

荧光/MRI双模态靶向成像诊疗试剂的制备

陈庆涛¹ 石向东¹ 梁妮妮¹ 姜利英² 方少明¹ 陈凤华^{*,1}

(¹郑州轻工业大学材料与化学工程学院, 郑州 450002)

(²郑州轻工业大学电气信息工程学院, 郑州 450002)

摘要: 在聚乙二醇二胺(NH₂-PEG-NH₂)修饰的石墨烯量子点(GODs)表面以酰胺键偶联二乙基三胺五乙酸(DTPA)分子,之后将Gd³⁺离子与其进行配合,得到了GODs-Gd(DTPA)复合纳米粒子,然后再通过酰胺键在GODs-Gd(DTPA)的表面修饰叶酸(FA)靶分子,最后进一步将阿霉素(DOX)通过 π - π 堆积吸附在造影剂的表面,制备了FA/GODs-Gd(DTPA)/DOX荧光/MRI双模态靶向肺癌细胞成像诊疗试剂,通过透射电子显微镜、紫外可见吸收光谱、荧光光谱和激光共聚焦扫描显微镜等手段表征了其形貌、发光性能和靶向成像性能。MRI、激光共聚焦扫描显微镜和MTT等结果表明,相对于正常的HLF细胞,所制备的FA/GODs-Gd(DTPA)/DOX纳米粒子能够靶向检测FA受体高表达的肺癌H460细胞,并具有明显的抗肿瘤活性。

关键词: 石墨烯量子点; 荧光; 磁共振成像; 纳米粒子; 诊疗一体

中图分类号: TB34 文献标识码: A 文章编号: 1001-4861(2021)09-1555-08

DOI: 10.11862/CJIC.2021.181

Synthesis of Fluorescence/MRI Dual Targeted Imaging Theranostics Reagent

CHEN Qing-Tao¹ SHI Xiang-Dong¹ LIANG Wei-Wei¹

JIANG Li-Ying² FANG Shao-Ming¹ CHEN Feng-Hua^{*,1}

(¹College of Materials and Chemical Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China)

(²College of Electrical and Information Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Poly (ethylene glycol diamine) (NH₂-PEG-NH₂) modified graphene quantum dots (GODs) were conjugated with diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) via an amide bond. Then the product further coordinated with Gd³⁺ ions, followed by the subsequent linkage of folic acid (FA) to form FA/GODs-Gd(DTPA). Next, an anticancer drug, doxorubicin (DOX), was loaded on the surface of FA/GODs-Gd(DTPA) to obtain the final fluorescence/MRI dual targeted imaging diagnostic reagents (FA/GODs-Gd(DTPA)/DOX) for lung cancer cells. The sample was characterized by transmission electron microscopy, UV-Vis absorption spectroscopy, fluorescence spectroscopy, laser confocal microscopy, and so on. Compared with normal HLF cells, the results of MRI, confocal laser scanning microscopy and MTT showed that the prepared FA/GODs-Gd(DTPA)/DOX could be targeted to detect lung cancer H460 cells, in which folate receptor was highly expressed, and also displayed significant anti-tumor activity.

Keywords: graphene quantum dots; fluorescence; magnetic resonance imaging; nanoparticles; theranostics

肿瘤的“诊疗一体化”是在肿瘤细胞的早期筛查和早期诊断的基础上进行同步治疗,可以大幅度提高肿瘤患者的治愈率、生活质量、生存期及生存

率。因此,研发新型多功能诊疗制剂(theranostic agent)具有重要的意义^[1]。纳米技术的出现为癌症诊疗一体化的实现带来了新的希望。其中,分子成像

收稿日期:2021-02-21。收修改稿日期:2021-05-21。

国家自然科学基金(No.21671179,62073299)和河南省科技厅科技攻关计划项目(No.202102210045)资助。

*通信联系人。E-mail: phenix@zzuli.edu.cn

技术是癌症诊疗一体化的核心和重要基础。

磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)作为一种先进的分子影像技术,具有无损伤性、高分辨率等优点,已经广泛用于临床疾病诊断,而30%以上的MRI诊断需要使用造影剂^[2-3]。以钠盐或者葡甲胺盐的离子形式用于临床的Gd-DTPA(Magnevist,二乙三胺五乙酸钆)是应用广泛的小分子离子型 T_1 造影剂,但它产生的渗透压较高,并且易经肾脏代谢后迅速排出,在体内存留时间较短;同时不具有组织及器官的选择性和靶向性^[4-5],往往需要对其进行修饰。对于多胺多羧酸配合物而言,其弛豫效率主要由旋转相关时间决定^[6],所以增大配合物分子的体积一方面可以提高弛豫效率,另一方面由于大分子本身的特点,向大分子中引入特定的对人体某一组织器官具有亲和性的基团,还能增强选择性或者靶向性。因此,对Gd-DTPA进行的大分子修饰近年来研究得比较多,现在已报道的有将小分子Gd-DTPA造影剂共价或者非共价的与血红细胞^[7]、蛋白质^[8-9]、多糖^[10-11]、聚氨基酸^[12]、树枝状大分子^[13]及人工合成的其他生物相容性高分子^[14]相结合,用于提高弛豫效率,增强成像的对比度和清晰度。

石墨烯量子点(graphene quantum dots, GODs)因

其显著的量子限域和边缘效应呈现出多种独特的物理化学性能,此外GODs表现出的低细胞毒性、良好溶解性、稳定的光致发光等优点,使其成为极好的生物成像探针,已被人们广泛用于细胞及组织成像的研究^[15-17]。若将Gd-DTPA修饰负载在GODs上,一方面可以增大Gd-DTPA造影剂的分子体积,增强 T_1 阳性造影效果,提高肿瘤检测的准确性;另一方面利用GODs的荧光成像,可以改善MRI成像存在的灵敏度低和信号采集耗时等缺点,同时还可利用GODs表面较好的接枝性能及大的比表面积,偶联针对不同肿瘤的靶分子和通过 π - π 堆垛吸附具有芳环结构的抗癌药物,实现肿瘤细胞的诊疗一体化。

