

文章编号 1006-8147(2018)02-0122-09

论 著

用于肿瘤靶向性 X 线 CT 造影剂和抗肿瘤药物传递的多功能含碘纳米粒子的制备和表征

朱颖^{1,2}, 张岩¹, 陈研¹, 杨晓英¹

(1.天津医科大学药学院,天津市临床药物关键技术重点实验室,天津 300070;2.天津医科大学第二医院药学部,天津 300211)

摘要 目的:制备用于肿瘤靶向性 X 线 CT 造影剂和抗肿瘤药物传递的多功能含碘纳米粒子,用于肿瘤诊断和治疗。方法:利用沉淀聚合法制备含碘聚合物纳米粒子 P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP,该纳米粒子以 2-甲基丙烯酰(3-酰胺-2,4,6-三碘苯甲酸)(MATIB)为单体,以 N,N'-亚甲基双丙烯酰胺为交联剂(MBA),通过甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA)和乙二胺(EDA)将叶酸分子修饰到该纳米粒子表面,并原位沉积金纳米粒子(AuNP)。结果:TEM 结果显示该纳米粒子分散均匀,平均粒径为 135 nm。体外 X 线 CT 成像检测结果表明 AuNP 的掺杂显著增加了该纳米粒子的 X 线衰减性能。该纳米粒子同时可高效负载抗肿瘤药物(DOX),载药量为 51.3%,并具有 pH 敏感的可控释放性能。体外药物输送结果显示有 FA 修饰的纳米粒子能更好地携带抗肿瘤药物进入肿瘤细胞。细胞毒性的结果显示该 P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP 纳米粒子在浓度低于 100 $\mu\text{g/mL}$ 时未显示明显毒性。载药后,有叶酸修饰的纳米粒子对肿瘤细胞具有更好的杀伤性能。结论:该纳米粒子可同时作为肿瘤靶向性 X 线 CT 造影剂和抗肿瘤药物载体,用于肿瘤诊断和治疗。

关键词 沉淀聚合;肿瘤靶向;CT 造影剂;药物输送

中图分类号 O63

文献标志码 A

Preparation and characterization of the multi-functional iodine-containing nanoparticles used as tumor targeted X-ray CT contrast agent and anti-cancer drug delivery

ZHU Ying^{1,2}, ZHANG Yan¹, CHEN Yan¹, YANG Xiao-ying¹

(1. School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin Key Laboratory on Technologies Enabling Development of Clinical Therapeutics and Diagnostics (Theranostics), Tianjin 300070, China; 2. Department of Pharmacy, The Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China)

Abstract Objective: To prepare the multi-functional iodine-containing nanoparticles used as tumor targeted X-ray CT contrast agent and anti-cancer drug delivery for applications in tumor diagnosis and therapy. **Methods:** The iodine-containing polymer nanoparticles P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP were prepared by precipitation polymerization with 2-methacryl(3-amide-2,4,6-triiodobenzoic acid) (MATIB) as the monomer and N,N'-methylene bisacrylamide (MBA) as the crosslinker. Folic acid molecules were modified onto the nanoparticles via the conjugation of glycidyl methacrylate (GMA) and ethane diamine (EDA). Gold nanoparticles (AuNP) were then deposited on the nanoparticles in situ. **Results:** From the observation of TEM images, the nanoparticles with the average size of 135 nm dispersed well. The results of *in vitro* CT imaging showed that the X-ray attenuation performance of the nanoparticles doping with AuNP was better than that of the nanoparticles without AuNP. In addition, the anti-cancer drugs doxorubicin hydrochloride (DOX) could be efficiently loaded onto the nanoparticles with a high loading capacity of 51.3% and their release showed pH dependence. *In vitro* drug delivery study indicated that the nanoparticles with FA modification could deliver DOX into MCF-7 cells more efficiently than the nanoparticles without functionalization of FA. The results of cytotoxicity assay indicated that the nanoparticles had no marked toxicity to MCF-7 cells at the concentration below 100 $\mu\text{g/mL}$. The nanoparticles with FA modification showed much higher efficiency to kill tumour cells than the nanoparticles without FA after them loading with DOX. **Conclusion:** It is suggested that the P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP nanoparticles could be used as X-ray CT contrast agent and anti-cancer drug carriers at the same time for tumor diagnosis and treatment.

Key words precipitation polymerization; tumor targeting; CT contrast agent; drug delivery

计算机断层扫描(CT)是目前临床上应用最广

泛的非侵入性成像诊断技术之一,在临床已经使用大半个世纪。为增强软组织的对比度,人们研制了多种 CT 造影剂。目前临床上广泛使用的水溶性造影剂均为三碘苯环的衍生物,如碘海醇、碘帕醇、碘普罗胺、泛影葡胺等。然而,由于这些 CT 造影剂均

基金项目 天津市应用基础与前沿技术研究计划基金资助项目(15JCZDJC36300);天津市自然科学基金资助项目(17JCQNJC14100)
作者简介 朱颖(1987-),女,药师,硕士在读,研究方向:药剂学;通信作者:杨晓英, E-mail: yangxiaoying@tmu.edu.cn。

为含碘小分子,在体内循环时间短,无选择性,大剂量使用又会导致严重不良反应及部分患者过敏的问题,因而极大地限制了它们在一些部位如肿瘤、肝、淋巴结等部位的靶向成像和血管造影^[1]。过去十几年中,研究者利用纳米粒子的可体内长循环、实体瘤组织的高通透性和滞留效应(EPR效应)、容易进行表面修饰及整合多功能于一体等独特的性能来解决这一问题。大量研究集中于将临床应用的碘代小分子发展成碘代纳米粒子,包括乳液^[2-3]、脂质体^[4-7]、脂质蛋白^[8-9]、聚合物纳米粒子^[10-14]和不溶性纳米材料^[15]等。这些纳米材料的主要目的是增加碘的浓度和达到一定粒径,使其对比度能高于常规水溶性CT对比剂,并达到与临床所用碘代小分子对比剂不一样的体内动力学效果。此外,一些研究将具有高吸收X线性能的金属和无机纳米粒子引入碘对比剂,用以增加其对比性能。如金元素由于具有比碘高的原子序数以及对X线衰减贡献较大的光电效应,受到广泛关注,许多基于Au纳米粒子的对比剂用于体内X线CT成像^[16-18]。我们之前的研究^[19]和Peng等^[20]的研究结果均表明,当金与碘这两种高度不透X线的元素结合在一起时,二者具有协同作用,显示出显著增强的X线衰减效应。为将纳米粒子靶向到肿瘤组织,实现肿瘤靶向性药物递送和生物成像,通常采用配体-受体结合系统或抗体-抗原结合系统实现主动靶向作用。叶酸(FA)是应用较早的肿瘤靶向分子,与其在正常组织中的表达水平相比,FA受体在大肠癌、卵巢癌和乳腺癌等上皮恶性肿瘤中过表达^[21-23]。研究表明,FA是FA受体的高亲和配体($K_d \approx 10^{-10}$ mol/L)^[24],FA修饰的载体可以通过受体介导的内吞作用被FA受体高表达的细胞高效摄取^[25]。本研究采用沉淀聚合法制备了含碘聚合物纳米粒子P(MATIB-co-MBA-co-GMA),并将FA分子修饰到该纳米粒子表面,然后在该纳米粒子内部和表面沉积金纳米粒子(AuNP),最终得到P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP纳米粒子,作为肿瘤靶向性X线CT造影剂,同时以该纳米粒子为载体,以抗肿瘤药物盐酸阿霉素(DOX)为药物模型,研究了该纳米粒子作为抗肿瘤药物输送载体的性能,以期获得能同时实现肿瘤靶向性成像和药物递送的纳米粒子系统,实现肿瘤的诊治一体化。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂 N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(MBA)购自天津中信凯泰化工有限公司,纯度为98%,使用前用丙酮重结晶;甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA)、乙

