

共加载阿霉素/血红蛋白树枝状介孔硅球的 制备及其生物性能研究

潘珊¹, 李永生¹, 施剑林^{1,2}

(1. 华东理工大学 材料科学与工程学院, 上海 200237; 2. 中国科学院 上海硅酸盐研究所, 上海 200050)

摘要: 实体瘤中普遍存在乏氧现象, 是导致肿瘤对非手术治疗手段抗拒性增加, 降低药物疗效的重要因素。针对这一问题, 本研究采用简单的两相界面法制备了一种小尺寸(65 nm)、单分散、生物稳定性良好的可共载抗癌药物盐酸阿霉素(DOX)和载氧蛋白血红蛋白(Hb)的树枝状介孔硅纳米颗粒(DMSNs)。利用扫描电子显微镜(SEM)、透射电子显微镜(TEM)、动态光散射仪(DLS)和氮气吸附-脱附仪等对材料进行表征。结果表明, 合成的 DMSNs 纳米颗粒粒径均一、分散性良好, 具有较大的比表面积($654.52 \text{ m}^2/\text{g}$)和孔容($1.26 \text{ cm}^3/\text{g}$)以及两套孔道结构(直径 2.7 nm 和 5.4~6.8 nm)。更重要的是, 树枝状介孔层的孔径仅需改变三乙醇胺(TEA)的用量即可调节。药物释放、流式细胞术、激光共聚焦以及细胞毒性等相关实验结果表明, DMSNs 可同时装载 DOX 与 Hb, 且具有较高的药物释放能力(75.6%)和持久的释放性能(48 h)。载入血红蛋白后, 其 IC_{50} 为 $20.6 \text{ }\mu\text{g/mL}$, 能够有效提高抗癌药物 DOX 的细胞致死率。因此, 这种小尺寸的树枝状介孔硅球在药物传输和肿瘤治疗方面具有潜在的应用价值。

关键词: 乏氧; 小尺寸; 树枝状介孔硅纳米颗粒; 药物传输

中图分类号: TQ174 文献标识码: A

Facile Synthesis of Dendritic Mesoporous Silica Nanoparticles for Co-loading of Doxorubicin and Hemoglobin

PAN Shan¹, LI Yong-Sheng¹, SHI Jian-Lin^{1,2}

(1. School of Material Science and Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. Shanghai Institute of Ceramics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050, China)

Abstract: Tumor hypoxia is a ubiquitous factor to cause the therapeutic resistance of drug or other treatments. To solve this problem, a facile biophase stratification approach was developed to fabricate dendritic mesoporous silica nanoparticles (DMSNs) with small particle size of 65 nm, high dispersity and excellent biostability through simply controlling the oil-water interfacial reaction. The resultant DMSNs were characterized by various techniques such as scanning electron microscope (SEM), transmission electron microscope (TEM), dynamic light scattering (DLS), and N_2 adsorption-desorption analysis, etc. It is verified that DMSNs possess two types of pore size (2.7 nm and 5.4–6.8 nm), high specific surface ($654.52 \text{ m}^2/\text{g}$) and pore volume ($1.26 \text{ cm}^3/\text{g}$), which are capable to co-load DOX and Hb, simultaneously. Moreover, the mesopore size in the dendritic mesoporous layer could be tuned by changing the amounts of triethanolamine (TEA). The testing results from drug release, flow cytometry histograms, confocal laser scanning microscopy, and cell cytotoxicity demonstrate that DMSNs possess high efficiency of drug release (75.6%), durable releasing period (48 h) and significantly enhanced cell lethality ($\text{IC}_{50} = 20.6 \text{ }\mu\text{g/mL}$). These data demonstrate that such

收稿日期: 2018-02-10; 收到修改稿日期: 2018-03-19

基金项目: 国家自然科学基金(51461165202, 51472085) National Natural Science Foundation of China (51461165202, 51472085)

作者简介: 潘珊(1993–), 女, 硕士研究生. E-mail: sanne_pan@163.com

通讯作者: 李永生, 教授. E-mail: ysl@ecust.edu.cn; 施剑林, 研究员. E-mail: jlshi@mail.sic.ac.cn

kind of dendritic mesoporous silica nanoparticles has great potentials in drug delivery and tumor chemotherapy.

