

载药荧光纳米粒子的制备及在乳腺癌 MCF-7 细胞系的应用及效果评价

张海鹏¹, 韩冰¹, 贾致真³, 丁荣波¹, 徐斌², 徐蔚青², 范志民¹

(1. 吉林大学第一医院, 长春 130021;

2. 吉林大学超分子结构与材料国家重点实验室, 长春 130012;

3. 东北师范大学计算机科学与技术学院, 长春 130117)

摘要 利用两亲性聚乙二醇-聚乳酸共聚物(PEG-PDLLA)包覆荧光染料(DPBA)和紫杉醇(PTX), 通过自组装方法制得载药荧光纳米粒子 DPBA/PTX@PEG-PDLLA. 纳米粒子尺寸均一, 具有良好的生物相容性. 对纳米粒子的发光性质、载药量和体外药物释放等进行了表征, 并考察了纳米粒子对乳腺癌细胞 MCF-7 的抑制效果, 观察了 MCF-7 细胞对纳米粒子的摄取情况. 结果表明, DPBA/PTX@PEG-PDLLA 纳米粒子具有较强的红光发射, 不仅可以用于 MCF-7 肿瘤细胞质荧光成像, 而且对肿瘤细胞的增殖具有一定的抑制能力.

关键词 载药荧光纳米粒子; 自组装; 药物释放; 生物成像; 紫杉醇

中图分类号 O631; O629

文献标志码 A

目前癌症的发病率呈逐年增加的趋势, 已成为导致人类发病率和死亡率增加的主要原因. 越来越多的研究人员开始关注癌症的形成原因, 新诊断技术和治疗方法也不断得到开发和应用^[1,2]. 兼具诊断和治疗功能的新型功能纳米材料, 在癌症诊断和治疗领域展现出独特的应用前景, 已成为生命科学和医学领域的研究热点^[3-6]. 具有荧光特性的新型载药纳米材料, 因其具有荧光显微成像和药物释放载体的多重功能^[7-9], 在肿瘤细胞的识别和治疗, 以及在细胞水平上研究药物的生理作用和相关动力学过程表现出很好的应用潜力^[10,11]. 因此, 开发高荧光强度、发光波长位于红光的新型荧光纳米材料^[12], 不仅可以改善传统荧光染料荧光强度较弱、易光漂白等限制, 而且可以避免由于生物分子的自发荧光导致的背景噪声, 进而提高检测灵敏度.

紫杉醇是一种天然植物来源的抗癌药物^[13], 它能抑制肿瘤细胞的分化、新血管的形成和肿瘤转移, 对乳腺癌等恶性肿瘤具有显著的治疗效果, 大大提高了乳腺癌的无病生存和总生存^[14,15]. 但由于紫杉醇在水中溶解度极低, 大大降低了其临床应用的治疗效果^[16]. 本文利用聚乙二醇-聚乳酸(PEG-PDLLA)嵌段共聚物为载体^[17-19], 采用自组装方法负载高效红光染料(DPBA)和紫杉醇(PTX), 制备了具有高固态荧光量子效率的红光紫杉醇载药荧光纳米粒子 DPBA/PTX@PEG-PDLLA. 考察了荧光载药纳米粒子的药物负载紫杉醇的累积释放率以及在乳腺癌 MCF-7 细胞系的荧光成像、细胞作用后凋亡率以及细胞周期变化, 实现了药物作用于肿瘤细胞后的疗效实时观察, 为进一步药物作用机制研究和药物改良研发提供了新方法.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

红光染料 DPBA 按照文献[20]方法合成和提纯. 紫杉醇, 西安宝赛生物科技有限公司; PEG2000-

收稿日期: 2017-02-27. 网络出版日期: 2017-04-18.

基金项目: 吉林省科技厅自然科学基金项目(批准号: 20150101205JC)、吉林大学白求恩医学科研支持计划项目(批准号: 2013205023)和吉林大学第一医院青年基金(批准号: JDYY72016040)资助.

