

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.03.0288

pH 响应性磁靶向纳米复合粒 $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2 @ \text{PEG-}b\text{-PAsp} @ \text{DOX}$ 的构建及体外评价

王双冉^{1△}, 张瀚哲^{2△}, 詹洁琼¹, 马志强³, 余 岚³, 杨 峰^{1,3*}

1. 河北北方学院研究生部, 张家口 075000
2. 第二军医大学学员旅学员 11 队, 上海 200433
3. 第二军医大学药学院无机化学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 制备 pH 响应性的磁性纳米复合粒多柔比星 (doxorubicin, DOX) 载体 $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2 @ \text{PEG-}b\text{-PAsp} @ \text{DOX}$ 并对其理化性质进行表征, 考察药物的 pH 响应性释放、在磁场作用下的靶向性及其对人肺癌 A549 细胞的杀伤作用。

方法 利用水热法、Stöber 方法、溶胶凝胶法、交联法等构建 pH 响应性载药磁性纳米复合粒 $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2 @ \text{PEG-}b\text{-PAsp} @ \text{DOX}$; 利用透射电镜观察其形貌, 激光粒度-zeta 电位测定仪测定其粒径和 zeta 电位, 磁滞回线测试仪测定其磁性; 紫外分光光度法测定载药磁性纳米复合粒的载药量与包封率, 透析法测定其 pH 响应性释药, CCK-8 法和 Annexin V-FITC/PI 双染法考察其体外对人肺癌 A549 细胞的杀伤作用。**结果** $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2 @ \text{PEG-}b\text{-PAsp} @ \text{DOX}$ 载药体系的平均粒径为 (197.7 ± 1.5) nm, zeta 电位为 (-35.9 ± 0.6) mV, 载药量 $(20.36 \pm 0.67)\%$, 包封率 $(83.71 \pm 0.53)\%$ 。在较低的 pH(5.5) 下 DOX 的累积释放量得到提高 ($P < 0.05$), 在外磁场作用下表现出良好的磁响应性和细胞靶向性, 且对人肺癌 A549 细胞具有显著的杀伤作用。**结论** $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2 @ \text{PEG-}b\text{-PAsp} @ \text{DOX}$ 具有良好的 pH 响应性和磁靶向特性, 可使药物靶向到达肿瘤部位并控制释放, 有效杀伤人肺癌 A549 细胞。

[关键词] pH 响应性; 磁靶向; 载药系统; 多柔比星; 复合纳米粒

[中图分类号] R 943.42 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)03-0288-07

Preparation of pH/magnetic dual responsive nanocomplex $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2 @ \text{PEG-}b\text{-PAsp} @ \text{DOX}$ and its cytotoxicity effect on A549 cells

WANG Shuang-ran^{1△}, ZHANG Han-zhe^{2△}, ZHAN Jie-qiong¹, MA Zhi-qiang³, SHE Lan³, YANG Feng^{1,3*}

1. Graduate Student Division, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei, China
2. The 11th Team of Student Brigade, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
3. Department of Inorganic Chemistry, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To prepare doxorubicin-loaded pH/magnetic dual responsive nanocomplex denoted as $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2 @ \text{PEG-}b\text{-PAsp} @ \text{DOX}$ and to determine its chemo-physical properties, pH/magnetic dual responsive release, and cytotoxicity against human lung cancer A549 cells. **Methods** The nanocomplex was synthesized through a sequential process involving hydrothermal treatment, Stöber method, sol-gel technique, and cross-linking. The morphology, diameter, zeta potential and magnetic properties of the nanocomplex were characterized by transmission electron microscopy, zeta potential measurement analyzer, and hysteresis loop tester, respectively. Drug loading efficiency and encapsulation efficiency were examined by ultraviolet visible absorption spectroscopy; pH-stimulated drug release was investigated by dialysis *in vitro*; and the anti-proliferative activity apoptosis-induction effect of the complex nanoparticles were investigated by CCK-8 method and flow cytometer, respectively. **Results** The average particle size of drug-loaded system $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2 @ \text{PEG-}b\text{-PAsp} @ \text{DOX}$ was (197.7 ± 1.5) nm and the zeta potential was (-35.9 ± 0.6) mV. Drug loading efficiency and encapsulation efficiency were

[收稿日期] 2015-10-22 **[接受日期]** 2015-12-30

[基金项目] 国家自然科学基金(21401214), 第二军医大学青年启动基金(2013QN03). Supported by National Natural Science Foundation of China (21401214) and Starting Foundation for Young Scholars of Second Military Medical University (2013QN03).

[作者简介] 王双冉, 硕士生. E-mail: wangsr924@126.com; 张瀚哲, 第二军医大学临床医学专业五年制 2013 级学员. E-mail: zhanghanzhe2013@sina.com

△共同第一作者(Co-first authors).

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81871218, E-mail: yangfeng1008@126.com

(20.36±0.67)% and (83.71±0.53)%, respectively. Cumulative release rate was significantly increased in mild acid condition (pH=5.5) ($P<0.05$). The nanocomplex also demonstrated a good magnetic response and targeting ability under outside magnetic field. Moreover, the drug-loaded nanoparticle showed a significant cytotoxicity effect against human lung A549 cells *in vitro*. **Conclusion** Fe₃O₄@SiO₂@PEG-*b*-PAsp@DOX possesses a good pH/magnetic dual responsive release characteristics and exhibits efficient antitumor activity *in vitro* against lung cancer A549 cells.

