

兼具顯影、感測、可標的細胞內抗癌藥物之傳輸的多功能pH敏感型磁性奈米粒子

Shashwat S. Banerjee, 陳東煌*

國立成功大學工學院化學工程學系

chendh@mail.ncku.edu.tw

Nanotechnology 2008, 19(50), 505104

與細胞內構成要素或狀況(如pH變化)相互影響之標的藥物傳輸系統在藥物的控制與觸發釋放上愈來愈重要。在過去的十年間，奈米技術與奈米組裝對藥物傳輸領域有了顯著的衝擊。由於粒徑與超分子結構使然，奈米粒子在偵測、診斷、與癌症治理上特別具有用途。在本研究中，我們發展出一新穎的多功能奈米醫學系統，可同時進行癌細胞標的光學顯影、感測、及磁導引pH觸發藥物傳輸。如示意圖1所示，此奈米醫學系統係藉著水解可分解且pH敏感之hydrazone鍵將doxorubicin (DOX) 聯結至adipic dihydrazide(ADH)接枝之阿拉伯膠修飾磁性奈米粒子(ADH-grafted gum arabic modified magnetic nanoparticles; ADH-GAMNP)上而製得，可選擇性的將藥物傳輸至腫瘤細胞。不同於傳統上藉由酵素作用引發藥物釋放，此新穎系統以hydrazone鍵聯結DOX，不需活化藥物之溶小體酵素(lysosomal enzyme)，即可在模擬腫瘤細胞內小體(endosome)的溫和酸水解作用下將藥物釋放，且hydrazone鍵在模擬血液循環系統之中性緩衝溶液中相對穩定。此外，我們發現阿拉伯膠修飾之磁性奈米粒子(GAMNP)透過雙光子吸收機制，可以近紅外光激發展現螢光特性。以近紅外光激發螢光的優點是，利用組織透明視窗(750-1000 nm)範圍內的光，可允許有較深的光穿透及具有較低的雷射熱治療危險。此奈米粒子的螢光與磁性，提供了作為器官內螢光顯微鏡之光學探針與磁共振造影(MRI)之顯影劑的新方法。

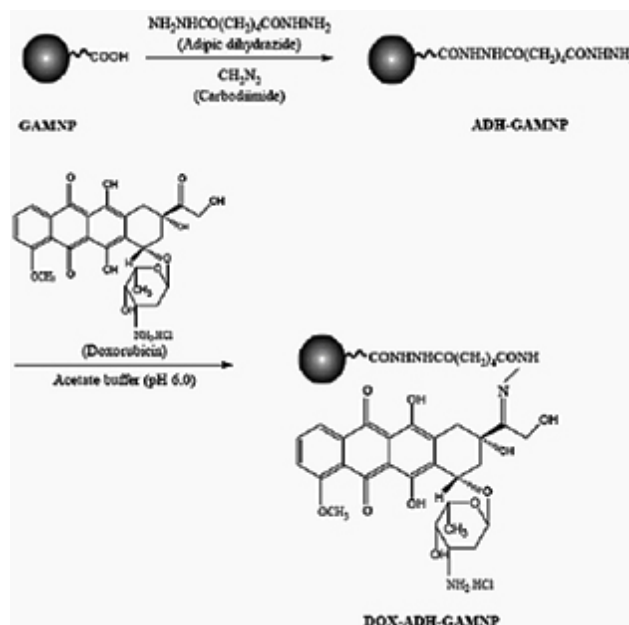


示意圖 1. 聯結DOX之GAMNP的製造流程。DOX之CO基與ADH-GAMNP之hydrazone基間形成的hydrazone鍵可在與細胞中之endosomes/lysosomes內相近的pH5.0酸性條件下被有效斷裂。