故我们在聚乙二醇二胺(NH_2 -PEG- NH_2)修饰的GODs表面以酰胺键偶联二乙基三胺五乙酸(DTPA)分子,之后将 Gd^{3+} 离子与其进行配合,得到GODs-Gd(DTPA)复合纳米粒子,然后再通过酰胺键在GODs-Gd(DTPA)的表面修饰叶酸(FA)靶分子,最后将阿霉素(DOX)进一步通过 π - π 堆垛吸附在该造影剂的表面,制备GODs-Gd(DTPA)荧光/MRI双模态靶向肺癌细胞成像诊疗试剂FA/GODs-Gd(DTPA)/DOX,具体制备流程如图1所示。

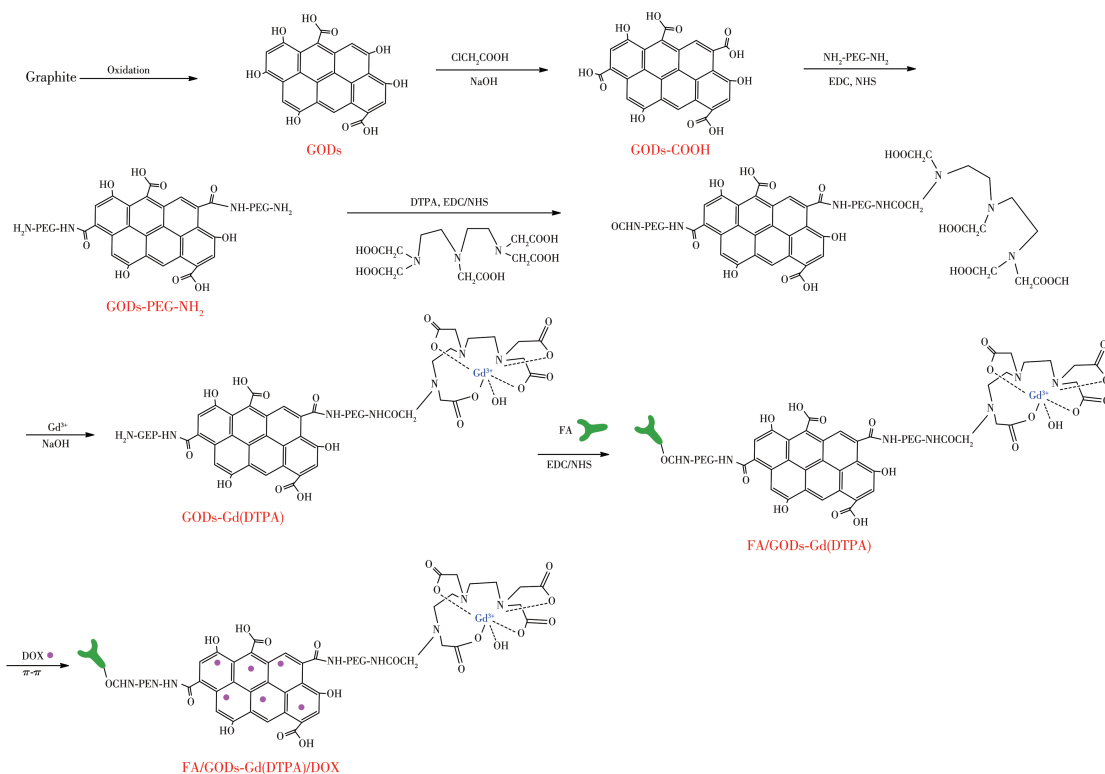


图1 荧光/MRI双模态成像诊疗试剂(FA/GODs-Gd(DTPA)/DOX)的制备过程

Fig.1 Preparation process of double-fluorescence/MRI dual targeted imaging diagnostic reagents (FA/GODs-Gd(DTPA)/DOX)

1 实验部分

1.1 试剂

1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC·HCl, 纯度大于98.5%)、DTPA、氯乙酸钠购于Sigma-Aldrich公司;天然石墨、氯化钆(Ⅲ)六水合物购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司;(NH₂-PEG-NH₂, $M_w=10\ 000$)购于Jenkem Technology;浓硫酸、浓盐酸、发烟硝酸、醋酸钠、无水碳酸钠、氢氧化钠、三乙胺、二甲基亚砜、碳酸氢钠等其他所用试剂均为分析纯,购于国药集团化学试剂有限公司;磷酸盐缓冲盐溶液(PBS)和DOX购于BBI公司;H460和HLF细胞为肿瘤医院赠送,细胞培养基、MTT购于上海普飞生物科技公司;实验所用水均为三次水和电阻为18.2 MΩ以上的超纯水。

1.2 实验过程

1.2.1 GODs的制备及修饰

根据文献制备GODs^[18],具体步骤如下:将0.2 g的天然石墨加入到15 mL浓硫酸和5 mL发烟硝酸的混合浓酸中,超声10 min后于120 ℃搅拌反应30 min。反应结束后,冷至室温,加入100 mL去离子水稀释反应物,并用NaHCO₃溶液调节pH值为7~8,然后将反应溶液转移到透析袋(截留分子量为14 kDa)中透析48 h除去多余的盐,最后得到浓度为1.47 mg·L⁻¹的焦黄色的GODs分散液。向此40 mL的GODs分散液中依次加入2.9 g NaOH和6.16 g ClCH₂COONa,超声反应2 h后用稀HCl调节pH值到中性,然后超滤去除未反应的小分子,得到羧基化的GODs分散液(GODs-COOH,浓度为0.3 mg·mL⁻¹)。

取30 mL GODs-COOH溶液,依次向内加入1 mL NH₂-PEG-NH₂溶液(50 mg·mL⁻¹)和0.3 mL EDC·HCl水溶液(80 mg·mL⁻¹),用三乙胺调节pH值到8后室温搅拌反应24 h。反应结束后转移到截留分子量为14 kDa的透析袋中,透析2 d除去未反应完的小分子和NH₂-PEG-NH₂,得到末端带有一NH₂的聚乙二醇链修饰的GODs液(GODs-PEG-NH₂)。

