

# 载多柔比星二氧化钛纳米粒的制备及体外评价

徐爱仁, 应景艳, 何文跃, 陈武, 马卫成\* (宁波市泌尿肾病医院药剂科, 浙江 宁波 315100)

**摘要:** 目的 制备载多柔比星(doxorubicin, DOX)的二氧化钛( $\text{TiO}_2$ )纳米粒, 并考察其体外释放百分率及细胞毒性。方法 通过水热法合成 DOX 的  $\text{TiO}_2$  纳米粒, 采用透射电镜及 X-射线衍射仪对其进行表征, 紫外可见分光光度法测定载药量及体外释放, 采用 MTT 法分析其对 MCF-7 细胞和 Hela 细胞的细胞毒性。结果 所制备的纳米粒分散均匀, 外观呈梭状, 长度约为 200 nm, 在水中的载药量达 10.85%, 体外释放具有 pH 敏感性, 空白纳米粒细胞毒性较低, 载药纳米粒的细胞毒性与游离多柔比星相当。结论 所制备的  $\text{TiO}_2$  纳米粒具有较高的载药量及 pH 敏感的体外释放性能, 可作为 DOX 的载体。

**关键词:** 细胞毒性; 二氧化钛; 多柔比星; pH 敏感释放

中图分类号: R943

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)08-0962-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.08.013

## Preparation and Evaluation of Doxorubicin-loaded Titanium Dioxide Nanoparticles

XU Airen, YING Jingyan, HE Wenyue, CHEN Wu, MA Weicheng\* (Department of Pharmacy, Renopathy and Urology Hospital, Ningbo 315100, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To prepare doxorubicin(DOX)-loaded titanium dioxide( $\text{TiO}_2$ ) nanoparticles and evaluate *in vitro* release and cytotoxicity. **METHODS** The  $\text{TiO}_2$  nanoparticles were synthesized using solvothermal reaction and then characterized with TEM and X-ray diffraction (XRD). The drug loading capacity and release profile were determined using UV-Vis spectrophotometer. The cytotoxicity against MCF-7 and Hela cells was evaluated by MTT method. **RESULTS** The obtained  $\text{TiO}_2$  nanoparticles with the length about 200 nm were well dispersed in water. The drug loading capacity in water was 10.85%. The release of DOX *in vitro* was pH sensitive. No obvious cytotoxicity of  $\text{TiO}_2$  nanoparticles was observed. The drug-loaded nanoparticles showed equivalent cytotoxicity against MCF-7 and Hela cells with free DOX. **CONCLUSION**  $\text{TiO}_2$  nanoparticles which show high drug loading capacity and controllable drug release can be used as a novel carrier for the antitumor drug doxorubicin.

**KEY WORDS:** cytotoxicity; titanium dioxide( $\text{TiO}_2$ ); doxorubicin; pH sensitive release

随着纳米科技的发展, 纳米载体相对于传统材料显示出明显的优势。大量研究表明, 纳米粒子能将治疗药物有效地传递到靶组织或靶细胞, 增加药物体内循环时间, 避免药物降解失活。目前可用于治疗肿瘤的纳米给药系统层出不穷, 如树枝状高分子、脂质体、聚合纳米粒、蛋白纳米粒、磁性纳米粒等。这其中, 无机材料因其具有磁性、光催化、声催化等特殊性质, 在药物传递方面的应用越来越受重视。在众多无机药物载体中, 基于二氧化钛( $\text{TiO}_2$ )的载体研究较为广泛。 $\text{TiO}_2$  作为一种新型功能纳米材料, 具有良好的生物相容性<sup>[1]</sup>, 作为药物载体还具有显著的细胞穿透能力, 能到达细胞质及细胞核<sup>[1-2]</sup>, 同时由于其具有较高的表面积( $300 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ )<sup>[3]</sup>, 可负载大量药物,

