

载多柔比星双介孔二氧化硅纳米球的表征及体外抗癌研究

聂晓娅^{1,2}, 张小娟¹, 张艳¹, 葛少兵³, 胡清伟^{1,2*} (1. 重庆医药高等专科学校, 重庆 401331; 2. 重庆市药物制剂工程技术研究中心, 重庆 401331; 3. 西北工业大学, 西安 710072)

摘要:目的 制备载多柔比星(doxorubicin, DOX)的双介孔二氧化硅纳米球(bimodal mesoporous silica nanospheres, BMSNs), 并评估其体外吸附/脱附特性和对肿瘤细胞增殖的抑制作用。方法 通过溶胶-凝胶法和溶剂热处理途径合成 BMSNs; 采用扫描电镜、比表面积及孔隙度分析仪、傅里叶变换红外光谱仪、紫外-可见光谱仪等方法对 BMSNs 进行分析和表征; 采用间歇式吸附实验考察 BMSNs 对 DOX 的吸附/脱附特性; 采用 CCK8 法检测载 DOX 双介孔二氧化硅纳米球 BMSNs-DOX 对人乳腺癌细胞 MCF-7 和人肺癌细胞 A549 增殖抑制作用。结果 BMSNs 对 DOX 吸附/脱附能力明显优于典型均匀介孔二氧化硅 MCM-41。在 pH=7.0 时, BMSNs 对 DOX 的吸附量高达 $91.7 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ (即载药量 5.32%), 是 MCM-41 吸附量的 1.6 倍。在 pH=5.0 缓冲溶液中, BMSNs-DOX 对 DOX 分子的脱附(释放)效率可达约 96%, 脱附时间仅需约 30 min。与 MCM-41-DOX 和 DOX 相比, BMSNs-DOX 对人乳腺癌细胞 MCF-7 和人肺癌细胞 A549 增殖抑制作用更强, 在 $4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 质量浓度时, 癌细胞存活率仅为 23.67% 和 15.79%。结论 相比于 MCM-41, BMSNs 能更快、更多地对癌症细胞释放抗癌药物 DOX, BMSNs-DOX 对 MCF-7 细胞和 A549 细胞有较强的杀伤作用, 是一种具有潜在应用价值的新型给药系统。

关键词: 双介孔二氧化硅纳米球; 多柔比星; 吸附; 脱附; 抗癌

doi:10.11669/cpj.2024.14.009 中图分类号:R944 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)14-1331-08

Characterization and *in Vitro* Anticancer Ability of Doxorubicin Loaded Bimodal Mesoporous Silica Nanospheres

NIE Xiaoya^{1,2}, ZHANG Xiaojuan¹, ZHANG Yan¹, GE Shaobing³, HU Qingwei^{1,2*} (1. Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 401331, China; 2. Chongqing Engineering Research Center of Pharmaceutical Sciences, Chongqing 401331, China; 3. Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare bimodal mesoporous silica nanospheres loaded with doxorubicin, and evaluate their adsorption/desorption properties and proliferation inhibition effects on cancer cells. **METHODS** bimodal mesoporous silica nanospheres (BMSNs) were prepared using sol-gel method and thermal treatment. The nanospheres were analyzed and characterized using scanning electron microscopy, specific surface area and porosity analyzer, Fourier transform infrared spectroscopy, and UV-VIS spectrometer. The adsorption/desorption characteristics of DOX by BMSNs were investigated by adsorption experiment. The proliferation inhibition effects of BMSNs-DOX on MCF-7 cells and A549 cells were detected using CCK8 method. **RESULTS** Compared with mesoporous MCM-41, which has typical uniform mesopores, BMSNs could provide more favorable matter diffusion and adsorption capacity towards DOX due to their more expansive pore structure. At pH = 7.0, BMSNs exhibited a high adsorption capacity for DOX of $91.7 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ (equivalent to a drug loading capacity of 5.32%), which was 1.6 times higher than that of MCM-41. In pH = 5.0 buffer solution, BMSNs-DOX desorbed (released) DOX molecules with an efficiency of about 96%, in just 30 minutes. BMSNs-DOX exhibited a stronger inhibitory effect than MCM-41-DOX and DOX. At a concentration of $4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, the survival rate of MCF-7 cells and A549 cells was only 23.67% and 15.79% respectively. **CONCLUSION** Compared with MCM-41, BMSNs is expected to release DOX to cancer cells more efficiently. BMSNs-DOX exhibits a significant inhibitory effect on MCF-7 cells and A549 cells, suggesting its potential as a drug carrier to enhance the cytotoxicity of chemotherapy drugs on cancer cells.

KEY WORDS: bimodal mesoporous silica nanospheres; doxorubicin; adsorption; desorption; anticancer

随着空气、气候、饮食和生活方式等非遗传性因素的变化, 人体内正常细胞发生基因突变、畸变甚至癌变的风险持续增高^[1-4]。世界卫生组织国际癌症研究机构(IARC)发布 2020 年全球新发癌症病例

基金项目: 重庆市自然科学基金面上项目资助(cstc2020jcyj-msxmX0627); 重庆市教委科学技术研究青年项目资助(KJQN201902803); 重庆医药高等专科学校科研教研项目资助(CQYGZJG2003)

作者简介: 聂晓娅, 女, 本科, 实验师 研究方向: 新型药物传递系统 * **通讯作者:** 胡清伟, 男, 本科, 讲师 研究方向: 肿瘤药理学
Tel: (023)691969199