二胺(EDA)、偶氮二异丁腈(AIBN)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)均购自上海阿拉丁试剂有限公司;氯金酸(HAuCl_4)购自天津市风船化学试剂科技有限公司;1-(3-(二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)购自西格玛奥德里奇贸易有限公司;DOX购自上海浩然生物技术有限公司。

1.1.2 仪器 核磁共振波谱仪(Bruker, 400MHZ Advance);透射式电子显微镜(Hitachi, HT7700)(TEM);傅立叶变换红外光谱仪(Bruker, Tensor 27)(FT-IR);紫外-可见吸收光谱仪(JASCO, V-570)(UV-vis);激光粒度仪(Malvern, Zetasizer Nano-ZS);CT扫描仪(PHILIP MX-16 SLICE);Countstar自动细胞计数仪(上海睿钰生物科技有限公司, IC 1000);CO₂培养箱(Forma Scientific);酶标仪(Promega, GloMax-Multi)。

1.2 实验方法

1.2.1 单体化合物2-甲基丙烯酰(3-酰胺-2,4,6-三碘苯甲酸)(MATIB)的合成 在50 mL的双颈圆底烧瓶中加入16 mL用分子筛干燥的N,N-二甲基乙酰胺(DMA)溶液,然后加入3-氨基-2,4,6-三碘苯甲酸(4.0 g),超声使其完全溶解。圆底烧瓶上面依次连接冷凝管、标口玻璃弯形干燥管,冷凝管通水,将圆底烧瓶置于油浴中加热,使反应体系维持在25℃之下,使用5 mL的注射器将甲基丙烯酰氯(2.5 mL)缓慢逐滴滴加到溶解有3-氨基-2,4,6-三碘苯甲酸的DMA的溶液中,滴加完成之后,将该反应体系温度升高到50℃,并使该反应体系维持50℃继续反应12 h,反应结束后,将上述反应液在25℃下缓慢滴入80 mL水中,持续搅拌反应5 h后,将所得沉淀依次用超纯水、乙腈洗涤3遍。所得产物放于50℃的真空干燥箱中干燥。使用无水乙醇对产物进行重结晶,然后置于50℃的真空干燥箱中干燥。

1.2.2 含碘聚合物纳米粒子P(MATIB-co-MBA-co-GMA)的制备 在250 mL的圆底烧瓶中,称取单体MATIB(900 mg),加入144 mL乙腈,14.4 mL乙醇,超声使其完全溶解,然后加入交联剂MBA(150 mg)和引发剂AIBN(22 mg),使其溶解。将圆底烧瓶置于85℃油浴中加热,使反应体系在30 min内沸腾并回流。反应65 min时加入GMA(110 mg),反应80 min时终止反应。反应体系快速降温后,产物离心(12 000 r/min, 20 min)获得,用乙腈洗3次,在真空干燥箱中干燥至恒重,得到P(MATIB-co-MBA-co-GMA)含碘纳米粒子。

1.2.3 FA修饰的含碘聚合物纳米粒子P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA的制备 向无水甲醇(6 mL)

中加入 P (MATIB-co-MBA-co-GMA) 纳米粒子 40 mg, 超声使其分散, 加入 EDA (3 mL), 25 °C 下搅拌 2 d, 离心得到 P (MATIB-co-MBA-co-GMA)-EDA 纳米粒子, 用无水甲醇洗 3 次, 在真空干燥箱中干燥至恒重。

将 FA (40 mg) 超声溶于 DMSO (4 mL), 与 EDC (35 mg) 和 NHS (21 mg) 混合, 37 °C 下搅拌 60 min, 将前一步得到的 P (MATIB-co-MBA-co-GMA)-EDA 纳米粒子 (40 mg) 加入该黄色透明液体中, 继续避光搅拌 4 d, 离心得到 P (MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA 纳米粒子, 用 DMSO 和水洗至紫外-可见吸收光谱仪检测不到上清液中的 FA 分子。

1.2.4 AuNP 在含碘聚合物纳米粒子 P (MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA 上的沉积 取 P (MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA 纳米粒子 15 mg, 溶于 10 mL 去离子水中, 另取 $\text{HAuCl}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (15 mg) 溶于 5 mL 去离子水中, 加入该纳米粒子水溶液中, 避光下磁力搅拌 24 h, 然后将反应液离心 (12 000 r/min, 20 min), 沉淀产物用去离子水洗 3 遍, 将其重新分散于 20 mL 去离子水中, 之后在快速搅拌下, 迅速加入含有 3.5 mL NaBH_4 (200 mmol/L) 的 NaOH (100 mmol/L) 溶液, 当 NaBH_4 加入后, 溶液体系由浅黄立即变为深红色, 继续磁力搅拌 120 min, 产物离心并用去离子水洗 3 遍, 即得到 P (MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP 纳米粒子。

