

三明治结构 rGO/Fe₃O₄@mSiO₂ 载体的构筑及协同抗肿瘤性能

杨永梅^{1,2} 嵇明翔¹ 杨 颖¹ 谢安建¹ 沈玉华^{*,1}

(¹ 安徽大学化学化工学院, 现代生物制造协同创新中心, 合肥 230601)

(² 黄山学院化学化工学院, 黄山 245041)

摘要: 采用温和的反应条件, 制备出三明治结构 rGO/Fe₃O₄@mSiO₂, 利用 SEM、TEM、FTIR、XRD 和 N₂ 吸附-脱附等对其形貌和性能进行表征, 考查了其对 HeLa 细胞的毒性和细胞荧光成像效果, 并探讨了其形成机理。实验结果表明: rGO/Fe₃O₄@mSiO₂ 具有较高的比表面积(217 m²·g⁻¹), 对抗癌药物 5-氟尿嘧啶(5-FU)的载药率达到 57.34%; 它还具有较好的磁性, 磁饱和强度为 32 emu·g⁻¹; 而且 rGO/Fe₃O₄@mSiO₂ 纳米复合物在光照条件下具有优异的光热转换性能, 对 HeLa 细胞表现出明显的杀伤效果。

关键词: 纳米复合材料; 磁靶向; 光热治疗; 药物载体; 协同抗癌

中图分类号: O611.4; TB333

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2018)06-1095-08

DOI: 10.11862/CJIC.2018.164

Construction and Synergistic Anticancer Efficacy of Sandwich-like rGO/Fe₃O₄@mSiO₂ Drug Carriers

YANG Yong-Mei^{1,2} JI Ming-Xiang¹ YANG Ying¹ XIE An-Jian¹ SHEN Yu-Hua^{*,1}

(¹ School of Chemistry and Chemical Engineering, Collaborative Innovation Center of Modern Bio-manufacture, Anhui University, Hefei 230601, China)

(² School of Chemistry and Chemical Engineering, Huangshan University, Huangshan, Anhui 245041, China)

Abstract: A novel sandwich-like nanocomposites of rGO/Fe₃O₄@mSiO₂ were successfully fabricated through a facile method. The morphology and properties of nanocomposites were characterized by SEM, TEM, FTIR, XRD and N₂ adsorption-desorption. As a result, it was observed that the nanocomposites exhibit the saturation magnetization of 32 emu·g⁻¹, and possess abundant pores with a large surface area as much as 217 m²·g⁻¹. The loading capacity of Pentafluorouracil (5-FU) with the nanocomposites was high (57.34%). The formation mechanism of rGO/Fe₃O₄@mSiO₂ was discussed. Additionally, the synergistic anticancer efficacy of as-prepared nanocomposites against HeLa cell line was investigated by MTT assay and cell fluorescence microscopic imaging analysis. The results indicated that 5-FU loaded in the nanocomposites is effectively delivered to tumor lesion sites under the action of magnetic targeting. Moreover, the rGO/Fe₃O₄@mSiO₂ nanocomposites have excellent photothermal conversion properties under light conditions, and show significant killing effect on HeLa cells.

Keywords: nanocomposite; magnetic targeting; photo-thermal therapy; drug carrier; synergistic anti-cancer

癌症已成为危害公众健康的重大疾病之一。多年来国内外研究者一直致力于行之有效的癌症治疗方法探寻, 使得诊治该疾病的方法得到了快速发

展。现在化疗和放疗是临床上应用最广泛的方法, 但其所用药物副作用大, 让病人产生巨大的痛苦^[1-2]。因此, 近年来毒副作用有所降低的光热疗法^[3]、磁热疗

收稿日期: 2018-03-16。收修改稿日期: 2018-04-17。

国家自然科学基金(No.21571002, 21671001)和安徽省高校优秀青年骨干人才国内外访学项目(No.gxfx2017105)资助。

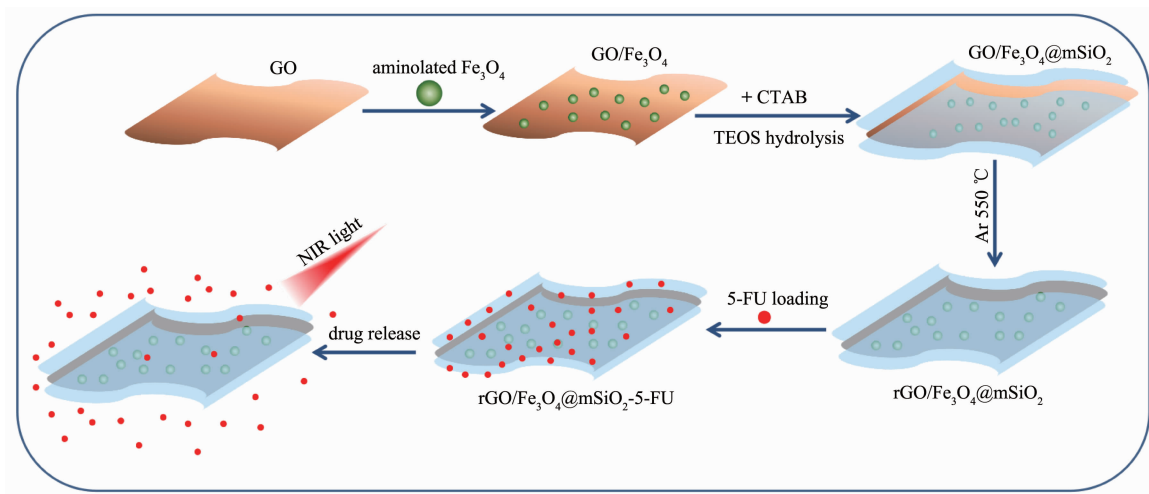
*通信联系人。E-mail: s_yuhua@163.com

法^[4]、免疫疗法^[5]和微波疗法^[6]等不断被开发出来,为癌症治疗提供了新的选择,但单一疗法仍无法得到令人满意的效果,探索多模式协同抗癌的治疗方法成了新的研究方向。另一方面,众多优异的药物载体如介孔硅^[7]、介孔碳^[8]和金属有机框架化合物^[9]等被合成出来。其中,介孔二氧化硅(mSiO₂)是近年来在生物医学领域中被广泛应用的药物载体。它具有较大的比表面积、高孔容、可调孔径以及优良生物相容性等特点^[10]。但是,单一的化疗效果不理想,且单纯的 mSiO₂ 无法将药物精准地运输到肿瘤部位。

