

# 叶酸修饰 pH 响应壳聚糖衍生物胶束的制备及性能表征

樊蓉蓉 郝悦玮 王洁欣 乐 园\*

(北京化工大学 化学工程学院 有机无机复合材料国家重点实验室, 北京 100029)

**摘 要:** 制备了叶酸(FA)、胆固醇琥珀酸单酯(CHS)共修饰的羟丙基壳聚糖衍生物(CHS-HPCHS-FA),该衍生物在水中能够自组装形成粒径为200~400nm的胶束。研究了疏水片段CHS的取代度对胶束的临界胶束浓度、粒径、载药及释药性能的影响,分析了胶束pH响应控释药物的机理,结果表明,疏水片段取代度高的产物,其临界胶束浓度较低,形成的胶束粒径较小,载药效率较高。体外溶出结果显示,载药胶束在pH5.5条件下释药速率明显比pH7.4条件下更快,体现了pH响应控释药物的效果。体外细胞毒性实验结果表明,胶束的生物相容性较好,且叶酸修饰的载药胶束可增强肿瘤细胞的摄取,细胞毒性明显增大。

**关键词:** 羟丙基壳聚糖;胆固醇琥珀酸单酯;聚合物胶束;pH响应;叶酸靶向

**中图分类号:** O636.1 **DOI:** 10.13543/j.bhxbzr.2017.03.005

## 引 言

近年来,聚合物纳米胶束由于具有生物相容性好、可提高药物表观水溶性、减少网状内皮系统(RES)对药物的吞噬、延长体内循环周期、增加药物在肿瘤组织处的定位积累等优点,成为一类极具应用前景的抗癌药物载体<sup>[1-2]</sup>。聚合物胶束经过特殊修饰基团修饰后,可以在体内特异性地集结于靶部位,携带药物浓集于肿瘤部位,对特定病变部位的环境进行刺激,在结构、物理和化学性质方面做出相应的变化,从而控制药物释放,提高药效,降低毒副作用<sup>[3-5]</sup>。

体内正常组织与癌细胞周围环境的pH存在明显差异性,大多数癌细胞生存外环境pH为6.5~7.2<sup>[6]</sup>,然而正常组织生存环境相对比较温和,其pH为7.4<sup>[7]</sup>。载体携带药物经过内吞作用进入癌细胞后,经历的环境pH会继续降低,例如在核内体pH为5.5~6.0<sup>[8-9]</sup>,溶酶体pH为4.5~5.0<sup>[10]</sup>。运用不同组织和细胞间的pH差异,设计制备相应pH响应性的聚合物,能够实现药物的可控释放<sup>[11-14]</sup>。

叶酸是细胞增殖时碱基合成所必需的维生素,在许多肿瘤细胞表面过度表达。叶酸修饰过的治疗药物可以减小体内毒副作用并增强其对肿瘤细胞的毒性,对恶性肿瘤治疗具有实际应用意义<sup>[15-17]</sup>。由于目前大多数响应性聚合物在体内稳定性较低、生物相容性及降解性较差,限制了其在药物传递领域的应用,因此有必要开发新型的载体材料。

壳聚糖是一种天然存在并带有正电荷的多糖,具有良好的生物相容性和生物可降解性,被广泛用作药物载体<sup>[18-20]</sup>。本文制备叶酸(FA)和胆固醇琥珀酸单酯(CHS)共修饰的羟丙基壳聚糖(HPCHS),作为叶酸靶向pH响应性胶束用于抗癌药物阿霉素(DOX)的输运,考察了胶束的载药性能及pH响应机理,并研究了胶束的细胞毒性及肿瘤靶向性。

## 1 实验部分

### 1.1 实验原料和仪器

#### 1.1.1 实验原料

羟丙基壳聚糖,分子量15 kDa,南京绿神有限责任公司;胆固醇琥珀酸单酯,叶酸,N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC·HCl),二环己基碳二亚胺(DCC),均为分析纯,美国Sigma Aldrich;二甲基亚砜(DMSO),分析纯,北京化学试剂公司;阿霉素(DOX),原料药,北京中硕试剂有限公司;DMEM高糖,MCF-7、HeLa细胞,北京协和基础细胞医学中心。

