

医药与日化原料

# 靶向光敏剂 $\text{NaYF}_4 : \text{Yb, Tm} @ \text{NaGdF}_4 : \text{Yb} @ \text{TiO}_2 @ \text{PEI-PAA-FA}$ 的制备和性能

毛 艳<sup>1</sup>, 梁天华<sup>1</sup>, 胡小锋<sup>1</sup>, 董孟杰<sup>2</sup>, 刘振锋<sup>2</sup>, 宫培军<sup>1\*</sup>

(1. 浙江师范大学“先进催化材料”教育部重点实验室, 浙江 金华 321004; 2. 浙江大学医学院附属第一医院核医学科 PET 中心, 浙江 杭州 310003)

**摘要:** 采用水解法用  $\text{TiO}_2$  包覆上转换纳米粒子  $\text{NaYF}_4 : \text{Yb, Tm} @ \text{NaGdF}_4 : \text{Yb}$ , 然后修饰聚乙烯亚胺 (PEI) 和聚丙烯酸 (PAA) 并偶联叶酸 (FA), 制备了叶酸受体靶向纳米光敏剂 ( $\text{NaYF}_4 : \text{Yb, Tm} @ \text{NaGdF}_4 : \text{Yb} @ \text{TiO}_2 @ \text{PEI-PAA-FA}$ )。借助 XRD 和 TEM 表征  $\text{NaYF}_4 : \text{Yb, Tm} @ \text{NaGdF}_4 : \text{Yb} @ \text{TiO}_2$  的物相和形貌, FTIR 和 Zeta 电位证实有机成分的成功修饰, 并测试了产物的上转换发光光谱。结果表明: 在 980 nm 近红外光 (NIR) 下, 纳米光敏剂存在下的 1,3-二苯基异苯并呋喃溶液吸收光谱的降低证明了单线态氧的产生。此外, 纳米光敏剂可以载带阿霉素 (DOX), 最大载药率为 50.8%, 包封率为 84.7%。载药后的纳米光敏剂中 DOX 释放对介质具有 pH 响应性, 在 NIR 照射的酸性介质 (pH=5.0) 中 12 h 的累积缓释率为 38.1%, 远高于中性介质 (pH=7.4) 的 10.4%。

**关键词:** 上转换纳米粒子; 二氧化钛; 阿霉素; 叶酸; 药物缓释; 光动力治疗; 化疗; 医药原料

中图分类号: TQ427.7; O648 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2018) 11-1914-07

## Preparation and Properties of Targeting Photosensitizer $\text{NaYF}_4 : \text{Yb, Tm} @ \text{NaGdF}_4 : \text{Yb} @ \text{TiO}_2 @ \text{PEI-PAA-FA}$

MAO Yan<sup>1</sup>, LIANG Tian-hua<sup>1</sup>, HU Xiao-feng<sup>1</sup>, DONG Meng-jie<sup>2</sup>,  
LIU Zhen-feng<sup>2</sup>, GONG Pei-jun<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of the Ministry of Education for Advanced Catalysis Materials, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, Zhejiang, China; 2. PET Center, Department of Nuclear Medicine, the First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, Zhejiang, China)

**Abstract:** Folate receptor-targeted nanophotosensitizer ( $\text{NaYF}_4 : \text{Yb, Tm} @ \text{NaGdF}_4 : \text{Yb} @ \text{TiO}_2 @ \text{PEI-PAA-FA}$ ) was prepared by coating  $\text{TiO}_2$  on the upconversion nanoparticles  $\text{NaYF}_4 : \text{Yb, Tm} @ \text{NaGdF}_4 : \text{Yb}$  via a hydrolysis method, followed by modification with polyethyleneimine (PEI) and polyacrylic acid (PAA) and subsequent conjugation of folic acid (FA). XRD and TEM were used to characterize the crystal structure and morphology of the inorganic components of the nanophotosensitizer. FTIR and Zeta potential were used to verify the binding of these organic components. Upconversion luminescence spectra of the samples were also measured. The decrease in the absorbance of 1,3-diphenylisobenzofuran solution in the presence of the nanophotosensitizer under 980 nm near-infrared (NIR) laser irradiation indicated the singlet oxygen was produced from the nanophotosensitizer. Besides, the photosensitizer could carry doxorubicin (DOX), the maximum drug loading efficiency was 50.8% and the encapsulation efficiency was 84.7%. The DOX release from the nanophotosensitizer was sensitive to the pH value of the buffer. As the DOX-loaded nanophotosensitizer was suspended in an acidic buffer of pH=5.0 and exposed to NIR laser irradiation for 12 h, the cumulative release of DOX was 38.1%, much higher than that obtained from a neutral buffer (pH=7.4), which was 10.4%.

收稿日期: 2017-11-07; 定用日期: 2018-02-12; DOI: 10.13550/j.jxhg.20170908

基金项目: 浙江省公益技术应用研究计划项目 (2016C31014); 浙江省自然科学基金 (LY16H180002); 浙江师范大学“先进催化材料”教育部重点实验室和“固体表面反应化学”浙江省重点实验室开放课题基金 (2017-15); 国家级大学生创新创业训练计划 (201710345018)

作者简介: 毛 艳 (1992—), 女, 硕士生。联系人: 宫培军 (1978—), 男, 副教授, E-mail: skygpj@zjnu.cn。

**Key words:** upconversion nanoparticles; titanium dioxide; doxorubicin; folic acid; drug release; photodynamic therapy; chemotherapy; drug materials