GAMNP的合成係先以氨水將 Fe^{2+} 與 Fe^{3+} 離子共沉澱，然後再以阿拉伯膠修飾其表面。為了將ADH聯結至GAMNP，先將0.05g的GAMNP以超音波振盪10分鐘分散於10mL的緩衝溶液A(0.003M磷酸鹽，pH 6，0.01 M NaCl)中，然後加入2.5 mL的carbodiimide溶液(0.025 g/mL於緩衝溶液A中)與10 mL的ADH溶液(0.5M 於緩衝溶液A中)，在4~7 °C下以超音波再振盪60分鐘。所得ADH-GAMNP藉磁性分離，然後以水重覆清洗，最後再真空乾燥。關於DOX-ADH-GAMNP的合成，係將0.25 g的ADH-GAMNP置於10 mL的醋酸緩衝溶液(0.5M, pH 6.0)中，在室溫下磁石攪拌。10分鐘後，加入25 mL的DOX溶液(0.144 mg/mL於methanol與dioxane混合液(50:50)中)，於室溫下再攪拌24小時，hydrazone鍵即可於DOX之 COCH_3 基與ADH-GAMNP之hydrazide基間形成。所得產物藉磁性分離，然後以pH 7.5的NaOH溶液重覆清洗，最後再真空乾燥。

本研所得之DOX-ADH-GAMNP平均粒徑13.8 nm (圖1)，藉著改變ADH溶液之濃度與體積，可以熱重分析法決定GAMNP鍵結ADH之最大量為3.5 mg/g。且由光譜分析得知，聯結至ADH-GAMNP之DOX量為6.52 mg/g。DOX在試管內自DOX-ADH-GAMNP釋放的研究，係於37 °C之生理條件(磷酸緩衝溶液，pH 7.4)與弱酸環境(pH 5.0)下進行，以模擬內小體與溶小體微環境中之pH值。其藥物釋放曲線(圖2)顯示，DOX-ADH-GAMNP呈現與pH明顯相關的特性。pH 7.4時的藥物釋放(2~3小時後達最大釋放約20%)明顯低於pH 5.0時(5小時後達最大釋放約74%)，可確認其pH觸發藥物釋放的特性。如此，實際應用上，在血液循環系統內(pH~7.4)，在傳送至標的細胞的過程中，DOX自DOX-ADH-GAMNP釋放的量較少，大部份的藥物會在進入標的細胞後，才因內小體/溶小體內部pH值較低(pH \approx 4-6)而釋放，如示意圖2所示。

