

荔枝状 $\text{CaCO}_3@ \text{HA}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性介孔多级微球的制备

肖文谦, 张 静, 李克江, 邹新宇, 蔡昱东, 李 波, 刘 雪, 廖晓玲

(重庆科技学院 纳微复合材料与器件重庆市重点实验室, 重庆 401331)

摘 要: 为了克服常规的生物陶瓷微球缺乏靶向功能的缺点, 本研究制备了内核为 CaCO_3 , 外壳为磁性可控羟基磷灰石(HA)的新型荔枝状多孔微球。结果表明: 抗肿瘤药物阿霉素(DOX)能有效地负载于磁性 HA 微球上, 并具备磁性靶向功能。此外, HA 外壳具有良好的生物相容性和 pH 响应特性, 可在模拟酸性肿瘤细胞环境中控制 DOX 的释放, 有效杀死肿瘤细胞, 并在模拟正常细胞培养环境中减少对正常细胞的毒副作用。这种新型的微球材料具有超顺磁性能, 且微结构可控, 是一种智能化药物控释微球载体, 可以灵敏地释放 DOX, 从而有效地实现抗肿瘤活性。

关 键 词: 核壳结构; 微球; 羟基磷灰石; DOX

中图分类号: TQ174 文献标识码: A

Litchi-like Superparamagnetic Hydroxyapatite Microspheres with Hierarchically Mesoporous Microspheres

XIAO Wen-Qian, ZHANG Jing, LI Ke-Jiang, ZOU Xin-Yu, CAI Yu-Dong, LI Bo, LIU Xue, LIAO Xiao-Ling

(Chongqing Key Laboratory of Nano/Micro Composite Materials and Devices, Chongqing University of Science and Technology, Chongqing 401331, China)

Abstract: Due to the fact that the conventional bioceramic microspheres lack target function, novel litchi-like porous microspheres composed of a core of CaCO_3 and a tunable magnetic-hydroxyapatite (HA) shell were successfully prepared in this study. Antitumor drug, doxorubicin (DOX), was effectively loaded on the HA microspheres which possess magnetic targeting function. In addition, the HA shell, which had favorable biocompatibility and pH response characteristics, could be used to control release of loaded DOX from the litchi-like superparamagnetic microspheres in a simulated acidic tumor cell environment, effectively killing tumor cells and reducing toxic side effects to normal cells. The smart design presented in this study, which incorporates a tunable superparamagnetic shell and a controlled architecture, allows the sensitive release of drugs for efficient antitumor activity.

Key words: core-shell; microspheres; hydroxyapatite; DOX

目前, 具有尺寸、形状和结构可控的功能性微球的制备因其特殊的科学意义和广泛的技术应用, 具有重要意义^[1-3]。另外, 超顺磁性材料因其独特的

磁性特征以及在生物医学中的重要应用, 在过去的几十年中引起了广泛关注^[4]。尤其是超顺磁性纳米材料已被广泛研究用于药物输送、生物分离和分子

收稿日期: 2018-10-18; 收到修改稿日期: 2018-12-24

基金项目: 国家自然科学基金(11532004, 51603026); 重庆市高校创新团队项目(CXTDX201601032); 重庆市基础科学与前沿技术研究项目(CSTC 2016jcyjA0541, CSTC 2018jcyjAX0711, CSTC2015JCYJBX0003); 重庆市教委科学技术研究项目(KJ1601301)

National Natural Science Foundation of China (11532004, 51603026); Chongqing University Innovation Team Project (CXTDX201601032); Chongqing Research Program of Basic Research and Frontier Technology (CSTC 2016jcyjA0541, CSTC2018jcyjAX0711, CSTC2015JCYJBX0003); Chongqing Municipal Education Commission Science and Technology Research Project (KJ1601301)

作者简介: 肖文谦(1982-), 男, 博士, 讲师. E-mail: wxqiao@cqust.edu.cn

通讯作者: 李 波, 教授. E-mail: Libo@cqust.edu.cn; 刘 雪, 讲师. E-mail: Liuxue@cqust.edu.cn

诊断^[5-7]。在各种磁性纳米材料中,几种类型比如 Fe_3O_4 和 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 超顺磁性氧化铁,由于其在生理条件下良好的生物相容性和稳定性,被认为是具有特殊医学用途的理想材料^[8]。为了扩展其生物医学功能,将多种药物如消炎类药物、抗肿瘤药物及生长因子等与超顺磁性氧化铁相结合,构建的药物载体能够实现长时间的局部药物输送。

目前,通常有两种方法可用于制备氧化铁基超顺磁性介孔生物材料。一种是制备纯氧化铁介孔/空心微球,然而其低比表面积和较小的孔体积极大地限制了它们作为功能性多孔材料的应用。此外,纯氧化铁材料在生物系统中易于团聚和快速生物降解^[9-10]。为了克服这些缺点,近几年发展了另一种基于氧化铁基质的复合材料,如将二氧化硅、钙磷陶瓷和高分子聚合物与氧化铁相结合^[11-13]。在这些基质材料中,钙磷陶瓷由于无毒性,孔径可调、高的比表面积和孔体积而被认为是与氧化铁相结合并拓宽其生物应用的理想材料^[14]。

羟基磷灰石($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HA)是一种典型的钙磷陶瓷,是自然骨的主要无机成分,多孔HA生物陶瓷已被广泛用于骨组织工程和药物输送领域^[15-17]。然而,传统HA药物载体没有靶向运输功能,这影响了它们在局部药物递送中的应用^[18-19]。最近,通过共沉淀法^[20]、模板法^[21]、生物矿化涂层^[22]、浸涂法^[23]、乳化法^[24]、超声波喷涂热解法^[25]和超声波混合法^[26]等,研究者们深入研究了将 Fe_3O_4 掺入HA从而得到HA/ Fe_3O_4 的磁性复合微球。所获得的磁性HA微球具有多种功能,如靶向给药、磁性运输和癌症热疗^[18]、新型磁导组织再生^[27]、可重复使用的生物传感器^[28]和磁性可回收/可恢复的催化剂和吸附剂^[29]等。然而,这些HA/ Fe_3O_4 复合材料大都属于微观结构不可控的粉末或块体材料,相比于超微结构可控的微球而言,这限制了它们作为可注射骨再生生物材料和细胞/药物负载等方面的应用。而具有核-壳结构的超顺磁性HA/ Fe_3O_4 微球,由于其核壳双相成分,具有独特的物理、化学和生物学性质,在众多功能材料中脱颖而出,具有广泛的潜在应用。纯HA具有降解性较慢的缺点,而纯的 CaCO_3 则降解较快,制备HA与 CaCO_3 的双相复合陶瓷则可以综合二者的优点。但是,精确合成同时具有核-壳分级双相结构和多功能的超顺磁性HA/ Fe_3O_4 微球仍然面临着很大的挑战。因此,寻找更加简便和有效的方法以用于控制超顺磁性HA/ Fe_3O_4 微球的形态、结构和功能,在生物医学领域引起了极大的关注。