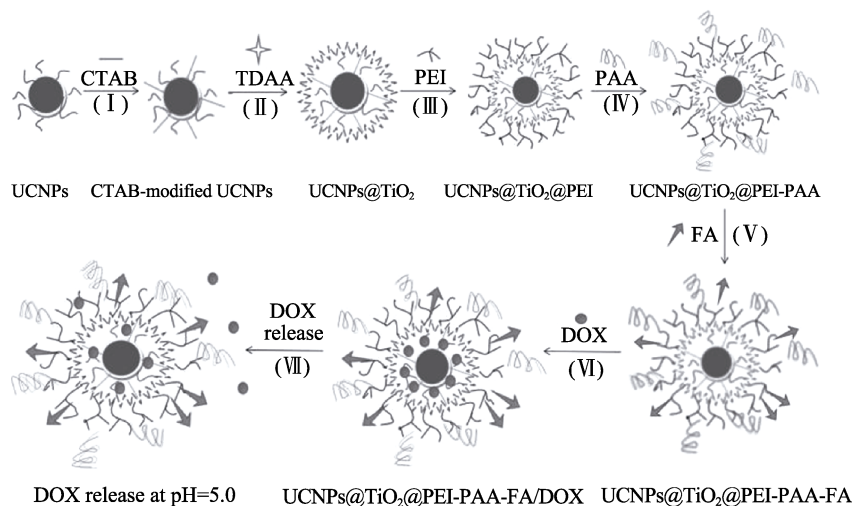
**Foundation items:** Public Welfare Technology Application Research Plan Project of Zhejiang Province (2016C31014); Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LY16H180002); Opening Research Fund of Key Laboratory of the Ministry of Education for Advanced Catalysis Materials and Zhejiang Key Laboratory for Reactive Chemistry on Solid Surfaces, Zhejiang Normal University (2017-15); National Training Program of Innovation and Entrepreneurship for Undergraduates (201710345018)

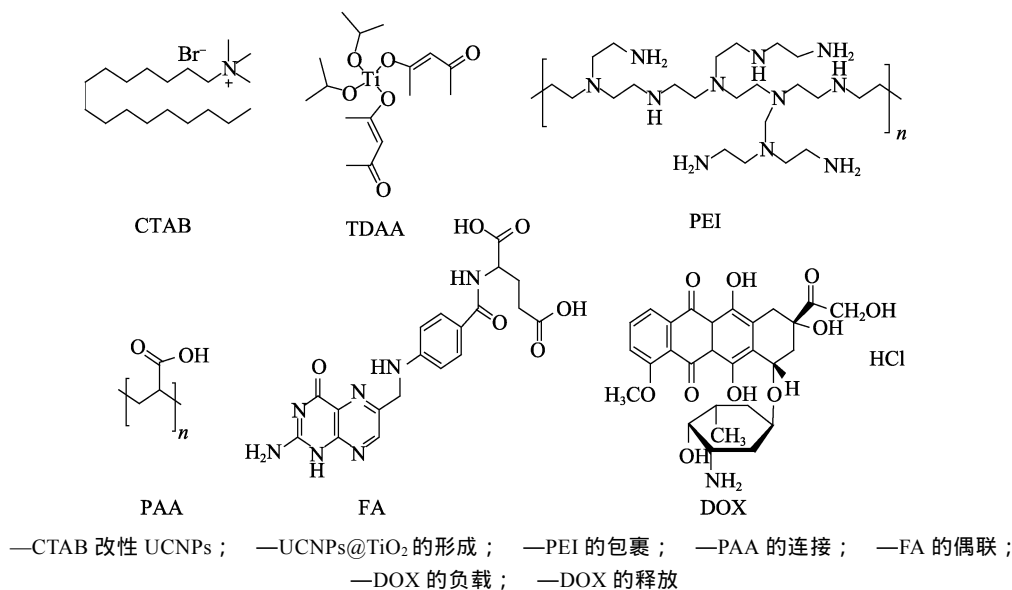
癌症较高的发病率和较低的治愈率严重威胁着人类的健康和生命。传统的化疗和放疗技术存在组织选择性差、药物利用率低、毒副作用大等问题。光动力疗法 (photodynamic therapy, PDT) 是借助光敏剂在光照下产生的活性氧物种 (reactive oxygen species, ROS) 杀灭肿瘤细胞的一种非入侵性治疗技术, 治疗作用仅发生在光波照射和穿透区域, 因而呈现较好的区域选择性和安全性<sup>[1-3]</sup>。临床的有机小分子光敏剂的组织滞留时间较短, 可见区激发光的组织穿透能力较弱, 易发生光漂白现象, 这些弊端极大地限制了其应用范围和治疗效果。

镧系离子掺杂型上转换荧光纳米材料 (upconversion nanoparticles, UCNPs) 是一类能通过吸收多个低能量近红外光子、经转换发射高能量的紫外光或可见光的功能材料。由于近红外光 (NIR) 的组织穿透能力较强、UCNPs 的发射光可以激发某些光敏剂, 研究人员在聚合物或氧化硅修饰的 UCNPs 上吸附有机光敏剂<sup>[4-5]</sup>或复合二氧化钛等无机半导体<sup>[6-7]</sup>, 构建了 NIR 激发的 PDT 纳米光敏剂, 利用设计的主动靶向性能使药物富集在肿瘤组织, 借助纳米粒子的增强渗透与滞留效应延长药物的组织滞留时间, 较传统光敏剂在治疗深组织肿瘤方面获得重要进展<sup>[2,8-10]</sup>。为进一步增强治疗效果, 一些课题组借助 UCNPs 纳米光敏剂载带化疗药物构建了多功能纳米药物,

可以将化疗药物高效载带至肿瘤组织并释放, 在降低副作用的同时实现化疗-PDT 协同治疗<sup>[5,11-13]</sup>。为此, 高的载药率和 pH 响应的释放性能对协同治疗中的化疗功能至关重要, 而载药需借助纳米光敏剂所具有的中空或介孔结构  $\text{SiO}_2$ 、疏水性高分子层或对药物有静电引力的聚电解质<sup>[5,14-16]</sup>。如何统筹设计纳米平台的组分和结构使纳米药物能兼顾 PDT 性能的发挥和化疗药物的载带, 在技术上具有难度, 目前文献报道较少。

