

• 药剂与工艺 •

载紫杉醇聚(2-乙基-2-噁唑啉)修饰单壁碳纳米管递药系统的制备及体外抗肿瘤作用评价

王小宁, 闫梦茹, 马远涛, 梁晓燕, 罗国平
西安医学院药学院, 陕西 西安 710021

摘要: 目的 以抗肿瘤药物紫杉醇 (PTX) 为模型药物, 制备载紫杉醇聚(2-乙基-2-噁唑啉) (PEOz) 修饰单壁碳纳米管递药系统 (PTX@PEOz-SWCNT), 对其进行理化性质、体外释药、生物相容性及体外抗肿瘤作用的评价。方法 采用化学偶联合成 PEOz-SWCNT, 用紫外-可见吸收光谱法 (UV-Vis) 和红外光谱法 (FTIR) 对合成产物进行表征, 并对其粒径和电位进行测定; 制备载药复合物 PTX@PEOz-SWCNT, 测定其载药量和包封率, 透析法进行体外释药试验; 体外溶血试验评价载体材料的安全性, MTT 法评价载体材料生物相容性及载药复合物对 MCF-7 细胞的生长抑制率, 用荧光倒置显微镜考察了香豆素-6 (C6) 标记载体在 MCF-7 细胞中的摄取。结果 PEOz-SWCNT 材料的平均粒径为 (219.8 ± 2.9) nm, Zeta 电位值为 (-35.23 ± 0.74) mV, PTX@PEOz-SWCNT 的载药量为 (38.19 ± 0.74) %, 包封率为 (94.38 ± 0.94) %; 载药复合物在 pH 5.0 的条件下释药明显加快, 表现出明显的 pH 响应性; 体外溶血试验结果表明, PEOz-SWCNT 质量浓度在 0.4 mg/mL 以下无明显溶血反应, PEOz-SWCNT 材料在细胞水平生物相容性良好, PTX@PEOz-SWCNT 对 MCF-7 细胞的生长抑制率显著增强; 与 C6@SWCNT 相比, C6@PEOz-SWCNT 载药复合物的细胞摄取增加。结论 PTX@PEOz-SWCNT 递药系统在肿瘤靶向给药方面具有一定的应用前景。

关键词: 紫杉醇; pH 响应性; 聚(2-乙基-2-噁唑啉); 单壁碳纳米管递药系统; 生物相容性; 抗肿瘤; 透析法; 溶血试验
中图分类号: R943; R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)03-0607-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.03.009

Preparation of PEOz-modified single-walled carbon nanotube paclitaxel delivery system and evaluation of its anti-tumor effect *in vitro*

WANG Xiao-ning, YAN Meng-ru, MA Yuan-tao, LIANG Xiao-yan, LUO Guo-ping
College of Pharmacy, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China

Abstract: Objective To prepare a PEOz modified single-walled carbon nanotube delivery system (PEOz-SWCNT) with the anti-tumor drug paclitaxel (PTX) as a model drug (PTX@PEOz-SWCNT) and evaluate its physical and chemical properties, *in vitro* drug release, biocompatibility, and *in vitro* antitumor effects. **Methods** PEOz-SWCNT was synthesized by chemical coupling method, and the products were characterized by UV-Vis spectroscopy (UV-Vis) and infrared spectroscopy (FTIR). The particle size and Zeta potential of PEOz-SWCNT were measured. The drug-loaded complex PTX@PEOz-SWCNT was prepared and the loading efficiency and encapsulation efficiency were measured. The dialysis method was used for *in vitro* drug release. The safety of the application of PEOz-SWCNT was evaluated by *in vitro* hemolysis test. The MTT method was used to evaluate the biocompatibility of the material and the growth inhibition rate of the drug-loaded complex on MCF-7 cells. The uptake of Coumarin-6 (C6)-labeled vector in MCF-7 cells was examined by fluorescence inversion microscope. **Results** The average particle size of PEOz-SWCNT was (219.8 ± 2.9) nm and the Zeta potential was (-35.23 ± 0.74) mV. The loading efficiency of PTX@PEOz-SWCNT was (38.19 ± 0.74) %, and the

收稿日期: 2019-08-23

基金项目: 陕西省科技厅面上项目 (2018JM7092); 陕西省教育厅专项科研项目 (19JK0757); 陕西省科技厅面上项目 (2018JM7089); 西安医学院中尼友好拉吉姆医学实验室开放基金项目 (18LJM06); 2018 年省级大学生创新创业训练项目计划项目 (201825055); 西安医学院 2017 年国家基金培育项目 (2017GJFY10); 陕西高校青年创新团队建设项目 (陕教 [2019] 90 号)

作者简介: 王小宁 (1987—), 女, 硕士, 讲师, 主要从事制剂新技术与新剂型的研究。E-mail: wangxn_0508@126.com

encapsulation efficiency was $(94.38 \pm 0.94)\%$. The drug release rate was significantly accelerated at pH 5.0, showing obvious pH responsiveness. There was no obvious hemolysis when the concentration of PEOz-SWCNT was below 0.4 mg/mL. The biocompatibility of PEOz-SWCNT on Hela cells was good, and the PTX@PEOz-SWCNT could significantly enhance the cell growth inhibition rate on MCF-7 cells. The *in vitro* antitumor activity test results showed that the cell uptake of the C6@PEOz-SWCNT was increased compared to C6@SWCNT. **Conclusion** PTX@PEOz-SWCNT drug delivery system is promising in tumor-targeted drug delivery.

