

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 32720131150560

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

智能复合纳米颗粒用于诊断治疗一体化的 应用研究

Activatable Hybrid Nanoparticles for Cancer Theranostic

张力文

指导教师姓名: 朱雷 副教授

专 业 名 称: 流行病学与卫生统计学

论文提交日期: 2016 年 4 月

论文答辩日期: 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他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(朱雷)课题(组)的研究成果,获得(朱雷)课题(组)经费或实验室的资助,在(影像暨转化医学)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): 张力文

2016年5月24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）：张力文
2016 年 5 月 24 日

摘要

众所周知癌症已经成为人类在健康领域中面临的重大问题。临床研究控制和治愈肿瘤最有效的方式是实现早期的诊断和治疗，而如何使肿瘤早期诊断成为现实，提高治疗效果已成为这一研究领域的热门话题。纳米医学，即纳米技术在医学中的应用，推动了脂质体，纳米颗粒，胶束等载药型纳米颗粒的发展。重要的是这些医学纳米材料作为有效的诊断治疗试剂用于多种疾病的诊断和治疗。一个优秀的纳米材料应该具备多重优势：(1)实现肿瘤或其他疾病的早期可视化，(2)有效转运药物到目标部位，(3)诊断治疗试剂在体内的分布以及(4)使用可视化的治疗策略降低毒副作用。因此，优秀的纳米材料在诊断治疗领域有着举足轻重的作用。

在第二章中，我们研发荧光染料 Cy5.5 标记的透明质酸，通过装载硫化铜，构成纳米颗粒 (HANPC)。硫化铜拥有较好的近红外吸收特性，可用于光声成像和肿瘤光热治疗。在这个系统中，经 Cy5.5 荧光信号与纳米颗粒内部 CuS 发生淬灭，直到整个纳米颗粒被透明质酸酶分解，荧光才得以恢复。此外，尾静脉注射 HANPC 到 SCC7 荷瘤小鼠体内，肿瘤部位观察到明显的荧光/光声信号，同时进行激光辐射，肿瘤产生明显的抑制效果。

为了进一步提高光转换效率并且改善当前纳米材料的肿瘤消融效果。在第三章中，我们通过金纳米颗粒生长在氧化石墨烯 (GO) 表面，研发一种荧光/光声成像指导的光热试剂。Cy5.5 标记的基质金属蛋白酶-14 基质 (CP) 化学修饰到石墨烯/金纳米复合物上，形成可活化诊断治疗试剂 (CPGA)。淬灭状态下的 CPGA 可以被金属基质蛋白酶 MMP-14 分解，从而使荧光得以恢复。研究还发现发现石墨烯/金复合物具有更高的光热效应。尾静脉注射 CPGA 到 SCC7 荷瘤小鼠，肿瘤区域的荧光和光声信号随着时间的推移增加，其峰值出现在注射后第 6 小时。经该纳米复合物介导的光热治疗对肿瘤组织产生更强的抑制作用。

总而言之，本论文较完整的描述了两种可视化纳米材料在诊疗一体化中的应用。我们的研究为了鼓励这种靶向性多功能纳米复合物的生物医学应用，尤其是癌症治疗诊断学。

关键词：透明质酸纳米颗粒 石墨烯 金纳米颗粒 光热治疗 荧光成像 光声成像

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

It is well known that cancer has become a major problem in the field of human health. The clinical study find that early diagnosis and treatment are useful methods to control and treat tumor. It has become a hot topic in these research to achieve early diagnosis of tumors as well as improve the therapeutic effect. Nanomedicine, the application of nanotechnology in medicine, promotes development of liposomes, nanoparticles, micelles and other drug-loaded nanoparticles. Above all, these materials in nanomedicine as effective theranostic agents can be used for diagnosis and therapy of various diseases. An ideal nanomaterial will provide: (1) early visualization of tumors or other disease sites, (2) effective delivery of drugs into the site of interest, (3) distribution of the theranostic agent in *vivo*, and (4) optimized therapeutic strategy to reduce adverse side effects. Therefore, excellent nanomaterials play an important role in diagnosis and treatment fields.