氧化石墨烯(GO)是一种拥有单原子厚度的二维碳材料,不仅拥有较高的比表面积,为负载药物分子提供平台,而且具有优异的光热性能,因而可作为光热效果治疗肿瘤组织方法^[11-12]中的理想材料。但由于石墨烯片层之间有较强的范德华力作用^[13],使其容易发生团聚。因此,对其表面进行修饰并与其他材料复合是防止其团聚的有效措施。另外,Fe₃O₄ 是一种典型的磁性材料,将一些药物载体材料与之复合,

借用外磁场可以实现药物的靶向传输。例如 Fe₃O₄/MoS₂^[14]、Fe₃O₄@zirconium^[15]以及 Fe₃O₄@NH₂@MOF-5^[16]等复合物均利用 Fe₃O₄ 的优异磁性实现了药物的靶向传输,提高了治疗效果。

鉴于此,本论文提出一种新的具有协同作用的靶向药物传输方法。如 Scheme 1 所示,首先对制备的 Fe₃O₄ 纳米粒子进行氨基化修饰,再与 GO 复合,形成 GO/Fe₃O₄ 复合物。然后,以十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)作为一种致孔剂,使 SiO₂ 沿着石墨烯两侧生长,构建一种类似“三明治”结构的 GO/Fe₃O₄@mSiO₂, 再将 GO 还原得到 rGO/Fe₃O₄@mSiO₂ 复合载体材料。SiO₂ 具有大量的介孔结构,使复合材料具有较大的比表面积和孔容,利于载药。同时,复合材料中的 Fe₃O₄ 作为磁靶向物质,可将药物有效运输到肿瘤部位。GO 具有优异的光热性能,可在靶向定位后对肿瘤区域进行光热治疗有望实现协同抗癌治疗效果。



Scheme 1 Preparation, drug loading and controlled release of rGO/Fe₃O₄@mSiO₂ nanocomposites

1 实验部分

1.1 主要试剂和材料

石墨片,高锰酸钾(KMnO₄),硝酸钠(NaNO₃),六水合三氯化铁(FeCl₃·6H₂O),乙二醇(C₂H₆O₂),乙酸钠(CH₃COONa),聚乙二醇(*M_n*=1 500),十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)和二甲基亚砷(DMSO)购于国药试剂有限公司;3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES),正硅酸乙酯(TEOS)购于阿拉丁试剂(上海)有限公司;五氟尿嘧啶(5-FU),Hoechst 33342,碘化吡啶(PI),3-(4,5-二甲

基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT),胰酶(0.25% 含 EDTA,GIBCO),DMEM 高糖培养基和胎牛血清(GIBCO)购自上海生工生物工程有限公司。以上试剂均为分析纯,未经进一步纯化。实验用水为超纯水(18.0 MΩcm)。

1.2 仪器和设备

所用仪器包括紫外可见分光光度计(UV-1800,日本岛津)、荧光显微镜(DMI3000B,德国徕卡)、酶联免疫检测仪(RT-2100C,深圳镭拓)。采用 NEXUS-870 FTIR 型傅里叶变换红外光谱仪,利用溴化钾压

片法来检测样品结构;采用 DX-2700 型 X 射线衍射仪(Cu K α 射线作为发射源,波长为 0.154 056 nm,衍射角 2θ 为 $5^\circ\sim 90^\circ$)对样品的物相进行分析,测试电压为 40 kV,电流为 100 mA;采用 SU 1510 型扫描电子显微镜(加速电压 10 kV)和 JEM 100SX 型透射电子显微镜(加速电压 200 kV),观察产物形貌与结构;采用 ELSZ-2 型 ζ 电位分析仪(日本大塚电子株式会社)对产品进行 ζ 电位测量;采用 3H-2000BET-A 型比表面测试仪器对产品进行 N₂ 吸附-脱附和孔径测定。产物的磁学性质测试在 MPMS XL-7 型精密 SQUID 磁学测量系统(美国量子设计公司)上进行。采用 Fluke Ti32 热红外摄像机对样品光照前后进行热红外图像采集。

