基于荧光硅纳米粒子的pH响应型复合纳米药物 载体的制备及其在肿瘤细胞中的应用

卢佳慧*,张婷婷*,张益豪,郝昌安,窦亚坤#,刘占军

华北理工大学药学院,河北 唐山

收稿日期: 2025年4月29日; 录用日期: 2025年5月21日; 发布日期: 2025年5月30日

摘要

一锅水热法制备的硅纳米粒子(Si NPs)作为荧光载体,介孔二氧化硅纳米粒子(MSNs)为药物载体,制备 出了pH响应型复合荧光纳米药物载体(Si NPs-MSNs),并针对肿瘤细胞进行荧光成像和治疗。利用一系 列表征手段,对纳米粒子进行光学性能分析和结构表征。以盐酸阿霉素(DOX)为药物模型,对制备的复 合荧光纳米药物载体进行药物吸附性和释放性的考察;通过MTT和细胞成像实验考察纳米载体的生物安 全性和成像效果。药物吸附性测试表明,该复合纳米载体的载药率为23.08%,包封率为76.94%。体外 药物释放实验表明,该复合纳米载体对pH具有敏感响应。MTT的结果表明制备的复合纳米载体具有较小 的细胞毒性,适用于生物应用,同时也证明了负载了DOX的复合纳米药物载体具有杀死肿瘤细胞的作用。 肿瘤细胞成像实验表明复合纳米载体在肿瘤细胞中达到良好的荧光成像效果,可用于体外生物成像领域。 本研究成功制备了基于荧光Si NPs的pH响应型复合纳米药物载体,以抗肿瘤药物DOX为药物模型,该复 合纳米药物载体具有良好的药物装载率和包封率,并且可以实现对肿瘤细胞荧光实时成像和治疗作用。

关键词

硅纳米粒子,pH响应,荧光成像,肿瘤细胞治疗

Preparation of pH-Responsive Composite Nanodrug Carriers Based on Fluorescent Silicon Nanoparticles and Their Application in Tumor Cells

Jiahui Lu*, Tingting Zhang*, Yihao Zhang, Chang'an Hao, Yakun Dou#, Zhanjun Liu

College of Pharmacy, North China University of Science and Technology, Tangshan Hebei

*共同第一作者。 #通讯作者。

文章引用: 卢佳慧, 张婷婷, 张益豪, 郝昌安, 窦亚坤, 刘占军. 基于荧光硅纳米粒子的 pH 响应型复合纳米药物载体 的制备及其在肿瘤细胞中的应用[J]. 分析化学进展, 2025, 15(2): 287-301. DOI: 10.12677/aac.2025.152028

Received: Apr. 29th, 2025; accepted: May 21st, 2025; published: May 30th, 2025

Abstract

Silicon nanoparticles (Si NPs) prepared by a one-pot hydrothermal method were used as fluorescent carriers, while mesoporous silica nanoparticles (MSNs) were used as drug carriers, pH responsive composite fluorescent nanocarriers (Si NPs-MSNs) were prepared and used for fluorescence imaging and treatment of tumor cells. Using a series of characterization methods to analyze the optical properties and structural characterization of nanomaterials. Using doxorubicin hydrochloride (DOX) as a drug model, the drug adsorption and release properties of the prepared composite fluorescent nano drug carrier were investigated; Investigating the biosafety and imaging effectiveness of nanocarriers through MTT and cell imaging experiments. The drug adsorption test showed that the drug loading rate of the composite nanocarrier was 23.08%, and the encapsulation efficiency was 76.94%. In vitro drug release experiments showed that the composite nanocarrier has a sensitive response to pH. The MTT results indicate that the prepared composite nanocarrier has low cytotoxicity and is suitable for biological applications. It also proves that the composite nanocarrier loaded with DOX has the ability to kill tumor cells. Tumor cell imaging experiments have shown that composite nanocarriers can exhibit good fluorescence imaging effects in tumor cells and can be used in the field of *in vitro* biological imaging. This study successfully prepared a pH responsive composite nano drug carrier based on fluorescent Si NPs, using the anti-tumor drug DOX as the drug model. The composite nano drug carrier has good drug loading and encapsulation efficiency, and can achieve real-time fluorescence imaging and therapeutic effects on tumor cells.

Keywords

Silicon Nanoparticles, pH Response, Fluorescence Imaging, Tumor Cell Therapy

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc. This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0). http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

1. 引言

近年来,硅纳米粒子(Silicon nanoparticles, Si NPs)作为一种新型的环境友好型荧光成像探针得到了广 泛的关注[1] [2]。与传统的镉元素系列及铅元素系列的荧光量子点相比,Si NPs 具有生物相容性好等优 势,凭借其低毒性和优异的光学性质,如荧光发射波长可调、光稳定性好、发光强度高,在传感领域取 得了显著的成效,并在生物成像领域展现出了一定的应用潜力[3]-[6]。众所周知,荧光探针的发射波长越 长,荧光量子产率越高,探针的组织穿透能力越强,越有利于生物荧光成像[7]-[9]。到目前为止,水热法 制备的 Si NPs 大多发射蓝绿色荧光。最近,Ye [10]等人利用微波辅助合成法在 180℃下合成了荧光量子 产率为 28.8%,发射蓝色荧光的 Si NPs,并成功应用于细胞成像;Min [11]的小组利用反应釜提高反应温 度,在 150℃条件下反应 5h 制备了发射黄绿色荧光的 Si NPs,并应用于活细胞 pH 值的可视化;Ma [12] 课题组在氮气保护,200℃条件下反应 15 min 合成了发光强度较高的蓝绿色荧光 Si NPs,缩短了反应时 间,同时提高了发光强度。但这些合成的 Si NPs 常在高温高压条件下制得,且对发射波长较短。因此在 更加温和的条件下合成荧光发射波长更长且强度相对较高的荧光 Si NPs 是具有挑战性的工作。