1.2.2 FA/GODs-Gd(DTPA)的制备

向含有0.1 g DTPA的5 mL DMSO溶液中加入5 mL所制备的GODs-PEG-NH₂分散液、1 mL EDC的DMSO溶液(50 mg·mL⁻¹)和50 μL的三乙胺,搅拌反应24 h后将产物转移到透析袋内透析2~3 d,得到GODs-DTPA溶液,然后向此溶液中加入10 mL GdCl₃溶液(20 mmol·L⁻¹),搅拌反应4 h,最后透析除去未反应的GdCl₃得到GODs-Gd(DTPA)纳米粒子。

取10 mL GODs-Gd(DTPA)纳米粒子的分散液,超声30 min后用三乙胺调pH值为8左右,然后依次向内加入10 mL FA溶液(0.1 mg·mL⁻¹)和1 mL EDC·HCl水溶液(80 mg·mL⁻¹),室温搅拌反应48 h。反应结束后,超滤去除未反应的FA,得到修饰有FA的GODs-Gd(DTPA)纳米粒子(FA/GODs-Gd(DTPA))。ICP-MS测试结果表明样品中Gd³⁺的浓度为12.3 μg·mL⁻¹。FA/GODs-Gd(DTPA)中FA的负载率(loading efficiency, LE_{FA})通过下列公式进行计算:LE_{FA}=($m_{i,FA}-m_{d,FA}$)/ $m_{i,FA}$ ×100%,其中, $m_{i,FA}$ 为实验投入的FA质量(1 mg); $m_{d,FA}$ 为未偶联上的FA质量(mg),即收集的所有透析液中的FA含量,根据FA的标准曲线 $c/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})=0.306+8.877A$ 进行计算(A 为吸光度, $R^2=0.998\ 5$)。由此可得出FA的负载率为79.8%。

1.2.3 FA/GODs-Gd(DTPA)/DOX的制备

向2 mL FA/GODs-Gd(DTPA)的分散液中加入0.5 mL DOX溶液(1 mg·mL⁻¹),在摇床中过夜,反应结束后,超滤、水洗,将未吸附的DOX去除干净(所有滤液收集于容量瓶中,便于根据紫外吸收光谱测得载药量),得到载有DOX的FA/GODs-Gd(DTPA)纳米诊疗试剂(FA/GODs-Gd(DTPA)/DOX)。FA/GODs-Gd(DTPA)/DOX的载药率(LE_{DOX}),即 π - π 堆垛吸附在FA/GODs-Gd(DTPA)表面的DOX质量占实验投入的DOX质量(0.5 mg)的百分比含量,通过下列公式进行计算:LE_{DOX}=($m_{i,DOX}-m_{d,DOX}$)/ $m_{i,DOX}$ ×100%,其中, $m_{i,DOX}$ 为实验投入的DOX质量(0.5 mg); $m_{d,DOX}$ 为未吸附在材料表面的DOX质量,即收集的所有透析液中的DOX含量,根据DOX的标准曲线 $c/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})=0.500\ 5+0.061\ 1A$ 进行计算(A 为吸光度, $R^2=0.999\ 3$)。由此可算出FA/GODs-Gd(DTPA)/DOX的载药率为83.8%。

1.2.4 细胞成像实验

荧光成像实验:在含有10%的胎牛血清和1%的青霉素、链霉素的DMEM培养基中,人肺纤维HLF细胞和肺癌细胞H460细胞分别接种在底部厚度为0.17 mm的细胞培养皿中,置于37 ℃、CO₂体积分数5%的细胞培养箱中培养24 h后,弃去原培养基,分别加入浓度为50 μg·mL⁻¹的FA/GODs-Gd(DTPA)纳米粒子的DMEM培养基,继续培养1 h后,弃去培养基,培养皿用PBS清洗细胞3次除去未进入细胞的纳米粒子,随后用甲醇固定20 min,再次用PBS清洗细胞3次,最后加入1 mL PBS保持细胞形态,然后置于激光共聚焦扫描显微镜下观察细胞内

的荧光。

MRI 成像实验:将含有不同浓度 Gd^{3+} (15、30、45、60 和 $75 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 FA/GODs-Gd(DTPA) 纳米粒子与 H460 细胞孵育 24 h 后, 上清液用 PBS 清洗 3 遍, 收集细胞加入核磁管, 进行细胞 MRI 成像。所用 MRI 成像设备为 11.7 T Bruker micro-MRI system, 测试参数: TR=300 ms, TE=5.9 ms, matrix=128×96, slice thickness=1 mm, FOV=1.60 cm×1.80 cm, NEX=2。

1.2.5 DOX 体外释放曲线的测定

分别取 2 mL FA/GODs-Gd(DTPA)/DOX 的水分散液置于截留分子量为 14 kDa 的透析袋中, 紧密封口, 然后分别置于 10 mL 37 °C、pH 为 7.4 和 5.5 的 PBS 中, 定时取 0.5 mL 释放介质测定其紫外吸收光谱, 同时补充等量的释放液, 根据 DOX 工作曲线计算其浓度, 并绘制累计释药率-时间曲线。

