

# 硼碳氮纳米管的制备及靶向递送 阿霉素的抗肿瘤性能

杨欢<sup>1</sup>, 李佳鑫<sup>2</sup>, 顾水丹<sup>2</sup>, 骆丽杰<sup>1</sup>, 陈拥军<sup>1\*</sup>

(1. 海南大学 材料科学与工程学院, 海南 海口 570228; 2. 华中科技大学 材料科学与工程学院, 湖北 武汉 430074)

**摘要:** 通过改进固相合成法制备了硼碳氮纳米管 (BCNNTs), 并利用 XRD、FTIR 和 SEM 对其进行了表征。然后, 采用叶酸 (FA) 对 BCNNTs 进行功能化修饰, 用于负载阿霉素 (DOX), 构建了 FA-BCNNTs-DOX 靶向给药系统, 并评价了该载药系统的抗肿瘤效果。结果表明, DOX 有效负载到 BCNNTs 和 FA-BCNNTs 上, 其负载量分别为 67.33 和 87.11 mg/g。与 DOX 和 BCNNTs-DOX 相比, FA-BCNNTs-DOX 能引起更多的人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞死亡, 这归因于在叶酸受体介导的内吞作用下, MDA-MB-231 细胞对 FA-BCNNTs-DOX 的摄取能力得到明显提高。在肿瘤细胞酸性条件下, FA-BCNNTs-DOX 释放 DOX, DOX 在细胞核内逐步积累, 从而产生优异的抗肿瘤效果。

**关键词:** 硼碳氮纳米管; 阿霉素; 叶酸; 靶向递送; 抗肿瘤; 功能材料

**中图分类号:** TQ460.4; TB34 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2023) 06-1294-08

## Boron carbonitride nanotubes for targeted delivery of DOX: Preparation and antitumor performance

YANG Huan<sup>1</sup>, LI Jiabin<sup>2</sup>, GU Shuidan<sup>2</sup>, LUO Lijie<sup>1</sup>, CHEN Yongjun<sup>1\*</sup>

(1. School of Materials Science and Engineering, Hainan University, Haikou 570228, Hainan, China; 2. School of Materials Science and Engineering, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, Hubei, China)

**Abstract:** Boron carbonitride nanotubes (BCNNTs) were prepared via an improved solid-state synthesis method and characterized by XRD, FTIR and SEM. Then the targeted drug delivery system of FA-BCNNTs-DOX was constructed by loading doxorubicin (DOX) into folate (FA) functionalized BCNNTs, and analyzed for its anti-tumor performance. The results showed that DOX was successfully encapsulated into BCNNTs and FA-BCNNTs with a loading capacity of 67.33 and 87.11 mg/g, respectively. Compared with DOX and BCNNTs-DOX, FA-BCNNTs-DOX led to more significant human breast cancer MDA-MB-231 cells growth inhibition, which was attributed to the enhanced FA-BCNNTs-DOX uptake capacity of MDA-MB-231 cells via folate receptor-mediated endocytosis. Under the acidic environment of tumor cells, DOX was released from FA-BCNNTs-DOX, and gradually accumulated in the nucleus, thus producing excellent anti-tumor effects.

**Key words:** boron carbonitride nanotubes; doxorubicin; folate; targeted delivery; antitumor; functional materials

癌症已严重危及到人类生命, 但目前其治疗依然以化学疗法为主。化疗药物在临床使用时面临了

两大难题: 一是化疗药物不能识别特定的肿瘤细胞且透膜性能不好, 导致了其生物利用率低; 二是化

收稿日期: 2022-10-17; 定用日期: 2022-12-08; DOI: 10.13550/j.jxhg.20220953

基金项目: 海南省基础与应用基础研究计划 (自然科学领域) 高层次人才项目 (2019RC029)

作者简介: 杨欢 (1992—), 女, 博士, E-mail: huanhuanyang@hainanu.edu.cn。联系人: 陈拥军 (1970—), 男, 教授, E-mail: chenyj99@163.com。

疗药物会对正常细胞引起毒性,产生一系列副作用。例如:阿霉素(DOX)是一种蒽环类的高效广谱抗肿瘤抗生素,已广泛应用于治疗各种实体肿瘤<sup>[1]</sup>。DOX对细胞的非特异性毒性导致其在抑制肿瘤细胞生长的同时会对正常的细胞造成严重的损伤,特别是在长期服用后会后对心脏、大脑、肾脏等产生严重的毒副作用,甚至出现耐药性,这些缺陷极大地限制了DOX在临床上的应用<sup>[2-3]</sup>。

为了解决这一问题,研究者采用纳米材料作为DOX的递送载体,并对载体进行功能化修饰,构建的纳米载药系统有助于提高DOX利用率的同时减弱其毒副作用<sup>[4-5]</sup>。其中,碳纳米管(CNTs)和氮化硼纳米管(BNNTs)因其特殊的性质(如大的比表面积、强的细胞摄取能力、实体瘤的高通透性和滞留效应以及容易与化疗药物结合等)已成为具有吸引力的药物载体<sup>[6-8]</sup>。ALI-BOUCETTA等<sup>[9]</sup>研究了分散在Pluronic F127中的DOX-MWCNT(多壁碳纳米管)超分子复合物对人乳腺癌细胞(MCF7)的体外细胞毒性,与游离DOX和DOX-Pluronic F127配合物相比,非共价DOX-MWCNT配合物具有更高的细胞毒性。LIU等<sup>[10]</sup>开发了一种聚乙二醇功能化单壁碳纳米管(SWCNT)负载DOX的给药系统SWCNT-DOX,与游离DOX相比,SWCNT-DOX中的DOX循环半衰期延长了近10倍,肿瘤对DOX摄取量增加了一倍。JI等<sup>[11]</sup>利用壳聚糖(CHI)修饰的SWNT构建了一种可控载/释放DOX的新型给药体系,其能有效杀伤肝癌细胞SMMC-7721,较好抑制肝癌裸鼠生长。EMANET等<sup>[12]</sup>证明了BNNTs是一种潜在的含芳香环的化疗药物(如DOX)的有效载体,可提高药物的治疗效率,减少其副作用。硼氮碳纳米管(BCNNTs)作为CNTs和BNNTs的结构类似物,也具有许多优异的物化性质<sup>[13-14]</sup>,可以通过强酸(如硝酸)氧化等方法在B位点、C位点和N位点分别引入—OH、—COOH和—NH<sub>2</sub>基团,这有利于纳米管表面的功能化,提高纳米管的分散性和载药量,从而使BCNNTs有望成为一种良好的药物载体。

