

荷载紫杉醇介孔二氧化硅纳米粒的制备及体外性能

张雪, 苏志桂, 薛玲静, 张灿*

(中国药科大学新药研究中心, 江苏省代谢性疾病药物研究重点实验室, 南京 210009)

摘要 介孔二氧化硅纳米粒(mesoporous silica nanoparticle, MSN)作为药物载体已成为纳米给药系统研究的热点。以无序孔道的MSN为载体,以溶剂吸附法负载化疗药物紫杉醇(PTX),从而制备得到PTX@MSN。考察了PTX@MSN的理化性质、药物体外释放行为和体外抗肿瘤活性等特性。研究表明,PTX@MSN载药量为 $(23.76 \pm 1.14)\%$,在水性介质中分散良好,粒径约为250 nm,电位为 $-(8.01 \pm 1.81)$ mV。PTX@MSN具有药物缓释特性,24 h后PTX累积释放率为 $(23.62 \pm 2.15)\%$ 。细胞毒性结果显示,空白MSN生物安全性良好,而PTX@MSN组对人肝癌HepG2细胞的杀伤作用较市售Taxol组强。本研究为MSN递送抗肿瘤药物提供一定的理论与应用基础。

关键词 介孔二氧化硅纳米粒;紫杉醇;体外释放;抗肿瘤活性

中图分类号 R944 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2015)06-0653-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150603

Preparation and *in vitro* properties of paclitaxel-loaded mesoporous silica nanoparticle

ZHANG Xue, SU Zhigui, XUE Lingjing, ZHANG Can*

Jiangsu Provincial Key Laboratory of Drug Discovery for Metabolic Diseases, Center of Drug Discovery, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract Mesoporous silica nanoparticle as drug carrier has become the new research focus in the field of nano-drug delivery system in recent years. In this study, paclitaxel-loaded mesoporous silica nanoparticle (PTX@MSN) was manufactured by the solvent adsorption. *In vitro* studies revealed that PTX@MSN was well dispersed in aqueous medium with particle size of 250 nm, the potential of $-(8.01 \pm 1.81)$ mV and drug loading efficiency of $(23.76 \pm 1.14)\%$. PTX@MSN showed the sustained-release characteristics with the cumulative PTX of release $(23.62 \pm 2.15)\%$ at 24 h. In additions, the cytotoxicity investigation indicated that blank MSNs were biocompatible while PTX@MSN group showed improved *in vitro* anti-tumor activity against HepG2 cell when compared with Taxol group. In conclusion, MSN is a promising platform to build drug delivery systems for tumor therapy.

Key words mesoporous silica nanoparticles; paclitaxel; *in vitro* drug release; anti-tumor activity

近年来,无机纳米材料的发展为药物递送系统的研究开辟了一条新途径。自2001年Vallet-Regi等首次将MCM-41型介孔二氧化硅纳米粒(mesoporous silica nanoparticle, MSN)用作布洛芬药物载体开始,介孔二氧化硅纳米粒已得到越来越广泛的关注^[1]。MSN作为药物载体具有多种优势,如具有较大的比表面积和孔容,载药量较脂质体、胶束等纳米载体高。表面富含硅羟基且易于修饰,可实现药物靶向、控释等目的。MSN与药物分子间的

作用力主要有静电结合、范德华力及氢键等,所负载的药物种类繁多并且不受其溶解性能的制约^[2-5]。

本研究将疏水性化疗药物紫杉醇(PTX)通过物理吸附负载于介孔二氧化硅纳米粒的孔道中,获得载药介孔二氧化硅纳米PTX@MSN,并重点考察PTX@MSN的理化性质、体外药物释放行为及机制和体外抗肿瘤活性等特性,为无序孔道MSN作为药物载体的应用提供研究依据。

