

文章编号 1006-8147(2015)01-0029-06

论著

## 磁性介孔二氧化硅用于药物传输和光动力治疗

汪文媚<sup>1</sup>, 吴伯岳<sup>2</sup>, 要 旻<sup>2</sup>, 高卫真<sup>1,2</sup>

(1.天津医科大学基础医学院药理学教研室, 天津 300070; 2.天津医科大学医学检验学院, 天津 300203)

**摘要** 目的:制备温度和 pH 双重响应的核壳结构磁性荧光介孔二氧化硅纳米粒子用于抗肿瘤药物传输以及协同光动力治疗。方法:采用溶剂热法、反相胶束法制备实心硅包覆的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  核,以改良的溶胶凝胶法制备介孔硅中间层,再以种子沉淀聚合在介孔硅表面修饰温敏聚合物壳层,得到  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2(\text{F})@\text{mSiO}_2(\text{P})@\text{P}(\text{NIPAM-co-AA})$  纳米粒子。利用透射电子显微镜(TEM)对其形貌进行了表征。以盐酸阿霉素为模型药考察了该纳米粒子对药物的负载与释放行为,并采用 MTT 比色法对其进行了体外细胞活性评价。结果:TEM 表征结果显示,该纳米粒子平均粒径约为 300 nm。药物负载与释放结果表明,该纳米粒子不仅具有较高的载药量( $206.75 \pm 17.59$ )  $\mu\text{g}/\text{mg}$  和包封率( $68.91 \pm 5.86$ ) wt%,药物释放也呈现明显的温度和 pH 依赖性。MTT 结果表明,载药的纳米粒子在 680 nm LED 灯照射条件下与单用化学治疗和光动力治疗相比,对细胞的毒性明显增大 ( $P < 0.01$ )。结论: $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2(\text{F})@\text{mSiO}_2(\text{P})@\text{P}(\text{NIPAM-co-AA})$  纳米粒子可作为一个抗肿瘤药物载体,实现肿瘤化疗和光动力治疗的协同研究。

**关键词** 介孔二氧化硅;磁靶向性;刺激响应;药物传输;光动力治疗

中图分类号 R9

文献标志码 A

### Magnetic mesoporous silica nanoparticles for drug delivery and photodynamic therapy

WANG Wen-mei<sup>1</sup>, WU Bo-yue<sup>2</sup>, YAO Yang<sup>2</sup>, GAO Wei-zhen<sup>1,2</sup>

(1.Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. School of Medical Laboratory, Tianjin Medical University, Tianjin 300203, China)

**Abstract Objective:** To prepare temperature-pH responsive and core-shell-structured magnetic fluorescent mesoporous silica nanoparticles for antitumor drug delivery and photodynamic therapy. **Methods:** First, the core of nonporous silica coated  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  was prepared via solvothermal reaction and reverse micelle method, then mesoporous silica as the middle layer was further coated on the core by modified sol-gel process, and finally the  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2(\text{F})@\text{mSiO}_2(\text{P})@\text{P}(\text{NIPAM-co-AA})$  nanoparticles were prepared with the polymer shell modified on the middle layer through seed precipitation polymerization. Transmission electron microscopy (TEM) was carried out to characterize the morphology of the nanoparticles. Doxorubicin hydrochloride (DOX) was used as a model drug to investigate the drug loading and releasing behavior. And MTT assay was adopted to evaluate the biocompatibility and cytotoxicity of the nanoparticles. **Results:** The results of TEM showed that the average diameter of the nanoparticles was 300 nm. The drug loading and releasing results indicated that the nanoparticles exhibited an excellent drug loading content of ( $206.75 \pm 17.59$ )  $\mu\text{g}/\text{mg}$  and encapsulation efficiency of ( $68.91 \pm 5.86$ ) wt%, and controlled drug releasing could be obtained by changing the temperature or pH values. MTT assay showed that the cytotoxic effect of DOX-loaded nanoparticles irradiated with a 680 nm LED lamp was significantly higher than that achieved by chemotherapy and photodynamic therapy alone. **Conclusion:**  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2(\text{F})@\text{mSiO}_2(\text{P})@\text{P}(\text{NIPAM-co-AA})$  nanoparticles could be used as an antitumor drug carrier to achieve a synergistic effect by combining chemotherapy and photodynamic therapy.