Key words: tumor hypoxia; small size; dendritic mesoporous silica nanoparticles; drug delivery

肿瘤内部乏氧微环境的存在不但会进一步诱导肿瘤的发展与转移,而且严重降低了肿瘤组织对常规化疗、放疗、光动力治疗等治疗手段的响应性^[1-4]。据文献[2,5-6]报道,血红蛋白(Hb)、MnO₂以及全氟己烷的引入均能有效增加肿瘤内的氧气浓度并提高肿瘤治疗效率。其中,Hb是高等生物体内负责运载氧的蛋白质,是安全的天然载氧体,与抗癌药物共运输于肿瘤部位可降低乏氧微环境与肿瘤治疗之间的抗拒^[5,7-8],从而提高药物对癌细胞的杀伤效率。树枝状介孔氧化硅纳米颗粒具有良好的化学稳定性,优异的生物安全性以及生物相容性^[9-10],是一种实现小分子药物(<2 nm)与大分子蛋白(>2 nm)共同装载的优良药物运输载体^[11-13]。目前大多数报道所制备的树枝状介孔氧化硅纳米颗粒粒径过大^[9-10,14]。然而,相关研究表明细胞对小尺寸纳米颗粒(<100 nm)吞噬效率较高^[15-16]。与此同时,关于抗癌药物与载氧蛋白共装载的树枝状介孔氧化硅球鲜有报道。因此,制备一种小尺寸、双孔道、大孔径、可有效装载Hb和抗癌药物的树枝状介孔硅球非常值得研究。

本研究采用一种简单的两相界面法合成了一类小粒径(65 nm)、具有两种介孔孔道的单分散树枝状介孔氧化硅纳米材料(DMSNs),并通过调节三乙醇胺(TEA)的加入量调控树枝状介孔层孔径,实现盐酸阿霉素(DOX)与Hb的共装载。选取SMMC-7721作为细胞模型研究其对肿瘤细胞的杀伤效率,并结合药物的持续缓释效果探索其对改善肿瘤内部的乏氧微环境以及在药物传输与癌症治疗方面的应用潜力。

1 实验方法

1.1 树枝状介孔氧化硅纳米颗粒的制备

根据文献[17-19]报道,制备粒径为30 nm左右的介孔二氧化硅纳米颗粒(MSNs)。然后将MSNs超声分散于20 mL的超纯水中,加入一定量的TEA和20 mL的正硅酸乙酯(TEOS)/环己烷(20 vol%)溶液,混合均匀,60℃搅拌12 h,离心纯化后用盐酸/乙醇(10 vol%)溶液萃取多次以完全去除模版剂,得到树枝状介孔氧化硅纳米颗粒,记为DMSNs。为了调节树枝状介孔层的孔径,TEA溶液的加入量依次为0、0.3和0.6 g,样品依次命名为DMSNs-0、DMSNs-0.3和DMSNs-0.6。

1.2 DMSNs 的药物装载与释放能力测试

1.2.1 药物装载能力测试

10 mg 纳米颗粒分散于 4 mL DOX 的水溶液中(1 mg/mL),室温避光搅拌。24 h 后,离心分离并用磷酸缓冲液(PBS)(pH=7.4)溶液洗涤数次^[20]。收集样品 DOX@DMSNs,依据紫外分光光度计(UV-Vis)进行装载量的检测与计算。

DOX@DMSNs 重新分散于 Hb 的水溶液(0.5 mg/mL)中,于恒温振荡器中振荡 24 h。离心分离^[21]。收集样品 Hb/DOX@DMSNs,依据 UV-Vis 进行装载量的检测与计算。