1.2.5 P (MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP 纳米粒子的表征 分别取各步所得的纳米粒子分散液, 滴在碳膜铜网上, 待自然晾干后于 TEM 下观测并摄片记录。分别用 Nano measurer 软件测量 TEM 图片中纳米粒子 (>100 个) 的直径, 采用激光粒度仪统计各纳米粒子在溶液中的 Zeta 电位、粒径和粒径分布情况。采用 FT-IR 光谱仪分别检测各步所得纳米粒子的红外特征光谱图。样品分别与溴化钾以 1:50 的比例在研钵中研磨混匀后, 压溴化钾窗片, 用傅里叶-红外光谱仪扫描样品, 得出样品的红外吸收光谱图。采用 UV-vis 吸收光谱仪分别检测各步所得纳米粒子的 UV-vis 吸收光谱图。

1.2.6 P (MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP 纳米粒子的 CT 造影性能 对 P (MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP 纳米粒子溶液的体外 CT 造影性能进行测定, 即测定该纳米粒子溶液的体外 CT 值。首先采用电感耦合等离子体质谱分别测定 P (MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP 和 P (MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA 纳米粒子中的碘含量和金含量, 然后将其分别配制成一系列不同碘

浓度的水溶液, 用飞利浦 MX-16SLICE 型 CT 成像仪进行 CT 成像断层扫描, 分别读取各溶液中 3 处不同位置处的 CT 值, 同时对比医用碘海醇溶液的 CT 值。CT 成像断层扫描的各种参数为: 层厚 1.5 mm; 间距 0.75 mm; 电压 90 kV; 电流 34 mAs。以读出的各 CT 值为纵坐标, 各溶液的碘浓度为横坐标进行作图, CT 值均为 3 次读数的平均值。

1.2.7 P (MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP 纳米粒子的载药和释药性能 将一系列不同初始浓度的 DOX 溶液分别与相同量的 P (MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP (0.5 mg/mL) 溶液混合均匀, 置于摇床上, 室温条件下避光温和地振摇 24 h, 离心得到负载 DOX 的纳米粒子, 并通过 UV-vis 吸收光谱仪测定上清溶液在 480 nm 处的吸收, 计算得到上清溶液中 DOX 的浓度。初始溶液中 DOX 的总量与负载后上清溶液中的 DOX 的量之差即为负载在该聚合物纳米粒子上的药量。纳米粒子的载药量和包封率按照公式 (1) 和 (2) 计算得到:

$$\text{载药量} = (W_{\text{administered dose}} - W_{\text{residual dose in solution}}) / W_{\text{nanoparticles}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{包封率} = (W_{\text{administered dose}} - W_{\text{residual dose in solution}}) / W_{\text{administered dose}} \times 100\% \quad (2)$$

其中 $W_{\text{administered dose}}$ 指初始溶液中 DOX 的质量, $W_{\text{residual dose in solution}}$ 指负载后上清溶液中 DOX 的残余量, $W_{\text{nanoparticles}}$ 指用于载药的纳米粒子的质量。

根据载药性能检测结果, 制备载药 (DOX 溶液初始浓度为 414 $\mu\text{g/mL}$) P (MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP 纳米粒子 (1.0 mg/mL), 测定负载 DOX 后的 P (MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP 纳米粒子分别在不同 pH 值的 PBS 缓冲溶液 (50 mmol/L, pH 6.0 或 7.4) 中 37 °C 下的体外释药性能。即将载药纳米粒子分散于 8 mL 水中, 分为 2 等份, 分别置于截留分子量为 3 500 的透析袋中, 再将透析袋分别置于不同 pH 条件下的 60 mL 缓冲溶液中, 缓慢搅拌进行释药, 每个条件平行做 3 组。在每个设定的时间点从释药容器内取出 1.5 mL 溶液, 测定其在 480 nm 处的紫外吸收, 计算得到其中 DOX 的浓度。为保持药物释放体系的体积不变, 每次取样后向容器内补加相同条件的等量新鲜的缓冲盐溶液。以停止释药实验时穿过透析膜释放的药物分子总量表示累积释放药量。

1.2.8 P (MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP 纳米粒子的细胞吸收性能 采用激光共聚焦荧光显微镜观察负载 DOX 的 P (MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP 纳米粒子的入胞能力, 以负载

DOX 的 P (MATIB-co-MBA-co-GMA)-AuNP 纳米粒子作为对照. 分别将终浓度为 $1 \mu\text{g/mL}$ 的负载 DOX 的 P (MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP 纳米粒子和 P (MATIB-co-MBA-co-GMA)-AuNP 纳米粒子与人乳腺癌 MCF-7 细胞孵育 0.5 h 后, 通过共聚焦荧光显微镜观察. 进一步采用流式细胞分析仪检测该纳米粒子的肿瘤细胞靶向性.

1.2.9 P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP 纳米粒子的细胞毒性 将负载 DOX 的 P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP 纳米粒子和 P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-AuNP 纳米粒子按照不同 DOX 浓度配制一系列载药纳米粒子溶液, 以游离 DOX 溶液做对照.

人乳腺癌细胞 MCF-7 培养于含 10% 胎牛血清 FBS 和 1% 青/链霉素的细胞 DMEM 培养液中, 在 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中培养, 将 MCF-7 细胞按约每孔 5 000 个细胞的浓度接种于 96 孔板中, 在培养箱中培养 1 d 后, 将一系列不同浓度的 P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP 纳米粒子溶液加入其中, 在培养箱中培养 48 h 后, 每孔加入 20 μL MTT 溶液, 继续培养 4 h 后, 在酶标仪上测定 490 nm 波长处的吸光值, 按公式(3)计算上述细胞的相对存活率. 对于载药纳米粒子, 按 0.01、0.05、0.1、0.5、1、2.5、5 $\mu\text{g/mL}$ 的 DOX 浓度分别加入载药纳米粒子溶液和游离 DOX 溶液到 MCF-7 细胞中, 并按照上述方法测定其细胞存活率.

$$W = (A - A_0) / (A_1 - A_0) \times 100\% \quad (3)$$

其中, W 为相对细胞存活率, A 为实验孔吸光值, A_0 为空白孔吸光值, A_1 为对照孔吸光值.

2 结果

2.1 单体化合物 MATIB 的表征 产物 MATIB 的化学结构采用核磁共振波谱氢谱进行表征, 如图 1 所

示, 在其氢谱图中 1.95 ppm 处出现 $-\text{CH}_3$ 的质子峰, 5.92 ppm 和 5.56 ppm 处出现 $=\text{CH}_2$ 的质子峰, 8.35 ppm 处出现 Ar-H 处的质子峰, 9.93 ppm 为 Ar-COOH 中的质子峰, 13.95 ppm 为 $-\text{NH}-$ 中的质子峰. 因而从该核磁谱图可以确定 MATIB 的结构.

