

花状碳酸钙的仿生合成及其载药性能

朱琳, 谢晓晓, 杨林

(河南师范大学 化学化工学院, 河南 新乡 453007)

摘要:生理温度下,以无水氯化钙和碳酸钠为原料,硫酸软骨素为靶向试剂,癌细胞分泌物为形貌调控剂,制得花状碳酸钙.运用场发射扫描电子显微镜(FESEM)、X射线粉末衍射仪(XRD)、傅里叶红外光谱仪(FT-IR)对碳酸钙的形貌和结构成分进行了表征测定.激光共聚焦实验和负载实验证明该碳酸钙可以高效负载抗肿瘤药物盐酸阿霉素(DOX),不同pH值下的释放实验表明,该负载体系的DOX更易在弱酸性条件下释放,并且释放较为缓慢,有较好的缓释性能.细胞活性(MTT)实验表明,该负载体系对肿瘤细胞有特异性抑制效果.

关键词:分泌物;花状;碳酸钙;载药;缓释

中图分类号:O611.6

文献标志码:A

具有特殊形貌的碳酸钙纳米材料,因其具有多级组装纳米结构^[1-2]、孔隙率高^[3]、比表面积大^[4]、吸附容量大^[5]和三维结构可设计等优异性能,以及碳酸钙本身具有良好的生物相容性和酸性环境下易降解等优势,在生物医药、生物传感器、吸附、分离和光催化等领域具有广泛的应用前景^[5-6].例如生物医药方面,目前特殊形貌碳酸钙已被应用于抗肿瘤靶向药物载体研究^[7-8].

目前制备特殊形貌纳米结构碳酸钙的方法主要有:模板法,水热法,有机基质、添加剂辅助法等^[9-12].文献[13]以海胆骨架为模型制备类海胆骨架状的碳酸钙.赵丽娜等^[14]以聚丙烯酸钠为模板合成了蝶状文石型碳酸钙.陈先勇等^[15]利用微波水热法合成了六瓣花状、双头扁平铲形、双头矛状等形貌特殊的碳酸钙.文献[16]利用不同含量氯化镁制备出了针状方解石和梭形文石两种形貌和晶相的碳酸钙,还研究了Mg²⁺离子与有机添加剂的结合对其晶型、形貌及结构形成和性能的影响.因此可控合成不同特殊形貌的碳酸钙,并研究其潜在的应用性能具有重要的理论和实际意义.

本文以含有癌细胞分泌物的废弃培养液为形貌调控剂,制备了花状碳酸钙,并研究了花状碳酸钙对抗肿瘤药物盐酸阿霉素(DOX)的负载及释放性能.合成方法简单温和,充分利用了废液培养基.花状碳酸钙负载DOX体系较低浓度下能够特异性杀死肿瘤细胞,作为药物载体具有重要研究价值.

1 实验部分

1.1 试剂

癌细胞的废弃培养液;无水氯化钙CaCl₂(分子量:110.98,分析纯,国药集团化学试剂有限公司);碳酸钠Na₂CO₃(分子量:105.99,分析纯,国药集团化学试剂有限公司);硫酸软骨素CS(BioReagent grade,索莱宝公司).

1.2 碳酸钙的制备

在细胞培养箱37℃条件下,培养癌细胞24h后,收集培养基10mL(细胞另做它用).称取4mg硫酸软骨素溶于4mL上述培养基中形成硫酸软骨素溶液(a),8.9mg无水氯化钙溶于2mL上述培养基中形成氯

收稿日期:2019-05-27;修回日期:2019-12-13.

基金项目:国家自然科学基金(21171051);河南省创新型科技团队(CXTD2009005).

作者简介:朱琳(1989-),女,河南柘城人,河南师范大学博士研究生,研究方向为生物无机化学,E-mail:zhulin1231989@163.com.

通信作者:杨林(1955-),河南师范大学教授,博士生导师,E-mail:yanglin1819@163.com.

化钙溶液(b),8.5 mg 碳酸钠溶于 2 mL 上述培养基中形成碳酸钠溶液(c).首先将 a,b 混合搅拌 30 min 后再将 c 加入反应体系,混匀.放入培养箱继续反应 24 h.离心收集,用去离子水洗涤沉淀、干燥,即可得到花状碳酸钙.