1 929万例,癌症死亡病例 996 万例,给人类的生命健康和经济发展带来了严重的威胁^[5-6]。目前用于癌症治疗的方法主要有手术疗法、放射疗法、免疫疗法和化学疗法等^[7-8]。其中,化学疗法以某些药物能够干扰或杀死分裂中的癌细胞为理论基础,通过口服、静注等方式进行给药,并随着人体内部循环将药物扩散至各个器官,对处于全身性转移的癌症具有较好的疗效,已得到临床验证和应用^[9-10]。但目前主流的化疗药物如多柔比星(doxorubicin, DOX)、紫杉醇、顺铂等,均被报道存在自身毒性、细胞摄取率低、副作用大等缺陷,大大限制了其临床应用^[11-14]。因此采用负载量高、细胞摄取强、靶向特性好的药物载体和运输体系成为了改善化学治疗效果的有效途径之一^[15-16]。

常见的药物载体材料有脂质、聚乙二醇和聚乳酸-羟基乙酸共聚物等。目前临床使用的有 DOX 脂质体,虽然其与 DOX 疗效相当,且毒副作用减少,但其粒径较大,稳定性相对较差,易被网状内皮系统识别和摄取,仍需进一步改进^[17]。有研究表明非晶体或非粉尘状的介孔二氧化硅纳米颗粒具有良好的化学稳定性与生物相容性^[18];且其发达的孔道结构、大的孔容量和超高的比表面积,为大量药物分子的负载与运输提供了广阔空间^[19-21];表面大量活跃的硅羟基(Si-OH)为多种形式的修饰与功能化奠定了坚实平台,这些均使得介孔二氧化硅在载药递送体系中展现出潜在的应用前景,被广泛用于抗癌药物负载、运输和释放等研究^[18-24]。Roik 等^[25]通过溶胶-凝胶模板法合成的介孔二氧化硅 MCM-41,其可通过静电和氢键作用对 DOX 产生显著的吸附能力。Gai 等^[26]采用自组装途径合成的聚磁性和介孔于一体的 Fe₃O₄/二氧化硅微球,可将 DOX 运送到人子宫颈癌细胞(HeLa)的细胞核,从而杀死癌细胞;对 L929 纤维细胞也具有高效的毒杀作用。基于上述研究背景,本实验以合成二维六方介孔氧化 MCM-41 为基础,通过溶胶-凝胶和溶剂热处理途径合成了具有孔径尺寸为 2.6、4.1 nm 的双介孔二氧化硅纳米球(BMSNs),成功制备了载 DOX 的 BMSNs,并对其体外吸附/脱附特性和对肿瘤细胞增殖的抑制作用进行了考察。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

AUX220 分析天平(日本 Shimadzu 公司);GL-3250B 磁力搅拌器(其林贝尔仪器制造有限公司);Vortex-2 旋涡混合器(上海沪析实业有限公司);

VEGA3-LMH 扫描电镜(捷克 TESCAN 有限公司);Tensor 27 傅里叶变换红外光谱仪(德国 BRUKER 公司);BlueStar 紫外-可见光谱仪(北京莱伯泰科仪器股份有限公司);TriStar II 3020 全自动比表面积及孔隙度分析仪(美国 Micromeritics 仪器公司)。

1.2 试剂

盐酸 DOX(大连美仑生物技术有限公司,纯度 >98%,BR);十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、正硅酸乙酯(TEOS)、四甲基氢氧化铵(TMAOH)(成都市科隆化学品有限公司);氨水、无水乙醇、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠(国药集团上海化学试剂公司);其他试剂均为分析纯,实验用水为超纯水。

2 方法

2.1 介孔二氧化硅 MCM-41 的制备

在 35℃ 持续搅拌条件下,将 3.5 g CTAB 完全溶于 31.6 mL 去离子水后,加入含有 TEOS(17.1 mL)和 TMAOH(8.1 mL)混合溶液,20 min 后再缓慢加入 15.4 mL TEOS 溶液。1 h 后将体系混合溶液转移至聚四氟乙烯反应釜中,在 100℃ 下老化 24 h。最后进行过滤、洗涤、干燥,并在 500℃ 下煅烧 6 h,反应结束后冷却至室温,用无水乙醇清洗 5 次,制得介孔二氧化硅 MCM-41,冷冻干燥密封保存^[27]。

2.2 BMSNs 的制备

在 35℃ 持续搅拌条件下,将 3.0 g CTAB 完全溶于 61.5 mL 去离子水后,加入 17.5 mL 氨水(质量分数 25%~28%)和 95.0 mL 无水乙醇,15 min 后逐滴加入 5.3 mL TEOS 溶液。2 h 后对反应物进行过滤处理,并将所得固体产物分散于 100 mL 无水乙醇溶液后,转移至聚四氟乙烯反应釜,在 100℃ 下进行溶剂热处理 24 h。最后进行过滤、洗涤、干燥,并在 500℃ 下煅烧 6 h,反应结束后冷却至室温,用无水乙醇清洗 5 次,制得双介孔二氧化硅纳米球 BMSNs,冷冻干燥密封保存,制备过程见图 1。

2.3 分析与表征

样品形貌通过 VEGA3-LMH 扫描电镜(SEM)观测。氮气吸附/脱附等温曲线通过 TriStar II 3020 仪器测得,测试前样品需预先真空脱气处理(80℃/12 h),材料比表面积、孔径分布分别通过 Brunauer-Emmett-Teller、Barrett-Joyner-Halenda 方法计算得到。傅立叶红外光谱(FTIR)由 Bruker Tensor 27 型傅立叶红外光谱仪进行表征,波数范围 400~4 000 cm⁻¹,分辨率为 4 cm⁻¹。DOX 浓度通过 BlueStar 系列紫外-可见光谱测定(λ_{\max} = 480 nm)。



