

硅酸铜空心球纳米药物载体的合成及应用研究

秦茜茹, 于立策, 杨佳文, 景丹妮, 汪 洋*

南通大学化学化工学院, 江苏 南通
Email: *ywang85@ntu.edu.cn

收稿日期: 2021年6月30日; 录用日期: 2021年7月30日; 发布日期: 2021年8月6日

摘 要

目的: 一种新型的基于硅酸铜空心纳米球的纳米载体被设计出来用于抗癌药物DOX的递送, 并对其结构、性能以及细胞毒性进行了研究。方法: 通过“自牺牲模板”的方法, 利用二氧化硅纳米球作为模板, 经过一步水热合成法制备了硅酸铜。通过SEM、TEM、Zeta电位、紫外吸收光谱和红外光谱对其形貌、结构以及表面特性等进行了表征。结果: 合成的硅酸铜纳米颗粒的形貌是类似海胆状的空心球, 且球的平均直径约为210 nm, 表面电荷为-18.5 mV。由于其空心结构使得负载DOX的量达到了10 wt%。结论: 在本研究中, 通过模板法合成了硅酸铜空心纳米球并负载DOX后, 实现了对pH响应性的可控释放。细胞毒性结果表明, 相对于单独的DOX, 纳米载体负载后能显著提高其肿瘤治疗效果。

关键词

硅酸铜, 水热合成, 药物递送, 可控释放, 纳米药物

Study on Application and Synthesis of Hollow Copper Silicate Nanosphere-Based Nano-Drug Carrier

Xiru Qin, Lice Yu, Jiawen Yang, Danni Jing, Yang Wang*

School of Chemistry and Chemical Engineering, Nantong University, Nantong Jiangsu
Email: *ywang85@ntu.edu.cn

Received: Jun. 30th, 2021; accepted: Jul. 30th, 2021; published: Aug. 6th, 2021

Abstract

Purpose: A novel nanocarrier based on copper silicate hollow spheres was rationally designed for delivery of anticancer drug of DOX, and its structure, performance, and cell toxicity was studied.

*通讯作者。

文章引用: 秦茜茹, 于立策, 杨佳文, 景丹妮, 汪洋. 硅酸铜空心球纳米药物载体的合成及应用研究[J]. 纳米技术, 2021, 11(3): 117-123. DOI: 10.12677/nat.2021.113015

Method: Copper silicate was synthesized via the “self-sacrificing template” approach by using silica nanospheres as the templates with one-pot hydrothermal method. The morphology, structure, and surface characteristics have been studied through SEM, TEM, Zeta potential, UV-vis and FTIR. **Results:** The morphology of the synthesized copper silicate is similar to the urchin-like hollow sphere with the average diameter of 210 nm, and the surface charge is about -18.5 mV. **Conclusion:** In this study, copper silicate hollow nanospheres were synthesized by template method and loaded with DOX drugs to achieve a controlled release in response to pH. The results of cell cytotoxicity indicated that the nanocarrier showed a significantly therapeutic efficacy in comparison with free DOX.

Keywords

Copper Silicate, Hydrothermal Synthesis, Drug Delivery, Controlled Release, Nanomedicine