此外,  $\text{TiO}_2$  具有光催化及超声催化作用, 激发后可产生活性氧簇(ROS), 具有良好的抗肿瘤效果<sup>[4-5]</sup>。

多柔比星(doxorubicin, DOX)是一种蒽环类抗肿瘤抗生素, 可抑制 RNA 和 DNA 的合成, 对多种肿瘤均有作用, 属周期非特异性药物, 临床应用较广<sup>[6]</sup>。但是由于存在明显的心脏、骨髓抑制等不良反应, 临床使用受到一定限制。本实验制备了  $\text{TiO}_2$  纳米粒, 并负载抗肿瘤药物多柔比星, 对载药粒子的体外释放及细胞毒性进行了研究。

### 1 材料与仪器

#### 1.1 材料

四氯化钛( $\text{TiCl}_4$ )、氨水( $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )、二甲基亚砜(DMSO)均为分析纯(国药化学试剂有限公司); DOX(北京华联博科技有限公司, 批号:

基金项目: 宁波市自然科学基金项目(2012A610182)

作者简介: 徐爱仁, 男, 主管药师 Tel: (0574)83039130  
(0574)83038595 E-mail: weichengma@126.com

E-mail: xuairen@126.com

\*通信作者: 马卫成, 男, 主任中药师

Tel:

HF100519, 含量>98.0%); 人乳腺癌 MCF-7 细胞(中科院上海生化与细胞所); 人宫颈癌细胞 Hela 细胞(浙江大学医学院附属邵逸夫医院中心实验室); 四甲基氮唑蓝(MTT, 上海普飞生物技术有限公司); Hoechst 33342(美国 Sigma-Aldrich); 其他试剂均为分析纯。

## 1.2 仪器

JEM-1200EX 透射电子显微镜(日本电子公司); TU-1800PC 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司); BT125D 精密电子天平(德国赛多利斯集团); MK3 酶标仪(美国 Thermo); TGL-168 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂); 培养箱(德国 HERAEUS), X 射线衍射仪(荷兰 X'Pert PRO)。

## 2 方法

### 2.1 纳米 $\text{TiO}_2$ 的制备

采用水热法制备  $\text{TiO}_2$  纳米粒。快速搅拌下将 2 mL  $\text{TiCl}_4$  滴加到 100 mL 去离子水中, 继续搅拌 10 min, 生成纳米  $\text{TiO}_2$  前驱体, 边搅拌边加入  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 调节 pH 至 9.3, 继续搅拌 30 min, 离心洗涤数次后, 转移至内衬聚四氟乙烯的不锈钢反应釜中进行水热反应, 220 °C 反应 3 h 后, 自然冷却至室温, 取出后洗涤 3 次, 60 °C 干燥, 然后转移至马弗炉中 350 °C 煅烧 2 h。

所得产物形态利用 TEM 进行观察, 用紫外分光光度计测定吸收光谱, 测定范围 350~800 nm。利用 XRD 考察  $\text{TiO}_2$  纳米粒的晶体特征, 具体条件为: 铜靶, 高压强度 40 kV, 管流 200 mA, 扫描范围 10°~80°(2 $\theta$ )。

### 2.2 $\text{TiO}_2$ -DOX 的制备

将约 3 mg DOX 与 10 mL 的 0.4 mg·mL<sup>-1</sup>  $\text{TiO}_2$  在水中搅拌过夜, 然后 10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心去除未结合的 DOX, 所得物用 pH 7.4 PBS 洗涤数遍, 直到上清液完全无色, 所得物(标记为  $\text{TiO}_2$ -DOX)重悬后 4 °C 保存。上清液合并收集, 用 UV-Vis 紫外分光光度计 488 nm 测定吸光度, 根据标准曲线计算载药量。

### 2.3 $\text{TiO}_2$ -DOX 纳米粒的体外释放研究

精密称取  $\text{TiO}_2$ -DOX 纳米粒适量, 分别分散于 pH 5.0, 6.5, 7.4 介质中, 配置成 1 mg·mL<sup>-1</sup> 的溶液, 在 37 °C 下恒温振荡(100 r·min<sup>-1</sup>) 进行体外释放考察, 分别在 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 24 h

