

# 基于UiO-66-NH<sub>2</sub>的智能药物递送体系的构建及其协同抗肿瘤活性研究

潘业婷, 刘玉红, 王鹤润, 杜晓倩, 孙杰\*

鲁东大学生命科学学院, 山东 烟台  
Email: jiesunld@163.com

收稿日期: 2021年5月22日; 录用日期: 2021年6月5日; 发布日期: 2021年7月5日

## 摘要

目的: 以阿霉素(DOX)和内消旋-四(4-羧基苯基)卟吩(meso-tetra(4-carboxyphenyl)porphine:TCPP)为模型药物, UiO-66-NH<sub>2</sub>为纳米载体, 构建了一种能响应肿瘤微环境的复合纳米载药体系, 并对其性能进行研究。方法: 将TCPP通过配位作用引入到金属-有机框架的周期性结构中, 负载DOX, 构建了UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP@DOX复合纳米载药体系。通过SEM、XRD、IR和荧光光谱进行形貌和结构的表征。同时, 研究了其在不同pH缓冲溶液中药物的释放情况、细胞外和细胞内单线态氧产量及对B<sub>16</sub>F<sub>10</sub>肿瘤细胞的细胞毒活性。结果: 纳米载药体系平均粒径约为200 nm, DOX的负载量为31 wt%, TCPP的负载量为10.9 wt%。在pH为5.0的缓冲液中, 时间108 h内DOX的累积释放率为47.2%, TCPP的累积释放率为76.8%, 高于在pH为7.0的缓冲溶液中的相应释放量。此外, UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP@DOX在细胞外和细胞内都有较高的单线态氧产量, 细胞毒实验证明其在体外能够明显杀伤肿瘤细胞B<sub>16</sub>F<sub>10</sub>, 在660 nm激光照射下, 细胞存活率为55%, 表明UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP@DOX中光敏剂协同化疗药物对肿瘤细胞的高效杀伤效果。结论: 本实验通过构建复合纳米载药体系UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP@DOX有效避免了光敏剂的聚集, 提高了DOX负载量, 增强了靶向性, 从而实现了光敏剂和化疗药的有效递送和对肿瘤细胞的协同杀伤作用。

## 关键词

纳米载药体系, 阿霉素, TCPP, 药物释放, 光动力治疗, 抗肿瘤活性

## A Smart Drug Delivery System Based on UiO-66-NH<sub>2</sub> and Its Synergistic Antitumor Activity

Yeting Pan, Yuhong Liu, Herun Wang, Xiaoqian Du, Jie Sun\*

\*通讯作者。

文章引用: 潘业婷, 刘玉红, 王鹤润, 杜晓倩, 孙杰. 基于 UiO-66-NH<sub>2</sub> 的智能药物递送体系的构建及其协同抗肿瘤活性研究[J]. 生物医学, 2021, 11(3): 149-158. DOI: 10.12677/hjbm.2021.113020

## Abstract

**Purpose:** A smart composite nano-drug delivery system, which was responsive to the acid tumor microenvironment was developed based on UiO-66-NH<sub>2</sub>, loading doxorubicin and meso-tetra(4-carboxyphenyl)porphine(TCPP). Its properties were also studied in detail. **Methods:** TCPP was introduced into the periodic porous metal-organic frameworks (MOFs) by the coordination ability of TCPP. UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP@DOX was constructed after DOX was loaded into the pores of UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP. After all, the morphology and structure were characterized by SEM, XRD, IR and fluorescence spectra. At the same time, the properties including the drugs release in different buffer solutions, the extracellular and intracellular singlet oxygen production and cytotoxic activities against B<sub>16</sub>F<sub>10</sub> were also investigated. **Results:** The average diameter of nanoparticles was about 200 nm and 31 wt% of DOX, 10.9 wt% of TCPP existed in the composite nano particles respectively. In the buffer solution with a pH of 5.0, the cumulative release rate of DOX and TCPP was 47.2% and 76.8% respectively within 108h, which were higher than that in the buffer solution with a pH of 7.0. In addition, UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP @DOX exhibited high efficient singlet oxygen generation, which was confirmed by the extracellular and intracellular experiments. Cytotoxic experiments have shown that it can kill tumor cells B<sub>16</sub>F<sub>10</sub> *in vitro* effectively. The cell survival rate was 55% under irradiation of 660 nm laser, indicating that the photosensitizer combined with chemotherapeutic drugs in UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP@DOX has a high killing effect on tumor cells. **Conclusion:** The composite nano-drug loading system can effectively avoid the aggregation of photosensitizers, improve the loading capacity of DOX and enhance the targeting ability, so as to realize the effective delivery of photosensitizers and chemotherapeutic drugs, which have synergistic effects in the treatment of cancer.

## Keywords

Nano-Drug Delivery System, DOX, TCPP, Drug Release, Photodynamic Therapy, Antitumor Activity

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

癌症的治疗是世界性的难题。近年来, 光动力治疗(PDT)因为靶向性好、对正常组织损伤小、低侵入性、经济性、无耐药性等优点日渐成为一种非常有前景的癌症治疗新型疗法[1]。在特定波长激光的照射下, 光敏剂激发肿瘤部位的氧气发生不完全氧化转变成活性氧种或单线态氧, 从而引起血管损害或者直接杀死肿瘤细胞。卟啉及其衍生物是研究和应用最广泛的光敏剂药物, 然而卟啉分子含有的共轭大环结构及其固有的强疏水性使得其在生物体环境极易聚集, 造成暗毒性增加, 体内循环时间缩短[2] [3]。此外, 光敏剂在肿瘤部位较低的靶向聚集能力也限制了光动力治疗的效果, 更为严重的是会对正常组织产生光

