

## 摘要

5-氟尿嘧啶 (5-FU) 是目前临床上最常用的抗癌药物之一, 在癌症的治疗中发挥着重要作用, 但因其存在体内吸收不规则、生物半衰期短、选择性差以及毒副作用大等问题, 严重影响它在临床上的应用。为了实现对癌细胞具有靶向、药物输送的可视化、提高 5-FU 的疗效降低毒副作用, 本研究设计了新型的 5-FU 纳米粒, 以制备的荧光产率高、生物相容性好的红色荧光碳点为载体, 负载化疗药物 5-FU, 得到可视踪的肝癌靶向缓释 5-FU 纳米粒, 并通过体内外成像研究并分析了该纳米粒在微观细胞水平的动力学行为以及抗肿瘤作用。

本课题主要研究内容如下:

1. 首先采用水热法制备了氮和硼掺杂的表面功能化红色荧光碳点 (R-CDs), 以 R-CDs 为载体与化疗药物 5-FU 通过氢键成功负载, 得到 CDs/5-FU 纳米粒, 然后通过酰胺反应在 R-CDs 表面连接聚乙二醇 (PEG) 和靶向分子乳糖酸 (LA) 制备 LPC/5-FU 纳米粒。通过激光粒度仪、透射电子显微镜 (TEM)、傅里叶变换红外光谱仪 (FT-IR)、紫外分光光度计 (UV)、X 射线粉末衍射仪 (XRD)、荧光分光光度计等仪器对其进行表征。结果表明: 荧光光谱显示制备的 R-CDs 激发波长在 540 nm 处且具有激发依赖性, 光照时间、pH 稳定性良好, 计算得到掺杂的红色碳点量子产率高达 23.8%; 通过 TEM 和激光粒度仪制备的 LPC/5-FU 形貌呈球形或类球形, 粒径均一且稳定性良好; 红外光谱图、XRD 和 TGA 图谱证明了 LPC/5-FU 的成功制备。

2. 通过高效液相色谱法建立了 5-FU 含量测定的方法, 对该方法进行方法学研究, 用于测定 LPC/5-FU 纳米粒的药物负载量和包封率。结果表明: 该方法具有专属性高、精密度佳和重复性好的特点, 保留时间约 3 min, 可用于快速检测 5-FU。在 25  $\mu\text{g/mL}$ -200  $\mu\text{g/mL}$  浓度范围内有良好的线性关系。制备出的载药纳米粒的包封率为 76.4%, 负载量为 37.6%。

3. 对 LPC/5-FU 纳米粒进行体外释放研究和体外安全性评价实验, 体外释放结果表明: 游离药 5-FU 在 4 h 内已基本释放完全, 释放量为 95.7%; LPC/5-FU 中 5-FU 释放量随释放介质 pH 值的降低而增加, 在 pH 5.5 的 PBS 缓冲溶液中释放速度最快, 释放量最高, 达到了 87.7%, 说明所制备的载药纳米粒在酸性缓冲溶液中分子间作用力减弱, 会

使其更持续高效的释放药物，在一定程度上达到了缓释、延长药效的效果。通过溶血实验评价 R-CDs 和 LPC/5-FU 体外安全性，结果表明：R-CDs 和 LPC/5-FU 具有良好的生物相容性，安全性良好。MTT 实验结果表明:LPC/5-FU 纳米粒对正常肝细胞（7702）的毒性远低于游离药 5-FU，原因可能是 LPC/5-FU 纳米粒表面的 LA 分子需特异性识别去唾液酸糖蛋白受体（ASGPR）发挥作用，正常肝细胞表面受体较少，因此对 7702 细胞毒性较弱。游离 5-FU 和 LPC/5-FU 纳米粒对两种肝癌细胞（HepG2、SUN-739）的抑制作用均呈浓度依赖性和时间依赖性：随着作用时间的延长，LPC/5-FU 纳米粒中 5-FU 逐渐释放完全，LPC/5-FU 纳米粒可以达到和游离 5-FU 相当的抑制作用。

4.通过倒置荧光显微镜和活体成像仪对制备得到的红色碳点 R-CDs 和 LPC/5-FU 纳米粒进行体内外成像，荧光显微镜成功观察到 R-CDs 和 LPC/5-FU 纳米粒在 HepG2 的细胞质中发出红色荧光，细胞呈时间依赖性摄取 R-CDs 和 LPC/5-FU 纳米粒。选用昆明雌性小鼠尾静脉注射 LPC/5-FU 纳米粒进行活体成像，可观察 R-CDs 和 LPC/5-FU 纳米粒在体内的分布，实验结果表明以 R-CDs 为载体制备的 LPC/5-FU 可实现药物示踪，为该纳米粒细胞动力学行为的研究提供指导。

