

载药蛋白质/聚苯硼酸复合纳米微球制备及其释药性能研究

殷雪旻 顾恺 邵正中*

(聚合物分子工程国家重点实验室 复旦大学高分子科学系 先进材料实验室 上海 200433)

摘要 蛋白质纳米颗粒具有良好的生物相容性和生物降解性,易于进行额外的表面修饰,用作药物输送系统提高了生物利用度,减少了药物分子的毒副作用。本工作在利用苯硼酸基团与再生桑蚕丝蛋白(RSF)上相关侧基之间具有路易斯酸-碱配对反应的基础上,通过3-丙烯酰胺苯硼酸(APBA)在RSF水溶液中原位聚合,使RSF分子链重排形成微球并在表面负载抗炎中药,制备了载药丝蛋白/聚苯硼酸纳米微球。此尺寸分布均匀的微球直径约为550~600 nm,表面光滑且在水中的分散性能良好;对乔松素、杜鹃素和地奥司明三种药物的负载率分别为7.8%,11.9%和13.4%,包封率分别为75.0%,89.1%和93.7%。载药微球控制释放约7 d,且缓释行为具有pH响应性。丝蛋白/聚苯硼酸纳米微球与主体药物协同作用提高了自由基清除速度和清除效率,优于直接给药组。与此同时,将RSF更换为牛血清白蛋白或明胶蛋白,采用此方法也能制成尺寸分别为260和100 nm的白蛋白/聚苯硼酸微球或明胶蛋白/聚苯硼酸微球。由此,三种不同尺寸、电性和药物释放速率的蛋白质/聚苯硼酸纳米微球有望适应多种静脉注射和皮下或腹腔注射药物传输的需求。

关键词 蛋白质;苯硼酸;抗炎药;纳米载体;控制释放

Preparation of the Protein/Polyphenylboronic Acid Nanospheres for Drug Loading and Unloading

Yin, Xueyang Gu, Kai Shao, Zhengzhong*

(State Key Laboratory of Molecular Engineering of Polymers, Department of Macromolecular Science, Laboratory of Advanced Materials, Fudan University, Shanghai 200433)

Abstract Protein nanoparticles (NPs), biocompatible and biodegradable, can be easily surface modified. In particular, amphiphilic proteins act as “surfactants” that help form microparticles while undergoing molecular chain rearrangement. These NPs have been successfully used as drug delivery systems, improving bioavailability and reducing the toxic effects of drug molecules. The use of regenerated silk protein (RSF) with *m*-acrylamidophenylboronic acid (APBA) composites as drug carriers for loading anti-inflammatory herbal extracts was reported. Firstly, a simple and rapid method was used to prepare silk protein/polyphenylboronic acid nanospheres, in brief, RSF solution and a certain amount of initiator were added to APBA solution, and the pH was adjusted by NaOH, and the polymerization was initiated by heating at 90 °C under nitrogen protection with stirring at 500 r/min. After 2 h of reaction, a milky solution was obtained, which formed silk protein/benzeneboronic acid nanospheres with hydrophobic interior and hydrophilic surface. The drug-loaded silk protein/polyphenylboronic acid nanospheres with an average size of 550 to 600 nm were prepared by mixing with the drug solution after dialysis and stirring at room temperature for 12 h to load the drug by adsorption. By the same method, drug-loaded albumin/polyphenylboronic acid microspheres and collagen/polyphenylboronic acid microspheres with sizes around 260 nm and 100 nm, respectively, could be prepared. The results observed by scanning and projection electron microscopy and dynamic light scattering showed that the drug-loaded silk protein/polyphenylboronic acid nanomicrospheres displayed regular spherical shape indicating smoothness and good dispersion with no obvious aggregation. The highest drug loading rate was about 13.4%, and the encapsulation rate was over 90%. Also, such drug-loaded nanospheres could achieve controlled release for about seven days and their slow release behavior was pH-responsive, with faster drug release in buffer solution at pH=5.5 than in buffer solution at pH=7.4. In addition, the synergistic interaction of the silk protein/polyphenylboronic acid nanomicrospheres with the subject drug improved its free radical scavenging rate and scavenging efficiency, which was superior to that of the direct drug delivery group. Thus, three protein/polyphenylboronic acid nanomicrospheres with different sizes, electrical properties and drug release rates may be adaptable to a wide range of intravenous and subcutaneous or intraperitoneal drug delivery needs and have great potential for clinical applications.

Keywords proteins; phenylboronic acid; anti-inflammatory drugs; nanocarriers; controlled release

* E-mail: zzshao@fudan.edu.cn; Tel.: 021-31249907

Received November 16, 2022; published December 13, 2022.

Supporting information for this article is available free of charge via the Internet at <http://sioc-journal.cn>.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21935002).

项目受国家自然科学基金(No. 21935002)资助。

1 引言

炎症相关的疾病被认为是人类健康的最大威胁之一,根据世界卫生组织(WHO)报告的数据显示,全球每五个患病者中就有三个人因这类疾病导致死亡^[1]. 抗炎药物水溶性差,化学性质不稳定,对正常细胞的毒性大,最终会产生耐药性^[2-3]. 各种治疗方法,如可离子化药物的盐化、与环糊精的络合等^[4-7]大多未能增强药物的治疗效果,存在突释或休眠性释放、组织特异性、排泄等抗炎药物传输系统性能不理想的问题. 因此,选择性地治疗药物靶向实体致病区域是实现疾病缓解和最终治愈的主要方法,如何提高治疗药物在致病区域的浓度并延长药物作用时间则是研究的重要方向^[8-13].

基于蛋白质的纳米结构尺寸更小且表面积更大,促使它们能与其他分子很好地发生相互作用. 蛋白质纳米颗粒(NPs)具有良好的生物相容性和生物降解性,并易于进行表面修饰. 特别是由具有两亲性的蛋白质作为“表面活性剂”,在进行分子链重排的同时,帮助形成微颗粒. 这些 NPs 已被成功地用作药物输送系统,提高了生物利用度,减少了药物分子的毒副作用^[14].