Copyright © 2021 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/>



Open Access

1. 引言

近年来, 基于纳米药物载体用于提高抗肿瘤药物的治疗效果方面的研究受到了广泛的关注[1]。相对于传统的化疗方式采用直接注射的方法, 基于纳米载体的药物体系的化疗具有明显的优势, 如: 纳米载体能够通过肿瘤部位的丰富的血管组织渗透并富集[1]; 能够通过胞吞作用将纳米药物递送到细胞内, 克服肿瘤细胞的耐药性[2]; 通过纳米载体能够大大延长纳米药物在体内的循环时间, 实现高效的治疗[3]; 通过设计可实现对抗肿瘤药物的可控释放等[4] [5]。国内外的学者在开发新型的靶向纳米药物载体上都取得了一定的研究进展, 大量的纳米载体被合成出来, 如超顺磁性的铁氧化物、金基的纳米颗粒、碳基纳米材料、介孔二氧化硅等[6]-[11], 而且由于这些纳米材料的特性不仅可作为纳米药物载体还可以用于生物成像、核磁共振成像、光热治疗等应用。然而, 这些纳米载体仍然存在着很多的缺点, 如合成过程比较繁琐、成本比较高、生物不可降解、易在体内累积存在长期的毒性等问题, 因此限制了这些纳米载体的广泛使用。因此, 发展一种简单、廉价、普适、绿色的合成方法制备低毒、高生物相容性的、高效的、智能肿瘤靶向的纳米药物载体具有非常重要的现实意义。

由于其具有较大的比表面积、可调的孔径、高的负载率和可控的药物释放, 空心结构的纳米材料可被广泛应用于纳米生物医学领域[12] [13] [14] [15]。基于此, 在本研究中利用二氧化硅(SiO_2)作为模板, 采用“自牺牲模板”的方法, 得到了一种具有海胆状的硅酸铜(CuSiO_3)的空心纳米球。利用其内部空心结构负载抗癌药物阿霉素(DOX), 通过胞吞方式将药物递送到肿瘤细胞内, 且实现了对肿瘤微环境响应的可控释放过程, 显著提高了化疗药物的治疗效果。该纳米载体的成功制备可为设计合成具备空心结构载体提供了一种新的思路, 而且有望实现在纳米医学领域的潜在应用。

2. 实验部分

2.1. 仪器与试剂

扫描电子显微镜(ZEISS Gemini SEM 300); 透射电子显微镜(Talos F200X); 紫外-可见吸收光谱(UV-Vis); 傅立叶变换红外光谱仪(FTIR); 马尔文粒径电位分析仪; 荧光显微镜(Leica TCS SP8)。

无水乙醇, 氨水, 硅酸四乙酯(TEOS), 三水合硝酸铜, 盐酸阿霉素(DOX), mPEG-silane (Mw = 5000), PBS 缓冲溶液等均为分析纯购买自上海阿拉丁试剂有限公司; 实验所用均为去离子水。

2.2. CuSiO₃-PEG@DOX 纳米载药体系的构建

2.2.1. 硅酸铜空心球的合成

190 nm 左右的二氧化硅纳米球采用经典的 Stöber 方法合成的。接着, 将 0.7 mmol Cu(NO₃)₂·3H₂O 和 1 mL 氨水混合到 30 mL 去离子水中, 置于圆底烧瓶中。取上述合成的二氧化硅(70 mg)均匀分散在 20 mL 的去离子水中并超声 5 min。将以上两种均匀溶液进行混合, 并磁力搅拌 20 min, 接着将混合溶液转移到 100 mL 的高压反应釜中, 放入预热的烘箱里, 置于 140℃ 下进行反应 10 h。待反应完成后, 离心收集产物, 用去离子水和乙醇各洗涤三次, 保存在 50 mL 的无水乙醇中。对所得到的产物的其结构、形貌进行 SEM、TEM、红外光谱、紫外可见光谱等表征。

2.2.2. 硅酸铜表面 PEG 修饰及负载 DOX

将上述合成的硅酸铜的乙醇溶液中加入 1 mL 的氨水和 100 mg 的 mPEG-silane, 在氮气保护下 70℃ 回流 12 h。反应结束后, 离心收集产物并用乙醇和水洗涤多次, 最后分散在去离子水中。

取一定量的 CuSiO₃-PEG 加到 DOX 的溶液(1 mg/mL)中, 常温下避光搅拌 24 h 后, 离心收集产品, 并用去离子水洗涤。并通过紫外可见吸收光谱测定负载前后 DOX 溶液的吸光度, 并通过标准的 DOX 的吸光度与浓度曲线, 计算出 CuSiO₃-PEG 负载 DOX 的量约为 10 wt%。DOX 药物负载量计算公式: DOX 负载量 = $(W_{\text{加入的 DOX 质量}} - W_{\text{未负载的 DOX 质量}}) / W_{\text{CuSiO}_3\text{-PEG@DOX}}(\%)$ 。