1.3 rGO/Fe₃O₄@mSiO₂ 纳米复合载体的制备

参照文献报道的 Hummers 法和溶剂热法分别制备 GO 纳米片^[17-19]和 Fe₃O₄ 纳米粒子^[20],备用。将 150 mg Fe₃O₄ 纳米粒子分散于 100 mL 无水乙醇中,缓慢滴加 5 mL 的 APTES,超声 5 min 后,再磁力搅拌 6 h,对其表面进行氨基化修饰,再磁铁分离。然后将修饰后的 Fe₃O₄ 纳米粒子分散于 75 mL 去离子水中,制备浓度为 2 mg·mL⁻¹ 的氨基化 Fe₃O₄ 纳米粒子悬浮液。配制 0.25 mg·mL⁻¹ 的 GO 溶液 150 mL,加入 20 mL 2 mg·mL⁻¹ 氨基化的 Fe₃O₄ 纳米粒子溶液,加热至 40 ℃并搅拌 2 h。然后加入 1.5 g CTAB,待完全溶解后,缓慢滴加 1.5 mL TEOS,40 ℃条件下持续搅拌 24 h。然后在 6 000 r·min⁻¹ 下离心分离并用热乙醇(40 ℃)清洗 2 次,再用 0.45 μ m 的水系微孔滤膜抽滤,取滤膜上的固体,纯水和乙醇清洗多次,真空干燥,得到 GO/Fe₃O₄@mSiO₂ 复合材料。最后在氩(Ar)气氛下 550 ℃煅烧 3 h,得到 rGO/Fe₃O₄@mSiO₂ 纳米复合载体,保存备用。

1.4 药物负载及释放

抗癌药物 5-FU 的负载:称取 5 mg 制备的 rGO/Fe₃O₄@mSiO₂ 纳米复合载体加入到 5 mL 的 1 mg·mL⁻¹ 5-FU 溶液中,超声分散后,在摇床上振荡 24 h,得到 rGO/Fe₃O₄@mSiO₂-5-FU 悬浮液。离心分离,取上层清液稀释 30 倍测定吸光度。根据 5-FU 标准曲线,并利用公式(1)计算载药率(DLR)。

$$DLR = \frac{m_{\text{装载药物}}}{m_{\text{载体}}} \times 100\% \quad (1)$$

药物释放:取 10 mg 的 rGO/Fe₃O₄@mSiO₂-5-FU 加入到 50 mL pH 值分别为 7.4 和 5.0 的磷酸盐缓冲液(PBS)中,振荡并在 0~48 h 内多次取溶液离心,

取上层清液 0.1 mL 稀释至 3 mL,测定吸光度并计算药物释放率。原溶液中每次取出溶液后均补加 0.1 mL PBS,保持总体积不变,并且后面所取样品的吸光度均为其前所有吸光度数值的总和。其中光照组在药物释放 8 h 时光照 10 min 再继续相同的操作,计算并绘制出药物释放行为曲线。

1.5 细胞毒性测试

选用 MTT 实验来检测 rGO/Fe₃O₄@mSiO₂ 的生物相容性以及 HeLa 细胞的杀伤能力。首先将所制备的 rGO/Fe₃O₄@mSiO₂ 与 rGO/Fe₃O₄@mSiO₂-5-FU 复合物配制为浓度为 1 mg·mL⁻¹ 的悬浮液,用紫外光照 10 min 进行灭菌处理,然后用 DMEM 培养基稀释至 0.1、0.01 和 0.001 mg·mL⁻¹,保存备用。将 HeLa 细胞以每孔 5×10^3 个接种到 96 孔板,并置于含有 5%(V/V) CO₂ 的培养箱(37 ℃)中培养 24 h。然后移去培养基,加入 100 μ L 稀释后的复合物-培养基溶液(包括对照组),再放入培养箱中继续培养 24 h。分别设置避光与光照条件,其中光照组在 4 h 后取出,并利用 808 nm 近红外光照 10 min 再放回。置于 CO₂ 培养箱中孵化 24 h 后,移去培养基,加入 20 μ L MTT 检测液,继续孵化 4 h 后,去除上层液,加入 100 μ L DMSO 溶液,持续振荡,完全溶解后使用酶联免疫检测仪进行检测 490 nm 处的吸光值(OD 值),并用公式(2)计算细胞存活率(RCV),其中 OD_{exp}、OD_{bla} 和 OD_{con} 分别为实验组、空白组和对照组的 OD 值。

$$RCV = \frac{OD_{\text{exp}} - OD_{\text{bla}}}{OD_{\text{con}} - OD_{\text{bla}}} \times 100\% \quad (2)$$

1.6 细胞荧光显微镜图像分析

为了进一步研究复合材料对 HeLa 细胞的杀伤效果,利用 Hoechst 33342 和 PI 双染色的方法观察细胞凋亡情况^[21-22]。HeLa 细胞按照每孔 5×10^4 个接种在 6 孔板上,在含 5%(V/V) CO₂,37 ℃的恒温培养箱中培养 24 h。然后分别将 3 mL 内含 1 mL rGO/Fe₃O₄@mSiO₂ 与 rGO/Fe₃O₄@mSiO₂-5-FU 溶液的培养基加入到 6 孔板中,放入培养箱中继续培养 24 h。设置避光与光照条件进行对照,其中光照组在 4~6 h 后取出并利用 808 nm 近红外激光照射 10 min 后放回培养箱继续孵育 24 h。最后取出 6 孔板,弃去培养基,用 pH=7.4 的 PBS 冲洗,再使用 0.5 mL 的 Hoechst 33342(10 μ g·mL⁻¹)和 0.5 mL 的 PI(10 μ g·mL⁻¹)溶液分别对其进行染色 10 min,然后用 PBS 清洗干净,固定后在倒置荧光显微镜下观察并拍照。

2 结果与讨论

2.1 产物的形貌表征

为了解产物的形貌及尺寸,对其进行了 SEM 测试。图 1A 和 B 分别为 GO 与 Fe_3O_4 的 SEM 图,可以看出 GO 为薄片层状结构并伴有明显的褶皱,而 Fe_3O_4 为尺寸均匀的纳米微球,粒径约为 200 nm。图 1C 显示 Fe_3O_4 纳米球均匀地分布在 GO 表面,表明氨基化的 Fe_3O_4 与 GO 成功地复合。而在图 1D 中可以看出, $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ 具有明显的二维平面结构,尺寸约为 4 μm 的片层相互堆叠,其表面已看不到 Fe_3O_4 纳米球。这可能是由于介孔 SiO_2 覆盖于 $\text{GO}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 表面上下两层,将其包裹起来形成类似“三明治”结构的复合材料。