[Key words] pH responsive; magnetic targeting; delivery system; doxorubicin; complex nanoparticles

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(3): 288-294]

恶性肿瘤是威胁人类健康的常见疾病^[1-3]。化疗是临床治疗恶性肿瘤最主要的手段之一,但目前常用的化疗药物属全身性给药,肿瘤部位药物浓度偏低并伴随着较大的全身性不良反应,不仅损害了化疗患者的身体健康,而且严重限制了其临床应用^[4]。因此使化疗药物能更有效靶向富集至肿瘤部位并在肿瘤部位有效释放的靶向性控释药物载体的研究备受关注。目前常用的靶向方法有生物靶向和物理靶向两大类,其中利用磁性物质在磁场作用下定向移动并滞留的特性进行靶向的方法是物理靶向中最常采用的方法之一^[5]。本研究设想利用能够负载药物分子且自身具有 pH 敏感性的高分子聚合物聚乙二醇-*b*-聚天冬氨酸(PEG-*b*-PAsp)与超顺磁性的 Fe₃O₄ 纳米粒构建形成化疗药物给药体系^[6-7],以期在外磁场作用下,化疗药物载体在体内能够定向移动并富集于肿瘤病灶部位,并在其肿瘤部位具有较低 pH 的生理条件下有效释放负载的化疗药物,增加药物在肿瘤部位的浓度、降低化疗药物的全身毒性,从而达到更好的化疗效果。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

盐酸多柔比星(DOX·HCl,大连美仑生物技术有限公司),4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI,罗氏公司),六水合氯化铁(FeCl₃·6H₂O)、乙酸钠(NaAc)、柠檬酸三钠(Na₃Cit)均购自国药集团化学试剂有限公司,氨基聚乙二醇单甲醚(PEG-NH₂,M_w 5 000)、L-天冬氨酸-β-苄酯[H-Asp(OBzl)-OH],3-氨基丙基三乙氧基硅烷(APTS)、1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)及 *N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)均购自美国阿拉丁工业公司。水热釜(YK-200,上海豫康科教仪器设备有限公司),激光粒度-zeta 电位测定仪(Zetasizer Nano ZS,英国马尔文仪器有限公司),荧光显微镜(Olympus IX71, Olympus 公司),流式细胞仪(BD FACS Calibur, BD 公司),磁滞回

线测试仪(MicroSence EV9,德国 VSM 公司)。其他为实验室常用试剂与仪器。

1.2 磁性纳米复合粒的制备

1.2.1 磁性 Fe₃O₄ 纳米粒的制备

利用水热法^[8]合成 Fe₃O₄ 纳米粒,将 0.24 g Na₃Cit 溶于 20 mL 乙二醇中,再加入 0.54 g FeCl₃·6H₂O 和 1.21 g NaAc 至完全溶解,置于水热釜中,200℃ 下反应 10 h。冷却至室温后用钕铁硼磁铁收集磁性 Fe₃O₄ 纳米粒,用无水乙醇和去离子水分别洗涤 3 次,真空干燥得到棕黑色磁性 Fe₃O₄ 纳米粒。

1.2.2 氨基化磁性 Fe₃O₄@SiO₂-NH₂ 纳米粒的制备

通过 Stöber 法和溶胶凝胶法制备 Fe₃O₄@SiO₂-NH₂ 纳米粒^[9],将 16 mg 磁性 Fe₃O₄ 纳米粒分散于 90 mL 水与乙醇体积比为 1:3.5 的混合溶液中,超声并高速搅拌 0.5 h,加入 2 mL 浓氨水,缓慢加入 100 μL 正硅酸乙酯(TEOS),500 r/min 搅拌反应 5 h 后加入氨基化试剂 APTS 50 μL。继续搅拌 2 h,用钕铁硼磁铁吸附反应产物,用无水乙醇和去离子水超声洗涤 3 次,真空干燥,得到氨基化磁性 Fe₃O₄@SiO₂-NH₂ 纳米粒。

1.2.3 pH 响应性高分子聚合物 PEG-*b*-PAsp 的合成

参照文献^[10]的方法合成高分子聚合物 PEG-*b*-PAsp。取 2.5 g H-Asp(OBzl)-OH 溶于 30 mL 无水四氢呋喃(THF)中,升温至 60℃,加入 3 g 固体三光气,通风橱中搅拌至溶液澄清后,再加入过量正己烷并于 4℃ 过夜沉淀;抽滤后用乙酸乙酯与正己烷体积比为 1:1 的混合液重结晶,真空干燥得到天冬氨酸苄酯环内酸酐(BLA-NCA)。取 0.5 g PEG-NH₂ 和 2.5 g BLA-NCA,分别用无水硫酸镁预处理的二氯甲烷溶解,两者在 N₂ 氛围下 30℃ 搅拌反应 72 h,用 10 倍体积无水乙醚沉淀,抽滤并真空干燥得到聚乙二醇-*b*-聚天冬氨酸苄酯(PEG-*b*-PBLA)。取 4 g PEG-*b*-PBLA 溶于 200 mL THF 与 NaOH(1 mol/L)体积比为 1:1 的混合溶液中,室温搅拌 10 h,用 0.1 mol/L HCl 溶液调至中性,浓

