

特约专栏

智能响应型聚合物微粒及其与细胞的相互作用

张文晶, 高长有

(浙江大学高分子科学与工程学系 教育部高分子合成与功能构造重点实验室, 浙江 杭州 310027)

摘要: 智能响应型材料能够感受来自外界的刺激, 导致某些物理或者化学性能发生显著的变化, 因而有着广泛的研究和应用, 尤其是在生物医用材料领域。除传统的温度、光、pH、磁响应方式以外, 主要综述了几种生物信号响应型材料, 例如生物分子、酶、葡萄糖, 以及多重响应型材料; 着重介绍用作基因或药物载体的材料。关注不同响应方式的智能材料与细胞之间的相互作用, 包括智能响应型微粒的胞吞、胞内转运、细胞内的分布以及响应, 和微粒的响应性变化过程比如体积的膨胀收缩, 而非材料本身性质与细胞的相互作用。这些结果有利于在细胞和亚细胞层次上理解响应性材料在基因和药物控释中的生物相容性等问题, 从而更好地设计载体材料。

关键词: 智能响应; 微粒; 基因/药物传递; 聚合物; 微粒与细胞相互作用

中图分类号: R318.08 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-3962(2012)06-0019-12

Intelligent-Responsive Polymeric Particles and Their Interactions with Cells

ZHANG Wenjing, GAO Changyou

(MOE Key Laboratory of Macromolecular Synthesis and Functionalization, Department of Polymer Science and Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract: Intelligent-responsive materials exhibit abrupt changes of physical and/or chemical properties in response to external stimuli. This kind of materials is of great importance in both basic researches and applications, especially in the field of biomedical materials. Besides the traditional photo-, pH-, magnetic-responsive materials, this article briefly summarizes materials responding to several types of biological signals including enzymes, glucose and other biomolecules. The materials with multi-responsive properties are emphasized with respect to the applications for gene and drug delivery. New breakthroughs are introduced on the interactions between the intelligent materials and cells, such as cellular uptake, intracellular transportation and distribution as well as responsivity. The importance of specific stimuli-responsivity such as volume expansion and contraction is envisaged in terms of cells-particles interaction. This would be intriguing to understand the biocompatibility and some other issues of the stimuli-responsive particles, which in turn can guide the design of delivery carriers of better biological performance.

Key words: intelligent-responsive; particles; gene/drug delivery; polymers; interactions between particles and cells

1 前言

智能响应型材料能感受来自外界的刺激, 从而导致某些物理或化学性质的显著变化。外部刺激信号除了包括温度^[1-8]、光^[9-10]、pH^[7,11-15]、离子强度^[16]、电场^[17-18]、磁场^[5,19-21]等, 还包括生物分子浓度^[7,22-23]、酶^[24]、氧化-还原^[25]等。刺激响应型材料通过对外界刺激信号的响应进而可以实现一些特定的功

能, 如: 调控离子或分子的运输, 改变浸润性或是对特定物质的粘附性, 或是实现某些化学或者生物化学信号与光、热、电、磁信号之间的转变等。因此近年来受到人们的广泛关注并得到了大量深入的研究, 也广泛应用于基因和药物传递、诊断、组织工程、智能光学系统、生物传感器等方面^[26-32]。

智能响应材料在生物医学领域的应用尤为重要。通过材料对某些特定信号或者生物体内某种特定信号的响应, 可以实现疾病的诊断和治疗, 例如增强基因或药物的靶向性和释放的可控性。本文主要关注应用于生物医学领域中的智能响应型材料, 重点关注响应过程与细胞之间的相互作用, 包括细胞对微粒的吞噬, 微粒在细胞内的转运和分布, 以及响应型微粒在细胞内的响应

收稿日期: 2012-04-01

基金项目: 国家自然科学基金(51120135001), 浙江省自然科学基金(Z4090177)资助

作者简介: 张文晶, 女, 1986年生, 博士

通信作者: 高长有, 男, 1966年生, 教授, 博士生导师

作用。

2 响应型载体微粒及作用原理

随着高分子领域的逐渐发展和完善,人们已经从新型聚合物材料的研发转为开发功能性和智能型材料。因此智能响应型材料近年来引起科研工作者广泛的兴趣,相关的文章和报道也较为全面和丰富。本节对传统的响应型材料仅作简要介绍,更关注于近年来新兴的响应型材料如氧化还原响应、葡萄糖响应、酶响应型材料。

2.1 单一响应

2.1.1 物理信号响应

温度响应 温度响应型材料研究较多的是具有最低临界相转变温度(LCST)和最高临界相转变温度(UCST)的两类物质。这两类物质中同时含有亲水和疏水链段,通过温度的调控实现亲疏水的转变,宏观表现为在水中溶解和不溶解两种状态,同时可能伴随着其它一些物理性质的改变。LCST类物质中研究较多的是N取代的丙烯酰胺类聚合物,其中以聚N-异丙基丙烯酰胺(PNIPAM)研究最多。Gao等合成了带羧基的PNIPAM^[33]后,将其与聚烯丙基胺(PAH)接枝制备了具有34℃最低临界相转变温度的温敏型共聚物^[34]。在此基础上Mao^[35]利用PNIPAM-COOH与三甲基壳聚糖接枝共聚制备温敏纳米粒子,并将其用作基因载体。通过改变温度可调控基因的转染,例如在25℃时,该温敏的基因载体转染效果较好,可达到脂质体2000的效果。

磁响应 磁性对于生命体有着很重要的影响。血液当中的血红蛋白由于本身含铁而具有磁响应性。同时,大量证据表明在所有的生命体包括动物与人体内,存在着大量的磁性微粒作为磁性受体而存在^[36]。磁响应型纳米微粒在生物医用领域有着广泛的应用,包括细胞分选^[37-38]、基因和药物传递以及磁共振成像的增强剂等^[39-40]。

采用聚合物或者天然大分子包覆磁性纳米粒子是一种重要的制备磁性胶体微粒的方法。传统的乳液聚合即是一种方便而有效的方法。Xu等人^[41]将丙烯酰胺单体、交联剂、乳化剂等与磁性的氧化铁纳米粒子共同分散在反应液当中,通过乳液聚合的方法,制备得到了具有超顺磁性的聚丙烯酰胺微粒。磁性纳米粒子可以作为“纳米加热器”来杀死肿瘤细胞^[42]。通过胞吞途径,5~90 nm的磁性纳米微粒可以有效地进入细胞内部。在细胞培养环境下施加一个高频变换的磁场,由于磁场的高频变换,磁性纳米粒子不会发生运动,磁场的能量转变为热量,使得纳米粒子温度升高,达到杀死肿瘤细胞的作用。

光响应 通过在微粒中引入光响应的基团或者分子,即可实现微粒对光的响应。由于光响应具有简易、快捷、高效的特点,光响应型材料也成为广为关注的热点之一。光响应材料有2个很重要的优点:①光可以通过模板实现区域化,因此可以控制光照的位置来实现特定区域的响应;②光照时间也就是反应时间易于调控,可实现材料的性质精确调控^[43-44]。

2.1.2 化学信号响应

pH响应 pH响应型材料在靶向到特定部位以后,产生特定的响应,可用于基因和药物控制的定点和定时释放^[13]。

聚甲基丙烯酸(PMAA)及其共聚物制备的纳米微粒是其中很重要的一类^[45]。在胃液酸性(pH=1~3)的环境中,该纳米粒子紧缩;在通过胃部以后,纳米粒子由于pH的升高发生溶胀从而实现药物的可控释放。研究表明,装载了胰岛素的甲基丙烯酸和乙二醇共聚物PMAA-PEG纳米粒子在pH=7.4时,2 h即可实现90%的胰岛素的释放;而在相同的时间内,pH=1.2的环境中,纳米微粒大约只有10%的胰岛素释放。此外,MAA与丙烯酸甲酯(MA)或者丙烯酸乙酯(EA)的共聚物由于具备pH响应性,可用于肠道不同部位的药物释放。例如,Eudragit L100-55是一种商品化的MAA与EA的共聚物,当pH>5.5时可以发生溶解,从而可用于十二指肠部位的药物释放^[46]。与此类似,Eudragit S100是MAA与MA的共聚物,在pH>7.0时可以发生溶解,可用于回肠的药物释放^[47]。

氧化还原响应 某些化学键可以与特定的生物分子发生氧化还原反应,例如二硫键可以被谷胱甘肽(Glutathione, GSH)分子所还原^[48]。脂质体作为一种市售的药物载体有着广泛的应用;采用二硫键将药物共价接枝到脂质体上或者采用二硫键作为脂质体的交联剂都可以实现脂质体对谷胱甘肽分子的响应,进而实现释放药物的目的。基于硫代胆固醇制备的阳离子脂质体可以被用作DNA的载体。在较低浓度的还原剂的存在下,即可实现对DNA的释放^[49]。同时,Kirpotin等人^[50]制备了聚乙二醇(PEG)包覆的脂质体,PEG与脂质体通过二硫键连接。由于PEG的存在,该载体在体内可以实现长时间的循环,进而实现在肿瘤部位的富集。当载体到达靶向细胞的内部时,会被细胞内的谷胱甘肽还原,实现药物或基因的释放。