本文提出一种兼有 980 nm NIR 驱动 PDT-化疗协同灭活肿瘤细胞功能的靶向纳米药物平台的构建方法。首先, 借助水解法制备了 NIR 驱动的无机光敏剂  $\text{NaYF}_4 : \text{Yb, Tm} @ \text{NaGdF}_4 : \text{Yb} @ \text{TiO}_2$ , 进一步在其表面修饰聚乙烯亚胺和聚丙烯酸并偶联叶酸以, 获得的靶向纳米光敏剂可靶向叶酸受体过表达的肿瘤细胞。 $\text{NaGdF}_4 : \text{Yb}$  壳可以提高  $\text{NaYF}_4 : \text{Yb, Tm}$  核的发光效率并使靶向药物平台具备扩展研究磁共振成像增强的功能<sup>[8,17]</sup>。本文在分析靶向纳米药物平台的化学组成、尺寸分布、表面电位等特征的基础上, 讨论了其作为 PDT 光敏剂的 ROS 产生能力、负载和释放模型化疗药物阿霉素 (DOX) 的性能。靶向药物平台的制备、DOX 负载与释放过程如下所示:





## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

六水合氯化钇(III)、六水合氯化镱(III)、六水合氯化铥(III)、六水合氯化钆(III)、油酸(OA)、十八烯(ODE)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、*N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、聚丙烯酸(PAA, 质量分数 50% 的水溶液,  $M_w=3000$ )、叶酸(FA)、二甲基亚砜(DMSO)、1,3-二苯基异苯并咪唑(DPBF), AR, 阿拉丁化学有限公司; 双(乙酰丙酮基)二异丙基钛酸酯(TDAA), AR, Sigma-Aldrich 公司; 支化型聚乙烯亚胺(PEI, 质量分数 30% 的水溶液,  $M_w=50000\sim 100000$ ), Alfa Aesar 化学有限公司; 阿霉素(DOX, 质量分数 98%), 生工生物工程(上海)股份有限公司; 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、戊二醛及其他试剂均为 AR, 国药集团化学试剂有限公司; 实验用水为去离子水, 使用磷酸二氢钠和磷酸氢二钠配制磷酸盐缓冲液(PB), 使用碳酸氢钠和碳酸钠配制碳酸盐缓冲溶液, 浓度均为 0.010 mol/L。

JEM-2010 型透射电子显微镜, 日本 JOEL 公司; D8 Advance 型 X 射线衍射仪, 德国 Bruker 公司; Nicolet Nexus 670 型傅里叶变换红外光谱仪, 美国 Nicolet 公司; Malvern zetasizer nano ZS90 型纳米粒度和 Zeta 电位分析仪, 英国 Malvern 公司; F-7000 型荧光分光光度计, 日本 Hitachi 公司; Lambda 25 型紫外-可见分光光度计, 美国 Perkin-Elmer 公司。

### 1.2 NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm@NaGdF<sub>4</sub>:Yb 的制备

参考文献[18]方法合成 NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm@NaGdF<sub>4</sub>:Yb (UCNPs)。将 0.2124 g (0.7 mmol) YCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O、0.1162 g (0.3 mmol) YbCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 和 0.0019 g (0.005 mmol) TmCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 与 6 mL OA 和

15 mL ODE 在三口烧瓶内搅拌加热到 150 °C 至液体澄清, 将溶液温度降至 50 °C 时加入 5 mL 浓度为 1 mol/L NaF 的甲醇溶液, 升温蒸去甲醇, 氮气保护下在 320 °C 反应 1 h。用丙酮洗涤冷却的固体产物, 将得到的 NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm 分散在 20 mL 环己烷中。采用外延生长制备 NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm@NaGdF<sub>4</sub>:Yb 壳层的实验步骤和条件同上, 以 NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm 为种子, 壳层所用的稀土盐为 0.1300 g (0.35 mmol) GdCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 和 0.0581 g (0.15 mmol) YbCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 浓度为 1 mol/L NaF 的甲醇溶液 2.5 mL, 其他条件不变, 得到 100 mg NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm@NaGdF<sub>4</sub>:Yb 分散在 20 mL 环己烷中用于后续合成。

### 1.3 UCNPs@TiO<sub>2</sub> 的制备

参考文献[19]方法合成, 过程略作修改: 将 0.15 g CTAB 溶于 10 mL 水中, 加入 2 mL UCNPs 环己烷分散液, 在 80 °C 水浴中搅拌至溶液澄清, 离心去除母液, 用水洗去残余的 CTAB, 将粒子分散在 10 mL 异丙醇中, 加入 5 mL 水和 400 μL 氨水, 搅拌 30 min, 在磁搅拌下逐滴加入 50 μL TDAA 与 10 mL 异丙醇的混合溶液, 继续搅拌 24 h。离心分离固体, 用乙醇洗涤两次, 所得固体分散在 20 mL 乙醇中, 转入水热釜在 200 °C 下晶化 5 h, 得到无机光敏剂 UCNPs@TiO<sub>2</sub> 粉末 20 mg。

### 1.4 UCNPs@TiO<sub>2</sub>@PEI-PAA-FA 的制备

取 15 mg UCNPs@TiO<sub>2</sub> 和 100 mg PEI, 在 9.7 mL 浓度为 0.010 mol/L 碳酸盐缓冲液 (pH=9.5) 中吸附 5 h 后加入 30 mg 戊二醛, 交联反应进行 1.5 h 后加入 2.7 mg KBH<sub>4</sub>, 反应 15 min 后去除清液, 水洗两次, 将得到的白色颗粒 UCNPs@TiO<sub>2</sub>@PEI 分散在 3 mL PB (pH=7.5) 中。将 7.5 mg PAA、0.5 mg EDC 和 0.5 mg NHS 加入 5 mL PB (pH=5.0) 振荡 30 min, 用 NaOH 调节反应液至 pH=7.5 后加入 UCNPs@TiO<sub>2</sub>@PEI 分

