

功能材料

无载体水溶性聚卟啉纳米粒用于肿瘤的光动力治疗

杜梦¹, 徐翔¹, 姜珊¹, 郑楠¹, 刘德华^{2*}, 宋汪泽^{1*}

(1. 大连理工大学 化工学院, 辽宁 大连 116024; 2. 辽宁省肿瘤医院 介入科, 辽宁 沈阳 110801)

摘要: 为了解决大环共轭类光敏剂存在的聚集诱导猝灭 (ACQ) 效应与强疏水性, 通过引入不同长度的醚基柔性链合成了一系列水溶性聚卟啉 (P-10、P-30 和 P-50)。其中, P-50 具有最优的水溶性、最高的单线态氧产率 (单线态氧产率是四羧基苯基卟啉单体的 1.95 倍); P-50 在不借助外源载体的情况下可自组装形成粒径在 100 nm 左右的纳米粒, 该纳米粒具有良好的 pH 稳定性、血清稳定性、稀释稳定性、冻干稳定性以及时间稳定性。对 P-50 纳米粒进行了体外光暗毒性表征, 结果表明, P-50 纳米粒在肿瘤细胞 (Hep1-6) 以及正常细胞 (293T) 中均具有较低的暗毒性 (细胞存活率达 80% 以上), 并且在 Hep1-6 中具有明显的光毒性 (细胞存活率低于 30%), 具有典型的光动力杀伤肿瘤的效果。

关键词: 水溶性; 聚卟啉; 纳米粒; 光动力治疗; 无载体; 功能材料

中图分类号: R730.5; TB383 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2022) 03-0488-08

Carrier-free water-soluble polyporphyrin nanoparticles for anti-tumor photodynamic therapy

DU Meng¹, XU Xiang¹, JIANG Shan¹, ZHENG Nan¹, LIU Dehua^{2*}, SONG Wangze^{1*}

(1. College of Chemical Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning, China; 2. Department of Intervention, Liaoning Cancer Hospital, Shenyang 110801, Liaoning, China)

Abstract: To solve the ubiquitous aggregation-induced quenching (ACQ) effect and strong hydrophobicity of large ring conjugated photosensitizers, a series of water-soluble polyporphyrins (P-10, P-30 and P-50) were prepared by introducing different flexible chains containing ether groups. Upon screening, P-50 owned the best water-solubility and the highest singlet oxygen yield, its singlet oxygen yield was 1.95-fold that of porphyrin monomer. P-50 could self-assembled into nanoparticles (NPs) with a particle size of 100 nm in a carrier-free manner. The NPs had excellent pH stability, serum stability, dilution stability, freeze-drying stability and time stability. *In vitro* photo/dark toxicity results indicated that the NPs had low dark-toxicity in both tumor cells (Hep1-6) and normal cells (293T) (cell viability higher than 80%). The NPs had obvious photo-toxicity in Hep1-6 cells (cell viability fewer than 30%), showing that the NPs had typical anti-cancer photodynamic therapy (PDT) effect.

Key words: water-soluble; polyporphyrin; nanoparticles; photodynamic therapy; carrier-free; functional materials

癌症是威胁人类健康的重要疾病之一, 传统的肿瘤治疗手段有外科手术切除、放疗以及化疗, 具有易复发、毒副作用大、选择性差以及有创性等弊端。相比于传统的肿瘤治疗方法, 光动力治疗 (PDT) 是一种新型的、非侵入性肿瘤治疗方法, 具有毒副作用小、可重复性光照、选择性好以及无创或微创

等优势^[1-4]。目前, PDT 已成为多种浅表肿瘤 (如食道癌、膀胱癌、黑色素瘤等) 疾病的临床治疗方式^[5-7]。光敏剂是 PDT 的核心^[8], 目前已被开发的光敏剂主要有卟啉类、酞菁类、稠环类以及氟硼二吡咯类等^[9-10], 其中, 卟啉类光敏剂是目前在 PDT 中应用最为广泛的光敏剂之一^[11-14]。

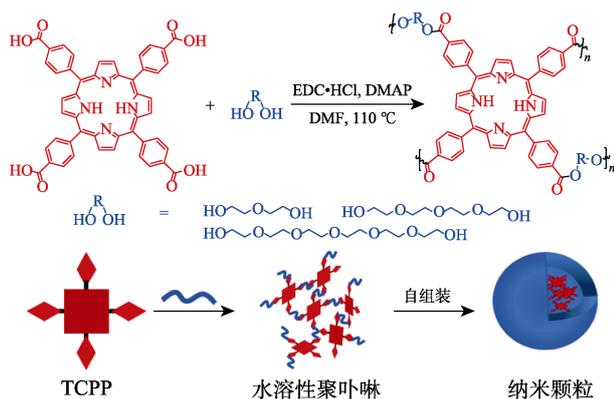
收稿日期: 2021-08-12; 定用日期: 2021-10-27; DOI: 10.13550/j.jxhg.20210808

基金项目: 国家自然科学基金 (21978039); 中央引导地方科技发展专项 (2021JH6/10500148, 2021JH6/10500146); 大连理工大学“医工交叉”联合基金 (DUT20YG120, DUT21YG133)

作者简介: 杜梦 (1997—), 女, 硕士生, E-mail: mengd1114@163.com。联系人: 刘德华 (1973—), 男, 主任医师, E-mail: ldh29@163.com; 宋汪泽 (1986—), 男, 教授, E-mail: wzsong@dut.edu.cn。

四苯基卟啉 (TPP) 能高效地产生单线态氧, 且具有相对较低的暗毒性^[14-16], 但由于其平面刚性共轭结构, 在水性介质中容易产生 π - π 堆积, 随着浓度的增加趋于聚集, 引发聚集诱导猝灭 (ACQ), ACQ 会大大降低单线态氧量子产率, 削弱 PDT 的效果^[17-21]。近年来, 国内外研究者为了避免具有大环共轭结构的光敏剂发生 ACQ 效应采取了不同的措施, 如使用聚合物对光敏剂进行物理包封^[22]、设计合成卟啉偶联物^[23-24]、通过引入金属离子增大卟啉的空间位阻或引入氟原子影响共轭结构的相互作用^[25-27]、通过引入柔性链段推开光敏剂小分子^[28-31] 以及通过引入具有空间位阻结构的取代基抑制光敏剂分子自身的聚集倾向^[32-33]等。以上措施可以有效地避免光敏剂小分子的自聚集, 提高单线态氧的产率。但是为了解决大部分光敏剂水溶性差导致的不利于给药及药物输送且在体内循环时间短等问题, 仍然需要引入其他的组分来提高光敏剂的生物相容性。