毒性。要提高光动力治疗效果, 必须实现针对肿瘤组织的光敏剂靶向输送。近年来, 纳米尺度的金属-有机框架(Nano Metal-Organic Frameworks, NMOFs)由于其比表面积大、结构和孔径可调、组成丰富多样、载药量大以及优异的生物相容性而在生物医用领域, 尤其是药物递送与传感方面显示出良好的应用前景[4]。常用的药物负载策略包括, 在 MOFs 的合成过程中, 直接将药物包覆在载体中[5]; 将药物非共价吸附到 MOFs 表面[6]或通过偶联分子将药物分子共价连接到 MOFs 的表面[7]; 此外, Lin [8]和 Zhou [9]研究小组用一锅法合成一系列用卟啉分子作为连接子与  $Zr^{4+}$ 和  $Hf^{4+}$ 配位的 NMOFs 用于光动力治疗, 结果表明这种将卟啉分子引入到 MOFs 的周期性网状结构中的策略, 有效的避免了光敏剂的聚集, 提高了肿瘤部位细胞对光敏剂的吞噬能力。本文将内消旋-四(4-羧基苯基)卟吩(meso-tetra(4-carboxyphenyl)porphine:TCPP)与 2-氨基对苯二甲酸以一定的摩尔比与  $Zr^{4+}$ 配位, 一步合成  $UiO-66-NH_2@TCPP$ , 然后在其孔道中负载盐酸阿霉素, 研究了  $UiO-66-NH_2@TCPP@DOX$  在体外的药物释放和胞外单线态氧产生情况, 并以小鼠黑素瘤细胞  $B_{16}F_{10}$  为模型, 研究胞内单线态氧的产生及其对肿瘤细胞的杀伤。

## 2. 实验部分

### 2.1. 实验材料与仪器

材料: 四氯化锆; N,N-二甲基甲酰胺(DMF); 冰乙酸; 2-氨基对苯二甲酸; 内消旋-四(4-羧基苯基)卟吩(TCPP); 无水乙醇; 盐酸阿霉素; 丙酮; 咪唑; N,N-二甲基-4-亚硝基苯胺(RNO); 以上试剂均购自阿拉丁试剂有限公司, RPMI-1640 培养基; 胰蛋白酶 0.25%; 青霉素链霉素溶液; 胎牛血清; MTT; 均购自 sigma, DMSO; 活性氧检测试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。

仪器: 电热恒温鼓风干燥箱(DHG-9123A 上海天呈实验仪器制造有限公司); 紫外分光光度计(TU-1810 北京普析通用仪器有限责任公司); 荧光分光光度计(Cary Eclipse 安捷伦科技(中国)有限公司); pH 计(PHC-3C 上海仪电科学仪器股份有限公司); 高分辨场发射扫描电镜(SU8010 日本 Hitachi); 傅立叶红外光谱仪(MAGNA 美国尼高力公司); X 射线衍射仪(D8 Advance 德国布鲁克); 二氧化碳培养箱(Thermo 311 赛默飞世尔科技(中国)有限公司); 激光发生器(HF-1064-200 北京中科思远光电科技有限公司); 酶标仪(SpectraMax 美谷分子仪器(上海)有限公司)。

### 2.2. 载药体系构建

#### 2.2.1. $UiO-66-NH_2$ 的合成

称取 40 mg 四氯化锆加到 10 mL N,N-二甲基甲酰胺中, 超声 3 min 至溶解, 然后加入 0.2 mL 冰乙酸, 超声 30 s 后加入 31 mg 2-氨基对苯二甲酸, 超声 3 min, 最后将 0.0125 mL 水加入到溶液中[10]。转入聚四氟乙烯内衬里, 然后放到反应釜里, 放入烘箱中, 设置程序, 300 min 升至 120°C, 120°C 保持 24 小时。24 小时后, 通过离心分离沉淀物, 将沉淀物在 N,N-二甲基甲酰胺中浸泡 2~6 小时[11], 除去未反应的 2-氨基对苯二甲酸, 进行离心后弃去上清液, 沉淀用无水乙醇洗涤, 真空干燥获得淡黄色粉末状材料。

#### 2.2.2. $UiO-66-NH_2@TCPP$ 的合成

称取 40 mg 四氯化锆加到 10 mL N,N-二甲基甲酰胺中, 超声 3 min 至溶解, 然后加入 0.2 mL 冰乙酸, 超声 30 s 后加入 31 mg 2-氨基对苯二甲酸, 超声 3 min, 加入 6.42 mg 内消旋-四(4-羧基苯基)卟吩(TCPP), 超声 30 s, 最后将 0.0125 mL 水加入到溶液中。转入聚四氟乙烯内衬里, 然后放到反应釜里, 放入烘箱中, 设置程序, 300 min 升至 120°C, 120°C 保持 24 小时。24 小时后, 通过离心分离沉淀物, 将沉淀物在 N,N-二甲基甲酰胺中浸泡 2~6 小时, 除去未反应的 2-氨基对苯二甲酸, 离心后弃去上清液, 沉淀用无水

乙醇洗涤，真空干燥获得紫色粉末状材料。

取 5 mg UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP 将其分散在乙醇中测其在 A514 处的吸光值，根据 TCPP 的标准曲线计算出材料中 TCPP 的负载量为 10.9 wt%。