**Key words** mesoporous silica nanoparticles; magnetic targeting; stimuli response; drug delivery; photodynamic therapy

自 1992 年美国 Mobil 公司首次合成 MCM-41 型高度有序的介孔二氧化硅材料以来<sup>[1]</sup>,介孔二氧化硅纳米粒子(mesoporous silica nanoparticles, MSNs)因其独特的孔道结构、有序可调的孔径大小、较高的比表面积和孔容、易于修饰的内外表面等特性<sup>[2]</sup>,已广泛应用于生物成像<sup>[3]</sup>、生物传感<sup>[4]</sup>、药物传输<sup>[5]</sup>、光动力治疗<sup>[6]</sup>等生物医学领域。近年来,基于 MSNs

的多功能刺激响应型纳米载药系统更是成为该领域的研究热点<sup>[7]</sup>。光动力治疗(photodynamic therapy, PDT)是一种新兴的癌症治疗技术,是利用光敏剂在适当波长的光激发下将能量传递给周围的氧分子产生单线态氧( $^1\text{O}_2$ )及其它活性氧自由基,造成肿瘤细胞或组织的氧化损伤,具有低毒、创伤性小等优点<sup>[8]</sup>,但其疗效却由于光敏剂的疏水性、易聚集、单线态氧( $^1\text{O}_2$ )产率低、靶向性差等因素而大大受到限制<sup>[9]</sup>。然而 MSNs 因其良好的结构特性,不仅可以作为一个高效的载体装载疏水性光敏剂,同时其孔道结构也有利于增强氧分子与单线态氧的渗透性,因

基金项目 国家自然科学基金青年基金资助项目(21205087)

作者简介 汪文媚(1989-),女,硕士在读,研究方向:纳米材料在药物传输方面的应用;通信作者:高卫真,E-mail:weizhengao33@163.com。

而受到广泛关注<sup>[10]</sup>。磁性四氧化三铁( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )纳米粒子拥有优越的磁学性能、良好的生物相容性等,在磁共振成像(MRI)、磁热疗、靶向药物传输等方面应用前景广泛<sup>[11]</sup>。本文为了实现药物的靶向输送、可控释放以及化疗和光动力治疗的协同研究,并对药物传输过程进行荧光示踪,以掺杂异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)的实心硅包覆 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 为核心,以掺杂光敏剂 ZnPc 的介孔硅为中间层,以交联的聚 N-异丙基丙烯酰胺-co-丙烯酸为壳层,合成了温度和 pH 双重响应的核壳结构磁性荧光介孔二氧化硅纳米材料  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2(\text{F})@\text{mSiO}_2(\text{P})@\text{P}(\text{NIPAM-co-AA})$ (以下简称 FSMP-NPs),并对其做了形貌表征,同时,以盐酸阿霉素(doxorubicin hydrochloride, DOX)为模型药物对其载药与可控释放能力、光动力学治疗效果、细胞毒性等进行了体外评价。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞株 人宫颈癌 Hela 细胞株由天津市肿瘤医院提供,本实验室传代保种。

1.1.2 实验试剂 乙酰丙酮铁、苯甲醇、FITC、3-氨基丙基三乙氧基硅烷 (APTES)、N-异丙基丙烯酰胺(NIPAM)、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(MBA)、过硫酸钾(KPS)、丙烯酸(AA,上海晶纯生化科技股份有限公司);油胺(西格玛奥德里奇上海贸易有限公司);聚氧乙烯醚(Brij58)、ZnPc、3-(异丁烯酰氧)丙基三甲氧基硅烷(MPS)、1,3-二苯基异苯并呋喃(DPBF,北京百灵威科技有限公司);油酸、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、二甲基亚砷(DMSO)、正硅酸乙酯(TEOS,天津市光复精细化工研究所);浓氨水(25%,天津市福晨化学试剂厂);3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT,碧云天生物技术有限公司);DOX(北京华泰联博科技有限公司)。

1.1.3 实验仪器 HT7700 型透射电子显微镜(日本日立高新技术公司);TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);F-380 荧光分光光度计(天津港东科技股份发展有限公司);XL001WP01NRC 680 nm LED 灯(深圳市希兰光电有限公司);Universal 320R 高速冷冻离心机(德国 Hettich 公司);IS-RDD3 台式恒温振荡器(美国精骐有限公司);Synergy 2 化学发光检测仪(美国 BioTek 公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 FSMP-NPs 的合成

1.2.1.1  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米粒子的合成:采用溶剂热法制

备  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米粒子。将 0.706 g 乙酰丙酮铁、1.9 mL 油酸、1.9 mL 油胺分别加入 20 mL 苯甲醇中,磁力搅拌得到橙黄色均一溶液,转入聚四氟高压反应釜中,密封加热至 200 °C 反应 10 h。将反应釜冷却至室温,得到黑色磁性纳米粒子,磁分离,沉淀用无水乙醇洗 3 次,每次 20 mL,最后分散于 10 mL 环己烷中待用,产量约 150 mg。