Key words: paclitaxel; pH responsivity; poly(2-ethyl-2-oxazoline); single-walled carbon nanotube drug delivery system; biocompatibility; anti-tumor; dialysis method; hemolysis test

肿瘤为目前危害人类健康和生命的第 2 大疾病, 如何将药物有效递送到肿瘤部位是肿瘤给药研究的关键^[1]。肿瘤细胞微环境不同于正常组织, 大多数癌症的代谢特征为有氧糖酵解, 而缺氧的肿瘤区域中存在无氧糖酵解, 使得肿瘤细胞内产生大量乳酸。为了避免肿瘤细胞中的酸蓄积导致酸中毒, 在肿瘤细胞表面存在大量转运蛋白, 促进 H^+ 的流出, 使得肿瘤微环境的 pH 环境呈酸性^[2], 大约为 6.5, 明显低于正常组织的 pH 7.4, 溶酶体和内涵体的 pH 值更低 (pH 5.0~5.5)^[3]。肿瘤部位这种弱酸性环境可以为设计 pH 敏感给药系统在酸性部位快速释放药物提供条件。聚(2-乙基-2-噁唑啉) [poly(2-ethyl-2-oxazoline), PEOz-OH] 是一种近年来较多应用于功能高分子合成的亲水性材料。研究表明, PEOz-OH 具有很好的水溶性和生物相容性, 其 pK_a 值 (4~6) 接近生理 pH 值, 在弱酸性环境下和生理 pH 环境下会表现出不同的性质^[4]。Zhao 等^[5]用 PEOz-PLA 制备的胶束在 pH 5.0 环境下的释药速率明显快于在 pH 7.4 环境下的释药速率, 证实了其具有 pH 敏感性。同时, PEOz-OH 与聚乙二醇 (PEG) 的作用相似, 可以用来修饰载体表面, 增加其表面亲水性, 形成立体位阻, 使纳米粒躲过网状内皮系统的识别, 避免被摄取清除, 因此能够达到延长药物体内循环时间、提高其在肿瘤组织部位的蓄积。

自 1993 年发现单壁碳纳米管 (single-walled carbon nanotubes, SWCNT) 以来, 其独特的电学、力学、光学和热学性质引起了各学科的广泛关注^[6]。SWCNT 用作药物载体具有表面积大、载药量高、有高度穿过细胞膜的倾向、入胞能力强的特点, 大量研究表明, 经过功能化修饰的 SWCNT 可改善其溶解性, 对人体毒性小且生物相容性良好^[7-9]。因此, 功能化修饰的 SWCNT 用作肿瘤药物载体系统应用前景广阔, 可利用其细胞穿透性和靶向分子的细胞亲和性, 建立多功能载药 SWCNT 靶向给药系统。

紫杉醇 (PTX) 是一种从红豆杉的树皮分离提

纯的天然次生代谢产物, 在临床上用于乳腺癌、卵巢癌、肺癌和鼻咽癌等多种癌症的治疗^[10-16]。本实验采用 PEOz-OH 修饰 SWCNT (PEOz-SWCNT) 并对其表征; 包载 PTX 后, 考察载药复合物 (PTX@PEOz-SWCNT) 体外释药的 pH 响应性及体外抗肿瘤作用, 为肿瘤的靶向治疗提供理论依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

ZNCL-T1000 集热式恒温加热磁力搅拌器, 西安予辉仪器有限公司; WTL-6K 台式低速离心机, 湖南湘仪仪器有限开发公司; 布鲁克 T-27 傅里叶红外光谱仪 (FTIR), 安捷伦科技有限公司; KQ520E 超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; DZF6050 真空干燥箱, 温州鼎力医疗器械有限公司; Malvern 激光粒度分析仪, 英国马尔文仪器有限公司; Agilent 1260 型高效液相色谱仪, 安捷伦科技有限公司; 680 酶标仪, 美国 BIO-RAD 公司; lx73 倒置荧光显微镜, Olympus 公司; LS55 荧光分光光度计, 上海沛升仪器设备有限公司; Cary60 紫外-可见分光光度计, 安捷伦科技有限公司。

1.2 材料

SWCNT, 质量分数 >60.0%, 中国科学院成都有机化学有限公司; PEOz, Sigma-Aldrich 公司; PTX, 批号 MUST-19043010, 质量分数 >99.9%, 成都曼斯特生物科技有限公司; PEOz-OH, 相对分子质量 5 000, Sigma-Aldrich 公司; *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF), 分析纯, 天津红岩试剂厂; 浓硫酸、浓硝酸、四氢呋喃 (THF)、甲苯、三乙胺、无水乙醇、氯化亚砷 ($SOCl_2$), 均为分析纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司; 乙腈, 色谱纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司; 四甲基偶氮唑蓝 (MTT)、荧光探针香豆素-6 (C6), 美国 Sigma 公司; 胎牛血清, 浙江天航生物科技有限公司; 胰蛋白酶-EDTA 消化液, 北京索来宝有限公司; RPMI 1640 培养基、青霉素-链霉素 (10 000 IU/mL 青霉素-G 和 10

mg/mL 链霉素), Hyclone 海德创业生物科技有限公司; 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI), 苏州宇恒生物科技有限公司; 多聚甲醛, 天津大茂化学试剂有限公司。

雌性新西兰大白兔, 体质量 2.5 kg, 普通级, 成都达硕实验动物有限公司, 动物使用许可证号 SCXK (川) 2015-030。

2 方法与结果

2.1 载体材料的合成

2.1.1 SWCNT 的羧基化^[12] 精密称取 SWCNT 500 mg 于混酸 (浓硫酸-浓硝酸 3:1) 100 mL 中, 室温超声 5 h, 加去离子水稀释, 抽滤, 用去离子水洗涤至中性, 60 °C 真空干燥 24 h, 即得 SWCNT-COOH, 产率约为 72.03%。

2.1.2 SWCNT 的酰氯化^[17] 精密称取干燥后的 SWCNT-COOH 250 mg, 加入 SOCl₂ 60 mL, DMF 2 mL, 超声 30 min, 80 °C 回流反应 24 h (氮气保护), 结束后, 减压蒸除 DMF 及 SOCl₂, 残留物用 THF 洗涤多次, 60 °C 真空干燥 24 h, 得 SWCNT-COCl, 产率约为 89.4%。