2.1.3 生物学信号的响应

葡萄糖响应 糖尿病现在已经成为威胁人类健康的主要慢性病之一,葡萄糖响应型材料因其葡萄糖响应性和在胰岛素传递方面的潜在应用,受到人们的广泛关

注。由于胰岛素等多肽类药物在体内很容易被降解,因此需要载体复合该类药物治疗,以实现靶向治疗的目的^[51-52]。

通过葡萄糖氧化酶与 pH 响应的水凝胶结合来感应葡萄糖浓度的变化是一种重要的控制胰岛素释放的体系。包覆有葡萄糖氧化酶的 pH 响应水凝胶中,葡萄糖可以转变为葡萄糖酸,从而降低水凝胶当中的 pH,这会引起水凝胶的溶胀,进而实现胰岛素的释放。Horbett 等人^[23]将甲基丙烯酸二乙氨基乙酯-co-甲基丙烯酸 2-羟基丙酯(DEA-co-HPMA)共聚薄膜与交联的聚丙烯酰胺(AM)膜结合,其中膜上修饰了葡萄糖氧化酶。在葡萄糖存在的情况下,胰岛素可以很容易地通过膜实现释放。研究表明,这个过程需要两个条件才能实现,一是葡萄糖氧化酶的反应,一是 pH 响应体系的溶胀,其中胰岛素的释放速率和修饰的葡萄糖氧化酶的量成正比。

酶响应 可以靶向核酸或者蛋白质的酶降解型载体粒子近年来引起了人们的兴趣。

苯硼酸与含羟基的糖类化合物可以生成一种稳定的络合物。汤宇^[53]等人以 3-丙烯酰胺基苯硼酸(AAPBA)与马来酸酐改性的环糊精(MAH- β -CD)为单体,合成了两亲性聚合物。该聚合物在溶剂中可以自组装成胶束,从而实现对药物的装载及其在糖响应下的可控释放。Hoare 等人^[54]采用 EDC 偶联的方法将 3-氨基苯硼酸修饰到 NIPAM 与丙烯酸(AA)共聚的微凝胶上,得到了葡萄糖响应的微凝胶,通过改变葡萄糖浓度可以很好的实现微凝胶的体积转变。Du 等^[55]将一种单体与葡萄糖响应的 3-丙烯酰胺基苯硼酸,分批加入反应釜中,通过连续的自由基聚合合成的中空纳米微球在 $pK_a = 8.86$ 时,具有葡萄糖响应性,且溶胀度正比于葡萄糖浓度。

Zhu^[56]以及 Tong^[57]等制备了含有伴刀豆球蛋白(Concanavalin A, Con A)的中空微胶囊,由于 Con A 与糖分子的特异性结合作用,该微胶囊在糖类的水溶液中可实现其响应性。

聚(乙二醇丙烯酸酯)(PEGA800)分子上修饰嗜热菌蛋白酶(Thermolysin)可切断的两亲性多肽链,通过在体系中引入嗜热菌蛋白酶,可以将特定部位的肽键切断,使得含有羧基的肽链从该分子上脱落下来,这样微粒就从中性变成了阳离子化,进而发生溶胀,释放其中包覆的蛋白质^[58]。

De Geest 等^[59]在 2006 年制备了可酶解的微胶囊。两类以 $CaCO_3$ 为模板的可降解微胶囊通过层层自组装的方法制备。第一种是以聚精氨酸(PARG)为聚阳离子,

以磺化葡聚糖(DEXS)为聚阴离子;第二种是以甲基丙烯酸羟丙酯-二甲基乙醇胺共聚物 P(HPMA-DMAE)为聚阳离子,以聚苯乙烯磺酸钠(PSS)为聚阴离子。聚精氨酸可以被细胞内的酶降解,而 P(HPMA-DMAE)则会发生水解。采用上述微胶囊包覆异硫氰酸酯荧光素(FITC)修饰的葡聚糖。共聚焦显微镜观察发现,两种微胶囊都可以在细胞内发生降解,释放出包覆的大分子。

2.2 双重或多重响应

单一响应型材料所能实现的功能也较为单一,仅可以实现药物的靶向释放或基因的靶向传递,比如磁响应型材料在应用中仅可以实现热疗。而多重响应型载体在未来的实际应用中,因为其可同时对多种刺激进行响应,更加有利于在复杂的生理环境下实现功能,比如靶向的药物载体同时负载磁响应型粒子,在靶向药物释放的同时,可通过磁热疗增加疗效。因此多种响应性协同作用具有更加广泛的应用和实际意义。

2.2.1 双重响应

Xing 等人^[60]制备了具有互穿网络(IPN)结构的双重响应中空纳米水凝胶,通过温度响应调控药物装载, pH 响应控制药物释放。Chen 等人^[61]制备了具有温度和 pH 双重响应的亲疏水反转胶束的水凝胶,如图 1^[61]所示。该胶束由聚谷氨酸(PLG)和超分子的聚氧化乙烯(PEO)嵌段共聚物组成,同时将 α -环糊精(α -CD)与 PEO 形成超分子复合物。该种水凝胶在温度变化时存在溶胶-凝胶之间的转变。在不同 pH 下的凝胶机理不同。正向胶束的形成首先是 PLG 的成核,然后通过 α -CD 与 PEO 形成超分子复合物,由于 α -CD 分子之间的疏水作用力,形成物理交联点,进而形成凝胶。反向胶束水凝胶的形成首先是以 α -CD/PEO 复合物为核,然后通过 PLG 分子之间的氢键作用物理交联,形成凝胶。胶束中装载的抗癌药物阿霉素(DOX)可在 45 d 内连续释放,说明该响应型材料可以作为一种有效的可注射药物载体。

NIPAM 与丙烯酸(AA)共聚制备的微凝胶具备 pH 和温度双重响应的特性^[62]。将银纳米粒子通过原位还原的方法包埋到凝胶内部,可得到杂化微凝胶;该凝胶在 pH 和温度的调控下可以实现体积膨胀和收缩。由于银与荧光分子之间存在金属增强荧光效应(Metal-Enhanced Fluorescence),在吸附荧光分子 Por^{4+} -5, 10, 15, 20-四(1-甲基-4-吡啶基)卟啉四(对甲苯磺酸盐)后,通过凝胶体积的转变可改变银纳米粒子与荧光分子之间的距离进而实现对该荧光增强效应的调控。

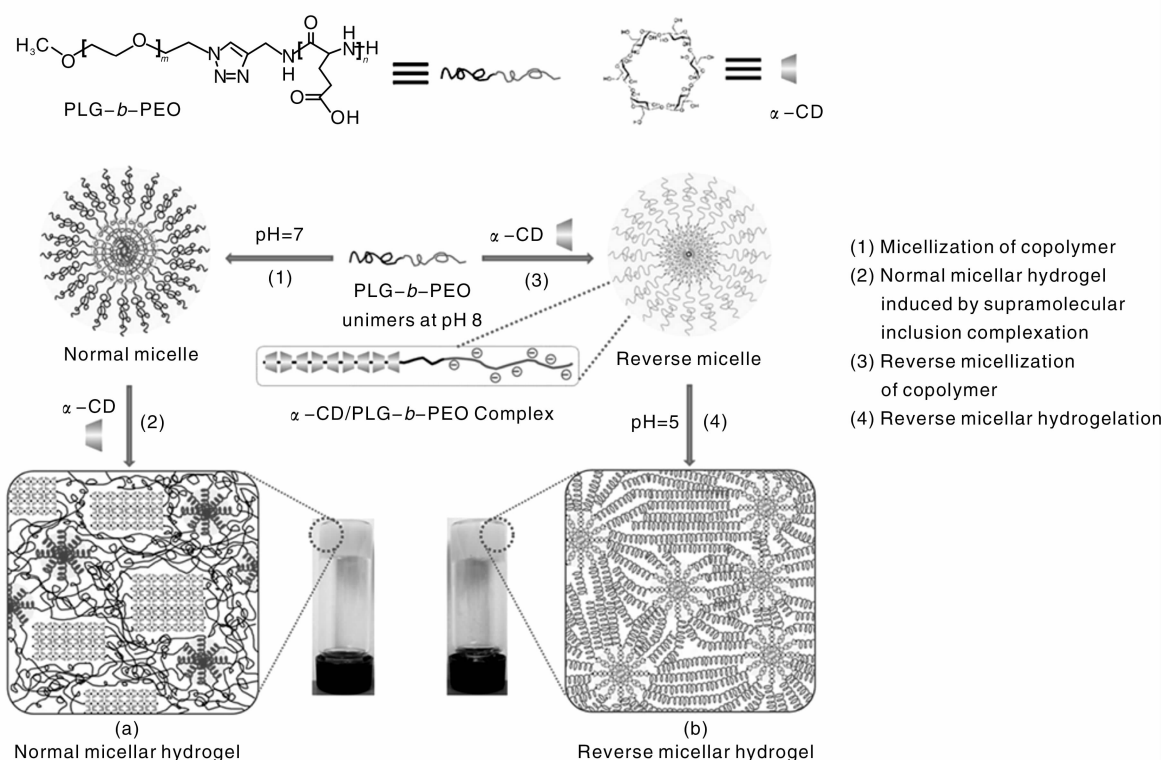


图 1 α -CD/PLG-b-PEO 超分子水凝胶的凝胶机理: (a) 正向水凝胶胶束, (b) 反向水凝胶胶束

Fig. 1 Schematic illustration of the proposed structures and gelation mechanism of supramolecular hydrogels: (a) normal micellar hydrogel and (b) reverse micellar hydrogel