2.2.3. DOX 药物释放

一定量的 CuSiO₃-PEG@DOX 分散在不同 pH 值的 PBS 缓冲溶液中(pH = 4.5, 6.0, 7.2), 在室温条件下磁力轻微搅拌, 每隔 1 h 取一定量的溶液并离心收集上清液, 通过紫外可见光谱测定其吸光度。对照 DOX 标准曲线计算其释放的含量。

2.2.4. 细胞毒性试验

Hep-G2 肿瘤细胞安排每个孔 1×10^6 个细胞浓度分散到培养液中, 接着取 200 μL 培养液分别加入到 96 孔板中, 在 37℃ 下 5% 的 CO₂ 条件下培养 24 h。接着每个孔中加入不同浓度的 CuSiO₃-PEG, DOX, CuSiO₃-PEG@DOX 进行培养。继续培养 24 h 后, 加入新鲜的含有 5 mg/mL 的 MTT 的 DMED 溶液, 并孵育 4 h。除去上清液并加入 150 μL 的 DMSO 溶剂并震荡 10 min 后, 用酶标仪测定。

3. 结果与讨论

3.1. 硅酸铜空心球的形貌与结构表征

二氧化硅纳米球是通过硅酸四乙酯在碱性条件下水解得到的(经典的 Stöber 合成法) [16]。从图 1(a) 中的 SEM 电镜图片可以看出, 合成的 SiO₂ 分散非常均匀的纳米球, 且直径约为 190 nm。利用二氧化硅小球作为模板, 经过一步水热法得到了硅酸铜。如图 1(a)和图 1(b)中 TEM 电镜图片所示, 得到的 CuSiO₃ 是分散相对比较均匀的纳米球, 进一步放大图片可以清晰看出合成的 CuSiO₃ 纳米球是内部空心的结构, 且外壳是由纳米片组装而成的类似海胆形状貌。相对于 SiO₂ 纳米球, CuSiO₃ 纳米球的直径由略微的增大约为 200 nm 左右, 这与图 2(a)中的 DLS 分析结果是一致的。空心纳米球的元素组成用 X-射线能谱元素分析进一步确认。如图 1(d)中所示, STEM-HAADF 图片揭示了合成的纳米球是空心结构且外壳呈现出分级结构。元素分析表明, Cu、Si、O 三种元素均匀分布在纳米球的外壳上。合成的纳米球用 XRD 表征了其晶体结构, 如图 2(b)所示, 对照标准的硅酸铜卡片(JCPDS 03-0219), 合成的产物的 XRD 与标准卡片基

本上吻合,证明了产物为 CuSiO_3 [17]。但是从 XRD 图片也可以看出合成的产物 CuSiO_3 的结晶性比较差。此外,从红外图谱上也可以看出,对比二氧化硅反应前后红外光谱发现,反应后产物在 957 cm^{-1} 和 800 cm^{-1} 处的吸收峰消失了,而 1090 cm^{-1} 处的吸收峰则发生了迁移,这可能是由于形成了 Si-O-Cu 键而导致的[18]。通过以上的结构与物相以及元素分析结果表明合成的产物是 CuSiO_3 空心纳米球。

