

带电多孔二氧化硅纳米颗粒在硫醇/磷脂混合双层膜上的非特异性吸附*

陆乃彦¹⁾ 元冰^{2)‡} 杨恺^{2)†}

1) (南京大学物理学院, 固体微结构国家实验室, 南京 210093)

2) (苏州大学, 软凝聚态物理及交叉研究中心, 苏州 215006)

(2013年4月19日收到; 2013年5月15日收到修改稿)

制备了表面带阴/阳离子的多孔二氧化硅纳米颗粒, 通过 QCM-D 研究了颗粒在不同 pH 值环境下与磷脂膜的非特异性吸附情况. 结果表明, $\text{NH}_2\text{-MSN}$ 在 4—8 的 pH 值范围内与磷脂膜相互吸引, 而 COOH-MSN 由于与磷脂膜的电性始终保持一致而无法发生吸附现象. 本研究能够帮助理解和预测纳米颗粒与细胞膜间的相互作用, 为药物运输提供载体, 有助于多孔二氧化硅纳米颗粒在药物输运体系中的应用.

关键词: 多孔二氧化硅纳米颗粒, 磷脂膜, 非特异性吸附, QCM-D

PACS: 87.16.D-, 68.43.Mn, 82.60.Qr

DOI: 10.7498/aps.62.178701

1 引言

近年来, 纳米颗粒在生物方面的应用越来越受到人们的重视^[1]. 多孔二氧化硅纳米颗粒 (mesoporous silica nanoparticles, MSN) 由于其载药量大, 生物相容性高, 因而在药物输运和缓释方面有着巨大的应用前景^[2-9]. 但近来研究表明, 纳米颗粒也可能具有细胞毒性^[10]. 因此, 深入研究多孔二氧化硅纳米颗粒与细胞膜的相互作用机理, 对于 MSN 的实际应用具有重要意义.

纳米微粒和细胞膜之间的相互作用受到很多因素的影响, 比如颗粒的尺寸和形状、表面修饰官能团的分布和化学性质等等. 其中, 微粒的表面带电情况被认为是影响两者相互作用最重要的因素之一^[11], 但目前相关的研究结果尚存在较大争议. 部分研究表明, 由于阳离子纳米颗粒与膜的作用比阴离子纳米颗粒更强, 因而具有更大的毒性^[12,13]. 但也有部分研究者认为阴离子颗粒对膜具有更大

的扰动性^[14,15]. 这些相悖的结论可能是由于实验环境的复杂性以及颗粒表面物理化学性质的差异等因素造成的. 因此, 深入分析 MSN 与磷脂膜在不同的环境条件下的吸附行为有助于人们理解两者复杂的相互作用机理和多孔二氧化硅颗粒今后的实际应用^[16].

耗散型石英晶体微天平 (QCM-D) 是一种微量传感测量仪器, 具有纳克级质量敏感度, 能够获得表面吸附层的质量、厚度、粘弹性等信息^[17-19], 是研究物体表面吸附行为有效的实验手段. 而硫醇/磷脂混合双层膜具有很高的机械稳定性, 是当前研究细胞膜性质及其相关体系最常用的模型系统之一^[20-23]. 在本实验中, 我们制备了直径 30 nm 的多孔二氧化硅颗粒, 使它的表面分别带氨基和羧基, 并通过耗散型石英晶体微天平 (QCM-D) 研究了二氧化硅颗粒在硫醇/磷脂混合双层膜上的吸附行为. 实验发现, 当改变溶液环境的 pH 值时, 两种颗粒会发生完全相反的吸附现象. 这一结果对于纳米载药颗粒对不同细胞的靶向性研究具有很好的

* 国家自然科学基金 (批准号: 11104192, 21106114)、教育部科学技术研究重点项目 (批准号: 210208) 和云南省应用基础研究计划 (批准号: 2010CD091) 资助的课题.

† 通讯作者. E-mail: yangkai@suda.edu.cn

‡ 通讯作者. E-mail: yuanbing@suda.edu.cn

指导意义.