为了解决上述问题, 本课题组前期通过在卟啉单体间引入柔性链, 并用两亲性聚乙二醇-聚乳酸 (PEG-PLA) 载体进行共沉淀形成纳米粒, 有效抑制了卟啉类光敏剂的 ACQ 效应, 提高了光敏剂的单线态氧产率、水溶性和体内循环时间等^[34-35]。但是, 在形成纳米粒的过程中, 仍会有大量的疏水性卟啉单体聚集而导致载药量较低, 除此以外, 由于引入了没有治疗功效的 PEG-PLA 载体会对正常组织造成一定的细胞毒性及免疫反应。为了克服上述问题, 本文通过引入亲水性的柔性醚链合成了一系列卟啉聚合物, 通过对聚合条件筛选获得高相对分子质量且具有良好水溶性的聚卟啉 P-50。P-50 可以直接溶解在水中, 具有最优的单线态氧产率, 在不借助载体的情况下自组装形成纳米粒, 并对所形成的纳米粒稳定性以及体外光暗毒性进行了测试。水溶性聚卟啉的合成路线及自组装过程如下所示 [图中 EDC·HCl 为 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、DMAP 为对二甲氨基吡啶、TCPP 为四羧基苯基卟啉]。



1 实验部分

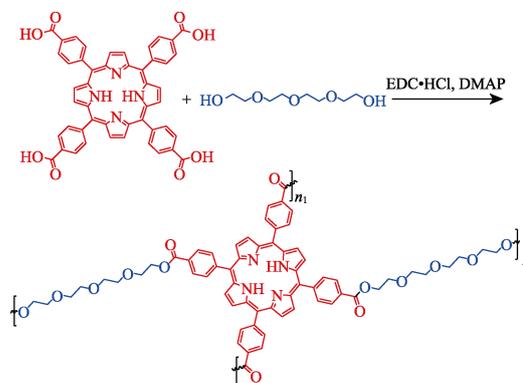
1.1 试剂与仪器

乙二醇 (质量分数 99%)、六甘醇 (质量分数 97%)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC·HCl, 质量分数 99%)、对二甲氨基吡啶 (DMAP, 质量分数 98%)、1,3-二苯基异苯并呋喃 (DPBF, 分析纯), 上海萨恩化学技术有限公司; 三缩四乙二醇 (3O-2OH, 质量分数 99%), 上海麦克林生化科技有限公司; 四羧基苯基卟啉 (TCPP, 质量分数 97%), 上海楷树化学科技有限公司; 磷酸盐缓冲溶液 (PBS, pH 7.2)、胎牛血清 (FBS), 格来赛生命科技 (上海) 有限公司; 乙醚、甲醇、*N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF)、三氯甲烷、四氢呋喃、甲苯、乙腈 (分析纯), 天津市科密欧化学试剂有限公司。

Varian DLG400 核磁共振波谱仪, 美国 Varian 公司; ZS90 纳米粒度与 Zeta 电位分析仪, 英国马尔文公司; 基质辅助激光解吸飞行时间质谱仪 (MALDI-TOF)、1515 型凝胶色谱仪 (GPC), 美国 Waters 公司; UV8543 紫外-可见分光光度计, 日本岛津仪器公司; NOVA NanoSEM 450 场发射扫描电子显微镜 (SEM), 美国 FEI 公司。

1.2 水溶性聚卟啉的合成

水溶性 P-30 的合成路线如下所示。



以单体为 3O-2OH 为例简述水溶性 P-30 的制备方式。称取 TCPP (25 mg, 0.032 mmol)、EDC·HCl (49 mg, 0.256 mmol) 和 DMAP (15.6 mg, 0.128 mmol) 溶于 400 μ L DMF 中, 加热至 80 $^{\circ}$ C 搅拌 10 min。然后, 加入 3O-2OH (12.4 mg, 0.064 mmol) 和 100 μ L DMF 的混合溶液, 升温至 110 $^{\circ}$ C 继续反应 48 h。待反应结束后, 将反应液在 15 mL 乙醚中沉降, 经离心收集沉淀, 在室温下真空干燥过夜除去残留的乙醚。将沉淀溶于 4 mL DMSO 和水的混合溶剂 [$V(\text{H}_2\text{O}) : V(\text{DMSO}) = 10 : 1$] 中, 并用截留相对分子质量为 500 的透析袋在去离子水中透析 24 h 后, 于 -40 $^{\circ}$ C 的冷冻干燥机中冻干, 最终产物

为紫色固体 P-3O。对产物进行 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 表征和相对分子质量表征。相对分子质量表征方法如下：将 P-3O 溶于色谱级 DMF (质量浓度 2 g/L)，通过流动相为色谱级 DMF (含有质量分数为 0.1% 的溴化锂)、流速为 1 mL/min 且柱温为 45 °C 的凝胶渗透色谱仪 (GPC) 测定聚卟啉的数均相对分子质量、重均相对分子质量以及分散性指数。

将单体换成二乙二醇或六甘醇可对应得到 P-1O 与 P-5O。

1.3 单线态氧产率计算

使用 1,3-二苯基异苯并呋喃 (DPBF) 测量 P-1O、P-3O 或 P-5O 的单线态氧产率。DPBF 是常见的检测单线态氧产率的探针，DPBF 在 420 nm 处有明显的紫外吸收峰，通过最初的 [4+2] 环加成反应与单线态氧反应生成环加合物，该环加合物不稳定，会分解成 1,2-二苯甲酰基苯。在此过程中可以观察到 DPBF 的紫外吸收峰强度降低，通过 UV-Vis 光谱监测此过程。将 DPBF 及光敏剂 (TCPP、P-1O、P-3O 或 P-5O) 溶解在 DMSO 中，分别配制成 DPBF 溶液 (2×10^{-5} mol/L) 与光敏剂浓度为 2×10^{-6} mol/L 的 TCPP 或聚卟啉 (P-1O、P-3O 或 P-5O) 溶液，将上述两种溶液分别取 1.5 mL 混合。激光灯参数设置为波长 650 nm、光斑密度为 20 mW/cm²。将混合溶液用光照射，每隔一定时间记录其在 420 nm 的紫外吸光度。单线态氧产率 (Φ_{Δ}) 的计算公式如下：