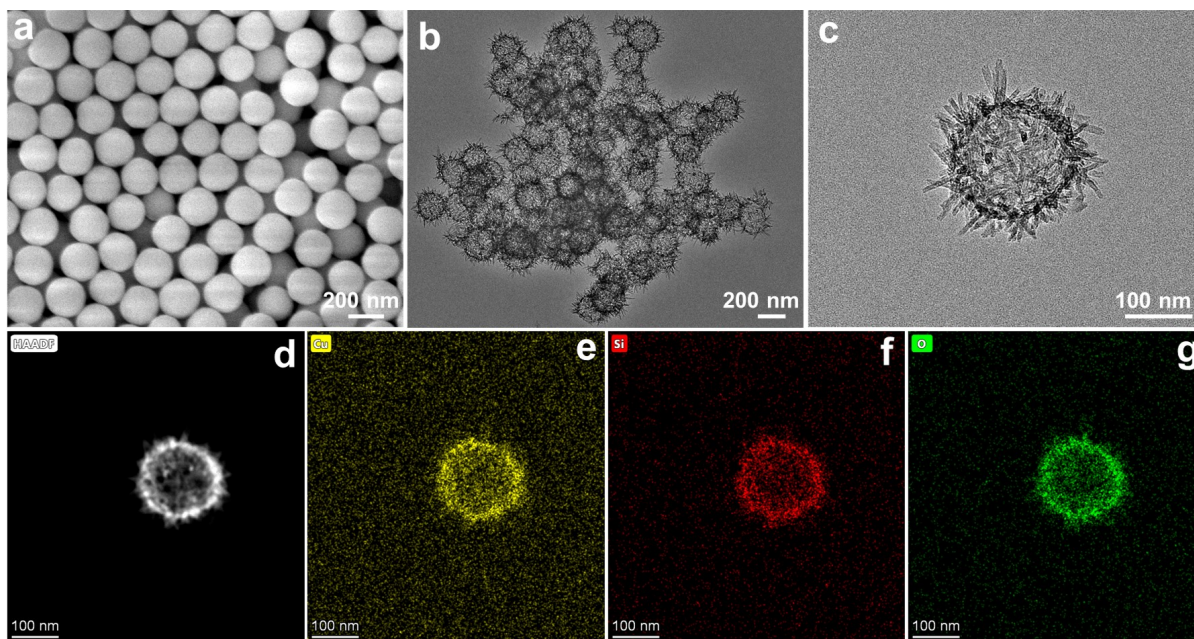


Figure 1. (a) SEM image of SiO_2 nanospheres; (b) TEM image of CuSiO_3 hollow nanospheres; (c) partial high-magnification image of b; (d) STEM-HAADF and element mapping images of image of CuSiO_3 hollow nanospheres: (e) Cu element; (f) Si element; (g) O element

图 1. (a) SiO_2 纳米球的 SEM 图片; (b) CuSiO_3 空心纳米球的 TEM 图片; (c) 图片 b 的部分放大图; (d) CuSiO_3 空心球的 STEM-HAADF 和元素分布图片: (e) Cu 元素; (f) Si 元素; (g) O 元素

