

· 论 著 ·

氧化介孔碳球纳米粒作为紫杉醇载体的研究

王 欢¹, 余 岚², 王琳召¹, 马志强², 张欣荣², 杨 峰^{1,2} (1. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350108; 2. 第二军医大学药学院无机化学教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的 制备氧化介孔碳球纳米粒(oMCN), 考察其理化性质以及作为抗肿瘤药物紫杉醇递送载体的研究。方法 采用低浓度水热法合成介孔碳球纳米粒, 观察其形貌特征, 测定其介孔性质参数、粒径、Zeta 电位、载药量大小, 利用透析法研究体外释药行为, 用 CCK-8 法考察体外抗肿瘤活性。结果 oMCN 的比表面积为 704.63 m²/g、孔容积为 0.57 cm³/g、孔径分布约为 3.23 nm、平均粒径为 140 nm、Zeta 电位为 -36 mV、载药量高达 45.6%、72 h 体外累积释药量为 57.6%, 具有良好的药物负载与缓释性能, 对小鼠肺癌 LLC 细胞具有显著的抑制作用。结论 oMCN 作为抗肿瘤药物紫杉醇的载体具有较好的应用前景。

[关键词] 介孔碳; 纳米粒; 氧化修饰; 肿瘤; 载药系统

[中图分类号] R94 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2015)02-0114-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.02.005

Oxidized mesoporous carbon nanospheres as carriers for paclitaxel

WANG Huan¹, SHE Lan², WANG Linzhao¹, MA Zhiqiang², ZHANG Xinrong², YANG Feng^{1,2} (1. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China; 2. Department of Inorganic Chemistry, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To prepare oxidized mesoporous carbon nanospheres and investigate potential application as drug delivery carriers for paclitaxel. **Methods** Physicochemical properties such as morphology, diameter, pore diameter and pore volume were characterized. Drug-loading capacity was measured and drug release behavior *in vitro* was investigated by dialysis method. *In vitro* antitumour effect was evaluated by CCK-8 methods. **Results** The synthesized oxidized mesoporous carbon nanospheres had an average diameter of 140 nm, Zeta potential of -36 mV, high specific surface area of 704.63 m²/g, high drug-loading capacity of 45.6%. **Conclusion** Oxidized mesoporous carbon nanospheres have promising application in anti-cancer drug delivery system.

[Key words] mesoporous carbon; nanoparticles; surface modification; tumour; drug delivery system

介孔材料是指具有孔径在 2~50 nm 之间有序孔道结构的材料, 它们具有较大的比表面积、孔容积和有序开放的孔道结构, 在吸附、催化、能量储存等领域有较为广泛的应用^[1-3]。Vallet 等^[4] 2001 年首次报道了以介孔分子筛作为药物的缓释载体, 近年来基于介孔碳材料在药物传递系统的应用得到了研究者的密切关注^[5-8]。本研究中, 笔者合成纳米粒径的介孔碳球, 对其表面氧化修饰改善碳材料固有的疏水性质, 制得氧化介孔碳球纳米粒(oMCN), 以

抗肿瘤药物紫杉醇(paclitaxel, PTX)为模型药物, 考察了 oMCN 作为紫杉醇药物载体的可能应用前景。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 电阻炉(SK2-1-10, 上海意丰电炉有限公司), 紫外分光光度仪(Lambda25, DerkinElmer 公司), 纳米粒度-Zeta 电位测定仪(Zetasizer Nano ZS, 英国马尔文公司), 荧光显微镜(Olympus 公司), 台式超速离心机(Centifuge5424, Hitachi 公司), 恒温振荡培养箱(Thermo Fisher Scientific 公司)。紫杉醇原料药(PTX, 江苏红豆杉药业有限公司), 异硫氰酸荧光素(FITC, 大连美仑生物有限公司), LLC 细胞株(第二军医大学医学免疫学国家重点实验室), 其他为实验室常用仪器与试剂。

[基金项目] 国家自然科学基金项目(21401214); 第二军医大学青年启动基金项目(2013QN03)

[作者简介] 王 欢, 硕士研究生, 研究方向: 药物缓释给药系统. E-mail: wang568855641@163.com

[通讯作者] 杨 峰, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 药物缓释给药系统. E-mail: yangfeng1008@126.com

