

负载环丙沙星和紫杉醇的 ZIF-8 纳米 给药平台的构建与性能

朱 威, 徐健祥, 蒋京浩, 朱利民*

(东华大学 生物与医学工程学院, 上海 201620)

摘要: 以 2-甲基咪唑 (2-MeIm) 和 $Zn(NO_3)_2$ 为原料, 制备了沸石咪唑骨架-8 (ZIF-8) 纳米材料, 将其作为化疗药物载体, 在其内外层分别负载化疗药物环丙沙星 (CIP) 和紫杉醇 (TAX), 最后包覆聚多巴胺 (PDA) 构建了 ZIF-8 : CIP@ZIF-8 : TAX@PDA 纳米给药平台 (ZCZTP)。采用 TEM、纳米粒度及 Zeta 电位分析仪、XRD、EDS 对 ZCZTP 进行了表征, 通过 CCK-8 法评估了 ZCZTP 的生物安全性和细胞毒性, 通过标记罗明丹 B (RhB) 和激光共聚焦扫描显微镜 (CLSM), 评价了 4T1 细胞对 ZCZTP 的摄取能力。结果表明, ZCZTP 粒径均一, 且形态规则呈立方体; CIP 与 TAX 分别在载体内外层包覆; ZCZTP 的 Zeta 电位为 (-13.23 ± 2.29) mV, 其 CIP 和 TAX 的载药量分别为 4.28% 和 8.57%, 包封率分别为 42.8% 和 85.7%, CIP 和 TAX 的 48 h (pH=6.5) 药物累积释放量分别为 46.0% 与 61.1%, 释放具有 pH 响应性, 在酸性条件下可以释放更多药物; ZCZTP 具有良好的生物安全性与血液相容性, 质量浓度为 400 g/L 的 ZCZTP 对 Balb/c 小鼠血的溶血率 $< 5%$, ZCZTP 可以通过内吞作用进入 4T1 细胞并在溶酶体中积累, 经质量浓度为 10 mg/L 的 ZCZTP 处理后的 4T1 细胞存活率较无药物添加的对照组下降 62.49%。

关键词: 金属有机框架; 沸石咪唑骨架-8; 分区载药; 化疗; 协同治疗; 生物工程

中图分类号: TB383.1; TQ460.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2025) 10-2182-08

Construction and performance of ZIF-8 nanodrug delivery platform loaded with ciprofloxacin and paclitaxel

ZHU Wei, XU Jianxiang, JIANG Jinghao, ZHU Limin*

(College of Biological and Medical Engineering, Donghua University, Shanghai 201620, China)

Abstract: Zeolite imidazole-8 (ZIF-8) nanomaterial as chemotherapy drug carrier was prepared from 2-methylimidazole (2-MeIm) and $Zn(NO_3)_2$, loaded with chemotherapy drugs ciprofloxacin (CIP) and paclitaxel (TAX) in the inner and outer layers, respectively, and finally was coated with polydopamine (PDA) to obtain a ZIF-8 : CIP@ZIF-8 : TAX@PDA nano drug delivery platform (ZCZTP), which was further characterized by TEM, nano particle size and Zeta potential analyzer, XRD and EDS. The biosafety and cytotoxicity of ZCZTP were evaluated by CCK-8 method, and the ZCZTP uptake ability of 4T1 cells was analyzed by labeling with Rhodamine B (RhB) and confocal laser scanning microscopy (CLSM). The results indicated that ZCZTP exhibited a uniform particle size and a regular cubic morphology, with the CIP and TAX loaded on the inner and outer layers, respectively. Moreover, the ZCZTP showed a Zeta potential of (-13.23 ± 2.29) mV, a drug loading capacity for CIP and TAX of 4.28% and 8.57%, respectively, an encapsulation efficiency of 42.8% and 85.7%, respectively, and a cumulative drug release at 48 h (pH=6.5) of 46.0% and 61.1%, respectively. The release was pH responsive and could release more drugs under acidic conditions. ZCZTP also displayed good blood compatibility, with the Balb/c mouse blood hemolysis

收稿日期: 2024-09-19; 定用日期: 2024-11-04; DOI: 10.13550/j.jxhg.20240714

基金项目: 上海市科学技术委员会项目 (22520710400、21WZ2501300、20DZ2254900); 教育部生物医药纺织材料“111 项目” (B07024)

作者简介: 朱 威 (1998—), 男, 硕士生, E-mail: zhveir@qq.com. 联系人: 朱利民 (1960—), 男, 教授, E-mail: lzhu@dhu.edu.cn.

rate of ZCZTP with a mass concentration of 400 mg/L less than 5%. ZCZTP could enter 4T1 cells through endocytosis and accumulate in lysosomes. The survival rate of 4T1 cells treated by ZCZTP with a mass concentration 10 mg/L decreased by 62.49% compared with control group without addition of medicine.

Key words: metal organic frameworks; zeolite imidazole framework-8; partition drug loading; chemotherapy; synergistic therapy; bioengineering

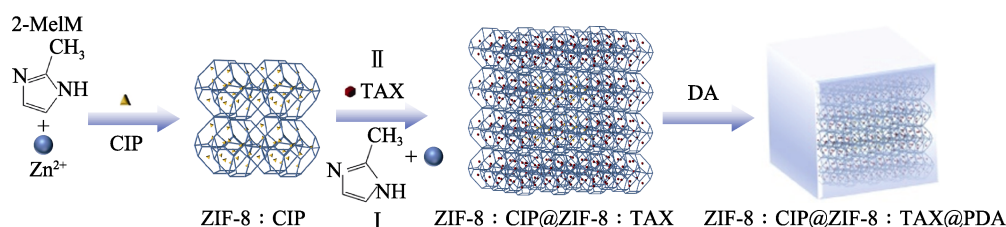
癌症是生物体的一种疾病状态, 其根源在于细胞的异常增殖, 最终导致肿瘤的形成^[1]。2005~2015年, 中国的甲状腺癌发病率呈现显著的上升趋势, 其死亡率也同步增加^[2]。传统的治疗方法, 如手术治疗^[3]、化疗^[4]、放疗^[5]等仍是目前癌症治疗的主要手段, 但其各自存在的局限性至今仍难以解决。近 20 年来, 纳米材料凭借其独特的物理和化学性质, 在癌症治疗领域展现出巨大的应用潜力^[6-7]。