1 材料

1.1 试剂与细胞

介孔二氧化硅纳米粒(MSN,中南大学物理院纳米生物技术实验室提供);紫杉醇(paclitaxel, PTX,江苏红豆杉生物科技有限公司);二氯甲烷(江苏强盛功能化学股份有限公司);二甲基亚砜(DMSO,国药集团化学试剂有限公司);RPMI 1640培养基、青霉素-链霉素-胎牛血清(FBS)(美国Hyclone公司);胰蛋白酶(Trypsin,美国Gibco公司);四甲基噻唑蓝(MTT, Sunshine Biotechnology公司);甲醇为色谱纯,其他试剂均为市售分析纯。

L02细胞(人正常肝细胞)、HepG2细胞株(人肝癌细胞)(中国科学院上海细胞库)。

1.2 仪器

高效液相色谱仪、紫外检测器(日本岛津公司);电子天平(北京赛多利斯天平有限公司);激光粒度测定仪(美国Brookhaven Instruments公司);压力蒸汽灭菌器(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);荧光倒置显微镜(日本Olympus公司);酶联免疫检测仪(上海智理科学仪器有限公司);透析袋(MWCO=14 000,北京经科宏达生物技术有限公司);透射电子显微镜(日本Jeol公司)。

2 方法

2.1 PTX@MSN的制备

称取MSN 10 mg,加至PTX乙醇溶液(PTX 10 mg)1 mL中,室温搅拌4 h。12 000 r/min离心10 min收集纳米粒,真空干燥沉淀以彻底除去残留的乙醇,即得PTX@MSN粉末。

2.2 PTX@MSN的理化性质研究

2.2.1 MSN和PTX@MSN粒径、电位及TEM 称取MSN和PTX@MSN 4 mg,加至纯水4 mL中,均质分散,取适量混悬液滴加到覆盖碳膜的铜网上,红外下干燥。将制备好的样品置于透射电子显微镜下观察粒子大小及形貌^[6]。

分别称取MSN和PTX@MSN 4 mg,加至纯水4 mL中,均质分散,采用激光粒度测定仪测定纳米粒的粒径分布及电位大小。

2.2.2 载药量的测定 称取PTX@MSN粉末10 mg分散于甲醇10 mL中,超声后14 000 r/min

离心10 min收集上清液,重复两次后合并上清液^[7]。使用HPLC测定上清液中PTX的含量,计算载药量(DL)。

2.3 体外释放研究

本研究以市售制剂Taxol作为对照,考察PTX@MSN的体外释药情况,释放介质为0.5% Tween 80-磷酸盐缓冲液(pH 7.4)。分别将PTX@MSN和市售制剂Taxol(含PTX 0.12 mg)置于透析袋内(MWCO=14 000),两端扎紧,投入释放介质30 mL中,于37℃,避光,100 r/min搅拌条件下考察其释放情况。在相应的时间点,分别取样0.5 mL,并补充等体积新鲜的释放介质。所取样品14 000 r/min离心10 min,吸取上清液,使用HPLC测定PTX含量,计算药物累积释放量,绘制释放曲线。

用一级、零级、Higuchi方程和Ritger-Peppas指数模型分别对PTX@MSN的释放曲线进行拟合,以考察其体外释放机制。

2.4 细胞毒性试验

2.4.1 细胞培养 采用两株肝细胞,分别为人正常肝细胞为L02细胞株和人肝癌细胞HepG2细胞株。L02细胞和HepG2细胞培养基为RPMI 1640完全培养基,在37℃、5% CO₂恒温培养箱中培养。接种1 d后,细胞完全贴壁后更换培养基,除去死细胞及细胞残渣。此后,每两天换1次培养基。待细胞长至细胞培养瓶80%以上,按1:6的比例进行细胞传代^[8]。

