

As₂O₃ 磁性 Fe₃O₄ 白蛋白微球的制备与表征

葛素梅¹, 张峰¹, 邢宝玲^{1*}, 李婷¹, 强贤¹, 侯欣欣²

(¹南京医科大学附属常州市妇幼保健院病理科, 江苏 常州 213003; ²东南大学医学院病理学与病理生理学系, 江苏 南京 210009)

[摘要] 目的: 制备用于肿瘤热化疗和逆转多药耐药的 As₂O₃ 磁性 Fe₃O₄ 白蛋白微球并表征。方法: 化学共沉淀法制备 Fe₃O₄ 磁性纳米粒, 运用透射电镜、X 射线衍射分析进行表征, 溶血实验及 MTT 试验进行毒理学评定。去溶剂化交联法制备 As₂O₃ 磁性 Fe₃O₄ 白蛋白微球, 运用透射电镜和能谱仪进行表征, 在交变磁场作用下进行体外升温试验, 体外释药方法研究其释药速率。结果: Fe₃O₄ 磁性纳米粒近似球形, 粒径约 20 nm, 无溶血作用, 细胞毒性为 1 级。As₂O₃ 磁性 Fe₃O₄ 白蛋白微球近似球形, 大小均匀, 粒径约 193.4 nm, 其不同浓度的磁流体在交变磁场下可升温至 39.5~58.0℃并保持恒定。体外释药实验证实 As₂O₃ 磁性 Fe₃O₄ 白蛋白微球具有明显的缓释功能。结论: Fe₃O₄ 磁性纳米粒作为药物载体具有良好的生物相容性。用去溶剂化交联法可以成功制备出 As₂O₃ 磁性 Fe₃O₄ 白蛋白微球, As₂O₃ 磁性 Fe₃O₄ 白蛋白微球释药速率缓慢, 为研究肿瘤热化疗和逆转多药耐药提供理论和实验基础。

[关键词] As₂O₃; 磁性纳米微球; 白蛋白; 制备; 表征

[中图分类号] R73-63+2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)11-1486-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20141106

Preparation and characterization of As₂O₃-loaded magnetic Fe₃O₄ albumin nanospheres

Ge Sumei¹, Zhang Feng¹, Xing Baoling^{1*}, Li Ting¹, Qiang Xian¹, Hou Xinxin²

(¹Department of Pathology, Changzhou Maternal and Child Health Care Hospital Affiliated to NJMU, Changzhou 213003; ²Department of Pathology and Pathophysiology, School of Medicine, Southeast University, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:** To study the preparation and characterization of As₂O₃-loaded magnetic Fe₃O₄ albumin nanospheres which could be used in thermochemotherapy and reversing multidrug resistance of tumor. **Methods:** Fe₃O₄ magnetic nanoparticles were prepared by chemical co-precipitation method. Their characteristics were observed by transmission electron microscope (TEM), X-ray diffraction (XRD), and their cytotoxicity was measured by hemolytic test and MTT assay. As₂O₃-loaded magnetic Fe₃O₄ albumin nanospheres were prepared by desolvation-crosslinking method. Their characteristics were observed by TEM and energy dispersive spectrometer(EDS). Their hyperthermia induced by alternating magnetic field (AMF) was explored *in vitro*. The release rate of As₂O₃ from the nanospheres was assessed by a dissolution test *in vitro*. **Results:** The prepared Fe₃O₄ magnetic nanoparticles were approximately spherical. The diameter was about 20 nm. They had no hemolysis activity and their cytotoxicity was 1 class. The prepared As₂O₃-loaded magnetic Fe₃O₄ albumin nanospheres were approximately spherical, uniform in size observed by TEM. The diameter was about 193.4 nm. The temperature of magnetic fluid with different concentrations could rise to 39.5-58.0℃, and the magnetic fluid keep stable in AMF. The drug release test *in vitro* showed that As₂O₃-loaded magnetic Fe₃O₄ albumin nanospheres had a slow release rate. **Conclusion:** As a drug carrier, magnetic Fe₃O₄ nanoparticle is a kind of good biocompatibility material. The As₂O₃-loaded magnetic Fe₃O₄ albumin nanospheres can be prepared by desolvation-crosslinking method. They have an obvious effect of slow release of drug which may provide a theoretical and practical basis for further study of tumor thermochemotherapy and reversing multidrug resistance.

