

功能化二硫化钼纳米载药复合物的制备 及体外药物释放研究

章学易 吴建荣 钱倩倩 牛世伟 朱利民*

(东华大学化学化工与生物工程学院,上海 201620)

摘 要 采用二硫化钼(MoS_2)表面接枝硫辛酸(LA)修饰的聚乙二醇(PEG)(LA-PEG),以增加其生物相容性,进一步接枝聚乙烯亚胺(PEI),用以连接牛血清蛋白(BSA)修饰的叶酸(FA),构建主动靶向体系叶酸-牛血清蛋白-聚乙烯亚胺-硫辛酸-二硫化钼-硫辛酸-聚乙二醇(FA-BSA-PEI-LA- MoS_2 -LA-PEG),并对产物的形貌及理化性质进行测试。研究表明,制得的产物的水动力学直径约 133nm,适合用作抗癌药物载体,以阿霉素(DOX)为模型药物,研究产物的载药能力和体外药物释放行为,在 $\text{pH}=5.0$,近红外光照射条件下,经过 68h,产物负载的 DOX 的累计释放量为 67.8%,具有良好的载药能力和应用价值。

关键词 二硫化钼,近红外光刺激响应,pH 敏感,药物控释,乳腺癌靶向

Study on the preparation and in vitro drug release of functionalized MoS_2 nanocomposite

Zhang Xueyi Wu Jianrong Qian Qianqian Niu Shiwei Zhu Limin

(College of Chemistry, Chemical Engineering and Biotechnology, Donghua University,
Shanghai 201620)

Abstract Lipophilic (LA) modified polyethylene glycol (PEG) (LA-PEG) was grafted to the surface of molybdenum disulfide (MoS_2) to improve its biocompatibility, and further modified by graft polyethylenimine (PEI) which was used to link bovine serum albumin (BSA) modified folic acid (FA). Thus the drug delivery system FA-BSA-PEI-LA- MoS_2 -LA-PEG was constructed. The morphology and physicochemical properties of materials were characterized. The hydrodynamic size of materials was 133nm, which was suitable for using as a carrier of anticancer drugs. The drug loading efficiency and in vitro drug release behavior of complexes were investigated with DOX as model drug. The results showed that the cumulative drug release was 67.8% after 68h with NIR at pH 5.0. The drug delivery system had good drug-loading ability as well as application value.

Key words molybdenum disulfide, near-infrared light stimulus response, pH stimulus response, drug controlled release, breast cancer targeting

过渡金属二硫化物(TMDs)与石墨烯类似,TMDs 具有层状结构,TMDs 的单层的过渡金属原子和硫属原子通过强共价键相互作用,层间通过范德华力堆叠在一起^[1]。每个 TMDs 单层由 3 个原子层组成,其中过渡金属层夹在 2 个硫族元素层之间。基于液体剥离的过渡金属二硫属元素的细胞毒性低于石墨烯及其类似物,使其拥有体内生物医学应用的前景。

光热治疗(PTT)是一种微创的治疗方式。PTT 的光源通常采用近红外(NIR)激光,因为它有能穿透深层组织,生物组织吸收较少,以及低细胞毒性的巨大优势^[2-3]。光热治疗能与化疗一起完成协同治疗来治疗癌症。

二硫化钼(MoS_2)是一种典型的 TMDs 材料,具有超高比表面积,能作为多功能纳米平台来递送药物,可用于近红外光响应的光热治疗^[4-5]。通过对

基金项目:上海市科学技术委员会资助项目(16410723700);生物医用纺织材料“111 工程”中国教育部(B07024)

