

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。研究结果表明, 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 addition, 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 試劑與細胞

介孔二氧化矽納米粒 (MSN, 中南大學物理院
納米生物技術實驗室提供); 紫杉醇 (paclitaxel,
PTX, 江蘇紅豆杉生物技術有限公司); 二氯甲烷
(江蘇強盛功能化學股份有限公司); 二甲基亞砜
(DMSO, 國藥集團化學試劑有限公司); RPMI
1640 培養基、青霉素-鏈霉素、胎牛血清 (FBS)
(美國 Hyclone 公司); 胰蛋白酶 (Trypsin, 美國
Gibco 公司); 四甲基嘜唑藍 (MTT, Sunshine Bio-
technology 公司); 甲醇為色譜純, 其他試劑均為
市售分析純。

L02 細胞 (人正常肝細胞)、HepG2 細胞株 (人
肝癌細胞) (中國科學院上海細胞庫)。

1.2 儀 器

高效液相色譜儀、紫外檢測器 (日本島津公
司); 電子天平 (北京賽多利斯天平有限公司); 激光
粒度測定儀 (美國 Brookhaven Instruments 公司); 壓
力蒸汽滅菌器 (上海博訊實業有限公司醫療設備
廠); 荧光倒置顯微鏡 (日本 Olympus 公司); 酶聯免
疫檢測儀 (上海智理科學儀器有限公司); 透析袋
(MWCO = 14 000, 北京經科宏達生物技術有限公
司); 透射電子顯微鏡 (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 °C, 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 °C, 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 ± 0.1	0.227 ± 0.025	-28.05 ± 1.91	/
PTX@ MSN	256.5 ± 5.5	0.246 ± 0.021	-8.01 ± 1.81	23.76 ± 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。

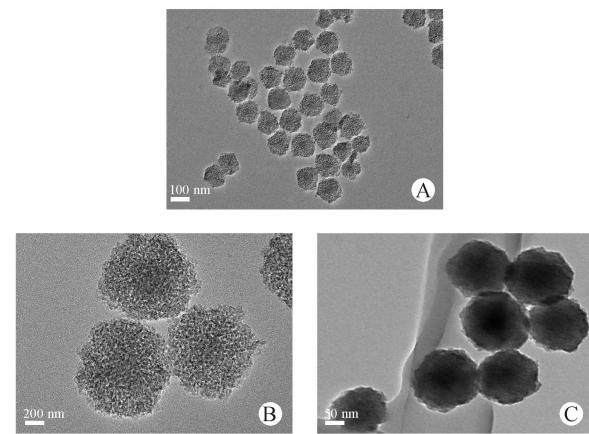
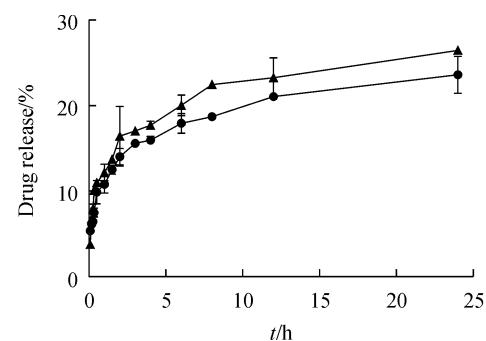


Figure 1 Transmission electron microscopy of mesoporous silica nanoparticle (MSN) (A), (B) and paclitaxel@ mesoporous silica nanoparticle (PTX@ MSN) (C)

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。



—▲—Taxol; —●—PTX@ MSN

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

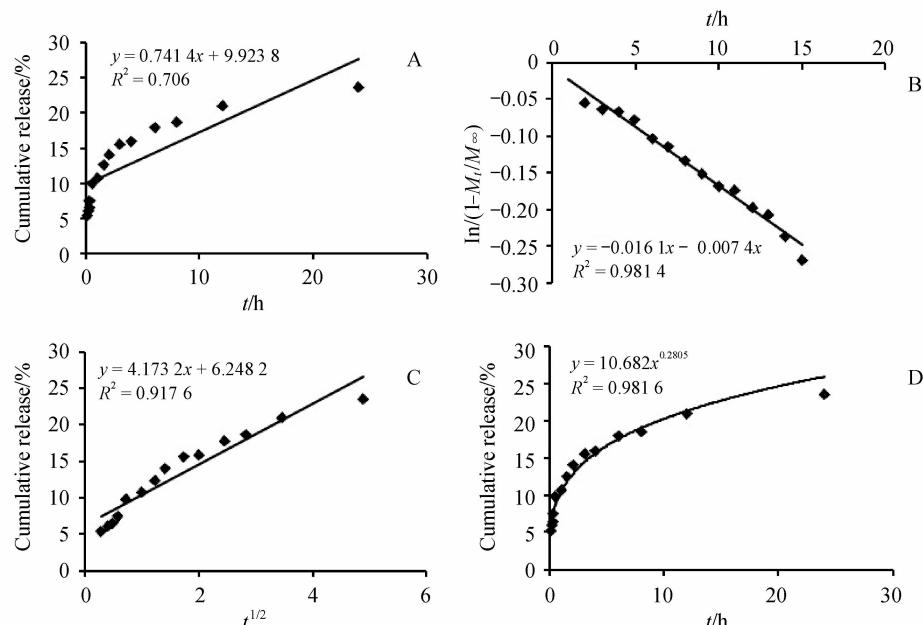
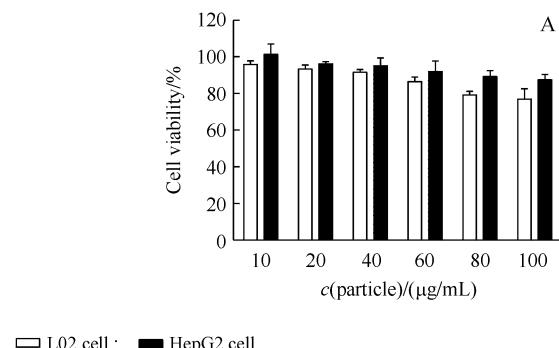