联系人简介: 范志民, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事乳腺癌诊断与治疗相关研究. E-mail: fanzhimin@163.com

PDLLA2000, 济南岱罡生物工程有限公司; 四氢呋喃(THF), 色谱纯, 北京化工厂; 磷酸盐缓冲溶液(PBS), 浓度为 0.01 mol/L(pH=7.4), 北京索莱宝科技有限公司; 醋酸纤维素材质的透析袋, 截留分子量 3500; 乳腺癌肿瘤细胞系(MCF-7), 吉林大学第一医院乳腺科. 其它试剂均为分析纯.

Shimadzu UV-3600 紫外可见分光光度计和 Shimadzu RF-5301PC 分光光度计(日本岛津公司); Malvern Zetasizer Nano ZS 粒度仪(马尔文公司). Olympus FV1000 型激光共聚焦扫描显微镜(日本奥林巴斯公司).

1.2 纳米粒子的制备

配制 1 mg/mL DPBA 的 THF 溶液和 5 mg/mL PEG-PDLLA 的 THF 溶液, 备用. 用移液枪分别量取 200 mL DPBA THF 溶液和 1000 mL THF 溶液于 4 mL EP 管中, 按照染料与药物的质量比取不同量的 PTX 置于 4 mL EP 管中, DPBA 与 PTX 质量比分别为 1:1, 1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10. 根据纳米粒子的荧光量子效率不同, 选取载药最佳包覆比例. 加 THF 定容至 1 mL, 超声使聚合物完全溶解. 于 20 mL 玻璃瓶中加入 5 mL 去离子水, 将上述 THF 溶液快速倒入玻璃瓶中, 并超声 5~10 min. 将玻璃瓶置于加热台上通入氮气鼓泡(以气泡不会溢出瓶口为宜), 去除 THF, 直至无味道为止. 用 0.22 μm 的水相过滤头过滤溶液, 得到多种纳米粒子溶液.

1.3 荧光量子产率测试

参照文献[21]方法测试荧光量子效率. 溶液和悬浮液的荧光量子效率是以罗丹明的乙醇溶液的光谱(吸收值 <0.1 , 激发波长 365 nm, 量子效率 $\phi_r = 69\%$)为参比, 由折射率修正后通过下式计算得到:

$$\phi_s = \phi_r \left(\frac{A_r}{A_s} \right) \left(\frac{I_s}{I_r} \right) \left(\frac{n_s^2}{n_r^2} \right)$$

式中, ϕ_r 和 ϕ_s 分别为罗丹明和测试样品的荧光量子效率; A_r 和 A_s 分别为罗丹明和测试样品在激发波长处的吸收值; I_r 和 I_s 分别为罗丹明和测试样品的荧光强度积分值; n_r 和 n_s 分别为罗丹明和测试样品的溶液折射率.

1.4 载药纳米粒子的体外释放实验

将载药纳米粒子分别用生理盐水稀释, 置于相对分子量为 3500 的透析袋中, 以体积分数为 0.5% Tween 80 的磷酸盐缓冲溶液(pH=7.4, 6.4, 5.0)作为释放介质. 置于 100 mL 锥形瓶中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床处理, 并分别于 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48 h 移取释放介质 1 mL, 同时补充相同体积的同温空白介质. 将取出的释放介质利用高效液相色谱(HPLC)测定释放介质中紫杉醇的质量浓度, 计算累积释放量, 并绘制累积释放曲线.

1.5 MTT 实验

胰蛋白酶于 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化, 离心, 收集并显微镜下计数, 将 MCF-7 细胞以 5000~10000 个/mL 浓度铺于 96 孔板内, 200 μL /孔, 用含 10% (体积分数) 血清的 DMEM 培养基, 以 5% 二氧化碳, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 24 h. 弃去上清液, 用 PBS 缓冲液冲洗细胞 2 次, 加入含不同浓度纳米粒子的 DMEM 培养基(2% 血清), 每个浓度用 3 个平行孔, 以 5% 二氧化碳, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h, 除去 MTT 后, 每孔加入 100 μL 二甲基亚砜[四氯唑(MTT)粉末溶于 PBS 缓冲溶液, 5 mg/mL], 避光于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4 h, 室温振荡 5 min, 用酶标仪于 650 nm 处检测吸光度.

