

一种水溶性酞菁纳米晶的制备及光敏活性研究

周 莉¹, 赵光辉¹, 周 林², 魏少华²

(1. 南京航空航天大学材料科学与技术学院, 江苏 南京 211106)

(2. 南京师范大学化学与材料科学学院, 江苏 南京 210046)

[摘要] 通过“再沉淀法”将一种疏水性的锌酞菁(2(3),9(10),16(17),23(24)-四-((2-(三苯甲基-氨基)乙氨基)甲基)苯氧基)酞菁(II), NNZnPc) 转变成一种水溶性的酞菁纳米晶(NNZnPc-NP), 该酞菁纳米晶符合光动力疗法(Photodynamic therapy, PDT)对药物运载的需求. 通过透射电镜(TEM)、紫外-可见分光光度计(UV-Vis)、倒置荧光显微镜研究和表征了该酞菁纳米晶的表面形貌、稳定性、单线态氧产生能力以及光敏抗肿瘤活性. 所制备的 NNZnPc-NP 颗粒粒径均一、分散性好、在水溶液中能稳定存在, 且有较高的单线态氧($^1\text{O}_2$)产生效率及抗光漂白的能力. 体外抗肿瘤实验结果表明, 可见光照射下 NNZnPc-NP 可有效杀灭宫颈癌细胞(HeLa), 有较好的应用潜力.

[关键词] 光动力疗法, 酞菁, 纳米晶, 光敏抗肿瘤活性

[中图分类号] O644.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2017)03-0118-05

Preparation and Photodynamic Activity of a Water-Soluble Phthalocyanine Nanoparticle

Zhou Li¹, Zhao Guanghui¹, Zhou Lin², Wei Shaohua²

(1. College of Material Science and Technology, Nanjing University of Aeronautics and Astronautics, Nanjing 211106, China)

(2. School of Chemistry and Materials Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

Abstract: A novel water soluble nanocrystalline phthalocyanine(NNZnPc-NP) was prepared using reprecipitation method. The surface morphology, stability, singlet oxygen generation ability and photosensitive anticancer activity of it were studied by transmission electron microscopy(TEM), UV-Vis spectrophotometer and inverted fluorescence microscope. The results showed that the particle size of NNZnPc-NP is uniform, the dispersion is good, and it can be stable in aqueous solution. Besides, it also exhibits excellent singlet oxygen generation ability and photostability. The in vitro anticancer experiment results confirm that NNZnPc-NP can efficiently kill HeLa cells under the visible light irradiation. The above results indicate NNZnPc has good potential to be used as clinical photosensitizer for PDT.

Key words: photodynamic therapy, zinc phthalocyanine, nanocrystalline, photosensitive anticancer activity

光动力疗法(Photodynamic therapy, PDT)是上世纪 70 年代末开始形成的一项肿瘤治疗新技术, 目前已得到美国、英国、德国、法国、日本等不少国家政府相关部门的正式批准, 成为肿瘤治疗的一项重要手段^[1-2]. 光动力疗法的治疗过程是光敏剂受特定波长的光激发产生单线态氧($^1\text{O}_2$)及其它活性氧物种(ROS), 导致肿瘤细胞的坏死和凋亡, 从而实现癌症的治愈^[3-4].

酞菁化合物及其衍生物作为第二代有前景的光敏剂, 具有优良的光物理和光化学性质, 有包括对特定波长的光有强吸收, 结构可修饰性位点多, 较高的活性氧产生能力等诸多优点, 因而成为 PDT 治疗中药物研究的热点^[5]. 然而, 大多数酞菁及其金属配合物存在水溶性差, 易聚集等问题, 这就限制了其在血液中的传输. 此外, 聚集还会影响酞菁在细胞中的渗透和光化学性质, 从而影响其光敏活性^[6-7].

为了解决这一难题, 目前已有许多课题研究使用不同方法使酞菁在水环境下形成稳定分散的体

收稿日期: 2017-03-20.

