

文章编号: 1008-9357(2026)02-0167-10

DOI: 10.14133/j.cnki.1008-9357.20260127001

二茂铁修饰氧化葡聚糖胶束用于抗癌药物递送

向珍妮, 吴万霞

(成都大学药学院, 成都 610000)

摘要: 通过席夫碱反应将二茂铁基团(Fc)修饰到氧化葡聚糖(ODex)上, 得到一种可诱发芬顿反应的两亲性聚合物载体 Fc-ODex。以阿霉素(DOX)为模型药物, 采用透析法制备载药胶束 Fc-ODex@DOX, 系统考察胶束的自组装性质、pH 响应性能和细胞毒性。结果表明, 聚合物载体 Fc-ODex 的细胞存活率超过 87%, 具有良好的 pH 响应性、诱发芬顿反应活性和低毒性。载药胶束在 pH 5.0 条件下, 108 h 后 DOX 释放量达 69%, 其在弱酸性条件下通过亚胺键断裂、释放 DOX 杀伤癌细胞, 同时肿瘤细胞产生的过氧化氢能和二茂铁参与芬顿反应, 生成羟基自由基, 进一步诱导癌细胞死亡。

关键词: 多糖; pH 响应性; 纳米胶束; 芬顿反应; 二茂铁

中图分类号: O636.1

文献标志码: A

Ferrocene Modified Oxidized Dextran Micelles for Anticancer Drug Delivery

XIANG Zhenni, WU Wanxia

(College of Pharmacy, Chengdu University, Chengdu 610000, China)

Abstract: A novel amphiphilic polymer carrier named Fc-ODex was successfully synthesized by modifying ferrocene (Fc) groups onto oxidized dextran (ODex) via a Schiff base reaction, endowing it with the ability to induce Fenton reaction. This amphiphilic polymer enables self-assembly into micelles, making it a promising drug delivery system. Using doxorubicin (DOX) as a model anticancer drug, the DOX-loaded micelles Fc-ODex@DOX were prepared through the dialysis method, and the self-assembly properties, pH responsiveness, and cytotoxicity of micelles were systematically investigated. Results confirm that Fc-ODex exhibits excellent performance in multiple aspects. Its amphiphilic structure allows stable self-assembly into micelles, ensuring effective encapsulation and protection of DOX during circulation. Cytotoxicity tests reveal that the blank Fc-ODex carrier has low toxicity with a cell survival rate exceeding 87%, indicating good biocompatibility. Collectively, Fc-ODex integrates pH-triggered drug release, Fenton reaction-mediated oxidative therapy, and biocompatibility, presenting a potential synergistic strategy for targeted cancer treatment. Importantly, the polymer shows remarkable pH responsiveness due to the presence of imine bonds formed via the Schiff base reaction. The drug-loaded micelles achieve a DOX release of 69% after 108 h at pH 5.0. In the slightly acidic microenvironment of tumors (pH 5.0–6.5),

收稿日期: 2026-01-27

基金项目: 国家自然科学基金 (51903022)

作者简介: 向珍妮(1998—), 女, 四川南充人, 硕士生, 主要研究方向为药用高分子材料。E-mail: 791995132@qq.com

通信联系人: 吴万霞, E-mail: wuwanxia@cdu.edu.cn

引用格式: 向珍妮, 吴万霞. 二茂铁修饰氧化葡聚糖胶束用于抗癌药物递送 [J]. 功能高分子学报, 2026, 39(2): 167-176.

Citation: XIANG Zhenni, WU Wanxia. Ferrocene Modified Oxidized Dextran Micelles for Anticancer Drug Delivery [J]. Journal of Functional Polymers, 2026, 39(2): 167-176.

these imine bonds break, triggering the disassembly of Fc-ODex@DOX micelles and rapid release of DOX, which directly kills cancer cells while reducing damage to normal tissues. Additionally, Fc-ODex demonstrates strong Fenton reaction-inducing activity. Tumor cells, characterized by high metabolism, produce excessive hydrogen peroxide (H_2O_2). The ferrocene groups in the carrier react with this endogenous H_2O_2 through the Fenton reaction, generating highly cytotoxic hydroxyl radicals ($\cdot OH$). These radicals further induce oxidative damage to tumor cells, including DNA breakage and lipid peroxidation, and these radicals synergize with DOX to enhance anticancer efficacy.

Key words: polysaccharide; pH-sensitivity; nanomicelle; Fenton reaction; ferrocene

癌症是世界上公认的死亡率最高的疾病之一^[1]。癌症的治疗手段多样,其中化疗是主要治疗手段之一。然而,化疗药物的低靶向性和毒副作用等问题严重影响治疗效果。靶向制剂是一种先进的药物递送系统,它通过载体将药物选择性递送至病变组织和器官等特定目标部位,同时保持健康组织不受影响,这种给药系统显著提高了药物的疗效,并减少了副作用^[2]。

近年来,天然生物大分子因其绿色安全、功能可调等特性备受关注^[3,4],其中多糖(如壳聚糖、葡聚糖、透明质酸等)凭借其固有的生物相容性、生物降解性、表面活性基团多样、来源广泛等特点,成为构建新型载药系统的理想材料^[5]。这些多糖可以通过表面基团修饰实现靶向递送药物、提高治疗效果、降低副作用的目的。与正常组织不同,肿瘤微环境(TME)具有低pH、缺氧和高氧化还原电位等特征^[6]。多糖表面活性基团多样,可针对TME的各种异常信号,选择性地被不同功能的疏水端修饰,以达到靶向治疗的目的^[7]。Feng等^[8]将葡聚糖用高碘酸钠氧化成氧化葡聚糖醛,并通过席夫碱反应与阿霉素(DOX)偶联得到两亲性聚合物。该两亲性聚合物在水溶液中聚集形成均匀的球形纳米颗粒,在中性环境中纳米颗粒保持稳定;但当pH降低时,纳米颗粒中的亚胺键迅速断裂,使DOX被局部释放并在肿瘤细胞中发挥作用。Zhou等^[9]将氧化羟丙基纤维素与苯丙氨酸通过席夫碱反应形成具有pH响应的水凝胶。这些水凝胶的孔径和溶胀比在弱酸性环境下比中性环境下大,并且降解速率更快,从而减少了含胺药物的副作用。

化学动力学疗法(CDT)是一种基于化学反应的新型抗癌治疗手段^[10]。基于TME中的芬顿反应的化学动力学疗法于2016年首次被提出^[11],其核心原理是利用金属离子介导的芬顿(类芬顿)反应,催化过氧化氢生成高毒性的羟基自由基($\cdot OH$),从而杀伤肿瘤细胞。与传统的治疗方法相比,CDT具有较高的肿瘤特异性和选择性、较低的全身毒性等优点^[12]。Li等^[13]合成了一种以 Fe_3O_4 为铁离子来源、聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)为载体材料的多聚体 Fe_3O_4 -PLGA,并将 H_2O_2 包裹其中。当该多聚体到达肿瘤部位后, H_2O_2 被释放,与 Fe_3O_4 协同催化芬顿反应;然而,载体里的 H_2O_2 过早泄漏可能会对正常组织造成氧化损伤。Huo等^[14]制备了一种包裹葡萄糖氧化酶(GOD)的铁基纳米制剂 $GOD-Fe_3O_4@DMSNs$ (GFD),该纳米粒可以释放GOD到肿瘤细胞中,催化肿瘤细胞中的葡萄糖产生 H_2O_2 ,从而达到跟 H_2O_2/Fe_3O_4 -PLGA载药纳米粒同样的抗肿瘤目的。CDT的治疗性能受到多个关键问题的限制并严重制约其临床应用效果^[15]。第1个问题是TME中内源性 H_2O_2 含量相对较低,并且现有催化剂(如 Fe_3O_4 和 CuO_2)的催化效率也难以达到理想治疗效果。这一局限性直接影响了CDT的临床转化进程,使其在医学领域的应用面临重大挑战^[16]。第2个问题是肿瘤微环境虽呈现弱酸性,但也不足以达到芬顿或者类芬顿反应最佳活性pH(pH 4.0),限制了芬顿反应效率,从而影响治疗效果^[17]。第3个问题是肿瘤微环境中高浓度的还原性物质(如谷胱甘肽(GSH))会中和芬顿反应生成的羟基自由基,从而显著降低CDT的治疗效果,使得CDT在实际应用中难以充分发挥治疗潜力^[18]。