作者简介:章学易(1994-),男,硕士,研究方向为从事生物材料、药物控释的研究。

联系人:朱利民(1960-),男,博士,教授,主要研究方向为酶化学与缓释材料研究。

MoS₂ 进行必要的修饰,可以改善它的生物相容性和胶体稳定性^[6],如采用硫辛酸(LA)缀合的聚乙二醇(PEG),或双功能硫醇化 PEG 配体。

人体正常血液及组织的 pH 约 7.4,而肿瘤区域则呈弱酸性。更为重要的是,通过内吞途径进入细胞的药物递送系统(DDS)^[7],会先进入 pH 约 5.0 的核内体,如果不从核内体逃逸出来,则会被输送往 pH 更低的溶酶体,无法到达细胞质,从而影响药物治疗的效果^[8]。所以通过内吞进入细胞的药物递送系统核内体逃逸的能力,才能完成细胞质运输。

刺激响应性药物递送系统能响应外部刺激,如光、磁场和超声波^[9-11],以及内部刺激,如氧化还原电位、pH 和生物分子^[12-14]。药物递送系统可以采用这个优势,来完成靶向的药物释放,并实现高效率的递送^[15]。

本研究采用合成修饰的 MoS₂ 复合物作为刺激响应型药物递送系统,改善 MoS₂ 的溶解度和稳定性,并赋予其靶向乳腺癌细胞的能力,使其成为具有应用前景的抗乳腺癌药物载体。

1 实验部分

1.1 材料

甲氧基聚乙二醇胺(PEI)、盐酸阿霉素(DOX)、牛血清蛋白(BSA),均为分析纯,阿拉丁生化科技股份有限公司;2-吗啉乙磺酸(MES,分析纯),上海泰坦科技股份有限公司;乙腈(分析纯),上海凌峰化学试剂有限公司,LA、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、*N*-羟基丁二酰亚胺(NHS)、PEG、聚乙烯亚胺、二氯甲烷、三乙醇胺(TEA)、叶酸(FA)、吗啉乙磺酸(MES)、钼酸钠、硫代乙酰胺,均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司;超纯水,实验室自制。

1.2 仪器

磁力搅拌器(JB-3 型),江苏澳华有限公司;真空干燥箱(DZF-6210 型),上海一恒科技有限公司;精密电子天平(BS124S 型),德国赛多利斯公司;冷冻干燥机(FD-1D-50 型),北京博医康实验仪器有限公司;超声波仪(VGT-1990QT 型),深圳市固特宏业机械设备有限公司;高速离心机(CR22G 型),日本日立公司;透射电子显微镜(TEM, JEM-2100 型),日本 JEOL 公司;傅里叶红外光谱仪(FT-IR, Nicolet Avatar 370 型),美国尼高力公司;核磁共振仪(¹H-NMR, Avance III TM 600MHz 型),德国布

鲁克公司;紫外-可见分光光度计(UV-Vis, U-3900 型),Hitachi 公司;动态光散射仪(DLS, BI-200SM 型),美国布鲁克海文仪器公司。

1.3 样品的制备

称取钼酸钠 0.3g 和硫代乙酰胺 0.6g 分散在 30mL 水中,采用超声波仪(VGT-1990QT 型,深圳市固特宏业机械设备有限公司)超声 10min 后,采用磁力搅拌器(JB-3 型,江苏澳华有限公司)至完全溶解,采用真空干燥箱(DZF-6210 型,上海一恒科技有限公司)220℃反应 24h,反应结束后,采用高速离心机(CR22G 型,日本日立公司)离心收集黑色沉淀物,即制得 MoS₂。