目前,BCNNTs的制备方法主要有电弧放电法、激光蒸发法、化学气相沉积法、模板法、热解法、固相合成法。其中,固相合成法通常采用碳源、硼源(如硼酸)和氮源(如尿素)作为起始原料并添加一定量的催化剂,在N<sub>2</sub>或NH<sub>3</sub>氛围中加热反应合成。MO等<sup>[15]</sup>以无定形硼粉和活性炭粉为原料,Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>为催化剂,混合球磨后在N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>气氛下650℃还原后,再在1100℃反应6h,获得了直径均匀的BCNNTs。闭晓帆等<sup>[16]</sup>以活性炭、无定形硼粉、尿素为原料,九水合硝酸铁为催化剂,先采用共沉淀

法制备出中间体,随后在N<sub>2</sub>下800℃退火1h,并在NH<sub>3</sub>下1200℃反应3h获得了表面光滑的竹节状BCNNTs。曹利华等<sup>[17]</sup>以硼粉和氯化铁为原料,在NH<sub>3</sub>氛围下升温至1000℃,用N<sub>2</sub>通入乙醇带入碳源,升温至1200℃保温3h,获得竹节状BCNNTs。LI等<sup>[18]</sup>发现,在N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>混合气流下加热球磨后的无定形硼粉和活性炭的混合粉末及少量Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>,在反应温度1000℃时,主要形成竹节状BCNNTs,当温度升至1100℃时,竹节状和准中空状BCNNTs共存,而当温度进一步升高至1200℃时,则为中空BCNNTs。综上,固相合成法虽然合成工艺较为简单,但是产物不纯,通常容易夹杂催化剂颗粒,需要对产物进行提纯处理。

为了提高DOX的治疗效率,降低DOX在癌症治疗中引起的副作用和耐药性,本文拟以硼粉为原料、ZnO和Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>为催化剂、N<sub>2</sub>为氮源、无水乙醇为碳源,在高温N<sub>2</sub>、乙醇蒸气和H<sub>2</sub>混合气氛下采用改进的固相合成法来合成BCNNTs;接着,用浓硝酸对BCNNTs改性;然后,采用叶酸(FA)靶向修饰BCNNTs形成FA-BCNNTs;最后通过 $\pi$ - $\pi$ 相互作用将DOX负载在FA-BCNNTs上,得到纳米复合物人乳腺癌(FA-BCNNTs-DOX),以实现靶向给药的目的。选用MDA-MB-231细胞为肿瘤模型,考察FA-BCNNTs-DOX的体外抗肿瘤活性。以期BCNNTs可作为一种优异的纳米药物载体,应用在生物医学领域。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

无定形硼粉,丹东化工研究所;ZnO、Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>,AR,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;盐酸阿霉素(DOX·HCl)、缓冲液(Hepes),北京索莱宝科技有限公司;FA、N-(3-二甲氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸(EDC·HCl)、4-(N,N-二甲氨基吡啶)(DMAP),AR,上海麦克林生化科技股份有限公司;磷酸盐缓冲液(PBS),武汉塞维尔生物科技有限公司;胎牛血清(FBS),浙江天杭生物科技有限公司;DMEM培养基,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;双抗(青霉素/链霉素)、4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)、细胞计数试剂盒(CCK8)、钙黄绿素/碘化丙啶双染试剂(Calcein AM/PI),上海碧云天生物科技有限公司;无水乙醇(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH)、浓盐酸(HCl,质量分数37.5%)、浓硝酸(质量分数65%),西陇化工有限公司;N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>混合气体(H<sub>2</sub>体积分数为15%),海南金厚气体公司。

BK-FD10S台式真空冷冻干燥机,山东博科生物产业有限公司;S-4800扫描电子显微镜,日本Hitachi公司;SmartLab型X射线衍射仪,日本理学

株式会社; Frontier 傅里叶变换红外光谱仪, 美国 Perkin Elmer 仪器有限公司; Evolution 220 紫外-可见分光光度计、Nanodrop 2000C 微量紫外-可见分光光度计、Countess II 细胞计数仪 (配备 EVOS™ 光立方), 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; WJ-2 二氧化碳细胞培养箱, 上海跃进医疗器械有限公司; Spark 多功能酶标仪, 瑞士 Tecan 公司; DMi8 全自动倒置微分干涉显微镜, 德国 Leica 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 BCNNTs 的合成

将 2.50 g (0.23 mol) 硼粉、28.23 g (0.35 mol) ZnO 和 1.85 g (0.0115 mol) Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 分散在 50 mL 无水乙醇中, 搅拌混合均匀后转移至 80 °C 真空干燥箱中干燥 24 h 后, 充分研磨得到混合物料约 32 g。称取 0.8 g 混合物料置入管式炉中, 在 N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> 混合气体 (H<sub>2</sub> 体积分数为 15%) 中以 10 °C/min 的速率程序升温至 650 °C, 并在该温度下保温 1 h; 然后继续以 10 °C/min 升温到 1150 °C, 立即将 N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> 混合气体通过鼓泡的方式将无水乙醇带入到管式炉中进行反应, 整个过程中气体流量均为 50 mL/min。在 1150 °C 保温 0.5 h 后关闭加热使其自然降温, 待管式炉冷却至室温, 得到黑色蓬松丝绒状产物, 质量约为 200 mg。

1.2.2 FA-BCNNTs 的合成

采用 FA 对 BCNNTs 进行修饰使其具有靶向性。首先, 称取 100 mg BCNNTs 样品, 加入到 100 mL 硝酸中, 在室温下超声分散 6 h, 在 1.5×10<sup>4</sup> r/min 转速下进行离心分离, 将沉淀反复用去离子水清洗至中性, 然后在台式真空冷冻干燥机-50 °C 下冷冻干燥 24 h, 得到含有羟基修饰的 BCNNTs (记为 BCNNTs-OH)。接着, 将 20 mg (0.045 mmol) FA 溶于 20 mL 去离子水中, 并将 20 mg (0.104 mmol) EDC·HCl 和 40 mg (0.327 mmol) DMAP 加入到 FA 溶液中磁力搅拌 1 h, 使 FA 活化。然后, 将 20 mg BCNNTs-OH 加入到该混合液中继续搅拌 12 h, 1.5×10<sup>4</sup> r/min 下离心分离 30 min, 收集沉淀, 并用去离子水反复洗涤沉淀以除去未反应完全的 FA。最后, 在-50 °C 下冷冻干燥 24 h, 得到 FA-BCNNTs。