基金项目: 教师教学能力提升研究课题(90YAJ16018)、江苏省优势学科建设工程资助项目.

通讯联系人: 魏少华, 教授, 研究方向: 光敏剂的结构设计、合成和光敏活性研究. E-mail: shwei@njnu.edu.cn

系. 其中,“再沉淀法”就是一种简单可行的方法. 利用有机化合物在不同的溶剂中溶解度的不同来制备有机纳米晶^[8-12]. 这种方法非常简单,无需添加额外物质,如表面活性剂,大大降低药物在患者体内的毒性.

本文采用“再沉淀法”制备了一种水溶性的酞菁纳米晶 NNZnPc-NP,并对该纳米晶的形貌、光学性质以及稳定性进行了表征;比较了 NNZnPc 和 NNZnPc-NP 在水溶液体系中的单线态氧产生能力. 通过光敏抗肿瘤活性研究证实,NNZnPc-NP 表现了良好的光敏抗肿瘤活性能力,这与其单线态氧能力产生情况相一致.

1 实验部分

1.1 仪器和设备

紫外可见吸收光谱用 VARIAN CARY 5000 紫外可见分光光度计测定;纳米晶在水溶液环境中的形貌及分散性用透射电子显微镜进行观察 (HITACH H-7650,加速电压 120 kV);细胞形态学观察用倒置荧光显微镜 (Nikon, Japan);细胞存活率检测用酶标仪 (Bio Tek synergy 2, 美国 BioTek 有限公司)

1.2 材料与试剂

二甲基亚砜 (DMSO) 等试剂为国产分析纯;9,10-二苯基蒽丙酸 (ADPA) 购于 Sigma-Aldrich;细胞培养基 (DMEM) 购于 Gibico;小牛血清购于兰州民海生物工程有限公司;胰蛋白酶购于南京生兴生物技术有限公司;Hoechst 33342 和噻唑兰 (MTT) 购于民海生物;人宫颈癌细胞株 (HeLa) 购于中科院上海细胞库.

1.3 实验方法

1.3.1 NNZnPc-NP 的制备

NNZnPc 由课题组制备表征^[13]. 首先,将 NNZnPc 溶解于 DMSO,然后在室温条件下,将 NNZnPc 的 DMSO 溶液 (200 μ L, 1 mmol/L) 注入到 20 mL 的蒸馏水中,磁力搅拌 1 h,当形成纳米晶后,将样品用 8~12 kDa 中空纤维素薄膜透析 24 h 去除 DMSO,即得水溶性的酞菁纳米晶 (NNZnPc-NP).

1.3.2 稳定性测定

以水做溶剂,分别配制 5 μ mol/L 的 NNZnPc 和 NNZnPc-NP 溶液. 每天分别测两种溶液的最大吸收波长 (680 nm) 的紫外吸收强度,连续测 5 d.

1.3.3 ADPA 光漂白实验检测单线态氧

配制 5.5 mmol/L 的 ADPA 水溶液. 分别向 3 mL 5 μ mol/L 的 NNZnPc 和 NNZnPc-NP 溶液中加入 30 μ L 5.5 mmol/L ADPA 溶液,用 LED 灯 (665 nm) 作为光源分别照射样品 0 min, 1 min, 2 min, 3 min, 4 min 和 5 min,然后测量记录 378 nm 处 ADPA 的吸光值,分析其单线态氧的产生能力.

1.3.4 细胞形态的变化

用无血清的 DMEM 将 NNZnPc 和 NNZnPc-NP 溶液分别稀释至 5 μ mol/L, HeLa 细胞用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基接于 3 块六孔板中,培养板置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱培养 24 h 后取出,弃掉培养液,每孔分别加入 1 mL 的 NNZnPc/NNZnPc-NP 溶液,同时设空白组 (每孔只加无血清 DMEM 1 mL),放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养 4 h. 3 块板均用 LED 灯 (λ = 665 nm) 光照 5 min,再放入培养箱中培养 24 h 后,弃掉培养基,用 PBS 溶液冲洗 3 次后每孔加入 1 mL 的无血清 DMEM 培养基,用荧光倒置显微镜检测.

