

# 多孔丝素颗粒的可控制备及药物负载研究

雷 容,徐江晖,周文翠,袁梅华,蔡玉荣,姚菊明

(浙江理工大学材料与纺织学院,杭州 310018)

**摘 要:**近年来桑蚕丝素蛋白以来源广泛、可降解且生物相容性好等优点,在生物医用材料领域得到了越来越广泛的关注。以丝素蛋白为原材料,研究丝素蛋白浓度、熟化温度及盐浴浓度对所制备的丝素蛋白粒径及形貌的影响,并探索该颗粒对抗肿瘤药物阿霉素的负载和控释能力。研究表明:丝素颗粒表面呈多孔状态的球体,粒径变化范围在400~3600 nm,对药物阿霉素的包封率为93.86%,载药量为14.08  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ;随pH降低,药物释放速率和累积释放量增加。实验表明:纳米级丝素颗粒可作为药物载体,可高效包覆抗癌药物阿霉素,并实现药物的可控释放。

**关键词:**丝素;纳米颗粒;多孔;药物负载及释放

**中图分类号:** TB34

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1673-3851(2018)01-0037-08

## 0 引 言

近年来癌症的发病率和死亡率越来越高,抗癌药物能有效杀死癌细胞,但药物在血液环境中易被降解而无法在人体内稳定存在,为维持药物在体内的有效血药浓度,研究者们设计了将药物包覆在载体之上的载药体系<sup>[1-2]</sup>。当载体包覆药物后,药物能稳定存在于血液环境中,从而达到增强药物稳定性的效果。此外,载体还能在一定刺激条件下,对药物进行可控释放,因此研究一种抗癌药物的高效载体非常重要。

药物载体材料的类型主要有无机材料<sup>[3-4]</sup>和有机高分子材料<sup>[5-6]</sup>,但无机材料在体内释放药物后难降解,丝蛋白质作为一种天然高分子材料,生物相容性良好,能被蛋白酶水解<sup>[7]</sup>,可作为药物载体材料来解决在体内降解困难的问题。同时,丝蛋白制备的纤维和膜具有一定的机械强度,应用在手术缝线、人造血管及医用敷料<sup>[8-11]</sup>等研究方面。Kundu等<sup>[12]</sup>采用去溶剂化的方法制备丝素纳米颗粒,结果

显示丝素纳米球呈 $\beta$ -折叠结构,且无明显细胞毒性。Wenk等<sup>[13]</sup>人以水杨酸为药物模型,制得丝素蛋白载药微囊,发现由浓度高的丝素蛋白溶液制备的载药微囊,对药物的释放速率更稳定。

本实验以丝蛋白为载体材料,阿霉素为抗肿瘤药物模型,制备粒径可控的微纳米颗粒。在颗粒形成过程中,丝素颗粒将药物阿霉素包覆在其中,从而实现药物阿霉素的负载;并在不同pH的磷酸盐缓冲溶液(PBS)中,测定阿霉素的释放速率和累积释放量,对载药微球响应释放阿霉素的性能进行表征。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验试剂

蚕茧购自湖州新天丝生物技术有限公司,溴化锂、碳酸钠购自阿拉丁试剂(上海)有限公司,无水磷酸氢二钠和无水磷酸二氢钠购自天津市科密欧化学试剂有限公司,阿霉素购自上海士锋生物科技有限公司。

收稿日期:2017-06-20 网络出版日期:2017-11-09

基金项目:国家自然科学基金项目(51372226);浙江省自然科学基金项目(LY16E020013)

作者简介:雷 容(1992-),女,湖北孝感人,硕士研究生,主要从事生物材料方面的研究。

通信作者:姚菊明,E-mail:yaoj@zstu.edu.cn

## 1.2 丝素溶液的制备

将蚕茧加入 0.02 mol/L 的碳酸钠溶液中煮沸 30 min,重复两次,用超纯水洗涤 3 次,于 60 °C 烘箱中干燥过夜。称取 15 mg 脱胶后的丝素纤维,溶解在 100 mL 浓度为 9.30 mol/L 的溴化锂溶液中,60 °C 反应 2 h。将溶解得到的丝素溶液置于透析袋中,去离子水透析 3 d,每 12 h 更换去离子水,对所得溶液进行离心即得到丝素溶液,置于 4 °C 冰箱保存备用。

## 1.3 丝素微纳米颗粒的制备及药物负载

用  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  和  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  配制 pH 值为 8、浓度为 1.25 mol/L 的磷酸盐溶液,将浓度分别为 0.50、1.00、1.50、2.00 mg/mL 的丝素溶液缓慢滴加到磷酸盐溶液中,低温处理 4 h 后再在 20 °C 熟化温度下处理 12 h,离心去离子水洗涤三次,得多孔的丝素微纳米颗粒(silk fibroin nanoparticle, SFNPs)。选择最优的丝素溶液浓度作为下一步研究的工艺条件。