1.2.3 DOX 的负载

FA-BCNNTs-DOX 的制备示意图如图 1 所示。

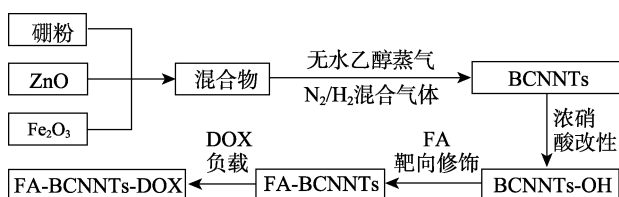


图 1 FA-BCNNTs-DOX 的制备示意图

Fig. 1 Schematic diagram of preparation of FA-BCNNTs-DOX

首先, 将 5.3 mg (9 μmol) DOX·HCl 溶解于 10 mL PBS (pH=7.4) 中; 然后, 将 20 mg FA-BCNNTs 和 20 mg BCNNTs 分别加入到 2.5 mL DOX 溶液中, 并置于 37 °C 恒温摇床中振荡 30 h, 使 DOX 与 BCNNTs 充分结合; 随后, 将混合液以 1.5×10<sup>4</sup> r/min 的转速离心分离 15 min, 并用 PBS (pH=7.4) 洗涤沉淀 3 次除去游离的 DOX, 收集每次离心后的上清液, 用于后续计算 DOX 负载量, 沉淀置于 4 °C 冰箱中保存, 得到负载 DOX 的纳米复合物 BCNNTs-DOX 和 FA-BCNNTs-DOX。DOX 在 BCNNTs 或者 FA-BCNNTs 上的负载量按式 (1) 计算:

$$L = \frac{m_0 - m_1}{m} \quad (1)$$

式中: L 为 DOX 的负载量, mg/g; m<sub>0</sub> 为 DOX 的初始质量, mg; m<sub>1</sub> 为游离 DOX 的质量, mg; m 为 BCNNTs (或 FA-BCNNTs) 的质量, g。

1.3 表征方法与性能测试

采用扫描电子显微镜对 BCNNTs 的形貌进行表征。通过 X 射线衍射仪采集 BCNNTs 的 XRD 谱图, Cu 靶 (λ=0.1546 nm), 扫描范围 10°~80°, 扫描速率 5 (°)/min。采用紫外-可见分光光度计测试 DOX、BCNNTs-DOX 和 FA-BCNNTs-DOX 的 UV-Vis 吸收光谱。采用微量紫外-可见分光光度计测试不同浓度 DOX 在 488 nm 的吸光度。使用 KBr 压片法采用傅里叶变换红外光谱仪测试 BCNNTs、FA-BCNNTs、BCNNTs-DOX、FA-BCNNTs-DOX 的 FTIR 谱图。

1.4 细胞培养

以人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞为实验对象进行体外细胞实验。细胞采用完全培养液进行培养, 然后置于含有体积分数为 5% CO<sub>2</sub> 的 37 °C 细胞培养箱中进行培养。完全培养液由 DMEM 添加体积分数为 10% FBS、体积分数为 1% 双抗 (青霉素/链霉素) 以及体积分数 1% HEPES 配制而成。当细胞贴壁生长密度 > 75% 以后进行传代培养。

1.5 抗肿瘤性能测试

1.5.1 细胞摄取

采用全自动倒置微分干涉显微镜观察 MDA-MB-231 细胞对 DOX、BCNNTs-DOX 和 FA-BCNNTs-DOX 的摄取情况。具体步骤为: 将 MDA-MB-231 细胞接种在 6 孔板上, 每孔细胞数量为 4×10<sup>5</sup> 个, 培养 24 h 后分别加入 DOX、BCNNTs-DOX、FA-BCNNTs-DOX (DOX 等效质量浓度为 10 mg/L) 孵育 4 h; 然后用 DAPI 染色 15 min, 并用 PBS (pH=7.4) 洗涤 3 次; 最后用全自动倒置微分干涉显微镜对细胞进行成像。

为了进一步研究 FA 介导的主动靶向作用, 设计了游离的 FA 对 FA-BCNNTs-DOX 的竞争性抑制

实验。用不同浓度(0、10、20  $\mu\text{mol/L}$ )的游离 FA 预处理 MDA-MB-231 细胞 1 h; 然后, 加入 FA-BCNNTs-DOX (DOX 质量浓度为 1 mg/L) 孵育 4 h, 加入 DAPI 染色 15 min 后用 PBS (pH=7.4) 洗涤 3 次, 最后采用全自动倒置微分干涉显微镜观察并成像。

### 1.5.2 细胞活力测定

采用 CCK8 测定体外细胞活力。将 MDA-MB-231 细胞接种于 96 孔板中 ( $n=3$ ), 每孔细胞数量为  $5 \times 10^4$  个。培养 24 h 后, 分别加入不同质量浓度 (10、20、50、100、200 mg/L) 的 FA-BCNNTs 和含不同 DOX 质量浓度 (0.1、0.2、0.4、0.8、1.0 mg/L) 的 DOX、BCNNTs-DOX、FA-BCNNTs-DOX。将细胞分别培养 24、48、72 h 后, 去掉培养基, 重新加入 100  $\mu\text{L}$  含有体积分数为 10% CCK8 溶液的培养基 (不含 FBS), 放回细胞培养箱继续孵育 2 h 后用多功能酶标仪读取 96 孔板每个孔在 450 nm 处的吸光度 ( $\text{OD}_{450}$ ), 根据式 (2) 计算细胞活力:

$$V/\% = \frac{A_1 - A_0}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

式中:  $V$  为细胞活力, %;  $A_0$  为不加入任何材料或药物的对照组的吸光度;  $A_1$  为实验组的吸光度。

采用活/死染色测定细胞活力。将 MDA-MB-231 细胞接种在细胞培养皿中 ( $n=3$ ), 每个皿中细胞数量为  $2 \times 10^5$  个, 培养 24 h; 接着, 分别加入质量浓度为 800 mg/L 的 DOX、BCNNTs-DOX、FA-BCNNTs-DOX, 继续培养 48 h; 然后, 用胰蛋白酶将细胞消化, 并用 PBS (pH=7.4) 离心洗涤 3 次, 最后 1 次离心后用 100  $\mu\text{L}$  PBS (pH=7.4) 重悬; 最后, 将 Calcein-AM (1  $\mu\text{L}$ ) 和 PI (1  $\mu\text{L}$ ) 同时加入细胞悬液中, 染色 15 min 后, 每个样品取 10  $\mu\text{L}$  加入到细胞计数板中, 通过细胞计数仪对细胞进行成像。