2.2.2 多重响应

有研究者^[63]以带有双键的荧光染料与苯乙烯共聚所得的微球为核, 在外层通过聚合包裹温度响应型聚合物 PNIPAM, 同时负载磁响应的 Fe_3O_4 纳米粒子。在这个复合粒子中, 荧光染料荧光素-O-甲基丙烯酸酯同时具有光响应和 pH 响应特性。因此该粒子为四重响应型微粒。但只局限于概念模型, 并未实现真正的使用价值。

Yuan 等人^[64]将药物通过脰键与 Fe_3O_4 连接, 脰键在酸性条件下可以发生断裂, 因此该体系具备了 pH 响应性。在 Fe_3O_4 纳米微粒表面包覆一层温度响应性的聚合物——聚(N-异丙基丙烯酰胺-co-N, N-二甲基丙烯酰胺)P(NIPAAm-co-MAAm)接枝的壳聚糖分子, 该分子的 LCST 为 38 $^{\circ}\text{C}$ 。因而这个体系具备了磁场、温度和 pH 三重响应性。当温度达到较低温度(低于 38 $^{\circ}\text{C}$), 同时 pH < 5.3 时, 药物可以实现最高效率的释放。

Majewski 等人^[65]在 Fe_3O_4 纳米粒子表面通过原子转移自由基聚合(Atom Transfer Radical Polymerization, ATRP)的方法制备了甲基丙烯酸二甲氨基乙酯(DMAE-MA)的聚合物刷, 该聚合物具备 pH 和温度双重响应性。聚合物刷接枝到磁性纳米粒子表面后, 所得纳米微

粒同样具备 pH 和温度响应的特性, 可以实现 pH 和温度变化时的可逆聚集。该纳米微粒具备很高的基因转染效率。与聚乙烯亚胺(PEI)相比, 该纳米微粒的转染效率是 PEI 的 2 倍, 细胞毒性也不大。除此以外, 由于该磁性纳米微粒是通过胞吞途径进入细胞实现转染, 因此可以通过磁场的作用分选出成功实现转染的细胞(如图 2 所示)^[65]。

3 智能响应型微粒与细胞的相互作用

近年来, 大量的智能型胶体微粒被用于药物和基因的载体传递系统。智能响应型的微粒用于药物装载可以有效地提高治疗癌症等疾病的几率, 并具有以下几个优点: 可以通过修饰具备靶向效应的分子, 促进微粒在特定部位聚集; 通过分子设计, 实现微粒在特定部位如肿瘤处的释放, 或者实现药物在肿瘤细胞内的释放并杀死细胞, 提高药物的利用率, 同时避免杀死正常细胞。在上述过程中, 细胞与微粒的相互作用及过程是其中一个重要环节, 包括进入细胞的过程、微粒在细胞内的转运和分布, 以及在细胞内的响应^[66]。

3.1 胞吞

为了实现最佳的基因或药物靶向效果, 要求载体携

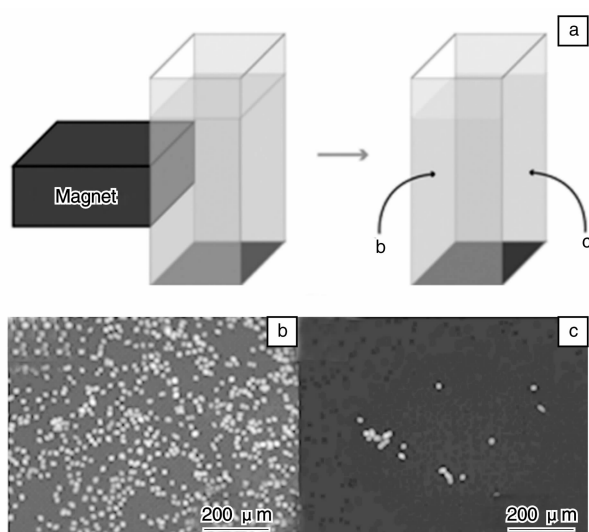


图2 磁场分选磁性纳米粒子/pDNA 复合物转染细胞的(a)分选示意图, (b)顺着磁场方向细胞的荧光显微镜照片, (c)相反方向的器壁上的细胞照片。细胞核使用Hoechst 33258 染色

Fig. 2 Magnetic separation of cells transfected with $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ @(PDMAEMA₅₉₀)₄₆/pDNA polyplexes. Separation scheme (a), Fluorescence microscopy pictures of the cells grown on the wall facing the magnet (b) or on the opposite wall (c). The nuclei were counterstained with Hoechst 33258

带药物到达指定部位, 同时该部位的肿瘤细胞对该载体实现最高效的胞吞, 进而实现释放药物并杀伤肿瘤细胞。因此, 研究载体-药物通过何种途径进入细胞的过程是非常重要的。

胞吞的机理大致如下^[67]: 首先是微粒附着在细胞膜表面, 这部分细胞膜内陷形成小囊, 包围着微粒。然后小囊从细胞膜上分离下来, 形成囊泡, 进入细胞内部。微粒与细胞膜的粘附是粒子与细胞发生相互作用的基础^[68], 也是胞吞的基础。细胞膜表面带有负电, 因此带有正电荷的粒子更容易通过静电作用与细胞发生粘附^[69]。在粒子表面修饰特异性基团, 与细胞表面的受体发生特异性结合; 也可通过某些外力的作用如磁场引导实现粒子向细胞的靶向运动。

只有实现了材料和细胞膜的粘附才能进一步完成与细胞的其它相互作用。通常在聚合物的表面进行修饰^[70], 通过修饰细胞表面配体如适配体的方法可以有效地改善细胞对纳米微粒的胞吞^[71-72]。但是对于响应型聚合物要考虑修饰对响应动力学(响应速率和响应性)和对材料性质改变的影响。

3.2 细胞内的转运过程

非病毒性药物或基因载体, 不同于病毒性载体, 必须克服多种细胞内和细胞外的屏障, 才能完成载体的使

命, 起到相应的作用。以提高非病毒性载体基因传递效率为例, 阐述多重响应型微粒在细胞内的响应过程(如图3^[28]所示): 完成与细胞的粘附, 细胞胞吞进入细胞, 刺激响应引发溶酶体逃逸, 胞液释放, 在细胞内实现装载物的靶向释放。首先使粒子与基因的复合物对酶的降解有一定的稳定性, 延长在血液中的循环时间, 并能靶向到特定的细胞。进入溶酶体后, pH 响应导致溶酶体的破坏或者与溶酶体的膜融合。经刺激降解效应使所负载基因与载体分离, 并在细胞内的目标位置有效地释放核酸, 使核酸进入细胞质或是细胞核而发挥作用。

3.3 细胞内的分布

为实现粒子或转载物质在细胞器内的靶向分布通常要进行一些特异性结合或修饰。质粒 DNA 与小干扰 RNA(siRNA)转运相比, 通常需要进行穿核定位。对于正在分裂的细胞, 质粒 DNA 能够暂时通过已经破坏的核膜进入细胞核, 但是对于分裂的细胞, 质粒 DNA 必须穿过核孔复合体; 而通过自由扩散作用, 这种结构只能允许小分子量的分子通过^[73]。这就需要特殊的核定位信号^[74-75]。

3.4 细胞内的响应

pH 响应微粒 伴随着胞吞过程, 内吞体在膜质子泵的作用下会发生短暂的酸化(2~3 min), 内吞体内的 pH 值迅速降低至 6.0 以下。在这样的酸性环境中, 药物、DNA、siRNA 等被传递的分子可能会发生降解。但这个酸化的过程也可以被用来作为内吞体逃逸和药物释放的刺激因素, 即所谓的“质子海绵”效应。在内吞体的酸性 pH 下, 纳米微粒与质子螯合, 导致内吞体中的渗透压上升, 从而内吞体破裂, 微粒释放到细胞质中。pH 响应的聚合物微粒可用于缓冲内吞体的 pH 变化, 实现药物、DNA 的控制释放^[13]。

含有大量氨基的聚合物常被用来装载药物或者 DNA 来达到类似的效果。例如, 甲氧基聚乙二醇(mPEG)、聚己内酯(PCL)和聚(2-氨基乙基乙烯磷酸盐)(PPEEA)的三嵌段共聚物 mPEG45-b-PCL100-b-PPEEA12^[76] 可以用作 siRNA 的载体。该两亲性的载体可以成功装载 siRNA, 并且实现对 HEK293(人胚肾细胞)细胞的绿色荧光蛋白(GFP)基因的沉默; 同时该载体具有良好的细胞相容性, 细胞毒性较低。