2.1.3 PEOz-SWCNT 的合成 合成路线图如图 1 所示。精密称取 SWCNT-COCl 100 mg、PEOz-OH 1.5 g 于 250 mL 烧瓶中, 甲苯-THF (3:1) 20 mL 作为反应溶剂, 2 mL 三乙胺作催化剂, 在 80 °C 条件下连续回流 48 h (氮气保护), 得到的反应溶液趁热减压滤过, 并用 THF 和蒸馏水反复清洗, 得到的黑色固体置于 60 °C 干燥箱中干燥 24 h, 恒定质量得到产物, 产率约为 55.44%。

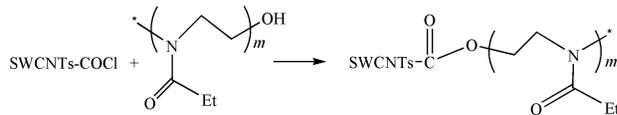


图 1 PEOz-SWCNT 的合成路线图

Fig. 1 Synthesis route of PEOz-SWCNT

2.2 合成产物的表征

2.2.1 紫外-可见吸收光谱法 对 PEOz、SWCNT-COOH、PEOz-SWCNT 进行 200~400 nm 波长范围的扫描, 得到紫外-可见分光光谱图见图 2。由图 2 可知, PEOz 在 227 nm 附近有最大吸收, SWCNT 经 PEOz 修饰后在 258 nm 附近有吸收峰, 这是由于 PEOz 与 SWCNT 本身发生共轭, 可导致峰向右移动, 说明 PEOz 成功连接在 SWCNT 上。

2.2.2 红外光谱法 采用红外光谱法对 PEOz、SWCNT、SWCNT-COOH、PEOz-SWCNT 进行表征。

红外吸收光谱图见图 3。由图 3 可知, SWCNT-COOH 在 1 720 cm⁻¹ 附近有羧基的特征吸收, PEOz 中 1 640 cm⁻¹ 处的峰归属为 PEOz 酰胺键上羰基的振动峰, 3 451 cm⁻¹ 处的峰归属为 PEOz 端-OH 的振动峰; PEOz-SWCNT 中 1 750 cm⁻¹ 归属为酯键的峰, 峰型明显, 1 173 cm⁻¹ 处有酯分子中 C-O-C 伸缩振动吸收峰, 说明 PEOz 成功连接在 SWCNT 上。

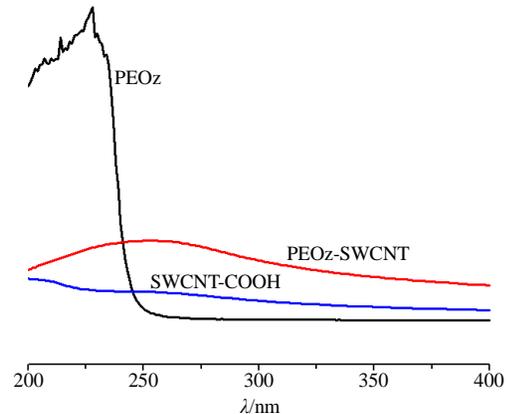


图 2 各产物的紫外-可见分光光谱图

Fig. 2 UV-visible spectroscopic spectrum of each product

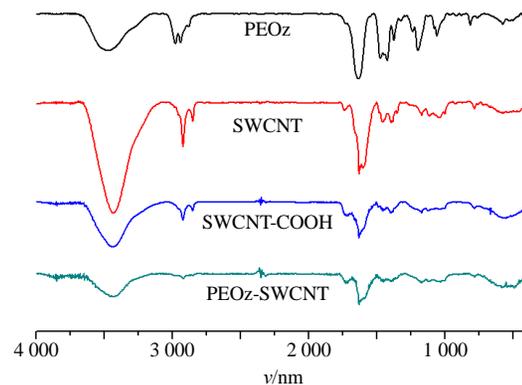


图 3 各产物的红外吸收光谱图

Fig. 3 FTIR spectrum of each product

2.3 载药复合物的制备

精密称取 PTX 40 mg, 于 2.5 mL 无水乙醇溶液中搅拌溶解, 即得 16 mg/mL 的 PTX 无水乙醇溶液。精密称取 PEOz-SWCNT 4 mg, 加入 PTX 无水乙醇溶液 0.5 mL, 边超声边滴加超纯水 3 mL, 完毕后探头超声 (功率为 400 W, 工作时间 3 s, 间隔 6 s, 超声 10 次), 4 000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 取沉淀, 加入质量浓度为 10 mg/mL 的泊洛沙姆 188 溶液 5 mL, 在上述探头超声条件下再经 4 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 冷冻干燥得 PTX@PEOz-SWCNT^[13]。同法制备 PTX@SWCNT-COOH。

2.4 PTX@PEOz-SWCNT 中 PTX 的含量测定

2.4.1 色谱条件 采用 Agilent 1260 型高效液相色谱

谱仪, 色谱柱为 C_{18} 反相色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-水 (50 : 50); 进样量 20 μ L; 检测波长 227 nm; 温度为室温; 体积流量 1.0 mL/min^[18]。

2.4.2 专属性考察 精密称取 PTX 对照品 0.2 mg, 甲醇定容至 100 mL, 即得 2.0 μ g/mL 的对照品溶液; 精密称取 2.0 mg PTX@PEOz-SWCNT 于 10 mL 量瓶中, 加入甲醇溶液定容, 超声 (400 W, 40 kHz) 15 min, 将所得溶液 10 000 r/min 离心 10 min, 收集上清, 过 0.22 μ m 有机微孔滤膜, 即得供试品溶液。按照色谱条件分别进样对照品溶液和供试品溶液, 得到色谱图见图 4。可知, PTX 的保留时间为 9.44 min, 供试品在对照品相同位置出峰, 供试品中的溶剂和辅料对 PTX 的测定无干扰。