本研究通过水热法合成了具有新型荔枝状结构

且超顺磁性可调的HA微球。将 Fe_3O_4 微球通过共沉淀的形式掺入 CaCO_3 微球中,作为反应的前驱体模板,在 Na_2HPO_4 溶液中进行水热反应,控制水热反应时间从而成功制备了以 CaCO_3 为内核、HA/ Fe_3O_4 为外壳的新型荔枝状超顺磁性可控的复合陶瓷微球,并评估了它们的药物装载能力和pH响应特性,以及体外抗肿瘤细胞特性等性质。

1 实验方法

1.1 药品与试剂

阿霉素(DOX)购自阿拉丁试剂公司,聚苯乙烯磺酸钠(PSS)购自麦克林公司,氯化钙(99%)、碳酸钠(98%)、磷酸氢二钠(Na_2HPO_4 , 99%)、六水三氯化铁($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 99%)、柠檬酸三钠(99%),乙酸钠(99%)、乙二醇(99%)、氢氧化钠(99%)、盐酸、乙醇 $\geq 99\%$ 、磷酸盐缓冲盐水($\text{pH}=(3.4\pm 0.1)$ 、 (5.7 ± 0.1) 、 (7.4 ± 0.1)),均购自成都科龙化学试剂公司,分析纯;实验室自制去离子水。

1.2 荔枝状 $\text{CaCO}_3@ \text{HA}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微球的制备

采用 $\text{CaCO}_3/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微球作为硬模板,通过水热法制得荔枝状超顺磁 $\text{CaCO}_3@ \text{HA}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微球。以六水三氯化铁为主要原料合成的 Fe_3O_4 微球,参考之前的报道^[30],通过溶剂热法制备得到的黑色 Fe_3O_4 微球。制备步骤如下:1.35 g 六水三氯化铁和0.05 g 柠檬酸三钠溶解在40 mL 乙二醇中,然后加入3.6 g 醋酸钠再连续搅拌直到完全溶解。该溶液被转移到50 mL 聚四氟乙烯衬里高压釜,密封并保持在200 °C反应15 h,然后冷却到室温。所得的黑色沉淀采用磁铁收集,使用去离子水和无水乙醇分别清洗3次,然后用真空干燥箱在60 °C下6 h处理得到 Fe_3O_4 微球。

在磁力搅拌条件下,将10 mL 0.2 mol/L 的 CaCl_2 溶液滴入100 mL 2 mg/mL 的PSS,得到混合溶液。同时配制四组相同的溶液,依次加入 CaCO_3 理论生成含量为0、25wt%、33wt%、50wt%的 Fe_3O_4 微球,超声处理约30 min。依次向溶液中逐滴加入10 mL 0.2 mol/L 的 Na_2CO_3 溶液,迅速搅拌。离心收集沉淀(5000 r/min, 5 min),分别用去离子水和无水乙醇洗涤三次,得到 $\text{CaCO}_3/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微球沉淀,60 °C真空干燥24 h,保存在离心管中备用。

将约100 mg干燥后的 $\text{CaCO}_3/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 前驱体模板加入到50 mL 0.1 mol/L 的磷酸氢二钠溶液中,用0.5 mol/L 氢氧化钠溶液调节该混合溶液的pH至11.0,精确控制在120 °C条件下水热反应1 h,随后离心收集,使用无水乙醇和去离子水各洗涤三次,

取其沉淀物, 在 -80°C 下预冻 12 h, 经预冻后将其放在 -60°C 冷冻干燥机中干燥 24 h, 即制备得到不同结构的荔枝状超顺磁性 $\text{CaCO}_3@/\text{HA}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微球。所制备的 $\text{CaCO}_3@/\text{HA}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微球其 Fe_3O_4 理论含量为 0、25wt%、33wt%、50wt%, 分别记为 S0、S1、S2 和 S3。

1.3 表征

利用场发射扫描电镜(FSEM, JSM-7800, 日本电子)在 5 kV 的加速电压和工作距离约 10 mm 的条件下观察微球的微观结构, 使用 Image-Pro Plus 6.0 计算 SEM 图像上的微球尺寸分布, 同时利用 EDS 考察微球核壳化学成分组成。利用 X 射线衍射仪(XRD, smartLab-9, 日本理学)考察样品的相组成, 2θ 扫描范围: $20^\circ\sim 80^\circ$, 扫描速率为 $2^\circ/\text{min}$ 。采用氮气等温吸附测定微球的比表面积与微孔分布(Quantachrome, USA)。通过综合物性测量系统(Physical Property Measurement System, PPMS)在 300 K 下表征样品的磁性。

1.4 微球的 DOX 吸附与释放实验

选取 DOX 作为体外药物吸附和释放性能实验的模型药物, 吸附 DOX 的荔枝状 $\text{CaCO}_3@/\text{HA}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微球在不同 pH 的 PBS 缓冲液中进行药物释放。首先, 将 100 mg 微球加入到 10 mL 1 mg/mL 的 DOX 水溶液中, 在 37°C 的恒温摇床中以 120 r/min 的速度吸附 48 h。而后离心收集, 去离子水冲洗, 除去游离的 DOX, 最终得到负载 DOX 的荔枝状 $\text{CaCO}_3@/\text{HA}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微球, 将所得载有 DOX 的微球置于 37°C 的恒温箱中干燥 24 h。

