

二氧化钛纳米管及其作为溶栓药物载体的研究

陈熔熔, 景春兰, 赵玲玲*, 梁洪泽

(宁波大学 材料科学与化学工程学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 为改善直接使用溶栓蛋白药物尿激酶(uPA)时容易形成全身性纤维蛋白分解和大出血的问题, 设计并制备了负载溶栓药物的二氧化钛纳米管支架. 采用阳极氧化法合成排列整齐有序的二氧化钛纳米管阵列, 该纳米管可负载溶栓药物 uPA, 通过酰胺键将壳聚糖(CS)连接到二氧化钛纳米管阵列上, 可对纳米管进行封端, 得到 uPA 缓控释放的溶栓支架 Ti-TNTs-uPA-CS. 用扫描电子显微镜、红外光谱等方法对 Ti-TNTs-uPA-CS 的形貌和结构进行表征, 并模拟人体生理环境进行体外溶栓实验. 与空白组对比后的结果表明, Ti-TNTs-uPA-CS 具有良好的溶栓效果, 并随着溶栓时间积累, 溶栓效果显现, 说明该溶栓支架对血栓的治疗具有积极意义.

关键词: 二氧化钛纳米管; 药物载体; 尿激酶; 溶栓

中图分类号: TQ937

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2021) 04-0097-04

血管血栓的形成是继发性心肌梗死、中风、肺栓塞以及其他血管阻塞的祸根. 尿激酶作为常用溶栓药物, 其通过激活蛋白纤溶酶原为纤溶酶, 进而发挥溶栓作用, 然而这类药物具有全身性副作用, 注射后易形成全身性纤维蛋白分解和大出血^[1-2]. 因此, 将药物载入支架材料中, 当血栓形成时, 可定点靶向缓慢释放药物, 不仅能达到治疗效果, 还可以缓解药物的副作用. 以钛片作为基底, 垂直有序排列的二氧化钛纳米管阵列(TNTs)作为医用载体和支架, 具有高表面积, 耐腐蚀性, 优异的载药能力, 良好的生物相容性, 目前已经被认为是药物输送体系中有前途的载体^[3]. 虽然二氧化钛纳米管有其独特的优势, 但纳米管间的黏附性差, 易于从钛基底剥离, 使得二氧化钛纳米管阵列的应用受到极大影响. 为了提高二氧化钛纳米管阵列对基底的黏附性, 研究人员做出了很大的努力. 例如, Schmuki 等^[4-5]用乙炔处理将 TNTs 转化为半金属形式, 以增加二氧化钛纳米管微观结构中的碳来提高其机械强度. Xiong 等^[6]在空气中退火二氧化钛纳米管, 得到二氧化钛纳米管的黏附性随退火时间而改善的研究结果. 通过这些方法改善

TNTs 黏合度的效果还是有限, 因而亟需一种方法能够有效增加 TNTs 的黏附性.

为增加二氧化钛纳米管对基底的黏附性, 可以从其形成过程来了解, 并提出改善方案. 众所周知, 二氧化钛纳米管可以通过电化学阳极氧化的方法形成^[7], 其电解液一般为含氟的电解液. 早在 1979 年, Kelly 课题组研究了氟化物对钛氧化的影响, 发现低浓度氟化物可以促进多孔氧化物的形成^[8]. 由此我们逐渐意识到, 在电解液中加入少量氟离子是形成二氧化钛纳米管的关键. 另一方面, 电解液中氟化物亦会影响阳极氧化过程, 这是因为氟化物会形成 $[\text{TiF}_6]^{2-}$ 水溶性物质. $[\text{TiF}_6]^{2-}$ 会从两处产生, 一处是在氧化物-电解质界面上的 Ti^{4+} 发生复合: $\text{Ti}^{4+} + 6\text{F}^- \rightarrow [\text{TiF}_6]^{2-}$, 另一处是由阳极氧化得到的 TiO_2 化学侵蚀而成: $\text{TiO}_2 + 6\text{F}^- + 4\text{H}^+ \rightarrow [\text{TiF}_6]^{2-} + 2\text{H}_2\text{O}$ ^[9]. 所形成含有氟化物的 TiO_2 层简称为 FRL (Fluoride-rich TiO_2 Layer), FRL 的存在被认为是界面之间黏附性差的主要原因. 因而, 消除 FRL 是提高 TNTs 黏附性的有效方法.