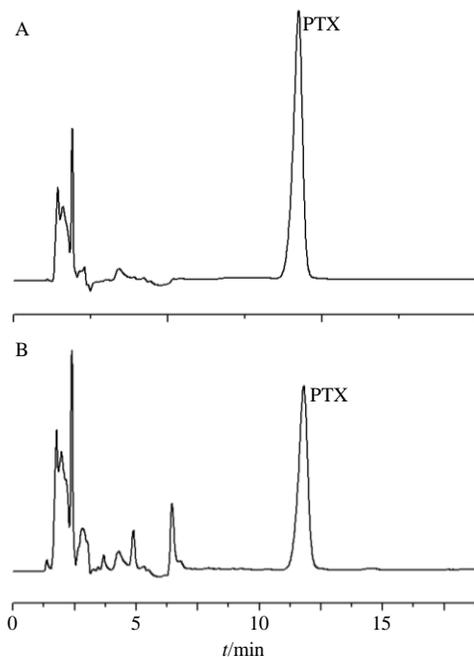


图 4 PTX 对照品 (A) 和 PTX@PEOz-SWCNT 样品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 4 HPLC of paclitaxel reference substance (A) and PTX@PEOz-SWCNT sample (B)

2.4.3 线性关系考察 精密称取 PTX 1 mg 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶液定容, 得 100 μ g/mL PTX 母液。分别精密吸取母液 100、120、150、200、300、350、400 μ L 于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶液定容, 得质量浓度为 1.0、1.2、1.5、2.0、3.0、3.5、4.0 μ g/mL 对照品溶液, 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 进样, 进样量为 20 μ L。以峰面积 (A) 为纵坐标, 质量浓度 (C) 为横坐标绘制标准曲线, 得标准曲线方程为 $A = 40.503 C + 0.218 1$, $r = 0.999 2$, 表明 PTX 在 1.0~

4.0 μ g/mL, 峰面积与质量浓度线性关系良好。

2.4.4 精密度试验 取同一质量浓度的 PTX 溶液 (2.0 μ g/mL), 按照 “2.4.1” 项色谱条件连续进样 6 次, 计算 RSD 值为 0.78%, 说明方法精密度良好。

2.4.5 稳定性试验 取同一质量浓度的样品溶液 (4.0 μ g/mL), 分别在 0、2、4、8、12 h, 按照 “2.4.1” 项色谱条件进样测定, 计算 RSD 值为 1.36%, 说明样品溶液在 12 h 内稳定。

2.4.6 重复性试验 按 “2.4.2” 项下方法制备供试品溶液 6 份, 按照 “2.4.1” 项下色谱条件进样测定, 计算 PTX 质量浓度的 RSD 为 0.83%, 说明该方法重复性良好。

2.4.7 加样回收率试验 分别取 10 mL 已知药物质量浓度 (0.5、1.0、1.5 μ g/mL) 的 PTX@PEOz-SWCNT 样品溶液, 加入 2.0 μ g/mL 的对照品溶液 1 mL, 每个质量浓度配制 3 个平行样品, 按照 “2.4.1” 项色谱条件进样测定, 得到的回收率结果显示, 在低、中、高质量浓度时所得的回收率均在 90%~110%, 平均值为 96.4%, RSD 值为 3.9%, 表明方法回收率良好。

2.5 载体材料及载 PTX 复合物的表征

2.5.1 载体材料的水分散性 分别称取 2 mg 的 SWCNT、SWCNT-COOH、PEOz-SWCNT 分散于 5 mL 超纯水中, 超声 5 min, 静置观察其分散性, 记录是否有聚沉现象。结果表明, 未处理的 SWCNT, 在水中分散性差, 几乎不溶于水, 放置后即分层沉淀; 酸化后的 SWCNT 因连接上羧基, 分散性有所改善, 但放置后仍有大颗粒沉淀, 且有分层现象; PEOz 修饰后的 SWCNT, 很好地均匀分散于水中, 呈均一黑色溶液, 放置数天后无分层沉淀。

2.5.2 载体材料的粒径、Zeta 电位值、形态 分别取少量 SWCNT-COOH 和 PEOz-SWCNT, 以载体与溶剂 1 : 10 000 的比例分散于水中, 采用马尔文激光粒度测定仪测其粒径、Zeta 电位、多分散指数 (PDI), 载体的形态通过透射电镜来观察。

SWCNT-COOH 和 PEOz-SWCNT 的粒径、PDI 和 Zeta 电位值如表 1 所示, 粒径及电位分布图见图 5、6, 透射电镜图见图 7。结果表明, SWCNT-

表 1 粒径、PDI 和 Zeta 电位值

Table 1 Particle size, PDI and Zeta potential value

材料	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
SWCNT-COOH	183.0 \pm 3.2	0.401 \pm 0.077	-18.40 \pm 0.66
PEOz-SWCNT	219.8 \pm 2.9	0.254 \pm 0.089	-35.23 \pm 0.74

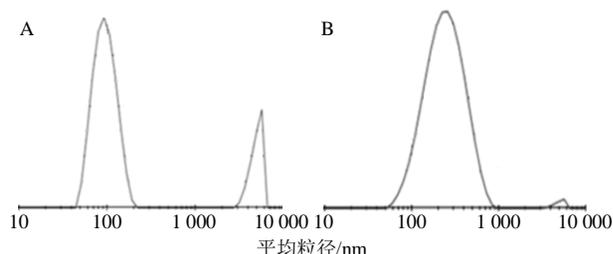


图 5 SWCNT-COOH (A) 和 PEOz-SWCNT (B) 的粒径分布

Fig. 5 Particle size distribution of SWCNT-COOH (A) and PEOz-SWCNT (B)

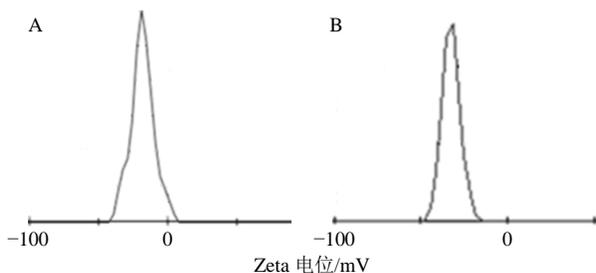


图 6 SWCNT-COOH (A) 和 PEOz-SWCNT (B) 的 Zeta 电位分布

Fig. 6 Zeta potential distribution of SWCNT-COOH (A) and PEOz-SWCNT (B)