图1 双介孔二氧化硅纳米球(BMSNs)的制备示意图

Fig. 1 Preparation procedure of bimodal mesoporous silica nanospheres

2.4 吸附特性实验

吸附性能测试实验均通过间歇式途径完成,详细操作过程为:20 mg 吸附剂材料与 20 mL 预定浓度的 DOX 溶液混合,在 30 °C 条件下振荡 24 h 之后,通过滤膜孔径为 0.22 μm 的过滤器进行过滤,溶液中 DOX 浓度通过紫外-可见分光光度计测定。平衡吸附量 q_e ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$) 由公式 1 计算得到:

$$q_e = \frac{c_0 - c_e}{m} \times \frac{V}{1\,000} \quad \text{公式(1)}$$

式中: q_e ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$) 为样品的平衡吸附量, m (g) 为样品的质量, V (mL) 为吸附质溶液的体积, c_0 ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 c_e ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 分别为溶液的初始摩尔浓度和吸附平衡后溶液的摩尔浓度。

pH 值影响试验:取 6 只清洁的 100 mL 锥形瓶,分别加入 20 mg 吸附剂(BMSNs、MCM-41)和浓度为 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DOX 溶液,溶液 pH 通过 pH 缓冲液依次调整为 3.0、3.8、5.0、6.0、6.8、8.0,体积为 20 mL。在 30 °C 下,以 50 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 恒温振荡 24 h 后,对溶液进行过滤,并测定溶液中 DOX 浓度 c_e 。按照公式 1 计算 BMSNs、MCM-41 在不同 pH 条件下的平衡吸附量 q_e 。

等温吸附实验:取 7 只清洁的 100 mL 锥形瓶,分别加入 20 mg BMSNs 和 20 mL 初始浓度不同 DOX 溶液(70、100、135、160、190、220、250 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。在 30 °C 下,以 50 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 恒温振荡 24 h 后,对溶液进行过滤,并测定溶液中 DOX 浓度 c_e 。按照公式 1 计算 BMSNs 在不同初始浓度条件下的平衡吸附量 q_e ,得到对应等温吸附曲线。

吸附动力学实验:取 7 只清洁的 100 mL 锥形瓶,分别加入 20 mg BMSNs 和 20 mL 初始浓度为 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DOX 溶液。在 30 °C 以下以 50 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 恒温振荡,对应吸附时间的依次为 5、20、40、60、120、200、360 min 后,对溶液进行过滤,并

测定溶液中 DOX 浓度 (c_t),由公式 2 得出 BMSNs 在不同吸附时间内对 DOX 的吸附量 q_t ,并得到对应的吸附动力学曲线。

$$q_t = \frac{c_0 - c_t}{m} \times \frac{V}{1\,000} \quad \text{公式(2)}$$

式中: q_t ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$) 为样品在不同反应时间内对 DOX 的吸附量, c_t ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 为样品与溶液接触 t min 后 DOX 的摩尔浓度。

脱附(释放)实验:取 2 只清洁的 100 mL 锥形瓶,加入 20 mg 在 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DOX 溶液 (pH = 7.0) 中吸附完成的 BMSNs 干燥材料,分别加入 pH 为 5.0 或 7.4 的缓冲溶液(20 mL)。在 30 °C 下以 50 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 恒温振荡,在一定时间间隔内进行取样、过滤,并测定计算溶液中 DOX 浓度及含量 m_1 ,由公式 3 得出 BMSNs 在不同 pH 下对 DOX 的脱附(释放)效率 η (%)。

$$\eta(\%) = \frac{m_1}{m} \times 100\% \quad \text{公式(3)}$$

式中: m (μmol) 为 20 mg BMSNs 干燥材料在 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DOX 溶液 (pH = 7.0) 中的吸附量, m_1 (μmol) 为缓冲溶液中 DOX 含量。

2.5 空白纳米球的毒性实验

评估空白纳米球 MCM-41 和 BMSNs 的细胞毒性,排出药物载体毒性的干扰。采用 CCK-8 法测定 MCM-41 和 BMSNs 对人乳腺癌细胞 MCF-7、人肺癌细胞 A549 增殖活力的影响。取对数生长期的 MCF-7 细胞、A549 细胞接种于 96 孔板中,细胞密度为每孔 4×10^3 个,在 37 °C、5% CO_2 的细胞培养箱中孵育过夜。次日将培养基更换为 200 μL 含不同质量浓度 (10、25、50、100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) MCM-41 和 BMSNs 的新鲜培养基,同时设置调零组、对照组,各个浓度平行做 6 个复孔。培养 48 h 后,每孔加入 20 μL CCK-8 溶液,继续孵育 1 h 后,用酶标仪检测

各孔在 450 nm 波长的吸光度(A)值,按公式 4 计算细胞存活率:

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{A_{\text{实验组}} - A_{\text{调零组}}}{A_{\text{对照组}} - A_{\text{调零组}}} \times 100\% \quad \text{公式(4)}$$