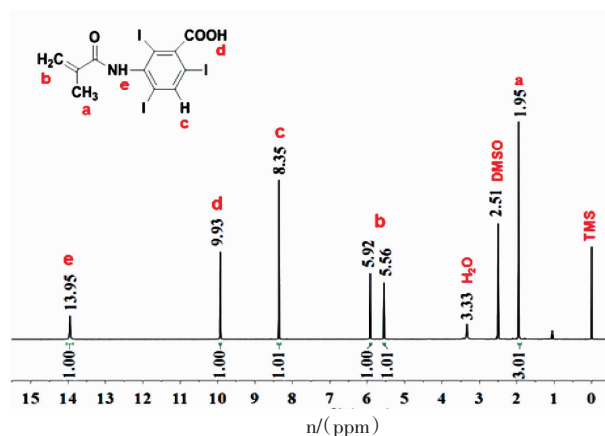


图1 MATIB 在 $\text{DMSO}-d_6$ 中的 ^1H NMR 谱图

Fig 1 ^1H NMR (400 MHz) spectrum of MATIB in $\text{DMSO}-d_6$

2.2 纳米粒子的结构与形貌表征 P (MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP 纳米粒子的制备方法如图 2 所示, 先将 3-氨基-2,4,6-三碘苯甲酸进行甲基丙烯酸酯化, 得到可用于聚合的单体化合物 MATIB. 再将其与 MBA 和 GMA 通过沉淀聚合方法进行共聚反应, 得到具有交联结构和表面有环氧基团修饰的含碘聚合物纳米粒子 P(MATIB-co-MBA-co-GMA). 然后通过 EDA 在纳米粒子表面引入氨基, 并进一步通过 EDC 缩合反应将 FA 分子修饰在纳米粒子表面, 得到 P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA 纳米粒子. 最后, 通过还原法在纳米粒子上原位沉积 AuNP, 得到 P (MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP 纳米粒子.

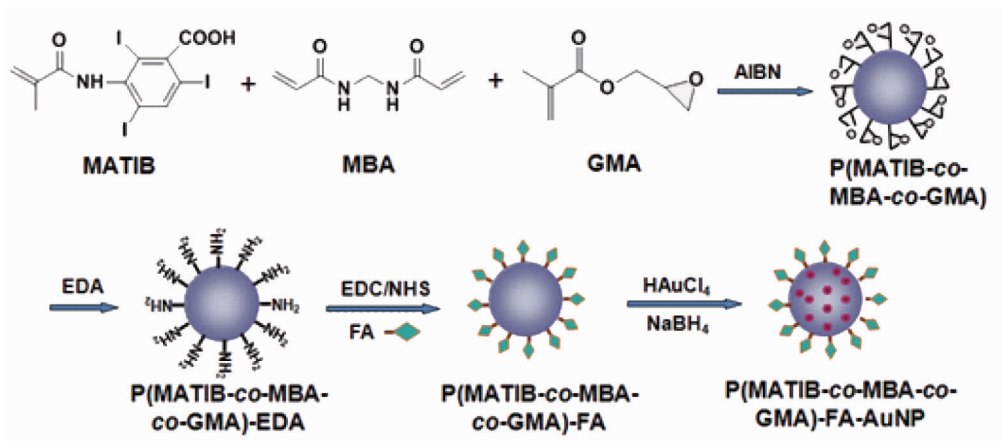


图2 P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP 纳米粒子的制备示意图

Fig 2 Schematic illustration for preparation of P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP nanoparticles

2.2.1 TEM 表征 由图3可知,所制备的纳米粒子均为表面光滑、大小均一的球形,并具有良好的分散性。 $P(\text{MATIB-co-MBA-co-GMA})$ 纳米粒子平均粒径为102 nm,当表面修饰了FA分子并沉积了AuNP后,所得的 $P(\text{MATIB-co-MBA-co-GMA})\text{-FA-AuNP}$ 纳米粒子平均粒径为135 nm,并且在其上可观察到均匀分布的粒径小于5 nm的AuNP。

2.2.2 FT-IR 光谱和 UV-vis 吸收光谱 $P(\text{MATIB-co-MBA-co-GMA})$ 纳米粒子和 $P(\text{MATIB-co-MBA-co-GMA})\text{-FA-AuNP}$ 纳米粒子的FTIR光谱和UV-vis吸收光谱 在 $P(\text{MATIB-co-MBA-co-GMA})$ 纳米粒子的FT-IR光谱中可以看到 $1\,657\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,517\text{ cm}^{-1}$ 处分别出现了属于酰胺基团中的C=O伸缩振动峰和N-H的弯曲振动峰,即酰胺I带和酰胺II带,在 $1\,731\text{ cm}^{-1}$ 处出现了属于羧基的C=O伸缩振动峰。当与FA分子连接并沉积了AuNP后,所得的 $P(\text{MATIB-co-MBA-co-GMA})\text{-FA-AuNP}$ 纳米粒子中原先属于羧基的C=O伸缩振动峰消失,并且属于酰胺基团的酰胺I带和II带谱峰的位置均发生了位移,说明FA分子通过酰胺键成功修饰到纳米粒子表面。在 $P(\text{MATIB-co-MBA-co-GMA})$ 纳米粒子的UV-vis吸收光谱中可以看到,在250 nm处出现了属于纳米粒子中苯环共轭体系的特征吸收峰,在修饰FA分子后,在304 nm处出现了FA分子相对应的吸收峰,相比游离FA分子在280 nm处的吸收峰红移了24 nm。在 $P(\text{MATIB-co-MBA-co-GMA})\text{-FA-AuNP}$ 纳米粒子的UV-vis吸收光谱中位于500 nm左右的属于AuNP的吸收峰极其微弱,可能由于相比苯环的特征吸收峰较弱所致。而属于纳米粒子中苯环共轭体系的特征吸收峰出现在226 nm处,发生了24 nm的蓝移,可能AuNP的沉积导致其与苯环共轭体系发生了一定程度的电子转移(图4)。

