

线粒体靶向聚合物 TPP-PEI-LND 的构建及其特性

张兵锋^{1,2}, 姜虎林^{1*}

(¹中国药科大学药学院,南京 210009; ²贵阳中医学院,贵阳 550002)

摘要 以低相对分子质量聚乙烯亚胺(PEI)为骨架,将线粒体靶向基团三苯基膦(TPP)和化疗药物氯尼达明(LND)以酰胺键接枝到PEI上,构建线粒体靶向聚合物TPP-PEI-LND。TPP-PEI-LND经¹H NMR确证。采用透析法考察TPP-PEI-LND的体外释放。采用HeLa细胞研究TPP-PEI-LND的线粒体靶向能力和细胞毒性。结果显示,TPP-PEI-LND线粒体靶向聚合物制备成功,其释药行为呈现缓释特点,并可以靶向递送药物到达线粒体,显著增强药物对肿瘤细胞的疗效。

关键词 线粒体靶向;聚合物;氯尼达明;三苯基膦;聚乙烯亚胺

中图分类号 R944 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2015)06-0659-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150604

Construction and characterization of mitochondria-targeted TPP-PEI-LND

ZHANG Bingfeng^{1,2}, JIANG Hulin^{1*}

¹School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009;

²Guangxi College of Traditional Chinese Medicine, Nanning 550002, China

Abstract The mitochondria-targeted TPP-PEI-LND was synthesized by mitochondria-targeted ligand triphenylphosphine (TPP) and therapeutic drug lonidamine (LND) conjugated to low molecular weight branched polyethyleneimine (PEI). TPP-PEI-LND was verified using ¹H NMR; *in vitro* release was determined by the dialysis. Besides, the cytotoxicity and mitochondria-targeted potential of TPP-PEI-LND were investigated in HeLa cells. The results showed that TPP-PEI-LND was successfully synthesized and it exhibited the feature of extended-release. Hence, TPP-PEI-LND could deliver LND to mitochondria, resulting in significantly enhanced efficacy of LND.

Key words mitochondria-targeted; polymer; lonidamine; triphenylphosphine; polyethyleneimine

This study was supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20140659)

目前,以线粒体为作用靶点的化疗药物的研发是肿瘤治疗的热点^[1]。氯尼达明(LND)作为线粒体介导的抗肿瘤药物,在临幊上用于多种肿瘤如头颈部癌、肺癌、慢性淋巴细胞白血病和乳腺癌等的治疗,且没有传统化疗药物的骨髓抑制、脱发等不良反应^[2-3]。然而氯尼达明水溶性较差,缺乏选择性分布,到达肿瘤细胞线粒体的量过少,从而导致临幊上疗效不理想,而加大剂量又会引起严重的不良反应^[4]。因此,提高氯尼达明的水溶性及线粒体靶向性问题是提高其疗效的关键点。聚合物前

药通常由水溶性的聚合物载体、疏水性药物和靶向分子等组成,是由药物与聚合物通过化学键相连而形成^[5]。聚合物前药因能提高疏水性药物的溶解性以及能链接靶向基团,将可有效地解决此类问题^[6]。

本研究以水溶性的支链型聚乙烯亚胺(PEI)为聚合物载体,通过酰胺键键合作用于线粒体的抗肿瘤药物氯尼达明,改善氯尼达明的疏水性。为进一步增强聚合物前药的线粒体靶向能力,再通过酰胺键引入线粒体靶向分子三苯基膦(TPP)。通过

氢谱验证聚合物 TPP-PEI-LND 的结构，并对其体外释药能力、线粒体靶向性、增强抗肿瘤细胞药效等进行了研究。

1 材 料

1.1 試 剂

氯尼达明(武汉顶辉化工有限公司);聚乙烯亚胺(PEI, M_r 1.8 k, 阿法埃莎化学有限公司);二甲基亚砜(DMSO, 天津希恩思生化科技有限公司);三苯基膦、6-溴己酸、*N,N'*-二环己基碳二亚胺(DCC)、*N*-羟基琥珀酰亚胺(阿拉丁试剂有限公司);异硫氰酸荧光素(FITC, 天津希恩思生化科技有限公司);细胞增殖与毒性检测试剂盒(MTS)(美国 Promega 公司);胎牛血清、RPMI 1640 培养基、胰酶(Gibco[®], 美国 LifeTech 公司);其他试剂均为分析纯。