称取 300mg PEI 溶解在水中,调节 pH 至中性,称取 82.4mg LA 溶解在 20mL 乙腈中,称取 EDC 191.7mg、NHS 115.1mg,采用磁力搅拌器(JB-3 型,江苏澳华有限公司)搅拌均匀后,加入至聚乙烯亚胺溶液中搅拌 24h 后透析,采用冷冻干燥机(FD-1D-50 型,北京博医康实验仪器有限公司)冷冻干燥,即制得 LA-PEI。称取 30mg LA-PEI 加入至 0.25mg/mL 的 MoS₂ 分散液 10mL 中,采用超声波仪(VGT-1990QT 型,深圳市固特宏业机械设备有限公司)超声 30min 后,搅拌 12h,透析,采用冷冻干燥机(FD-1D-50 型,北京博医康实验仪器有限公司)冷冻干燥,得到 MoS₂-LA-PEI。称取 45mg LA 溶解在 2.4mL 二氯甲烷中,加入 300mg PEG 搅拌至溶液澄清,再加入 DCC 和 TEA,采用磁力搅拌器(JB-3 型,江苏澳华有限公司)磁力搅拌 2h 后旋蒸去除有机溶剂,溶解在水中后过滤,调节 pH=8.0,采用冷冻干燥机(FD-1D-50 型,北京博医康实验仪器有限公司)冷冻干燥得到 LA-PEG。将 MoS₂-LA-PEI 溶解在水中配制成 0.5mg/mL 的溶液,称取 3mL 并加入 15mg LA-PEG,采用超声波仪(VGT-1990QT 型,深圳市固特宏业机械设备有限公司)超声 30min,采用磁力搅拌器(JB-3 型,江苏澳华有限公司)磁力搅拌 12h,即制得聚乙烯亚胺-硫辛酸-二硫化钼-硫辛酸-聚乙二醇(PEI-LA-MoS₂-LA-PEG)。

称取配制得到的 3mg/mL 的 FA 与 MES 缓冲液 1mL(其中 MES 浓度为 50mmol, pH=6.0)中加入 3mg EDC 和 3mg NHS,采用磁力搅拌器(JB-3 型,江苏澳华有限公司)磁力搅拌 20min。称取上述溶液 0.5mL 加入到 0.4mg/mL 的 BSA 与 MES 缓

冲液 100mL 中(其中 MES 浓度为 50mmol, pH = 6.0), 反应 12h, 透析, 即制得叶酸-牛血清蛋白(FA-BSA)溶液。

称取 FA-BSA 溶液 20mL, 加入 50mg PEI-LA-MoS₂-LA-PEG, 24mg EDC 和 14mg NHS, 采用磁力搅拌器(JB-3 型, 江苏澳华有限公司)搅拌 12h, 采用高速离心机(CR22G 型, 日本日立公司)离心, 透析, 采用冷冻干燥机(FD-1D-50 型, 北京博医康实验仪器有限公司)冷冻干燥, 即制得叶酸-牛血清蛋白-聚乙烯亚胺-硫辛酸-二硫化钼-硫辛酸-聚乙二醇(FA-BSA-PEI-LA-MoS₂-LA-PEG, 以下简称功能化二硫化钼纳米载药复合物)。

1.4 样品的测试

采用透射电子显微镜(TEM, JEM-2100 型, 日本 JEOL 公司)观察制得的 MoS₂ 的形貌。采用傅里叶红外光谱仪(FT-IR, Nicolet Avatar 370 型, 美国尼高力公司)对样品进行测试, 波长 600~4000cm⁻¹, 间隔为 2cm⁻¹。采用核磁共振仪(¹H-NMR, Avance IIIITM 600MHz 型, 德国布鲁克公司)对样品进行测试。采用紫外-可见分光光度计(UV-Vis, U-3900 型, Hitachi 公司)对样品进行测试。采用动态光散射仪(DLS, BI-200SM 型, 美国布鲁克海文仪器公司)对样品进行测试。

对样品载药能力的测试。将功能化二硫化钼纳米载药复合物与模拟药物阿霉素(DOX)按不同配合比在纯水中混合, 采用磁力搅拌器(JB-3 型, 江苏澳华有限公司)搅拌 12h。采用高速离心机(CR22G 型, 日本日立公司)离心, 收集上层清液, 测试功能化二硫化钼纳米载药复合物的载药能力。在功能化二硫化钼纳米载药复合物与 DOX 的质量配合比为 2:1 条件下, 载药能力最强, 1g 功能化二硫化钼纳米载药复合物能负载 151.4mg 的 DOX。

