

学校编码:10384

学号:31420131150136

分类号_____密级_____

UDC_____

廈門大學

碩 士 学 位 论 文

富勒烯-环糊精/沙利度胺包合物的光动力效
应及抗血管生成作用

Photodynamic and antiangiogenic effect of
fullerene-cyclodextrin/thalidomide inclusion compound

周 童

指导教师姓名: 叶社房 副教授

专 业 名 称: 生物医学工程

论文提交日期: 2016 年 4 月

论文答辩时间: 2016 年 5 月

学位授予日期: 2016 年 月

答辩委员会主席:_____

评 阅 人:_____

2016 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其它个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月

摘 要

近年来肿瘤发病率有呈上升的趋势，由于传统治疗方法有风险大、毒副作用强等弊端，人们积极寻找更安全有效的治疗手段。光动力治疗（photodynamic therapy, PDT）具有非侵入性、可多次安全重复使用等优点。抗肿瘤血管生成治疗（antiangiogenic therapy）以肿瘤血管内皮细胞为作用靶点，系统毒性较小，不易产生耐药性，与肿瘤化学药物联用可以起到协同效应。纳米颗粒输送系统基于生物体实体瘤的高通透性和滞留效应（enhanced permeability and retention effect, EPR）或表面修饰靶向基团后，可被动或主动靶向到达肿瘤组织，起到良好的抗肿瘤作用。

本文旨在合成一种富勒烯-环糊精/沙利度胺包合物，利用包合物中的环糊精部分增强体系的生物相容性，并包合药物，利用富勒烯结构光动力作用生成活性氧簇（reactive oxygen species, ROS）杀死肿瘤细胞（肿瘤实质），利用沙利度胺药物作用杀死肿瘤血管内皮细胞（肿瘤间质），从而起到协同作用。采用该纳米药物载体，其潜在优势在于：① 生物相容性好；② 提高药物溶解度，载药率高；③ 具有被动靶向性。

本文合成了环糊精-富勒烯/沙利度胺包合物，在理化表征的基础上进行了生物学应用探讨。方法与结果如下：（1）利用乙二胺加成到富勒烯碳笼上得到氨基化富勒烯衍生物，马来酸酐与 β -环糊精反应得到羧基化环糊精，将这两者酰胺化偶联，最后利用环糊精空腔包合沙利度胺药物。通过红外光谱、质谱、紫外光谱、核磁共振等技术手段对材料结构表征分析。结果表明成功合成了富勒烯与 β -环糊精摩尔比为 1: 1 的复合物，并包合沙利度胺，载药率为 7.34%，该包合物具有较好的药物缓释能力。（2）HeLa 细胞与一系列梯度浓度包合物共培养并光照处理后：采用 MTT 法检测细胞活性，载体材料无光照条件下生物相容性很好，光照处理下会发生光动力反应，而包合物无光照条件下释放药物导致细胞毒性，光照处理下有协同效应对细胞毒性更强；添加不同的 ROS 抑制剂，用 MTT 法比较细胞活性的改变，L-组氨酸和 NAC（两种单线态氧清除剂）的添加显著提高了细胞活性，鉴别出光动力反应是 Type II 型为主；用流式细胞术检测细胞内 ROS

积累量，再进一步由 ABDA 检测单线态氧产率；用钙黄绿素/PI 双染法做活细胞/死细胞双重染色，观察细胞死亡情形；通过 Fura-2/AM 探针检测细胞内 Ca^{2+} 浓度。结果显示富勒烯-环糊精/沙利度胺包合物光照处理下会发生光动力作用，使细胞活性降低，ROS 升高， Ca^{2+} 浓度升高。（3）通过 MTT 实验、细胞划痕实验、Transwell 侵袭实验和体外小管形成实验来探讨包合物光照处理对人脐静脉内皮细胞（HUVECs）的增殖、迁移、小管形成的抑制作用。结果表明包合物的药物抗血管生成作用和光动力效应协同作用，明显抑制了 HUVEC 细胞体外血管生成。综上所述，本课题合成了一种新的环糊精-富勒烯/沙利度胺包合物，具有光动力效应和药物抗血管生成作用，可以对肿瘤实质和肿瘤间质同时作用。