2.6 载药纳米球抑制肿瘤增殖作用实验

采用 CCK-8 法测定载药纳米球 BMSNs-DOX 和 MCM-41-DOX 对人乳腺癌细胞 MCF-7、人肺癌细胞 A549 的增殖抑制作用。按上述方法将人乳腺癌细胞 MCF-7、人肺癌细胞 A549 接种在 96 孔板并孵育过夜。次日,将培养基更换为 200 μL 含系列质量浓度(0.1、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) DOX、MCM-41-DOX、BMSNs-DOX 的培养基,同时设置调零组、对照组,各 6 个复孔。培养 48 h 后,每孔加入 20 μL CCK-8 溶液,继续孵育 1 h 后,用酶标仪检测各孔在 450 nm 波长的吸收值,计算细胞存活率,方法同上。

数据处理 所有实验平行操作 3 次,数据采用 SPSS 22.0 软件统计分析,数据采用平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 视为差异具有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 结构表征与分析

为确认 MCM-41 和 BMSNs 样品形貌,采用 SEM 进行表征,结果见图 2A ~ B。可见,MCM-41 纳米颗粒形貌为类球形,但颗粒间交联现象明显,颗粒粒径约为 520 ~ 960 nm;BMSNs 为球形颗粒,分散性明显优于 MCM-41,粒径约为 420 ~ 780 nm。为进一步表征其孔结构,在 -196°C 条件下对 MCM-41 和 BMSNs 样品进行了氮气吸附脱附测试,结果见图 2C。根据 IUPAC 定义可知^[28],MCM-41 和 BMSNs 氮气吸附脱附等温曲线均属于 IV 类曲线,MCM-41 滞后环为 H_1 型,BMSNs 滞后环为 H_2 型,说明两者都具有较发达的介孔结构。MCM-41 和 BMSNs 比表面积分别为 967.2、1 043.6 $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$;孔体积容量分别为 0.68、0.91 $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ 。图 2D 表明 MCM-41 的孔径分布均匀,约为 2.4 nm;BMSNs 具有孔径约为 2.6、4.1 nm 的双介孔。图 2E 显示 MCM-41 和 BMSNs 均出现了属于 SiO_2 物质的 FTIR 吸收谱图,无其他杂峰,说明在洗涤、模板去除等样品过程中进行彻底,样品较纯。其中位于 3 450 cm^{-1} 吸收峰由 O-H 键伸缩振动引起,1 650 cm^{-1} 吸收峰来源于 Si-OH 和吸附 H_2O 的弯曲振动,960 cm^{-1} 吸收峰为 Si-OH

对称伸缩振动,1 080、800、457 cm^{-1} 吸收峰分别归因于 Si-O-Si 键的不对称伸缩振动、对称伸缩振动和弯曲振动。

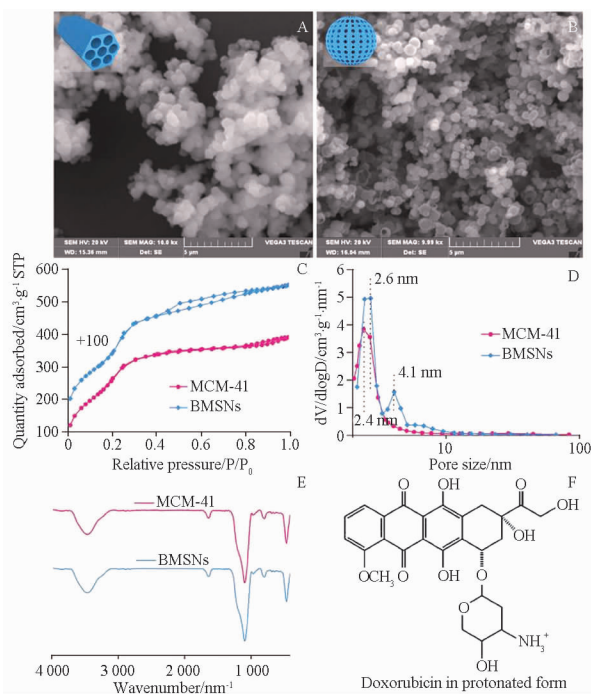


图 2 MCM-41(A)和 BMSNs(B)的扫描电镜图和氮气吸附-脱附等温曲线(C)、孔径分布(D)、红外光谱(E)和质子化多柔比星(DOX)化学结构式(F)

Fig. 2 Scanning electron microscopy(A - B), nitrogen adsorption-desorption isotherms(C), pore size distribution(D) and infrared spectra(E) of MCM-41 and BMSNs, and chemical structure of protonated doxorubicin(F)

3.2 吸附特性研究

为研究 BMSNs 和 MCM-41 对抗癌药物分子 DOX 的吸附能力,分别考察了两者在不同 DOX 溶液和不同环境 pH 条件下对 DOX 的吸附平衡能力,结果见图 3。由图 3A 可以发现,BMSNs 和 MCM-41 对 DOX 的吸附能力均随着初始浓度的增大而增大,这是由于溶液中吸附质分子的浓度增加,使 DOX 具有更强的物质传输动力和更好的物质扩散能力,使其更容易被 BMSNs 和 MCM-41 吸附。

随着溶液 pH 值由 3.0 调整至 8.0, BMSNs 和 MCM-41 对 DOX 均呈现出先增加后降低的吸附能力(图 3B),说明 pH 均对 BMSNs 和 MCM-41 的吸附能力具有显著影响。这是因为不同 pH 环境对 DOX 在溶液中的分子电荷状态以及 SiO_2 表面 Si-OH 的电离程度均具有较大影响^[27]。在酸性条件下,DOX 大量被质子化呈现阳离子状态