介孔二氧化硅纳米粒子(MSNs)具有比表面积高、孔容积大、易于表面改性和良好生物安全性等优点, 常被用做载体对药物进行装载[13]-[16]。其作为载体可通过静电吸附作用或者化学键的作用将药物接枝 到孔道的表面和内部,从而实现载药的目的[17]-[19]。因此 MSNs 是一种良好的药物载体,能够实现药物的装载与释放,使难以被人体直接吸收的药物在人体内缓释从而提高生物利用度[20]。Chang [21]等人利用 MSNs 对阿霉素进行装载,用于对乳腺癌的治疗;Feng [22]课题组通过对 MSNs 表面羧基改性提高对抗肿瘤药物的负载率,进一步提高抗肿瘤效果;Rui [23]等人利用 MSNs 装载抗癌药物甲氨蝶呤合成了一种简单的 pH 响应性药物控制释放系统。然而,这些研究都只是将 MSNs 用于肿瘤的治疗,很少有人将 MSNs 和荧光成像探针结合,尤其是鲜有与 Si NPs 进行结合,从而实现对肿瘤的成像和治疗双重作用。

本课题是设计利用水热法制备发射黄色荧光的 Si NPs, 克服 Si NPs 发射波长短的缺点; 同时用溶胶 - 凝胶法合成 MSNs, 通过对表面进行功能化改性, 再利用偶联剂将 Si NPs 和 MSNs 有机结合; 以 DOX 为药物模型制备基于荧光 Si NPs 的 pH 响应型复合纳米药物载体; 对制备的复合荧光纳米药物载体进行 药物装载和释放试验,并验证其生物安全性, 同时进行肿瘤细胞荧光成像和治疗, 为 Si NPs 和 MSNs 在 生物领域的进一步应用提供了理论基础和研究思路。

2. 实验部分

2.1. 仪器与试剂

电子天平(BS-224S,赛多利斯科学仪器有限公司)、数控超声波清洗器(JP-040S,深圳市洁盟清洗设备有限公司);荧光分光光度计(F-4500,日本日立公司);紫外分光光度计(Lambda 35,PerkinElmer 仪器有限公司);激光粒度测定仪(ZEN-3690,英国马尔文有限公司);透射电子显微镜(JEM-2800F,日本电子株式会社);场发射扫描电子显微镜(Scios,FEI 捷克有限公司);X-射线衍射仪(D8 Advance, Bruker 公司); 傅立叶红外光谱仪(Spectrum Two, PerkinElmer 仪器有限公司)。

3-(氨基丙基)三乙氧基硅烷(APTES)、N-[3-(三甲氧基硅基)丙基]乙二胺(DAMO)、邻氨基苯酚、1-乙 基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和盐酸阿霉素(DOX)购自上海阿 拉丁生化科技有限公司。正硅酸四乙酯(TEOS)和十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)购自上海国药集团试剂有 限公司,无水乙醇购自天津市津东天正精密化学试剂厂。氢氧化钠(NaOH)、氯化钠(NaCl)和氨水购自天 津永大化学试剂有限公司。戊二酸酐(GA)、无水磷酸二氢钠(NaH2PO4)和无水磷酸氢二钠(Na2HPO4)购自 上海麦克林生化科技有限公司。实验室制备去离子水并用于所有实验。所有试剂均为分析级,无需纯化 可直接使用。

2.2. 荧光 Si NPs 的制备

将 10 mL 的去离子水加入 25 mL 烧瓶中,再加入精确称取的 10 mg 邻氨基苯酚。室温下搅拌(1200 r/min) 20 min,得到混合均匀的溶液。将 2 mL 的 N-[3-(三甲氧基硅基)丙基]乙二胺(DAMO)缓慢滴加到该溶液中,然后将反应温度升高至 110℃反应(油浴)反应 20 min 后,待烧瓶中液体温度降至室温后取出,得到橙黄色 Si NPs 溶液。将 Si NPs 溶液装入分子截留量为 1000 的透析袋中透析 12 h 后(每 4 h 换一次水),得到纯化后的 Si NPs 溶液。将其储存在 4℃冰箱中备用。此外,将一部分纯化的 Si NPs 溶液冷冻干燥得固体,用于后续表征。

2.3. 功能化介孔二氧化硅纳米粒子的制备

2.3.1. 介孔二氧化硅纳米粒子的制备

首先量取 188 mL 的去离子水和 52 mL 的无水乙醇加入到 500 mL 的烧瓶中,精密称量 0.5 g 的十六 烷基三甲基溴化铵(CTAB),将其充分分散在烧瓶中,在 40℃下搅拌(300 r/min)直至 CTAB 完全溶解;然 后加入 1.75 mL 的 2 mol/L 的 NaOH 溶液;最后缓慢的滴加 2.5 mL 的正硅酸四乙酯(TEOS)。将该混合溶

液在 40℃下搅拌 2 h 后取出离心,用去离子水冲洗 3 次,放入电鼓风干燥箱中 100℃下干燥 12 h。将干燥后的白色粉末放在马弗炉里 550℃下煅烧 5 h 以除去模板剂 CTAB,得到介孔二氧化硅纳米粒子(MSNs)。

2.3.2. 氨基化介孔二氧化硅纳米粒子的制备

精密称取 0.5 g MSNs 加入到 150 mL 无水乙醇中,超声使其充分分散后,加入 1 mL 的 3-(氨基丙基) 三乙氧基硅烷(APTES)在 40℃下连续搅拌 24 h。离心后用无水乙醇洗 3 次除去未反应的 APTES,放入真 空干燥箱中 40℃下干燥 12 h,得到氨基化介孔二氧化硅纳米粒子(NH₂-MSNs)。

2.3.3. 羧基化介孔二氧化硅纳米粒子的制备

精密称取 0.4 g 的 NH₂-MSNs 加入到 200 mL 乙醇溶液中,超声使其充分分散后,加入 1.2 g GA 在 37℃下连续搅拌 3 h。离心后用 0.1 mol/L 的 NaCl 溶液(0.1 mol/L)洗涤除去未反应的 GA,冷冻干燥得到 羧基化介孔二氧化硅纳米粒子(COOH-MSNs)。