1.2.1.2 实心硅包覆  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米粒子  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2(\text{F})$  的合成:采用反相胶束法。首先 10 mg FITC 和 75  $\mu\text{L}$  APTES 在 5 mL 无水乙醇中避光反应 24 h,反应产物于 4 °C 保存。然后将 2.8 g Brij58、0.15 mL 蒸馏水、1.5 mL  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  环己烷溶液、0.56 mL 浓氨水分别加入 11.25 mL 环己烷中,搅拌 30 min 后,再分别加入 1.0 mL FITC-APTES 溶液和 1.5 mL TEOS,50 °C 避光反应 8 h。反应结束后,将合成产物磁分离,用无水乙醇洗 3 次,每次 30 mL。最后加至 20 mL 无水乙醇中避光保存,产量约 0.5 g。

1.2.1.3 介孔硅掺杂 ZnPc 包覆实心硅纳米粒子  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2(\text{F})@\text{SiO}_2(\text{P})$  的合成:采用改良的溶胶凝胶法。反应前,先将 10 mg ZnPc 溶于 100 mL DMSO 和乙醇的混合溶液中(体积比 1:1),放置 24 h 后,轻轻倒出上清液得 ZnPc 饱和溶液。在 250 mL 三颈瓶中,分别加入含 0.4 g  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2(\text{F})$  纳米粒子的乙醇溶液、0.34 g CTAB、1.0 mL 浓氨水和 108 mL 蒸馏水,补加无水乙醇使反应体系为 160 mL;超声 10 min 后,再分别加入 60 mL ZnPc 饱和溶液和 0.6 mL TEOS,室温搅拌 8 h。反应结束后,将合成产物磁分离,无水乙醇洗 3 次,每次 30 mL。最后加至 20 mL 无水乙醇中保存,产量约 0.4 g。

1.2.1.4 MPS 修饰的  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2(\text{F})@\text{mSiO}_2(\text{P})$  纳米粒子的合成:将含 0.3 g  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2(\text{F})@\text{SiO}_2(\text{P})$  纳米粒子的乙醇溶液(未除 CTAB)、300  $\mu\text{L}$  MPS 以及相应体积的无水乙醇分别加入 250 mL 三颈瓶中,使反应总体积维持在 150 mL,80 °C 搅拌 3 h。反应结束后,磁分离,沉淀用 20 mL 无水乙醇洗 2 次,并将产物转入截留分子量为 3 500 的透析袋中,利用索氏提取原理,用乙醇洗涤 CTAB 24 h。最后将洗涤后产物磁分离,用 10 mL 无水乙醇洗 1 次、50 mL 蒸馏水洗 5 次,得到 MPS 修饰的  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2(\text{F})@\text{mSiO}_2(\text{P})$  纳米粒子,并转移至 8 mL 蒸馏水中保存,产量约 120 mg。

1.2.1.5 FSMP-NPs 的合成:采用种子沉淀聚合。将含 0.1 g MPS 修饰的  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2(\text{F})@\text{mSiO}_2(\text{P})$  纳米粒子超声分散于 20 mL 蒸馏水中后,转移至 100 mL 三颈瓶中,再将 0.45 g NIPAM、0.05 g AA 和 0.025 g MBA 溶于 30 mL 蒸馏水中后加入其中。机

械搅拌下通氩气,待温度上升至 75 ℃时,加入 0.015 g KPS,继续反应 5 h。反应结束后,磁分离,用 100 mL 蒸馏水洗 5 次以除去未反应的单体和聚合物,得到多功能磁性介孔二氧化硅纳米粒子  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2(\text{F})@\text{mSiO}_2(\text{P})@\text{P}(\text{NIPAM-co-AA})$ ,并将其分散于 20 mL 蒸馏水中,保存待用,产量约 60 mg。

**1.2.2 FSMP-NPs 的表征** FSMP-NPs 的形貌采用透射电子显微镜(TEM)进行观察。将 FSMP-NPs 分散于蒸馏水中,配成 10  $\mu\text{g/mL}$  溶液,超声分散均匀。然后用滴管将溶液滴 1 滴在覆有碳膜的铜网上,室温干燥后,置于透射电子显微镜下观察。用荧光分光光度计测量 FSMP-NPs 的荧光强度。将 FSMP-NPs 分散于水溶液中,并置于磁铁附近,观察其水分散性及磁响应性。

**1.2.3 单线态氧( $^1\text{O}_2$ )的检测** 将 750  $\mu\text{L}$  DPBF(300  $\mu\text{g/mL}$  DMSO 溶液)加到 29.25 mL FSMP-NPs 溶液(300  $\mu\text{g/mL}$  DMSO 溶液)中,DPBF 终浓度为 7.5  $\mu\text{g/mL}$ 。将混合液分成 9 管,每管 3 mL,分别使用 680 nm LED 灯照射 0、0.5、1、2、4、6、8、10 min 以及避光保存 10 min。另以 7.5  $\mu\text{g/mL}$  DPBF 的 DMSO 溶液以同样方式处理作为对照。采用 UV-vis 光谱扫描,记录各组在 417 nm 处的吸光度值。