二次水溶液用作对照实验溶剂,其他条件同主题实验一样合成碳酸钙以便作为对照样品.

1.3 碳酸钙的表征

用场发射扫描电子显微镜(FESEM)对样品的形貌和粒径进行表征;用 X 射线粉末衍射仪(XRD)和傅里叶红外光谱仪(FT-IR)对样品进行物相分析;使用紫外分光光度计测量吸光度以研究碳酸钙对抗肿瘤药物 DOX 的吸附和释放;利用细胞活性(MTT)实验检测碳酸钙负载 DOX 体系对于细胞生存活力的影响.

2 结果与讨论

2.1 形貌表征

图 1(a,b)分别为碳酸钙不同放大倍数下的场发射电子显微镜照片.图 1(a)和图 1(b)可以看出样品呈现类似花状的形貌,平均粒径为 $2 \mu\text{m}$,该花状碳酸钙有明显分级结构,是由一簇刺状纳米棒组成的.而不用癌细胞分泌液其他合成条件相同的对照实验合成的样品则是椭球状的,表明癌细胞分泌物在样品合成中起着重要作用.

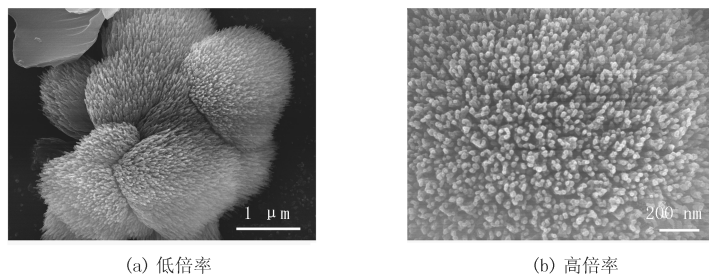


图 1 不同放大倍数的花状碳酸钙的场发射扫描电子显微镜图片

Fig.1 FESEM images of flower-like calcium carbonate

2.2 XRD 测试样品物相

花状碳酸钙的 XRD 图谱见图 2,由图 2 可知,衍射峰位置与标准碳酸钙的 PDF 卡片(PDF33-0268)衍射峰位置吻合,为球霏石.峰形比较尖锐,基本没有其他杂峰出现,表明样品结晶性良好,并且为较纯净晶体.衍射峰 2θ 为 21.0,24.9,27.0,32.7,38.8,39.5,40.8,42.8,43.8,49.1,50.1,51.0,55.8,59.9,62.9,68.7 分别对应于碳酸钙球霏石的(004),(110),(112),(114),(211),(205),(116),(008),(300),(304),(118),(220),(224),(401),(308),(228)晶面.晶胞参数: $a = 0.7147 \text{ nm}$, $b = 0.7147 \text{ nm}$, $c = 1.6917 \text{ nm}$,属于 P63mc 空间群.

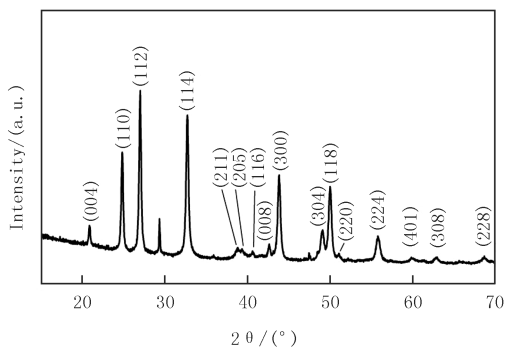


图 2 花状碳酸钙的 XRD 图谱

Fig.2 XRD pattern of flower-like calcium carbonate

2.3 FT-IR

FT-IR 测试结果进一步证实,合成的花状碳酸钙的晶型是球霏石(图 3a).图 3(a)中位于 745 cm^{-1} , 878 cm^{-1} 和 1089 cm^{-1} 的吸收峰可分别归属于球霏石面内弯曲振动特征吸收峰、面外弯曲振动特征吸收峰和对称伸缩振动特征吸收峰^[17-18]. 1444 cm^{-1} 和 1486 cm^{-1} 之间有一个宽峰,可归属于球霏石反对称伸缩振动特征吸收峰^[14].这些结果与 XRD 结果一致.然而对照实验合成的样品红外光谱测试结果图 3(b)显示的是方解石晶型,这一结果进一步表明了癌细胞分泌液在样品合成过程中起着重要作用.