2.4. 基于荧光 Si NPs 的复合纳米载体的制备

首先量取 45 mL 的去离子水(pH = 5.0)于 100 mL 的单口烧瓶中,加入 0.1 g N-羟基琥珀酰亚胺(NHS) 和 0.15 g 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)搅拌 5 min,然后加入 0.15 g 的 COOH-MSNs 继续搅拌 30 min 活化 MSNs 表面的羧基,最后将 20 mL 纯化后的 Si NPs 溶液加入到该体系中,室温(25℃) 下避光搅拌 24 h。冷冻干燥得到复合荧光纳米药物载体(Si NPs-MSNs)。

2.5. 复合荧光纳米药物载体(Si NPs-MSNs)的药物吸附性能测试

DOX 的装载采用浸渍法。取药物和载体比例分别为 1/10、3/10、5/10、7/10 和 10/10,用 PBS 配制 对应浓度的 DOX 溶液。按比例精密称取 Si NPs-MSNs 加入到对应的 DOX 溶液中,室温条件下避光缓慢 搅拌 24h 后,离心取上清液 5 mL 定容于 25 mL 的容量瓶中,通过紫外可见分光光度法在 480 nm 下对溶 液进行检测,测定溶液中 DOX 的剩余质量浓度,根据标准曲线对载药率和包封率进行计算。

$$LC(\%) = \frac{m_0 - m_1}{m_2} \times 100$$
(1)

$$EE(\%) = \frac{m_0 - m_1}{m_0} \times 100$$
 (2)

式中:

LC---载药率;

EE——包封率;

 m_0 ——溶液中 DOX 的初始量,g;

 m_1 ——平衡时溶液中 DOX 的量, g;

*m*₂——纳米载体的量,g。

2.6. 体外药物释放实验

用无水磷酸二氢钠和无水磷酸氢二钠配制 pH 值分别为 7.4、6.5 和 5.0 的 PBS 缓冲液。首先精确称 取三份 0.01 g 冻干后的 DOX@Si NPs-MSNs 放于分子截留量为 14000 的透析袋中, 然后各加入不同 PBS 缓冲液 3 mL, 分别置于 30 mL 的 pH = 7.4、pH = 6.5、pH = 5.0 的 PBS 缓冲液中进行体外药物释放,于 37℃持续搅拌,每隔一段时间(1.0, 2.0, 3.5, 5.0, 6.5, 8.0, 12.0, 24.0, 48.0, 72.0, 96.0 h)取出 4 mL 液体,同时 补加 4 mL 的原 pH 值的 PBS 缓冲液,以保持溶液的总体积不变。用紫外可见分光光度计在 DOX 的最大

吸收波长 480 nm 处对取出的液体进行吸光度值的测定,绘制 DOX 累计释放率与时间的曲线,以观察其 释药特性。

$$C_r(\%) = \frac{V_i \sum_{1}^{n-1} C_i + V_0 C_n}{m_0} \times 100$$
(3)

式中:

*C*_r——药物累积释药率;

 V_i ——补加液 PBS 的体积, mL;

n——取样的次数;

 C_i —一之前所取释放液中 DOX 的浓度, mg/L;

V0——整个释放体系的体积, mL;

C_n——所取释放溶液中 DOX 的浓度, mg/L;

*m*₀——载体中药物的质量, mg。

2.7. 复合纳米载体的体外溶血性实验

2.7.1.2%红细胞混悬液的配制

首先收集新鲜的 SD 雄性大鼠的血液 5 mL 到抗凝管中,加入适量的生理盐水后转移到离心管中,在 4℃条件下低速离心,弃去上清液后向离心管中再加入适量生理盐水混合均匀后离心,经多次洗涤至上清 液变得无色透明。最后吸取 0.5 mL 的红细胞加入 24.5 mL 生理盐水中配置成 2%的红细胞悬液。

2.7.2. 溶血实验

称取复合荧光纳米药物载体粉末,用 0.9%的生理盐水配制成浓度分别为 0.05、0.25、0.5、0.75 和 1 mg/mL 的混悬液,取 2 mL 的混悬液分别与 2 mL 的 2%的红细胞悬液(实验组)、生理盐水(阴性对照组)和 去离子水(阳性对照组)充分混合均匀,在 37℃条件下震荡 1 h 后,在 4℃下低速离心,取上清液在 541 nm 下测样品、阴性对照组和阳性对照组的吸光度,根据公式(4)计算溶血率(*HR*):

$$HR(\%) = \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{negative}}}{A_{\text{positive}} - A_{\text{negative}}} \times 100\%$$
(4)

式中:

 Asample
 —实验组上清液的吸光度;

 Anegative
 — 阴性对照组上清液的吸光度;

 Apositive
 — 阳性对照组上清液的吸光度。

2.8. 体外细胞毒性测定

取对数期生长的细胞将其稀释,并以每孔 100 µL 且含有 5×10³ 个细胞的量接种到 96 孔板中,没有 用到的孔加入等量无菌 PBS,放入培养箱中培养 24 h,再加入 100 µL 不同浓度(4、8、16、32、64、128、 200 µg/mL)用空白培养基稀释的纳米药物载体混悬液,并设有空白组和对照组,每个浓度设置 5 个复孔。 继续放入培养箱中培养 24 h 后,用新鲜的 PBS 溶液冲洗,每孔加入 100 µL 空白培养基和 20 µL 5mg/mL MTT 溶液,继续培养 4 h,移除培养液后在每孔中加入 150 µL 的 DMSO,振荡 4 min,用酶标仪在 490 nm 测定样品的 OD 值。按照公式(5)计算细胞存活率(CVR):

细胞存活率(%) =
$$\frac{OD_n - OD_0}{OD_a - OD_0} \times 100$$
 (5)

式中:

*OD*_{*a*}——实验组的吸光度值; *OD*_{*a*}——对照组的吸光度值; *OD*₀——空白组的吸光度值。

2.9. 体外细胞成像实验

取对数期生长的 HepG2 细胞将其稀释,并以每孔 500 μL 且含有 4 × 10⁴ 个细胞的量接种到 24 孔板中 (24 孔板加入了提前消毒好的玻片),没有用到的孔加入等量无菌 PBS,放入培养箱中培养 24 h 后,再加入 300 μL 不同浓度(50、100、150、200 μg/mL)用空白培养基稀释的纳米药物载体混悬液,并设置空白组,继 续放入培养箱培养 12 h;固定纳米药物载体混悬液的浓度为 200 μg/mL,培养时间分别为 3、6、9、12 h, 同样设置空白组,进行培养。培养结束后对细胞进行 DAPI 染色,在荧光倒置显微镜下观察荧光成像情况。