5.以肝癌细胞 HepG2 为实验对象，首先建立测定细胞内 5-FU 含量的高效液相方法，其次对细胞摄取机制、细胞动力学行为进行研究。以不同时间、不同摄取抑制剂研究 LPC/5-FU 进入细胞途径。结果：细胞摄取 LPC/5-FU 呈能量依赖性且主要是由网格蛋白（clathrin）参与介导的细胞内吞。以高效液相色谱法测定细胞内 5-FU 含量并进行细胞动力学研究，按照药物动力学单室模型和统计矩计算，结果表明：与对照制剂 5-FU、LC/5-FU 相比，LPC/5-FU 纳米粒的半衰期延长，在细胞内滞留时间更长，细胞动力学行为得到改善，这可能是 LPC/5-FU 毒副作用低、体外抗肿瘤效果好的原因。以昆明雌性小鼠建立荷瘤小鼠模型，对 5-FU 和 LPC/5-FU 纳米粒进行体内药效评价。结果：制备的纳米粒在体内有良好的抗肿瘤效果。

综上所述，本研究成功制备了氮硼掺杂的红色荧光碳点 R-CDs 以及 LPC/5-FU 荧光纳米粒，经验证以 R-CDs 制备的荧光纳米粒是生物成像和药物递送的优异载体材料、可降低 5-FU 毒副作用、改善细胞动力学行为以及提高药物在体内外的抗肿瘤效果。

**关键词：**氮硼掺杂红色荧光碳点，5-FU，生物成像，细胞动力学

# 目 录

摘 要.....	I
ABSTRACT.....	III
第一章 绪论.....	1
1.1 肝癌的研究现状.....	1
1.2 5-氟尿嘧啶的研究现状.....	1
1.3 碳点的研究现状.....	2
1.3.1 荧光纳米粒子.....	2
1.3.2 碳点.....	2
1.3.3 碳点结构和分类.....	2
1.3.4 碳点性质.....	3
1.3.5 碳点的制备.....	4
1.4 碳点作为载体在生物学中的应用.....	5
1.4.1 碳点在药物递送中的应用.....	5
1.4.2 碳点在生物成像中的应用.....	6
1.5 细胞动力学的研究现状.....	8
1.6 选题依据和研究内容.....	9
第二章 R-CDS 和 LPC/5-FU 的制备与表征.....	11
2.1 实验仪器及试剂.....	11
2.1.1 实验试剂.....	11
2.1.2 实验仪器.....	11
2.2 R-CDs、LPC/5-FU 的制备与表征.....	12
2.2.1 R-CDs 制备.....	12
2.2.2 LPC/5-FU 的制备.....	12
2.2.3 R-CDs 以及 LPC/5-FU 的表征.....	12
2.2.4 实验结果与讨论.....	14

2.5 本章小结 .....	20
<b>第三章 LPC/5-FU 纳米粒含量测定方法的建立 .....</b>	<b>21</b>
3.1 实验仪器及试剂 .....	21
3.1.1 实验仪器 .....	21
3.1.2 实验试剂 .....	21
3.2 实验方法与结果 .....	22
3.2.1 实验方法 .....	22
3.2.2 实验结果 .....	23
3.3 LPC/5-FU 负载以及包封率的测定 .....	26
3.3.1 LPC/5-FU 负载以及包封率测定方法 .....	26
3.3.2 LPC/5-FU 负载以及包封率测定结果 .....	27
3.4 本章小结 .....	27
<b>第四章 LPC/5-FU 纳米粒体外释放和体外安全性评价研究 .....</b>	<b>29</b>
4.1 实验仪器及试剂 .....	29
4.1.1 实验仪器 .....	29
4.1.2 实验试剂 .....	29
4.2 实验方法 .....	30
4.2.1 5-FU、LPC/5-FU 的体外释放行为考察 .....	30
4.2.2 溶血性实验 .....	30
4.2.3 细胞毒性试验 .....	31
4.3 实验结果 .....	31
4.3.1 5-FU、LPC/5-FU 的体外释放实验结果 .....	31
4.3.2 溶血性实验结果 .....	32
4.3.3 细胞毒性试验 .....	33
4.4 本章小结 .....	35
<b>第五章 LPC/5-FU 纳米粒的生物成像 .....</b>	<b>37</b>
5.1 实验仪器与试剂 .....	37
5.1.1 实验仪器 .....	37
5.1.2 实验试剂 .....	37