2.4 花状碳酸钙吸附抗肿瘤药物 DOX 的研究

首先绘制吸光度与 DOX 质量浓度的标准曲线.利用不同质量浓度的 DOX 对应不同的紫外吸光度,配制 0.00,0.02,0.04,0.06,0.08,0.10 mg/mL 的 DOX,测定其吸光度,绘制吸光度与 DOX 浓度的标准曲线,如图 4,标准曲线的具体参数如表 1.

其次利用图 4 标准曲线,研究花状碳酸钙对于 DOX 的负载性能.称取 6 mg 的花状碳酸钙置于 4 mL 的 0.1 mg/mL 的 DOX 溶液中,摇床摇晃使其负载.24 h 后离心观察花状碳酸钙的颜色从白色变为了红色.测定剩余 DOX 溶液的吸光度,利用标准曲线计算出剩余的 DOX 量,计算得到负载量和负载率(负载量占被负载总量的百分比)分别为 0.075 15 mg/mg 和 92.4%.另外,为了进一步证实花状碳酸钙确实负载上了 DOX,又做了激光共聚焦实验.图 5 是花状碳酸钙负载 DOX 的激光共聚焦实验图像.图 5(a)为明场图像,图 5(b)为盐酸四环素染钙的绿色荧光图像,图 5(c)为 DOX 的自发荧光图像,图 5(d)为叠加图.图 5(b)中的绿色荧光可以与图 5(c)中的红色荧光很好的叠加在一起,形成 5d 图像,表明花状碳酸钙确实成功地负载上了 DOX.

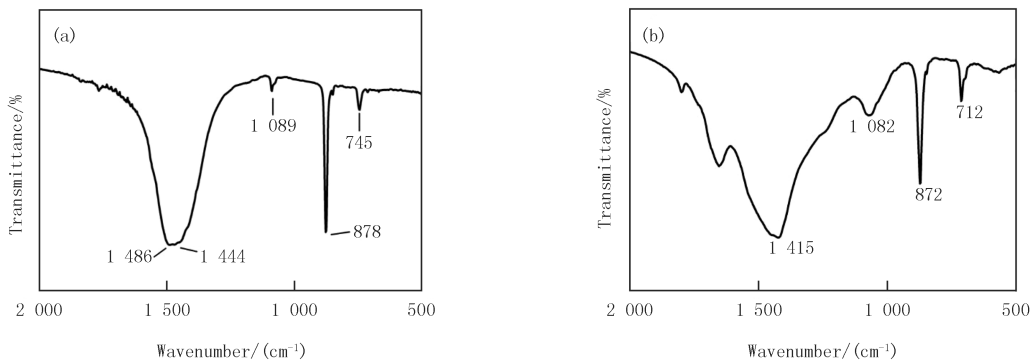


图 3 花状碳酸钙 (a) 和对照实验 (b) 的 FT-IR 图谱

Fig. 3 FT-IR spectrum of (a) flower-like calcium carbonate and (b) the control experiment

表 1 DOX 的标准曲线参数

Tab.1 Parameters of the DOX standard curve

Parameters	Value	Standard Error
Intercept	0.006 89	0.003 70
Slope	18.591 29	0.006 22
Pearson's r	0.999 98	
R-Square	0.999 94	

2.5 花状碳酸钙负载 DOX 体系释放研究

为了探究花状碳酸钙对于负载的 DOX 的释放情况,结合体内肿瘤细胞与正常细胞的微环境的不同,特别是 pH 的差异,设计了 3 个不同 pH 值的体系来进行模拟实验.将 3 份负载过 DOX 的花状碳酸钙分别置于 pH 为 5.0、6.0 和 7.4 的磷酸盐缓冲溶液(PBS)中,在摇床上摇晃使其释放,并定时离心取出测定其吸光度,计算释放量和释放率(释放量占总吸收量的百分比),绘制释放曲线,见图 6.从图 6 中可以看出,花状碳酸钙在人体正常体液 pH 为 7.4 的情况下的释放率较低,720 h 释放率仅为 17%,这样用花状碳酸钙负载的 DOX 可以显著降低对正常细胞或者正常组织的副作用.pH=6.0 的释放体系中的释放速率略高于 pH=7.4 中的释放速率.在 pH=5.0 的酸性释放体系中,DOX 释放速率最高,前期的释放速度较快,120 h 以内的释放率约 40%,以后释放速率略微降低,但依然在不断释放,直到大约 700 h 的时候基本达到平台,释放率约为 75%.以上结果表明,花状碳酸钙负载的 DOX 更容易在酸性环境下快速、较多释放.