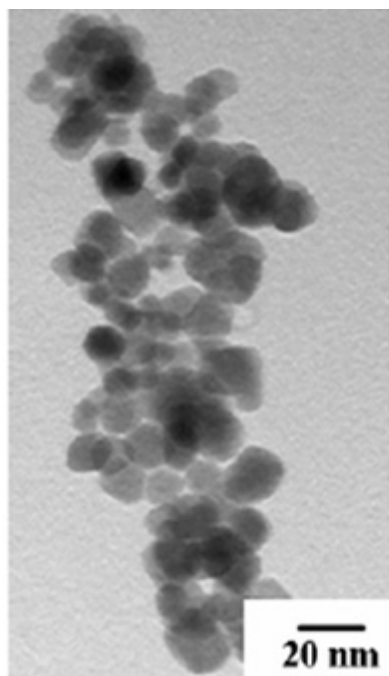


圖 1. DOX-ADH-GAMNP 典型之TEM影像。

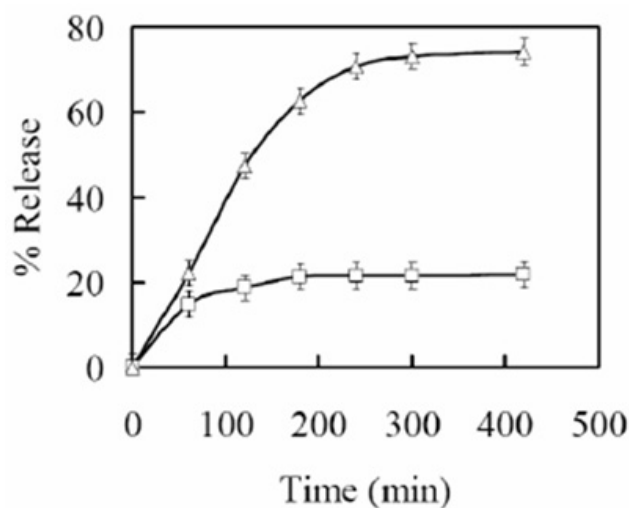


圖 2. DOX-ADH-GAMNP 在 pH 5.0 (Δ) 與 7.4 (\square) 磷酸緩衝液中之 DOX 釋放曲線

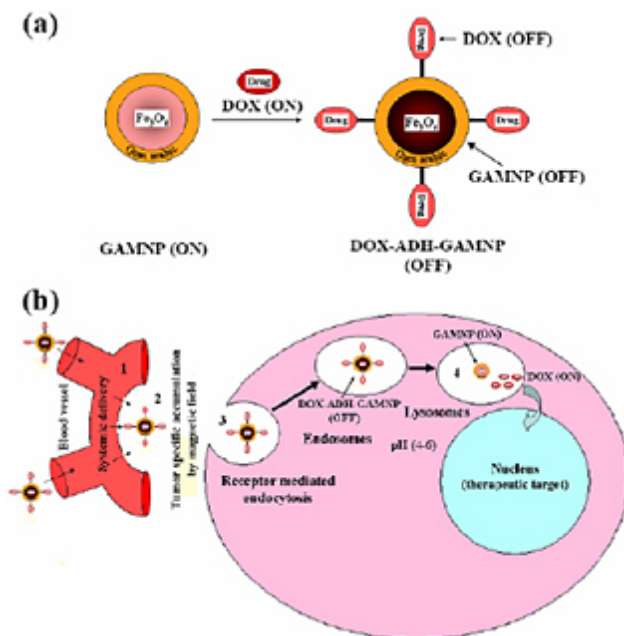


示意圖 2. (a)DOX-ADH-GAMNP雙螢光共振電子轉移系統之示意圖。在第一步驟中，DOX與GAMNP攝入標的癌細胞之示意圖。DOX自DOX-ADH-GAMNP釋出會使GAMNP與DOX之螢光回復。可藉此偵測DOX在胞內的釋放。

GAMNP具有螢光特性，激發波長850 nm時之放射峰約在波長572 nm處(圖3)，可作為光子上轉換(up conversion)材料，透過多重光子激發，將低能量光轉換為高能量光。而且，眾所熟知蒽環類(anthracycline)藥物(如DOX)具有螢光特性，以波長850 nm的光激發時，DOX也會在波長約571 nm處發出螢光，與GAMNP的情況接近。圖3顯示，DOX在磷酸緩衝溶液中的吸收光譜與GAMNP的螢光放射光譜有部份重疊，此允許能量可以在它們之間傳遞，使得DOX分子可作為在560-620 nm間發出螢光之GAMNP的光子接受者。