然后根据以下步骤分别在 pH 为 3.4、5.7 和 7.4 的 PBS 缓冲溶液中作药物释放实验: 将 10 mg 载 DOX 的微球置于含有 30 mL 不同 pH 溶液的 45 mL 离心管中。分别在 1、4、7、12、24、36、48 h, 及 3、5、7、10、14 d 定时取样 1 mL, 冷冻保存, 随后向溶液中再加等体积(1 mL) pH 相同的 PBS 溶液, 并振荡均匀, 继续在 37°C 的恒温箱中进行释放, 以此类推。最终将取得的所有样品用酶标仪(Multiscan Go 1510, Thermo Fisher Scientific)在 477 nm 处测量吸光度, 并用标准曲线计算浓度, 每个条件测 3 个平行样取平均值, 并通过计算获得微球的累积药物释放量。

1.5 体外细胞毒性测定

体外细胞毒性实验采用荔枝状 $\text{CaCO}_3@/\text{HA}$ 微球和 Fe_3O_4 理论含量为 25wt% 的荔枝状超顺磁性 $\text{CaCO}_3@/\text{HA}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微球作为测试材料, 分别在负载 DOX 和不负载 DOX 的情况下, 选取 HaCaT (人正常

皮肤永生角质细胞, 代表正常细胞)和 HN6(口腔鳞癌细胞, 代表癌细胞)进行细胞毒性试验。将两种细胞以 3×10^3 /孔接种在 96 孔板中, 加入 100 μL 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养基, 在 37°C 、5vol% 的 CO_2 培养箱中培养 24 h。换液后向 96 孔板中加入 100 μL 10% FBS 的 DMEM 培养基, 培养基内含有浓度分别为 0、1、10、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 微球材料, 继续在二氧化碳培养箱中培养 24 h。通过 CCK-8 增殖试验测量细胞活性, 随后使用酶标仪(Multiscan Go 1510, Thermo Fisher Scientific, USA)在 450 nm 处读取 96 孔板的吸光度。

2 结果与讨论

2.1 表面形貌

图 1 显示了不同 Fe_3O_4 含量的微球(S0-S3)的 SEM 照片。可见所制备的对照组不含 Fe_3O_4 的陶瓷

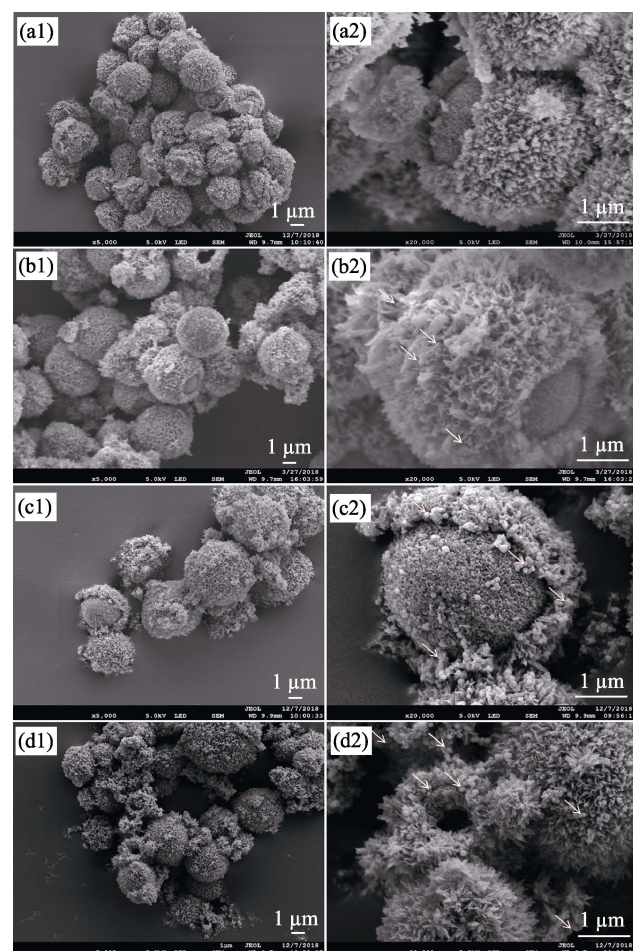


图 1 不同 Fe_3O_4 含量的超顺磁性 $\text{CaCO}_3@/\text{HA}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微球的 SEM 照片

Fig. 1 SEM images of superparamagnetic $\text{CaCO}_3@/\text{HA}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ microspheres with different Fe_3O_4 component. Note: S0 (a1, a2), S1 (b1, b2), S2 (c1, c2), S3 (d1, d2)

微球和掺杂不同含量 Fe_3O_4 的陶瓷微球的结构相似, 且微球粒径约为 $4\ \mu\text{m}$ 。从高倍照片(图 1(a2, b2, c2, d2))中, 很明显地观察到经水热处理之后的微球形状与水果荔枝相似, 呈典型的核壳双层结构, 其外表面均匀分布着长短均一的针状纳米晶体, 可以推测这些针状晶体应该是 CaCO_3 溶解后再在其表面沉积的羟基磷灰石晶体。随着 Fe_3O_4 掺杂含量的增加, 微球表面越来越多地生成应该属于 Fe_3O_4 微球的颗粒状物质。并可发现, 微球的形态结构并不受 Fe_3O_4 的影响, 且微球体的大小均一、分散性较好、具有丰富的孔结构。

图 2 显示了 Fe_3O_4 为 25wt% 的陶瓷微球经水热处理前后的 TEM 照片。可见反应前后的晶体微结构有较大的差异, 特别是反应后出现了明显的针状晶体, 进一步印证了 SEM 结果的推测, 其表面针状晶体应该是 HA。表面形貌观察证实, 以 $\text{CaCO}_3/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微球作为硬模板前驱体通过简单的水热处理, 成功地制备了具有核-壳结构的荔枝状微球。

观察图 3 的 EDS 图像, 显然荔枝状超顺磁性微球的内核和外壳成分有较大差别, 微球的外壳上的 Fe 元素含量明显多于内核, 且外壳的成分多属于羟

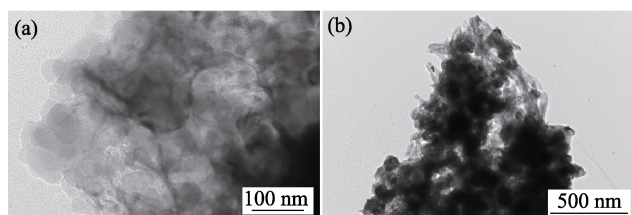


图 2 Fe_3O_4 为 25wt% 的 $\text{CaCO}_3@HA/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微球水热处理前 (a) 后 (b) 的 TEM 照片