1.6 激光共聚焦显微镜检测标记纳米粒子与 MCF-7 细胞的作用

将 MCF-7 细胞株用作细胞成像, 培养基均为 DMEM 培养基+10% 胎牛血清+100 U/mL 青霉素+100 mg/mL 链霉素, 培养条件为 5% 二氧化碳, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养. 待细胞长至 90 mm 并且培养皿铺满 80% 时, 用胰蛋白酶于 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化, 转移至共聚焦培养皿内生长过夜, 用 PBS 溶液冲洗细胞, 用含 40% 荧光纳米粒子的 DMEM 维持培养基(2% 血清)换液, 4~6 h 后, 弃去培养基, 用 PBS 缓冲液冲洗细胞 3 次, 每次 5 min, 加入 DAPI 商业染料 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 染色 20 min, 用 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 在共聚焦显微镜(CLSM)下观察照相. 激发波长 408 nm, 捕获 430~475 nm 荧光用于检测 DAPI 荧光信号, 捕获 650~700 nm 荧光检测荧光纳米粒子信号.

2 结果与讨论

2.1 紫杉醇荧光纳米粒子的制备及表征

两亲性聚合物(PEG-PDLLA)用于共包覆红光染料 DPBA 和紫杉醇 PTX 制备荧光纳米粒子 DPBA/PTX@ PEG-PDLLA. 制备过程如图 1 所示. 在水溶液中, 由于染料 DPBA 和紫杉醇具有高度疏水性, 因而 DPBA, PTX 与 PDLLA 链段的疏水聚集是形成纳米粒子的驱动力. 荧光染料、紫杉醇与 PDLLA 链段处于纳米粒子的内部, PEG 链段构成纳米粒子的外层, 因而整个聚集态呈双层胶束形态, 使荧光染料和紫杉醇得到有效保护, 并且纳米粒子在水中的溶解性较好. 利用动态光散射(DLS)方法测得纳米粒子的平均粒径为 88.31 nm(图 S1, 见本文支持信息).

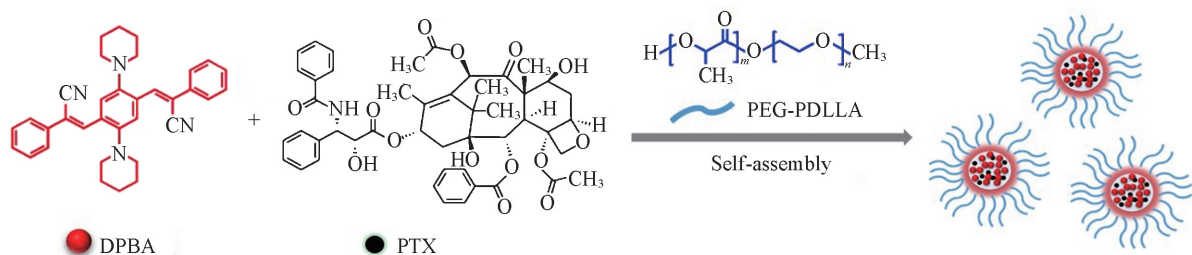


Fig.1 Schematic illustration of the fabrication of DPBA and PTX co-loaded nanoparticles using PEG-PDLLA as the matrix

2.2 荧光纳米粒子的光物理特性

图 2 为荧光纳米粒子 DPBA/PTX@ PEG-PDLLA 的紫外吸收光谱和荧光光谱. 从图 2 可以看出, DPBA/PTX@ PEG-PDLLA 纳米粒子在水溶液中有 2 个吸收带, 峰位分别位于 348 和 448 nm. 而据文献[13]报道, 紫杉醇的紫外吸收峰位于 233 nm, 因此, 纳米粒子的紫外吸收峰主要来源于染料分子 DPBA 的吸收, 这与文献[13]的结果一致. DPBA/PTX@ PEG-PDLLA 纳米粒子表现出很强的红光发射, 其最大发射峰位于 654 nm.