本文以分别含 H_3PO_4 和氟化铵的两种乙二醇电解液进行阳极氧化纯钛片, 制备具有良好黏附

收稿日期: 2019-12-23.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journal1g.nbu.edu.cn/>

基金项目: 国家自然科学基金(51403108); 宁波市自然科学基金(2018A610243).

第一作者: 陈熔熔(1994-), 女, 浙江宁波人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 生物医用材料. E-mail: 1021769525@qq.com

*通信作者: 赵玲玲(1986-), 女, 湖南会同人, 副教授, 主要研究方向: 生物医用材料. E-mail: zhaolingling@nbu.edu.cn

性的二氧化钛纳米管阵列. 以该纳米管阵列为载体, 负载溶栓药物尿激酶(uPA), 然后以壳聚糖为封端剂, 通过酰胺键结合到 TiO_2 纳米管以改善其生物相容性, 制备尿激酶载体支架材料 Ti-TNTs-uPA-CS. 在不同 pH 下, Ti-TNTs-uPA-CS 能缓慢释放出 uPA 药物, 并显现出良好的溶栓效果.

1 实验部分

1.1 原料

乙二醇(EG), 上海麦克林生化科技有限公司, 体积分数 $>99\%$; 氟化铵(NH_4F), 上海麦克林生化科技有限公司, 质量分数 $\geq 99.99\%$; 磷酸(H_3PO_4), 上海麦克林生化科技有限公司, AR, 质量分数 $\geq 85\%$; 钛片, 北京翠铂林有色金属技术开发中心有限公司; 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl), Sigma Aldrich(St. Louis, US); N-羧基琥珀酰亚胺(NHS), 衢州新腾化学有限公司; 吗啉乙磺酸(MES), Sigma Aldrich, 质量分数 $\geq 99.5\%$; 壳聚糖(CS), 宁波市海鑫生物科技有限公司友情提供; 磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、酮, 国药集团化学试剂有限公司; 尿激酶(uPA), 丽珠医药集团股份有限公司.

1.2 二氧化钛纳米管阵列(TNTs)的制备

采用阳极氧化法制备二氧化钛纳米管. 具体实验步骤为: 将切割成 $3\text{ cm} \times 3\text{ cm}$ 的钛片机械抛光, 在丙酮中超声清洗 15 min. 然后在含 NH_4F 的乙二醇溶液中以 60 V 的电解电压将钛片电化学阳极氧化 30 min, 通过超声除去表面氧化物; 再将钛片在含 H_3PO_4 的乙二醇溶液中以相同电压氧化 3~4 min, 并用去离子水冲洗; 第 3 次在含 NH_4F 的乙二醇溶液中氧化 1 h, 再用去离子水冲洗; 最后在含 H_3PO_4 的乙二醇溶液反应 3~5 min, 并用去离子水冲洗. 将制得的二氧化钛纳米管样品在空气中以 $2\text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 程序升温至 $450\text{ }^\circ\text{C}$, 煅烧 3 h, 得到的样品为煅烧后的二氧化钛纳米管.

1.3 壳聚糖(CS)修饰 TNTs

CS 修饰 TNTs 的制备参考文献[10]方法, 并进行了适当的调整, 具体步骤如下: 将 EDC·HCl (20 mmol, 0.038 3 g), NHS(50 mmol 0.057 5 g)溶于 10 mL $0.1\text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ MES(pH 6.0)中, 混合搅拌均匀, 然后加入壳聚糖(1.0 g), 使壳聚糖溶液质量浓度为

$100\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 搅拌 6 h 形成溶液; 将 TNTs 放入壳聚糖溶液中, 室温持续均匀震荡 16 h. 取出钛片, 用 MES 溶液冲洗, 再用去离子水冲洗, 得到样品 Ti-TNTs-CS.

