

Fe₃O₄@PEG 磁性纳米粒子的合成及其对阿霉素的载药性能

张 坤¹, 江 峰¹, 季 帆¹, 谷元亮², 苏 红², 赵进顺², 张剑锋^{1*}

(1.宁波大学 材料科学与化学工程学院, 浙江 宁波 315211; 2.宁波大学 医学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 将通过化学共沉淀方法得到的 Fe₃O₄ 纳米粒子依次用柠檬酸和双羧基化的聚乙二醇进行修饰, 合成了具有磁靶向的纳米粒子载体(Fe₃O₄@PEG), 分别用 X 射线衍射、红外光谱、扫描电镜、粒径分布、热重分析对其结构进行了表征, 将合成的磁性纳米粒子负载上模型药物阿霉素(DOX), 得到新的载药体系 Fe₃O₄@PEG-DOX, 研究了该载药体系的载药特征和释放行为. 研究发现, 该载体在水中载药率为 85%, 累积释放实验表明, 在 72 h 内, pH 5.0 时释放率达到 71%, 远高于 pH 7.4 时 43% 的释放率, 体外细胞实验表明负载阿霉素的磁性纳米载体的抗肿瘤活性没有损失, 与未经修饰的阿霉素的抗肿瘤活性相当. 研究结果表明, 通过柠檬酸连接的 Fe₃O₄@PEG 纳米粒子对阿霉素具有较好的修饰作用, 是一种较为理想的阿霉素载药系统.

关键词: 阿霉素; 纳米粒子; 四氧化三铁; 药物修饰; 聚乙二醇化

中图分类号: TQ460.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2018) 03-0060-05

恶性肿瘤是人类的主要死亡原因之一, 已经成为严重危害人类生命健康、制约社会经济发展的一大类疾病. 当前其治疗方式主要有手术治疗、放射治疗和化学治疗. 阿霉素(DOX)是临床上广为使用的化学治疗癌症药物, 但其缺乏肿瘤靶向性^[1], 特别是大剂量使用时存在严重的毒副作用风险^[2].

纳米粒子递送系统可以通过肿瘤细胞的高通透性和滞留效应(即 EPR 效应)使得药物在病灶部位聚集^[3], 因而被广泛应用于化疗药物的靶向输送. 纳米粒子作为载体能够提高药物的化学稳定性, 改善药物的生物分布和靶向性, 同时减少肿瘤的耐药性^[3-5]. 常用的纳米粒子包括聚合物^[6]、无机纳米粒子(Fe₃O₄、Au)^[7-8]和超分子纳米阀^[9]等, 其中 Fe₃O₄ 磁性纳米粒子被认为是非常理想的药物靶向输送纳米粒子, 其比表面积大、化学性质稳定、生物相容性高, 具有优良的磁性^[10].

对磁性纳米粒子表面进行化学修饰有利于提高其表面活性, 改善其生物相容性. 为了使得 Fe₃O₄ 纳米粒子的表面官能化, 可以将有利于提高药物功效的小分子对其进行包覆, 其中, 柠檬酸是

较常用的一种小分子^[11-12]. 同时, 为了增加药物在血液中的循环时间, 可使用生物相容性好的聚合物, 如壳聚糖^[13]、葡聚糖^[14]、聚乙二醇(PEG)^[15]等, 对纳米粒子进行修饰. PEG 是获得 FDA 批准使用的药物修饰材料, 它具有良好的水溶性, 经 PEG 修饰的磁性纳米粒子能够避免被内皮网状系统(RES)吞噬^[16-17], 提高药物在血液中的水溶性和循环时间, 放慢药物释放速度, 延长药物释放时间.

本文用化学共沉淀方法合成了磁性 Fe₃O₄ 纳米粒子, 再依次用柠檬酸(CA)和双羧基化的聚乙二醇(COOH-PEG-COOH)进行修饰, 得到具有磁靶向的磁性纳米粒子载体 Fe₃O₄@PEG, 并将其负载上阿霉素, 对该载药体系的载药性能, 释药能力及其体外抗肿瘤活性进行了探讨.

1 实验部分

1.1 主要试剂和仪器

FeCl₃·6H₂O、FeCl₂·4H₂O、柠檬酸(CA)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDCI)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)、二甲基亚砜(DMSO)购自

收稿日期: 2017-10-09.

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

基金项目: 浙江省公益性技术应用研究计划(2015C31044); 宁波市自然科学基金(2014A610113).