### 1.5.3 体外释放实验

配制 pH=4.5 和 7.4 的 PBS 模拟肿瘤细胞和正常细胞的生理液环境。分别取 0.2 mL BCNNTs-DOX 和 FA-BCNNTs-DOX (质量浓度为 1 mg/L) 悬浮液, 以  $1.5 \times 10^4$  r/min 转速离心 15 min 去除上清液; 再用 0.4 mL pH=4.5 和 7.4 PBS 进行重悬, 将样品编号并置于 37  $^{\circ}\text{C}$  的恒温摇床避光振荡, 每隔一定时间离心 10 min, 每个样品均取 100  $\mu\text{L}$  上清液到新离心管内, 并重新补充 100  $\mu\text{L}$  相对应 pH 的新鲜 PBS, 继续在恒温摇床上避光振荡。释放 96 h 后, 使用微量紫外-可见分光光度计测量所有上清液样品在 488 nm 处的吸光度, 根据 DOX 的标准曲线 [式 (3)], 分析计算 BCNNTs-DOX 和 FA-BCNNTs-DOX 所释放的 DOX 累积量, 最终根据式 (4) 得到 DOX 的累积释放率:

$$y = 1.20225x - 0.03655 \quad (R^2 = 0.9969) \quad (3)$$

$$r/\% = \frac{x}{x_0} \times 100 \quad (4)$$

式中:  $x$  为释放  $t$  时刻 DOX 的质量浓度, mg/L;  $y$  为吸光度;  $r$  为累积释放率, %;  $x_0$  为 DOX 的初始质量浓度, mg/L。

### 1.5.4 统计分析

采用 SPSS 软件进行单因素方差分析 (ANOVA)。结果以“均值 $\pm$ 标准偏差”表示。当  $P < 0.05$  时, 为数据间具有显著性差异 (\*)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 BCNNTs 的表征

对 BCNNTs 进行了 XRD、FTIR 和 SEM 测试, 结果见图 2 和图 3。

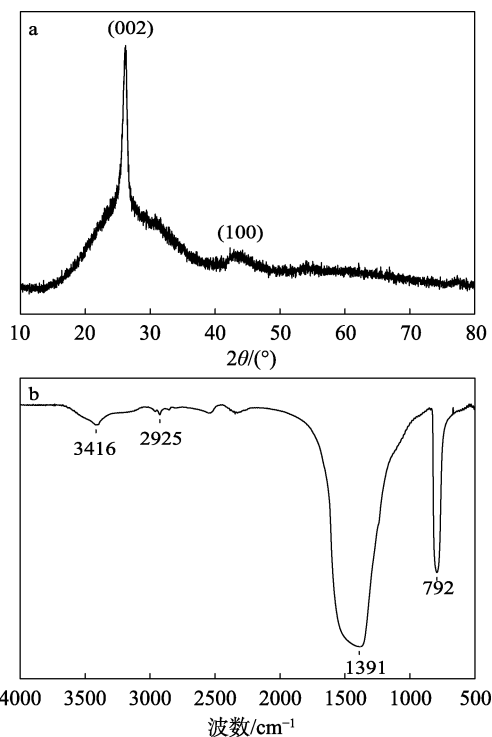


图 2 BCNNTs 的 XRD (a) 及 FTIR (b) 谱图  
Fig. 2 XRD pattern (a) and FTIR spectrum (b) of BCNNTs

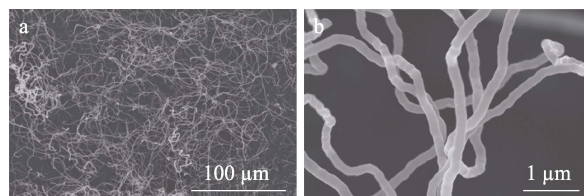


图 3 BCNNTs 的 SEM 图  
Fig. 3 SEM images of BCNNTs

由图 2a 可见, 在  $2\theta=26.2^{\circ}$  和  $43.2^{\circ}$  处存在两个特征衍射峰分别对应于 BCNNTs (JCPDS No. 53-0047) 的 (002) 和 (100) 晶面<sup>[16]</sup>, 且未观察到其他杂峰。由图 2b 可见, 在 3416、2925、1391、792  $\text{cm}^{-1}$

处出现的吸收峰分别归属于 O—H、C—H 和 B—N 键的伸缩振动以及 B—N—B 的弯曲振动, 表明 BCNNTs 的成功合成。由图 3a 和 b 可以发现, BCNNTs 表面有大量的纳米管生成, 且纳米管的表面光滑, 直径大约为 320 nm。

### 2.2 FA-BCNNTs-DOX 的合成

对 FA、BCNNTs、BCNNTs-DOX、FA-BCNNTs-DOX 进行了 UV-Vis 和 FTIR 测试, 结果见图 4。

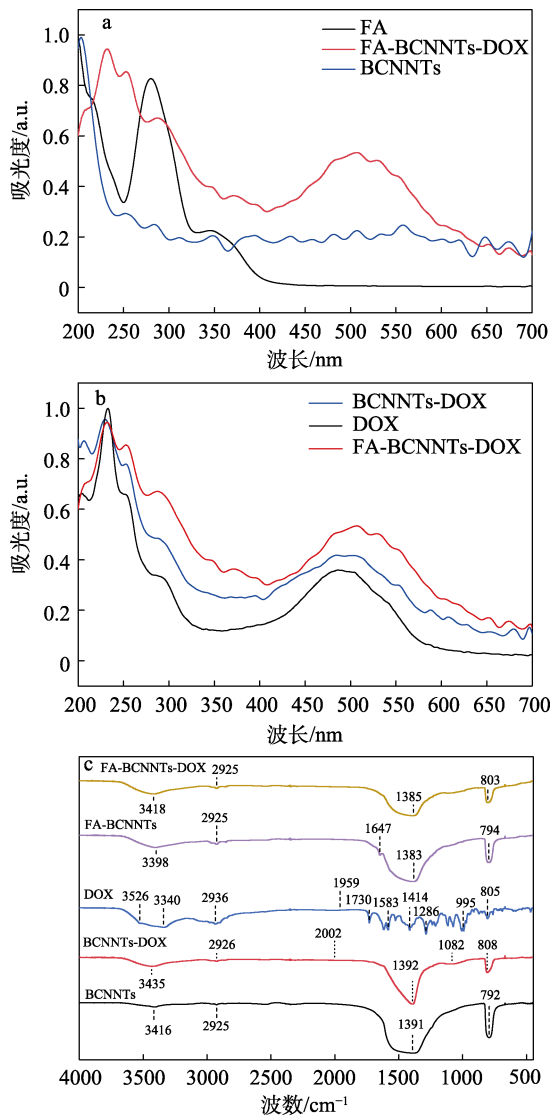


图 4 样品的 UV-Vis 吸收 (a、b) 及 FTIR 谱图 (c)  
Fig. 4 UV-Vis adsorption spectra (a, b) and FTIR spectra (c) of samples