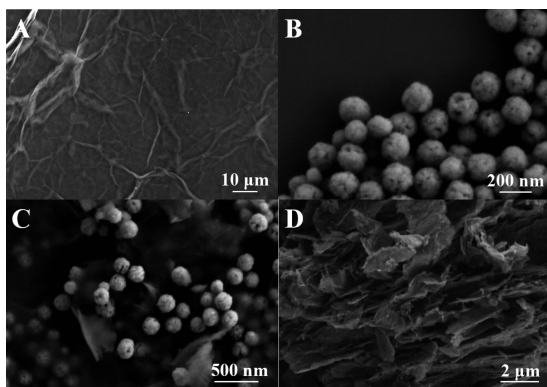


图 1 GO (A)、 Fe_3O_4 (B)、 $\text{GO}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ (C) 和 $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ (D) 的扫描电子显微镜(SEM)图

Fig.1 SEM images of GO (A), Fe_3O_4 (B), $\text{GO}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ (C) and $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ (D)

2.2 产物的 X 射线衍射(XRD)和红外光谱(FTIR)图分析

图 2A 为不同样品的 XRD 图,从图 2A-a 可以

看出,物质的主要峰位在 2θ 为 30.1° 、 35.4° 、 43.1° 、 56.9° 和 62.5° 处(以 Δ 表示),分别对应 Fe_3O_4 的 (220), (311), (400), (511), (440) 晶面 (PDF No.65-3107)。图 2A-b 在 10.2° 出现一个 GO 的特征峰(以 $\blacksquare$ 表示)。从图 2A-c 可以同时看到 Fe_3O_4 和 GO 的特征峰,GO 的特征峰偏移至 11° 左右,可能是由于氨基化的 Fe_3O_4 与 GO 复合对其的影响。如图 2A-d 所示:除 Fe_3O_4 的特征峰外,在 $23^\circ\sim 26^\circ$ 处出现一个宽峰可能是由于 rGO 与 SiO_2 的特征吸收峰在此处相互重叠而形成的,表明 $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ 成功合成。为进一步证明这一结论,又对制备过程各阶段产物进行了红外光谱测试(图 2B)。从 Fe_3O_4 红外光谱图可以看出在 570 cm^{-1} 处有归属于 Fe_3O_4 的 Fe-O 键的特征伸缩振动峰^[23]。 $\text{GO}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合物的 FTIR 光谱图中,在 1655 cm^{-1} 位置出现 C=O 振动吸收峰,这是因为 GO 中含有大量的羧基。而加入了表面活性剂 CTAB 修饰后的 $\text{GO}/\text{Fe}_3\text{O}_4$, 在 2917 、 2849 和 1486 cm^{-1} 位置均有出峰,分别归属于 CTAB 分子中的 $-\text{CH}_3$ 和 $-\text{CH}_2-$ 基团的 C-H 伸缩振动和弯曲振动吸收峰。在 $\text{GO}/\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ 的 FTIR 图中,约 810 、 965 cm^{-1} 处的吸收峰分别对应于 Si-O-Si 的伸缩振动吸收峰和 Si-OH 的振动峰^[24],说明成功合成了 $\text{GO}/\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ 。同时,可以看出 CTAB 峰明显减弱,可能是由于其在清洗过程中被大量除去。通过 Ar 气氛中高温煅烧,CTAB 的振动吸收峰基本消失,表明 CTAB 发生改变,而 GO 的 C=O 振动特征峰也随之减弱,这可能是由于在高温煅烧过程中 CTAB 分解产生的碳及氮作为还原剂将 GO 转化为 rGO,生成了最终产物 $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ 。

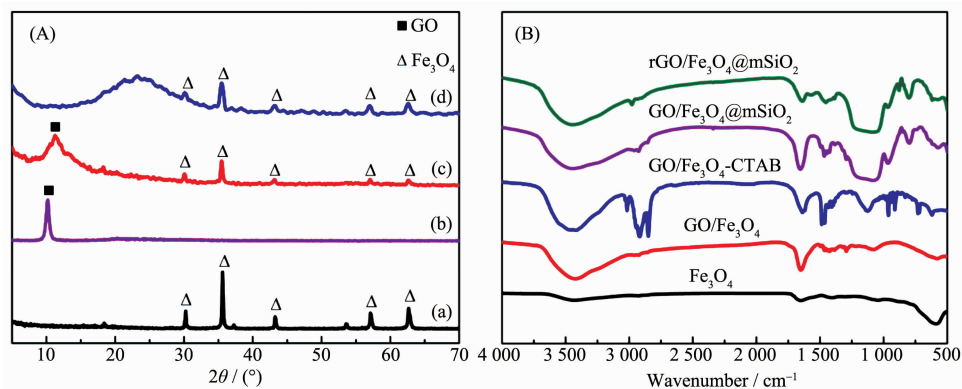


图 2 (A) Fe_3O_4 (a)、GO (b)、 $\text{GO}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ (c) 和 $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ (d) 的 XRD 图; (B) 样品的 FTIR 谱图

Fig.2 (A) XRD patterns of Fe_3O_4 (a), GO (b), $\text{GO}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ (c) and $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ (d); (B) FTIR spectra of different samples

