

甲氨蝶呤/层状双金属氢氧化物的性能调控及细胞生物实验研究

霍晓磊 柳素青 李淑萍*

(江苏省生物医药功能材料协同创新中心, 江苏省生物功能材料重点实验室,
南京师范大学化学与材料科学学院, 南京 210097)

摘要: 在乙醇-水混合体系中, 以氨水为沉淀剂共沉淀合成了甲氨蝶呤/层状双金属氢氧化物(MTX/LDH)纳米复合物, 采用控制水热处理时间的方式来调控其性能。利用 X-射线衍射(XRD)、透射电镜(TEM)和红外光谱(FT-IR)等表征手段, 对其结构及形貌进行了表征。研究表明: MTX 分子以单层倾斜或垂直方式插入 LDH 层间, 随着水热处理时间的不同, MTX 在层间的倾斜角度发生了变化; 水热处理时间对产物的结晶度、粒径和层间排列方式都有影响, 当水热处理时间为 12h 时, 得到的 MTX/LDH 纳米复合物的结晶度最高, 单分散性最好。在磷酸缓冲液中考察了 MTX/LDH 纳米复合物的缓释性能, 结果表明样品均呈现出良好的缓释性能, 释放速率先快后慢。重点考察了这几种 MTX/LDH 纳米复合物作用于肺癌细胞 A549 的细胞生物实验, 研究表明这几种复合物对肺癌细胞 A549 都具有良好的抑制作用, 其效果与纳米复合物的单分散性和粒径有密切的关系, 单分散性越好, 粒径分布越均匀, 对 A549 癌细胞的抑制效果越好。

关键词: 纳米粒子; 层状化合物; 缓释性能; 抗癌效果; 甲氨蝶呤

中图分类号: TB333

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2014)06-1331-08

DOI: 10.11862/CJIC.2014.195

Controllable Synthesis of Methotrexatum/Layered Double Hydroxide Nanohybrids to Improve Their Anticancer Efficacy

HUO Xiao-Lei LIU Su-Qing LI Shu-Ping*

(Jiangsu Collaborative Innovation Center of Biomedical Functional Material, Jiangsu Key Laboratory of Biofunctional Materials,
College of Chemistry and Materials Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: The Methotrexatum/Layered Double Hydroxide (MTX/LDH) nanohybrids with different properties were prepared by controlling the hydrothermal duration, using the coprecipitation method in alcohol-water solvent and $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ as precipitator. The structure and morphologies of MTX/LDH were systematically characterized by X-ray diffraction (XRD), transmission electron micrograph (TEM) and fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). Results showed that MTX molecules were intercalated into LDH interlayers as a declining or perpendicular monolayer with the variation of hydrothermal treatment. Indeed, the crystallinity degree (indicated by the sharpness of the diffraction peaks) and particle size were also affected by the hydrothermal duration. The results indicated that MTX/LDH nanohybrids can be synthesized with the highest quality (morphology, monodispersity and crystallinity) at 100 °C for 12 h. The high drug-loading capacity of all the nanohybrids indicated that pristine LDH is a good carrier and it seems that capacity has no relation with the particle size. In addition, *in vitro* release tests of the drugs intercalated into LDH were explored in phosphate buffered saline (PBS) with pH=7.4, and four dissolution-diffusion kinetic models were used to fit the release process. The results indicated that the nanohybrids present two-step release process, i.e., initially fast and then the controlled-release, probably suitable

收稿日期: 2013-11-22。收修改稿日期: 2014-01-20。

国家自然科学基金(No.21073093), 高等学校博士点专项科研基金(No.20103207120006)和江苏高校优势学科建设工程资助。

*通讯联系人。E-mail: lishuping@njnu.edu.cn

for clinic application. Furthermore, the modified parabolic diffusion model can simulate the release progress better, indicating that MTX/LDH *in vitro* release process belongs to multi-phase diffusion process *via* ion exchange. At last, the anticancer efficacy of MTX/LDH hybrids was estimated by the bioassay such as MTT with the human lung cancer (A549). According to the cell-line tests, the drug efficacy is associated with dispersion coefficient ε closely: the smaller ε is, the better the tumor suppression efficiency becomes. The parameter ε is determined by both the monodispersity and the particle size.

Keywords: nanoparticles; layered nanohybrids; release properties; anticancer efficacy; methotrexatum

0 引言

层状双金属氢氧化物(Layered Double Hydroxide, LDH),也称类水滑石(hydrotalcite like compounds),是一类由带正电荷的金属氢氧化物层和层间充斥的可交换阴离子所构成的层状化合物,化学通式可表示为: $[M^{2+}_{1-x}M^{3+}_x(OH)_2]^{x+}[A^{n-}]_{x/n} \cdot mH_2O$,其中 M^{2+} 表示+2价金属离子, M^{3+} 表示+3价金属离子, A^{n-} 表示层间阴离子, x 为每摩尔LDH中 M^{3+} 的摩尔数; m 是每摩尔LDH中结晶水的摩尔数^[1-4]。由于LDH具有层间阴离子的可交换性和层间空间的可调性,因此,可以将某些无机、有机、配合物阴离子以及一些生物药物分子等插入其层间,且LDH独特的层板结构,能够有效地保护插入其中的分子或离子^[5-8]。LDH为药物载体不仅可以提高药物的安全性、有效性,还可以提高药物的稳定性和溶解度,控制药物的释放速率,因而具有广泛的应用价值,是近年来新发展的一个非常活跃的领域^[9-12]。