2 实验部分

2.1 仪器和材料

二油酰磷脂酰胆碱 (DOPC, 99%)、正十八硫醇 (98%)、三羟甲基氨基甲烷 (Tris, 99.9+%) (Aldrich); 3-[2-(2-Aminoethylamino)ethylamino]propyl-trimethoxysilane, APTMES (Acros); 丁二酸酐 (CP)、十六烷基三甲基氯化铵 (CTAC) 为化学纯试剂; 正硅酸乙酯 (TEOS)、三乙醇胺 (TEA)、二甲基甲酰胺 (DMF)、氯仿、浓盐酸、无水乙醇、氨水 (25%)、双氧水 (30%) 均为分析纯试剂. 实验所用缓冲液均为 Tris 缓冲液 (10 mM Tris, 100 mM NaCl), 所用水均为 Milli-Q 超纯水 (Millipore Co.), 电阻率 18.2 M Ω -cm.

2.2 多孔二氧化硅纳米颗粒制备

多孔二氧化硅纳米颗粒 (MSN) 按照之前

报道过的方法合成^[24,25]. 在烧瓶中加入 TEOS (1.92 g, 9.22 mmol), TEA (14.3 g, 95.6 mmol), 油浴加热到 90 °C 并保持 20 min 得到 A 液, 再将 CTAC (2.33 g, 7.29 mmol) 溶解到超纯水 (21.7 g, 1.21 mol) 中加热到 60 °C 得到 B 液. 将 B 液加入到 A 液中, 得到的混合液中各组分的摩尔比例为 TEOS:CTAC:TEA:H₂O=1:0.2:10.4:130.2. 将混合液在 90 °C 下以 500 r/min 的速度搅拌 30 min, 加入 APTMES (16.3 μ L, 0.0922 mmol) 和 TEOS (20.6 μ L, 0.0922 mmol) 的混合液, 并且在室温下以 500 r/min 的速度搅拌 24 h^[26]. 然后加入 100 mL 乙醇并离心分离, 将得到的颗粒分散到含 15 mL 浓盐酸的 120 mL 乙醇溶液中, 60 °C 加热至少 2 h, 洗去颗粒中的模板分子 CTAC, 离心后用乙醇清洗. 洗去 CTAC 的步骤重复 3 次后得到表面带氨基的多孔二氧化硅纳米颗粒 (NH₂-MSN). 带羧基的二氧化硅纳米颗粒的合成如图 1 所示: 将 NH₂-MSN (45 mg) 加入到 30 mL 含过量丁二酸酐的 DMF 中反应 24 h 即可得到表面带羧基的阴离子纳米颗粒 (COOH-MSN)^[27], 离心并用乙醇清洗 3 次备用.

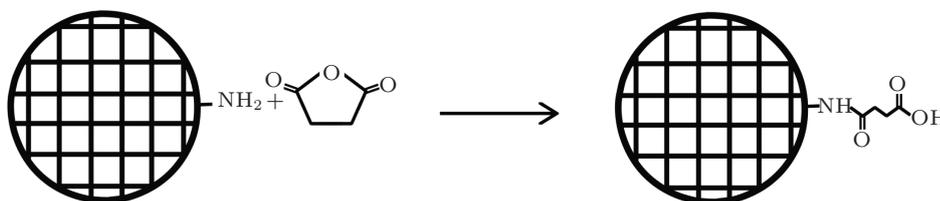


图 1 COOH-MSN 的合成路线

2.3 制备硫醇/磷脂混合双层膜

硫醇/磷脂混合双层膜制备在表面镀金的 QCM 晶片上. QCM 晶片按照标准清洗方法清洗: 用紫外/臭氧处理晶片 10 min, 浸没在超纯水、氨水、双氧水的体积比为 5:1:1 的洗液中, 75 °C 下加热 5 min, 用超纯水冲洗后用氮气吹干, 再用紫外/臭氧处理 10 min. 清洗干净后, 将晶片浸入正十八硫醇的乙醇溶液 (2 mM) 中反应 24 h 形成一层硫醇膜, 用乙醇洗去过量的硫醇后用氮气吹干^[28,29]. 磷脂单层通过 KSV-NIMA 公司的 LB 膜仪沉积到硫醇膜上^[30]. 将 DOPC 溶解在氯仿中 (2 mg/mL) 并滴在水面上, 静置 15 min 直到氯仿完全挥发. 慢慢压缩水面上的磷脂膜直到表面压达到 30 mN/m. 稳定至少 30 min 后, 通过水平挂膜法将磷脂单层膜转移

到烷基化的 QCM 晶片上. 实验中得到的硫醇/磷脂混合双层膜结构如图 2 所示.