再生桑蚕丝蛋白(RSF)是一种天然的“两亲性嵌段共聚物”,它具有良好的生物相容性、透气透氧性以及优异的生物可降解性、结构可控性和环境稳定性. 由于其低细胞毒性和几无免疫原性^[15-17],因此近年来,RSF 常被用作载体材料,负载药物小分子或大分子以及无机纳米粒子^[18-21]. 另一方面,常被称为第五组分的牛血清白蛋白(BSA)^[22-24]和明胶蛋白(GEL)^[25-26]同样具备了生物相容性、生物降解性、非免疫原性、长半衰期、有淋巴保护作用以及环境可持续性、低成本高效益等优势,可以作为药物传输系统的主要成分. 纳米药物传输载体的尺寸大小决定了细胞摄取和体内生物分布. 通常粒径在 200~600 nm 之间,尺寸均一的纳米微球可以作为理想负载药物的载体. 对于静脉给药要求的纳米医学颗粒的尺寸较小^[27],而通过皮下或腹腔注射治疗则需要较大的颗粒来延长其在注射部位的滞留时间^[28]. 然而,目前的研究对于蛋白质纳米载体的药物负载量、突释以及在实际应用中的纳米粒子尺寸等问题关注较少.

乔松素、杜鹃素都是传统的中药中间体,乔松素具有抗菌、抗原虫、抗氧化、抗凋亡等作用,药理学研究表明,其对感染性休克、癌症、心血管病等疾病有治疗作用. 杜鹃素具有抗炎、抗氧化、抗菌活性、细胞保护以及免疫抑制的作用. 杜鹃素已被证明对乳腺炎、过敏性哮喘和 TNBS 诱导的结肠炎症具有显著的治疗效果^[29]. 地奥司明是一种传统的中药, Fattori 等^[30]发现黄酮类化合物地奥司明能够减少脂多糖引起的炎症性疼痛和腹膜炎.

在本工作中,我们改进了以再生桑蚕丝蛋白基为主的蛋白质纳米载体,用简单快捷的方法制得了适合负载含羟基抗炎中药的蛋白质基纳米微球,解决了其在实际

应用中的若干问题,并研究了载药微球的缓释行为和自由基清除效率.

2 结果与讨论

2.1 负载抗炎中药的蛋白质纳米微球的制备

根据本课题组^[18]的前期工作,首先使用乙醇诱导和冷冻结合的方法制备载药 RSF 纳米微球. RSF 分子链在含有药物的不良溶剂中迅速发生构象转变,即由无规或螺旋结构向 β -折叠转变以形成微晶,冷冻过程中的剪切力进一步促使构象转变,并使微晶聚集从而形成微球,实现药物负载. 尽管通过计算表明所形成的 RSF 微球对乔松素、杜鹃素的负载量分别为 2.5%和 4.1%,包封率分别为 32.6%和 49.4%(地奥司明不溶于乙醇而无法以此原位制备载药微球),但是观察发现,该方法制备 RSF 纳米微球(20%乙醇条件下)在载药后存在尺寸分布较宽(粒径在 50~500 nm 不等)、表面粗糙且形状不规则等问题,并且载药 RSF 微球易产生大面积聚集(图 S1,见支持信息). 另外,由于纯 RSF 微球骨架较为脆弱,在 40 kHz 超声 5 min 条件下微球崩碎,此类载药体系具有一定的局限性.

因苯硼酸(PBA)中的相关基团可以与 RSF 中的碱性基团,如氨基和胍基等,发生路易斯酸-碱配对反应^[31],本研究尝试苯硼酸衍生物在 RSF 水溶液中原位聚合的方式,以聚苯硼酸诱导 RSF 微球的形成并改善其分散性、稳定性和特异性等. 根据 RSF 的一级结构^[17],RSF 的分子链被认为是由亲水段和疏水段交替构成的“两亲性多嵌段共聚物”^[32],因此,在 RSF 水溶液中聚合 3-丙烯酰胺基苯硼酸(APBA),得到的疏水聚苯硼酸衍生物(PAPBA)有可能与 RSF 的疏水段发生相互作用,以形成微球的疏水内核,而 RSF 的亲水链段朝向纳米粒子外部,包裹住内部疏水链段,形成内部疏水表面亲水且分散稳定的 RSF-PAPBA 微球. 在同样实验条件下若不利用苯硼酸衍生物参与反应,纯丝蛋白微球无法形成(图 S2,见支持信息).

RSF 与 APBA 的混合溶液在高温下引发聚合反应,2 h 后,溶液呈乳白色(图 S3,见支持信息),且放置 48 h 并无沉淀现象. 图 1 表明,此乳白色液体实际为微球的悬浊液,其间微球的平均粒径大约 500 nm,分布较为均匀且表面光滑;即便负载上乔松素(Pin)、杜鹃素(Far)和地奥司明(Dio)后,微球的尺寸基本没有变化,也无明显的聚集. 根据傅立叶变换红外光谱(FTIR)测试结果(图 S4,见支持信息),微球中同时有 RSF 和 PAPBA 存在,表明我们成功地合成了 RSF-PAPBA 纳米微球.

为避免由 RSF 在等电点(pH=3.8~4.0)附近的无序聚集所导致的非规整或粘连的 RSF-PAPBA 纳米微球出现,我们在反应过程及后处理过程中均将环境的 pH 值固定在 5.0~5.5 左右. 实际上,我们发现当环境 pH 值降低而稍偏离于此,微球的确不易形成或出现一定程度