第一作者: 张坤(1993-), 女, 安徽合肥人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 生物医药材料. E-mail: zhangzkun@126.com

*通信作者: 张剑锋(1968-), 男, 湖南邵阳人, 教授, 主要研究方向: 材料化学. E-mail: zjf@nbu.edu.cn

上海阿拉丁生物试剂公司; 水合肼、氨水购自国药集团化学试剂有限公司; COOH-PEG-COOH ($M_w=5000$ Da) 购自北京键凯科技有限公司; 阿霉素购自北京华丰联博; 肝细胞(HL7702)、肝癌细胞(HepG2) 购自中国科学院上海生物化学与细胞生物研究所; 胎牛血清培养基、胰酶、3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐购自 AMRESCO 公司. 试剂与溶液均为分析纯, 使用前均未做特殊处理.

X 粉末衍射仪(Bruker D8 Focus); 热重分析仪(DTA7300); 马尔文激光粒度仪(Nano ZS90); 傅里叶变换红外光谱仪(尼高利 FTIR); 扫描电子显微镜(日立 SU70); 紫外分光光度计(北京谱析 TU-1901); CO_2 细胞培养箱; 离心机(Vortex mixer KMC-1300V); 酶标仪(ST-360, KHB); 显微镜(Pro-microscan 5898).

1.2 Fe_3O_4 磁性纳米粒子的制备

参考 Zou 等^[12]的实验用共沉淀方法制备 Fe_3O_4 磁性纳米粒子. 将 288.1 mg 的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 104.6 mg 的 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 溶于 10 mL 蒸馏水中, 再将其加入至含有 2 mL 氨水, 5 mL 水合肼的 50 mL 去离子水溶液中, 在温度 90°C 机械搅拌 30 min, 加入由 400 mg 柠檬酸和 10 mL 去离子水组成的混合溶液中, 继续搅拌 1.5 h, 放置到室温, 用磁铁进行分离, 磁性纳米粒子用去离子水洗涤 3 次, 放入真空干燥箱中干燥, 得到用柠檬酸改性的 Fe_3O_4 粒子.

1.3 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG}$ 磁性纳米粒子载体的合成

将 25.3 mg Fe_3O_4 纳米粒子悬浮于 20 mL 去离子水中, 再分别称取 5.6 mg 聚乙二醇双羧基(COOH-PEG-COOH)、11.9 mg 4-二甲氨基吡啶、11.0 mg 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐, 加入到上述混合体系中, 常温下搅拌 24 h, 静置后移出上清液, 下层物质用去离子水洗涤 3 次, 在真空干燥箱中干燥, 得到聚乙二醇双羧基修饰的 Fe_3O_4 粒子.

1.4 载药体系 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG-DOX}$ 的制备

取 15.0 mg 制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG}$ 纳米粒子溶解在 10 mL 去离子水中, 然后加入 5.0 mg DOX 在室温下避光搅拌 48 h. 然后通过磁铁收集磁性粒子, 用去离子水洗涤 3 次, 真空干燥箱烘干, 收集上清液, 用紫外分光光度计测量并计算出载药率.

1.5 载药体系 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG-DOX}$ 的释放实验

称取 2 份 10.0 mg 盐酸阿霉素, 分别将其溶解

于 pH 5.0 和 pH 7.4 的 PBS 缓冲液中, 分别配制成质量浓度为 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的阿霉素溶液, 进行紫外检测, 绘制出不同 pH 条件下的标准曲线.

取 2 份 80 μg $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG-DOX}$ 纳米粒子, 分别加入 10 mL pH 5.0, pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液, 在透析袋中进行透析, 置于 37°C 恒温箱中. 分别在 1/6, 1/2, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 h 时取样 1 mL, 并补加 1 mL PBS 缓冲溶液以保持 10 mL 的总体积不变, 取样进行紫外光谱检测.

1.6 细胞毒性测试

将生长状态良好的 HepG2 细胞与 HL7702 细胞用胰酶消化后, 取均匀分散的细胞悬液计数, 调整细胞的浓度, 以每孔 10×10^3 个细胞的密度接种到 96 孔板内培养 24 h, 将不同浓度梯度的 DOX, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG-DOX}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG}$ 置于孔内, 放在培养箱中培养 24 h, 倒出培养基后往每孔中加入 10 μL MTT, 90 μL 培养基继续培养 4 h, 倒出培养基后向每孔加入 200 μL DMSO, 将其置于摇床摇晃 15 min, 置于酶标仪下测量 546 nm 处每孔吸光度(OD).