用  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  和  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  配制 pH 值为 8 浓度分别为 1.00、1.25、1.50、2.00 mol/L 磷酸盐溶液,将浓度为最优的丝素溶液缓慢滴加到其中,低温处理 4 h 后再在熟化温度下处理 12 h,离心洗涤三次,得到 SFNPs。选择最优的磷酸盐溶液浓度作为下一步研究的工艺条件。

用  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  和  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  配制 pH 值为 8 浓度为最优浓度的磷酸盐溶液,将浓度为最优的丝素溶液缓慢滴加到其中,低温处理 4 h 后再在不同熟化温度(10、20、30、40 °C)下处理 12 h,离心洗涤三次,得到 SFNPs。选择最优的熟化温度作为下一步研究的工艺条件。

选取上述实验最优工艺条件,将阿霉素加入到丝素溶液中,混合均匀后,将丝素溶液加入到磷酸盐溶液中,低温处理 4 h 后熟化温度下处理 12 h,离心洗涤,得到载药丝素颗粒。

## 1.4 载药颗粒对药物的体外缓释

将制备的载药颗粒分散于 pH 为 5.0、6.5、7.4 的 PBS 中,放入 37 °C 恒温振荡箱中,振荡频率 150 r/min,分别隔 1.0、2.5、4.5、7.0、10.5、14.0、19.0、25.0、32.0 h 检测阿霉素释放量。

## 1.5 表征分析

采用场发射扫描电镜(FE-SEM,日本 Hitachi 公司 S-4800 型)观察多孔丝素颗粒的表面形貌。

采用马尔文激光粒度仪(Zetasizer,英国马尔文仪器有限公司 NanoZS90 型)测定丝素颗粒的粒径、

粒径分布及颗粒表面电位。

采用傅里叶红外变换衰减全反射红外吸收光谱仪(FTIR,美国 Thermo Electron)对丝素蛋白在形成颗粒前后进行结构分析。

采用紫外分光光度计测定阿霉素的在 480 nm 处的吸光度,建立标准曲线,对丝素颗粒包覆药物的载药量和包封率<sup>[14]</sup>进行定量计算。计算公式如下:

$$\text{载药量}/(\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}) = \frac{\text{载体中包覆的药物量}}{\text{载体总量}},$$

$$\text{包封率}/\% = \frac{\text{载体中包覆的药物量}}{\text{总投药量}} \times 100.$$

## 2 结果与讨论

### 2.1 丝素浓度对 SFNPs 形貌及粒径的影响

丝素溶液浓度会影响晶体生长,为了解丝素溶液浓度对 SFNPs 形貌及粒径分布的影响,在 SFNPs 制备过程中保持熟化温度为 20 °C,磷酸盐溶液浓度为 1.25 mol/L 不变,仅改变丝素溶液浓度,分别为 0.5、1.0、1.5、2.0 mg/mL。采用扫描电镜和激光粒度仪对 SFNPs 的形貌和粒径分布进行表征,结果如图 1 所示。图 1(a)中丝素浓度为 0.5 mg/mL 时,丝素颗粒表面为多孔结构,图 1(e)中丝素颗粒的粒径最小,主要分布在 500~600 nm 左右,颗粒为表面呈多孔结构的球形。图 1(d)在丝素浓度增加到 2.0 mg/mL 时,丝素颗粒表面多孔结构没有变化,图 1(h)粒径增大到 1500 nm 左右。从图 1 的扫描电镜照片看出随着丝素溶液浓度增加, SFNPs 的多孔结构几乎没有发生变化,颗粒粒径呈现增大的趋势,激光粒度仪结果如图 1(e)~(h),随着丝素溶液浓度增加,丝素颗粒粒径增加,也证实扫描电镜观察到的结果。其原因可能是在制备丝素颗粒的过程中,丝素溶液浓度越高,越易于析出,析出的丝素小颗粒作为晶种使溶液中的丝素蛋白能够在其上生长,形成大的丝素颗粒<sup>[15]</sup>。图 1 中丝素溶液浓度 0.5 mg/mL 和 1.0 mg/mL 相比,后者颗粒粒径稍有增加,粒径分布变化不大,考虑到产量的问题,这里选择浓度为 1.0 mg/mL。

### 2.2 熟化温度对 SFNPs 形貌及粒径的影响

温度会影响晶体生长,为探究熟化温度对丝素形貌及粒径分布的影响,在丝素溶液浓度为 1 mg/mL,磷酸盐浓度为 1.25 mol/L 的工艺条件下,分别在不同熟化温度下制备 SFNPs,采用扫描电子显微镜及激光粒度仪对 SFNPs 进行表征。图 2(a)中熟化温度为 10 °C 时,丝素颗粒主要呈球形,少部分为短棒

