

· 论著 ·

PVP 和 PEG 表面修饰对有序介孔碳纳米粒分散性及细胞毒性的影响

王琳召¹, 乐李敬¹, 康安锋¹, 余 岚², 王 欢¹, 马志强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** 通过聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和培化磷脂酰乙醇胺(DSPE-mPEG2000)对制备的有序介孔碳纳米粒(MCN)进行表面修饰,以改善材料的疏水性质,并考察其对MCN分散性和细胞毒性的影响。**方法** 采用低浓度水热法合成MCN,并用PVP和DSPE-mPEG2000对其表面修饰,采用透射电镜(TEM)、扫描电镜(SEM)、氮气吸附脱附仪、粒径仪和红外(IR)等表征其性质。考察了表面修饰对MCN分散性的影响,并用CCK-8法考察材料的细胞毒性,用流式细胞术检测材料对细胞氧化应激的影响。**结果** 制备的MCN粒径分布均一,平均粒径约90 nm,修饰后的粒径略有增大,Zeta电位稍有升高,分散性明显提高,但修饰前后材料对小鼠成纤维细胞(L929)和宫颈癌细胞(HeLa)的毒性没有显著性差异,在相同浓度下,修饰后的MCN能明显减少细胞氧化应激的产生。**结论** MCN具有良好的生物相容性,用PVP和DSPE-mPEG2000修饰后的MCN能明显减少细胞氧化应激的发生。

[关键词] 有序介孔碳纳米粒;聚乙烯吡咯烷酮;培化磷脂酰乙醇胺;表面修饰;细胞毒性

[中图分类号] R94 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2016)02-0158-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.02.015

Effects on the dispersion and cytotoxicity of ordered mesoporous carbon nanoparticles modified with PVP or PEG

WANG Linzhao¹, YUE Lijing¹, KANG Anfeng¹, SHE Lan², WANG Huan¹, MA Zhiqiang², 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 improve the hydrophobic properties of the ordered mesoporous carbon nanoparticles (MCN) by PVP or DSPE-mPEG2000 modification, and to compare the effect on the dispersion and cytotoxicity of MCN before and after modification. **Methods** MCN was synthesized by low concentration hydrothermal method. The surface was modified by PVP or DSPE-mPEG2000. The properties of the materials were characterized by transmission electron microscopy (TEM), scanning electron microscopy (SEM), nitrogen sorption analysis, particle size and infrared spectroscopy (IR). The effect on the dispersion of MCN was investigated. CCK-8 method was used to investigate the cytotoxicity of the materials. Flow cytometry was used to investigate the effect of cell oxidative stress. **Results** The distribution of synthesized MCN was uniform, with average particle size about 90 nm. The particle size and Zeta potential increased slightly after surface modification, while the dispersibility was significantly improved. No significant difference was observed in the toxicity of L929 and HeLa cells before and after modification. However, the modified MCN showed significant effect of reducing production of cellular reactive oxygen species. **Conclusion** Ordered mesoporous carbon nanoparticles with surface modified by PVP or DSPE-mPEG2000 provide good biocompatibility and can significantly reduce oxidative stress.

[Key words] ordered mesoporous carbon nanoparticles; PVP; DSPE-mPEG2000; surface modification; cytotoxicity

有序介孔碳材料是一类新型的非硅基介孔材料,在生物医药领域有较为广泛的应用,被研究者们

认为是目前最具应用潜能的介孔材料之一^[1-3]。由于其较大的比表面积、孔容积、有序开放的孔道结构和较强的吸附能力而具有较高的载药量和较好的药物释放特性^[4],在难溶性和疏水性药物载体^[5-8]等领域有良好的应用前景。但随着有序介孔碳材料在生物医药领域应用研究的深入,其生物安全性问题日益受到人们的关注。

介孔碳的表面氧化是一种最简单、方便的改善

[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)