5.2 实验部分 .....	37
5.2.1 R-CDs、LPC/5-FU 细胞成像 .....	37
5.2.2 R-CDs、LPC/5-FU 的小鼠活体成像 .....	38
5.3 结果与讨论 .....	38
5.3.1 R-CDs 和 LPC/5-FU 细胞成像 .....	38
5.3.2 R-CDs 和 LPC/5-FU 的小鼠活体成像 .....	41
5.4 本章小结 .....	41
<b>第六章 LPC/5-FU 纳米粒的细胞动力学研究 .....</b>	<b>43</b>
6.1 实验仪器及试剂 .....	43
6.1.1 实验仪器 .....	43
6.2.2 实验试剂 .....	43
6.2 细胞内 5-FU 含量测定 .....	44
6.2.1 空白细胞液的制备 .....	44
6.2.2 标准溶液的配制 .....	44
6.2.3 内标 5-溴尿嘧啶溶液的配制 .....	44
6.2.4 细胞样品的处理 .....	44
6.2.5 细胞内 5-FU 含量测定方法的建立 .....	44
6.3 细胞内 5-FU 载药纳米粒摄取和消除动力学研究 .....	45
6.3.1 LPC/5-FU 的细胞摄取实验 .....	45
6.3.2 LPC/5-FU 的细胞消除实验 .....	47
6.3.3 LPC/5-FU 的体内抗肿瘤实验 .....	47
6.4 实验结果与讨论 .....	47
6.4.1 细胞内 5-FU 含量测定方法的建立 .....	47
6.4.2 LPC/5-FU 的细胞摄取实验 .....	50
6.4.3 LPC/5-FU 的细胞消除实验 .....	53
6.4.4 LPC/5-FU 的体内抗肿瘤实验结果 .....	55
6.5 本章小结 .....	56
<b>全文总结 .....</b>	<b>57</b>
<b>参考文献 .....</b>	<b>59</b>

致 谢..... 67

## 第一章 绪论

### 1.1 肝癌的研究现状

肝癌是全世界最常见也是最难治疗的癌症之一，每年几乎有近 100 万人死亡，是全球与癌症相关的第三大死亡原因<sup>[1-3]</sup>。肝癌的发病机制很复杂，早期症状并不明显<sup>[4]</sup>，一旦发现，肿瘤很可能处于中晚期。化学治疗仍是目前最常见的治疗方法之一，临床用于治疗肝癌的化疗药有紫杉醇<sup>[5,6]</sup>、奥沙利铂<sup>[7,8]</sup>、5-氟尿嘧啶<sup>[9-13]</sup>等，但这些化疗药物有很大的毒副作用，体内半衰期短、无靶向能力，限制了其临床应用<sup>[14-25]</sup>。因此改善化疗药物性能成了研究者们亟待解决的关键。随着现代生物医学的发展，纳米医学中的纳米载药系统成为闪耀之星<sup>[26-29]</sup>，可降低药物毒性、改善药物性能、实现靶向和缓控释释放药物，向肿瘤输送足够的药物，也可改善药物动力学行为和增强特异性<sup>[30]</sup>，为癌症治疗提供了新的契机<sup>[31,32]</sup>。

### 1.2 5-氟尿嘧啶的研究现状

5-氟尿嘧啶 (5-FU) 是嘧啶类的抗代谢药物，广泛用于治疗恶性肿瘤<sup>[33]</sup>，目前临床常用于乳腺癌<sup>[34,35]</sup>、消化道癌<sup>[36-38]</sup>、肝癌<sup>[39,40]</sup>等，但其在体内半衰期短、毒副作用大、选择性差，在临床应用上受限<sup>[41-45]</sup>。随着生物医药领域的飞速发展，通过制备纳米载药体系来改善药物的疗效、降低药物毒性已成为发展趋势<sup>[46]</sup>。近年来，5-FU 通过化学改性或者制备成新型的纳米载药体系来降低药物毒副作用，延长半衰期的研究越来越多<sup>[47-50]</sup>。如 Dai<sup>[51]</sup>课题组选用生物相容性高且具有靶向性的壳聚糖分子 (CS) 和生物素 (Bio) 材料，制备生物素修饰的壳聚糖 (Bio-CS)，最终优化得到具有双靶向的叶酸修饰的生物素化壳聚糖 (FA-CS-Bio)，制备的 FA-CS-Bio 包裹 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 得到 FA-CS-Bio/5-氟尿嘧啶 (5-FU) 纳米体系，经过一系列的体内外的实验验证制备的纳米载药体系，是可以提高靶向抑制肝癌细胞增殖和迁移的缓释纳米粒子。Harisa<sup>[52]</sup>等人，用纳米红细胞膜 (NEs) 为载体来靶向肝细胞，制备成负载有 5-FU 的壳聚糖包覆的聚 (丙交酯-共-羟基乙酸) 纳米粒子 (5-FU-C-NPs-NEs)，该纳米粒子载药量和包封率良好，体外释放实验也显示了缓释时间高达 72 h，与对照组制剂相比，药物的药代动力学和生物分布得