时间点取样, 10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心, 取出上清液, 同时补充新鲜释放介质, 上清液于 488 nm 测定吸光度, 计算释放百分率。

### 2.4 空白及载药纳米粒的细胞毒性

采用 MTT 法考察游离 DOX、空白  $\text{TiO}_2$  和  $\text{TiO}_2$ -DOX 纳米粒对人乳腺癌 MCF-7 细胞及人宫颈癌 Hela 细胞的细胞毒性作用。取对数生长期的细胞, 胰蛋白酶消化后 PBS 洗涤, 制成 4 × 10<sup>4</sup> · mL<sup>-1</sup> 的细胞悬液, 将该悬液按每孔 100 μL 加入 96 孔板中, 每孔细胞数为 4 000 个, 在 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下孵育 24 h, 待贴壁后, 加入 25 μL 不同浓度的 DOX、空白  $\text{TiO}_2$  和  $\text{TiO}_2$ -DOX 纳米粒的 PBS 溶液, 继续孵育 24 h 后, 每孔加入 31.5 μL 5 mg·mL<sup>-1</sup> 的 MTT 溶液, 继续培养 4 h, 吸去原液, 加入 200 μL 二甲基亚砜(DMSO), 10 min 后, 在酶标仪上以 570 nm 波长测定 A 值, 计算生存率。上述试验, 每组重复 3 次, 每个浓度设 4 个复孔。

## 3 结果

### 3.1 $\text{TiO}_2$ 的表征

利用 TEM 对  $\text{TiO}_2$  纳米粒的形态进行表征, 见图 1。 $\text{TiO}_2$  分散良好, 无明显团聚现象, 外观呈类梭状, 长度约为 200 nm, 宽度约为 50 nm。利用 X 射线衍射对晶体类型进行表征, 见图 2。从图中看出,  $\text{TiO}_2$  纳米粒的晶体结构为锐钛矿型, 而已有报道证明, 锐钛矿相  $\text{TiO}_2$  纳米粒相对金红石相具有更好的催化性能, 因此该纳米粒在肿瘤催化治疗方面具有一定前景。利用紫外分光光度计测定  $\text{TiO}_2$  纳米粒的吸收光谱, 见图 3, 结果显示纳米粒对波长低于 450 nm 的光具有较强的吸收能力, 为典型  $\text{TiO}_2$  吸收峰。