收稿日期: 2016-11-28

基金项目: 国家“973”计划(2015CB932100)

第一作者: 女,1992年生,硕士生

\* 通讯联系人

E-mail: leyuan@mail.buct.edu.cn

### 1.1.2 实验仪器

8700 型傅里叶红外光谱 (FT-IR) 仪, 美国 Nicolet 公司; AV III 400M 核磁共振波谱 ( $^1\text{H-NMR}$ ) 仪, 德国 Bruker 公司; 3000HS 激光粒度分析仪和 zeta 电位测定仪, 英国 Malvern 公司; UV-2600 紫外分光光度计 (UV-Vis), 日本岛津公司; JY92-DN 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技有限公司; RCM8D 溶出试验仪, 天大天发科技有限公司; F-7000 荧光分光光度计, 日本 Hitachi 公司。

## 1.2 制备方法

### 1.2.1 CHS-HPCHS-FA 的合成

120 mg 羟丙基壳聚糖溶于水, 静置 10 h 确保完全溶解, 搅拌下逐滴加入 24 mL 无水乙醇, 随后加入 30 mg EDC·HCl 及 30 mg NHS。继续搅拌活化 2 h 后逐滴加入 CHS 的 85% 乙醇溶液, 室温反应 72 h 后将溶液置于透析袋 (截留分子量为 8000 ~ 14000 Da) 中透析, 过滤, 冻干后得到白色的产物—胆固醇琥珀酸单酯修饰的羟丙基壳聚糖 (CHS-HPCHS)。

将 2.0 g 叶酸溶于 40 mL 无水 DMSO 中, 加入 1.0 g NHS 以及 1.83 g DCC, 搅拌下缓慢滴入 1 mL 三乙胺, 30 °C 下反应 10 h, 过滤, 将滤液减压蒸馏, 缓慢加入至冷的无水乙醚中, 过滤即得黄色沉淀物叶酸活性酯。

将制得的胆固醇琥珀酸单酯修饰的羟丙基壳聚糖 160 mg 加入去离子水搅拌使其完全溶解, 缓慢加入 20 mg/mL 叶酸活性酯的 DMSO 溶液, 40 °C 下反应 8 h, 将反应溶液置于透析袋中, 去离子水避光透析 72 h。冻干即得叶酸与胆固醇琥珀酸单酯共修饰的羟丙基壳聚糖 (CHS-HPCHS-FA)。

### 1.2.2 胶束的制备

称取 40 mg 1.2.1 节制备的聚合物, 加入 20 mL 去离子水, 采用细胞破碎仪超声 20 min (功率 90 W, 工作 5 s 停歇 5 s), 即得聚合物自组装纳米胶束。在 5000 r/min 的搅拌速度下将 1 mL 溶有阿霉素的 DMSO 溶液缓慢滴加至上述所得胶束溶液中, 避光搅拌后转移至透析袋中透析 20 h 即得载药胶束。

## 1.3 表征方法

### 1.3.1 临界胶束浓度的测定

采用稳态荧光探针法以芘作探针测定两性性聚合物的临界胶束浓度 (CMC) <sup>[21-22]</sup>。将芘定量溶于丙酮配制成浓度为  $6 \times 10^{-6}$  mol/L 的溶液, 精确移取 1 mL 至 10 mL 的容量瓶中, 60 °C 条件下待丙酮挥发后, 将配制的质量浓度为 0.500, 0.300, 0.200,

0.100, 0.050, 0.025, 0.010 和 0.005 mg/mL 的 CHS-HPCHS 聚合物胶束加入到容量瓶中, 静置 24 h。通过荧光分光光度计在室温下测量芘的稳态荧光激发光谱。

### 1.3.2 载药胶束的载药量和包封率的测定

配制阿霉素标准溶液, 采用紫外可见分光光度计测定其在波长 479 nm 处的吸光度, 绘制紫外吸收标准曲线。称取一定量的载阿霉素聚合物胶束, 溶解后测定阿霉素的含量, 载药量和包封率计算见公式 (1)、(2)。

$$L = \frac{m_1}{m_2} \times 100\% \quad (1)$$

$$E = \frac{m_1}{m_0} \times 100\% \quad (2)$$

其中,  $L$  为载药量;  $E$  为包封率;  $m_0$  为初始投入阿霉素的总质量;  $m_1$  为载药胶束中阿霉素的质量;  $m_2$  为载药胶束总质量。