1.3.5 Hoechst 33342 染色检测光敏损伤前后染色质变化

用无血清的 DMEM 将 NNZnPc 和 NNZnPc-NP 溶液分别稀释至 5 μ mol/L, HeLa 细胞用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基接于 3 块六孔板中,培养板置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱培养 24 h 后取出,弃掉培养液,每孔分别加入 1 mL 的酞菁稀释液,同时设空白组 (每孔只加 1 mL 无血清 DMEM),放入培养箱中培养 4 h. 然后将培养板用 LED 灯 (λ = 665 nm) 光照 30 min,再放入培养箱中培养 24 h 后,弃掉培养基,每孔加入 1 mL 含 100 μ L Hoechst 33342 母液的无血清 DMEM 培养基,在培养箱中培养 30 min,取出培养板,弃掉培养基,用 PBS 溶液冲洗 3 次后用荧光显微镜检测.

1.3.6 MTT 实验

噻唑兰 (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, MTT) 是一种黄色染料,MTT 比色法是一种检测细胞存活和生长的方法^[14]. 将肿瘤细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化后,用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液制成单细胞悬液,细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种于 96 孔板,每孔加入细胞悬液 100 μ L,在 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C、饱和湿度

条件下培养 24 h 后,每孔加入 100 μL 浓度分别为 2 $\mu\text{mol/L}$ 、4 $\mu\text{mol/L}$ 、6 $\mu\text{mol/L}$ 、8 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 的 NNZnPc/NNZnPc-NP 溶液;空白对照组加入 100 μL /孔的 DMEM 培养液,每组设 6 个复孔,实验重复 3 次. 加药后细胞培养 24 h,用 LED 灯($\lambda=665\text{ nm}$)光照 60 min. 细胞继续培养 24 h,移去上层培养液,然后每孔加入 MTT 溶液 100 μL ,继续培养 4 h 后,加入 100 μL DMSO 终止. 在 570 nm 测定波长(参比波长 650 nm)酶标仪测定吸光度值(OD 值),细胞存活率($\%$)=(1-实验组 OD/空白组 OD) $\times 100\%$

2 结果与讨论

2.1 NNZnPc-NP 的形貌和稳定性

NNZnPc-NP 的 TEM 图如图 1 所示,所制备的酞菁纳米晶呈规则的球形,粒径 100 nm 左右,均匀稳定地分散在水溶液环境中. 静脉注射的药物其稳定性是衡量药物是否适合在血液传输的一个非常重要的评价指标. 因为一个好的药物运输体系能够避免药物在血液传输过程中出现药物团聚(凝聚)、药物沉积等问题^[15]. 将疏水性的锌酞菁制备成可以溶于水的酞菁纳米晶,可以增加其水溶性和靶向性,使 NNZnPc-NP 更易进入靶细胞. 为了验证酞菁纳米晶的稳定性,将 NNZnPc 和 NNZnPc 溶液在水溶液环境下放置 5 d,每天测其紫外可见吸收光谱,并比较两种化合物的各自特征吸收峰值的变化. 结果表明,NNZnPc 不能在水溶液中稳定存在,放置 5 d 后吸光值下降约 80%(图 2);而 NNZnPc-NP 的特征吸收峰强度基本无明显变化,说明 NNZnPc-NP 在水溶液环境中能稳定存在.