甲氨蝶呤(Methotrexatum,简称MTX)是一类抗叶酸类抗肿瘤药,主要通过对二氢叶酸还原酶的抑制而达到阻碍肿瘤细胞DNA的合成,从而抑制肿瘤细胞的生长与繁殖,主要适用于急性白血病、乳腺癌、绒毛膜上皮癌及恶性葡萄胎、头颈部肿瘤、骨肿瘤、白血病脑膜脊髓浸润、肺癌、生殖系统肿瘤、肝癌、顽固性普通牛皮癣、系统性红斑狼疮、皮炎等自身免疫病^[13]。MTX价格便宜、药效显著,但它具有不良反应严重、体内半衰期短、组织分布广泛、器官靶向性差等缺点^[14-15]。因此,减少MTX的不良反应,提高其生物利用度,成为医药界和科学界的研究热点。研究表明,甲氨蝶呤(MTX)嵌入LDH层间后,因静电相互作用而使其稳定性大为增加;相同药物浓度下,MTX/LDH复合物的药效约为MTX本身的5000倍^[16]。Choy等^[16-17]以LDH为载体,采用共沉淀法成功合成了MTX/LDH纳米复合物,并分别

将MTX和MTX/LDH作用于人类骨肉瘤细胞(SaOS-2)中,研究发现MTX/LDH抑制肿瘤细胞生长的效率远远高于纯MTX的,且体内释放半衰期延长,器官靶向性增强。

制备MTX/LDH纳米复合物最常用的方法是共沉淀法。共沉淀法具有操作简单、条件容易控制等优点,但同时存在着粒径分布难以控制、易团聚、单分散性差等缺点^[18],对实际应用造成了很大的影响。我们课题组采用了改进的共沉淀法^[19-20]成功制备出了单分散性好、粒径分布均一的MTX/LDH复合物。从应用层面上看,一种新型的载药系统无论其具有多么优良的理化及药剂学特性,最终均应以生物效应来评价其实际应用。本文采用了改进的共沉淀法,并通过控制水热处理时间的方式来调控MTX/LDH纳米复合物的性能,重点研究了MTX/LDH纳米复合物对肺癌细胞A549的抑制作用。我们的研究结果发现MTX/LDH纳米复合物的物化性能与抗癌效果之间存在着某种密切的关系,我们首次利用分散系数 ε 对此进行了量化,这为MTX/LDH纳米复合物的结构-药效相关性的研究打下了坚实的基础。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

仪器:用D/max-2500PC型XRD仪测定样品的相结构,靶压200 kV,靶流100 mA,Cu $K\alpha$ 射线源为光源, $\lambda=0.154\ 06\ \text{nm}$,用石墨单色器滤波;H-7650-HITACHI型TEM仪观察粒子的大小和形貌,工作电压为200 KV;Bruker Tensor 27型FT-IR光谱仪,样品与KBr质量比为1:100;Cary50型紫外可见分光光度计,单波长测量,波长为306 nm,5% CO_2 培养箱,超净工作台;TCL-16C离心机。

试剂: $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (固含量不少于99%),分析纯,广东汕头市西陇化工厂有限公司; $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot$

9H₂O(固含量不少于99%),分析纯,上海新宝精细化工厂;NaOH(固含量不少于96%),分析纯,天津市化学试剂三厂;甲氨蝶呤(MTX),浙江省湖州展望药业有限公司;乙醇(含量不少于99.7%),分析纯,上海国药集团化学试剂有限公司;二甲亚砜(DMSO),分析纯,上海生物工程有限公司;小牛血清(BB001),上海生物工程有限公司;DMEM(编号PB0680)培养基,上海生物工程有限公司;MTT(Sigma 编号T0793),上海生物工程有限公司;胰蛋白酶(PB0680),上海生物工程有限公司;酶标仪(Thermo MK4, USA);实验用水均为去离子水。

1.2 共沉淀法合成 MTX/LDH

称取 0.769 2 g Mg(NO₃)₂·6H₂O、0.562 7 g Al(NO₃)₃·9H₂O 溶于乙醇与水体积比为 1:3 的混合溶液中,并转移至三颈烧瓶中,在恒定温度为 60 ℃ 的条件下磁力搅拌,并通以氮气。将 0.340 8 g 的 MTX 溶于 20 mL 乙醇与 2 mL 5% 的氨水混合液中,迅速倒入三颈烧瓶中,用 10% 的氨水作为沉淀剂,控制沉淀剂以 0.1 mL·s⁻¹ 的滴加速率滴加到上述混合溶液中,调节溶液的 pH 值至 9.5,恒温继续搅拌,保温 1 小时。待反应结束后,在 4 000 r·min⁻¹ 转速下将所得产物用无水乙醇离心洗涤 2 遍,并用去离子水离心洗涤 3 遍,每次离心时间为 3 min,以清除吸附在表面的 MTX。将沉淀分散于 25 mL 水中,转移至 50 mL 反应釜(内衬为聚四氟乙烯)内,80 ℃ 条件下水热处理 6~48 h。水热处理完毕之后,干燥得到产物。