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_{\Delta}^{\text{Std}} \times R \times I^{\text{Std}} / (R^{\text{Std}} \times I)$$

式中： $\Phi_{\Delta}^{\text{Std}}$ 是 TCPP 的单线态氧产率； R 和 R^{Std} 分别代表存在聚卟啉 (P-1O、P-3O 或 P-5O) 和 TCPP 的情况下 DPBF 在 420 nm 处的紫外吸光度变化与照射时间的关系曲线的斜率； I^{Std} 和 I 分别代表 TCPP 和聚卟啉 (P-1O、P-3O 或 P-5O) 的紫外吸光度。单线态氧产率结果为重复测试 3 次后的平均值。

1.4 纳米粒的制备、表征以及稳定性研究

将 P-5O 直接溶于去离子水中制成质量浓度为 5 g/L 的母液，在 37 °C 下静置 1 h，由于 P-5O 的两亲性会在水溶液中自发自组装成纳米粒，将该纳米粒水溶液直接用于后续研究，不需要进一步分离。纯水中的粒径大小用动态光散射仪 (DLS) 测量。

pH 稳定性：取上述纳米粒母液稀释至具有不同 pH (pH=5.53、7.16、8.33) 的 PBS 缓冲液中，终质量浓度为 0.5 g/L，在 37 °C 下静置 1 h 后，通过 DLS 测量粒径。

血清稳定性：取上述纳米粒母液稀释至含有体积分数为 10% FBS 的细胞培养基 (DMEM 培养基) 中，终质量浓度为 0.5 g/L，以去离子水或 pH 为 7.16 的 PBS 代替上述含有体积分数为 10% FBS 的细胞培

养基作为对照组，在 37 °C 下静置 1 h 后通过 DLS 测量粒径变化。

稀释稳定性：使用含有体积分数为 10% 胎牛血清的细胞培养基将初始质量浓度为 0.5 g/L 的纳米粒溶液分别稀释 5、10、20、50 和 100 倍，配制质量浓度分别为 0.1、0.05、0.025、0.01 和 0.005 g/L 溶液，在 37 °C 下静置 1 h 后通过 DLS 测量粒径变化。

冻干稳定性：取上述纳米粒母液稀释至 pH 为 7.16 的 PBS 溶液中，终质量浓度为 0.5 g/L，通过 DLS 分别测量其在 -40 °C 冻干前后的粒径。

时间稳定性：取上述纳米粒母液稀释至 pH 为 7.16 的 PBS 溶液中，终质量浓度为 0.5 g/L，并保存于室温下，分别在第 1、2、3 d 通过 DLS 测量粒径。

粒径稳定性用 T 检验进行双侧显著性差异分析。ns 代表无显著性差异，* $p < 0.05$ 表示具有统计学差异，** $p < 0.01$ 表示具有显著统计学差异，*** $p < 0.001$ 表示具极其显著的统计学差异。

1.5 聚卟啉的体外光暗毒性评价

采用 MTT 法测定 P-5O 纳米粒对小鼠肝癌细胞 (Hep1-6) 以及人肾上皮细胞 (293T) 的细胞毒性^[34-35]。将两种细胞以 1×10^4 个细胞/孔的密度接种在 96 孔板中，使用含体积分数为 10% FBS 的 DMEM 培养基培养。按照 1.4 节所述母液配制方法配制浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 的纳米粒溶液，并将其加入 Hep1-6 或 239T 细胞中。培养 4 h 后，用 650 nm 激光 (激光功率密度为 10 mW/cm²) 照射孔板 30 min，继续将细胞孵育 20 h 后，使用 MTT 方法对其光毒性进行测定。移除光毒性测定实验步骤中的光照部分，即为暗毒性的测定方法；移除光毒性测定实验步骤中的加入纳米粒的步骤，即为仅光照组的测定方法；移除光毒性测定实验步骤中的加入纳米粒以及光照的步骤，即为空白对照组的测定方法。体外光暗毒性评价的结果用 T 检验进行双侧显著性差异分析。

2 结果与讨论

2.1 聚合反应条件优化

使用 TCPP 和 3O-2OH 制备 P-3O 为初始聚合模板反应，对聚合条件进行筛选^[36-37]。

为探究溶剂对聚合反应的影响，筛选了 5 种不同的溶剂，结果如表 1 所示。使用三氯甲烷、甲苯和乙腈为反应溶剂时，P-3O 的产率较低且重均相对分子质量 (M_w) 均低于 5000。这可能是由于 TCPP 在这些溶剂中的溶解性较差所致。相比之下，当以四氢呋喃或 DMF 为溶剂时，TCPP 单体的溶解性很好，其中 DMF 溶剂具有最佳的产率及重均相对分子质量。综合考虑，选用 DMF 作为反应溶剂。

表1 反应溶剂对聚合反应的影响^①Table 1 Effect of solvent on polymerization^①

溶剂	产率/%	M_n ^②	M_w ^②	D ^②
DMF	50.7	5500	10700	1.95
乙腈	23.1	4000	4900	1.23
四氢呋喃	48.8	5500	6900	1.27
三氯甲烷	36.2	2500	2700	1.05
甲苯	43.7	3600	4100	1.13

①温度为 50 °C, 时间为 48 h, TCPP 浓度为 0.063 mol/L, 3O-2OH 浓度为 0.126 mol/L; ② M_n 、 M_w 和 D 通过 GPC 测定, 以聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA) 为标准样, 后续相对分子质量测试均参照此条件。 M_n 为数均相对分子质量, D 为相对分子质量分布指数。下同。

接下来研究了温度对聚合反应的影响, 结果如表 2 所示。随着温度的升高, 聚合反应的产率有了明显提高, 但 P-3O 的重均相对分子质量有所下降。这可能是高温使聚合物链发生了部分裂解, 导致聚合物相对分子质量降低。比较不同温度下的产物在水中的溶解性, 发现当温度在 110 °C 下时, P-3O 的重均相对分子质量为 8000 时聚合物的溶解性最好。最终确定 110 °C 为最佳反应温度。

表2 温度对聚合反应的影响

Table 2 Effect of temperature on polymerization

温度/°C	产率/%	M_n	M_w	D
50	50.7	5500	10700	1.95
90	62.6	6324	10200	1.61
110	83.7	4610	8000	1.73