### 2.2.3. UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP@DOX 的合成

称取 172 mg 盐酸阿霉素与 200 mg UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP 加入圆底烧瓶中，再加入 84 mL DMF，超声至完全分散，常温下避光搅拌 36 h。36 h 后，通过离心分离沉淀物，将沉淀物用 DMF 浸泡 2~6 h，再次离心，弃掉上清，重复此操作 2~3 遍，然后将沉淀用无水乙醇洗涤 2 至 3 遍，除去游离的盐酸阿霉素，单独保留上清，留待测负载率及负载量，真空干燥沉淀物获得深紫色粉末材料。用紫外分光光度计测上清在 A480 处的吸光值，根据 DOX 的标准曲线计算出未被负载在材料上的盐酸阿霉素，进而可以得到材料上负载的盐酸阿霉素的量，算出盐酸阿霉素在 UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP@DOX 上的负载量为 31 wt%，经与文献比对，载体对 DOX 具有相当高负载量[12] [13]，这可能是归因于 UiO-66-NH<sub>2</sub> 规则的孔道结构和较大的比表面积，可以将 DOX 吸附到其孔道结构中[14]。

## 2.3. 载药体系性能

### 2.3.1. UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP@DOX 在不同 pH 值的缓冲液中的 DOX 的释放情况

称取 30 mg (分为两份，每份 15 mg)的 UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP@DOX，然后分别将其分散在 pH = 5.0 和 pH = 7.0 的 PBS 缓冲液中，放置 37℃，200 rpm 运行的振荡培养箱中，使其中的盐酸阿霉素缓慢释放出来[15]。然后在相应的时间间隔中，将其取出离心，获得上清，在上清中取出适量体积并补充相同体积的新鲜缓冲液。通过紫外分光光度计测出取出上清的吸光值，通过标准曲线可以得出盐酸阿霉素在这段时间内释放出的量，通过计算可以得出盐酸阿霉素的累计释放量和释放率，并可以据此绘制出释放曲线。

### 2.3.2. UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP@DOX 在不同 pH 值的缓冲液中的 TCPP 的释放情况

称取 30 mg 的 UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP@DOX (分为两份，每份 15 mg)，然后分别将其分散在 pH = 5.0 和 pH = 7.0 的 PBS 缓冲液中，将其放置在 37℃，200 rpm 运行的振荡培养箱中，使其中的 TCPP 缓慢释放出来。然后在相应的时间间隔中，将其取出离心，获得上清，在上清中取出适量体积并补充相同体积的新鲜缓冲液。通过紫外分光光度计测出取出上清的吸光值，通过标准曲线可以得出 TCPP 在这段时间内释放出的量，通过计算可以得出 TCPP 的累计释放量和释放率，并可以据此绘制出释放曲线。

### 2.3.3. 测定 UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP@DOX 的单线态氧产生情况

胞外单线态氧的检测：配制 pH = 7.4 的 0.01 M 的 PBS 溶液。称取 5 mg RNO 使其溶于 2.200 mL 无水乙醇，最终混合形成 15 mM 的 RNO 溶液，然后梯度稀释成所需的 15 μM 的 RNO 溶液。

称取 5 mg 咪唑使其溶于 4.896 mL 无水乙醇，最终混合形成 15 mM 的咪唑溶液，然后梯度稀释成所需的 15 μM 的咪唑溶液。称取适量 UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP@DOX，将其分散在无水乙醇中。将 UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP@DOX 的乙醇溶液与 15 μM RNO 溶液、15 μM 咪唑溶液、pH 为 7.4 的 0.01 M 的 PBS 缓冲液按体积比 1:1:1:1 的比例均匀混合于透明玻璃小瓶中，然后用 0.3 W/cm<sup>2</sup>，660 nm 的激光照射。参比溶液用不含有材料的 15 μM RNO 溶液、15 μM 咪唑溶液、pH 为 7.4 的 0.01 M 的 PBS 缓冲液按等比例混合得到。对照组选择没有掺入光敏剂 TCPP 的 UiO-66-NH<sub>2</sub> 来替代 UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP@DOX 与 15 μM RNO 溶液、15 μM 咪唑溶液、pH 为 7.4 的 0.01 M 的 PBS 缓冲液按体积比 1:1:1:1 的比例均匀混合于透明玻璃小瓶中，然后用 0.3 W/cm<sup>2</sup>，660 nm 的激光照射。对照组和实验组分别照射 2 min，4 min，6 min，8 min，10 min，照射相应时间后，用紫外分光光度计测量在 A440 处的吸光值。材料在 440 处的吸光值的减少即代表着 RNO 的衰减，RNO 的衰减即可反应活性氧的变化。



### 2.3.4. 胞内活性氧的检测

细胞培养：从液氮罐中取出  $B_{16}F_{10}$  细胞，放在  $37^{\circ}\text{C}$  水浴锅中融化，融化后加入完全培养基 (90% RPMI-1640, 10% FBS, 1% 青霉素链霉素溶液) 离心，离心后倒掉上清，重新用完全培养基吹打，加入适量完全培养基后转移至培养瓶中，放置在  $37^{\circ}\text{C}$ ，饱和湿度和 5.0%  $\text{CO}_2$  的二氧化碳培养箱进行培养，培养至足够的处于贴壁生长期的细胞后，进行后续实验。

将  $B_{16}F_{10}$  细胞培养处于生长期后，用胰酶消化细胞，将细胞浓度稀释至  $1 \times 10^6$  个/mL，以 2 mL/孔的浓度铺 6 孔板，放在二氧化碳培养箱中培养 24 小时，24 h 后观察细胞状态，如果细胞在贴壁生长期即可进行后续实验。用活性氧检测试剂盒检测细胞内产生活性氧的水平。