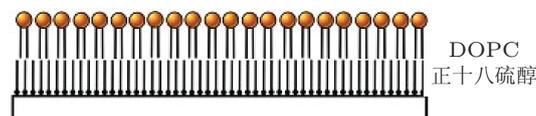


图 2 硫醇/磷脂混合双层膜示意图

2.4 MSN 的表征

采用日本 JEOL 公司 JEM-200CX 透射电子显微镜得到颗粒的形貌 (如图 3 所示); 采用英国 Malvern 公司 Nano-Z Zeta 电位仪得到颗粒表面电位.

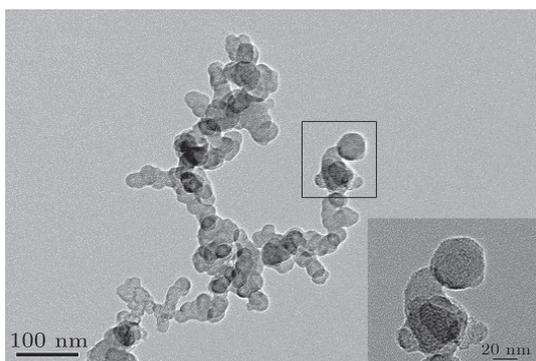


图3 多孔二氧化硅纳米颗粒 (MSN) 的透射电镜照片 (右下角为方框部分的放大图像)

2.5 Q-CMD 监测

采用 QCM E1(Q-Sense AB, Sweden) 监测颗粒与磷脂膜的相互所用. 将制备好混合双层膜的晶片装入 QCM-D 实验舱中, 通入 Tris 缓冲液至少 2 h 直到基线稳定. 将表面不同修饰的 MSN 分散到 Tris 缓冲液中并加入到实验舱中. 所有 QCM-D 实验中温度保持在 25 °C

3 结果与讨论

为研究二氧化硅纳米颗粒在硫醇/磷脂混合双

层膜上的吸附行为, 我们将制备得到的两种不同表面修饰的 MSN 分散到不同 pH 值的 Tris 缓冲液中 (0.5 mg/mL), 在超声 1h 后引入到 QCM-D 实验舱中进行测量. 在 QCM-D 测量中, 参数 Δf (共振频率) 和 ΔD (能量耗散) 的变化最为重要, 可用于表示吸附到晶片表面的分子的质量和粘弹性. 实验发现, 当将 NH_2 -MSN 引入到实验舱中后, Δf 值明显减小, 同时 ΔD 增大 (图 4(a), (b)). 而在对照实验中 (图 5), 不同 pH 值的缓冲液引起的 Δf 的变化量小于 1 Hz, 而 ΔD 的变化量小于 1×10^{-6} , 也就是说, 溶液 pH 值的改变对 QCM-D 结果的影响可以忽略. 因此, 图 4(a) 和 (b) 中 Δf 的减小 (ΔD 的增大) 说明 NH_2 -MSN 的确会吸附到磷脂膜的表面, 改变膜的粘弹性. 而且, pH=5 时 Δf 变化量约为 pH=8 时的两倍, 表明 pH=5 时 MSN 与膜的相互作用更强. 实验中我们还发现, 即使我们用 Tris 缓冲液再次冲洗后, Δf 没有明显变化. 这表明 NH_2 -MSN 与磷脂膜之间的吸引作用较强. 与此相反, 当我们将 COOH -MSN 引入实验舱并改变缓冲液的 pH 值 (8 至 3.5), 发现 Δf 和 ΔD 均没有明显变化 (图 4(c), (d)). 这表明颗粒与磷脂膜之间没有相互吸引的作用.