1.2 仪 器

DYYB-10 冷冻干燥机(上海德洋意邦仪器有限公司);RE-52AA 旋转蒸发器(上海予华仪器设备有限公司);AV-300 核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司);Multiskan FC 酶标仪(Thermo Fisher Scientific 公司);pH 计(PB-10, 德国赛多利斯公司);XS105DU

分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);Milli-Q 超纯水系统(Advantage A10[®], 美国密理博公司);激光共聚焦显微镜(德国徕卡显微系统有限公司)。

1.3 细胞

HeLa 细胞购于中国科学院上海细胞库。

2 方 法

2.1 TPP-PEI-LND 聚合物的合成

TPP-PEI-LND 聚合物的合成路线见图 1。

2.1.1 5-羧戊基三苯基溴化𬭸(TPP-COOH)的合成 根据文献[7]方法,称取三苯基膦(TPP, 10 mmol)、6-溴己酸(10.5 mmol),溶于无水乙腈,氮气保护,回流反应 16 h。反应物经重结晶后即得 TPP-COOH。

2.1.2 TPP-PEI 聚合物的合成 称取 TPP-COOH(2 mmol)、DCC(2.4 mmol)、*N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS, 2.4 mmol)溶于无水 DMSO 10 mL,室温反应 12 h 后,加入 PEI(1 mmol),室温下继续反应 12 h 后,反应液转移到透析袋(截留相对分子质量 1 000),先用 DMSO 透析 24 h 再用去离子水透析 48 h。透析液经冷冻干燥后得到中间状态产物(TPP-PEI)。

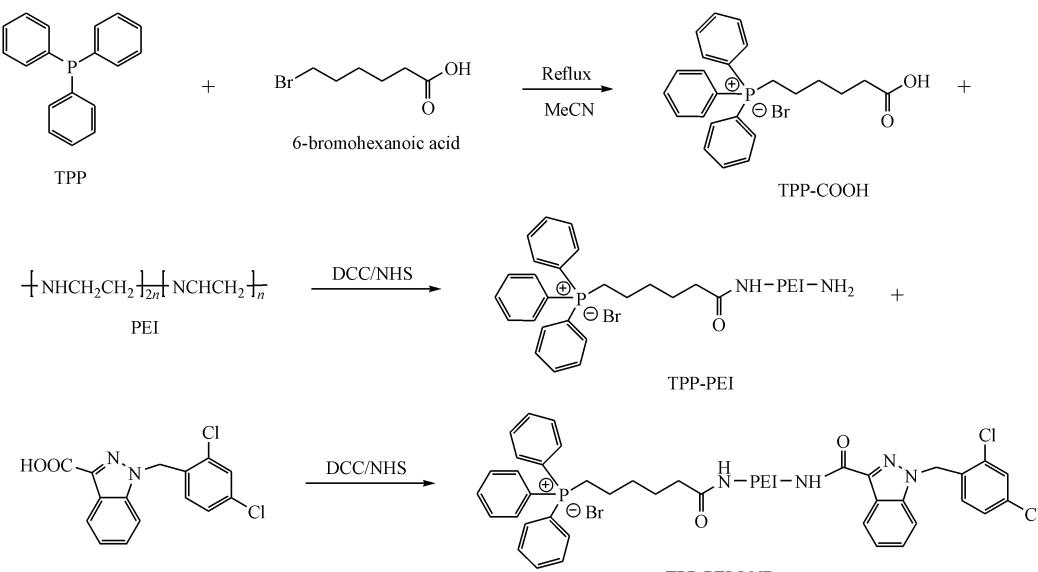


Figure 1 Synthesis of TPP-PEI-LND (TPP:Triphenylphosphine; PEI:Polyethyleneimine; LND:Lonidamine)