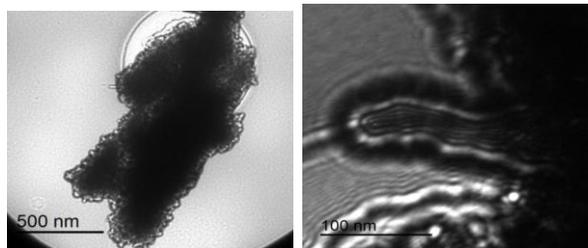


图 7 载体 SWCNT-COOH (A) 和 PEOz-SWCNT (B) 的 TEM 图

Fig. 7 TEM of SWCNT-COOH (A) and PEOz-SWCNT (B)

COOH 的粒径较小, 经 PEOz 修饰后, 粒径增大, PDI 减少, 说明分散性改善。SWCNT-COOH 的 Zeta 电位值为负值, 这是由其表面的羧基引起, 经 PEOz 修饰后, 载体表面的电位值增大, 稳定性增加。

由图 7 可以看出, SWCNTs-COOH 团聚较为严重, 难以观察到单个分散的单壁纳米管, 而经 PEOz 修饰后 SWCNT 分散性改善, 可以看到单个的管状结构。

2.5.3 载药复合物的载药量和包封率 分别称取 2.0 mg PTX@SWCNT-COOH 和 PTX@PEOz-SWCNT 于 10 mL 量瓶中, 加入甲醇溶液定容, 超声 (400 W, 40 kHz) 15 min, 将所得溶液 10 000 r/min 离心 10 min, 下层的载药复合物用去离子水洗 4 次, 离心, 收集所有离心后的上清液, 测量其总体积,

按“2.4.1”项下的色谱条件测定上清液中 PTX 的质量浓度, 按如下公式计算载药量及包封率, 结果见表 2。

$$\text{载药量} = (\text{总投入量} - \text{未载进去的药量}) / \text{总投入量}$$

$$\text{包封率} = (\text{总投入量} - \text{未载进去的药量}) / \text{投入药量}$$

表 2 载药量和包封率测定结果

Table 2 Drug loading and encapsulation efficiency

制剂	载药量/%	包封率/%
PTX@SWCNT-COOH	39.37±1.45	95.63±1.21
PTX@PEOz-SWCNT	38.19±0.74	94.38±0.94

2.6 体外释放试验

精密吸取 PTX@PEOz-SWCNT 1 mL 置于透析袋 (截留相对分子质量 3 500) 内, 封紧两端, 分别置于 30 mL pH 7.4 的磷酸缓冲液中, 加入司盘 80 1 滴 (大约 0.05 mL), 放入振荡器 37 °C, 转速 100 r/min。分别于 1、2、4、8、12、24 h 取出 1 mL 释放液, 同时补充 1 mL 的新鲜释放介质。取出的释放介质样品经 0.22 μm 的滤膜滤过后, 用 HPLC 法测定 PTX 的含量, 同法于 pH 为 6.5、5.0 的磷酸缓冲液 (PBS) 中进行释药实验, 计算累积释放率 (Q)。

$$Q = (C_n V + \sum_{i=1}^{n-1} C_i V_i) / m$$

C_n 为不同取样点时释放液质量浓度, C_i 为取样点时取样液质量浓度, V 为释放介质体积, V_i 为取样体积, m 为总药量

PTX@PEOz-SWCNT 复合物在不同释放介质中的释放曲线如图 8 所示。载药制剂在 pH 7.4 和 pH 6.5 的释放介质中释药缓慢, 在 pH 7.4 的释放介质中 24 h 时累积释放率仅为 30.66%, 在 pH 6.5 的介质中比在 pH 7.4 的释放介质中释药加快, 24 h 时累积释放率为 43.11%。而在 pH 5.0 的释放介质中释药最快, 1、8、12 h 时累积释放率分别为 10.60%、

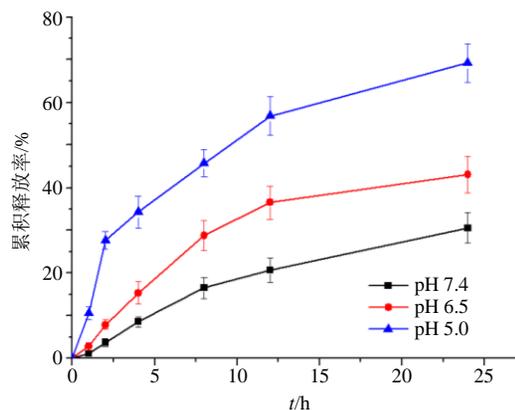


图 8 载药复合物 PTX@PEOz-SWCNT 的体外释药情况

Fig. 8 In vitro release of drug-loaded complexes

45.72%、56.80%，24 h 时累积释放率达到 69.22%，说明经 PEOz 修饰的载体材料具有 pH 敏感性，在 pH 5.0 的条件下释药加快。PTX@PEOz-SWCNT 这种性质有利于在肿瘤组织释药，因此，可以提高靶组织或靶细胞的药物浓度，实现增强抗肿瘤作用的目的。

2.7 载体材料 PEOz-SWCNT 体外溶血试验

2.7.1 2% 红细胞悬液的制备 取家兔全血 20 mL，用细玻璃棒搅拌除去纤维蛋白，再加入约 10 倍量的生理盐水，混匀后 3 000 r/min 离心 5 min，弃上清，沉淀再用生理盐水按上述方法洗涤 2~3 次，直至上清不显红色为止，将得到的红细胞按体积比用生理盐水配成 2% 的悬液。

2.7.2 试验方法 取 8 个试管按表 3 分别加入不同体积的溶液，1~6 号管加供试品溶液（质量浓度为

10 mg/mL 的 PEOz-SWCNT 溶液，按表 3 配制成终质量浓度分别为 0.2、0.4、0.8、1.0、2.0、4.0 mg/mL 的溶液），7 号管为阴性对照，8 号管为阳性对照。将各管轻轻混匀，置于 37 °C 恒温水浴中，孵育 1 h 后，对试管内液体 3 000 r/min 离心 5 min，取上清于 416 nm 处用紫外-可见分光光度计测定其吸光度（A）值，计算溶血率。溶血试验设计与结果见表 3。

$$\text{溶血率} = (A_{\text{样品}} - A_{\text{阴性}}) / (A_{\text{阳性}} - A_{\text{阴性}})$$