关键词：富勒烯；沙利度胺；包合物；光动力治疗；抗血管生成

Abstract

Currently tumor incidence is rising year by year. Since traditional therapies have some disadvantages, such as high risk and side effects, people are seeking for safer and more effective treatment. Photodynamic therapy is non-invasive and can be repeated multiple times safely. Antiangiogenic therapy targets the tumor vascular endothelial cells, which means low systematic toxicity and not prone to be drug-resistant. Its cooperative use with antitumor can display significant synergistic effect. Nanoparticle delivery system based on the EPR effect or modified with targeting groups can be passively or actively targeting to the tumor tissue, which may show excellent antitumor effect.

Our work aims to synthesize an inclusion compound, fullerene-cyclodextrin/thalidomide. β -cyclodextrin can enhance the biocompatibility of the system and the drug can be included into its cage, fullerene can generate ROS to kill the tumor cells (tumor parenchyma), and thalidomide can kill tumor vascular endothelial cells (tumor stroma). In this way it plays a synergistic effect. The potential superiority of this nano-drug carrier is good biocompatibility, good drug solubility with high drug loading ratio and passively targeting to malignant cells.

Our paper covers the research process of the inclusion compound, including the ideas, methods, characterization and its applications. The methods and results are listed below: In Chapter 2, we obtained the fullerene amino derivatives (C_{60} -NH₂) from the addition reaction between ethylenediamine and the carboxyl cyclodextrin derivatives (MAH- β -CD) from the reaction between maleic anhydride and beta cyclodextrin. These two products were coupled through amidation reaction. Finally the drug thalidomide was included into the cage of beta cyclodextrin. We analysed the structure by FT-IR, MS, UV-Vis, NMR etc. It was confirmed that cyclodextrin-fullerene conjugate is with molar ratio 1:1. Then thalidomide was included and the drug loading ratio was 7.34%. It had drug sustained release. In Chapter 3, HeLa cells were co-cultured with inclusion compound of different concentrations and treat with light. We detected the HeLa cell viability by MTT assay,

which indicated that the carrier had no dark cytotoxicity and was biocompatible. After illumination, it had cytotoxicity because of the photodynamic effect. The inclusion compound had drug sustained-releas in dark, which lead to cytotoxicity. And it had more cytotoxicity with illumination. After cells added with different ROS scavengers we measured it again by MTT assay. L-histidine and NAC (two kinds of singlet oxygen scavengers) improved cell viability more significantly, so we make sure that the photodynamic reaction is mostly based on Type II mechanism. Relative accumulation of intracellular ROS was measured by flow cytometry and $^1\text{O}_2$ yield was measured with ABDA. We observed the cell death by calcein-AM/PI double staining. The intracellular free calcium concentration was analyzed by the fluorescent calcium indicator Fura-2/AM. The results showed that cyclodextrin-fullerene/thalidomide inclusion compound had photodynamic reaction, which lead to cell damage, the elevation of intracellular ROS and Ca^{2+} . In Chapter 4, We analyzed the inhibition of inclusion compound on HUVEC cell proliferation, migration and tube formation by MTT assay, cell scratch wound assay, Transwell invasion experiment and the tube formation assay. It showed that the inclusion compound significantly inhibited in-vitro angiogenesis because of synergistic effect. In summary, we synthesized a new kind of inclusion compound, cyclodextrin-fullerene/thalidomide, which has photodynamic effect and antiangiogenic effect. It produced effects on tumor parenchyma and stroma at the same time.