1.2.2 药物释放能力测试

10 mg 载药材料分散于 3 mL 的 PBS 溶液中,在预设的不同时间点离心分离,取上清液依据 UV-Vis 测得药物释放曲线。

1.3 DMSNs 的细胞毒性及细胞吞噬试验

1.3.1 DMSNs 的细胞毒性试验

以人源肝癌细胞 SMMC-7721 为细胞模型,置于 37℃、5% CO₂ 的气氛中贴壁培养 24 h。分别加入 DOX、DOX@DMSNs 和 Hb/DOX@DMSNs(DOX 浓度为 0~50 μg/mL)的细胞培养液,继续培养 24 h,利用 MTT 测试方法检测并计算细胞存活率。

1.3.2 DMSNs 的细胞吞噬试验

SMMC-7721 细胞置于 37℃、5% CO₂ 的气氛中贴壁培养,加入 Hb/DOX@DMSNs(DOX 浓度为 12.5 μg/mL)的细胞培养液中共培养 1、4、8 和 24 h。利用莱卡荧光显微镜以及流式细胞仪进行测试。

2 结果与讨论

2.1 DMSNs 复合颗粒的结构及形貌分析

首先参考文献报道的方法^[17-19]合成小粒径的 MSNs(第一步),然后以 30 nm 左右的 MSNs 为“种子”,利用简单的两相界面法合成具有较大孔径的树枝状介孔层(第二步),其中溶解于上层油相环己烷(Cyclohexane)中的 TEOS 扩散至界面水解缩聚形成硅酸盐低聚物,同时亲水性-Si-OH 使其与水相 MSNs 表面的十六烷基三甲基氯化铵(CTAC)通过协同自组装作用进一步成核生长。而体系中持续搅拌带来的剪切力使硅酸盐/表面活性剂/油纳米胶束自由生长,从而形成树枝状的硅层(图 1)。

由图 2(a)~(b)可见, 所合成的 MSNs 粒径约 30 nm, 具有规整的球形形貌、均一性和单分散性。经过二次生长后, MSNs 表面依次生长出树枝状的外层结构, 且孔径相较于内层 MSNs 明显增大。图 2(e)~(f)和图 2(g)~(h)分别对应加入 0.3 和 0.6 g 的 TEA 所得

