

抗癌载药体系 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}@ \text{PA}$ 的合成及药物释放

王晓丹^{1,2}, 徐丹丹¹, 吕维忠¹, 刘婧媛¹, 刘琦¹, 景晓燕¹, 王君¹

(1. 哈尔滨工程大学材料科学与化学工程学院, 哈尔滨 150001;

2. 黑龙江工程学院材料与化学工程学院, 哈尔滨 150050)

摘要 采用溶剂热法合成磁性 Fe_3O_4 纳米粒子, 并以此为基底设计制备了一种具有 pH 响应核壳结构的磁性纳米复合材料 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}@ \text{PA}$. 该材料的比饱和磁化强度可达 $35.46 \text{ A} \cdot \text{m}^2/\text{g}$, 具有良好的磁性. Fe_3O_4 纳米粒子呈球型结构, 分散性良好. 与基底相比, 复合微球的粒径尺寸明显增大, 但依然符合载体材料的理想尺寸且分布均匀. 此外, 载体具有多孔结构, 表面积较大, 载药效率和载药量分别高达 96.4% 和 144.6 mg/g . 在 pH 为 7.4 和 5.0 的条件下对载药纳米粒子进行了药物释放研究. 24 h 内, 粒子在 2 种 pH 下累计释放量分别为 39.8% 和 78.6%. 通过药物缓释验证了载体的 pH 响应性能. 在实验中引入了对癌细胞具有杀伤作用的植酸, 使合成的载体具有一定的抗癌作用. 同时采用四甲基偶氮唑盐 (MTT) 法对人骨肉瘤细胞 (MG-63) 进行了体外分析实验, 证实材料与抗癌药物阿霉素 (DOX) 之间存在着一定的协同抗癌效果.

关键词 pH 响应性; 协同作用; 磁性纳米复合材料; 核壳结构; 植酸; 药物释放

中图分类号 O614; O636

文献标志码 A

一直以来, 将治疗试剂准确地传递到体内病灶位置成为各种疾病治疗过程中努力寻求突破的途径. 试剂的非靶向性传递不仅大大降低了疾病的治疗效果, 还会因为在血液中的大量凝聚对正常的组织器官产生一定的危害^[1]. 近年来, 磁性纳米复合材料作为一种有效的靶向传递药物的工具而受到生物学界的广泛关注. 以磁性纳米粒子为载体材料的载药释药系统的工作原理是将药物分子通过物理或化学吸附作用负载到载体材料的表面, 在外加磁场的作用下实现载药载体的定点传递, 再通过刺激响应来控制载体释放药物, 从而实现药物分子的磁靶向性^[2-4]. 具有高比表面积、大孔体积和可调孔径的多孔材料, 如由金属阳离子和配体形成的金属有机骨架材料 (MOFs), 其中沸石咪唑酯骨架材料 (ZIF-8) 相对于其它骨架材料, 不仅具有较大的比表面积和良好的孔隙率, 而且还具备较高的稳定性、良好的生物降解性和生物相容性, 在生物医用领域具有很大的应用前景^[5,6]. 而天然有机磷酸化合物植酸 (肌醇六磷酸, PA) 作为一种环境友好的经济型试剂, 广泛存在于动植物细胞中, 其本身就具有优秀的生物相容性和抗氧化作用^[7]. 植酸可以提高杀伤细胞的活性和杀菌能力, 具有明显的抗癌效果^[8,9]. Graf 等^[10] 指出饮食中的植酸能够降低结肠癌以及肠炎的发病率. Shamsuddin 等^[11] 报道了植酸能够快速被人 and 鼠科动物吸收和代谢, 从而抑制纤维瘤细胞的转移. 鉴于此, 本文采用上述 2 种原料对基底 Fe_3O_4 进行功能化修饰, 设计合成了一种具有双响应金属配合物包覆的核壳复合材料. 引入具有抗癌作用的活性组分, 研究了材料的磁性、生物相容性及负载药物分子后在药物控释领域的应用.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

六水合三氯化铁 ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、乙酸铵 ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$)、乙二醇 ($\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$)、硝酸锌

收稿日期: 2017-03-24. 网络出版日期: 2017-10-10.

基金项目: 国家自然科学基金 (批准号: 51402065) 资助.

联系人简介: 刘婧媛, 女, 博士, 讲师, 主要从事功能材料研究. E-mail: liujingyuan1004@hrbeu.edu.cn

[Zn(NO₃)₂]及植酸(PA)购于国药集团化学试剂有限公司;磷酸氢二钠(Na₂HPO₄·12H₂O)、磷酸二氢钠(NaH₂PO₄·12H₂O)、磷酸(H₃PO₄)、甲醇(CH₃OH)和无水乙醇(CH₃CH₂OH)购于天津市科密欧化学试剂有限公司;二甲基亚砷(DMSO)和2-甲基咪唑(C₄H₆N₂)购于天津市富宇精细化工有限公司;噻唑蓝(MTT)和阿霉素(DOX)购于阿拉丁试剂公司. 所用试剂均为分析纯.