### 2.4. 细胞毒实验

细胞暗毒性实验：将  $B_{16}F_{10}$  细胞培养至生长期后，用胰酶消化细胞，将细胞浓度稀释至  $5 \times 10^4$  个/mL，以  $100 \mu\text{L}$ /孔的浓度铺 96 孔板，放在二氧化碳培养箱中培养 24 小时，24 h 后观察细胞状态，如果细胞在贴壁生长期即可进行后续实验。将之前的培养基弃掉，在 96 孔板中分别加入用完全培养基配制的  $100 \mu\text{L}$  盐酸阿霉素浓度为  $20 \mu\text{g}/\text{mL}$  的  $\text{UiO-66-NH}_2@\text{TCPP}@\text{DOX}$ ，根据  $\text{UiO-66-NH}_2@\text{TCPP}@\text{DOX}$  中 TCPP 的负载量，加入同浓度的  $\text{UiO-66-NH}_2@\text{TCPP}$  以及  $\text{UiO-66-NH}_2$ ，晃动孔板，让纳米粒子均匀的铺在孔板中，放在二氧化碳培养箱中培养，24 h 后，每孔加入  $10 \mu\text{L}$  MTT 溶液，在二氧化碳培养箱中培养 4 h，取出离心，弃掉上清液，每孔加入  $150 \mu\text{L}$  DMSO 溶液，震荡 10 min，使用酶标仪检测 A490，计算细胞存活率。

细胞光毒性实验：细胞培养，铺板以及加药同细胞暗毒性实验。加药培养 4 h 后，将孔板放在 660 nm 激光发射器下，光照强度为  $125 \text{ mW}/\text{cm}^2$ ，照射 10 min，照射结束后将孔板放回二氧化碳培养箱继续培养直至 24 h。每孔加入  $10 \mu\text{L}$  MTT 溶液，在二氧化碳培养箱中培养 4 h，取出离心，弃掉上清液，每孔加入  $150 \mu\text{L}$  DMSO 溶液，震荡 10 min，使用酶标仪检测 A490，计算细胞存活率。

## 3. 结果与讨论

### 3.1. 载药体系结构表征

#### 3.1.1. 扫描电镜

如图 1(a)和图 1(b)分别表示纳米粒子  $\text{UiO-66-NH}_2$  和  $\text{UiO-66-NH}_2@\text{TCPP}$  的 SEM 图，从图中可以看出纳米粒子的表面均匀，呈现正八面体的结构，属于较稳定的形态。而且将 TCPP 参与配位构建的  $\text{UiO-66-NH}_2@\text{TCPP}$  并没有改变纳米粒子的形态，依然是稳定的八面体结构。

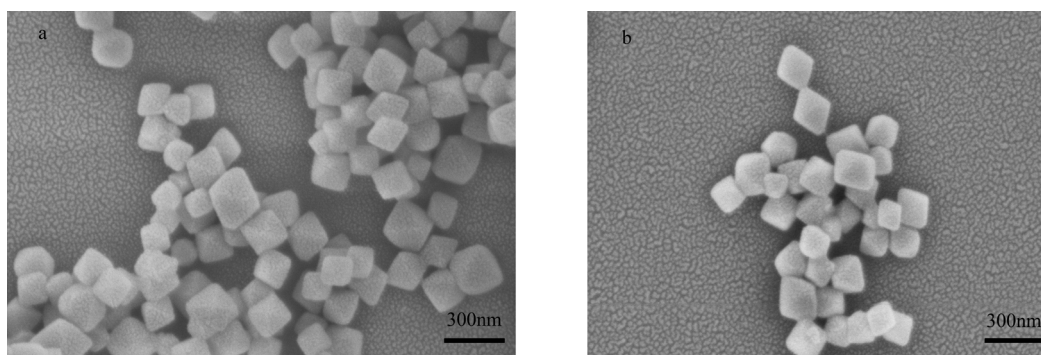


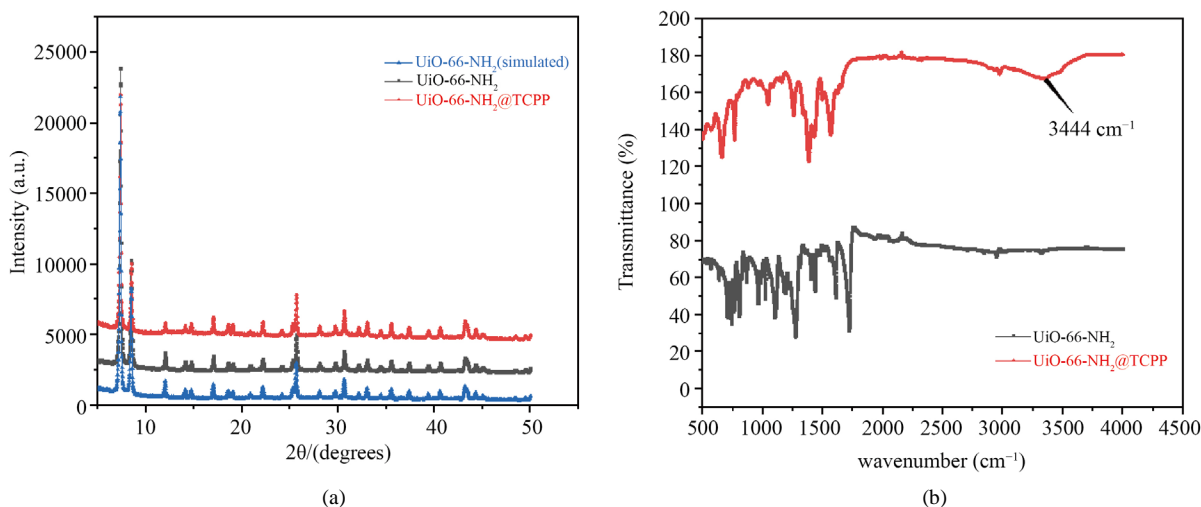
Figure 1. SEM images of  $\text{UiO-66-NH}_2$  (a) and  $\text{UiO-66-NH}_2@\text{TCPP}$  (b)