Key Words: fullerene; thalidomide; inclusion compound; photodynamic therapy; antiangiogenic therapy

目录

摘 要.....	I
Abstract.....	III
目录.....	V
Contents	VII
第一章 绪论	1
1.1 引言	1
1.2 光动力治疗	2
1.3 抗血管生成治疗	6
1.4 环糊精及其衍生物	8
1.5 本论文选题意义及研究内容	10
参考文献	13
第二章 包合物 C₆₀-β-CD/Thd 的制备与表征.....	19
2.1 引言	19
2.2 实验材料与仪器	21
2.3 实验方法	22
2.4 结果与讨论	27
2.5 本章小结	33
参考文献	34
第三章 包合物 C₆₀-β-CD/Thd 的光动力作用研究.....	36
3.1 引言	36
3.2 实验材料与仪器	37
3.3 实验方法	38
3.4 结果与讨论	43
3.5 本章小结	49

参考文献	51
第四章 包合物 C₆₀-β-CD/Thd 的抗血管生成作用研究.....	54
4.1 引言	54
4.2 实验材料与仪器	55
4.3 实验方法	55
4.4 结果与讨论	58
4.5 本章小结	63
参考文献	64
第五章 全文总结和展望	67
5.1 总结	67
5.2 展望	68
硕士期间发表论文	69
致 谢.....	70

Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Review	1
1.1 Introduction.....	1
1.2 Photodynamic therapy.....	2
1.3 Antiangiogenic therapy	6
1.4 Cyclodextrin and its derivatives	8
1.5 The proposal and contents of this study.....	10
References.....	13
Chapter 2 The preparation and characterization of the inclusion compound C₆₀-β-CD/Thd	19
2.1 Introduction.....	19
2.2 Materials and instruments	20
2.3 Methods.....	22
2.4 Results and Discussion.....	26
2.5 Summary.....	32
References.....	33
Chapter 3 The PDT effect of the inclusion compound C₆₀-β-CD/Thd	35
3.1 Introduction.....	35
3.2 Materials and instruments	36
3.3 Methods.....	37
3.4 Results and Discussion.....	42
3.5 Summary.....	48

References.....	50
Chapter 4 The antiangiogenic effect of the inclusion compound	
C₆₀-β-CD/Thd	52
4.1 Introduction.....	52
4.2 Materials and instruments	53
4.3 Methods.....	55
4.4 Results and Discussion.....	56
4.5 Summary.....	61
References.....	62
Chapter 5 Conclusion and outlook.....	65
5.1 Conclusion	65
5.2 Outlook.....	66
Research achievements.....	67
Acknowledgements	68

第一章 绪论

1.1 引言

纳米科技 (nanotechnology): 以研究与制备纳米材料 (nanomaterial) 为核心, 探索纳米物质的结构特性, 以及研究原子、分子及纳米结构单元之间的相互作用的科学与技术^[1]。纳米科技领域中的许多学科相互渗透和融合, 也给它的发展注入了源源不绝的活力, 推动了新成果的不断涌现。纳米材料是纳米科技的基础与核心, 由纳米粒子 (nanoparticle) 组成。纳米材料的四大基本效应是小尺寸效应、宏观量子隧道效应、表面与界面效应、量子尺寸效应^[2]。当材料尺寸达到纳米尺度, 其物理化学性质相对常规尺寸的材料会产生很大区别, 其中部分性能十分具有应用价值。纳米材料已经在许多领域中展示出良好的应用前景, 那些未解开的课题上笼罩的神秘帷幕正亟待科研工作者去解开。人类希望在单个原子或分子的层面上按照意愿和需求进行任意操纵, 从而制备出全新的物质, 这个想象愿景令人激动不已, 未来科技的进步让人期待。近几十年纳米科技一直是全球科研的热点, 它注定会把人类带入一个神奇的时代, 下一次工业革命将会由此引领^[3]。