[作者简介] 王琳召,硕士研究生.E-mail:Linzhao0309@163.com

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

介孔碳类材料水溶性的方法。氧化后的介孔碳不仅表面含有羧基而且增加了水溶性,但是氧化作用能破坏介孔结构和产生毒性杂质。聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和培化磷脂酰乙醇胺(DSPE-mPEG2000)是一种两亲性的生物相容性聚合物,有较低的毒性,广泛应用于纳米材料的表面改性。我们采用低浓度水热法合成制备了有序介孔碳纳米粒(MCN),并用PVP和DSPE-mPEG2000对其表面进行修饰,改善其表面性质和分散特性,并选用小鼠成纤维细胞(L929)和宫颈癌细胞(HeLa)考察了表面修饰对材料细胞毒性和氧化应激状态的影响,为表面修饰MCN在药物载体领域的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 DSPE-mPEG2000(Lipoid公司),CCK-8(cell counting kit-8,日本Dojindo实验室),氧自由基检测试剂盒(ROS,碧云天),RPMI-1640培养基、DMEM培养基(美国Hyclone),澳洲胎牛血清、0.25%胰蛋白酶溶液(含0.02% EDTA, Gibco)。电阻炉(SK2-1-10,上海意丰电炉有限公司),激光粒度-Zeta电位测定仪(Zetasizer Nano ZS,英国马尔文公司),台式超速离心机(Centrifuge 5424, Hitachi公司),恒温振荡培养箱(Thermo Fisher Scientific公司)。其他为实验室常用试剂与仪器。

1.2 实验方法

1.2.1 MCN的制备及其表面修饰 按照文献[9]的报道合成MCN:0.6 g苯酚固体放于45℃水浴中融化,立即加入15 ml、0.1 mol/L的氢氧化钠溶液,搅拌10 min后加入2.1 ml、37%的甲醛溶液,升温至70℃继续搅拌0.5 h,得到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65 ml的去离子水,加入上述混合液,在66℃以(340±40) r/min的转速搅拌16~18 h,至瓶底出现沉积物。将17.7 ml的上述溶液转移至水热釜,用56 ml水稀释,在130℃水热24 h。以10 000 r/min离心10 min收集产物,室温干燥。所得干燥粉末在N₂氛围中700℃焙烧3 h,即得MCN。

0.05 g PVP(MW, 40 kg/mol)、0.1 g L-抗坏血酸加入200 ml、0.25 mg/ml MCN溶液中,室温搅拌10 min后,80℃继续搅拌4 h,过滤,去离子水洗3遍,冻干后收集产物,即得MCN-PVP^[10]。

称取10 mg DSPE-mPEG2000溶于10 ml氯仿,10 mg MCN于上述溶液中超声分散2 h,保持水温低于30℃。室温旋转蒸发除去氯仿。用去离子

水重新分散后过滤,并用去离子水洗3遍,冻干后收集产物,即得MCN-PEG。

1.2.2 材料的表征 采用透射电镜(TEM)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,以相对压力 $P/P_0=0.99$ 时的吸附量计算孔容。激光粒度仪考察材料粒径大小、分布及Zeta电位。溴化钾压片,采用傅立叶变换红外光谱仪在400~4 000 cm^{-1} 范围扫描测定产物的红外光谱。

1.2.3 分散性评估 分别配制浓度为100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的MCN、MCN-PVP、MCN-PEG的水溶液,超声振荡30 min后室温下静置,每隔1.5 h进行拍照,观察溶液的分散状态^[11]。

1.2.4 细胞毒性实验 分别取对数生长期的L929和HeLa细胞,用胰酶消化,PBS洗涤。取100 μl 的细胞悬液(3×10^4 个/ml)接种于96孔板中,于37℃、5% CO₂的条件下培养12 h。分别加入不同浓度的MCN、MCN-PVP、MCN-PEG(12.5、25、50、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$),每组设3个复孔为实验组,同时设置空白溶剂组和阴性对照组。培养24 h后加入100 μl 10% CCK-8溶液,孵育2 h后,酶标仪测定在450 nm处的吸光度值(A),重复实验3次。计算细胞相对存活率大小,公式如下:细胞相对存活率(%)=(实验组A值-空白溶剂组A值)/(阴性对照组A值-空白溶剂组A值)×100%。

