

# 肿瘤靶向 pH 响应载药 ZnO 量子点的制备、表征及对阿霉素的控制释放研究

魏英英, 吴兴军, 何文涛, 施 萍, 袁建超\*

(西北师范大学 化学化工学院 甘肃省高分子材料重点实验室, 兰州 730070)

**摘要:**聚丙烯酸(PAA)接枝聚乙二醇(PEG)和叶酸(FA)形成含有羧基的聚合物 PAA-PEG-FA, 与氨基修饰的 ZnO 量子点(ZnO QDs)表面的氨基通过静电作用过, 形成具有肿瘤靶向 pH 响应的 ZnO@(PAA-PEG-FA)核/壳纳米粒子(量子点为核, 聚合物为壳), 抗癌药物阿霉素(DOX)通过配位形成肿瘤靶智能释药/显像体系: ZnO@(PAA-PEG-FA)-DOX(量子点的荧光可示踪/显像药物递送过程)。核磁共振( $^1\text{H-NMR}$ )和红外光谱测试结果表明, PAA-PEG-FA 聚合物和氨基 ZnO QDs 通过静电引力组合为核/壳纳米粒子; 透射电镜(TEM)测得该体系呈规整球形且分布均匀, 平均粒径约 10nm; 体外模拟释放结果表明, 载药体系在癌细胞的溶酶体/内涵体(pH 5)内能很好地释放出阿霉素, 而在药物输送过程(pH 7.4)中只有很少的阿霉素释放出来。因此, 该肿瘤靶向 pH 响应型 ZnO 纳米颗粒作为抗癌药物载体具有潜在的应用价值。

**关键词:** ZnO 量子点; 叶酸; 静电作用; DOX; pH 敏感; 控制释放

恶性肿瘤的发病率大幅增加, 严重威胁到人类的生命和健康<sup>[1]</sup>。由于药物小分子的溶解性、稳定性、毒副作用等原因, 许多以纳米颗粒为基础的材料如各种聚合物胶束<sup>[2~4]</sup>、脂质体<sup>[5~7]</sup>、蛋白质<sup>[8~9]</sup>等已被开发用于靶向肿瘤给药系统的载体。ZnO 量子点(QDs), 由于具有无毒性、良好生物相容性、pH 敏感、尺寸小、表面可修饰(如聚乙二醇表面修饰的量子点)、可示踪药物输送进程等优点<sup>[10~12]</sup>, 作为新型纳米材料日益受到研究者的重视。

聚乙二醇修饰的药物载体可延长药物体内循环时间。聚乙二醇修饰的药物载体带负电荷, 可抵抗来自蛋白质的静电吸附<sup>[13~15]</sup>, 但是由于与细胞膜的静电排斥不容易进入癌细胞<sup>[16]</sup>; 带正电荷的药物载体与血清成分具有很强的非特异性相互作用, 载体很容易被网状内皮系统吞噬<sup>[17,18]</sup>。

因此, 结合以上优缺点, 我们设计了一个以阴阳离子静电作用为基础的被动-主动双靶向 ZnO 量子点载药/显像系统。聚丙烯酸(PAA)作为纳米载体, 具有被动靶向功能; 叶酸(FA)作为主动靶向配体, 可以和叶酸受体阳性癌细胞特异性识别而主动靶向; 聚乙二醇(PEG)可改善载体的生物相容性、延长药物体内循环时间、减少载体的负电性; ZnO 量子点(ZnO QDs)通过配位作用, 负载抗癌药物阿霉素, 通过自身的荧光显像/示踪药物的输送过程。首先用酯化反应和酰胺化反应分别把聚乙二醇和叶酸接枝到聚丙烯酸上, 同时用十二胺增加 ZnO QDs 表面的正电荷, 再使羧基阴离子与氨基阳离子静电作用, 最后和模型药物阿霉素(DOX)螯合形成 pH 敏感的具有核壳结构的 ZnO QD-DOX 药物输送/显像体系。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

聚乙二醇(PEG, 400g/mol); 聚丙烯酸水溶液(PAA,  $M_w \approx 5000$ , wt = 50%), 十二胺(98%); 醋酸锌( $\text{Zn}(\text{Ac})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ); FA-NH<sub>2</sub> (实验室自制); N, N'-二环己基碳二亚胺(DCC, 99%); 4-二甲氨基吡啶

10.14028/j.cnki.1003-3726.2018.03.007

收稿: 2017-06-01; 修回: 2017-11-21;

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21364011, 20964003);

作者简介: 魏英英(1992—), 女, 硕士生, 研究方向为靶向抗肿瘤高分子药物、生物高分子材料;

\* 通讯联系人, E-mail: jianchaoyuan@nwnu.edu.cn.