2.4.2 空白MSN、PTX@MSN的细胞毒性试验

取对数生长期的L02细胞和HepG2细胞,分别以每孔 1×10^4 个细胞的密度接种在96孔细胞培养板中,每孔体积为200 μ L。放至恒温培养箱里培养24 h后,弃去培养基,然后分别加入以无血清RPMI 1640培养基稀释的不同浓度空白MSN和空白Taxol材料聚氧乙烯蓖麻油(cremophor EL, CrEL),以考察空白材料的细胞毒性;分别加入以无血清RPMI 1640培养基稀释的PTX质量浓度为0.005~20 μ g/mL的PTX@MSN和Taxol,以考察制剂的细胞毒性。继续培养24和48 h,于给药结束后,采用MTT法评价空白MSN材料、空白Taxol材料、PTX@MSN和Taxol两组含药制剂对L02细胞和HepG2细胞的细胞毒性^[9-10]。计算细胞存活率。

3 结果与讨论

3.1 MSN 和 PTX@MSN 的理化性质研究

3.1.1 MSN 和 PTX@MSN 粒径、电位及 TEM 由电镜照片(图 1)可以清楚地观察到 MSN 表面蠕虫状的孔道,表明 MSN 具有无序介孔结构,单分散性良好,粒径约 100 nm,载药后 PTX@MSN 粒径为 110 nm 左右,没有显著增加。

采用激光粒度测定仪测定纳米粒的粒径、粒径分布及电位(表 1),结果显示 MSN 在水性介质中粒径约 200 nm,载药后的 PTX@MSN 粒径稍大,为 250 nm 左右,而电镜测得的粒径分别为 100 和 110 nm 左右,造成粒径偏大的原因为:①在水性介质中 MSN 外表面的硅羟基结合水分子形成水化层,因此较干燥状态下的粒子稍大^[11];②激光粒度测定仪的原理是通过激光衍射技术测定粒子粒径,粒子对激光产生散射,因此计算机分析出的结果较实际值偏大^[7]。

Table 1 Sizes,Zeta potentials and loading capacity of MSN and PTX@MSN ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Sample	Size/nm	PDI	Zeta potential/mV	DL/%
MSN	197.1 \pm 0.1	0.227 \pm 0.025	-28.05 \pm 1.91	/
PTX@MSN	256.5 \pm 5.5	0.246 \pm 0.021	-8.01 \pm 1.81	23.76 \pm 1.14

PDI:Polydispersity index;DL:Drug loading

3.1.2 载药量的测定 测定结果表明(表 1),PTX@MSN 中 PTX 载药量为 (23.76 \pm 1.14)%。PTX 分子大小约 1.0 \times 1.5 \times 2.0 nm,本研究采用的无序 MSN 孔径约 3.03 nm,因此可实现对 PTX 药物的有效负载。另外,MCM-41 型二氧化硅纳米粒的载药量文献报道一般为(16.7 \pm 1.2)%^[7],小于本研究中无序 MSN 的载药量,推测原因可能是无序孔道较 MCM-41 比表面积大,因此所吸附的药物分子数量更多。

3.2 体外释放行为的考察

PTX@MSN 和 Taxol 体外释放曲线如图 2,比较两组释放曲线可知,初始 PTX@MSN 组释放较 Taxol 组稍快,这可能是 MSN 外表面结合的 PTX 分子突释所致。随着时间的延长,PTX@MSN 组释药速率较为缓慢,这有利于维持药物浓度在治疗窗内。综上所述,与 Taxol 相比,PTX@MSN 具有更好的缓释特性。

根据一级、零级、Higuchi 方程和 Ritger-Peppas

MSN 和 PTX@MSN 的表面电位分别为 -(28.05 \pm 1.91) mV 和 -(8.01 \pm 1.81) mV,主要为 MSN 表面的硅羟基在水性介质中可发生部分电离呈负电性。