细胞存活率=(实验组 OD-空白组 OD)/(对照组 OD-空白组 OD) $\times 100\%$.

2 结果与讨论

从 Fe_3O_4 的 XRD 图(图 1)可以看出分别在 31.2° , 36.8° , 44.8° , 55.6° , 59.3° 和 65.2° 处具有 6 个衍射峰, 它们分别对应于 Fe_3O_4 的(220), (311), (400), (422), (511) 和 (440) 晶面, 与 Fe_3O_4 标准卡片(PDF # 26-1136)相一致, 表明该物质为 Fe_3O_4 .

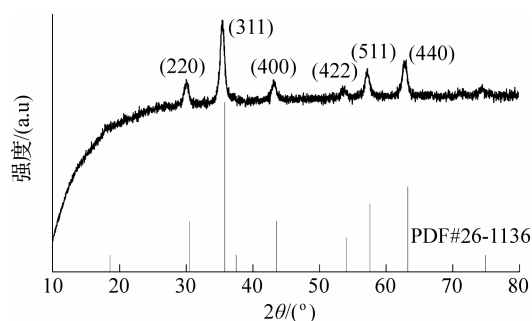


图 1 Fe_3O_4 的 X 射线衍射图谱

由柠檬酸(CA)改性的 Fe_3O_4 的红外光谱(图 2)可以看出, 588 cm^{-1} 处的吸收峰为 Fe_3O_4 中 Fe-O 键

的伸缩振动峰. 1605 cm^{-1} 处为柠檬酸中的羧基的 $\text{C}=\text{O}$ 的伸缩振动吸收峰, 1365 cm^{-1} 为柠檬酸中 $\text{C}-\text{O}$ 伸缩振动峰, 可确定在 Fe_3O_4 纳米粒子的表面已经覆盖了柠檬酸.

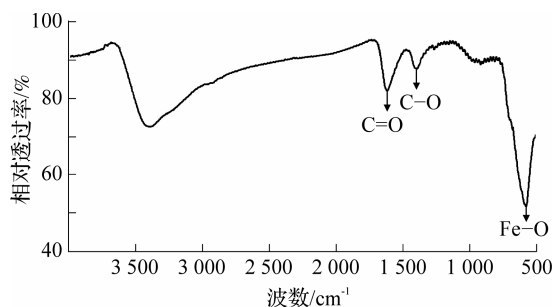


图2 柠檬酸(CA)修饰的 Fe_3O_4 的红外图谱

图3为 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG}$ 和 COOH-PEG-COOH 的红外光谱. 从图3可以看出 581 cm^{-1} 处为 $\text{Fe}-\text{O}$ 键的伸缩振动峰, 这是 Fe_3O_4 的特征吸收峰. 除此之外, 还分别在以下位置出现了相对应的吸收峰: 1606 cm^{-1} 为柠檬酸中的 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动峰, 1365 cm^{-1} 为柠檬酸中 $\text{C}-\text{O}$ 伸缩振动峰, 2831 cm^{-1} 为 COOH-PEG-COOH 中长烷基链中的 $\text{C}-\text{H}$ 伸缩振动峰, 1439 cm^{-1} , 880 cm^{-1} 处为 COOH-PEG-COOH 中 $\text{O}-\text{H}$ 变形振动峰, $\text{O}-\text{H}$ 面外变形振动峰. 与 COOH-PEG-COOH 的红外光谱进行对比可以得知, 双羧基化聚乙二醇实现了对柠檬酸修饰的四氧化三铁颗粒的修饰.

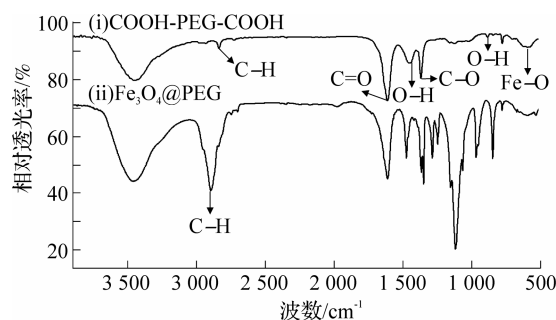


图3 COOH-PEG-COOH 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG}$ 的红外图谱

Fe_3O_4 纳米粒子的扫描电镜及粒径分布见图4. 可以看出, Fe_3O_4 纳米粒子呈球形分布较为均匀, 而且该球状 Fe_3O_4 纳米粒子的分布范围比较窄, 其尺寸约为 16 nm , 与电镜观测到的尺寸大致相符合.