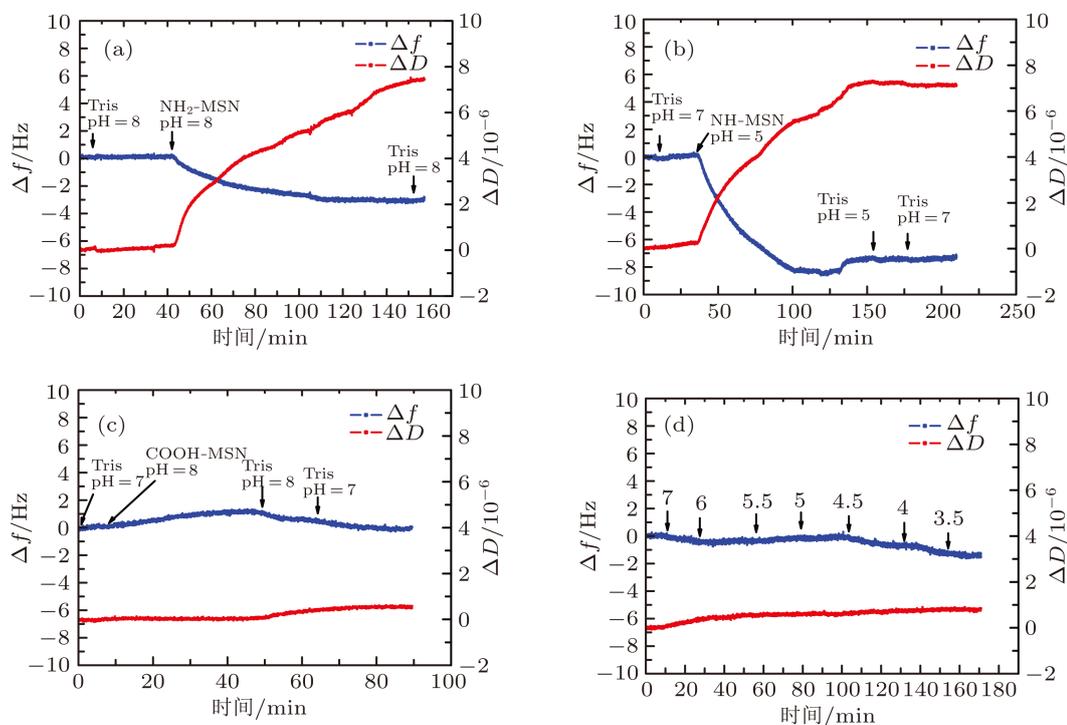


图4 NH_2 -MSN (a), (b) 和 COOH -MSN (c), (d) 在不同 pH 值下与磷脂膜相互作用的 Δf -t 与 ΔD -t 曲线

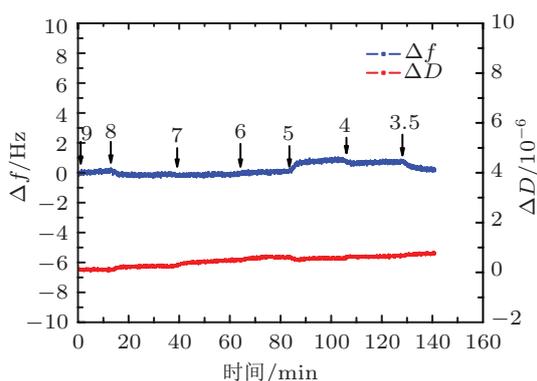


图5 不同 pH 值的 Tris 缓冲液对 QCM-D 结果的影响

我们的实验结果表明, 表面带有不同修饰的纳米颗粒与磷脂膜之间的相互作用是不同的. 而且, 这种相互作用会受到溶液环境(如 pH 值)的影响. 细胞膜中主要的几类磷脂分子的头部都具有 P⁻-N⁺ 极性, 这导致这些磷脂分子在不同的溶液环境中会表现出不同的带电性, 从而使磷脂膜与外界物质之间的相互作用变得非常复杂. 根据以前的实验报道^[16], DOPC 的等电位点在 4 附近, 这意味着在 pH < 4 时, 磷脂膜带正电, 而 pH > 4 时, 膜带负电. 在本实验中, 我们测得 NH₂-MSN 的 pK_a 略大于 8(图 6). 这表明, NH₂-MSN 在溶液 pH=8 时 Zeta 电位略比 0 高, pH=5 时则它的 Zeta 电位会远大于零. 而根据 DOPC 在不同 pH 值下的带电性, 两者在 pH 值为 4—8 之间时所带电性正好相反(图 6). 所以, 在我们的实验中, NH₂-MSN 总是会吸附在膜的表面, 并且在 pH=5 时, 实验测得的 Δf 变化量更大. 对于 COOH-MSN, 我们发现其 pK_a 在 4 附近, 和 DOPC 的等电位点接近. 所以, 无论溶液 pH 如何变化, 颗粒与膜的电性总是相同, 使得 COOH-MSN 很难吸附到磷脂膜上(图 6).