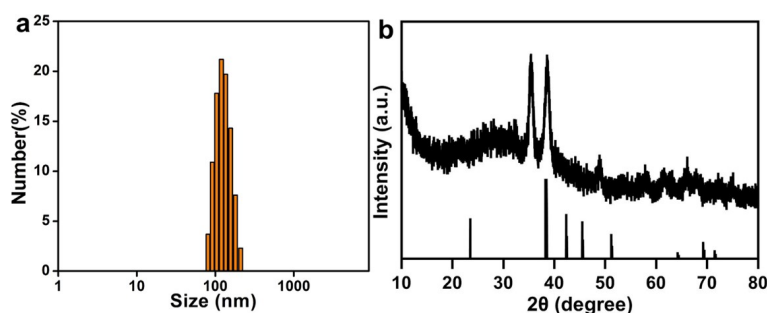


Figure 2. (a) DLS of CuSiO_3 hollow nanospheres; (b) XRD pattern of CuSiO_3

图 2. (a) CuSiO_3 空心球的 DLS 图谱; (b) CuSiO_3 的 XRD 谱图

3.2. DOX 药物释放

为了提高 CuSiO_3 纳米球的生物相容性,生物性高分子 PEG 被修饰到了其表面,从图 3(c)中纳米载体的 Zeta 电位的变化可以看出, CuSiO_3 -PEG 被成功地合成出来。由于具备空心结构,合成的 CuSiO_3 纳米球可以作为抗癌药物 DOX 的载体用于体内的药物递送。 CuSiO_3 纳米球加入到 DOX 的溶液中通过物理吸附将药物负载到纳米载体上,利用紫外可见光谱测试表明, CuSiO_3 纳米载体负载 DOX 的含量可达到 10 wt% (图 3(b))。负载药物后, Zeta 电位也发生了明显的变化,这也证明了抗癌药物 DOX 被成功地负载到了 CuSiO_3

纳米载体上(图 3(c))。我们进一步研究了纳米药物载体在不同 pH 条件下的药物释放过程。如图 3(d) 中所示, 在中性条件下, 纳米药物载体几乎不释放出 DOX。当溶液的 pH 减少到 6.0 时, 大约有 62% 的 DOX 从载体上释放出来。随着 pH 进一步降低到 4.5, 释放出来的 DOX 达到了 90%。这些结果表明, DOX 药物从载体上释放过程时受 pH 影响的。通常肿瘤部位的 pH 相对正常组织来说是偏酸性的, 而肿瘤细胞内的微环境更偏酸性 pH 约为 4.5~5.0。这也说明了我们合成的纳米药物载体在体内循环时能够避免不必要的释放, 保证了纳米药物载体在肿瘤细胞内的充分释放, 从而能显著提高化疗的效果同时减少对正常组织和细胞的伤害。