缩、透析、干燥得到白色固体 PEG-*b*-PAsp。

1.2.4 负载 DOX 的 pH 响应磁性纳米复合粒 Fe₃O₄@SiO₂@PEG-*b*-PAsp@DOX 的制备 参照武承林等^[11]的方法,分别取 20 mg Fe₃O₄@SiO₂-NH₂ 和 PEG-*b*-PAsp 均溶于 4 mL 的纯水,400 r/min 搅拌混匀 0.5 h 后,加入溶于 4 mL 纯水的 17 mg EDC·HCl 和 3.2 mg NHS,冰浴下反应 4 h,再加入 5 mL 的 DOX·HCl 溶液(4.4 g/L),反应过夜,透析并真空干燥,得到负载 DOX 的磁性纳米复合粒 Fe₃O₄@SiO₂@PEG-*b*-PAsp@DOX。而空白材料 Fe₃O₄@SiO₂@PEG-*b*-PAsp 则是将未加入 DOX·HCl 的复合物经透析真空干燥制备得到的。

1.3 载药磁性纳米复合粒的形貌、粒径、zeta 电位和磁性测定 制备的载药磁性纳米复合粒超声分散于无水乙醇中,碳膜铜网上制样并在透射电镜下观察其形貌。制备纳米复合粒纯水重悬液,用马尔文激光粒度仪测定其粒径分布和 zeta 电位,并通过外界施加磁场来对其磁性进行测定;同时取一定质量干燥的纳米复合粒,利用磁滞回线测试仪检测其超顺磁性和磁饱和度。

1.4 载药磁性纳米复合粒的载药量和包封率的测定 取 5 mg 干燥的 Fe₃O₄@SiO₂@PEG-*b*-PAsp@DOX 超声分散于 400 mL pH 5.5 的 PBS 溶液中,避光搅拌 12 h,将含有药物的溶液进行离心、过滤,收集滤液,利用紫外可见分光光度法测定 DOX 在 235 nm 处的光密度(*D*)值。结合该条件下 DOX 的标准曲线,计算 Fe₃O₄@SiO₂@PEG-*b*-PAsp@DOX 中 DOX 的含量,并按以下公式计算载药率与包封率:载药量(%)=(载药纳米粒中的 DOX 含量/载药纳米粒的总量)×100%,包封率(%)=(载药纳米粒中的 DOX 含量/投入的 DOX 量)×100%。

1.5 载药磁性纳米复合粒在不同 pH 缓冲溶液中的药物释放研究 用精密分析天平称取相同质量的 Fe₃O₄@SiO₂@PEG-*b*-PAsp@DOX 干燥粉末,分别溶于 2 mL pH 分别为 5.5 和 7.4 的 PBS 中,置于截留相对分子质量为 10 000 的透析袋中,分别置于 100 mL 不同 pH 的缓冲溶液(pH 5.5, pH 7.4)^[12]中,37℃以恒定速率振荡,在 0.5、1、2、4、8、12、24、48、60、72、96 h 取样 3 mL,并补加相同体积的缓冲液。利用紫外分光光度仪测定 235 nm 处的 *D* 值,结合 DOX 的标准曲线计算出各个时间点的累积释

放量。

1.6 细胞摄取实验和载药磁性纳米复合粒的体外磁靶向性考察 取处于对数生长期的 A549 细胞以 10⁶/mL 的密度接种于 6 孔板,加入浓度为 5 μg/mL 的 Fe₃O₄@SiO₂@PEG-*b*-PAsp@DOX,37℃、5% CO₂ 条件下孵育 2 h 后,PBS 清洗 2 次。用 4% 的多聚甲醛溶液固定,再用 PBS 清洗 2 次,用 1 μg/mL 的 DAPI 溶液染核 20 min,PBS 清洗 2 次,荧光显微镜观察 DOX 的红色荧光,考察 A549 细胞对 DOX 或载药纳米复合粒的摄取情况。另取等量 A549 细胞接种于 2 片等面积的玻片上,于同一培养皿中培养,在其中一玻片下施加外磁场。培养皿中加入载药纳米复合粒至 5 μg/mL,混合均匀后共培养 2 h,每 15 min 轻摇混匀,分别收集玻片上细胞,通过流式细胞仪测定比较两组摄取细胞的荧光强度,考察载药纳米复合粒的体外磁靶向性^[13-14]。

1.7 细胞毒性实验 取 A549 细胞以 1×10⁴/孔接种于 96 孔板,37℃、5% CO₂ 条件下培养过夜后分别加入不同浓度的 Fe₃O₄@SiO₂@PEG-*b*-PAsp、DOX 和 Fe₃O₄@SiO₂@PEG-*b*-PAsp@DOX,其中 Fe₃O₄@SiO₂@PEG-*b*-PAsp@DOX 中 DOX 含量与 DOX 溶液一致,分别在 24、48 h 弃去上层培养液后加入 100 μL 10% 的 CCK-8 培养基溶液,继续于 37℃、5% CO₂ 条件下孵育 1~2 h,测量在 450 nm 处的 *D* 值,并结合以下公式计算:细胞相对存活率(%)=(*D*_{实验组}-*D*_{空白溶剂组})/(*D*_{阴性对照组}-*D*_{空白溶剂组})×100%。