金属有机框架 (MOFs) 是一类由金属核心 (如金属离子或簇) 和有机连接体 (如磺酸盐、磷酸盐、羧酸盐配体或其他带负电荷的配体) 配位的结晶多孔材料, 具有潜在的生物性, 如肿瘤部位富集、生物相容性、细胞毒性等, 在肿瘤治疗领域已经得到了广泛应用。相较于其他递送系统, 如 Au/Pt 纳米片、Cu/Fe 复合纳米颗粒、脂质体、细菌等, MOFs 广泛易得, 形态与孔径、孔径等控制简单, 便于改性, 适用面广泛^[8-13]。作为 MOFs 的一种, 由锌离子与 2-甲基咪唑 (2-MeIm) 配位形成的沸石咪唑骨架-8 (ZIF-8) 可以体现上述特点^[14]。ZIF-8 具有 pH 敏感性, 能够在肿瘤微环境中降解并精准释药, 是一种有效的药物递送制剂^[15-16]。

SONG 等^[17]以 ZIF-8 为分层支架包封辣根过氧化物酶 (HRP), 展示出超高的 HRP 负载效率和催化活性, 多孔 MOFs 支架为酶固定提供了更多空腔和底物扩散路径。XU 等^[18]构建了 ZIF-8 包封雷帕霉素并与阿霉素联合给药的平台 (Rapa@ZIF-8&Dox), 该平台具有更为显著的化学增敏效果。

ZHAO 等^[6]通过将银纳米簇和中草药包封在 ZIF-8 中, 设计了 pH 响应自组装纳米平台 (AgNC/TRG/ZIF-8), 该平台具有良好的生物相容性和 pH 响应降解性。然而, 通过增加 MOFs 中活性化合物的负载来提高化学动力治疗或化疗效果的研究尚未完善, 同时, 单一的疗法通常不能完全根除肿瘤。紫杉醇 (TAX) 是一种经典的抗癌药物, 其作用于微管, 可破坏微管蛋白与组成微管蛋白二聚体之间的动态平衡, 诱导并促进微管蛋白聚合, 防止其解聚, 稳定微管并抑制癌细胞的有丝分裂^[19]。环丙沙星 (CIP) 是合成的第三代喹诺酮类抗菌药物, 具备广谱抗菌活性, 其通过抑制 DNA 旋转酶、DNA 回旋酶和拓扑异构酶 IV 等关键酶的活性, 干扰蛋白质的合成, 从而发挥抗肿瘤作用^[20]。双药通过不同的途径干扰癌细胞的正常生长, 可有效提高对癌细胞的杀伤效果。

本文拟通过一锅法^[21]来制备内外层均为 ZIF-8 的纳米颗粒, 分别包封 CIP 和 TAX (如下所示), 考察双药化疗联合 ZIF-8 于肿瘤微环境受酸分解释放活性氧的化学动力治疗协同抗肿瘤的效果, 并进一步包覆聚多巴胺 (PDA)^[22-23], 以减少药物递送的损耗, 最终构建纳米给药平台 ZIF-8 : CIP@ZIF-8 : TAX@PDA, 希望分区载药可以降低化疗药之间的电荷影响以及减少在同一区域的载药挤占, 增加药物负载和释放量。以期通过增加 MOFs 中活性化合物的负载来提高化学动力或化疗效果的协同治疗研究提供参考。



1 实验部分

1.1 材料、试剂与仪器

RMPI 1640 培养基、DMEM 高糖培养基, 美国 Cytiva 公司; Tris-HCl 缓冲溶液, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH=7.4)、

青霉素-链霉素双抗溶液、胰蛋白酶 (含酚红)、4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 染液, 北京兰杰柯科技有限公司; 胎牛血清 (FBS), 美国 Sigma-Aldrich 公司; L929 细胞和 4T1 细胞, 赛百慷 (上海) 生物技术股份有限公司; 2-MeIm, AR, 上海吉至生化科技有限公司; Zn(NO₃)₂, AR, 上海易恩化学技术

有限公司; 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB)、盐酸多巴胺 (DA), AR, 阿拉丁试剂 (上海) 有限公司; 二甲基亚砜 (DMSO), AR, 上海凌峰化学试剂有限公司; 罗丹明 B (RhB), AR, 国药集团化学试剂有限公司; CIP, 北京百灵威科技有限公司; TAX, 大连美仑生物技术有限公司。

JEM-2100 型透射电子显微镜 (TEM), 日本电子株式会社; Zetasizer Nano ZS90 型纳米粒度及 Zeta 电位分析仪, 英国马尔文仪器有限公司; D8 Advance 型 X 射线衍射仪 (XRD), 德国 Bruker 公司; FV1000 型激光共聚焦扫描显微镜 (CLSM), 日本 Olympus 公司; SCQ-5201C1 型超声波清洗机, 上海声彦超声波仪器有限公司; FD-1D-50 型冷冻干燥机, 北京博医康实验仪器有限公司; UV3600 型紫外-可见分光光度计 (UV-Vis), 日本 Shimadzu 公司; ADR-1860 型激光器, 上海熙隆光电科技有限公司; Multiskan FC 酶标仪, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 制备方法

1.2.1 ZIF-8 包封 CIP 材料的制备

将 0.4 mg CTAB 分散到 2 mL 去离子水中; 随后, 将 115.0 mg 2-MeIm 加入到上述溶液中, 并添加 0.9 mg CIP; 将混合物在室温下以 300 r/min 的转速搅拌 2 min; 接着, 将 0.25 mL 质量浓度为 30 g/L 的 $Zn(NO_3)_2$ 水溶液迅速加入到上述体系, 并继续搅拌 5 min; 然后, 将混合溶液在室温下静置 3 h。完成静置后, 将反应产物进行离心洗涤, 每次以 16000 r/min 的转速离心 10 min, 共进行 3 次, 得到 8.9 mg ZIF-8 包封 CIP 材料, 经冷冻干燥 ($-45\text{ }^\circ\text{C}$, 48 h) 后为白色粉末, 无味, 记为 ZIF-8 : CIP。将其分散到 1 mL 去离子水中, 备用。