注: 溶剂为 DMF, 时间为 48 h, TCPP 浓度为 0.063 mol/L, 3O-2OH 浓度为 0.126 mol/L。

进一步探究了不同 TCPP 浓度对聚合反应的影响, 结果如表 3 所示。

表3 TCPP 浓度对聚合反应的影响

Table 3 Effect of TCPP concentration on polymerization

浓度/(mol/L)	产率/%	M_n	M_w	D
0.01	76.4	2900	3600	1.27
0.025	89.6	2700	3700	1.39
0.05	67.9	3300	5400	1.64
0.063	83.7	4600	8000	1.73
0.1	50	2700	3500	1.29

注: 温度为 110 °C, 时间为 48 h。

当反应溶液中 TCPP 的浓度低于 0.05 mol/L 时, 重均相对分子质量均低于 5500。这可能是由于低浓度降低了 TCPP 分子间的碰撞几率。当 TCPP 浓度高达 0.1 mol/L 时, 聚合物的产率以及相对分子质量都明显降低, 可能是由于过高的浓度导致单体的溶解性下降, 从而影响聚合反应。除此以外, 低相对

分子质量的 P-3O 在水中的溶解性较差, 可能是由于相对分子质量较低时引入的柔性醚链不能很好地推开卟啉单体, 不能达到提高水溶性的效果。因此, 选择的最佳 TCPP 浓度为 0.063 mol/L。

在上述条件基础上, 本文继续探究了柔性链长度对产物水溶性的影响, 结果如表 4 所示。

表4 不同单体制备的聚卟啉性能

Table 4 Properties of polyporphyrins prepared from different monomers

聚合物	产率/%	M_n	M_w	D
P-1O	87.9	4700	7400	1.57
P-3O	83.7	4600	8000	1.73
P-5O	91.1	4100	8600	2.12

注: 温度为 110 °C, 溶剂为 DMF, 时间为 48 h, TCPP 浓度为 0.063 mol/L, 3O-2OH 浓度为 0.126 mol/L。

实验中选择二乙二醇、3O-2OH 和六甘醇为二醇单体, 聚合的产率均达到 80% 以上, 且重均相对分子质量可达 8000 左右。P-1O 的水溶性较差, 可能是因为卟啉单体间的柔性醚链较短, 推开卟啉单体的能力较弱。相比之下, P-5O 比 P-3O 有着更好的水溶性, 甚至几乎达到了完全水溶, 这是由于六甘醇作为柔性链时可以更好地达到抑制卟啉单体聚集的效果。因此, 选用水溶性最好的 P-5O 作后续研究。

为了进一步验证 P-5O 的最优反应条件, 对反应温度以及单体浓度重新进行了筛选, 结果如表 5 和 6 所示。当重均相对分子质量在 8000 左右时, P-5O 的水溶性最好, 因此选择 110 °C 为反应温度。六甘醇单体浓度过低或过高均不利于聚合反应的进行。因此, 选择最佳六甘醇单体浓度为 0.063 mol/L。

表5 温度对水溶性 P-5O 的影响

Table 5 Effect of temperature on the water-soluble P-5O

温度/°C	产率/%	M_n	M_w	D
60	79.8	5800	6600	1.14
90	80.9	6500	7900	1.20
110	91.1	4100	8600	2.12
140	85.3	6300	7900	1.26

注: 溶剂为 DMF, 时间为 48 h, TCPP 浓度为 0.063 mol/L, 3O-2OH 浓度为 0.126 mol/L。

表6 TCPP 浓度对水溶性 P-5O 的影响

Table 6 Effect of concentration of TCPP on the water-soluble P-5O

浓度/(mol/L)	产率/%	M_n	M_w	D
0.030	82.7	4600	5600	1.22
0.063	91.1	4100	8600	2.12
0.100	45.6	5100	6300	1.24

注: 温度为 110 °C, 溶剂为 DMF, 时间为 48 h。

2.2 结构表征

对聚合物进行了 ^1H NMR 及 ^{13}C NMR 表征, 结果如图 1 所示。比较 P-3O 和单体 TCPP 的 ^1H NMR 谱图 (图 1a) 可知, 在 δ 8.27、8.34、8.81 及 2.94 处 TCPP 单体的特征峰出现在 P-3O 的谱图中。在 δ 4.56 处属于 3O-2OH 中羟基的特征峰在聚合物谱图中消失 (δ 4.56 处小峰与其他亚甲基峰不成比例, 是聚合物末端存在的少量单羟基的峰), 在 δ 3.4~3.5 属于亚甲基的特征峰出现在聚合物谱图中。比较 P-3O 和单体 TCPP 的 ^{13}C NMR 谱图 (图 1b) 可知, 在 δ 120~170 内属于 TCPP 单体中碳的特征峰均出现在 P-3O 的碳谱中。此外, 在 δ 60~80 内属于单体 3O-2OH 中亚甲基上碳的特征峰出现在聚合物的谱图中。同时使用 MALDI-TOF 进一步验证 P-3O 的结构, 结果如图 1d 所示。P-3O 实际测试的重复单元相对分子质量为 1106, 与理论重复单元相对分子质量相一致, 证明聚合反应的发生。P-1O 和 P-5O 的 ^1H NMR 谱图如图 1c 所示。

聚合物 ^1H NMR 表征结果如下:

P-1O, 紫色固体; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ :8.83(s, 8H), 8.36(m, 8H), 8.29(m, 8H), 3.34~4.08(m, 16H), -2.93(s, 2H)。

P-3O, 紫色固体; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ :8.81(s, 8H), 8.34(m, 8H), 8.27(m, 8H), 3.16~3.57(m, 32H), -2.94(s, 2H)。

P-5O, 紫色固体; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ :8.84(s, 8H), 8.36(m, 8H), 8.31(m, 8H), 3.11~3.88(m, 48H), -2.93(s, 2H)。

