

# 甘肃省大学生创新创业训练计划

## 项目申报表

(创新训练项目)

推荐学校：西北师范大学（盖章）

项目名称：基于叶酸靶向的复合多糖给药载体的制备及应用

所属一级学科名称：生物医学工程类

项目负责人：王 湔

联系电话：17361634972

指导教师：姚 健

联系电话：13893158561

申报日期：2019 年 4 月 25 日

甘肃省教育厅 制

|                                                                                                                                                                    |                                                                                                           |                                                                                                         |      |              |                   |             |                   |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|--------------|-------------------|-------------|-------------------|
| 项目名称                                                                                                                                                               |                                                                                                           | 基于叶酸靶向的复合多糖给药载体的制备及应用                                                                                   |      |              |                   |             |                   |
| 项目所属一级学科                                                                                                                                                           |                                                                                                           | 生物医学工程类                                                                                                 |      |              |                   |             |                   |
| 项目实施时间                                                                                                                                                             |                                                                                                           | 起始时间： 2018 年 11 月                                                                                       |      |              | 完成时间： 2019 年 11 月 |             |                   |
| 项目简介<br>(100 字以内)                                                                                                                                                  | 本项目以具有靶向性能的叶酸，偶联胺化海藻酸上的氨基，合成具有对肿瘤表面特异性受体敏感的叶酸-胺化海藻酸复合高分子载药凝胶，并在肿瘤细胞中评估该系统的靶向性及释药特性，为抗肿瘤药物靶向给药体系的合理设计提供参考。 |                                                                                                         |      |              |                   |             |                   |
| 申请人或申请团队                                                                                                                                                           |                                                                                                           | 姓名                                                                                                      | 年级   | 学号           | 所在院系/专业           | 联系电话        | E-mail            |
|                                                                                                                                                                    | 主持人                                                                                                       | 王湔                                                                                                      | 16 级 | 201674040124 | 生命科学学院<br>制药工程    | 17361634972 | 244480246@qq.com  |
|                                                                                                                                                                    |                                                                                                           | 陈甜甜                                                                                                     | 16 级 | 201674040102 | 生命科学学院<br>制药工程    | 17393154794 | 602430950@qq.com  |
|                                                                                                                                                                    | 成员                                                                                                        | 徐海蓉                                                                                                     | 16 级 | 201674040130 | 生命科学学院<br>制药工程    | 17393150786 | 2417201123@qq.com |
|                                                                                                                                                                    |                                                                                                           | 刘萌                                                                                                      | 16 级 | 201674040109 | 生命科学学院<br>制药工程    | 18809467913 | 1871845298@qq.com |
|                                                                                                                                                                    |                                                                                                           | 陈阳                                                                                                      | 16 级 | 201674040103 | 生命科学学院<br>制药工程    | 15193144772 | 1134878774@qq.com |
|                                                                                                                                                                    | 指导教师                                                                                                      | 第一指导教师                                                                                                  | 姓名   | 姚健           |                   | 单位          | 西北师范大学            |
|                                                                                                                                                                    |                                                                                                           | 年龄                                                                                                      | 59   |              | 专业技术职务            | 研究员         |                   |
| 主要成果                                                                                                                                                               |                                                                                                           | 参与国家自然科学基金项目 3 项，科技部支撑计划 1 项，校地合作项目 1 项。发表 SCI 收录期刊发论文 10 余篇，授权发明专利 4 项。获甘肃省科技进步一等奖,1 项，甘肃省科技进步二等奖 1 项。 |      |              |                   |             |                   |
| 一、申请理由（包括自身具备的知识条件、自己的特长、兴趣、已有的实践创新成果等）<br><br>团队自成立以来，完成了多糖基复合凝胶的制备及缓释性能研究，具备一定的研究基础（授权发明专利 1 项，公开 1 项）。团队成员品学兼优，对科学研究具有极大的兴趣，积极参与与本专业相关的科学研究课题，符合我省大学生“双创”的指导思想。 |                                                                                                           |                                                                                                         |      |              |                   |             |                   |