二茂铁作为一种典型的茂金属在1951年被发现^[19],是一种由2种环戊二烯和铁离子组成的三明治结构的金属有机配合物,具有良好的化学稳定性、亲脂性和无毒性^[20]。二茂铁提供了一个比 Fe_3O_4 更稳定的 Fe^{2+} 来源,常用于癌症细胞的化学动力学治疗。近年来,CDT与化疗的联合应用成为研究的热点。这种联合治疗方式具有显著的协同效应:一方面是化疗药物能够通过特定的作用机制增加细胞内 H_2O_2 的浓度,加快芬顿反应速率;另一方面是CDT与化疗的联合能增强疗效,可通过适当减少化疗药物的使用剂量来减轻化疗药物对患者身体正常组织和器官的损害^[21]。肿瘤组织的内源 H_2O_2 含量相对不足,使芬顿反应的临床应用受到限制。因此,可以自身提供 H_2O_2 的化疗药物是增强型化学动力学治疗(ECDT)的理想选择。Li等^[22]合成了一种含二茂铁和肉桂醛(CA)的活性氧(ROS)响应聚合物,具有硫缩醛结构的聚合物主链在响应ROS后断开,

释放的 CA 使细胞内 H_2O_2 增多,而这些积累的 H_2O_2 可以协同侧链上的二茂铁触发芬顿反应诱导铁死亡。一些化疗药物,如阿霉素和顺铂,能产生超氧阴离子,随后被超氧化物歧化酶(SOD)转化为 H_2O_2 ,增强芬顿反应活性^[23]。Song 等^[24]报道了一种负载 DOX 的两亲嵌段共聚物——聚乙二醇-*b*-聚己内酯-二茂铁(mPEG-PCL-Fc),该聚合物的席夫碱在肿瘤细胞中的弱酸性环境中断开,释放的 DOX 与二茂铁诱导的铁死亡协同治疗癌症。因此,当 CDT 与多种治疗方法或药物在单一纳米平台相互作用时,能产生显著的协同增强效果^[25]。

本文设计合成了一种以氧化葡聚糖(ODex)为亲水嵌段、二茂铁衍生物为疏水嵌段,通过席夫碱反应偶联的一种新型可引发芬顿反应的 pH 响应型两亲性载体材料(Fc-ODex)。通过透析法负载阿霉素得到载药胶束,该载药胶束在肿瘤细胞的弱酸性环境中,亚胺键能够快速断裂并释放出包裹的阿霉素,诱导细胞产生的 H_2O_2 和二茂铁一起参与芬顿反应,产生羟基自由基,进一步杀死肿瘤细胞。

1 实验部分

1.1 原料和试剂

葡聚糖(Dextran, α -1,6-糖苷键为主,分析纯,相对分子质量为 6000、10000、20000)、高碘酸钠($NaIO_4$, $w=99\%$)、二茂铁甲酸($w=96\%$)、盐酸羟胺($w=98\%$)、邻苯二甲酸氢钾($w=99\%$)、4-二甲氨基吡啶(DMAP, $w=98\%$)、乙酸($w=99.5\%$)、无水醋酸钠($w=99\%$)、三氟乙酸(TFA, $w=99\%$)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDCI, $w=99\%$)、*N*-叔丁氧羰基-1,4-丁二胺($w=98\%$)、阿霉素盐酸盐($w=98\%$)、三乙胺(Et_3N , $w=99.5\%$)、无水二甲基亚砜(DMSO, $w=99.7\%$)、无水二氯甲烷($w=99.9\%$)、氘代氯仿($CDCl_3$, $w=99.8\%$)、氘代二甲基亚砜- d_6 (DMSO- d_6 , $w=99.8\%$):安耐吉化学公司;3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB, $w=98\%$):上海阿拉丁生化科技股份有限公司; $w=30\%$ 过氧化氢、氢氧化钠:分析纯,成都科隆化学品有限公司。

1.2 测试与表征仪器

紫外-可见分光光度计(上海美普达仪器有限公司 UV-3100 PC 型);核磁共振波谱(NMR)仪(德国布鲁克 Avance NEO 400 M 型);透射电子显微镜(日本电子株式会社 JEOL-F200 型);动态激光散射(DLS)仪(英国马尔文 ZEN3600 型);液相色谱(HPLC)仪(中国赛智科技(杭州)有限公司 LC-10 T 型,色谱柱:Ultimate AQ-C18, 5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm;检测器:SPD-10 Tvp, 波长范围:190~700 nm);傅里叶变换红外光谱(FT-IR)仪(美国珀金埃尔默 Spectrum 3 型);全波长酶标仪(美国赛默飞 1550 A51119700 DPC 型);荧光光谱仪(上海天美科学仪器有限公司 FL970 型)。

1.3 ODex 的合成

称取 6 g 不同相对分子质量的葡聚糖,分别溶于 50 mL 去离子水中;随后缓慢滴加 0.99 g 的 $NaIO_4$ 溶于该体系中,避光下搅拌反应过夜;再将溶液转移到截留分子量 3500 的透析袋中,透析 5 d;经冷冻干燥机冻干后,得到白色松针状固体,即 ODex。当葡聚糖的相对分子质量为 6000、10000、20000 时,得到的 ODex 分别命名为 ODex6k、ODex10k、ODex20k1。实验步骤同上,对于相对分子质量为 20000 的葡聚糖,将滴加的 $NaIO_4$ 质量改为 0.79 g,得到的 ODex 命名为 ODex20k2。

1.4 Fc-ODex 的合成

Fc-ODex 及其对照物 Ar-ODex 的合成路线如图 1 所示。

1.4.1 *N*-(4-叔丁氧羰氨基)二茂铁甲酰胺(Fc-Boc)的合成 称取 4.00 g 二茂铁甲酸、3.67 g EDCI 和 1.94 g 三乙胺于 40 mL 的 0 $^{\circ}C$ 无水二氯甲烷中,搅拌活化 0.5 h;再加入叔丁基(4-氨基丁基)氨基甲酸酯 3.60 g、DMAP 0.23 g 室温反应 24 h;反应结束后加 40 mL 水淬灭反应;用二氯甲烷萃取 3 次,合并有机层,用 50 mL 饱和食盐水洗涤 2 次;用无水硫酸镁干燥,过滤,减压蒸馏,柱层析(层析液为体积比 1:1 的乙酸乙酯-二氯甲烷混合液)分离得 6.23 g 黄色固体 Fc-Boc(产率为 91%)。 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 6.08 (s, 1 H), 4.70 (s, 2 H), 4.33 (s, 2 H), 4.19 (s, 5 H), 3.40 (d, $J=4$ Hz, 2 H), 3.17 (d, $J=4$ Hz, 2 H), 1.61 (s, 4 H)。