### 1.3.3 胶束的体外溶出实验

采用动态透析法将制备的载药胶束溶液加入透析袋中, 分别于 pH 5.5 及 pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液在 37 °C、100 r/min 恒温水浴下振荡, 间隔一定时间取样。利用紫外分光光度法确定药物浓度, 根据公式 (3) 计算阿霉素的累积释放率。

$$C = \frac{n_1}{n_0} \times 100\% \quad (3)$$

其中,  $C$  为阿霉素的累积释放率;  $n_1$  为一定时间释放出的阿霉素的物质的量;  $n_0$  为初始投入的阿霉素的总物质的量。

### 1.3.4 胶束细胞毒性的测定

采用 MTT 法 <sup>[23-24]</sup> 考察空白胶束及其载药胶束对宫颈癌 (HeLa) 细胞与乳腺癌 (MCF-7) 细胞的细胞毒性。将 HeLa 和 MCF-7 细胞接种于 DMEM 培养基 (含有胎牛血清、青链霉素混合液) 的 96 孔板中, 培养 24 h 后分别加入 20  $\mu\text{L}$  载药胶束、药物溶液 (空白对照组加入等量的 PBS 缓冲液), 继续培养 24 h。之后在孔板中每孔加入 20  $\mu\text{L}$  质量浓度为 5 mg/mL 噻唑蓝的 PBS 溶液, 继续培养 4 h。吸去全部培养液, 在每个孔板中加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO, 使形成的固体完全溶解于 DMSO。采用酶标仪检测 570 nm 处的吸光度值, 以未加样品的培养孔为空白对照组, 根据公式 (4) 计算细胞存活率。

$$V = \frac{A_1}{A_0} \times 100\% \quad (4)$$

其中,  $V$  为细胞存活率;  $A_1$  为实验组的 OD 值;  $A_0$  为对照组的 OD 值。

2 结果与讨论

2.1 CHS-HPCHS-FA 的化学结构

原料 CHS、HPCHS 和产物 CHS-HPCHS 的红外谱图如图 1 所示。对比发现, 产物 CHS-HPCHS 在  $1750\text{ cm}^{-1}$  处出现了特征峰, 对应 CHS 上的羰基, 且对比产物与原料 CHS 红外谱图可看出其余特征峰的强度和位置均不同, 说明产物中没有 CHS 残留。而在  $1650\text{ cm}^{-1}$  处酰胺键的峰强度有所增加, 进一步说明 CHS 与 HPCHS 发生反应时形成了酰胺键。

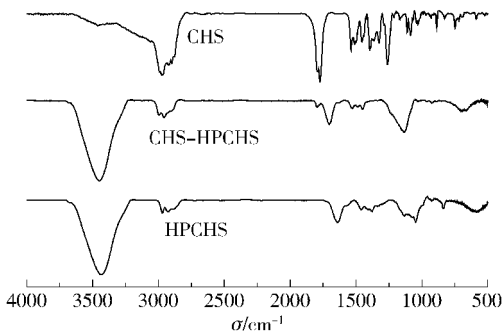


图 1 原料和产物的红外谱图

Fig. 1 FT-IR spectra of reactants and products

图 2 所示 CHS-HPCHS 的  $^1\text{H-NMR}$  谱图在  $\delta = 2.61, 2.68$  出现的峰归属于 CHS 的  $-\text{CH}_2\text{CO}-$  的特征峰, 进一步证实 CHS 已偶联到 HPCHS 上。