Figure 3 Fitting models of PTX@MSN *in vitro* release: (A) Zero order; (B) First order; (C) Higuchi equation; (D) Ritger-Peppas equation

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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。



■ L02 cell; ■ HepG2 cell

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。

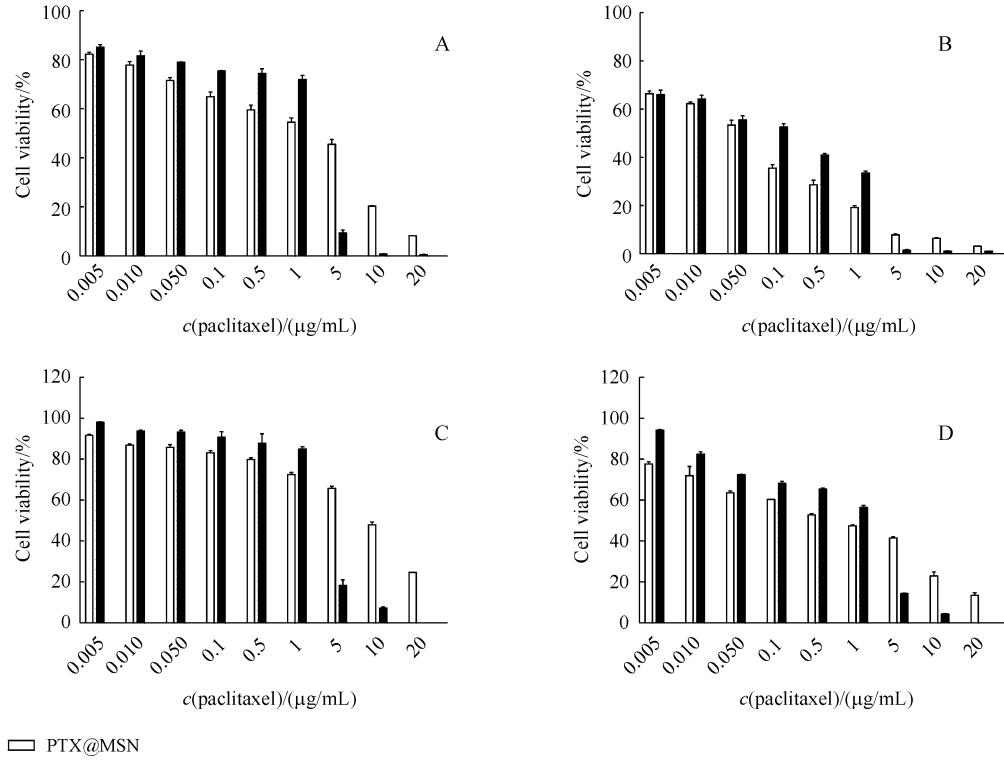
IC₅₀ 的结果(表 2)可见: PTX@MSN 和对照组 Taxol 的细胞毒性呈时间依赖性和浓度依赖性, 48 h 的 IC₅₀ 要显著小于 24 h 的值($P < 0.001$), 且随着 PTX 浓度的增加, 细胞毒性增强。与 L02 细胞相比, 两种制剂对 HepG2 细胞的细胞毒作用更小,

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/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Taxol/($\mu\text{g}/\text{mL}$)
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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,



■ Taxol; □ PTX@MSN

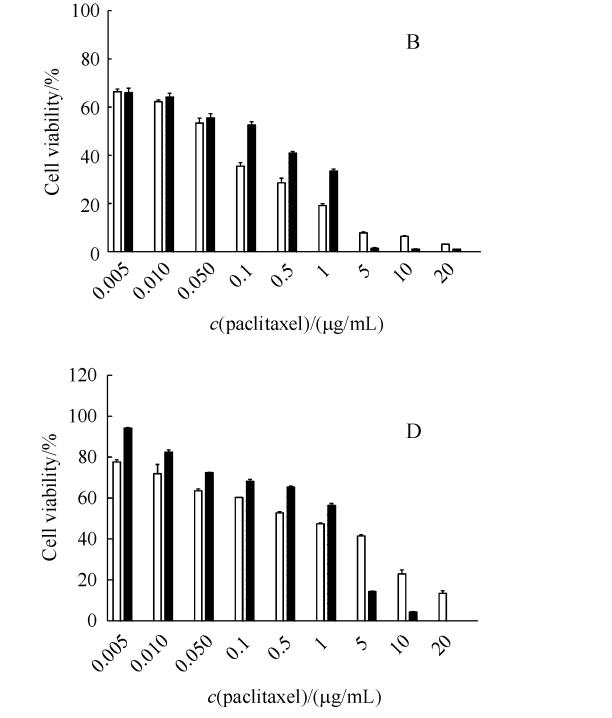
Figure 5 *In vitro* cytotoxicity of PTX@ MSN and Taxol against L02 cells for 24 h (A) and 48 h (B). And *in vitro* cytotoxicity of HepG2 cells incubated with PTX@ MSN and Taxol for 24 h (C) and 48 h (D) ($\bar{x} \pm s, n=5$)

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 的药动学、体内药效学进行评价,为 PTX@ MSN 在肿

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。



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 nanocarriers[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]. *Carbohyd 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.