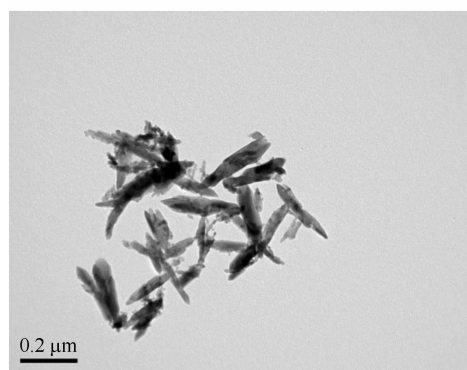


图 1  $\text{TiO}_2$  的透射电镜图片

Fig. 1 Transmission electron microscopy (TEM) image of  $\text{TiO}_2$

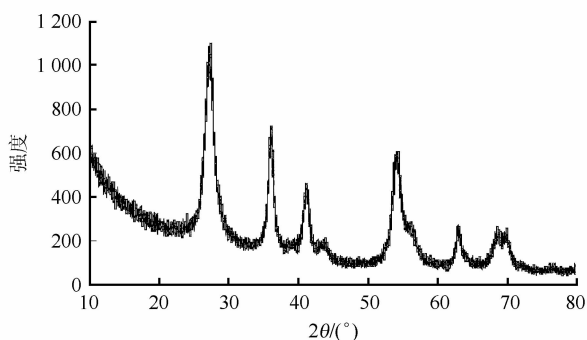


图2 TiO<sub>2</sub>的X射线衍射图

Fig. 2 The X-ray diffraction pattern of TiO<sub>2</sub>

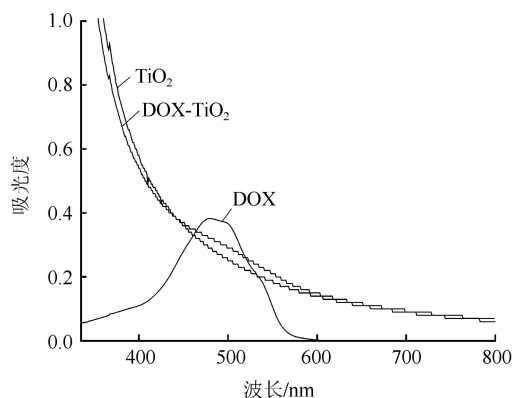


图3 DOX、TiO<sub>2</sub>及TiO<sub>2</sub>-DOX的紫外吸收曲线

Fig. 3 UV-Vis scanning spectra of DOX, TiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub>-DOX

### 3.2 TiO<sub>2</sub> 纳米粒载药量测定

由于DOX在488 nm附近有特定的UV-Vis吸收,因此本实验利用UV-Vis分光光度计来检测其含量。重复测量3批载药TiO<sub>2</sub>纳米粒,计算得到其载药量为(10.85 ± 1.54)%。从DOX、TiO<sub>2</sub>及TiO<sub>2</sub>-DOX的紫外吸收曲线中可以看出,TiO<sub>2</sub>-DOX在488 nm附近较TiO<sub>2</sub>有明显的吸收,说明DOX成功负载到TiO<sub>2</sub>纳米粒表面。

### 3.3 TiO<sub>2</sub>-DOX 的体外释放研究

正常微环境的pH约为7.0,但肿瘤部位pH值较正常组织低<sup>[7]</sup>,此外细胞内的溶酶体、内涵体pH亦较低,约为5.0~6.5<sup>[8]</sup>。因此本实验应用3种不同pH值的PBS溶液(pH 5.0, 6.5, 7.4)作为释放介质研究载药纳米粒的释放情况,以模拟生物体内环境。TiO<sub>2</sub>-DOX在不同pH值条件下随时间变化的体外释放结果见图4。从图中可以看出,在pH 7.4的PBS介质中,DOX释放较慢,24 h累积释放量为50%左右。随着pH的降低,药物释放加快,在pH 5.0介质中,24 h累积释放超过70%。这主要是由于DOX在酸性条件下溶解度较高,当

pH降低时DOX以解离状态存在,DOX与TiO<sub>2</sub>之间的疏水作用力减弱,因此释放速度加快<sup>[9-10]</sup>。

由于DOX具有较强的心脏毒性,因此TiO<sub>2</sub>纳米粒的这种pH依赖性释放能更好的促进药物在肿瘤部位的释放,降低对心脏、肾脏等正常组织的不良反应<sup>[11-12]</sup>。

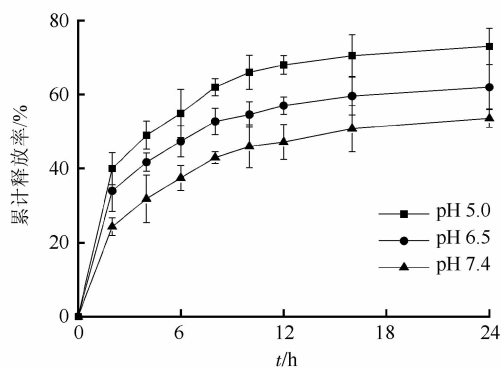


图4 TiO<sub>2</sub>-DOX在不同pH介质中的体外释放

Fig. 4 The release of TiO<sub>2</sub>-DOX in media with different pH

### 3.4 细胞毒性

**3.4.1 空白TiO<sub>2</sub>纳米粒的细胞毒性** 经过不同浓度的TiO<sub>2</sub>纳米粒处理24 h后,MCF-7及Hela细胞的存活率均未见显著下降,即使浓度高达333 μg·mL<sup>-1</sup>,细胞存活率仍高于80%,说明TiO<sub>2</sub>具有较低的细胞毒性,结果见图5。