采用制备 ZIF-8 : CIP 的方法和步骤, 不加入 CIP, 得到的 ZIF-8 记为 ZIF-8¹。

采用制备 ZIF-8 : CIP 的方法和步骤, 将 CIP 调整为 ZIF-8¹, 得到 ZIF-8@ZIF-8, 记为 ZIF-8²。

1.2.2 ZIF-8 包封 CIP 和 TAX 材料的制备

将 10 mg ZIF-8 : CIP 分散在去离子水中, 加入 1 mg TAX, 室温缓慢搅拌 12 h。产物用去离子水离心洗涤 3 次, 得到 8.5 mg ZIF-8 包封 CIP 和 TAX 材料, 经冷冻干燥 ($-45\text{ }^\circ\text{C}$, 48 h) 后为白色粉末, 无味, 记为 ZIF-8 : CIP@ZIF-8 : TAX。

1.2.3 纳米给药平台的构建

将 10 mg ZIF-8 : CIP@ZIF-8 : TAX 分散在 10.5 mL 去离子水中, 并通过超声处理实现均匀分散; 接着, 向此分散液中添加 0.25 mL 质量浓度为 1.5 g/L DA 水溶液, 并搅拌 5 min; 随后, 向混合液中加入 8 mL 浓度为 10 mmol/L、pH 为 8.5 的 Tris-HCl 缓冲溶液, 并继续搅拌 2 h; 最后, 通过离

心 (13000 r/min, 15 min) 收集产物, 用去离子水洗涤 2~3 次, 得到 8.4 mg 沉淀为 ZIF-8 : CIP@ZIF-8 : TAX@PDA, 经冷冻干燥 ($-45\text{ }^\circ\text{C}$, 48 h) 后为深灰色粉末, 无味, 记为 ZCZTP。将 ZCZTP 重新分散在 1 mL PBS 中。将分散液进行冷冻干燥 ($-45\text{ }^\circ\text{C}$, 48 h), 备用。

采用制备 ZIF-8 : CIP@ZIF-8 : TAX@PDA 的方法和步骤, 将 ZIF-8 : CIP@ZIF-8 : TAX 调整为 ZIF-8², 得到 ZIF-8@ZIF-8@PDA, 记为 ZIF-8²@PDA。

1.3 表征方法与性能测试

1.3.1 表征方法

TEM 测试: 分别吸取质量浓度为 0.2 g/L 的 ZIF-8¹、ZIF-8² 乙醇溶液, 滴加到铜网上, 自然干燥至液滴消失后, TEM 观察样品形貌, 工作电压 5.0 kV。粒径和 Zeta 电位测定: 分别吸取经超声分散后质量浓度为 0.5 g/L 的 ZIF-8 : CIP 与 ZIF-8² 水溶液 2 mL, 转移到测试样品池中, 用纳米粒度及 Zeta 电位分析仪测定不同样品的粒径。分别吸取经超声分散后质量浓度为 0.5 g/L ZIF-8¹、ZIF-8²@PDA 与 ZIF-8 : CIP@ZIF-8 : TAX@PDA 水溶液 800 μL , 转移到测试样品池中, 用纳米粒度及 Zeta 电位分析仪测定不同样品的 Zeta 电位。XRD 测试: 取 200 mg ZIF-8¹, 使用 XRD 测试纳米材料的晶体结构, 靶材 Cu, 管电压 40 kV, 管电流 40 mA, K_α 射线波长 0.1541 nm, 扫描速率 8 ($^\circ$)/min, 扫描范围 $5^\circ\sim 40^\circ$ 。

1.3.2 CIP 和 TAX 负载量与累积药物释放率测定

首先, 用 PBS 分别配制质量浓度为 5、6、7、8、9、10 mg/L 的 CIP 的 PBS 溶液, 利用 UV-Vis 测定各溶液在波长 (λ) 430 nm 处的吸光度, 得到 CIP 的 PBS 溶液吸光度 (y)-质量浓度 (x , mg/L) 标准曲线方程 $y=0.083x-0.0001$ ($R^2=0.9973$)。随后, 将 ZCZTP 加入到 PBS 溶液中, 配制质量浓度为 1 g/L 的 ZCZTP 溶液, 利用 UV-Vis 测定其在 $\lambda=430\text{ nm}$ 的吸光度, 根据上述标准曲线方程, 计算 ZCZTP 中 CIP 的含量。

然后, 用无水乙醇配制质量浓度为 7、14、21、28、35 mg/L 的 TAX 乙醇溶液。利用 UV-Vis 测定各溶液在 $\lambda=230\text{ nm}$ 的吸光度, 得到 TAX 乙醇溶液吸光度 (y)-质量浓度 (x , mg/L) 标准曲线方程 $y=0.0086x-0.0029$ ($R^2=0.997$)。随后, 将 ZCZTP 加入到无水乙醇中, 配制质量浓度为 1 g/L 的 ZCZTP 溶液, 利用 UV-Vis 测定其在 $\lambda=230\text{ nm}$ 的吸光度, 根据上述标准曲线方程, 计算 ZCZTP 中 TAX 的含量。

最后, 根据式 (1) 和 (2) 计算 ZCZTP 的载药量 (LC, %) 和包封率 (EE, %):

$$LC/\% = \frac{m_0 - m_1}{m} \times 100 \quad (1)$$

$$EE / \% = \frac{m_0 - m_1}{m_0} \times 100 \quad (2)$$

式中: m_0 为 CIP 或 TAX 的初始投药量, g; m_1 为上清中 CIP 或 TAX 测定的剩余药量, g; m 为 ZCZTP 使用量, g。

配制 10 mL 质量浓度为 3 g/L 的 ZCZTP 溶液, 每隔一段时间, 均匀搅拌溶液后快速取 2 mL 药物释放溶液的上清液, 检测其吸光度, 之后倒回原溶液。将吸光度代入环丙沙星与紫杉醇的标准曲线方程, 按照式 (3) 计算累积药物释放量 (%):

$$\text{药物累积释放量} / \% = (\rho_{\text{上清}} / \rho_{\text{原溶液}}) \times 100 \quad (3)$$

式中: $\rho_{\text{上清}}$ 为不同时间时双药各自在上清液中的质量浓度, g/L; $\rho_{\text{原溶液}}$ 为加入 ZCZTP 的等效双药质量浓度, g/L。