[Key words] As₂O₃; magnetic nanospheres; albumin; preparation; characterization

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(11): 1486-1490, 1502]

[基金项目] 南京医科大学科技发展基金重点项目(2012NJMU094)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: 793506861@qq.com

肿瘤细胞对化疗药物的多药耐药性(multidrug resistance, MDR)是肿瘤化疗失败的主要原因,逆转肿瘤耐药的研究较多。研究发现三氧化二砷(As_2O_3)及热疗均可以下调 P-gp,抑制抗凋亡基因的表达^[1]。但 As_2O_3 溶液因其不良反应不适宜全身用药治疗实体瘤。近年来利用载体携带化疗药物是治疗肿瘤并逆转多药耐药的一项探索性研究。 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒是一种独特的靶向药物运载系统,具有高的载药量,生物相容性好,对肿瘤细胞具有更高的亲和力,且其磁流体在交变磁场下还可以升温恒温,被用作肿瘤的热化疗及逆转耐药的研究^[2]。白蛋白是一种化学性能稳定、无毒、无免疫原性和生物相容性好的理想的微球材料^[3],具有缓慢释放药物的特性,并可实现靶向输送药物的目的^[4]。目前国内外制备 As_2O_3 磁性材料的辅料选用脂质体、乳剂等较多,与脂质体和乳剂相比,白蛋白微球在体内和贮存时的稳定性较好。研究 As_2O_3 白蛋白微球的报道较多,其制备方法有乳化热固化法、蛋白交联固化法等,并用于肺癌、骨肉瘤等实体瘤的治疗,显示了较好的缓释效应及抑瘤能力^[5],而关于 As_2O_3 磁性 Fe_3O_4 白蛋白微球的制备与表征鲜见。本研究通过去溶剂化交联法制备载 As_2O_3 的磁性 Fe_3O_4 白蛋白微球,并对其进行表征分析,探讨其体外缓释效应,为后期研究肿瘤热化疗和逆转耐药提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

As_2O_3 (北京双鹭药业有限公司);三氯化铁分析纯($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)、氯化亚铁分析纯($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)、盐酸、25%戊二醛、无水乙醇(上海化学试剂公司);小牛血清白蛋白(杭州四季青生物工程公司);JEM-2010 高分辨透射电镜(JEOL 公司,日本);X-射线衍射仪(Shimadzu 公司,日本);能谱仪(Thermo NORAN Vantage 公司,美国);SP-04C 高频感应加热器(深圳双平高频加热器厂)。小鼠成纤维细胞株 L929(上海细胞生物研究所)。

1.2 方法

1.2.1 Fe_3O_4 磁性纳米粒及 As_2O_3 纳米粒的制备及表征

Fe_3O_4 磁性纳米粒的制备采用化学共沉淀法,参照文献^[6]。 As_2O_3 纳米粒的制备采用溶胶凝胶法,参照文献^[7]。透射电镜观察其形貌及粒径。 Fe_3O_4 磁性纳米粒通过 X 射线衍射分析(x-ray diffraction, XRD)表征。 Fe_3O_4 磁性纳米粒的生物相容性检测:①