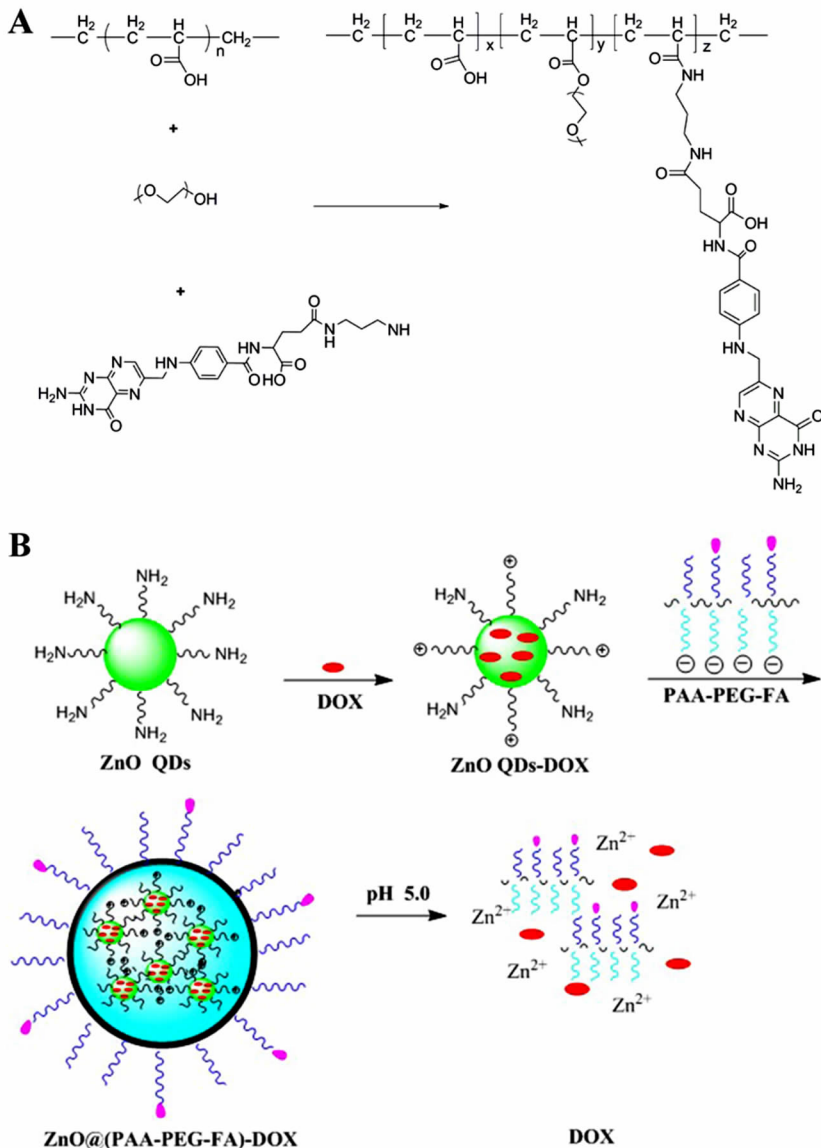


图 1 (A)PAA-PEG-FA 的合成方案;(B)ZnO@(PAA-PEG-FA)(DOX)的制备和药物释放机理示意图

Figure 1 (A)Synthetic scheme of PAA-PEG-FA; (B) Preparation of ZnO@(PAA-PEG-FA)(DOX) and schematic illustration of drug release mechanism