图5为柠檬酸(CA)修饰的 Fe_3O_4 纳米粒子和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG}$ 纳米粒子的热重曲线. 从该图中可以看出两者分解过程主要有3个阶段: 第1阶段是室

温至 150°C , 这一阶段为 Fe_3O_4 表面水分蒸发; 第2阶段为有机成分分解; 第3阶段为 $400\sim 600^\circ\text{C}$ 之间的 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 相转移失重. Fe_3O_4 150°C 左右失重主要是由于 CA 分解所致, 总失重率为 7% . $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG}$ 在 150°C 失重 13% , 这是表面包裹的 CA 和 COOH-PEG-COOH 受热分解导致的, 则 COOH-PEG-COOH 的含量为 6% ; 在 $400\sim 600^\circ\text{C}$ 之间, 为 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 的相转移失重. 综合热重分析和红外光谱分析得知, 以柠檬酸作为连接桥梁的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG}$ 纳米颗粒结构得以确证.

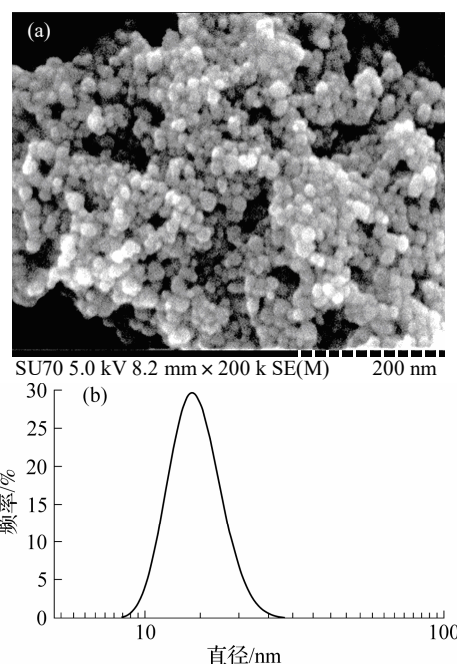


图4 Fe_3O_4 的(a)扫描电镜和(b)粒径分布

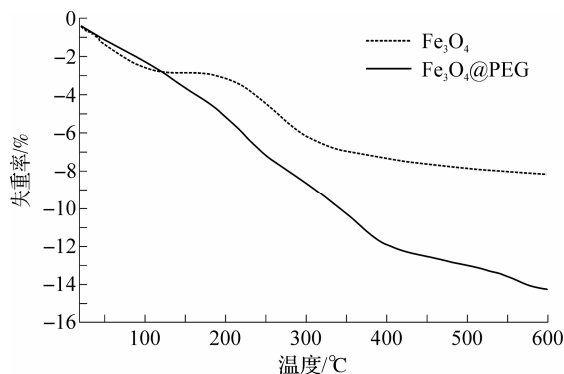


图5 CA 修饰的 Fe_3O_4 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG}$ 的热重分析图谱

用紫外分光光度计测量载药体系 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG-DOX}$ 对 DOX 的平均载药率为 85% , 与文献[18]报道的结果基本一致, 但其在不同 pH 环境下的 DOX 累积释放结果(图6)可以看出, 在 pH 5.0 条件

下的释放速率高于 pH 7.4 下的释放速率, 72 h 的累积释放率分别为 71% 和 43%, 这说明该载体系具有较好的 pH 响应释放性能, 在酸性环境下, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG-DOX}$ 中阿霉素的累积释放率和释放速率均有明显增加, 这对于提高阿霉素的药物性能、降低阿霉素的毒副作用具有重要意义, 修饰药物可以通过 Fe_3O_4 的磁性顺利到达肿瘤部位, 使其在呈明显酸性的肿瘤部位得以有效释放并产生治疗效果, 而在运送过程中则很少释放阿霉素, 从而大大减少了对其他正常细胞的损害. 综上所述, 该载体有望在治疗癌症方面具有较好的应用.