1.3 缓释性能研究

根据测出的载药量计算出做缓释性能实验所需的 MTX/LDH 的量,将称量好的 MTX/LDH 纳米复合物置于 pH 值为 7.4(500 mL)的磷酸缓冲液(按照中国药典 2005 年版第二部附录 XIVE 方法配置)中,在(37±0.5) ℃ 下恒温搅拌,一定的时间间隔内,取 3 mL 溶液 10 000 r·min⁻¹ 下离心 30 s 后取其上清液,用紫外-可见分光光度计在 306 nm 处测其吸光度,并根据标准曲线 $A=0.051\ 85c+0.000\ 62$ ($r=0.999\ 9, n=7$) 计算 MTX 的累积释放量。

1.4 MTT 细胞生物实验

人肺癌 A549 细胞接种于 100 mL 的培养中,培养基为含有 10% 小牛血清的 DMEM,置于 37 ℃,5% CO₂ 恒温培养箱内培养箱孵育,用显微镜观测待细胞长满培养瓶的 80%~90%,用 0.25% 的胰蛋白酶消化,传代。用 10% DMEM 将悬浮的细胞接种到 96 孔板,每孔体积 100 μL,正常培养 24 h 后吸走废

液,加入不同浓度的 MTX 和 MTX/LDH,如 20、40、60、80、120 μg·mL⁻¹(用 DMEM 稀释),每组设 6 孔重复,对照组加 100 μL DMEM(无血清),分别培养 24 h 后弃除 96 孔板中的残药和 DMEM,每孔加入新鲜 DMEM(无血清)90 μL,10 μL MTT(5 mg·mL⁻¹, pH=7.4 的 PBS 配制),继续培养 4 h 后,终止培养,小心吸弃孔内培养上清液,每孔加 100 μL DMSO,震荡 5 min,用酶标仪检测。

2 结果与讨论

2.1 XRD 分析

图 1 为不同水热处理时间下制备的 MTX/LDH 的 XRD 图,考察了 100 ℃ 下水热处理时间分别为 6、12、24、36 和 48 h 下得到的 MTX/LDH 纳米复合物的性能。从图中可以看出水热处理时间较短(6 h)时,所得产物的 XRD 特征衍射峰峰值较低。12~48 h 下制备的 MTX/LDH 纳米复合物都具有尖锐的(003)、(006)面特征衍射峰,基线低且平稳,衍射峰峰型窄且尖,表明制备的 MTX/LDH 纳米复合物晶相单一,晶体结构一致,晶面生长的有序程度高,结晶度好。分析 XRD 图可知,水热处理 6 h 后得到的样品,其衍射峰强度最低,结晶度最差,水热处理 12 h 后的样品衍射峰强度最高,峰形最好,这说明水热处理 12 h 后得到的 MTX/LDH 纳米复合物的晶型发育最完整。

表 1 为不同水热处理时间下得到的 MTX/LDH 纳米复合物的特征数据及平均粒径。根据布拉格公

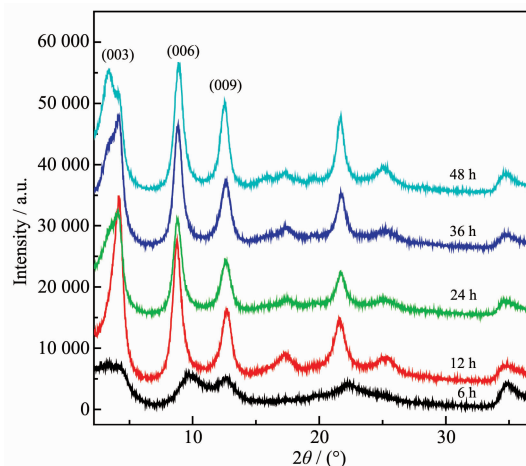


图 1 不同水热处理时间下制得的 MTX/LDH 纳米复合物的 XRD 图

Fig.1 XRD patterns of MTX/LDH nanohybrids obtained at different hydrothermal treatment time

表 1 不同水热处理时间下制备的 MTX/LDH 的晶体结构数据

Table 1 Characteristic data of MTX/LDH nanohybrids obtained at different hydrothermal treatment time

Sample	Basal spacing / nm	Interlayer spacing / nm	Angle of inclination / (°)	Mean particle size / nm	ε
6 h	2.218 3	1.738 3	55.08	96.07	0.67
12 h	2.127 5	1.647 5	51.00	147.46	0.54
24 h	2.154 5	1.674 5	52.17	162.06	0.64
36 h	2.120 7	1.640 7	50.71	210.00	0.71
48 h	2.602 3	2.122 3	90	216.34	0.75