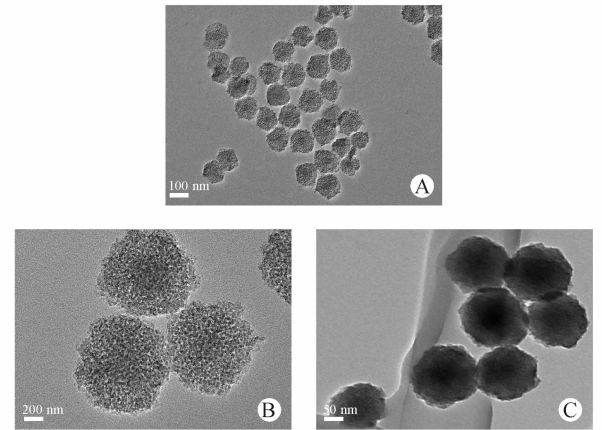


Figure 1 Transmission electron microscopy of mesoporous silica nanoparticle (MSN) (A), (B) and paclitaxel@ mesoporous silica nanoparticle (PTX@MSN) (C)

指数模型,对 PTX@MSN 的体外释药曲线进行拟合,拟合曲线如图 3 所示。结果表明,Ritger-Peppas 方程中相关系数最大,因此认为 PTX@MSN 体外释药行为符合 Ritger-Peppas 指数模型。另外,指数模型中 n 表示药物释放机制的特征参数,方程中 $n = 0.2805$,小于 0.45,说明药物的释放以扩散机制为主。

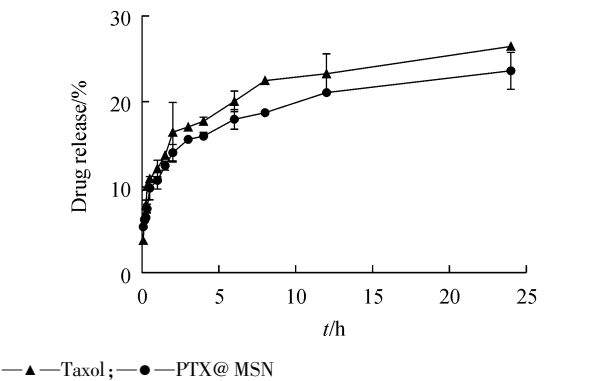


Figure 2 In vitro release profiles of PTX from Taxol and PTX@MSN ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

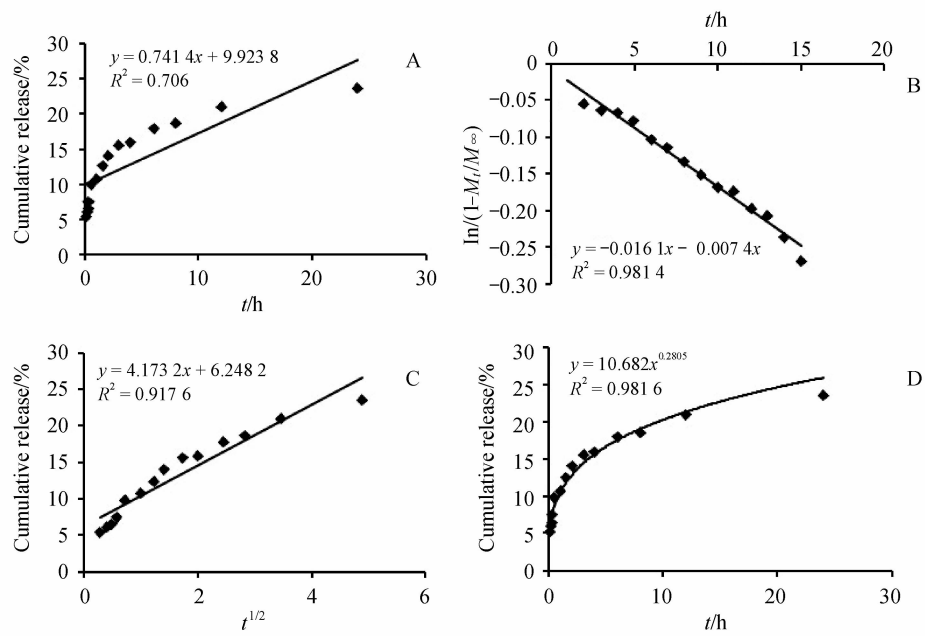


Figure 3 Fitting models of PTX@MSN *in vitro* release: (A) Zero order; (B) First order; (C) Higuchi equation; (D) Ritger-Peppas equation