## 二、项目方案

具体内容包括：

2.1 项目研究背景（国内外的研究现状及研究意义、项目已有的基础，与本项目有关的研究积累和已取得的成绩，已具备的条件，尚缺少的条件及方法等）

药物治疗是最常用的治疗疾病的方法之一，但是大多数药物水溶性差，物理化学不稳定性，渗透性能力有限不利于药物的吸收和利用。药物运输系统的应用有利于提高药物的生物利用度。植物多糖是一种天然的高分子化合物，很多植物多糖有很好黏性，有溶-凝胶转变的能力，被作为负载药物的载体被广泛的应用于给药系统，而其中最常用的是海藻胶。海藻胶是从一些海藻类植物的细胞壁和细胞间隙中提取的藻类植物多糖。海藻酸通常以阳离子盐的形式存在，在藻类植物组织中有钙、镁和钠三种海藻酸盐，其中海藻酸钠是最常用的海藻酸多糖。

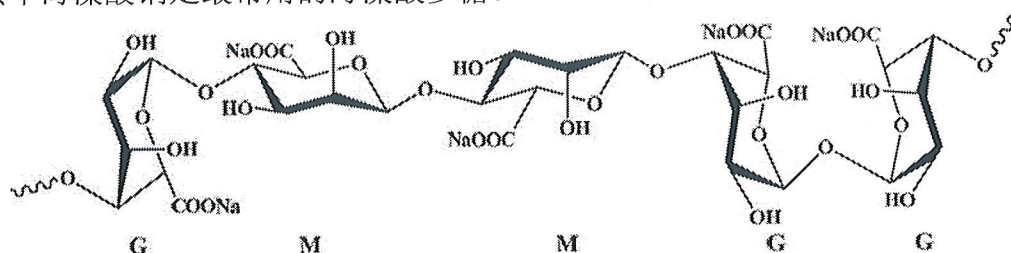


图 1 海藻酸钠的重复结构

海藻酸钠 (sodium alginate, SA) 的是一种水溶性多糖，其结构如图 1 所示。在 pH 低于 4 的条件下，SA 上的 -COO<sup>-</sup> 能够与二价阳离子 (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>) 形成三维网络交联结构的水凝胶，利用凝胶的三维结构负载药物可以控制药物的释放速率。因此 SA 被广泛的应用于药物释放领域，但是海藻酸钠水凝胶的机械强度较低，容易降解，严重限制了 SA 在药物释放领域的应用范围，因此与其他高分子聚合物形成复合凝胶能够提高水凝胶的机械强度和网络交联密度，有利于 SA 在给药系统中的应用，可以作为一种理想的药物载体。

随着给药形式的不断改进，具有给药量少，作用大，毒副作用小等突出优势的靶向给药系统 (Targeting drug delivery system, TDDS) 越来越受到重视。TDDS 能够增大靶向区域的药物浓度，减少在非靶向细胞、组织或器官的浓度，减少靶向区域药物向非靶向区域逸散，达到降低非靶向区域毒副作用的目的，抗肿瘤药物的靶向给药系统的研究日益活跃。

其中叶酸受体在抗肿瘤靶向治疗领域有着十分重要的作用。叶酸受体 (folate receptor, FR) 是一种糖基化磷脂酰肌醇连接的膜糖蛋白，在不同癌细胞表面的表达水平不同，但很少在正常细胞表面表达，FR 对叶酸 (folic acid, FA) 及叶酸类似物具有很高的亲和力和特异性，可介导这其内吞进入细胞。因此，可利用 FR 对 FA 及其类似物的转运机制和在细胞表面的高表达性，可将 FR 作为一种介导 FA 途径的靶向配体。