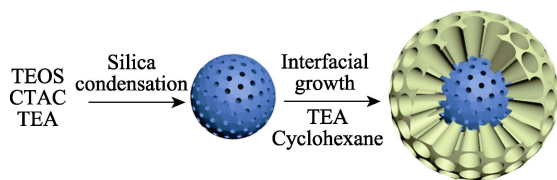


图 1 DMSNs 纳米颗粒的制备示意图

Fig. 1 Schematic illustration for the preparation of DMSNs

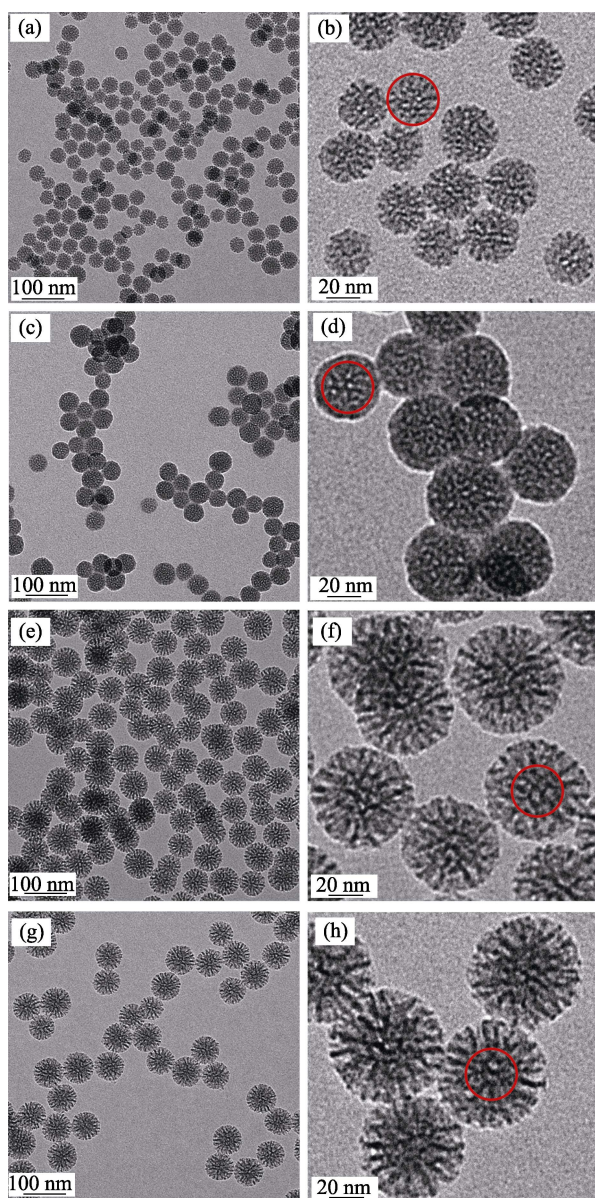


图 2 MSNs (a)~(b)、DMSNs-0 (c)~(d)、DMSNs-0.3 (e)~(f)、DMSNs-0.6 (g)~(h) 的不同放大倍数的透射电镜照片

Fig. 2 TEM images of MSNs (a, b), DMSNs-0 (c, d), DMSNs-0.3 (e, f), and DMSNs-0.6 (g, h) at different magnification

到的纳米颗粒, 可见, 通过调节 TEA 的加入量可成功对树枝状孔径大小进行调控。而且, 颗粒粒径均为 65 nm 左右, 解决了文献[9-10]报道的材料粒径较大的问题。另外, 比较图 2(d)和(h), 没有加入 TEA 溶液的样品, 几乎没有生成明显的树枝状介孔层, 这表明作为碱源的 TEA 溶液同时也起到了扩孔的作用。

图 3 是纳米颗粒的动态光散射粒径分布图。可以看出 MSNs、DMSNs-0、DMSNs-0.3 和 DMSNs-0.6 纳米颗粒的平均水合粒径分别为 35、40、70 和 70 nm, 这说明 TEA 的引入是形成树枝状孔道的关键因素, 同时并不会造成颗粒粒径变大。另外, 这些纳米颗粒均具有较窄的粒径分布。这说明随着制备过程的不断进行, 材料依然保持良好的水溶性以及单分散的状态。

图 4(a)~(b)是 MSNs 及 DMSNs 的氮气吸附-脱附曲线和孔径分布图, 表 1 是纳米颗粒的孔参数结果。可以看出, DMSNs-0 不仅没有成功构建较大的外层孔道, 反而出现了一定程度的堵孔情况。相较于 MSNs 内核, 其孔径与孔容都出现了明显下降(孔径为 1.7 nm, 孔容为 0.7 cm³/g)。随着 TEA 用量的增加, 材料的比表面积、树枝状介孔层孔径以及孔容依次增大, 同时保持了 MSNs 提供的 2.7 nm 的内核孔。其中 DMSNs-0.6 比表面积最大(654.52 m²/g), 总孔容为 1.26 cm³/g, 同时具备 2.7 和 6.8 nm 两套孔道, 完全满足 DOX(<1 nm³)和 Hb(5.3 nm×5.4 nm×6.5 nm)的装载需求^[22]。因此, 相关细胞实验均选择 DMSNs-0.6 组进行评估。

2.2 DMSNs 纳米颗粒的稳定性测试及药物释放

图 5(a)为 DMSNs 分别分散在超纯水与细胞培养液 RPMI 1640 中的稳定性测试结果。从图中可以看出 14 d 内纳米颗粒的粒径无明显波动, 基本保持