Jeong 等人^[77]制备了可还原的聚(氨基-乙烯亚胺)(Poly(Amido Ethylenimine))作为 siRNA 的载体, 该聚合物通过三甲基四胺和 N,N'-双(丙烯酰)脲胺共聚得到。将其作为内皮细胞生长因子(VEGF)的 siRNA 载体作用于人的前列腺癌细胞, 结果发现该分子相对于线性

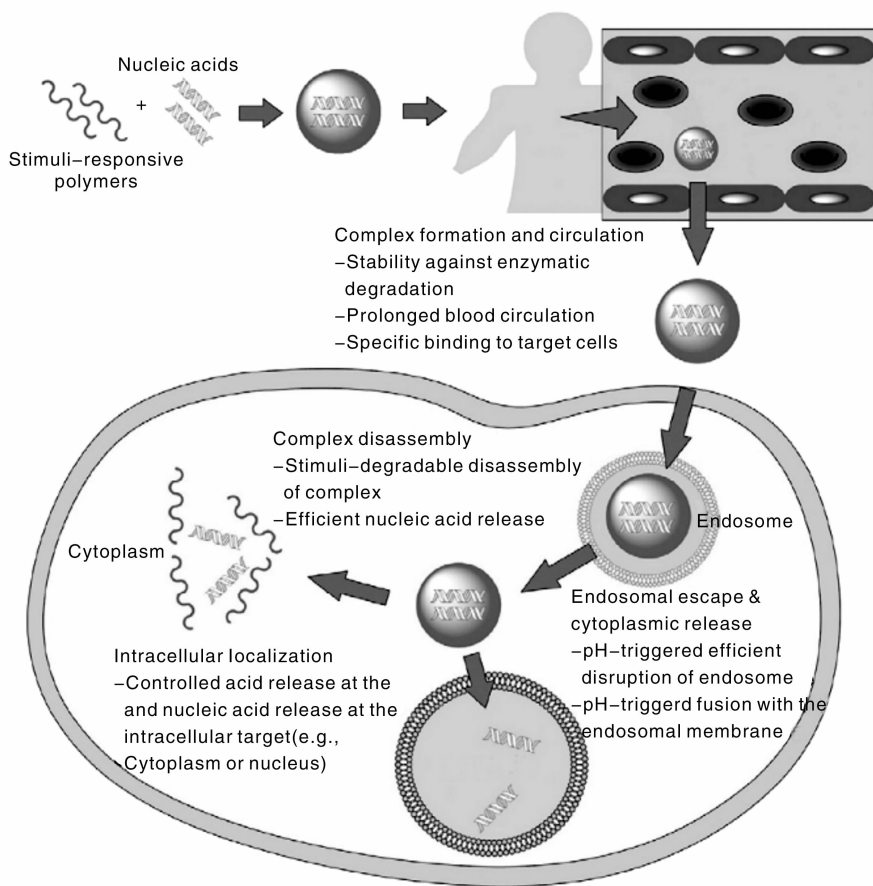


图 3 多种刺激响应型方式协同作用克服基因传递过程中的多重障碍

Fig. 3 Various stimuli-responsive approaches to overcoming multi-dimensional (extra- and intracellular) barriers in nonviral gene delivery

PEI 分子的细胞毒性较低, 同时成功地实现了对 VEGF 基因的沉默。

Cho 等人^[78]以装载绿色荧光蛋白 (GFP) 基因的腺相关病毒为核结构, 聚缩酮 (PK) 包裹荧光素酶小干扰 RNA (Luc siRNA) 为壳结构, 制备成嵌合体纳米粒子 (GFPAAV/Luc siRNA ChNPs)。粒子进入溶酶体之后 (如图 4^[78]), PK 壳层在弱酸性介质中水解增加了溶酶体的渗透压, 使溶酶体破裂, 将 siRNA 释放到细胞质中, 沉默了荧光素酶的表达。同时腺相关病毒核结构通过细胞核的孔通道进入细胞核, 并释放病毒 DNA, 实现绿色荧光蛋白的表达。

Ding 等人^[79]合成了含有 pH 响应基团亚胺的分子。该亚胺基团在 pH 为 7.4 的时候非常稳定, 但是在 pH 降低到 6.5 时, 化学键开始水解。因此当肿瘤细胞吞噬该胶束进入细胞内部以后, 由于细胞的内吞体的 pH 较低 (5.0 ~ 6.5), 胶束发生溶胀; 同时由于胶束上带的正电荷增多, 胶束与膜之间的作用力增强。因此, 内吞体的膜被破坏, 胶束粒子以及胶束装载的药物实现释

放, 达到杀伤肿瘤细胞的目的。

温度响应微粒 温度易于调控, 而且改变温度在十几度 (如 20 °C 到 37 °C) 的变化范围内, 细胞自身的活性不会受到太大的影响, 所以温度响应微粒在药物控释领域中也有着广泛的应用^[80]。

Peng 等人^[81]将 NIPAM 与甲基丙烯酸-2-(N, N-二甲氨基)乙酯 (DMAEMA) 通过自由基聚合共聚, 该共聚物的 LCST 为 41 °C。该载体可以对疏水性的抗癌药物 SN-38 实现有效的装载, 在温度高于 LCST (42 °C) 时的释放速率明显高于温度低于 LCST (37 °C) 时的释放速率, 表明可以通过升高温度的方法来实现药物的有效释放。该载体通过胞吞进入 HT-29 (人结肠癌细胞) 细胞内后, 可以实现药物的释放并有效地杀死 HT-29 细胞, 是一种良好的温度响应性载体。

Guo^[12]等人成功制备了 Pluronic (一种聚醚, 聚乙二醇和聚丙二醇的三嵌段共聚物, PEO-PPO-PEO) 与聚乙炔亚胺 (PEI) 的纳米胶囊; 该胶囊在温度从 37 °C 降低至 20 °C 时, 体积可以膨胀 40 倍左右。当该胶囊胞吞至细

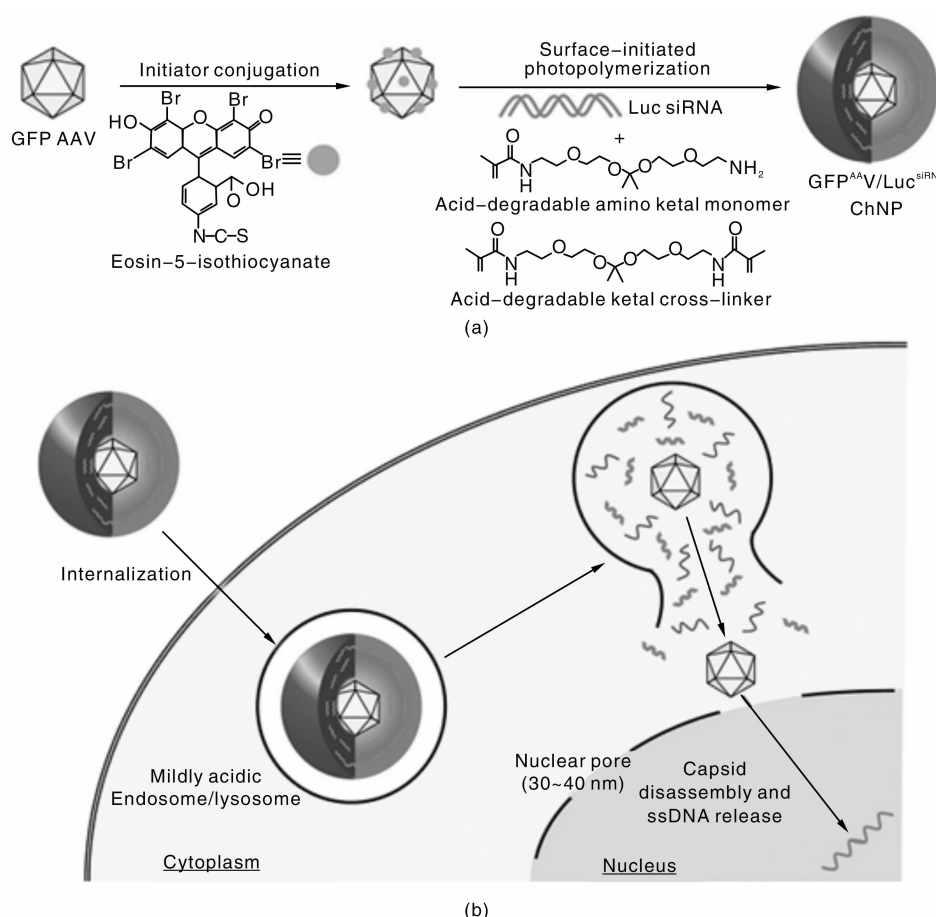


图4 (a)合成的绿色荧光蛋白标记的腺相关病毒核/聚缩酮包裹荧光素酶小干扰RNA壳嵌合体纳米粒子(GFPAAV/Luc siRNA ChNPs), (b)小干扰RNA和腺相关病毒被嵌合体纳米粒子分别转运到细胞质和细胞核中

Fig. 4 (a) Synthesis of ChNPs with a GFP-encoding AAV core and Luc siRNA-encapsulating PK shell (GFPAAV/Luc siRNA ChNPs), (b) Intracellular trafficking of siRNA and AAV core that are differentially delivered by a ChNP to the cytoplasm and the nucleus, respectively