In the second chapter, we developed a multifunctional nanocomposite by loading copper sulfide (CuS) into Cy5.5-conjugated hyaluronic acid nanoparticles (HANP), forming an activatable Cy5.5-HANP/CuS (HANPC) nanocomposite. CuS with strong NIR absorbance became an excellent contrast agent for photoacoustic (PAI) imaging and photothermal therapy (PTT). In this system, Cy5.5 fluorescent signal was quenched by CuS inside the particle. when the whole nanocomposite was degraded by hyaluronidase, strong fluorescence signals were monitored in the tumor site. After intravenous administration of HANPC into SCC7 tumor-bearing mice, high fluorescence and PA signals were observed in the tumor site. In addition, tumors were then irradiated with a laser, and then an outstanding tumor inhibition rate was observed.

In order to further improve the light conversion efficiency and tumor ablation effect of nanomaterials. In the third chapter, we developed a fluorescent/PAI guided PTT agent by seeding Gold (Au) nanoparticles onto graphene oxide (GO). Near infrared dye labeled- matrix metalloproteinase-14 (MMP-14) substrate (CP) was conjugated onto the GO/Au complex (GA), forming activable tumor theranostic probe (CPGA). Quenched CPGA could be degraded by MMP-14, recovering fluorescence signal. We also fund that the photothermal effect of hybrid GA was found significantly elevated compared with Au or GO alone. After the travenous administration of CPGA, high fluorescence and PA signals were measured in the tumor area over time, which peaked

at the 6 h time point. an excellent tumor inhibition was then observed without recurrence.

In summary, this paper described two activatable nanomaterials for theranostic integration. Our research encourage the biomedical application of these multifunctional nanocomposites, especially in the diagnosis and treatment of cancer.

Keywords: Hyaluronic Acid Nanoparticles; Graphene; Gold Nanoparticles; Photothermal Therapy; Fluorescence Imaging; Photoacoustic Imaging.

厦门大学博硕士论文摘要库

目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
第 1 章 绪论.....	1
1.1 研究课题背景	1
1.2 常见的纳米载体	1
1.2.1 透明质酸纳米颗粒.....	2
1.2.2 石墨烯.....	3
1.3 智能纳米材料	3
1.3.1 酶活化的纳米材料.....	3
1.3.2 活性氧活化的纳米材料.....	6
1.3.3 pH 活化的纳米材料.....	7
1.3.4 光活化的纳米材料.....	7
1.4 成像方法的分类	8
1.4.1 光学成像.....	8
1.4.2 光声成像.....	9
1.4.3 磁共振成像.....	9
1.5 光热治疗	10
1.5.1 金纳米颗粒.....	11
1.5.2 碳纳米管.....	11
1.6 诊疗一体化的研究进展	13
1.7 本课题的主要研究内容	14
第 2 章 可活化透明质酸在诊断治疗一体化中研究.....	15
2.1 引言.....	15
2.2 实验材料及仪器	16
2.2.1 实验材料及试剂.....	16
2.2.2 实验仪器.....	16
2.2.3 实验所需动物及细胞系.....	17
2.2.4 常用溶液的配制.....	17
2.3 实验方法	18