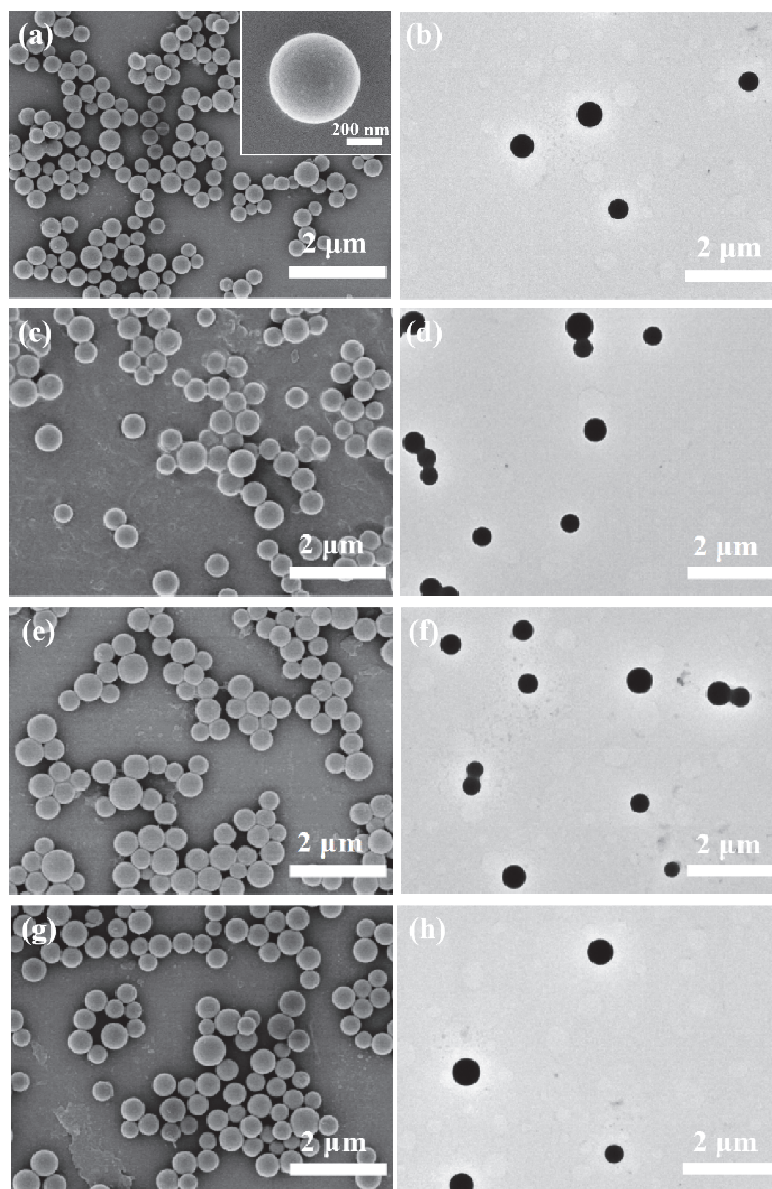


图1 RSF/聚苯硼酸纳米微球的扫描电镜(a)和透射电镜(b)图像以及分别负载乔松素(c, d)、杜鹃素(e, f)和地奥司明(g, h)的RSF/聚苯硼酸纳米微球的扫描电镜和透射电镜图像

Figure 1 SEM and TEM images of RSF-PAPBA (a, b), Pin@RSF-PAPBA (c, d), Far@RSF-PAPBA (e, f), and Dio@RSF-PAPBA (g, h) nanospheres

的聚集。猜想是RSF的 β -折叠晶区作为纳米级物理凝胶点,与疏水的PAPBA共同成为微球的核心区域,而此时RSF非晶区的松散结构将嵌入RSF纳米微球中,并且非晶区的亲水性氨基酸残基片段易向水中伸展,有利于各类药物的负载和逐级释放。

乔松素、杜鹃素和地奥司明的紫外吸收波长分别为289, 297和345 nm。通过相应的测试和计算,得到所制备的RSF-PAPBA纳米微球对乔松素、杜鹃素和地奥司明三种药物的负载量分别为7.8%, 11.9%和13.4%,包封率分别为75.0%, 89.1%和93.7%,远高于前述乙醇冷冻法所得纯RSF纳米微球的载药能力,有潜力成为优异的纳米药物传输体系。这是因为苯硼酸基团可以作为电子受体,与电子供体原子(如氮和氧等)进行路易斯酸碱配

对,例如PBA基团和药物中的胺基之间的氮硼(N-B)配位^[33],有助于开发具有高药物负载的药物输送系统^[34]。乔松素、杜鹃素和地奥司明三种药物的结构具有相似性,即有多个羟基,因此药物分子易失去电子与PAPBA链上的缺电子硼原子发生配位作用,被负载到纳米微球上,其中地奥司明负载量最高,这一结果也与它的分子结构(图S5,见支持信息)一致。

根据报道,粒径在200~600 nm之间,尺寸均一的纳米微球可以作为理想负载药物的载体。当纳米粒子需要通过皮下或者腹腔注射进入人体致病部位时,在此处较大尺寸的微球载体相比于较小尺寸具有更好的靶向能力。从动态光散射测得的多种纳米微球的流体力学直径和多分散指数PDI来看(表1),RSF-PAPBA纳米微球

尺寸约为 540 nm, 载药后微球的平均粒径在 550~600 nm 范围, 变化不大. 此外, 所有样品的多分散系数均小于 0.1, 表明载药后微球尺寸的均一性也无变化. 另外, 当 RSF-PAPBA 微球上负载疏水性药物后, 负值的 Zeta 电位变得更低(图 S6, 见支持信息), 有利于其在水中的分散. 将 RSF-PAPBA 载药纳米微球在磷酸盐缓冲液(PBS)中静置 20 d 后, 微球尺寸变化较小, 仍然能保持较好的分散性以及结构稳定性(图 S7, 表 S1, 见支持信息). 另一方面, 由冷冻法制得的纯 RSF 微球尺寸约为 535 nm, 尽管与 RSF-PAPBA 尺寸非常相近, 但 PDI 较大, 表明其尺寸分布较不均匀; 负载上药物的纯 RSF 微球的流体力学直径明显减小, 猜测是由于药物存在影响了冷冻过程中 RSF 纳米微球的形成过程.

表 1 载药前后 RSF 纳米微球的流体力学直径、多分散性指数和 Zeta 电位

Table 1 Hydrodynamic diameter (nm), polydispersity index (PDI) and Zeta potential (mV) of RSF nanospheres before or after drug loading

Sample	Hydrodynamic diameter/nm	PDI	Zeta potential/mV
RSF-PAPBA	540	0.04	-23.0
Pin@RSF-PAPBA	590	0.06	-31.0
Far@RSF-PAPBA	560	0.09	-32.5
Dio@RSF-PAPBA	570	0.07	-30.2
RSF	540	0.12	-23.3
Far@RSF	290	0.18	-34.4

纳米药物传输载体的大小决定了细胞摄取和体内生物分布, 更小尺寸的颗粒表现出清除率下降和血液循环时间延长^[35-41]. 牛血清白蛋白(BSA)同样具有如氨基和胍基等的碱性基团, 而猪皮明胶(GEL)分子链上除了有大量的羟基外, 还有许多羧基和氨基, 因此, 我们设想其同样能够形成相应的 PAPBA 复合微球.