胞内部的内吞体后,通过突然降低温度的方法使得微粒迅速膨胀,细胞的内吞体被破坏,该纳米凝胶迅速分散到了细胞质中。

Lee等人^[82]合成了一种内部由聚赖氨酸(PLL)接枝PEG分子链交联而成,外部为低聚乳酸(OLA)与Pluronic形成的嵌段共聚物胶束组成的纳米凝胶(PLL-g-PEG/OLA-PLU-OLA)。该纳米凝胶具有体积相转变行为,在37℃粒子大小约为150 nm;温度迅速降低至15℃时,粒子的动力学直径可以变为1.4 μm左右。将胞吞该粒子后的人宫颈癌(Hela)细胞在37℃培养30 min,然后迅速降温至15℃,培养30 min,发现细胞活性约为对照组的一半左右。在突然降温后,纳米凝胶粒子由150 nm左右变为1 μm以上,导致细胞无法承受细胞内部的流体静力学压力,破坏了细胞骨架的稳定性和细胞膜结构的完整性,最终导致癌细胞的死亡(如图5^[82])。

氧化还原响应微粒 细胞质中存在着大量的还原性

分子,例如谷胱甘肽(GSH)的含量约为几毫摩尔到几十毫摩尔。而细胞外基质中GSH的含量只有微摩尔量级。因此利用二硫键对还原性分子谷胱甘肽的响应性,可以设计含有二硫键的载体来实现药物在细胞内的有效释放。

Zhao等人^[25]以丙烯酸胺和N-(3-氨基丙基)甲基丙烯酸酯作为单体,通过N,N'-双(丙烯酸)酰胺交联制备得到了氧化还原响应的微粒,采用双丙烯酸酯交联剂体系作为对照。结果发现,包覆了蛋白质的凝胶到达细胞质环境中后,由于谷胱甘肽等分子的存在,该凝胶发生降解从而将蛋白质释放出来。不同功能的蛋白质都可以在细胞质内实现释放。采用该凝胶装载CP-3(一种半胱氨酸蛋白酶,可激活细胞内的凋亡刺激因子)分别进入Hela(人宫颈癌细胞)、MCF-7(人乳腺癌细胞)和U-87 MG(人脑星形胶质母细胞瘤)三种细胞,呈现了很好的细胞凋亡结果。表明该氧化还原响应的微粒是一种有效的转运蛋白质的体系。

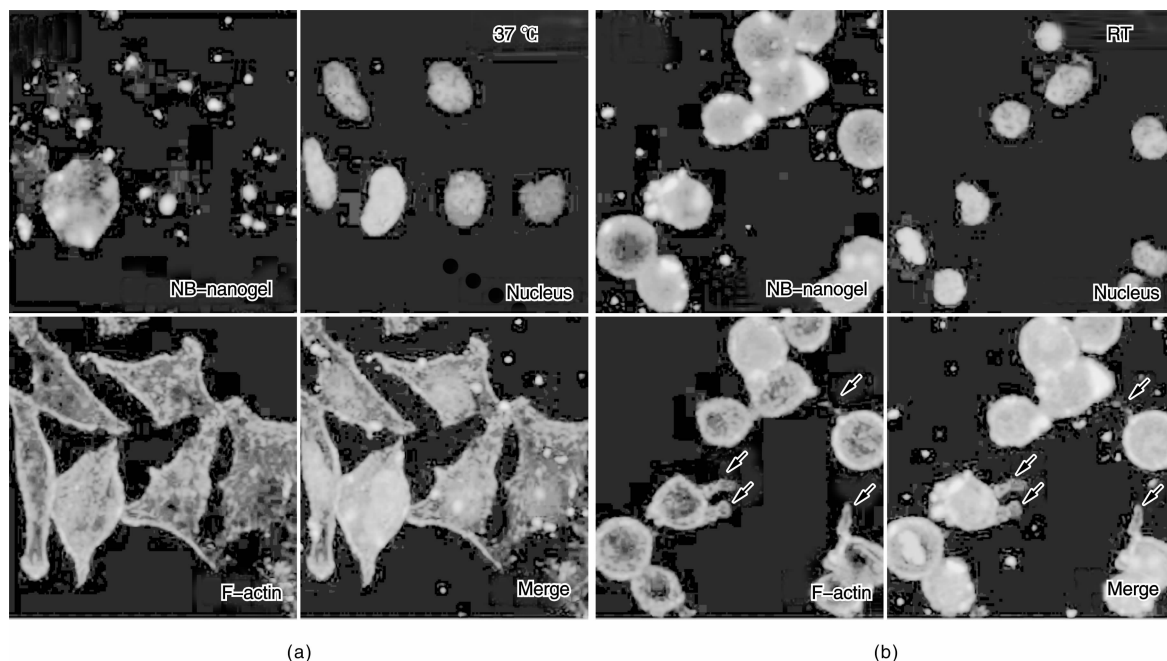


图 5 纳米凝胶体积相转变致死的癌细胞染色后激光共聚焦照片。NB-nanogel: 纳米凝胶; Nucleus: 细胞核; F-actin: 纤维状肌动蛋白。Merge 为三通道叠加。细胞器染色之前, 细胞分别在 (a) 37 °C 和 (b) 15 °C 与收缩的纳米粒子共培养 30 min。箭头表示细胞表面形成的小泡

Fig. 5 CLSM images of necrotic cell death by drastic expansion of volume transition nanogels (NB-nanogel) within HeLa cells. “nanogel” fluorescence indicates nanogels, “nucleus” fluorescence indicates nucleus, and “F-actin” fluorescence indicates F-actin distribution. Prior to the staining of cellular compartments, transfected HeLa cells with shrunken nanogels were incubated at (a) 37 °C and (b) 15 °C for 30 min. Arrows indicate bleb traces on the cell surface

将甲氧基聚乙二醇 (mPEG) 与聚乳酸 (PLA) 通过二硫键连接得到的双亲性的聚合物可装载紫杉醇, 得到载体-药物复合的纳米微粒。研究表明, 该微粒在 GSH 的溶液中表现出很好的释放性能, 释放速率与 GSH 的浓度成正比。A549 (人肺癌细胞)、MCF-7、Hela 三种细胞对该微粒均有良好的胞吞作用, 同时该微粒的细胞相容性较好, 细胞毒性较低。以上结果表明, 这种响应性的载体可用于装载抗癌药物, 细胞毒性较低, 并且能够在特定的环境中释放, 是一种良好的药物传递载体^[83]。

光响应微粒 光相对与其他外界刺激来讲, 方法直接、无明显的毒副作用, 同时光照刺激可以实现空间和时间上的控制, 因此光响应性材料在生物医学领域也有广泛的应用^[84]。

包覆了金纳米粒子的脂质体具有光响应的特性, 采用小角度 X 光衍射 (SAXS) 可以实时监测光照引起的体积相转变。光照后该脂质体转变为流体状态, 流式细胞仪的检测结果显示该载体可以在 ARPE-19 细胞中有效地释放包覆在其中的钙黄绿素^[85]。

通过光可切断的分子来连接脂质体的亲水段与疏水段, 可以得到光可降解的脂质体。在光照区域, 由于亲

水段和疏水段分离, 脂质体会马上破裂, 将疏水药物释放出来^[86-87]。

酶响应微粒 金属基质蛋白酶 (Matrix Metalloproteinase, MMP) 尤其是 MMP-2 和 MMP-9, 在肿瘤细胞的微环境中表达较多。因此采用 MMP 可切断的多肽来连接治疗肿瘤的药物与载体, 实现药物在肿瘤细胞处的释放^[88-89]。

在二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE) 分子上接枝 PEG 化的 MMP-2 可切断的多肽 (Gly-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln), 将该分子引入到半乳糖化的脂质体中。由于位阻效应, 该脂质体无法被正常的肝细胞胞吞, 而 HCC 细胞 (一种肝癌细胞) 由于会分泌 MMP, 可以实现该脂质体的胞吞。这就实现了对特定细胞的靶向和药物传递^[88]。

Sarkar 等人^[90]在脂质体的制备过程中, 引入了 MMP 可切断的多肽, 得到了 MMP 响应的脂质体。该脂质体的亲水部位为 MMP 可切断的多肽。在 MMP-9 存在的情况下, 多肽链段被切断, 脂质体发生破裂, 从而实现药物的快速释放。

3.5 细胞功能

PNIPAM 对温度响应后发生亲疏水的转变, 在其

LCST 温度 32 °C 之上, 表现为疏水, 细胞粘附, 温度小于 32 °C 时, PNIPAM 亲水, 表现为链伸展, 细胞不粘附。利用此原理, 表面为 PNIPAM 的培养盘培养细胞, 通过调控温度可以制备层状细胞片^[91-92]。

Wu 等^[93]将甲氧基聚乙二醇 (mPEG) 接枝到玻璃片表面, 调控 mPEG 的接枝密度, 研究对血管平滑肌细胞的粘附和迁移行为的影响。研究发现接枝量调控细胞的粘附和迁移行为, 随着接枝量的增大细胞的迁移速率先增大后减小, 通过对细胞的粘附力、细胞骨架、与粘附相关的基因和蛋白表达水平的进一步研究, 发现细胞-基底之间的相互作用控制着细胞的运动。当细胞和基底之间的粘附力适宜的情况下细胞的迁移速率最大。

