶向纳米给药系统中的应用 [J]. 海峡药学, 2011, 23(6): 80-82.
- [3] 安莲效, 李 慧, 顾月清. RGD 肽作为药物靶向配体的研究进展 [J]. 中国生化药物杂志, 2010, 31(1): 66-69.
- [4] 杨建宏. RGD 修饰的氧化苦参碱聚合物泡囊抗肝纤维化作用的研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2013.
- [5] 赵宝红, 封 伟, 王丹宁, 等. RGD 肽修饰纯钛表面对人牙齦成纤维细胞和上皮细胞黏附影响研究 [J]. 中国实用口腔科杂志, 2012, 5(1): 31-33.
- [6] 秦丽洁, 丁 亮, 秦长圆, 等. 纳米金属有机骨架化合物(NMOFs)的合成及其生物应用 [J]. 上海师范大学学报: 自然科学版, 2012, 41(2): 211-220.
- [7] 周馨慧, 李洪辉. 金属-有机骨架(MOFs)的最新研究进展 [J]. 南京邮电大学学报: 自然科学版, 2012, 32(3): 100-110.
- [8] 赵 波, 范侯辰, 王学清, 等. iRGD 修饰的阿奇霉素主动靶向脂质体的细胞毒与抗肿瘤效果评价 [J]. 药学报, 2013, 48(3): 417-422.
- [9] 吉顺荣, 吴闻哲, 王 浩, 等. RGD 偶联吉西他滨白蛋白纳米粒对胰腺癌细胞增殖抑制作用的研究 [J]. 外科理论与实践, 2011, 16(5): 470-473.
- [10] 刘瑞江, 张业旺, 闻崇炜, 等. 正交试验设计和分析方法研究 [J]. 实验技术与管理, 2010, 27(9): 52-55.
- [11] 魏效玲, 薛冰军, 赵 强. 基于正交试验设计的多指标优化方法研究 [J]. 河北工程大学学报: 自然科学版, 2010, 27(3): 95-99.
- [12] 伍 石, 吴 云. 金属有机骨架材料研究进展 [J]. 广东化工, 2013, 40(5): 139-140.
- [13] 陆家贤. 有机胺和金属 Salen 修饰的金属有机骨架材料的合成及催化性能研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2013.