1.4.2 *N*-(4-氨基丁基)二茂铁甲酰胺(Fc-NH₂)的合成 称取 Fc-Boc 2.00 g 溶于 25 mL 二氯甲烷中,加 5 mL 三氟乙酸,在 0 $^{\circ}C$ 下搅拌反应 2 h,再在室温反应 10 h;加 10 mL 水淬灭反应,随后用 25 mL 饱和食盐水萃取 2 次,再加 $w=20\%$ 的氢氧化钠溶液调节 pH 至 9,用二氯甲烷萃取 3 次,用无水硫酸镁干燥,抽滤,减压浓缩得 1.11 g 黄色固体 Fc-NH₂(产率为 74%)。 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 6.34 (s, 1 H), 4.69 (s, 2 H), 4.32 (s, 2 H),

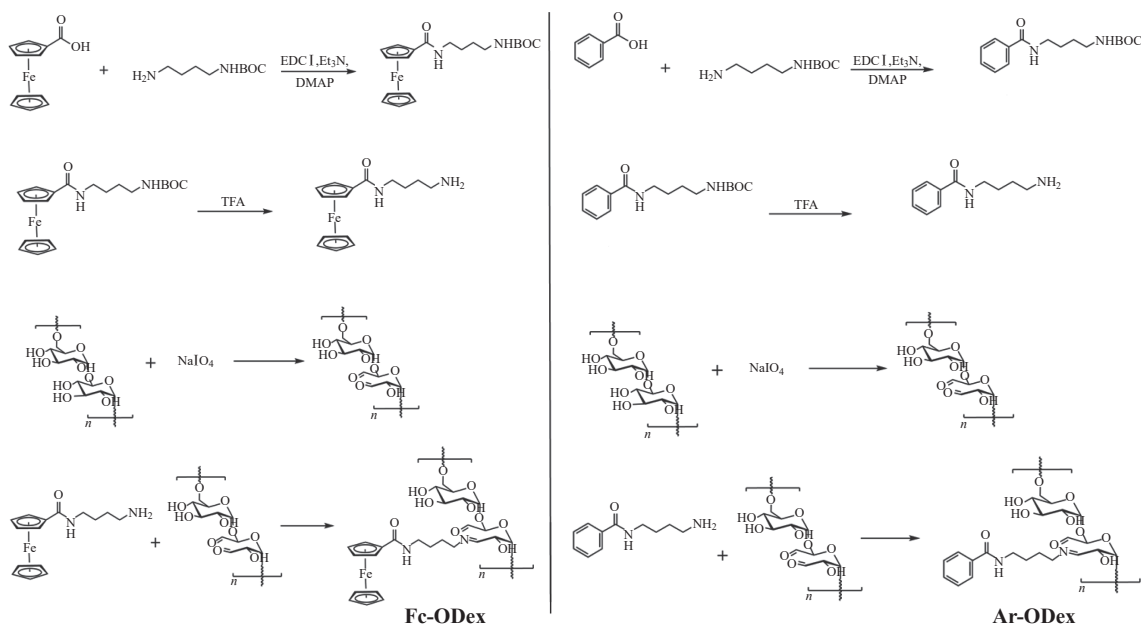


图 1 Fc-ODex 和 Ar-ODex 的合成路线

Fig. 1 Synthesis routes of Fc-ODex and Ar-ODex

4.19 (s, 5 H), 3.38 (d, $J = 4$ Hz, 2 H), 2.78 (s, 2 H), 1.61 (s, 4 H), 2.07 (s, 2 H), 1.56 (d, $J = 36$ Hz, 4 H)。

1.4.3 Fc-ODex 的合成 称取 0.8 g ODex6k (含 0.50 mmol 醛基) 和 0.24 g Fc-NH₂ 溶于 25 mL 二甲基亚砜中, 在 50 °C 下反应 48 h; 用预冷至 0 °C 的甲基叔丁基醚洗涤 3 次, 在 -60 °C 下冷冻干燥 2 d, 得到橙红色黏液 Fc-ODex6k 0.42 g (产率为 45%)。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 6.48 (d, $J = 28$ Hz, O=CNH₂), 4.15~4.93 (m, OCH₂OCH₂O, OCH₂O, Fe(C₅H₅)₂), 3.19~3.74 (m, OCH₂CHOHCHOHCHOH, OCH₂C, CN=CHC), 1.46 (m, CH₂CH₂CH₂N=C)。

按照类似的方法分别合成 Fc-ODex10k, Fc-ODex20k1, Fc-ODex20k2。

1.5 Ar-ODex 的合成

1.5.1 *N*-(4-叔丁氧羰氨基) 苯甲酰胺 (Ar-Boc) 的合成 称取 1.5 g 苯甲酸、EDCI 2.59 g 和 1.37 g 三乙胺于 30 mL 的 0 °C 无水二氯甲烷中, 搅拌活化 0.5 h, 加入叔丁基 (4-氨基丁基) 氨基甲酸酯 2.54 g、DMAP 0.15 g, 室温反应 24 h; 再加水 35 mL 淬灭反应, 用二氯甲烷 40 mL 萃取 3 次, 合并有机层, 用饱和食盐水 50 mL 洗涤 2 次; 加无水硫酸镁干燥, 过滤, 减压蒸馏, 柱层析 (层析液为体积比 1:1 的乙酸乙酯-二氯甲烷混合液) 分离得到白色固体 Ar-Boc 2.33 g (产率为 65%)。

1.5.2 *N*-(4-氨基丁基) 苯甲酰胺 (Ar-NH₂) 的合成 称取 1 g Ar-Boc 溶于 10 mL 二氯甲烷中, 加入 2 mL 三氟乙酸, 在 0 °C 下搅拌反应 2 h, 再在室温反应 10 h; 加 5 mL 水淬灭反应, 随后用 10 mL 饱和食盐水萃取 2 次, 加入 $w=20\%$ 的氢氧化钠溶液调节 pH 到 9, 用 30 mL 二氯甲烷萃取 3 次, 加无水硫酸镁干燥, 抽滤, 减压浓缩得黄色固体 0.48 g (产率为 77%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.76 (d, $J = 8$ Hz, 2 H), 7.39 (m, 3 H), 6.94 (s, 1 H), 3.46 (d, $J = 4$ Hz, 2 H), 2.77 (s, 2 H), 1.56~1.70 (m, 6 H)。

1.5.3 Ar-ODex 的合成 称取 0.4 g ODex20k1 (含 0.32 mmol 的醛基) 和 0.10 g Ar-NH₂ 溶于 20 mL 二甲基亚砜中, 在 50 °C 下反应 48 h; 用预冷至 0 °C 的甲基叔丁基醚洗涤 3 次, 在 -60 °C 下冷冻干燥 2 d, 得到淡黄色黏液 Ar-ODex20k1 0.21 g (产率为 47%)。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.83 (s, CH=C—CH), 7.45 (m, CH=CHCHC), 6.60 (s, O=CNH₂), 4.52~4.94 (m, CH₂CH₂CH₂N=C, OCH₂OCH₂O, OCH₂O), 3.21~3.75 (m, OCH₂CHOHCHOHCHOH, OCH₂C, CN=CHC), 1.56 (m, CH₂CH₂CH₂N=C)。