为了进一步优化荧光纳米粒子的发光性能, 探讨了 PEG-PDLLA 包覆染料 DPBA 负载量对纳米粒子发光性能的影响. 研究发现, 随着染料负载量的降低, 纳米粒子的荧光强度逐渐升高(图 S2, 见本文支持信息). 当 DPBA 与 PEG-PDLLA 投料质量比达到 1:25 时, 其荧光量子产率可达 26%. DPBA 是一种典型的聚集诱导发光分子, 其在溶液中几乎不发光, 而在固态或聚集态下发出强烈的红光. 这说明当形成纳米粒子时, DPBA 被固定在聚合物基质中, 分子内的振转运动被限制, 降低了非辐射过程的发生, 增强了荧光发射. 为了保证较高的荧光量子产率, 我们采用 DPBA 与 PEG-PDLLA 质量比为 1:25 为基础, 考察了不同染料与药物负载比例对纳米粒子发光性能的影响. 图 3 为以不同染料与药物

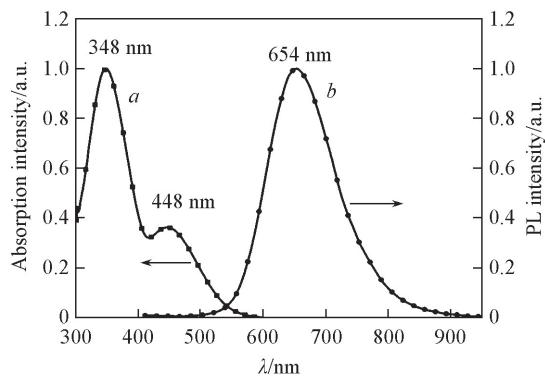


Fig.2 Normalized absorption (a) and emission (b) spectra of DPBA/PTX @ PEG-PDLLA nanoparticles in water

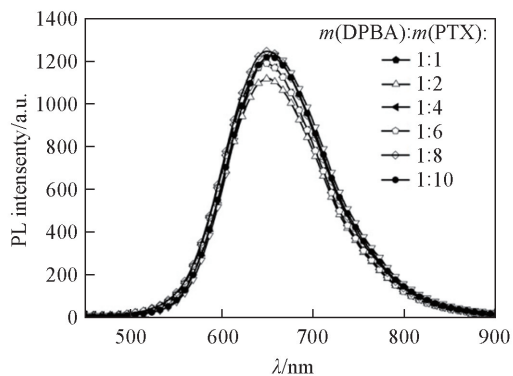


Fig.3 Emission spectra of DPBA and PTX with different mass ratios loaded PEG-PDLLA nanoparticles in water

负载浓度制备的纳米粒子的荧光光谱.可以看出,药物紫杉醇的加入并没有影响纳米粒子的发光颜色,其发光峰位基本不变.

此外,紫杉醇的引入导致纳米粒子的荧光量子效率有所降低,当染料 DPBA 与紫杉醇的负载比例为 1:8 时,纳米粒子的荧光量子效率仍可达到 25%(图 S3,见本文支持信息).结果表明,利用两性性聚合物 PEG-PDLLA 共包覆染料 DPBA 和药物 PTX,可以避免因聚集引起的荧光猝灭,是一条获得高效荧光载药纳米粒子的有效途径.

2.3 载药 DPBA/PTX@PEG-PDLLA 纳米粒子的体外释放

图 4 为紫杉醇在 DPBA/PTX@PEG-PDLLA 纳米粒子中不同 pH 下的累积释放量.可以看出,DPBA/PTX@PEG-PDLLA 载药纳米粒子可以缓释药物紫杉醇,在 pH=7.4 的 PBS 缓冲溶液中,3 h 后累积释放量为 19.5%,在 48 h 的累积释药量可达 25.1%.此外,随着 pH 值降低,溶液的酸性增强,药物的释放量增大.DPBA/PTX@PEG-PDLLA 载药纳米粒子在 pH=5.0 的 PBS 缓冲溶液中 48 h 的累积释药量最高可达 38.88%.因此,DPBA/PTX@PEG-PDLLA 载药纳米粒子可以用作 PTX 的药物载体与释放介质.

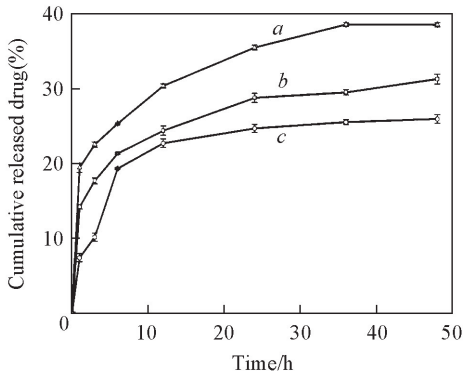


Fig.4 Drug release profile of DPBA/PTX@PEG-PDLLA in phosphate buffer (0.1 mol/L) containing 0.5% Tween 80 at 37 °C

a. pH=5.0; b. pH=6.4; c. pH=7.4.