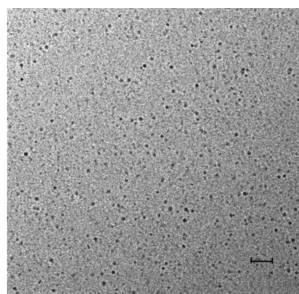


图 1 NNZnPc-NP 的透射电镜(TEM)
Fig. 1 The TEM image of NNZnPc-NP nanoparticles

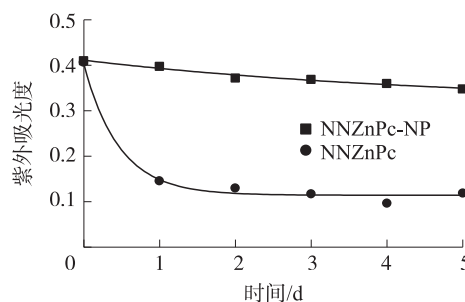


图 2 NNZnPc 和 NNZnPc-NP 在水中的吸光值随时间的变化
Fig. 2 The absorbance tendency variation with time of NNZnPc and NNZnPc-NP in aqueous solutions

2.2 光漂白实验检测单线态氧

单线态氧是活性氧物种之一,在 PDT 中有非常重要的作用. 光敏剂在 PDT 治疗过程中可产生单线态氧,从而使 ADPA 的吸光值下降. 本文采用 9,10-二苯基蒽丙酸钠(ADPA)光氧化漂白法来测定 NNZnPc 和 NNZnPc-NP 在水溶液中光敏产生单线态氧的能力. ADPA 是最常用的化学捕获剂,其与单线态氧可以快速反应生成稳定的内氧化物,通过用紫外分光光度计测定 ADPA 在 378 nm 的吸光度的减少量即可以检测单线态氧的含量. 由图 3 可知,在 665 nm LED 光照射情况下,NNZnPc-NP 体系中的 ADPA 的吸收峰强度在 300 s 内急剧持续地下降(图 3 插图),相反,NNZnPc 体系中只有很少程度的下降. 这说明 NNZnPc-NP 比 NNZnPc 有优越的光动力活性,预示了 NNZnPc-NP 有较强的单线态氧($^1\text{O}_2$)产生能力.

因此,以 ADPA 为探针分子,在激发光照射条件下,通过化学检测法检测了 NNZnPc 和 NNZnPc-NP 诱导的 ADPA 光催化氧化速率,进而验证了 NNZnPc-NP 有较强的单线态氧产生能力. 图 4 所示,NNZnPc 和 NNZnPc-NP 的 $\ln(\text{ADPA}_t/\text{ADPA}_0)$ 数值与照射时间 t 呈现良好的线性关系($R_1^2=0.973\ 49$; $R_2^2=0.980\ 1$),而 k 值可作为评估单

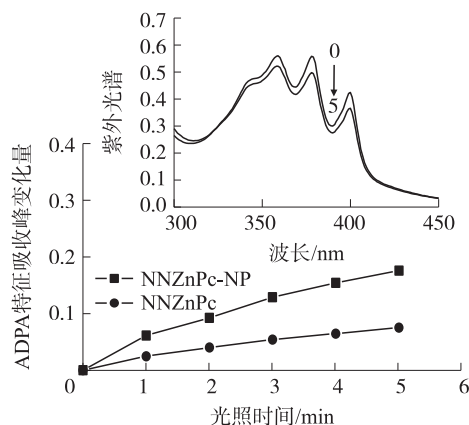


插图 为 NNZnPc-NP 水溶液中 ADPA 吸收峰随光照时间变化图
图 3 NNZnPc 和 NNZnPc-NP 的 ADPA 光漂白曲线
Fig. 3 Photosensitized ADPA bleaching by NNZnPc and NNZnPc-NP

线态氧产生能力的一个指标. NNZnPc 和 NNZnPc-NP 的 k 分别为 $0.027\ 86\ \text{min}^{-1}$, $0.072\ 27\ \text{min}^{-1}$. 结果表明 NNZnPc-NP 具有较高的单线态氧产生能力,可能是由于形成纳米晶后降低了水对单线态氧的物理猝灭作用^[16].