**1.2.4 药物负载实验** 将 10 mg FSMP-NPs 加到 10 mL 含 0.3 mg/mL DOX 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)中,超声混合均匀后,放于恒温振荡器中避光振荡 24 h(25 ℃,200 r/min)。将载药后产品离心分离(5 000 r/min,5 min),收集上清液,沉淀用上述缓冲液洗 2 次,每次 10 mL 以洗去表面吸附的 DOX,最后将洗液与上清液混合,采用 UV-vis 光谱扫描,测定其在 480 nm 处的吸光度。利用事先绘制好的 DOX 标准曲线计算游离药物含量,再计算药物负载量和包封率。沉淀放于 4 ℃冰箱保存,后续做释放实验。

**1.2.5 药物释放实验** 取 4 管载药后的 DOX-FSMP-NPs 沉淀约 12 mg,分别加入 5 mL 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)和 0.01 mol/L 乙酸盐缓冲液(pH 5.5),放于 37 ℃或 25 ℃恒温振荡器中振荡(200 r/min)。每管分别振荡 2、4、6、8、23、26、32 和 48 h 后,将 DOX-FSMP-NPs 溶液离心分离(5 000 r/min,5 min),小心吸取上清液 3 mL(并补加等体积新的缓冲液继续振荡)。采用 UV-vis 光谱扫描,并记录各上清液在 480 nm 处的吸光度,利用事先绘制好的 DOX 标准曲线计算药物累积释放率。

**1.2.6 细胞毒性实验** 采用 MTT 比色法检测细胞活性。Hela 细胞培养于含 10%胎牛血清、1%双抗(100 U/mL 青霉素,100  $\mu\text{g/mL}$  链霉素)的 RPMI 1640

培养基中,并放于 37 ℃、含 5%  $\text{CO}_2$  的饱和湿度培养箱中培养,每隔 2 d 传代 1 次,取对数生长期细胞进行实验。

为了评价 FSMP-NPs 的细胞生物相容性,用 0.25%胰蛋白酶消化细胞后制成单细胞悬液,按每孔约  $5 \times 10^3$  个细胞密度接种于 96 孔板中,每孔终体积为 200  $\mu\text{L}$ ,并设置只含有培养基的孔作为调零孔。在培养箱中培养 24 h 后,细胞换液,向实验孔中分别加入不同浓度的 FSMP-NPs 溶液 10  $\mu\text{L}$ ,使其终浓度分别为 40、50、60 和 75  $\mu\text{g/mL}$ ,每个浓度设置 3 个平行孔,以只加入 10  $\mu\text{L}$  0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)的孔作为对照孔。继续培养 24 h 后,每孔加入 20  $\mu\text{L}$  MTT(5 mg/mL)溶液,4 h 后小心吸弃培养液,每孔加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO,置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解。用化学发光检测仪测定每孔在 570 nm 波长处的吸光度,按以下公式计算细胞存活率。

$$\text{CV}(\%) = (A - A_0) / (A_1 - A_0) \times 100\%$$

CV 为细胞存活率,A 为实验孔 OD 值, $A_0$  为调零孔 OD 值, $A_1$  为对照孔 OD 值。

对于化疗、光动力治疗以及化疗和光动力治疗的协同研究,分别向细胞中加入终浓度为 10  $\mu\text{g/mL}$  的纯 DOX,60  $\mu\text{g/mL}$  的 DOX-FSMP-NPs(DOX 浓度为 10  $\mu\text{g/mL}$ ),50  $\mu\text{g/mL}$  的 FSMP-NPs(以下简称 FSMP-NPs+Light)以及 60  $\mu\text{g/mL}$  的 DOX-FSMP-NPs(DOX 浓度为 10  $\mu\text{g/mL}$ )(以下简称 DOX-FSMP-NPs+Light),并使用 680 nm LED 灯照射 10 min,随后采用上述 MTT 比色法进行细胞毒性测试。

**1.3 统计学处理** 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS17.0 软件对数据进行处理,多组间均数比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),并进行方差齐性检验,方差齐时采用 LSD 法;方差不齐时采用 Dunnett's T3 法,以  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 FSMP-NPs 的表征

**2.1.1 FSMP-NPs 的微观形态** 通过透射电子显微镜对 FSMP-NPs 的形貌进行观察。由图 1A 可看到 FSMP-NPs 呈现出良好的球形形状,具有优异的单分散性,平均粒径约为 300 nm。由图 1B 可清晰地看到 FSMP-NPs 有着规则的孔道结构,并且可观察到其中包裹了黑色纳米粒子。