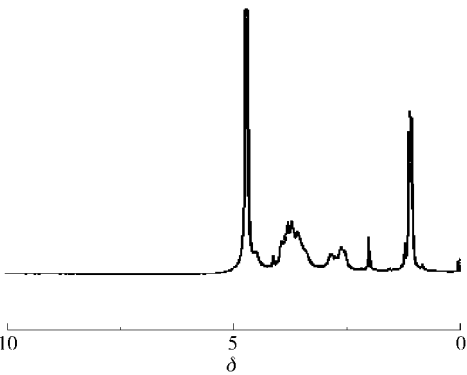


图 2 CHS-HPCHS 的核磁氢谱图

Fig. 2  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of CHS-HPCHS

改变 CHS 投料量合成两种 CHS 取代度不同的 CHS-HPCHS, 采用元素分析法得到 CHS 取代度结果如表 1 所示。

选择 CHS 取代度为 6% 的聚合物 CHS-HPCHS 与叶酸进行反应, 得到产物为 CHS-HPCHS-FA 的

表 1 CHS-HPCHS 中 CHS 的取代度 (DS) 分析  
Table 1 Analysis of the degree of substitution (DS) of CHS

聚合物	$m_{\text{CHS}}/\text{mg}$	$w_{\text{C}}/\%$	$w_{\text{H}}/\%$	DS/%
HPCHS	0	45.94	6.92	0
CHS-HPCHS-1	35	47.17	8.21	2
CHS-HPCHS-2	75	50.69	8.20	6

$^1\text{H-NMR}$  谱图如图 3 所示。图中  $\delta = 8.68, 7.61, 6.79$  等位移处 (图中圆圈标示) 出现叶酸的 特征峰, 说明 叶酸成功修饰在 CHS-HPCHS 上。

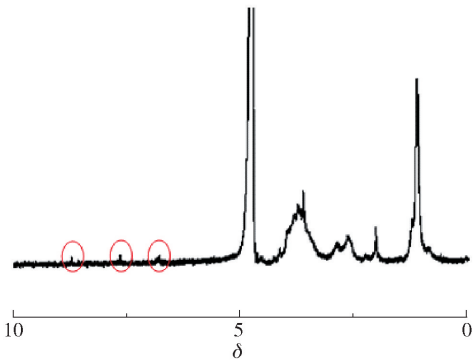


图 3 叶酸靶向、取代度为 6% 的 CHS-HPCHS 的核磁氢谱图

Fig. 3  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of 6% CHS-HPCHS-FA

由于叶酸的取代度较低, 而其在波长  $356\text{ nm}$  处有紫外特征吸收峰, 因此应用紫外分光光度法确定叶酸的取代度。分析得到在现有制备条件下制得的产物中叶酸的取代度为 0.9%。

2.2 胶束的 CMC 及 pH 响应行为

以激发光谱中波长为  $338\text{ nm}$  和  $333\text{ nm}$  处的荧光强度比值对浓度的对数作图, 得到产物 CHS-HPCHS-1 聚合物的 CMC 值为  $0.0955\text{ mg/mL}$ , CHS-HPCHS-2 聚合物的 CMC 值为  $0.0562\text{ mg/mL}$ 。两种不同取代度的 CHS-HPCHS 的临界胶束浓度都很低, 表明它们均可以在较低浓度的水相中自组装形成稳定的胶束。相比之下, CHS-HPCHS-2 聚合物的临界胶束浓度更低, 这是由于疏水片段取代度越高, 越容易形成胶束疏水内核, 从而在相对较低的浓度下也可以形成稳定的胶束, 保持结构完整。采用激光粒度分析仪和 zeta 电位测定仪考察不同 pH 条件下两种不同 CHS 取代度的聚合物胶束粒径及 zeta 电位变化, 结果列于表 2。

从表中可以看出, CHS-HPCHS-1 聚合物胶束的粒径大于 CHS-HPCHS-2 聚合物胶束的粒径, 是由于疏水片段增加导致疏水内核结构紧缩而粒径减

表 2 CHS-HPCHS-1 和 CHS-HPCHS-2 在不同 pH 条件下的粒径和电位变化

pH	粒径/nm		PDI		电位/mV	
	CHS-HPCHS-1	CHS-HPCHS-2	CHS-HPCHS-1	CHS-HPCHS-2	CHS-HPCHS-1	CHS-HPCHS-2
7.4	409.4	215.7	0.402	0.299	-0.4	-0.8
6.8	406.0	274.1	0.301	0.357	0.7	0.5
5.5	466.9	285.6	0.276	0.278	9.4	10.5
4.6	504.6	438.4	0.291	0.292	17.5	17.7