状,表面呈多孔结构,图 2(e)粒径主要分布在 2000~2300 nm 左右。图 2(d)当熟化温度升高到 40 °C 时,跟图 2(a)相比,更多颗粒呈球形,表面多孔结构没有变化,且粒径减小,减少到 1500~1700 nm。从图 2 的扫描电镜图中看出,丝素颗粒形貌变化不大,随着熟化温度的增加,丝素颗粒粒径呈现减小的趋

势。激光粒度仪结果表明熟化温度越高,丝素颗粒粒径越小,而且粒径分布范围更窄。这是由于晶核在低温条件下生长速度快,高温会破坏已形成的有序晶核,特别是在均相成核中,因而随着熟化温度升高,丝素颗粒粒径减小<sup>[16]</sup>。考虑到粒径小有利于细胞吞噬,因此选熟化温度为 40 °C。

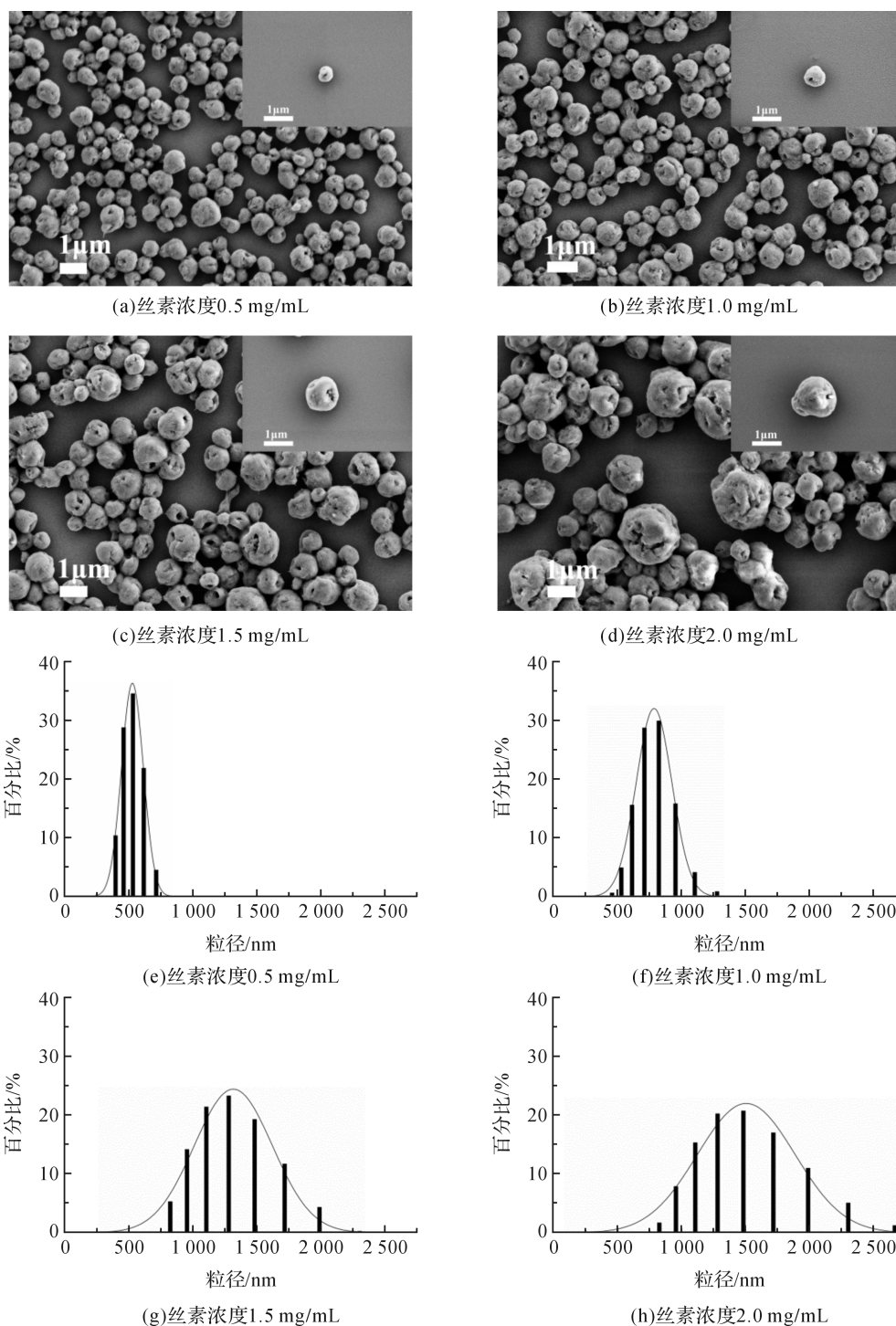


图 1 不同丝素溶液浓度的 SFNPs 扫描电镜照片和的粒径分布



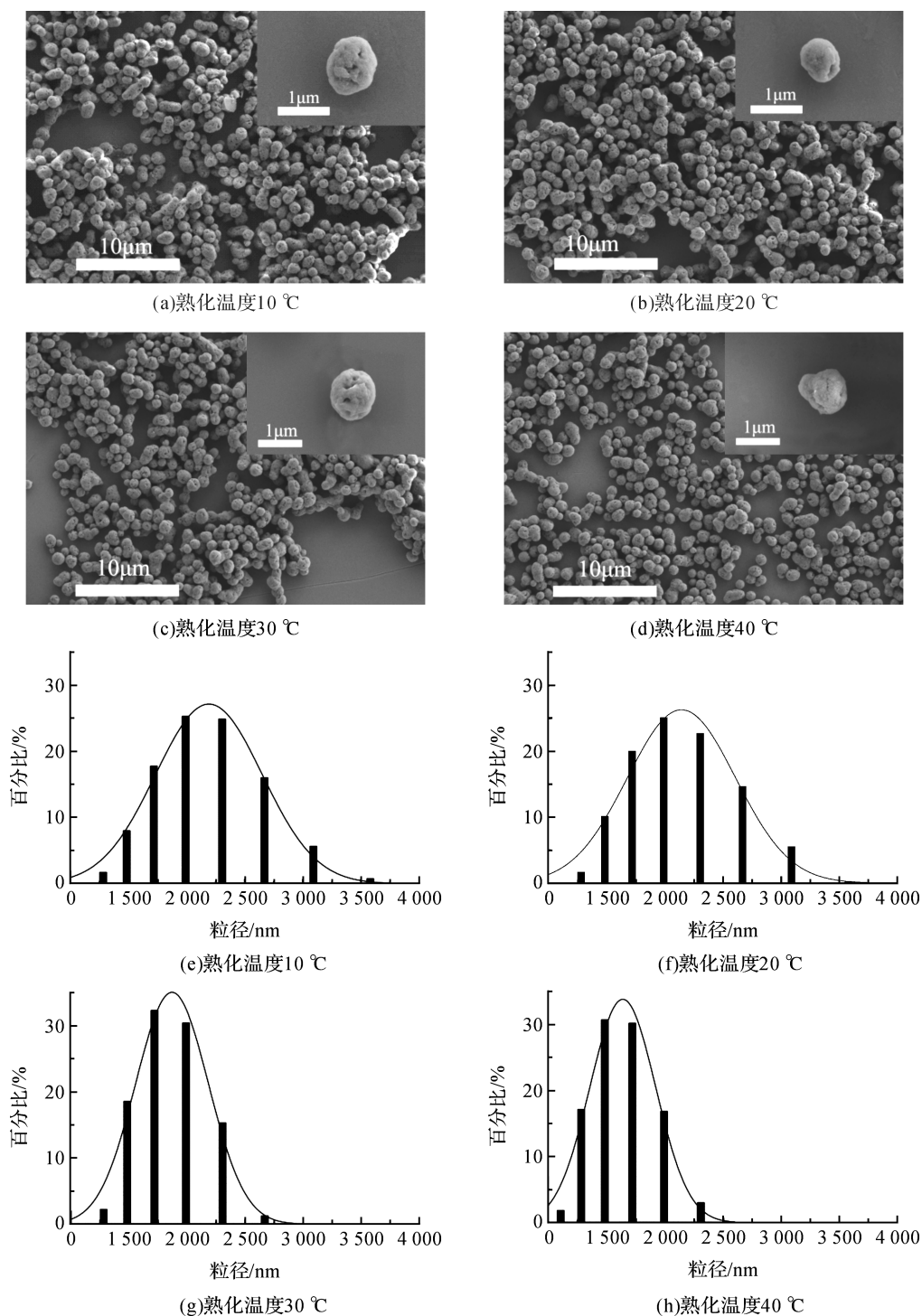


图2 不同熟化温度的丝素颗粒扫描电镜照片及其粒径分布

### 2.3 离子强度对 SFNPs 形貌及粒径的影响

蛋白质是亲水性大分子,在水溶液中有双电层结构,以保证分子的溶解度平衡并在水溶液中稳定存在。当加入无机盐类时,盐会电离成为离子态,盐离子的电性破坏溶液中蛋白质的双电层结构,从而导致蛋白质沉淀析出<sup>[17]</sup>。不同离子强度对蛋白质双电层的影响程度不同,为探究不同离子强度对丝素颗粒及粒径分布,在丝素溶液浓度为 1 mg/mL,