根据结果，阴性对照管上层液体为无色透明，无溶血发生，阳性对照管呈澄明红色即发生了全溶血，可知，PEOz-SWCNT 的质量浓度为 0.8 mg/mL 时，溶血率为 4.9%，说明载体在此质量浓度下可作为安全可靠的可注射纳米药物载体，随后溶血率随着质量浓度的上升而增大，当质量浓度达到 4 mg/mL 时，溶血率为 68.7%。

表 3 溶血试验

Table 3 Design of hemolysis test

试管编号	2% 红细胞悬液/mL	0.9% NaCl/mL	蒸馏水/mL	供试品溶液/mL	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	总体积/mL	溶血率/%
1	2.5	2.4	0	0.1	0.2	5.0	0.3
2	2.5	2.3	0	0.2	0.4	5.0	1.3
3	2.5	2.1	0	0.4	0.8	5.0	4.9
4	2.5	2.0	0	0.5	1.0	5.0	6.6
5	2.5	1.5	0	1.0	2.0	5.0	37.5
6	2.5	0.5	0	2.0	4.0	5.0	68.7
7	2.5	2.5	0	0	-	5.0	0
8	2.5	0	2.5	0	-	5.0	100.0

2.8 载药复合物的抗肿瘤作用研究

2.8.1 载体生物相容性评价 将 MCF-7 细胞 1×10⁴ 个/孔接种于 96 孔培养板，放入培养箱培养 24 h，分别加入终质量浓度为 5、10、15、20、25 μg/mL 的 SWCNT-COOH 和 PEOz-SWCNT 材料各 200 μL，对照组加入等体积含血清培养基，每组设 6 个复孔。继续培养 24 h 后，避光加入 10 μg/mL 的 MTT 150 μL，37 °C 孵育 4 h，弃去上清液，每孔加入 DMSO 100 μL，用酶标仪检测 490 nm 波长处 A 值，计算细胞存活率，得到生物相容性结果见表 4。

$$\text{细胞存活率} = \text{实验组平均 A 值} / \text{对照组平均 A 值}$$

由表 4 可以看出，与 SWCNT-COOH 相比，经修饰后，PEOz-SWCNT 的细胞存活率升高，生物相容性增强（P<0.001）。同时，随着载体材料质量浓度的增大，细胞存活率逐渐下降，当载体材料质量浓度为 25 μg/mL 时，PEOz-SWCNT 组的细胞存活

率为（89.81±6.10）%，说明在低于此质量浓度时 PEOz-SWCNT 材料的生物相容性良好。

2.8.2 体外细胞生长抑制率 将 MCF-7 细胞 1×10⁴ 个/孔接种于 96 孔培养板，放入培养箱培养 24 h 后，分别加入药物（PTX）终质量浓度为 0.005、

表 4 生物相容性试验结果

Table 4 Results of biocompatibility test

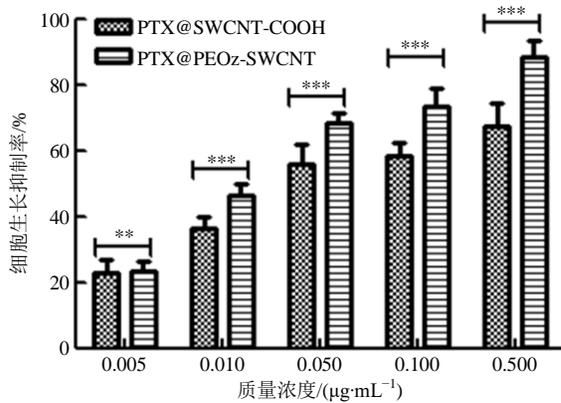
质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	细胞存活率/%	
	PEOz-SWCNT	SWCNT-COOH
5	96.90±4.59***	85.01±3.89
10	92.08±3.66***	80.60±4.12
15	91.55±5.17***	72.16±6.07
20	90.29±3.98***	67.53±7.13
25	89.81±6.10***	63.81±5.60

与 SWCNT-COOH 组比较：***P<0.001
***P < 0.001 vs SWCNT-COOH group

0.010、0.050、0.100、0.500 $\mu\text{g/mL}$ 的 PTX@SWCNT-COOH 和 PTX@PEOz-SWCNT 载药复合物, 对照组加入等体积完全培养基, 使每孔终体积为 200 μL , 每组设 6 个复孔。继续培养 24 h 后, 避光加入 10 $\mu\text{g/mL}$ 的 MTT 150 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h, 弃去上清液, 每孔加入 100 μL DMSO, 用酶标仪检测 490 nm 波长处 A 值, 计算细胞生长抑制率。载药复合物对 MCF-7 细胞生长抑制率结果见图 9。

细胞生长抑制率 = 1 - (实验组平均 A 值 / 对照组平均 A 值)

由结果可知, 各组载药复合物对细胞的抑制率随着药物质量浓度的增大而增强。相同质量浓度下的 PTX@PEOz-SWCNT 对肿瘤细胞生长的抑制率



与 PTX@SWCNT-COOH 组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$
** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs PTX@SWCNT-COOH group

图 9 体外细胞生长抑制率结果

Fig. 9 Results of *in vitro* cell growth inhibition rate

比 PTX@SWCNT-COOH 组更高 ($P < 0.01$ 、0.001), 说明经 PEOz 修饰后, PTX 对肿瘤细胞的抑制作用更强, 这可能是由于 PTX@PEOz-SWCNT 具有 pH 响应性, 在肿瘤细胞内部的酸性条件下, 药物更容易释放, 可以快速达到有效治疗浓度, 增强了细胞生长抑制效果。