1.6 Fc-ODex 的芬顿反应活性考察

以 TMB 作为典型基质底物, 采用控制变量法研究了 Fc-ODex 的芬顿反应活性。取 2 mL、pH=4 的缓冲溶液 (0.4 mol/L)、1.6 mL Fc-ODex20k1 或 Ar-ODex20k1 水溶液 (0.1 mg/mL)、0.2 mL TMB 的乙醇溶液 (0.02 mol/L)、0.2 mL H₂O₂ 溶液 (0.1 mol/L), 在室温下反应 10 min; 立即用紫外-可见光谱测定反应液在 650 nm 的吸光度。之后分别以不同的 pH、H₂O₂ 浓度、Fc-ODex 质量浓度为变量, 考察芬顿反应的活性。

1.7 载药胶束 Fc-ODex@DOX 和 Ar-ODex@DOX 的制备

称取 30 mg Fc-ODex(或 Ar-ODex)溶于 2 mL DMSO 中,加入 3 mg 阿霉素盐酸盐和 50 μ L 三乙胺,避光下搅拌过夜,随后加入 8 mL 纯净水,将溶液转移到截留分子量 3500 的透析袋中透析 1d;经冷冻干燥后得到载药胶束 Fc-ODex@DOX(或 Ar-ODex@DOX)。利用荧光分光光度计测定载药量(DL)和包封率(EE)。

1.8 pH 响应性能的验证

通过 DLS 来验证胶束的 pH 响应性能。将 Fc-ODex20k1 聚合物溶于不同 pH 的缓冲溶液,配制成 0.2 mg/mL 的胶束样品,于 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床中振摇 72 h,用 DLS 测定胶束的粒径变化。

取少量 Fc-ODex 溶于 1.5 mL 水和 1.5 mL 甲醇混合溶液中;取 1.5 mL 该溶液于另一个试剂瓶中并向其滴加盐酸溶液(0.01 mol/L)调节 pH 为 4,得到酸化的 Fc-ODex 溶液,并在 37 $^{\circ}$ C 下恒温摇床孵育 3 d 后,通过 HPLC 分析水解产物。HPLC 的柱温为 30 $^{\circ}$ C,流动相为 $w=0.5\%$ 的醋酸溶液(溶剂 A)与甲醇(溶剂 B)的混合液;梯度洗脱程序:在 30 min 内将流动相由 90%(体积分数,下同)溶剂 A+10% 溶剂 B 逐渐变为 10% 溶剂 A+90% 溶剂 B;检测波长 321 nm;进样量 20 μ L。

1.9 药物体外释放行为研究

将 Fc-ODex20k1@DOX 用纯水溶解并稀释,使包裹的 DOX 质量浓度为 32 mg/L,然后各取 1 mL 放入 3 个透析袋,分别置于 40 mL 的 pH 7.4、6.5、5.0 的缓冲溶液中;在 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床中持续振摇,在规定时间内间隔内取 3 mL 混合液测定荧光值,同时补充等量的新鲜缓冲液。

1.10 细胞毒性测定

采用噻唑兰(MTT)细胞毒性试验分别测定空白胶束和载药胶束在正常细胞 NIH3T3 和肝癌细胞 HepG-2 中的细胞毒性。将处于对数生长期的 NIH3T3 细胞和 HepG-2 细胞以每孔 1×10^4 个细胞的密度接种于 96 孔板中,在培养皿中孵育 24 h。按每孔 100 μ L 的总体积,分别加入不同量的 Fc-ODex 胶束溶液和细胞培养基液,使阿霉素的最终质量浓度为 5、10、20、40、60 mg/L,培养 24 h 后,弃去培养基,加入 MTT 溶液(5 mg/mL),继续孵育 3 h,通过酶标仪测定每孔液体在波长 490 nm 处的吸光度。

2 结果与讨论

2.1 Fc-ODex 的合成及表征

制备得到的 4 种氧化葡聚糖 ODex6k、ODex10k、ODex20k1、ODex20k2,通过盐酸羟胺法测定醛基含量分别为 0.6183、0.4918、0.8207、0.6373 mmol/g。再通过席夫碱反应,得到两亲性聚合物 Fc-ODex。图 2(a)为 Fc-ODex20k1 的核磁氢谱图,核磁峰 a~g 都归属于 Fc-NH₂ 的部分结构,核磁峰 1~7 都归属于 ODex 的部分结构。从图 2(b)核磁对比图上看,ODex 在化学位移 9.67 处的醛基峰消失,并且多了 4.19 处的二茂铁戊环信号峰,证明了 Fc-ODex 的成功合成;图 3 为 Fc-ODex、ODex 和葡聚糖的红外对比谱图。Fc-ODex 的红外谱图上

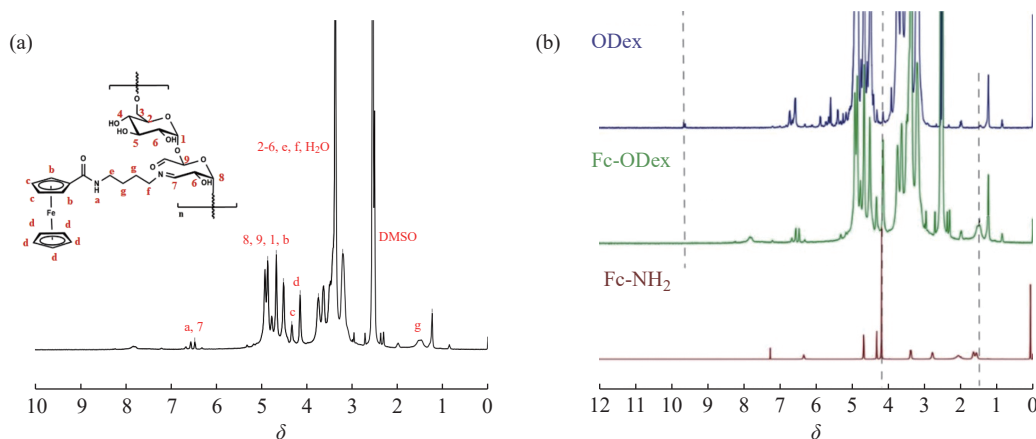


图 2 (a) Fc-ODex20k1 和(b)ODex、Fc-ODex、Fc-NH₂ 的¹H-NMR 谱图

Fig. 2 ¹H-NMR spectra of (a) Fc-ODex20k1 and (b) ODex, Fc-ODex, Fc-NH₂

多了 1546 cm^{-1} 的亚胺 C=N 的伸缩振动峰和 950 cm^{-1} 的二茂铁上戊环的 C-H 面外弯曲振动峰, 说明 Fc-ODex 构建成功。

2.2 Fc-ODex 的芬顿反应活性

TMB 是一种比较稳定的中性物质, 可以被活性氧氧化为蓝色产物, 并在 650 nm 处出现氧化态 TMB (oxTMB) 的特征吸收峰。从图 4 和图 5(a) 可以看出, 当 Fc-ODex 单独与 TMB 或 H_2O_2 反应、TMB 与 H_2O_2 单独反应、Ar-ODex 与 TMB 或 H_2O_2 同时反应时, 溶液都呈现无色或者淡蓝色, 且 650 nm 处的紫外吸收强度微弱。只有 Fc-ODex、TMB 和 H_2O_2 同时存在时, 体系的溶液颜色才变成深蓝色, 并在 650 nm 处有强吸收峰。芬顿反应速率主要受 pH、 Fe^{2+} 质量浓度、 H_2O_2 浓度等因素影响。由图 5(b) 可知, 芬顿反应活性会随着 pH 降低而升高。由图 5(c, d) 可知, Fc-ODex 的芬顿反应的活性同时受到 H_2O_2 浓度和 Fc-ODex 质量浓度的调控, 随着 H_2O_2 质量浓度和 Fc-ODex 质量浓度的增加, 芬顿反应活性显著增强。以上实验结果表明 Fc-ODex 可以跟 H_2O_2 发生芬顿反应并产生活性氧, 并且该反应在弱酸性环境下活性更高。