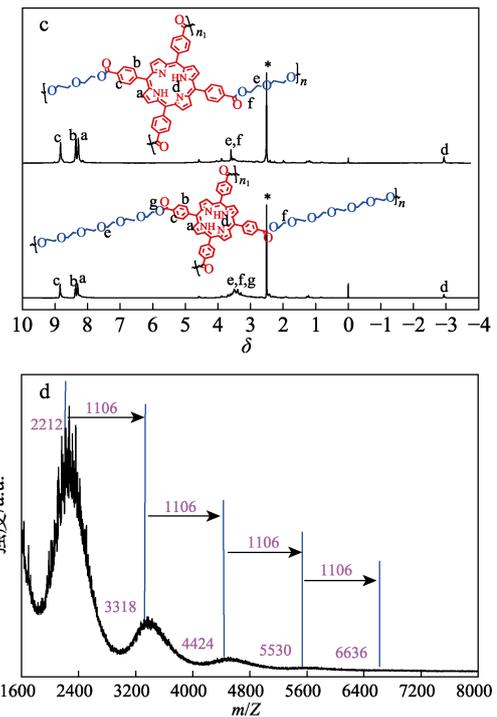
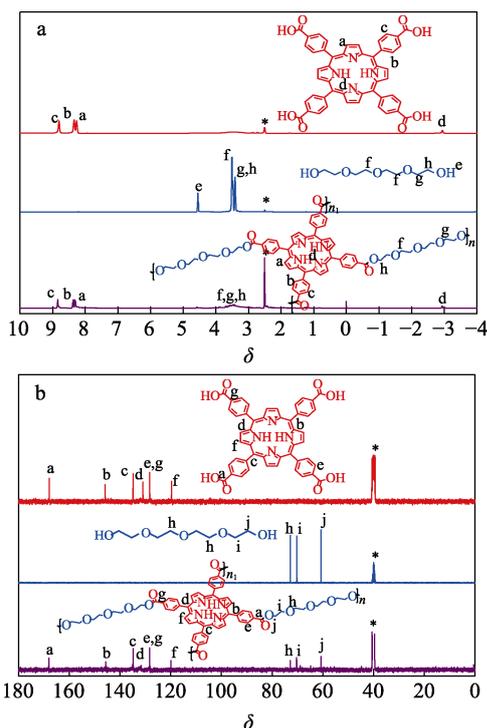


图 1 TCPP、3O-2OH 和 P-3O 的 ^1H NMR (a) 和 ^{13}C NMR 谱图 (b); P-1O 和 P-5O 的 ^1H NMR 谱图 (c); P-3O 的 MALDI-TOF 谱图 (d)

Fig. 1 ^1H NMR (a) and ^{13}C NMR (b) spectra of TCPP, 3O-2OH and P-3O; ^1H NMR spectra (c) of P-1O and P-5O; MALDI-TOF spectrum (d) of P-3O

2.3 单线态氧产率测试

利用 DPBF 对 P-1O、P-3O、P-5O 以及 TCPP 单体进行了单线态氧产率的测试, 重复测试 3 次取平均产率并进行显著性差异分析^[38]。

DPBF 和 P-1O、P-3O 或 P-5O 的混合溶液在 420 nm 处的紫外吸光度均随光照时间的增加而下降。这是由于在一定波长的光照射下, 聚卟啉产生的单线态氧和 DPBF 进行反应, 导致混合溶液在 420 nm 处的紫外吸收峰降低。根据其在 420 nm 处的紫外吸光度与光照时间的变化, 可分别计算 P-1O、P-3O 和 P-5O 的单线态氧产率^[38]。以 TCPP 单体的单线态氧产率为 1, 归一化的单线态氧产率见图 2。

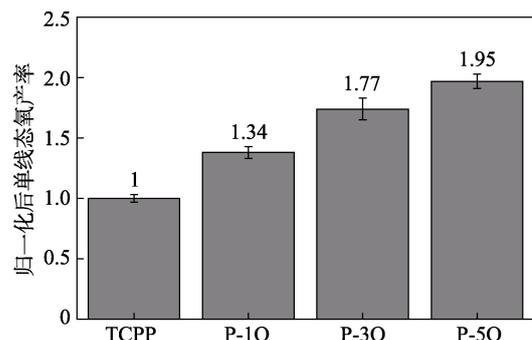


图 2 归一化后的单线态氧产率

Fig. 2 Singlet oxygen yield after normalization

通过计算可知, P-1O、P-3O、P-5O 的单线态氧产率分别是 TCPP 单体的 1.34 倍、1.77 倍、1.95 倍 (图 2)。由此可知, 引入柔性醚链成功抑制了卟啉单体间的 $\pi-\pi$ 堆积效应, 提高了单线态氧的产率, 且随着链长的增加抑制能力显著增强。

2.4 纳米胶束的表征以及稳定性测试

由于 P-5O 具有较好的水溶性以及单线态氧产率, 所以选择 P-5O 自组装成纳米粒并对纳米粒进行了一系列的稳定性测试, 纳米粒制备方法以及稳定性研究方法详见 1.4 节。对 P-5O 溶于水自组装形成的纳米粒进行了 SEM 测试 (图 3a), 结果表明, 形成的纳米粒粒径在 100 nm 左右。随后, 在不同 pH 的环境下测试纳米粒的粒径 (图 3b)。

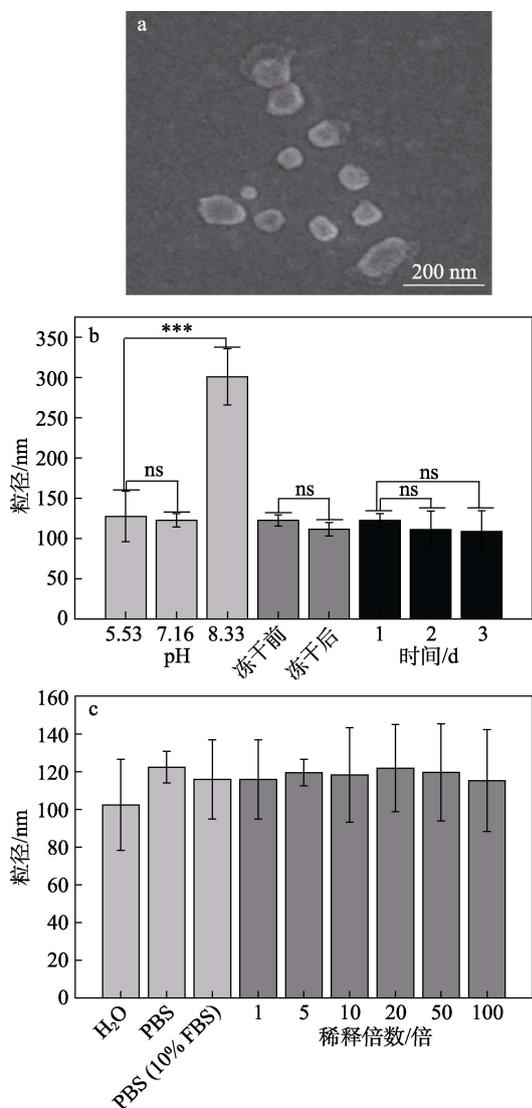


图 3 纳米粒的 SEM 图 (a); 纳米粒在不同 pH 下、冻干前后以及在 PBS (pH=7.16) 中 3 d 内的稳定性 (b); 纳米粒在不同溶剂下以及不同稀释倍数下的稳定性 (c)