2.1.3 TPP-PEI-LND 聚合物的合成 称取 LND(4 mmol)、DCC(4.8 mmol)、NHS(4.8 mmol)溶于无水 DMSO, 室温反应 12 h 后, 加入 TPP-PEI(1 mmol), 室温下继续反应 12 h 后, 余步骤同

“2.1.2”项。

2.1.4 结构表征 以 DMSO-*d*₆ 为溶剂,通过¹H NMR 表征 TPP-COOH、PEI、TPP-PEI、LND、TPP-PEI-LND 的结构。

2.2 缓冲能力

TPP-PEI-LND 的缓冲能力通过酸碱滴定法测定^[8]。移取含 TPP-PEI-LND 2 mg 的 0.15 mol/L NaCl 溶液 10 mL。用 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 10, 然后用 0.1 mol/L HCl 滴定, 每次滴定 4 μL, 至溶液 pH 到 3 为止, 利用 pH 计实时记录溶液 pH 变化情况。0.15 mol/L NaCl 溶液(阴性对照)和含 PEI 1.8 k 2 mg 的 0.15 mol/L NaCl 溶液(阳性对照)以同样方式滴定。

2.3 体外释放研究

精密称取适量的 TPP-PEI-LND 溶于乙醇溶液中, 转入截留相对分子质量为 1 000 的透析袋中。分别以 pH 7.4、6.5、4.5 的 PBS 缓冲液 100 mL 为释放介质, 37 °C, 120 r/min 振摇。在预设时间点取样 3 mL, 同时补充相同体积及相同温度的相应介质 3 mL。0.45 μm 微孔滤膜过滤, 采用紫外分光光度计在波长 298 nm 处测 LND 的吸收度, 计算 LND 的质量浓度。

2.4 激光共聚焦观察(CLSM)

对数生长期的 HeLa 细胞以每孔 5×10^4 个细胞接种于激光共聚焦培养皿中, 37 °C 培养 12 h 后, 分别加入培养基(含 FITC 标记的 TPP-PEI-LND 或 PEI-LND, 质量浓度为 20 μg/mL) 2 mL, 共孵育 6 h。然后用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 1 次, 加入 100 nmol/L MitoTracker Red 染色 30 min。再用冷 PBS 清洗 2 次, 4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 清洗后, 用激光共聚焦显微镜观察聚合物前药线粒体靶向情况。

2.5 细胞毒性

将对数生长期的 HeLa 细胞以每孔 1×10^4 个细胞加入 96 孔板中, 过夜培养后, 弃去培养基, 分别加入含药培养基(TPP 组、PEI 1.8k 组、LND 组、TPP-PEI-LND 组、PEI-LND 组、PEI 25k 组), 每个样品至少 3 复孔, 以正常细胞作为对照组, 只加培养基的为空白组。培养 24 h 后, 每孔加入 MTS 溶液 20 μL, 37 °C 避光振摇 4 h, 于 490 nm 用酶标仪检测吸收度(A)。每孔细胞存活率计算公式如下:

$$\text{细胞存活率} (\%) = \frac{A_s - A_0}{A_c - A_0} \times 100$$

其中: A_s 、 A_c 和 A_0 分别表示处理组、对照组和空白组的吸收度。

2.6 统计分析

每组实验至少重复 3 次, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用统计软件 SPSS 21.0 对数据进行统计分析, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异, $P < 0.01$ 表示具有极显著性差异。