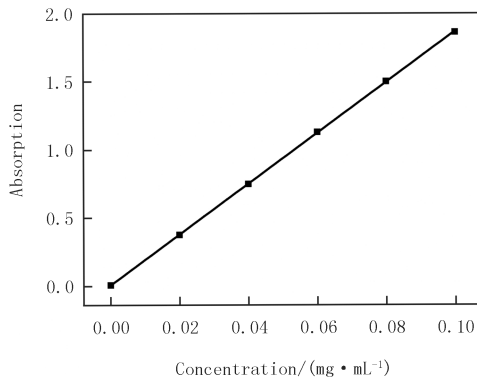


图 4 DOX 的标准曲线

Fig. 4 Standard curve of DOX

2.6 花状碳酸钙负载 DOX 体系的细胞活性(MTT)研究

为了检测花状碳酸钙负载 DOX 体系与细胞作用情况,选择了人肝癌细胞(Hep G2)和大鼠肝细胞(BRL 3A)作为细胞模型,做了 MTT 实验.设定负载过 DOX 的花状碳酸钙的最终作用质量浓度梯度为:0.781 25, 1.562 50,3.125 00,6.250 00,12.500 00,25.000 00,50.000 00 $\mu\text{g}/\text{mL}$.游离 DOX 的浓度梯度为 0.010 94, 0.021 88,0.043 75,0.087 50,0.175 00,0.350 00,0.700 00 $\mu\text{g}/\text{mL}$.分别将花状碳酸钙负载 DOX 体系和游离 DOX 与 Hep G2 和 BRL 3A 共孵育 5 d,测定这些细胞的存活率,并计算出花状碳酸钙负载 DOX 体系和游离 DOX 中 IC_{50} 的 DOX 的浓度.结果见图 7,图 7(a)和图 7(b)分别是花状碳酸钙负载 DOX 体系和游离 DOX 与 Hep G2 细胞共孵育 5 天的细胞的存活率情况及相应的 IC_{50} 值(一定浓度的药物诱导细胞凋亡 50%,即凋亡细胞与全部细胞数之比等于 50%时所对应的药物浓度).从图中可以看出,随着花状碳酸钙负载 DOX 体系或者游离 DOX 的浓度增加,细胞的存活率降低,较高浓度时的细胞存活率均低于 50%.花状碳酸钙负载 DOX 体系和游离 DOX 的 IC_{50} 值分别为 DOX 0.078 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 0.196 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$,说明花状碳酸钙负载 DOX 体系较单纯游离 DOX 更易杀死 Hep G2 等癌细胞.