1.2.5 ROS水平的测定 取对数生长期的L929和HeLa细胞,以每孔 2×10^5 个的密度接种于6孔板中,于37℃、5% CO₂条件下培养12 h,分别加入不同浓度的MCN、MCN-PVP、MCN-PEG(0、12.5、25、50、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$),每个浓度设3个复孔。24 h后弃去原培养基,PBS冲洗后,加入终浓度为10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的DCFH-DA,避光孵育20 min后弃去孵育液,用PBS洗2遍,以0.25%的胰蛋白酶消化收集细胞,加入PBS 500 μl ,将细胞制成单细胞悬液,立即用流式细胞仪检测荧光强度(激发波长488 nm,发射波长525 nm)^[12]。

1.3 统计学处理 采用SPSS 20.0统计软件,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多样本均数差的多重比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 MCN的制备及表征 我们以三嵌段共聚物F127为模板,酚醛树脂为碳源,采用低浓度水热合成法制得MCN。图1A为MCN的TEM照片,可

以观察到 MCN 为均一的球形,平均直径在 90 nm 左右,高倍 TEM 图可以看到纳米粒表面介孔孔道排列有序。扫描电镜(SEM)照片(图 1B)显示,制备的 MCN 为规则的球形,大小均一。MCN 的 BET

比表面积约为 $462 \text{ m}^2/\text{g}$,总孔容为 $0.51 \text{ cm}^3/\text{g}$,孔径分布约为 3 nm(图 1C),良好的介孔结构使其成为潜在的药物传递系统。MCN 的动态光散射粒径如图 1D,其粒径约为 94.81 nm。

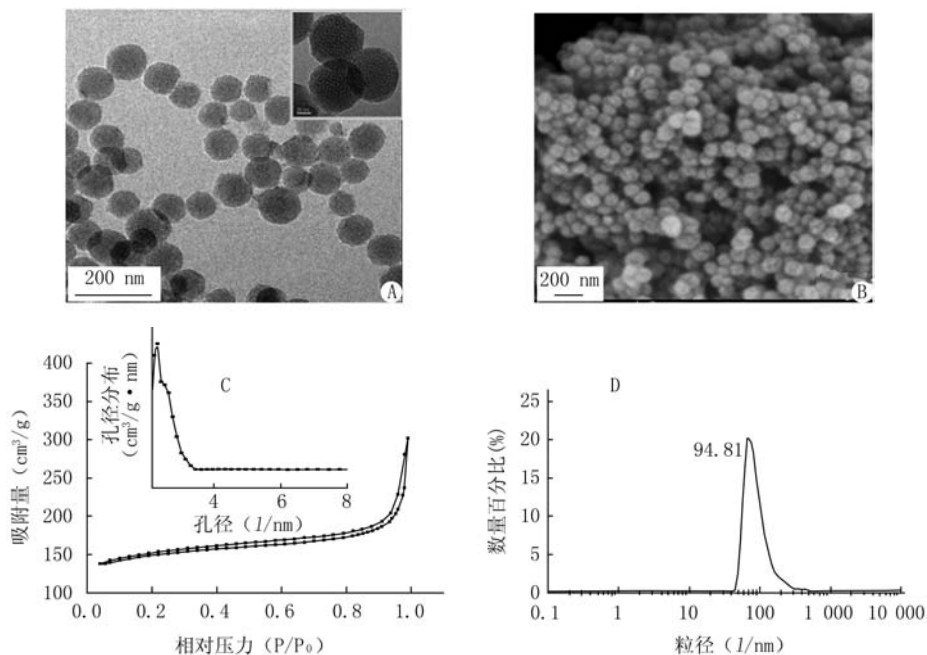


图 1 MCN 的材料表征图

A. TEM 图;B. SEM 图;C. N_2 吸附脱附等温线与孔径分布图;D. 粒径分布图

为了改善 MCN 表面的疏水性和在溶液中的分散性,用生物相容性高分子 PVP、DSPE-mPEG2000 修饰介孔碳,通过介孔碳的吸附作用形成 PVP、DSPE-mPEG2000 包裹的 MCN、MCN-PVP 和 MCN-PEG。利用 TEM(图 2A、2B)可以观察到经过修饰的 MCN 仍然呈球形,并且表面覆盖了一层有机物,介孔孔道排列有序,说明没有破坏 MCN 原有的介孔结构。利用动态光散射表征,结果如图 2C 和图 2D,MCN 的粒径约为 94.81 nm,而修饰后的 MCN-PVP 粒径为 108 nm,MCN-PEG 粒径为 112.3 nm。MCN 表面电荷的变化也可以证明 PVP、DSPE-mPEG2000 成功包裹纳米粒。MCN 的 Zeta 电位为 -16.9 mV ,修饰后的 MCN-PVP、MCN-PEG 的 Zeta 电位分别为 -0.445 、 -1.12 mV ,Zeta 电位有所改变。