3 结果

3.1 TPP-PEI-LND 聚合物的结构表征

根据图 2 的氢谱结果, 将各个单体化合物的 ^1H NMR 进行归属。TPP-COOH δ : 12.01 (s, 1H, -COOH), 7.91 ~ 7.75 (m, 15H, Ar-H), 3.62 ~ 3.53 (m, 2H, -CH₂-), 2.17 ~ 2.14 (m, 2H, -CH₂-), 1.50 (s, 6H, -CH₂-); LND: δ 13.09 (s, 1H, -COOH), 8.14 ~ 8.11 (d, 1H), 7.82 ~ 7.79 (d, 1H), 7.69 (d, 1H), 7.52 ~ 7.44 (t, 1H), 7.40 ~ 7.32 (m, 2H), 6.98 ~ 6.95 (d, 1H), 5.84 (s, 2H, -CH₂-); PEI: δ 2.27 ~ 2.55 (m, -HNCH₂CH₂-)。

图 2 中红色虚线表示的是 TPP-COOH 的特征化学位移 7.75 ~ 7.91, 蓝色虚线表示的是 PEI 的特征化学位移 2.27 ~ 2.55。中间产物 TPP-PEI 氢谱上有 TPP-COOH 和 PEI 的特征化学位移, 提示 TPP-PEI 的成功合成。绿色虚线表示的是 LND 的特征化学位移 5.84。在终产物 TPP-PEI-LND 氢谱图中 LND、TPP-COOH、PEI 的特征化学位移均有出现, 这些结果说明 TPP-PEI-LND 的成功合成。

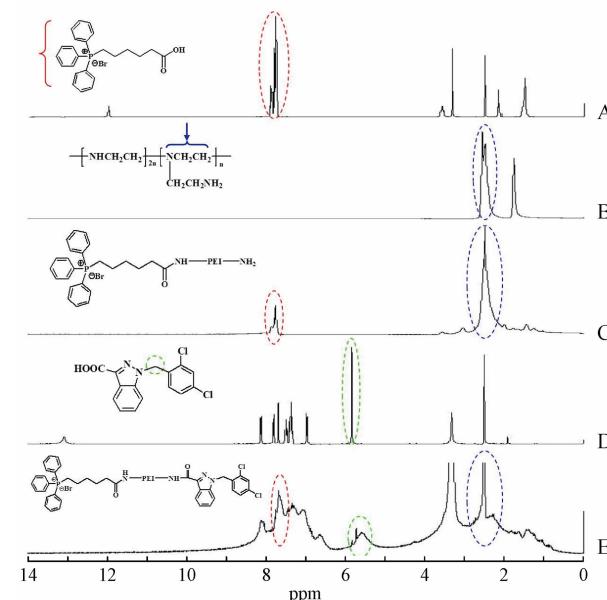


Figure 2 ^1H NMR spectra of TPP-COOH (A), PEI (B), TPP-PEI (C), LND (D) and TPP-PEI-LND (E)

TPP-PEI 中的 TPP 含量是通过紫外分光光度法在 267 nm 处测定, TPP 的质量浓度在 2.5~125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与吸收度呈良好线性关系, $A = 0.00858c - 0.00127$ ($r = 0.9999$), 计算得 TPP 的含量为 16.34% (g/g)。TPP-PEI-LND 中的 LND 载药量是通过紫外分光光度法在 298 nm 处测定, LND 在 2.525~25.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度范围内呈良好线性关系, $A = 0.03369c - 0.01178$ ($r = 0.9998$)。TPP-PEI-LND 中 LND 载药量为 19.86%。

3.2 TPP-PEI-LND 的缓冲能力

研究认为, PEI 具有较高的内涵体缓冲能力^[9], PEI 及其衍生物在基因转染中表现出较高的转染效率与其缓冲能力密切相关, 其以质子海绵效应使内涵体-溶酶体渗透肿胀至破裂, 使其从内涵体逃逸^[10]。采用酸碱滴定法考察 TPP-PEI-LND 聚合物的缓冲能力, 滴定曲线如图 3 所示。结果显示在 pH 5.0~7.4 范围内, 聚合物 TPP-PEI-LND 与 PEI 1.8 k 的缓冲能力基本一致。