1.8 细胞凋亡实验 取 A549 细胞调整密度为 2×10⁵/mL,取 1 mL 接种于 6 孔板中,在 37℃、5% CO₂ 的孵箱环境中培养过夜。分别加入不同浓度的 Fe₃O₄@SiO₂@PEG-*b*-PAsp、Fe₃O₄@SiO₂@PEG-*b*-PAsp@DOX 溶液,37℃条件下孵育 24 h,离心并收集细胞行 Annexin V-FITC 和碘化丙啶(PI)染色,流式细胞仪进行分析。

1.9 统计学处理 使用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 pH 响应性高分子聚合物 PEG-*b*-PAsp 的核磁共振氢谱图 PEG-*b*-PAsp 是通过在碱性条件下水解去除 PEG-NH₂ 引发 BLA-NCA 开环聚合产物的

苯醇得到的。图 1 显示的分别为 PEG-*b*-PBLA(图 1A)和 PEG-*b*-PAsp(图 1B)的谱图,其中峰 1、1'为聚乙二醇主链亚甲基吸收峰,峰 2、2'为天冬氨酸主链上次甲基吸收峰(4.29),峰 3、3'为天冬氨酸侧链上亚甲基保护峰(2.66~3.14),峰 4 和 5 分别为侧链保护基亚甲基(5.02~5.16)和苯环吸收峰(7.27)。由两者的图谱比较,可以看出侧链保护基团的吸收峰基本完全消失,说明聚合物已经水解充分,结合峰 1 和峰 4 的积分比可知所得产物为 PEG-*b*-PAsp。

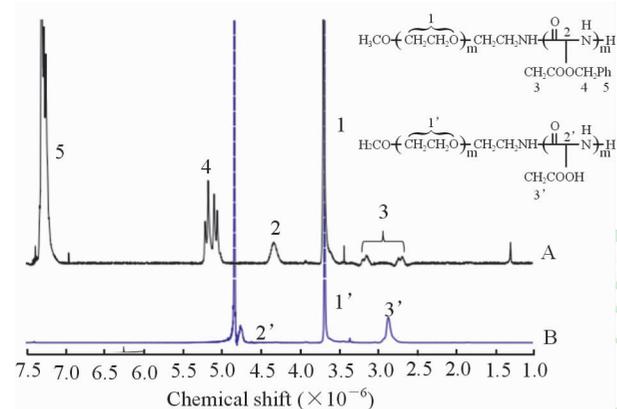


图 1 PEG-*b*-PBLA (A)和 PEG-*b*-PAsp (B)的核磁共振氢谱图

Fig 1 The ^1H NMR spectrum of PEG-*b*-PBLA (A) and PEG-*b*-PAsp (B)

PEG: Polyethylene glycol; PBLA: Poly (β -benzyl-L-aspartate); PAsp: Polyaspartic acid

2.2 载药磁性纳米复合粒形态、粒径和 zeta 电位 制备的磁性纳米复合粒在透射电镜下观察可见形态呈圆球形,表面光滑且粒径较均一(图 2)。激光粒度仪测得 Fe_3O_4 的平均粒径为 (138.4 ± 1.1) nm, zeta 电位 (-18.9 ± 0.3) mV; $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{SiO}_2$ 的平均粒径为 (160.3 ± 1.3) nm, zeta 电位 (-30.2 ± 0.5) mV; $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{SiO}_2@/\text{PEG-}b\text{-PAsp}@/\text{DOX}$ 的平均粒径为 (197.7 ± 1.5) nm, zeta 电位 (-35.9 ± 0.6) mV。

2.3 载药磁性纳米复合粒对 DOX 的载药及 pH 响应性释药 利用紫外分光光度法,以不同浓度 DOX 溶液的浓度值为横坐标, D_{235} 值为纵坐标,建立直线回归方程为 $Y=0.0181X-0.0039$ ($0.25\sim 25\ \mu\text{g/mL}$, $R=0.9996$,图 3A)。利用直线回归方程计算出载药磁性纳米复合粒的载药量为 $(20.36 \pm 0.67)\%$, $S=0.6006$ ($n=3$); 包封率为 $(83.71 \pm 0.53)\%$, $S=0.7461$ ($n=3$)。在磁性载药纳米复合粒的体外 pH 响应性释药实验中,以 pH 5.5 和 pH 7.4 的 PBS 溶液作为释放介质,结果(图 3B)显示在 pH 5.5 的 PBS 溶液中药物 48 h 累积释放率高达 70%,高于 pH 7.4 (50%),差异有统计学意义($P<0.05$),根据药物累积释放曲线可以看到载药体系 $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{SiO}_2@/\text{PEG-}b\text{-PAsp}@/\text{DOX}$ 的释药具有 pH 响应性。