1.4 生物安全性测试

以 L929 细胞为实验对象, 使用 CCK-8 法测定并评估细胞的存活情况。

首先, 以 1×10^5 个/cm² 的细胞密度, 将 L929 细胞接种于 96 孔透明细胞培养板中。随后, 使用含有双抗 (培养基体积分数 1%, 青霉素 100 U/mL 和链霉素质量浓度 100 g/L) 和 FBS (培养基体积分数 10%) 的 DMEM 高糖培养基, 在 37 °C、CO₂ 体积分数 5% 的培养箱中恒温培养上述细胞 24 h。接着, 向每孔中加入不同质量浓度 (0、2、4、6、8、10 mg/L) 的 ZIF-8²@PDA 悬液, 并继续培养 24 h。将 96 孔透明细胞培养板含有细胞的孔用 PBS 轻柔冲洗 3 次后, 加入适量 CCK-8 试剂盒试剂, 在 37 °C、CO₂ 体积分数 5% 的培养箱中恒温染色 1 h, 期间保持避光。最后, 使用酶标仪测量并记录 $\lambda=450$ nm 处的吸光度。

根据式 (4) 计算细胞存活率 (CS, %):

$$CS / \% = (OD_i - OD_b) / (OD_c - OD_b) \times 100 \quad (4)$$

式中: OD_i 、 OD_b 和 OD_c 分别为实验组、空白组和对照组的吸光度。

1.5 体外细胞毒性测试

以 4T1 细胞为实验对象, 使用 CCK-8 法测定并评估细胞的存活情况。

首先, 将 4T1 细胞以 1×10^5 个/cm² 的细胞密度接种在 96 孔透明细胞培养板中。随后, 使用含有双抗 (培养基体积分数 1%, 青霉素 100 U/mL 和链霉素质量浓度 100 g/L) 和 FBS (培养基体积分数 10%) 的 DMEM 高糖培养基, 在 37 °C、CO₂ 体积分数 5% 的培养箱中恒温培养上述细胞 24 h。接着, 向培养板中分别加入不同质量浓度 (0、2、4、6、8、10 mg/L) 的 ZIF-8²@PDA、ZIF-8 : CIP@ZIF-8 : TAX@PDA、CIP 悬浮液和 TAX 悬浮液, 其中, CIP 悬浮液和 TAX 悬浮液的药物含量与 ZCZTP 的载药

率相等。继续孵育细胞 24 h 后, 将 96 孔透明细胞培养板含有细胞的孔用 PBS 轻柔冲洗 3 次后, 加入适量配制好的 MTT 检测试剂 (使用 MTT 与不含血清的 DMEM 配制), 在 37 °C、CO₂ 体积分数 5% 的培养箱中恒温染色 1 h, 期间保持避光。然后, 吸除染液并用 PBS 缓缓冲洗 2 次, 在每孔加入 DMSO 100 μ L 避光置于摇床 (240 r/min) 20 min。最后, 使用酶标仪测量并记录 $\lambda=570$ nm 处的吸光度。

根据式 (5) 计算细胞存活率 (CS', %):

$$CS' / \% = (OD_i' - OD_b') / (OD_c' - OD_b') \times 100 \quad (5)$$

式中: OD_i' 、 OD_b' 和 OD_c' 分别为实验组、空白组和对照组的吸光度。

1.6 体外细胞摄取

制备带有 RhB 标记的 ZIF-8²@PDA。将 2 mL 质量浓度为 3 g/L 的 ZIF-8²@PDA 悬液与 6 mg RhB 在搅拌下混合, 搅拌 12 h 后, 离心并用去离子水洗涤 3 次, 随后冷冻干燥 (-45 °C, 48 h) 得到 RhB 标记的 ZIF-8²@PDA 粉末 (ZIF-8²@PDA-RhB)。之后, 用 1640 完全培养基将 ZIF-8²@PDA-RhB 配制成质量浓度为 1 g/L 的悬液备用。

将 4T1 细胞以 1×10^5 个/cm² 的细胞密度接种于共聚焦培养皿中, 并在 37 °C、CO₂ 体积分数 5% 的培养箱中培养 24 h。然后, 去除原培养基, 用 PBS 洗涤细胞 2 次, 再加入含有 PBS、RhB 和 ZIF-8²@PDA-RhB 的培养基继续孵育细胞 12 h。孵育结束后, 再次去除原培养基, 用 PBS 洗涤细胞 3 次。随后, 加入 1 mL 质量分数为 4% 的多聚甲醛溶液固定细胞 15 min, 吸除固定液后, 再次用 PBS 洗涤细胞 3 次。在避光环境下, 使用 500 μ L 的 DAPI 染色液对细胞进行 3 min 的染色, 然后用 PBS 洗涤 3 次。最后, 通过 CLSM 拍摄并记录细胞摄取纳米材料的图像。

1.7 溶血率测试

配制不同质量浓度的 ZIF-8 : CIP@ZIF : TAX@PDA PBS 溶液 (25、50、100、200、400 g/L)。在 1.5 mL 离心管中加入 1 mL ZIF-8 : CIP@ZIF : TAX@PDA 溶液及 20 μ L 红细胞 (取 Balb/c 小鼠血 3000 r/min 离心 3 min 的沉淀), 吹打后 4 °C 静置 45 min。静置后离心 (3000 r/min) 3 min, 将红细胞与上清液分离。最后取上清液 200 μ L 加入 96 孔板使用酶标仪测吸光度 ($\lambda=540$ nm)。

除了实验组, 同时设有阴性 (红细胞+PBS) 与阳性 (红细胞+H₂O) 对照组。

根据式 (6) 计算细胞的溶血率 (HR, %):

$$HR / \% = (OD_i'' - OD_{NC}) / (OD_{BC} - OD_{NC}) \times 100 \quad (6)$$

式中: OD_i'' 、 OD_{NC} 和 OD_{BC} 分别为实验组、阴性对

照组和阳性对照组的吸光度。

1.8 活性氧检测

配制质量浓度为 3 g/L 的 ZIF-8²@PDA 溶液，使用稀盐酸调节溶液 pH=6.5。再加入指示剂亚甲基蓝 (MB)，质量浓度为 2 mg/L，随后混匀，继续静置 24 h。分别在第 2、4、6、8、10、12、24 h 时记录溶液波长在 664 nm 的吸光度和褪色照片。