JSM-6480A型扫描电子显微镜-能谱仪(SEM, 日本JEOL公司), 工作电压20 kV, 分辨率3 nm, 工作距离13 mm. Rigaku D/max-TTR-III系列X射线粉末衍射仪(XRD, 日本JEOL公司), Cu K α 靶, $\lambda = 0.15405$ nm, 管电压40 kV, 管电流150 mA, 扫描速度10°/min. 美国Nicolet公司的Avatar 370型红外光谱仪, 扫描范围400~4000 cm⁻¹, 扫描次数为32次/min. Tecnai G2 S-Twin型透射电子显微镜(TEM, 美国FEI公司), 灯丝电压3.7 kV, 加速电压200 kV, 双倾台调整样品取向. ASAP2010型氮气-吸附脱附仪(美国Micromeritics公司), 采用BET法和BJH法计算样品的比表面积和孔体积. 7304型振动样品磁强计(美国LakeShore公司), 磁矩量程20.00 A·m², 磁场量程2.0 T, 磁场设定7.96×10⁵ A/m. NETZSCH STA409PC型热重-差示扫描量热仪(TG, 德国耐驰仪器制造有限公司), 参比物 α -Al₂O₃, 测试范围25~800 °C, 升温速率10 °C/min, 氮气气氛测试, 氮气流速20 mL/min. Nano ZS90型纳米粒度-Zeta电位分析仪(英国Malvern公司). UV-1601型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司), 测定阿霉素吸收波长为490 nm处的吸光度值.

1.2 实验过程

1.2.1 Fe₃O₄@ZIF-8@PA的制备 参照文献[12]方法合成. 称取1.35 g六水合三氯化铁和3.85 g乙酸铵加入到70 mL乙二醇中, 快速搅拌均匀后持续搅拌30 min, 将其转移至100 mL反应釜中, 于200 °C下反应12 h后冷却至室温, 所得产物分别用无水乙醇和去离子水清洗3次, 于80 °C真空干燥12 h制得基底Fe₃O₄. 将0.1 g Fe₃O₄超声分散于30 mL甲醇溶液中, 加入摩尔比为1:1的硝酸锌和配体2-甲基咪唑, 于70 °C油浴下反应30 min. 利用外加磁场分离所得产物, 用无水乙醇和溶剂多次清洗, 去除残留的反应前驱体, 于60 °C真空干燥12 h, 即可制得磁性金属有机骨架复合材料Fe₃O₄@ZIF-8. 准确称取上述产物0.1 g, 分别加入到50 mL浓度为5, 10和15 mmol/L的植酸溶液中, 于60 °C水浴下搅拌1 h后, 将所得产物分别用无水乙醇和去离子水清洗3次, 于60 °C下真空干燥12 h制得载体Fe₃O₄@ZIF-8@PA.

1.2.2 细胞相容性实验 使用MG-63细胞系通过标准的细胞增殖分析实验(MTT)对体外细胞生存能力进行检测, 研究Fe₃O₄@ZIF-8的生物相容性及Fe₃O₄@ZIF-8@PA磁性纳米微球的细胞毒性. 实验步骤如下: 在37 °C下, 将MG-63人成骨癌细胞接种到含有DMEM培养基的96孔板(每孔5000~6000个细胞)中, 将孔板放到CO₂含量为5%的培养箱培养24 h, 使细胞附着于孔中. Fe₃O₄@ZIF-8和Fe₃O₄@ZIF-8@PA通过紫外线照射灭菌2 h后, 以浓度为0, 3, 12.5, 6.25, 12.5, 25和50 μ g/mL分别添加到上述细胞培养液中培养24 h. 随后, 分别向孔板中加入20 μ L 5 mg/mL MTT溶液共同培养4 h. 温育后, 将上清液移除, 向各孔中添加100 μ L二甲基亚砷(DMSO)溶液, 以150 r/min速度振动5 min至混合均匀. 用酶标仪测定各孔中溶液在490 nm处的吸光度值, 取3次平均值用下式计算细胞的存活率(%):

$$\text{Cell viability} = (A_{\text{test}}/A_{\text{control}}) \times 100\% \quad (1)$$

式中: A_{test} 为添加纳米载体后的吸光度平均值; A_{control} 为未加入纳米载体的纯药物吸光度平均值.

1.2.3 载体药物的负载和体外控释实验 称取5 mg DOX, 30 mg Fe₃O₄@ZIF-8@PA加入到5 mL pH=7.4的磷酸盐缓冲溶液(PBS)中, 超声30 s使分散均匀. 在室温避光条件下置于恒温振荡器中振荡24 h后高速离心分离留取上清液, 用同体积PBS缓冲溶液多次清洗直至澄清. 将多次收集的上清液用紫外分光光度计进行吸光度检测. 负载DOX后的样品标记为Fe₃O₄@ZIF-8@PA-DOX, 用紫外分光光度计进行吸光度检测. 分别计算药物负载量(D_{LC} , %)和载药效率(D_{LE} , %), 计算公式如下:

$$D_{\text{LC}} = [(m_{\text{OD}} - m_{\text{SD}})/m_{\text{N}}] \times 100\% \quad (2)$$

$$D_{\text{LE}} = [(m_{\text{OD}} - m_{\text{SD}})/m_{\text{OD}}] \times 100\% \quad (3)$$

式中: m_{OD} 为初始DOX质量; m_{SD} 为载药载体离心后清液中残留的DOX质量; m_{N} 为纳米载体质量.