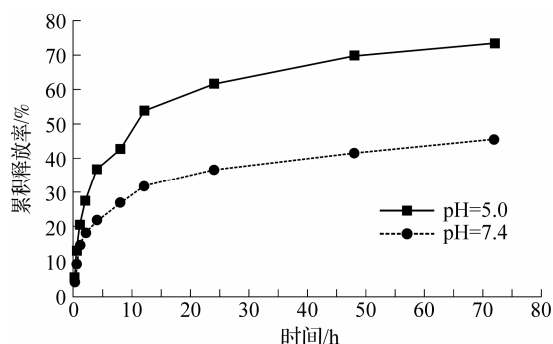
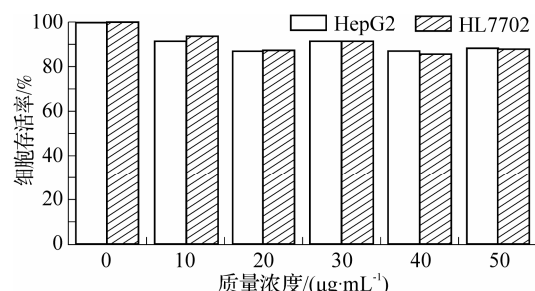
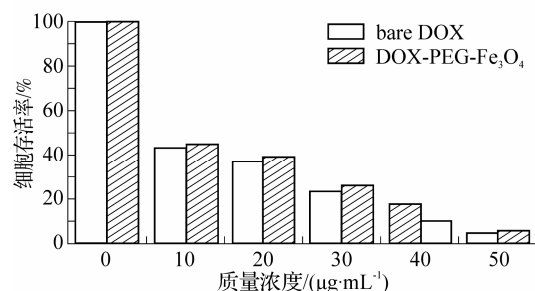


图6 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG-DOX}$ 在不同 pH 缓冲液中的累积释放

图 7 为载体和载药体系对不同细胞的毒性试验比较.



(a) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG}$ 对正常肝细胞和肝癌细胞的毒性



(b) DOX 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG-DOX}$ 对肝癌细胞的毒性

图7 载体和载药体系的细胞毒性

由图 7(a) 可以看出, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG}$ 载体纳米粒子对肝细胞和肝癌细胞几乎无毒性, 而图 7(b) 的结果

表明, DOX 与 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG-DOX}$ 在不同质量浓度时对肝癌细胞的毒性相当. 所以, 制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG}$ 纳米粒子能够运用在负载 DOX 药物上, 既不会产生对正常细胞的毒性, 也不会造成阿霉素对肿瘤细胞的活性损失.

3 结论

用共沉淀法合成了分布均匀的 Fe_3O_4 磁性纳米粒子, 并用柠檬酸、双羧基 PEG 对其进行修饰, 然后对 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG}$ 纳米粒子分别使用 XRD、FTIR、SEM、PSD、TG 等方法进行表征. 紫外分光光度计测量了在波长为 480 nm 情况下负载率为 85%, 体外释放研究表明, 在 pH 5.0 中的累积释放率 (71%) 要远高于在 pH 7.4 中的累积释放率 (43%). 体外细胞实验说明, Fe_3O_4 磁性纳米粒子的毒性较小, 对正常细胞基本上没有毒性, 而 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG}$ 纳米粒子负载的阿霉素和原药阿霉素对肝癌细胞的毒性基本没有差别. 研究结果表明, 通过柠檬酸连接的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG}$ 纳米粒子对阿霉素具有较好的修饰作用, 是一种较为理想的阿霉素载药系统.

参考文献:

- [1] Jayant S, Khandare J J, Wang Y, et al. Targeted sialic acid-doxorubicin prodrugs for intracellular delivery and cancer treatment[J]. *Pharmaceutical Research*, 2007, 24(11):2120-2130.
- [2] Zheng Z, Pavlidis P, Chua S, et al. An ancestral haplotype defines susceptibility to doxorubicin nephropathy in the laboratory mouse[J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2006, 17(7):1796-1800.
- [3] Maeda H, Wu J, Sawa T, et al. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: A review[J]. *Journal of Controlled Release*, 2000, 65(1/2):271-284.
- [4] Lammers T, Kiessling F, Hennink W E, et al. Drug targeting to tumors: Principles, pitfalls and (pre-) clinical progress[J]. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 2012, 161(2):175-187.
- [5] Hu C M J, ZHANG L. Therapeutic nanoparticles to combat cancer drug resistance[J]. *Current Drug Metabolism*, 2009, 10(8):836-841.
- [6] Prabakaran M, Grailer J J, Pilla S, et al. Amphiphilic multi-arm-block copolymer conjugated with doxorubicin via pH-sensitive hydrazone bond for tumor-targeted drug