近年的研究表明, 微粒的尺寸^[94-95]、形状^[95-98]、表面电荷^[99]、化学性质^[95,100]等因素对细胞的功能(如粘附^[94, 97]、增殖^[97, 99]、迁移^[94, 97]、分化^[99])都存在影响。然而, 智能响应性微粒对细胞功能的影响研究尚在起步阶段。借鉴非响应型材料对细胞功能影响的研究方法和手段, 可以开展智能响应型材料对细胞行为和功能的影响研究。例如, 磁性纳米粒子通过胞吞进入细胞以后, 外加磁场可以实现对胞吞磁性纳米微粒细胞的分选^[65,101]。有鉴于此, 可开展进一步的研究, 例如细胞胞吞磁性纳米微粒以后, 在粘附状态下外加磁场对细胞的迁移行为的影响。

4 结 语

多种智能响应型微粒被广泛研究和应用, 显示了十分强大的诊断和治疗效果, 尤其是在药物和基因传递领域。当前关注的热点主要包括响应性、专一性、稳定性和低毒性等。借鉴普通微粒与细胞相互作用的研究成果和手段, 需加强开展智能响应型微粒与细胞的相互作用及其对细胞功能的影响。响应型胶体微粒的胞吞和细胞内响应的规律研究有十分重要的科学意义和应用价值。

(1) 有利于发展此类胶体微粒的制备方法, 促进其在生命科学和医学领域的应用。在细胞吞噬过程中, 胶体微粒周围环境不断发生变化(如 pH 值、离子强度、酶浓度和氧化-还原环境), 导致其化学结构和物理性质的变化。因此需根据细胞内响应的要求, 对胶体微粒的化学组成和结构等进行调控, 或引入相应的功能物质, 从而必然促进新制备方法和新结构胶体微粒的产生、功能提高和最终应用。

(2) 可以实现胶体微粒在体外模型体系中和细胞内环境下的响应性能的对比。通过原位跟踪胶体微粒在细胞内的化学物理性质的变化, 将可以阐明微粒在细胞内发生变化的过程和机理, 从而可以对比体外模型环境下

的异同。

(3) 有利于在细胞和亚细胞层次上理解胶体材料的生物相容性(细胞毒性)问题。响应型胶体微粒在细胞内发生化学结构和物理性质的改变, 例如分解、膨胀或者变形, 必然改变其与细胞内器官和生物活性物质的相互作用, 从而对细胞的活性和功能产生影响。这种影响本质上更依赖于胶体微粒的响应性变化过程, 而不是构成胶体微粒的材料本身。

(4) 有利于发展相关的研究方法学。胶体微粒的内吞和胞内响应过程涉及到细胞、亚细胞和分子的层次, 既十分复杂又高度交叉。响应型胶体微粒化学物理性质在细胞内的跟踪、外界刺激的施加和响应的实现, 以及对细胞功能的影响和规律研究, 必然会促进开展此项研究所需要的方法和技术的进步。

参考文献 References

- [1] Matsuda R, Tsujino T, Sato H, *et al.* Temperature Responsive Channel Uniformity Impacts on Highly Guest-Selective Adsorption in a Porous Coordination Polymer[J]. *Chemical Science*, 2010, 1 (3): 315-321.
- [2] Agut W, Brûlet A, Schatz C, *et al.* pH and Temperature Responsive Polymeric Micelles and Polymersomes by Self-Assembly of Poly [2-(dimethylamino) ethyl methacrylate]-b-Poly (glutamic acid) Double Hydrophilic Block Copolymers[J]. *Langmuir*, 2010, 26 (13): 10 546-10 554.
- [3] Lee H, Yoo S J, Lee J H, *et al.* Genetic Framework for Flowering-Time Regulation by Ambient Temperature-Responsive miRNAs in Arabidopsis[J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(9): 3 081-3 093.
- [4] Zhang W, Rong J, Wang Q, *et al.* The Encapsulation and Intracellular Delivery of Trehalose Using a Thermally Responsive Nanocapsule[J]. *Nanotechnology*, 2009, 20: 275 101.
- [5] Liu T Y, Liu K H, Liu D M, *et al.* Temperature-Sensitive Nanocapsules for Controlled Drug Release Caused by Magnetically Triggered Structural Disruption[J]. *Advanced Functional Materials*, 2009, 19(4): 616-623.
- [6] Chilkoti A, Dreher M R, Meyer D E, *et al.* Targeted Drug Delivery by Thermally Responsive Polymers[J]. *Advanced drug delivery reviews*, 2002, 54(5): 613-630.
- [7] Shen Hairong(沈海蓉), Zhong Mingkan(钟明康), Li Zhongdong(李中东). 智能水凝胶在药物控释系统中的应用[J]. *Chinese Pharmaceutical Journal* (中国药学杂志). 2004, 39 (7): 490-493
- [8] Li L, Zhu Y, Li B, *et al.* Fabrication of Thermoresponsive Polymer Gradients for Study of Cell Adhesion and Detachment[J]. *Langmuir*, 2008, 24(23): 13 632-13 639.
- [9] Malavolta L, Cabral F R. Peptides: Important Tools for the Treatment of Central Nervous System Disorders[J]. *Neuropeptides*, 2011, 45(5): 309-316.
- [10] Lin H M, Wang W K, Hsiung P A, *et al.* Light-Sensitive Intelli-

- gent Drug Delivery Systems of Coumarin-Modified Mesoporous Bioactive Glass[J]. *Acta Biomaterialia*, 2010, 6(8): 3 256 – 3 263.
- [11] Riedinger A, Pernia Leal M, Deka S R, *et al.* “Nanohybrids” Based on pH-Responsive Hydrogels and Inorganic Nanoparticles for Drug Delivery and Sensor Applications[J]. *Nano Letters*, 2011, 11(8): 3 136 – 3 141.
- [12] Guo M, Que C, Wang C, *et al.* Multifunctional Superparamagnetic Nanocarriers with Folate-Mediated and pH-Responsive Targeting Properties for Anticancer Drug Delivery[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(1): 185 – 194.
- [13] Gao W, Chan J M, Farokhzad O C. pH-Responsive Nanoparticles for Drug Delivery[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2010, 7(6): 1 913 – 1 920.
- [14] Zhou K, Wang Y, Huang X, *et al.* Tunable, Ultrasensitive pH-Responsive Nanoparticles Targeting Specific Endocytic Organelles in Living Cells[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2011, 50(27): 6 109 – 6 114.
- [15] Zhu Xueyan(朱雪燕), Chen Mingqing(陈明清), Liu Xiaoya(刘晓亚), *et al.* pH 响应性水溶性微凝胶的研制[J]. *Journal of Jiangnan University: Natural Science Edition*(江南大学学报: 自然科学版), 2004, 3(1): 83 – 86.
- [16] Yigit M V, Mishra A, Tong R, *et al.* Inorganic Mercury Detection and Controlled Release of Chelating Agents from Ion-Responsive Liposomes[J]. *Chemistry & Biology*, 2009, 16(9): 937 – 942.
- [17] Kwon I C, Bae Y H, Okano T, *et al.* Drug Release from Electric Current Sensitive Polymers[J]. *Journal of Controlled Release*, 1991, 17(2): 149 – 156.
- [18] Yuk S H, Cho S H, Lee H B. Electric Current-Sensitive Drug Delivery Systems Using Sodium Alginate/Polyacrylic Acid Composites[J]. *Pharmaceutical research*, 1992, 9(7): 955 – 957.
- [19] Chatterjee J, Haik Y, Chen C J. Modification and Characterization of Polystyrene-Based Magnetic Microspheres and Comparison with Albumin-Based Magnetic Microspheres[J]. *Journal of magnetism and magnetic materials*, 2001, 225(1): 21 – 29.
- [20] Giri S, Trewyn B G, Stellmaker M P, *et al.* Stimuli-Responsive Controlled-Release Delivery System Based on Mesoporous Silica Nanorods Capped with Magnetic Nanoparticles[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2005, 44(32): 5 038 – 5 044.
- [21] Yu Yaoyu(于耀宇), Li Jian(李建), Li Xinghong(李立宏), *et al.* 磁性白蛋白纳米微粒的制备及其物理性能分析[J]. *Chinese Journal of Clinical Neurosurgery*(中国临床神经外科杂志), 2011, 16(10): 609 – 611.
- [22] Ishihara K, Kobayashi M, Ishimaru N, *et al.* Glucose Induced Permeation Control of Insulin through a Complex Membrane Consisting of Immobilized Glucose Oxidase and a Poly (amine)[J]. *Polymer Journal*, 1984, 16(8): 625 – 631.
- [23] Albin G, Horbett T A, Ratner B D. Glucose Sensitive Membranes for Controlled Delivery of Insulin; Insulin Transport Studies[J]. *Journal of Controlled Release*, 1985, 2: 153 – 164.
- [24] Thornton P D, Mart R J, Ulijn R V. Enzyme-Responsive Polymer Hydrogel Particles for Controlled Release[J]. *Advanced Materials*, 2007, 19(9): 1 252 – 1 256.
- [25] Zhao M, Biswas A, Hu B, *et al.* Redox-Responsive Nanocapsules for Intracellular Protein Delivery[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(22): 5 223 – 5 230.
- [26] Ulijn R V, Bibi N, Jayawarna V, *et al.* Bioresponsive hydrogels[J]. *Materials Today*, 2007, 10(4): 40 – 48.
- [27] Ganta S, Devalapally H, Shahiwala A, *et al.* A Review of Stimuli-Responsive Nanocarriers for Drug and Gene Delivery[J]. *Journal of Controlled Release*, 2008, 126(3): 187 – 204.
- [28] Shim M S, Kwon Y J. Stimuli-Responsive Polymers and Nanomaterials for Gene Delivery and Imaging Applications[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012.
- [29] Bajpai A K, Shukla S K, Bhanu S, *et al.* Responsive Polymers in Controlled Drug Delivery[J]. *Progress in Polymer Science*, 2008, 33(11): 1 088 – 1 118.
- [30] Macewan S R, Callahan D J, Chilkoti A. Stimulus-Responsive Macromolecules and Nanoparticles for Cancer Drug Delivery[J]. *Nanomedicine*, 2010, 5(5): 793 – 806.
- [31] Roy D, Cambre J N, Sumerlin B S. Future Perspectives and Recent Advances in Stimuli-Responsive Materials[J]. *Progress in Polymer Science*, 2010, 35(1–2): 278 – 301.
- [32] Li Hongxia(李红霞), Cao Yue(曹 玥), Liu Zhengyu(刘正玉), *et al.* 智能型聚合物材料的研究进展[J]. *Materials Review*(材料导报). 2012, 26(5): 84 – 87.
- [33] Gao C, Möhwald H, Shen J. Thermosensitive Poly(Allylamine)-g-Poly(N-Isopropylacrylamide): Synthesis, Phase Separation and Particle Formation[J]. *Polymer*, 2005, 46(12): 4 088 – 4 097.
- [34] Gao C, Chen B, Möhwald H. Thermosensitive Poly(Allylamine)-g-Poly(N-Isopropylacrylamide) Copolymers: Salt-Tuned Phase Separation, Particle Formation and Their Applicability on Curved Surface[J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2006, 272(3): 203 – 210.
- [35] Mao Z, Ma L, Yan J, *et al.* The Gene Transfection Efficiency of Thermoresponsive N, N, N-Trimethyl Chitosan Chloride-g-Poly(N-Isopropylacrylamide) Copolymer[J]. *Biomaterials*, 2007, 28(30): 4 488 – 4 500.
- [36] Deng Yonghui(邓勇辉), Wang Changchun(汪长春), Yang Wuli(杨武利), *et al.* 磁性聚合物微球研究进展[J]. *Polymer Bulletin*(高分子通报), 2006, 5: 27 – 35.
- [37] Chatterjee J, Haik Y, Chen C J. Modification and Characterization of Polystyrene-Based Magnetic Microspheres and Comparison with Albumin-Based Magnetic Microspheres[J]. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2001, 225(1): 21 – 29.
- [38] Cheng Yanling(程艳玲), Li Ruohui(李若慧), Ma Liuqiang(马榴强), *et al.* 医药用磁性聚合物微球的研究进展[J]. *Journal of Beijing Union University: Natural Science Edition*(北京联合大学学报: 自然科学版). 2007, 1: 68 – 74.
- [39] Pankhurst Q A, Connolly J, Jones S K, *et al.* Applications of Magnetic Nanoparticles in Biomedicine[J]. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2003, 36: R167.
- [40] Tartaj P, Morales M P, Veintemillas-Verdaguer S, *et al.* The Preparation of Magnetic Nanoparticles for Applications in Bio-