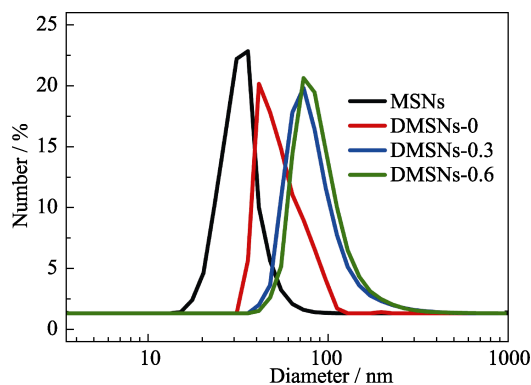


图 3 MSNs、DMSNs-0、DMSNs-0.3 和 DMSNs-0.6 动态光散射粒径分布图

Fig. 3 DLS size distribution curves of MSNs, DMSNs-0, DMSNs-0.3, and DMSNs-0.6

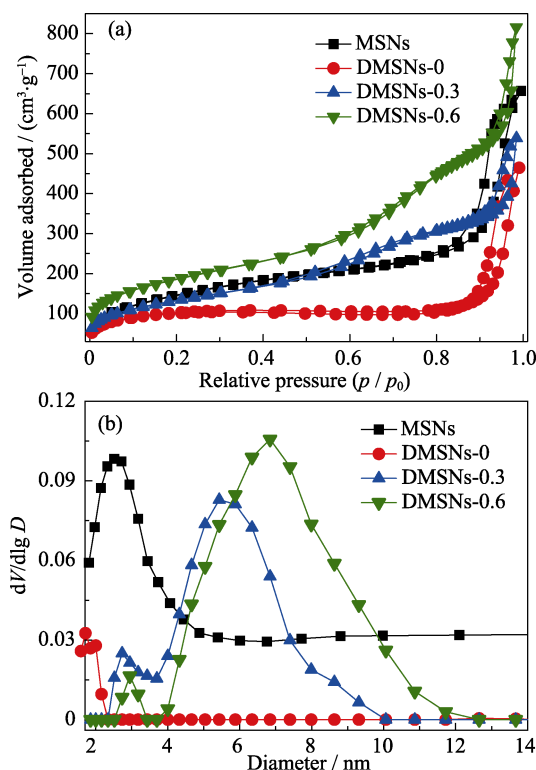


图 4 MSNs\DMSNs-0\DMSNs-0.3 和 DMSNs-0.6 氮气吸附-脱附曲线(a)及孔径分布图(b)

Fig. 4 N_2 adsorption-desorption isotherms (a) and corresponding BJH pore size distributions (b) of MSNs, DMSNs-0, DMSNs-0.3, and DMSNs-0.6

表 1 MSNs、DMSNs-0、DMSNs-0.3 和 DMSNs-0.6 的孔结构参数比较

Table 1 Pore structural parameters of the synthesized MSNs, DMSNs-0, DMSNs-0.3, and DMSNs-0.6

Sample	Specific surface area/ $(\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1})$	Pore diameter/nm	Pore volume/ $(\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1})$
MSNs	525.81	2.7	1.02
DMSNs-0	342.86	1.7	0.70
DMSNs-0.3	469.16	2.7 & 5.4	0.83
DMSNs-0.6	654.52	2.7 & 6.8	1.26

在 70 nm 左右, 这说明 DMSNs 在超纯水与细胞培养液 RPMI 1640 中没有发生颗粒的破坏或团聚, 表现出优异的生物稳定性。

确定材料的稳定性后, 以 DOX 为药物模型, Hb 为蛋白模型研究 DMSNs 在药物装载与释放方面的效果。利用 DOX 和 Hb 的标准曲线分别测定, DMSNs 对 DOX 的装载量约为 15%, 对 Hb 的装载量约为 32%。由于 DOX 的药物释放行为与溶液环境的酸碱性相关^[23], 酸性条件下, DOX 的氨基发生质子化反应能够使其释放量有所增加。图 5(b)为不同 pH 的 PBS 溶液中的阿霉素累计释放曲线。可以看出, pH 为 7.4 时, DOX 的累计释放量约为 59%, pH 为 5.4 时, 其累计释