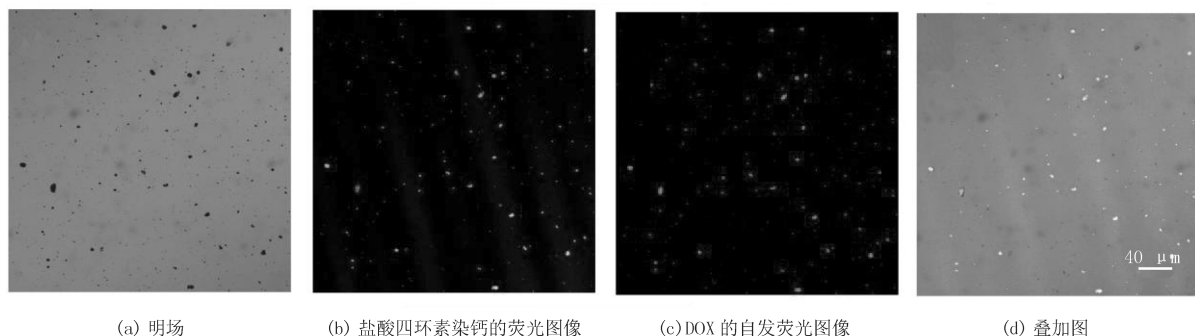


图 5 花状碳酸钙负载上 DOX 的激光共聚焦图像

Fig.5 CLSM images of flower-like calcium carbonate

图 7(c)和图 7(d)分别是花状碳酸钙负载 DOX 体系和游离 DOX 与 BRL 3A 细胞共孵育 5 d 的细胞的存活率情况及相应的 IC_{50} 值.从图中结果可以看出,随着花状碳酸钙负载 DOX 体系或者游离 DOX 的浓度增加,细胞的存活率降低,较高浓度时的细胞存活率均低于 50%.花状碳酸钙负载 DOX 体系和游离 DOX 的 IC_{50} 值分别为 DOX 0.359 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 0.132 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,说明花状碳酸钙负载 DOX 体系较单纯游离 DOX 对 BRL 3A 这样的正常细胞杀伤性低,可以降低 DOX 对正常细胞的副作用.

从图 7(b)和图 7(d)中可以看出,游离 DOX 不管是对 Hep G2 这样的癌细胞还是 BRL 3A 这样的正常细胞,都能杀死,并且有基本相同的作用效果(IC_{50} 值接近).所以使用游离 DOX 治疗癌症,杀死癌细胞的同时势必会同时杀死正常细胞,引起严重的副作用.

从图 7(a)和图 7(c)中可以看出,花状碳酸钙负载 DOX 体系对 Hep G2 这样的癌细胞和 BRL 3A 这样的正常细胞,也都能杀死,但是两者的作用浓度差别较大,花状碳酸钙负载 DOX 体系中只需要 DOX 质量浓度 0.078 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 就能杀死一半的癌细胞,而对于 BRL 3A 达到这一杀伤作用,则需要花状碳酸钙负载

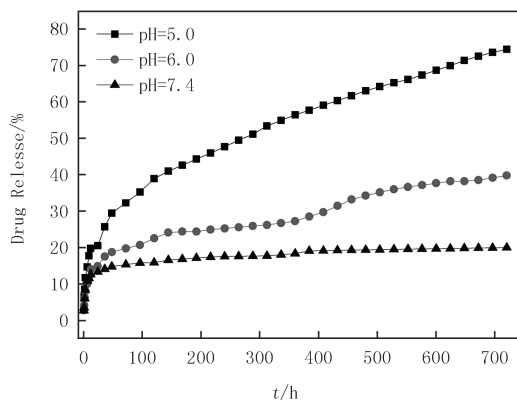


图 6 花状碳酸钙负载的 DOX 在不同 pH 值的 PBS 中的释放曲线

Fig.6 Release curve of DOX loaded in flower-like calcium carbonate in PBS with different pH values

DOX 体系中 DOX 质量浓度达到 $0.3595 \mu\text{g}/\text{mL}$, 低于这一浓度时, 正常细胞活力较强. 所以如果使用花状碳酸钙负载 DOX 体系治疗癌症, 杀死癌细胞的同时可能只会较少的杀死正常细胞, 预计会避免引起严重的副作用.