(图2F), SiO_2 表面以 $\text{Si}-\text{OH}$ 形式存在, SiO_2 对 DOX 的吸附主要通过范德华力。在碱性条件下, DOX 主要以非离子状态存在, SiO_2 表面 $\text{Si}-\text{OH}$ 电离为 $\text{Si}-\text{O}^-$ 阴离子, SiO_2 对 DOX 的吸附也主要通过范德华力。因此 BMSNs 和 MCM-41 在酸、碱条件下均对 DOX 产生相对较低的吸附能力。而当溶

液呈中性时, 部分 DOX 分子被质子化呈阳离子状态, SiO_2 表面部分 $\text{Si}-\text{OH}$ 电离为电负性的 $\text{Si}-\text{O}^-$ 阴离子, SiO_2 可通过静电作用对 DOX 进行吸附; 且未质子化的 DOX 可与表面 $\text{Si}-\text{OH}$ 通过氢键作用进行吸附, 所以 $\text{pH}=7.0$ 时, BMSNs 和 MCM-41 对 DOX 的吸附能力显著增加。

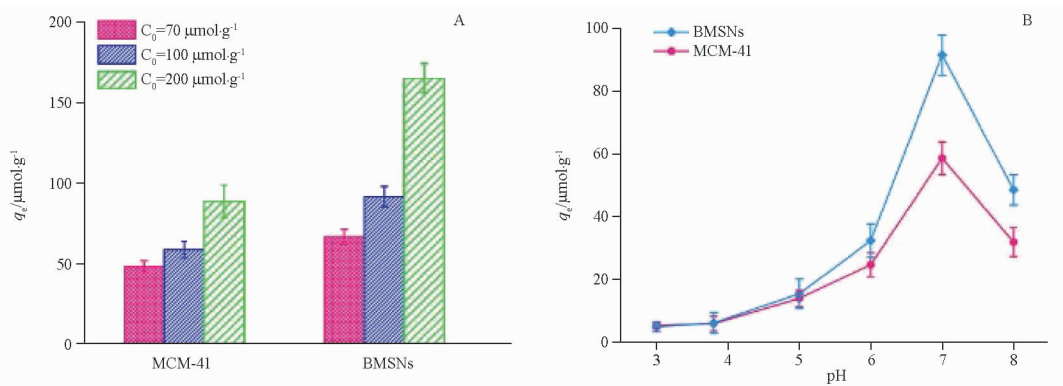


图3 不同 DOX 初始浓度(A)、不同 pH 条件(B)下 MCM-41 和 BMSNs 对 DOX 的吸附性能。 $n=3, \bar{x} \pm s$

Fig. 3 Adsorption capacities of MCM-41 and BMSNs toward DOX at the different initial DOX concentration(A) or pH condition(B). $n=3, \bar{x} \pm s$

另一方面, 在相同的 DOX 初始浓度(图3A)、pH 条件(图3B)下, BMSNs(孔径尺寸 2.6、4.1 nm)对 DOX 的吸附能力均明显优于 MCM-41(孔径尺寸 2.4 nm)。特别是在 $\text{pH}=7.0$ 时, BMSNs 对 DOX 的吸附量高达 $91.7 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (即载药量为 5.32%), 是 MCM-41 吸附量的 1.6 倍。说明具有 2 种不同小大孔径的 BMSNs, 更有利于 DOX 分子在其内外表面的扩散和运输, 能产生更优异的吸附能力, 可作为 DOX 高负载量载体。

为进一步探究 BMSNs 对 DOX 的吸附特性, 对其等温吸附、动力学吸附进行了实验和理论拟合。同时根据肿瘤组织中 pH 值比正常细胞更低的特点, 尤其是在癌细胞内 $\text{pH}=6.5 \sim 6.8$, 溶酶体内 $\text{pH}=4.5 \sim 6.5$ [29-31]。对其在不同 pH 条件下的脱附(释放)性质进行了验证。由图4A可知, BMSNs 对 DOX 的吸附平衡量随着平衡浓度的增加而呈现出非线性式增加趋势。通过 3 种典型的吸附模型(Freundlich、Redlich-Peterso 和 Temkin)对等温吸附数据进行了拟合, 由表1可知, 该过程最符合 Freundlich 模型($r^2=0.9953, K_f=41.479 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}$)。BMSNs 主要通过不均匀的作用力(静电吸附和氢键作用)对 DOX 产生吸附。由图4B可知, BMSNs 对 DOX 的吸附速率较快, 在 DOX 初始浓度为 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, BMSNs 在约 120 min 内可实现对 DOX 的饱

和吸附。通过 3 种典型的动力学模型(准一级动力学、准二级动力学和 Elovich 模型)对动力学实验数据进行了拟合分析, 由表2可知, 该过程最符合于准二级动力学吸附模型($r^2=0.98736, K_2=0.00129 \text{ g}\cdot\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)。由图5可知, 在 $\text{pH}=7.0$ 条件下吸附完成的 BMSNs-DOX, 均可在 $\text{pH}=5.0$ 和 $\text{pH}=7.4$ 的缓冲溶液中进行 DOX 分子脱附/释放。且在 $\text{pH}=5.0$ 溶液中, BMSNs 对 DOX 分子的脱附(释放)效率可达约 96%, 脱附时间仅需约 30 min, 脱附(释放)速率和效率均显著优于在 $\text{pH}=7.4$ 环境中的 DOX 脱附/释放, 说明 BMSNs 可实现对癌细胞释放更多更快的抗癌药物分子 DOX, 增强对癌细胞的破坏和杀死作用; 同时减少在正常细胞内释放 DOX, 降低副作用, 在作为癌细胞特异性药物载体方面具有潜在应用价值。