本课题组前期完成了沙蒿胶-海藻酸钠复合凝胶的制备及缓释性能研究。流变测试发现其粘性和弹性极大增强，应变极限也极大提高，体外药物释放研究还表明复合水凝胶在碱性条件下可以克服传统 SA 水凝胶模型药物的爆发释放问题。此外，C. Shu 等人制备的叶酸-肽-紫杉水凝胶纳米粒也表明，水凝胶基的载药体系缓释作用明显，具



有较显著的抗癌作用和较低的副作用。综上，可以认为具有叶酸靶向的海藻酸钠复合凝胶是受控制的和持续的药物释放材料，具有很大的发展潜力。

## 2.2 项目研究目标及主要内容

### (1) 研究目标：

制备海藻酸钠 (SA) 载药凝胶和叶酸-胺化海藻酸 (FA-ASA) 复合载药凝胶，测定其载药率及凝胶的溶胀行为、流变学行为和体外释药情况。探究 FA-ASA 复合/甲氨蝶呤 (MTX) 载药凝胶对 A549 和 HepG-2 细胞的靶向抑制作用。

### (2) 研究内容

#### ①胺化海藻酸钠的合成及表征

以海藻酸钠为材料，通过 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 的催化酰胺化反应，用乙二胺的-NH<sub>2</sub> 与海藻酸钠连接合成胺化的海藻酸 (ASA)，并优化合成条件，筛选出最佳反应条件，为下一步连接叶酸打下基础。

#### ②叶酸修饰海藻酸钠的合成及表征

胺化海藻酸上未反应的-NH<sub>2</sub> 能够与叶酸上的-COOH 发生反应。以 ASA 为材料，利用活化剂 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 对叶酸上的羧基进行活化，通过与合成的 ASA 上的氨基偶联，合成叶酸-胺化海藻酸 (FA-ASA) 材料，考察料液比、催化剂和反应温度等因素对叶酸-海藻酸材料的影响，筛选偶联叶酸最佳的反应条件。

#### ③叶酸-胺化海藻酸复合载药凝胶的制备及靶向性能测定

以甲氨蝶呤为模型药，以 FA-ASA 为材料，加入葫芦巴胶 (FG) 和 SA 通过碳酸钙/D-葡萄糖酸- $\delta$ -内酯 (CaCO<sub>3</sub>-GDL) 原位释放法，制备 SA 载药凝胶和 FA-ASA 复合载药凝胶，并测定凝胶的溶胀行为，凝胶流变学行为，通过紫外分光光度法测定其的载药率和载药凝胶的体外释放情况。设置空白组，MTX 直接给药组，SA/MTX 和 FA-ASA 复合/MTX 载药凝胶给药组，并设置在 FA-ASA 复合/MTX 中加入游离 FA 为对照，探索不同给药时间，SA/MTX 和 FA-ASA 复合/MTX 载药凝胶对 A549 和 HepG-2 肿瘤细胞的抑制作用，比较添加游离叶酸后 FA-ASA 复合/MTX 给药组与无游离叶酸的 FA-ASA 复合/MTX 给药组对肿瘤细胞的抑制作用。利用荧光显微镜观察 A549 细胞形态的变化。

## 2.3 项目创新特色概述

本项目采用海藻酸钠为材料，利用海藻酸钠的羧基对其进行叶酸化学修饰，首次制成 FA-ASA 复合凝胶，并负载了 MTX，对其凝胶性能进行表征。以甲氨蝶呤为模型药，用 FA-ASA 为原料制备叶酸靶向载药体系，对其性能进行表征和体外细胞实验，筛选载药凝胶的最佳释药条件，评估其靶向能力，可为抗肿瘤药物靶向给药体系的合理设计提供参考