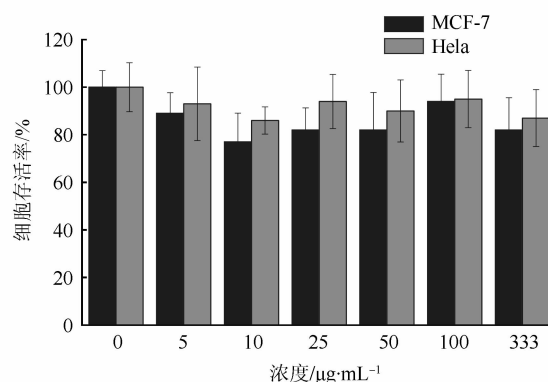


图5 与不同浓度TiO<sub>2</sub>孵育24 h后MCF-7和Hela的细胞存活率曲线

Fig. 5 Cell viability curves of MCF-7 and Hela cells incubated with different concentrations of TiO<sub>2</sub> for 24 h

**3.4.2 载药纳米粒TiO<sub>2</sub>-DOX的细胞毒性** MCF-7、Hela细胞分别与DOX、TiO<sub>2</sub>-DOX孵育24 h后的细胞存活率变化见图6。从图中可以看出,DOX和载DOX纳米粒的细胞毒性均有浓度依赖性,即随着浓度的增长,细胞生存率下降。对于KB细胞

而言,载药纳米粒表现出与游离多柔比星相当的细胞毒性,说明  $\text{TiO}_2$  表面负载的药物能有效释放。从 MCF-7 的毒性实验结果可以看出,  $\text{TiO}_2$ -DOX 表现出更强的细胞毒性,而药物释放结果(图 4)显示,药物释放相对较慢,12 h 释放度低于 50%,以上结果表明,  $\text{TiO}_2$  可以协助药物进入细胞,以增加药物的毒性,同时也表明  $\text{TiO}_2$  在作为药物载体方面具有良好的应用前景。

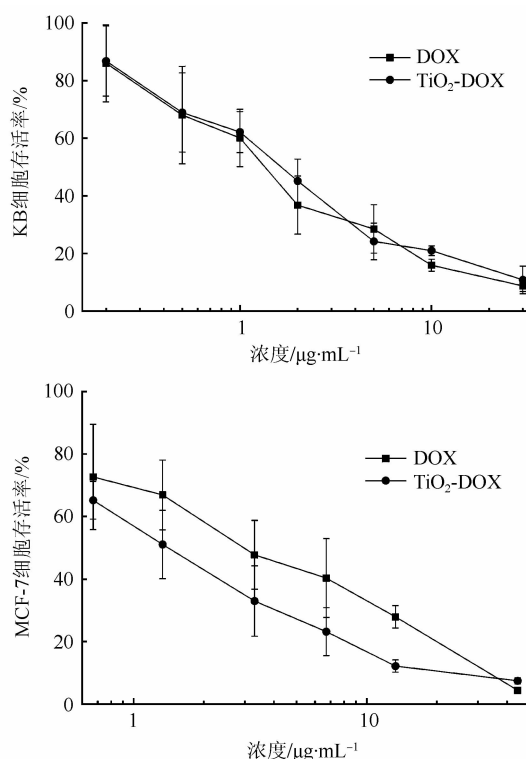


图 6 孵育 24 h 后, DOX 和  $\text{TiO}_2$ -DOX 对 MCF-7 和 Hela 细胞的细胞毒性( $n=3$ )