3. 结果与讨论

3.1. Si NPs 的合成与表征

3.1.1. Si NPs 的合成

图 1 是通过水热法制备黄色荧光 Si NPs 的示意图。



Figure 1. Schematic diagram of Si NPs prepared by hydrothermal method 图 1. 水热法制备 Si NPs 的示意图

3.1.2. Si NPs 合成条件优化

利用单一变量法,通过改变反应物剂量、反应时间和温度对 Si NPs 的合成条件进行优化。由图 2 可以 得到最佳的反应条件。由图 2(a)可以看出,固定硅源 DAMO 的用量为 2 mL,还原剂邻氨基苯酚的用量从 5 mg 增大到 50 mg 的过程中,当邻氨基苯酚的用量为 10 mg 时,合成的 Si NPs 的荧光强度较强,且荧光发 射波长较长;由图 2(b)可以看出,当反应时间从 10 min 逐渐增大到 35 min 的过程中,当反应时间为 20 min 时,合成的 Si NPs 的荧光强度最大;由图 2(c)可以看出,当反应温度从 90℃增大到 140℃的过程中,当反 应温度为 110℃时,合成的 Si NPs 的荧光强度最大。因此 Si NPs 的最佳合成条件为固定硅源 DAMO 的用 量为 2 mL,还原剂邻氨基苯酚的用量为 10 mg,反应时间和反应温度分别为 20 min 和 110℃。



Figure 2. Optimization of conditions for synthesizing Si NPs 图 2. 合成 Si NPs 的条件优化

3.1.3. Si NPs 的光学性质

图 3 中的曲线 a 是 Si NPs 的激发光谱,曲线 b 是其荧光发射光谱,从谱图可见,合成的 Si NPs 的最 佳激发波长为 450 nm,最佳发射波长为 580 nm。由图 3 中的插图可以看到,将合成的 Si NPs 溶液放在 紫外灯下照射,合成的 Si NPs 溶液发射黄色荧光,与其发射波长是一致的。



Figure 3. The optimal excitation spectrum (curve a) and emission spectrum (curve b) of Si NPs. Illustration: Luminescence of Si NPs solution under UV light irradiation

```
图 3. Si NPs 的最佳激发光谱图(曲线 a)与最佳发射光谱图(曲线 b)。插图: Si NPs 溶液在紫外灯照射下的发光图
```

3.1.4. Si NPs 的结构表征

对合成的 Si NPs 进行了粒径表征。图 4(a)为 Si NPs 的透射电镜图(TEM)。通过 TEM 可以看出,合成的 Si NPs 呈球形,且分散性良好。为了进一步分析 Si NPs 的粒径,我们对合成的 Si NPs 进行了动态光散射分析,由图 4(b)可知,Si NPs 的平均粒径为 2.3 nm。图 4(c)是 Si NPs 的红外光谱图,图中 1096 cm⁻¹和 1013 cm⁻¹对应 Si-O-Si 的伸缩振动; 3279 cm⁻¹处的峰对应 N-H 键的伸缩振动峰;在 2932 cm⁻¹和 1459 cm⁻¹分别与不饱和 C-H 伸缩振动和弯曲振动相关;1590 cm⁻¹和 761 cm⁻¹分别对应 N-H 弯曲和摇摆振动;在 1348 cm⁻¹弱吸收带是 C-N 的伸缩振动[24] [25]。以上结果表明,合成的 Si NPs 富含氨基。



Figure 4. Structural characterization of Si NPs. (a) TEM image, (b) particle size analysis, (c) FT-IR spectrum 图 4. Si NPs 的结构表征。(a) TEM 图, (b) 粒径分析, (c) FT-IR 谱图

3.2. MSNs 的结构表征

图 5(a),图 5(b)分别为 MSNs 的 TEM 和 SEM 图。由 TEM 图可以看出 MSNs 具有蠕虫状的孔道结构,说明 MSNs 的成功合成,其粒径为 200 nm。由 SEM 图可以看出 MSNs 在大尺度上是均匀分散且大小均一的球形纳米颗粒。图 5(c)为 MSNs 的小角 XRD 衍射谱图。可以观察到 MSNs 在 20 为 2.5°左右时,

具有明显的衍射峰,此衍射峰证明样品内存在高度均匀的介孔结构[26][27]。图 5(d)中的黑色、红色和蓝色曲线分别是 MSNs、NH2-MSNs 和 COOH-MSNs 的红外光谱图,黑色曲线中 1045 cm⁻¹ 和 440 cm⁻¹ 处对应 Si-O-Si 的不对称伸缩和弯曲振动峰,3748 cm⁻¹ 处对应 Si-OH 的特征峰[28][29];由红色曲线可以看到 3748 cm⁻¹ 处 Si-OH 的特征峰消失了,在 1635 cm⁻¹ 处出现 N-H 的伸缩振动峰,在 2980 cm⁻¹ 处出现 C-H 的对称伸缩振动峰[30]-[32],说明氨基成功接枝到介孔二氧化硅纳米粒子表面上;由蓝色曲线可以看到 出现的 1714 cm⁻¹ 是 C=O 伸缩振动、1635 cm⁻¹ 羧基 C-O 变形振动和 1408 cm⁻¹ 处 O-H 面内变形振动[33],说明 MSNs 的羧基改性成功。





Figure 5. Structural characterization of MSNs. (a) Small angle XRD spectra, (b) TEM and SEM images, (c) FT-IR image of the nanocarriers

图 5. MSNs 的结构表征。(a) 小角 XRD 谱图, (b) TEM 和 SEM 图, (c) 纳米载体的 FT-IR 图

3.3. Si NPs-MSNs 的制备和结构表征

3.3.1. Si NPs-MSNs 的制备和 DOX 的装载

图 6 是 Si NPs 和 COOH-MSNs 在偶联剂的作用下发生偶联反应及 DOX 的装载示意图。



Figure 6. Schematic diagram of the preparation of Si NPs MSNs and DOX loading 图 6. Si NPs-MSNs 的制备和 DOX 的装载示意图