1.2.4 磁分离和载体体外药物释放 模拟人体正常体温(37 °C)和pH(7.4)的条件下, 取0.05 g磁性

复合载体分散于 10 mL PBS 缓冲溶液中, 在外磁场下进行分离. 在正常人体体温的条件下, 分别模拟正常细胞环境和肿瘤溶酶体的 pH 范围进行药物释放实验. 分别将 5 mL pH=7.4 和 pH=5.0 的 PBS 缓冲溶液补充到上述离心管中, 置于恒温振荡器中, 在 37 °C 避光条件下进行缓慢振荡. 以一定的时间间隔, 高速离心提取上层缓冲溶液并将其贮存于避光环境中, 同时补充等体积的新鲜缓冲溶液继续振荡. 用紫外分光光度计检测, 测得不同时间点提取含 DOX 的缓冲溶液的吸光度值, 根据 DOX 浓度和吸光度值的标准曲线, 确定每个时间间隔 DOX 的释放量, 确定 DOX 的释放总量, 用下式计算不同时间点的药物释放效率(RE, %):

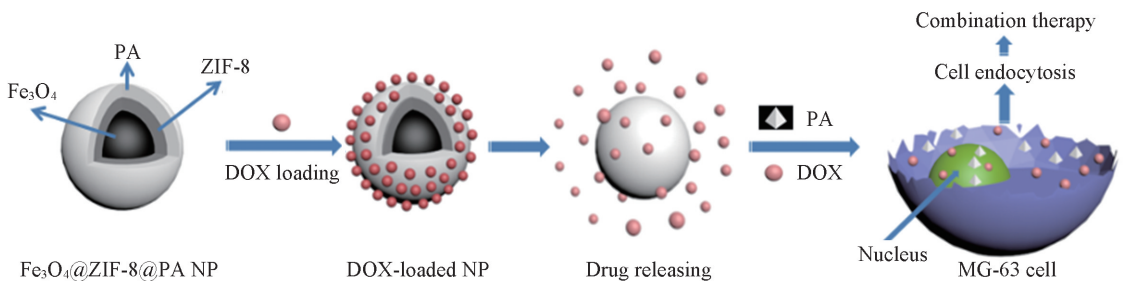
$$RE = (\sum m_{ST}) / m_{LD} \times 100\% \quad (4)$$

式中: m_{ST} 为缓冲溶液中不同时间药物释放量; m_{LD} 为载体负载药物的最终质量.

2 结果与讨论

2.1 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8@PA$ 药物载体的形成

采用原位合成法将磁性基底封装于金属骨架材料中, 再通过静电相互作用逐层自组装法制备了一种新型多孔复合纳米载体材料 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8@PA$, 反应过程如 Scheme 1 所示. 将磁性基底添加到多孔框架材料 ZIF-8 的前驱体混合液中, 使其可以围绕磁性基底生长. 然后, 将其分散于植酸溶液中进行机械搅拌, 植酸与锌离子之间发生螯合作用, 使磁性载体表面形成一层植酸锌配合物. ZIF-8 多孔的表面结构有利于 PA 通过静电相互作用包覆于纳米粒子表面. 天然高分子植酸具有良好的生物相容性和抗癌效果, 可以作为表面活性剂和稳定剂修饰磁性基底. 因材料具有较大比表面积和明显的多孔结构, 通过物理吸附将药物分子负载于载体材料, 从而提高药物负载效率. 此外, PA 具有的丰富磷酸基团和羟基基团可以为药物负载提供活性位点, 而 DOX 拥有可电离的氨基官能团, 二者之间发生离子化作用, 使药物分子通过静电引力及氢键等作用连接到纳米材料表面, 从而提高药物负载效率. 分别在模拟人体正常组织与肿瘤组织微环境的 pH 值条件下对药物进行控制释放实验研究和 pH 对药物释放的影响. 因材料本身具有良好的生物降解性, 可以在弱酸条件下进一步发生降解, 导致表面多孔结构坍塌, 从而控制释放药物分子. 其中 PA 在弱酸条件下进一步降解成具有抗氧化作用的肌醇和磷脂分子. 最后通过 MTT 实验研究了 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8@PA$ 负载 DOX 对 MG-63 癌细胞的再生协同抑制作用.



Scheme 1 Schematic representation of basic constitution of $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8@PA$ nanoparticles, loading and multi-responsive releasing of DOX and the nanocarriers combining with DOX acting in MG-63 cells

2.2 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8@PA$ 的结构表征

图 1 为纯 Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8$ 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8@PA$ 的 SEM, TEM 照片和最终样品的粒径分布图. 由 SEM 照片可知, 基底 Fe_3O_4 呈粒径分布均匀的球形结构, 纳米粒子表面较为光滑; ZIF-8 围绕基底生长后, 载体表面较为粗糙, 粒径明显增大; 植酸的引入使最终载体的表面粗糙度增加, 粒径没有发生显著变化. TEM 照片[图 1(D~F)]与 SEM 结果一致, 基底 Fe_3O_4 呈粒径分布均匀的球形结构, 纳米粒子表面较为光滑; ZIF-8 围绕基底生长后, 形成明显的核壳结构, 且壳层具有清晰的孔结构, 孔径在 10~20 nm, 该结构有助于植酸的引入和药物的负载; 植酸的引入使最终载体的壳层密度增加, 可能是由原壳层 ZIF-8 中的 Zn^{2+} 与植酸发生螯合反应产生的螯合物的掺杂所致. 证实了样品 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8@PA$ 的制备. 从载体材料 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8@PA$ 的粒径分布图[图 1(F)插图]可以看出, 样品的平均粒径

为 382 nm. 同时测得载体的多分散指数为 0.046, 证明载体材料的粒径分布较窄, 符合作为药物载体材料的理想粒径要求, 与 SEM 和 TEM 图像分析结果一致. *zeta* 电位测试表明, $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}$ 表面 *zeta* 电位为 -29.4 mV , $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}@ \text{PA}$ 表面 *zeta* 电位为 -23.7 mV , $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}$ 被 PA 修饰后, 电位得到了提升. 而实验测得的 PA 的表面电位为 3.07 mV , 与 2 种材料电位前后变化相符合. 证明植酸除了通过化学键结合到 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}$ 表面之外, 二者之间也存在电荷作用.