Fig. 6 *In vitro* cytotoxicity of DOX and  $\text{TiO}_2$ -DOX against MCF-7 and Hela cells after 24 h incubation( $n=3$ )

#### 4 讨论

本实验运用水热法合成  $\text{TiO}_2$ , 得到长度约为 200 nm、具有良好水分散性的梭状纳米粒, 该纳米粒晶型为锐钛矿型。其在水中载药量为 10.85%, 体外释放具有一定的 pH 敏感性, pH 越低药物释放越快, 从而可以促进药物在肿瘤部位的释放, 达到减少不良反应的效果。本实验采用 MTT 法研究空白载体和载药纳米粒子的细胞毒性, 结果表

明, 空白载体具有较低的细胞毒性, 载药纳米粒子对 MCF-7 和 Hela 细胞的细胞毒性与游离 DOX 相当。本实验在载体的催化抗肿瘤方面尚未开展, 催化与化学治疗在抗肿瘤方面的联合应用有待进一步探讨, 进而为该载体在抗肿瘤应用研究提供实验基础和理论依据。

#### REFERENCES

- [1] MAO J, WANG L, QIAN Z Y, et al. Uptake and cytotoxicity of Ce(IV) doped  $\text{TiO}_2$  nanoparticles in human hepatocyte cell line L02 [J]. J Nanomater, 2010, Article ID 910434, 2010. Doi:10.1155/2010/910434.
- [2] ANDERSSON P O, LEJON C, HAMMARSTRÖM B E, et al. Polymorph- and size-dependent uptake and toxicity of  $\text{TiO}_2$  nanoparticles in living lung epithelial cells [J]. Small, 2011, 7(4): 514-523.
- [3] MIKI I, KEI M, NAOYA E, et al. Thermal stability of rutile  $\text{TiO}_2$  with high specific surface area synthesized by self-hydrolysis process [J]. Sci Adv Mater, 2010, 2(1): 102-106.
- [4] NINOMIYA K, OGINO C, OSHIMA S, et al. Targeted sonodynamic therapy using protein-modified  $\text{TiO}_2$  nanoparticles [J]. Ultrason Sonochem, 2012, 19(3): 607-614.
- [5] YAMAGUCHI S, KOBAYASHI H, NARITA T, et al. Sonodynamic therapy using water-dispersed  $\text{TiO}_2$ -polyethylene glycol compound on glioma cells: Comparison of cytotoxic mechanism with photodynamic therapy [J]. Ultrason Sonochem, 2011, 18(5): 1197-1204.
- [6] BIBBY D C, TALMADGE J E, DALAL M K, et al. Pharmacokinetics and biodistribution of RGD-targeted doxorubicin-loaded nanoparticles in tumor-bearing mice [J]. Int J Pharm, 2005, 293(1/2): 281-290.
- [7] TANNOCK I F, ROTIN D. Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation [J]. Cancer Res, 1989, 49(16): 4373-4384.
- [8] HUBBELL J A. Enhancing drug function [J]. Science, 2003(300): 595-596.
- [9] YOU J, ZHANG G D, LI C. Exceptionally high payload of doxorubicin in hollow gold nanospheres for near-infrared light-triggered drug release [J]. Acs Nano, 2010, 4(2): 1033-1041.
- [10] LIU Z, SUN X M, NAKAYAMA-RATCHFORD N, et al. Supramolecular chemistry on water-soluble carbon nanotubes for drug loading and delivery [J]. Acs Nano, 2007, 1(1): 50-56.
- [11] SHEN H J, SHI H, MA K, et al. Polyelectrolyte capsules packaging BSA gels for pH-controlled drug loading and release and their antitumor activity [J]. Acta Biomater. 2013, 9(4): 6123-6133.
- [12] XIE M, SHI H, LI Z, et al. A multifunctional mesoporous silica nanocomposite for targeted delivery, controlled release of doxorubicin and bioimaging [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2013(110): 138-147.

收稿日期: 2013-10-30