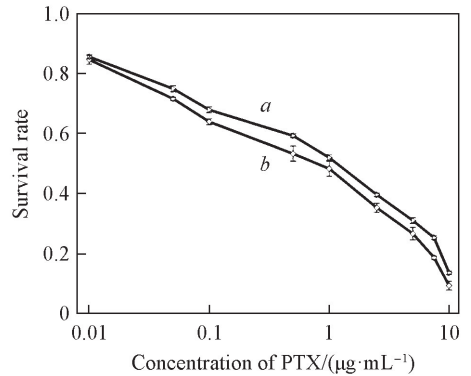


Fig.5 In vitro biological toxicity of DPBA/PTX@PEG-PDLLA nanoparticles (a) and PTX (b) against MCF-7 cells for 48 h

2.4 荧光纳米粒子的细胞毒性

采用 MTT 比色法考察 DPBA/PTX@PEG-PDLLA 纳米粒子对 MCF-7 细胞生长的抑制作用,结果如图 5 所示.随着 DPBA/PTX@PEG-PDLLA 纳米粒子用量的增加,MCF-7 肿瘤细胞生长受到明显的抑制.相比于纯药 PTX,纳米粒子的细胞毒性有所降低.结果表明,纳米粒子可以在细胞内环境中有效释放药物分子,对肿瘤细胞生长起到抑制作用,其药物毒性与纯药紫杉醇的细胞毒性接近,具有良好的抗癌效果.

2.5 共聚焦显微镜检测细胞摄取纳米粒子

图 6 是经过荧光标记的 DPBA/PTX@PEG-PDLLA 处理 MCF-7 细胞的 CLSM 显微照片.先将 MCF-7 细胞在生理环境下用 5 μg/mL 的 DPBA/PTX@PEG-PDLLA 纳米粒子共培养 4 h,然后用细胞核染料 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)对细胞核染色 10 min.

图 6(A)中蓝色部分显示用 DAPI 标记的 MCF-7 细胞的细胞核.从图 6(B)和(C)中可以看到,在细胞质内发光强烈的红色荧光,说明 DPBA/PTX@PEG-PDLLA 纳米粒子已经被 MCF-7 细胞摄取且多聚集于细胞质中.通过细胞形态的观察发现,DPBA/PTX@PEG-PDLLA 纳米粒子通过内吞形式进入到 MCF-7 细胞内部,形成内含体;随着内含体的破裂,其中包裹的纳米粒子分散到细胞质中,呈现出红色发光.随后 PTX 从聚合物载体上解离和释放,纳米粒子停留在细胞质中,PTX 进入细胞核,与基因发生作用.

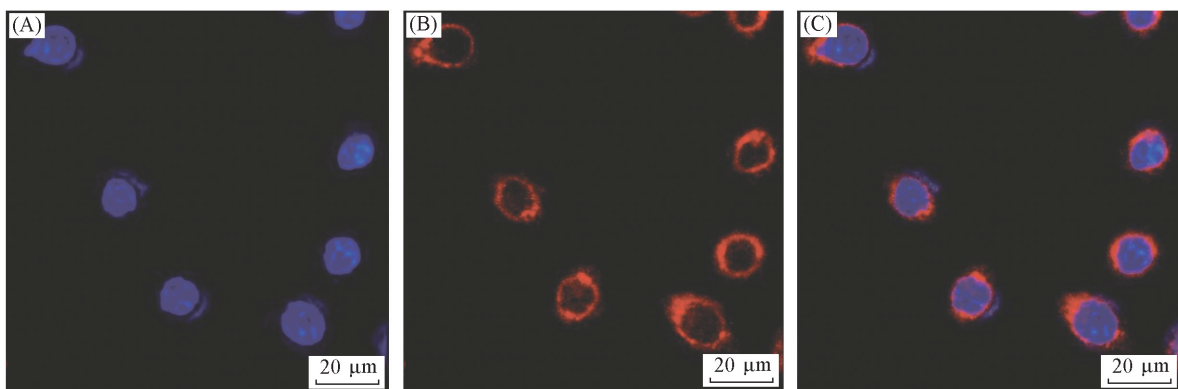


Fig.6 Confocal microscopy images of MCF-7 cells stained with DAPI(10 $\mu\text{g/mL}$) and DPBA/PTX@PEG-PDLLA nanoparticles(5 $\mu\text{g/mL}$)