(DMAP,98%);均购自上海晶纯生化科技股份有限公司;盐酸阿霉素(DOX·HCl,99%)购自北京华联邦博科技有限公司;二甲基亚砜(DMSO)、乙醇等均购于中国国药(集团)上海化学试剂公司,所有试剂均为分析纯,实验用水为一次蒸馏水。

Mercuryplus-400 型核磁共振仪(NMR,美国 Varian 公司);F-7000 型荧光分光光度计(日本日立公司);JEM-1400 型透射电子显微镜(TEM,日本 JEOL 公司);傅里叶变换红外分光光度计(美国热电仪器集团有限公司)。

## 1.2 PAA-PEG-FA 的合成

按照文献<sup>[19]</sup>的方法,称取 PAA(1.0g,0.1mmol),PEG(0.8g,2.0mmol),FA-NH<sub>2</sub>(0.2g,0.4mmol) DMAP(0.244g,2.0mmol)置于 50mL 圆底烧瓶中,用 10mL DMSO 溶解,再将 DCC(0.412g,2.0mmol)

加入上述反应液中,50℃下搅拌反应 24h。过滤,转移至透析袋(MWCO 3000)中,用蒸馏水透析 48h,旋转蒸发,干燥得到产物,为白色粘稠液(1.5g;<sup>1</sup>H NMR 如图 2 所示),产率 84%。

### 1.3 氨基修饰的 ZnO 量子点的合成

按照文献<sup>[10]</sup>的方法,将二水醋酸锌(0.35g,1.5mmol),十二胺(0.26g,1.4mmol)溶于 35mL 无水乙醇中,于 80℃活化反应 2h,加入 5mL 氢氧化钾(0.5mol/L),反应 5~7min;然后室温下搅拌反应 3h,最后用正己烷、石油醚沉淀,离心 2~3 次,得到白色固体(0.43g),即为 ZnO QDs,产率 78%。

### 1.4 ZnO@(PAA-PEG-FA)-DOX 的制备与表征

将 10mg ZnO QDs 与 4mg 阿霉素溶解在 2mL 乙醇中,室温下避光搅拌 24h,得到 ZnO-DOX QDs。然后将 2mL ZnO-DOX QDs 逐滴滴入到 2mL PAA-PEG-FA (1mg/mL)的乙醇溶液中,室温下避光再搅拌 24h 后,往混合溶液中滴加 6mL 的蒸馏水,继续避光搅拌 24h。最后将混合溶液装入透析袋(MWCO = 3000)置于蒸馏水中透析 3 天,及时更换透析液,取透析袋内澄清液用 0.45nm 滤膜过滤,冷冻干燥即得到载药 ZnO@(PAA-PEG-FA)-DOX 纳米颗粒,通过透射电镜(TEM)观察 ZnO@(PAA-PEG-FA)-DOX 纳米载体的形态结构。将透析得到的 ZnO 药物载体滴在铜网表面,放在红外灯下,待干燥后,采用 TEM 检测,加速电压为 200kV。

### 1.5 药物体外释放实验

称取 10mg ZnO@(PAA-PEG-FA)-DOX 量子点于 10mL 蒸馏水溶解后,取两份 5mL 载药量子点水溶液,分别置于 100mL 的 pH=7.4(100mL)的磷酸盐缓冲溶液与 pH=5.0(100mL)的醋酸缓冲溶液中透析 48h,按照一定的时间间隔取透析液,分别测试紫外吸收。按照紫外-可见分光光度法,取 450nm~550nm 波长范围内的最大吸收值(与标准曲线对照计算阿霉素的浓度)按如下公式计算载药量子点的封装率和载药量:

$$\text{封装率}(\%) = (\text{负载到量子点中 DOX 的质量} / \text{加入 DOX 总质量}) \times 100\%$$

$$\text{载药量}(\%) = (\text{负载到量子点中 DOX 的质量} / (\text{载药量子点} + \text{聚合物}) \text{的总质量}) \times 100\% \quad (1)$$

计算结果,ZnO@(PAA-PEG-FA)量子点的封装率为 68.4%,载药量为 82.8%。

绘制标准曲线:用 pH 为 7.4 磷酸盐缓冲溶液配制不同浓度的 DOX 溶液,在 37℃下,用 UV/Vis 可见光谱检测 480 nm 激发波长处的吸光度,绘制标准曲线。