散液, 室温反应 4 h。将 1.0 mg FA、1 mL DMSO、1.6 mg EDC 和 1.1 mg NHS 加入 3 mL PB (pH=5.0) 振荡反应 30 min, 用 NaOH 调节反应液 pH 至 7.5 后, 将其加至含 UCNPs 的反应液中, 室温磁力搅拌反应 12 h。离心去掉反应液, 依次用 PB 和水洗涤粒子 2 次, 得到 PEI、PAA 修饰和 FA 偶联的叶酸受体靶向纳米光敏剂 (UCNPs@TiO<sub>2</sub>@PEI-PAA-FA) 粉末。

### 1.5 光敏剂的 ROS 产生能力检测

借助探针 DPBF<sup>[12]</sup>检测光敏剂在 NIR 照射下产生的 ROS。1 mg UCNPs@TiO<sub>2</sub> 或 UCNPs@TiO<sub>2</sub>@PEI-PAA-FA 分散在 4 mL 质量浓度为 50 mg/L 的 DPBF 溶液中, 黑暗吸附 1 h 达到平衡, 使用功率密度为 1.0 W/cm<sup>2</sup> 的 980 nm 激光照射溶液, 在不同时间取样, 用紫外-可见分光光度计测上清液的 UV-Vis 吸收光谱。

### 1.6 DOX 在 UCNPs@TiO<sub>2</sub>@PEI-PAA-FA 上的负载和释放

用 PB (pH=7.4) 配制不同质量浓度 (0.3、0.5、0.8、1.0 和 1.2 g/L) 的 DOX 溶液, 将 2 mg UCNPs@TiO<sub>2</sub>@PEI-PAA-FA 分散在 1 mL DOX 溶液中, 室温搅拌 24 h 完成 DOX 负载。用 PB 洗去过量 DOX, 得到 DOX 负载的靶向纳米光敏剂 (UCNPs@TiO<sub>2</sub>@PEI-PAA-FA/DOX); 合并上清液和洗涤液后测定其在 484 nm 处的吸光度, 依据 DOX 的质量浓度-吸光度标准曲线得到合并液中 DOX 的质量浓度, 光敏剂对 DOX 的包封率与载药率的计算公式如下:

$$\text{包封率}/\% = \frac{\text{被载带 DOX 的质量}}{\text{DOX 投料量}} \times 100$$

$$\text{载药率}/\% = \frac{\text{被载带 DOX 的质量}}{\text{载体的质量}} \times 100$$

将 2 mg UCNPs@TiO<sub>2</sub>@PEI-PAA-FA/DOX 分别分散到 1 mL 不同 pH 的 PB (pH=5.0、6.5 和 7.4) 中, 置于 37 °C 水浴中避光振荡, 1 h 后离心沉淀粒子, 取出上清液并测定其在 484 nm 处的吸光度, 计算 DOX 的释放量。补充 1 mL PB 分散光敏剂后继续在 37 °C 水浴中重复上述 DOX 释放过程, 计算累积释药率并绘制时间-DOX 累积释药率曲线。

## 2 结果与讨论

### 2.1 UCNPs@TiO<sub>2</sub> 的结构和形貌

图 1A 是无机光敏剂 UCNPs@TiO<sub>2</sub> 的 XRD 图。由图 1 可知, UCNPs@TiO<sub>2</sub> 在 17.1°、29.9°、30.8°、43.4° 和 53.2° 处衍射峰与 NaYF<sub>4</sub>:Yb 标准卡 (JCPDF 16-334) 对应, 在 25.4°、37.9°、48.2° 和 55.2° 的衍射峰与 TiO<sub>2</sub> 标准卡 (JCPDF 73-1764) 一致, 证明 UCNPs@TiO<sub>2</sub> 是由 β 相 UCNPs 和锐钛矿相 TiO<sub>2</sub> 构成的。图 1B、C 分别为 UCNPs 和

UCNPs@TiO<sub>2</sub> 的 TEM 图。UCNPs 呈现六棱柱状, UCNPs@TiO<sub>2</sub> 中 TiO<sub>2</sub> 纳米片蓬松地复合在 UCNPs 表面, 有助于 UCNPs 产生的 ROS 向周围介质扩散、增强 PDT 效能, 光敏剂呈现出较大的表面积和 TiO<sub>2</sub> 片间的空隙有利于 DOX 的负载。由于水热晶化较文献的高温煅烧法<sup>[19]</sup>条件更温和、能避免纳米 TiO<sub>2</sub> 烧结、保持粒子的分散性, 因此, UCNPs@TiO<sub>2</sub> 更适用于体内 PDT 应用。

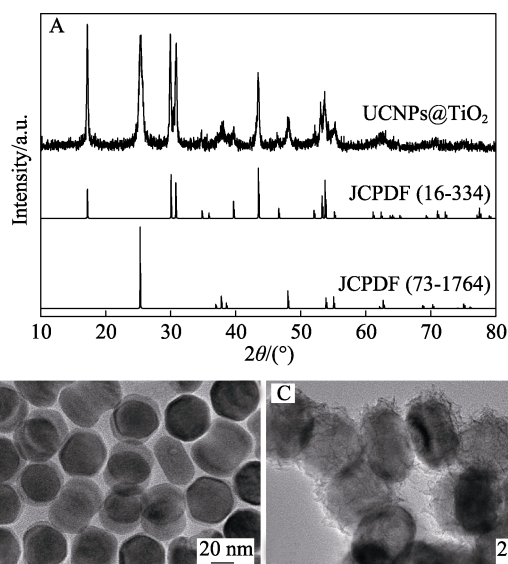


图 1 UCNPs@TiO<sub>2</sub> 的 XRD 图(A); UCNPs (B) 和 UCNPs@TiO<sub>2</sub> (C) 的 TEM 图

Fig. 1 XRD patterns of UCNPs@TiO<sub>2</sub> (A) and TEM images of UCNPs (B) and UCNPs@TiO<sub>2</sub> (C)