1.2 实验方法

1.2.1 介孔碳球纳米粒的制备及其表面修饰 根据文献[9]报道方法合成介孔碳球纳米粒(MCN), 步骤如下: 0.6 g 苯酚固体先于 45 °C 水浴中融化, 随即加入 15 ml、0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液, 搅拌 10 min 后再加入 2.1 ml 的甲醛溶液(37%), 升温至 70 °C 继续搅拌 30 min, 即制备了低分子量的酚醛树脂。另称取 0.96 g 的三嵌段共聚物 F127 溶于 15 ml 的去离子水中, 加入到上述混合液中, 66 °C 下以(340±20)r/min 速率搅拌 2 h 后, 加入 50 ml 的去离子水稀释, 继续搅拌约 16 h 直至瓶底出现沉积物。整个反应过程中, 溶液颜色从无色到粉红、最后到深红色。取 17.7 ml 的反应液再加 45 ml 水稀释, 密封于水热釜中, 在 130 °C 下处理 24 h。以 10 000 r/min 离心 10 min 收集产物, 室温干燥。最后干燥粉末在 N₂ 氛围中 700 °C 条件下焙烧 3 h, 即得 MCN。

精密称取 100 mg 的 MCN, 超声分散于 50 ml 的双氧水中, 持续超声处理 4 h。为防止水温过高, 每 0.5 h 换一次超声池里的水。100 °C 干燥收集固体粉末, 即得 oMCN。

1.2.2 材料的表征 利用 FTIR 分析产物的特征官能团结构, 记录 500~4 000 cm⁻¹ 范围内的扫描图谱。利用小角 X 射线散射(SAXS)考察样品介观结构特征, 管压 40 kV, 管流 35 mA, 记录时间 30 min。d 值通过公式($d = 2\pi/q$)计算。采用透射电镜考察纳米粒的形貌特征。利用比表面积分析仪测定材料的结构参数, 采用 BET 和 BJH 方法计算比表面积和孔径分布, 相对压力 P/P₀ = 0.99 时的吸附量计算孔容。采用激光粒度仪考察材料粒径大小、分布及 Zeta 电位。

1.2.3 PTX 的负载及载药量的计算 采用溶剂浸渍平衡与溶剂挥发过程装载抗肿瘤药物 PTX。步骤如下: 将 oMCN 粉末超声分散于 10 ml 浓度为 2 mg/ml 的紫杉醇-乙醇溶液中, 超声处理 30 min 后, 继续搅拌 24 h。之后在室温中, 减压状态下缓慢旋转蒸发 2 h 以去除有机溶剂。再用乙醇与水交替洗涤固体 3 次, 离心收集沉淀, 40 °C 下真空干燥, 即得装载有 PTX 的 oMCN, 命名为 oMCN@PTX。

对于载药量的计算, 首先精密称取 5 mg 的 oMCN@PTX 固体粉末, 超声分散于 200 ml 的甲醇溶液中, 搅拌 12 h 使载体中的药物充分释放溶解。溶液高速离心后, 过厚度 0.22 μm 滤膜。利用紫外可见分光光度法测定滤液在 227 nm 处的吸光度

(A)值。代入 PTX 标准曲线, 计算 oMCN@PTX 分散体系中 PTX 的含量, 并按以下公式计算载药率与包封率:

载药率 = (载药纳米粒中的药物含量 / 载药纳米粒的总量) × 100%

包封率 = (载药纳米粒中的药物含量 / 投药量) × 100%

1.2.4 PTX 的体外释放研究 精密称取 oMCN@PTX 粉末, 分散于 2 ml 的 DMSO 溶液中, 分散液密封于透析管中(截留分子量为 10 000 g/mol), 投入 30 ml pH 值 7.4 的磷酸缓冲液中, 在 37 °C 的恒温箱中以 100 r/min 的速率振荡, 定时取样 2 ml, 并补充新鲜的等温、等体积磷酸缓冲液。所有样品在 4 °C 下 15 000 r/min 离心 30 min, 紫外分光光度法测定 227 nm 处的 A 值。计算 PTX 在各个时间点累积释药率 Q, 计算公式如下:

$$Q(\%) = \frac{V_0 \times C_t + V \times \sum_{n=1}^{t-1} C}{W \times X} \times 100\%$$

V₀: 释放介质的总体积; C_t: 各个时间点释放介质中的 PTX 浓度(μg/ml); V: 每次取样的体积; W: 投入的 oMCN@PTX 的总质量; X: oMCN@PTX 的载药量(%)。