图 1.  $\text{UiO-66-NH}_2$  (a)和  $\text{UiO-66-NH}_2@\text{TCPP}$  (b)的 SEM 图

### 3.1.2. 载药体系 X 射线衍射(XRD)与红外光谱(IR)

图 2(a)是通过 X 射线粉末衍射实验对物质结构进行分析, 并和 UiO-66-NH<sub>2</sub> 的 XRD 的模拟数据进行比较, 可以看出合成的 UiO-66-NH<sub>2</sub> 和 UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP 具有非常高且尖锐的衍射峰, 说明两者有完善的晶体结构, 且与 UiO-66-NH<sub>2</sub> 的模拟数据能够完全对应, 说明 TCPP 参与配位并未破坏纳米粒子的原有结构。

从图 2(b) UiO-66-NH<sub>2</sub> 和 UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP 的红外光谱图可以看出 UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP 在 3444 cm<sup>-1</sup> 处有一个区别于 UiO-66-NH<sub>2</sub> 的峰, 是 TCPP 上吡咯环 N-H 的伸缩振动峰, 可以证明 TCPP 的成功负载。



**Figure 2.** Powder diffraction patterns (a) and Infrared spectra of UiO-66-NH<sub>2</sub> and UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP (b)

**图 2.** UiO-66-NH<sub>2</sub> 和 UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP 的 XRD (a) 和 IR (b) 图

### 3.1.3. 载药体系荧光光谱

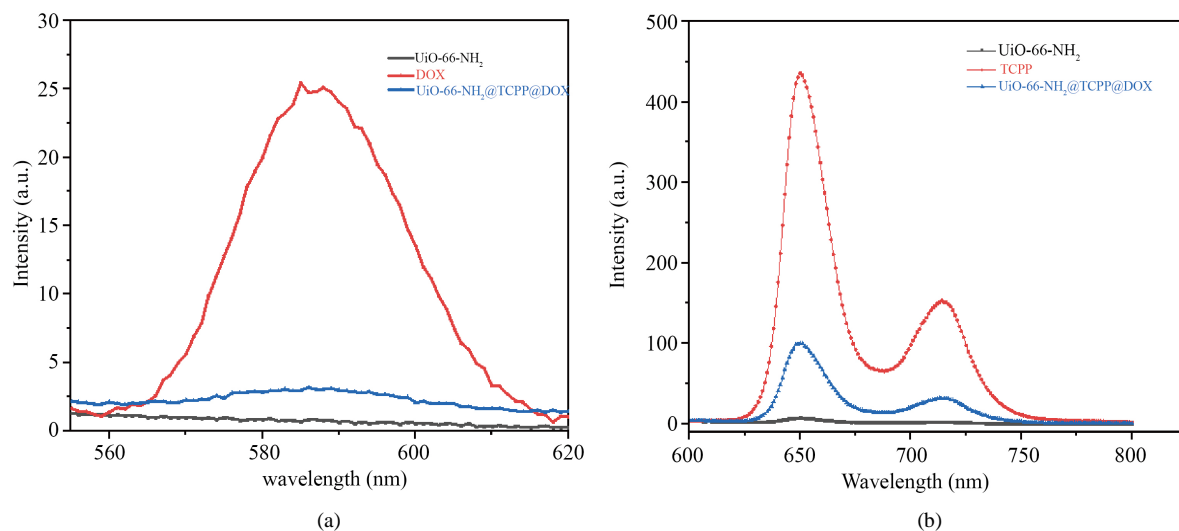
如图 3(a)所示, 以 480 nm 为激发光, 扫描 500 nm 到 620 nm 的荧光可以看到, 游离的 DOX 和 UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP@DOX 在 585 nm 左右的位置均有一定强度的荧光出现, UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP@DOX 的荧光值偏低, 可能是因为在测试荧光的条件下, 不会降解, 其孔道中负载的 DOX 没有释放出来, 据报道有些发光材料在溶液中有很高的荧光量子产率, 但在固态下荧光会急剧减弱甚至不发光[16]。而 UiO-66-NH<sub>2</sub> 并未出现荧光, 可以证明 DOX 已经被成功负载在 UiO-66-NH<sub>2</sub> 上。如图 3(b)所示, 以 514 nm 为激发光, 扫描 550 nm 到 800 nm 的荧光可以看到, 游离的 TCPP 和 UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP@DOX 在 650 nm 和 710 nm 左右的位置均有一定强度的荧光出现, 而 UiO-66-NH<sub>2</sub> 并未出现荧光, 也同样可以证明 TCPP 的成功负载。