称取功能化二硫化钼纳米载药复合物与 DOX 的质量配合比为 2:1, 至纯水中混合, 采用磁力搅拌器(JB-3 型, 江苏澳华有限公司)搅拌 12h, 采用高速离心机(CR22G 型, 日本日立公司)离心收集, 称取 5mg 载药载体分散在 3mL 纯水中, 然后采用透析袋(MWCO=6000)中透析, 透析袋外部为 100mL 纯水, 每间隔一定时间取透析袋外部液体 5mL, 采用紫外-可见分光光度计(U-3900 型, Hitachi 公司)对样品的紫外吸收性能进行测试, 并补充透析袋外部液体 5mL 纯水, 分析样品的载药性能。

2 结果与讨论

2.1 MoS₂ 纳米片的 TEM 分析

MoS₂ 纳米片的 TEM 图见图 1。从图可以看出, 被剥离的 MoS₂ 纳米片呈片状, 层层相互堆叠在一起。

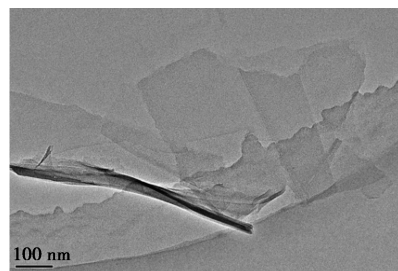


图1 MoS₂ 纳米片的 TEM 图

2.2 FT-IR 分析

功能化二硫化钼纳米载药复合物的 FT-IR 谱图见图 2。从图可以看出, 3436cm⁻¹ 处有特征峰, 说明功能化二硫化钼纳米载药复合物具有 PEI 物质, 1638cm⁻¹ 处为酰胺键的特征峰, 说明 LA 与 PEI 通过酰胺键成功连接, 1461cm⁻¹ 处的特征峰说明了 BSA 的存在, 而 1193cm⁻¹、1115cm⁻¹、1049cm⁻¹ 处的特征峰则是说明了有 PEG 和 FA 的存在。从而可以证明成功制得功能化二硫化钼纳米载药复合物。

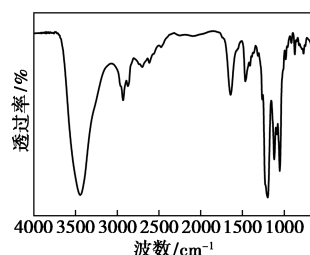


图2 功能化二硫化钼纳米载药复合物的 FT-IR 谱图

2.3 DLS 分析

功能化二硫化钼纳米载药复合物的水动力学直径图见图 3。从图可以看出, 功能化二硫化钼纳米

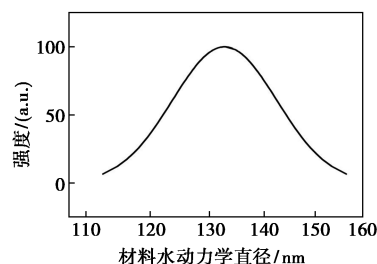


图3 功能化二硫化钼纳米载药复合物的水动力学直径图

载药复合物的水动力学直径约 133nm, 材料的尺寸适合于用作抗肿瘤载体。

2.4 药物释放分析

在 pH=5.0, 近红外光照射条件下, 功能化二硫化钼纳米载药复合物负载 DOX 的体外释放曲线见图 4。从图可以看出, 在 pH=5.0, 近红外光照射条件下, 经过 68h, 功能化二硫化钼纳米载药复合物负载的 DOX 的累计释放量为 67.8%。研究结果表明, 制得的药物载体功能化二硫化钼纳米载药复合物具有较好的药物缓释效果。