APBA 在 BSA 和 GEL 水溶液中聚合反应后, 体系呈现为浅蓝微浑浊溶液(图 S3, 见支持信息), 长时间静置无沉淀现象. 根据图 2 和表 2 可知, BSA-PAPBA 微球呈现规则球形, 但尺寸明显较 RSF-PAPBA 小, SEM 和动态光散射观测的结果分别为 150 和 260 nm 左右; 其 Zeta 电位约为 -24.2 mV. 负载杜鹃素后 BSA-PAPBA 微球的 Zeta 电位降低, 尺寸略有变大. 相比之下, GEL-PAPBA 微球更小, SEM 和动态光散射观测的结果分别为 90 和 170 nm 左右, Zeta 电位约为 21.5 mV, 表面带强正电荷. 这样内部疏水外部亲水的结构使蛋白质/聚苯硼酸纳米微球在水溶液中分散性好, 具备了很强的稳定性, 即使在超声条件下也能保持原有球形形貌. BSA-PAPBA 微球和 GEL-PAPBA 微球对杜鹃素的负载量分别为 10.3% 和 6.8%, 包封率分别为 85.0% 和 71.7%. 这表明此蛋白质/聚苯硼酸复合微球的制备方法同样适用于牛血清白蛋白和猪皮明胶蛋白等蛋白质材料, 且复合微球的大小也能够一定程度上得到调控.

表 2 载药前后 BSA-PAPBA 和 GEL-PAPBA 纳米微球的流体力学直径、多分散性指数和 Zeta 电位

Table 2 Hydrodynamic diameter (nm), polydispersity index (PDI) and Zeta potential (mV) of BSA-PAPBA or GEL-PAPBA nanospheres before and after drug loading

Sample	Hydrodynamic diameter/nm	PDI	Zeta potential/mV
BSA-PAPBA	260	0.05	-24.2
Far@BSA-PAPBA	290	0.09	-46.2
GEL-PAPBA	170	0.04	+21.5
Far@GEL-PAPBA	180	0.06	+14.3

2.2 载药纳米粒子的体外药物缓释

由于苯硼酸衍生物中的硼酸基团具有靶向优越性, 可以与过度表达的唾液酸发生可逆性的快速反应, 因而

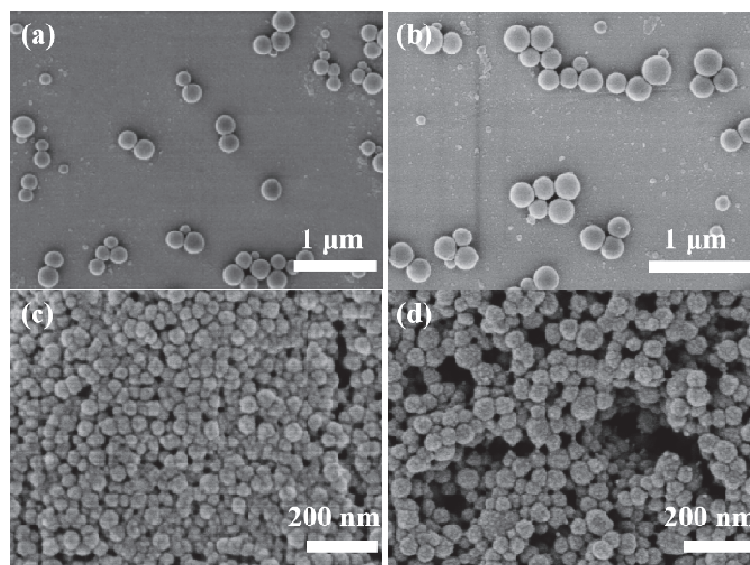


图 2 (a) BSA-PAPBA、(b) Far@BSA-PAPBA、(c) GEL-PAPBA 和 (d) Far@GEL-PAPBA 纳米微球的扫描电镜图像

Figure 2 SEM images of BSA-PAPBA (a), Far@BSA-PAPBA (b), GEL-PAPBA (c) and Far@GEL-PAPBA (d) nanospheres

能增强纳米粒子对细胞的识别能力,防止因为炎症的反复刺激导致的肿瘤,并延长纳米粒子的作用时间.另外,由于炎症部位剧烈的新陈代谢激活,巨噬细胞^[42]释放的活性氧(ROS)累积,如过氧化氢和羟自由基等会损害细胞和组织^[43],同时炎症区域 pH 值与正常组织相比降低,因此具有 ROS 和 pH 值双重响应能力的苯硼酸衍生物的修饰材料是抗炎药物输送的有效载体^[44-46].

人体正常生理环境组织外基质及血液中 pH 约为 7.4,由于炎症部位会代谢产生过量乳酸,将影响到体内环境中的酸碱平衡,因此选择在弱酸性条件下对三种不同载药蛋白质/聚苯硼酸纳米微球以及载药纯 RSF 纳米微球的药物释放性能进行测定.

在 pH=5.5 的条件下,即便经过 160 h,纯 RSF 纳米微球中的药物几乎没有释放,而三种不同的蛋白质/聚苯硼酸纳米载药系统都呈现出持续控制药物释放的效果(图 3a).其中,RSF-PAPBA 在 70 h 左右时就达到了约 80%药物的释放量;BSA-PAPBA 体系的药物释放稍慢,需 160 h 才达 80%左右的药物释放量;而 GEL-PAPBA 微球的药物释放更为缓慢,160 h 后才有 30%左右的释放量.鉴于其释药速度与复合微球的尺寸有明显的相关性,因而被认为是由于药物与不同种蛋白质/聚苯硼酸微球的疏水相互作用力的不同所致.

选择在不同的 pH 值即分别为 7.4、6.5、5.5 和 4.5 的 PBS 缓冲溶液中,研究载有杜鹃素的 RSF-PAPBA 纳米微球的药物释放情况.根据载药纳米微球的体外释放曲线(图 3b),在 37 °C 下经过 7 d,各 pH 下的载药纳米微球基本都达到了释药平衡,其中 pH 为 7.4 环境中最终有 34%的杜鹃素从微球中释放出来;在 pH=6.5 时,100 h 后已有 55%的药释放;在 pH=5.5 时,56 h 后药释放量达到 68%;而 pH=4.5 时,仅经过 30 h 就有 88%的杜鹃素释放出来.这是由于当环境 pH 值降低,体系呈现更强的酸性,药物分子上原本给电子的羟基受到 H⁺离子的影响,越来越多地发生离子化,并与 PAPBA 上硼原子脱离而从微球上释放出来.另外,在 pH=7.4 和 pH=5.5 的条件下,RSF-PAPBA 纳米微球对于乔松素、杜鹃素和地奥司明三种药物都能进行 pH 差异性的缓释(图 3c, 3d),说明了其至少对于多羟基的物质具有一定的普适性.