1.4 Ti-TNTs-CS 负载 uPA

将修饰过的钛片(TNTs-CS)裁剪成 $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$, 加入 uPA($5\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)溶液, 在 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 摇床下避光缓慢震荡 48 h, 将载完药物的钛片冻干, 于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 下保存. 由 uPA 的上清液标准曲线测出, 在 $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ 的钛片上, 载有 1.4 mg FITC-uPA.

1.5 产物结构表征

1.5.1 扫描电子显微镜(SEM)

扫描电镜(SEM)表征: 将煅烧前后的二氧化钛纳米管分别裁成小片, 黏在导电胶上, 真空镀金后, 用 Hitachi S-4300 场发射扫描电镜在 15 kV 加速电压下观察二氧化钛纳米管样品的微观结构和尺寸.

1.5.2 红外光谱(FTIR)

采用 Micro-FTIR 显微红外光谱仪(美国安捷伦科技(中国)有限公司)对 Ti-TNTs 和 Ti-TNTs-CS 样品进行分析.

1.6 体外溶栓实验

血栓的制备: 取活鸡身上的血于洁净的培养皿中, 厚度为 3 cm, 自然静置 3~4 h, 从血液离体到开始溶栓时间约为 5 h, 每块血栓长约 4 cm, 用滤纸擦净表面水分, 用分析天平称重, 并记录其数值 M_1 .

实验步骤: 将处理后的血栓放入 24 孔板中, 分别加入 1 mL 下列溶液: PBS 缓冲溶液 A 组, Ti-TNTs-uPA-CS+PBS 缓冲溶液 B 组, 放入 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴锅中恒温不同时间, 依次在 4、8、17 h 后取出血栓, 用滤纸吸干表面的水分, 用分析天平称重, 分别标记剩余的血栓块质量为 M_2 、 M_3 、 M_4 , 失重 $M'_2 = M_1 - M_2$, 溶栓率 $= M'_2 / M_1 \times 100\%$.

2 结果与讨论

2.1 阳极氧化合成 TNTs

通过 SEM 电镜表征二氧化钛纳米管在煅烧前后的形貌特征, 如图 1 所示, 上下图形分别为煅烧前和高温煅烧后的二氧化钛纳米管. 由图可见, 经 $450\text{ }^\circ\text{C}$ 高温煅烧后, 其表面结构没有发生较大的变化, 且 TNTs 管之间依然保持整齐有序的排列, 从

左图中可以看出, 制备出的二氧化钛纳米管排列密集, 其管内径平均在 (70 ± 10) nm, 厚度在 $7\mu\text{m}$ 左右; 并且可以观察到Ti与TNTs之间形成了致密的氧化物层(ACOL, Additional Compact Oxide Layer), 由于这层致密氧化物层的存在, Ti与TNTs的黏附性大大提高. 图2进一步证实, TNTs在翻折下, 其纳米管膜没有剥落现象. 从右图中可以明显观察到二氧化钛纳米管的内壁增厚, 并且管内径约保持40 nm不变. 并且在使用 H_3PO_4 乙二醇电解液阳极氧化钛片的过程中, 对二氧化钛纳米管的表面结构影响不大, 仍保持多孔结构.