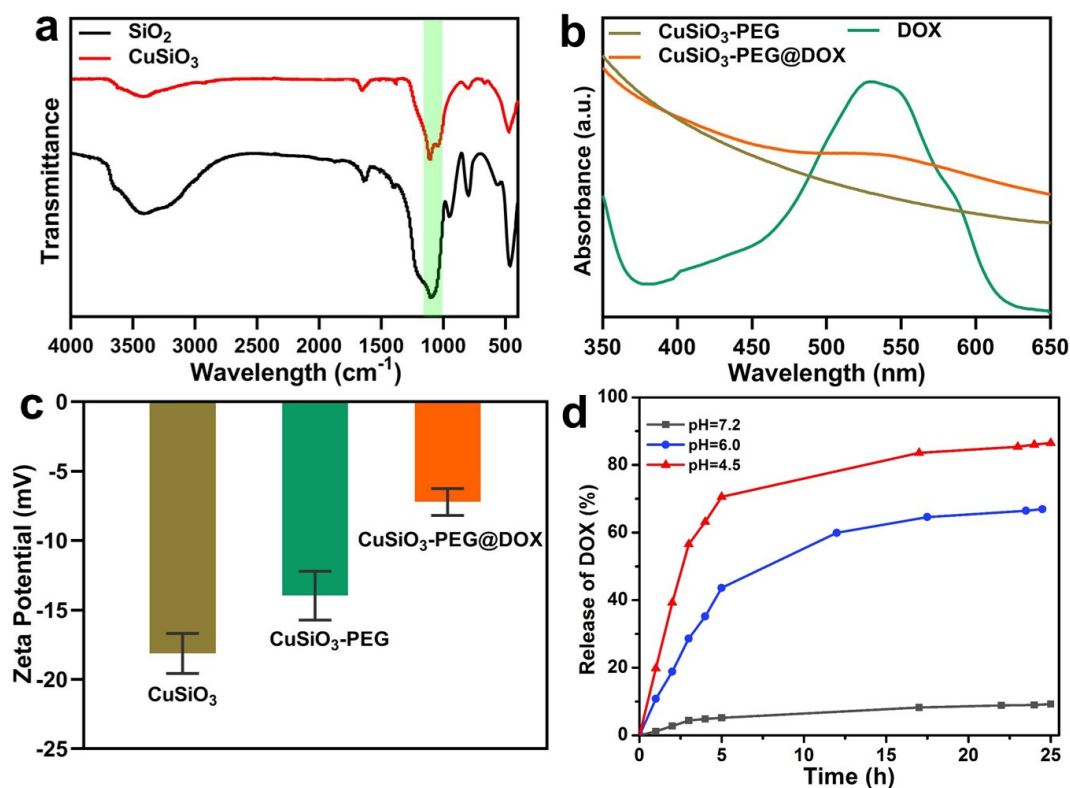


Figure 3. (a) FTIR spectra of SiO₂ and CuSiO₃; (b) UV-vis absorbance spectra of CuSiO₃-PEG, DOX, and CuSiO₃-PEG@DOX; (c) Zeta potential of CuSiO₃, CuSiO₃-PEG, and CuSiO₃-PEG@DOX; (d) DOX release profiles from CuSiO₃-PEG@DOX in PBS buffer at pH values of 7.2, 6.0, and 4.5

图 3. (a) SiO₂ 和 CuSiO₃ 的 FTIR 光谱; (b) CuSiO₃-PEG, DOX 和 CuSiO₃-PEG@DOX 的紫外可见吸收光谱; (c) CuSiO₃, CuSiO₃-PEG 和 CuSiO₃-PEG@DOX 的 Zeta 电位; (d) CuSiO₃-PEG/DOX 在 pH 值为 7.2, 6.0 和 4.5 的 PBS 缓冲溶液中的药物释放曲线

3.3. 细胞毒性研究

以 Hep-G2 肿瘤细胞为模型, 对纳米载体的毒性进行了考察。从图 4(a) 中 MTT 结果表明, 合成的 CuSiO₃-PEG 纳米载体具有优异的生物相容性, 即使在浓度高达 160 μg/mL 时, 肿瘤细胞的存活率仍然达到了 95% 以上。纳米药物载体 CuSiO₃-PEG@DOX 的细胞毒性结果表明, 相对于单独的 DOX 药物, 结合纳米载体后明显提高了 DOX 药物的化疗效果。例如, 浓度为 16 μg/mL 的 DOX 与 Hep-G2 细胞培养 24 h 后, 细胞存活率约为 30%; 在等量的 DOX 浓度下, CuSiO₃-PEG@DOX 处理组的肿瘤细胞存活率下降到了 8%, 说明结合纳米载体后能显著提升化疗药物的治疗效果。从图 4(b) 中细胞死活染色的荧光图片也可以看出, PBS 和 CuSiO₃-PEG 处理组的细胞几乎没有死亡; 单独 DOX 药物组处理的细胞部分死亡了; 而