由此,具有缓释性能并在不同 pH 下表现不同释放速率的 RSF-PAPBA 纳米微球对于人体内药物传输和治疗都有积极作用,在到达炎症部位前减少在人体健康组织环境中的药物流失,并且 pH 响应可控地对目标位置进行富集,因而提高药物传输系统对炎症部位的靶向.

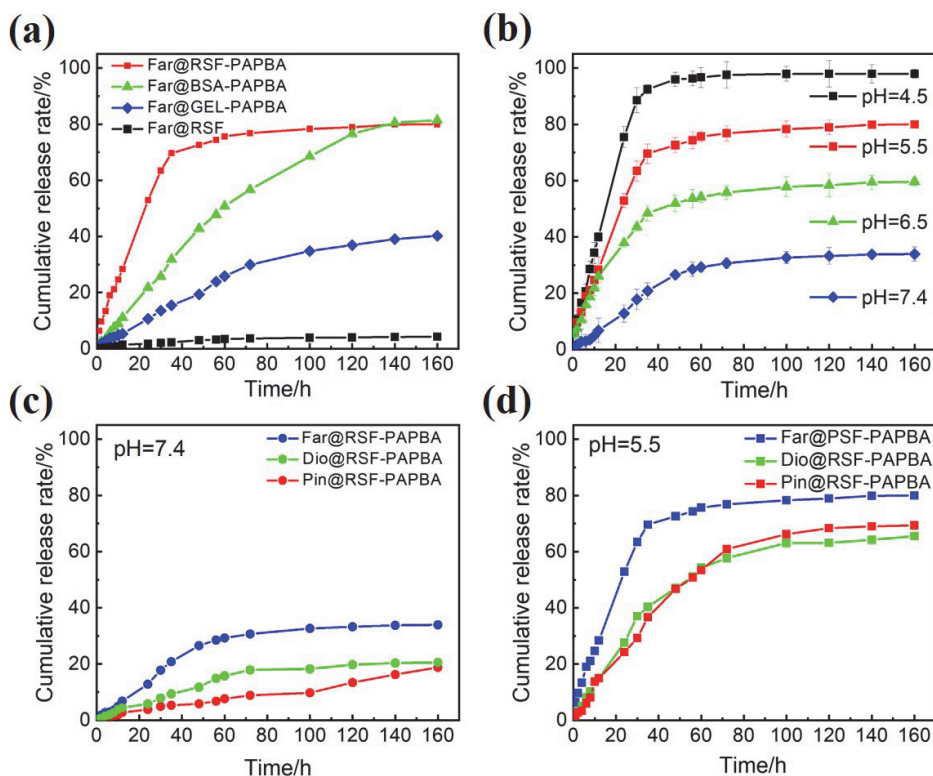


图 3 负载药物的蛋白质/聚苯硼酸纳米微球在磷酸缓冲溶液中的释放曲线. (a) 负载杜鹃素的不同微球在 pH=5.5 时的释放曲线; (b) 负载杜鹃素的 RSF-PAPBA 微球在不同 pH 下的释放曲线; (c, d) pH=7.4 和 pH=5.5 时,载药 RSF-PAPBA 对乔松素、杜鹃素和地奥司明三种不同药物的释放曲线

Figure 3 Release profiles of drug loaded protein/polyphenylboronic acid nanospheres in phosphate buffer solution. (a) Release profiles of different microspheres loaded with farrerol at pH=5.5; (b) release profiles of RSF-PAPBA microspheres loaded with azathioprine at different pH; (c, d) release profiles of drug loaded RSF-PAPBA for three different drugs, namely, pinocembrin, farrerol and diosmin, at pH=7.4 and pH=5.5

2.3 载药体系的 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除能力

研究发现,所制备的纯 RSF、RSF-PAPBA、BSA-PAPBA 和 GEL-PAPBA 纳米微球溶液本身就具有一定的抗氧化能力,其中 RSF-PAPBA 抗氧化能力最强(图 S8,见支持信息).

图 4 表明,乔松素、杜鹃素和地奥司明三种药物及其相应的 RSF-PAPBA 载药体系都呈现出显著的 DPPH 自由基清除效果.其中载药体系的样品管比纯药物显现更浅的颜色,这说明载药体系提高了药物的自由基清除能力.30 min 内,乔松素的 DPPH 自由基清除率为 25.9%,而负载乔松素的 RSF-PAPBA 纳米微球的 DPPH 自由基清除率能达到 58.2%;地奥司明、负载地奥司明的 RSF-PAPBA 纳米微球、杜鹃素以及负载杜鹃素的 RSF-PAPBA 纳米微球的自由基清除率分别为

41.6%、78.9%、55.3%和 93.0%.其中杜鹃素本身的抗氧化能力最好(图 S9,见支持信息),负载杜鹃素的 RSF-PAPBA 纳米微球也相应地达到了最高的抗氧化能力.此实验表明,相比于游离的药物,载药的 RSF-PAPBA 纳米微球能较大程度上提高药物的自由基清除速度和清除效率.与此同时,通过体外测试,载药微球处理浓度范围为 0.05 mg/mL 至 0.25 mg/mL 时该给药体系基本没有细胞毒性(图 S10,见支持信息),因此具有良好的应用潜力.