2.8.3 载体细胞摄取试验 C6 标记载体的构建^[19]: C6@SWCNT、C6@PEOz-SWCNT 的制备方法与各载 PTX 制剂的制备方法相同, 用荧光分光光度法定 C6 载药量为 21.46%。

将 MCF-7 细胞 3×10^5 个/孔接种于 6 孔培养板, 培养 24 h。吸弃培养液, 用无血清培养液漂洗, 加入 2 mL 无血清培养液稀释的游离 C6 溶液、C6@SWCNT、C6@PEOz-SWCNT, 使 C6 的终质量浓度为 50 ng/mL 。继续孵育 4 h, 孵育完毕后, 吸弃含药培养液, 用冷的 PBS 漂洗 3 次, 接着用 4% 的多聚甲醛在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下固定 20 min, 固定完毕后用 PBS 洗 3 次。固定后的细胞用 DAPI 染色 15 min, 冷 PBS 洗 3 次, 防荧光淬灭封片剂封片。用倒置荧光显微镜进行观察分析。MCF-7 细胞对不同载药复合物的摄取结果见图 10。

由图 10 可以看出, SWCNT-COOH 和 PEOz-SWCNT 均能有效携带 C6 进入细胞内, 这可能是由于细胞对载药粒子的内吞作用引起的。通过观察在细胞质中的荧光情况, 可以看出, 与 C6@SWCNT-COOH 组相比, MCF-7 细胞对 C6@PEOz-SWCNT

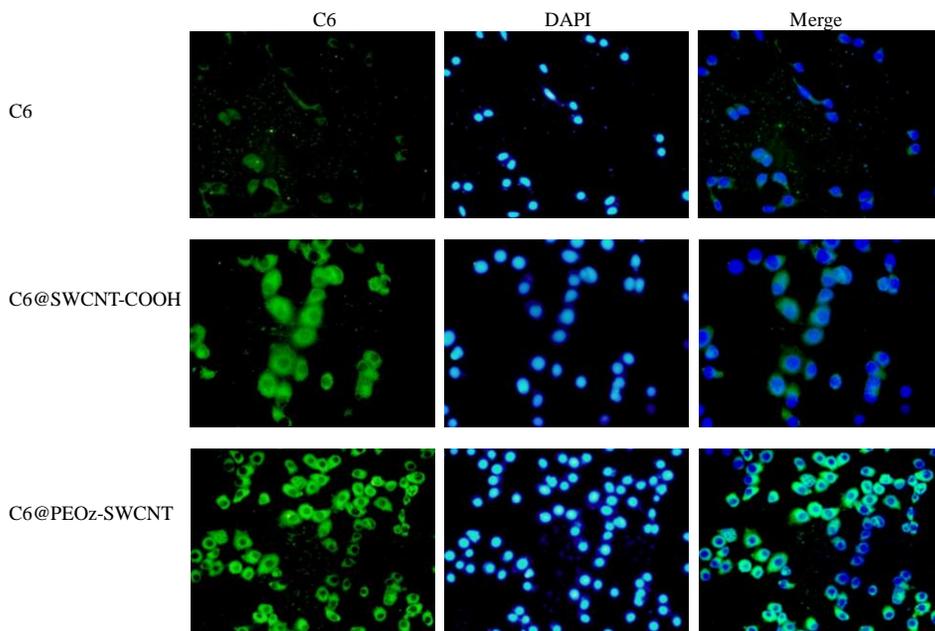


图 10 细胞摄取试验结果

Fig. 10 Results of cell uptake test

的摄取量增多, 显示出 PEOz-SWCNT 较强的细胞内化作用, 这可能是由于 PEOz 分子中的叔酰胺基团在酸性条件下容易质子化, 与带有负电荷的细胞膜形成较强的相互作用, 更容易通过内吞作用被摄取, 从而增强了抗肿瘤药物的抗肿瘤效果^[20]。

3 讨论

载体系统是影响药物靶向治疗效果的重要因素之一。近年来, 纳米靶向给药系统研究发展迅速并取得了一些成效, 但还需解决以下几个问题: 载药量低, 载体与肿瘤细胞结合后入胞能力较弱, 相当大一部分的药物在细胞外释放, 纳米微粒在达到肿瘤部位时往往不能顺利的裂解、释药或与肿瘤细胞结合内化, 造成胞内药物浓度不足^[21]。因此, 在实现肿瘤部位靶向的前提下, 提高制剂的载药量、增加细胞穿透性就成了亟待解决的问题。自 1993 年发现 SWCNT 以来, 其在生物医学领域的应用得到了广泛关注^[22]。SWCNT 用作药物载体具有以下特点: ①具有大离域 π 键、表面积大, 载药量高; ②有高度穿过细胞膜的倾向, 入胞能力强, 可有效携带蛋白质、抗体、多肽、药物和核酸等生物活性物质进入细胞, 且不会对细胞造成损伤; ③化学性质稳定, 易于修饰, 可与多种生物分子相连, 提高靶向性, 实现治疗的目的。然而 SWCNT 在大多数极性溶剂中分散性不好, 容易团聚, 具有一定的细胞毒性, 需要对其进行功能化修饰, 克服其在溶剂中分散性差的问题, 从而提高其水溶性及生物相容性^[23]。本实验采用生物相容性良好的 PEOz 高分子材料对 SWCNT 进行修饰, 利用其亲水基团端羟基, 与酰氯化后的 SWCNT 酯化合成, 形成 PEOz 修饰的 SWCNT, 由于羧基化 SWCNT 与羟基酯化反应具有可逆性, 而酰氯化后与 PEOz 形成酯键减小了其可逆化程度, 减少了副反应的发生, 提高了合成产率。修饰后的 SWCNT 水分散性及生物相容性得到了明显的改善。