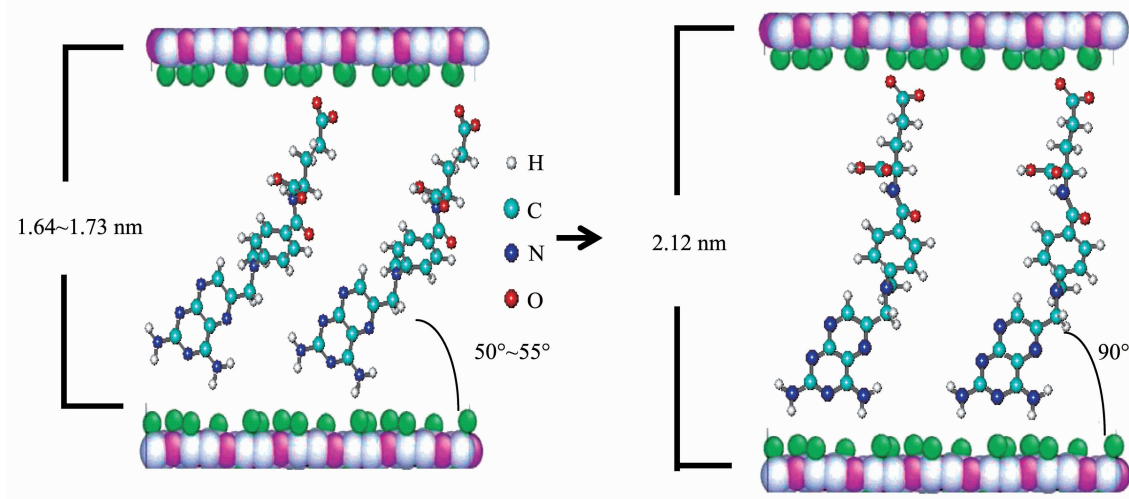


图 2 不同水热处理时间下得到的 MTX/LDH 纳米复合物的排列方式示意图(左)6~36 h; (右) 48 h

Fig.2 Scheme of the arrangement of MTX/LDH nanohybrids obtained at different hydrothermal treatment time (left) 6~36 h; (right) 48 h

式可以计算出 MTX/LDH 的层间距, 由于 LDH 层板厚度为 $0.48 \text{ nm}^{[21]}$, 可以得到样品的通道高度随着水热处理时间的延长分别为 1.738 3 、 1.647 5 、 1.674 5 、 1.640 7 和 $2.122 \text{ 3} \text{ nm}$ 。甲氨蝶呤分子的长度为 $2.12 \text{ nm}^{[22]}$, 据此我们模拟了不同水热处理时间下制得的 MTX/LDH 纳米复合物空间排列示意图, 如图 2 所示: 随着水热处理时间的增加, MTX 在 LDH 层间从单分子倾斜排列变化到垂直单分子排列。平均粒径是通过测定多张(>50 , 保证 200 个粒子以上)TEM 图中粒子的粒径得到的, 也列于表 1。从中可以看出: 不同的处理时间对产物的层间距有非常大的影响, 当水热处理时间较短时(6~36 h), MTX 以单层倾斜的方式排列, 当时间增加到 48 h 时, 层间距急剧增大, MTX 以单层垂直的方式排列。

2.2 FT-IR 分析

图 3 显示了不同水热处理时间下得到的 MTX/LDH 纳米复合物的 FT-IR 光谱图。从图 3 可以看出, $3\,400 \text{ cm}^{-1}$ 处的宽峰对应于 LDH 层板上和层间水分子的 OH 伸缩峰^[23]。 $1\,614 \text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,456 \text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰对应于 MTX 中芳香环的 C=C 伸缩振动

峰^[21], 这些峰的出现表明 MTX 已经成功插层到 LDH 层间。 $1\,207 \text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰为 MTX 的 C-N 键。在低频振动区间, 出现的吸收峰对应着点阵振动模式(Al-O, Mg-O, Al-O-Mg 等)。

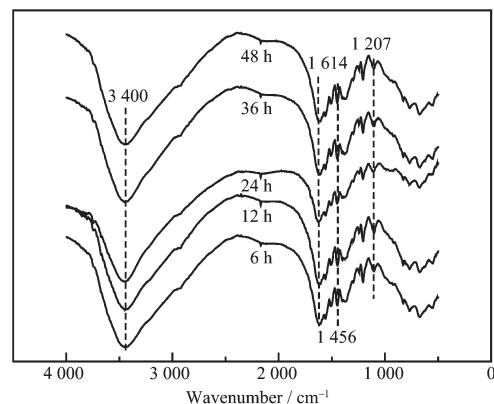


图 3 不同水热处理时间下得到的 MTX/LDH 纳米复合物的 FT-IR 光谱

Fig.3 FT-IR spectra of MTX/LDH nanohybrids obtained at different hydrothermal treatment time

2.3 TEM 图分析

图 4 为不同水热处理时间下制备的 MTX/LDH

纳米复合物的形貌及相应的粒径分布图。从 TEM 图中可以观察到不同水热处理时间下制备的 MTX/LDH 纳米复合物基本呈圆形, 水热处理时间的不同导致了粒子粒径发生变化。随着水热处理时间的延长, 粒子粒径逐渐变大。但水热处理时间过短或过长则会导致单分散性降低、形貌不规则程度的加剧。不同水热处理时间下得到的 MTX/LDH 纳米复