3 结论

利用 3-丙烯酰胺基苯硼酸(APBA)单体中的苯硼酸基团与具有良好生物相容性的再生丝素蛋白(RSF)中的碱性基团发生路易斯酸-碱配对反应,通过 APBA 在 RSF 水溶液中的原位聚合,使其诱导 RSF 分子链重排并

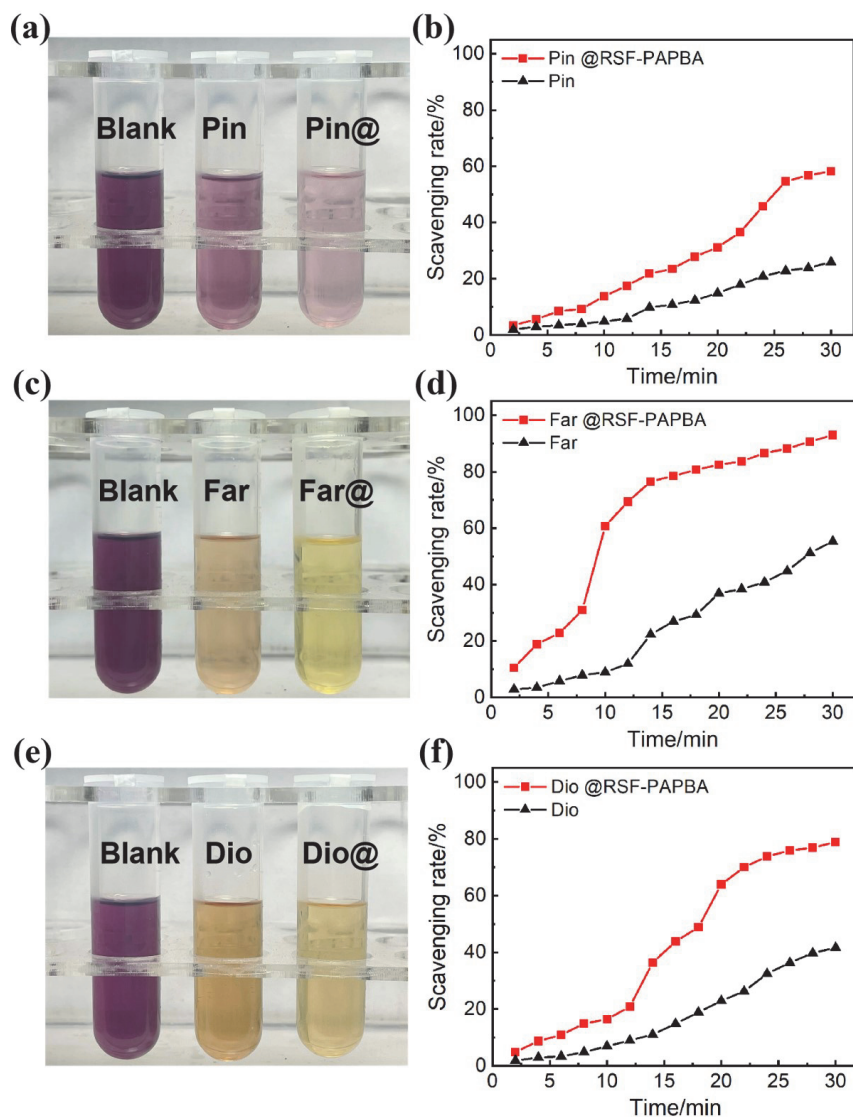


图 4 药物及其对应的 RSF-PAPBA 载药纳米微球在 30 min 内的 DPPH 自由基清除效果的对比照片(a, c, e)和定量曲线(b, d, f)

Figure 4 The photographs (a, c, e) and quantitative curves (b, d, f) of the scavenging effects regarding DPPH radical of the corresponded drug and its RSF-PAPBA loaded nanospheres within 30 min

成核,进而制备形成 540 nm 左右内部疏水表面亲水的 RSF-PAPBA 纳米微球.相比于纯的 RSF 纳米微球,该复合 RSF-PAPBA 微球不仅具有负载乔松素、杜鹃素和地奥司明这类抗炎药的高载药率和包封率,还能在不同 pH 下表现出不同的释药速率,有望通过 pH 响应以实现目标位置进行靶向释药.载药的纳米微球对乔松素、杜鹃素和地奥司明都显示出良好的药物释放特性,能实现 7 d 左右的控制释放.另外,RSF-PAPBA 纳米微球与主体药物协同作用提高了自由基清除速度和清除效率.此类 RSF-PAPBA 给药体系可以作为良好的载体材料,对人体皮下或腹腔注射抗炎药物传输和靶向治疗都具有相应的潜力.

与此同时,用牛血清白蛋白(BSA)或猪皮明胶蛋白(GEL)替代基础蛋白质材料 RSF,采用此制备方法同样能够获得 BSA-PAPBA 微球或 GEL-PAPBA 微球,并载上相应的药物.更重要的是,RSF-PAPBA 微球、BSA-PAPBA 微球和 GEL-PAPBA 微球的尺寸在 540 nm 和 170 nm 之间梯次变化,且其载药微球的表面电性和药物释放特性也有所差异,有望适应多种人体静脉注射和皮下或腹腔注射的药物传输需求.

4 实验部分

4.1 负载抗炎中药的蛋白质纳米微球的制备

将 3-丙烯酰胺基苯硼酸(APBA)溶解在去离子水中,在 60 °C 的油浴中加热 30 min 至溶解为黄色澄清透明溶液备用.取 50 mL 2 mg/mL APBA 溶液加入 2.5 mL RSF 溶液(固含量约为 4%,RSF 溶液的制备如本课题组^[47]先前工作所述),缓慢搅拌混合均匀,加入 125 μ L 0.3 mol/mL NaOH 溶液和 30 mg 引发剂 4,4-偶氮(4-氰基戊酸),在氮气保护下加热 90 °C,500 r/min 搅拌引发聚合,2 h 后得到乳白色溶液.冷却后将 RSF-PAPBA 溶液放入截留分子量为 100000 的透析袋,用 pH=5.0~5.5 的去离子水透析 24 h 以除去其中未参与反应的小分子,其间共换 3 次水,保证体系弱酸性环境,再将透析后的溶液冷冻干燥后得到 RSF-PAPBA 纳米微球.向 4 mL RSF-PAPBA 纳米粒子水溶液(4 mg/mL)中,逐滴加入 100 μ L 2 mg/mL 的乔松素(Pin)、杜鹃素(Far)或地奥司明(Dio),其中乔松素和杜鹃素为乙醇溶液,地奥司明为二甲基亚砜(DMSO)溶液.常温下搅拌 12 h 后用 11000 r/min 离心 15 min,取下层沉淀用去离子水和乙醇分别洗涤离心三次并冻干得到载药的 RSF-PAPBA 纳米微球.BSA-PAPBA 和 GEL-PAPBA 纳米微球的制备及其载药过程与 RSF-PAPBA 的相同.