2 结果与讨论

2.1 表面形貌分析

图 1 为 ZIF-8¹、ZIF-8² 和 ZIF-8²@PDA 的 TEM 图。

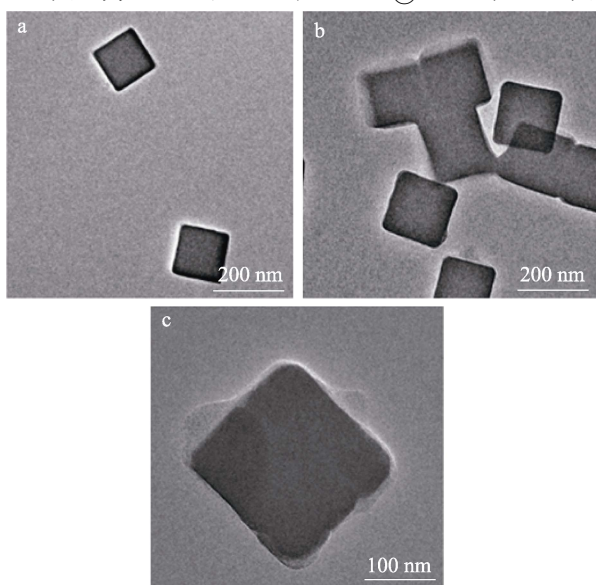


图 1 ZIF-8¹ (a)、ZIF-8² (b)、ZIF-8²@PDA (c) 的 TEM 图

Fig. 1 TEM images of ZIF-8¹ (a), ZIF-8² (b), ZIF-8²@PDA (c)

从图 1 可以看出，ZIF-8¹ 和 ZIF-8² 的大小和形态均保持高度一致，呈现规则的立方体形状。ZIF-8² 的粒径相较于 ZIF-8¹ 有所增加，这是因为，ZIF-8¹ 通过二次反应，于原位增长第二层 ZIF-8。经 PDA 包覆后，ZIF-8²@PDA 表面可见一层明显薄膜。

图 2 为 ZIF-8¹ 和 ZIF-8²@PDA 在水中分散的照片。

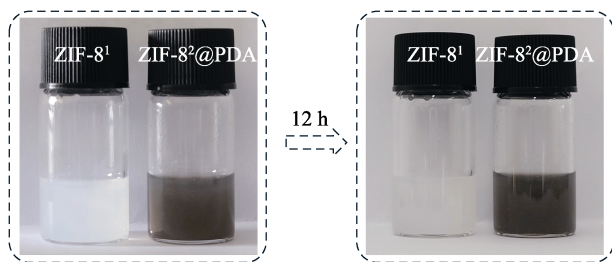


图 2 ZIF-8¹ 和 ZIF-8²@PDA 在水中分散的照片

Fig. 2 Photos of ZIF-8¹ and ZIF-8²@PDA dispersed in water

从图 2 可以看出，经过 12 h 的静置，ZIF-8¹ 和 ZIF-8²@PDA 的水悬浊液均未出现明显的聚集现象，表明两者具备良好的分散性与稳定性。

2.2 粒径与电势分析

图 3 为 ZIF-8¹:CIP 和 ZIF-8² 的粒径分布图，以及 ZIF-8¹、ZIF-8²@PDA 和 ZIF-8:CIP@ZIF-8:TAX@PDA 的 Zeta 电位。

从图 3a 可以看出，ZIF-8¹:CIP 和 ZIF-8² 的平均粒径分别约为 92.8 和 169.1 nm。从图 3b 可以看出，ZIF-8¹、ZIF-8²@PDA 和 ZIF-8:CIP@ZIF-8:TAX@PDA 的 Zeta 电位分别为 (40.32±1.66)、(-8.10±0.47) 和 (-13.23±2.29) mV。双药 (CIP 和 TAX) 负载使 ZIF-8¹ 的 Zeta 电位降低，从正值变为负值，而包覆 PDA 后 Zeta 电位进一步降低。结果证实，双药已成功负载在纳米平台上，并由 PDA 成功包覆。

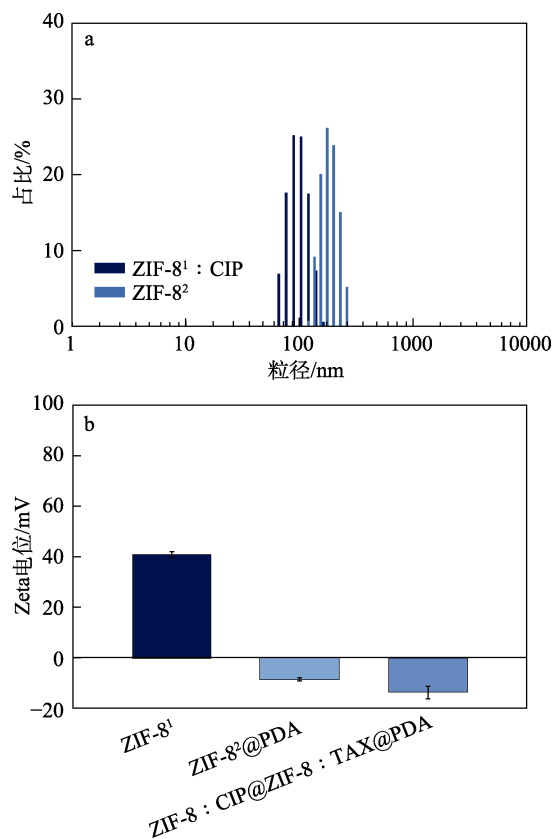


图 3 ZIF-8¹:CIP 和 ZIF-8² 的粒径分布图 (a); ZIF-8¹、ZIF-8²@PDA 和 ZIF-8:CIP@ZIF-8:TAX@PDA 的 Zeta 电位 (b)

Fig. 3 Particle size distribution diagram of ZIF-8¹:CIP and ZIF-8² (a); Zeta potential of ZIF-8¹, ZIF-8²@PDA and ZIF-8:CIP@ZIF-8:TAX@PDA (b)