(A) Channel blue: fluorescent nucleus imaging stained with DAPI, excitation wavelength: 405 nm, scan range: 425—490 nm; (B) Channel red: fluorescent cytoplasm imaging stained with nanoparticles, excitation wavelength: 488 nm, scan range: 610—670 nm; (C) Overlay imaging of (A) and (B).

3 结 论

利用两亲性聚合物 PEG-PDLLA 共包覆红光染料 DPBA 与紫杉醇, 制备了载药荧光纳米粒子 DPBA/PTX@PEG-PDLLA, 实现了高效红光发光和药物释放功能的集成. DPBA/PTX@PEG-PDLLA 纳米粒子可以发出强的红光(654 nm), 与紫杉醇复合后其荧光量子效率可达 25%. DPBA/PTX@PEG-PDLLA 纳米粒子具有一定的药物缓释能力, 在 pH=7.4 的 PBS 缓冲溶液中, 48 h 累积释药量可达 25.1%. 在 pH=5.0 的 PBS 缓冲溶液中 48 h 累积释药量可达 38.88%. 体外 MTT 和 CLSM 实验结果表明, DPBA/PTX@PEG-PDLLA 纳米粒子不仅对肿瘤细胞增殖具有较好的抑制能力, 而且还可以对 MCF-7 肿瘤细胞的细胞质成像. 因此, 集荧光和载药功能于一身的 DPBA/PTX@PEG-PDLLA 纳米粒子在生命科学和医学领域具有良好的应用前景.

支持信息见 <http://www.cjcu.jlu.edu.cn/CN/10.7503/cjcu20170120>.

参 考 文 献

- [1] Dharap S. S., Wang Y., Chandna P., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2005**, 102(36), 12962—12967
- [2] Schally A. V., Nagy A., Trends E., *J. MeTab.*, **2004**, 15(7), 300—310
- [3] Hu Y., Jiang X., Ding Y., *Biomaterials*, **2003**, 24(13), 2395—2404
- [4] Zang Z. Q., Geng H. R., Xuan R. F., Chen M. M., Chen H., Liu A. H., *Chem. J. Chinese Universities*, **2014**, 35(7), 1509—1514(张卓琦, 耿浩然, 宣瑞飞, 陈敏敏, 陈摇辉, 刘爱辉, 曹希传. 高等学校化学学报, **2014**, 35(7), 1509—1514)
- [5] Lu J., Liang M., Zink J. I., Tamanoi F., *Small*, **2007**, 3, 1341—1346
- [6] Hu X. L., Li J., Lin W. H., Huang Y. B., Jing X. B., Xie Z. G., *RSC Advances*, **2014**, 4(72), 38405—38411
- [7] Wu D., Zheng Y. H., Hu X. L., Fan Z. M., Jing X. B., *Mat. Sci. Eng. C: Mater.*, **2015**, 53, 68—75
- [8] Wang H., Zhang C., Zhang L. H., Liu L. X., Zheng Y., Zhu D. W., *Chem. J. Chinese Universities*, **2014**, 35(10), 2239—2245(王海, 张超, 张琳华, 刘兰霞, 郑义, 朱敦皖. 高等学校化学学报, **2014**, 35(10), 2239—2245)
- [9] Tian Y., Mao S., *Expert. Opin. Drug Deliv.*, **2012**, 9(6), 687—700
- [10] Yan L. L., Zhang Y., Xu B., Tian W. J., *Nanoscale*, **2015**, 8(5), 2471—2487
- [11] Felice B., Prabhakaran M. P., Rodriguez A. P., Ramakrishna S., *Mat. Sci. Eng. C: Mater.*, **2014**, 41, 178—195
- [12] Ji G., Yan L. L., Wang H., Ma L., Xu B., Tian W. J., *J. Acta Chim. Sinica*, **2016**, (11), 917—922
- [13] Qiu X. H., Ouyang D., Cao H., Zhou Y. Q., *Chem. J. Chinese Universities*, **2000**, 21(3), 415—416(邱晓航, 欧阳砥, 巢晖, 周永治. 高等学校化学学报, **2000**, 21(3), 415—416)
- [14] Zhang X. F., Li Y. X., Chen X. S., *Biomaterials*, **2005**, 26(14), 2121—2128
- [15] Han H. L., Jin S. Z., Miao Z., Chen P., Wang Z. F., Xie Z. G., *Chem. J. Chinese Universities*, **2016**, 37(4), 661—668(韩海玲, 金