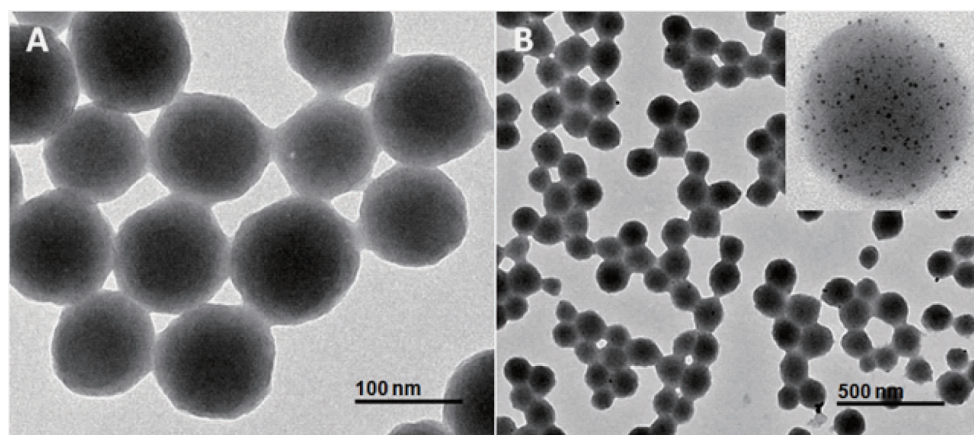


图3 $P(\text{MATIB-co-MBA-co-GMA})$ (A)和 $P(\text{MATIB-co-MBA-co-GMA})\text{-FA-AuNP}$ (B)纳米粒子的TEM图片

Fig 3 TEM images of $P(\text{MATIB-co-MBA-co-GMA})$ (A) and $P(\text{MATIB-co-MBA-co-GMA})\text{-FA-AuNP}$ (B) nanoparticles

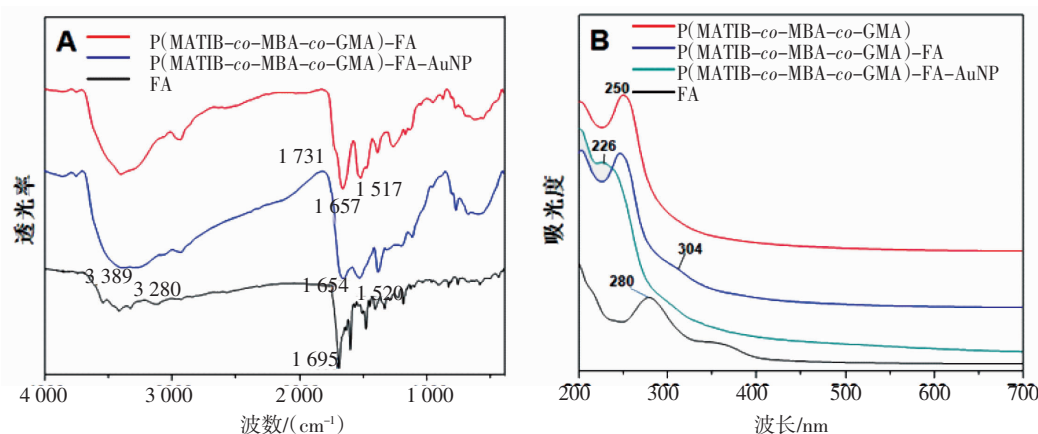


图4 A. $P(\text{MATIB-co-MBA-co-GMA})$ 纳米粒子、 $P(\text{MATIB-co-MBA-co-GMA})\text{-FA-AuNP}$ 纳米粒子和FA的FTIR光谱; B. $P(\text{MATIB-co-MBA-co-GMA})$ 纳米粒子、 $P(\text{MATIB-co-MBA-co-GMA})\text{-FA}$ 纳米粒子、 $P(\text{MATIB-co-MBA-co-GMA})\text{-FA-AuNP}$ 纳米粒子和FA的UV-vis吸收光谱

Fig 4 FTIR spectra of $P(\text{MATIB-co-MBA-co-GMA})$ nanoparticles, $P(\text{MATIB-co-MBA-co-GMA})\text{-FA-AuNP}$ nanoparticles and FA (A) and UV-vis absorbance spectra of $P(\text{MATIB-co-MBA-co-GMA})$ nanoparticles, $P(\text{MATIB-co-MBA-co-GMA})\text{-FA}$ nanoparticles, $P(\text{MATIB-co-MBA-co-GMA})\text{-FA-AuNP}$ nanoparticles and FA (B)

2.2.3 粒径分析与Zeta电位 如表1所示,各步所得纳米粒子用激光粒度分析仪测定的水力直径(D_h)均小于200 nm,且比TEM照片中所得相应纳米粒子的平均粒径(D_n)偏大,这是由于各纳米粒子在水溶液中均有一定程度的溶胀所致。同时,各步所得纳米粒子在水溶液中均具有较窄的粒径分布,PDI值由0.002到0.077之间不等,说明所制备的P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP纳米粒子粒径非常均匀,且在水溶液中具有很好的分散性。从Zeta电位的表征结果可以看出,P(MATIB-co-MBA-co-GMA)纳米粒子的Zeta电位为 (-51.3 ± 2.1) mV,这是由于其表面连有大量羧基和环氧基所致。当与EDA连接后,表面大部分变成了氨基,因而Zeta电位变为 (-16.2 ± 0.4) mV,明显正向移动,说明EDA被成功接上。当修饰了FA分子后,其又变为 (-49.3 ± 1.4) mV,这是由于FA分子有两个羧基,

表1 各步所得纳米粒子的粒径、粒径分布、Zeta电位、I和Au的含量

Tab 1 The size, size distribution, Zeta-potentials and content of I and Au in nanoparticles from every step

Nanoparticles	D_w /nm	D_n /nm	PDI	Zeta potential/ mV	Content of I /%	Content of Au /%
P(MATIB-co-MBA-co-GMA) nanoparticles	102	134	0.002	-51.3 ± 2.1	—	—
P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-EDA nanoparticles	—	136	0.015	-16.2 ± 0.4	—	—
P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA nanoparticles	123	143	0.044	-49.3 ± 1.4	47.9	—
P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP nanoparticles	135	154	0.077	—	31.9	12.6

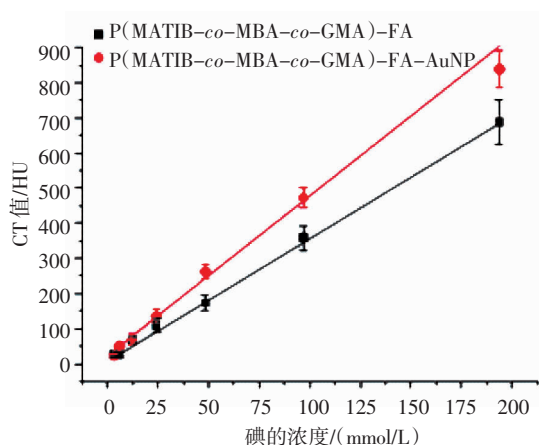


图5 P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA纳米粒子和P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP纳米粒子的I含量与X线衰减关系

Fig 5 Relationship of X-ray attenuation with I concentration in P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA nanoparticles and P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP nanoparticles *in vitro*