2.3 XRD 分析

图 4 为 ZIF-8¹ 与 ZIF-8 晶体结构模拟^[24]的 XRD 谱图。

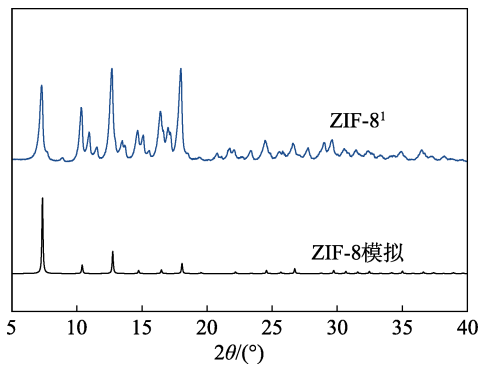


图 4 ZIF-8¹ 与已发表的 ZIF-8 晶体结构模拟的 XRD 谱图

Fig. 4 XRD patterns of ZIF-8 and published ZIF-8 crystal structure simulation

从图 4 可以看出, ZIF-8¹ 的衍射峰与标准拟合图相比无明显偏移, 表明 ZIF-8¹ 成功制备。

2.4 元素映射分布分析

图 5 为 ZIF-8 : CIP@ZIF-8 : TAX 的元素分布图。

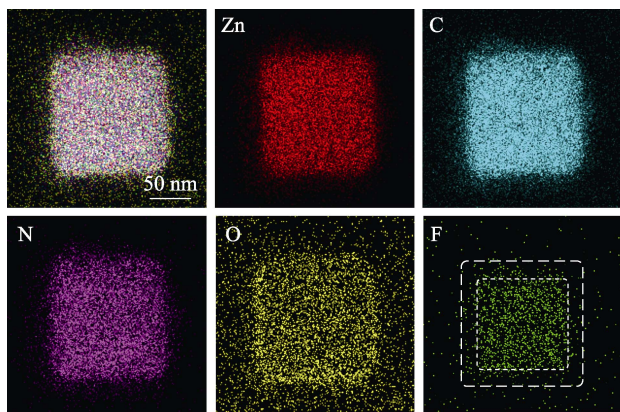


图 5 ZIF-8 : CIP@ZIF-8 : TAX 的元素分布图

Fig. 5 Element distribution images of ZIF-8 : CIP@ZIF-8 : TAX

从图 5 可以看出, ZIF-8 : CIP@ZIF-8 : TAX 包括 Zn、C、N、O、F 5 种元素, 且在粒子内分布均匀。CIP (C₁₇H₁₈FN₃O₃) 的特征元素 F 集中分布在 ZIF-8 内层。相对地, 因外层对 TAX (C₄₇H₅₁NO₁₄) 的负载, O 元素在外层含量显著高于内层。结果证实, ZIF-8 内外层对 CIP 和 TAX 负载成功。

2.5 药物负载与释放分析

经式 (1) 和 (2) 计算, CIP 和 TAX 的载药量分别为 4.28% 和 8.57%, 包封率分别为 42.8% 和 85.7%。

图 6 为 CIP 和 TAX 在不同 pH 下随着时间的药物释放量。

从图 6 可以看出, 在中性 (pH=7.4) 和酸性 (pH=6.5) 条件下, CIP 和 TAX 随着时间的增加, 药物累积释放量呈现相同的趋势, 先为较快的突释过程, 继而逐步转为平稳期。CIP 和 TAX 的 48 h (pH=6.5) 的药物累积释放量分别为 46.0% 与

61.1%。TAX 较 CIP 释放更快, 可能是因为, TAX 被包裹在外层, 更易被酸性环境腐蚀而释放。

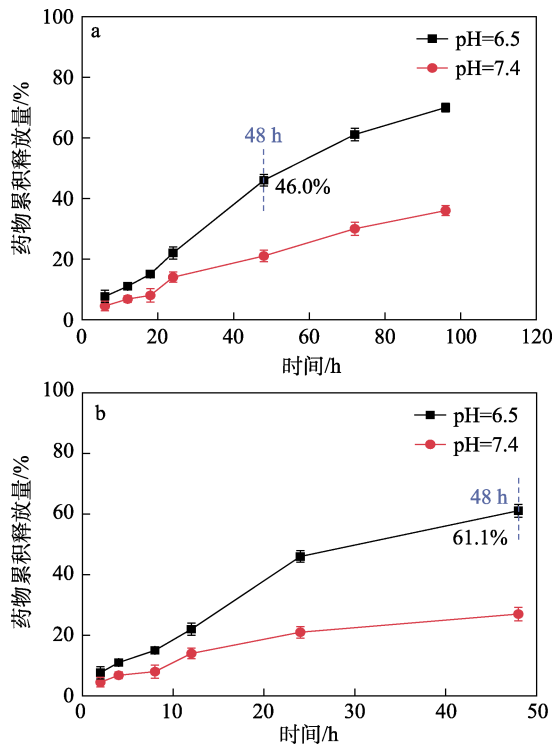


图 6 CIP (a) 和 TAX (b) 在不同 pH 条件下的药物累积释放量

Fig. 6 CIP (a) and TAX (b) accumulated drug releases at different pH conditions

在中性 (pH=7.4) 条件下, CIP 和 TAX 的药物累积释放量约为酸性 (pH=6.5) 条件下的一半, 说明双药释放具有 pH 响应性, 在酸性条件下可以释放更多药物。

2.6 pH 响应能力与体外活性氧分析

图 7 为 ZIF-8²@PDA 在降解过程中的 UV-Vis 吸收光谱。

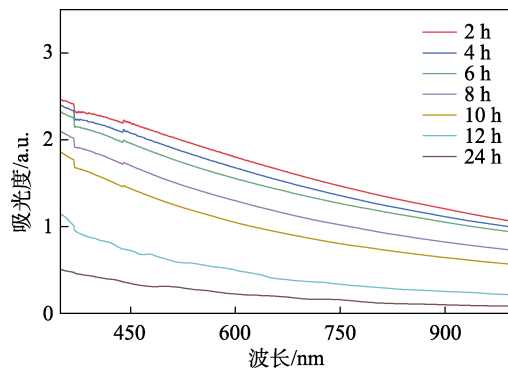


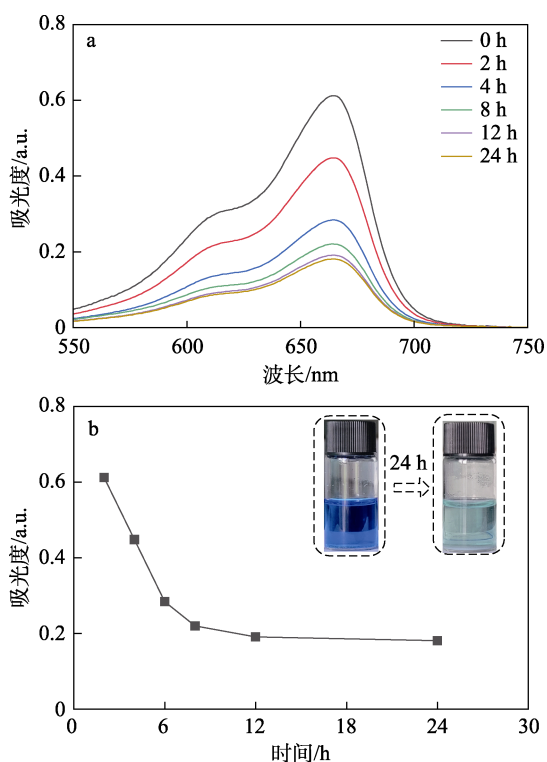
图 7 ZIF-8²@PDA 在降解过程中的 UV-Vis 吸收光谱
Fig. 7 UV-Vis absorption spectra of ZIF-8²@PDA during degradation