溶血试验:预先采集新西兰兔血 10 ml,加入适量草酸钾混匀抗凝血。实验分为纳米粒组、阴性对照组(加入生理盐水)、阳性对照组(加入去离子水)。每组重复 3 管,每个试管加入新鲜稀释兔血 0.2 ml,37℃ 水浴中维持 60 min。低速离心后,抽取上清液在波长 540 nm 下测量吸光度,溶血程度=(纳米粒组吸光度值-阴性对照组吸光度值)/(阳性对照吸光度值-阴性对照吸光度值)×100%,如溶血率<5%,说明材料无溶血作用,符合医用材料的溶血试验要求;②毒性试验:将 L-929 细胞分为 6 组,分别接种于 96 孔培养板,每组设 6 个复孔。实验组分别加入 100%、75%、50%和 25%的纳米粒浸渍液,阴性对照组加入 RPMI-1640 培养基,阳性对照组加入 PVC 材料浸渍液(PVC 为含锌稳定剂的管状材料),培养 48 h 后,常规 MTT 法检测各组细胞活性,计算各浓度组细胞相对增殖率(%)=(各浓度组吸光度值/阴性对照组吸光度值)×100%。参照毒性分级标准进行毒性评定^[8]。

1.2.2 As_2O_3 磁性 Fe_3O_4 白蛋白微球的制备及表征

去溶剂化交联法制备 As_2O_3 磁性 Fe_3O_4 白蛋白微球,具体制备方法如下:小牛血清白蛋白、 Fe_3O_4 纳米粒及 As_2O_3 纳米粒共同加入双蒸水溶液混匀并轻微震荡,待全部溶解后,在磁力搅拌器上搅拌一定时间,用 1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 值至 9.0,乙醇以 1 ml/min 的速度滴至已经孵化好的材料与白蛋白混合溶液中,继续搅拌,向纳米粒溶液中缓慢滴加 50 μ l 25%戊二醛溶液,室温磁力搅拌过夜,使纳米粒交联固化 12 h 左右,制得固化的白蛋白纳米球溶液。次日将纳米球溶液以 12 000 r/min 的转速离心 30 min,倾去上清液,加水至原体积,超声分散,洗涤 3 次,以去除制备中加入的有机溶剂。将部分生成物真空干燥备用。形态观察:取出少量制备的 As_2O_3 磁性 Fe_3O_4 白蛋白微球,加无水乙醇超声分散 15 min,滴有膜铜网,制得电镜样品,透射电镜下观察; As_2O_3 磁性 Fe_3O_4 白蛋白微球能谱分析:在 JEM-2010 透射电镜视野下任意选几个白蛋白微球,用能谱仪及原子荧光分光光度计对其成份进行分析,以验证 As_2O_3 磁性 Fe_3O_4 白蛋白微球已被成功制备。

1.2.3 As_2O_3 磁性 Fe_3O_4 白蛋白微球在交变磁场下的体外升温测试

将 As_2O_3 磁性 Fe_3O_4 白蛋白微球用生理盐水溶解后,调节配制 Fe_3O_4 浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/ml 的磁流体后,放入直径 25 cm 的试管中,在 20℃室温下,置于频率为 200 kHz、输出电流为 300 A

的交变磁场下 1 h, 用玻璃温度计置于试管中测温, 每 5 min 测 1 次并记录, 画出相应的曲线图。

1.2.4 As₂O₃ 磁性 Fe₃O₄ 白蛋白微球稳定性检测

As₂O₃ 磁性 Fe₃O₄ 白蛋白纳米微球制备成功后立即测量 As₂O₃ 和 Fe₃O₄ 成分含量; 取少量微球分别在温度 0~4℃、20~25℃、37℃ 下避光放置 3 个月, 重新检测 As₂O₃ 和 Fe₃O₄ 含量并与 3 个月之前质量相比计算百分率。

1.2.5 As₂O₃ 磁性 Fe₃O₄ 白蛋白微球体外释药速率测定

在 Visking 透析袋内分别放入 As₂O₃ 溶液及精确测量的 As₂O₃ 磁性 Fe₃O₄ 白蛋白微球 100 mg, 同时加入 10 ml 生理盐水。膜外 250 ml 烧杯中加入 50 ml 生理盐水作为释放介质, 温度 (37 ± 1)℃, 搅