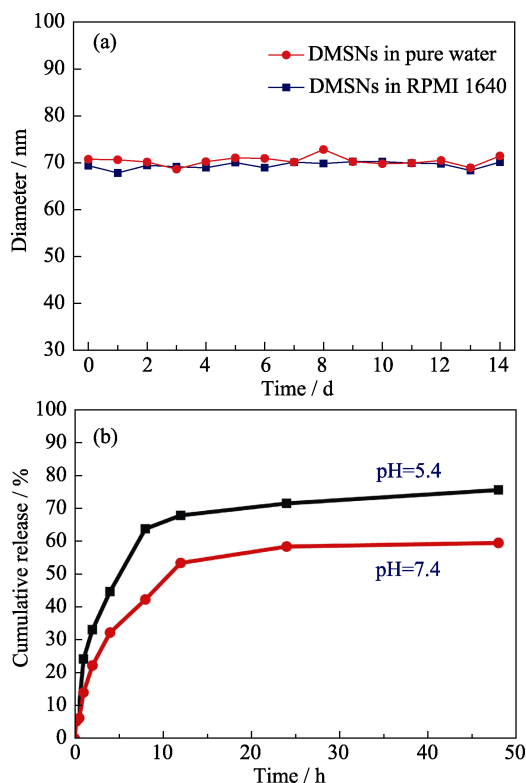


图 5 DMSNs 的稳定性测试(a)、Hb/DOX@DMSN 在不同 pH (pH=5.4 和 pH=7.4)PBS 溶液里的释放曲线(b)

Fig. 5 Biostability testing of DMSNs (a) and cumulative drug release of Hb/DOX@DMSN in PBS with pH=7.4 and pH=5.4 (b)

放量达到 75.6%。而肿瘤部位呈酸性(pH= 5.5)环境, 这意味着 Hb/DOX@DMSNs 可在病灶部位实现持久的药物缓释效果, 更好地达到治疗效果。

2.3 DMSNs 纳米颗粒的细胞吞噬及细胞毒性

从流式细胞术结果(图 6(a))可知, 随着时间推移, FL2-A 通道内的荧光信号即 DOX 的荧光信号发生了明显的位移, 这表明细胞内的 DOX 浓度逐渐增加, 也说明了 Hb/DOX@DMSNs 进入细胞后, DOX 从载体中陆续释放并具有一定的持续性。从激光共聚焦结果(图 6(b))可知 SMMC-7721 细胞对材料表现出良好的吞噬效果。其中细胞核因被 DAPI 染色呈蓝色荧光, DOX 自身为红色荧光。不难发现, DOX 释放后依次进入细胞质和细胞核, 充分发挥对肿瘤细胞的杀伤作用。

图 7 为 DMSNs 单载或共载抗癌药物或蛋白对细胞的致死效率与材料浓度的关系。相较于纯 DOX 组和 DOX@DMSNs 组, 当材料共负载 Hb 和 DOX 后, 其对癌细胞的致死效果更加明显, 且随着 DOX 浓度的提升, 细胞存活率持续降低。另外, 装载 Hb/DOX 的纳米颗粒 IC_{50} 为 20.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 相较于单载 DOX 纳米颗粒(IC_{50} 为 45.59 $\mu\text{g}/\text{mL}$)表现出更高的细胞毒性。这说明 Hb 的引入一定程度上缓解了肿瘤部位

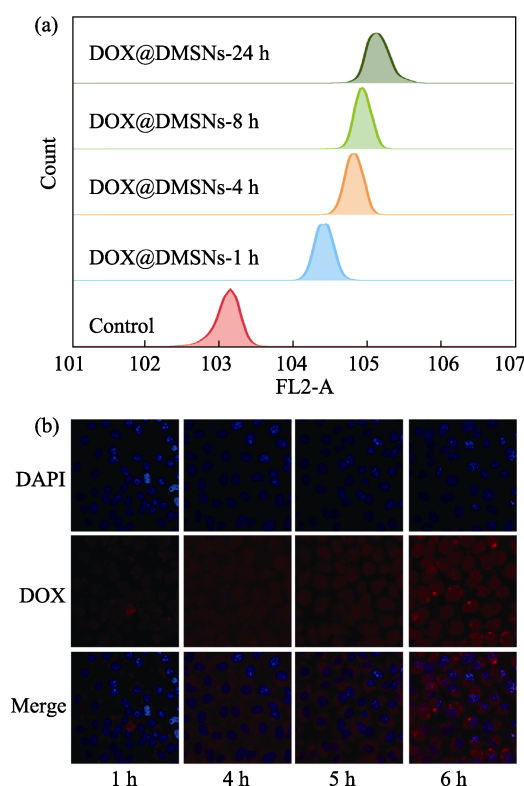


图 6 Hb/DOX@DMSN 与 SMMC-7721 细胞共培养不同时间 (1、4、8 和 24 h) 的流式细胞术结果(a)和激光共聚焦照片(b)
Fig. 6 Flow cytometry histograms (a) and CLSM images (b) of SMMC-7721 cells after being incubated with Hb/DOX@DMSN for 1 h, 4 h, 8 h, and 24 h