由图 4a 可见, 相比于 BCNNTs, FA-BCNNTs-DOX 在 280 nm 处出现了吸收峰, 这归属于 FA 的特征吸收峰, 表明 FA 成功修饰到 BCNNTs 上。经浓硝酸氧化, BCNNTs 产生了极性基团, 能够通过酯化反应与 FA 结合, 形成 FA-BCNNTs 复合物<sup>[19]</sup>。在图 4b 中, 游离 DOX 的吸收峰位于 233、252、488 nm 处, 复合物 BCNNTs-DOX 和 FA-BCNNTs-DOX 均在 488 nm 附近存在一个很强的肩峰, 在 233 和 252 nm

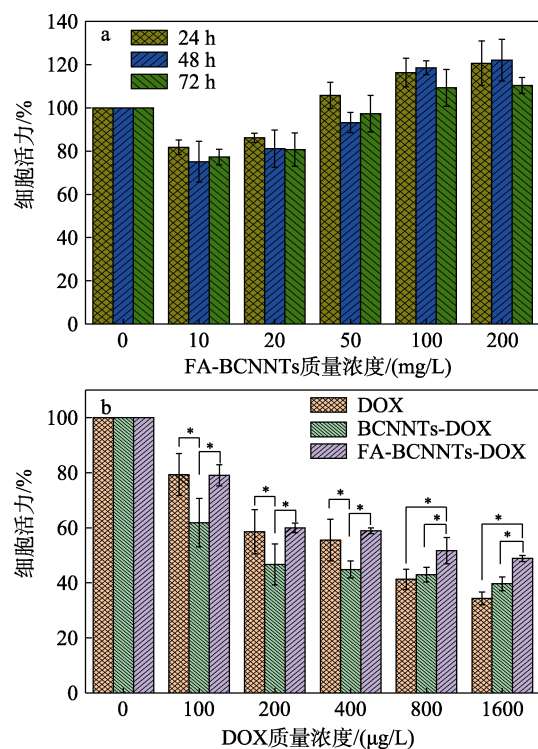
附近也出现了吸收峰, 这归属于 DOX 的特征吸收峰。但相比于游离的 DOX, 复合物 BCNNTs-DOX 和 FA-BCNNTs-DOX 中 DOX 的特征吸收峰分别红移至 493 和 510 nm 处, 这是由于 BCNNTs 与 DOX 之间的  $\pi$ - $\pi$  堆积<sup>[20]</sup>和疏水作用导致<sup>[21]</sup>。

为了研究 DOX 在 BCNNTs-DOX 和 FA-BCNNTs-DOX 上的负载量, 绘制了 DOX 在 488 nm 处的标准吸收曲线 [式 (3)]。根据计算可以得出, DOX 在 BCNNTs 和 FA-BCNNTs 的负载量分别为 67.33 和 87.11 mg/g。经过 FA 修饰后 BCNNTs 对 DOX 的负载量明显增大, 这可能是由于 FA 的修饰增加了纳米管的负电荷和分散性, 促进了溶液中 BCNNTs 与 DOX 之间的静电相互作用<sup>[22]</sup>。

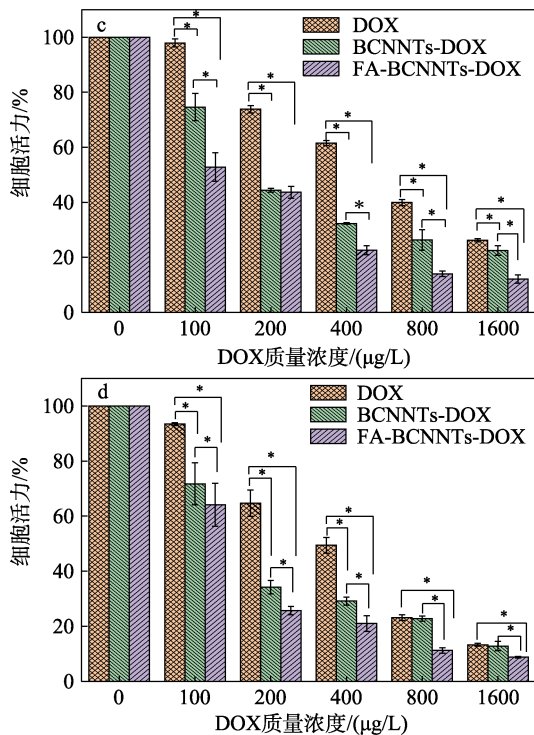
由图 4c 可知, BCNNTs、FA-BCNNTs、BCNNTs-DOX、FA-BCNNTs-DOX 4 种物质均约在 794、1383、2925  $\text{cm}^{-1}$  处存在吸收峰, 分别对应于 B—N—B 的弯曲振动、B—N 键的伸缩振动、C—H 键的拉伸振动。对于 FA-BCNNTs, 在 1647  $\text{cm}^{-1}$  处有一个吸收峰, 归属于 CO—NH 基团中 N—H 键的弯曲振动, 表明 BCNNTs 上成功嫁接了 FA。在 FA-BCNNTs-DOX 和 BCNNTs-DOX 中, 由于 BCNNTs 的含量远远超过了 DOX, 因此无法观察到 DOX 的红外特征吸收峰。UV-Vis 吸收光谱和 FTIR 结果都表明, BCNNTs-DOX 和 FA-BCNNTs-DOX 已成功构筑。

### 2.3 细胞活力测定

载体的生物相容性是药物递送系统一个重要性能。采用 CCK8 法测定 FA-BCNNTs 的生物相容性及体外抗肿瘤作用, 结果如图 5 所示。







误差线表示标准偏差 ( $n=3$ )

图5 不同质量浓度的FA-BCNNTs处理后MDA-MB-231细胞活力(a);不同质量浓度的DOX、BCNNTs-DOX和FA-BCNNTs-DOX分别处理24h(b)、48h(c)、72h(d)后MDA-MB-231细胞活力