1.2.5 细胞摄取实验 将对数期生长的 LLC 细胞调整浓度为 5 × 10⁵ 个/ml, 铺于 6 孔板中, 用含有 10% 胎牛血清的 1640 培养基在 37 °C 及 5% 的 CO₂ 条件下培养 24 h, 待细胞贴壁后弃去上清液, 加入浓度约为 50 μg/ml 的 oMCN@FITC 培养基溶液与细胞共孵育 2 h。用 4% 的多聚甲醛溶液固定细胞 20 min 后, 再用含有 20 μl 的 DAPI 的 200 μl 的 PBS 溶液染核 20 min, PBS 洗尽残余染料后用荧光显微镜观察碳球纳米粒被 LLC 细胞摄取情况。

1.2.6 细胞毒性实验 用 CCK-8 法评价 oMCN 的生物安全性及 oMCN@PTX 的细胞毒性。调整 LLC 细胞浓度为 5 × 10⁴ 个/ml, 以每孔 100 μl 培养在 96 孔板中, 24 h 后分别加入不同浓度的 oMCN、oMCN@PTX 和 PTX(PTX 先用 DMSO 溶解再用含血清培养基稀释, DMSO 含量 < 0.1%), 设为实验组, 同时设立空白溶剂组和阴性对照组。24 h 后加入 10% 的 100 μl 的 CCK-8 培养基溶液, 继续在 37 °C 下及 5% 的 CO₂ 中培养 2 h, 颜色变化后用酶标仪测量在 450 nm 处的 A 值, 计算细胞相对存活率大小, 公式如下:

$$\text{细胞相对存活率}(\%) = \frac{\text{实验组 A 值} - \text{空白溶剂组 A 值}}{\text{阴性对照组 A 值} - \text{空白溶剂组 A 值}} \times 100\%$$

2 结果

2.1 MCN 的制备及表征 按照文献[9]方法,笔者先以三嵌段共聚物 F127 为模板,酚醛树脂为碳源,利用低浓度水热的方法合成了 MCN 材料。然后,为了改善碳材料固有的疏水特性,又以双氧水为氧化剂用湿热氧化法对碳球表面进行氧化处理,以期引入亲水性的官能团,提高纳米粒的亲水性和分散性。红外光谱 (FTIR) 图 (图 1) 清晰地表明所合成的 oMCN 除了具有类似 MCN 典型的芳香烃结构外,在 $1\ 722\ \text{cm}^{-1}$ 处出现了羰基伸缩振动峰,在 $1\ 190\ \text{cm}^{-1}$ 处出现了碳氧单键伸缩振动峰,表明我们成功地在纳米粒表面引入了含氧官能团。

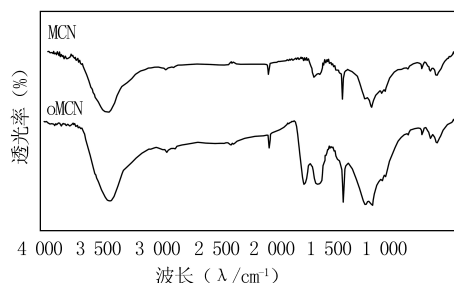


图1 MCN 与 oMCN 的红外光谱 (FTIR) 图谱

利用透射电镜 (TEM) 对材料进行形貌的表征。结果如图 2 示, MCN 与 oMCN 为规则的球型, 大小均一, 两者粒径都在 140 nm 左右。氧化前后纳米粒表面介孔孔道都排列有序, 说明利用双氧水湿热氧化并不会破坏纳米粒原有的介观结构。

对纳米粒进行小角 X 射线散射 (SAXS), 表征结果如图 3A 所示, MCN 与 oMCN 都有 3 个清晰衍射峰, q 值比为 $1 : \sqrt{2} : \sqrt{3}$, 分别对应了体心立方 $\text{Im}\bar{3}\text{m}$ 结构的 110、200 和 211 的 3 个晶面的衍射峰。结果表明, 即使经过氧化处理, oMCN 仍然保持了良好的介观结构, 结果与 TEM 结果一致。oMCN 的 BET 比表面积约为 $704.63\ \text{m}^2/\text{g}$, 总孔容为 $0.57\ \text{cm}^3/\text{g}$, 孔径分布约 3.23 nm (图 3B)。样品的动态光散射粒径及 Zeta 电位分布情况如图 3C、3D 所示, MCN 粒径约为 141.5 nm, 而氧化处理后的 oMCN 粒径为 148.2 nm。通过动态光散射法测得的粒径为粒子的水合粒径, 其数值一般略大于通过 TEM 直接观察的结果, 两者结果并不矛盾。氧化后, 由于在纳米粒表面引入了大量的含氧官能团, 纳米粒的 Zeta 电位也从原来的 $-5.3\ \text{mV}$ 变为 $-36\ \text{mV}$, 增加了粒子的悬浮稳定性。