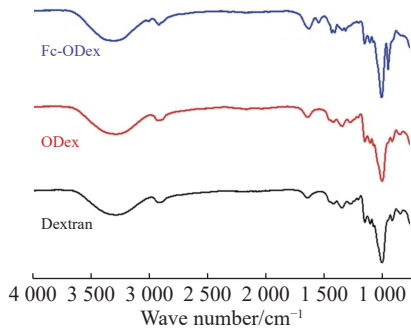
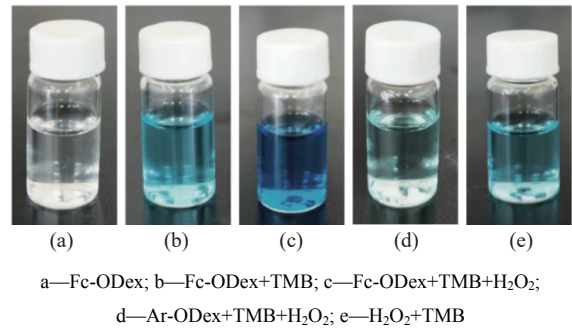


图 3 Fc-ODex、ODex、Dextran 的红外光谱

Fig. 3 FT-IR spectra of Fc-ODex, ODex and Dextran



a—Fc-ODex; b—Fc-ODex+TMB; c—Fc-ODex+TMB+ H_2O_2 ;
d—Ar-ODex+TMB+ H_2O_2 ; e— H_2O_2 +TMB

图 4 不同组分溶液体系的颜色对比示意图

Fig. 4 Color comparison of different component solution systems

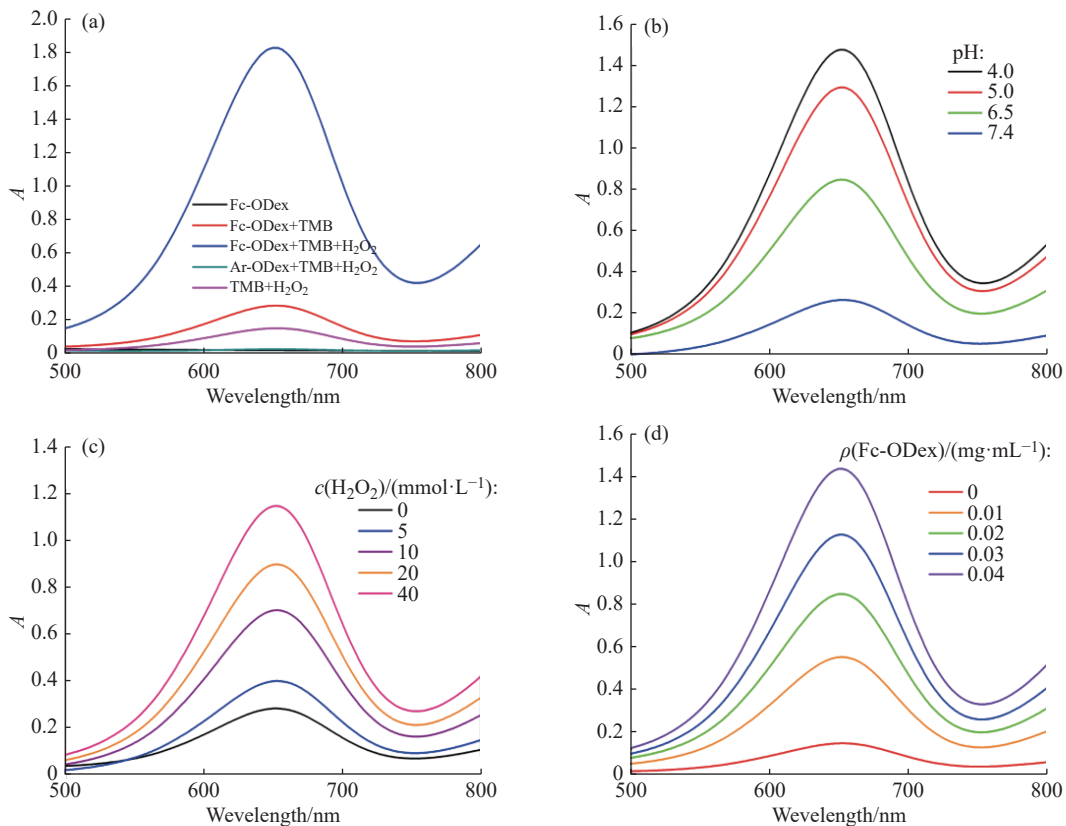


图 5 (a) 不同组分溶液体系的紫外吸收强度; (b) pH、(c) H_2O_2 浓度和 (d) Fc-ODex 质量浓度对芬顿反应活性的影响

Fig. 5 (a) UV absorption intensity of different component solution systems; Effect of (b) pH、(c) H_2O_2 concentration and (d) Fc-ODex mass concentration on Fenton reaction activity

2.3 胶束理化性质表征

通过芘荧光探针法测定了不同载体材料 Fc-ODex6k、Fc-ODex10k、Fc-ODex20k1、Fc-ODex20k2 在水溶液中形成胶束的临界胶束浓度(CMC)分别为 0.2、0.15、0.47、0.09 mg/mL(图 6(a)), 这表明 Fc-ODex 在水溶液中易自组装形成胶束结构。通过 DLS 检测了 Fc-ODex 粒径及分布, 结果如图 6(b)所示。Fc-ODex6k、Fc-ODex10k、Fc-ODex20k1、Fc-ODex20k2 胶束的粒径(d)及多分散性指数(PDI)分别为 (257.3 ± 10.4) nm (PDI = 0.397 ± 0.047)、 (232.2 ± 14.4) nm (PDI = 0.399 ± 0.043)、 (325.2 ± 18.1) nm (PDI = 0.325 ± 0.016) 和 (356.0 ± 15.2) nm (PDI = 0.402 ± 0.022); 载药胶束 Fc-ODex6k@DOX、Fc-ODex10k@DOX、Fc-ODex20k1@DOX、Fc-ODex20k2@DOX 的粒径分别为 (31.0 ± 7.8) nm (PDI = 0.458 ± 0.034)、 (39.3 ± 14.5) nm (PDI = 0.278 ± 0.04)、 (27.9 ± 5.7) nm (PDI = 0.326 ± 0.007)和 (35.8 ± 4.9) nm (PDI = 0.305 ± 0.022), 均呈现单一分布。载药胶束的粒径要小于空白胶束, 这可能是由于阿霉素与胶束中的二茂铁通过疏水作用和 π - π 堆积作用, 致使胶束疏水核致密化。我们进一步通过荧光分析法测定胶束 Fc-ODex6k、Fc-ODex10k、Fc-ODex20k1、Fc-ODex20k2 及对照 Ar-ODex20k1 的载药量分别为 4.3%、6.0%、8.3%、5.7%、8.7%; 包封率分别为 45%、64%、88%、61%、92%。随着亲水端氧化葡聚糖分子量的增大, 载体材料的包封率和载药量均有所提高。当氧化葡聚糖分子量一致时, 载药量随其氧化度的降低而减小, 原因是氧化度降低使席夫碱偶联的二茂铁疏水段减少, 胶束包裹疏水药物的能力随之降低。载药胶束 Fc-ODex@DOX 的形貌如图 6(c)所示, 载药胶束呈现出规则、均一的圆球状。