- medicine[J]. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2003, 36: R182.
- [41] Xu Z Z, Wang C C, Yang W L, *et al.* Encapsulation of Nanosized Magnetic Iron Oxide by Polyacrylamide via Inverse Miniemulsion Polymerization[J]. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2004, 277(1-2): 136-143.
- [42] Rabin Y. Cancer Treatment by Electromagnetic Activated Nanoheaters[J]. *EurekAlert-Nanotechnology in Context*, 2002.
- [43] Shi D, Matsusaki M, Akashi M. Photo-Tunable Protein Release from Biodegradable Nanoparticles Composed of Cinnamic Acid Derivatives[J]. *Journal of Controlled Release*, 2011, 149(2): 182-189.
- [44] Schreier W J, Schrader T E, Koller F O, *et al.* Thymine Dimerization in DNA is an Ultrafast Photoreaction[J]. *Science*, 2007, 315(5812): 625-629.
- [45] N A P, Devices Based on Intelligent Biopolymers for Oral Protein Delivery[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2004, 277(1-2): 11-17.
- [46] Dai S, Tam K C, Jenkins R D. Aggregation Behavior of Methacrylic Acid/Ethyl Acrylate Copolymer in Dilute Solutions[J]. *European Polymer Journal*, 2000, 36(12): 2671-2677.
- [47] Dai J, Nagai T, Wang X, *et al.* pH-Sensitive Nanoparticles for Improving the Oral Bioavailability of Cyclosporine A[J]. *International journal of pharmaceutics*, 2004, 280(1): 229-240.
- [48] Tang Qianqian(唐倩倩), Yuan Li(袁丽), Yang Dong(杨东), *et al.* 二巯键修饰的介孔二氧化硅微球的制备与表征[J]. *Acta Chimica Sinica(化学学报)*, 2010, 68(18): 1925-1929.
- [49] Huang Z, Li W, Mackay J A, *et al.* Thiocholesterol-Based Lipids for Ordered Assembly of Bioresponsive Gene Carriers[J]. *Molecular therapy*, 2005, 11(3): 409-417.
- [50] Kirpotin D, Hong K, Mullah N, *et al.* Liposomes with Detachable Polymer Coating: Destabilization and Fusion of Dioleoylphosphatidylethanolamine Vesicles Triggered by Cleavage of Surface-Grafted Poly(Ethylene Glycol)[J]. *FEBS Letters*, 1996, 388(2-3): 115-118.
- [51] Liu Wenguang(刘文广), Yao Kangde(姚康德), Qi Wuqin(戚务勤). 水凝胶研究的最新进展[J]. *Polymer Materials Science & Engineering(高分子材料科学与工程)*, 2002, 18(5): 54-57.
- [52] Guan Xiaoyu(管晓玉), Hao Hong(郝红), Li Hairui(李海瑞), *et al.* 葡萄糖敏感型水凝胶最新研究进展[J]. *Polymer Bulletin(高分子通报)*, 2009(008): 49-53.
- [53] Tang Yu(汤宇), Wang Tian(王填), Li Chaoxing(李朝兴). 新型含苯硼酸基团的两亲性共聚物微球的制备及其糖敏感性能[J]. *Chemical Journal of Chinese Universities(高等学校化学学报)*, 2007, 28(8): 1581-1585.
- [54] Hoare T, Pelton R. Engineering Glucose Swelling Responses in Poly(N-Isopropylacrylamide)-Based Microgels[J]. *Macromolecules*, 2007, 40(3): 670-678.
- [55] Du P, Mu B, Wang Y, *et al.* Glucose and Temperature Dual-Responsive Monodispersed Hollow Nanospheres via Facile One-Pot Two-Step Process[J]. *Materials Letters*, 2012, 75(0): 77-79.
- [56] Zhu Y, Tong W, Gao C. Molecular-Engineered Polymeric Microcapsules Assembled from Concanavalin A and Glycogen with Specific Responses to Carbohydrates[J]. *Soft Matter*, 2011, 7(12): 5805-5815.
- [57] Tong W, Zhu Y, Gao C. One-Step Controlled Precipitation to Fabricate Glucose-Responsive Microcapsules[Z]. *Springer Berlin/Heidelberg*, 2012: 290, 233-240.
- [58] McDonald T O, Qu H, Saunders B R, *et al.* Branched Peptide Actuators for Enzyme Responsive Hydrogel Particles[J]. *Soft Matter*, 2009, 5(8): 1728-1734.
- [59] De Geest B G, Vandenbroucke R E, Guenther A M, *et al.* Intracellularly degradable polyelectrolyte microcapsules[J]. *Advanced materials*. 2006, 18(8): 1005-1009.
- [60] Xing Z, Wang C, Yan J, *et al.* Dual Stimuli Responsive Hollow Nanogels with IPN Structure for Temperature Controlling Drug Loading and pH Triggering Drug Release[J]. *Soft Matter*, 2011, 7(18): 7992-7997.
- [61] Chen Y, Pang X H, Dong C M. Dual Stimuli-Responsive Supramolecular Polypeptide-Based Hydrogel and Reverse Micellar Hydrogel Mediated by Host-Guest Chemistry[J]. *Advanced Functional Materials*, 2010, 20(4): 579-586.
- [62] Tang F, Ma N, Tong L, *et al.* Control of Metal-Enhanced Fluorescence with pH- and Thermoresponsive Hybrid Microgels[J]. *Langmuir*, 2012, 28(1): 883-888.
- [63] Govindaiah P, Lee S J, Kim J H, *et al.* Synthesis and Characterization of Poly(Styrene-co-Fluorescein O-Methacrylate)/poly(N-Isopropylacrylamide)-Fe₃O₄ Core/shell Composite Particles[J]. *Polymer*, 2011, 52(22): 5058-5064.
- [64] Yuan Q, Venkatasubramanian R, Hein S, *et al.* A Stimulus-Responsive Magnetic Nanoparticle Drug Carrier: Magnetite Encapsulated by Chitosan-Grafted-Copolymer[J]. *Acta Biomaterialia*, 2008, 4(4): 1024-1037.
- [65] Majewski A P, Schallon A, Jerome V, *et al.* Dual-Responsive Magnetic Core-Shell Nanoparticles for Non-Viral Gene Delivery and Cell Separation[J]. *Biomacromolecules*, 2012.
- [66] Hu L, Mao Z, Zhang Y, *et al.* Influences of Size of Silica Particles on the Cellular Endocytosis, Exocytosis and Cell Activity of HepG₂ Cells[J]. *Journal of Nanoscience Letters*, 2011, 1(1): 1-16.
- [67] Iversen T G, Skotland T, Sandvig K. Endocytosis and Intracellular Transport of Nanoparticles: Present Knowledge and Need for Future Studies[J]. *Nano Today*, 2011.
- [68] Hu Ling(胡玲), Zhang Yuying(张裕英), Gao Changyou(高长有). 聚合物纳米粒子的结构和性能对胞吞和细胞功能的影响[J]. *Progress in Chemistry(化学进展)*, 2009, 21(6): 1254-1267.
- [69] Chnari E, Nikitzuk J S, Uhrich K E, *et al.* Nanoscale Anionic Macromolecules can Inhibit Cellular Uptake of Differentially Oxidized LDL[J]. *Biomacromolecules*, 2006, 7(2): 597-603.
- [70] Pamujula S, Hazari S, Bolden G, *et al.* Cellular Delivery of PEGylated PLGA Nanoparticles[J]. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2012, 64(1): 61-67.
- [71] Xie L, Tong W, Yu D, *et al.* Bovine Serum Albumin Nanoparticles Modified with Multilayers and Aptamers for pH-Responsive