## 3.2. 载药体系性能

### 3.2.1. 载药体系体外药物释放情况

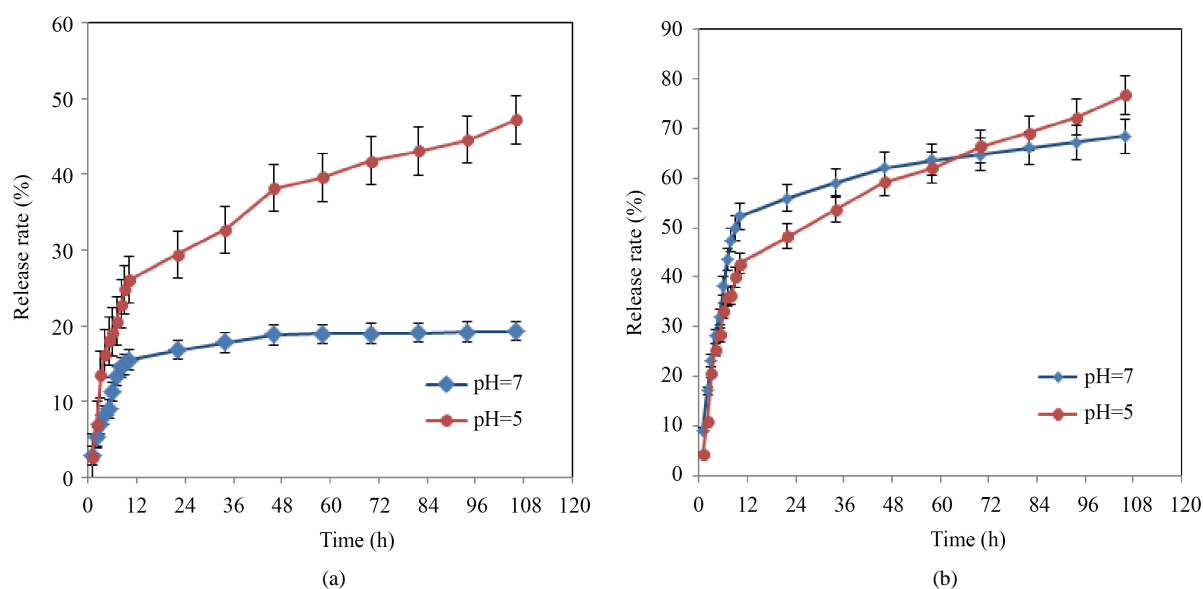
DOX 释放: 从图 4(a)中可以看出 UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP@DOX 中的 DOX 在整个 108 小时的释放过程中, 释放平稳, 并没有出现爆释现象, 说明该纳米载药体系具有一定的缓释作用。在不同的 pH 中, DOX 的整个释放情况并不相同, 相比 pH 为 7 时, pH 为 5 时 DOX 的释放情况更好, 可以达到 47.2%, 而 pH 为 7 时, 释放量仅为 19.25%。说明在微酸性的肿瘤微环境下, 纳米载体更容易降解, 从而使负载在其孔中的药物得到释放, 也说明纳米载体可以智能响应肿瘤微环境的弱酸性, 使药物得到更好的释放, 从而

减少了对正常组织的毒副作用。



**Figure 3.** Fluorescence spectra excited at 480 nm (a) and 514 nm (b)

**图 3.** 480 nm (a)和 514 nm (b)光激发的荧光光谱图



**Figure 4.** The release of DOX (a) and TCPP (b) in UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP@DOX

**图 4.** UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP@DOX 中 DOX (a)和 TCPP (b)的释放曲线

**TCPP 释放:** 从图 4(b)中可以看出 UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP 中 TCPP 在整个 108 个小时的释放过程中, 释放比较平稳, 依然是没有出现爆释现象。在不同的 pH 中, TCPP 的整个释放情况并不相同, 在前 60 个小时, pH 为 7 时 TCPP 的释放情况更好, 累计释放率更多, 但是在 60 个小时后, pH 为 5 时的累计释放率逐渐超过 pH 为 7 时的情况。且可以在图中看出, 在 12 个小时之后, pH 为 5 时的释放趋势更大, 导致最后的累计释放率高于 pH 为 7。在经过 108 个小时的释放后, pH 为 7 时的累计释放率为 68.5%, 而 pH 为 5 时的累计释放率可以达到 76.8%。

### 3.2.2. 载药体系单线态氧产生情况

细胞外单线态氧产生: TCPP 在咪唑溶液中可以产生单线态氧, 一些咪唑衍生物可以诱导对亚硝基二硝基苯(RNO)漂白, 而单线态氧不能和 RNO 发生反应, 所以 RNO 的漂白是咪唑环捕捉单线态氧, 进而生成了使 RNO 漂白的反式环氧过氧化物中间体 AO<sub>2</sub>。因此随着照射时间的增加, TCPP 产生的单线态氧将能够引起 RNO 在 440 nm 处光密度的下降, 进而体现出单线态氧的产生[17] [18]。从图 5(a)中可以看出随着时间的延长 UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP@DOX 在 440nm 处的吸光值在降低且下降趋势较为明显。而 UiO-66-NH<sub>2</sub>并未检测到在 A440 处明显的吸光值的降低。

细胞内单线态氧产生: 胞内活性氧检测主要是通过荧光探针 DCFH-DA 进行, DCFH-DA 自身是没有荧光的, 且它可以自由穿过细胞膜进入细胞, 被细胞内的活性氧氧化生成有荧光的 DCFH, DCFH 不能透过细胞膜从而可以轻易装载探针, 并通过检测 DCFH 的荧光来检测细胞内活性氧的水平。

从图 5(b)中数据可以看出, UiO-66-NH<sub>2</sub> 在照射 20 min 后的荧光强度仅为 1.697, 而 UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP@DOX 在相同条件下的荧光强度为 7.725, 不仅高于载体 UiO-66-NH<sub>2</sub> 也高于阳性对照的荧光强度, 说明 UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP@DOX 在细胞内具有很高的产生单线态氧产率, 可以用于光动力治疗。