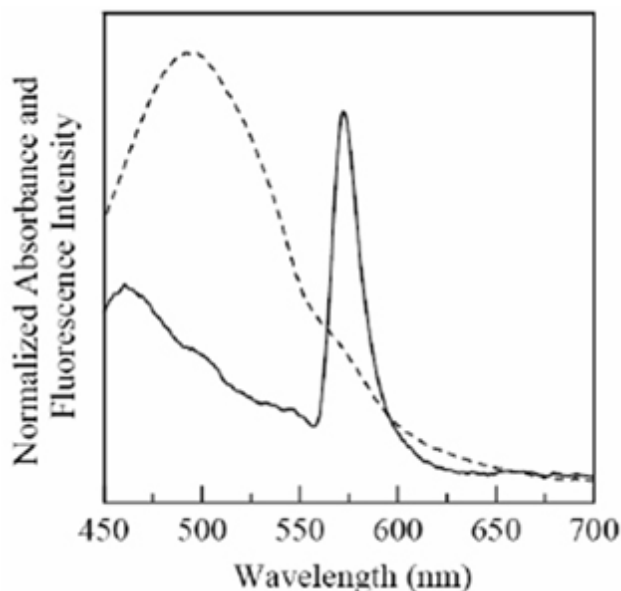


圖 3. DOX之吸收光譜(---)與GAMNP在波長850nm之光激發下的螢光放射光譜。

為進一步了解此奈米系統之能量傳送現象，我們以螢光顯微鏡觀測DOX釋放對以波長850 nm光激發所得螢光強度的影響。如圖4所示，當DOX-ADH-



GAMNP (25 ppm)分散於pH 5.0的磷酸緩衝溶液時，螢光放射強度持續增加。但當分散於pH 5.0的磷酸緩衝溶液時，螢光放射強度持續增加的程度較為微弱。此可以電子提供者(donor)及接受者(acceptor)間的螢光共振能量轉移(fluorescence resonant energy transfer; FRET)機制加以解釋，當DOX與GAMNP聯結時，電子提供者GAMNP與接受者DOX會藉由彼此間的FRET機制而導致螢光淬熄。當DOX-ADH-GAMNP 曝露於酸性介質時，持續增加的螢光放射即可能是由於DOX較快速脫離GAMNP，使得GAMNP與DOX間的能量傳遞降低的結果所致。在pH 7.4的磷酸緩衝溶液中，此螢光放射增加的情況較不顯著，乃是由於仍有較多的DOX存在於GAMNP表面，使得GAMNP與DOX間的能量傳遞依然較為可行所致。又文獻也有報導，當DOX與高分子結合時，會因FRET機制所致的螢光淬熄作用而使其螢光強度減弱。因此，磁性奈米粒子表面的阿拉伯膠也可能因DOX與阿拉伯膠間的交互作用而使得DOX的螢光淬熄。如此，DOX-ADH-GAMNP 分散液螢光強度的持續增加，可歸因於DOX釋放後重獲正常之螢光放射所致。由此推論，DOX與GAMNP的聯結可能產生一雙FRET(Bi-FRET)系統。DOX釋放引起DOX-ADH-GAMNP 螢光強度改變的特性，有潛力應用於藥物傳輸釋放的感測，如示意圖2所示。

總而言之，本研究發展出一新穎的多功能奈米醫學系統，以pH敏感之hydrazone鍵聯結藥物與奈米粒子，以阿拉伯膠作為標的用配位體，同時結合螢光與磁的特性。此一在光學顯影、利用螢光強度變化感測、及可將抗癌藥物標的傳送至癌細胞並於細胞內將藥物釋放至細胞質液中之頗具應用潛力的奈米載體，在藥物傳輸器具的發展上為一顯著的突破。

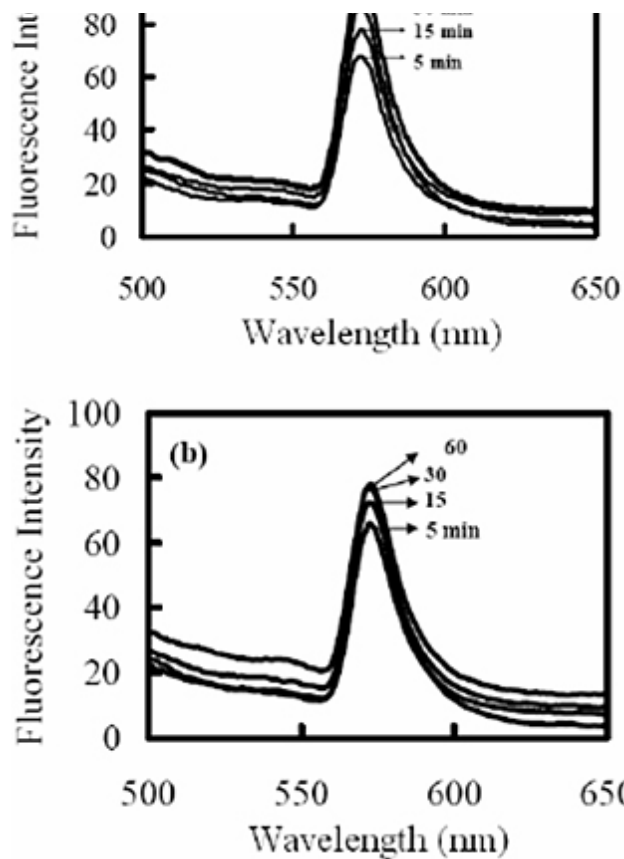


圖 4. DOX-ADH-GAMNP 在 pH 5.0 (a) 與 7.4 (b) 磷酸緩衝溶液中，不同時間以波長 850 nm 之光激發所得的螢光放射光譜。