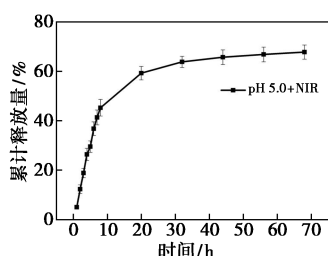


图 4 功能化二硫化钼纳米载药复合物负载 DOX 的体外释放曲线图

3 结论

对单层 MoS₂ 进行修饰, 并成功制得功能化二硫化钼纳米载药复合物。制得的功能化二硫化钼纳米载药复合物的水动力学直径约 133nm, 适合用作抗癌药物载体, 在 pH=5.0, 近红外光照射条件下, 经过 68h, 功能化二硫化钼纳米载药复合物负载的 DOX 的累计释放量为 67.8%, 具有较好的药物释放性能, 在生物医药领域具有潜在的应用价值。

参考文献

- [1] Chhowalla M, Shin H S, Eda G, et al. The chemistry of two-dimensional layered transition metal dichalcogenide nanosheets [J]. *Nature Chemistry*, 2013, 5(4): 263-275.
- [2] Shanmugam V, Selvakumar S, Yeh C S. Near-infrared light-responsive nanomaterials in cancer therapeutics [J]. *Chemical Society Reviews*, 2014, 43(17): 6254-6258.
- [3] Robinson J T, Tabakman S M, Liang Y, et al. Ultrasmall reduced graphene oxide with high near-infrared absorbance for photothermal therapy [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133(17): 6825-6831.
- [4] Zhou M, Zhang R, Huang M, et al. A chelator-free multifunctional [64Cu]CuS nanoparticle platform for simultaneous micro-PET/CT imaging and photothermal ablation therapy [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132(43): 15351-15358.
- [5] Mou J, Yu C, Ming M, et al. Facile synthesis of liposome/Cu_{2-x}S-based nanocomposite for multimodal imaging and photothermal therapy [J]. *Science China Materials*, 2015, 58(4): 294-301.
- [6] Deng H, Yang X, Gao Z. MoS₂ nanosheets as an effective fluorescence quencher for DNA methyltransferase activity detection [J]. *Analyst*, 2015, 140(9): 3210-3215.
- [7] Sakai-Kato K, Nishiyama N, Kozaki M, et al. General considerations regarding the in vitro and in vivo properties of block copolymer micelle products and their evaluation [J]. *J Control Release*, 2015, 210: 76-83.
- [8] Kim J, Kim H, Kim W J. Single-layered MoS₂-PEI-PEG nanocomposite-mediated gene delivery controlled by photo and redox stimuli [J]. *Small*, 2016, 12(9): 1184-1187.
- [9] Matsushitaishiodori Y, Ohtsuki T. Photoinduced RNA interference [J]. *Accounts of Chemical Research*, 2012, 45(7): 1039-1042.
- [10] Namgung R, Singha K, Yu M K, et al. Hybrid superparamagnetic iron oxide nanoparticle-branched polyethylenimine magnetoplexes for gene transfection of vascular endothelial cells [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(14): 4204-4213.
- [11] Deckers R, Moonen C T. Ultrasound triggered, image guided, local drug delivery [J]. *Journal of Controlled Release Official Journal of the Controlled Release Society*, 2010, 148(1): 25-33.
- [12] Son S, Ran N, Kim J, et al. Bio-reducible polymers for gene silencing and delivery [J]. *Accounts of Chemical Research*, 2012, 45(7): 1100-1109.
- [13] Mo R, Jiang T, Disanto R, et al. ATP-triggered anticancer drug delivery [J]. *Nature Communications*, 2014, 5(1): 3364-3369.
- [14] Sanjoh M, Hiki S, Lee Y, et al. pDNA/poly(L-lysine) polyplexes functionalized with a pH-sensitive charge-conversional poly(aspartamide) derivative for controlled gene delivery to human umbilical vein endothelial cells [J]. *Macromolecular Rapid Communications*, 2010, 31(13): 1181-1186.
- [15] Yu S, Zhang X, Tan G, et al. A novel pH-induced thermosensitive hydrogel composed of carboxymethyl chitosan and poloxamer cross-linked by glutaraldehyde for ophthalmic drug delivery [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 155: 208-217.

收稿日期: 2017-12-13

修稿日期: 2019-02-15