3.3 细胞毒性试验

3.3.1 空白 MSN 细胞毒性试验 从图 4-A 可以看出,在 MSN 质量浓度介于 10 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,两种细胞的存活率均大于 85%,显示出良好的安全性^[12]。图 4-B 反映了 Taxol 中辅料在低浓度范围内细胞毒性低,而当 CrEL 超过 0.041 75% 时,

对 L02 细胞和 HepG2 细胞的毒性会骤然变大,几乎可以杀死全部的细胞。已有大量文献证明,Taxol 具有良好治疗效果的同时,也暴露出严重的不足,即 CrEL 显示出严重的毒性及过敏反应,严重时甚至威胁生命^[13]。由此可见,空白 MSN 具有更好的生物安全性。

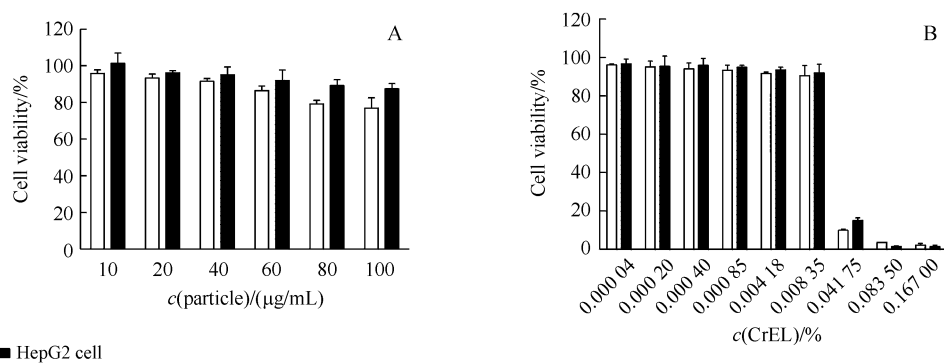


Figure 4 *In vitro* cytotoxicity of MSNs (A) and blank Taxol (B) against L02 and HepG2 cell for 48 h ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3.3.2 PTX@MSN 的细胞毒性研究 以市售制剂 Taxol 为阳性对照组,评价了 PTX@MSN 对 L02 细胞和 HepG2 细胞的细胞毒性,结果如图 5 所示。

IC₅₀的结果(表 2)可见:PTX@MSN 和对照组 Taxol 的细胞毒性呈时间依赖性和浓度依赖性,48 h 的 IC₅₀要显著小于 24 h 的值($P < 0.001$),且随着 PTX 浓度的增加,细胞毒性增强。与 L02 细胞相比,两种制剂对 HepG2 细胞的细胞毒作用更小,

Table 2 IC₅₀ of PTX@MSN and Taxol against L02 cells and HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Cell	t/h	PTX@MSN/($\mu\text{g/mL}$)	Taxol/($\mu\text{g/mL}$)
L02	24	0.530 4 \pm 0.009 5	0.805 8 \pm 0.124 7
	48	0.044 1 \pm 0.004 3 **	0.054 3 \pm 0.004 9 **
HepG2	24	7.92 \pm 0.93	8.25 \pm 2.05
	48	0.36 \pm 0.09 ** #	1.66 \pm 0.05 **

** $P < 0.001$; IC₅₀ at 24 h vs IC₅₀ at 48 h; # $P < 0.001$; IC₅₀ of PTX@MSN at 48 h vs IC₅₀ of Taxol at 48 h

说明肿瘤细胞比普通细胞对化疗药物更加不敏感。细胞比较两组制剂可发现,PTX@MSN 对 HepG2 48 h 的 IC_{50} 显著小于 Taxol 组 ($P<0.001$)。此外,在 PTX 药物浓度较低时,PTX@MSN 对细胞的杀伤能力强于 Taxol,而当 PTX 质量浓度大于 5 $\mu\text{g/mL}$ 时,