3.3.2. Si NPs-MSNs 的结构表征

图 7(a)为 MSNs 和 Si NPs-MSNs 的小角 XRD 衍射图谱。黑色曲线是 MSNs 的 XRD 衍射, 红色曲线 是 Si NPs-MSNs 的 XRD 衍射, 仍能观察到 20 为 2.5°左右具有明显的衍射峰, 说明复合后的纳米药物载 体内依旧存在高度均匀的介孔结构。图 7(b)中黑色、红色和蓝色曲线分别是 COOH-MSNs、Si NPs 和 Si NPs-MSNs 的红外光谱图。蓝色曲线中 1635 cm⁻¹和 3382 cm⁻¹处出现 N-H 的伸缩振动峰; 1548 cm⁻¹ C-O 变形振动, Si NPs 与 COOH-MSNs 反应后, 在复合纳米药物载体中形成了 O=C-N 键, 且合成的复合纳米 药物载体表面有大量氨基[34], 证明 Si NPs 成功偶联到了 MSNs 上面, 制备得到了复合纳米药物载体 Si NPs-MSNs。



Figure 7. (a) Small angle XRD spectra of MSNs and Si NPs MSNs, (b) FT-IR plots of Si NPs-MSNs 图 7. (a) MSNs 和 Si NPs-MSNs 的小角 XRD 图谱, (b) Si NPs-MSNs 的 FT-IR 图

3.4. Si NPs-MSNs 的药物装载

由图 8(a)的全波长(200~800 nm)扫描可知 DOX 的最大吸收波长为 480 nm,在 480 nm 下测得 DOX 浓度与吸光度的对应关系,对所得数据进行拟合得到 DOX 的标准曲线,结果如图 8(b)所示,其中 A 为 吸光度; C 为 DOX 的质量浓度; R²为相关系数。结果表明,在浓度 15~40 mg/L 范围内, DOX 的浓度与 吸光度呈现良好的线性关系。



Figure 8. (a) UV Wavelength Scan of DOX, (b) Standard curve plot for DOX 图 8. (a) DOX 的紫外波长扫描图 DOX 的标准曲线绘制, (b) DOX 的标准曲线图 通过紫外可见分光光度法在 480 nm 下对溶液进行检测,测定溶液中 DOX 的剩余质量浓度。由表 1 可知,DOX 通过浸渍 24 h 后,最佳的药物/载体质量比为 3/10,由式(1)、式(2)计算得出纳米药物载体的载药率和包封率分别为 23.08%和 76.94%。

不同药物/载体质量比 载药率 包封率 1/10 14.93% 48.16%
1/10 14.93% 48.16%
3/10 23.08% 76.94%
5/10 28.58% 57.16%
7/10 20.78% 66.59%
10/10 21.17% 60.71%

 Table 1. Effect of different drug/carrier mass ratios on drug loading and encapsulation rates

 表 1. 不同的药物/载体质量比对载药率和包封率的影响

3.5. 体外药物释放实验

由于肿瘤细胞部位的值比正常组织细胞的 pH 值低,细胞内涵体和溶酶体的 pH 值在 5.0~6.5 之间,因此本研究考察了不同 pH 值下 Si NPs-MSNs 的体外药物释放性能。由图 9 可知在 pH 为 7.4 的 PBS 缓 冲溶液中,Si NPs-MSNs 的药物释放速度较慢,累计释放率为 44.92%;当在 pH 为 6.5 的 PBS 缓冲溶液中,药物累计释放率可达 50.54%;随着 pH 的降低药物累计释放率有所提升,当在 pH 为 5.0 的 PBS 缓 冲溶液中,药物累计释放率可达 73.46%。由此可见,随着 pH 的降低,促进了药物的释放。这是由于在酸性介质中,静电吸引力被破坏[35] [36],导致 DOX 从 Si NPs-MSNs 的孔隙中释放出来。因此制备的 Si NPs-MSNs 具有 pH 响应性,这种特性能更好的使滞留在组织细胞的药物快速释放发挥肿瘤抑制作用。



Figure 9. Release profiles of Si NPs-MSNs at different pH. (a) pH = 7.4; (b) pH = 6.5; (c) pH = 5.0 图 9. 不同 pH 下 Si NPs-MSNs 的释药曲线图。(a) pH = 7.4; (b) pH = 6.5; (c) pH = 5.0

3.6. 体外溶血和细胞毒性实验

为了评估复合纳米药物载体的生物安全性,进行了体外溶血实验。根据规定,所制备的材料的溶血 率低于 2%时,材料为可视为无毒;溶血率在 2%~5%之间时,材料的毒性较低;当溶血百分比大于 5%时, 毒性较高,不适合进行生物应用。图 10(a)是复合纳米药物载体溶血率,可以看出当复合纳米药物载体浓度在 0.05~1 mg/mL 范围内,溶血率均低于 5%,说明该复合纳米药物载体具有较好的生物相容性。MTT 法检测纳米药物载体(MSNs)、复合纳米药物载体(Si NPs-MSNs)和装载了 DOX 的复合纳米药物载体 (DOX@Si NPs-MSNs)对 HepG2 细胞的细胞毒性。如图 10(b)所示,细胞存活率在每个时间点均显示出剂量依赖性。MSNs 组和 Si NPs-MSNs 组与对照组相比,在浓度达到 200 μg/mL 时,细胞的存活率均在 90% 以上,说明在 0~200 μg/mL 浓度范围内 MSNs 和 Si NPs-MSNs 的细胞毒性较小,生物安全性良好。与血液相容性实验结果一致,证明纳米药物载体有较好的生物相容性。