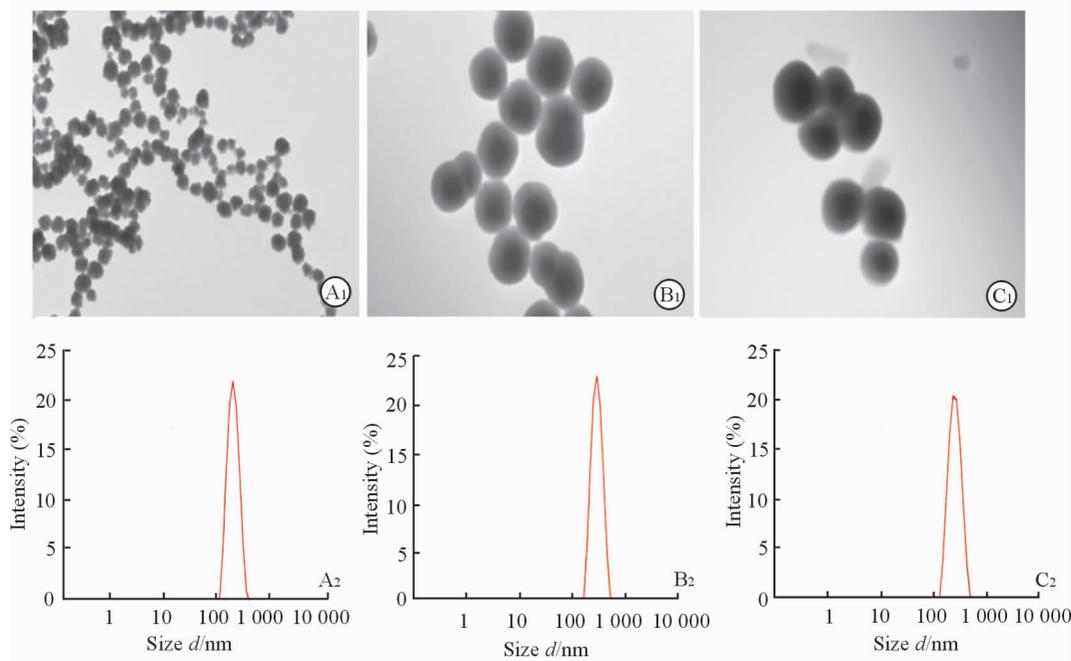


图 2 磁性纳米粒子的透射电镜形态(A₁~C₁)和粒径图(A₂~C₂)

Fig 2 TEM photograph (A₁-C₁) and diameter (A₂-C₂) of magnetic nanoparticles

A₁, A₂: Fe_3O_4 ; B₁, B₂: $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{SiO}_2$; C₁, C₂: $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{SiO}_2@/\text{PEG-}b\text{-PAsp}@/\text{DOX}$. TEM: Transmission electron microscope; PEG: Polyethylene glycol; PAsp: Polyaspartic acid; DOX: Doxorubicin. Original magnification: $\times 8\ 000$ (A₁), $\times 20\ 000$ (B₁, C₁)

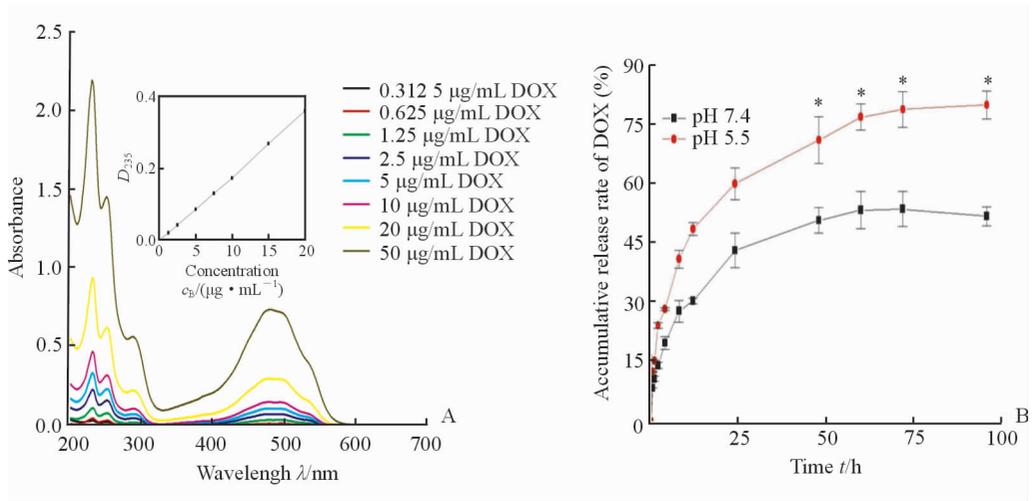


图3 DOX溶液的紫外吸收和光密度-浓度标准曲线(A)及药物的pH响应性释放曲线(B)

Fig 3 Ultraviolet absorption curve and standard curve of absorbance-concentration of DOX solution (A) and pH sensitivity release curve of drugs *in vitro* (B)

DOX: Doxorubicin. * $P < 0.05$ vs pH 7.4. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

2.4 载药磁性纳米复合粒的细胞摄取和体外磁靶向性 利用人肺癌 A549 细胞并借助于 DOX 的自身红色荧光观察肿瘤细胞对载药磁性纳米复合粒的摄取情况。光镜下可见细胞中黑色纳米粒子的摄入和聚集(图 4A),在荧光显微镜下可看到 DOX 的红色荧光(图 4B)与细胞核染的蓝色荧光(图 4C)重合(图 4D),表明载有 DOX 的磁性纳米复合粒被细胞摄取后, DOX 在细胞质中释放并能够有效进入细胞核。