到改善，最终结果表明 5-FU-C-NPs-NEs 可用于递送 5-FU 并增强其对肝癌的靶向性。

## 1.3 碳点的研究现状

### 1.3.1 荧光纳米粒子

目前，荧光纳米粒子主要有无机发光量子点、荧光高分子纳米微球、复合荧光二氧化硅纳米粒子三大类。荧光纳米粒子由于兼备递送药物和细胞成像的功能而具有诱人的前景。然而，一些基于荧光纳米粒子的载药系统尺寸较大、水溶性不好、细胞毒性高、生物相容性低和荧光性质差等缺陷，限制了其在癌症治疗中的应用。碳点是新型荧光纳米材料中的后起之秀，展现出粒径小且均一、荧光量子产率高和表面功能化等独特优势，迅速在荧光纳米粒子中脱颖而出，并能在一定程度上克服传统的有机荧光染料亮度低、稳定性差的缺陷。通过碳点创建新型的纳米载药系统可建立可视化分析方法，利用碳点荧光稳定性良好的优势进行生物成像以及监测药物分布。

### 1.3.2 碳点

碳点 (carbon dots, CDs) 是尺寸在 10 nm 左右的新颖荧光碳纳米微粒，具有荧光稳定性高、良好的水溶性、生物相容性高、制备原料丰富且低廉、表面易于修饰等优良性质<sup>[53,54]</sup>，其骨架主要是  $sp^2$  杂化碳和部分  $sp^3$  杂化碳，结构为单层或多层石墨，或者为聚合物类的聚集颗粒<sup>[55]</sup>。表面含有丰富的羟基、羧基、氨基等官能团或者有机聚合物。碳点最早发现于 2004 年，是由 Xu 等人通过电弧放电制备单壁纳米管 (SWNTs)，实验过程中意外发现了可以发出荧光的荧光碳素<sup>[56]</sup>，随即在 2006 年，Clemson University 的 Ya-Ping Sun 等人发现了量子大小的碳类似物，并对经过简单表面钝化的碳纳米粒子首次命名为“碳点”<sup>[57]</sup>。

### 1.3.3 碳点结构和分类

CDs 的结构一直以来都存在争议，有研究者提出是类似石墨非晶态的碳基质<sup>[58]</sup>或结晶的核心，也有研究者提出了纯  $sp^3$  碳的非晶形核心或  $sp^3$ :  $sp^2$  不同比例碳的核心<sup>[59, 60]</sup>。无论何种假设，其内部的杂化碳结构和有机状表面都决定了碳点的特性。碳点的分类如图 1-1，主要分为石墨烯量子点 (GQD)、碳纳米点 (CND) 和聚合物点 (PD)。GQD 结构存在一层或多个石墨烯层和组合的化学基团，是准零碳纳米点；CND 具有球形结构，PD 通常由未偶联聚合物通过脱水或部分碳结合交联聚集体形成。元素组成主要



为 C，并同时含有 H、O 等基本元素，也可以通过不同的途径，例如选用不同原料和实验方法，掺杂 N、S、P 等一些元素<sup>[61,62]</sup>。有研究证明杂原子引入到碳点中，可以改变碳原子的电荷分布和供电子性质，也可提高碳点的荧光量子产率（QY），拓展碳点的应用领域<sup>[63, 64]</sup>。