**2.1.2 FSMP-NPs 的磁性** 由图 2 可知,FSMP-NPs 在无磁场存在条件下在水中分散均匀,而在有磁场存在下,FSMP-NPs 立即聚集到磁场附近,水溶液呈无色透明状态,并且无 FSMP-NPs 游离出来。



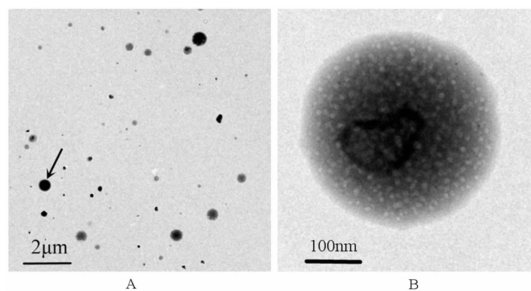


图 1 FSMP-NPs 的透射电镜表征图(A.×15 000, B.×120 000)

Fig 1 TEM images of FSMP-NPs

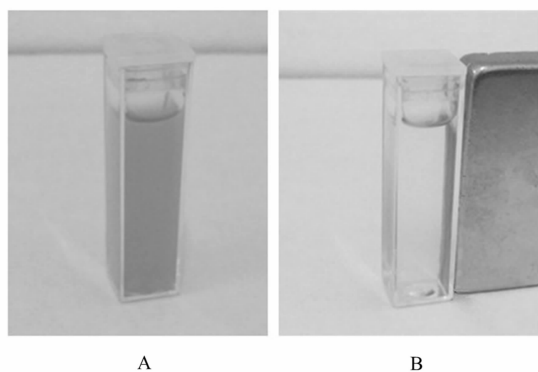


图 2 FSMP-NPs 在无(A)和有(B)磁场存在条件下的水分散性

Fig 2 The water dispersibility of FSMP-NPs in absence of (A) and in presence of (B) magnetic field

2.1.3 FSMP-NPs 的荧光光谱分析 由图 3 可知, 当用 470 nm 激发时, FSMP-NPs 仅在 520 nm 处出现了一条发射峰, 与 FITC 的发射峰相对应; 当改变激发波长到 604 nm 时, 仅在 675 nm 处出现了一条发射峰, 与 ZnPc 发射峰相对应。

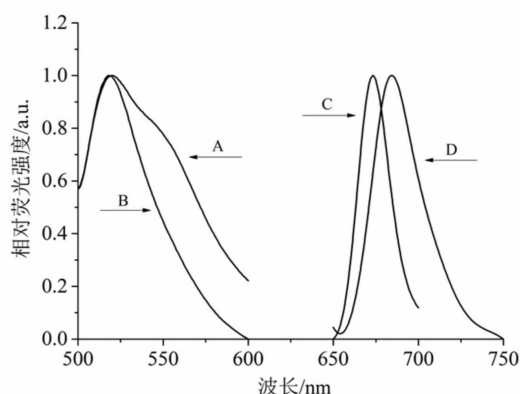


图 3 FITC (A), FSMP-NPs (B)(470 nm 激发) 和 FSMP-NPs(C), ZnPc(D)(604 nm 激发)的相对荧光强度

Fig 3 Normalized fluorescence intensity of FITC (A), FSMP-NPs (B) excited at 470 nm and FSMP-NPs (C), ZnPc (D) excited at 604 nm

2.2 单线态氧 ( $^1\text{O}_2$ ) 的检测结果分析 DPBF 可与  $^1\text{O}_2$  不可逆结合产生内过氧化物, 使其在 417 nm 处的吸光度降低。图 4 是用 680 nm LED 灯在不同时间照射下 FSMP-NPs+DPBF 以及 DPBF 在 417 nm

处的吸光度变化。由图 4A 可知, 在 FSMP-NPs+DPBF 条件下, 随着照射时间的延长, DPBF 在 417 nm 处的吸光度持续下降; 然而在只有 DPBF 的条件下, 随着照射时间的延长, 并没有看到明显的吸光度降低(图 4B)。

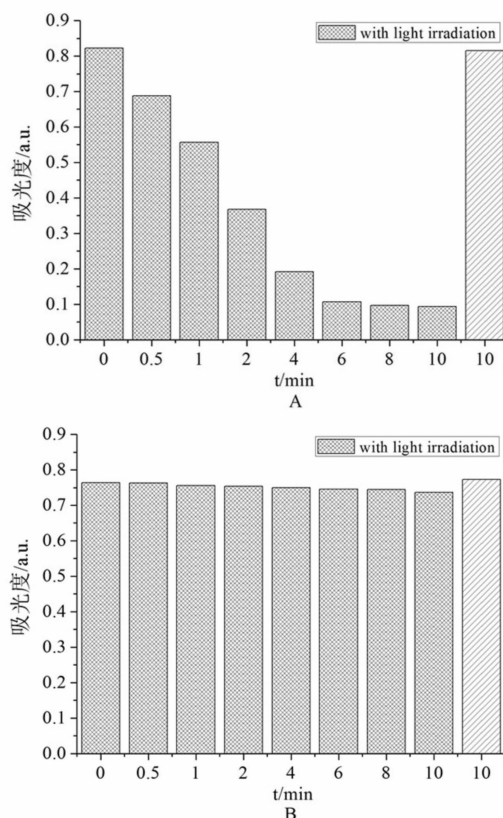


图 4 用 680 nm LED 灯在不同时间照射下 FSMP-NPs+DPBF(A) 和 DPBF(B)在 417 nm 处的吸光度变化

Fig 4 Absorbance of DPBF at 417 nm in presence of FSMP-NPs (A) and in absence of FSMP-NPs (B) at different times after irradiation with a 680 nm LED lamp