2.3 光敏抗肿瘤活性

通过单线态产生实验预示了 NNZnPc-NP 有较好的光敏抗肿瘤活性. 因此,我们对 NNZnPc 和 NNZnPc-NP 进行了 HeLa 细胞体外光敏活性研究. 用荧光倒置显微镜观察加药前后 HeLa 细胞形态学改变. 结果表明,对照组(图 5(a))的 HeLa 细胞呈梭形,细胞形态规整,贴壁牢固,有极少量细胞缩小变圆. 与空白对照组相比,用光敏剂处理的 HeLa 细胞在光照后,细胞表面形态发生明显变化. HeLa 细胞变圆并逐渐从培养瓶壁上脱落下来,细胞体积变小,胞核固缩,大部分细胞逐渐形成凋亡小体. 与 NNZnPc(图 5(b))相比,用 NNZnPc-NP 处理的 HeLa 细胞(图 5(c)),细胞基本上全部形成凋亡小体,NNZnPc-NP 具有良好的杀伤肿瘤细胞能力.

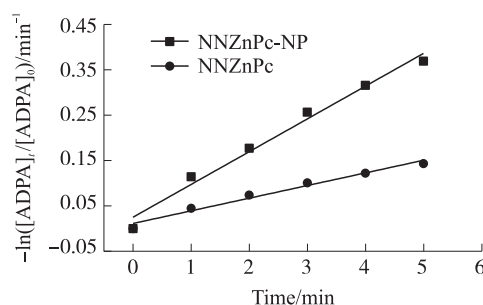


图 4 NNZnPc 和 NNZnPc-NP 的单线态氧生成速率的线性拟合曲线

Fig. 4 The best fit of the singlet oxygen generation rate of NNZnPc and NNZnPc-NP

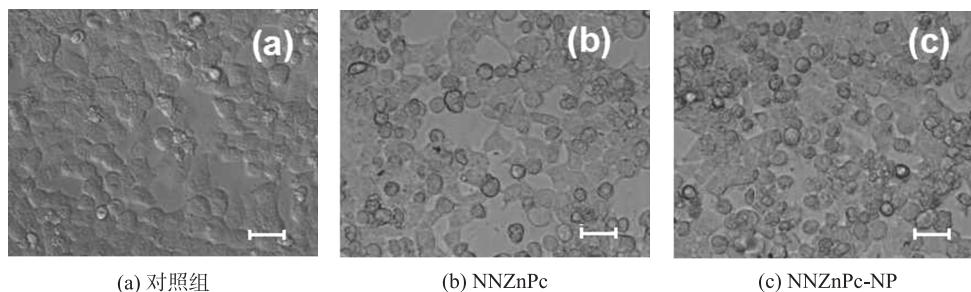


图 5 HeLa 细胞光敏损伤形态学变化图(a)对照组;(b)NNZnPc;(c)NNZnPc-NP(光照 30 min; $C_{\text{ZnPc}} = 5\ \mu\text{mol/L}$;短线长度 = 100 μm)

Fig. 5 Morphological changes of HeLa cells in light sensitive injury. (a) Control group of HeLa cells (cells just irradiation by light but not treated by drugs); (b) cells treated with NNZnPc ($5\ \mu\text{mol/L}$) and irradiation for 30 min; (c) cells treated with NNZnPc-NP ($5\ \mu\text{mol/L}$) and irradiation for 30 min. Bar = 100 μm

Hoechst 33342 是一种可穿透细胞膜并对 DNA 染色的细胞核染色试剂,它在嵌入双链 DNA 后释放出强烈的蓝色荧光,因此可用于细胞凋亡检测. 用荧光倒置显微镜观察加药前后 HeLa 细胞凋亡过程中核染色质形态学变化. Hoechst 33342 染色实验结果:经 Hoechst 33342 染色后,荧光显微镜下对照组 HeLa 细胞膜均完整,核染色质着色浅,密度均匀. NNZnPc(Fig. 6(b))/NNZnPc-NP(Fig. 6(c))处理的细胞,大部分细胞核部位出现高亮度块状荧光,个别细胞出现极不规则的纺锤状或月牙形高亮度块状荧光,并出现细胞出芽现象,说明其细胞核染色质发生浓缩,表现为核固缩现象. 与 NNZnPc 相比,NNZnPc-NP 处理的细胞,大部分细胞内出现月牙形或星形高亮度块状荧光,细胞膜皱缩,细胞核相对变小,并伴随着细胞出芽形成凋亡小体.