2.3.1 HANP 的制备方法.....	18
2.3.2 HANPC 的制备方法.....	18
2.3.3 HANPC 的体外表征.....	19
2.3.4 HANPC 的酶促反应实验.....	19
2.3.5 HANPC 的体外光热效果.....	20
2.3.6 HANPC 的体外光声信号.....	20
2.3.7 肿瘤细胞摄取实验.....	20
2.3.8 细胞毒性研究.....	21
2.3.9 多模态成像.....	21
2.3.10 肿瘤光热治疗.....	21
2.3.11 统计学处理及分析.....	22
2.4 实验结果与讨论.....	22
2.4.1 体外表征.....	22
2.4.2 确定 CuS 装载率和包封率.....	23
2.4.3 酶促反应实验.....	24
2.4.4 体外光热实验.....	26
2.4.5 体外光声信号.....	27
2.4.6 细胞摄取实验.....	27
2.4.7 细胞毒性研究.....	28
2.4.8 多模态成像.....	30
2.4.9 生物分布.....	31
2.4.10 肿瘤光热治疗.....	33
2.4.11 体内毒性测试.....	34
2.5 本章小结.....	36
第 3 章 可活化石墨烯纳米复合物在诊断治疗一体化中的研究.....	37
3.1 引言.....	37
3.2 实验材料及仪器.....	38
3.2.1 实验材料及试剂.....	38
3.2.2 实验仪器.....	39
3.2.3 实验所需动物及细胞系.....	40
3.2.4 常用溶液, 试剂及培养基的配制.....	40
3.3 实验方法.....	40

3.3.1 MMP-14 敏感基质多肽的制备	41
3.3.2 CPGA 纳米复合物的制备	41
3.3.3 CPGA 的体外表征	42
3.3.4 CPGA 的体外光声成像	42
3.3.5 CPGA 的酶促反应实验	43
3.3.6 CPGA 的体外光热实验	43
3.3.7 CPGA 的体内多模态成像	43
3.3.8 增强的肿瘤光热治疗	44
3.3.9 统计学处理及分析	44
3.4 实验结果与讨论	45
3.4.1 CPGA 的制备	45
3.4.2 体外表征	45
3.4.3 体外光声成像	48
3.4.4 酶促反应实验	49
3.4.5 体外光热实验	50
3.4.6 多模态成像	51
3.4.7 生物分布	53
3.4.8 增强的肿瘤光热治疗	54
3.4.9 安全性评价	56
3.5 本章小结	56
结论和展望	58
参考文献	59
硕士期间论文发表情况	68
硕士期间获奖情况	69
致 谢	70

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Research Background	1
1.2 Common Nanocarriers	1
1.2.1 Hyaluronic acid nanoparticles.....	2
1.2.2 Graphene	3
1.3 Smart Nanomaterials	3
1.3.1 Enzyme-activated nanomaterials	3
1.3.2 ROS-activated nanomaterials.....	6
1.3.3 pH-activated nanomaterials	7
1.3.4 Light-activated nanomaterials.....	7
1.4 Classification of Imaging Methods	8
1.4.1 Optical imaging.....	8
1.4.2 Photoacoustic imaging.....	9
1.4.3 Magnetic resonance imaging.....	9
1.5 Photothermal Therapy	10
1.5.1 Gold nanoparticles	11
1.5.2 Carbon nanotubes.....	11
1.6 The Research of Theranostics	13
1.7 The main research contents of this paper	14
Chapter 1 Activatable Hyaluronic Acid in Theranostics	15
2.1 Introduction of HANPC	15
2.2 Materials and Equipments	16
2.2.1 Materials and reagent.....	16
2.2.2 Equipments	16
2.2.3 Animals and cell line.....	17
2.2.4 The preparation of the reagent	17
2.3 Methods	18
2.3.1 Synthesis of HANP	18
2.3.2 Synthesis of HANPC	18
2.3.3 Characterization of HANPC	19