通过图 10(b),可以看到 DOX@Si NPs-MSNs 组与 MSNs 组和 Si NPs-MSNs 组相比细胞存活率明显 下降,证明 DOX@Si NPs-MSNs 对 HepG2 细胞有杀伤作用。这也证明了我们制备的装载了 DOX 的复合 纳米药物载体对 HepG2 细胞有治疗作用。为了进一步证明 DOX @Si NPs-MSNs 对 HepG2 细胞治疗效 果,我们进行了对比实验。如图 11 所示,在保证所含 DOX 浓度相同的情况下,用不同浓度梯度的游离



Figure 11. Relative survival of DOX and DOX-loaded composite nanocarriers after 24 h of co-culture with cells 图 11. DOX 和载 DOX 的复合纳米载体与细胞共同培养的 24 h 后的相对存活率

DOX 和 DOX@Si NPs-MSNs 分别去培养细胞,发现随着 DOX 浓度增大,细胞存活率逐渐下降,并且两者的存活率下降程度基本一致。进一步证明了 DOX @Si NPs-MSNs 对 HepG2 细胞有杀伤作用,具有对肿瘤细胞进行治疗的潜力。

3.7. 体外细胞成像实验

为了验证 Si NPs-MSNs 的荧光成像效果,我们用 Si NPs-MSNs 对 HepG2 细胞进行孵育 12 h 后观察 细胞形态。在用不同浓度的 Si NPs-MSNs 孵育 12 h 后,如图 12 所示并没有发现细胞形状的明显变化, 说明了 Si NPs-MSNs 具有较小的细胞毒性。在 HepG2 细胞成像中,如图 12(a)~(e),在 Si NPs-MSNs 实验 组中的细胞在 480 nm 激发光照射下显示出黄色荧光,并且随着剂量的增加荧光信号呈依赖性模式增强。 Si NPs-MSNs 荧光成像图和 DAPI 染色后的细胞核荧光成像图合并后,如图 12(a'')~(e'')所示,可以看出 Si NPs-MSNs 成功进入 HepG2 细胞中,并主要集中位于细胞核周围的细胞质中。



Figure 12. Fluorescence photographs of HepG2 cells after incubation in DMEM medium containing 0, 50, 100, 150 and 200 μg/mL of Si NPs-MSNs for 12 h. Yellow fluorescence photographs of Si NPs-MSNs in HepG2 cells (a)~(e), blue fluorescence photographs of nuclei stained with DAPI (a')~(e') and merged images (a")~(e"). Scale bar: 100 μm **212.** HepG2 细胞在含 0、50、100、150 和 200 μg/mL 的 Si NPs-MSNs 的 DMEM 培养基中孵育 12 h 后的荧光照片。 HepG2 细胞中 Si NPs-MSNs 的黄色荧光照片(a)~(e)、用 DAPI 染色的细胞核的蓝色荧光照片(a')~(e')和合并的图像 (a")~(e")。比例尺: 100 μm

我们又继续用浓度为 200 μg/mL 的 Si NPs-MSNs 混悬液对 HepG2 细胞进行不同时间的孵育。从 图 13 可以看出在不同孵育时间(3、6、9 和 12 h)下,随着孵育时间的增加,进入细胞质中的 Si NPs-MSNs 逐渐增多,荧光亮度逐渐增强。这些结果不仅说明了 Si NPs-MSNs 的低毒性,而且还证明了 Si NPs-MSNs 可以通过内吞作用逐渐进入细胞中。结合细胞存活率实验的结果,可以看到 Si NPs-MSNs 在 HepG2 细胞中可以呈现出良好的荧光成像效果,证明我们制备的 Si NPs-MSNs 可用于体外生物成 像。



Figure 13. Fluorescence photographs of 200 μg /mL Si NPs-MSNs suspension after co-incubation with HepG2 cells at different time points (3, 6, 9, and 12 h). yellow fluorescence photographs of Si NPs-MSNs (a)~(e), blue fluorescence photographs of nuclei stained with DAPI (a')~(e'), and their merged images (a'')~(e''). Scale bar: 100 μm 图 13. 200 μg /mL Si NPs-MSNs 混悬液与 HepG2 细胞共孵育后不同时间点(3、6、9和12h)的荧光照片。Si NPs-MSNs 的黄色荧光照片(a)~(e), 用 DAPI 染色的核的蓝色荧光照片(a')~(e'), 以及它们的合并图像(a'')~(e'')。比例尺: 100 μm

4. 结论

采用水热法制备出能够发射黄色荧光的 Si NPs,采用溶胶一凝胶法合成介孔二氧化硅纳米粒子;将 Si NPs 和功能化 MSNs 连接,制备出基于 Si NPs 的 pH 响应型复合纳米药物载体 Si NPs-MSNs。选用盐 酸阿霉素(DOX)作为药物模型研究了 Si NPs-MSNs 的载药和释药行为。结果表明,该 pH 响应型复合纳 米药物载体的载药率和包封率较高,并且在模拟肿瘤组织环境下的释药速率明显快于在正常组织环境下 的释药速率,对肿瘤的荧光成像和治疗有着潜在的应用价值。MTT 和体外 HepG2 细胞成像实验,不仅说 明了 Si NPs-MSNs 的低毒性,以及装载药物后对肿瘤细胞的杀伤作用,而且还证明了 Si NPs-MSNs 可以 进入细胞呈现出良好的荧光成像效果,因此我们制备的 Si NPs-MSNs 具有对肿瘤细胞进行诊断和治疗的 潜力。该研究为制备长波长荧光发射 Si NPs 提供了理论方法,并且为 Si NPs 在活体内进行荧光成像提供 了可能性,同时为 MSNs 在生物领域的进一步应用提供了理论基础和研究思路。

致 谢

感谢河北省自然科学基金青年基金项目(nos B2024209021)和河北省教育厅科学研究项目——河北省省属高校基本科研业务费研究项目(JQN2021036)对本研究提供的资助。