2.3 药物负载结果分析 DOX 在 480 nm 处有很强的紫外吸收峰, 将 DOX 溶液稀释成特定浓度, 测定其在 480 nm 处的吸光度, 得到 DOX 的浓度-吸光度标准曲线  $y=0.016 0x+0.0034$ ,  $R^2=0.999$ 。由标准曲线计算得 FSMP-NPs 的平均载药量和包封率分别为  $(206.75 \pm 17.59) \mu\text{g}/\text{mg}$ 、 $(68.91 \pm 5.86) \text{wt}\%$ 。

2.4 药物释放结果分析 通过 DOX 释放曲线  $y=0.024 1x+0.020 1$ ,  $R^2=0.999$  (pH 5.5) 和  $y=0.014 8x+0.014 3$ ,  $R^2=0.996$  (pH 7.4) 计算药物累积释放率。所得结果见图 5, 在温度为 37 °C 时, pH 5.5 条件下 DOX 在 48 h 的累积释放率高达 40 wt%, 而在 pH 7.4 条件下累积释放率却不足 10 wt%; 在温度为 25 °C 时, pH 5.5 条件下 DOX 在 48 h 的累积释放率约为 30 wt%, 而在 pH 7.4 条件下的累积释放率只有 5 wt%。

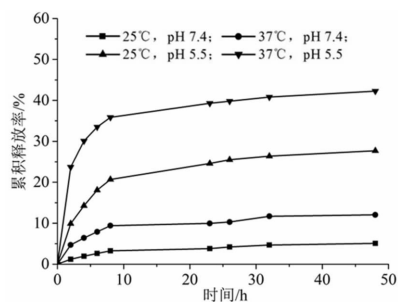
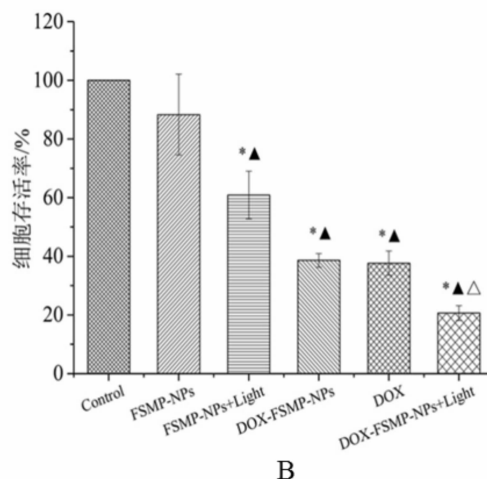
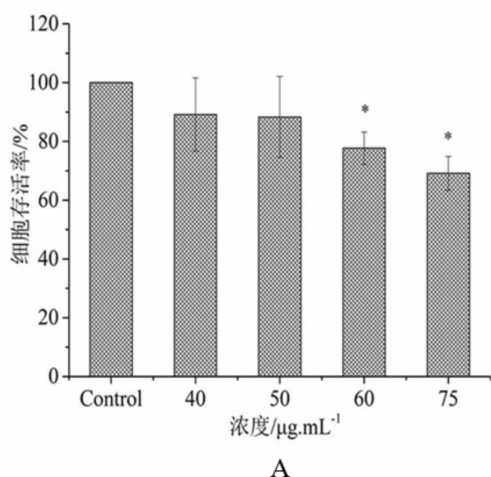


图 5 不同温度和 pH 条件下 DOX 的累积释放率

Fig 5 Cumulative DOX release from DOX-loaded FSMP-NPs at different temperatures and pH conditions



与 Control 组比较 \* $P<0.05$ ; 与 FSMP-NPs 组比较  $\Delta P<0.01$ ; 与 FSMP-NPs+Light 组, DOX-FSMP-NPs 组比较  $\wedge P<0.01$

图 6 不同浓度 FSMP-NPs 对 HeLa 细胞存活率的影响 (A) 以及在含 FSMP-NPs 浓度为 50  $\mu\text{g/mL}$ , DOX 浓度为 10  $\mu\text{g/mL}$  时不同条件下对 HeLa 细胞存活率的影响 (B)Fig 6 Viability of HeLa cells (A) treated with FSMP-NPs at different concentrations and (B) treated with FSMP-NPs, FSMP-NPs+Light, free DOX, DOX-FSMP-NPs and DOX-FSMP-NPs+Light (the concentration of FSMP-NPs is 50  $\mu\text{g/mL}$  and DOX is 10  $\mu\text{g/mL}$ )