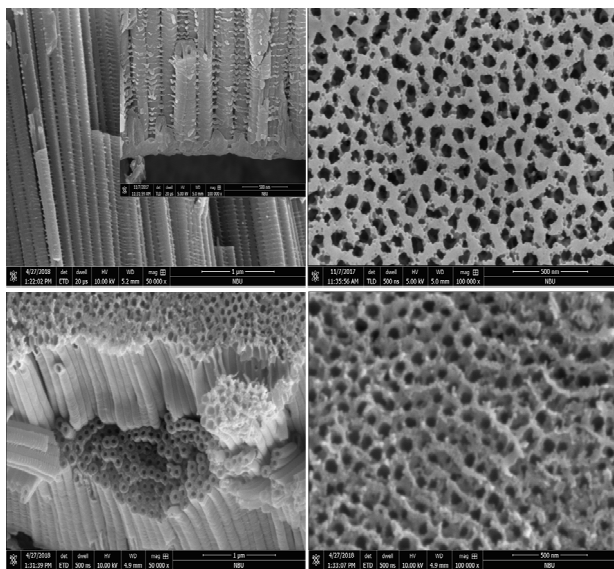


图1 煅烧前后 TNTs 的 SEM 图

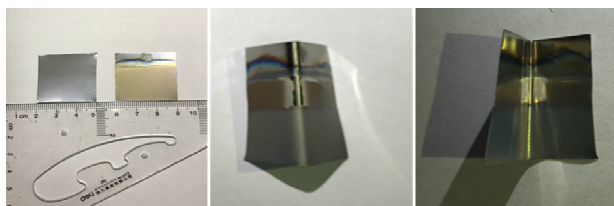


图2 TNTs 图

2.2 红外分析(FTIR)

如图3所示, 红外光谱图上TNTs中的 TiO_2 的谱带在 $400\sim 700\text{ cm}^{-1}$ 之间, 645 cm^{-1} 处归属于二氧化钛的特征峰, 即TNTs中Ti-O的伸缩振动峰. TNTs-CCS中 2926 cm^{-1} 处为壳聚糖的C—H伸缩振动峰, 1645 cm^{-1} 和 1553 cm^{-1} 处分别是仲酰胺I带中C=O的伸缩振动峰和仲酰胺II带中N—H的弯曲振动峰, 通过CS上的氨基和羧基形成酰胺键, 结果表明CS成功修饰到TNTs上.

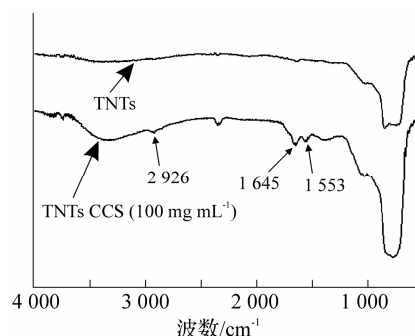
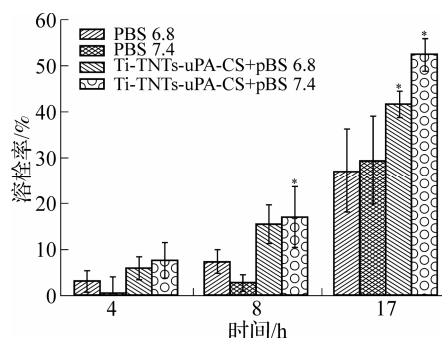


图3 TNTs 和 TNTs-CCS 的红外谱图

2.3 Ti-TNTs-uPA-CS 载药及体外溶栓实验

如图4所示, 通过溶栓实验考察Ti-TNTs-CCS-uPA在不同pH值的磷酸盐缓冲溶液中以及不同溶栓时间的体外溶栓效果, 并以磷酸盐缓冲溶液作为对照. 结果表明, 在本工作实验条件下, 经过4 h, Ti-TNTs-uPA-CS 缓慢释放出尿激酶, 具有一定溶栓效果, 且随着溶栓时间的增长, 溶栓效果显著增加. 当溶栓时间达到17 h时, Ti-TNTs-uPA-CS+pBS 6.8 组溶栓率为41.87%, 而Ti-TNTs-uPA-CS+pBS 7.4 组溶栓率为52.67%, 整体来看, 不同pH的缓冲溶液下, Ti-TNTs-uPA-CS 的溶栓效果差异不大. 该实验表明, 将尿激酶成功载入钛片后, 依旧能保持良好的溶栓能力, 为我们进一步的靶向研究提供了一定基础.



与pBS空白组相比(* $P < 0.05$, $n=3$), Ti-TNTs-uPA-CS在不同pH下, 不同时间下对空白组的相对生物活性, 相对于pH 6.8和pH 7.4下生物活性进行标准化.