将 MCN 和 MCN-PVP 的红外光谱图(图 3A)进行对比后发现,经 PVP 修饰的 MCN 出现了 PVP 的特征峰。 2918 cm^{-1} 处是亚甲基的伸缩振动峰; 1639 cm^{-1} 处是 PVP 环上羰基的伸缩振动峰; 1421 cm^{-1} 处为亚甲基剪式弯曲振动引起的吸收峰; 1261 cm^{-1} 处为 C-N 伸缩振动峰。因此,两亲性聚合物 PVP 已经被引入到 MCN 的表面。通过红

外光谱分析法对比了经过表面处理的 MCN-PEG 和纯 MCN,结果见图 3B。由图可以明显看出,修饰过的介孔碳出现了 DSPE-mPEG2000 的特征峰,如 2922 、 2848 cm^{-1} 处甲基、亚甲基的伸缩振动峰, 1960 cm^{-1} 处是 C-O 的吸收峰,说明在 MCN 上成功连接了 PEG。

2.2 分散性评估 为了观察修饰前后 MCN 的分散性变换,将浓度为 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的 MCN、MCN-PVP 和 MCN-PEG 的水溶液超声混合后静置,拍照。结果如图 4 所示,0 h 时,三者都分散均匀;1.5 h 后,MCN 发生明显的聚集沉降,而 MCN-PVP 和 MCN-PEG 仍然呈均匀分散;6 h 后,MCN 和 MCN-PVP 沉降完全,上层溶液呈透明,而 MCN-PEG 仍具有较好的分散性。结果表明,用 PVP、DSPE-mPEG2000 修饰,可有效改善介孔碳的分散性,且 MCN-PEG 的分散性最好。

2.3 细胞毒性实验 由图 5 可见,高浓度的 3 种材料($100 \mu\text{g}/\text{ml}$)刺激 L929 和 HeLa 细胞 24 h 后,均表现出轻微的细胞毒性,但在 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下浓度,并未表现出明显的细胞毒性,表明 MCN 在表面修饰前后均具有良好的生物相容性。而在 MCN-PVP 和 MCN-PEG 刺激组,细胞存活率略有提高,但是

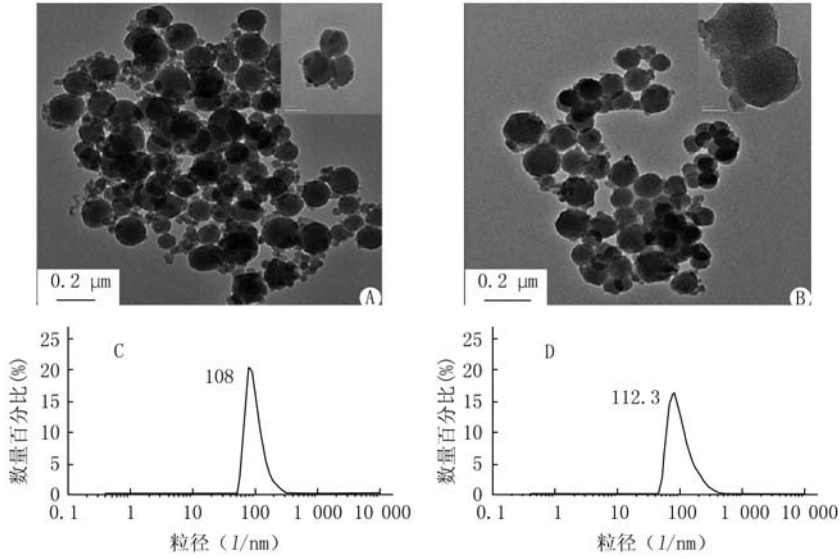


图2 修饰后材料的TEM照片和粒径分布图
A. MCN-PVP的TEM图;B. MCN-PEG的TEM图;
C. MCN-PVP的粒径分布图;D. MCN-PEG的粒径分布图