### 3 讨论

基于介孔二氧化硅的有机无机核壳结构纳米粒子作为药物传输载体已经引起了极大的关注。2001 年首次报道 MSNs 作为纳米载体用于输送药物分子<sup>[12]</sup>, 但当时仍缺乏对药物分子实现控释的概念。近年来, 研究者把目光主要集中在以 MSNs 为主材料的多功能刺激响应纳米载体系统。由于恶性肿瘤组织的温度比正常组织稍高, pH 值比正常组织低<sup>[13]</sup>, 因此可以利用此特点来实现抗肿瘤药物的控释。聚(N-异丙基丙烯酰胺)(PNIPAM)是一种常用的温敏性聚合物, 当加热到其最低临界相转变温度(LCST)32 $^{\circ}\text{C}$ 以上时, 会发生从亲水的溶胀状态到疏水的蜷缩状态的转变, 与亲水性单体共聚可以提高其 LCST<sup>[14]</sup>。聚丙烯酸(PAA)是一种重要的对 pH 敏感的亲水性聚合物, 因具有良好的生物相容性, 已经广泛用于 pH 响应性药物载体的制备<sup>[15]</sup>。

本文为了实现药物的靶向输送和可控释放, 合成了温度和 pH 双重响应的磁性荧光介孔二氧化硅

2.5 细胞毒性实验结果分析 由图 6A 可知, 当 FSMP-NPs 浓度为 50  $\mu\text{g/mL}$  时, 平均细胞存活率约为 88%, 对细胞基本没有毒性( $P=0.144$ ); 当浓度为 60  $\mu\text{g/mL}$  时, 平均细胞存活率约为 77%, 开始表现出细胞毒性( $P=0.013$ )。由图 6B 可知, DOX-FSMP-NPs 组即化疗组和 FSMP-NPs+Light 组即光动力治疗组的细胞存活率分别为  $(38.63\pm 2.32)\%$ 、 $(60.87\pm 8.13)\%$ , 且两者协同治疗组 DOX-FSMP-NPs+Light 组的细胞存活率降低到了  $(20.63\pm 2.55)\%$ , 差异具有统计学意义( $P<0.01$ )。

纳米粒子, 透射电镜结果表明, 磁性纳米粒子  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  被成功地包覆进二氧化硅壳层中, 形成具有核壳结构的磁性介孔二氧化硅纳米粒子(图 1), 且磁性实验表明该纳米粒子具有优异的磁响应性(图 2)。图 3 所示荧光测定结果说明, 在 407 nm 和 604 nm 波长激发下, FSMP-NPs 显示了不同的荧光发射光谱, 并与 FITC 和 ZnPc 发射谱相对应, 说明 FITC 和 ZnPc 被成功地包覆在 FSMP-NPs 内。我们使用 DPBF 来考察所合成的药物载体的  $^1\text{O}_2$  产生情况。从图 4A 可以看出, 随着 680 nm LED 灯光的照射, DPBF 在 417 nm 处的特征吸收不断变小, 而将 DPBF 与载体在非光照条件下共混 10 min 其紫外吸收不会产生明显变化; 另一方面, 使用上述光源单独照射 DPBF 10 min 其紫外吸收也不会产生明显变化。以上结果说明, DPBF 紫外吸收下降, 是由于 680 nm 光源照射载体, 激发其中所含 ZnPc 产生的  $^1\text{O}_2$  所致。图 5 给出的药物释放结果表明, 我们所合成的药物载体, 其药物释放过程具有明显的温度和 pH 依赖性, 达

到了刺激响应性可控释放的目的。MTT 结果表明,当细胞培养环境中 FSMP-NPs 浓度为 50  $\mu\text{g/mL}$  时并不表现出明显细胞毒性,可以此浓度进行后续实验(图 6A)。为了更有效地杀伤肿瘤细胞,我们将化疗和光动力治疗结合,并通过 MTT 法对治疗效果进行体外评价。由图 6B 可知,实验采用 60  $\mu\text{g/mL}$  DOX-FSMP-NPs+Light(DOX 浓度为 10  $\mu\text{g/mL}$ )为实验组,通过与 DOX-FSMP-NPs 组、FSMP-NPs+Light 组以及纯 DOX 组的细胞存活率对比可以发现,采用化疗和光动力联合治疗,其肿瘤细胞生存率明显低于单独进行光动力治疗或化疗,具有更好的肿瘤治疗效果。