## 2 结果与讨论

### 2.1 PAA-PEG-FA 的核磁共振氢谱表征

PEG 和 FA-NH<sub>2</sub> 通过取代反应连接到末端为羧基的聚丙烯酸大分子上,得到具有靶向性的水溶性大分子 PAA-PEG-FA。PAA-PEG-FA 的<sup>1</sup>H-NMR 核磁谱图如图 2 所示。图 2 中通过核磁共振氢谱分析可以看出,在 δ=1.35~2.05(p,q)左右出现聚合物主链上的亚甲基质子的吸收峰;δ=3.24(a)和 δ=3.83(b)左右出现了 PEG 上的特征峰;在 δ=6.69(j),δ=7.61(k)和 δ=8.63(n)左右为叶酸苯环及杂环上质子的峰,δ=4.26 和 δ=4.47 为叶酸上烷基连上的质子的峰,该特征峰的出现证明了 FA 和 PEG 的成功接枝。核磁共振氢谱说明成功合成了大分子 PAA-PEG-FA,即为量子点的亲水性外壳。通过核磁积分得 PEG 的接枝率为 25%,FA 的接枝率为 3%,共聚物的  $M_n = 1.3 \times 10^4$ 。

### 2.2 NH<sub>2</sub>-ZnO QDs 的红外和 ZnO@(PAA-PEG-FA)荧光表征

用红外光谱对十二胺修饰的 ZnO QDs 进行表征,如图 3(A)所示,473cm<sup>-1</sup>或 488cm<sup>-1</sup>处的吸收峰为 Zn—O 键的特征吸收峰;通过与十二胺的振动吸收进行对比,结果发现在 NH<sub>2</sub>-ZnO QDs 的 2937cm<sup>-1</sup>和 1023cm<sup>-1</sup>出现了 C—C 键的伸缩振动和平面摇摆振动吸收峰,这表明十二胺成功地修饰到了 ZnO 量子点表面。

为了进一步了解 ZnO@(PAA-PEG-FA)QDs 的 pH 响应性,在不同的 pH(pH=4~8)PBS 缓冲液

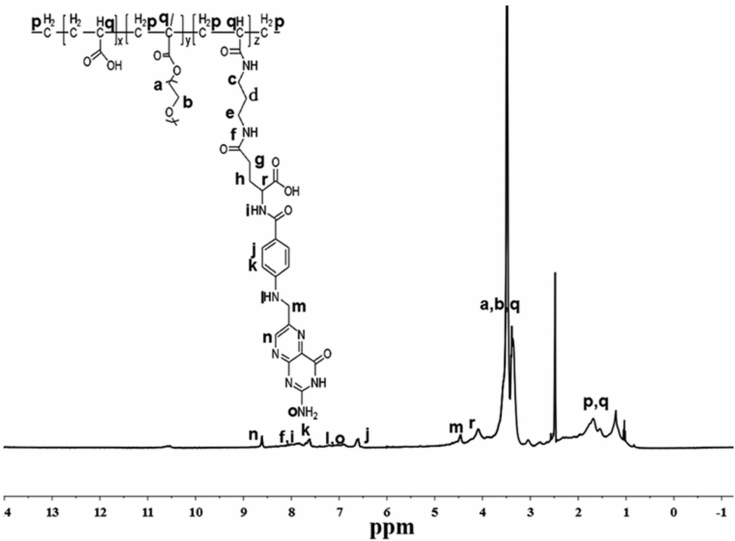


图 2 PAA-PEG-FA 的<sup>1</sup>H NMR 谱图  
Figure 2 <sup>1</sup>H NMR spectrum of PAA-PEG-FA