Fig. 3 SEM images of nanoparticles (a); Stability of nanoparticles at different pH, before or after lyophilization, and in PBS (pH=7.16) within 3 d (b); Stability of nanoparticles in different solutions and at different dilution times (c)

从图 3b 可知, 在弱酸条件下纳米粒的粒径差别不大, 在碱性条件下, 粒径有变大的趋势。碱性介质下, 可能 P-5O 表面少量未反应的羧基与介质中的负电荷由于静电作用相排斥, 使得纳米粒在碱性介质中较疏松。对纳米粒的血清稳定性进行了测试, 如图 3c 所示。纳米粒粒径在水中、PBS 缓冲液以及含有体积分数 10% FBS 的 PBS 缓冲液 [PBS(10%FBS)] 中变化不大, 具有良好的血清稳定性。对母液中的纳米粒进行的稀释稳定性研究见图 3c。从图 3c 可以看出, P-5O 纳米粒在稀释 5~100 倍时, 粒径几乎没有变化。纳米粒的冻干稳定性结果见图 3b。从图 3b 可知, 冻干前后纳米粒的稳定性良好。图 3b 证明纳米粒在 3 d 内具有良好的稳定性。pH 稳定性表明, P-5O 纳米粒可以在弱酸环境下保持良好的稳定性; 血清稳定性表明, P-5O 纳米粒可以在模拟的人体组织液以及血液中保持稳定; 稀释稳定性表明, P-5O 纳米粒可以在稀释至 100 倍时仍维持良好的稳定性; 冻干稳定性表明, P-5O 纳米粒可以在 -40 °C 下保存; 时间稳定性表明, P-5O 纳米粒可以在一定时间内维持良好的稳定性。综上所述, P-5O 纳米粒在模拟的人体生理环境中具有良好的稳定性。

2.5 聚卟啉体外光暗毒性评价

采用 MTT 法对 P-5O 纳米粒进行了体外光暗毒性评估^[34-35], 结果如图 4 所示。

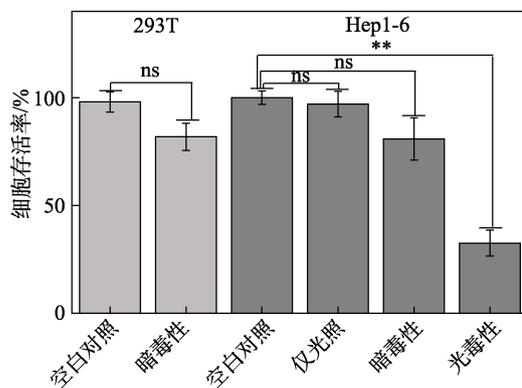


图 4 对 293T 的体外暗毒性以及对 Hep1-6 的体外光/暗毒性

Fig. 4 *In vitro* dark toxicity to 293T and *in vitro* photo toxicity and dark toxicity to Hep1-6

由图 4 可知, P-5O 纳米粒在正常细胞 (293T) 中具有较低的暗毒性, 在较高浓度下 (50 $\mu\text{mol/L}$) 细胞存活率依旧高于 80%, 证明其具有一定的安全性。如图 4 所示, P-5O 纳米粒在肿瘤细胞 (Hep1-6) 中同样具有较低的暗毒性, 在较高浓度下 (50 $\mu\text{mol/L}$) 细胞存活率高于 80%, 但是在激光照射下, Hep1-6 细胞存活率显著下降至 30% 以下, 证明其具有明显的 PDT 杀死肿瘤细胞的能力。仅光照组的结果显示,

在不加入光敏剂的情况下, 仅接受激光照射的细胞存活率高于 90%, 证明了激光照射技术自身不会引入额外的毒性, 具有一定的安全性。上述结果显示, 该 P-5O 纳米粒具有较高的细胞光毒性以及较低的细胞暗毒性, 有望用于肿瘤的 PDT。