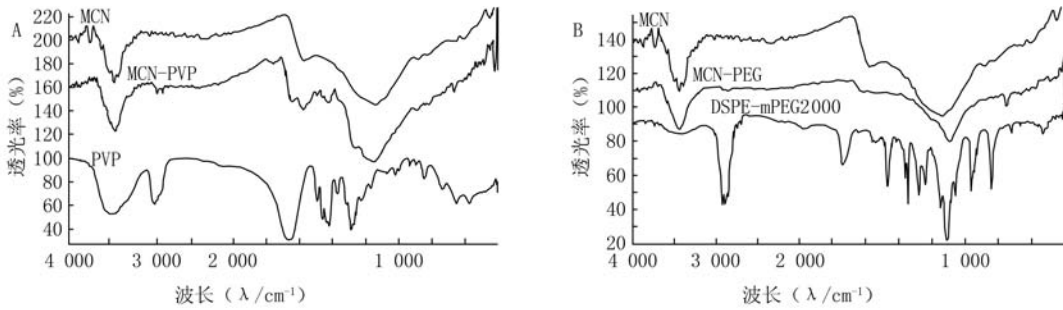


图3 材料的红外光谱(FTIR)图

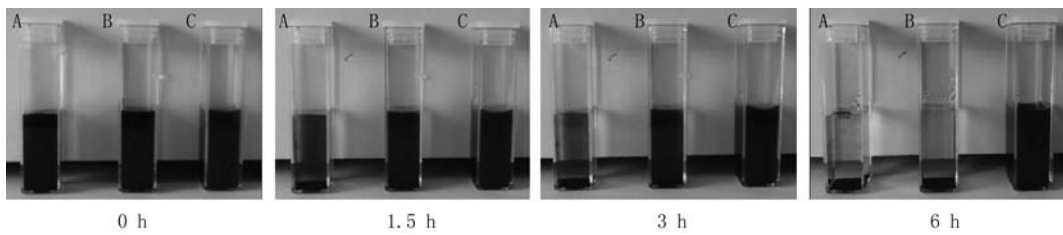


图4 3种材料(100 μg/ml)不同时间点的分散性照片
A. MCN;B. MCN-PVP;C. MCN-PEG

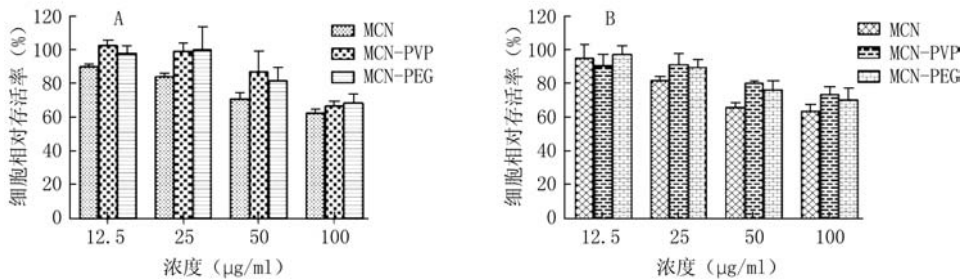


图5 3种材料对2种细胞的毒性

A.不同浓度的3种材料与L929细胞作用24 h后的细胞相对存活率;
B.不同浓度的3种材料与HeLa细胞作用24 h后的细胞相对存活率

差异无统计学意义。

2.4 材料对细胞氧化应激状态的影响 图6结果表明,MCN、MCN-PVP和MCN-PEG与L929和HeLa细胞作用24h,可刺激细胞内ROS产生,随着材料浓度的增加,产生的ROS也增多,与对照组相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。表明修饰