Fig. 2 TEM images before (a) and after (b) hydrothermal conversion of $\text{CaCO}_3@HA/\text{Fe}_3\text{O}_4$ microspheres with 25wt% Fe_3O_4 component

基磷灰石的 Ca、P 成分, 这也进一步证明经水热处理的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CaCO}_3$ 微球转化成 $\text{CaCO}_3@HA/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 。

2.2 荔枝状超顺磁性 $\text{CaCO}_3@HA/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微球的相组成

图 4 显示了不同 Fe_3O_4 掺杂含量的 CaCO_3 微球经水热处理后所制备的荔枝状超顺磁性 $\text{CaCO}_3@HA/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微球(S0-S3)的 XRD 图谱。对照标准的 HA 卡片, 空白组 S0 的主要衍射峰与 HA 的标准卡片 (JCPDS#09-0432) 完全重合, 图中对照组样品 S0 主要是 HA 相, 而 S1~S3 也出现 HA 特征峰, 说明四组微球样品皆存在 HA 相。经比较图 4 发现, S0 组在 $2\theta=29.5^\circ$ 左右有一组明显的方解石特征峰, 说明水热处理之后的 HA 微球中还含有方解石型碳酸钙并未完全转化。而 S1~S3 并未出现这一组特征峰, 说明 Fe_3O_4 的掺入促进了方解石的转化。据图 4 箭头所显示的结果可知, S1~S3 三组谱线在 $2\theta=35.71^\circ$ 为 Fe_3O_4 的特征峰, 对应的是 Fe_3O_4 的 (311) 晶面, 据此可证明荔枝状超顺磁性微球是 HA 相和 Fe_3O_4 相的复合物。随着 Fe_3O_4 含量的增加, HA 峰强度明显下降, 而 Fe_3O_4 特征峰半高宽更加弥散, 表明掺入磁性 Fe_3O_4 组分降低了 HA 的结晶度。与 SEM 照片 (图 1) 相比, 微球内核还有一种 XRD 无法检测出的相成分。结合微球壳层断面的高倍 SEM 照片, 内部的成分为球形结构, 与 HA 的针状结构差别较大, 推测无定形 CaCO_3 可能还保留在微球模板内部, 无定形 CaCO_3 没有典型的 XRD 特征峰, 其可能在合成 $\text{CaCO}_3/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微球的初始阶段就已经存在。除此之外, XRD 结果还显示, 观察到产物的 2θ 没有明显移动, 而离子掺杂到 HA 的结构中会导致 XRD 的 2θ 发生明显变化^[23], 这表明 Fe_3O_4 并未进入 HA 的晶格, 而是与 HA 晶体共存。

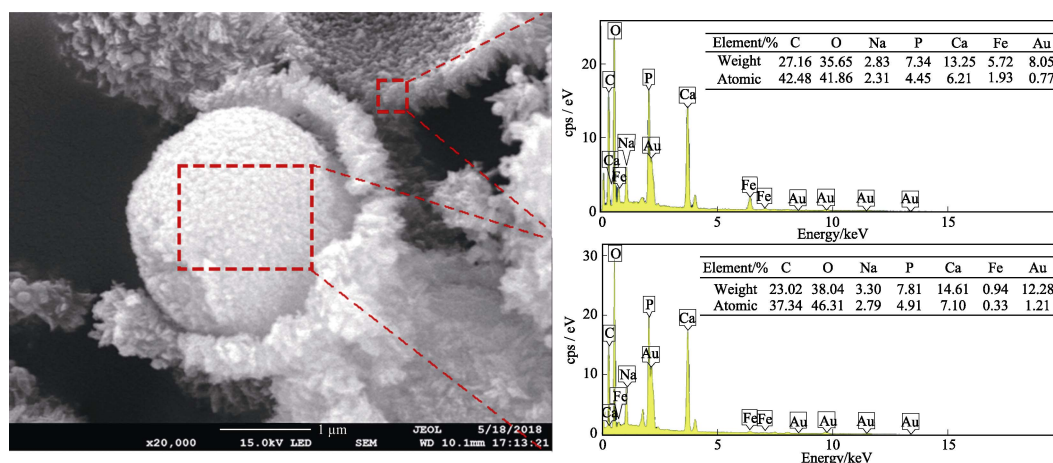


图 3 掺杂 25wt% Fe_3O_4 的 $\text{CaCO}_3@HA/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微球水热处理后的 EDS 图像
Fig. 3 Typical EDS patterns of HA microspheres with 25wt% Fe_3O_4 component

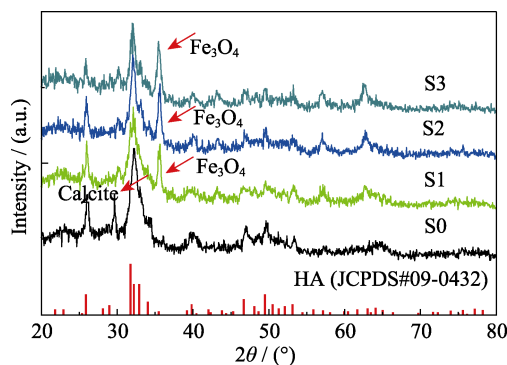


图4 不同 Fe_3O_4 含量荔枝状超顺磁性 $\text{CaCO}_3@HA/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微球的 XRD 图谱

Fig. 4 XRD patterns of $\text{CaCO}_3@HA/\text{Fe}_3\text{O}_4$ microspheres with different Fe_3O_4 component

2.3 孔结构分析

根据国际纯粹和应用化学联合会规定, 和不同含量 Fe_3O_4 掺杂的陶瓷微球样品的氮气等温吸附-脱附曲线图(图 5(a))和 BJH 孔径分布曲线(图 5(b))来看, 前者氮气等温吸附-脱附曲线可以被认定为具有狭缝状孔隙的颗粒聚集体衍生的 H3 型回线。