熟化温度为 40 °C 工艺条件下,采用扫描电镜和激光粒度仪对丝素颗粒形貌及粒径分布进行表征。图 3 (a)离子强度为 1.00 mol/L 时,颗粒表面呈多孔结构,图 3(e)粒径主要分布在 950 nm 左右。当离子强度增加到 2.00 mol/L 时,如图 3(d)所示,颗粒表面多孔结构减少,图 3(h)粒径主要集中在 500 nm 左右,且粒径分布范围更窄。图 3 扫描电镜结果显示,随着离子强度增加,丝素表面形貌更加趋向平



滑,粒径分布呈减小的趋势,激光粒度仪结果如图 3 (e)–(h),随着离子强度增加,丝素颗粒粒径减小,也证实扫描电镜中粒径减小的现象。

为证实离子强度影响丝素蛋白的双电层结构,测定不同离子强度制得的丝素颗粒的表面电位。图 4 结果表明,当离子强度为 1.00 mol/L 时,颗粒表面电位为  $-35$  mV,当离子强度增加到 2.00 mol/L

时,颗粒表面电位增加  $-47$  mV 左右,这表明随着离子强度的增加,丝素颗粒的表面电位也增加,这一结果跟前面图 3 分析得到的随着离子强度增加,颗粒粒径减小的结果一致,即离子强度越高,对蛋白质双电层影响程度越大,高的表面电位有利于颗粒在溶液体系中稳定存在,在制备药物载体时选用离子强度为 2.00 mol/L 的盐浴溶液。