3.3 体外药效学评价

为了评价空白载体的毒性, 分别将 MCM-41 和 BMSNs 加入 MCF-7 和 A549 细胞中, 共同孵育 48 h 后, 采用 CCK8 法测定细胞的存活率。实验结果见图6A~B, 与 2 种空白纳米球共孵育的肿瘤细胞存活率均高于 90%, 表明空白 MCM-41 和 BMSNs 毒性小, 生物相容性好, 是安全的药物载体。为了验证载药纳米球 BMSNs-DOX 可以增强 DOX 的抗肿瘤

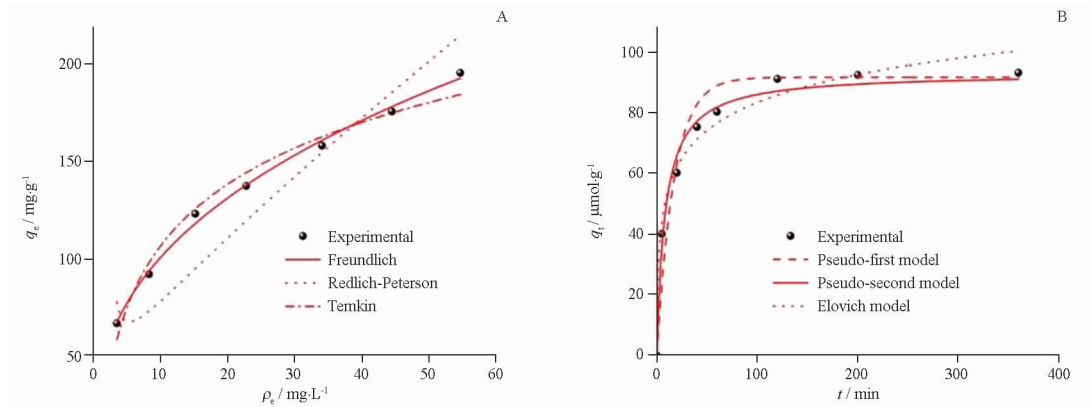


图4 BMSNs对DOX的等温吸附模型(A)和动力学模型(B)吸附性能(pH=7.0, T=30℃)

Fig. 4 Isothermal (A) and dynamic (B) adsorption model of BMSNs toward DOX (pH=7.0, T=30℃)

表1 BMSNs对DOX等温吸附模型拟合参数表

Tab. 1 Isotherm parameters for adsorption models in the DOX adsorption on BMSNs

Adsorption model	Formula	Parameter	Value
Freundlich	$q_e = K_f C_e^{1/n_f}$	$K_f/L \cdot g^{-1}$	41.479
		n_f	2.607
		r^2	0.9953
Redlich-Peterson	$q_e = \frac{K_r C_e}{1 + a_r C_e^g}$	$K_r/L \cdot g^{-1}$	0.54304
		α_r	-1.03228
		g	0.04519
		r^2	0.7532
Temkin	$q_e = \frac{RT}{b_T} \ln(A_T C_e)$	b_T	381.0668
		A_T	1.01663
		r^2	0.9707

表2 BMSNs对DOX吸附动力学模型拟合参数表

Tab. 2 Kinetic parameters for kinetic models in the DOX adsorption on BMSNs

Kinetic models	Formula	Parameter	Value
Pseudo-first model	$q_t = q_e(1 - e^{-K_1 t})$	q_e	91.717
		$K_1/g \cdot \mu mol^{-1} \cdot min^{-1}$	0.0584
		r^2	0.94233
Pseudo-second model	$q_t = \frac{q_e^2 K_2 t}{1 + q_e K_2 t}$	q_e	93.152
		$K_2/g \cdot \mu mol^{-1} \cdot min^{-1}$	0.00129
		r^2	0.98736
Elovich	$q_t = \frac{1}{b} \ln(1 + abt)$	α	70.249
		b	0.07518
		r^2	0.97958

效果,将不同浓度的DOX、MCM-41-DOX、BMSNs-DOX分别加入到MCF-7和A549细胞中,48h后采用CCK8法测定肿瘤细胞存活率。实验结果见图6C~D,随着DOX浓度的增加,肿瘤细胞存活率逐渐降低,在相同药物浓度下,BMSNs-DOX组相较于DOX组和MCM-41-DOX组,展现出更强的肿瘤细胞