小。随着 pH 值降低,两种不同取代度的胶束粒径和 zeta 电位均增大。这是由于壳聚糖具有氨基,在酸性条件下 HPCHS 链段发生溶胀,导致胶束结构变得松散,从而粒径增大。pH 从 7.4 变化到 4.6, CHS-HPCHS-2 胶束粒径从 215.7 nm 变为 438.4 nm,zeta 电位从 -0.8 mV 变为 17.7 mV。以上结果表明,CHS-HPCHS 胶束具有明显的 pH 响应性,通过调节体系酸碱度,可以实现对药物的控释。

2.3 胶束的载药性能

采用透析法制备载阿霉素胶束,考察了不同投药比时聚合物胶束的载药效果,结果如表 3 所示。可以看出,随着投药比的增大,载药量有所增加,包封率则略有降低。在相同投药比的条件下,CHS-HPCHS-2 的载药量与包封率均高于 CHS-HPCHS-1,这是由于疏水片段取代度越高,越有利于对难溶性药物的增溶,从而更有助于对药物的负载;而 CHS-HPCHS-2 与 CHS-HPCHS-FA 相比载药量与包封率基本接近,说明叶酸的引入基本不影响胶束对阿霉素的载药量及包封率。

表 3 聚合物载阿霉素胶束的表征

载体	投药比	载药量/	包封率/
	( <i>m</i> <sub>药</sub> : <i>m</i> <sub>载</sub> )	%	%
CHS-HPCHS-FA	1:10	6.4	68.4
	1:5	10.4	58.1
CHS-HPCHS-2	1:10	6.3	67.2
	1:5	9.7	53.7
CHS-HPCHS-1	1:10	4.7	49.3
	1:5	5.8	30.8

2.4 胶束的体外释药行为

不同 pH 条件下载阿霉素胶束体外释放曲线如图 4。可以看出载阿霉素胶束的释药速率与载体本身性质以及 pH 环境有关。3 种不同的聚合物载药

胶束在释药初期均不存在突释现象,而且都表现出 pH 响应释药行为。在 pH 5.5 条件下胶束的释药更快,速率均约为 pH 7.4 条件下的 1.5 倍。结合表 2

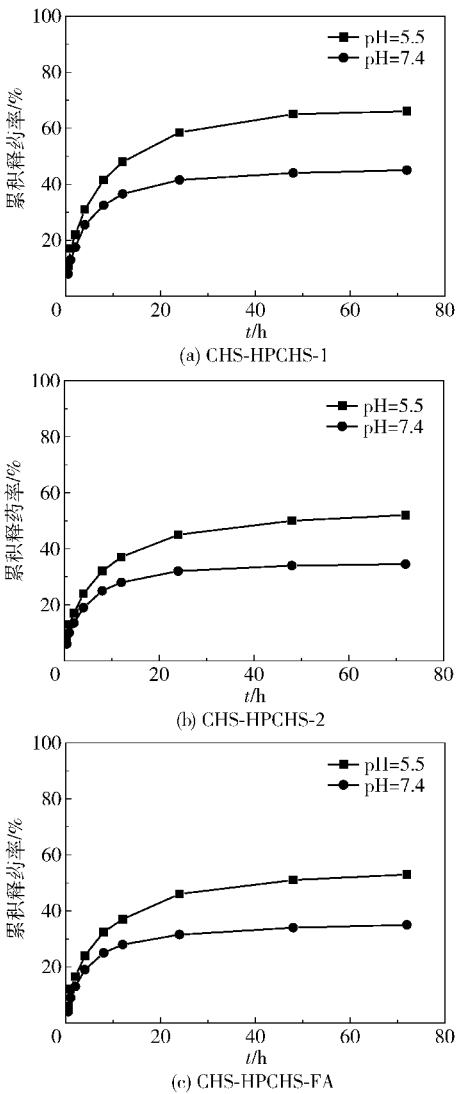


图 4 pH 5.5 和 pH 7.4 条件下载药胶束中 DOX 的释药情况

Fig. 4 DOX release from drug-loaded micelles at pH 5.5 and pH 7.4



的分析结果可知,pH 5.5 条件下 HPCHS 链段发生溶胀,胶束结构变得松散,从而加速了药物的释放。

同时,对于 CHS-HPCHS 载药胶束,CHS 的取代度越高,释药速率越慢。在 pH 5.5 的条件下,CHS-HPCHS-1 载药胶束在 72 h 释药 66%,而 CHS-HPCHS-2 载药胶束在 72 h 只释放了 52% 的药物。这可能还是由于疏水片段增加导致疏水内核结构更加紧凑,从而阻碍了药物的向外扩散。同时还可以发现,叶酸修饰对载体的释药性能几乎没有影响。