### 2.2 靶向纳米光敏剂的组成和 Zeta 电位

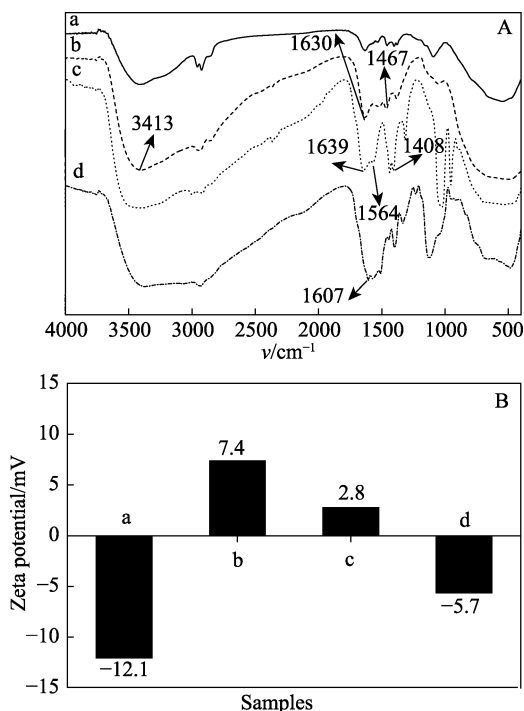
图 2A 为制备的靶向纳米光敏剂不同阶段产物的 FTIR 谱图。曲线 b 中 3413、1630 和 1467 cm<sup>-1</sup> 分别对应于 N—H 的伸缩振动、变形振动以及 C—N 伸缩振动, 表明 PEI 对 UCNPs@TiO<sub>2</sub> 的修饰; 曲线 c 中出现的 1639 和 1564 cm<sup>-1</sup> 处酰胺 I 带和 II 带以及 1408 cm<sup>-1</sup> 处羧酸根 COO<sup>-</sup> 的对称伸缩振动带证实 PAA 修饰成功。曲线 d 中 1607 cm<sup>-1</sup> 的苯环特征振动证明叶酸在光敏剂上的偶联<sup>[3]</sup>。

图 2B 为上述不同反应阶段产物的 Zeta 电位。随着正电性 PEI 和负电性 PAA 对 UCNPs@TiO<sub>2</sub> 的依次修饰, Zeta 电位由 -12.1 mV 先增加至 7.4 mV 后降低为 2.8 mV, 间接证明 PEI 和 PAA 的成功修饰。UCNPs@TiO<sub>2</sub>@PEI-PAA-FA 的 Zeta 电位为 -5.7 mV, 较低的负电性可以确保光敏剂对正电性 DOX 具有吸引力、同时避免过强的静电引力不利于 DOX 的释放。

### 2.3 靶向纳米光敏剂的尺寸分布、发光和 ROS 产生能力

UCNPs@TiO<sub>2</sub> 和 UCNPs@TiO<sub>2</sub>@PEI-PAA-FA 在水溶液中的 DLS 图见图 3A。UCNPs@TiO<sub>2</sub>@PEI-

PAA-FA 的平均水力学粒径为 460.8 nm，较 UCNPs@TiO<sub>2</sub> (306.9 nm) 明显增大，可能源于亲水性 PEI 和 PAA 修饰层在水中发生的溶胀。



a—UCNPs@TiO<sub>2</sub>; b—UCNPs@TiO<sub>2</sub>@PEI; c—UCNPs@TiO<sub>2</sub>@PEI-PAA; d—UCNPs@TiO<sub>2</sub>@PEI-PAA-FA

图 2 带有不同修饰成分的纳米光敏剂的 FTIR (A) 和 Zeta 电位 (B)

Fig. 2 FTIR spectra (A) and Zeta potentials (B) of the nanophotosensitizers modified with different organic components

图 3B 为 UCNPs、UCNPs @TiO<sub>2</sub> 和 UCNPs@TiO<sub>2</sub>@PEI-PAA-FA 在 980 nm 激光下的上转换荧光光谱。UCNPs 在 345、361、452 和 476 nm 的 4 个发射峰分别对应 Tm<sup>3+</sup> 的 <sup>1</sup>I<sub>6</sub>→<sup>3</sup>F<sub>4</sub>、<sup>1</sup>D<sub>2</sub>→<sup>3</sup>H<sub>6</sub>、<sup>1</sup>D<sub>2</sub>→<sup>3</sup>F<sub>4</sub>、<sup>1</sup>G<sub>4</sub>→<sup>3</sup>H<sub>6</sub> 跃迁<sup>[8]</sup>。TiO<sub>2</sub> 包覆使材料的荧光强度明显下降，一方面是因为 TiO<sub>2</sub> 对紫外区发射光的吸收，另一方面与 TiO<sub>2</sub> 纳米片对 UCNPs 发光的散射有关，但是被散射后再次到达 TiO<sub>2</sub> 纳米片的部分光子可能被用于激发 PDT 功能。靶向纳米光敏剂在 345 和 361 nm 发射峰进一步变弱，在 452 nm 处发射峰明显增强，这是由于 FA 吸收了上述紫外光后发射的荧光在 450 nm 附近<sup>[20]</sup>。

高浓度 ROS 会破坏细胞内的线粒体和 DNA，引起细胞凋亡<sup>[21]</sup>，而 DPBF 在捕获光敏剂产生的单线态氧 (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) 后在 350~470 nm 处的吸收强度会减弱，据此，利用 DPBF 的 UV-Vis 谱测定光敏剂的 ROS 产生能力可以在一定程度上反映其作为 PDT 药物的可行性<sup>[12]</sup>。图 3C 和 D 分别为 UCNPs@TiO<sub>2</sub> 和 UCNPs@TiO<sub>2</sub>@PEI-PAA-FA 在 980 nm 光照下氧

化 DPBF 的 UV-Vis 谱。随着光照时间的增加，DPBF 的吸收峰快速减弱，在最大吸收波长 414 nm 处吸收强度的降幅分别为 76.4%和 76.7%，表明 UCNPs@TiO<sub>2</sub>