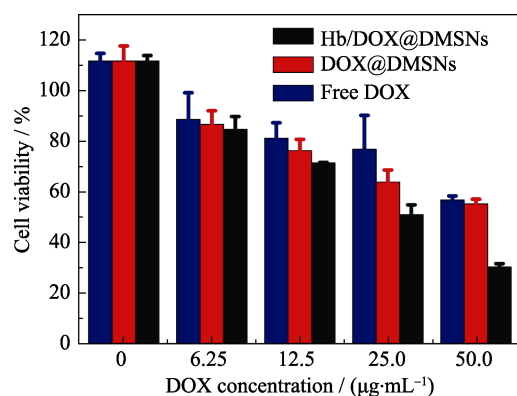


图 7 SMMC-7721 细胞与不同 DOX 浓度的 Hb/DOX@DMSNs、DOX@DMSNs 和 Free DOX 共培养 24 h 的细胞毒性结果
Fig. 7 Cell viability of SMMC-7721 cells incubated with Hb/DOX@DMSNs, DOX@DMSNs and free DOX with different concentrations of DOX for 24 h

的乏氧状态, 使 DOX 能够充分发挥药效, 提高细胞致死率, 从而改善抗癌药物的治疗效果。

3 结论

本研究利用两相界面法可控地制备了小尺寸 (65 nm)、单分散、稳定性良好的树枝状介孔氧化硅

纳米颗粒。该方法合成步骤简单, 反应条件温和, 制备的 DMSNs 结构稳定, 均一性良好且具备两套明显的介孔孔道(2.7 和 6.8 nm), 是血红蛋白与盐酸阿霉素实现共载的优良载体。研究发现, 血红蛋白的引入能够在一定程度上有效改善肿瘤细胞的乏氧状态, 使盐酸阿霉素在病灶部位表现出更高的细胞致死率, 其 IC_{50} 为 20.6 $\mu\text{g/mL}$ 。同时 DOX 在肿瘤部位是一个缓慢释放的过程(48 h), 具备持久的杀伤效果。因此, 小尺寸、双孔道的树枝状介孔硅纳米颗粒在药物传输与肿瘤治疗方面具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] ZHU W W, DONG Z L, FU T T, *et al.* Modulation of hypoxia in solid tumor microenvironment with MnO_2 nanoparticles to enhance photodynamic therapy. *Advanced Functional Materials*, 2016, **26**(30): 5490–5498.
- [2] CHEN Q, FENG L Z, LIU J J, *et al.* Intelligent albumin- MnO_2 nanoparticles as pH-/ H_2O_2 -responsive dissociable nanocarriers to modulate tumor hypoxia for effective combination therapy. *Advanced Materials*, 2016, **28**(33): 7129–7136.
- [3] SONG X J, FENG L Z, LIANG C, *et al.* Ultrasound triggered tumor oxygenation with oxygen-shuttle nanoperfluorocarbon to overcome hypoxia-associated resistance in cancer therapies. *Nano Letters*, 2016, **16**(10): 6145–6153.
- [4] LUO Z Y, ZHENG M B, ZHAO P F, *et al.* Self-monitoring artificial red cells with sufficient oxygen supply for enhanced photodynamic therapy. *Scientific Reports*, 2016, **6**(1): 1–11.
- [5] TIAN H, LUO Z, LIU L, *et al.* Cancer cell membrane-biomimetic oxygen nanocarrier for breaking hypoxia-induced chemoresistance. *Advanced Functional Materials*, 2017, **27**(38): 1703197–1–7.
- [6] CHENG Y, CHENG H, JIANG C, *et al.* Perfluorocarbon nanoparticles enhance reactive oxygen levels and tumour growth inhibition in photodynamic therapy. *Nature Communications*, 2015, **6**(1): 8785–8793.
- [7] BU H X, XU X, CHEN J M, *et al.* Synthesis of a hemoglobin-conjugated triblock copolymer for oxygen carrying and specific recognition of cancer cells. *RSC Advances*, 2017, **7**(76): 48166–48175.
- [8] LIU Y H, LIU R T. Spectroscopy and molecular model identify the behavior of doxorubicin-SPION binding to bovine hemoglobin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, **79**: 564–569.
- [9] HUANG M X, LIU L, WANG S G, *et al.* Dendritic mesoporous silica nanospheres synthesized by a novel dual-templating micelle system for the preparation of functional nanomaterials. *Langmuir*, 2017, **33**(2): 519–526.
- [10] SHEN D K, YANG J P, LI X M, *et al.* Biphasic stratification approach to three-dimensional dendritic biodegradable mesoporous silica nanospheres. *Nano Letters*, 2014, **14**(2): 923–932.
- [11] KNEŽEVIĆ N Ž, DURAND J O. Large pore mesoporous silica nanomaterials for application in delivery of biomolecules. *Nano-scale*, 2015, **7**(6): 2199–2209.
- [12] SHIN H S, HWANG Y K, HUH S. Facile preparation of ultra-large pore mesoporous silica nanoparticles and their application to the encapsulation of large guest molecules. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2014, **6**(3): 1740–1746.
- [13] XU C, YU M H, NOONAN O, *et al.* Core-cone structured monodispersed mesoporous silica nanoparticles with ultra-large cavity for protein delivery. *Small*, 2015, **11**(44): 5949–5955.
- [14] DU X, SHI B, LIANG J, *et al.* Developing functionalized dendrimer-