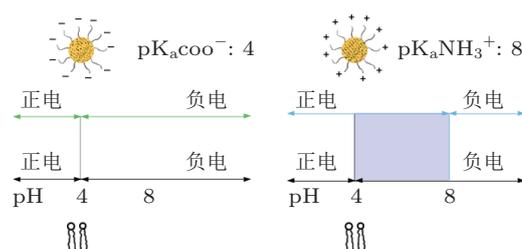


图6 不同 pH 值下 DOPC 和 MSN 的带电情况和 MSN 与膜的吸附“窗口”(阴影部分)

4 结论

本实验合成了表面带氨基和羧基的阳/阴离子多孔二氧化硅纳米颗粒, 并且用 QCM-D 研究了它们在不同 pH 值下与磷脂膜的相互作用. 实验发现, NH₂-MSN 能够在 pH 4—8 之间吸附在磷脂膜上, 而 COOH-MSN 在所有测试的 pH 值下都不会与磷脂膜的发生吸附作用.

多孔二氧化硅纳米颗粒由于具有较大的载药能力而一直受到人们的普遍关注. 而我们的实验还表明, 对多孔二氧化硅纳米颗粒进行表面修饰而使其带有不同的电性后, 还可以调节二氧化硅纳米颗粒与不同组分磷脂膜的“吸附窗口”, 从而让二氧化硅纳米颗粒具备有对不同细胞(膜)选择性吸附的功能. 这给出了一条实现控制纳米粒子与细胞相互作用的有效途径. 另外, 表面官能团(-NH₂ 和 -COOH)的存在也使得人们可以根据不同的需要来引入靶向配体^[31,32]. 这些结果能够帮助人们进一步理解纳米颗粒与磷脂膜之间的相互作用机理, 同时也有助于多孔二氧化硅纳米颗粒在药物运输体系中的实际应用.

- [1] Yousaf M Z, Yu J, Hou Y L, Gao S 2013 *Chin. Phys. B* **22** 058702
- [2] Liu J W, Jiang X M, Ashley C, Brinker C J 2009 *J. Am. Chem. Soc.* **131** 7567
- [3] Giri S, Trewyn B G, Stellmaker M P, Lin V S Y 2005 *Angew. Chem. Int. Ed.* **44** 5038
- [4] Hong C Y, Li X, Pan C Y 2008 *J. Phys. Chem. C* **112** 15320
- [5] Liu R, Zhang Y, Zhao X, Agarwal A, Mueller L J, Feng P Y 2010 *J. Am. Chem. Soc.* **132** 1500
- [6] Ashley C E, Carnes E C, Phillips G K, Padilla D, Durfee P N, Brown P A, Hanna T N, Liu J W, Phillips B, Carter M B, Carroll N J, Jiang X M, Dunphy D R, Willman C L, Petsev D N, Evans D G, Parikh A N, Chackerian B, Wharton W, Peabody D S, Brinker C J 2011 *Nature Materials* **10** 389
- [7] Rosenholm J M, Peuhu E, Eriksson J E, Sahlgrén C, Lindén M 2009 *Nano Lett.* **9** 3308
- [8] Liang M, Lu J, Kovichich M, Xia T, Ruehm S G, Nel A E, Tamanoi F, Zink J I 2008 *ACS Nano.* **2** 889
- [9] Lei J M, Lü L, Liu L, Xu X L 2011 *Acta Phys. Sin.* **60** 017501 (in Chinese) [雷洁梅, 吕柳, 刘玲, 许小亮 2011 物理学报 **60** 017501]
- [10] Kirchner C, Liedl T, Kudera S, Pellegrino T, Muñoz-Javier A, Gaub H E, Stölzle S, Fertig N, Parak W J 2005 *Nano Lett.* **5** 2331
- [11] Cho E C, Xie J, Wurm P A, Xia Y 2009 *Nano Lett.* **9** 1080
- [12] Arvizo R R, Miranda O R, Thompson M A, Pabelick C M, Bhattacharya R, Robertson J D, Rotello V M, Prakash Y S, Mukherjee P 2010 *Nano Lett.* **10** 2543
- [13] Xia T, Kovichich M, Liang M, Zink J I, Nel A E 2008 *ACS Nano.* **2** 85
- [14] Wilhelm C, Billotey C, Roger J, Pons J N, Bacri J C, Gazeau F 2003