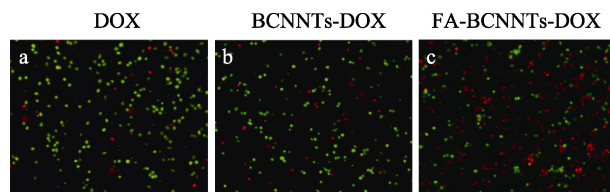
Fig. 5 Viability of MDA-MB-231 cells treated with different mass concentrations of FA-BCNNTs (a); Viability of MDA-MB-231 cells treated with different mass concentrations of DOX, BCNNTs-DOX and FA-BCNNTs-DOX for 24 h (b), 48 h (c), 72 h (d)

由图5a可知,MDA-MB-231细胞在质量浓度高达200 mg/L的FA-BCNNTs中孵育72 h后,其细胞活力也没有明显的变化,表明FA-BCNNTs是一种安全的药物递送载体。

图5b~d分别展示了在不同时间和质量浓度的影响下,DOX、BCNNTs-DOX和FA-BCNNTs-DOX对MDA-MB-231细胞的毒性。结果表明,DOX、BCNNTs-DOX和FA-BCNNTs-DOX均能明显降低细胞活力,且表现出了时间和剂量依赖性。但在相同剂量的DOX作用下,DOX、BCNNTs-DOX和FA-BCNNTs-DOX对MDA-MB-231细胞却表现出不同的毒性。由图5b可见,在孵育初始阶段,BCNNTs-DOX比DOX能够引起更多的细胞死亡,这可能是细胞对低质量浓度游离的DOX摄取量少且会被快速排除到细胞外<sup>[18]</sup>。然而,FA-BCNNTs-DOX表现出了比DOX和BCNNTs-DOX更低的细胞毒性,这是由于DOX与FA之间形成了额外的氢键,导致DOX释放需要一定的时间,使能作用于细

胞的DOX量减少,细胞死亡减少<sup>[23]</sup>。由图5c、d可见,随着药物质量浓度的增加以及与细胞共同孵育时间的延长,FA-BCNNTs-DOX表现出比DOX和BCNNTs-DOX更高的细胞增殖抑制能力。质量浓度为1600 µg/L的DOX、BCNNTs-DOX、FA-BCNNTs-DOX培养48 h后,MDA-MB-231细胞活力分别降至26.22%、22.46%、12.12%;培养72 h后分别降至13.26%、12.77%、8.74%。结果表明,在FA受体介导的内吞作用下,MDA-MB-231细胞对FA-BCNNTs-DOX的摄取能力得到提高,进入细胞后的FA-BCNNTs-DOX在酸性条件下释放DOX,在细胞核内逐步积累,产生优异的抗肿瘤效果<sup>[24]</sup>。

采用活/死试剂染色分别测试了DOX、BCNNTs-DOX和FA-BCNNTs-DOX对MDA-MB-231细胞的毒性,结果见图6。由图6可以看出,加入相同质量浓度(800 µg/L)DOX孵育48 h后,MDA-MB-231细胞出现了不同程度的死亡,相比于DOX和BCNNTs-DOX,经FA-BCNNTs-DOX孵育后,死细胞的比例大幅度增加,仅有少量细胞存活。说明FA-BCNNTs-DOX能引起更多的细胞死亡,表现出优异的抗肿瘤效率。



绿色代表活细胞;红色代表死细胞

图6 分别与DOX(a)、BCNNTs-DOX(b)、FA-BCNNTs-DOX(c)孵育后,MDA-MB-231细胞的染色结果  
Fig. 6 Staining results of MDA-MB-231 cells after incubation with DOX (a), BCNNTs-DOX (b) and FA-BCNNTs-DOX (c)

## 2.4 细胞摄取药物

采用全自动倒置微干涉显微镜观察了MDA-MB-231细胞分别对DOX、BCNNTs-DOX、FA-BCNNTs-DOX 3种药物的摄取情况,结果如图7所示。由图7可见,在与药物共同孵育4 h后,3组细胞的细胞核周围均出现了不同程度的红色荧光,表明DOX在细胞内聚集。其中,DOX孵育组的细胞仅能观察到微弱的红色荧光,表明细胞对DOX的摄取量很低。因为DOX是以被动扩散的方式进入细胞<sup>[25]</sup>,其中一些很容易被P-糖蛋白排出,造成DOX的核积累量低<sup>[26]</sup>。与BCNNTs-DOX孵育组相比,FA-BCNNTs-DOX孵育组的细胞核内红色荧光更加明亮,表明细胞对FA-BCNNTs-DOX的摄取量更高。由于FA配体的存在,在摄取过程中FA-BCNNTs-DOX能够与MDA-MB-231细胞膜上的FA受体特异性结合,通

过受体介导的内吞作用，提高了细胞对 FA-BCNNTs-DOX 的摄取能力，显示出 FA-BCNNTs 具有靶向递送药物的能力，有望成为一种良好药物载体。

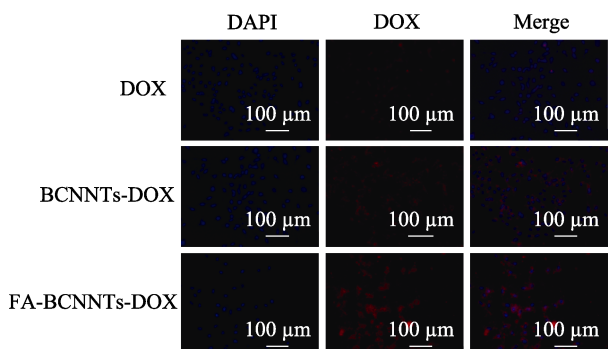


图 7 细胞内 DOX、BCNNTs-DOX、FA-BCNNTs-DOX 分布的荧光显微镜图像

Fig. 7 Fluorescence images of intracellular uptake of DOX, BCNNTs-DOX and FA-BCNNTs-DOX

为了进一步证实 MDA-MB-231 细胞对 FA-BCNNTs-DOX 的摄取是通过 FA 受体介导的，分别将不同浓度 (0、10、20 μmol/L) 的游离 FA 加入到 MDA-MB-231 细胞中，先与细胞孵育 1 h，然后再加入 FA-BCNNTs-DOX 一起孵育 4 h，采用全自动倒置微分干涉显微镜观察细胞内 DOX 的含量，结果见图 8。

