

研究快报

# 新型竹红菌甲素水溶性纳米二氧化硅载体的制备激光敏活性研究

赵传峰, 周 林, 马 菲, 王 薇, 唐 静, 冯玉英, 周家宏

(南京师范大学化学与环境科学学院, 江苏省生物医药功能材料工程研究中心, 江苏 南京 210046)

[关键词] 竹红菌甲素, 纳米二氧化硅, 水溶性, 单线态氧量子产率

[中图分类号] O657 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2010)04-0177-04

竹红菌 (*hypocrella bambusae*) 系子囊菌纲肉座菌科竹寄生真菌, 从竹红菌中提取出的竹红菌甲素 (Hypocrellin A) 是我国首次发现并应用于临床的新型光敏剂药物. 竹红菌甲素系 3, 10-二羟基-4, 9-萘醌类化合物 (图 1), 广泛用于治疗各种皮肤病<sup>[1]</sup>. 由于它在光敏条件下能产生各种活性氧尤其是单线态氧, 对癌细胞具有明显的抑制作用<sup>[2, 3]</sup>而具有良好的抗癌活性, 引起国内外研究者的重视.

作为抗癌光疗药物而言, 天然的竹红菌素均属于亲脂性化合物, 水溶性很差, 因而极易在极性溶剂和血液中自发聚集而形成毛细血管的栓塞, 因此难以直接静脉给药<sup>[4]</sup>.

具有核壳结构的纳米二氧化硅颗粒是一种新型的药物载体, 特别适合作为包裹光动力疗法领域中的光敏剂<sup>[5, 6]</sup>. 与先前的药物载体相比, 该类载体具有制备方法简单, 对环境及温度要求低, 水溶液中稳定的优点<sup>[7, 8]</sup>. 另外, 由于纳米二氧化硅具有硬性的核壳结构, 这使得被注射到人体内的竹红菌甲素只能存在于其核壳内, 不会被释放出来. 因此该类药物载体可以有效避免竹红菌素的释放造成的血管栓塞, 但光照激发后产生的活性氧物质却可以通过载体表面微孔自由扩散出载体进而发挥光动力疗效<sup>[9]</sup>.

本文中, 我们通过微乳液法合成一种包裹竹红菌甲素的纳米二氧化硅载体, 该载体有效地改善了竹红菌甲素的水溶性, 与单体竹红菌甲素相比, 包裹后的竹红菌甲素荧光强度及单线态氧量子产率明显增强.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂

氨丙基三乙氧基硅烷 (APTES 99%) 及乙烯基三乙氧基硅烷 (TEVS 97%) 购自 Acros Organics 公司, Triton X-100 购自 Amresco 公司, 9, 10-二苯基蒽丙酸购自 Sigma 公司, N, N-二甲基甲酰胺 (DMF) 及正己醇均为国产分析纯, 水为超纯去离子水. 9, 10-二苯基蒽丙酸使用前制备成浓度为 5.5 mM 的 9, 10-二苯基蒽丙酸钠盐 (ADPA) 水溶液. 竹红菌甲素由中国科学院理化技术研究所制备, 纯度在 96% 以上, 使用前用丙酮重结晶后以 DMF 配制成 15 mmol/L 母液避光保存.

### 1.2 仪器

HITACHI-7650 型高分辨透射电子显微镜, Varian 公司 Cary5000 型紫外可见光谱仪, Varian 公司 Cary Eclipse 型荧光光谱仪. 所有的实验均在室温避光条件下进行.

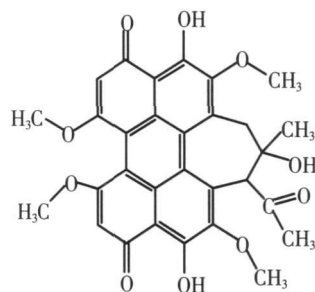


图 1 竹红菌甲素分子结构

Fig.1 Molecular structure of Hypocrellin A

收稿日期: 2010-03-20

基金项目: 国家自然科学基金 (20603018).

通讯联系人: 周家宏, 博士后, 副教授, 研究方向: 光化学与功能材料. E-mail: zhoujiahong@njnu.edu.cn

1.3 包裹竹红菌甲素的纳米二氧化硅载体的制备

包裹竹红菌甲素的纳米粒子是在 Triton X-100 正己醇 / 水的非极性核心形成的. 实验中在磁力搅拌器搅拌状态下依次溶解 0.64 g Triton X-100 800 μL 正己醇、60 μL 竹红菌甲素的 DMF 母液 ( 15 mmol/L ) 于 20 mL 超纯去离子水中, 拌澄清后加入 200 μL TEVS, 反应 1 h 后加入 10 μL APTES 反应 20 h 后将样品用截断分子量为 12~14 kD 的透析袋对水透析 72 h 以除去 Triton X-100 和正己醇. 作为实验对照的竹红菌甲素 /DMF 水溶液是将 60 μL 竹红菌甲素的 DMF 母液 ( 15 mmol/L ) 溶解于与包裹样品等体积的去离子水中.