4.2 测试与表征

4.2.1 扫描电子显微镜(SEM)观察

将制备好的纳米微球样品在去离子水中分散,稀释一定倍数后滴到玻璃片上,放在常温下干燥.样品经过

喷金 60 s 后采用 S-4800 FE-SEM 场发射扫描电子显微镜进行观察,测试电压为 20 kV.

4.2.2 透射电子显微镜(TEM)观察

将通过上述方法制备好的纳米微球样品在去离子水中分散,稀释一定倍数,再滴加在铜网上,并将铜网放在滤纸上,常温下干燥,样品在 200 kV 下用 TEM (FEI Tecnai G2 TWIN)成像,观察纳米微球的形貌.

4.2.3 傅立叶变换红外光谱(FTIR)测试

将纳米微球乳液通过液氮淬冷并冷冻干燥后,与对照样纯 3-丙烯酰胺基苯硼酸分别进行红外光谱测试.采用傅立叶变换红外光谱仪(Nicolet 6700 FTIR Spectrometer)对样品进行测试(KBr 压片法).波谱范围为 400~4000 cm^{-1} ,分辨率为 4 cm^{-1} ,每条谱线由 64 次扫描叠加采集.

4.2.4 动态光散射(DLS)和 Zeta 电位

将通过上述方法制备好的纳米微球样品在去离子水中分散,稀释后采用 Malvern 公司的 Zetasizer Nano 型纳米粒度-Zeta 电位分析仪测定微球的粒径 Hydrodynamic diameter (nm)、多分散系数 PDI 和 Zeta 电位 Zeta Potential (mV).

4.2.5 载药蛋白质纳米微球的载药量、包封率和体外缓释实验

取首次离心分离后的上层清液并收集所有清洗的上层清液,用紫外分光光度计测量其中未被负载的药物吸光度,来计算其浓度,乔松素、杜鹃素和地奥司明的紫外吸收波长分别为 480 nm.测定乔松素、杜鹃素和地奥司明的紫外标准曲线.载药纳米粒子的载药量(DLC)和包封率(DLE)分别由式(1)和(2)计算得到:

$$\text{DLC}(\%) = [(\text{负载上药物质量})/(\text{样品总质量})] \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{DLE}(\%) = [(\text{负载上药物质量})/(\text{投入药物质量})] \times 100\% \quad (2)$$

配制 0.01 mol/L pH 值分别为 7.4、6.5、5.5 和 4.5 的磷酸盐缓冲液(PBS)作为释放介质.载药纳米微球的体外释放测定需要将一定量冻干且负载了乔松素、杜鹃素和地奥司明的 RSF-PAPBA 纳米粒子,及负载杜鹃素的 BSA-PAPBA、GEL-PAPBA 和纯 RSF 纳米粒子分散在 1 mL PBS 溶液中,并放入截留分子量为 14000 的透析袋中.将系口的透析袋浸入 4 mL 含有 2.5×10^{-4} mol/L H_2O_2 的上述各 PBS 缓冲溶液中,在 37 °C 的摇床中以 100 r/min 振荡,每隔一段时间取出 1 mL 的 PBS,并加入新鲜的等量 PBS.通过使用紫外可见分光光度计(Hitachi U-2910, Japan)测得释放介质中的药物浓度来计算药物释放量.相同条件取 3 组平行实验值平均.

4.2.6 载药体系的 DPPH 自由基清除能力

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)溶解在无水乙醇中.在保证药物添加量相等的前提下,将乔松素、杜鹃素和地奥司明溶液稀释一定浓度,并将载药后的 RSF-PAPBA、BSA-PAPBA、GEL-PAPBA 和纯 RSF 纳

米微球分散在乙醇中. 取各 3 mL 样品溶液与 1 mL 0.4 mol/L 的 DPPH 溶液混合, 在避免光照的条件下, 搅拌 30 min, 每隔 5 min 在波长 517 nm 处测定吸光度 A , 与标样即 0.1 mol/L 的 DPPH 溶液在 517 nm 的吸光度 A_0 对比, 通过式(3)计算 DPPH 自由基清除效率(η).