2.3.2 载药释药性能 如图6A所示,在一定范围内,P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP纳米粒子的载药量随着DOX溶液初始浓度的增加而不断增大,而包封率则随着DOX溶液初始浓度的增加而不断减小。当DOX溶液的初始浓度为1500 μ g/mL时,其载药量为51.3%,包封率为34.2%。此时纳米粒子的载药量达到饱和,不再随初始DOX的量的

通常以 γ 羧基与载体材料相连,而保留游离 α 羧基,所以Zeta电位又负向移动。

2.3 纳米粒子的性能表征

2.3.1 体外X线衰减性能 通过ICP-MS检测得到P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA纳米粒子中的I含量约为47.9%,P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP纳米粒子中的I含量约为31.9%,Au含量为12.6%(表1)。以不同的I浓度配制一系列两种纳米粒子的溶液,然后进行CT成像,读取相应的CT值,得到这两种纳米粒子溶液随碘浓度变化的体外X-射线衰减关系图(图5)。可以看出,随I浓度增大,X-射线的衰减能力逐渐增强,沉积了AuNP的纳米粒子其CT值明显高于相同I含量下的P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA纳米粒子溶液的CT值,说明AuNP的掺入显著增强了其CT造影性能。

增加而增大。

DOX在不同pH下的释放曲线如图6B所示,6 h内释药速率较快,之后DOX的释放速率变得缓慢,48 h后,在pH 6.0的PBS溶液中DOX释放率约为25%,明显高于在pH 7.4的缓冲溶液中的释放速率,说明DOX在该纳米粒子中的释放具有一定的pH响应性。

2.3.3 细胞吸收及体外靶向性能 如图7所示,分别将终浓度为1 μ g/mL的负载DOX的P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP纳米粒子和P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-AuNP纳米粒子与人乳腺癌MCF-7细胞孵育0.5 h后,从共聚焦荧光显微镜的观察可以看出,在负载DOX的P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP纳米粒子处理的细胞中可以看到明显的红色DOX荧光,说明P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP纳米粒子可以携带DOX很好地进入细胞,而P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-AuNP纳米粒子携带DOX的入胞能力明显较差。流式细胞仪的进一步检测也得到了相同的结果(图7h),说明经FA修饰的纳米粒子对肿瘤细胞具有一定的主动靶向性,其能够通过受体介导的内吞作用被FA受体高表达的MCF-7细胞更高效地结合和摄取。

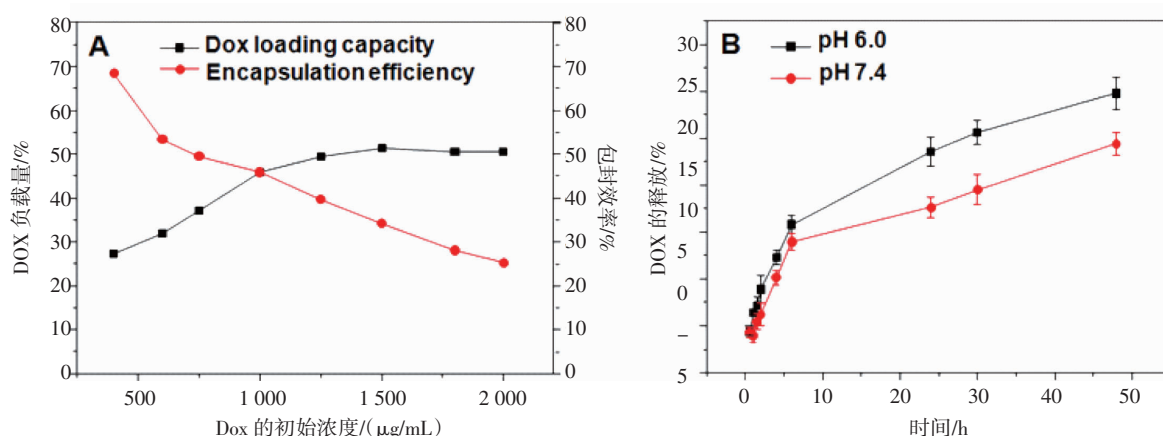


图 6 A. P (MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP 纳米粒子在不同初始浓度 DOX 溶液时的载药量和包封率;B. 不同 pH 值时 DOX 从 P (MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP 纳米粒子中的释放

Fig 6 The drug loading capacity and encapsulation efficiency of P (MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP nanoparticles with different initial DOX concentrations (A) and the DOX release from P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP nanoparticles under different pH values (B)