1.4 纳米二氧化硅载体包裹的竹红菌甲素理化性质研究

使用透射电子显微镜研究纳米颗粒粒径及单分散性. 检测过程中对照品使用竹红菌甲素 /DMF 水溶液, 并通过比较包裹竹红菌甲素的二氧化硅纳米粒子与对照品的紫外-可见光谱 ( 350~800 nm ) 及荧光光谱 ( 激发波长为 480 nm ) 判定包裹是否成功.

1.5 光谱学方法检测单线态氧

每 3 mL 样品加入 100 μL 5.5 mmol/L 的单线态氧捕捉剂 ADPA, 470 nm 滤光片截断光源条件下光照, 每隔 30 s 检测一次紫外光谱, 通过紫外光谱 379 nm 处 ( ADPA 特征峰 ) 的变化规律, 计算包裹前后 ADPA 猝灭相关速率常数 *k* 及竹红菌甲素的单线态氧量子产率.

2 结果与讨论

2.1 纳米颗粒粒径分析

从图 2 中可见包裹竹红菌甲素的纳米二氧化硅粒子的粒径大约为 20~30 nm, 单分散性质良好.

2.2 光谱性质研究

从图 3 可以看出, 纳米二氧化硅载体包裹的竹红菌甲素与竹红菌甲素 /DMF 水溶液在 350~800 nm 范围内都有 3 个吸收峰. 纳米二氧化硅载体包裹的竹红菌甲素在此范围内的吸收峰分别位于 584.549 及 467 nm 处, 竹红菌甲素 /DMF 水溶液在此范围内的吸收峰分别位于 592.544 及 480 nm, 包裹后峰位整体向短波长方向移动.

从包裹前后竹红菌甲素的荧光光谱 ( 见图 4 ) 中可见纳米二氧化硅载体包裹的竹红菌甲素在此范围内的荧光峰在 604.5 nm 处, 峰强为 233.13 竹红菌甲素 /DMF 水溶液在此范围内的吸收峰在 615.5 nm 处, 峰强为 16.53 由此可见包裹后样品的荧光峰位向短波长方向移动并且荧光强度明显增强, 这是因为竹红菌甲素完全暴露于水环境后荧光很快被水猝灭, 而包裹于纳米二氧化硅非极性核心的竹红菌甲素有效避免了与水的接触, 所以其具有很强的荧光<sup>[5]</sup>. 这也有力地证明了竹红菌甲素有效地包裹入纳米二氧化硅的载体内部.

2.3 单线态氧产生能力研究

单线态氧是光动力疗法中重要的活性氧成分, 所以在光敏剂研究中, 单线态氧的检测尤为重要. 从图 5 可见, 随光照时间的延长, ADPA 的特征峰逐渐降低, 这是因为 ADPA 与单线态氧生成内过氧化物 ADPAO<sub>2</sub><sup>[7,8]</sup>. 图 5A 和图 5B 分别是二氧化硅纳米粒包裹竹红菌甲素与竹红菌甲素 /DMF 水溶液对 ADPA 的光猝灭作用, 从图中可见包裹后竹红菌甲素对 ADPA 的猝灭能力明显增强, 即单线态氧的产生能力大幅增加, 这是因为水对竹红菌素的激发态有很强的猝灭作用, 而纳米二氧化硅硅壳可以减少竹红菌甲素与水分子的接触, 有效地保护竹红菌甲素的单重激发态<sup>[10]</sup>.

光照条件下, HA 与 ADPA 在水体系中发生如下反应 ( 1 ) ~ ( 4 ):

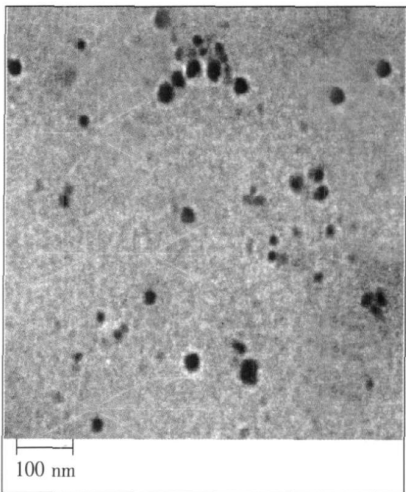


图 2 二氧化硅包裹竹红菌甲素纳米粒子透射电镜图  
Fig.2 The TEM image of HA embedded in silica nanoparticles