拌, 速率为 50 r/min, 每隔 30 min 取样, 同时补加等量的释放介质, 取样 270 min, 测定释放液中 As₂O₃ 的质量。绘制累积释药率曲线。

1.3 统计学方法

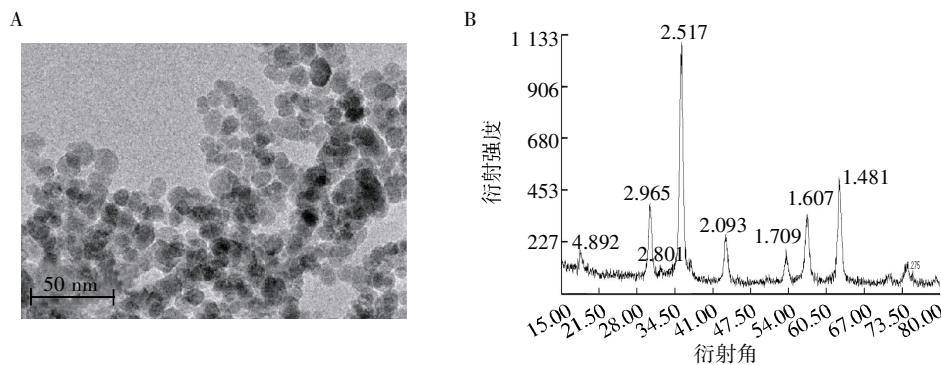
数据经 SPSS11.5 统计软件处理, 采用 *t* 检验和单因素方差分析, 以 *P* ≤ 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Fe₃O₄ 磁性纳米粒的表征

2.1.1 透射电镜观察 Fe₃O₄ 磁性纳米粒

近似球形, 粒径约 20 nm, 分散性较好(图 1A); XRD 显示 Fe₃O₄ 磁性纳米粒(图 1B), 可见有尖锐的衍射峰, 说明 Fe₃O₄ 磁性纳米粒的结晶状态很好。



A: Fe₃O₄ 磁性纳米粒电镜图; B: Fe₃O₄ 磁性纳米粒 XRD 图谱。

图 1 Fe₃O₄ 磁性纳米粒的表征

Figure 1 Characterization of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles

2.1.2 Fe₃O₄ 磁性纳米粒溶血试验

Fe₃O₄ 磁性纳米粒溶血率为 1.4%, 溶血率 < 5% (表 1)。与阳性对照组比较, *P* = 0.000 53, 说明材料无溶血作用, 符合医用材料的溶血实验要求。

2.1.3 Fe₃O₄ 磁性纳米粒的细胞毒性

不同浓度的纳米粒浸渍液对于细胞增殖无明显影响, 细胞毒性分级均为 1 级(表 2), 与阳性对照组

表 1 Fe₃O₄ 磁性纳米粒溶血试验

组别	吸光度值
阴性对照组	0.012 ± 0.007
Fe ₃ O ₄ 磁性纳米粒	0.024 ± 0.010*
阳性对照组	0.831 ± 0.041

与阳性对照组相比, **P* < 0.05。

表 2 Fe₃O₄ 磁性纳米粒的细胞毒性

Table 2 Cytotoxicity of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles

组别	吸光度值	相对增殖率(%)	毒性分级	<i>a</i> <i>P</i> 值
阴性对照组	0.76 ± 0.03	100.0	0	-
25% Fe ₃ O ₄	0.75 ± 0.03	98.7	1	0.000 3
50% Fe ₃ O ₄	0.70 ± 0.04	92.1	1	0.000 9
75% Fe ₃ O ₄	0.67 ± 0.04	88.2	1	0.001 0
100% Fe ₃ O ₄	0.65 ± 0.04	85.5	1	0.001 0
阳性对照组	0.12 ± 0.01	15.8	4	-