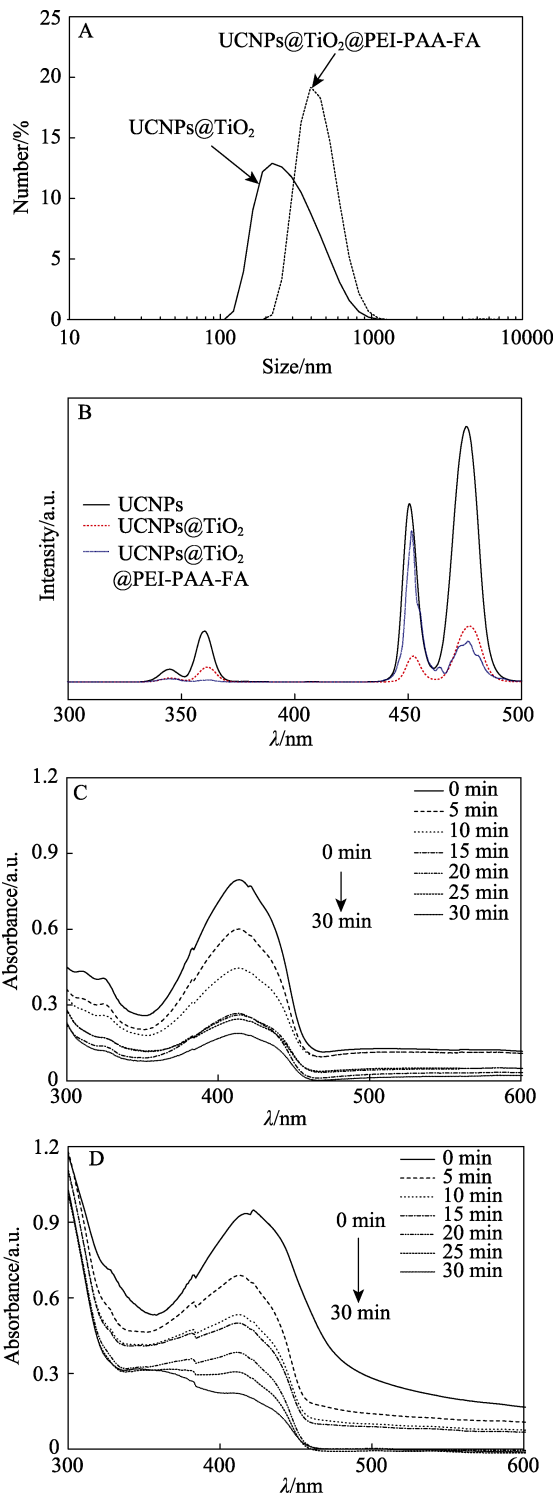


图 3 UCNPs@TiO<sub>2</sub> 与 UCNPs@TiO<sub>2</sub>@PEI-PAA-FA 的 DLS 图 (A)、上转换荧光光谱 (B)、在 980 nm NIR 照射下氧化 DPBF 的吸收光谱 (C, D)

Fig. 3 DLS (A) and upconversion luminescence spectra (B) of UCNPs@TiO<sub>2</sub> and UCNPs@TiO<sub>2</sub>@PEI-PAA-FA, absorption spectra of DPBF under 980 nm NIR irradiation in the presence of UCNPs@TiO<sub>2</sub> (C) and UCNPs@TiO<sub>2</sub>@PEI-PAA-FA (D)

和 UCNP@s@TiO<sub>2</sub>@PEI-PAA-FA 均能产生 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 且产生能力基本一致, 显示出 PEI、PAA 和 FA 的存在对光敏剂的 ROS 产生能力无负面影响。因此, UCNP@s@TiO<sub>2</sub>@PEI-PAA-FA 有望作为 PDT 光敏剂用于肿瘤细胞灭活。

#### 2.4 靶向纳米光敏剂负载和释放 DOX 的性能

DOX 溶液的浓度对纳米光敏剂的载药率和包封率的影响见图 4A。随着溶液中 DOX 质量浓度从 0.3 g/L 增至 1.2 g/L, 载药率由 10.1% 升至 50.8%, 高于 Zeng<sup>[9]</sup> 等以叶酸修饰 NaYF<sub>4</sub>: Yb/Tm-TiO<sub>2</sub> 和 Li<sup>[14]</sup> 等以介孔 SiO<sub>2</sub> 包覆的 NaYF<sub>4</sub>: Yb, Er 对 DOX 的最大载药率 (分别为 10.1% 和 8.4%)。推测高的载药率得益于靶向纳米光敏剂的结构和所含组分: 其一, TiO<sub>2</sub> 纳米片间的空隙不仅有利于 DOX 的负载, 也使 DOX 可以迁移到 UCNP@s 表面的油酸疏水层, 在疏水作用下<sup>[15]</sup> 将疏水性的多元环结构插入到油酸修饰层内, 获得额外的 DOX 载带; 其二, 负电性 PAA 对正电性的 DOX 的静电引力促进了 DOX 的负载。同时, DOX 包封率总体上处于较高水平

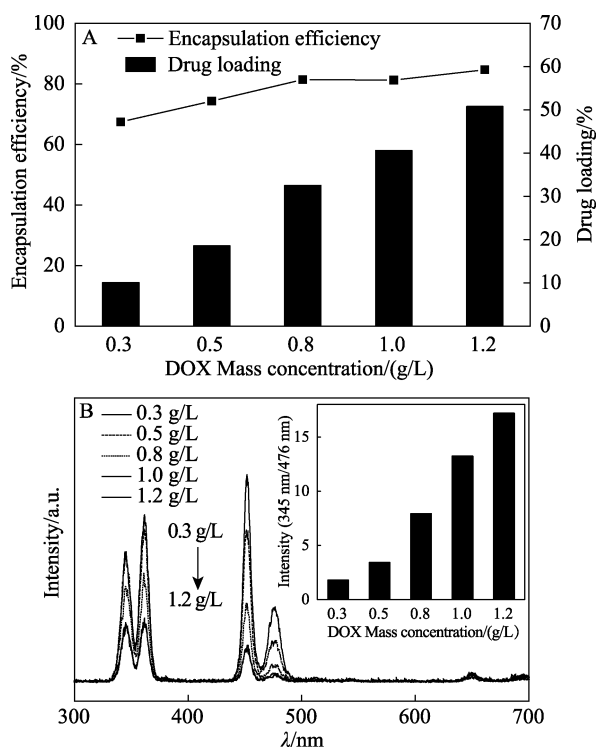


图 4 DOX 溶液的质量浓度对包封率与载药率 (A)、DOX 负载 UCNP@s@TiO<sub>2</sub>@PEI-PAA-FA 的上转换荧光光谱 (B) 的影响 (B 中插图为在 345、476 nm 发射峰的强度比与 DOX 溶液质量浓度的关系)