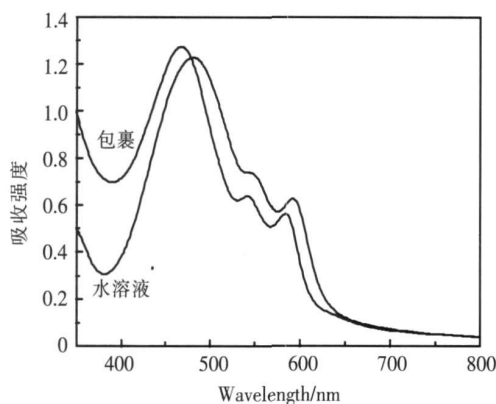


图3 二氧化硅包裹竹红菌甲素纳米粒子与竹红菌甲素/DMF 水溶液的紫外光谱比较

Fig.3 The comparison of absorption spectra of HA embedded in silica nanoparticles and HA/DMF in water

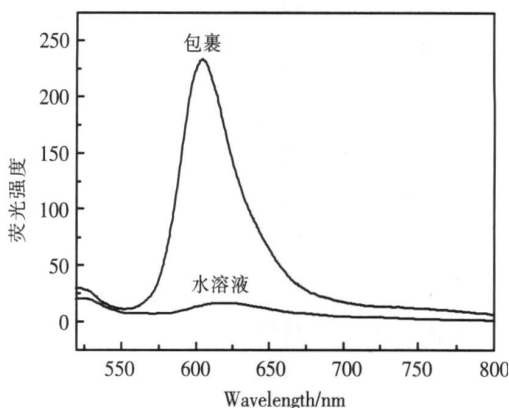


图4 二氧化硅包裹竹红菌甲素纳米粒子与竹红菌甲素/DMF 水溶液的荧光光谱比较

Fig.4 The comparison of fluorescence spectra of HA embedded in silica nanoparticles and HA/DMF in water

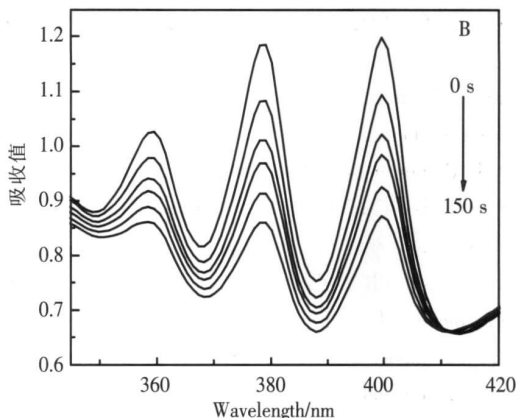
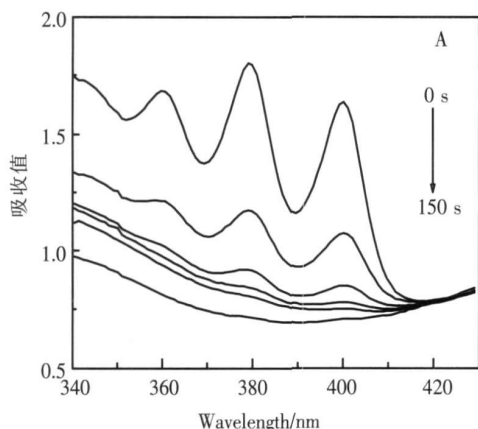
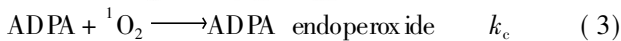


图5 纳米二氧化硅包裹竹红菌甲素(A)及竹红菌甲素/DMF 水溶液(B)单线态氧检测

Fig.5 The singlet oxygen detection of HA embedded in silica nanoparticles (A) and HA/DMF in water (B)



$k_a$ 是激发态的HA( $\text{HA}^*$ )被三线态氧猝灭产生单线态氧的速率常数,  $k_c$ 是ADPA存在下单线态氧( ${}^1\text{O}_2$ )的化学猝灭常数,  $k_d$ 是单线态氧衰变为其基态的速率常数. 通过公式(3)计算ADPA存在下单线态氧( ${}^1\text{O}_2$ )的化学猝灭常数, 那么与单线态氧反应的ADPA的量就可以通过以下方法计算:

$$-d[\text{ADPA}]/dt = k_c[\text{ADPA}][{}^1\text{O}_2].$$

因此, ADPA的衰变遵循一级反应动力学.

$$[\text{ADPA}]_t = [\text{ADPA}]_0 \exp(-kt), \quad (5)$$

$$\ln[\text{ADPA}]_t / [\text{ADPA}]_0 = -kt \quad (6)$$

设  $k = k_c[{}^1\text{O}_2] = \Phi_{{}^1\text{O}_2} I^{abs} k_c / k_d$ , 其中,  $\Phi_{{}^1\text{O}_2}$ 为对应样品的单线态氧量子产率. 因此, 相关速率常数  $k$ 就可以通过实验数据的线性关系获得<sup>[7, 8]</sup>.