2.3.4 Enzyme activation of HANPC.....	19
2.3.5 In vitro photothermal ablation of HANPC.....	20
2.3.6 In vitro photoacoustic signal of HANPC.....	20
2.3.7 Cell internalization of HANP.....	20
2.3.8 Cytotoxicity test.....	21
2.3.9 Multimodality imaging.....	21
2.3.10 Tumor photothermal therapy.....	21
2.3.11 Statistical processing and analysis.....	22
2.4 Result and Discussion.....	22
2.4.1 Characterization.....	22
2.4.2 CuS loading efficiency.....	23
2.4.3 Enzyme activation.....	24
2.4.4 In vitro photothermal ablation test.....	26
2.4.5 In vitro photoacoustic signal test.....	27
2.4.6 Cell internalization.....	27
2.4.7 Cytotoxicity test.....	28
2.4.8 Multimodality imaging.....	30
2.4.9 Bio-distribution test.....	31
2.4.10 Tumor photothermal therapy.....	33
2.4.11 H&E staining.....	34
2.5 Conclusion.....	36
Chapter 3 Activatable Graphene Nanocomposites in Theranostics..	37
3.1 Introduction of CPGA.....	37
3.2 Materials and Equipments.....	38
3.2.1 Materials and reagent.....	38
3.2.2 Equipments.....	39
3.2.3 Animals and cell line.....	40
3.2.4 The preparation of the reagent.....	40
3.3 Methods.....	40
3.3.1 Synthesis of MMP-14 sensitive substrate peptide.....	41
3.3.2 Synthesis of CPGA.....	41
3.3.3 Characterization of CPGA.....	42
3.3.4 In vitro photoacoustic imaging of CPGA.....	42
3.3.5 Enzyme activation of CPGA.....	43
3.3.6 In vitro photothermal ablation test of CPGA.....	43

3.3.7 In vivo Multimodality imaging.....	43
3.3.8 Enhanced Tumor photothermal therapy.....	44
3.3.9 Statistical processing and analysis.....	44
3.4 Result and Discussion	45
3.4.1 Synthesis of CPGA	45
3.4.2 Characterization	45
3.4.3 In vitro photoacoustic imaging	48
3.4.4 Enzyme activation.....	49
3.4.5 In vitro photothermal ablation test.....	50
3.4.6 Multimodality imaging	51
3.4.7 Bio-distribution test	53
3.4.8 Enhanced tumor photothermal therapy.....	54
3.4.9 Safety evaluation.....	56
3.5 Conclusion	56
Conclusions and Prospectives.....	58
References.....	59
Publications list	68
Award and honor	69
Acknowledgement.....	70

第1章 绪 论

1.1 课题研究背景

随着全球肿瘤人数的急剧增长,医学成像和新型治疗方式在癌症的早期诊断和治疗中起着举足轻重的作用。常用的医学诊断设备有 SPECT、PET、MRI 等,这些设备具有分辨率高,特异性好,可信性高等优点。此外,使用这种非侵入的方法,能以较快速度,较低痛苦对病人进行的癌症早期诊断。目前,化疗、手术治疗、放疗是治疗癌症的主要方式。但是,这些治疗方式仍旧存在一些问题,例如,进行手术切除肿瘤时,病灶往往难以清除干净,肿瘤易复发。放疗的同时引起免疫功能降低、骨髓抑制等毒副作用,严重损害机体的健康。随着肿瘤治疗技术的不断发展和完善,许多新型的治疗方法被越来越多的人所接受,比如,微创介入治疗、光热治疗、光动力治疗、射频治疗等。这些新型治疗方式都具有损害小、安全高、特异性好等优点。临床研究发现,疾病诊断和治疗相互分离不仅效率低下,耗费了大量的人力物力财力。因此,如何利用疾病成像和治疗的优势互补,实现诊断治疗一体化,成为这一领域中的热点问题。

1.2 常见的纳米载体

纳米载体主要是一些胶体尺寸的颗粒,包括脂质体,聚合物,无机材料等^[1]。由于它们特有的物理化学性质,这些材料被广泛的用于药物转运系统(图 1.1)。接下来将描述几种优秀的纳米载体用于药物转运和肿瘤靶向等作用。