Taxol 的细胞毒性骤然增强。其原因在于,当 PTX 浓度增加的时候,Taxol 制剂中 CrEL 的浓度也随之增加,而高浓度的 CrEL 本身对细胞就具有较强的毒性,这与图 4 得到的结果是一致的。综上所述,PTX@MSN 组显示出更好的体外抗肿瘤活性。

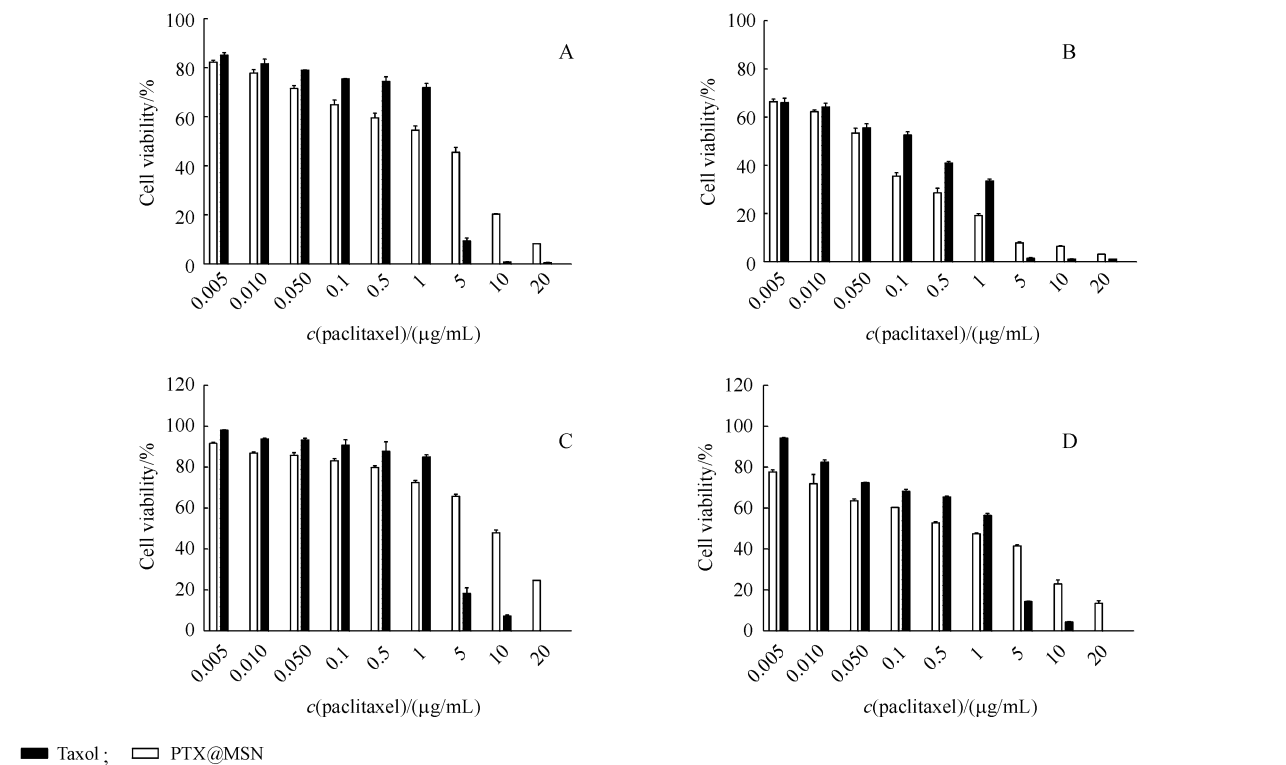


Figure 5 *In vitro* cytotoxicity of PTX@MSN and Taxol against L02 cells for 24 h (A) and 48 h (B). And *in vitro* cytotoxicity of HepG2 cells incubated with PTX@MSN and Taxol for 24 h (C) and 48 h (D) ($\bar{x} \pm s, n=5$)