通过公式(6)可以计算纳米二氧化硅包裹竹红菌甲素及竹红菌甲素/DMF水溶液猝灭ADPA的相关速率常数分别为  $3.56 \times 10^{-3} / \text{s}$  和  $1.54 \times 10^{-3} / \text{s}$ . 包裹后竹红菌甲素产生单线态氧的相关速率常数明显增大.

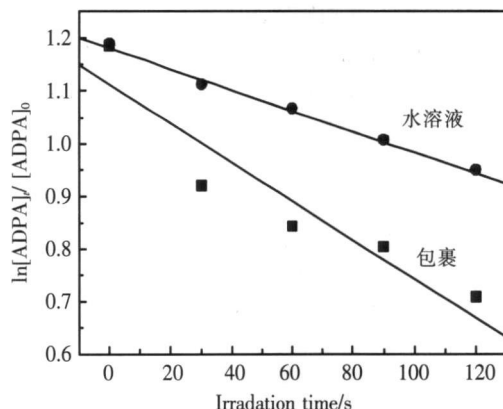


图6 纳米二氧化硅包裹竹红菌甲素(A)及竹红菌甲素/DMF 水溶液(B)单线态氧产生速率常数比较

Fig.6 Comparison of the singlet oxygen generation speed constant of HA embedded in silica nanoparticles and HA/DMF in water

### 3 结论

本文通过反向微乳液法合成了新型水溶性竹红菌甲素纳米二氧化硅载体, 该类载体粒径大约为 20~30 nm, 单分散性良好. 包裹后样品的荧光显著增强, 这为今后的细胞定位实验提供了必备条件. 包裹后, 作为光敏剂发挥光动力作用最主要的活性氧分子  $^1\text{O}_2$  的产生能力明显增强, 纳米二氧化硅包裹竹红菌甲素及竹红菌甲素 /DMF 水溶液猝灭 ADPA 的相关速率常数分别为  $3.56 \times 10^{-3} / \text{s}$  和  $1.54 \times 10^{-3} / \text{s}$ , 即包裹后竹红菌甲素产生单线态氧的相关速率常数明显增大. 以上结果预示该类纳米二氧化硅载体能有效推进竹红菌甲素在光动力疗法领域中的应用进程.

### [参考文献]

- [1] A ckroyd R, Brown N J, Davis M F, et al. Aminolevulinic acid induced photodynamic therapy in the treatment of dysplastic Barrett's oesophagus and adenocarcinoma [J]. *Laser in Medical Science*, 1999, 14(4): 275-278.
- [2] 夏盛钦. 新型竹红菌素光敏剂的合成及其光动力性质的研究 [D]. 北京: 中国科学院理化技术研究所, 2004.
- [3] Zhou L, Zhou JH, Dong C, et al. Water soluble hypocrellin A nanoparticles as a photodynamic therapy delivery system [J]. *Dyes and Pigments*, 2009, 82(1): 90-94.
- [4] Baba K, Pudavar H E, Roy I, et al. New method for delivering a hydrophobic drug for photodynamic therapy using pure nanocrystal form of the drug [J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2006, 4(2): 289-297.
- [5] Roy I, Ohulchanskyy T Y, Pudavar H E, et al. Ceramide based nanoparticles entrapping water insoluble photosensitizing anticancer drugs: a novel drug carrier system for photodynamic therapy [J]. *Journal of American Chemistry Society*, 2003, 125(26): 7860-7865.
- [6] Wang S Z, Gao R M, Zhou F M, et al. Nanomaterials and singlet oxygen photosensitizers: potential applications in photodynamic therapy [J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2004, 14(4): 487-493.
- [7] Yan F, Kopelman R. The embedding of metatetra (hydroxyphenyl)-chlorin into silica nanoparticle platforms for photodynamic therapy and their singlet oxygen production and pH-dependent optical properties [J]. *Photochemistry and Photobiology*, 2003, 78(6): 587-591.
- [8] Tang W, Xu H, Kopelman R, et al. Photodynamic characterization and in vitro application of methylene blue containing nanoparticle platforms [J]. *Photochemistry and Photobiology*, 2005, 81(2): 242-249.
- [9] Zhou L, Liu JH, Zhang J, et al. A new soft silica nanovehicle preparation for photodynamic therapy in vitro [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2010, 386(1/2): 131-137.
- [10] 何慧珠, 蒋险峰, 王夺元. 在胶束中竹红菌甲素的光物理特性 [J]. *感光科学与光化学*, 1992, 10(3): 193-199.

[责任编辑: 顾晓天]