1.2.6 细胞毒性试验

采用 MTT 法检测了 FA/GODs-Gd(DTPA) 纳米粒子负载 DOX 前后对 H460 细胞的毒性。把 $100 \mu\text{L}$ 密度为 1×10^4 的 H460 细胞接种在 96 孔板中, 先在 37 °C、 CO_2 体积分数 5% 的细胞培养箱中培养 24 h, 然后培养基分别被 $100 \mu\text{L}$ 含有不同浓度的 FA/GODs-Gd(DTPA) 纳米粒子和 FA/GODs-Gd(DTPA)/DOX 的培养基替换, 细胞在 37 °C、 CO_2 体积分数 5% 的细胞培养箱中继续培养 24 h 后, 每个孔中加入 $15 \mu\text{L}$ 的 MTT 溶液 ($5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 在 37 °C、 CO_2 体积分数 5% 的培养箱中再孵育 4 h, 小心倒出培养基后, 每孔中加入 $150 \mu\text{L}$ 的 DMSO, 震荡 10 min。用酶标仪在 490 nm 处测定其光吸收值(OD 值), 将没有加入纳米粒子孵育的细胞作为对照组, 实验结果由 4 组平行实验数据求平均值得到: $\text{Cell viability} = (\text{OD}_{\text{exp}} / \text{OD}_{\text{con}}) \times 100\%$, 其中 OD_{exp} 为实验组 OD 值, OD_{con} 为对照组 OD 值。

1.3 测试与表征

样品的形貌采用日本 JEOL 公司 JEM-2100 型透射电子显微镜(TEM)进行表征(在 200 kV 下操作)。采用德国 Bruker TENSOR27 红外光谱仪对样品进行 FTIR 光谱分析。采用 LabRam HR 800 型共聚焦显微拉曼光谱仪进行拉曼光谱测试, 激发光波长为 638 nm。在日本 Hitachi U-3900H 型紫外可见光谱仪和 F-4600 型荧光光谱仪进行紫外光谱和荧光光谱的测试, 采用硫酸奎宁在激发波长 360 nm 的荧光量子产率 0.54 为标准, 测量计算样品的荧光量子产率。采用英国 Malwen 公司的 Zetasizer Nano ZS 型纳

米粒度及 ζ 电位分析仪测试纳米粒子的表面电位。在美国 Perkin Elmer Victor X4 型酶标仪上测定光吸收值。细胞成像在德国 Leica TCS SP5 II 型激光共聚焦扫描显微镜上测试。 Gd^{3+} 的浓度利用 ICP-AES (Perkin Elmer Optima 8000) 进行测定。

2 结果与讨论

2.1 TEM 表征

图 2 为所制备的 GODs 和 FA/GODs-Gd(DTPA)/DOX 分散液的照片及其对应的 TEM 图片。从图 2a 中可以看出所制备的 GODs 溶液呈现焦黄色, 分散性较好, 经过进一步修饰 Gd(DTPA)、FA 及 DOX 后, FA/GODs-Gd(DTPA)/DOX 的分散液呈现红色(图 2b)。GODs 的 TEM 照片(图 2c)显示所制备的 GODs 为粒径为 1~2 nm 的小粒子, 尺寸分布较均一, FA/GODs-Gd(DTPA)/DOX 的形貌没有发生变化(图 2d), 但是粒径增大到了 5~6 nm。

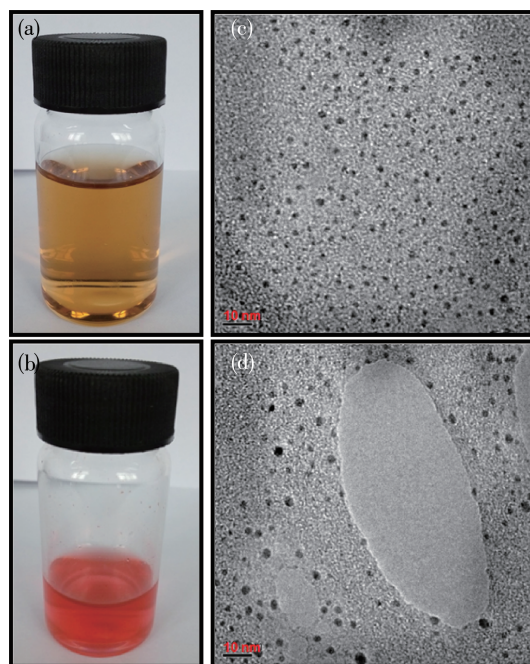


图 2 所制备的 GODs 和 FA/GODs-Gd(DTPA)/DOX 分散液的照片(a、b)及其对应的 TEM 图片(c、d)

Fig.2 Photographs (a, b) and corresponding TEM images (c, d) of as-prepared GODs and FA/GODs-Gd(DTPA)/DOX dispersion

2.2 Raman 光谱表征

图 3 为所制备的 GODs(a)和 FA/GODs-Gd(DTPA)/DOX 分散液(b)的 Raman 光谱。图 3a 中出现了 GODs 很明显的 D 带(A_{1g})和 G 带(E_{2g})峰, 分别位于 1348 和 1602 cm^{-1} 处。当 GODs 修饰上生物功能分子后, 除

了保留 GODs 的特征 Raman 峰外,在 FA/GODs-Gd(DTPA)/DOX (DTPA)/DOX 的 Raman 光谱中(图 3b)还出现了明显的 DOX 和 FA 分子的 Raman 特征峰,分别位于 450 cm^{-1} ($\delta_{\text{C}=\text{O}}$)、 991 cm^{-1} (苯环的伸缩振动)、 $1\,083\text{ cm}^{-1}$ (苯环的伸缩振动)、 $1\,244\text{ cm}^{-1}$ ($\delta_{\text{O}-\text{H}}$ 、 $\delta_{\text{C}-\text{H}}$ 和 $\delta_{\text{C}-\text{OH}}$)、 $1\,575\text{ cm}^{-1}$ (苯环振动和 $\nu_{\text{C}=\text{C}}$) 和 $1\,631\text{ cm}^{-1}$ ($\nu_{\text{C}=\text{O}}$) 处。此外,在 597 cm^{-1} 处可以明显看到归属为 Gd—O 的 Raman 峰,以上分析均证明了 FA/GODs-Gd(DTPA)/DOX 的成功制备。