- like silica nanoparticles with hierarchical pores as advanced delivery nanocarriers. *Advanced Materials*, 2013, **25**(41): 5981–5985.
- [15] OSAKI F, KANAMORI T, SANDO S, *et al.* A quantum dot conjugated sugar ball and its cellular uptake. on the size effects of endocytosis in the subviral region. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, **126**(21): 6520–6521.
- [16] LU F, WU S H, HUNG Y, *et al.* Size effect on cell uptake in well-suspended, uniform mesoporous silica nanoparticles. *Small*, 2009, **5**(12): 1408–1413.
- [17] PAN L M, LIU J N, HE Q J, *et al.* MSN-mediated sequential vascular-to-cell nuclear-targeted drug delivery for efficient tumor regression. *Advanced Materials*, 2014, **26**(39): 6742–6748.
- [18] PAN L M, LIU J N, HE Q J, *et al.* Overcoming multidrug resistance of cancer cells by direct intranuclear drug delivery using TAT-conjugated mesoporous silica nanoparticles. *Biomaterials*, 2013, **34**(11): 2719–2730.
- [19] PAN L M, HE Q J, LIU J N, *et al.* Nuclear-targeted drug delivery of TAT peptide-conjugated monodisperse mesoporous silica nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, **134**(13): 5722–5725.
- [20] LI N, NIU D C, JIANG Y, *et al.* Morphology evolution and spatially selective functionalization of hierarchically porous silica nanospheres for improved multidrug delivery. *Chemistry of Materials*, 2017, **29**(24): 10377–10385.
- [21] CHEN Y, CHEN H, GUO L, *et al.* Hollow/rattle-type mesoporous nanostructures by a structural difference-based selective etching strategy. *ACS Nano*, 2009, **4**(1): 529–539.
- [22] TU J, BOYLE A L, FRIEDRICH H, *et al.* Mesoporous silica nanoparticles with large pores for the encapsulation and release of proteins. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016, **8**(47): 32211–32219.
- [23] SINGH R K, KIM T H, MAHAPATRA C, *et al.* Preparation of self-activated fluorescence mesoporous silica hollow nanoellipsoids for theranostics. *Langmuir*, 2015, **31**(41): 11344–11352.