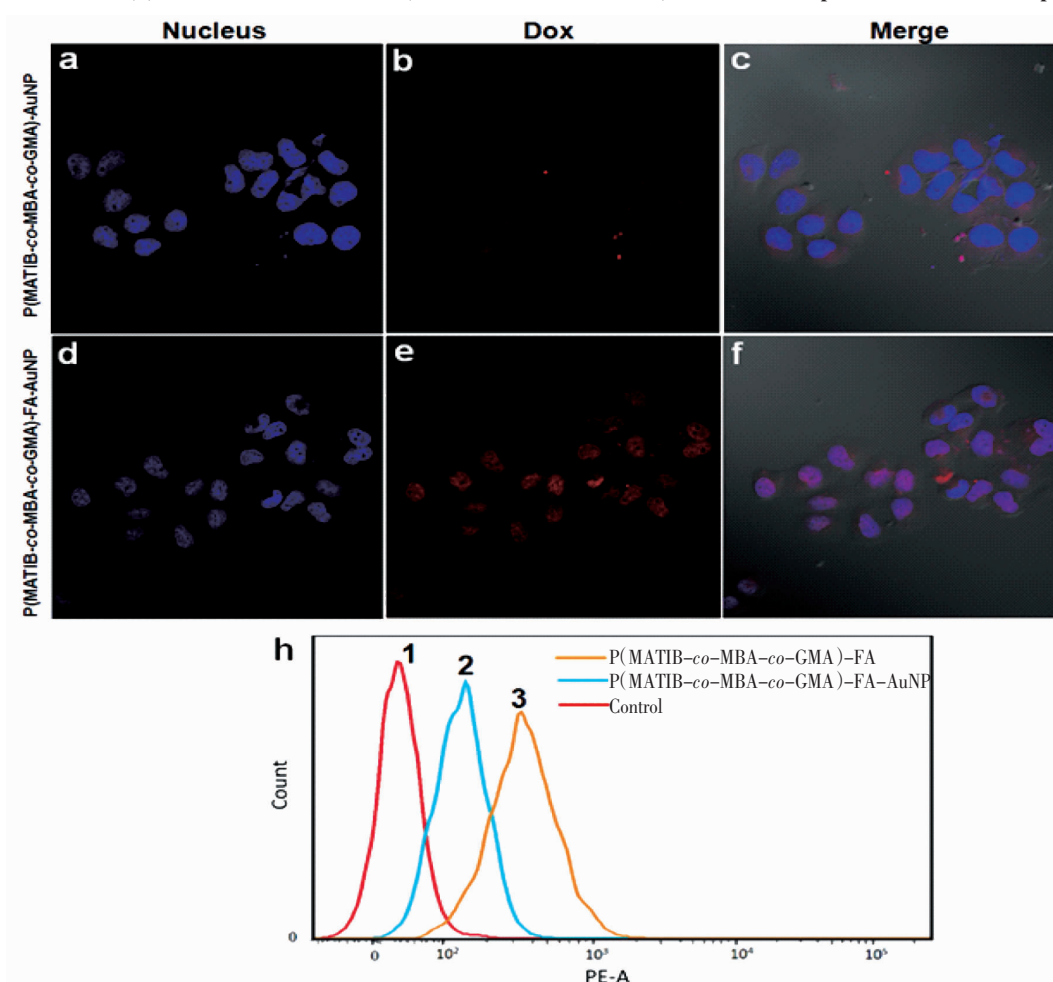


图 7 MCF-7 细胞分别与 P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP 纳米粒子和负载 DOX 的 P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-AuNP 纳米粒子在 37 °C 孵育 0.5 h 后的共聚焦荧光显微镜照片 (a-f) 和相关流式细胞仪检测结果 (h)

Fig 7 Confocal fluorescence microscope photos (a-f) and the flow cytometry results (h) of untreated MCF-7 cells, P (MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP nanoparticles and DOX-loaded P (MATIB-co-MBA-co-GMA)-AuNP nanoparticles incubated with MCF-7 cells at 37 °C for 0.5 h

2.3.4 细胞毒性 本研究采用 MTT 实验进一步评估 P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP 纳米粒子的细胞毒性及其载药纳米粒子对肿瘤细胞 MCF-

7 的杀伤作用, 如图 8 所示。可以看出, 当 P (MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP 纳米粒子浓度低于 100 $\mu\text{g/mL}$ 时细胞生存活性在 80% 以上,

未显示出明显毒性。在载药纳米粒子中,随 DOX 浓度增加,负载 DOX 的 P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP 纳米粒子和 P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-AuNP 纳米粒子分别处理的 MCF-7 细胞活性均显示得到很好的抑制,二者的 IC_{50} 分别为 0.33 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.65 $\mu\text{g/mL}$ 。结果表明,有 FA 修饰的载药纳米粒子显示出对肿瘤细胞更好的杀伤性能。但相比游离 DOX 的 IC_{50} (0.11 $\mu\text{g/mL}$),二者对肿瘤细胞的杀伤能力相对较低,这主要是因为 DOX 在纳米

粒子中的释放较慢,在检测时间内未达到完全释放。负载 DOX 的 P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP 纳米粒子在 5 $\mu\text{g/mL}$ 的 DOX 浓度下可杀死约 94% 的 MCF-7 细胞,此时纳米粒子的浓度约为 10 $\mu\text{g/mL}$,纳米粒子本身远不至于产生细胞毒性。这些结果表明,负载 DOX 的 P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP 纳米粒子易被 MCF-7 细胞高效摄取,并在细胞内释放出 DOX 发挥杀伤作用,从而减少对正常组织细胞的伤害。

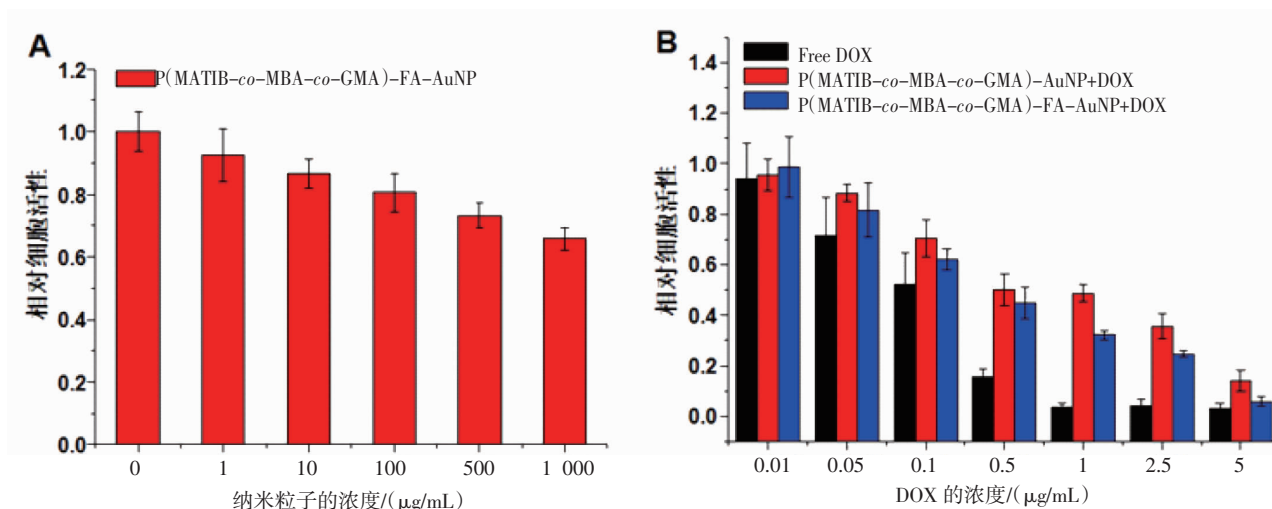


图8 A. P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP 纳米粒子对 MCF-7 细胞的细胞毒性;B. 负载 DOX 的 P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP 纳米粒子、P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-AuNP 纳米粒子和游离 DOX 对 MCF-7 细胞的细胞毒性

Fig 8 Relative cellular viability of MCF-7 cells after treatment with P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP nanoparticles (A), DOX loaded P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP nanoparticles, DOX loaded P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-AuNP nanoparticles and free DOX (B)