CuSiO₃-PEG@DOX 处理组的 Hep-G2 细胞几乎全部死亡了,这与上述的 MTT 实验得到结果是相一致的。

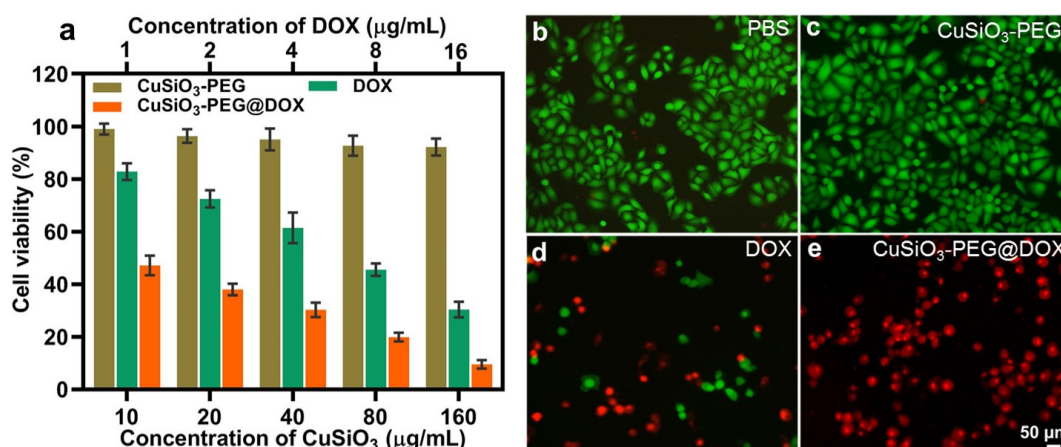


Figure 4. (a) Hep-G2 cell viabilities incubation with different concentrations of CuSiO₃-PEG, free DOX, and CuSiO₃-PEG@DOX; (b) live/dead cell staining assay to visualize the cell viability of Hep-G2 cells under different treatments

图 4. (a) Hep-G2 细胞分别与不同浓度的 CuSiO₃-PEG, DOX 和 CuSiO₃-PEG@DOX 共培养后的细胞活性; (b) 不同处理组的 Hep-G2 细胞的死活染色的荧光照片

4. 结论

在本文中,我们发展了一种“自模板牺牲”的方法,利用二氧化硅纳米球作为模板,在碱性条件下通过一步水热的方法合成了表面多刺状的硅酸铜空心纳米球,并对其结构和性能进行了详细的表征。为了进一步提高其生物相容性,在其表面修饰了 PEG,得到了具有优异生物相容性的 CuSiO₃-PEG 纳米载体。由于其空心的结构,可以负载抗肿瘤药物 DOX,且负载量达到了 10 wt%。进一步的细胞实验表明,相对于单独的 DOX 药物,合成的 CuSiO₃-PEG@DOX 对 Hep-G2 肿瘤细胞显示出更强的细胞毒性,显著提高了化疗的效果。此外,本论文也为设计合成空心结构的纳米药物载体提供了一种新的方法。

基金项目

本项目由国家自然科学基金(批准号:22007052),江苏省自然科学基金(批准号: BK20190917),江苏省高校基金(批准号:19KJB150015)和南通大学博士科研启动基金支持。

参考文献

- [1] Peer, D., Karp, J.M., Hong, S., Farokhzad, O.C., Margalit, R. and Langer, R. (2007) Nanocarriers as an Emerging Platform for Cancer Therapy. *Nature Nanotechnology*, **2**, 751-760. <https://doi.org/10.1038/nnano.2007.387>
- [2] He, Q. and Shi, J. (2014) MSN Anti-Cancer Nanomedicines: Chemotherapy Enhancement, Overcoming of Drug Resistance, and Metastasis Inhibition. *Advanced Materials*, **26**, 391-411. <https://doi.org/10.1002/adma.201303123>
- [3] Wang, Y., Zhao, R., Wang, S., Liu, Z. and Tang, R. (2016) In Vivo Dual-Targeted Chemotherapy of Drug Resistant Cancer by Rationally Designed Nanocarrier. *Biomaterials*, **75**, 71-81. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.09.030>
- [4] Petros, R.A. and DeSimone, J.M. (2010) Strategies in the Design of Nanoparticles for Therapeutic Applications. *Nature Reviews Drug Discovery*, **9**, 615-627. <https://doi.org/10.1038/nrd2591>
- [5] Shi, J., Votruba, A.R., Farokhzad, O.C. and Langer, R. (2010) Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering: From Discovery to Applications. *Nano Letters*, **10**, 3223-3230. <https://doi.org/10.1021/nl102184c>
- [6] Xia, Y., Li, W., Cobley, C.M., Chen, J., Xia, X., Zhang, Q., Yang, M., Cho, E.C. and Brown, P.K. (2011) Gold Nanocages: From Synthesis to Theranostic Applications. *Accounts of Chemical Research*, **44**, 914-924. <https://doi.org/10.1021/ar200061q>