## 2.4 项目研究技术路线

### (1) 技术路线

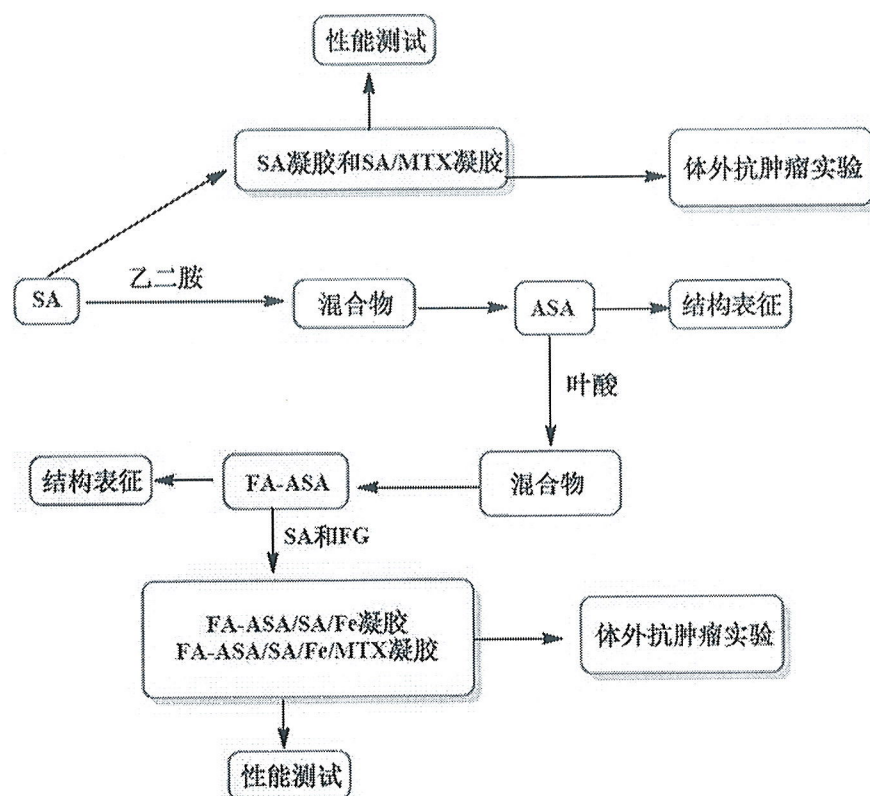


图 2 本项目技术路线

### (2) 实验方案

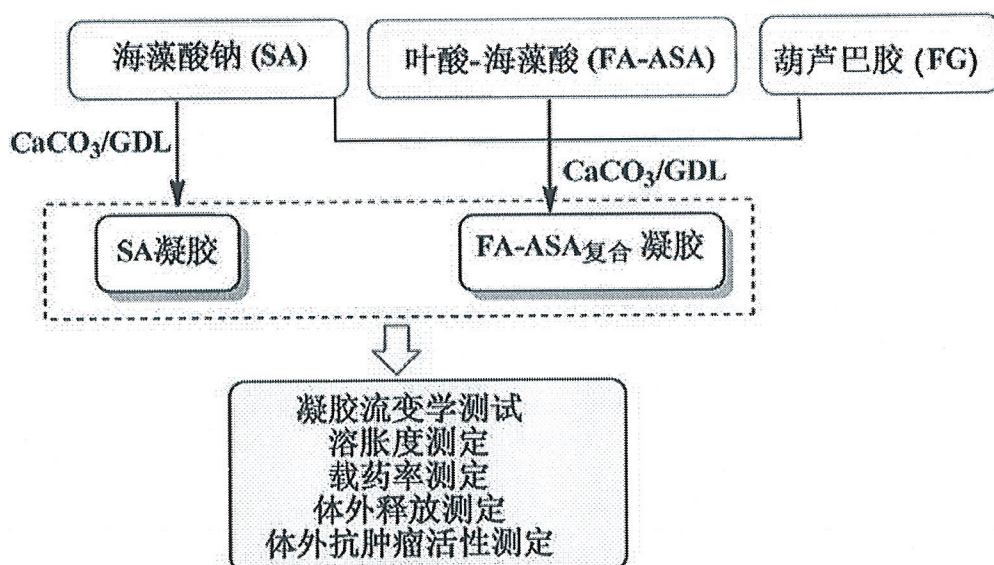


图 3 复合载药凝胶的制备及靶向性能研究实验方案

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |       |          |      |          |      |         |       |          |      |          |      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|----------|------|----------|------|---------|-------|----------|------|----------|------|
| <p>2.5 研究进度安排</p> <p>(文献查阅): 2018 年 11 月至 2018 年 12 月</p> <p>(方案设计): 2019 年 1 月至 2019 年 2 月</p> <p>(实验研究): 2019 年 3 月至 2019 年 5 月</p> <p>(数据处理): 2019 年 6 月至 2019 年 7 月</p> <p>(撰写论文或研究报告): 2019 年 8 月至 2019 年 9 月</p> <p>(成果推广或论文发表): 2019 年 10 月至 2019 年 11 月</p> <p>2.6 项目组成员分工</p> <p>王 湫—胺化海藻酸钠的合成及表征</p> <p>陈甜甜—叶酸修饰海藻酸钠的合成及表征</p> <p>刘 萌—叶酸-胺化海藻酸复合载药凝胶的制备徐海蓉—靶向性能测定</p> <p>陈 阳—靶向性能测定</p> |       |          |      |          |      |         |       |          |      |          |      |
| <p>三、学校提供条件 (包括项目开展所需的实验实训情况、配套经费、相关扶持政策等)</p> <p>3.1 西北师范大学创新创业学院为所开展的立项项目提供人民币总计 10000 元(大写壹万元整)。本课题以 1 项授权专利 (专利名称: 海藻酸钠-沙蒿胶复合水凝胶的制备方法, ZL 201310018897.6)、1 项公开专利 (专利名称: 基于叶酸靶向的复合多糖凝胶的制备及应用, 2017112641999) 为技术支撑。</p> <p>3.2 所在的西北师范大学生命科学学院具备实验所需的红外光谱、荧光分光光度计等, 化学测试中心有实验所需的体积排阻色谱、核磁共振仪。</p> <p>3.3 西北师范大学图书馆的中外文电子资源数据库便于获得国际上最新的研究动态和技术资料。本实验所需的研究条件基本具备, 为实验的顺利进行创造了有利条件。</p>         |       |          |      |          |      |         |       |          |      |          |      |