Fig. 4 Dependence of DOX concentration on encapsulation efficiency and drug loading of UCNP@s@TiO<sub>2</sub>@PEI-PAA-FA (A) and upconversion fluorescence spectrum of UCNP@s@TiO<sub>2</sub>@PEI-PAA-FA/DOX (B). The inset in (B) shows the intensity ratio between emission peaks at 345 and 476 nm versus the DOX concentration.

(67.5%~84.7%), 基本满足靶向纳米光敏剂的载药需要。图 4B 为 DOX 负载靶向纳米光敏剂的上转换荧光光谱。随着溶液中 DOX 质量浓度的增大, UCNP@s@TiO<sub>2</sub>@PEI-PAA-FA/DOX 的荧光强度整体减弱, 但 345 与 476 nm 发射峰的强度比则逐渐增大 (图 4B 中插图), 由于 DOX 的最大吸收波长位于 480 nm 附近, 这一变化也表明光敏剂的 DOX 负载量不断增大。

为了评估靶向纳米光敏剂是否适合在体内环境运输和释放 DOX, 测试了 UCNP@s@TiO<sub>2</sub>@PEI-PAA-FA/DOX 在模拟正常体液、肿瘤组织附近和肿瘤细胞内 (如内涵体、溶酶体) 酸度环境的 3 种 PB 溶液 (pH=7.4、6.5 和 5.0) 中的 DOX 缓释曲线, 结果见图 5。随着介质 pH 的降低, DOX 的初始释放速度加快, 在 12 h 内 DOX 累积释放率依次为 10.4%、21.9% 和 31.5%, 说明药物释放具有环境 pH 响应性, 原因在于在酸性环境中 DOX 的质子化使其亲水性增强<sup>[22]</sup>, 与靶向纳米光敏剂中正电性 PEI 之间的排斥作用增大。这一结果意味着 UCNP@s@TiO<sub>2</sub>@PEI-PAA-FA/DOX 在体内正常运输中 DOX 的释放量很少, 在到达微酸性的肿瘤组织或进入癌细胞内会快速释放大量 DOX, 确保 DOX 的利用率较高、毒副作用较小。同时, NIR 照射可以加速光敏剂在 pH=5.0 体系中 DOX 缓释, 累积释放率增大到 38.1%, 尽管这一数值明显低于前述 Zeng<sup>[9]</sup> 等和 Li<sup>[14]</sup> 等的样品 (12 h 释放率约为 73% 和 85%), 由于本文光敏剂的载药率 (32.6%, 载药光敏剂使用质量浓度为 0.8 g/L DOX 溶液制备) 高于后两者, 单位质量光敏剂的 DOX 释放量 (12.4 mg/g 载体) 仍高于上述文献 (分别约为 7.4 和 7.2 mg/g 载体), 高的 DOX 释放量有助于快速杀灭肿瘤细胞。DOX 负载的靶向纳米光敏剂的细胞毒性、PDT 和 PDT-化疗协同灭活肿瘤细胞的研究正在进行, 这有助于更好评价靶向纳米光敏剂的治疗性能。

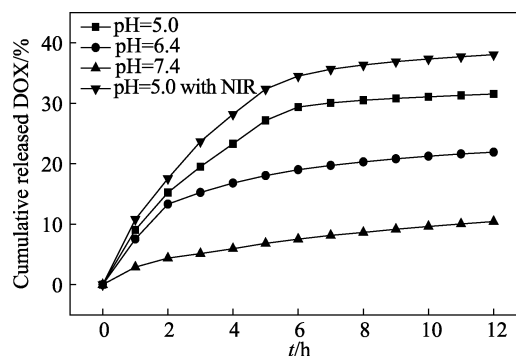


图 5 UCNP@s@TiO<sub>2</sub>@PEI-PAA-FA/DOX 在不同介质环境中的 DOX 累积释放曲线

Fig. 5 Cumulative release curves of DOX from UCNP@s@TiO<sub>2</sub>@PEI-PAA-FA/DOX under different circumstances

### 3 结论

采用水解法将  $\text{TiO}_2$  包覆在  $\beta$  相  $\text{NaYF}_4 : \text{Yb, Tm} @ \text{NaGdF}_4 : \text{Yb}$  表面, 构建核壳结构  $\text{UCNPs} @ \text{TiO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$  纳米片疏松的复合方式有助于 DOX 的负载和上转换发光的高效利用。通过对  $\text{UCNPs} @ \text{TiO}_2$  修饰 PEI 与 PAA 和偶联 FA, 制备了叶酸受体靶向纳米光敏剂, 其平均水力学粒径为 460.8 nm, Zeta 电位为 -5.7 mV, 有机修饰成分对光敏剂在 980 nm NIR 下的 ROS 产生能力无明显影响, 证明光敏剂具备 PDT 活性。靶向纳米光敏剂对 DOX 的最大载药率可达 50.8%, 包封率为 84.7%。DOX 从靶向纳米光敏剂上的释放受介质 pH 值和 NIR 照射的影响, 在 NIR 照射下和 pH=5.0 的 PB 中 12 h 累积释放率为 38.1%。进一步研究 DOX 负载的靶向纳米光敏剂的细胞毒性、靶向性和对肿瘤细胞的灭活效果, 将有助于评价其作为肿瘤光动力治疗/化疗协同治疗药物的可行性。