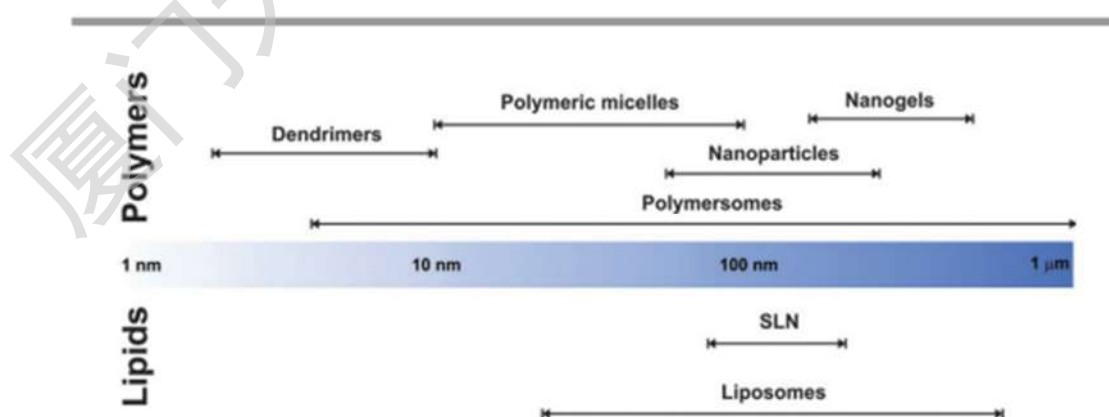


图 1.1 基于脂质体和聚合物的纳米载体在药物转运和机体靶向中的应用。

Figure 1.1 Lipid and polymer-based nanoparticulate systems used in the field of drug delivery and active targeting.

1.2.1 透明质酸纳米颗粒

近年来,透明质酸(hyaluronic acid, HA)在纳米医学领域作为理想的智能载体受到广泛的关注^[2, 3]。由于HA具有很强的亲水性,通过疏水性化合物5 β -胆烷酸(CA)的疏水性修饰形成双亲性化合物。这种双亲性嵌段共聚物在极性溶液中形成胶束。该胶束具有“核-壳”结构、药物缓释等、低临界胶束浓度特性,是各类药物尤其是疏水性药物良好的载体。Ki Young Choi等人通过HANP装载疏水性药物阿霉素和喜树碱,改善药物水溶性的同时增加药物在靶向部位递送量^[4]。这种纳米药物投送系统具有多种优良特性(图1.2): (1)形成的透明质酸纳米颗粒(HANP)具有良好的水溶性、稳定性、低毒、体内可降解、免疫原性低且价格便宜等优点。(2)HANP独有的肿瘤双靶向作用,即HANP与肿瘤细胞膜表面过度表达的CD44分子特异性结合,并通过细胞的内吞作用进入胞内,实现肿瘤细胞的主动靶向性^[5];另一方面,HANP的粒径约为200 nm,能够通过实体瘤的高通透性和滞留效应(EPR)被动聚集在肿瘤细胞,提高肿瘤靶向性。通过双靶向作用,大大提高了肿瘤对HANP及其装载药物的摄取^[6]。(3)HANP的体内可降解性。HANP被肿瘤细胞中透明质酸酶(主要是透明质酸酶1和2)分解,释放药物^[7]。(4)HANP为药物提供缓释作用,对治疗药物的水溶性也无严格限制。这种药物含有亲水外壳可逃避单核巨噬细胞的吞噬,延长其血液半衰期^[8]。(5)HANP含有大量的化学基团,可进行共价修饰^[9]。因此HANP作为理想的智能可降解纳米载体,具有广泛的医学应用前景。