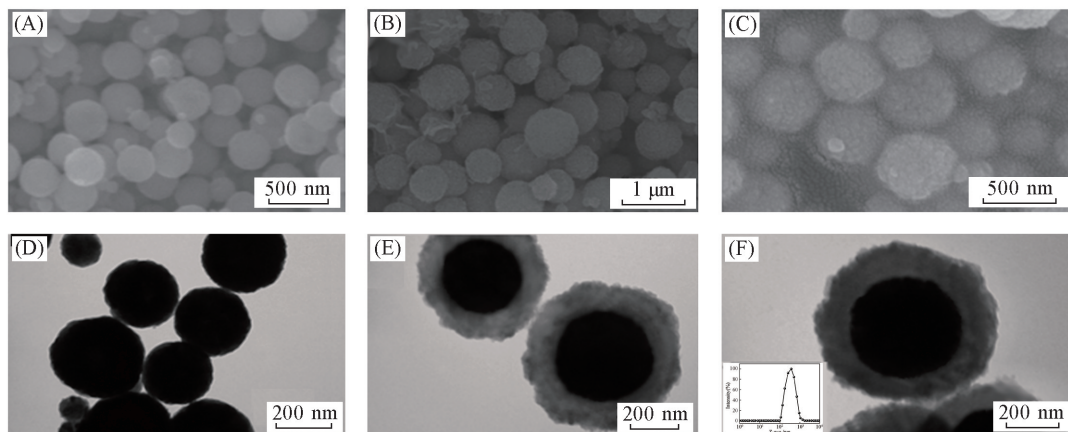


Fig.1 SEM images(A—C) and TEM images(D—F) of Fe_3O_4 (A, D), $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}$ (B, E) and $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}@ \text{PA}$ (C, F) nanoparticles

Inset of (F) is particle size distribution curve of $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}@ \text{PA}$.

图 2 为相同条件下合成的纯 ZIF-8, $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}@ \text{PA}$, PA 和 Fe_3O_4 样品的 FTIR 图谱. 其中样品 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}$ 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}@ \text{PA}$ 所显示的特征峰与文献[13, 14]中报道的对应 ZIF-8 的红外吸收光谱相一致, 其中 3135 和 2935 cm^{-1} 处的特征吸收峰分别归属于咪唑环和甲基中 C—H 键的伸缩振动吸收峰, 422 cm^{-1} 处的特征吸收峰为 Zn—N 伸缩振动^[15], 因磁性基底和植酸的引入, 使得样品峰强度依次减弱, 相对于纯 ZIF-8, $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}$ 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}@ \text{PA}$ 样品在 598 cm^{-1} 处均出现了 1 个新的特征峰^[16, 17], 由 Fe_3O_4 中 Fe—O 的伸缩振动引起的特征吸收峰. $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}@ \text{PA}$ 和 PA 在 1181 和 1010 cm^{-1} 处有与 PO_4^{3-} 对应的特征吸收峰^[18, 19]. 表明已制备出 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}@ \text{PA}$ 样品, 而且包覆过程中并未改变各功能材料本身的化学结构.

图 3 为纯 ZIF-8, $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}@ \text{PA}$ 和 Fe_3O_4 的 XRD 谱图. 可以明显看出, 复合材料中属于 Fe_3O_4 的 6 个特征衍射峰位置并没有发生变化, 分别对应 (220), (311), (400), (422), (511) 和 (440) 晶面, 这与 JCPDS No. 65-3107 标准卡片一致, 说明 Fe_3O_4 属于面心立方结构, 而且壳层结构已包覆于磁核表面, 未改变磁核具有的 Fe_3O_4 晶体结构^[20, 21]. 而壳层包覆后的样品 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}$ 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}@ \text{PA}$ 均出现了新的特征衍射峰, 且其各个特征峰强度与 Fe_3O_4 的 6 个特征衍射峰相比

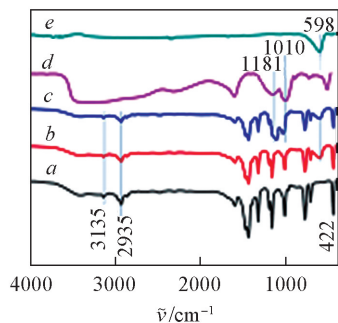


Fig.2 FTIR spectra of pure ZIF-8(a), $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}$ (b), $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}@ \text{PA}$ (c), PA(d) and Fe_3O_4 (e)

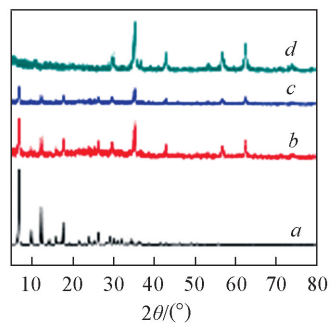


Fig.3 XRD patterns of pure ZIF-8(a), $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}$ (b), $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}@ \text{PA}$ (c) and Fe_3O_4 (d)