#### 参考文献:

- [1] Ding Huiying (丁慧颖). Photodynamic therapy: Basic principles and applications (光动力学治疗基本原理及其应用)[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2014.
- [2] Swarnalatha L S, Muhammad I N, Huang K, *et al.* In vivo biocompatibility, biodistribution and therapeutic efficiency of titania coated upconversion nanoparticles for photodynamic therapy of solid oral cancers[J]. *Theranostics*, 2016, 6(11): 1844-1865.
- [3] Huang Yan (黄燕), Zhu Weihua (朱卫华), Hua Mingqing (华明清), *et al.* Preparation and properties of CPTPP-FA-LCOS for photosensitive functionalized drug delivery system[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2017, 34(5): 494-498.
- [4] Idris N M, Gnanasammandhan M K, Zhang J, *et al.* In vivo photodynamic therapy using upconversion nanoparticles as remote-controlled nanotransducers[J]. *Nature Medicine*, 2012, 18(10): 1580-1585.
- [5] Dong C H, Liu Z Y, Wang S, *et al.* A protein-polymer bioconjugate-coated upconversion nanosystem for simultaneous tumor cell Imaging, photodynamic therapy, and chemotherapy[J]. *Applied Mater Interfaces*, 2016, 8(48): 32688-32698.
- [6] Idris N M, Sasidharan L S, Li Z, *et al.* Photoactivation of core-shell titania coated upconversion nanoparticles and its effect on cell death[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2014, 2(40): 7017-7026.
- [7] Yu Z Z, Pan W, Li N, *et al.* A nuclear targeted dual-photosensitizer for drug-resistant cancer therapy with NIR activated multiple ROS[J]. *Chemical Science*, 2016, 7: 4237-4244.
- [8] Hou Z Y, Zhang Y X, Deng K R *et al.* UV-emitting upconversion-based  $\text{TiO}_2$  photosensitizing nanoplatfrom: near-infrared light mediated in vivo photodynamic therapy via mitochondria-involved apoptosis pathway[J]. *ACS Nano*, 2015, 9(3): 2584-2599.
- [9] Zeng L Y, Pan Y W, Tian Y, *et al.* Doxorubicin-loaded  $\text{NaYF}_4 : \text{Yb/Tm-TiO}_2$  inorganic photosensitizers for NIR-triggered photodynamic therapy and enhanced chemotherapy in drug-resistant breast cancers[J]. *Biomaterials*, 2015, 57: 93-106.
- [10] Lucky S S, Muhammad N, Li Z Q, *et al.* Titania coated upconversion nanoparticles for near-infrared light triggered photodynamic therapy[J]. *ACS Nano*, 2015, 9(1): 191-205.
- [11] Zhao N, Wu B Y, Hu X L, *et al.* NIR-triggered high-efficient photodynamic and chemo-cascade therapy using caspase-3 responsive functionalized upconversion nanoparticles[J]. *Biomaterials*, 2017, 141: 40-49.
- [12] Lv R C, Yang P P, Fei H, *et al.* An imaging-guided platform for synergistic photodynamic/photothermal/chemo-therapy with pH/temperature-responsive drug release[J]. *Biomaterials*, 2015, 63: 115-127.
- [13] Zhong Y N, Meng F H, Deng C, *et al.* Targeted inhibition of human hematological cancers in vivo by doxorubicin encapsulated in smart lipoic acid-crosslinked hyaluronic acid nanoparticles[J]. *Drug Delivery*, 2017, 24(1): 1482-1490.
- [14] Li K, Su Q Q, Yuan W, *et al.* Ratiometric monitoring of intracellular drug release by an upconversion drug delivery nanosystem[J]. *Applied Materials & Interfaces*, 2015, 7(22): 12278-12286.
- [15] Zhang L M, Lu Z X, Bai Y Y, *et al.* PEGylated denatured bovine serum albumin modified water-soluble inorganic nanocrystals as multifunctional drug delivery platforms[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2013, 1(9): 1289-1295.
- [16] Huang S S, Cheng Z Y, Chen Y Y, *et al.* Multifunctional polyelectrolyte multilayers coated onto  $\text{Gd}_2\text{O}_3 : \text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+} @ \text{MSNs}$  can be used as drug carriers and imaging agents[J]. *RSC Advances*, 2015, 5(52): 41985-41993.
- [17] He M, Huang P, Zhang C L, *et al.* Dual phase-controlled synthesis of uniform lanthanide-doped  $\text{NaGdF}_4$  upconversion nanocrystals via an OA/ionic liquid two-phase system for in vivo dual-modality imaging[J]. *Advanced Functional Materials*, 2011, 21(23): 4470-4477.
- [18] Li Z Q, Zhang Y. An efficient and user-friendly method for the synthesis of hexagonal-phase  $\text{NaYF}_4 : \text{Yb, Er/Tm}$  nanocrystals with controllable shape and upconversion fluorescence[J]. *Nanotechnology*, 2008, 19(34): 1-5.
- [19] Su W K, Zheng M M, Li L, *et al.* Directly coat  $\text{TiO}_2$  on hydrophobic  $\text{NaYF}_4 : \text{Yb, Tm}$  nanoplates and regulate their photocatalytic activities with the core size[J]. *Journal of Materials Chemistry A*, 2014, 2(33): 13486-13491.
- [20] An Huimei (安会梅), Jia Rui (贾蕊), Zhu Ruohua (朱若华). Determination of folic acid in milk powder and urine by fluorescence spectrophotometry-based on simultaneous oxidation of potassium permanganate and photochemical reaction [J]. *Physical Testing and Chemical Analysis Part B (Chemical Analysis) (理化检验化学分册)*, 2007, 43(10): 870-872.
- [21] Zhang H J, Shan Y F, Dong L J. A comparison of  $\text{TiO}_2$  and  $\text{ZnO}$  nanoparticles as photosensitizers in photodynamic therapy for cancer [J]. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2014, 10(8): 1450-1457.
- [22] Wang Huan (王欢). Study on mesoporous carbon nanospheres for doxorubicin delivery system[D]. Fuzhou: Fujian University of Traditional Chinese Medicine(福建中医药大学), 2015.