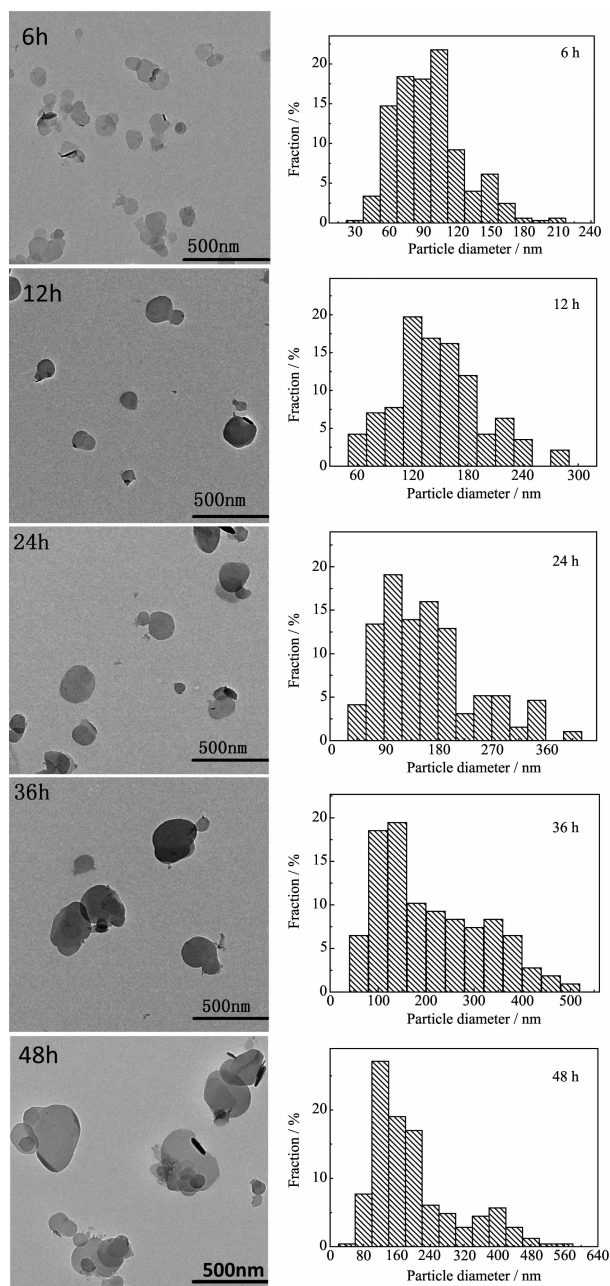


图4 不同水热处理时间下制备的 MTX/LDH 纳米复合物的 TEM 图和粒径分布图

Fig.4 TEM images and distribution of particle size of MTX/LDH nanohybrids obtained at different hydrothermal treatment time

合物的平均粒径列于表 1 中。从表中可以看出, 随着水热处理时间的延长, MTX/LDH 粒子的平均粒径逐渐增大, 增加速率先快后慢。48 h 时粒径最大。从 TEM 图中可看出处理时间为 6 h 或超过 24 h 后, 粒子单分散性变差, 粒径均匀度变差。12 h 和 24 h 得到的粒子单分散性好且粒子形状均匀。综上所述, 从粒子形貌、单分散性、结晶度等角度来分析, 12 h 样品的物化性能最为优良。

2.4 缓释性能研究

首先对不同水热处理时间得到的 5 种样品进行了载药量的测定, 6~48 h 样品的载药量分别为 42.6%、52.3%、47.6%、52.7% 和 51.5%, 据此可以看出, LDH 是一类载药能力很强的载体, 复合物的平均粒径与其载药量之间并无直接关系。图 5 为这 5 种样品的缓释曲线图。从图中可以看出, 5 种样品均呈现出良好的缓释性能, 释放速率先快后慢, 前 150 min 是一个较为快速的释放过程, 而以后的 150~500 min 释放速率缓慢, 整个过程中未出现突释现象。这种释放模式非常适合临床应用, 开始时的快速释放能满足最初的治疗目的, 而后来的控释-缓释模式则能保持体内药物浓度的稳定, 从而达到最佳的治疗。其中 48 h 样品释放速率最慢, 从表 1 可以看出, 48 h 样品与 36 h 样品粒径相近, 分别为 216.34 nm 和 210.00 nm, 而 MTX 在 LDH 层间排列方式有较大差异, 36 h 样品中 MTX 在 LDH 层间的倾斜角度为 50.71°, 48 h 样品 MTX 在 LDH 层间以单层垂直方式排列。从图 5 中可以看出 36 h 样品的释放速率远远大于 48 h 样品的释放速率: 100 min 时, 36 h 的释放达到 63%, 而 48 h 样品仅为 54%,