## 2.5 胶束的细胞毒性

CHS-HPCHS-2 和 CHS-HPCHS-FA 胶束对 MCF-7、HeLa 细胞的细胞毒性如图 5 所示。加药 24 h 后在胶束质量浓度为  $1000 \mu\text{g}/\text{mL}$  的条件下细胞存活率均在 80% 左右,表明两种胶束的细胞毒性都较小,生物相容性良好,适合作为药物载体应用于肿瘤的治疗。

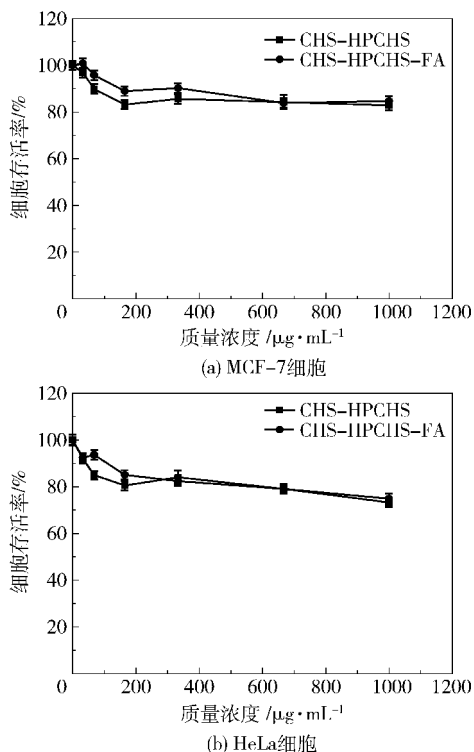


图5 聚合物胶束的细胞毒性

Fig.5 Cytotoxicity test results for the polymer micelles

加药 24 h 后 CHS-HPCHS-2 和 CHS-HPCHS-FA 载阿霉素胶束及原料药阿霉素对于 MCF-7、HeLa 两种细胞的毒性如图 6 所示。

对于 MCF-7 细胞,加药 24 h 后阿霉素的  $\text{IC}_{50}$  值(细胞存活率为 50% 条件下对应的药物的质量浓

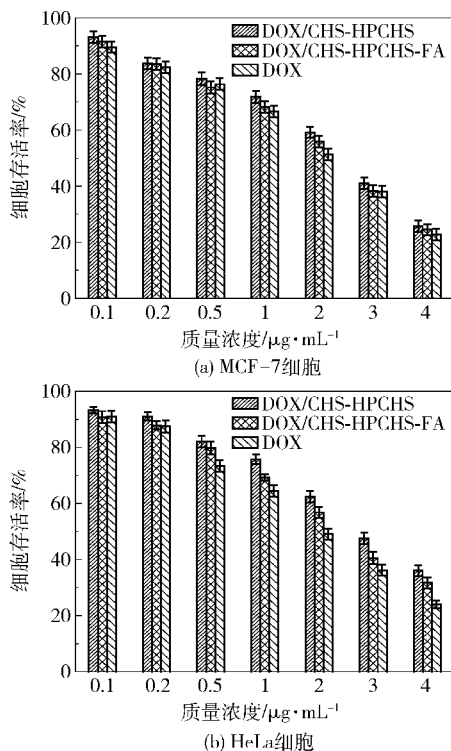


图6 分别在 MCF-7 细胞和 HeLa 细胞中培养 24 h 后阿霉素载药胶束的细胞毒性

Fig.6 Cytotoxicity of doxorubicin-loaded micelles after 24 h culture in MCF-7 cells and HeLa cells