2.3 rGO/Fe₃O₄@mSiO₂ 的形成机理探讨

为了探讨复合载体的形成机理,我们分别测定了各中间产物的 ζ 电位(图3)。Fe₃O₄纳米粒子 ζ 电位为-11.8 mV,是由于在水分散液中其表面富含羟基。利用APTES修饰后 ζ 电位为38.9 mV,表明Fe₃O₄纳米粒子表面被修饰了氨基,显正电荷,并可以较稳定地在溶液中分散。因此,经APTES修饰Fe₃O₄纳米粒子可通过静电引力与带负电荷(-52 mV)的GO复合,形成GO/Fe₃O₄复合物。由于GO负电荷较多,复合后总体显负电,电位为-13.1 mV。加入带正电荷的CTAB后,可以利用静电引力吸附在GO表面上下两层^[25-27],使得GO/Fe₃O₄-CTAB复合物显正电(18.1 mV)。之后引入TEOS,TEOS聚集在CTAB周围发生水解和缩聚生成SiO₂,而且其异质成核过程主要发生在GO/Fe₃O₄表面,形成了类似“三明治”结构的GO/Fe₃O₄@mSiO₂纳米复合材料。

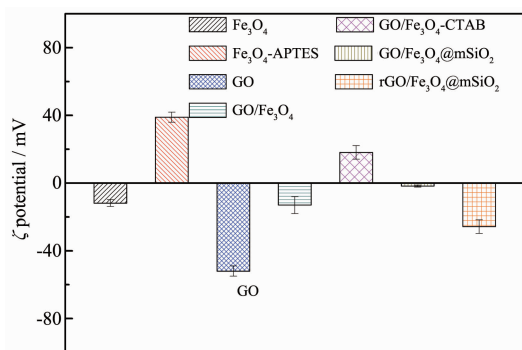
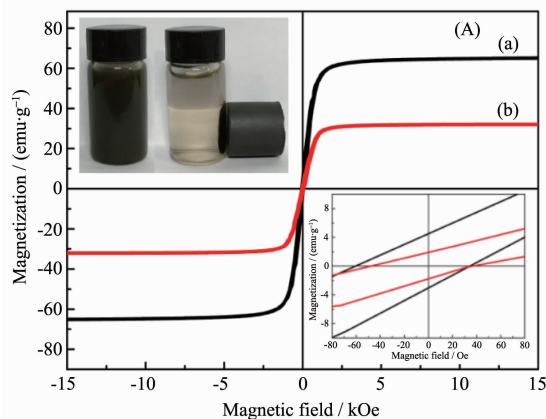


图3 不同样品的 ζ 电位分布图(25 °C)

Fig.3 ζ potential distribution of different samples(25 °C)



Inset in (A): top left: the nanocomposites in DI water are attracted toward the magnets; bottom right: the magnification at low magnetic field;
Inset in (B): thermal images of the DI water(a) and the aqueous dispersion of Fe₃O₄ (b), GO (c), GO/Fe₃O₄ (d), GO/Fe₃O₄@mSiO₂ (e) and rGO/Fe₃O₄@mSiO₂ (f)

再经Ar气氛的煅烧后,CTAB分子碳化分解,同时GO被还原。生成的rGO/Fe₃O₄@mSiO₂纳米复合载体经测定呈负电性(-25.7 mV)。 ζ 电位分析表明:产物形成的机理主要是各反应物层与层之间的静电吸附作用。

2.4 产物的磁性和光热性能分析

为了研究所制备产物的磁学性质,测试了Fe₃O₄和rGO/Fe₃O₄@mSiO₂复合物在室温下(300 K)的磁化强度随磁场变化的情况,并绘制曲线如图4A所示。Fe₃O₄纳米粒子的饱和磁化强度为65 emu·g⁻¹,而rGO/Fe₃O₄@mSiO₂复合物的饱和磁化强度则降低至32 emu·g⁻¹。导致磁化强度降低的原因可能是由于SiO₂与rGO的介入导致相同质量复合物中Fe₃O₄所占比重降低。低磁场放大图表明其呈现顺磁性,矫顽力约40 Oe。rGO/Fe₃O₄@mSiO₂的磁性使其在作为药物载体时具有磁靶向特性。另外,为检测复合物光致生热性能,采用Fluke Ti32热红外摄像仪对808 nm光照前后的去离子水、Fe₃O₄、GO、GO/Fe₃O₄、GO/Fe₃O₄@mSiO₂以及rGO/Fe₃O₄@mSiO₂水分散液进行热红外图像采集,光照时间为10 min。从图4B中发现相较于去离子水,Fe₃O₄、GO以及纳米复合物GO/Fe₃O₄、GO/Fe₃O₄@mSiO₂和rGO/Fe₃O₄@mSiO₂水分散液温度均有升高,其中GO/Fe₃O₄比Fe₃O₄和GO都高,表明Fe₃O₄对GO有一定的协同光热效果^[28];同时,rGO/Fe₃O₄@mSiO₂也比GO/Fe₃O₄@mSiO₂水分散液升温更多,说明GO被还原后光热效果更好;因此,浓度相同的rGO/Fe₃O₄@mSiO₂升温最高,达到

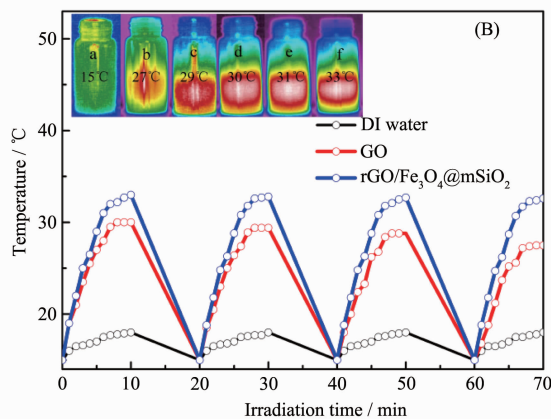


图4 (A) Fe₃O₄ (a)、rGO/Fe₃O₄@mSiO₂ (b)的磁滞回线;(B)样品水分散液在808 nm激光循环照射和冷却4次的温度变化曲线
Fig.4 (A) Magnetization curves of Fe₃O₄ (a) and rGO/Fe₃O₄@mSiO₂ (b); (B) Photothermal curves of aqueous dispersion of different samples under 808 nm irradiation/cooling four cycles