有明显的减弱, 但峰的位置并没有发生任何变化. 二者在 $2\theta = 7.3^\circ$ 附近均出现了相对较强的衍射峰, 包括其它新出现的衍射峰位置也都与文献 [22, 23] 报道的 ZIF-8 衍射峰位置一致, 说明样品表面包覆的 ZIF-8 壳层具有较高结晶度, 而且植酸的引入并没有对样品的晶体结构产生影响. 采用 $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ 为参比物在氮气气氛下对所合成纳米材料进行了热稳定性分析. 图 4 曲线 *a* 为 ZIF-8 的 TG 曲线, 升温达到 200°C 时, 质量损失为 3%, 主要是脱水引起的. $200\sim 450^\circ\text{C}$ 之间样品质量有小幅度的下降, 是由溶剂分子从 ZIF-8 壳层的脱除造成的. $450\sim 650^\circ\text{C}$ 之间曲线急剧下降, ZIF-8 的结构开始分解, 样品失重为 60% 以上. $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8@PA$ 的 TG 曲线如图 4 曲线 *b* 所示.

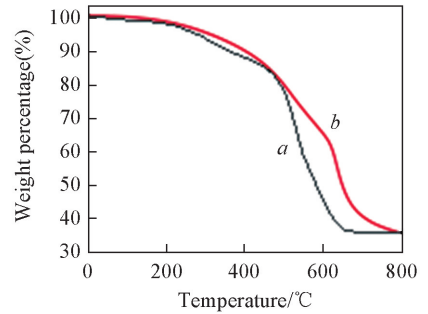


Fig.4 TG curves of ZIF-8(*a*) and $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8@PA$ (*b*) nanoparticles

磁性纳米载体材料在初始低温范围仅有 0.1% 的微量失重是由吸附的水分子蒸发和具有亲水性的纯 PA 初始的微量失重引起的 [24]. $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8@PA$ 磁性纳米载体材料在 $200\sim 650^\circ\text{C}$ 之间持续失重为 60% 以上, 主要是壳层材料和在改性过程中引入的植酸分子发生高温热解、在溶剂热反应过程中残留的其它有机物质分解、ZIF-8 结构的破坏以及测试过程中 N_2 的掺杂引起基底 Fe_3O_4 中 Fe—O 的断裂导致的重量损失. 实验进一步证明了核壳材料的合成, 而且载体具有一定热稳定性且载体磁含量较高, 符合医用载药材料领域应用对载体热稳定性的要求.

$\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8$ 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8@PA$ 材料的 N_2 吸附/脱附等温曲线如图 5 所示. 2 种材料的 N_2 吸附/脱附等温线与 I 型等温线相似, 插图分别为 2 种材料的孔径分布图, 可以明显看出, 2 种材料均具有较大的比表面积. 与 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8$ 复合材料的比表面积 $692.8\text{ m}^2/\text{g}$ 和平均孔径 16.3 nm 相比, 最终样品 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8@PA$ 的比表面积和平均孔径都明显降低, 但仍可达到 $517.4\text{ m}^2/\text{g}$ 和 5.8 nm , 进一步证实了植酸已经包覆于 ZIF-8 壳层结构表面, 与上述测试分析结果一致; 说明最终样品 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8@PA$ 仍然保持较高的比表面积, 为进一步在药物负载实验中的应用提供了坚实的基础.

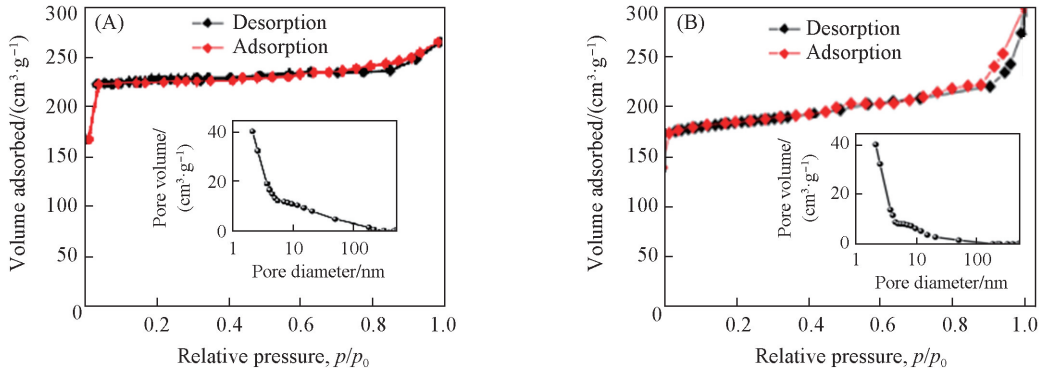


Fig.5 Nitrogen adsorption-desorption isotherm with pore size distribution curves in the inset of $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8$ (A) and $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8@PA$ (B)

2.3 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8@PA$ 的性能分析

样品的磁学性质如图 6 所示. 材料的磁滞回线重合且剩磁和矫顽力均为零且呈现超顺磁性 [20]. 由于非磁性物质植酸的引入, $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8@PA$ 的比饱和磁化强度为 $35.46\text{ A}\cdot\text{m}^2/\text{g}$, 相对于 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8$ ($42.30\text{ A}\cdot\text{m}^2/\text{g}$) 的比饱和磁化强度有一定的降低, 但依然保持较高的磁含量, 且两者的比饱和磁化强度与基底 Fe_3O_4 ($61.93\text{ A}\cdot\text{m}^2/\text{g}$) 相比均发生了明显的降低, 进一步证明了核壳材料的形成. 如图 6 插图显示加入磁场前后溶液分散状态. 左侧的图片为未外加磁场的磁性纳米粒子溶液, 粒子均匀分散于缓冲溶液中, 粒子之间分散性良好, 没有明显的聚集. 右侧为附加磁场后的溶液, 分散的磁性粒子迅速向磁场方向富集. 当外加磁场移走时, 晃动样品管, 又得到分散溶液. 载药体系在模拟人体环境

的外界磁场的作用下能够实现快速有效的分离. 证明载药体系可以在外磁场的作用下能够迅速的到达病变位置, 具有靶向功能.