-
- [7] Cheng, K., Shen, D., Hensley, M.T., Middleton, R., Sun, B., Liu, W., De Couto, G. and Marban, E. (2014) Magnetic Antibody-Linked Nanomatchmakers for Therapeutic Cell Targeting. *Nature Communications*, **5**, Article No. 4880. <https://doi.org/10.1038/ncomms5880>
- [8] Yang, K., Feng, L., Hong, H., Cai, W. and Liu, Z. (2013) Preparation and Functionalization of Graphene Nanocomposites for Biomedical Applications. *Nature Protocols*, **8**, 2392-2403. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.146>
- [9] Yuan, H., Fales, A.M. and Vo-Dinh, T. (2012) TAT Peptide-Functionalized Gold Nanostars: Enhanced Intracellular Delivery and Efficient Near Photothermal Therapy Using Ultralow Irradiance. *Journal of the American Chemical Society*, **134**, 11358-11361. <https://doi.org/10.1021/ja304180v>
- [10] Wu, H.X., Liu, G., Zhang, S.J., Shi, J.L., Zhang, L.X., Chen, Y., Chen, F. and Chen, H.R. (2011) Biocompatibility, MR Imaging and Targeted Drug Delivery of a Rattle-Type Magnetic Mesoporous Silica Nanosphere System Conjugated with PEG and Cancer-Cell-Specific Ligands. *Journal of Materials Chemistry*, **21**, 3037-3045. <https://doi.org/10.1039/c0jm02863k>
- [11] Xiao, Q., Zheng, X., Bu, W., Ge, W., Zhang, S., Chen, F., Xing, H., Ren, Q., Fan, W., Zhao, K., Hua, Y. and Shi, J. (2013) A Core/Satellite Multifunctional Nanotheranostic for *in Vivo* Imaging and Tumor Eradication by Radiation/Photothermal Synergistic Therapy. *Journal of the American Chemical Society*, **135**, 13041-13048. <https://doi.org/10.1021/ja404985w>
- [12] Lou, X.W., Archer, L.A. and Yang, Z.C. (2008) Hollow Micro-/Nanostructures: Synthesis and Applications. *Advanced Materials*, **20**, 3987-4019. <https://doi.org/10.1002/adma.200800854>
- [13] Fan, H.J., Gösele, U. and Zacharias, M. (2007) Formation of Nanotubes and Hollow nanoparticles Based on Kirkendall and Diffusion Processes: A Review. *Small*, **3**, 1660-1671. <https://doi.org/10.1002/smll.200700382>
- [14] Skrabalak, S.E., Chen, J., Sun, Y., Lu, X., Au, L., Copley, C.M. and Xia, Y. (2008) Gold nanocages: Synthesis, Properties, and Applications. *Accounts of Chemical Research*, **41**, 1587-1595. <https://doi.org/10.1021/ar800018v>
- [15] Tu, H.L., Lin, Y.S., Lin, H.Y., Hung, Y., Lo, L.W., Chen, Y.F. and Mou, C.Y. (2009) *In vitro* Studies of Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles for Photodynamic therapy. *Advanced Materials*, **21**, 172-177. <https://doi.org/10.1002/adma.200800548>
- [16] Yec, C.C. and Zeng, H.C. (2014) Nanobubbles within a Microbubble: Synthesis and Self-Assembly of Hollow Manganese Silicate and Its Metal-Doped Derivatives. *ACS Nano*, **8**, 6407-6416. <https://doi.org/10.1021/nn501948h>
- [17] Wang, Y., Wang, G., Wang, H., Cai, W. and Zhang, L. (2008) One-Pot Synthesis of Nanotube-Based Hierarchical Copper Silicate Hollow Spheres. *Chemical Communications*, **2008**, 6555-6557. <https://doi.org/10.1039/b816751f>
- [18] Wang, Y., Wang, G., Xiao, Y., Yang, Y. and Tang, R. (2014) Yolk-Shell Nanostructured Fe₃O₄@NiSiO₃ for Selective Affinity and Magnetic Separation of His-Tagged Proteins. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **6**, 19092-19099. <https://doi.org/10.1021/am505041a>