其在相对压力 0.8~1.0 区间急剧上升, 说明具有典型的介孔结构, 进一步由吸附-解吸附等温线和密度泛函理论(BJH)孔径分布曲线证实(图 5(b))均具有小于 15 nm 的介孔结构。用 N_2 等温吸附曲线计算得知, 25wt% Fe_3O_4 组分的 $\text{CaCO}_3@HA/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微球的比表面积高达 $196.481 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, 孔容为 $0.576 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ 。33wt% 和 50wt% Fe_3O_4 组分的微球比表面积分别为 50.749 和 $46.623 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, 通过对比三组样品的结果可知, 随着 Fe_3O_4 掺杂量的增加, 比表面积有降低的趋势。可能是由于 Fe_3O_4 微球比表面积较小, 较多的 Fe_3O_4 的掺入使得微球表面的比表面积减少。从 BET 结果分析可以推测, 该微球的药物吸附能力很高, 为该超顺磁性微球在药物控释载体等方面的应用奠定了基础。

2.4 形成机理

图 6 显示了荔枝状超顺磁性 $\text{CaCO}_3@HA/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微球形成的可能机理。根据之前的文献报道^[31]可以推测: PSS 在水溶液中电离, 其亲水性的磺酸根带负电, 容易吸附带正电的 Ca^{2+} , 形成大量的 PSS-Ca

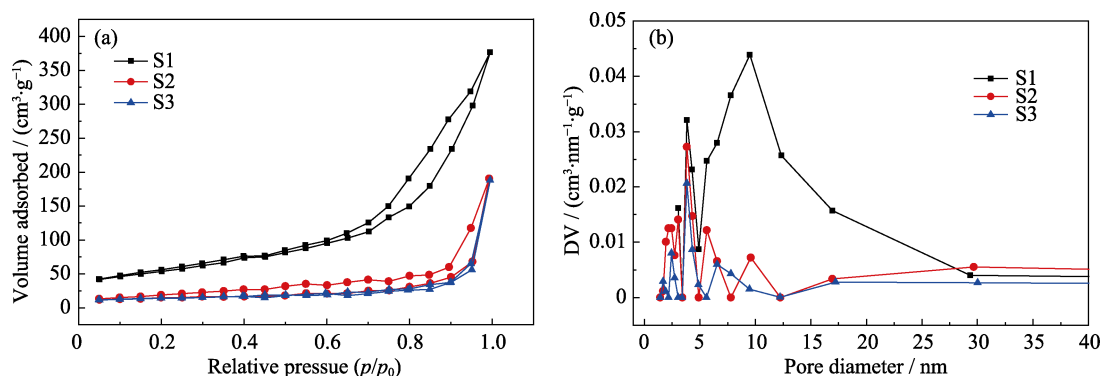


图5 不同 Fe_3O_4 掺杂含量的磁性 $\text{CaCO}_3@HA/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微球的等温吸附曲线(a)和孔径结构分布图(b)

Fig. 5 Typical nitrogen isothermal adsorption curves (a) and mesopore distribution (b) analysis of $\text{CaCO}_3@HA/\text{Fe}_3\text{O}_4$ microspheres with different Fe_3O_4 content

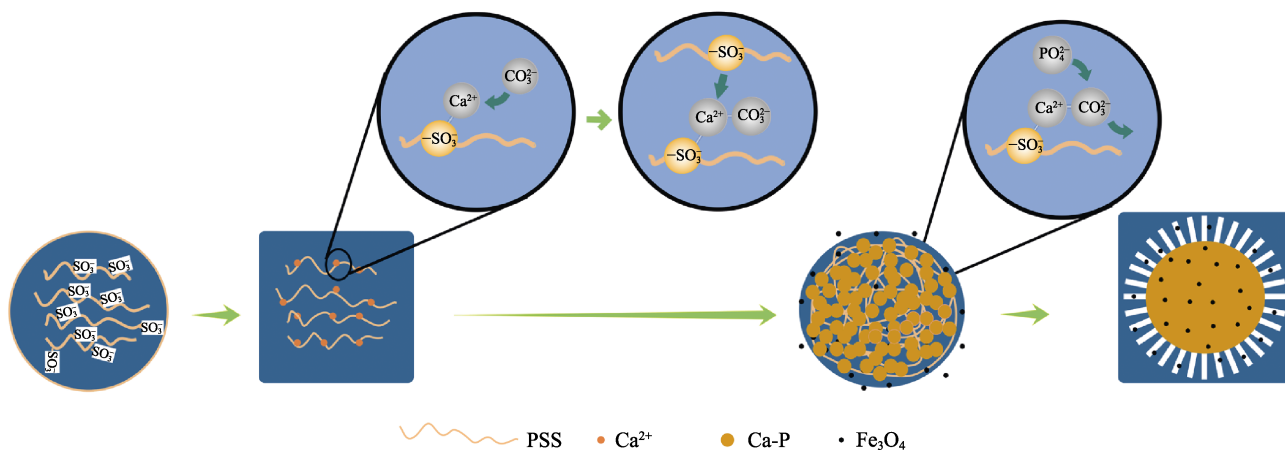


图6 荔枝状超顺磁性 $\text{CaCO}_3@HA/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微球形成机理示意图

Fig. 6 Formation mechanism diagram of litchi-like superparamagnetic $\text{CaCO}_3@HA/\text{Fe}_3\text{O}_4$ microspheres

的复合物,随着 CO_3^{2-} 的加入,成为 CaCO_3 晶体的成核位点。随着 CaCO_3 晶体的生长, PSS-Ca 会吸附在成核位点上,诱发二次成核。随着 Fe_3O_4 微球加入, Fe_3O_4 微球可能也会与磺酸根结合,或者进入长链的间隙,并在 PSS 调控下生长成掺杂有 Fe_3O_4 微球的 CaCO_3 微球。在水热反应的高温高压环境里,生成的 CaCO_3 微球开始溶解并释放 Ca^{2+} ,并在热力学驱动下, CO_3^{2-} 与 PO_4^{3-} 发生离子交换,在 CaCO_3 微球表面逐渐生长出棒状 HA 晶体,而 Fe_3O_4 微球保留在原来的位置,处于壳层结构中。控制水热反应的时间,最终得到荔枝状超顺磁性 $\text{CaCO}_3@HA/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微球。