基金项目

河北省自然科学基金青年基金项目(nos B2024209021),河北省教育厅科技项目 - 河北省省属高校基本科研业务费研究项目(JQN2021036)。

参考文献

- Cui, K., Chang, Y., Liu, P., Yang, L., Liu, T., Zheng, Z., Guo, Y. and Ma, X. (2020) Cell-Tailored Silicon Nanoparticles with Ultrahigh Fluorescence and Photostability for Cellular Imaging. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 47, 17439-17446. <u>https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c05845</u>
- [2] Pan, C., Wen, Q., Ma, L., Qin, X. and Feng, S. (2022) Green-Emitting Silicon Nanoparticles as a Fluorescent Probe for Highly-Sensitive Crocin Detection and pH Sensing. *New Journal of Chemistry*, 46, 12729-12738. <u>https://doi.org/10.1039/d2nj00690a</u>
- [3] Han, Y., Wang, Y., Liu, X., Chen, J. and Qiu, H. (2021) Green- and Red-Emitting Fluorescent Silicon Nanoparticles: Synthesis, Mechanism, and Acid Phosphatase Sensing. ACS Applied Bio Materials, 5, 295-304. https://doi.org/10.1021/acsabm.1c01086
- [4] Pan, C., Qin, X., Lu, M. and Ma, Q. (2023) Green Synthesis of Yellow-Green Emissive Silicon Nanoparticles and Their Application for the Sensitive Fluorescence Detection of Bilirubin. *Analytical Methods*, 15, 3034-3042. https://doi.org/10.1039/d3ay00421j
- [5] Bai, Y., Su, Q., Xiao, J., Feng, F. and Yang, X. (2020) Exploration of Synthesizing Fluorescent Silicon Nanoparticles and Label-Free Detection of Sulfadiazine Sodium. *Talanta*, **220**, Article 121410. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121410
- [6] Luo, L., Song, Y., Zhu, C., Fu, S., Shi, Q., Sun, Y., et al. (2018) Fluorescent Silicon Nanoparticles-Based Ratiometric Fluorescence Immunoassay for Sensitive Detection of Ethyl Carbamate in Red Wine. Sensors and Actuators B: Chemical, 255, 2742-2749. <u>https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.09.088</u>
- [7] Wang, R., Zhao, M., Deng, D., Ye, X., Zhang, F., Chen, H., et al. (2018) An Intelligent and Biocompatible Photosensitizer Conjugated Silicon Quantum Dots-MnO₂ Nanosystem for Fluorescence Imaging-Guided Efficient Photodynamic Therapy. Journal of Materials Chemistry B, 6, 4592-4601. <u>https://doi.org/10.1039/c8tb00931g</u>
- [8] Duan, Q., Zhao, Z., Zhang, Y., Fu, L., Yuan, Y., Du, J., et al. (2023) Activatable Fluorescent Probes for Real-Time Imaging-Guided Tumor Therapy. Advanced Drug Delivery Reviews, 196, Article 114793. https://doi.org/10.1016/i.addr.2023.114793
- [9] Ci, Q., Wang, Y., Wu, B., Coy, E., Li, J.J., Jiang, D., et al. (2023) Fe-Doped Carbon Dots as NIR-II Fluorescence Probe for *in Vivo* Gastric Imaging and pH Detection. Advanced Science, 10, Article 2206271. https://doi.org/10.1002/advs.202206271
- [10] Ye, H., He, X., Li, W. and Zhang, Y. (2022) Two-Photon-Excited Tumor Cell Fluorescence Targeted Imaging Based on Transferrin-Functionalized Silicon Nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 267, Article 120450. <u>https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120450</u>
- [11] Na, M., Han, Y., Chen, Y., Ma, S., Liu, J. and Chen, X. (2021) Synthesis of Silicon Nanoparticles Emitting Yellow-Green Fluorescence for Visualization of pH Change and Determination of Intracellular pH of Living Cells. *Analytical Chemistry*, 93, 5185-5193. <u>https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c05107</u>
- [12] Ma, Y., Li, S., Qin, Y., He, X., Li, W. and Zhang, Y. (2023) Multimode Sensing Platform Based on Turn-on Fluorescent Silicon Nanoparticles for Monitoring of Intracellular pH and GSH. *Analytical Chemistry*, 95, 6664-6671. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c00171
- [13] Djayanti, K., Maharjan, P., Cho, K.H., Jeong, S., Kim, M.S., Shin, M.C., *et al.* (2023) Mesoporous Silica Nanoparticles as a Potential Nanoplatform: Therapeutic Applications and Considerations. *International Journal of Molecular Sciences*, 24, Article 6349. <u>https://doi.org/10.3390/ijms24076349</u>
- [14] Feng, Y., Liao, Z., Li, M., Zhang, H., Li, T., Qin, X., et al. (2023) Mesoporous Silica Nanoparticles-Based Nanoplatforms: Basic Construction, Current State, and Emerging Applications in Anticancer Therapeutics. Advanced Healthcare Materials, 12, Article 2201884. <u>https://doi.org/10.1002/adhm.202201884</u>
- [15] Ramezanian, S., Moghaddas, J., Roghani-Mamaqani, H. and Rezamand, A. (2023) Dual pH- and Temperature-Responsive Poly(Dimethylaminoethyl Methacrylate)-Coated Mesoporous Silica Nanoparticles as a Smart Drug Delivery System. *Scientific Reports*, 13, Article No. 20194. <u>https://doi.org/10.1038/s41598-023-47026-7</u>
- [16] Xu, B., Li, S., Shi, R. and Liu, H. (2023) Multifunctional Mesoporous Silica Nanoparticles for Biomedical Applications. Signal Transduction and Targeted Therapy, 8, Article No. 435. <u>https://doi.org/10.1038/s41392-023-01654-7</u>
- [17] Chircov, C., Spoială, A., Păun, C., Crăciun, L., Ficai, D., Ficai, A., et al. (2020) Mesoporous Silica Platforms with Potential Applications in Release and Adsorption of Active Agents. *Molecules*, 25, Article 3814. https://doi.org/10.3390/molecules25173814
- [18] Giret, S., Wong Chi Man, M. and Carcel, C. (2015) Mesoporous-Silica-Functionalized Nanoparticles for Drug Delivery. *Chemistry—A European Journal*, 21, 13850-13865. <u>https://doi.org/10.1002/chem.201500578</u>
- [19] Bharti, C., Gulati, N., Nagaich, U. and Pal, A. (2015) Mesoporous Silica Nanoparticles in Target Drug Delivery System:

A Review. International Journal of Pharmaceutical Investigation, **5**, 124-133. https://doi.org/10.4103/2230-973x.160844

- [20] Li, Z., Zhang, Y. and Feng, N. (2019) Mesoporous Silica Nanoparticles: Synthesis, Classification, Drug Loading, Pharmacokinetics, Biocompatibility, and Application in Drug Delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 16, 219-237. https://doi.org/10.1080/17425247.2019.1575806
- [21] Chang, J., Mo, L., Song, J., Wang, X., Liu, H., Meng, C., et al. (2022) A pH-Responsive Mesoporous Silica Nanoparticle-Based Drug Delivery System for Targeted Breast Cancer Therapy. Journal of Materials Chemistry B, 10, 3375-3385. <u>https://doi.org/10.1039/d1tb02828f</u>
- [22] Feng, D., Wang, J., Gao, P., Gu, D., Li, W., Shi, L., et al. (2023) Synergic Fabrication of Folic Acid-Targeted Hyperbranched Polymer (HBP)-Modified pH-Response Drug Delivery System for the Treatment of Breast Cancer. Process Biochemistry, 130, 191-202. <u>https://doi.org/10.1016/j.procbio.2023.03.020</u>
- [23] Rui, Q., Yin, Z., Cai, W., Li, J., Wu, D. and Kong, Y. (2022) Hyaluronic Acid Encapsulated Aminated Mesoporous Silica Nanoparticles for pH-Responsive Delivery of Methotrexate and Release Kinetics. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 43, 650-657. <u>https://doi.org/10.1002/bkcs.12499</u>
- [24] Dou, Y., Shang, Y., He, X., Li, W., Li, Y. and Zhang, Y. (2019) Preparation of a Ruthenium-Complex-Functionalized Two-Photon-Excited Red Fluorescence Silicon Nanoparticle Composite for Targeted Fluorescence Imaging and Photodynamic Therapy in Vitro. ACS Applied Materials & Interfaces, 11, 13954-13963. <u>https://doi.org/10.1021/acsami.9b00288</u>
- [25] Nsanzamahoro, S., Wang, W., Zhang, Y., Shi, Y. and Yang, J. (2021) Synthesis of Orange-Emissive Silicon Nanoparticles as "off-on" Fluorescence Probe for Sensitive and Selective Detection of L-Methionine and Copper. *Talanta*, 231, Article 122369. <u>https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122369</u>
- [26] Vogt, B.D., Pai, R.A., Lee, H., Hedden, R.C., Soles, C.L., Wu, W., et al. (2005) Characterization of Ordered Mesoporous Silica Films Using Small-Angle Neutron Scattering and X-Ray Porosimetry. *Chemistry of Materials*, 17, 1398-1408. <u>https://doi.org/10.1021/cm048654k</u>
- [27] Nguyen, N.H., Truong-Thi, N., Nguyen, D.T.D., Ching, Y.C., Huynh, N.T. and Nguyen, D.H. (2022) Non-Ionic Surfactants as Co-Templates to Control the Mesopore Diameter of Hollow Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery Applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 655, Article 130218. <u>https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.130218</u>
- [28] Chen, A., Mu, H., Zuo, C. and Chen, Y. (2019) Fabrication, Characterization, and CMP Performance of Dendritic Mesoporous-Silica Composite Particles with Tunable Pore Sizes. *Journal of Alloys and Compounds*, 770, 335-344. <u>https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2018.08.173</u>
- [29] Wang, J., Yang, L., Xie, J., Wang, Y. and Wang, T. (2020) Surface Amination of Silica Nanoparticles Using Tris(Hydroxymethyl)Aminomethane. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 59, 21383-21392. <u>https://doi.org/10.1021/acs.iecr.0c04346</u>
- [30] Du, X. and He, J. (2011) Hierarchically Mesoporous Silica Nanoparticles: Extraction, Amino-Functionalization, and Their Multipurpose Potentials. *Langmuir*, 27, 2972-2979. <u>https://doi.org/10.1021/la200014w</u>
- [31] Wang, Y., Ke, J., Gou, K., Guo, Y., Xu, X., Li, S., et al. (2020) Amino Functionalized Mesoporous Silica with Twisted Rod-Like Shapes: Synthetic Design, in Vitro and in Vivo Evaluation for Ibuprofen Delivery. Microporous and Mesoporous Materials, 294, Article 109896. <u>https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2019.109896</u>
- [32] Gao, F., Zhou, H., Shen, Z., Zhu, G., Hao, L., Chen, H., et al. (2020) Long-Lasting Anti-Bacterial Activity and Bacteriostatic Mechanism of Tea Tree Oil Adsorbed on the Amino-Functionalized Mesoporous Silica-Coated by PAA. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 188, Article 110784. <u>https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110784</u>
- [33] Jeong, W., Jo, S., Park, J., Kwon, B., Choi, Y., Chae, A., et al. (2018) Hydrothermal Synthesis of Fluorescent Silicon Nanoparticles Using Maleic Acid as Surface-Stabilizing Ligands. *Journal of Materials Science*, 53, 2443-2452. <u>https://doi.org/10.1007/s10853-017-1712-3</u>
- [34] Li, J., Du, X., Zheng, N., Xu, L., Xu, J. and Li, S. (2016) Contribution of Carboxyl Modified Chiral Mesoporous Silica Nanoparticles in Delivering Doxorubicin Hydrochloride *in Vitro*: pH-Response Controlled Release, Enhanced Drug Cellular Uptake and Cytotoxicity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 141, 374-381. <u>https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.02.009</u>
- [35] 曾勇珠, 郭魏, 张裕彦, 等. 星点设计-效应面法优化 pH 值依赖型岩黄连碱口服结肠靶向纳米粒[J]. 中草药, 2024, 55(6): 1935-1945.
- [36] Teno, J., Pardo-Figuerez, M., Figueroa-Lopez, K.J., Prieto, C. and Lagaron, J.M. (2022) Development of Multilayer Ciprofloxacin Hydrochloride Electrospun Patches for Buccal Drug Delivery. *Journal of Functional Biomaterials*, 13, Article 170. <u>https://doi.org/10.3390/jfb13040170</u>