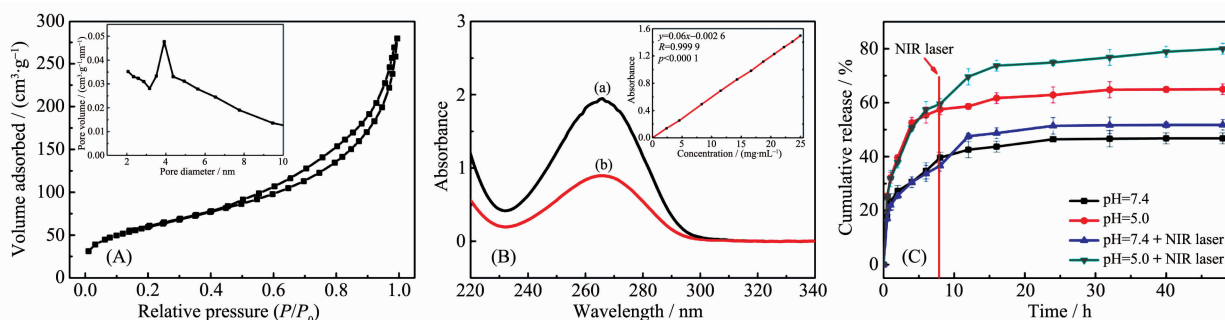
18 °C,可能是由于 rGO 更好地光热性能以及 GO 与 Fe_3O_4 复合的协同影响作用。同时,为考察纳米复合物循环使用情况,激光循环照射和冷却 4 次并分别测量其水分散液的温度,从图 4B 温度变化曲线可以看出 4 次循环后 GO 水分散液温度波动范围在 27.5~28.9 °C 之间,而 $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ 几乎未见温度波动,表明 $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ 纳米复合物具备良好的光热稳定性。

2.5 N_2 吸附等温线、孔径分布和药物的负载与释放

从 $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ 的 N_2 吸附等温线与孔径分布图(图 5A)可知,该等温线为 IV 型吸附平衡等温线,而迟滞环属于 H3 型,主要对应于材料的狭缝型孔,在较高相对压力区域没有表现出吸附限制,这说明了材料以介孔为主。吸附量随着相对压力 P/P_0 增大而缓慢增加,在相对压力 P/P_0 达到 0.4~0.5 时,吸附量出现激增现象,表明从该相对压力开始,材料中的介孔孔道内发生毛细管凝聚现象,进一步证明介孔结构的存在且孔径较均匀;在相对压力达到 1.0 左右,吸附量达到最大。 $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ 的 BET 比表面积和孔容分别为 $217 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $0.0478 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$,孔径为 3.92 nm 左右。说明这种方法制备的 $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ 复合材料拥有较大的比表面积与孔容,有利于药物分子的负载。

为验证 $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ 药物负载能力,我们测定了负载前后 5-FU 溶液在 266 nm 处的吸光度(图 5B),利用其标准曲线计算出 $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$

纳米复合物对 5-FU 的装载量。根据计算可知,负载率为 57.34%。 $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ 具有如此优异的载药性能主要是由于其 mSiO_2 和 rGO 均具有丰富的介孔结构以及较大的比表面积,两者复合更加增强了对药物的负载能力。为证明 $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ 作为药物载体的优势,我们进一步做了药物释放实验,从图 5C 中可知:在 $\text{pH}=7.4$ 的条件下,在 0~24 h 内 5-FU 含量不断上升,24 h 后释放速度趋于平缓,最终释放量为 46.6%;而在 $\text{pH}=5.0$ 时,药物在前 6 h 内快速释放,然后也趋于平缓,最终释放量较中性条件大大提升,达到 64.8%,可能是由于 5-FU 药物分子的 N 和 O 原子与介孔硅表面富含的羟基通过氢键结合,在中性环境下较为稳定,而在酸性环境中, H^+ 能跟氢键受体相结合,从而氢键被破坏,最终导致药物分子更多的释放。为进一步考察光照条件对药物释放的影响,光照组在药物释放 8 h 后光照 10 min 再继续测定,实验结果表明在 $\text{pH}=7.4$ 和 5.0 时,光照后 5-FU 释放速度均有大幅度提高, $\text{pH}=5.0$ 增幅更大,最终释放率也增高到约 79.8%,这可能是因为光照导致材料体系温度升高,5-FU 与介孔硅之间的氢键被大量破坏,作用力的减弱使药物释放率增大。实验表明在光照以及类似于肿瘤细胞所属的酸性环境下($\text{pH}=5.0$), $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ 药物载体具有较高的最终释放量和较快的释放速度,可有效提高到达肿瘤部位的药物浓度,从而更有利于药物发挥抗肿瘤作用。



Inset in (A): pore size distribution; Inset in (B): linear standard curve of 5-FU with different concentrations calculated by UV spectra at a wavelength of 266 nm

图 5 (A) $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ 的 N_2 吸附等温线; (B) 5-FU 被 $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ 负载前 (a)、负载后 (b) 的紫外吸收光谱; (C) 避光与光照条件和不同 pH 值 PBS 中 $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ -5-FU 释放行为曲线

Fig.5 (A) N_2 adsorption isotherms of $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$; (B) UV absorption spectra of the 5-FU solution before (a) and after (b) loaded on the $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ nanocomposites; (C) Release behaviors of 5-FU from $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ -5-FU nanocomposites in PBS with different pH values without or with NIR laser irradiation for 10 min, respectively