a: 不同浓度的纳米粒浸渍液与阳性对照组相比的 *P* 值。

比较, P 均 < 0.05 。

2.2 As₂O₃ 磁性 Fe₃O₄ 白蛋白微球的表征

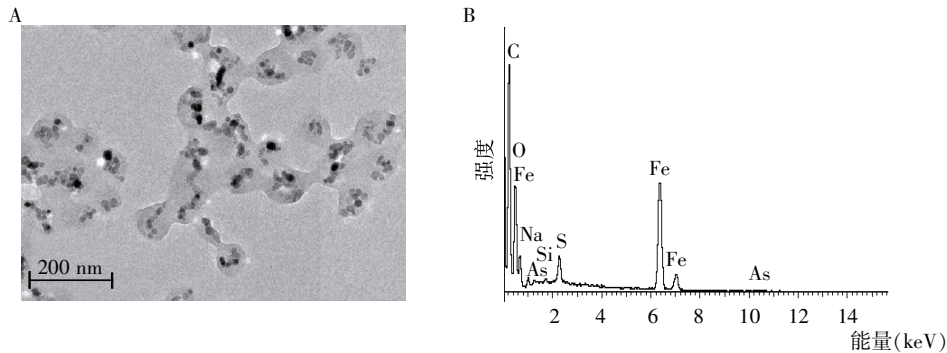
2.2.1 透射电镜观察 As₂O₃ 磁性 Fe₃O₄ 白蛋白微球

近似球形, 粒径均匀, 约为 193.4 nm (图 2A); 能谱仪及原子荧光分光光度计显示 As₂O₃ 磁性 Fe₃O₄ 白蛋白微球同时含有 As₂O₃ 和 Fe₃O₄ 化学成分 (图 2B), 其中含 As 重量百分比为 0.4%, 原子百分比为 0.09%, 含 Fe 重量百分比为 22.01%, 原子百分比为

6.35%。

2.2.2 As₂O₃ 磁性 Fe₃O₄ 白蛋白微球体外升温实验

5 种不同浓度的磁流体在交变磁场下, 温度可以升高至 39.5~58.0°C (图 3), 温度在最初 15 min 上升较快, 40 min 后基本达到一个稳定温度。输出电流相同时, 磁流体浓度越高, 温度升高越快, 恒定温度越高。因肿瘤热疗的最佳温度为 41~43°C, 因此磁流体中 Fe₃O₄ 的浓度可以选择 0.4~0.6 mg/ml。



A: As₂O₃ 磁性 Fe₃O₄ 白蛋白微球电镜图; B: As₂O₃ 磁性 Fe₃O₄ 白蛋白微球能谱图, 满量程 2 757 Cts 光标 0.00。

图 2 As₂O₃ 磁性 Fe₃O₄ 白蛋白微球的表征

Figure 2 Characterization of As₂O₃-loaded magnetic Fe₃O₄ albumin nanospheres

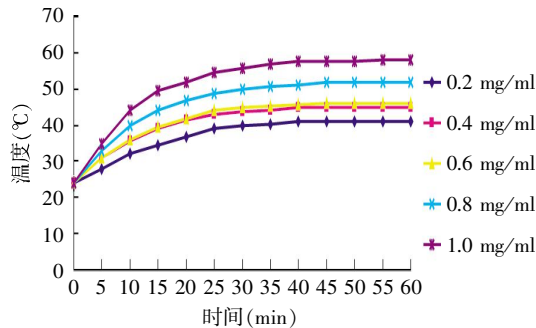


图 3 As₂O₃ 磁性 Fe₃O₄ 白蛋白微球在交变磁场下体外升温曲线
Figure 3 The temperature increase of As₂O₃-loaded magnetic Fe₃O₄ albumin nanospheres under an alternating magnetic field

2.3 As₂O₃ 磁性 Fe₃O₄ 白蛋白微球稳定性

3 个月后, 重新检测 As₂O₃ 和 Fe₃O₄ 质量并与之前相比计算百分率 (表 3), 结果显示它们质量无明显变化 ($P > 0.05$); 3 种不同温度比较, As₂O₃ 和 Fe₃O₄ 质量变化无明显差异 ($P > 0.05$)。