度)为  $2.06 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,CHS-HPCHS-FA 载药胶束  $\text{IC}_{50}$  值为  $2.40 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,CHS-HPCHS-2 载药胶束  $\text{IC}_{50}$  值为  $2.52 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。对于 HeLa 细胞,加药 24 h 后阿霉素的  $\text{IC}_{50}$  值为  $1.97 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,CHS-HPCHS-FA 载药胶束  $\text{IC}_{50}$  值为  $2.43 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,CHS-HPCHS-2 载药胶束  $\text{IC}_{50}$  值为  $2.81 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。可以看出,与 CHS-HPCHS-2 载阿霉素胶束相比,CHS-HPCHS-FA 载阿霉素胶束的细胞毒性均有明显增加,显示出一定的靶向抗肿瘤效果。

## 3 结论

(1)成功制备了同时具有叶酸靶向和 pH 响应的壳聚糖衍生物,该聚合物可以在较低浓度下自组装形成稳定胶束,胶束粒径在  $200 \sim 400 \text{ nm}$ 。

(2)聚合物中疏水片段的增加有助于提高阿霉素的负载量;体外释药行为表明,pH 5.5 的条件下阿霉素的释药速率约为 pH 7.4 条件下的 1.5 倍。

(3)聚合物胶束具有良好的生物相容性,经叶酸修饰的载药胶束可增强肿瘤细胞的摄取,细胞毒性明显增强,表现出一定的靶向抗肿瘤效果,有望成为具有良好应用前景的靶向抗肿瘤药物载体。

## 参考文献:

- [1] Bae Y, Kataoka K. Intelligent polymeric micelles from functional poly (ethylene glycol)-poly (amino acid) block copolymers [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009, 61(10): 768-784.
- [2] Kwon G S, Kataoka K. Block copolymer micelles as long-circulating drug vehicles [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012, 64: 237-245.
- [3] Huang C K, Lo C L, Chen H H, et al. Multifunctional micelles for cancer cell targeting, distribution imaging, and anticancer drug delivery [J]. *Advanced Functional Materials*, 2007, 17(14): 2291-2297.
- [4] Liu P, Wang B C, Li J, et al. Multi-anticancer drugs encapsulated in the micelle: a novel chemotherapy to cancer [J]. *Medical Hypotheses*, 2008, 71(3): 379-381.
- [5] Oerlemans C, Bult W, Bos M, et al. Polymeric micelles in anticancer therapy: targeting, imaging and triggered release [J]. *Pharmaceutical Research*, 2010, 27(12): 2569-2589.
- [6] Stubbs M, McSheehy P M J, Griffiths J R, et al. Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment [J]. *Molecular Medicine Today*, 2000, 6(1): 15-19.
- [7] Haag R. Supramolecular drug-delivery systems based on polymeric core-shell architectures [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2004, 43(3): 278-282.
- [8] Vaupel P. Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology [J]. *Seminars in Radiation Oncology*, 2004, 14(3): 198-206.
- [9] Kim J, Dang C V. Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect [J]. *Cancer Research*, 2006, 66(18): 8927-8930.
- [10] Guo X D, Zhang L J, Chen Y, et al. Core/shell pH-sensitive micelles self-assembled from cholesterol conjugated oligopeptides for anticancer drug delivery [J]. *AICHE Journal*, 2010, 56(7): 1922-1931.
- [11] Yang Q, Wang S C, Fan P W, et al. pH-responsive carrier system based on carboxylic acid modified mesoporous silica and polyelectrolyte for drug delivery [J]. *Chemistry of Materials*, 2005, 17(24): 5999-6003.
- [12] Ko J, Park K, Kim Y S, et al. Tumoral acidic extracellular pH targeting of pH-responsive MPEG-poly ( $\beta$ -amino ester) block copolymer micelles for cancer therapy [J]. *Journal of Controlled Release*, 2007, 123(2): 109-115.
- [13] Min K H, Kim J H, Bae S M, et al. Tumoral acidic pH-responsive MPEG-poly ( $\beta$ -amino ester) polymeric micelles for cancer targeting therapy [J]. *Journal of Controlled Release*, 2010, 144(2): 259-266.
- [14] Sethuraman V A, Lee M C, Bae Y H. A biodegradable pH-sensitive micelle system for targeting acidic solid tumors [J]. *Pharmaceutical Research*, 2008, 25(3): 657-666.
- [15] Zhu J D, Zhou Z C, Yang C H, et al. Folate-conjugated amphiphilic star-shaped block copolymers as targeted nanocarriers [J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2011, 97(4): 498-508.
- [16] Licciardi M, Craparo E F, Giammona G, et al. *in vitro* Biological evaluation of folate-functionalized block copolymer micelles for selective anti-cancer drug delivery [J]. *Macromolecular Bioscience*, 2008, 8(7): 615-626.
- [17] Liu Y H, Sun J, Cao W, et al. Dual targeting folate-conjugated hyaluronic acid polymeric micelles for paclitaxel delivery [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, 421(1): 160-169.
- [18] Valencia P M, Hanewich-Hollatz M H, Gao W W, et al. Effects of ligands with different water solubilities on self-assembly and properties of targeted nanoparticles [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(26): 6226-6233.
- [19] Mori A, Klibanov A L, Torchilin V P, et al. Influence of the steric barrier activity of amphipathic poly (ethyleneglycol) and ganglioside GM<sub>1</sub> on the circulation time of liposomes and on the target binding of immunoliposomes in vivo [J]. *FEBS Letters*, 1991, 284(2): 263-266.
- [20] Du J Z, Du X J, Mao C Q, et al. Tailor-made dual pH-sensitive polymer-doxorubicin nanoparticles for efficient anticancer drug delivery [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133(44): 17560-17563.
- [21] Kalyanasundaram K, Thomas J K. Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1977, 99(7): 2039-2044.
- [22] Xue Y N, Huang Z Z, Zhang J T, et al. Synthesis and self-assembly of amphiphilic poly (acrylic acid-*b*-DL-lactide) to form micelles for pH-responsive drug delivery [J]. *Polymer*, 2009, 50(15): 3706-3713.
- [23] Ferrari M L, Telles M A, Ferrazoli L, et al. Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line antimycobacterial agents in a Brazilian hospital: assessing the utility of the tetrazolium (MTT) microplate assay [J]. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 2010, 105(5): 661-664.
- [24] Yoo H S, Lee K H, Oh J E, et al. In vitro and in vivo anti-tumor activities of nanoparticles based on doxorubicin-PLGA conjugates [J]. *Journal of Controlled Release*, 2000, 68(3): 419-431.