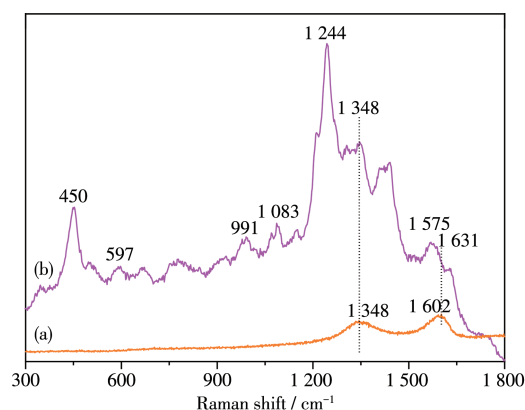


图3 制备的 GODs (a) 和 FA/GODs-Gd(DTPA)/DOX (b) 的拉曼光谱

Fig.3 Raman spectra of as-prepared GODs (a) and FA/GODs-Gd(DTPA)/DOX (b)

2.3 红外光谱和 ζ 电位分析

图4为所制备的 GODs、GODs-PEG-NH₂、GODs-Gd(DTPA)和 FA/GODs-Gd(DTPA)的 FT-IR 谱图。在 GODs 的红外光谱中(图4a), $3\,500\sim 3\,100\text{ cm}^{-1}$ 范围内的宽吸收峰是由于 GODs 和 GODs 吸附水中的羟基产生的 O—H 伸缩振动, $1\,727\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰是 GODs 表面的羰基伸缩振动峰, $1\,583\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰是 GODs 中 C=C 的伸缩振动产生的, 在 $1\,005\text{ cm}^{-1}$ 处可以观察到 C—O 的吸收峰。GODs 表面共价修饰-PEG-NH₂后, 图4b谱线中出现了明显的 N—H 的振动峰($3\,440\text{ cm}^{-1}$)、C—N 的振动峰($1\,238\text{ cm}^{-1}$)和比较强的—CH₂—的 C—H 振动峰($2\,870\text{ cm}^{-1}$), 而且在 $1\,632\text{ cm}^{-1}$ 处出现了一 CONH—键的吸收峰, 这均表明在 GODs 的表面成功地修饰上了含有氨基的 PEG 链, 便于进一步共价修饰 DTPA 分子。我们对该过程中的每步产物也进行了 ζ 电位值的测定, GODs 的 ζ 电位值为 -18.3 mV , 在其表面修饰羧基官能团后, GODs-COOH 的 ζ 电位值变为 -23.4 mV , 经进一步与 NH₂-PEG-NH₂ 反应后, GODs-PEG-NH₂ 的 ζ 电位值升高到了 -10.3 mV , 充分说明了氨基被成功

地修饰在了 GODs 表面。

图4c为 GODs-Gd(DTPA)的红外谱图, 其峰位基本与图4b相同, 但是位于 $1\,632\text{ cm}^{-1}$ 处的一 CONH—键的吸收峰强度明显增强, 同时在 $1\,400\text{ cm}^{-1}$ 处出现了明显的羧酸盐的特征峰, 间接证明了在 GODs-PEG-NH₂ 纳米粒子表面成功地通过酰胺链接枝上了 DTPA 分子, 并且 Gd 与配体形成了配合物。由于谱峰重叠, FA/GODs-Gd(DTPA)的红外谱图(图4d)与 GODs-Gd(DTPA)的谱峰差别不大, 但是可以通过紫外吸收光谱证实 FA 分子的成功偶联(见后文)。

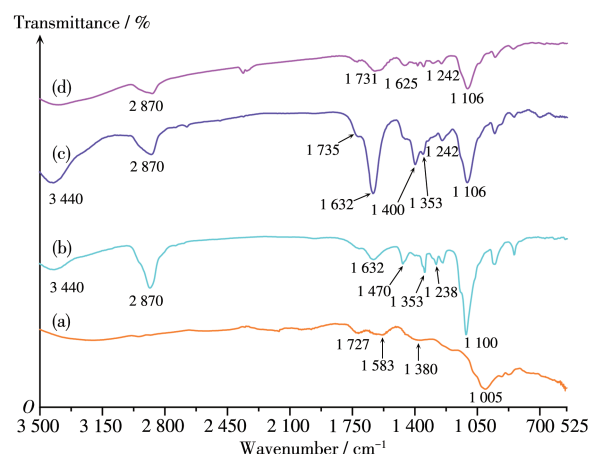


图4 制备的 GODs (a)、GODs-PEG-NH₂ (b)、GODs-Gd(DTPA) (c) 和 FA/GODs-Gd(DTPA) (d) 的红外谱图

Fig.4 FT-IR spectra of as-prepared GODs (a), GODs-PEG-NH₂ (b), GODs-Gd(DTPA) (c) and FA/GODs-Gd(DTPA)/DOX (d)

2.4 荧光光谱和紫外吸收光谱分析

GODs 的荧光谱图如图5a所示。结果表明所制备的 QDs 的荧光光谱呈现明显的激发波长依赖型的荧光特性^[19], 当激发光波长分别为 300 、 400 和 500 nm 时, 分别在 432 、 512 和 610 nm 处出现了 QDs 的荧光发射峰。当 QDs 表面修饰 Gd(DTPA) 和 FA 后, 虽然 FA/GODs-Gd(DTPA) 的荧光光谱(图5b)强度下降, 同时发生了蓝移^[20], 但是仍然呈现激发波长依赖型的荧光特性, 很好地保留了 GODs 的荧光性能, 有利于对细胞的荧光成像检测。根据 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 稀硫酸溶解的硫酸奎宁溶液和样品稀溶液在 360 nm 激发波长下的荧光积分强度比值和吸光度比值, 以硫酸奎宁在激发波长 360 nm 的荧光量子产率 0.54 为标准, 计算可得 GODs 及 FA/GODs-Gd(DTPA)/DOX 的荧光量子产率分别为 0.028 和 0.017 。