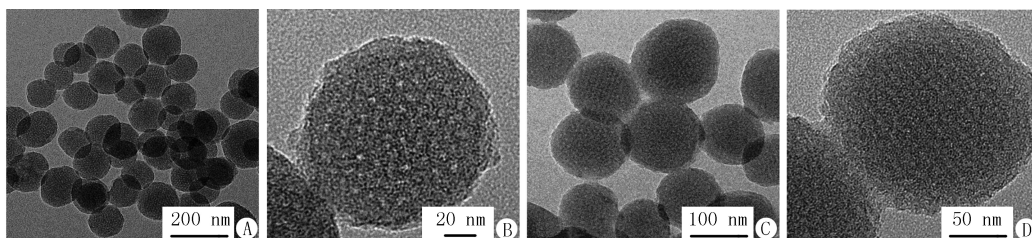


图 2 材料的透射电镜 (TEM) 照片

A. $\times 20\ 000$, MCN; B. $\times 200\ 000$, MCN; C. $\times 40\ 000$, oMCN; D. $\times 80\ 000$, oMCN

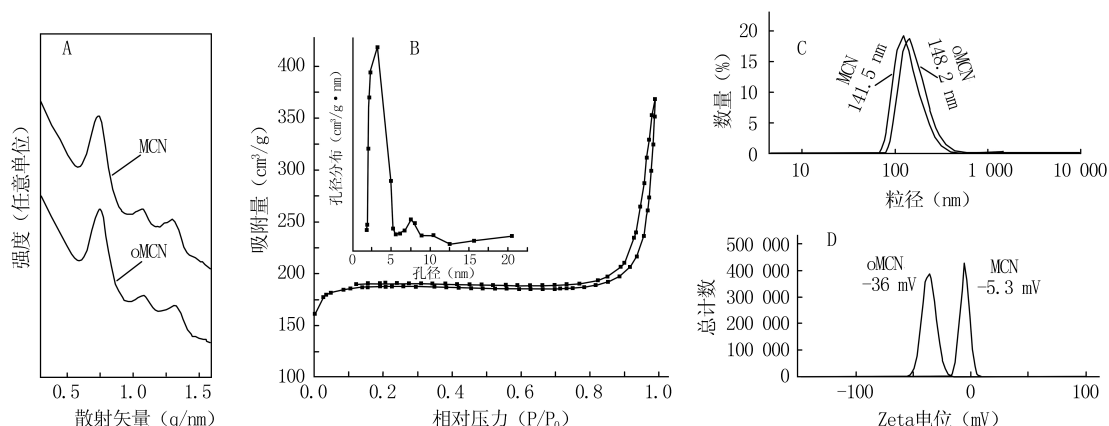


图 3 材料的理化性质表征结果图

A. MCN 与 oMCN 的小角 X 射线散射图谱; B. oMCN 的 N_2 吸附脱附等温线与孔径分布图;

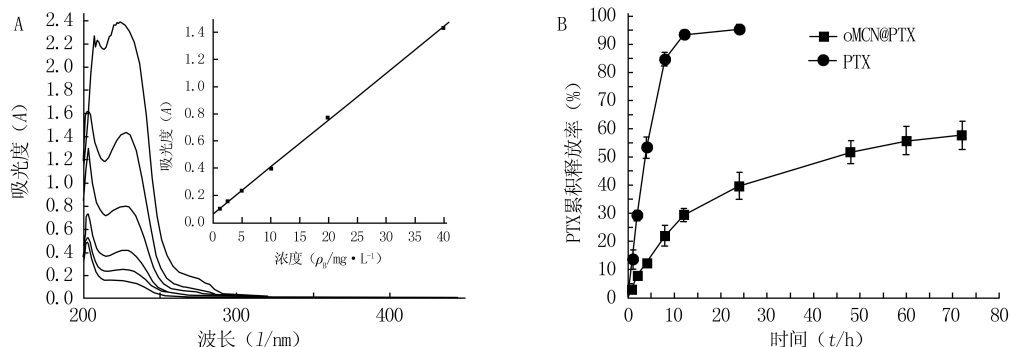
C. MCN 与 oMCN 的粒径分布图; D. MCN 与 oMCN 的 Zeta 电位分布图