中测定 ZnO@(PAA-PEG-FA)QDs 的荧光光谱,如图 3(B)所示,生理条件下,激发波长为 365nm,荧光发射光谱约为 530nm,呈现黄色荧光(图 2D),这是经典的氧化锌缺陷发光,表明该 ZnO@(PAA-PEG-FA)QDs 荧光性能良好。然而在 pH=5 的弱酸性条件下,ZnO@(PAA-PEG-FA)QDs 的荧光消失,结果表明 ZnO@(PAA-PEG-FA)QDs 中的氧化锌量子点能够有效溶解在酸性环境下,使该 ZnO@(PAA-PEG-FA)QDs 体系被破坏,具有 pH 敏感性。

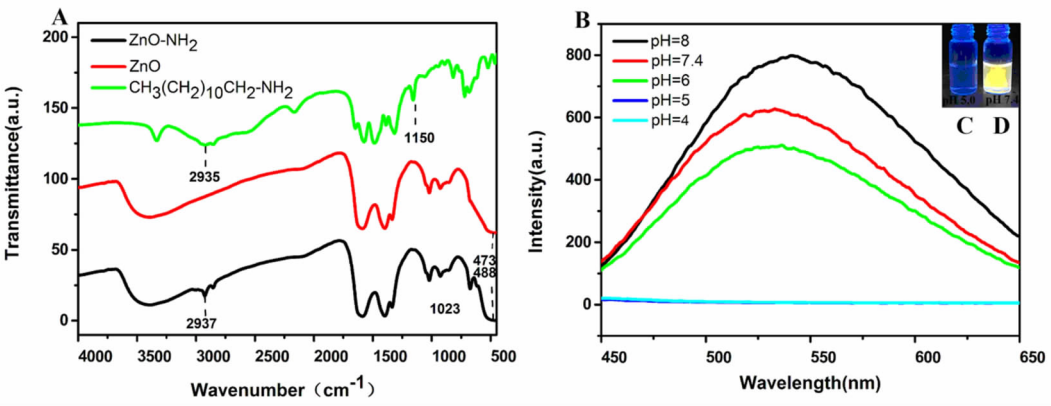


图 3 NH<sub>2</sub>-ZnO 量子点的红外光谱(A);  
不同 pH 下 ZnO@(PAA-PEG-FA)量子点的荧光光谱,激发波长为 340nm(B);  
ZnO@(PAA-PEG-FA)量子点在 pH 7.4(D)和 pH 5.0(C)时紫外灯下照片

Figure 3 FTIR spectra of NH<sub>2</sub>-ZnO QDs (A); Fluorescence spectra of ZnO@(PAA-PEG-FA) QDs at different pH under an excitation of 340 nm (B); ZnO@(PAA-PEG-FA) QDs at pH 7.4 (D) and pH 5.0 (C) under UV irradiation

2.3 ZnO@(PAA-PEG-FA)的形貌表征

为了观察纳米颗粒 ZnO@(PAA-PEG-FA)的尺寸和形貌,对其进行了 TEM 测试,如图 4 所示,通过电镜图 4(A)可知 ZnO 量子点颗粒小,易堆积,而 ZnO@(PAA-PEG-FA)呈现球状结构,能够稳定分散在水溶液中,粒径平均为 10nm,如图 4(B)所示。结果证明,带正电荷的量子点与阴离子聚合物有较强的结

合能力,大量的 ZnO 量子点被聚合物所包封。

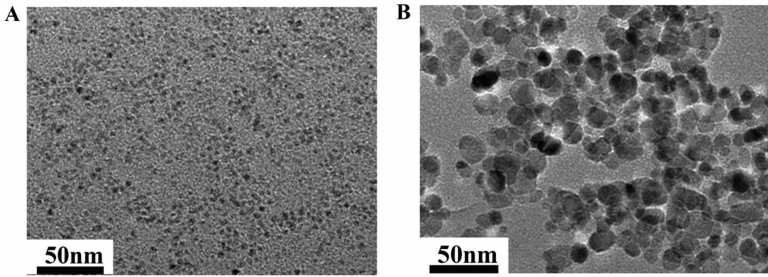


图 4 ZnO 量子点(A)、ZnO@(PAA-PEG-FA)量子点(B)的透射电镜图  
标尺刻度为 50nm。

Figure 4 TEM images of (A) ZnO QDs, (B) ZnO@(PAA-PEG-FA) QDs  
The scale bar represents 50 nm.