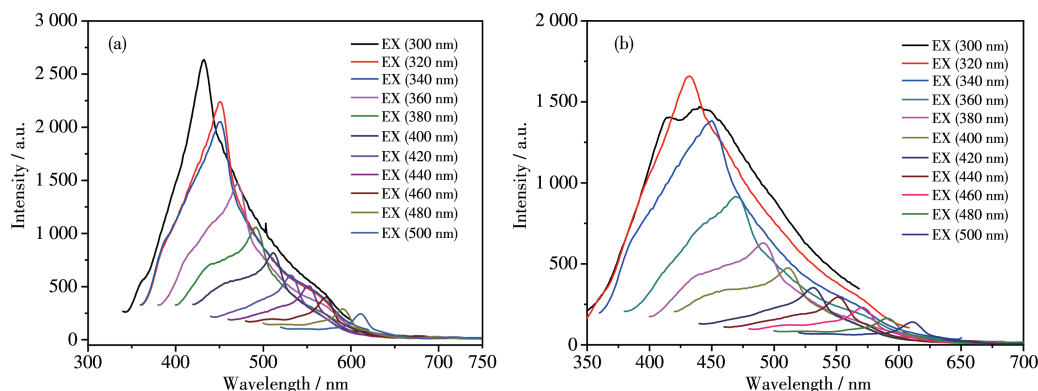


图5 制备的(a) GODs和(b) FA/GODs-Gd(DTPA)的荧光光谱图

Fig.5 Fluorescence spectra of as-prepared (a) GODs and (b) FA/GODs-Gd(DTPA)

图6是GODs、FA、DOX、FA/GODs-Gd(DTPA)和FA/GODs-Gd(DTPA)/DOX的UV-Vis吸收光谱。在GODs的光谱图中,由于GODs中碳碳共轭双键 $\pi \rightarrow \pi^*$ 的跃迁而在231 nm处出现了GODs的特征紫外吸收峰^[21];FA在254、284和365 nm处有明显的紫外吸收峰,当FA通过成键偶联到GODs-Gd(DTPA)的表面后,在FA/GODs-Gd(DTPA)的UV-Vis谱图中同时出现了FA位于250~280 nm范围处的紫外吸收峰和GODs在231 nm处的紫外吸收,证明FA分子成功地通过酰胺键修饰到了GODs-Gd(DTPA)的表面,制备了具有靶向功能的荧光成像纳米制剂。当FA/GODs-Gd(DTPA)进一步通过 $\pi-\pi$ 堆积作用吸附DOX后,FA/GODs-Gd(DTPA)/DOX的UV-Vis谱图中又出现了DOX位于233和480 nm处的明显特征吸收峰,表明DOX成功地担载在所制备的具有靶向功能的石墨烯量子点上,可实现肿瘤细胞的诊疗一体化。

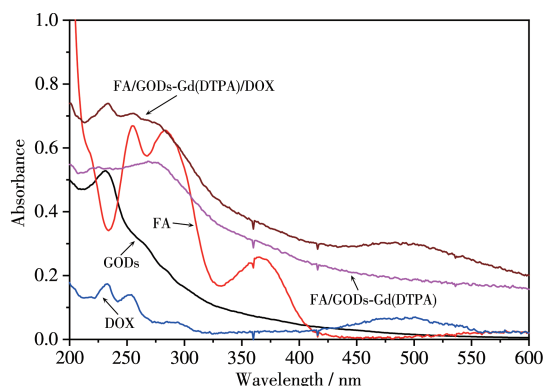


图6 GODs、FA、DOX、FA/GODs-Gd(DTPA)和FA/GODs-Gd(DTPA)/DOX的UV-Vis谱图

Fig.6 UV-Vis spectra of GODs, FA, DOX, FA/GODs-Gd(DTPA) and FA/GODs-Gd(DTPA)/DOX

2.5 细胞的荧光成像

图7是所制备的FA/GODs-Gd(DTPA)纳米试剂分别与肺癌细胞H460(a)和人肺纤维HLF正常细胞(b)共孵育1 h后的激光共聚焦显微照片。从图7a可以看出,在H460细胞中能够检测到GODs的绿色荧光,而在对比实验中,HLF正常细胞中的绿色荧光非常弱(图7b),说明HLF对FA/GODs-Gd(DTPA)的吞噬很少。这是因为HLF为FA受体低表达的正常细胞,从而导致细胞内绿色荧光较弱,而H460为FA受体高表达的实体肿瘤细胞,通过FA受体的介导作用,修饰有FA分子的纳米粒子优先被H460所吞噬,显示了FA/GODs-Gd(DTPA)在肿瘤早期的荧光成像检测中的应用前景。

2.6 MRI成像实验

ICP-AES检测所制备的FA/GODs-Gd(DTPA)样品中 Gd^{3+} 的浓度为 $12.3 \mu g \cdot mL^{-1}$ 。FA/GODs-Gd(DTPA)的体外MRI的 T_1 增强性能见图8a。随着FA/GODs-Gd(DTPA)分散液中 Gd^{3+} 浓度的增大, T_1 加权像依次变亮,对比增强效果逐渐显著,证明FA/GODs-Gd(DTPA)可实现MRI的 T_1 造影成像检测肿瘤细胞的目的。图8b是FA/GODs-Gd(DTPA)样品的弛豫率(r_1)拟合图,从纵向弛豫时间 T_1 的倒数随 Gd^{3+} 的浓度变化图斜率可计算出FA/GODs-Gd(DTPA)的 r_1 值为 $9.92 L \cdot mmol^{-1} \cdot s^{-1}$ 。

2.7 DOX的载药量及释放曲线

根据DOX的标准曲线计算,1 mL FA/GODs-Gd(DTPA)/DOX 诊疗试剂的分散液中含有209 μg DOX。图9为该诊疗试剂分别在pH值为5.5和7.5条件下的DOX释放曲线。从图中可以看出,在pH=5.5时的DOX释放速率明显高于pH=7.5条件下的释放速率,这是由于DOX分子与GODs之间的 $\pi-\pi$ 堆