2.5 磁性能测试

磁性 HA 微球可以均匀地分散于水溶液中,随着磁含量的增加其颜色逐渐加深(图 7(a))。当磁体靠近时,微球可以被快速吸引,几乎所有的微球都被吸引到了磁铁一侧,分离产生清澈的水溶液。由图 7(b)所示的曲线可知,所制备的磁性微球具有明显的超顺磁特征,且随着四氧化三铁含量的增加饱和磁化强度(M_s)明显随之增加。所制备的磁性 HA 产物 S1、S2 和 S3 的饱和磁化强度分别为 10.45、11.50、24.69 emu/g ($\text{emu/g}=4\pi\times 10^{-7}\text{Wb}\cdot\text{m/kg}$) (图 7(b))。通过与纯 Fe_3O_4 微球(饱和磁化强度为 65 emu/g)对比,可以大致计算出复合微球中 Fe_3O_4 的理论含量分别是: 16.08wt%、17.69wt%和 37.98wt%^[32]。饱和磁化强度随着 Fe_3O_4 掺杂含量增加而显著增加,

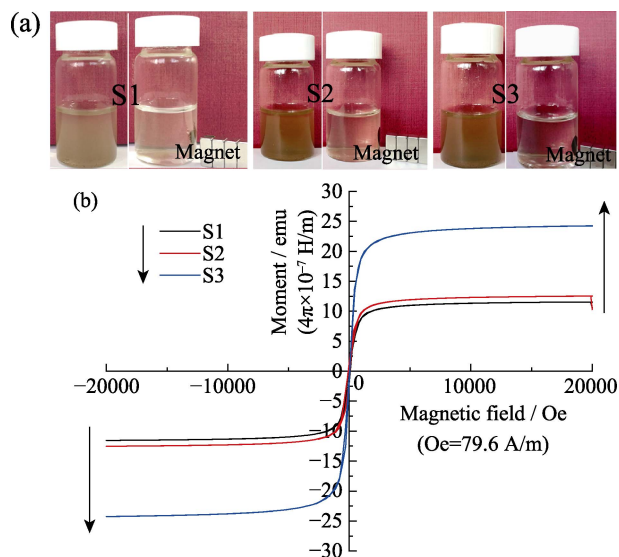


图 7 (a)荔枝状超顺磁性 $\text{CaCO}_3@HA/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微球悬浮液受磁铁吸引的数码照片,及(b)300 K 下不同 Fe_3O_4 含量的 $\text{CaCO}_3@HA/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微球的磁滞回线

Fig. 7 Digital photographs (a) of the litchi-like $\text{CaCO}_3@HA/\text{Fe}_3\text{O}_4$ magnetic HA microspheres in aqueous suspension and (b) magnetization of different samples as a function of the applied field measured at 300 K

表明这些荔枝状超顺磁性 $\text{CaCO}_3@HA/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微球的磁性可以通过调控 Fe_3O_4 的量来调节,可赋予微球良好的磁性靶向功能。

2.6 DOX 药物吸附释放

荔枝状超顺磁性 HA 微球显示出较高的载药量,三种微球的载药量超过 95 mg/g,载药率也高于 95% (表 1),与先前报道的陶瓷微球载体^[33]相比,相对较高。

图 8 显示了 25wt% 的 Fe_3O_4 含量的 $\text{CaCO}_3@HA/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微球在不同 pH 的 PBS 中的 DOX 体外累积释放结果。DOX 在各个 pH 的 PBS 中均呈现出两个明显的释放阶段,在第一个 48 h 内相对快速释放,其中,在 pH=3.4 时,释放率达到了 98%。与之相对的是,在 pH=5.4 和 7.4 均具有明显的控释行为,在随后的时间一直到 336 h (14 d)内持续释放,并在 14 d 时 DOX 累积释放分别约为 80%和 65%。

从荔枝状磁性 $\text{CaCO}_3@HA/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微球的释放 DOX 曲线显示药物释放极大地依赖于浸泡介质的 pH。随着 pH 的降低,药物的累积释放量明显增加。最初的快速释放可归因于物理吸附药物分子的快速扩散,其与外表面或通道的入口附近相互作用更弱。然后,存储在通道中并吸附在内表面的药物在较长时间的介质中浸泡渗透后将溶解并沿着水性通道扩散到介质中。同时,DOX 的缓释行为可能是由于药物分子与材料表面氢键之间的强烈相互作用。进一步的分析表明,微球在低 pH 条件下容易释放高浓度的 DOX。这可能是由于在酸性环境中发生的磷酸钙陶瓷微球的降解。该结果表明,荔枝状超顺磁性 HA 微球可用于靶向治疗,利用其 pH 敏感性,可针对肿瘤和炎症环境作靶向治疗。

将上述实验结果总结如表 1 所示。可见 S1~S3 的药物装载量和装载率接近。

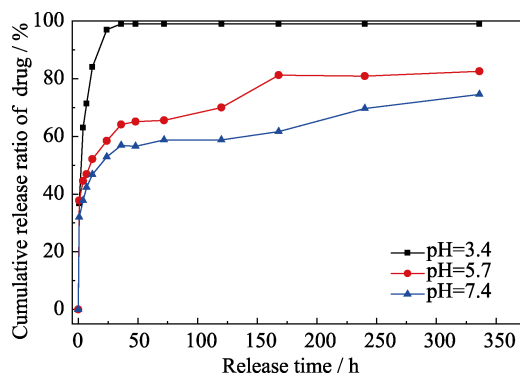


图 8 37 °C 下载药 $\text{CaCO}_3@HA/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微球在不同 pH (3.4、5.7、7.4) 的 PBS 中的 DOX 累积释放曲线

Fig. 8 DOX release profiles of the DOX-loaded litchi-like magnetic HA microspheres in PBS with different pH of 3.4, 5.7 and 7.3 at 37 °C

表 1 不同 Fe_3O_4 含量的 $\text{CaCO}_3@ \text{HA}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微球的比表面积(S_{BET})、载药量(DLA)和药物装载率(DLE)

Table 1 Fe_3O_4 content, specific surface area (S_{BET}), drug loading amount (DLA) and drug loading efficiency (DLE) of $\text{CaCO}_3@ \text{HA}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ microspheres