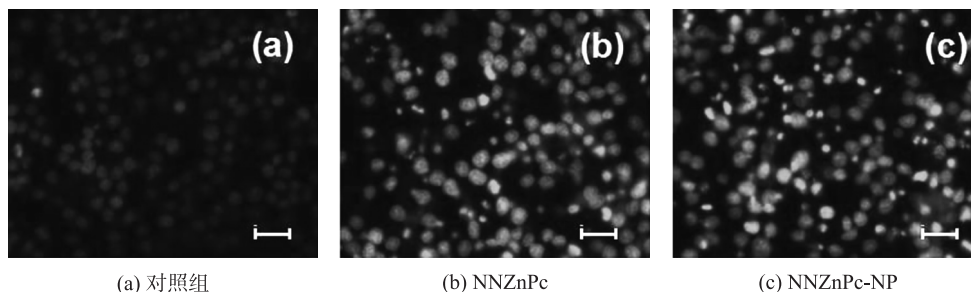


图 6 Hoechst 33342 染色的 HeLa 细胞荧光显微镜图(a)对照组;(b)NNZnPc;(c)NNZnPc-NP(光照 25 min; $C_{\text{ZnPc}} = 5\ \mu\text{mol/L}$;短线长度 = 100 μm)

Fig. 6 Fluorescence micrographs of HeLa cells stained with Hoechst 33342. (a) Control group of HeLa cells (cells just irradiation by light but not treated by drugs); (b) cells treated with NNZnPc ($5\ \mu\text{mol/L}$) and irradiation for 5 min; (c) cells treated with NNZnPc-NP ($5\ \mu\text{mol/L}$) and irradiation for 5 min. Bar = 100 μm

2.4 光敏活性抑制率

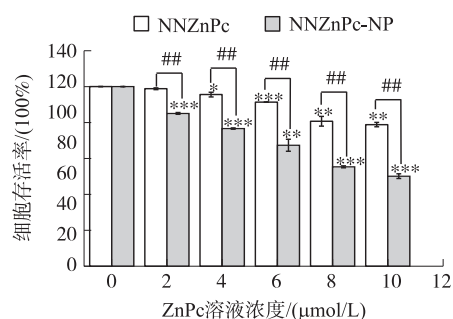
采用 MTT 法检测不同浓度的 NNZnPc、NNZnPc-NP 对 HeLa 细胞的光敏抗肿瘤活性能力。图 7 给出了在相同光照条件下,不同浓度酞菁对 HeLa 细胞的光敏活性抑制率,结果表明在 2~10 $\mu\text{mol/L}$ 的实验浓度条件下,酞菁对各种肿瘤细胞的抑制率随药物浓度的增大而增强,而 NNZnPc-NP 对细胞的活性影响尤为显著,这与其单线态氧产生情况相符。各组数据与空白组比较均有统计学意义($P < 0.05$)。

3 结论

本文通过“再沉淀法”制备了一种水溶性的酞菁纳米晶(NNZnPc-NP)。比较研究表明:NNZnPc-NP 呈现规则的球形,在水溶液中能均匀分散,具有较强的单线态氧产生能力和较好的光敏抗肿瘤活性。本实验为改善疏水性的锌酞菁提供了一个可靠的方法,也为药物在血液中运转等方面的应用提供了基本信息,对解决酞菁类光敏剂的生物应用具有重要意义。

[参考文献]