2.6 细胞毒性实验结果分析

通过细胞 MTT 测试,研究了 $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$

和 $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ -5-FU 在光照与否的条件下对细胞存活率的影响,结果如图 6 所示。对无光照条件

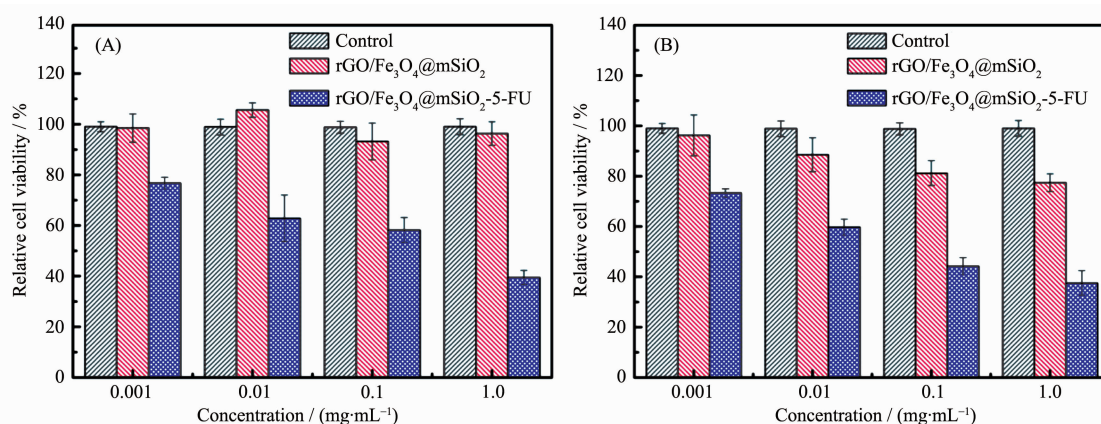


图6 不同浓度的 $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{mSiO}_2$ 和 $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{mSiO}_2$ -5-FU 在无光照 (A)和有光照 (B)条件下培养的 HeLa 细胞存活率

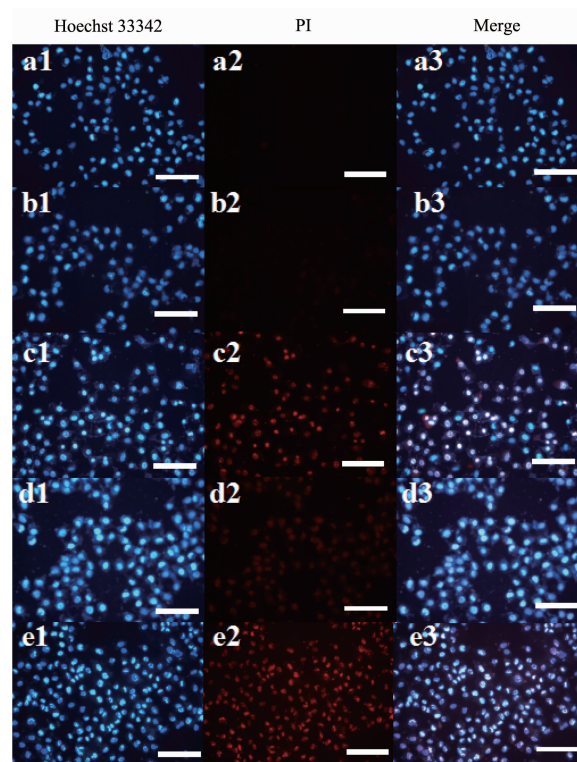
Fig.6 Viability of HeLa cells incubated with different concentrations of $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{mSiO}_2$ and $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{mSiO}_2$ -5-FU without (A) and with (B) irradiation

下的 $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{mSiO}_2$ 复合物(图 6A)来说,细胞存活率随着材料浓度的增加没有显著的变化,平均可达95%以上,说明 $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{mSiO}_2$ 复合材料具有良好的生物相容性。无光照条件下的 $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{mSiO}_2$ -5-FU,对细胞具有一定的杀伤效果,且在高浓度下更为显著,主要是由于 $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{mSiO}_2$ -5-FU 高浓度释放出的 5-FU 的化疗作用。而在光照条件下(图 6B),细胞的存活率均有不同程度的降低,是由于 $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{mSiO}_2$ 的光热性能对细胞具有一定的杀伤效果。光照条件下的 $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{mSiO}_2$ -5-FU,对 HeLa 细胞的杀伤效果则最为明显,源于 $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{mSiO}_2$ -5-FU 载体材料中释放出的 5-FU 的化疗与光照条件下材料优异的光热性能的协同抗肿瘤作用。

2.7 细胞荧光显微镜图像分析

为进一步验证 $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{mSiO}_2$ 作为药物载体对 HeLa 细胞的抑制作用,我们进行了细胞荧光成像分析。图 7a 为对照组,由图可以看出,HeLa 细胞呈现出亮蓝色荧光(a1)且无红色荧光(a2),这说明在此条件下 HeLa 细胞均处于存活状态,无明显死亡现象。当在细胞中加入了 $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{mSiO}_2$ 时,仍无明显红色荧光(b2)出现,表明复合物具有良好的生物相容性。与之相比较,光照之后在部分区域呈现出微弱的红色荧光 (d2),说明在光照时 $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{mSiO}_2$ 优异的光热效应引起局部温度上升导致部分细胞坏死或凋亡。在 $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{mSiO}_2$ -5-FU 纳米复合物存在下培养,可以看出细胞在无光照情况下出现较弱的红色(c2),是其负载的 5-FU 发挥了化疗效果,而在光照条件下,出现了十分明显的亮红