室温磁滞回线测定表明, Fe_3O_4 、 $Fe_3O_4 @ SiO_2$ 和 $Fe_3O_4 @ SiO_2 @ PEG-b-PAsp @ DOX$ 的磁饱和强度 M_s 分别为 48.07、13.7 和 10.97 $A \cdot m^2/kg$, 矫顽力 H_c 均为 0 A/m, 表明经过修饰的 $Fe_3O_4 @ SiO_2 @ PEG-b-PAsp @ DOX$ 纳米粒复合仍然具有良好的超顺磁性和磁饱和强度。在外界磁场作用下的聚集实验中, 载药磁性纳米复合粒在 15 min 内向施加磁场一侧有效聚集(图 5A)。通过对同一培养体系中施加和不施加外磁场的肿瘤细胞荧光强度的测定(图 5B), 可以发现施加外界磁场侧的细胞荧光强度(39.28)强于未施加外界磁场侧(27.29), 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 表明该载体材料能在外界磁场作用下定向聚集, 被肿瘤细胞更有效的摄取。

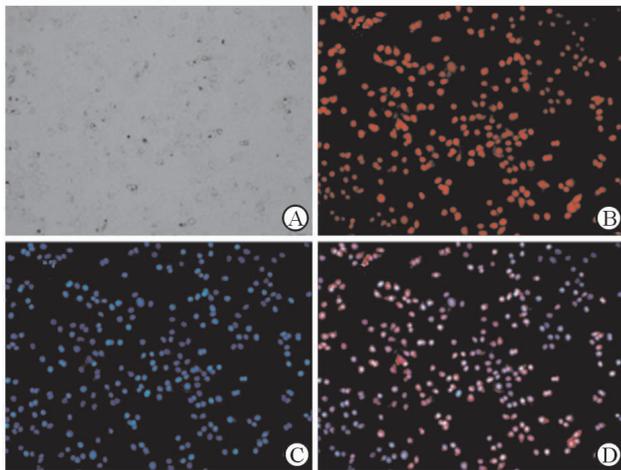


图4 荧光显微镜下 $Fe_3O_4 @ SiO_2 @ PEG-b-PAsp @ DOX$ 的细胞摄取情况

Fig 4 Cellular uptake of $Fe_3O_4 @ SiO_2 @ PEG-b-PAsp @ DOX$ under fluorescent microscope

A: Bright-field image; B: DOX; C: DAPI; D: $Fe_3O_4 @ SiO_2 @ PEG-b-PAsp @ DOX$. PEG: Polyethylene glycol; PAsp: Polyaspartic acid; DOX: Doxorubicin; DAPI: 4'-diamidino-2-phenylindole. Original magnification: $\times 200$

2.5 细胞毒性和细胞凋亡实验 采用 CCK-8 法考察载药体系对 A549 细胞的毒性, 结果(图 6A)发现空白载体 $Fe_3O_4 @ SiO_2 @ PEG-b-PAsp$ 自身的细胞毒性很小; 而载药体系 DOX 与 $Fe_3O_4 @ SiO_2 @ PEG-b-PAsp @ DOX$ 对细胞的杀伤作用均随着浓度的增加而增强, 差异具有统计学意义($P < 0.05$, 图 6B)。

利用 Annexin V-FITC/PI 双染法对载药体系诱导 A549 细胞凋亡的测定结果发现, 空白载体 $Fe_3O_4 @ SiO_2 @ PEG-b-PAsp$ 并未诱导细胞凋亡产生, 而载药体系 $Fe_3O_4 @ SiO_2 @ PEG-b-PAsp @ DOX$ 诱导 A549 细胞的凋亡呈现出明显的剂量依赖性(图 7)。

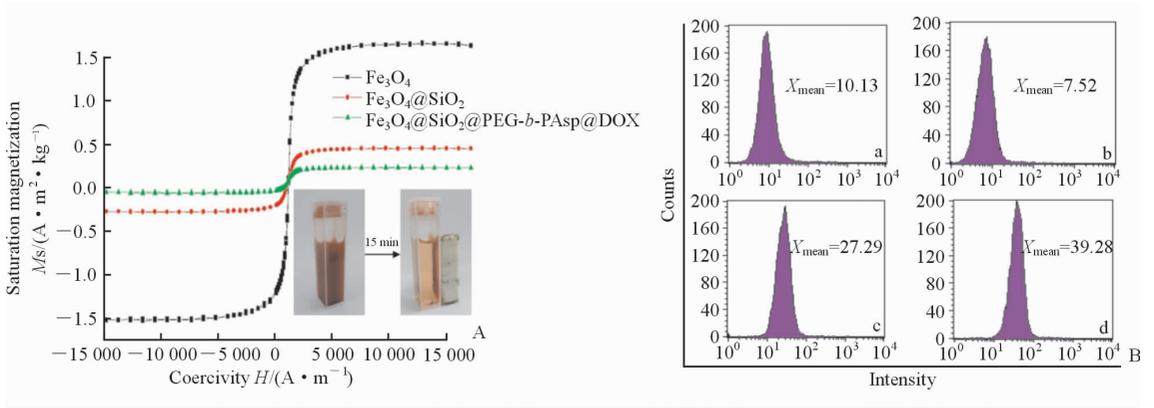


图 5 室温磁滞回线(A)和流式细胞术(B)示不同培养条件下 A549 细胞的荧光强度

Fig 5 Room temperature magnetic hysteresis curve(A) and flow cytometry(B) showing the fluorescence intensity of A549 cells under different culture conditions

a: Complete medium; b: $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{SiO}_2@/\text{PEG}-b\text{-PAsp}$; c: $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{SiO}_2@/\text{PEG}-b\text{-PAsp}@/\text{DOX}$; d: Under the magnetic field of $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{SiO}_2@/\text{PEG}-b\text{-PAsp}@/\text{DOX}$. PEG: Polyethylene glycol; PAsp: Polyaspartic acid; DOX: Doxorubicin