Sample	Fe_3O_4 content/wt%	S_{BET} /($\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$)	DLA /($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	DLE/%
S1	16.08	196.481	96.88	96.88
S2	17.69	50.749	96.14	96.14
S3	37.98	46.623	97.96	97.96

2.7 体外生物相容性试验和抗肿瘤细胞试验

图 9 显示 CCK8 试验法测定 HaCaT 和 HN6 细胞在有无 DOX 负载的 $\text{CaCO}_3@ \text{HA}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微球和 $\text{CaCO}_3@ \text{HA}$ 微球下的存活率。在微球没有负载 DOX 的情况下, 随着微球浓度的增加, 与 $\text{CaCO}_3@ \text{HA}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微球和 $\text{CaCO}_3@ \text{HA}$ 微球共培养的 HaCaT 和 HN6 细胞存活率没有明显变化(所有活力均高于 90%), 并有些微升高, 充分说明载体材料具有良好的生物相容性。

由图 9(a)可知, 正常 HaCaT 细胞分别与载 DOX 的 $\text{CaCO}_3@ \text{HA}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微球和载 DOX 的 $\text{CaCO}_3@ \text{HA}$ 微球一起孵育时, 随着微球浓度的逐渐增加, 细胞

的活性有所下降, 所有细胞的存活率都在 75% 以上。而由图 9(b)可知, 吸附 DOX 药物的微球对 HN6 细胞的抑制作用明显强于 HaCaT 细胞。进一步发现, 随着药物浓度的增加, 肿瘤细胞 HN6 的存活率急剧下降, 尤其在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下存活率可低至 30%。这可能是肿瘤细胞 HN6 形成的酸性微环境有利于载 DOX 的微球材料释放出更多的药物, 抑制了肿瘤细胞的生长, 而正常细胞的中性微环境中只有较少的药物释放出来。不难看出, 无论是 $\text{CaCO}_3@ \text{HA}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微球还是 $\text{CaCO}_3@ \text{HA}$ 微球, 均有一定的 pH 敏感特性, 而具有超顺磁性能的 $\text{CaCO}_3@ \text{HA}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微球 pH 敏感特性更强, 更有利于肿瘤细胞的靶向治疗。

3 结论

本研究采用简单的水热法制备荔枝状超顺磁性 $\text{CaCO}_3@ \text{HA}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微球, 并用于靶向药物控释系统, 结果表明介孔微球能够有效负载抗肿瘤药物 DOX, 载药量高达 95 mg/g 。其掺杂的 Fe_3O_4 微球赋予了生物陶瓷微球有效的磁性靶向功能, 并且其饱和磁化强度可以通过掺入 Fe_3O_4 微球含量进行控制。由于 $\text{CaCO}_3@ \text{HA}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微球显著的 pH 响应特性, 其在肿瘤所处的酸性环境中能释放更多的 DOX。基于本研究结果可见, $\text{CaCO}_3@ \text{HA}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微球是一种具备超顺磁性能的肿瘤靶向治疗的潜在药物载体。

参考文献:

[1] WANG H, LEEUWENBURGH SC, LI Y, *et al.* The use of micro- and nanospheres as functional components for bone tissue regeneration. *Tissue Engineering Part B Reviews*, 2012, **18**(1): 24–39.

[2] FAN J B, HUANG C, JIANG L, *et al.* Nanoporous microspheres: from controllable synthesis to healthcare applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 2013, **1**(17): 2222–2235.

[3] PARK J H, PÉREZ R A, JIN G Z, *et al.* Microcarriers designed for cell culture and tissue engineering of bone. *Tissue Engineering Part B Reviews*, 2013, **19**(2): 172–190.

[4] LIU J, QIAO S Z, CHEN J S, *et al.* Yolk/shell nanoparticles: new platforms for nanoreactors, drug delivery and lithium-ion batteries. *ChemInform*, 2011, **47**(47): 12578–12591.

[5] MAHMOUDI M, SANT S, WANG B, *et al.* Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): development, surface modification and applications in chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2011, **63**(1/2): 24–46.

[6] KIM D H, LI W, CHEN J, *et al.* Multimodal Imaging of nano-composite microspheres for transcatheter intra-arterial drug delivery to liver tumors. *Scientific Reports*, 2016, **6**: 29653.

[7] LIU Y, YANG F, YUAN C, *et al.* Magnetic nanoliposomes as *in situ* microbubble bombers for multimodality image-guided cancer theranostics. *ACS Nano*, 2017, **11**(2): 1509–1519.

[8] PARK J, AN K, HWANG Y, *et al.* Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals. *Nature Materials*, 2004, **3**(12): 891–895.

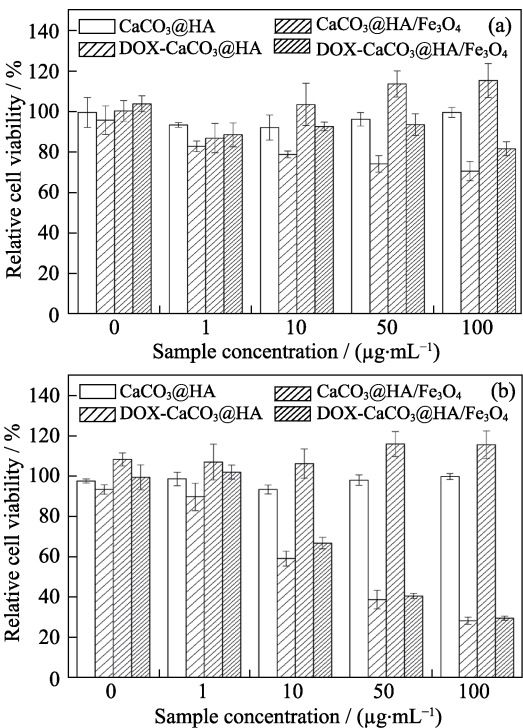


图 9 CCK8 试验法测定正常细胞 HaCaT(a)和肿瘤细胞 HN6(b)在载 DOX 和不载 DOX 的 $\text{CaCO}_3@ \text{HA}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 和 $\text{CaCO}_3@ \text{HA}$ 微球下的 24 h 存活率柱状图