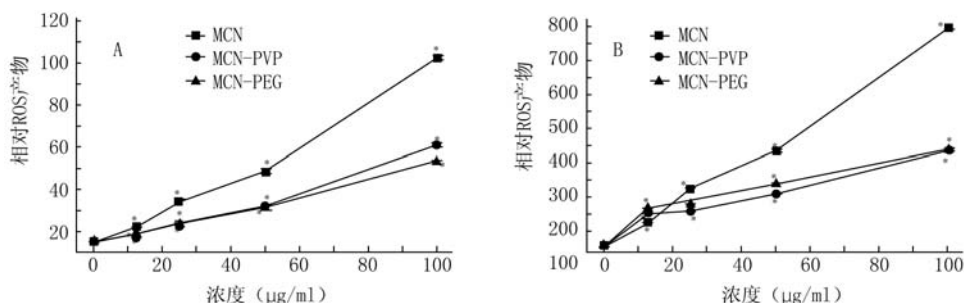


图6 材料对细胞内氧自由基(ROS)的影响

A. L929细胞; B. HeLa细胞; * $P < 0.01$, 与对照组比较

孔碳的吸附作用,成功地将两亲性的高分子PVP和DSPE-mPEG2000修饰到MCN的表面,从而改善了介孔碳的表面性质,提高了MCN载体材料的亲水性,也没有破坏其原有的介孔结构。本研究制备的MCN粒径为90nm左右,可以用来作为跨膜载体,MCN比表面积约为 $462 \text{ m}^2/\text{g}$,孔容积为 $0.51 \text{ cm}^3/\text{g}$,孔径分布约为3nm,具有良好的介孔结构。修饰后的MCN-PVP和MCN-PEG粒径稍有增大,Zeta电位稍提高至接近中性,MCN载体材料的分散性得到了明显提高。本研究利用L929和HeLa细胞观察了修饰前后材料的细胞相容性,结果表明高浓度的MCN载体材料有轻微的细胞毒性,而经过表面修饰后的MCN载体材料刺激产生的ROS量显著减少,表明PEG和PVP等亲水性材料的表面化学修饰确实能够较好地降低MCN载体材料对细胞的刺激性,提高载体材料的生物安全性。

【参考文献】

[1] Zhu J, Liao L, Bian X, et al. pH-controlled delivery of doxorubicin to cancer cells, based on small mesoporous carbon nanospheres[J]. Small, 2012, 8(17): 2715-2720.
 [2] Sapino S, Ugazio E, Gastaldi L, et al. Mesoporous silica as topical nanocarriers for quercetin: characterization and *in vitro* studies[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2015, 89: 116-125.
 [3] Zhu W, Zhao Q, Sun C, et al. Mesoporous carbon with spherical pores as a carrier for celecoxib with needle-like crystallinity: improve dissolution rate and bioavailability[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2014, 39: 13-20.
 [4] Zhao P, Wang L, Sun C, et al. Uniform mesoporous carbon

后的MCN能明显减少ROS的产生,降低MCN载体材料对细胞的刺激性,提高载体材料的生物安全性。

3 讨论

采用低浓度水热法成功合成了MCN,通过介

as a carrier for poorly water soluble drug and its cytotoxicity study[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2012, 80(3): 535-543.

[5] 朱杰,廖蕾,朱丽娜,等. 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(1): 69-74.
 [6] Zhang X, Zhang T, Ye Y, et al. Phospholipid-stabilized mesoporous carbon nanospheres as versatile carriers for systemic delivery of amphiphobic SNX-2112 (a Hsp90 inhibitor) with enhanced antitumor effect[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2015, 94: 30-41.
 [7] Zhang Y, Zhao Q, Zhu W, et al. Synthesis and evaluation of mesoporous carbon/lipid bilayer nanocomposites for improved oral delivery of the poorly water-soluble drug, nimodipine[J]. Pharm Res, 2015, 32(7): 2372-2383.
 [8] Gu J, Su S, Li Y, et al. Hydrophilic mesoporous carbon nanoparticles as carriers for sustained release of hydrophobic anti-cancer drugs[J]. Chem Commun (Camb), 2011, 47(7): 2101-2103.
 [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] Zhi X, Fang H, Bao C, et al. The immunotoxicity of graphene oxides and the effect of PVP-coating[J]. Biomaterials, 2013, 34(21): 5254-5261.
 [11] 王凯苑,孟颖,阎雪莹. PEG-PLGA包裹的介孔碳纳米给药系统的制备和表征[J]. 黑龙江医药, 2015, 28(2): 248-251.
 [12] Liang H, Jin C, Tang Y, et al. Cytotoxicity of silica nanoparticles on HaCaT cells[J]. J Appl Toxicol, 2014, 34(4): 367-372.

[收稿日期] 2015-10-16 [修回日期] 2016-01-21
 [本文编辑] 顾文华