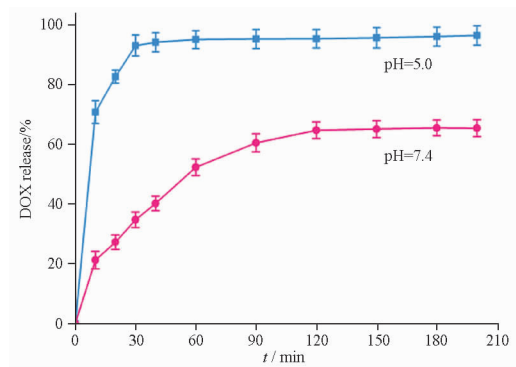


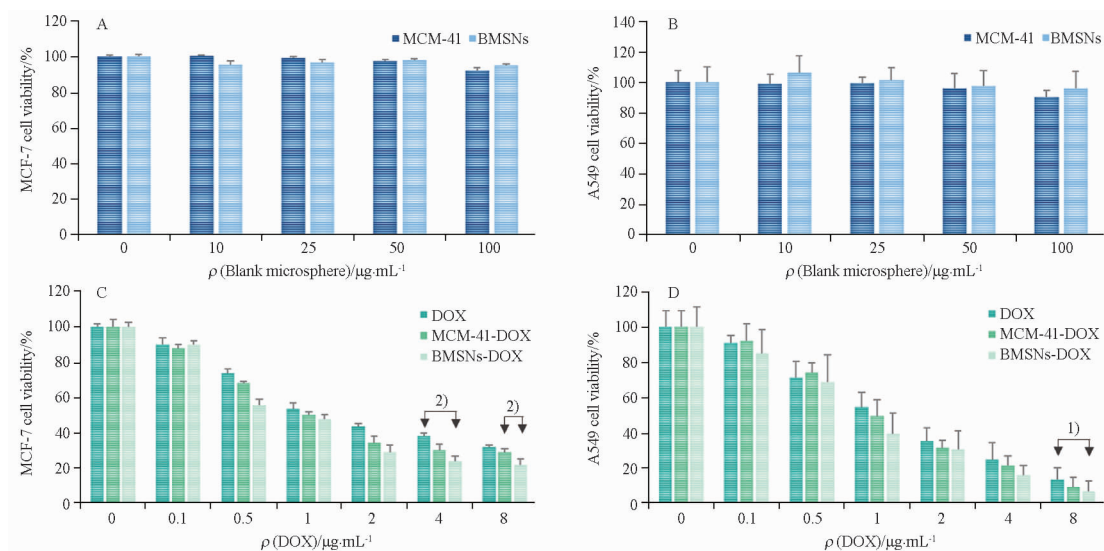
图5 BMSNs对DOX的脱附(释放)性能。n=3, x̄±s

Fig. 5 Desorption capacity of BMSNs to DOX. n=3, x̄±s

杀伤能力。在DOX 4 μg · mL⁻¹质量浓度下,BMSNs-DOX组MCF-7和A549细胞存活率仅为23.67%和15.79%,在DOX 8 μg · mL⁻¹质量浓度下,BMSNs-DOX组MCF-7和A549细胞存活率仅为21.85%和6.81%。

4 结论

本研究以CTAB为结构导向剂,TEOS为硅源,在碱性条件下进行溶胶-凝胶合成后,通过溶剂热处理途径合成了双介孔二氧化硅纳米球,孔径尺寸为2.6、4.1 nm,比表面积高达1043.6 m² · g⁻¹。通过吸附实验表明:①BMSNs对DOX的吸附能力均明显优于具有典型介孔的MCM-41(孔径尺寸为2.4 nm),特别是在pH=7.0条件下,BMSNs对DOX的吸附量高达91.7 μmol · g⁻¹(c₀=100 μmol · L⁻¹),是MCM-41吸附量的1.6倍;②BMSNs主要通过静电作用和氢键作用对DOX产生优异吸附作用,属于Freundlich等温吸附模型、准二级动力学吸附;③在pH=5.0缓冲溶液中,BMSNs对DOX分子的脱附(释放)效率可达约96%,脱附时间仅需约30 min,明显优于其在pH=7.4溶液



与 BMSNs - DOX 组比, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, vs BMSNs-DOX group.

图 6 CCK-8 法检测不同浓度空白微球对 MCF-7 细胞(A)、A549 细胞(B)细胞活力的影响;不同浓度载药微球对 MCF-7 细胞(C), A549 细胞(D)细胞活力的影响。 $n = 6, \bar{x} \pm s$

Fig. 6 The inhibition effect of blank microsphere(A, B) and drug-loaded microsphere(C, D) on MCF-7 cells and A549 cells proliferation was evaluated by the CCK8 assay. $n = 6, \bar{x} \pm s$

中的脱附(释放)量和速率。BMSNs-DOX 纳米球给药后可先通过 EPR 效应富集到肿瘤组织,然后被内吞进入肿瘤细胞溶酶体释放药物,药物逃逸溶酶体进入细胞核发挥药效。以上研究表明 BMSNs 有望实现对癌症细胞释放更多、更快的抗癌药物 DOX 以增强杀死癌细胞作用,提高药效,减少毒副作用。同时本研究在体外药效学实验中观察到 BMSNs-DOX 组相较于 DOX 组和 MCM-41-DOX 组表现出更好的肿瘤细胞杀伤作用。综上所述,表明 BMSNs 是一种较理想的癌细胞特异性递药载体,具有潜在的应用价值。

REFERENCES

- [1] ZHAO Z, SUN K, YAN T, *et al.* Multiple primary tumors; a case report and review of the literature[J]. *BMC Musculoskeletal Disord*, 2020, 21 (1): 394. DOI: 10.1186/s12891-020-03426-8.
- [2] MASOOD A. Telomeres, lifestyle, cancer, and aging[J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2011, 14(1):28-34.
- [3] YANG J, YU B, HUANG H B, *et al.* Expert consensus on prescription review of anti-tumor drugs for breast cancer[J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2020, 55(11): 961-967.
- [4] AFSHIN A, PATRICK J, KAIRSTEN A, *et al.* Health effects of dietary risks in 195 countries, 1990-2017: a systematic analysis for the global burden of disease study 2017[J]. *Lancet*, 2019, 393(10184):1958-1972.
- [5] YANG L, SHI P, ZHAO G, *et al.* Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy [J]. *Signal Trans Target Ther*, 2020, 5(1):8. DOI: 10.1038/s41392-020-0110-5.