PEOz-SWCNT 具有 pH 响应性, 在 pH 7.4 条件下, PEOz 长链分布在 SWCNT 管腔外, 对药物释放通道进行封堵, 而在酸性条件下, PEOz 中的叔酰胺基团及其相应的共振结构容易结合溶液体系中的氢离子^[24], 使得 PEOz 链之间斥力增加, 造成 PEOz 长链“舒张”, 促进 SWCNT 管腔中的药物释放。本实验通过体外释药实验证实了载药复合物的 pH 响应性, 并且在细胞水平对载药复合物的抑制肿瘤细胞生长效果进行了评价。

此外, PEOz 与 PEG 的作用相似, 可以增加载体表面亲水性, 形成立体位阻, 使纳米粒躲过网状内皮系统的识别, 避免被摄取清除, 因此能够延长药物体内循环时间。在后续的工作中, 将深入研究此载体复合物的体内循环特性, 评价其体内的抗肿瘤作用, 同时开展更多功能化 SWCNT 载药体系的研究, 以期改善 SWCNT 材料作为递送载体的细胞毒性等问题, 使其在肿瘤诊断、治疗的研究中具有更大的应用价值。

参考文献

- [1] 高会乐, 蒋新国. 肿瘤靶向递药新策略的研究进展 [J]. 药学报, 2016, 51(2): 272-280.
- [2] Ganapathy V, Thangaraju M, Prasad P D. Nutrient transporters in cancer: Relevance to Warburg hypothesis and beyond [J]. *Pharmacol Ther*, 2009, 121(1): 29-40.
- [3] Chen L G, Fu C, Deng Y J, et al. pH-Sensitive nanocarrier for tumor targeting [J]. *Pharma Res*, 2016, 33(12): 2989-2998.
- [4] Li J W, Zhou Y X, Li C W, et al. Poly(2-ethyl-2-oxazoline)-doxorubicin conjugate-based dual endosomal pH-sensitive micelles with enhanced antitumor efficacy [J]. *Bioconjugate Chem*, 2015, 26(1): 110-119.
- [5] Zhao Y, Zhou Y X, Wang D S, et al. pH-responsive polymeric micelles based on poly (2-ethyl-2-oxazoline)-poly(D,L-lactide) for tumor-targeting and controlled delivery of doxorubicin and P-glycoprotein inhibitor [J]. *Acta Biomater*, 2015, 17: 182-192.
- [6] Li Z X, de Barros A L B, Soares D C F, et al. Functionalized single-walled carbon nanotubes: Cellular uptake, biodistribution and applications in drug delivery [J]. *Int J Pharm*, 2017, 524(1/2): 41-54.
- [7] Singh R P, Sharma G, Sonali, et al. Chitosan-folate decorated carbon nanotubes for site specific lung cancer delivery [J]. *Mat Sc Eng C-Mater*, 2017, 77(3): 446-458.
- [8] Wang D Q, Hou C, Meng L J, et al. Stepwise growth of gold coated cancer targeting carbon nanotubes for the precise delivery of doxorubicin combined with photothermal therapy [J]. *J Mater Chem B*, 2017, 5(7): 1380-1387.
- [9] 李浩贤, 林华庆, 陈靖文, 等. 碳纳米材料在肿瘤药物递送系统的研究进展 [J]. 中国药科大学学报, 2019, 50(1): 100-106.
- [10] 康宁, 周东升, 李燕杰, 等. 线粒体靶向的载紫杉醇 TPP-PEG-PE 纳米胶束的体外评价及促肿瘤细胞凋亡研究 [J]. 中草药, 2018, 49(23): 5554-5560.
- [11] 文慧, 彭彦才, 艾葆春, 等. 阿帕替尼联合紫杉醇对

- 非小细胞肺癌患者的疗效及血清因子的影响 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(9): 1810-1813.
- [12] Wani M C, Taylor H L, Wall M E, *et al.* Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia* [J]. *J Am Chem Soc*, 1971, 93(9): 2325-2327.
- [13] 史清文. 天然药物化学史话: 紫杉醇 [J]. 中草药, 2011, 42(10): 1878-1884.
- [14] 许艳萍, 邹三鹏, 黄水英. 顺铂、紫杉醇联合治疗中晚期宫颈癌的疗效及对患者 CYFRA21-1、SCC-Ag 和预后的影响 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(10): 2070-2074.
- [15] 钱钧强, 朱宏明, 房志仲, 等. 博尔宁胶囊联合 TP 方案治疗乳腺癌的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(12): 3246-3249.
- [16] 申玉坤, 申玉璞, 潘一峰, 等. 氧化石墨烯对多烯紫杉醇的高效装载和缓释性能及其经皮给药的渗透性研究 [J]. 中草药, 2019, 50(12): 2830-2834.
- [17] 李君君. 碳纳米管的裁剪、亲水改性及其作为药物载体的初步研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2010.
- [18] 殷守宏, 徐长贵, 汪成. 高效液相色谱法测定紫杉醇的含量 [J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2002, 18(1): 123-124.
- [19] 张玉中, 彭洪尚, 黄世华, 等. 掺杂香豆素 6 的杂化纳米颗粒的制备及荧光性能研究 (英文) [J]. 发光学报, 2013, 34(12): 1555-1560.
- [20] 于树芳. pH 和磁场双重响应性聚氨基酸类药物载体的合成及控制释放研究 [D]. 天津: 南开大学, 2012.
- [21] Piktel E, Niemirowicz K, Wątek M, *et al.* Recent insights in nanotechnology-based drugs and formulations designed for effective anti-cancer therapy [J]. *J Nanobiotech*, 2016, 14(1): 39-62.
- [22] 雷冬梅, 孙岩, 赵闻迪, 等. 碳纳米管在生物医药领域的应用研究进展 [J]. 化工新型材料, 2015, 43(10): 1-3.
- [23] 徐湘婷, 王伟. 功能化碳纳米管在肿瘤诊疗领域的研究进展 [J]. 中国药科大学学报, 2018, 49(2): 165-172.
- [24] Gao Y J, Zhang C, Zhou Y X, *et al.* Endosomal pH-responsive polymer-based dual-ligand-modified micellar nanoparticles for tumor targeted delivery and facilitated intracellular release of paclitaxel [J]. *Pharm Res*, 2015, 32(8): 2649-2662.