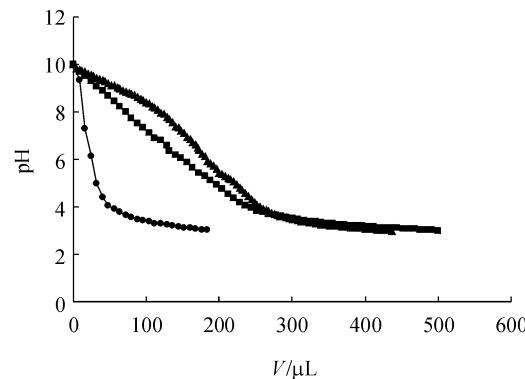
3.3 体外释放

分别在模拟生理环境 (pH 7.4)、肿瘤微环境 (pH 6.5) 和溶酶体环境 (pH 4.5) 的 PBS 中, 进行 TPP-PEI-LND 聚合物中 LND 的体外释放试验^[11]。结果如图 4 所示, 聚合物 TPP-PEI-LND 具有一定的缓释性, LND 的释放无明显的 pH 响应特性, 这是由于在这 3 种 pH 之间酰胺键的稳定性差异不大。

3.4 线粒体靶向能力

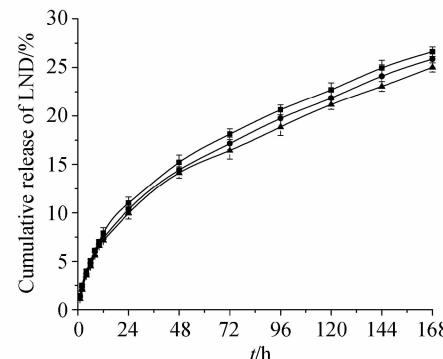
TPP-PEI-LND 线粒体靶向能力通过激光共聚焦成像来观察。从图 5 可看出, FITC 标记的 TPP-PEI-LND 显示绿色荧光, Mito-Tracker 染线粒体呈

红色荧光, 二者叠加后呈黄色, 说明 TPP-PEI-LND 已递送至线粒体。与不含 TPP 的 PEI-LND 相比, TPP-PEI-LND 孵育的细胞中黄色荧光最多, 表明 TPP 可有效地靶向递送 LND 到达线粒体。



—●—NaCl; —▲—PEI 1.8 k; —■—TPP-PEI-LND

Figure 3 Buffering capacity of TPP-PEI-LND copolymers obtained by titrating polymer aqueous solution (0.2 mg/mL) in 0.15 mol/L NaCl (pH 10) with 0.1 mol/L HCl



—■—pH 4.5; —●—pH 6.5; —▲—pH 7.4

Figure 4 Cumulative release profiles of LND in pH 7.4, 6.5 and 4.5 PBS

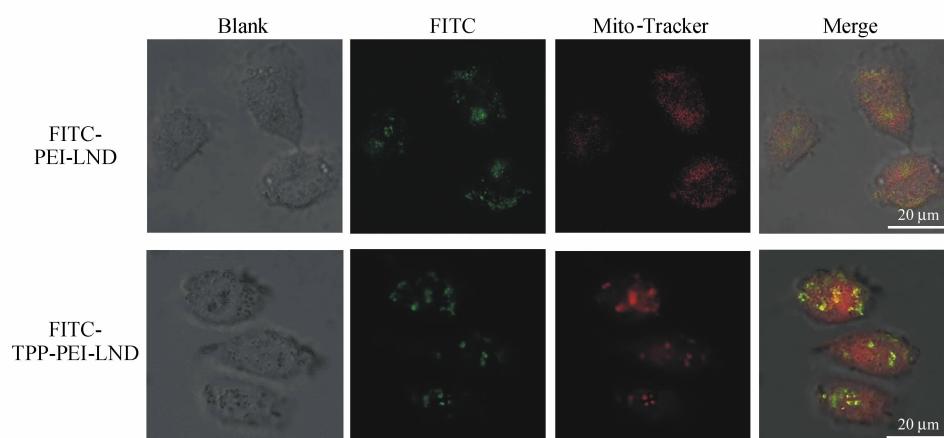


Figure 5 CLSM images of intracellular localization of the TPP-PEI-LND in HeLa cells after treated with FITC-TPP-PEI-LND or FITC-PEI-LND for 6 h