2.2 oMCN 对 PTX 的负载及释放 根据不同浓度的 PTX 甲醇溶液在 227 nm 处的 A 值,笔者首先作了 PTX 溶液浓度 (C) 与吸光度值 (A) 的标准曲线 (图 4A), 建立直线回归方程,为 $A=0.063\ 38+0.034\ 37\ C$,该曲线在浓度 1.25~40 $\mu\text{g/ml}$ 范围内具有较高的相关性 ($r=0.999\ 82$) 及较小的标准偏差 ($s=0.015\ 03$)。

利用 oMCN 对 PTX 进行负载,将 PTX 溶解于乙醇,配制成较高浓度的溶液,再与 oMCN 充分搅拌混合,使 PTX 充分吸附于 oMCN 的介孔孔道里。待乙醇挥发干净后,用水与乙醇重复洗涤以除去未被吸附或者吸附于 oMCN 浅表面的 PTX 分子,即得到载有药物的纳米粒 oMCN@ PTX。将 oMCN@ PTX 分散在过量的甲醇中,使 PTX 充分释放并溶解,利用标准曲线方程测得溶出液中 PTX 的含量,计算载药率为 45.56%,结果比一般的纳米载体要高,这是因为 PTX 是芳香族化合物,而 oMCN 为具有缺陷石墨烯结构的基面,药物和载体可以通过 π - π 堆积力和疏水作用紧密结合^[10,11]。在体外释放

的研究中,我们采用疏水环境作为 oMCN@ PTX 的溶出介质,因为 PTX 为难溶性药物,在水性环境中大多保留在孔道内,而当载体被细胞吞噬达到细胞的疏水环境后,药物就能缓慢释放出来^[12]。如图 4B 所示,游离的药物在 12 h 时几乎释放完全,而 oMCN@ PTX 显示出良好的缓释性能,前 12 h 以内约有 29.2% 的药物迅速释放,之后缓慢释药,直至 48 h 时到达平台期,可以使血药浓度在治疗窗内保持平缓,72 h 总释放量为 57.6%。以上结果表明, oMCN 十分适合作为疏水性药物的载释容器。

2.3 细胞摄取实验 为了考察 LLC 细胞对 oMCN 的摄取,笔者选取小鼠肺癌细胞 LLC 为研究对象。首先,以绿色荧光物质异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记 oMCN,制备了 oMCN@ FITC,利用荧光显微镜观察 LLC 对纳米粒的摄取。如图 5 所示,黑色的粒子周围具有明显的绿色荧光,且环绕着细胞核分布在细胞液中,为 oMCN@ FITC 释放的 FITC 所致。结果说明 oMCN 可以负载客体分子透过细胞膜,并且在细胞液中释放客体分子。