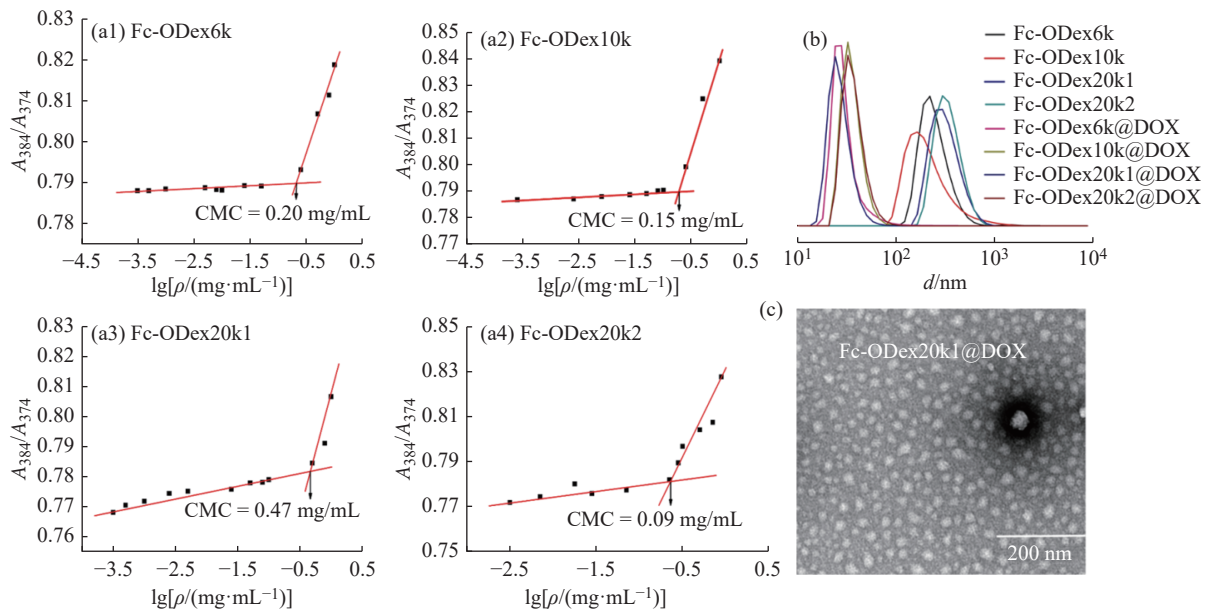


图6 (a) Fc-ODex 的 CMC 值; (b) Fc-ODex 和 Fc-ODex@DOX 的粒径分布; (c) Fc-ODex20k1@DOX 的 TEM 图像
Fig. 6 (a) CMC value of Fc-ODex; (b) Size distributions of Fc-ODex and Fc-ODex@DOX; (c) TEM image of Fc-ODex20k1@DOX

2.4 pH 响应机理

为了验证载体材料的 pH 响应性能, 将其分别溶于不同 pH 缓冲溶液中, 在 37 °C 恒温摇床中孵育 72 h, 在选定时间内通过 DLS 分析 Fc-ODex 的粒径变化, 结果如图 7 所示。Fc-ODex 在 pH 7.4 的缓冲液中孵育 72 h 后, 粒径及其分布基本保持不变, 说明该纳米载体在正常生理环境下趋于稳定。在 pH 5.0 和 pH 6.0 缓冲液中, Fc-ODex 的粒径随时间的延长而呈现多分布状态, 颗粒的粒径分布也逐渐变宽。这是由于亚胺键在酸性条件下的裂解及胶束的解离崩坏所导致的。为考察 Fc-ODex 在弱酸性环境中的降解性, 用 HPLC 分析了酸化的 Fc-ODex。由图 8(a)可知, Fc-ODex 经酸化后, 原有聚合物在 14.5 min 的信号峰消失, 同时在 25.5 min 出现 *N*-(4-叔丁氧羰氨基)二茂铁甲酰胺盐酸盐 (Fc-NH₂-HCl) 的信号峰, 这表明 Fc-ODex 在酸化后, 席夫碱发生断裂, 得到原来的 Fc-NH₂。

2.5 体外释放行为

为进一步评估 Fc-ODex@DOX 的 pH 响应释药性能, 分别在 pH 7.4、6.5、5.0 缓冲液中, 测定其 DOX 的释放量。从图 8(b)可见, 在 pH 7.4 缓冲液中, 12 h 后, 基本上不再释放 DOX; 108 h 后, DOX 的总释放量仅为

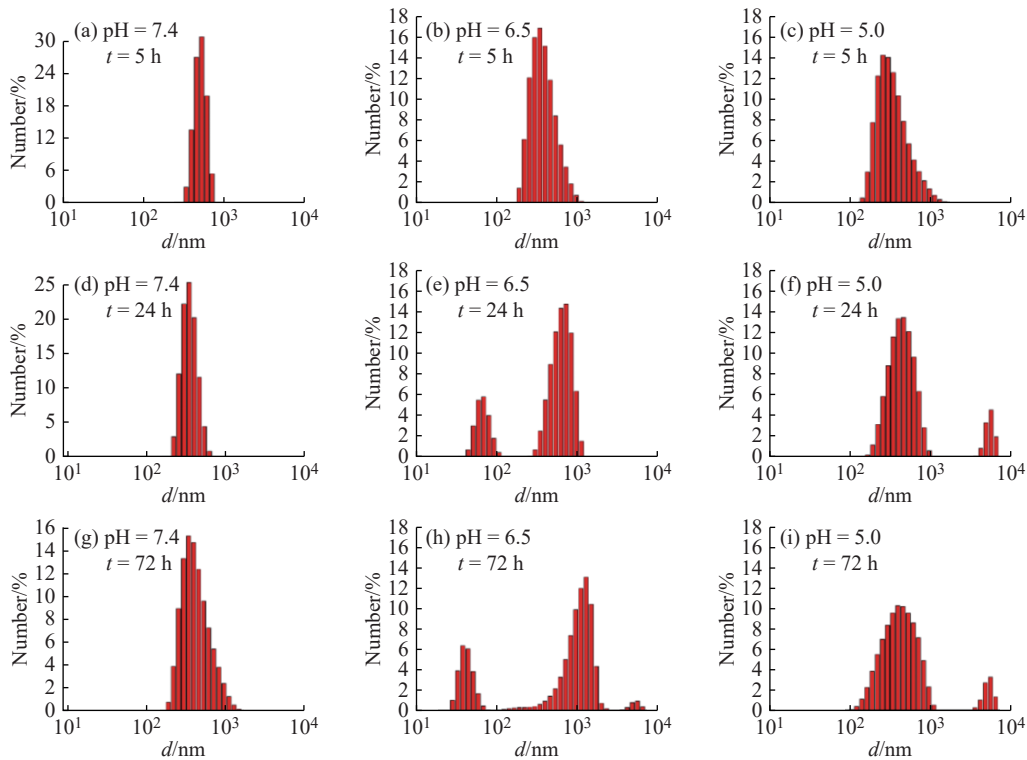
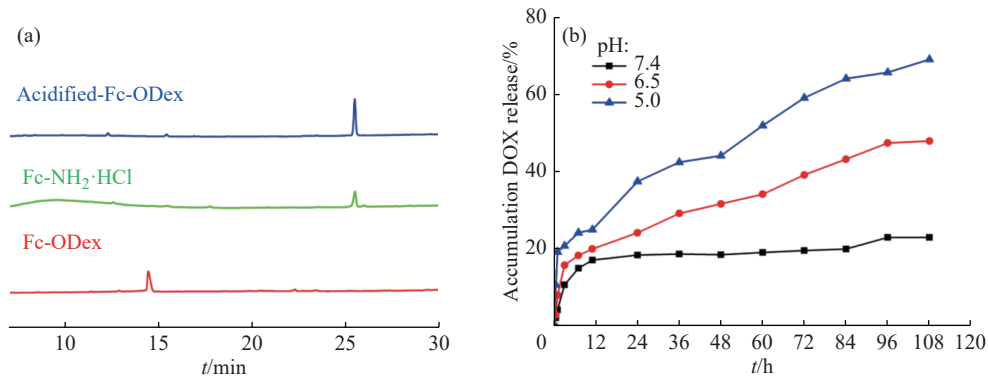