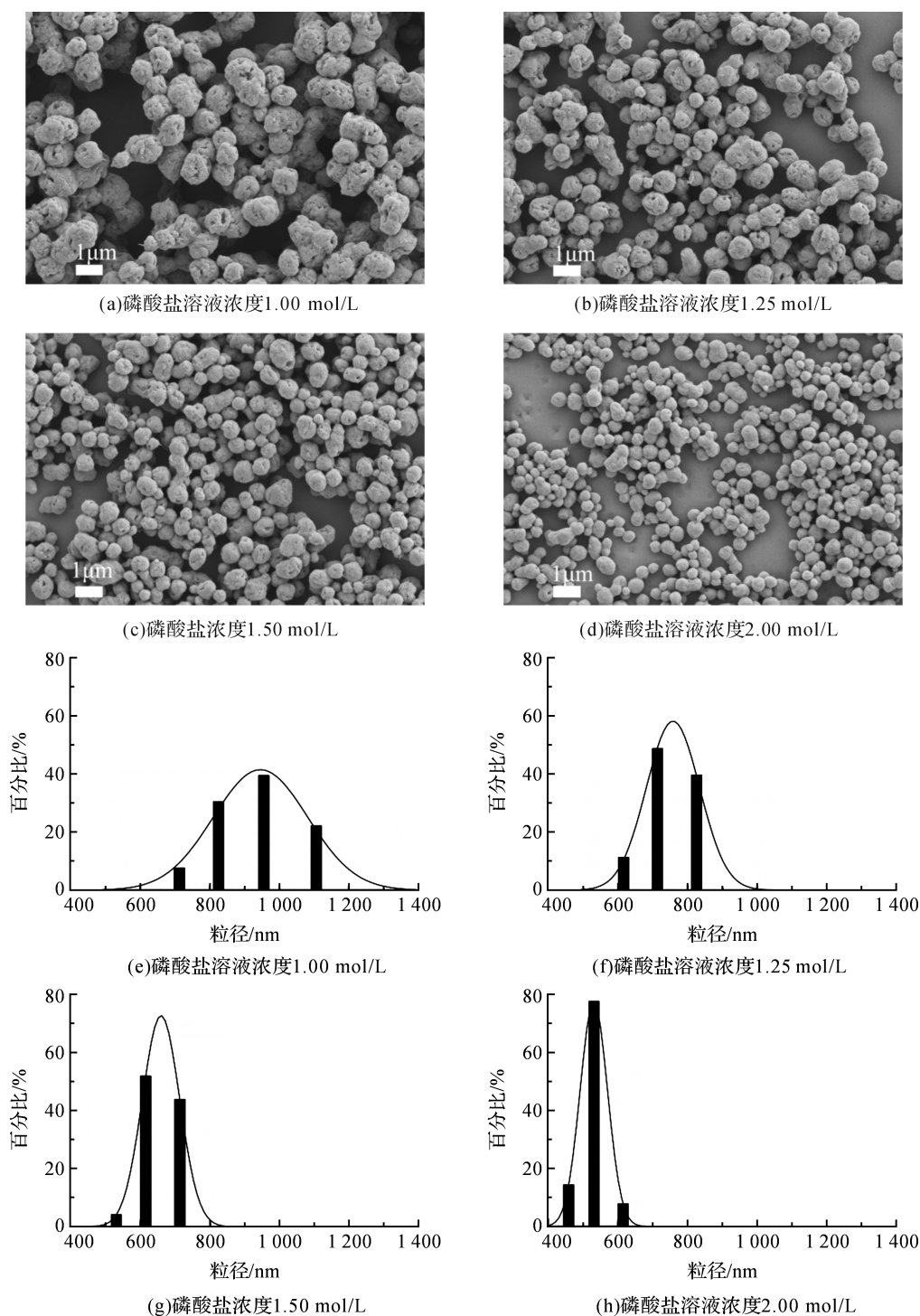


图 3 不同离子强度的丝素颗粒扫描电镜照片及粒径分布

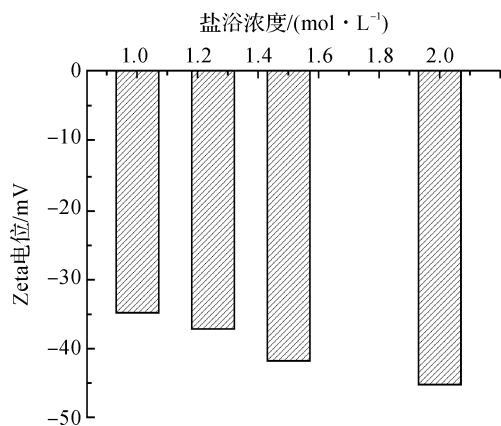


图4 不同离子强度制得的丝素颗粒的 Zeta 电位

## 2.4 SF 盐析前后构象的变化

将新制的丝素蛋白溶液通过冷冻干燥,得再生丝素蛋白(regenerated silk fibroin,RSF),RSF/SFNPs 的红外光谱图如图 5 所示。再生丝素蛋白在形成微纳颗粒后,RSF 的酰胺 I 峰(C=O 伸缩振动)的位置从原来的  $1633.22\text{ cm}^{-1}$  移到了  $1655.14\text{ cm}^{-1}$ <sup>[18]</sup>,表明丝素盐析后的构象趋向于形成无规线团,说明高浓度的盐溶液不利于了丝素纤维的有序排列。SFNPs 在  $1540.86\text{ cm}^{-1}$  处的酰胺 II (N-H 弯曲振动)和  $1239.43\text{ cm}^{-1}$  处的酰胺 III (C-N 伸缩振动)峰值明显增加,也说明丝素蛋白颗粒大部分为无规线团结构和少量  $\alpha$ -螺旋结构。

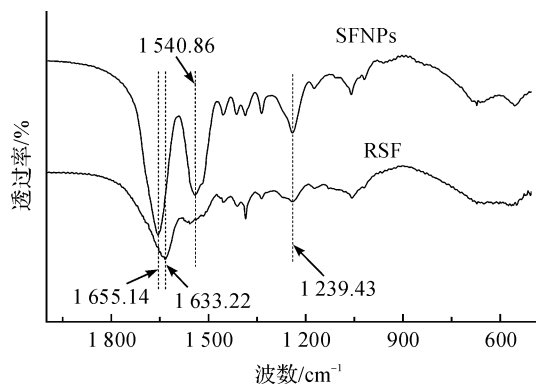


图5 丝素蛋白盐析前后红外谱图

## 2.5 SFNPs 的药物负载

将未载药的纯丝素颗粒、载药的丝素颗粒及药物阿霉素(DOX),跟溴化钾粉末研磨后进行压片,得到 SFNPs、DOX、SFNPs-DOX 的红外光谱图,结果如图 6 所示。

由图 6 结果可知,载药后的丝素颗粒分别在  $2850.32$ 、 $1281.90$ 、 $989.03\text{ cm}^{-1}$  呈现出阿霉素的特征振动峰,表明阿霉素已经成功被丝素颗粒包覆在颗粒中。由于 SFNPs 呈很高的负电性,Zeta 电位为  $-47\text{ mV}$ ,阿霉素呈弱正电性,阿霉素通过静电吸