2.4 As₂O₃ 磁性 Fe₃O₄ 白蛋白微球体外药物释放实验结果

以生理盐水为释放介质, 考察 As₂O₃ 磁性 Fe₃O₄ 白蛋白微球的体外动态释放 (图 4)。曲线显示, As₂O₃ 磁性 Fe₃O₄ 白蛋白微球释放速度明显慢于 As₂O₃ 溶液直接释放, As₂O₃ 溶液 6 h 内基本释放完全, 而 As₂O₃ 磁性 Fe₃O₄ 白蛋白微球仅释放约 27%, 药物半衰期明显延长, 表明 As₂O₃ 磁性 Fe₃O₄ 白蛋白微球具有较好的缓释效应。

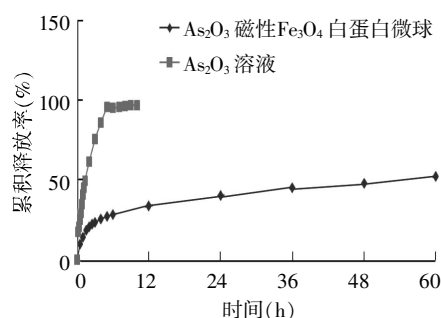
3 讨论

肿瘤多药耐药现象是影响化疗疗效的重要原因之一, 为此, 本研究研制了 As₂O₃ 磁性 Fe₃O₄ 白蛋白微球, 它将药物与磁性材料共同包埋于白蛋白中制成的类球形制剂, 粒径几百纳米至几微米不等。磁性纳米粒在外加磁场的作用下具有良好的靶向性和升

表 3 As₂O₃ 磁性 Fe₃O₄ 白蛋白微球的稳定性检测

Table 3 Detection of the stability of As₂O₃-loaded magnetic Fe₃O₄ albumin nanospheres (% , n=3)

放置时间(月)	As ₂ O ₃			Fe ₃ O ₄		
	0~4°C	20~25°C	37°C	0~4°C	20~25°C	37°C
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
3	98.7	98.5	98.6	98.9	98.6	98.8

图 4 As₂O₃ 磁性 Fe₃O₄ 白蛋白微球体外释放曲线Figure 4 In vitro release curve of As₂O₃-loaded magnetic Fe₃O₄ albumin nanospheres

温性, Fe₃O₄ 磁性纳米粒粒径小、比表面积大、易于在其表面偶联肿瘤特异性的靶向分子, 具有较高的载药量, 且具有较好的生物相容性^[9]。因其小尺寸效应, 容易被肿瘤细胞吞入, 可以通过增强渗透滞留效应 (enhanced permeability and retention effect, EPR) 被动靶向作用于肿瘤组织^[10], 从而解决肿瘤化疗的全身不良反应大, 达到了药物高效、低毒、高滞留性的目的, 且本身无毒, 起到了逆转多药耐药作用。研究表明 As₂O₃ 可逆转肝癌耐药细胞株多药耐药, 其机制可能是通过下调多药耐药基因的表达, 增加肿瘤细胞内药物积聚有关^[11]。As₂O₃ 磁性 Fe₃O₄ 白蛋白微球置于交变磁场中, 由于 As₂O₃ 和磁流体热疗均可以诱导肿瘤细胞凋亡, 两者联合后, 热、化疗作用不仅可以相加, 而且可以产生协同放大效应。热疗和化疗联合还可逆转肿瘤细胞多药耐药, 所以 As₂O₃ 磁性 Fe₃O₄ 白蛋白微球是非常有前途的药物新剂型, 具有热疗、化疗及修饰后的主动靶向治疗作用。