图 7 Fc-ODex 在不同条件下的粒径变化

Fig. 7 Particle size variation of Fc-ODex under different conditions

图 8 (a) 酸化的 Fc-ODex、Fc-NH₂·HCl 与 Fc-ODex 的 HPLC 谱图; (b) Fc-ODex@DOX 纳米粒中 DOX 的体外释放 DOX (37 °C)Fig. 8 (a) HPLC chromatograms of acidified Fc-ODex, Fc-NH₂·HCl and Fc-ODex; (b) *In vitro* release of DOX from Fc-ODex@DOX nanoparticles (37 °C)

23%。然而在 pH 6.5 和 pH 5.0 缓冲液中, 前 3 h 内释放速率较快, 随后缓慢释放; 108 h 后, DOX 的总释放量分别达到 48% 和 69%。pH 5.0 条件下释放速率明显高于 pH 6.5。这是由于 Fc-ODex 存在席夫碱结构, 在弱酸性环境下, 席夫碱中的 N 原子优先发生质子化, 使得 C=N 双键的电子云密度显著降低、稳定性下降, 进而触发席夫碱的水解断裂, 生成相应的氨基与醛基。这一结果表明, 载药纳米颗粒 Fc-ODex@DOX 不仅能在正常的生理环境下保持稳定, 减少药物泄漏, 并且在弱酸性环境下还能快速释放 DOX, 具有一定的 pH 响应性。

2.6 细胞毒性

为评价载体材料的毒性, 通过 MTT 法分别测定 Fc-ODex 胶束在正常细胞 NIH3T3 和肝癌细胞 HepG-2 中的细胞毒性。从图 9 可知, 随着 Fc-ODex 胶束的质量浓度增大, NIH3T3 细胞和 HepG-2 细胞的存活率仅有小幅度降低; 当 Fc-ODex 胶束的质量浓度达到 800 mg/L 时, 2 种细胞的存活率仍在 87% 以上, 表明 Fc-ODex 胶束具有较低的细胞毒性。我们进一步考察了 Fc-ODex@DOX 载药胶束对肿瘤细胞增殖的抑制效果(图 10)。Ar-ODex@DOX、Fc-ODex@DOX、游离阿霉素对肝癌细胞的细胞毒性依次变大, 这可能是因为载药胶束具有药物缓释性。在相同质量浓度下, Fc-ODex@DOX 对正常细胞 NIH3T3 中的毒性比对 HepG-2 细胞的毒性低,

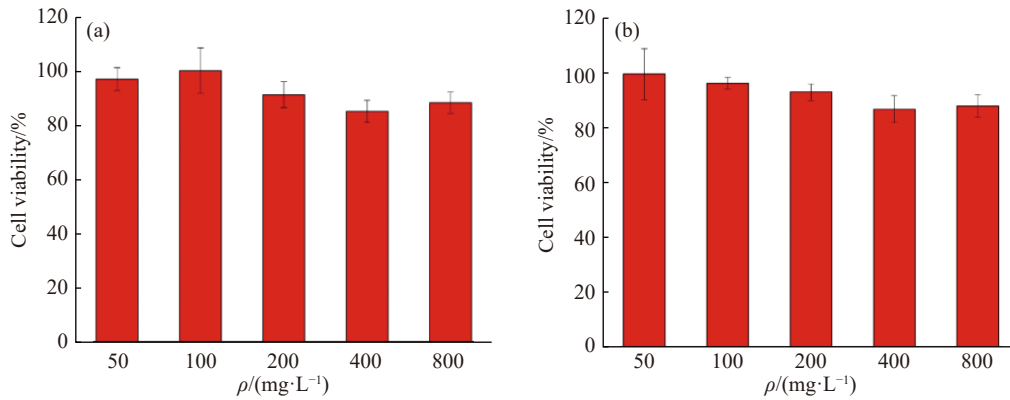


图 9 Fc-ODex 胶束在 (a) NIH3T3 细胞和 (b) HepG-2 细胞中的细胞毒性

Fig. 9 Cytotoxicity of Fc-ODex micelles in (a) NIH3T3 cells and (b) HepG-2 cells

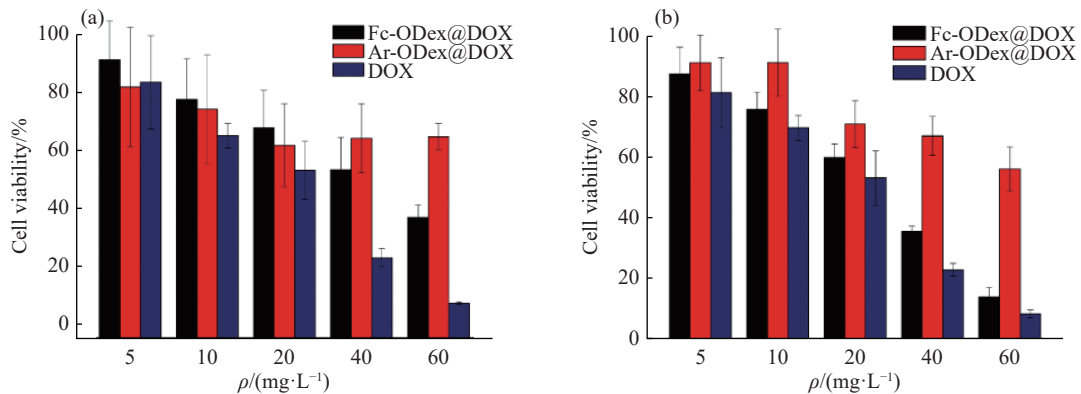


图 10 Fc-ODex@DOX 和 Ar-ODex@DOX 载药胶束在 (a) NIH3T3 细胞和 (b) HepG-2 细胞中的细胞毒性

Fig. 10 Cytotoxicity of Fc-ODex@DOX and Ar-ODex@DOX micelles in (a) NIH3T3 cells and (b) HepG-2 cells