3 讨论

本研究首先制备了含碘单体化合物 MATIB,从核磁谱图确定了其结构。然后采用沉淀聚合法制备了 FA 修饰并沉积了 AuNP 的含碘聚合物 P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP 纳米粒子。通过 TEM、FT-IR 光谱、UV-vis 吸收光谱及逐步所得纳米粒子的粒径、粒径分布、Zeta 电位、I 和 Au 的含量确定了 P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP 纳米粒子的结构和表面形貌。通过纳米粒子溶液随碘浓度变化的体外 X-射线衰减关系图可以看出 P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP 纳米粒子具有较好的 X 线衰减效应,并优于没有 AuNP 掺杂的纳米粒子,说明 AuNP 的掺入显著增强了其 CT 造影性能。载药和释药结果表明,该纳米粒子对 DOX 的负载量可达到 51.3%,并具有 pH 响应的药物释放性能。通过共聚焦荧光显微镜和流式细胞仪的观察,可以得知该纳米粒子对 MCF-7 肿瘤细胞具有一定的主动靶向性,其能够通过受体介导的内吞作用被 FA 受体高表达的 MCF-7 细胞更高效地

结合和摄取。细胞毒性表征结果显示,该纳米粒子具有较低的细胞毒性,并可以高效携带抗肿瘤药物进入肿瘤细胞并杀死肿瘤细胞。

综上所述,本研究制备的 P(MATIB-co-MBA-co-GMA)-FA-AuNP 纳米粒子显示了可同时作为 X 线 CT 造影剂和抗肿瘤药物输送载体的能力,有潜力成为肿瘤诊治一体化的诊疗剂。

参考文献:

- [1] De La Vega J C, Hafeli U O. Utilization of nanoparticles as X-ray contrast agents for diagnostic imaging applications[J]. Contrast Media Mol, 2015, 10(2): 81
- [2] Hayashi H, Toyota T, Goto S, et al. Development of a non-blurring, dual-imaging tissue marker for gastrointestinal tumor localization[J]. Surg Endosc, 2015, 29(6): 1445
- [3] Attia M F, Anton N, Chipier M, et al. Biodistribution of X-ray iodinated contrast agent in nano-emulsions is controlled by the chemical nature of the oily core[J]. ACS Nano, 2014, 8(10): 10537
- [4] Badea C T, Athreya K K, Espinosa G, et al. Computed tomography imaging of primary lung cancer in mice using a liposomal-iodinated contrast agent[J]. PLoS One, 2012, 7(4): e34496
- [5] Bhavane R, Badea C, Ghaghada K B, et al. Dual-energy computed

- tomography imaging of atherosclerotic plaques in a mouse model using a liposomal-iodine nanoparticle contrast agent[J]. *Circ Cardiovasc Imag*, 2013, 6(2): 285
- [6] Ekdawi S N, Stewart J M P, Dunne M, et al. Spatial and temporal mapping of heterogeneity in liposome uptake and microvascular distribution in an orthotopic tumor xenograft model[J]. *J Control Release*, 2015, 207: 101
- [7] Stapleton S, Allen C, Pintilie M, et al. Tumor perfusion imaging predicts the intra-tumoral accumulation of liposomes[J]. *J Control Release*, 2013, 172(1): 351
- [8] Lin Q Y, Jin C S, Huang H, et al. Nanoparticle-enabled, image-guided treatment planning of target specific RNAi therapeutics in an orthotopic prostate cancer model[J]. *Small*, 2014, 10: 3072
- [9] Hill M L, Corbin I R, Levitin R B, et al. In vitro assessment of poly-iodinated triglyceride reconstituted low-density lipoprotein: initial steps toward CT molecular imaging[J]. *Acad Radiol*, 2010, 17(11): 1359
- [10] deKrafft K E, Xie Z, Cao G, et al. Iodinated nanoscale coordination polymers as potential contrast agents for computed tomography[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2009, 48(52): 9901
- [11] Jin E, Lu Z R. Biodegradable iodinated polydisulfides as contrast agents for CT angiography[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(22): 5822
- [12] Lee J Y, Chung S J, Cho H J, et al. Iodinated hyaluronic acid oligomer-based nanoassemblies for tumor-targeted drug delivery and cancer imaging[J]. *Biomaterials*, 2016, 85: 218
- [13] Ghosh P, Das M, Rameshbabu A P, et al. Chitosan derivatives cross-linked with iodinated 2,5-dimethoxy-2,5-dihydrofuran for non-invasive imaging[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2014, 6(20): 17926
- [14] Margel S, Galperin A, Aviv H, et al. Radiopaque polymeric nanoparticles for X-ray medical imaging. *Nanotechnologies for the Life Sciences*[M]. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, 2012: 343
- [15] Hyafil F, Cornily J C, Feig J E, et al. Noninvasive detection of macrophages using a nanoparticulate contrast agent for computed tomography[J]. *Nat Med (N Y, NY, U S)*, 2007, 13(5): 636
- [16] Wang H, Zheng L, Peng C, et al. Folic acid-modified dendrimer-entrapped gold nanoparticles as nanoprobe for targeted CT imaging of human lung adenocarcinoma[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(2): 470
- [17] Wang H, Zheng L F, Guo R, et al. Dendrimer-entrapped gold nanoparticles as potential CT contrast agents for blood pool imaging[J]. *Nanoscale Res Lett*, 2012, 7(1): 190
- [18] Shi H Y, Wang Z M, Huang C S, et al. A functional CT contrast agent for in vivo imaging of tumor hypoxia[J]. *Small*, 2016, 12(29): 3995
- [19] Liu X H, Gao C H, Gu J H, et al. Hyaluronic acid stabilized iodine-containing nanoparticles with Au nanoshell coating for X-ray CT imaging and photothermal therapy of tumors[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8(41): 27622
- [20] Peng C, Li K, Cao X, et al. Facile formation of dendrimer-stabilized gold nanoparticles modified with diatrizoic acid for enhanced computed tomography imaging applications[J]. *Nanoscale*, 2012, 4(21): 6768
- [21] Ottaviano F G, Handy D E, Loscalzo J. Redox regulation in the extracellular environment[J]. *Circ J*, 2008, 72(1): 1
- [22] Saito G, Swanson J A, Lee K D. Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: role and site of cellular reducing activities[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, 55(2): 199
- [23] Leamon C P, Cooper S R, Hardee G E. Folate-liposome-mediated antisense oligodeoxynucleotide targeting to cancer cells: evaluation in vitro and in vivo[J]. *Bioconjug Chem*, 2003, 14(4): 738
- [24] Lu Y, Low P S. Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, 54(5): 675
- [25] Weitman S D, Lark R H, Coney L R, et al. Distribution of the folate receptor GP38 in normal and malignant cell lines and tissues[J]. *Cancer Res*, 1992, 52(12): 3396

(2017-07-25 收稿)

欢迎投稿

欢迎订阅