附的方式负载于丝素颗粒上,从而使 SFNPs 实现对药物阿霉素的负载。

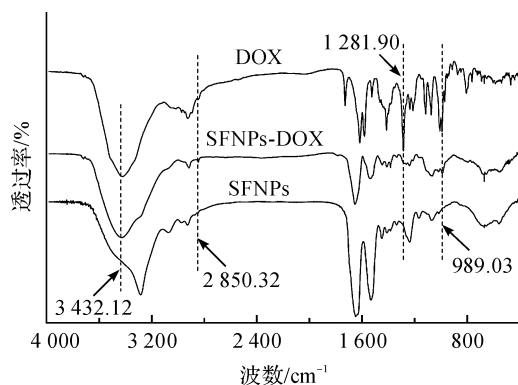


图6 载药丝素颗粒的红外光谱图

为实现载体对药物阿霉素的负载量和包封率的定量计算,通过紫外分光光度计对溶液中未包覆的阿霉素进行测定,结合标准曲线如图 7 所示,阿霉素的浓度与吸光度呈线性相关,方程式为  $Y=0.024X-0.001$ ,曲线拟合度  $R^2$  为  $0.99983$ ,计算得载药量为  $14.08\text{ }\mu\text{g/mg}$ ,包封率为  $93.86\%$ 。表明 SFNPs 将绝大部分阿霉素负载在其上,实现对抗癌药物阿霉素的高效负载。

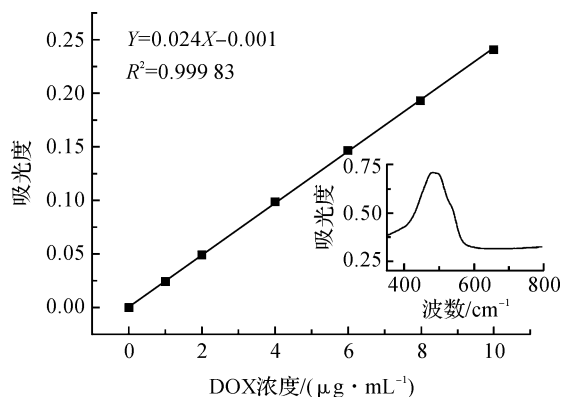


图7 阿霉素的标准曲线

## 2.6 药物的 pH 响应释放

由于癌细胞内部环境的 pH 值呈弱酸性,pH 为  $5.0$  的 PBS 模拟癌细胞中内涵体和溶酶体的微环境,pH 值为  $6.5$  的 PBS 模拟肿瘤细胞外环境,pH 值为  $7.4$  的 PBS 模拟体内血浆环境<sup>[19]</sup>。阿霉素是通过静电吸附的方式负载于丝素颗粒中,不同 pH 条件会影响其静电相互作用<sup>[20]</sup>,根据环境 pH 值的不同实现药物的响应释放。

图 8 为载药丝素颗粒在不同 pH 值的 PBS 中的累积释放药物阿霉素的量随时间的关系曲线。图 8 结果表明,当 PBS 的 pH 为  $7.4$  时,药物释放速率最慢,在释放  $7\text{ h}$  后达平衡状态,累积释放量为  $25.85\%$ 。当 PBS 的 pH 为  $6.5$  时,在释放  $14\text{ h}$  后

达到平衡,累积释放量为 41.21%。PBS 的 pH 为 5.0 时药物的释放速率在最快,释放 14 h 后达平衡期,药物的总释放量为 68.21%。图 8 说明酸性条件有利于药物释放。药物在酸性条件下释放量的增加,主要是由于酸性环境削弱了阿霉素和丝素蛋白之间的静电作用,导致药物从纳米颗粒中释放出来。以上结果表明丝素制得的纳米颗粒可作为药物载体,并在弱酸性环境的肿瘤细胞内部及周围实现 pH 响应释放。

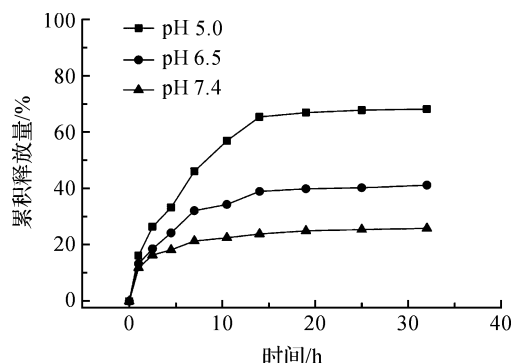


图 8 载药丝素颗粒的体外释放曲线

### 3 结 论

通过研究丝素溶液的浓度、熟化温度、磷酸盐溶液浓度,得到粒径可控的多孔丝素颗粒。丝素溶液浓度越低,磷酸盐溶液浓度越高,熟化温度越高,制得的丝素颗粒粒径越小。纳米级多孔丝素颗粒对抗癌药物阿霉素的负载性能良好,药物释放速率和累积释放量随 pH 降低而增加,根据癌细胞内部环境的 pH 比正常细胞低,可实现药物的控制释放,具有可观的医用前景,有望应用于癌症治疗。