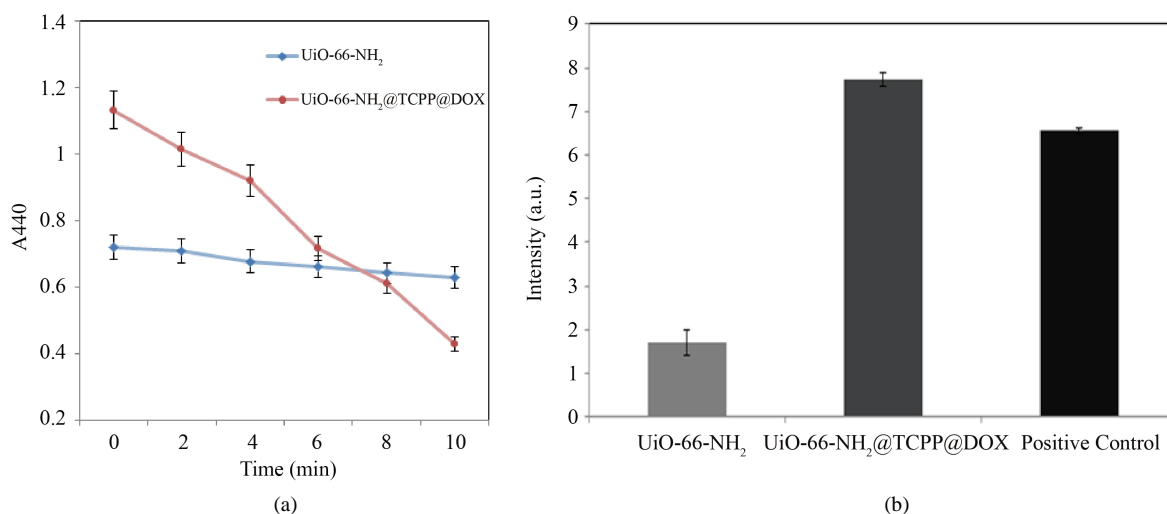


Figure 5. Singlet oxygen production of UiO-66-NH<sub>2</sub> and UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP extracellularly (a) and intracellularly (b)

图 5. UiO-66-NH<sub>2</sub> 和 UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP 细胞外(a)和细胞内(b)单线态氧产量

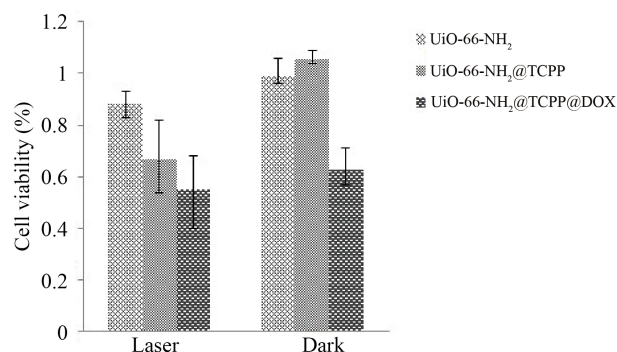
### 3.3. 细胞毒性实验

从图 6 中可以看出, 在暗反应中, UiO-66-NH<sub>2</sub> 处理的细胞存活率 99.00%, UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP 处理的细胞存活率为 100.06%, 证明载体材料 UiO-66-NH<sub>2</sub> 的生物安全性, 也说明在没有激发光的情况下, UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP 对细胞几乎没有杀伤作用, 光敏剂 TCPP 并没有发挥作用。而 UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP@DOX 中的 DOX 依然可以发挥化疗药物的作用, 此时细胞的存活率只有 62.67%; 通过单因素方差分析 UiO-66-NH<sub>2</sub>, UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP 和 UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP@DOX,  $P < 0.01$ , 说明 UiO-66-NH<sub>2</sub> 和 UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP 分别和 UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP@DOX 是具有极显著性差异的, 实验数据具有统计学意义。

在光反应中, UiO-66-NH<sub>2</sub>@TCPP 处理的细胞存活率为 67.00%, 相较于暗处理细胞存活率大大降低, 说明此时在激发光的照射下, 光敏剂 TCPP 可以发挥光动力治疗的效果。通过单因素方差分析, 在光反



应和暗反应的不同条件下, 细胞存活率的  $P$  值  $< 0.01$ , 说明  $\text{UiO-66-NH}_2\text{@TCPP}$  在暗处理和光处理条件下对细胞的杀伤效果具有显著性差异。 $\text{UiO-66-NH}_2\text{@TCPP@DOX}$  处理的细胞存活率为 55.00%, 相较于暗处理时细胞存活率 62.67%, 说明  $\text{UiO-66-NH}_2\text{@TCPP@DOX}$  中是光敏剂与化学药物的协同作用。



**Figure 6.** *In vitro* cytotoxicity of  $\text{UiO-66-NH}_2$ ,  $\text{UiO-66-NH}_2\text{@TCPP}$  and  $\text{UiO-66-NH}_2\text{@TCPP@DOX}$  against  $\text{B}_{16}\text{F}_{10}$  cells without and with laser

**图 6.**  $\text{UiO-66-NH}_2$ ,  $\text{UiO-66-NH}_2\text{@TCPP}$  和  $\text{UiO-66-NH}_2\text{@TCPP@DOX}$  在有/无激光照射下对  $\text{B}_{16}\text{F}_{10}$  的细胞毒性

#### 4. 结论

本论文将具有配位能力的光敏剂 TCPP 引入到 MOFs 的周期性网络结构中, 构建了  $\text{UiO-66-NH}_2\text{@TCPP}$ , 在其孔道中负载 DOX, 形成了复合载药体系  $\text{UiO-66-NH}_2\text{@TCPP@DOX}$ , 有效避免了光敏剂的聚集, 提高了 DOX 负载量, 利用纳米载体的 EPR 效应和在肿瘤弱酸性条件下的响应性释放, 有望增加在肿瘤部位的靶向性。DOX 的负载量为 31 wt%, TCPP 的负载量为 10.9 wt%。体外药物释放实验证明此载体具有一定的缓释效果, 且可以响应肿瘤弱酸性微环境, 实现 DOX 和 TCPP 在肿瘤部位响应性释放, 减少对正常组织的毒副作用。通过在光处理和暗处理条件下的细胞毒实验证明其在体外能够明显杀伤肿瘤细胞  $\text{B}_{16}\text{F}_{10}$ , 尤其是在 660 nm 激光照射下, 细胞存活率为 55%, 表明  $\text{UiO-66-NH}_2\text{@TCPP@DOX}$  中光敏剂协同化疗药物对肿瘤细胞的高效杀伤效果。因此, 该纳米载药体系的构建为进一步实现在生物医药领域的应用提供强有力的实验基础。同时, 在医药领域和肿瘤治疗等方面存在着潜在的应用前景。