20 世纪 80 年代科学家提出纳米这一概念, 随着 TEM、SEM 检测手段的发展, 人们对纳米尺度世界投入了极大关注。纳米材料很快就被尝试用于生物医学领域, 这一点也给生物医学工程的进一步发展提供了更广阔的平台。例如纳米陶瓷材料已经开始用于人工器官制造 (如人工关节等)^[4]; 纳米碳材料中纳米碳纤维可以吸附特定成分或病毒, 也可以制造人工器官, 碳纳米管可以用于癌细胞成像^[5]; 纳米高分子材料在免疫分析、药物载体及分离生物大分子等方面也逐渐显示出巨大的应用潜能^[6]。

1985 年, Kroto 等^[7]通过控制反应条件同时得到了 C_{60} 和 C_{70} 两种物质。富勒烯 (fullerene, C_{60}) 由六十个碳原子构成, 直径 0.7 nm 左右, 由于其具有小尺寸、大比表面积、高反应活性等特点, 科研工作者对它产生了巨大的研究热情^[8]。富勒烯随后在技术应用和医学领域等开始了尝试性应用。

沙利度胺 (thalidomide, Thd) 是人工化合的谷氨酸衍生物, 最初作为镇静剂

使用，后来被发现具有一定的抗肿瘤作用，并可以抑制肿瘤周边血管生成^[9, 10]。

1891年 Villiers 等^[11]通过降解淀粉分离得到环糊精（cyclodextrin, CD），环糊精由环状葡萄糖低聚物构成，可以和小分子或大分子的部分形成水溶性包合物。环糊精的生物相容性较好，对生物体毒性低，已经应用到药物领域，用来提高药物的生物相容性等^[12]。

1.2 光动力治疗

1.2.1 光动力治疗原理

光动力治疗（photodynamic therapy, PDT）是一种利用光动力作用选择性治疗病变的方法，光敏剂、光和氧分子是该过程的三大要素。PDT最大的优势在于非侵入性、可以多次重复安全使用和无暗毒性。光动力反应过程如图1-1所示^[13]。单重态基态（ S_0 ）的电子吸收光子能量后被激发到单重态激发能级（ S_1 ），通过振动弛豫/内转化弛豫到激发态最低能级，维持纳秒量级的寿命后，再通过非辐射弛豫/荧光发射回到基态（ S_0 ）^[14]。处于 S_1 的电子可以通过系间跨越到激发三重态（ T_1 ），处于 T_1 的电子也可以通过非辐射弛豫/磷光发射回到 S_0 。处在 T_1 的光敏剂可以激发两种光氧化反应，Type I反应和Type II反应^[15]。其中Type I反应是光子直接从光敏剂转移至细胞内，产生的自由基会与氧分子反应生成多种活性氧簇（ROS），如过氧化氧（ H_2O_2 ）、羟基自由基（ $\cdot OH$ ）等。Type II反应是光敏剂与氧分子反应产生另一些ROS，如单线态氧（ 1O_2 ）。这两种光氧化反应互相竞争，能够导致细胞内产生氧化应激，导致细胞死亡。