- [1] PUCELİK B, ARNAUT L G, STOCHEL G, et al. Design of pluronic-based formulation for enhanced redaporfin-photodynamic therapy against pigmented melanoma[J]. ACS applied materials and interfaces, 2016, 8(34): 22 039–22 055.
- [2] SOARES H T, CAMPOS J R S, GOMES-DA-SILVA L C, et al. Pro-oxidant and antioxidant effects in photodynamic therapy: cells recognize that not all exogenous ROS are alike[J]. Chem Bio Chem, 2016, 17(9): 836–842.
- [3] CHEN H C, TIAN J W, HE W J, et al. H_2O_2 -Activatable and O_2 -evolving nanoparticles for highly efficient and selective photodynamic therapy against hypoxic tumor cells[J]. Journal of the American chemical society, 2015, 137(4): 1 539–1 547.
- [4] HUANG J L, CHEN N S, HUANG J D, et al. Metal phthalocyanine as photosensitizer for photodynamic therapy(PDT)-preparation, characterization and anticancer activities of an amperiphilic phthalocyanine ZnPcS_2P_2 [J]. Science in China (series B), 2001, 44(2): 113–122.
- [5] 包富荣, 季春, 卢珊, 等. 可溶性酞菁化合物的溶剂效应[J]. 南京师大学报(自然科学版), 2007, 30(3): 58–63.
- [6] OLIVEIRA K T, ASSIS F F, RIBEIRO A O, et al. Synthesis of phthalocyanines-ALA conjugates: water-soluble compounds with low aggregation[J]. The journal of organic chemistry, 2009, 74(20): 7 962–7 965.
- [7] STASIO B D, FROCHOT C, DUMAS D, et al. The 2-aminoglucosamide motif improves cellular uptake and photodynamic activity of tetraphenylporphyrin[J]. European journal of medicinal chemistry, 2005, 40(11): 1 111–1 122.
- [8] NITSCHKE C, O' FLAHERTY S M, KROLL M, et al. Material investigations and optical properties of phthalocyanine nanoparticles[J]. The journal of physical chemistry B, 2014, 108(4): 1 287–1 295.
- [9] CHEN H Z, CHAO P, WANG M. Characterization and photoconductivity study of TiOPc nanoscale particles prepared by liquid phase direct reprecipitation[J]. Nanostructured materials, 1999, 11(4): 523–530.
- [10] YANG Z L, CHEN H Z, CAO L, et al. Preparation and photoconductivity study of azo nanoparticles via liquid phase surfactant-assisted reprecipitation[J]. Journal of materials science, 2004, 39(11): 3 587–3 591.
- [11] KASAI H, NALWA H S, OIKAWA H, et al. A novel preparation method of organic microcrystals[J]. Japanese journal of applied physics, 1992, 31(8A): L1132–L1134.
- [12] 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, 2007, 4(2): 289–297.
- [13] WANG A, ZHOU L, FANG K L, et al. Synthesis of novel octa-cationic and non-ionic 1,2-ethanediamine substituted zinc(II) phthalocyanines and their in vitro anti-cancer activity comparison[J]. European journal of medicinal chemistry, 2012, 58: 12–21.
- [14] 庄欠粉, 王金娥, 朱志军, 等. 四氨基酞菁锌负载二氧化硅纳米粒子的合成及其对细胞毒性的研究[J]. 分析化学, 2011, 39(10): 1 567–1 571.
- [15] ESUMI K, WAKE T, TERAYAMA H. Preparation of stable aqueous dispersion of drug in the presence of polymer as stabilizer[J]. Colloids and surfaces B: biointerfaces, 1998, 11(4): 223–229.
- [16] ZHOU L, DONG C, WEI S H, et al. Water-soluble soft nano-colloid for drug delivery[J]. Materials letters, 2009, 63(20): 1 683–1 685.



(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ NNZnPc-NP vs. NNZnPc)

图 7 NNZnPc 和 NNZnPc-NP 对 HeLa 细胞的光敏抗肿瘤活性能力影响

Fig. 7 In vitro photodynamic activity of NNZnPc versus NNZnPc-NP

[责任编辑:顾晓天]