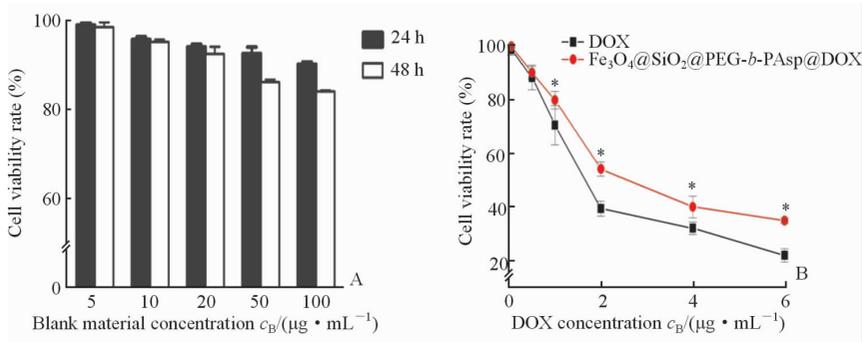


图 6 空白载体(A)及载药系统(B)对 A549 细胞的细胞毒性

Fig 6 Cytotoxicity of blank carrier (A) and the delivery system(B) to human lung cancer A549 cells

PEG: Polyethylene glycol; PAsp: Polyaspartic acid; DOX: Doxorubicin. * $P < 0.05$ vs DOX. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

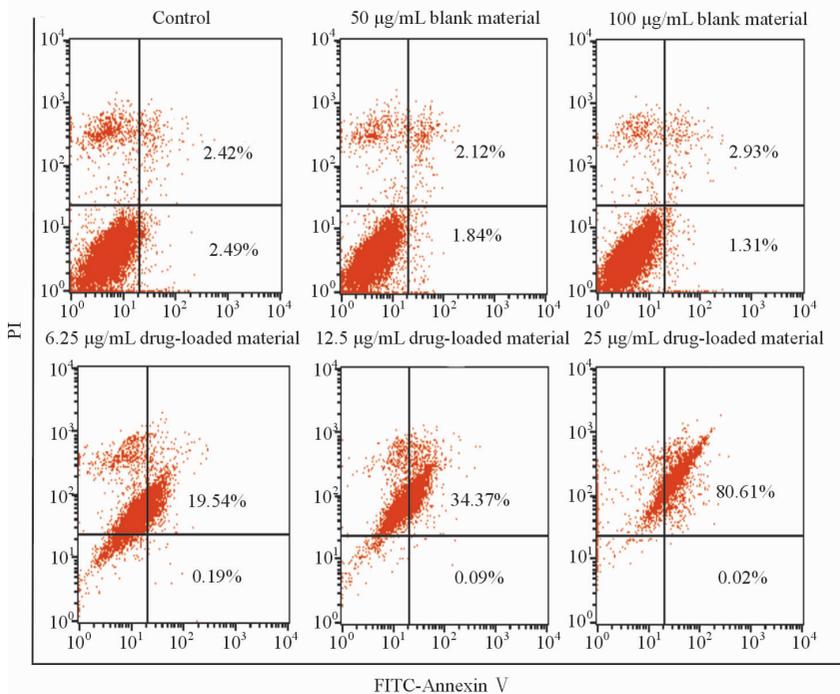


图 7 空白载体 $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{SiO}_2@/\text{PEG}-b\text{-PAsp}$ 和载药体系 $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{SiO}_2@/\text{PEG}-b\text{-PAsp}@/\text{DOX}$ 对 A549 细胞凋亡的影响

Fig 7 Flow cytometry showing apoptosis of A549 cells induced by blank material

$\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{SiO}_2@/\text{PEG}-b\text{-PAsp}$ and drug-loaded material $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{SiO}_2@/\text{PEG}-b\text{-PAsp}@/\text{DOX}$

PEG: Polyethylene glycol; PAsp: Polyaspartic acid; DOX: Doxorubicin

3 讨论

本研究首先通过水热法合成了 Fe_3O_4 磁性纳米粒,为提高 Fe_3O_4 磁性纳米粒的稳定性并降低其聚合作用,通过 Stöber 法和溶胶凝胶法在 Fe_3O_4 磁性纳米粒表面包覆上 SiO_2 层,最后通过酰胺化反应将 pH 响应性的聚合物载药材料 PEG-*b*-PA_{sp} 与氨基化的 SiO_2 层交联构建形成药物载体系统。以 DOX 为模型药物制备出 $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2 @ \text{PEG-}b\text{-PA}_{sp} @ \text{DOX}$,其平均粒径为 $(197.7 \pm 1.5) \text{ nm}$ 、zeta 电位 $(-35.9 \pm 0.6) \text{ mV}$ 。利用 DOX 自身的氨基通过静电作用负载在 $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2 @ \text{PEG-}b\text{-PA}_{sp}$ 上,在酸性环境中两者之间的静电力作用消失,加快了 DOX 的释放速率^[15]。DOX 可有效诱导肿瘤细胞的凋亡^[16-18],本研究体外靶向性抗肿瘤的研究结果表明,该磁性纳米粒具备相对良好的生物安全性,同时可以有效地负载 DOX 定向进入细胞并可控地释放药物,且对肿瘤细胞的杀伤效果较为显著。