### 参考文献:

- [1] Peer D, Karp J M, Hong S, et al. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy [J]. *Nature Nanotechnol*, 2007, 2(12): 751-760.
- [2] Barratt G. Colloidal drug carriers: achievements and perspectives[J]. *Cellular and Molecular Life Science*, 2003, 60(1): 21-37.
- [3] Son S J, Bai X, Lee S B. Inorganic hollow nanoparticles and nanotubes in nanomedicine: Part 1. Drug/gene delivery applications[J]. *Drug Discovery Today*, 2017, 12(15/16): 650-656.
- [4] Xu Z P, Zeng Q H, Lu G Q, et al. Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery[J]. *Chemical Engineering Science*, 2006, 61(3): 1027-1040.
- [5] Jiang T, Li Y M, Lv Y, et al. Amphiphilic polycarbonate conjugates of doxorubicin with pH-sensitive hydrazine linker for controlled release[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013, 111(1): 542-548.
- [6] Sokolsky-papkov M, Agashi K, Olaye A, et al. Polymer carriers for drug delivery in tissue engineering [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007, 59(4/5): 187-206.
- [7] Horan R L, Antle K, Collette A L, et al. In vitro degradation of silk fibroin [J]. *Biomaterials*, 2005, 26(17): 3385-3393.
- [8] Chen X J, Hou D D, Wang L, et al. Antibacterial surgical silk sutures using a high-performance slow-release carrier coating system[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015, 7(40): 22394-22403.
- [9] Lovett M, Cannizzaro C, Daheron L, et al. Silk fibroin microtubes for blood vessel engineering[J]. *Biomaterials*, 2007, 28(35): 5271-5279.
- [10] Tao H, Kaplan D L, Omenetto F G. Silk materials-A road to sustainable high technology [J]. *Advanced Materials*, 2012, 24(21): 2824-2837.
- [11] Gu Z P, Xie H X, Huang C C, et al. Preparation of chitosan/silk fibroin blending membrane fixed with alginate dialdehyde for wound dressing[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 58(1): 121-126.
- [12] Kundu J, Chung Y, Kim Y H, et al. Silk fibroin nanoparticles for cellular uptake and control release[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2010, 388(1/2): 242-250.
- [13] Wenk E, Wandrey A J, Merkle H P, et al. Silk fibroin spheres as a platform for controlled drug delivery[J]. *Journal of Controlled Release*, 2008, 132(1): 26-34.
- [14] Wang S H, Xu T, Yang Y H, et al. Colloidal stability of silk fibroin nanoparticles coated with cationic polymer for effective drug delivery[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015, 7(38): 21254-21262.
- [15] Shi P J, Goh J. Self-assembled silk fibroin particles: Tunable size and appearance [J]. *Powder Technology*, 2012, 215/216(1): 85-90.
- [16] Zhao Z, Li Y, Xie M B. Silk Fibroin-based nanoparticles for drug delivery[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(3): 4880-4903.
- [17] Grover P K, Ryall R L. Critical appraisal of salting-out and its implications for chemical and biological sciences [J]. *Chemical Reviews*, 2005, 105(1): 1-10.
- [18] Chen X, Shao Z Z, Marinkovic N S, et al. Conformation transition kinetics of regenerated Bombyx mori silk fibroin membrane monitored by time-resolved FTIR spectroscopy



- [J]. Biophysical Chemistry, 2001, 89(1): 25-34. (2): 1638-1647.
- [19] Hu D D, Xu Z P, Hu Z Y, et al. pH-Triggered charge-reversal silk sericin-based nanoparticles for enhanced cellular uptake and doxorubicin delivery[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2017, 5
- [20] Seib F P, Kaplan D L. Doxorubicin-loaded silk films: Drug-silk interactions and in vivo performance in human orthotopic breast cancer[J]. Biomaterials, 2012, 33(33): 8442-8450.

## Size-controlled preparation of porous silk fibroin particle used as drug carrier

LEI Rong, XU Jianghui, ZHOU Wencui, YUAN Meihua, CAI Yurong, YAO Juming

(College of Materials and Textiles, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** Recently, silkworm silk fibroin has received more and more attention in the field of biomedical material due to its excellent properties, such as extensive sources, biodegradability and biocompatibility. In the paper, the silk fibroin(SF) was used as the raw material to study the effects of SF concentration, aging temperature and salt bath concentration on the size and morphology of SF particles. Meanwhile, the loading capacity and controlled release capacity of the particles on anti-tumor drug were explored. Results show that the synthesized SF particle is spherical and porous. The diameter of SF particle could be adjusted in a range of 400~3600 nm. The loading content and the entrapment ratio of doxorubicin are 14.08  $\mu\text{g}/\text{mg}$  and 93.86% respectively. The release rate and accumulative release amount of drug increases with the decrease of pH. It is indicated that the SF particles can be used as the drug carrier to effectively coat the anti-cancer drug adriamycin. Besides, controlled drug release can be achieved.

**Key words:** silk fibroin; nanoparticle; porous; drug loading and release

(责任编辑: 廖乾生)