顺子, 苗壮, 陈平, 王占峰, 谢志刚. 高等学校化学学报, **2016**, 37(4), 661—668)

- [16] Wang Z. F., Luo Y. N., Zheng Y. H., Han H. L., Hong X. Y., Jing X. B., *Chem. J. Chinese Universities*, **2008**, 29(8), 1671—1676 (王占峰, 罗毅男, 郑勇辉, 韩海玲, 洪新雨, 景遐斌. 高等学校化学学报, **2008**, 29(8), 1671—1676)
- [17] Baimark Y., Srisaard M., *J. Appl. Polym. Sci.*, **2012**, 124(5), 3871—3878
- [18] Valencia P. M., Hanewich-Hollatz M. H., Gao W. W., Karim F., Langer R., Karnik R., Farokhzad O. C., *Biomaterials*, **2011**, 32(26), 6226—6233
- [19] Kumar R., Chen M. H., Parmar V. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126(34), 10640—10644
- [20] Yan L. L., Zhang Y., Guang J., Lian M., Chen J. L., Xu B., Tian W. J., *RSC Advances*, **2016**, 6, 65426—65433
- [21] Mantulin W. W., Huber J. R., *Photochemistry and Photobiology*, **1973**, 17(2), 139—143

Fabrication of Drug Loaded Fluorescent Nanoparticles and Its Biological Application in MCF-7 Breast Cancer Cell[†]

ZHANG Haipeng¹, HAN Bing¹, JIA Zhizhen³, DING Rongbo¹,
XU Bin², XU Weiqing², FAN Zhimin^{1*}

(1. The First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China;

2. State Key Laboratory for Supramolecular Structure and Materials, Jilin University, Changchun 130012, China;

3. College of Computer Science and Information Technology, Northeast Normal University, Changchun 130117, China)

Abstract Drug-loaded fluorescent nanoparticles(DPBA/PTX@PEG-PDLLA) were prepared by amphiphilic polymers(PEG-PDLLA) coated with AIE dyes (DPBA) and paclitaxel(PTX). The effects of capacity of DPBA and PTX on the photophysical properties of nanoparticles were investigated. In addition, the drug release *in vitro* of nanoparticles as well as the inhibitory effect of nanoparticles on breast cancer MCF-7 cells were investigated. Moreover, the nanoparticle uptake of MCF-7 cells was observed. As conclusion, the DPBA/PTX@PEG-PDLLA nanoparticles exhibit strong red emission(654 nm) with high fluorescence quantum yield up to 25%. The nanoparticles have uniform size and good biocompatibility. The freshly prepared nanoparticles have pretty drug release ability, and the cumulative release rate of 48 h can reach 25.1%. The results of *in vitro* MTT and CLSM experiments show that DPBA/PTX@PEG-PDLLA nanoparticles not only have good inhibiting ability with the cell proliferation of MCF-7 tumor cells, but also can be uptake by tumor cell and then absorbed by their cytoplasmic fluorescence imaging.

Keywords Drug loaded fluorescent nanoparticles; Self-assembly; Drug release; Bioimaging; Paclitaxel

(Ed.: D, Z)

[†] Supported by the Natural Science Foundation of Jilin Province Science and Technology Department, China(No.20150101205JC), the Jilin University Bethune Scientific Research Support Plan, China(No.2013205023) and the Youth Foundation of the First Hospital of Jilin University, China(No.JDYY72016040).