这可能是由于癌细胞中的弱酸性环境使阿霉素释放更多。随着载药胶束的质量浓度增加, Fc-ODex@DOX 载药胶束对肝癌细胞的毒性远大于不含二茂铁的 Ar-ODex@DOX 载药胶束; 这可能是由于释放出的阿霉素诱导肿瘤细胞产生的 H_2O_2 , 可以跟 Fc-ODex@DOX 载药胶束上的二茂铁一同发生芬顿反应, 从而产生高毒性的羟基自由基, 进一步杀死肿瘤细胞。

3 结 论

(1) 合成了一种新型 pH 响应的二茂铁修饰氧化葡聚糖纳米材料 Fc-ODex, 并通过透析法成功制备了包载阿霉素的载药胶束 Fc-ODex@DOX。

(2) 验证了 Fc-ODex 载体可以与过氧化氢发生芬顿反应并产生羟基自由基, 并且在弱酸性条件下反应活性有显著增强。

(3) 在体外释放行为研究中, 载药胶束 Fc-ODex@DOX 的药物释放速率在弱酸性环境中显著加快, 对肿瘤细胞增殖具有抑制效果。

参考文献:

- [1] LI J, KUANG X. Global cancer statistics of young adults and its changes in the past decade: Incidence and mortality from GLOBOCAN 2022 [J]. Public Health, 2024, 237: 336-343.
- [2] CROMMELIN D J A, FLORENCE A T. Towards more effective advanced drug delivery systems [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2013, 454(1): 496-511.
- [3] 刘银春, 张永勤, 董静文, 刘芳, 刘建瑞. 基于聚半乳糖醛酸的聚合物胶束制备及性能 [J]. 功能高分子学报, 2024, 37(4): 347-355.

- LIU Y C, ZHANG Y Q, DONG J W, LIU F, LIU J R. Preparation and properties of polymer micelles based on polygalacturonic acid [J]. *Journal of Functional Polymers*, 2024, 37(4): 347-355.
- [4] 庞洁, 武翠翠, 朱纤倩, 张文柠, 汤顺清, 李艳艳. 光交联纳米酶葡聚糖水凝胶的制备及应用 [J]. *功能高分子学报*, 2024, 37(5): 433-440.
- PANG J, WU C C, ZHU Q Q, ZHANG W N, TANG S Q, LI Y Y. Preparation and application of photo cross-linked nanase dextran hydrogels [J]. *Journal of Functional Polymers*, 2024, 37(5): 433-440.
- [5] GAIKWAD D, SUTAR R, PATIL D. Polysaccharide mediated nanodrug delivery: A review [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 261: 129547.
- [6] MPEKRIS F, VOUTOURI C, PANAGI M, BAISH J W, JAIN R K, STYLIANOPOULOS T. Normalizing tumor microenvironment with nanomedicine and metronomic therapy to improve immunotherapy [J]. *Journal of Controlled Release*, 2022, 345: 190-199.
- [7] WU Q, HU Y, YU B, XU F J. Polysaccharide-based tumor microenvironment-responsive drug delivery systems for cancer therapy [J]. *Journal of Controlled Release*, 2023, 362: 19-43.
- [8] FENG X, LI D, HAN J, ZHUANG X, DING J. Schiff base bond-linked polysaccharide-doxorubicin conjugate for upregulated cancer therapy [J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2017, 76: 1121-1128.
- [9] ZHOU Y, ZHAI Z, YAO Y, STANT J C, LANDRUM S L, BORTNER M J, FRAZIER C E, EDGAR K J. Oxidized hydroxypropyl cellulose/carboxymethyl chitosan hydrogels permit pH-responsive, targeted drug release [J]. *Carbohydrate polymers*, 2023, 300: 120213.
- [10] TANG Z, LIU Y, HE M, BU W. Chemodynamic therapy: Tumor microenvironment-mediated Fenton and Fenton-like reactions [J]. *Angewandte Chemie*, 2019, 131: 958-968.
- [11] ZHANG C, BU W, NI D, ZHANG S, LI Q, YAO Z, ZHANG J, YAO H, WANG Z, SHI J. Synthesis of iron nanometallic glasses and their application in cancer therapy by a localized Fenton reaction [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2016, 55: 2101-2106.
- [12] LI S L, JIANG P, JIANG F L, LIU Y. Recent advances in nanomaterial-based nanoplatfoms for chemodynamic cancer therapy [J]. *Advanced Functional Materials*, 2021, 31(22): 2100243.
- [13] LI W P, SU C H, CHANG Y C, LIN Y J, YEH C S. Ultrasound-induced reactive oxygen species mediated therapy and imaging using a Fenton reaction activable polymersome [J]. *ACS Nano*, 2016, 10(2): 2017-2027.
- [14] HUO M, WANG L, CHEN Y, SHI J. Tumor-selective catalytic nanomedicine by nanocatalyst delivery [J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 357.
- [15] LIU G, ZHU J, GUO H, SUN A, CHEN P, XI L, HUANG W, SONG X, DONG X. Mo₂C-derived polyoxometalate for NIR-II photoacoustic imaging-guided chemodynamic/photothermal synergistic therapy [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58: 18641-18646.
- [16] LIN L S, HUANG T, SONG J, OU X Y, WANG Z, DENG H, TIAN R, LIU Y, WANG J F, LIU Y, YU G. Synthesis of copper peroxide nanodots for H₂O₂ self-supplying chemodynamic therapy [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141: 9937-9945.
- [17] WANG Y, GAO F, LI X, NIU G, YANG Y, LI H, JIANG Y. Tumor microenvironment-responsive Fenton nanocatalysts for intensified anticancer treatment [J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2022, 20(1): 69.
- [18] GONG F, YANG N, WANG X, ZHAO Q, CHEN Q, LIU Z, CHENG L. Tumor microenvironment-responsive intelligent nanoplatfoms for cancer theranostics [J]. *Nano Today*, 2020, 32: 100851.
- [19] KEALY T J, PAUSON P L. A new type of organo-iron compound [J]. *Nature*, 1951, 168(4285): 1039-1040.
- [20] WU G L, TAN S, TAN X, CHEN G, YANG Q. Recent advances in ferrocene-based nanomedicines for enhanced chemodynamic therapy [J]. *Theranostics*, 2025, 15: 384.
- [21] REN Z, SUN S, SUN R, CUI G, HONG L, RAO B, LI A, YU Z, KAN Q, MAO Z. A metal-polyphenol-coordinated nanomedicine for synergistic cascade cancer chemotherapy and chemodynamic therapy [J]. *Advanced Materials*, 2020, 32: 1906024.
- [22] LI J, ZONG Q, LIU Y, XIAO X, ZHOU J, ZHAO Z, YUAN Y. Self-catalyzed tumor ferroptosis based on ferrocene conjugated reactive oxygen species generation and a responsive polymer [J]. *Chemical Communications*, 2022, 58: 3294-3297.
- [23] MA P A, XIAO H, YU C, LIU J, CHENG Z, SONG H, ZHANG X, LI C, WANG J, GU Z, LIN J. Enhanced cisplatin chemotherapy by iron oxide nanocarrier-mediated generation of highly toxic reactive oxygen species [J]. *Nano Letters*, 2017, 17(2): 928-937.
- [24] SONG C, YANG F, JI R, LV Y, WEI Z. Construction of a drug delivery system via pH-responsive polymeric nanomicelles containing ferrocene for DOX release and enhancement of therapeutic effects [J]. *ACS Omega*, 2021, 6: 28242-28253.
- [25] FAN W, YUNG B, HUANG P, CHEN X. Nanotechnology for multimodal synergistic cancer therapy [J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117: 13566-13638.

(责任编辑: 刘亚萍)