- and Targeted Anti-Cancer Drug Delivery [J]. *J Mater Chem*, 2012.
- [72] Mao Z, Wan L, Hu L, *et al.* Tat Peptide Mediated Cellular Uptake of SiO₂ Submicron Particles[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2010, 75(2): 432–440.
- [73] van der Aa M A E M, Mastrobattista E, Oosting R S, *et al.* The Nuclear Pore Complex: the Gateway to Successful Nonviral gene Delivery [J]. *Pharmaceutical research*, 2006, 23(3): 447–459.
- [74] Cartier R, Reszka R. Utilization of Synthetic Peptides Containing Nuclear Localization Signals for Nonviral Gene Transfer Systems [J]. *Gene therapy*, 2002, 9(3): 157.
- [75] Mao S, Neu M, Germershaus O, *et al.* Influence of Polyethylene Glycol Chain Length on the Physicochemical and Biological Properties of Poly (Ethylene Imine)-Graft-Poly (Ethylene Glycol) Block Copolymer/SiRNA Polyplexes [J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2006, 17(5): 1 209–1 218.
- [76] Sun T, Du J, Yan L, *et al.* Self-Assembled Biodegradable Micellar Nanoparticles of Amphiphilic and Cationic Block Copolymer for siRNA Delivery[J]. *Biomaterials*, 2008, 29(32): 4 348–4 355.
- [77] Hoon Jeong J, Christensen L V, Yockman J W, *et al.* Reducible Poly (Amido Ethylenimine) Directed to Enhance RNA Interference[J]. *Biomaterials*, 2007, 28(10): 1 912–1 917.
- [78] Cho S K, Kwon Y J. Simultaneous Gene Transduction and Silencing Using Stimuli-Responsive Viral/Nonviral Chimeric Nanoparticles[J]. *Biomaterials*, 2012.
- [79] Ding C, Gu J, Qu X, *et al.* Preparation of Multifunctional Drug Carrier for Tumor-Specific Uptake and Enhanced Intracellular Delivery through the Conjugation of Weak Acid Labile Linker[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2009, 20(6): 1 163–1 170.
- [80] Schmaljohann D. Thermo- and pH-Responsive Polymers in Drug Delivery[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2006, 58(15): 1 655–1 670.
- [81] Cheng-Liang P, Han-Min T. Development of Thermosensitive Poly (n-Isopropylacrylamide-Co-(2-Dimethylamino) ethyl Methacrylate)-Based Nanoparticles for Controlled Drug Release[J]. *Nanotechnology*, 2011, 22(26): 265 608.
- [82] Lee Y, Park S Y, Kim C, *et al.* Thermally Triggered Intracellular Explosion of Volume Transition Nanogels for Necrotic Cell Death [J]. *Journal of Controlled Release*, 2009, 135(1): 89–95.
- [83] Song N, Liu W, Tu Q, *et al.* Preparation and in Vitro Properties of Redox-Responsive Polymeric Nanoparticles for Paclitaxel Delivery[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2011, 87(2): 454–463.
- [84] Tian Feng(田 丰), Yu Yuanyuan(于媛媛), Wang Changchun(汪长春). 无皂乳液聚合制备光敏聚合物微球及其光响应性[J]. *Acta Chimica Sinica(化学学报)*, 2008, 66(7): 697–701.
- [85] Paasonen L, Sipilä T, Subrizi A, *et al.* Gold-Embedded Photosensitive Liposomes for Drug Delivery: Triggering Mechanism and Intracellular Release[J]. *Journal of Controlled Release*, 2010, 147(1): 136–143.
- [86] Wan Y, Angleson J K, Kutateladze A G. Liposomes from Novel Photolabile Phospholipids: Light-Induced Unloading of Small Molecules as Monitored by PFG NMR[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2002, 124(20): 5 610–5 611.
- [87] Chandra B, Subramaniam R, Mallik S, *et al.* Formulation of Photocleavable Liposomes and the Mechanism of Their Content Release[J]. *Org Biomol Chem*, 2006, 4(9): 1 730–1 740.
- [88] Terada T, Iwai M, Kawakami S, *et al.* Novel PEG-Matrix Metalloproteinase-2 Cleavable Peptide-Lipid Containing Galactosylated Liposomes for Hepatocellular Carcinoma-Selective Targeting[J]. *Journal of controlled release*, 2006, 111(3): 333–342.
- [89] Kikuchi A, Okano T. Pulsatile Drug Release Control Using Hydrogels[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, 54(1): 53–77.
- [90] Sarkar N, Banerjee J, Hanson A J, *et al.* Matrix Metalloproteinase-Assisted Triggered Release of Liposomal Contents[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2007, 19(1): 57–64.
- [91] Masuda S, Shimizu T, Yamato M, *et al.* Cell Sheet Engineering for Heart Tissue Repair [J]. *Advanced drug delivery reviews*, 2008, 60(2): 277–285.
- [92] Xue C, Choi B, Choi S, *et al.* Protein Adsorption Modes Determine Reversible Cell Attachment on Poly(N-isopropyl acrylamide) Brushes[J]. *Advanced Functional Materials*, 2012; In press.
- [93] Wu J, Mao Z, Gao C. Controlling the Migration Behaviors of Vascular Smooth Muscle Cells by Methoxy Poly (Ethylene Glycol) Brushes of Different Molecular Weight and Density[J]. *Biomaterials*, 2011.
- [94] Zhang Y, Hu L, Yu D, *et al.* Influence of Silica Particle Internalization on Adhesion and Migration of Human Dermal Fibroblasts[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(32): 8 465–8 474.
- [95] Gratton S E A, Ropp P A, Pohlhaus P D, *et al.* The Effect of Particle Design on Cellular Internalization Pathways[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(33): 11 613.
- [96] Chithrani B D, Ghazani A A, Chan W C W. Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells[J]. *Nano Letters*, 2006, 6(4): 662–668.
- [97] Huang X, Teng X, Chen D, *et al.* The Effect of the Shape of Mesoporous Silica Nanoparticles on Cellular Uptake and Cell Function[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(3): 438–448.
- [98] Champion J A, Katare Y K, Mitragotri S. Particle Shape: a New Design Parameter for Micro- and Nanoscale Drug Delivery Carriers [J]. *Journal of Controlled Release*, 2007, 121(1–2): 3–9.
- [99] Chung T, Wu S, Yao M, *et al.* The Effect of Surface Charge on the Uptake and Biological Function of Mesoporous Silica Nanoparticles in 3T3-L1 Cells and Human Mesenchymal Stem Cells[J]. *Biomaterials*, 2007, 28(19): 2 959–2 966.
- [100] Mukhopadhyay A, Grabinski C, Afroz A, *et al.* Effect of Gold Nanosphere Surface Chemistry on Protein Adsorption and Cell Uptake In Vitro[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 167(2): 327–337.
- [101] Cao Jingjing(曹菁菁). *Preparation of Highly Magnetizable Spheres for Bio-Separations(高响应性磁性微球的制备及其生物分离应用)*[D]. Tianjin: Tianjin University, 2009.