## Synthesis and characterization of folate modified pH-responsive micelles of chitosan derivatives

FAN RongRong XI YueWei WANG JieXin LE Yuan<sup>\*</sup>

(State Key Laboratory of Organic-Inorganic Composites, College of Chemical Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

**Abstract:** N-(2-hydroxypropyl) derivative of folate (FA) and cholesteryl hemisuccinate (CHS) conjugated chitosan (CHS-HPCHS-FA) have been synthesized. CHS-HPCHS-FA can self-assemble to form 200 – 400 nm micelles in aqueous media. The effects of the degree of substitution (DS) of CHS on the critical micelle concentration (CMC), particle size, drug loading capacity and drug release behaviour were studied. The mechanism of pH-responsive controlled drug release was investigated. The results indicated that CHS-HPCHS-FA micelles with a higher DS of CHS groups showed lower CMC values, smaller size and higher drug loading capacity. The in vitro release studies indicated that pH sensitivity enabled rapid drug release at pH 5.5. Furthermore, the micelles are biocompatible and interact well with cells in vitro. Folate-conjugated micelles could thus enhance drug uptake by tumor cells and lead to increased cytotoxicity.

**Key words:** N-(2-hydroxypropyl) chitosan; cholesteryl hemisuccinate; polymeric micelles; pH-responsive; folate targeting

(责任编辑:吴万玲)

### 更正声明

关于《北京化工大学学报(自然科学版)》于2017年第44卷第2期第95页所刊登文章《磁流变阻尼器多目标靶向抑制四跨转子轴系过临界转速振动实验研究》,论文第一作者:杨秀峰,单位:华陆工程科技有限公司。因单位名称有误,现更正为:华陆工程科技有限责任公司,特此声明。