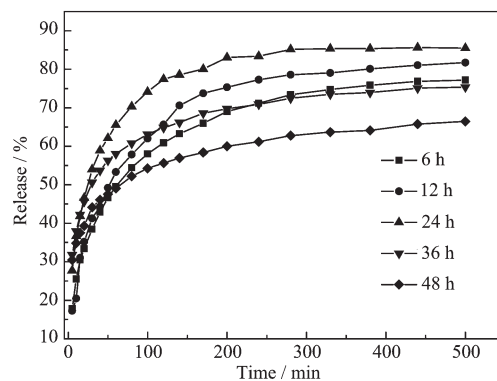


图5 不同水热处理时间制得的 MTX/LDH 纳米复合物的释放曲线图

Fig.5 Release profiles of MTX/LDH nanohybrids obtained at different hydrothermal treatment time

500 min 时, 36 h 最终释放率为 75%, 48 h 样品仅达到 66%。这说明了层间排列方式的不同导致了其释放速率不同, 层间倾斜角度越大, 释放速率越慢, 与段雪等人的结论一致^[24], 段雪的研究表明层间阴离子在层间的不同排布方式会极大地影响其释放速率。

2.5 动力学模拟

一般来讲, 生物药物/LDH 纳米复合物的释药机制主要有两种: 离子交换机理和 LDH 片层的溶蚀^[25]。为了探索 MTX/LDH 纳米复合物的释药机理, 通常采用以下 4 种常用的数学模型对 MTX/LDH 的释放过程进行拟合^[26-27]。

(1) 一级方程: $\ln(1-M_t/M_\infty)=-kt$, 多用于描述释放基质溶解所引发的药物释放行为和离子交换过程;

(2) Higuchi 方程: $M_t/M_\infty=kt^{0.5}$, 它是以 Fickian 扩散定律为基础提出的动力学方程, 适用于遵循扩散控制机理的释药过程;

(3) Bhaskar 方程: $\ln(1-M_t/M_\infty)=-kt^{0.65}$, 用于描述不规则扩散或者粒内扩散机理;

(4) Ritger-Peppas 方程: $M_t/M_\infty=kt^n$, 其中 n 为表征释放机制的特征参数。当 $0.45 < n < 0.89$ 时, 药物的释放机制为 non-Fickian 扩散, 即扩散与溶蚀并存;

当 $n < 0.45$ 时, 为 Fickian 扩散; 当 $n > 0.89$ 时, 为骨架溶蚀机制;

以上 4 个方程中, 其中 M_t 为 t 时间的累积释放量, M_∞ 为 ∞ 时累积释放量, M_t/M_∞ 为 t 时累积释放率, k 为释放常数。

采用这 4 种常用的数学模型对 MTX/LDH 的体外释放数据进行动力学拟合, 其结果示于图 6, 拟合数据列于表 2。由拟合结果可知, 采用 First-order 方程拟合得到的拟合因子 R 均较小, 从图 6 中可看出其拟合数据点离散严重, 说明 MTX/LDH 纳米复合物的释药机制不符合 First-order 方程。相对于 First-order 方程, 采用 Bhaskar 方程拟合得到的拟合因子相对较高(仅 24 h 样品的 $R < 0.95$), 初步判断 MTX/LDH 纳米复合物在 pH=7.4 的磷酸缓冲液中释放出 MTX 分子的机制属于扩散机制。进一步采用 Ritger-Peppas 方程, 从拟合结果 $R > 0.96$ 及 $n < 0.45$ 可判定, MTX/LDH 纳米复合物的释药机制属于离子交换机理, 且释放过程为扩散控制过程。最后采用 parabolic-diffusion 模型拟合得到了最高的拟合因子 ($R > 0.98$), 说明 MTX/LDH 纳米复合物的释药机制为粒内扩散或表面扩散所引起的扩散控制过程; 也就是说, MTX/LDH 纳米复合物在释放过程中主要是介质中的 HPO_4^{2-} 、 H_2PO_4^- 将 LDH 层间的 MTX 阴离