#### 基金项目

国家自然科学基金项目 21401096; 山东省高等学校省级大学生创新创业训练计划项目 S201910451137。

#### 参考文献

- [1] Pizzuti, V.J., Viswanath, D., Won, Y.Y., *et al.* (2020) Bilirubin-Coated Radioluminescent Particles for Radiation-Induced Photodynamic Therapy. *ACS Applied Bio Materials*, **3**, 4858-4872. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c00354>
- [2] Kan, J., Jiang Y., Dong, Y., *et al.* (2018) Surface Decorated Porphyrinic Nanoscale Metal-Organic Framework for Photodynamic Therapy. *Inorganic Chemistry*, **57**, 5420-5428. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b00384>
- [3] 戴晓晖. 用于光动力治疗的多肽类卟啉药物载体的合成及其性能研究[D]: [硕士学位论文]. 镇江: 江苏大学, 2016.
- [4] Feng, J., Xu, Z., Dong, P., *et al.* (2019) Stimuli-Responsive Multifunctional Metal-Organic Framework Nanoparticles for Enhanced Chemo-Thermal Therapy. *Journal of Material Chemistry B*, **7**, 994-1004. <https://doi.org/10.1039/C8TB02815J>

- [5] Alsaiari, S.K., Patil, S., Alyami, M., *et al.* (2018) Endosomal Escape and Delivery of CRISPR/Cas9 Genome Editing Machinery Enabled by Nanoscale Zeolitic Imidazolate Framework. *Journal of the American Chemical Society*, **140**, 143-146. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b11754>
- [6] He, E., Lu, K., Liu, D., *et al.* (2014) Nanoscale Metal-Organic Frameworks for the Co-Delivery of Cisplatin and Pooled siRNAs to Enhance Therapeutic Efficacy in Drug-Resistant Ovarian Cancer Cells. *Journal of the American Society*, **136**, 5181-5184. <https://doi.org/10.1021/ja4098862>
- [7] Wang, Z., Fu, Y., Kang, Z., *et al.* (2017) Organelle-Specific Triggered Release of Immunostimulatory Oligonucleotides from Intrinsically Coordinated DNA-Metal-Organic Frameworks with Soluble Exoskeleton. *Journal of the American Society*, **139**, 15784-15791. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b07895>
- [8] Lu, K., He, C., Lin, W., *et al.* (2015) A Chlorin-Based Nanoscale Metal-Organic Framework for Photodynamic Therapy of Colon Cancers. *Journal of the American Society*, **137**, 7600-7603. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b04069>
- [9] Park, J., Jiang, Q., Feng, D., *et al.* (2016) Size-Controlled Synthesis of Porphyrinic Metal-Organic Framework and Functionalization for Targeted Photodynamic Therapy. *Journal of the American Society*, **138**, 3518-3525. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b00007>
- [10] Chen, Q., He, Q., Lv, M., *et al.* (2015) Selective Adsorption of Cationic Dyes by UiO-66-NH<sub>2</sub>. *Applied Surface Science*, **327**, 77-85. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.11.103>
- [11] Kreno, L.E., Leong, K., Farha, O.K., *et al.* (2012) Metal-Organic Framework Materials as Chemical Sensors. *Chemical Reviews*, **112**, 1105-1125. <https://doi.org/10.1021/cr200324t>
- [12] Cheng, Y., Zhang, A., Zeng, X., *et al.* (2017) Multifunctional Peptide-Amphiphile End-Capped Mesoporous Silica Nanoparticles for Tumor Targeting Drug Delivery. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **9**, 2093-2103. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b12647>
- [13] Liang, Z., Yang, Z., Zheng, H., *et al.* (2018) A Protein@Metal-Organic Framework Nanocomposite for pH Triggered Anticancer Drug Delivery. *Dalton Transactions*, **47**, 10223-10228. <https://doi.org/10.1039/C8DT01789A>
- [14] He, C., Liu, D. and Lin, W. (2015) Nanomedicine Application of Hybrid Nanomaterials Built from Metal-Ligand Coordination Bonds: Nanoscale Metal-Organic Frameworks and Nanoscale Coordination Polymers. *Chemical Reviews*, **115**, 11079-11108. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00125>
- [15] Abazari, R., Mahjoub, A.R., Ataei, F., *et al.* (2018) Chitosan Immobilization on Bio-MOF Nanostructures: A Biocompatible pH-Responsive Nanocarrier for Doxorubicin Release on MCF-7 Cell Lines of Human Breast Cancer. *Inorganic Chemistry*, **57**, 13364-13379. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b01955>
- [16] 赵秋丽, 杨庆浩. 传统生色团的改造: 从聚集导致荧光猝灭到聚集诱导发光[J]. *功能材料*, 2015, 46(14): 14001-14011.
- [17] Tian, B., Wang, C., Zhang, S., *et al.* (2011) Photothermally Enhanced Photodynamic Therapy Delivered by Nano-Graphene Oxide. *American Chemical Society Nano*, **5**, 7000-7009. <https://doi.org/10.1021/nn201560b>
- [18] Cai, H., Qiao, Q., Ren, S., *et al.* (2018) Facile Synthesis and Photocatalytic Performance of Flower-Like Ag/ZnO Nanocomposites. *Micro & Nano Letters*, **13**, 622-625. <https://doi.org/10.1049/mnl.2018.0019>