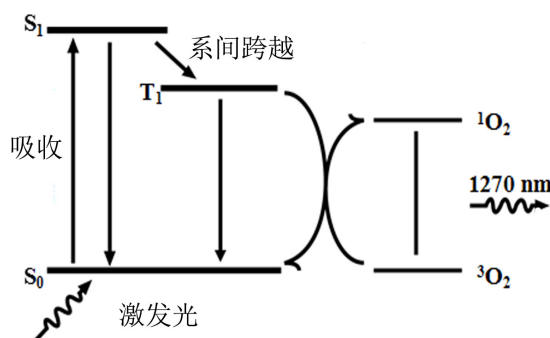


图 1-1 光动力反应过程

Figure 1-1 The process of photodynamic reaction

光敏剂是一类可以选择性地富集于作用部位的化学物质,被一定波长的光激发后会发生光化学反应。因为肿瘤细胞比正常细胞有更多的低密度脂蛋白受体,亲脂性的光敏剂易富集于肿瘤实质,而亲水性光敏剂更易富集于肿瘤间质和血管组织^[16]。光敏剂用于肿瘤治疗至少有四十年了,光动力治疗 PDT 能针对性杀伤肿瘤细胞、对正常组织无害、系统影响小等特点,因此对光敏剂的研究也不断推进。第一代光敏剂主要是混合叶啉类光敏剂,以癌卟啉(Hematoporphyrin derivative, HpD)为代表,其应用与研究也最详细,后来又从 HpD 中分离纯化出光敏素 2 (photofrin 2),而中国成功研制了癌光卟啉、癌光卟啉、光卟啉三种混合卟啉制剂,并成功用于国内的临床治疗^[17]。第二代光敏剂大多是单体化合物(包括酞菁、卟啉衍生物、叶绿素降解衍生物等),在 600-700 nm 的吸收系数较高。第三代光敏剂是在第二代光敏剂上的基础上继续研发,通过偶联生物化学分子,如氨基酸、蛋白质、脂质体、抗原、抗体等,使之具有某些生物特性,对肿瘤组织的选择性进一步提高,光敏剂靶向给药能力更强,从而发挥光动力治疗和药物治疗的协同效应。

目前对光敏剂的进一步研究是希望提高光敏剂对肿瘤组织的更强识别能力,或是利用光敏剂的介导功能,将抗癌药物推送到靶组织,从而发挥协同作用。理想的光敏剂最好应具备组分明确、来源广泛、易于制备、暗毒性低、选择性强、 $^1\text{O}_2$ 量子产率高等几个基本特征^[18]。

1.2.2 富勒烯及其衍生物

富勒烯的独特结构决定了它有许多特殊的性能。 C_{60} 作为富勒烯一族中的典型,其相关研究在世界材料发展史中占有重要地位。富勒烯化学结构如图 1-2 所示。单个富勒烯分子是凸三十二面体,分子直径约 0.7 nm,由十二个五元环和二十个六元环组成,其中五元环由单键构成,六元环由单双键交替构成,碳原子杂化方式处于 sp^2 和 sp^3 杂化之间。

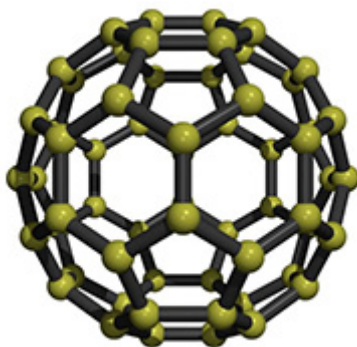


图 1-2 富勒烯 C₆₀ 的化学结构
Figure 1-2 Chemical structure of fullerene C₆₀

富勒烯 C₆₀ 的主要物理性质如表 1-1 所示^[19]。

表 1-1 C₆₀ 的主要物理性质
Table 1-1 The main physical properties of C₆₀

性质	C ₆₀
分子结构	凸三十二面体
分子大小	直径约 7.1 Å
密度	1.68 g/cm ³
颜色	溶于苯中显紫红色
导电性	不导电
溶解性	疏水

大部分生物反应体系基本在水环境中进行,而富勒烯的疏水性严重限制了其运用到生物学相关领域。因此人们积极开展水溶性富勒烯衍生物的相关研究,目前已合成的富勒烯衍生物材料已被证明可用于光学材料、超导体材料、高分子材料和生物材料等方面。其中富勒烯衍生物在生物医药领域的应用一直受到关注,包括抗病毒作用、抗氧化性、光动力治疗、药物载体等,具体如下:① 抗病毒作用:一种糖基修饰富勒烯的衍生物——富勒烯糖球在埃博拉病毒感染模型中有优异的抗病毒效果,有望进一步应用^[20];② 抗氧化性:C₆₀ 被喻为“游离基海绵”,不少富勒烯衍生物已被证明有良好的抗氧化性能。Lao 等^[21]发现羟基化富勒烯衍生物 C₆₀(OH)₂₂ 和丙二酸富勒烯衍生物 C₆₀(C(COOH)₂)₂ 通过清除一氧化氮(NO)保护老鼠大脑脑微血管内皮细胞(CMECs)。此外,富勒烯衍生物也可以防止 NO 诱导细胞骨架解聚和细胞核损伤,加速内皮细胞修复;③ 光动力治疗:Tabata 等^[22]就合成了水溶性的聚乙二醇富勒烯衍生物 C₆₀-PEG,静脉注射小鼠后,