| <p>四、预期成果</p> <p>4.1 发表 SCI 论文 2 篇</p> <p>4.2 申请国家发明专利 1 项</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |       |          |      |          |      |         |       |          |      |          |      |
| <p>五、经费预算</p> <table border="1"> <tr> <td>总经费 (元)</td> <td>10000</td> <td>财政拨款 (元)</td> <td>5000</td> <td>学校拨款 (元)</td> <td>5000</td> </tr> </table> <p>注: 总经费、财政拨款、学校拨款由学校按照有关规定核定数目进行填写</p> <p>具体包括:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1、文献资料文印费 500;</li> <li>2、低值办公用品购置费 500;</li> <li>3、靶向测试所需的细胞、及各类检测试剂盒 6000;</li> <li>4、学生撰写与项目有关的论文版面费、申请专利费等 3000.</li> </ol>                 |       |          |      |          |      | 总经费 (元) | 10000 | 财政拨款 (元) | 5000 | 学校拨款 (元) | 5000 |
| 总经费 (元)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 10000 | 财政拨款 (元) | 5000 | 学校拨款 (元) | 5000 |         |       |          |      |          |      |



## 六、导师推荐意见

王湔等同学在校期间学习刻苦，成绩优秀，已在本人实验室进行了一年的实验技能训练，对科学研究有浓厚的兴趣，特推荐其申请“甘肃省大学生创新创业训练计划项目”，并承诺为该项目提供相关的实验场地、经费和科研指导。

签名：姚健

2019 年 4 月 25 日

## 七、院系推荐意见

同意推荐

院系负责人签名：



学院盖章：



2019 年 4 月 26 日

## 八、学校推荐意见：

同意推荐

学校负责人签名：



学校公章



2019 年 5 月 5 日

注：表格栏高不够可增加。