从图 7 可以看出, 在 pH=6.5 的微酸性环境下

(PBS 中), ZIF-8²@PDA 在前 8 h 内有较大的降解速率, 而后降解速率逐步减缓, 表明 ZIF-8²@PDA 具有 pH 响应能力。

图 8 为亚甲基蓝 (MB) 测试 ZIF-8²@PDA 的活性氧 (ROS) 产生能力结果。

从图 8 可以看出, MB 溶液的吸光度随着放置时间的延长逐渐降低 (图 8a)。MB 经过 24 h 的静置, 原本饱和蓝色的液体明显褪色至淡蓝色, 溶液在最大吸收波长 (675 nm) 处的吸光度下降 (图 8b), 这是因为, MB 被 ZIF-8 降解后产生的 ROS 氧化的结果。表明在微酸性 (pH=6.5) 环境下, ZIF-8²@PDA 的水溶液能够因为其降解产生 ROS^[25]。



内插图为 MB 静置 24 h 后的褪色照片

图 8 ZIF-8²@PDA 作用下, MB 溶液的 UV-Vis 吸收光谱 (a) 及 675 nm 处吸光度随着时间的变化 (b)

Fig. 8 Under the action of ZIF-8²@PDA, UV-Vis absorption spectra of MB solution (a) and absorbance at 675 nm changes over time (b)

2.7 体外细胞实验分析

图 9 为生物安全性测试结果。

从图 9 可以看出, 随着 ZIF-8²@PDA 质量浓度的增加, L929 细胞的细胞存活率逐渐降低, 表明其对正常细胞的毒性具有质量浓度依赖性。当 ZIF-8²@PDA 质量浓度为 10 mg/L 时, L929 细胞的细胞存活率为 88.58%, 表明 ZIF-8²@PDA 对 L929 细胞仅有轻微的细胞毒性, 表现出一定的生物安全性。

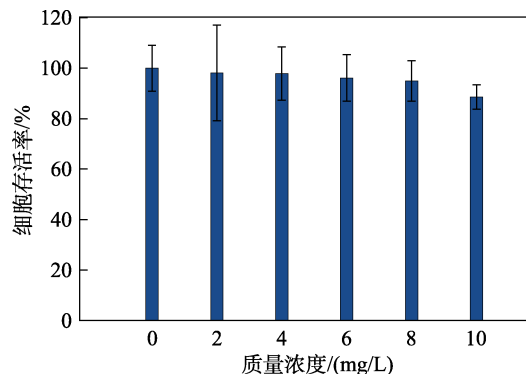
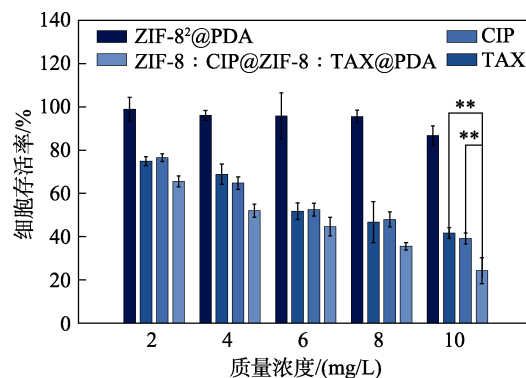


图 9 ZIF-8²@PDA 质量浓度对 L929 细胞存活率的影响
Fig. 9 Effect of ZIF-8²@PDA concentration on survival rate of L929 cells

图 10 为 MTT 法对 4T1 细胞进行细胞毒性评价结果。



**表示显著性差异 ($P < 0.01$), 下同

图 10 MTT 法对 4T1 细胞进行细胞毒性评价结果
Fig. 10 Cytotoxicity of 4T1 cells evaluated by MTT assay

从图 10 可以看出, ZIF-8²@PDA、ZIF-8 : CIP@ZIF-8 : TAX@PDA、CIP、TAX 对 4T1 的体外细胞毒性均随着质量浓度的提高而增加, 呈现一定的质量浓度依赖性。不同质量浓度 (2~10 mg/L) 的 ZIF-8²@PDA 对 4T1 的影响保持在合理区间, 4T1 的细胞存活率为 86.7%~96.8%; 与无药物添加的对照组相比, 经 10 mg/L 的 CIP 和 TAX 处理后 4T1 的细胞存活率分别下降 47.60%、39.15%; 经 10 mg/L 的 ZIF-8 : CIP@ZIF-8 : TAX@PDA 处理后下降 62.49%。并且, 使用单化疗药 (CIP 或 TAX) 与使用纳米平台 (ZIF-8 : CIP@ZIF-8 : TAX@PDA) 处理之间均存在显著性差异 ($P < 0.01$), 证明载体负载双药有效。

图 11 为 CLSM 检测的 4T1 细胞对给药平台的摄取情况评估结果。蓝色荧光代表经 DAPI 染色的细胞核, 而红色荧光则源于 RhB 及其标记的纳米颗粒^[26]。