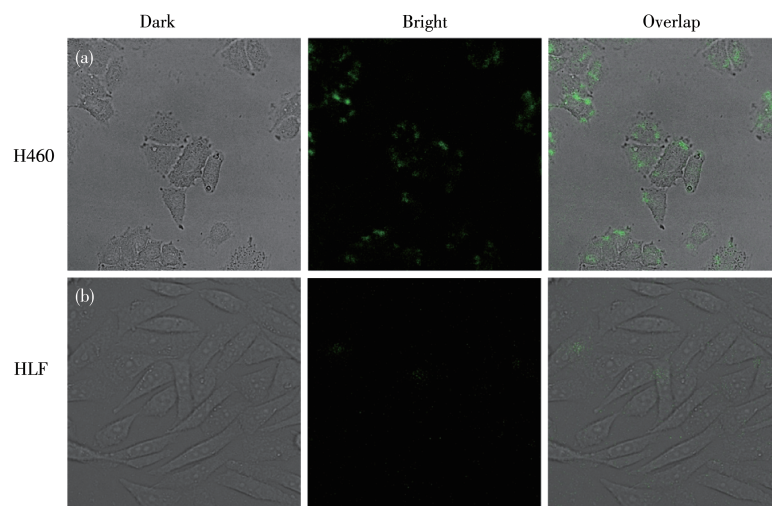


图7 FA/GODs-Gd(DTPA)分别与肺癌细胞 H460 (a)和人肺纤维 HLF 正常细胞(b) 共孵育 1 h 后的激光共聚焦显微镜明场、暗场和重叠照片

Fig.7 Bright field, dark field and overlap laser confocal microscopy images of H460 lung cancer cells (a) and HLF human lung fiber normal cells (b) incubated with FA/GODs-Gd(DTPA) for 1 h, respectively

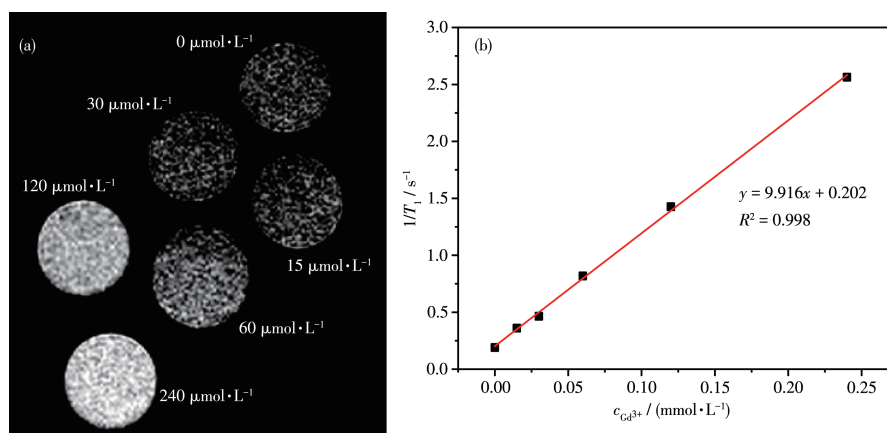


图8 (a) 含有不同 Gd^{3+} 浓度的 FA/GODs-Gd(DTPA) 与 H460 细胞孵育 24 h 后 T_1 加权的 MRI; (b) FA/GODs-Gd(DTPA) 样品的 $1/T_1$ vs $c_{Gd^{3+}}$ 线性拟合图

Fig.8 (a) T_1 weighted MRI of FA/GODs-Gd(DTPA) incubated with H460 cells for 24 h with different concentrations of Gd^{3+} ; (b) Linear fitting for plot of $1/T_1$ vs $c_{Gd^{3+}}$ of FA/ GODs-Gd(DTPA) sample

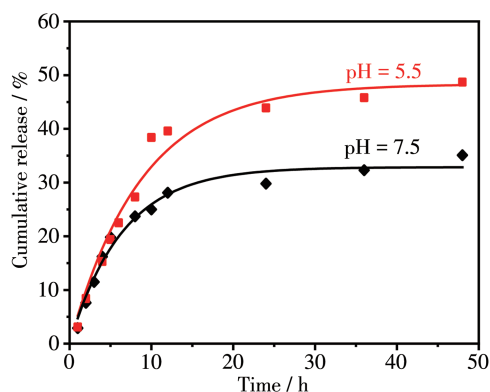


图9 在 PBS 中、37 °C 下 FA/GODs-Gd(DTPA)/DOX 在 pH 值分别为 7.5 和 5.5 条件下 DOX 的释放曲线

Fig.9 Release profiles of DOX from FA/GODs-Gd(DTPA)/DOX at pH=7.5 and 5.5, respectively, in PBS at 37 °C

垛作用在酸性质子化的环境下降低,有利于药物分子的脱附^[22]。以上结果说明在接近中性的血液(pH=7.4),FA/GODs-Gd(DTPA)/DOX 诊疗试剂的传输相对比较稳定,而在弱酸性的肿瘤细胞内能够很好地释放,从而进一步增强了诊疗试剂的靶向性。

2.8 细胞毒性试验

采用 MTT 法检测了 FA/GODs-Gd(DTPA)纳米粒子负载 DOX 前后对 H460 细胞的毒性。图 10 为同浓度的 FA/GODs-Gd(DTPA)纳米颗粒(50~200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)与肺癌细胞 H460 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 48 h 后的细胞活性,与对照组相比,细胞存活率稍微低了一些,但没有明显的差异。结果说明 FA/GODs-Gd(DTPA)纳米颗粒对 H460 细胞的毒性非常低,可以作为潜在的探针用于肿瘤靶向检测。负载 DOX 后,FA/GODs-Gd(DTPA)/DOX 对 H460 细胞的杀伤力明显增强,并且与单独的 DOX(按照 DOX 的质量浓度进行计算,分别为 40、80、120、160 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)相比,更好地提高了 DOX 的抗肿瘤活性。