3 结论

通过引入亲水柔性醚链的策略合成了一系列聚卟啉, 系统地研究了具有不同链长的聚卟啉在不同聚合条件下的水溶性, 并通过条件筛选确定最优聚合条件, 即以温度为 110 °C、溶剂为 DMF、时间为 48 h 以及 TCPP 单体浓度为 0.063 mol/L 得到水溶性良好的 P-5O。卟啉聚合物在水中以疏水的卟啉端为核、醚基柔性链为亲水端在去离子水中以无载体的形式自组装成纳米粒, 并对其单线态氧产率、纳米粒稳定性以及体外光暗毒性进行了研究。结果表明, 在 P-5O 中引入长柔性醚链结构能够有效抑制疏水性卟啉单体的 ACQ 效应以及提高其水溶性, P-5O 的单线态氧产率是 TCPP 单体的 1.95 倍。除此以外, P-5O 纳米粒在模拟的人体生理环境下具有很好的稳定性, 且在肿瘤细胞及正常细胞中均具有较低的暗毒性。在肿瘤细胞中, P-5O 纳米粒在激光照射下可诱导出较强的光毒性, 细胞存活率显著下降至 30% 以下。针对该纳米粒的细胞内吞机制、细胞内分布及体内 PDT 的研究正在进行中, 该类水溶性聚卟啉纳米粒的研制在未来开发光动力抗肿瘤药物方面具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] ETHIRAJAN M, CHEN Y H, JOSHI P, *et al.* The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy[J]. *Chemical Society Reviews*, 2011, 40(1): 340-362.
- [2] ZHOU Z J, SONG J B, NIE L M, *et al.* Reactive oxygen species generating systems meeting challenges of photodynamic cancer therapy[J]. *Chemical Society Reviews*, 2016, 45(23): 6597-6626.
- [3] HE H, ZHU R Y, SUN W, *et al.* Selective cancer treatment via photodynamic sensitization of hypoxia-responsive drug delivery[J]. *Nanoscale*, 2018, 10(6): 2856-2865.
- [4] CASTANO A P, MROZ P, HAMBLIN M R. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2006, 6(7): 535-545.
- [5] DANIELL M D, HILL J S. A history of photodynamic therapy[J]. *Australian & New Zealand Journal of Surgery*, 1991, 61(5): 340-348.
- [6] ACKROYD R, KELTY C, BROWN N, *et al.* The history of photodetection and photodynamic therapy[J]. *Photochemistry & Photobiology*, 2001, 74(5): 656-669.
- [7] LIPSON R L, BALDES E J, OLSEN A M. Hematoporphyrin derivative: A new aid for endoscopic detection of malignant disease[J]. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 1961, 42(5): 623-629.
- [8] LIU L H, QIU W X, LI B, *et al.* A red light activatable multifunctional prodrug for image-guided photodynamic therapy and cascaded chemotherapy[J]. *Advanced Functional Materials*, 2016, 26(34): 6257-6269.
- [9] JOSEFSEN L B, BOYLE R W. Unique diagnostic and therapeutic roles of porphyrins and phthalocyanines in photodynamic therapy, imaging and theranostics[J]. *Theranostics*, 2012, 2(9): 916-966.
- [10] LU X M (卢晓梅), ZHAO M (赵萌), HUANG W (黄维). Synthesis of near-infrared poly(IB-alt-MAnh)-aza-BODIPY and its application in photoacoustic imaging[J]. *Acta Polymerica Sinica (高分子学报)*, 2018, 49(11): 1451-1459.
- [11] SCHMITT J, HEITZ V, SOUR A, *et al.* Diketopyrrolopyrrole-porphyrin conjugates with high two-photon absorption and singlet oxygen generation for two-photon photodynamic therapy[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2015, 54(1): 169-173.
- [12] CELLI J P, SPRING B Q, RIZVI I, *et al.* Imaging and photodynamic therapy: Mechanisms, monitoring, and optimization[J]. *Chemical Reviews*, 2010, 110(5): 2795-2838.
- [13] TIAN J (田佳), ZHANG W A (张伟安). Construction and applications of well-defined porphyrin-containing polymers[J]. *Acta Polymerica Sinica (高分子学报)*, 2019, 50(7): 653-670.
- [14] WANG D, NIU L J, QIAO Z Y, *et al.* Synthesis of self-assembled porphyrin nanoparticle photosensitizers[J]. *ACS Nano*, 2018, 12(4): 3796-3803.
- [15] SKIDAN I, DHOLAKIA P, TORCHILIN V. Photodynamic therapy of experimental B-16 melanoma in mice with tumor-targeted 5,10,15,20-tetraphenylporphyrin-loaded PEG-PE micelles[J]. *Journal of Drug Targeting*, 2008, 16(6): 486-493.
- [16] HUANG Z. A review of progress in clinical photodynamic therapy [J]. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 2005, 4(3): 283-293.
- [17] GU B B, WU W B, XU G X, *et al.* Precise two-photon photodynamic therapy using an efficient photosensitizer with aggregation-induced emission characteristics[J]. *Advanced Materials*, 2017, 29(28): 1701076.
- [18] LUBY B M, WALSH C D, ZHENG G. Advanced photosensitizer activation strategies for smarter photodynamic therapy beacons[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(9): 2558-2569.
- [19] FAN H H, YAN G B, ZHAO Z L, *et al.* A smart photosensitizer-manganese dioxide nanosystem for enhanced photodynamic therapy by reducing glutathione levels in cancer cells[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2016, 55(18): 5477-5482.
- [20] LIU K, XING R R, ZOU Q L, *et al.* Simple peptide-tuned self-assembly of photosensitizers towards anticancer photodynamic therapy[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2016, 55(9): 3036-3039.
- [21] LUCKY S S, SOO K C, ZHANG Y. Nanoparticles in photodynamic therapy[J]. *Chemical Reviews*, 2015, 115(4): 1990-2042.
- [22] ARUNKUMAR E, SUDEEP P K, KAMAT P V, *et al.* Singlet oxygen generation using iodinated squaraine and squaraine-rotaxane dyes[J]. *New Journal of Chemistry*, 2007, 31(5): 677-683.
- [23] DALLAGNOL J C C, DUCATTI D R B, BARREIRA S M W, *et al.* Synthesis of porphyrin glycoconjugates bearing thiourea, thiocarbamate and carbamate connecting groups: Influence of the linker on chemical and photophysical properties[J]. *Dyes and Pigments*, 2014, 107: 69-80.
- [24] LAU J T F, LO P C, TSANG Y M, *et al.* Unsymmetrical β -cyclodextrin-conjugated silicon(IV) phthalocyanines as highly potent photosensitizers for photodynamic therapy[J]. *Chemical Communications*, 2011, 47(34): 9657-9659.
- [25] ZHAO P, HUANG J W, MEI W J, *et al.* DNA binding and photocleavage specificities of a group of tricationic metalloporphyrins[J]. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2010, 75(3): 1108-1114.
- [26] KRALOVA J, SYNYTSYA A, POUCKOVA P, *et al.* Novel porphyrin conjugates with a potent photodynamic antitumor effect: Differential efficacy of mono- and bis- β -cyclodextrin derivatives *in vitro* and *in vivo*[J]. *Photochemistry and Photobiology*, 2006, 82: 432-438.

- [27] EI Khouly M E, KANG E S, KAY K Y, *et al.* Silicon-phthalocyanine-cored fullerene dendrimers: Synthesis and prolonged charge-separated states with dendrimer generations[J]. *Chemistry-A European Journal*, 2007, 13(10): 2854-2863.
- [28] MALDASEED S, MACHACEK M, ALFADLY W, *et al.* Water-soluble non-aggregating zincphthalocyanine and *in vitro* studies for photodynamic therapy[J]. *Chemical Communications*, 2013, 49(95): 11149-11151.
- [29] WU C (吴川). Synthesis and properties of porphyrin-cored polypeptide as drug carrier for photodynamic therapy[D]. Zhenjiang: Jiangsu University (江苏大学), 2016.
- [30] SHEN X M, ZHENG B Y, HUANG X R, *et al.* The first silicon(IV) phthalocyanine-nucleoside conjugates with high photodynamic activity[J]. *Dalton Transactions*, 2013, 42(29): 10398-10403.
- [31] MITSUJUNAGA M, OGAWA M, KOSAKA N, *et al.* Cancer cell-selective *in vivo* near infrared photoimmunotherapy targeting specific membrane molecules[J]. *Nature Medicine*, 2011, 17(12): 1685-1691.
- [32] JIN J Q, ZHU Y C, ZHANG Z H, *et al.* Enhancing the efficacy of photodynamic therapy through a porphyrin/porphyrin-alternating copolymer[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2018, 57(50): 16354-16358.
- [33] GUAN M R, GE J C, WU J Y, *et al.* Fullerene/photosensitizer nanovesicles as highly efficient and clearable phototheranostics with enhanced tumor accumulation for cancer therapy[J]. *Biomaterials*, 2016, 103: 75-85.
- [34] ZHENG N, XIE D, WANG C S, *et al.* Water-soluble, zwitterionic poly-photosensitizers as carrier-free, photosensitizer-self-delivery system for *in vivo* photodynamic therapy[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11(47): 44007-44017.
- [35] ZHENG N, ZHANG Z Y, KUANG J, *et al.* Poly (photosensitizers) nanoparticles for enhanced *in vivo* photodynamic therapy by interrupting the π - π stacking and extending circulation time[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11(20): 18224-18232.
- [36] HE J N, ZHENG N, XIE D, *et al.* Multicomponent polymerization toward biodegradable polymers with diverse responsiveness in tumor microenvironments[J]. *Polymer Chemistry*, 2020, 11(6): 1198-1210.
- [37] WANG W H (王维虎), HE J N (何俊男), ZHENG Y B (郑玉斌), *et al.* Copper-catalyzed, three-component polymerization for the synthesis of polyphosphonylamidines[J]. *Acta Polymerica Sinica (高分子学报)*, 2021, 52(9): 1129-1137.
- [38] BAI J P (白景佩), XU X (徐翔), ZHENG Y B (郑玉斌), *et al.* Relationship between structure and singlet oxygen yield of poly-porphyrin[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2021, 38(7): 1380-1385.