磁性白蛋白微球常用制备方法是加热固化法^[12]和去溶剂化交联法^[13]。采用加热固化法制备的白蛋白微球在体内和贮存时的稳定性稍差, 药物镶嵌量少, 抗肿瘤药物在加热固化中易受热变性, 降低其药物活性, 且制备成本较高, 不易推广使用。去溶剂化交联法实验相对简单, 且制备的微球粒径大小合适, 因此本实验采用去溶剂化交联法制备 As₂O₃ 磁性 Fe₃O₄ 白蛋白微球。因微球的性能和质量与制备过程中各种条件有关, 其中白蛋白质量浓度、交联时间、乙醇的用量和滴加速度、戊二醛的用量和 pH 值均为粒径的影响因素。Zhang 等^[14]发现, 乙醇用量增加, 纳米粒产率升高, 但乙醇用量过大, 后处理过程复杂。戊二醛的用量从 5 μl 增加到 100 μl, 白蛋白微球的粒径变化不大, 综合考虑, 戊二醛的用量以 25~50 μl 为宜。本研究中发现 pH 为影响粒径的主要因素, 当 pH < 9.0 时, 白蛋白微球的粒径增大至 >

500 nm, 当 pH > 9.0 时, 白蛋白微球的粒径降低, 但其稳定性亦降低。乙醇的滴速应尽可能缓慢且匀速, 若滴速较快, 可能会引起白蛋白微球聚集。本研究制备出的 As₂O₃ 磁性 Fe₃O₄ 白蛋白微球粒径约为 193.4 nm, 并且大小均匀, 稳定性良好。

白蛋白具有安全无毒、可生物降解、生物相容性好等优点, 可作为理想的药物载体^[15]。分子中的氨基酸以肽键相连接, 且扭曲成团状, 具有网状空隙, 为镶嵌携带药物创造了有利条件, 且白蛋白具有许多活性氨基、羧基, 应用白蛋白表面的活性基团与药物偶联, 在体内酶的作用下, 链接的化学键缓慢断裂, 可以实现缓释、提高药物溶解性、靶向等目的^[16]。制备白蛋白微球包裹药物可以起到保护药物不受外界环境的影响, 提高药物稳定性, 并可实现靶向和缓释的目的。本研究以生理盐水作为释放介质考察了 As₂O₃ 磁性 Fe₃O₄ 白蛋白微球的缓释功能, 从药物释放曲线上可以看出, As₂O₃ 溶液在 6 h 内基本释放完全, As₂O₃ 磁性 Fe₃O₄ 白蛋白微球中 As₂O₃ 开始释放较快, 后来持续缓慢释放, 可以推测开始 6 h 释放的药物是吸附在纳米微球表面的, 因此容易释放, 而在白蛋白微球内部的药物与白蛋白共价结合, 故药物不易释放, 药物半衰期明显延长, 从而解决了药物体内消除快、不良反应大的问题, 提高了药物疗效, 有助于逆转肿瘤多药耐药。

综上所述, 本研究通过去溶剂化交联法制备的 As₂O₃ 磁性 Fe₃O₄ 白蛋白微球粒径约 193.4 nm。采用透射电镜、能谱仪、原子荧光分光光度计等进行表征, 并对磁性微球的体外释药速率进行了初步探索。磁性白蛋白微球包载化疗药后, 药物半衰期明显延长, 在磁场作用下靶向性增强, 抗肿瘤效果将增强, 并减少了药物的毒性反应, 为研究载药磁性微球对肿瘤的热化疗和逆转耐药提供了理论及实验依据。

[参考文献]

- [1] Qian XP, Liu BR. Effects of arsenic trioxide on drug transporting molecules in multidrug resistance malignant neoplasma MR2 cell line [J]. JNMU, 2006, 20 (3): 155-159
- [2] Islam T, Joseph L. Current state and future applications of active targeting in malignancies using superparamagnetic iron oxide nanoparticle [J]. Cancer Biomark, 2009, 5(1): 99-107
- [3] Estevanato L, Cintra D, Baldini N, et al. Preliminary biocompatibility investigation of magnetic albumin nanosphere designed as potential versatile drug delivery

(下转第 1502 页)