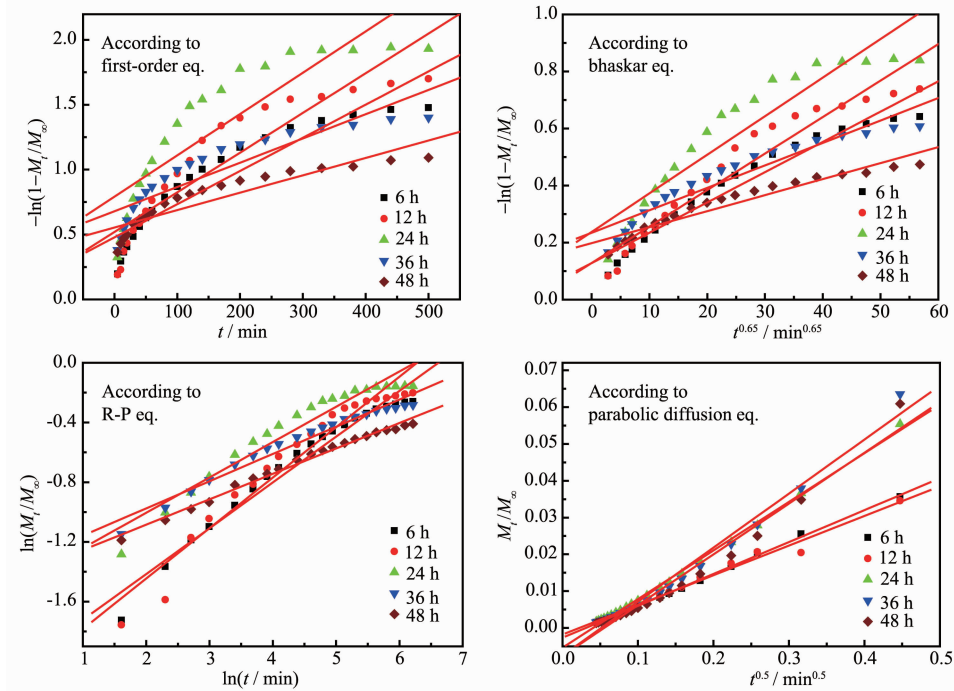


图 6 不同水热处理时间下得到的 MTX/LDH 纳米复合物释放过程的动力学拟合直线

Fig.6 Plots of different kinetic models for the release of MTX from the MTX/LDH nanohybrids obtained at different hydrothermal treatment time

表2 不同水热处理时间下制得的 MTX/LDH 纳米复合物释放过程的动力学拟合数据

Table 2 Fitting parameters of different kinetic models for the release of MTX from the MTX/LDH nanohybrids obtained at different hydrothermal treatment time

Sample	First-order Eq.		Bhaskar Eq.		R-P Eq.			Parabolic-diffusion Eq.	
	R	k_1	R	k_B	R	k	n	R	k_p
6 h	0.929 6	0.002 6	0.973 9	0.010 6	0.983 6	0.131 5	0.306 7	0.999 4	0.086 7
12 h	0.912 1	0.003 1	0.962 0	0.012 8	0.970 0	0.119 8	0.337 9	0.994 1	0.080 6
24 h	0.874 3	0.003 2	0.936 4	0.013 5	0.964 7	0.228 0	0.236 7	0.998 4	0.132 1
36 h	0.895 6	0.001 9	0.950 9	0.007 9	0.982 8	0.261 8	0.182 3	0.991 0	0.146 8
48 h	0.911 4	0.001 3	0.961 6	0.005 6	0.994 4	0.240 5	0.170 2	0.984 7	0.138 0

子置换出来,使得层间的 MTX 阴离子进入到缓释介质中。综上,MTX/LDH 在模拟体液中释放出 MTX 的机理为基于离子交换的多相扩散过程,parabolic-diffusion 模型能很好地阐述其释放机理。

2.6 细胞生物实验探索

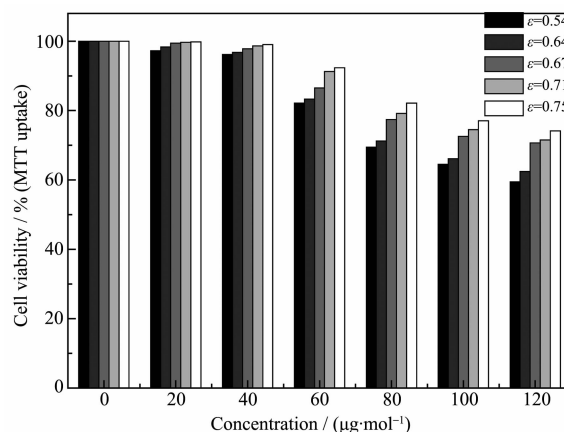
MTX/LDH 纳米复合物对某些癌细胞有非常明显的抑制效果,关于 MTX/LDH 纳米复合物抗癌-抑癌作用的研究,韩国科学家 Choy 等作出了大量的工作,他的研究表明,LDH 母体即使在很高的浓度下对人体也是无害的,MTX/LDH 纳米复合物的抗癌效果随着作用时间的延长而增加,随着复合物浓度的增加而增强;粒径在 100~300 nm 之间的复合物对癌细胞的摄取和治疗效果最佳^[16-17,28]。但是影响复合物抗癌-抑癌效果的关键因素目前还未有相关的报道,我们试图进行这方面的探索性研究。因而我们引入了一个新的参数:分散系数 ε , ε 与粒子的粒径和单分散性有关。 ε 值的提出鉴于这样的出发点:合成的复合物粒子粒径越均匀,它对癌细胞的抑制作用越均匀与稳定;粒径越小,因表面效应而产生的抑癌效果越明显。其定义式如下:

$$\varepsilon = \delta / \bar{D} \quad (1)$$

$$\delta = \sqrt{\frac{\sum (D - \bar{D})^2}{n-1}} \quad (2)$$

其中 $\bar{D}$ 是平均粒径, D 为所测粒子的半径, n 为所测粒子的数目, δ 为标准偏差, ε 值越小表明该体系的分散性越好。不同水热处理时间下得到复合物的 ε 值列于表 1, 同时复合物对肺癌细胞 A549 的抑制效果与 ε 的关系见图 7。从图 7 可以看出,复合物的抗癌效果与 ε 值密切相关, ε 值越小,复合物的抑癌-抗癌效果越明显;而复合物的平均粒径与其抗癌效果之间并无直接关系。从我们的研究结果还可以看出抗癌效果最好的 12 h 样品,其粒子形貌最规则、单分散性最好、晶型发育最完整、载药量也