- [6] LEITER A, VELUSWAMY R R, WISNIVESKY J P. The global burden of lung cancer; current status and future trends[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2023, 20(9):624-639.
- [7] SUDHAKAR A. History of cancer, ancient and modern treatment methods[J]. *J Cancer Sci Ther*, 2009, 1(2):1-4.
- [8] WANG C, FAN W, ZHANG Z, *et al.* Advanced nanotechnology leading the way to multimodal imaging-guided precision surgical therapy[J]. *Adv Mater*, 2019, 31(49): e1904329. DOI: 10.1002/adma.201904329.
- [9] COLEMAN R L, FLEMING G F, BRADY M F, *et al.* Veliparib with first-line chemotherapy and as maintenance therapy in ovarian cancer[J]. *New Engl J Med* 2019, 381(25):2403-2415.
- [10] SPRINGFELD, C, JAGER D, BUCHLER M W, *et al.* Chemotherapy for pancreatic cancer[J]. *La Presse Med*, 2019, 48(3 Pt 2):e159-e174.
- [11] WANG D, LIPPARD S J. Cellular processing of platinum anticancer drugs[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4(4):307-320.
- [12] YAN J Q, XU X Y, ZHOU J N, *et al.* Fabrication of a pH/reD-ox-triggered mesoporous silica-based nanoparticle with microfluidics for anticancer drugs Doxorubicin and paclitaxel codelivery [J]. *ACS Appl Biol Mater*, 2020, 3(2):1216-1225.
- [13] GIOFFRÉ S, RICCI V, VAVASSORI C, *et al.* Plasmatic and chamber-specific modulation of cardiac microRNAs in an acute model of DOX-induced cardiotoxicity[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 110:1-8.
- [14] KAMAEV P P, RAPOPORT N Y. Effect of anticancer drug on the cell sensitivity to ultrasound *in vitro* and *in vivo*. In: AIP Conference Proceedings[J]. *Am Inst Phys*, 2006:543-547.
- [15] AGHEBATI-MALEKI A, DOLATI S, AHMADI M, *et al.* Nanoparticles and cancer therapy: Perspectives for application of nanoparticles in the treatment of cancers[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(3):1962-1972.
- [16] BU L L, YAN J, WANG Z, *et al.* Advances in drug delivery for post-surgical cancer treatment [J]. *Biomaterials*, 2019, 219:

119182. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2019.04.027.
- [17] WANG S. The construction and in vitro performance of pH-sensitive lipid-mesoporous silica composite nanocarriers [D]. Shenzhen: Shenzhen University, 2019.
- [18] LI Z X, BARNES J C, BOSOY A, *et al.* Mesoporous silica nanoparticles in biomedical applications [J]. *Chem Soc Rev*, 2012, 41(7):2590-2605.
- [19] TANG F Q, LI L L, CHEN D. Mesoporous silica nanoparticles: synthesis, biocompatibility and drug delivery [J]. *Adv Mater*, 2012, 24(12):1504-1534.
- [20] YANG P P, GAI S L, LIN J. Functionalized mesoporous silica materials for controlled drug delivery [J]. *Chem Soc Rev*, 2012, 41(9):3679-3698.
- [21] MA Z, WU C, CHEN J. The research of hyaluronic acid functionalized mesoporous silica nanoparticles MCM-41 loading paclitaxel for SMMC-7721 liver cancer cells [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2019, 54(2): 110-116.
- [22] MANZANO M, VALLET-REGÍ M. Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery [J]. *Adv Funct Mater*, 2020, 30(2): 1902634. DOI: 10.1002/adfm.201902634.
- [23] ALYASSIN Y, SAYED E, MEHTA P, *et al.* Application of mesoporous silica nanoparticles as drug delivery carriers for chemotherapeutic agents [J]. *Drug Discov Today*, 2020, 25(8):1513-1520.
- [24] SU Q L, QIU H P, LI J J, *et al.* Inhibitory effect of doxorubicin-loaded mesoporous silica nanoparticles on bladder cancer cells [J]. *J Third Mili Med Univ* (第三军医大学学报), 2021, 43(23):2562-2569.
- [25] ROIK N V, BELYAKOVA L A, DZIAZKO M O. Adsorption of antitumor antibiotic Doxorubicin on MCM-41-type silica surface [J]. *Adsorp Sci Technol*, 2017, 35(1/2):86-101.
- [26] GAI S L, YANG P P, MA P A, *et al.* Fibrous-structured magnetic and mesoporous Fe₃O₄/silica microspheres: synthesis and intracellular Doxorubicin delivery [J]. *J Mater Chem*, 2011, 41(21): 16420-16426.
- [27] VALLET-REGI M, RAMILA R, DEL REA R P, *et al.* A new property of MCM-41: drug delivery system [J]. *Chem Mater*, 2001, 13(2): 308-311.
- [28] BRUNAUER S, DEMING L S, DEMING W E, *et al.* On a theory of the van der Waals adsorption of gases [J]. *J Am Chem Soc*, 1940, 62(7): 1723-1732.
- [29] GAO C X, WEI X D, HUANG W, *et al.* Effect of nano-drugs on tumor immune microenvironment [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2021, 56(19): 1546-1550.
- [30] TAN J, CHEN Y Z, LIN T T, *et al.* Constructed and characterization of tumor microenvironment-sensitive drug delivery system [J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学), 2014, 31(11):1297-1301.
- [31] HE Q, CHEN J, YAN J, *et al.* Tumor microenvironment responsive drug delivery systems [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2020, 15(4):416-448.

(收稿日期:2023-07-12)