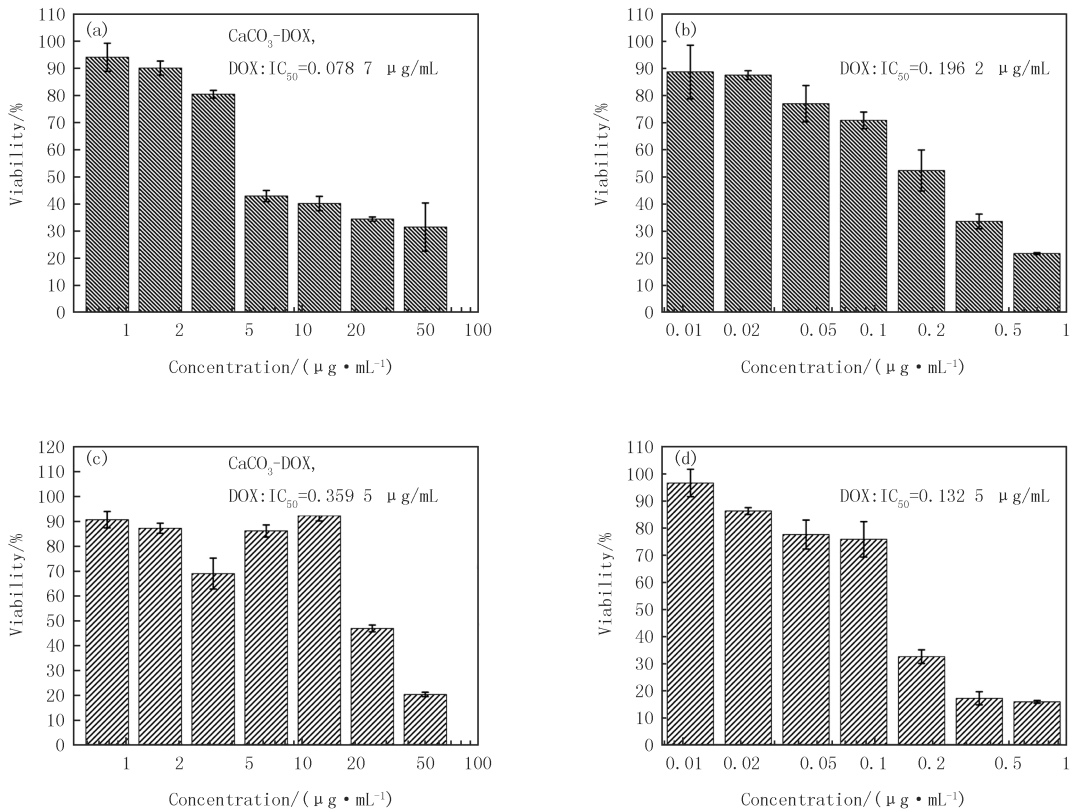


图7 花状碳酸钙负载 DOX 体系 (a) 和游离 DOX (b) 对 Hep G2 细胞共孵育 5 d 的细胞存活情况;

花状碳酸钙负载 DOX 体系 (c) 和游离 DOX (d) 对 BRL 3A 细胞共孵育 5 d 的细胞存活情况

Fig. 7 Cell viability after different treatment for 5 days. (a) Hep G2 cell treated by CaCO_3 -DOX, (b) Hep G2 cell treated by free DOX, (c) BRL 3A cell treated by CaCO_3 -DOX, (d) BRL 3A cell treated by free DOX

3 结 论

本文通过使用哺乳动物细胞分泌液调控合成了花状的碳酸钙, 晶型为球霏石, 平均粒径为 $2 \mu\text{m}$. 该样品对抗肿瘤药物 DOX 有较强的负载作用, 并且在特定酸性 pH 下缓慢释放. 细胞实验表明花状碳酸钙负载 DOX 体系特异性作用于癌细胞, 对正常细胞作用较弱. 花状的碳酸钙在作为抗肿瘤药物载体方面具有较好的应用前景.

参 考 文 献

- [1] MAO L B, GAO H L, YAO H B, et al. Synthetic nacre by pre-designed matrix-directed mineralization[J]. Science, 2016, 354(6308): 107-110.
- [2] GAO Y X, YU S H, CONG H, et al. Block-Copolymer-Controlled Growth of CaCO_3 Microrings[J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2006, 110(13): 6432-6436.
- [3] SHAO J, MA F, WU G, et al. In-situ $\text{MgO}(\text{CaCO}_3)$ templating coupled with KOH activation strategy for high yield preparation of various porous carbons as supercapacitor electrode materials[J]. Chemical Engineering Journal, 2017, 321: 301-313.
- [4] YANG J H, SHIH S M, WU C I, et al. Preparation of high surface area CaCO_3 for SO_2 removal by absorption of CO_2 in aqueous suspensions of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ [J]. Powder Technology, 2010, 202(1): 101-110.