很高。这说明 MTX/LDH 纳米复合物的物化性能与抗癌效果之间存在着某种密切的关系。而这种关系我们首次利用分散系数 ε 进行了量化处理。我们试图通过这个参数来量化构建 MTX/LDH 纳米复合物的结构-药效相关性,当然其科学性和准确性还需进一步的研究确认。

图7 MTX/LDH 纳米复合物的抗癌效果与 ε 值的关系Fig.7 Comparison of Cell viability tests for MTX/LDH nanohybrids with different ε values

3 结 论

通过改变水热处理时间来调控 MTX/LDH 纳米复合物的粒径以及单分散性,研究表明水热处理时间的不同会导致复合物的粒径、单分散性以及结晶度的不同,据此在宏观上可以通过控制水热处理时间来制备不同性质的 MTX/LDH 纳米复合物。将得到的 5 种 MTX/LDH 纳米复合物作用于肺癌细胞 A549 进行细胞生物实验,对实验结果首次采用分散系数 ε 构建 MTX/LDH 纳米复合物的结构-药效相关性。研究表明, ε 值越小,该复合物体系的分散性越好,相应地对肺癌细胞 A549 的抑制效果越明显。

References:

- [1] Iyi N, Sasaki T. *Appl. Clay Sci.*, **2008**,**42**:246-251
- [2] Kang H L, Huang G L, Ma S L, et al. *J. Phys. Chem. C*, **2009**,**113**:9157-9163
- [3] Zhao M Q, Zhang Q, Jia X L, et al. *Adv. Funct. Mater.*, **2010**,**20**:677-685
- [4] Oh J M, Biswick T T, Choy J H. *J. Mater. Chem.*, **2009**,**19**:2553-2563
- [5] JIA Chun-Xiao(贾春晓), ZHANG Xiao-Qing(张晓晴), LI Shu-Ping(李淑萍). *Chinese J. Chem.*(中国化学), **2012**,**30**:277-282
- [6] Bubniak G A, Schreiner W H, Mattoso N, et al. *Langmuir*, **2002**,**18**:5967-5970
- [7] Wei M, Shi S, Duan X, et al. *J. Solid State Chem.*, **2004**,**177**:2534-2541
- [8] Leroux F, Besse J P. *Chem. Mater.*, **2001**,**13**:3507-3515
- [9] Choy J H, Kwak S Y, Jeong Y J, et al. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**,**39**:4041-4045
- [10] Yang J H, Han Y S, Park M, et al. *Chem. Mater.*, **2007**,**19**:2679-2685
- [11] Katherine M T, Scott S R, Emmanuel G P. *J. Controlled Release*, **2004**,**95**:501-507
- [12] Kwak S Y, Kriven W M, Wallig M A, et al. *Biomaterials*, **2004**,**25**:5995-6001
- [13] Edward W B, Jeffes III, Jerry L, et al. *J. Invest. Dermatol.*, **1995**,**104**:183-188
- [14] Chow M, Koo J, Ng P, et al. *Mutat. Res.*, **1998**,**413**:251-264
- [15] Seitz M. *Curr. Opin. Rheumatol.*, **1999**,**11**:226-232
- [16] Oh J M, Park M, Kim S T, et al. *J. Phys. Chem. Solids*, **2006**,**67**:1024-1027
- [17] Oh J H, Choi S J, Kim S T, et al. *Bioconjugate Chem.*, **2006**,**17**:1411-1417
- [18] DU Xue-Yan(杜雪岩), CHEN, Yin-Ze(陈尹泽), MA Y-X(马应霞), et al. *Appl. Chem. Ind.*(应用化工), **2008**,**37**:1449-1452
- [19] QI Feng-Lin(齐凤林), LI Shu-Ping(李淑萍), ZHANG Xiao-Qing(张晓晴). *Acta Chim. Sinica*(化学学报), **2012**,**70**:2162-2168
- [20] WANG Ji-Qin(王继芹), LI Xin(李鑫), LI Shu-Ping(李淑萍), et al. *Acta Chim. Sinica*(化学学报), **2011**,**69**:137-144
- [21] Aisawa S, Takahashi S, Ogasawara W, et al. *J. Solid State Chem.*, **2001**,**162**:52-62
- [22] Choy J H, Jung J S, Oh J M, et al. *Biomaterials*, **2004**,**25**:3059-3064
- [23] Li B X, He J, David G, et al. *Appl. Clay Sci.*, **2004**,**27**:199-207
- [24] MENG Jin-Hong(孟锦宏), ZHANG Hui(张慧), DUAN Xue(段雪), et al. *Chinese Sci. Bull.*(科学通报), **2005**,**50**:208-214
- [25] Xu Z P, Lu G Q. *Pure Appl. Chem.*, **2006**,**78**:1771-1779
- [26] Zhang H, Pan D K, Duan X. *J. Phys. Chem. C*, **2009**,**113**:12140-12148
- [27] Li F S, Jin L, Han J B, et al. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2009**,**48**:5590-5597
- [28] Choi G, Kim S Y, Oh J M, et al. *J. Am. Ceram. Soc.*, **2012**,**95**:2758-2765