综上,本实验合成了一种基于磁性介孔二氧化硅的温度/pH 双重响应性的药物载体,通过在其中掺杂光敏剂 ZnPc,有望实现针对肿瘤靶向性药物和光动力的协同治疗。

#### 参考文献:

- [1] Kresge C T, Leonowicz M E, Roth W J, et al. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism[J]. *Nature*, 1992, 359(6397): 710
- [2] Slowing I I, Vivero-Escoto J L, Wu C W, et al. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60(11): 1278
- [3] Chen Y Y, Ma P A, Yang D M, et al. Multifunctional core-shell structured nanocarriers for synchronous tumor diagnosis and treatment in vivo[J]. *Chem Asian J*, 2014, 9(2): 506
- [4] Liu J L, Li C Y, Li F Y, et al. Fluorescence turn-on chemodosimeter-functionalized mesoporous silica nanoparticles and their application in cell imaging[J]. *J Mater Chem*, 2011, 21(20): 7175
- [5] Kang X J, Cheng Z Y, Yang D M, et al. Design and synthesis of multifunctional drug carriers based on luminescent rattle-type mesoporous silica microspheres with a thermosensitive hydrogel as a controlled switch[J]. *Adv Funct Mater*, 2012, 22(7): 1470
- [6] Teng I T, Chang Y J, Wang L S, et al. Phospholipid-functionalized mesoporous silica nanocarriers for selective photodynamic therapy of cancer[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(30): 7462
- [7] Wu S H, Hung Y, Mou C Y, et al. Mesoporous silica nanoparticles as nanocarriers[J]. *Chem Commun*, 2011, 47(36): 9972
- [8] Celli J P, Spring B Q, Rizvi I, et al. Imaging and photodynamic therapy: mechanisms, monitoring, and optimization [J]. *Chem Rev*, 2010, 110(5): 2795
- [9] Verma S, Watt G M, Mai Z M, et al. Strategies for enhanced photodynamic therapy effects[J]. *Photochem Photobiol*, 2007, 83(5): 996
- [10] Tu J, Wang T X, Shi W, et al. Multifunctional ZnPc-loaded mesoporous silica nanoparticles for enhancement of photodynamic therapy efficacy by endolysosomal escape[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(31): 7903
- [11] Hilger I, Kaiser W A. Iron oxide-based nanostructures for MRI and magnetic hyperthermia[J]. *Nanomedicine*, 2012, 7(9): 1443
- [12] Vallet-Regi M, Ramila A, del Real R P, et al. A new property of MCM-41: Drug delivery system[J]. *Chem Mater*, 2001, 13(2): 308
- [13] Gerweck L E, Seetharaman K. Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: potential exploitation for the treatment of cancer[J]. *Cancer Res*, 1996, 56(6): 1194
- [14] 刘聪颖, 胡建华, 杨东, 等. 多重响应性介孔二氧化硅纳米微球的制备及载药研究[J]. *化学学报*, 2009, 67(8): 843
- [15] Wu H X, Tang L H, An L, et al. pH-responsive magnetic mesoporous silica nanospheres for magnetic resonance imaging and drug delivery[J]. *React Funct Polym*, 2012, 72(5): 329

(2014-09-12 收稿)

.....

(上接第 24 页)

- Acids Res, 1981,9(22):5931
- [8] Cooke H. Repeated sequence s specific to human males[J]. *Nature*, 1976,262(5565):182
- [9] White P S, Tatum O L, Deaven L L, et al. New, male-specific microsatellite markers from the human Y chromosome[J]. *Genomics*, 1999, 57(3):433
- [10] Xu A Q, Xia M, Liu J T. Validation of quantitative fluorescent-PCR for rapid prenatal diagnosis of common aneuploidies in the Chinese population[J]. *Genet Mol Res*, 2013,12(4):6379
- [11] Roewer L, Krawczak M, Willuweit S, et al. Online reference database of European Y-chromosomal short tandem repeat (STR) haplotypes [J]. *Forensic Sci Int*, 2001,118(2/3):106
- [12] Armstrong R N, Colyer H A, Mills K I. Screening for miRNA expression changes using quantitative PCR (Q-PCR)[J]. *Methods Mol Biol*, 2012,863(3):293
- [13] Kayser M, Kittler R, Erler A, et al. A comprehensive survey of human Y-chromosomal microsatellites[J]. *Am J Hum Genet*, 2004,74(6):1183
- [14] 葛建业, 严江伟, 谢群, 等. 中国 Y-STR 数据库建设相关问题探讨[J]. *法医学杂志*, 2013,29(3):212
- [15] 张玉红, 贾东涛, 韩海军, 等. 南通汉族群体 16 个 Y-STR 基因座遗传多态性[J]. *中国法医学杂志*, 2008,23(3):197
- [16] 宋兴勃, 范红, 应斌武, 等. 成都地区汉族人群 17 个 Y 短串联重复序列基因座遗传多态性分析[J]. *南方医科大学学报*, 2009,29(10):1973
- [17] Brown L, Abigania M, Warburton D. Validation of QF-PCR for prenatal aneuploidy screening in the United States[J]. *Prenat Diagn*, 2006,26(11):1068

(2014-07-09 收稿)