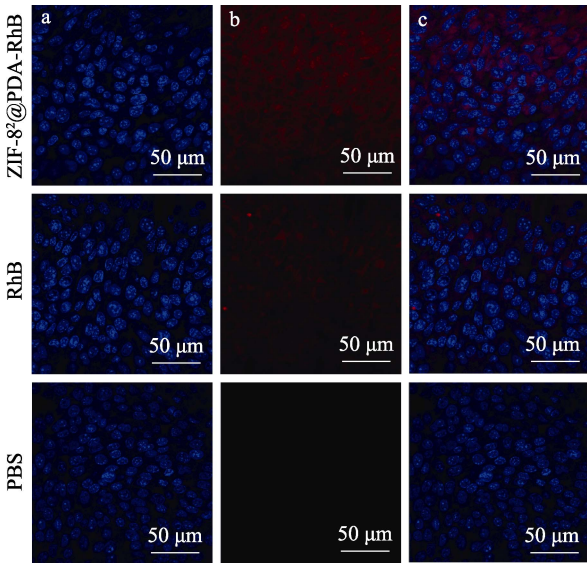


图 11 ZIF-8²@PDA-RhB 的 DAPI 染色的细胞核 (a) 与 ZIF-8²@PDA-RhB 的 DAPI 红色荧光 (b); 两图叠加 (c)

Fig. 11 ZIF-8²@PDA-RhB's DAPI stained nuclei (a) and ZIF-8²@PDA-RhB's DAPI red fluorescence (b); Superposition of two figures (c)

从图 11 的 4T1 细胞内 RhB 的荧光强度变化可以看出, 经过 12 h 孵育后, 4T1 细胞中的纳米颗粒组红色荧光显著强于游离 RhB 组, 证明纳米颗粒能有效被 4T1 细胞摄取。可能的途径为, ZIF-8²@PDA-RhB 纳米颗粒通过内吞作用进入细胞, 并在溶酶体中积累。当溶酶体破裂时, RhB 被释放到细胞质中, 进而显现出明显的红色荧光^[27]。

图 12 为 ZIF-8 : CIP@ZIF-8 : TAX@PDA 对 Balb/c 小鼠血的溶血率测定结果。

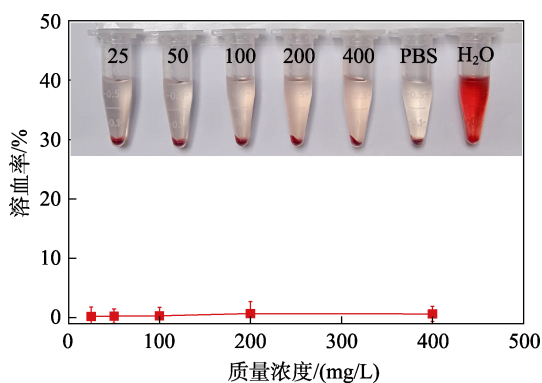


插图 为静置并离心后的红细胞照片, 数字代表 ZIF-8 : CIP@ZIF-8 : TAX@PDA 的质量浓度

图 12 ZIF-8 : CIP@ZIF-8 : TAX@PDA 对 Balb/c 小鼠血的溶血率

Fig. 12 Hemolysis rate of Balb/c mouse blood by ZIF-8 : CIP@ZIF-8 : TAX@PDA

从图 12 可以看出, 在经过 1 h 静置并重新离心后, 红细胞照片和相对应的溶血率显示, 最高质量

浓度为 400 g/L 的 ZIF-8 : CIP@ZIF-8 : TAX@PDA 对 Balb/c 小鼠血的溶血率 < 5%, 表明此给药平台具有良好的血液相容性。

3 结论

采用两步法制备的双层 ZIF-8 (ZIF-8 : CIP@ZIF-8 : TAX@PDA) 纳米给药平台, 成功负载了 CIP 与 TAX 两种药物。

(1) ZIF-8 : CIP@ZIF-8 : TAX@PDA 展现出极为均一的形态和粒径, 且具有良好的分散性, Zeta 电位为 (-13.23 ± 2.29) mV。

(2) ZIF-8 : CIP@ZIF-8 : TAX@PDA 的 CIP 和 TAX 的载药量分别为 4.28% 和 8.57%, 包封率分别为 42.8% 和 85.7%。

(3) ZIF-8 : CIP@ZIF-8 : TAX@PDA 的 CIP 和 TAX 的 48 h (pH=6.5) 的药物累积释放量分别为 46.0% 与 61.1%。被包覆在外层的 TAX 更易被酸性环境腐蚀而释放。双药释放具有 pH 响应性, 在酸性条件下可以释放更多药物。

(4) ZIF-8 : CIP@ZIF-8 : TAX@PDA 具有良好的生物安全性与血液相容性, 质量浓度为 400 g/L 的 ZIF-8 : CIP@ZIF-8 : TAX@PDA 对 Balb/c 小鼠血的溶血率 < 5%; ZIF-8 : CIP@ZIF-8 : TAX@PDA 可以通过内吞作用进入 4T1 细胞并在溶酶体中积累, 经质量浓度为 10 mg/L 的 ZIF-8 : CIP@ZIF-8 : TAX@PDA 处理后的 4T1 细胞存活率比无药物添加的对照组下降 62.49%。

本文制备的 ZIF-8 : CIP@ZIF-8 : TAX@PDA 纳米给药平台的合成方法简单, 可以为后续进一步双药联合多种疗法治疗肿瘤提供依据, 具备一定的应用潜力。

参考文献:

- [1] YADAV P, JAIN J, SHERJE A P. Recent advances in nanocarriers-based drug delivery for cancer therapeutics: A review[J]. *Reactive and Functional Polymers*, 2021, 165: 104970.
- [2] WANG J Y, YU F F, SHANG Y N, *et al.* Thyroid cancer: Incidence and mortality trends in China, 2005-2015[J]. *Endocrine*, 2020, 68(1): 163-173.
- [3] CONNOLLY C K, VAN SCHIL P E Y, MILROY R, *et al.* The approach to the surgical management of cancer in four European countries[J]. *European Respiratory Journal*, 2003, 22(5): 838-844.
- [4] NANGIA J, WANG T, OSBORNE C, *et al.* Effect of a scalp cooling device on alopecia in women undergoing chemotherapy for breast cancer[J]. *JAMA*, 2017, 317(6): 209839.
- [5] LUO H F, MA W, CHEN Q, *et al.* Radiotherapy-activated tumor immune microenvironment: Realizing radiotherapy-immunity combination therapy strategies[J]. *Nano Today*, 2023, 53: 102042.
- [6] ZHAO B, GUO W F, ZHOU X M, *et al.* Ferroptosis-mediated synergistic therapy of hypertrophic scarring based on metal-organic framework microneedle patch[J]. *Advanced Functional Materials*, 2023, 33(27): 2300575.

(下转第 2207 页)