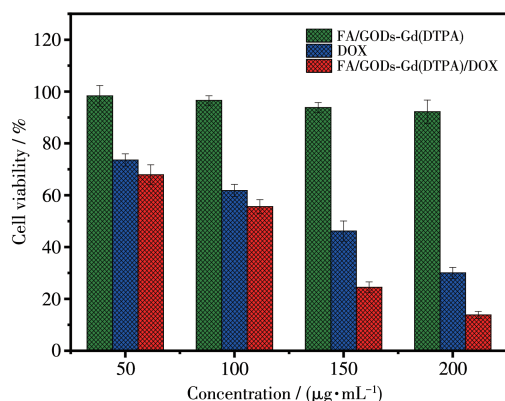


图 10 H460 细胞与不同浓度的 FA/GODs-Gd(DTPA)、DOX 和 FA/GODs-Gd(DTPA)/DOX 孵育 48 h 后的细胞存活率

Fig.10 Cell viability of H460 cells incubated with different concentrations of FA/GODs-Gd(DTPA), DOX and FA/GODs-Gd(DTPA)/DOX for 48 h, respectively

3 结 论

通过化学键作用依次将 MRI 造影剂 Gd(DTPA)和叶酸(FA)分子修饰在了石墨烯荧光量子点(GOGs)的表面,并将阿霉素(DOX)进一步通过 π - π 堆垛作用吸附在其表面,成功制备了 FA/GODs-Gd(DTPA)/DOX 荧光/MRI 双模态靶向肺癌细胞成像诊疗试剂。MRI 和共聚焦激光扫描显微镜结果表明,相对于正常的 HLF 细胞,所制备的纳米试剂可以有效地靶向

检测 FA 受体高表达的肺癌 H460 细胞,在接近中性的血液中,FA/GODs-Gd(DTPA)/DOX 诊疗试剂的传输相对比较稳定,而在弱酸性的肿瘤细胞内能够很好地释放,显示了其在肿瘤细胞的检测和治疗中潜在的应用前景。

参考文献:

- [1] Sarkar B, Paira P. *Mini-Rev. Med. Chem.*, **2018**, *18*(11):969-975
- [2] Pu Y Y, Zhu Y D, Qiao Z, Xin N N, Chen S P, Sun J, Jin R R, Nie Y, Fan H S. *J. Mater. Chem. B*, **2021**, *9*(7):1846-1857
- [3] Jenni S, Bolze F, Bonnet C S, Pallier A, Sour A, Toth E, Ventura B, Heitz V. *Inorg. Chem.*, **2020**, *59*(19):14389-14398
- [4] Boutry S, Burtea C, Laurent S, Vander Elst L, Muller R N. *Magn. Reson. Med.*, **2005**, *53*(4):800-807
- [5] Karabulut N, Elmas N. *Diagn. Interv. Radiol.*, **2006**, *12*(1):22-30
- [6] Ye F R, Jeong E K, Jia Z J, Yang T X, Parker D, Lu Z R. *Bioconjugate Chem.*, **2008**, *19*(12):2300-2303
- [7] Parac-Vogt T N, Kimpe K, Laurent S, Elst L V, Burtea C, Chen F, Muller R N, Ni Y, Verbruggen A, Binnemans K. *Chem. Eur. J.*, **2005**, *11*(10):3077-3086
- [8] Zhen M M, Zheng J P, Ye L, Li S M, Jin C, Li K, Qiu D, Han H B, Shu C Y, Yang Y J, Wang C R. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2012**, *4*(7):3724-3729
- [9] Anderson E A, Lsaacman S, Pesbody D S, Wang E Y, Canary J W, Kirshenbaum K. *Nano Lett.*, **2006**, *6*(6):1160-1164
- [10] Li W S, Li Z F, Jing F Y, Deng Y F, Wei L, Liao P Q, Yang X G, Li X J, Pei F K, Wang X X, Lei H. *Carbohydr. Res.*, **2008**, *343*(4):685-694
- [11] Sun G Y, Feng J H, Jing F Y, Pei F K, Liu M L. *J. Magn. Mater.*, **2003**, *265*(2):123-129
- [12] Uzgiris E E, Cline H, Moasser B, Grimmond B, Amaratunga M, Smith J F, Goddard G. *Biomacromolecules*, **2004**, *5*(1):54-61
- [13] Lim J, Turkbey B, Bernardo M, Bryant H, Garzoni J M, Pavan G M, Nakajima T, Choyke P L, Simanek E E, Kobayashi H. *Bioconjugate Chem.*, **2012**, *23*(11):2291-2299
- [14] Lu Z R, Wu X M. *Isr. J. Chem.*, **2010**, *50*(2):220-232
- [15] Goreham R V, Schroeder K L, Holmes A, Bradley S J, Nann T. *Microchim. Acta*, **2018**, *185*(2):128-134
- [16] Younis M R, He G, Lin J, Huang P. *Front. Chem.*, **2020**, *8*:424-448
- [17] Lee B H, Hasan M T, Lichthardt D, Gonzalez-Rodriguez R, Naumov A V. *Nanotechnology*, **2021**, *32*(9):095103
- [18] Chong Y, Ma Y F, Shen H, Tu X L, Zhou X, Xu J Y, Dai J W, Fan S J, Zhang Z J. *Biomaterials*, **2014**, *35*(19):5041-5048
- [19] Peng J, Gao W, Gupta B K, Liu Z, Romero-Aburto R, Ge L H, Song L, Alemany L B, Zhao X B, Gao G H. *Nano Lett.*, **2012**, *12*(2):844-849
- [20] Schroeder, K L, Goreham R V, Nann T. *Pharm. Res.*, **2016**, *33*(10):2337-2357
- [21] Zhang M X, Cao Y H, Chong Y, Ma Y F, Zhang H L, Deng Z W, Hu C H, Zhang Z J. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2013**, *5*:13325-13332
- [22] Zhao C H, Song X B, Liu Y, Fu Y F, Ye L L, Wang N, Wang F, Li L, Mohammadniaei M, Zhang M. *J. Nanobiotechnol.*, **2020**, *18*(1):142-173