(上接第 479 页)

- [76] WEN S H, CHEN L, LI W Q, *et al.* Insight into the characteristics, removal, and toxicity of effluent organic matter from a pharmaceutical wastewater treatment plant during catalytic ozonation[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 9581.
- [77] YANG W L, WANG T, WU J. Preparation of Ni₃O-Fe₃O₄/ceramsite catalyst and its application in advanced treatment of pharmaceutical wastewater[J]. *American Journal of Chemical Engineering*, 2020, 8(4): 96-96.
- [78] MALIK S, KHAN S, GHOSH P, *et al.* Treatment of pharmaceutical industrial wastewater by nano-catalyzed ozonation in a semi-batch reactor for improved biodegradability[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 678: 114-122.
- [79] JI Y P, PAN Z C, YUAN D H, *et al.* Advanced treatment of the antibiotic production wastewater by ozone/zero-valent iron process[J]. *Clean-Soil, Air, Water: A Journal of Sustainability and Environmental Safety*, 2018, 46(3): 1700661-1700666.
- [80] HUANG Y X, JIANG J W, MA L M, *et al.* Iron foam combined ozonation for enhanced treatment of pharmaceutical wastewater[J]. *Environmental Research*, 2020, 183: 109205.
- [81] ALPATOVA A L, DAVIES S H, MASTEN S J. Hybrid ozonation-ceramic membrane filtration of surface waters: The effect of water characteristics on permeate flux and the removal of DBP precursors, dicloxacillin and ceftazidime[J]. *Separation and Purification Technology*, 2013, 107(4): 179-186.
- [82] FUJIOKA T, HOANG A T, OKUDA T, *et al.* Water reclamation using a ceramic nanofiltration membrane and surface flushing with ozonated water[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2018, 15(4): 799.
- [83] CHEN L, LI J B, FU W Y, *et al.* Ceramic membrane based hybrid process for the upgrade of rural water treatment plants: A pilot study[J]. *Water Environment Research: A research publication of the Water Environment Federation*, 2021, 93(1): 75-83.
- [84] FAN X J, TAO Y, WANG L Y, *et al.* Performance of an integrated process combining ozonation with ceramic membrane ultra-filtration for advanced treatment of drinking water[J]. *Desalination*, 2014, 335(1): 47-54.
- [85] XIE X Y (谢新月), XU J J (许建军), ZHANG S H (张少华), *et al.* Characteristics and removal mechanism of an electro-hybrid ozonation-coagulation system in the treatment of organic matters[J]. *Environmental Science (环境科学)*, 2021, 42(2): 883-890.
- [86] IKHLAQ A, JAVED F, AKRAM A, *et al.* Synergic catalytic ozonation and electroflocculation process for the treatment of veterinary pharmaceutical wastewater in a hybrid reactor[J]. *Journal of Water Process Engineering*, 2020, 38: 101597.
- [87] MA F J (马富军), LI X Y (李新洋), ZONG B Y (宗博洋), *et al.* Study on electrochemical heterogeneous catalytic ozonation process for treatment of amantadine pharmaceutical wastewater[J]. *China Environmental Science (中国环境科学)*, 2018, 38(10): 3713-3719.
- [88] ZHAN J H, LI Z X, YU G, *et al.* Enhanced treatment of pharmaceutical wastewater by combining three-dimensional electrochemical process with ozonation to *in situ* regenerate granular activated carbon particle electrodes[J]. *Separation and Purification Technology*, 2018, 208: 12-18.
- [89] ESPEJO A, AGUINACO A, AMATA A M, *et al.* Some ozone advanced oxidation processes to improve the biological removal of selected pharmaceutical contaminants from urban wastewater[J]. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 2014, 49(4): 410-421.
- [90] MARQUEZ G, RODRIGUEZ E M, MALDONADO M I, *et al.* Integration of ozone and solar TiO₂-photocatalytic oxidation for the degradation of selected pharmaceutical compounds in water and wastewater[J]. *Separation and Purification Technology*, 2014, 136: 18-26.
- [91] YANG W L (杨文玲), WANG T (王坦). Advanced treatment of pharmaceutical wastewater by catalytic ozonation-MBR combined process[J]. *Applied Chemical Industry (应用化工)*, 2021, 50(3): 708-711.
- [92] LI X K (李新凯), YANG L (杨磊). Advanced treatment of antibiotics wastewater by ICB and catalytic ozonation[J]. *China Water & Wastewater (中国给水排水)*, 2017, 33(9): 89-91.
- [93] WEI J (魏健), HE J Y (何锦堃), SONG Y H (宋永会), *et al.* Advanced treatment of antibiotic wastewater by catalytic ozonation combined with BAF process and an analysis of the bacterial community structures[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae (环境科学学报)*, 2020, 40(6): 2090-2100.
- [94] YANG L Y, SHENG M S, LI Y J, *et al.* A hybrid process of Fe-based catalytic ozonation and biodegradation for the treatment of industrial wastewater reverse osmosis concentrate[J]. *Chemosphere*, 2020, 238: 124639.