同时对 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}@ \text{PA}$ 药物载体的载药能力进行测试, 如图 7(A) 所示. 与纯 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}@ \text{PA}$ 和纯 DOX 的紫外吸收光谱相比, $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}@ \text{PA-DOX}$ 在 DOX 最大吸收波长处 (480 nm) 出现明显的吸收峰, 证明载体药物负载成功. 根据式 (2) ~ (4) 可以计算出负载过程中的药物负载量和负载效率. 当 DOX 的初始加入量为 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 药物的载药量为 144.6 mg/g , 载药效率达 96.4%, 二者均维持在较高水平. $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}@ \text{PA-DOX}$ 的体外累积释放曲线如图 7(B) 所示. 对比了载药载体 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}@ \text{PA-DOX}$ 在 $\text{pH}=7.4$ (模拟正常体细胞 pH 环境) 以及 $\text{pH}=5.0$ (模拟肿瘤溶酶体微环境的 pH) 的 PBS 缓冲溶液中的药物释放量随时间的变化趋势^[25,26]. $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}@ \text{PA-DOX}$ 在 $\text{pH}=7.4$ 的条件下相对稳定, 由于药物物理吸附在纳米载体的表面, 使得在 1 h 之内出现快速释放, 释放量为 18.9%. 随后药物出现缓慢持续释放趋势, 这是因为在外界长时间的振荡作用下, 载体壳层孔道内的药物自身的扩散运动所产生的药物释放, 因此释放速率减慢. 24 h 后, 持续累积释放量达到 39.8%, 此时磷酸根主要以 HPO_3^- 的形式稳定存在, 而 DOX 中的氨基主要以 NH_3^+ 形式稳定存在, 二者之间存在很强的作用力, 使药物分子的释放受到限制. 即使是在有外加振动等作用力下药物也不容易得到释放, 表明负载 DOX 的纳米载体在正常体细胞的 pH 环境中具有良好的稳定性. 当 $\text{pH}=5.0$ 时, 由于载体表面物理吸附的药物分子以及载体本身壳层结构发生降解, 孔道内药物分子进行释放, 释放速率加快, 导致 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}@ \text{PA-DOX}$ 载体产生较快速的持续释放. 当释放时间为 10 h 后, 释放速率趋于稳定, 此时释放量可达 78.6%. 24 h 后最终累积释放量可高达 82.8%. 这是因为在弱酸条件下, 亚磷酸根离子质子化, 以 H_3PO_3 分子形式存在, 降低了纳米载体和药物分子之间的相互作用力, 此外 DOX 在酸性条件下溶解度增加, 使其较容易从载体表面得到释放. 因此, 合成的载药载体可以实现 pH 响应控制释放, 有利于药物在肿瘤部位的加速释放, 提高局部药物浓度^[27].

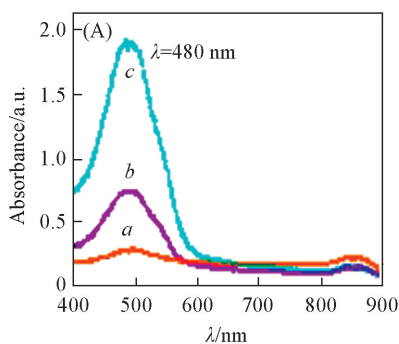


Fig.7 Absorbance spectra of bare $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}@ \text{PA}$ nanocarriers (a), $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}@ \text{PA-DOX}$ (b) and free DOX (c) (A) and release of DOX from $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}@ \text{PA-DOX}$ in buffer solutions at $\text{pH}=7.4$ (a) and 5.0 (b) (B)

采用标准细胞增殖分析实验对所合成样品进行了体外细胞毒性实验研究, 对样品的细胞相容性进行了分析. 图 8 为载体 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}@ \text{PA}$ 的生物相容性测试结果. 由图 8(A) 可见, 加入 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}@ \text{PA}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}@ \text{PA-DOX}$ 和纯 DOX 后, MG-63 人成骨瘤细胞的细胞存活率随着加入溶液溶剂浓度的增加呈现相同的下降趋势. 加入浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}@ \text{PA}$ 后, MG-63 人成骨瘤细胞经过 48 h 的培养后细胞存活率不足 60%, 表明所合成的载体材料对癌细胞具有一定的杀伤作用. 在此

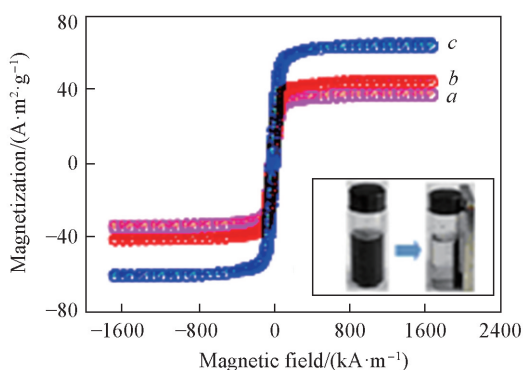
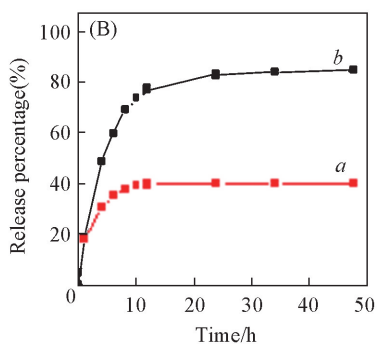


Fig.6 Magnetic hysteresis curves of $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}@ \text{PA}$ (a), $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}$ (b) and Fe_3O_4 (c)

Inset: magnetic separation experiment.