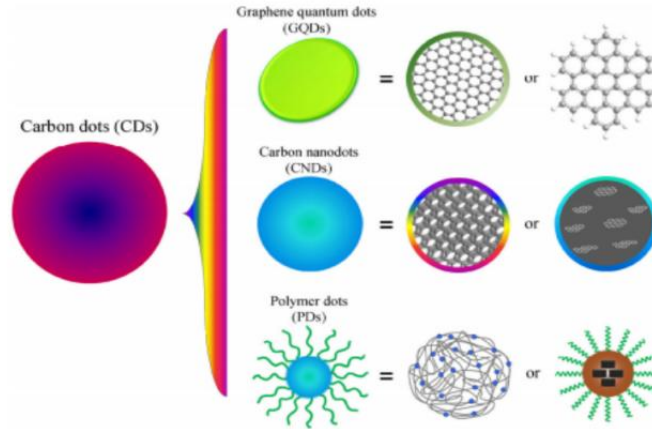


图 1-1 荧光碳点的结构类型

Figure 1-1 The types of fluorescent CDs<sup>[3]</sup>。

### 1.3.4 碳点性质

CDs 的特异性优势主要在其光学性质，这一光学特性使学者不断将研究的目光投向于更多未知的领域，同时加快了碳点在生物分析和生物成像方面中的应用，其光学特性主要包括紫外吸收、光致发光和上转换荧光<sup>[66]</sup>。

#### (1) 紫外吸收

不同条件制备得到的不同 CDs 紫外吸收波谱也不相同，但有一个明显的特征是在紫外光区（230 nm-320 nm）有强烈的吸收峰，并且可一直延伸至可见光区域（400 nm-700 nm）。在此区域呈现出荧光最大发射波长，并且 CDs 的发射波长会随着激发波长的增加有所改变，研究表明，不同分子对 CDs 表面的钝化可能导致 CDs 的吸收向更长的波长移动，从而产生了多发射荧光 CDs，表现出 CDs 独有的激发波长依赖性光学特征<sup>[67]</sup>。另外，CDs 的吸收光谱会出现吸收肩，分析可能是 CDs 内部大的  $sp^2$  共轭中 C=C 键的  $\pi \rightarrow \pi^*$  跃迁和 C=O 键的  $n \rightarrow \pi^*$  跃迁引起的。

#### (2) 光致发光 (PL)

CDs 作为一种新型的纳米材料，其突出的光致发光特性是研究的热点。目前光致发光的确切机理尚不明确，但一般认为它与 CDs 的表面缺陷状态和带隙跃迁有关。此外，

由于 CDs 表面存在发射陷阱，没有杂原子的 CDs 的 QY 低于表面钝化的 CDs 的 QY。通常表面钝化是提高亮度的常用方法<sup>[68-71]</sup>。

### (3) 上转换荧光(UCPL)

斯托克斯定律认为，物质只激发高能量的光，从而产生低能量的光。也就是说，短波长和高频光可以激发长波长和低频光，但后来发现，一些材料实现的荧光效果与上述定律正好相反，此现象称为反斯托克斯定律也叫上转化荧光。CDs 有时可展现上转换荧光特性，目前对 CDs 性质的机理尚不明确。但有科学家认为，CDs 可以同时吸收两个或多个光子，这使得它们能够吸收比激发波长短的光，并产生上转换荧光。该性质可以在实验中通过调整激发波长或粒径大小来选择不同的发射波长以满足光学标记和荧光图像需要。另外，在高效催化剂设计、生物科学和能源技术等方面也都有很好的应用前景和发展<sup>[72,73]</sup>。

## 1.3.5 碳点的制备

CDs 一经发现以来，研究者在制备方法上做了大量的工作。一般来讲，可以概括为两类：自上而下法 (Top – down) 和自下而上法 (Bottom-up)<sup>[74]</sup>。

### (1) 自上而下法

自上而下法是指将石墨、石墨烯、碳纳米管、炭黑、煤等较大的碳材料打碎成碎片制备而成，主要方法包括电弧放电法、激光刻蚀法、电化学氧化法、化学氧化法等<sup>[75-78]</sup>，结果如表 1-1，但以上方法的处理过程大多比较繁杂，生产设备高昂，制备产率低，且产生较多的废液，后续处理步骤繁琐，不利于大规模生产和实际应用。

表 1-1 碳点的制备方法及其特点总结

Table 1-1 Summary of preparation methods and characteristics of CDs

制备方法	原料	设备	反应条件	优点	缺点	
自上而下法	激光刻蚀法	碳靶	激光器	高温水蒸气、载气为氩气	原料廉价	步骤繁琐
	电化学氧化法	碳纳米管	电解池	离子液、通电	操作简单	污染环境
	电弧放电法	碳靶	弧光放电设备	电弧放电	量子产率较好	纯化步骤复杂

### (2) 自下而上法

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/107026100123010005>