Fig. 9 CCK-8 assay of HaCaT (a) and HN6 tumor cells (b) co-cultured with unloaded or DOX-loaded litchi-like magnetic HA microspheres and litchi-like HA microspheres for 24 h

- [9] CHEN Y, CHEN H, GUO L, *et al.* Hollow/rattle-type mesoporous nanostructures by a structural difference-based selective etching strategy. *ACS Nano*, 2010, **4**(1): 529–539.
- [10] WANG Y, WANG F, CHEN B, *et al.* Facile one-pot synthesis of yolk-shell superparamagnetic nanocomposites via ternary phase separations. *Chemical Communications*, 2011, **47**(37): 10350–10352.
- [11] LATTUADA M, HATTON TA. Synthesis, properties and applications of Janus nanoparticles. *Nano Today*, 2011, **6**(3): 286–308.
- [12] XIA L Y, ZHANG M Q, YUAN C E, *et al.* A facile heteroaggregate-template route to hollow magnetic mesoporous spheres with tunable shell structures. *Journal of Materials Chemistry*, 2011, **21**(25): 9020–9026.
- [13] GUO Y P, LONG T, TANG S, *et al.* Hydrothermal fabrication of magnetic mesoporous carbonated hydroxyapatite microspheres: biocompatibility, osteoinductivity, drug delivery property and bactericidal property. *Journal of Materials Chemistry B*, 2014, **2**(19): 2899–2909.
- [14] LIN K, CHEN L, LIU P, *et al.* Hollow magnetic hydroxyapatite microspheres with hierarchically mesoporous microstructure for pH-responsive drug delivery. *CrystEngComm*, 2013, **15**(15): 2999–3008.
- [15] QI C, LIN J, FU LH, *et al.* Calcium-based biomaterials for diagnosis, treatment, and theranostics. *Chemical Society Reviews*, 2017, **47**(2): 357–403.
- [16] HONG Y, FAN H, LI B, *et al.* Fabrication, biological effects, and medical applications of calcium phosphate nanoceramics. *Materials Science and Engineering: R*, 2010, **70**(3–6): 225–242.
- [17] YUAN H, FERNANDES H, HABIBOVIC P, *et al.* Osteoinductive ceramics as a synthetic alternative to autologous bone grafting. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, **107**(31): 13614–13619.
- [18] QIAO W, LAN X, TSOI J K H, *et al.* Biomimetic hollow mesoporous hydroxyapatite microsphere with controlled morphology, entrapment efficiency and degradability for cancer therapy. *RSC Adv.*, 2017, **7**(71): 44788–44798.
- [19] LI R, CHEN K, LI G, *et al.* Structure design and fabrication of porous hydroxyapatite microspheres for cell delivery. *Journal of Molecular Structure*, 2016, **1120**: 34–41.
- [20] WU H C, WANG T W, BOHN M C, *et al.* Novel magnetic hydroxyapatite nanoparticles as non-viral vectors for the glial cell line-derived neurotrophic factor gene. *Advanced Functional Materials*, 2010, **20**(1): 67–77.
- [21] GUO Y P, GUO L H, YAO Y B, *et al.* Magnetic mesoporous carbonated hydroxyapatite microspheres with hierarchical nanostructure for drug delivery systems. *Chemical Communications*, 2011, **47**(44): 12215–12217.
- [22] HUANG C, ZHOU Y, TANG Z, *et al.* Synthesis of multifunctional Fe₃O₄ core/hydroxyapatite shell nanocomposites by biomineralization. *Dalton Transactions*, 2011, **40**(18): 5026–5031.
- [23] BOCK N, RIMINUCCI A, DIONIGI C, *et al.* A novel route in bone tissue engineering: magnetic biomimetic scaffolds. *Acta Biomaterials*, 2010, **6**(3): 786–796.
- [24] LONG T, GUO YP, TANG S, *et al.* Emulsion fabrication of magnetic mesoporous carbonated hydroxyapatite microspheres for treatment of bone infection. *RSC Advances*, 2014, **4**(23): 11816–11825.
- [25] INUKAI A, SAKAMOTO N, AONO H, *et al.* Synthesis and hyperthermia property of hydroxyapatite–ferrite hybrid particles by ultrasonic spray pyrolysis. *Journal of Magnetism & Magnetic Materials*, 2011, **323**(7): 965–969.
- [26] TEO B M, SUH S K, HATTON T A, *et al.* Sonochemical synthesis of magnetic Janus nanoparticles. *Langmuir*, 2011, **27**(1): 30–33.
- [27] MENG J, ZHANG Y, QI X, *et al.* Paramagnetic nanofibrous composite films enhance the osteogenic responses of pre-osteoblast cells. *Nanoscale*, 2010, **2**(12): 2565–2569.
- [28] ZHANG Y, WANG H, YAN B, *et al.* A reusable piezoelectric immunosensor using antibody-adsorbed magnetic nanocomposite. *Journal of Immunological Methods*, 2008, **332**(1): 103–111.
- [29] SAFAVI A, MOMENI S. Highly efficient degradation of azo dyes by palladium/hydroxyapatite/Fe₃O₄ nanocatalyst. *Journal of Hazardous Materials*, 2012, **201**(1): 125–131.
- [30] JIANG X, WANG F, CAI W, *et al.* Trisodium citrate-assisted synthesis of highly water-dispersible and superparamagnetic mesoporous Fe₃O₄ hollow microspheres via solvothermal process. *Journal of Alloys & Compounds*, 2015, **636**: 34–39.
- [31] WANG Y, HASSAN MS, GUNAWAN P, *et al.* Polyelectrolyte mediated formation of hydroxyapatite microspheres of controlled size and hierarchical structure. *Journal of Colloid & Interface Science*, 2009, **339**(1): 69–77.
- [32] BRETCANU O, SPRIANO S, VERNÉ E, *et al.* The influence of crystallised Fe₃O₄ on the magnetic properties of coprecipitation-derived ferrimagnetic glass-ceramics. *Acta Biomaterials*, 2005, **1**(4): 421–429.
- [33] YANG Y H, LIU C H, LIANG Y H, *et al.* Hollow mesoporous hydroxyapatite nanoparticles (hmHANPs) with enhanced drug loading and pH-responsive release properties for intracellular drug delivery. *Journal of Materials Chemistry B*, 2013, **1**(19): 2447–2450.