基础上, 通过分别加入纯 DOX 与含等量 DOX 的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8@PA-DOX$ 培养的 MG-63 人成骨瘤细胞进行对照实验, 结果如图 8(B) 所示. 加入纯 DOX 所培养的 MG-63 人成骨瘤细胞存活率要高于 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8@PA-DOX$ 所培养的细胞, 表明所合成的载体材料与抗癌药物 DOX 具有协同抑制癌细胞再生的作用. 因此, 所合成的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8@PA$ 纳米材料能够作为潜在的载体应用于生物医药领域, 同时与抗癌药物产生协同作用, 从而提高抗癌效果.

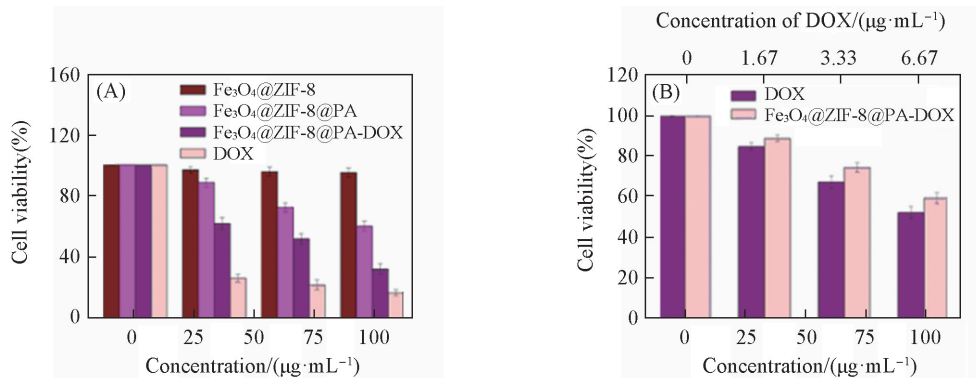


Fig.8 Cell viabilities of pure DOX, $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8@PA-DOX$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8@PA$ and $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8$ with the same concentration (A) and pure DOX and $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8@PA-DOX$ nanoparticles with different concentrations to MG-63 cells examined by MTT assay (B)

3 结 论

以溶剂热法合成的 Fe_3O_4 为基底, 制备了一种具有 pH 响应性能的核壳结构磁性纳米复合材料 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8@PA$. 载体呈球型结构, 其平均粒径为 382 nm, 多分散指数为 0.482, 比饱和磁化强度为 $35.46 \text{ A}\cdot\text{m}^2/\text{g}$, 具有较高的磁含量, 符合磁性纳米载体的生物医用要求. 此外, 载体的多孔结构和较大的表面积使载体的载药效率和载药量分别高达 96.4% 和 144.6 mg/g; 载体具有明显的 pH 响应性. 结果表明载体本身具有一定的杀伤力, 且其能与 DOX 产生一定的协同作用从而提高抗癌效果. 本文研究结果可为 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8@PA$ 作为药物载体在生物医学领域的应用提供参考.

参 考 文 献

- [1] Holohan C., Van Schaeybroeck S., Longley D. B., Johnston P. G., *Nature Reviews Cancer*, **2013**, 13(10), 714—726
- [2] Wang Y., Wang X. Y., Lü Y. Y., Xu W. B., Guo Y., Xu L., *Chem. J. Chinese Universities*, **2013**, 34(12), 2866—2870 (王岩, 王笑英, 吕言云, 许文彬, 郭轶, 徐力. 高等学校化学学报, **2013**, 34(12), 2866—2870)
- [3] Zhao Y. B., Qiu Z. M., Huang J. Y., *Chinese. J. Chem. Eng.*, **2008**, 16(3), 451—455 (赵原壁, 邱祖民, 黄佳英. 中国化学工程学报, **2008**, 16(3), 451—455)
- [4] Pan D. K., Zhang H., *Acta Chim. Sinica*, **2011**, 13(69), 1545—1552 (盘登科, 张慧. 化学学报, **2011**, 13(69), 1545—1552)
- [5] He M., Zhou J., Chen J., Zheng F., Wang D., Shi R., Guo Z., Wang H., Chen Q., *J. Mater. Chem. B*, **2015**, 3(46), 9033—9042
- [6] Qiao Z. W., Li L. B., Zhou J., *Chem. J. Chinese Universities*, **2014**, 35(12), 2638—2644 (乔智威, 李理波, 周健. 高等学校化学学报, **2014**, 35(12), 2638—2644)
- [7] You B., Xing W. T., Wu L. M., *Chem. J. Chinese Universities*, **2007**, 28(12), 2408—2412 (游波, 邢文涛, 武利民. 高等学校化学学报, **2007**, 28(12), 2408—2412)
- [8] Shears S. B., *Cellular Signalling*, **2001**, 13(3), 151—158
- [9] Sun K. H., Liu Z., Liu C. J., Yu T., Shang T., Huang C., Zhou M., Liu C., Ran F., Li Y., Shi Y., Pan L. J., *Scientific Reports*, **2016**, 6, 23931—23942
- [10] Graf E., Eaton J. W., *Cancer*, **1985**, 56(4), 717—718
- [11] Shamsuddin A. M., *Int. J. Food Sci. Tech.*, **2002**, 37(7), 769—782
- [12] Xu D. D., Xie R., Xu T. Y., Guo X. J., Liu Q., Liu J. Y., Lv W. Z., Jing X. Y., Zhang H. S., Wang J., *RSC Advances*, **2016**, 6(91), 88248—88254
- [13] Hu Y., Kazemian H., Rohani S., Huang Y. N., Song Y., *Chem. Commun.*, **2011**, 47(47), 12694—12696