3.5 TPP-PEI-LND 体外细胞毒性

采用 MTS 测定 TPP-PEI-LND 对 HeLa 细胞的毒性。从图 6-A 中可看出,TPP 对 HeLa 细胞基本没有毒性;PEI 1.8 k 在 100 μg/mL 时 HeLa 细胞的存活率约 80%,说明 PEI 1.8 k 对 HeLa 细胞的毒性较低。而 TPP-PEI-LND 显示出对 HeLa 细胞有显著的毒性作用,并呈剂量依赖性;且在浓度 50 和

100 μg/mL 时,对 HeLa 细胞的毒性显著高于不含 TPP 的 PEI 1.8 k-LND ($P < 0.01$),说明 TPP 线粒体靶向递送能显著提高 LND 对肿瘤细胞的毒性。图 6-B 显示的是 LND 对 HeLa 细胞的毒性作用,其 IC_{50} 为 379.45 μg/mL;TPP-PEI-LND 的 IC_{50} 是 23.28 μg/mL;结果进一步说明 TPP 靶向修饰可显著提高 LND 对 HeLa 细胞的毒性。

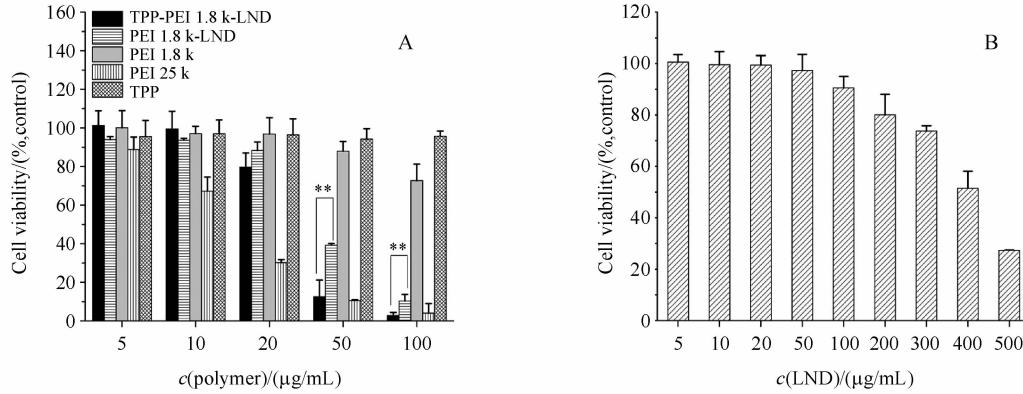


Figure 6 Cytotoxicity assay of TPP-PEI 1.8 k-LND, PEI 1.8 k-LND, PEI 1.8 k, PEI 25 k, TPP (A) and LND (B) at various concentrations at 24 h in HeLa cell ($\bar{x} \pm s, n=3$). ** $P < 0.01$

4 讨论

聚合物前药可有效解决抗肿瘤药物的疏水性问题,提高抗肿瘤药物的生物利用度,并可接枝靶向基团具备靶向递送能力,其为抗肿瘤药物的临床应用提供了新的机遇^[12-13]。本研究选择低相对分子质量的聚乙烯亚胺为聚合物载体,文献资料以及实验结果显示 PEI 1.8 k 的细胞毒性较低,是相对比较安全的载体材料^[14-15]。PEI 接枝 LND 后,水溶性主链可增强 LND 的溶解性,且 PEI 由于含有较多的胺类基团,在生理条件下显示正电性,更易于增加与肿瘤细胞的结合,从而提高 LND 的摄取率。合成的聚合物前药具有一定的缓冲能力,有利于其以质子海绵效应从内涵体逃逸。线粒体靶向基团三苯基膦的引入显著提高了聚合物前药到达线粒体的量,较好地解决了 LND 到达线粒体量少的问题^[16]。体外释放实验显示 TPP-PEI-LND 具有缓释性,说明聚合物前药在递送过程中释放 LND 较少,可将大部分 LND 靶向递送到线粒体。有文献报道显示对氯尼达明的羧酸进行修饰并不影响 LND 的活性^[17-18],所以 LND 接枝在低相对分子质量 PEI 上,被递送到线粒体后可能不释放也能显示出活性。细胞毒性结果表明聚合物显著增强了