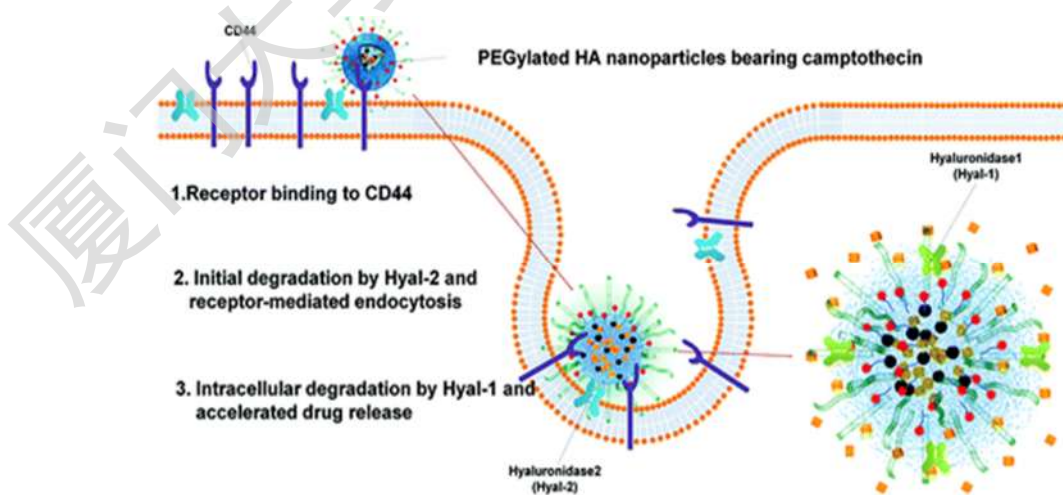


图 1.2 透明质酸纳米颗粒的细胞摄取通路和药物释放行为。

Figure 1.2 Hyaluronic acid nanoparticle of hypothetical cellular uptake pathways and subcellular drug release behaviors.

1.2.2 石墨烯

纳米石墨烯 (Graphene, GO) 从石墨材料中剥离出来的一种碳原子构成的新材料^[10]。石墨烯不仅广泛用于超级电容器, 储氢材料, 光学材料等领域, 同时也可以应用抗生作用, 多模态成像指导的治疗, 基因/药物递送等生物医学领域^[11]。石墨烯在生物医学领域中具有多重优势: (1) 其缺陷和边缘的位置存在许多活性的环氧基、羧基、羟基等化学基团, 可以通过共价键的方式进行修饰。例如, 使用亲水性很强的聚乙二醇 (PEG) 修饰石墨烯进而提高其稳定性, 生物相容性, 减少细胞的非特异性吸附^[12]。Bao 等人通过壳聚糖与石墨烯共价链接用于基因输送和药物递送^[13]。此外, Ling 及其同事在石墨烯上修饰聚丙烯酸增加其生物相容性^[14]。(2) 石墨烯及其衍生物的表面可以镶嵌一些纳米颗粒, 例如金, 银, 铜, 氧化锌等。Chensu Wang 等人通过石墨烯表面修饰金纳米簇用于药物递送和肿瘤成像^[15]。Zhang 等人发表文章认为石墨烯与 Fe_3O_4 结合作为一种新型的造影剂用于磁共振成像和细胞标记^[16]。(3) 经 PEG 修饰的石墨烯具有强烈的近红外吸收特性, 可用于肿瘤的光热治疗, 光动力治疗等新型治疗方式。例如, Jung HS 等人使用透明质酸装载石墨烯, 在激光照射作用下治疗皮肤癌^[17]。Huang 等人用二氢卟吩修饰到含在有叶酸的石墨烯上实现叶酸主动靶向的同时, 通过激光照射肿瘤部位实现光动力治疗的目的^[18]。(4) 由于肿瘤血管的 EPR, 石墨烯具有很高的肿瘤被动靶作用, 有效富集到肿瘤部位。由于其具有多重优势以及独特的生物化学特性, 石墨烯非常有希望作为优秀的纳米材料用于药物转运, 肿瘤治疗, 组织成像等生物医学领域^[19, 20]。

1.3 智能纳米材料

1.3.1 酶活化的纳米材料

目前, 可活化的纳米颗粒在生物医学成像领域得到越来越多的关注。与一般纳米颗粒相比, 可活化材料具有更强的目标性和特异性。这种可活化的纳米材料在机体初始条件下维持淬灭状态, 当接触到特定物质时 (酶, 光, Ph 等), 纳米材料被激活, 特殊性能被释放^{[21] [22]}。

细胞中的重要物质, 酶, 涉及多种重要的生理, 病理过程^[23]。酶可活化的纳米材料是最常用的智能纳米材料之一^[24]。Anca Dragulescu-Andrasi 和同事发明可激活的聚合显像剂用于光声成像^[25]。在聚合物探针的两端连接两亲性的分子半胱

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.