- [5] MA X, LI L, YANG L, et al. Adsorption of heavy metal ions using hierarchical CaCO_3 -maltose meso/macroporous hybrid materials: Adsorption isotherms and kinetic studies[J]. *Journal of Hazardous materials*, 2012, 209-210: 467-477.
- [6] TRUSHINA D B, BUKREEVA T V, KOVALCHUK M V, et al. CaCO_3 vaterite microparticles for biomedical and personal care applications[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2014, 45: 644-658.
- [7] GUO Y, JIA W, LI H, et al. Facile green synthesis of calcium carbonate/folate porous hollow spheres for the targeted pH-responsive release of anticancer drugs[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2016, 4(34): 5650-5653.
- [8] GUO Y, LI H, SHI W, et al. Targeted delivery and pH-responsive release of doxorubicin to cancer cells using calcium carbonate/hyaluronate/glutamate mesoporous hollow spheres[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2017, 502: 59-66.
- [9] MA M, FU L, LI S, et al. Hydrothermal synthesis and characterization of wood powder/ CaCO_3 composites[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 88(4): 1470-1475.
- [10] GASPARD D, MARIE B, LUQUET G, et al. Biochemical characteristics of the soluble organic matrix from the shell of three recent terebratulid brachiopod species[J]. *Fossils and Strata*, 2008, 98(54): 269-275.
- [11] CAI W, FENG L, LIU S, et al. Hemoglobin-CdTe- CaCO_3 @Polyelectrolytes 3D Architecture: Fabrication, Characterization, and Application in Biosensing[J]. *Advanced functional materials*, 2008, 18(20): 3127-3136.
- [12] SOMMERDIJK N, WITH G. Biomimetic CaCO_3 Mineralization using Designer Molecules and Interfaces[J]. *Chemical Reviews*, 2008, 108(11): 4499-4550.
- [13] PARK R J, MELDRUM F C. Synthesis of Single Crystals of Calcite with Complex Morphologies[J]. *Advanced Materials*, 2002, 14(16): 1167-1169.
- [14] 赵丽娜, 孔治国, 王继库. 聚丙烯酸钠存在下蝶状文石型碳酸钙的合成研究[J]. *化学通报*, 2012, 75(12): 1140-1144.
ZHAO L N, KONG Z G, WANG J K. Synthesis of Butterfly-like Aragonite Calcium Carbonate in the Presence of Sodium Polyacrylate[J]. *Chemistry*, 2012, 75(12): 1140-1144.
- [15] 陈先勇, 唐琴, 刘代俊. 独特形貌碳酸钙的微波水热合成与表征[J]. *功能材料*, 2012, 43(9): 1109-1112.
CHEN X Y, TANG Q, LIU D J. Microwave-assisted hydrothermal synthesis and characterization of calcium carbonate with novel morphology[J]. *Journal of Functional Materials*, 2012, 43(9): 1109-1112.
- [16] PARK W K, KO S J, LEE S W, et al. Effects of magnesium chloride and organic additives on the synthesis of aragonite precipitated calcium carbonate[J]. *Journal of Crystal Growth*, 2008, 310(10): 2593-2601.
- [17] XIE A J, SHEN Y H, ZHANG C Y, et al. Crystal growth of calcium carbonate with various morphologies in different amino acid systems[J]. *Journal of Crystal Growth*, 2005, 285(3): 436-443.
- [18] 汪小红, 王刚, 涂友志, 等. 高尔夫球状球霏石的简易制备研究[J]. *人工晶体学报*, 2016, 45(6): 1691-1695.
WANG X H, WANG G, TU Y Z, et al. Study on the facile fabrication of golf-like vaterite[J]. *Journal of Synthetic Crystals*, 2016, 45(6): 1691-1695.

Biomimetic synthesis of flower-like calcium carbonate and its drug-loading performance

Zhu Lin, Xie Xiaoxiao, Yang Lin

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: Herein, flower-like calcium carbonate were prepared at physiological temperature using chondroitin sulfate as target agent and cancer cell secretion as regulators of morphology. The morphology, microstructure, and composition of the as-prepared calcium carbonate were characterized by FESEM, XRD and FT-IR. Confocal laser scanning microscopy and loading experiment results showed that the flower-like calcium carbonate can efficiently load the clinical anticancer drug doxorubicin. The drug-release evaluation result showed that the drug-loading system exhibited the better release performance under the weak acidic conditions with sustained manner to specifically and significantly treat cancers.

Keywords: secretion; flower-like; calcium carbonate; drug-loading; sustained release

[责任编辑 赵晓华 陈留院]