2.4 ZnO@(PAA-PEG-FA)的载药行为和体外药物释放研究

ZnO@(PAA-PEG-FA) QDs 表面的  $Zn^{2+}$  能够与 DOX 配位而有效地负载 DOX,在弱酸性条件下会破坏  $Zn^{2+}$  与 DOX 的配位键而游离出 DOX。图 5(A)可以明显地看到 pH 为 7.4 比 pH 为 5.0 时 DOX 的荧光强度弱得多,结果表明 ZnO@(PAA-PEG-FA) QDs 的 ZnO QDs 可以负载 DOX,并在酸性条件下释放 DOX。在人体温度(37℃)下,考察不同 pH 值下载药 ZnO@(PAA-PEG-FA)-DOX 量子点的释放性能。累积释放曲线如图 5(D)所示,pH=5.0 时,在 48h 内阿霉素的累积释放率高达 90.5%;而 pH=7.4 时,阿霉素的累计释放率仅为 15.3%,这表明在酸性环境下会更好地释放出阿霉素,证明 ZnO@(PAA-PEG-FA)-DOX 量子点对 pH 具有高度敏感性。

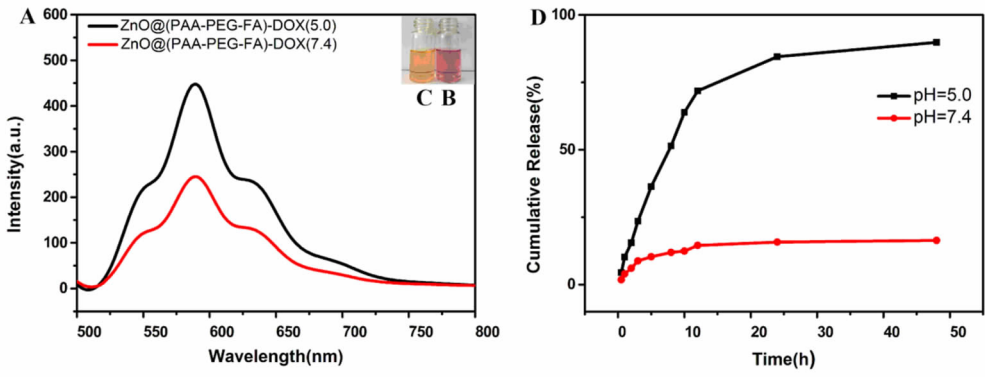


图 5 ZnO@(PAA-PEG-FA)-DOX 在 480nm 激发波长下的荧光光谱图(A)。插图:ZnO@(PAA-PEG-FA)-DOX 在 pH7.4(B)和 pH 5.0(C)中分解照片;ZnO@(PAA-PEG-FA)-DOX 体系在不同缓冲液中的释放曲线(D)  
Figure 5 Fluorescence spectra of ZnO@(PAA-PEG-FA)-DOX at pH 5.0 and 7.4 under an excitation of 480nm (A). Inset: digital photographs of ZnO@(PAA-PEG-FA)-DOX at pH 7.4 (B) and ZnO@(PAA-PEG-FA)-DOX decomposed at pH 5.0 (C). The release profile of DOX from ZnO@(PAA-PEG-FA)-DOX system in different buffers (D)

3 结论

本文成功合成了一种简单的基于 pH 响应的 ZnO@(PAA-PEG-FA)纳米药物载体。该纳米粒子可以形成核-壳结构,在水溶液中有良好分散性和稳定性,粒径在 10nm 左右。pH 为 5.0 时,ZnO@(PAA-PEG-FA)-DOX 的锌氧键断裂,氧化锌量子点溶解,ZnO@(PAA-PEG-FA)-DOX 体系解离为  $Zn^{2+}$ 、水溶性大分子 PAA-PEG-FA 和 DOX。体外模拟释放研究结果表明,pH 为 5.0 时的药物累计释放率明显较

高,48h 内 DOX 的累积释放率达 90.5%,而 pH 为 7.4 时 DOX 的累积释放率为 15.3%。总之,ZnO@ (PAA-PEG-FA)为智能药物载体系统提供了一个高效的平台,在癌症治疗中有着极为广阔的应用前景。