DOX 之所以能够负载在磁性纳米复合粒上,是由于自身的氨基在中性或者偏碱性环境中能够与纳米复合粒表面聚天冬氨酸链段的羧基发生静电作用,在载药过程中加入适当量的三乙胺调节反应体系的 pH 并充分搅拌,可以提高 DOX 的载药量。而在偏酸性环境中 DOX 的氨基与高分子链段羧基间的静电力作用消失,因此可以体现出药物释放的 pH 响应性。

本研究构建的 pH 响应性的载药磁性纳米复合粒能够有效的负载抗肿瘤药物,表现出显著的药物 pH 响应性释放和磁靶向性,有望在外磁场作用下靶向到达肿瘤病灶部位,实现在肿瘤部位可控的释放药物的目的,最终提高抗肿瘤药物的生物利用度、减小抗肿瘤药物的化疗不良反应,为 pH 响应性磁靶向载药系统作为抗肿瘤药物传递系统的研究提供了有益探索。

[参考文献]

[1] Norwood W D, Fuqua P A, Mancuso T F. Asbestos-an environmental health hazard[J]. Northwest Med, 1967, 66: 821-828.

[2] Poonthananiwatkul B, Howard R L, Williamson E M, Lim R H. Cancer patients taking herbal medicines; a review of clinical purposes, associated factors, and perceptions of benefit or harm[J]. J Ethnopharmacol, 2015: 58-66.

[3] Nygaard I. Balancing innovation and harm[J]. Am J Obstet Gynecol, 2014, 210: 383-384.

[4] Chen Y C, Kok V C, Chien C H, Horng J T, Tsai J J. Cancer risk in patients aged 30 years and above with type 2 diabetes receiving antidiabetic monotherapy: a cohort study using metformin as the comparator[J]. Ther Clin Risk Manag, 2015, 11: 1315-1323.

[5] Zou Y, Liu P, Liu C H, Zhi X T. Doxorubicin-loaded

mesoporous magnetic nanoparticles to induce apoptosis in breast cancer cells[J]. Biomed Pharmacother, 2015, 69: 355-360.

- [6] Mu B, Liu P, Pu Q. A functional cross linked polymeric nanocapsule with pH-responsive brushes on its inner wall: preparation, characterization and controlled release[J]. React Funct Polym, 2010, 70: 578-584.
- [7] Felber A E, Dufresne M H, Leroux J C. pH-sensitive vesicles, polymeric micelles, and nanospheres prepared with polycarboxylates[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2012, 64: 979-992.
- [8] Liu J, Sun Z, Deng Y, Zou Y, Li C, Guo X, et al. Highly water-dispersible biocompatible magnetite particles with low cytotoxicity stabilized by citrate groups[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2009, 48: 5875-5879.
- [9] Lu Y, Yin Y D, Mayers B T, Xia Y N. Modifying the surface properties of superparamagnetic iron oxide nanoparticles through a sol-gel approach [J]. Nano Lett, 2002, 2: 183-186.
- [10] 刘 赣. 聚合物纳米载体的制备及其对蛋白质的投递[D]. 天津:南开大学,2014.
- [11] 武承林,贺 欢,高红军,刘 赣,马如江,安英丽,等. $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2 @ \text{polymer}$ 复合粒子的制备及在药物控制释放中的应用[J]. 中国科学:化学,2010,40:269-275.
- [12] Vu F, Guinand S, Pasche O, Zürcher S, Ronga A, Arnold C, et al. [2014 literature findings in internal general medicine] [J]. Rev Med Suisse, 2015, 11: 174, 176-180.
- [13] 朱 杰,廖 蕾,朱丽娜,孔继烈,刘宝红. 叶酸功能化介孔碳纳米球负载阿霉素的细胞靶向传递及可控释放[J]. 化学学报,2013,71:69-74.
- [14] Fang J H, Lai Y H, Chiu T L, Chen Y Y, Hu S H, Chen S Y, et al. Magnetic core-shell nanocapsules with dual-targeting capabilities and co-delivery of multiple drugs to treat brain gliomas[J]. Adv Healthc Mater, 2014, 3: 1250-1260.
- [15] Kojima C, Suehiro T, Watanabe K, Ogawa M, Fukuhara A, Nishisaka E, et al. Doxorubicin-conjugated dendrimer/collagen hybrid gels for metastasis-associated drug delivery systems[J]. Acta Biomater, 2013, 9: 5673-5680.
- [16] Jain A, Kesharwani P, Garg N K, Jain A, Jain S A, Jain A K, et al. Galactose engineered solid lipid nanoparticles for targeted delivery of doxorubicin[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2015, 134: 47-58.
- [17] Attia S M, Bakheet S A. Effect of dihydrokainate on the capacity of repair of DNA damage and apoptosis induced by doxorubicin[J]. Mutagenesis, 2013, 28: 257-261.
- [18] 帅 怡,郭 隽,彭双清,张立实. 金属硫蛋白抑制阿霉素引起的心肌细胞凋亡作用研究[J]. 四川大学学报(医学版),2007,38:620-623.