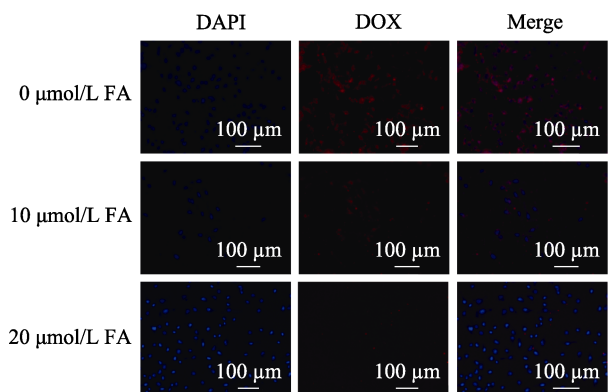


图 8 经 0、10、20 μmol/L 游离 FA 预处理后，MDA-MB-231 细胞内摄取的 FA-BCNNTs-DOX 的荧光显微镜图像

Fig. 8 Fluorescence images of the uptake of FA-BCNNTs-DOX by MDA-MB-231 cells after pretreatment with 0, 10, and 20 μmol/L of free FA

由图 8 可以看出，采用游离 FA 预处理后，MDA-MB-231 细胞核内红色荧光强度明显减弱，且随着游离 FA 质量浓度的增加，荧光强度降低得更多。这是因为，游离 FA 能够先与细胞表面过度表达的 FA 受体特异性结合，从而起到竞争性抑制作用，减弱了细胞对 FA-BCNNTs-DOX 的摄取能力。该结果进一步证实 MDA-MB-231 细胞是通过叶酸受体介导

的内吞作用对 FA-BCNNTs-DOX 进行摄取的。FA-BCNNTs 能够将 DOX 靶向递送到 MDA-MB-231 细胞内，提高药物的递送效率，有效避免因 DOX 的非选择性扩散引起的对正常细胞的损伤。

2.5 体外释放实验分析

测试了 BCNNTs-DOX 和 FA-BCNNTs-DOX 在不同 pH 的 PBS 中释放情况，结果见图 9。pH 为 7.4 的缓冲溶液对应于正常组织中的 pH，而 pH 为 4.5 对应于癌细胞内容酶体和内涵体中的 pH<sup>[27]</sup>。由图 9 可见，BCNNTs-DOX 和 FA-BCNNTs-DOX 具有相似的释放特性。在前 12 h，DOX 从 BCNNTs-DOX 和 FA-BCNNTs-DOX 中快速释放，随后 DOX 的释放速率相对减缓。并且 DOX 的释放具有 pH 依赖性，在中性条件下，DOX 的释放量较小；而在酸性条件下，DOX 的释放量显著增加，这是由于在酸性条件下 DOX 分子上的氨基容易发生质子化，使 DOX 与 FA-BCNNTs、BCNNTs 之间发生疏水相互作用，从而显著提高了 DOX 的释放速率<sup>[25]</sup>。此外，对 FA-BCNNTs-DOX 来说，在 pH=4.5 和 7.4 条件下释放 96 h 后，DOX 的累积释放率分别约为 66.04% 和 18.20%，而 BCNNTs-DOX 则分别为 57.38%、11.71%。在相同 pH 下，FA-BCNNTs-DOX 的累积释放率比 BCNNTs-DOX 大。在 FA-BCNNTs-DOX 中，FA 的羧基基团与 DOX 羟基基团之间存在氢键的相互作用，但由于酸性溶液中 H<sup>+</sup> 的竞争作用，该氢键作用被明显削弱，导致更多 DOX 的释放<sup>[24]</sup>。并且 DOX 在 FA-BCNNTs 上的负载量大于 BCNNTs，在相同释放条件下，FA-BCNNTs-DOX 能够释放更多的 DOX。因此，体外释放实验表明，FA-BCNNTs-DOX 和 BCNNTs-DOX 均能在癌细胞内实现 DOX 的 pH 响应性释放，这有助于提高 DOX 的生物利用度，减少其对正常细胞的损伤。

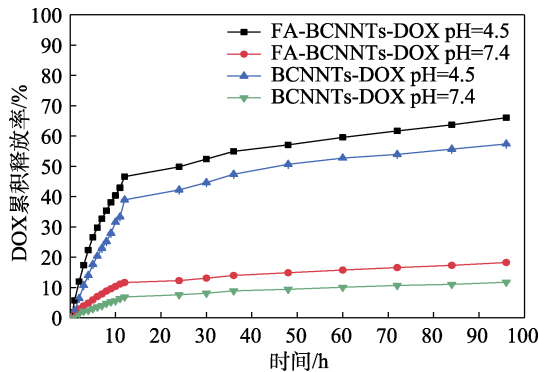


图 9 BCNNTs-DOX 和 FA-BCNNTs-DOX 分别在 pH=4.5 和 7.4 的 PBS 中 DOX 累积释放率随时间的变化

Fig. 9 Change of cumulative rate of DOX released from BCNNTs-DOX and FA-BCNNTs-DOX with time in PBS with pH 4.5 and 7.4, respectively

### 3 结论

通过改进的固相合成法制备了 BCNNTs, 并利用 FA 修饰 BCNNTs 得到 FA-BCNNTs, 用于负载化疗药物 DOX, 构筑了 FA-BCNNTs-DOX 靶向载药体系。通过研究 FA-BCNNTs-DOX 体外抗肿瘤作用、进入细胞的方式以及 pH 缓释行为, 得出以下结论:

(1) FA 经酯化反应实现了对 BCNNTs 的修饰, FTIR、UV-Vis 分析证实了 FA 已成功修饰到 BCNNTs 上, 体外细胞毒性实验表明了 FA-BCNNTs 在质量浓度高达 200 mg/L 时仍对 MDA-MB-231 细胞无毒, 这意味着 FA-BCNNTs 作为药物载体有非常好的应用前景;

(2) DOX 通过非共价的  $\pi$ - $\pi$  堆积和疏水作用负载在 BCNNTs 和 FA-BCNNTs 上, 其负载量分别为 87.11 和 67.33 mg/g, FA 的存在可以提高 BCNNTs 的载药量以及分散性;

(3) 体外细胞毒性实验表明, FA-BCNNTs-DOX、BCNNTs-DOX 和 DOX 均能使 MDA-MB-231 细胞活力明显降低, 且都表现出了时间依赖性和剂量依赖性。其中, FA-BCNNTs-DOX 的体外抗肿瘤活性显著高于 BCNNTs-DOX 和 DOX;

(4) FA-BCNNTs-DOX 以 FA 受体介导的方式内化到癌细胞内部, 通过靶向递送可以提高药物的递送速率, 减少药物剂量, 使药物聚集在癌细胞处;

(5) 体外释放实验表明, FA-BCNNTs-DOX、BCNNTs-DOX 具有 pH 响应性释放特点, 避免了 DOX 非选择性扩散对正常细胞的损伤, 提高了药物的治疗效果和生物利用度。因此, FA-BCNNTs-DOX 靶向给药系统的构建能有效提高抗肿瘤药物 DOX 的治疗效率。

#### 参考文献:

[1] LI J D (李进典), HONG X F (洪杏芳), ZHANG J (张健), *et al.* Advances in research on targeting drug delivery system of doxorubicin[J]. Progress in Pharmaceutical Sciences (药学进展), 2014, 38(12): 910-915.