- delivery[J]. *Biomaterials*, 2009, 30(29):5757-5766.
- [7] Yang J, Shen D, Zhou L, et al. Spatially confined fabrication of core-shell gold nanocages@mesoporous silica for near-infrared controlled photothermal drug release[J]. *Chemistry of Materials*, 2013, 25(15):3030-3037.
- [8] Wang C, Yan J, Cui X, et al. Synthesis of raspberry-like monodisperse magnetic hollow hybrid nanospheres by coating polystyrene template with $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ particles [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2011, 354(1):94-99.
- [9] Liu R, Zhang Y, Feng P. Multiresponsive supramolecular nanogated ensembles[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(42):15128-15129.
- [10] Maeda H S T, Konno T. Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS[J]. *Journal of Controlled Release*, 2001, 74(1):47-61.
- [11] Yang D, Hu J, Fu S. Controlled synthesis of magnetite-silica nanocomposites via a seeded sol-gel approach[J]. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2009, 113(18): 7646-7651.
- [12] Zou J, Peng Y G, Tang Y Y. A facile bi-phase synthesis of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ core-shell nanoparticles with tunable film thicknesses[J]. *RSC Advances*, 2014, 4(19):9693-9700.
- [13] Zhao P, Wang H, Gao H, et al. Reversal of multidrug resistance by magnetic chitosan- Fe_3O_4 nanoparticle-encapsulated MDR1 siRNA in glioblastoma cell line[J]. *Neurological Research*, 2013, 35(8):821-828.
- [14] Williams H D, Trevaskis N L, Charman S A, et al. Strategies to address low drug solubility in discovery and development [J]. *Pharmacological Reviews*, 2013, 65(1):315-499.
- [15] Tromsdorf U I, Bruns O T, Salmen S C, et al. A highly effective, nontoxic T1 MR contrast agent based on ultrasmall PEGylated iron oxide nanoparticles[J]. *Nano Letters*, 2009, 9(12):4434-4440.
- [16] Veronese F M, Schiavon O, Pasut G, et al. PEG-doxorubicin conjugates: Influence of polymer structure on drug release, in vitro cytotoxicity, biodistribution, and antitumor activity[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2005, 16(4):775-784.
- [17] Xie J, Chen L, Varadan V K, et al. The effects of functional magnetic nanotubes with incorporated nerve growth factor in neuronal differentiation of PC12 cells [EB/OL]. [2017-05-26]. <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/0957-4484/19/10/105101/pdf>.
- [18] Sahu N K, Gupta J, Bahadur D. PEGylated FePt- Fe_3O_4 composite nanoassemblies (CNAs): in vitro hyperthermia, drug delivery and generation of reactive oxygen species (ROS)[J]. *Dalton Transactions*, 2015, 44(19):9103-9113.

Magnetic $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG}$ nanoparticles synthesis and application for doxorubicin delivery

ZHANG Kun¹, JIANG Feng¹, JI Fan¹, GU Yuan-liang², SU Hong², ZHAO Jin-shun², ZHANG Jian-feng^{1*}

(1.Faculty of Material Science and Chemical Engineering, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2.Medical School, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Magnetic $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG}$ nanoparticles were prepared by modification of Fe_3O_4 with citric acid and di-carboxylic polyethylene glycol (PEG). The structure of magnetic nanoparticles was characterized by XRD, FT-IR, SEM, PSD, TGA. Doxorubicin (DOX) was loaded by the magnetic $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG}$ nanoparticle to establish a novel drug delivery system (DDS), $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG}$ -DOX. The loading capacity of nano-carrier and the release behavior of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG}$ -DOX was studied. The results reveal that the loading capacity of the nano-carrier is 85%. The cumulative release test reveals that the drug release rate reaches to 71% in pH 5.0 PBS buffer by contrast a lower drug release rate of 43% in pH 7.4 with 72 h. In vitro experiments indicate that $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG}$ -DOX shows the same antitumor activity as the unmodified doxorubicin without significant loss of cytotoxicity. The research forecasts that citric acid coated $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG}$ nanoparticles is a prospective DDR system for doxorubicin.

Key words: doxorubicin; nanoparticles; ferri ferrous oxide; drug modification; pegylation

(责任编辑 韩 超)