图4 Ti-TNTs-uPA-CS 的体外溶栓率

3 结论

本工作以钛片为基底, 通过电化学阳极氧化法制备二氧化钛纳米管阵列, 壳聚糖作为封端修饰TNTs, 制备溶栓药物载体材料. 用 H_3PO_4 乙二醇作为电解液制备二氧化钛纳米管阵列, 可生成

致密的氧化层, 增加纳米管阵列与钛基底的黏附性, 使其不易从钛片上剥落. 合成的 TNTs 高度有序, 排列整齐, 且煅烧后的 TNTs 结构依然保持不变. 通过红外证实壳聚糖成功修饰到 TNTs 上. 经摇床缓慢振荡, 溶栓药物 uPA 成功载入到 Ti-TNTs 上, 每片 $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ 的 Ti-TNTs-CS 载有 1.4 mg uPA. 体外溶栓实验表明, Ti-TNTs-uPA-CCS 具有良好溶栓能力, 为我们进一步靶向溶栓治疗提供了研究基础, 在治疗血栓领域具有应用前景.

参考文献:

- [1] Vaidya B, Nayak M K, Dash D, et al. Development and characterization of site specific target sensitive liposomes for the delivery of thrombolytic agents[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2011, 403(1/2):254-261.
- [2] Sakuragawa N, Shimizu K, Kondo K, et al. Studies on the effect of PEG-modified urokinase on coagulation-fibrinolysis using beagles[J]. Thrombosis Research, 1986, 41(5): 627-635.
- [3] Losic D, Simovic S. Self-ordered nanopore and nanotube platforms for drug delivery applications[J]. Expert Opinion on Drug Delivery, 2009, 6(12):1363-1381.
- [4] Schmidt S F, Thiemann S, Berger S, et al. Mechanical properties of anatase and semi-metallic TiO_2 nanotubes [J]. Acta Materialia, 2010, 58(19):6317-6323.
- [5] Hahn R, Schmidt S F, Salonen J, et al. Semimetallic TiO_2 Nanotubes[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2009, 48(39):7236-7239.
- [6] Xiong J Y, Wang X J, Li Y C, et al. Interfacial chemistry and adhesion between titanium dioxide nanotube layers and titanium substrates[J]. The Journal of Physical Chemistry C, 2011, 115(11):4768-4772.
- [7] Masuda H, Fukuda K. Ordered metal nanohole arrays made by a two-step replication of honeycomb structures of anodic alumina[J]. Science, 1995, 268(5216):1466-1468.
- [8] Kelly J J. The influence of fluoride ions on the passive dissolution of titanium[J]. Electrochimica Acta, 1979, 24 (12):1273-1282.
- [9] Roy P, Berger S, Schmuki P. TiO_2 nanotubes: Synthesis and applications[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2011, 50(13):2904-2939.
- [10] Shi Z L, Neoh K G, Kang E T, et al. Surface functionalization of titanium with carboxymethyl chitosan and immobilized bone morphogenetic protein-2 for enhanced osseointegration[J]. Biomacromolecules, 2009, 10(6):1603-1611.

Preparation of TiO_2 nanotubes and their application as carriers for thrombolytic drugs

CHEN Rongrong, JING Chunlan, ZHAO Lingling*, LIANG Hongze

(School of Material Science and Chemical Engineering, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: In order to solve the problems of direct use of urokinase (uPA) (e.g. the risk of breakdown systemic fibrinogen and bleeding) and improve the thrombolytic effect, TiO_2 nanotube arrays were designed and prepared as thrombolytic drug scaffold. The TiO_2 nanotube arrays were synthesized by anodized electrochemical method. The thrombolytic drug uPA could be encapsulated into the TiO_2 nanotube arrays, and chitosan (CS) was used as capping agent to combine in the tubes through amide bonds. The morphology and structure of Ti-TNTs-uPA-CS were proved by scanning electron microscopy and infrared spectroscopy. In vitro thrombolytic experiments were performed to simulate human physiological environment. The results showed that Ti-TNTs-uPA-CS produced good thrombolytic ability, compared to PBS control group. It indicates the potential promise of the TiO_2 nanotube arrays for uPA encapsulation and thrombus treatment.

Key words: TiO_2 nanotubes; drug carrier; uPA; thrombolysis

(责任编辑 章践立)