[2] VEJONGSA P, YEH E T H. Prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity[J]. Journal of the American College of Cardiology, 2014, 64(9): 938-945.

[3] LIU C (刘策), WANG Z X (王志祥), WU F W (武法文). Preparation of zeolitic imidazolate frameworks ZIF-8 and its application in the drug response release[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2019, 36(9): 1767-1772.

[4] PAN Y F (潘远凤). A multi-responsive nanogels for delivery of doxorubicin hydrochloride[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2020, 37(12): 2554-2561.

[5] YAGHOUBI A, RAMAZANI A. Anticancer DOX delivery system based on CNTs: Functionalization, targeting and novel technologies[J]. Journal of Controlled Release, 2020, 327: 198-224.

[6] CHADAR R, AFZAL O, ALQAHTANI S M, *et al.* Carbon nanotubes as an emerging nanocarrier for the delivery of doxorubicin for improved chemotherapy[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2021, 208: 112044.

[7] TURHAN E A, PAZARCEVIREN A E, ENIS Z, *et al.* Properties and applications of boron nitride nanotubes[J]. Nanotechnology, 2022,

33: 242001.

[8] YANG H (杨欢), LI W (李巍), XU M (许蒙), *et al.* Characterization of hydroxylated boron nitride nanotubes and its effect on L02 cells[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2021, 38(5): 941-946.

[9] ALI-BOUCETTA H, AL-JAMAL K T, MCCARTHY D, *et al.* Multiwalled carbon nanotube-doxorubicin supramolecular complexes for cancer therapeutics[J]. Chemical Communications, 2008, 8(4): 459-461.

[10] LIU Z, FAN A C, RAKHRA K, *et al.* Supramolecular stacking of doxorubicin on carbon nanotubes for *in vivo* cancer therapy[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2009, 48: 7668-7672.

[11] JI Z F, LIN G F, LU Q H, *et al.* Targeted therapy of SMMC-7721 liver cancer *in vitro* and *in vivo* with carbon nanotubes based drug delivery system[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2012, 365(1): 143-149.

[12] EMANET M, ŞEN Ö, ÇULHA M. Evaluation of boron nitride nanotubes and hexagonal boron nitrides as nanocarriers for cancer drugs[J]. Nanomedicine, 2017, 12(7): 797-810.

[13] MIYAMOTO Y, RUBIO A, COHEN M L, *et al.* Chiral tubules of hexagonal BC2N[J]. Physical Review, 1994, 50(7): 4976-4979.

[14] DOROZHKIN P S, GOLBERG D, BANDO Y, *et al.* Field emission from individual B—C—N nanotube rope[J]. Applied Physics Letters, 2002, 81(6): 1083-1085.

[15] MO L B, CHEN Y J, LUO L J. Solid-state reaction synthesis of boron carbonitride nanotubes[J]. Applied Physics A, 2010, 100(1): 129-134.

[16] BI X F (闭晓帆), CHEN Y J (陈拥军), LI J (李娟), *et al.* Effect of catalyst content on the formation of boron nitride nanotubes by co-precipitation and annealing method[J]. Journal of Materials Science & Engineering (材料科学与工程学报), 2013, 31(4): 557-561.

[17] CAO L H (曹利华), CHEN Y J (陈拥军), LI J B (李建保), *et al.* Ferrous chloride-catalyzed synthesis of boron carbonitride nanotube[J]. Journal of Synthetic Crystals (人工晶体学报), 2017, 46(3): 562-572.

[18] LI W, XIE X, WU T T, *et al.* Targeted delivery of Auristatin PE to Hep G2 cells using folate-conjugated boron nitride nanotubes[J]. Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications, 2020, 109: 110509.

[19] CIOFANI G, GENCHI G G, LIAKOS I, *et al.* A simple approach to covalent functionalization of boron nitride nanotubes[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2012, 374(1): 308-314.

[20] ZHOU T, ZHOU X M, XING D. Controlled release of doxorubicin from graphene oxide based charge-reversal nanocarrier[J]. Biomaterials, 2014, 35(13): 4185-4194.

[21] HU H Q, YU J H, LI Y Y, *et al.* Engineering of a novel Pluronic F127/graphene nanohybrid for pH responsive drug delivery[J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2011, 100(1): 141-148.

[22] FENG S N, ZHANG H J, YAN T, *et al.* Folate-conjugated boron nitride nanospheres for targeted delivery of anticancer drugs[J]. International Journal of Nanomedicine, 2016, 11: 4573-4582.

[23] HUANG H, YUAN Q, SHAH J S, *et al.* A new family of folate-decorated and carbon nanotube-mediated drug delivery system: Synthesis and drug delivery response[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2011, 63(14): 1332-1339.

[24] FENG S N, ZHANG H J, XU S, *et al.* Folate-conjugated, mesoporous silica functionalized boron nitride nanospheres for targeted delivery of doxorubicin[J]. Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications, 2019, 96: 552-560.

[25] YANG H, LI J X, GU S D, *et al.* Fabrication of hexagonal boron carbonitride nanoplates using for *in vitro* photodynamic therapy and chemo therapy[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2022, 212: 112377.

[26] FENG S N, ZHANG H J, ZHI C Y, *et al.* pH-Responsive charge-reversal polymer-functionalized boron nitride nanospheres for intracellular doxorubicin delivery[J]. International Journal of Nanomedicine, 2018, 13: 641-652.

[27] WAN D (万冬), XI Y J (习钰晶), LI S F (李孙帆), *et al.* Progress on nanocarriers in responsive to tumor microenvironment[J]. Chemical Industry and Engineering (化学工业与工程), 2021, 38(5): 80-87.