## 参考文献:

- [1] Xu W, Ding J, Xiao C, et al. *Biomaterials*, 2015, 54 (0): 72~86.
- [2] Rainbolt E A, Washington K E, Biewer M C, et al. *Polym Chem*, 2015, 6 (13): 2369~2381.
- [3] Chan J M W, Tan J P K, Engler A C, et al. *Macromolecules*, 2016, 49 (6): 2013~2021.
- [4] Paulmurugan R, Bhethanabotla R, Mishra K, et al. *Mol Cancer Ther*, 2016, 15 (2): 221~231.
- [5] Liu C, Yuan J, Luo X, et al. *Mol Pharm*, 2014, 11 (11): 4258~4269.
- [6] Agarwal R, Iezhitsa I, Agarwal P, et al. *Drug Delivery*, 2016, 23 (4): 1075~1091.
- [7] Chen T, Xu S, Zhao T, et al. *ACS Appl Mat Interfaces*, 2012, 4 (11): 5766~5774.
- [8] Chen K J, Liang H F, Chen H L, et al. *ACS Nano*, 2012, 7 (1): 438~446.
- [9] Zhen Z, Tang W, Chen H, et al. *ACS Nano*, 2013, 7 (6): 4830~4837.
- [10] Muhammad F, Guo M, Qi W, et al. *J Am Chem Soc*, 2011, 133 (23): 8778~8781.
- [11] Zhang J, Wu D, Li M F, et al. *ACS Appl Mat Interfaces*, 2015, 7 (48): 26666~26673.
- [12] Xu G, Zeng S, Zhang B, et al. *Chem Rev*, 2016, 116 (19): 12234~12327.
- [13] Bae Y H, Park K. *J Control Release*, 2011, 153 (3): 198~205.
- [14] Knop K, Hoogenboom R, Fischer D, et al. *Angew Chem Int Ed*, 2010, 49 (36): 6288~6308.
- [15] Lee Y, Miyata K, Oba M, et al. *Angew Chem*, 2008, 120 (28): 5241~5244.
- [16] Huang L, Liu Y. *Annu Rev Bio Eng*, 2011, 13 (1): 507~530.
- [17] Mintzer M A, Simanek E E. *Chem Rev*, 2008, 109 (2): 259~302.
- [18] Jin E, Zhang B, Sun X, et al. *J Am Chem Soc*, 2013, 135 (2): 933~940.
- [19] Li Q R, Gu C Z, Yin H, et al. *Chin J Org Chem*, 2005, 25 (11): 1416~1419.

## Tumor Targeted pH-Sensitive ZnO QDs: Preparation, Characterization and Controlled Release of DOX

WEI Ying-ying, WU Xing-jun, HE Wen-tao, SHI Ping, YUAN Jian-chao\*

(Key Laboratory of Gansu Polymer Materials, College of Chemistry and Chemical Engineering,  
Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** A novel tumor targeted pH-sensitive ZnO@ (Polyacrylic acid-polyethylene glycol-Folic acid (ZnO@ (PAA-PEG-FA)) QDs was formed by electrostatic interaction of the carboxyl of PAA-PEG-FA and amino of ZnO QDs. Doxorubicin (DOX) was loaded on the ZnO@ (PAA-PEG-FA) QDs through coordination to form drug controlled release/imaging QDs, ZnO@ (PAA-PEG-FA)-DOX. PAA-PEG-FA polymer and ZnO QDs were characterized by <sup>1</sup>H-NMR and IR. Transmission electron microscopy (TEM) showed that the ZnO@ (PAA-PEG-FA) QDs were spherical with an average diameter of about 10nm. The results of DOX release show that DOX released well from ZnO@ (PAA-PEG-FA) QDs in lysosomes/endosomes of cancer cell (pH 5), and only little DOX released in the process of drug delivery (pH 7.4). Therefore, the tumor targeted pH responsive ZnO QDs have potential application as anticancer drug carriers.

**Key words:** ZnO quantum dots; Folic acid; Electrostatic interactions; DOX; pH Sensitive; Controlled release