- [14] Zhu Y., Liu Q., Caro J., Huang A., *Separation and Purification Technology*, **2015**, 146, 68—74
- [15] Ren H., Zhang L., An J. P., Wang T. T., Li L., Si X. Y., He L., Wu X. T., Wang C. G., Su Z. M., *Chem. Commun.*, **2014**, 50(8), 1000—1002
- [16] Sjoeborg B. M., Sanders-Loehr J., Loehr T. M., *Biochemistry*, **1987**, 26(14), 4242—4247
- [17] Xiang J., Shen X. Q., Zhu Y. W., *Inorg. Mater.*, **2008**, 5(23), 1006—1010(向军, 沈湘黔, 朱永伟. 无机材料学报, **2008**, 5(23), 1006—1010)
- [18] Hazarika P., Gogoi P., Hatibaruah S., Konwar D., *Green Chemistry Letters and Reviews*, **2011**, 4(4), 327—339
- [19] Kannan S., Ferreira J. M. F., *Chem. Mater.*, **2006**, 18(1), 198—203
- [20] Kang X. J., Dai Y. L., Ma P. A., Y D. M., Li C. X., Hou Z. Y., Cheng Z. Y., Lin J., *Chem. Eur. J.*, **2012**, 18(49), 15676—15682
- [21] Jiao H., Yang H. Q., Song Y. Z., Wu X. Y., Chen D. C., Wang M. Z., *Acta Chim. Sinica*, **2007**, 20(65), 2336—2342(焦华, 杨合情, 宋玉哲, 武小燕, 陈迪春, 王明珍. 化学学报, **2007**, 20(65), 2336—2342)
- [22] Chumee J., Grisdanurak N., Neramittagapong S., Wittayakun J., *Braz. J. Chem. Eng.*, **2009**, 26(2), 367—373
- [23] Zheng J., Cheng C., Fang W. J., Chen, C., Yan, R. W., Huai, H. X., Wang, C. C., *Cryst. Eng. Comm.*, **2014**, 16(19), 3960—3964
- [24] Zhang S., Zhou Y., Nie W., Song L., *Cellulose*, **2012**, 19(6), 2081—2091
- [25] Liu J., Huang Y. R., Kumar A., Tan A., Jin S. B., Mozhi A., Liang X. J., *Biotechnol. Adv.*, **2014**, 32, 693—710
- [26] Yang B. H., Zhao W. O., Li C. J., Li Y. P., Wang J. Y., *Acta Polym. Sin.*, **2014**, (5), 636—642(杨伯涵, 赵外鸥, 李采金, 李亚鹏, 王静媛. 高分子学报, **2014**, (5), 636—642)
- [27] Saisyo A., Nakamura H., Fang J., Tsukigawa K., Greish K., Furukawa H., Maeda H., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2016**, 138, 128—137

Preparation and Drug Release of Anti-cancer $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}@ \text{PA}$ System Loaded with Drug[†]

WANG Xiaodan^{1,2}, XU Dandan¹, LÜ Weizhong¹, LIU Jingyuan^{1*},
LIU Qi¹, JING Xiaoyan¹, WANG Jun¹

(1. College of Materials Science and Chemical Engineering, Harbin Engineering University, Harbin 150001, China;
2. College of Materials and Chemical Engineering, Heilongjiang Institute of Technology, Harbin 150050, China)

Abstract An anti-cancer and loading drug system was prepared. Fe_3O_4 nanoparticles prepared by hydrothermal method was chosen as substrate to design and fabricate pH responsive magnetic nanocomposites $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{ZIF-8}@ \text{PA}$ with core-shell structure. This nanomaterial exhibited high saturation of $35.46 \text{ A} \cdot \text{m}^2/\text{g}$ and maintained well magnetic property. Fe_3O_4 nanoparticles showed spherical structure and good dispersion. Compared with the substrate, the particle size of composite microsphere increased significantly, but still conform to the ideal carrier material size. In addition, the carriers with porous structures showed large surface area, high drug loading efficiency and capacity for doxorubicin(DOX) of up to 96.4% and 144.6 mg/g. The drug release of nanoparticles loaded with drug was studied in pH = 7.4 and 5.0. The total released percentage of two kinds of pH were 39.8% and 78.6%, respectively. The drug releasing experiment was also to perform to verify the constructed nanocarriers excellent pH-response. The introduction of phytic acid with inhibition to cancer cells made it possible that the carriers could kill tumor cells. The methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) test act on human osteosarcoma cell line(MG-63) was also carried out *in vitro* to demonstrate the combination effect of anticancer between the carriers and DOX.

Keywords pH-responsiveness; Combination therapy; Magnetic nanocomposite; Core-shell structure; Phytic acid; Drug release

(Ed.: D, Z)

[†] Supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 51402065).