- Biomaterials* **24** 1001
- [15] Ryman-Rasmussen J P, Riviere J E, Monteiro-Riviere N A 2007 *Nano Lett.* **7** 1344
- [16] Zhang X F, Yang S H 2011 *Langmuir* **27** 2528
- [17] Rodahl M, Höök F, Fredriksson C, Keller C A, Krozer A, Brzezinski P, Voinova M, Kasemo B 1997 *Faraday Discuss* **107** 229
- [18] Voinova M V, Jonson M, Kasemo B 2002 *Biosensors and Bioelectronics* **17** 835
- [19] Richter R, Mukhopadhyay A, Brisson A 2003 *Biophys. J* **85** 3035
- [20] Lu N Y, Yang K, Yuan B, Ma Y Q 2012 *J. Phys. Chem. B* **116** 9432
- [21] Plant A L, Gueguchkeri M, Yap W 1994 *Biophys. J.* **67** 1126
- [22] Plant A L 1999 *Langmuir* **15** 5128
- [23] Jiang Z Y, Zhang G L, Ma J, Zhu T 2013 *Acta Phys. Sin.* **62** 018701 (in Chinese) [蒋中英, 张国梁, 马晶, 朱涛 2013 物理学报 **62** 018701]
- [24] Möller K, Kobler J, Bein T 2007 *Adv. Funct. Mater.* **17** 605
- [25] Kecht J, Schlossbauer A, Bein T 2008 *Chem. Mater.* **20** 7207
- [26] Cauda V, Engelke H, Sauer A, Arcizet D, Bräuchle C, Rädler J, Bein T 2010 *Nano Lett.* **10** 2484
- [27] Park C, Oh K, Lee S C, Kim C 2007 *Angew. Chem. Int. Ed.* **46** 1455
- [28] Academic A U 1991 *Nature* **354** 120
- [29] Diao P, Jiang D L, Cui X L, Gu D P, Tong R T, Zhong B 1999 *Bioelectrochem. Bioenerg.* **48** 469
- [30] Ding L, Li J H, Dong S J, Wang E K 1996 *J. Electroanal. Chem.* **416** 105
- [31] Tu C K, Chen K, Tian W D, Ma Y Q 2013 *Macromol. Rapid Comm.* **34** 1237
- [32] Ding H M, Ma Y Q 2012 *Biomaterials* **33** 5798

Nonspecific adsorption of charged mesoporous nanoparticles on supported thiol/lipid hybrid bilayers*

Lu Nai-Yan¹⁾ Yuan Bing^{2)‡} Yang Kai^{2)†}

1) (National Laboratory of Solid State Microstructures and Department of Physics, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

2) (Center for Soft Condensed Matter Physics and Interdisciplinary Research, Soochow University, Suzhou 215006, China)

(Received 19 April 2013; revised manuscript received 15 May 2013)

Abstract

Mesoporous silica nanoparticles (MSN) with cationic and anionic surface charges were synthesized. Their adsorption behaviors to the supported lipid membranes at different pH values were also studied using QCM-D. We found that NH₂-MSN could be adsorbed onto the membrane at pH values from 4 to 8, while the adsorption of COOH-MSN onto the membrane could not occur due to its charge being always the same as that of the membrane at any pH values. These results might provide the information for understanding and predicting the interactions between nanoparticles and cell membranes, and could be effectively used in drug delivery systems and disease treatment.

Keywords: mesoporous silica nanoparticles, lipid membrane, nonspecific adsorption, QCM-D

PACS: 87.16.D-, 68.43.Mn, 82.60.Qr

DOI: 10.7498/aps.62.178701

* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 11104192, 21106114), the Key Project of Chinese Ministry of Education, China (Grant No. 210208), and the Applied Basic Research Program of Yunnan Province, China (Grant No. 2010CD091).

† Corresponding author. E-mail: yangkai@suda.edu.cn

‡ Corresponding author. E-mail: yuanbing@suda.edu.cn