在肿瘤组织显著富集，可见光（400-505 nm, 89.2 mW/cm²）照射后肿瘤体积的增长被抑制。Mroz 等^[23]用亲水性基团或阳离子基团修饰富勒烯后，分别与三种鼠细胞系(J774、LLC 和 CT26)共培育 24 h 后，用白光(400–700 nm, 150 mW/cm²)照射后具有显著的光动力效果，发现单阳离子修饰的富勒烯衍生物具有很高的光动力活性，由活性氧簇（ROS）探针检测出其光动力机制主要是 Type I 机制（能量转移途径）。Li 等^[24]发现富勒烯氨基酸衍生物与人肝癌细胞共培育后，经白炽灯（75 W）光照（0-60 min）后癌细胞大量死亡。

富勒烯 C₆₀ 是一种闭环纳米碳材料，由于富勒烯 C₆₀ 扩展的 π 键共轭，它可以吸收紫外光和可见光，具有很高的三重态产率，是已报道的光敏剂中单线态氧产率最高的，高达 95%，因此它在光动力治疗方面具有很高的应用可能。Yamakoshi 等^[25]研究富勒烯的光动力机制时，发现 C₆₀ 在非极性溶剂中受激发主要生成超氧阴离子自由基 O₂^{-•} 和羟自由基 •OH，而在极性溶剂中更易生成 ¹O₂，特别是在 NADH（一种还原性还原型辅酶 I）存在的情况下。Miyata 等^[26]合成一种水溶性富勒烯/聚乙烯吡咯烷酮（C₆₀/PVP）体系，利用电子顺磁共振（electron paramagnetic resonance, EPR）自旋捕获方法仅检测到 O₂^{-•} 和 •OH 的生成，这表明 C₆₀^{-•} 与分子氧之间发生电子转移反应。Yu 等^[27]合成的六磺丁基富勒烯（FC4S）相比于 C₆₀/γ-环糊精的包合物体系单线态产率为 0.36，说明了其中的机制是 Type I 能量转移。

C₆₀ 生成 ROS 的过程如图 1-3 所示^[25]。

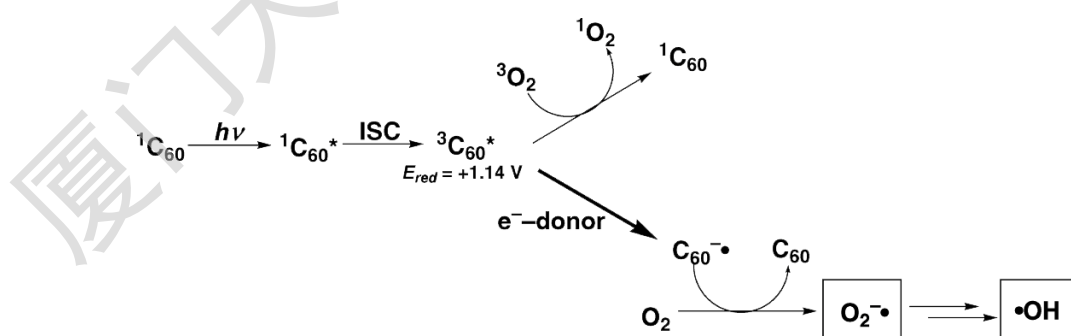


图 1-3 C₆₀ 生成 ROS 过程

Figure 1-4 The process of ROS generation by fullerene

富勒烯 C₆₀ 较独特的生物学活性可以总结为光敏性作用和非光敏性作用，其中光敏性作用与富勒烯在氧存在时受光激发产生 ROS 有关，包括光诱导断裂

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.