色荧光(e2)并拟合出紫红色荧光(e3),表明 HeLa 细胞大面积死亡,说明 $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{mSiO}_2$ 的光热和 5-



HeLa cell were dyed in blue by Hoechst 33342 (left), red by PI (middle) and the right is the merged image; Scale bars are 20 μm

图7 培养基 (a)、 $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{mSiO}_2$ (b, d)和 $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{mSiO}_2$ -5-FU (c, e)与 HeLa 细胞共孵育在无光照 (a~c)和有光照 (d, e)条件下的荧光显微镜图

Fig.7 Fluorescence microscopy images of HeLa cells incubated with nothing (a), $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{mSiO}_2$ (b, d) and $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{mSiO}_2$ -5-FU (c, e) without (a~c) and with irradiation(d, e)

FU 的化疗作用产生的协同效应可大幅度提升杀死癌细胞的效果。

3 结 论

通过各层之间静电吸附作用制备了类似三明治结构的 $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{mSiO}_2$ 纳米复合材料, 考察了其药物负载与释放能力, 实验结果表明 $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{mSiO}_2$ 能够有效的装载抗癌药物 5-FU, 载药率可达 57.34%, 并具有较高的药物释放量; 产物中 Fe_3O_4 成分的存在, 使得 $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{mSiO}_2$ 具有优异的磁性, 磁饱和强度为 $32 \text{ emu} \cdot \text{g}^{-1}$, 可应用于磁靶向药物传输; 而且, $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{mSiO}_2$ 复合纳米材料具有优异光热效应, 可对肿瘤细胞进行光热治疗。因此, 纳米复合物 $\text{rGO}/\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{mSiO}_2$ 是将磁靶向的 Fe_3O_4 、优异光热性能的 rGO 和生物相容性良好的 mSiO_2 相结合, 使其具备高效的药物装载能力以及化疗、光热疗法协同抗肿瘤作用, 将在医药领域具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Yang Y, Qi Y, Zhu M, et al. *Nano Res.*, **2016**, *9*(9):2531-2543
- [2] Wang C, Sun W, Wright G, et al. *Adv. Mater.*, **2016**, *28*(40):8912-8920
- [3] Liu B, Li C X, Chen G Y, et al. *Adv. Sci.*, **2017**, *4*:1600540
- [4] Cho M J, Cervadoro A, Maricela R R, et al. *J. Nanomater.*, **2017**, *7*(4):72-86
- [5] Solbrig C M, Saucier-Sawyer J K, Cody V, et al. *Mol. Pharm.*, **2016**, *4*(1):47-57
- [6] Fu C H, Zhou H Q, Tan L F, et al. *ACS Nano*, **2018**, *12*(3):2201-2210
- [7] Yu B, Zhou Y, Song M, et al. *RSC Adv.*, **2016**, *6*:2171-2175
- [8] Sánchez Á S, García F S, Alonso A M. *Carbon*, **2015**, *94*:152-159
- [9] Lin W, Hu Q, Yu J. *ChemPlusChem*, **2016**, *81*:804-810
- [10] Deng G Y, Sun J, Yuan H K, et al. *Nanoscale*, **2018**, *10*:2866-2875
- [11] Cheng R, Zou R, Ou S, et al. *Polym. Chem.*, **2015**, *6*(13):2401-2406
- [12] Chen G Y, Meng C L, Lin K C, et al. *Biomaterials*, **2015**, *40*:12-22
- [13] Huang C L, Huang C C, Mai F D, et al. *J. Mater. Chem. B*, **2015**, *3*(4):651-664
- [14] Zhang Y, Chena P, Wena F F. *J. Electroanal. Chem.*, **2016**, *761*:14-20
- [15] Kalita H, Rajput S, Prashanth Kumar B N, et al. *RSC Adv.*, **2016**, *6*:21285-21292
- [16] Tang Z X, Li F F. *J. Comput. Theor. Nanosci.*, **2016**, *13*:772-776
- [17] Hummers W S, Offeman R E. *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, *80*(6):1339-1339
- [18] Jin Y, Wang J, Ke H, et al. *Biomaterials*, **2013**, *34*(20):4794-4802
- [19] Zhu Y, Murali S, Cai W, et al. *Adv. Mater.*, **2010**, *22*(35):3906-3924
- [20] Deng H, Li X, Peng Q, et al. *Angew. Chem.*, **2005**, *117*:2842-2845
- [21] Zhao J, Huang Y, Song Y, et al. *Toxicol. Lett.*, **2009**, *185*(2):124-131
- [22] Ji Q X, Deng J, Xing X M, et al. *Carbohydr. Polym.*, **2010**, *82*(4):1153-1160
- [23] Lo C K, Xiao D, Choi M F. *J. Mater. Chem.*, **2007**, *17*:2418-2427
- [24] Ma Y, Jia P, Li X, et al. *J. Porous Mater.*, **2012**, *19*(6):1047-1052
- [25] Wang Z M, Wang W D, Coombs N, et al. *ACS Nano*, **2010**, *4*(12):7437-7450
- [26] SONG Chun-Peng(宋春芑). *Thesis for the Master of Shanghai Jiao Tong University*(上海交通大学硕士学位论文). **2012**.
- [27] CHEN Ya-Lin(陈亚玲), SONG Li(宋力), GUO Hu(郭虎), et al. *Chinese J. Inorg. Chem.*(无机化学学报), **2016**, *32*(4):633-640
- [28] ZHANG Bao-Long(张保龙). *Thesis for the Master of Qingdao University of Science and Technology*(青岛科技大学硕士学位论文). **2017**.