LND 的药效。因此,聚合物靶向递送以线粒体靶点的药物到达线粒体,可有效提高此类药物的疗效。

参考文献

- Fulda S, Galluzzi L, Kroemer G. Targeting mitochondria for cancer therapy [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, **9**(6): 447–464.
- Marrache S, Dhar S. Engineering of blended nanoparticle platform for delivery of mitochondria-acting therapeutics [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, **109**(40): 16288–16293.
- Di Cosimo S, Ferretti G, Papaldo P, et al. Lonidamine: efficacy and safety in clinical trials for the treatment of solid tumors [J]. *Drugs Today (Barc)*, 2003, **39**(3): 157–174.
- Li N, Zhang CX, Wang XX, et al. Development of targeting lonidamine liposomes that circumvent drug-resistant cancer by acting on mitochondrial signaling pathways [J]. *Biomaterials*, 2013, **34**(13): 3366–3380.
- Ringsdorf H. Structure and properties of pharmacologically active polymers [C]. *J Polym Sci Symp*, 1975, **51**(1): 135–153.
- Hoste K, De Winne K, Schacht E. Polymeric prodrugs [J]. *Int J Pharm*, 2004, **277**(1): 119–131.
- Cuchelkar V, Kopecková P, Kopecek J. Novel HPMA copolymer-bound constructs for combined tumor and mitochondrial targeting [J]. *Mol Pharm*, 2008, **5**(5): 776–786.
- Wang M, Hu H, Sun Y, et al. A pH-sensitive gene delivery system based on folic acid-PEG-chitosan-PAMAM-plasmid DNA

- complexes for cancer cell targeting [J]. *Biomaterials*, 2013, **34**(38):10120–10132.
- [9] Roy K, Ghosh B, Kasturi SP. Enhancing polysaccharide-mediated delivery of nucleic acids through functionalization with secondary and tertiary amines [J]. *Curr Top Med Chem*, 2008, **8**(4):331–340.
- [10] Nel AE, Mödler L, Velegol D, et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface [J]. *Nat Mater*, 2009, **8**(7):543–557.
- [11] Mo R, Sun Q, Xue J, et al. Multistage pH-responsive liposomes for mitochondrial-targeted anticancer drug delivery [J]. *Adv Mater*, 2012, **24**(27):3659–3665.
- [12] Duncan R, Vicent MJ. Polymer therapeutics-prospects for 21st century:the end of the beginning [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, **65**(1):60–70.
- [13] Hu X, Hu J, Tian J, et al. Polyprodrug amphiphiles:hierarchical assemblies for shape-regulated cellular internalization, trafficking, and drug delivery [J]. *J Am Chem Soc*, 2013, **135**(46):17617–17629.
- [14] Jiang HL, Kim YK, Arote R, et al. Chitosan-graft-polyethylenimine as a gene carrier [J]. *J Control Release*, 2007, **117**(2):273–280.
- [15] Kunath K, von Harpe A, Fischer D, et al. Low-molecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery: comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and *in vivo* distribution with high-molecular-weight polyethylenimine [J]. *J Control Release*, 2003, **89**(1):113–125.
- [16] Hu Q, Gao M, Feng G, et al. Mitochondria-targeted cancer therapy using a light-up probe with aggregation-induced-emission characteristics [J]. *Angew Chem Int Edit*, 2014, **53**(51):14225–14229.
- [17] Silvestrini B, Palazzo G, De Gregorio M. Lonidamine and related compounds [J]. *Prog Med Chem*, 1984, **21**:111–135.
- [18] Georg IG, Tash JS, Chakrasali R, et al. Lonidamine analogues and treatment of polycystic kidney disease: US, 8362031 [P]. 2013-01-29.