4 结 论

介孔二氧化硅纳米粒已被广泛应用于药物传输系统的构建。本研究采用溶剂吸附法,将 PTX 分子通过氢键和范德华力吸附在 MSN 无序的孔道表面,制备得到的 PTX@MSN 可稳定分散在葡萄糖注射液里。以市售制剂 Taxol 为阳性对照,本研究考察了 PTX@MSN 的体外释放行为,结果显示其具有更好的缓释特性。此外,体外安全性研究表明,空白 MSN 生物相容性良好,而高浓度范围内的 Taxol 辅料 CrEL 具有明显的毒性。细胞毒性研究结果显示 PTX@MSN 具有更好的体外抗肿瘤活性,对人肝癌细胞 HepG2 的细胞毒性要显著强于 Taxol 组。

在今后的研究中,拟进一步对 PTX@MSN 的药理学、体内药效学进行评价,为 PTX@MSN 在肿

瘤治疗中的应用提供更深入的理论和实验基础。

参 考 文 献

[1]

Vallet-Regi M, Ramila A. A new property of MCM-41 :drug delivery system[J]. *Chem Mater*,2001,**13**(4) :308 – 311.

[2]

Wang M,Zhang J,Yuan Z,*et al.* Targeted thrombolysis by using of magnetic mesoporous silica nanoparticles[J]. *J Biomed Nanotechnol*,2012(6) ,**8**:624 – 632.

[3]

Wu S,Hung Y,Mou C. Mesoporous silica nanoparticles as nano-carriers[J]. *Chem Comm*,2011,**47**(21) :9972 – 9985.

[4]

Tang FQ,Li LL,Chen D. Mesoporous silica nanoparticles :synthesis, biocompatibility and drug delivery[J]. *Adv Mater*,2012,**24**(12) :1504 – 1534.

[5]

Slowing II, Vivero-Escoto JL, Wu CW, *et al.* Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers[J]. *Adv Drug Deliv Rev*,2008, **60**(11) :1278 – 1288.

[6]

Jia LJ,Shen JY,Li ZY, *et al.* Successfully tailoring the pore size of mesoporous silica nanoparticles: exploitation of delivery

- systems for poorly water-soluble drugs[J]. *Int J Pharm*, 2012, **439**(1/2): 81 – 91.
- [7] Jia LJ, Shen JY, Li ZY, *et al.* *In vitro* and *in vivo* evaluation of paclitaxel-loaded mesoporous silica nanoparticles with three pore sizes[J]. *Int J Pharm*, 2013, **445**(1): 12 – 19.
- [8] Li WT, Wang L, Zhang C. Influence of surface characteristics on hepatocellular carcinoma cells uptake of nano-liposomes[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2013, **44**(3): 244 – 248.
- [9] Wu X, Wang ZY, Zhu D, *et al.* pH and thermo dual-stimuli-responsive drug carrier based on mesoporous silica nanoparticles encapsulated in a copolymer-lipid bilayer[J]. *Appl Mat Interfaces ACS*, 2013, **5**(21): 10895 – 10903.
- [10] Qu D, Lin HJ, Zhang N, *et al.* *In vitro* evaluation an novel modified chitosan for targeted antitumor drug[J]. *Carbohydr Polym*, 2012, **92**(1): 545 – 554.
- [11] Zheng O, Wan NH, Zhou MM, *et al.* Effect of pH on the dispersion characteristics of fumed silica[J]. *Chin J Appl Chem* (应用化学), 2011, **28**(12): 1448 – 1452.
- [12] Yu T, Malugin A, Ghandehari H. Impact of silica nanoparticle design on cellular toxicity and hemolytic activity[J]. *ACS Nano*, 2011, **5**(7): 5717 – 5728.
- [13] Lyu FF, Cao JN, Zhang J, *et al.* Phase I and pharmacokinetic study of polymeric micelle-formulated paclitaxel in adult Chinese patients with advanced solid tumors[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2014, **73**(11): 1173 – 1179.