$$\eta = [(A_0 - A)/A_0] \times 100\% \quad (3)$$

References

- [1] Pahwa, R.; Goyal, A.; Jialal, I. *Chronic Inflammation*, Vol. 1, Ed.: Bansal, P., StatPearls, Petersburg, **2020**, p. 7.
- [2] Luo, W. X.; Wen, G.; Yang, L.; Tang, J.; Wang, J. G.; Wang, J. H.; Zhang, S. Y.; Zhang, L.; Ma, F.; Xiao, L. L.; Wang, Y.; Li, Y. *Theranostics* **2017**, *7*, 452.
- [3] Kamimura, M.; Furukawa, T.; Akiyama, S.; Nagasaki, Y. *Biomater. Sci.* **2013**, *1*, 361.
- [4] Davis, M. E.; Brewster, M. E. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 1023.
- [5] Lee, C. C.; MacKay, J. A.; Frechet, J. M. J.; Szoka, F. C. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1517.
- [6] Serajuddin, A. T. M. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2007**, *59*, 603.
- [7] Akers, M. J. *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91*, 2283.
- [8] Gregoriadis, G.; Wills, E. J.; Swain, C. P.; Tavill, A. S. *Lancet* **1974**, *303*, 1313.
- [9] Juliano, R. L. *Prog. Clin. Biol. Res.* **1976**, *9*, 21.
- [10] Kobayashi, H.; Turkbey, B.; Watanabe, R.; Choyke, P. L. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 2093.
- [11] Mitchell, M. J.; Jain, R. K.; Langer, R. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 659.
- [12] Zheng, P.; Yang, L.; Chen, J. J.; Xu, W. G.; Li, G.; Ding, J. X. *Chinese Chem. Lett.* **2020**, *31*, 1178.
- [13] Kosheli, T. M.; George, F. B.; Li, X. T.; Chen, Z. J.; He, W. *Chinese Chem. Lett.* **2022**, *33*, 587.
- [14] Saha, A.; Pradhan, N.; Chatterjee, S.; Singh, R. K.; Trivedi, V.; Bhattacharyya, A.; Manna, D. *ACS Appl. Nano Mater.* **2019**, *2*, 3671.
- [15] Xie, M.; Fan, D.; Chen, Y.; Zhao, Z.; He, X.; Li, G.; Lan, P. *Biomaterials* **2016**, *103*, 33.
- [16] Wang, S.; Xu, T.; Yang, Y.; Shao, Z. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 21254.
- [17] Shao, Z. Z.; Vollrath, F. *Nature* **2002**, *418*, 741.
- [18] Wu, M.; Yang, W.; Chen, S.; Yao, J.; Shao, Z.; Chen, X. *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6*, 1179.
- [19] Sun, N.; Lei, R.; Xu, J. H.; Kundu, S. C.; Cai, Y. R.; Yao, J. M.; Ni, Q. Q. *J. Mater. Sci.* **2019**, *54*, 3319.
- [20] Yang, W. H.; Yu, S. Y.; Chen, S.; Liu, Y. Z.; Shao, Z. Z.; Chen, X. *Acta Chim. Sinica* **2014**, *72*, 1164 (in Chinese). (杨文华, 俞淑英, 陈胜, 刘也卓, 邵正中, 陈新, 化学学报, **2014**, *72*, 1164.)
- [21] Wang, S. H.; Sun, L. N.; Cao, H.; Zhong, Y. M.; Shao, Z. Z. *Acta Chim. Sinica* **2021**, *79*, 1023 (in Chinese). (王苏杭, 孙灵娜, 曹涵, 钟一鸣, 邵正中, 化学学报, **2021**, *79*, 1023.)
- [22] Huang, H.; Yang, D. P.; Liu, M. H.; Wang, X. S.; Zhang, Z. Y.; Zhou, G. D.; Liu, W.; Cao, Y. L.; Zhang, W. J.; Wang, X. S. *Int. J. Nano-med.* **2017**, *12*, 2829.
- [23] Lu, H. X.; Noorani, L.; Jiang, Y. Y.; Du, A. W.; Stenzel, M. H. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*, 9591.
- [24] Yu, Z.; Yu, M.; Zhang, Z. B. *Nanoscale Res. Lett.* **2014**, *9*, 343.
- [25] Azimi, B.; Nourpanah, P.; Rabiee, M.; Arbab, S. *Iran Biomed. J.* **2014**, *18*, 34.
- [26] Sahoo, N.; Sahoo, R. K.; Biswas, N.; Guha, A.; Kuotsu, K. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *81*, 317.
- [27] Kulkarni, S. A.; Feng, S. S. *Pharm. Res.* **2013**, *30*, 2512.
- [28] Lee, B. R.; Ko, H. K.; Ryu, J. H.; Ahn, K. Y.; Lee, Y. H.; Oh, S. J.; Na, J. H.; Kim, T. W.; Byun, Y.; Kwon, I. C.; Kim, K.; Lee, J. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 35182.
- [29] Ci, X.; Chu, X.; Wei, M.; Yang, X.; Cai, Q.; Deng, X. *PLoS One* **2012**, *7*, e34634.
- [30] Fattori, V.; Rasquel-Oliveira, F. S.; Artero, N. A.; Ferraz, C. R.; Borghi, S. M.; Casagrande, R.; Verri, W. A. *J. Nat. Prod.* **2020**, *83*, 1018.
- [31] Stephan, D. W. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 306.
- [32] Chen, H.; Shao, Z. Z. *Acta Polym. Sinica* **2018**, *62*, 987 (in Chinese). (陈红, 邵正中, 高分子学报, **2018**, *62*, 987.)
- [33] Chen, W.; Zhen, X.; Wu, W. *Sci. China Chem.* **2020**, *63*, 648.
- [34] Wang, L. J.; Sheng, X. L.; Wang, J.; Zhang, Y. H. *Chinese J. Org. Chem.* **2021**, *41*, 567 (in Chinese). (王李娟, 盛显良, 王杰, 张玉辉, 有机化学, **2021**, *41*, 567.)
- [35] Cabral, H.; Matsumoto, Y.; Mizuno, K.; Chen, Q.; Murakami, M.; Kimura, M.; Kataoka, K. *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 815.
- [36] Jiang, W.; Kim, B. Y.; Rutka, J. T.; Chan, W. C. *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 145.
- [37] Reddy, S. T.; Van Der Vlies, A. J.; Simeoni, E.; Angeli, V.; Randalph, G. J.; O'Neil, C. P.; Hubbell, J. A. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1159.
- [38] Wang, H.; Wang, S.; Su, H.; Chen, K. J.; Armijo, A. L.; Lin, W. Y.; Tseng, H. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4344.
- [39] Goodman, T. T.; Olive, P. L.; Pun, S. H. *Int. J. Nanomed.* **2007**, *2*, 265.
- [40] Tang, L.; Yang, X.; Dobrucki, L. W.; Chaudhury, I.; Yin, Q.; Yao, C.; Cheng, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 12721.
- [41] Tang, L.; Yang, X.; Yin, Q.; Cai, K.; Wang, H.; Chaudhury, I.; Yao, C.; Zhou, Q.; Kwon, M.; Hartman, J. A.; Dobrucki, I. T.; Dobrucki, L. W.; Borst, L. B.; Lezmi, S.; Helferich, W. G.; Ferguson, A. L.; Fan, T. M.; Cheng, J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111*, 15344.
- [42] Tan, H. Y.; Wang, N.; Li, S.; Hong, M.; Wang, X.; Feng, Y. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, *279*, 5090.
- [43] Chen, L.; Deng, H.; Cui, H.; Fang, J.; Zuo, Z.; Deng, J.; Li, Y.; Wang, X.; Zhao, L. *Oncotarget* **2018**, *9*, 7204.
- [44] Matsumoto, A.; Sato, N.; Kataoka, K.; Miyahara, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 12022.
- [45] Wang, J.; Wu, W.; Zhang, Y.; Wang, X.; Qian, H.; Liu, B.; Jiang, X. *Biomaterials* **2014**, *35*, 866.
- [46] Wang, H.; Wang, K.; Sun, J.; Fang, G. Q.; Yao, Q. Q.; Wu, Z. Y. *Chinese J. Org. Chem.* **2018**, *38*, 1035 (in Chinese). (王浩, 王凯, 孙捷, 方桂迁, 姚庆强, 吴忠玉, 有机化学, **2018**, *38*, 1035.)
- [47] Cao, Z. B.; Chen, X.; Yao, J. R.; Huang, L.; Shao, Z. Z. *Soft Matter* **2007**, *3*, 910.

(Cheng, B.)