身对 LLC 的毒性小,而 oMCN@ PTX 对细胞的杀

伤力来自其释放的药物分子。

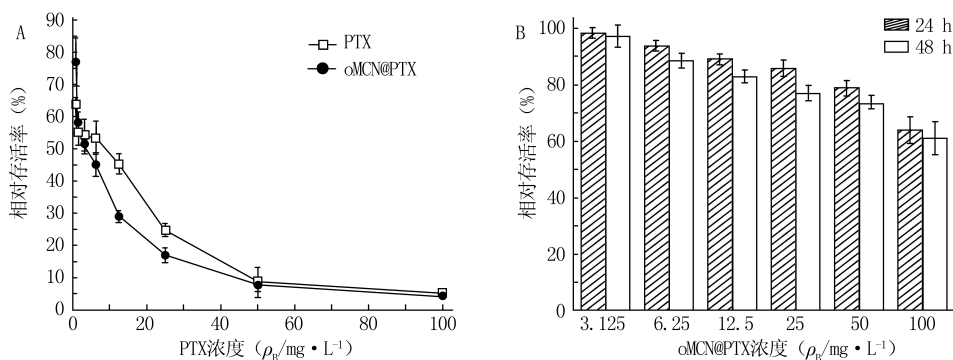


图 6 载药系统与空白载体对 LLC 细胞的细胞毒性结果图

A. 不同浓度的单纯药物与 oMCN@ PTX 与 LLC 细胞作用 24 h 后的细胞相对存活率;

B. 不同浓度的空白载体 oMCN 与 LLC 细胞作用 24 h 和 48 h 的细胞相对存活率

3 讨论

本研究成功合成了 MCN,并用双氧水作为温和氧化剂在纳米粒表面引入了含氧官能团,显著改善了纳米粒的分散性,提高了亲水性。笔者制备的 oMCN 粒径约为 140 nm,Zeta 电位为 -36 mV。根据肿瘤组织特异的 EPR 效应,合适的粒径大小赋予了纳米粒被动靶向能力。oMCN 比表面积为 $704.63 \text{ m}^2/\text{g}$,孔容积为 $0.57 \text{ cm}^3/\text{g}$,孔径为 3.23 nm。此外,oMCN 通过疏水作用以及 $\pi-\pi$ 堆积力可以负载大量的 PTX 分子,载药量达 45.56%,对药物具有缓释效果,十分适合作为难溶性药物的载体。体外实验证明,oMCN 可以有效地负载客体分子透过细胞膜,在细胞质中释放药物,该载药体系对 LLC 细胞具有良好的杀伤力,杀伤效果高于单独药物,而载体本身显示着良好的安全性。

本研究仍存在一些亟待解决的问题,譬如载药体系的体内抗肿瘤效果,载体的体内代谢命运等问题。本实验为 MCN 在抗肿瘤药物传递系统的研究提供一定的理论与实验依据,相信该载药体系在有效地增溶难溶性药物,提高抗肿瘤药物的生物利用度,发挥治疗效果中具有潜在的应用价值。

【参考文献】

- [1] Yuan X, Xing W, Zhuo SP, *et al.* Adsorption of bulky molecules of nonylphenol ethoxylate on ordered mesoporous carbons[J]. *J Colloid Interfac Sci*, 2008, 322(2): 558-565.
- [2] Peng H, Ma GF, Sun KJ, *et al.* Formation of carbon nanosheets *via* simultaneous activation and catalytic carbonization of macroporous anion-exchange resin for supercapacitors application[J]. *ACS Appl Mater Interfac*, 2014, 6(23): 20795-20803.

- [3] Li FH. Layer-by-layer loading iron onto mesoporous silica surfaces: synthesis, characterization and application for As (V) removal [J]. *Microporous Mesoporous Mater*, 2013, 171: 139-146.
- [4] Vallet RM, Ramila A, Real RP. A new property of MCN-41: drug delivery system [J]. *Chem Mater*, 2001, 13: 308-311.
- [5] Chen B, Quan GL, Wang ZH, *et al.* Hollow mesoporous silicas as a drug solution delivery system for insoluble drugs [J]. *Powder Technol*, 2013, 240: 48-53.
- [6] Shen S, Tang H, Zhang X, *et al.* Targeting mesoporous silica-encapsulated gold nanorods for chemo-photothermal therapy with near-infrared radiation [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(12): 3150-3158.
- [7] Zhao P, Jiang H, Jiang T, *et al.* Inclusion of celecoxib into fibrous ordered mesoporous carbon for enhanced oral bioavailability and reduced gastric irritancy [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2012, 45(5): 639-647.
- [8] Wang X, Liu P, Tian Y. Ordered mesoporous carbons for ibuprofen drug loading and release behavior [J]. *Microporous Mesoporous Mater*, 2011, 142(1): 334-340.
- [9] Fang Y, Gu D, Zou Y, *et al.* A low-concentration hydrothermal synthesis of biocompatible ordered mesoporous carbon nanospheres with tunable and uniform size [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2010, 49(43): 7987-7991.
- [10] Li Y, Zhong J, Yang X, *et al.* Simple synthesis of semi-graphitized ordered mesoporous carbons with tunable pore sizes [J]. *New Carbon Mater*, 2011, 26(2): 123-129.
- [11] Wang C, Xu H, Liang C, *et al.* Iron oxide @ polypyrrole nanoparticles as a multifunctional drug carrier for remotely controlled cancer therapy with synergistic antitumor effect [J]. *ACS Nano*, 2013, 7(8): 6782-6795.
- [12] Gu JL, Su SS, Li YS, *et al.* Hydrophilic mesoporous carbon nanoparticles as carriers for sustained release of hydrophobic anti-cancer drugs [J]. *Chem Commun*, 2011, 47(7): 2101-2103.

【收稿日期】 2014-09-18 【修回日期】 2015-01-10

【本文编辑】 陈 静