纳米光敏剂 $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Tm}@\text{NaGdF}_4:\text{Yb}@\text{SiO}_2@\text{TiO}_2\text{-Au}$ 的制备和碘标记性能

胡静慧¹, 曹潇楠¹, 董孟杰^{2*}, 刘振锋², 王寅峰¹, 方悦¹, 何伊静¹, 宫培军^{1*}

1. 浙江师范大学, 先进催化材料教育部重点实验室, 金华 321004;

2. 浙江大学医学院附属第一医院核医学科PET中心, 杭州 310003

* 联系人, E-mail: dongmengjie@126.com; skygpj@zjnu.cn

2019-06-17 收稿, 2019-08-26 修回, 2019-09-04 接受, 2019-09-12 网络版发表

浙江省公益技术应用研究计划(2016C31014)和国家级大学生创新创业训练计划(201810345040)资助

摘要 上转换纳米颗粒为发展深组织下肿瘤的成像和光动力治疗(PDT)提供契机. 良好的活性氧物种(ROS)产生能力和显像灵敏度是光敏剂应用于肿瘤诊疗的前提. 本研究采用吸附法将Au纳米粒(AuNPs)与聚乙烯亚胺修饰的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Tm}@\text{NaGdF}_4:\text{Yb}@\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ 纳米粒子(UST)复合, 制备近红外光驱动的纳米光敏剂UST-Au, 并借助Au- Γ 亲和作用标记放射性核素 ^{131}I . 研究了AuNPs用量对产物的形貌特征和应用性质的影响, 以及光敏剂在碘标记前后的分散稳定性和ROS产生性能, 分析了 ^{131}I 标记的光敏剂作为单光子发射计算机断层扫描(SPECT)成像探针的可行性. 结果表明AuNPs的负载使UST-Au的ROS产生能力明显优于UST. 当AuNPs用量为3 wt%(重量百分比)时, 光敏剂的尺寸分布较窄、zeta电位较高且ROS产生性能最佳. UST-Au对 Γ 的结合量随Au含量的增加而增大, 对 ^{131}I 的标记率超过95%, 且 Γ 标记后光敏剂的分散稳定性和ROS产生性能无明显减弱. 这些独特性能使UST-Au有望应用于SPECT影像引导的肿瘤光动力治疗.

关键词 上转换纳米颗粒, 光敏剂, 活性氧物种, 光动力治疗, 碘标记, 单光子发射计算机断层扫描成像

光动力治疗(PDT)是一种传统的癌症治疗方法. 其原理为借助激发光使光敏剂经光动力学反应产生具有生物毒性的活性氧物种(ROS), 用以损伤细胞内DNA和线粒体等, 最终导致肿瘤细胞凋亡^[1]. 因此, PDT技术具有无创、高度局部化、对正常组织的毒副作用极低的特点, 在安全性上显著优于化学疗法和放射疗法^[2]. 然而, 传统PDT采用的紫外或可见区激发光的组织穿透性能弱, 有机光敏剂的光化学稳定性差, 限制了该技术在深组织或大尺寸肿瘤处高效治疗的应用.

稀土掺杂的上转换纳米颗粒(UCNPs)具备吸收组织穿透能力强的近红外光(NIR)、发射紫外光和可见光的性能^[3], 这使得利用UCNPs设计纳米光敏剂, 发展

以NIR激发的深组织PDT技术成为可能^[4]. 同时, 纳米光敏剂的组织代谢和清除时间远长于有机小分子光敏剂, 其增强渗透与滞留效应可以促进粒子在肿瘤组织处的富集^[5]. 因此更容易实现减少给药次数、延长治疗窗口期和提高疗效的目的. 据此, 多个课题组^[6-9]将无毒、活性高和稳定性好的光催化剂 TiO_2 与UCNPs复合制备生物相容性好、PDT疗效稳定的UCNPs@ TiO_2 纳米光敏剂. 利用NIR激发UCNPs产生的紫外光引发 TiO_2 产生ROS, 通过对模型鼠一次给药、多次照射的方式获得了良好的肿瘤治疗效果. 表面功能化修饰是纳米光敏剂在体内应用必不可少的环节. 文献^[7,9]中UCNPs@ TiO_2 类纳米光敏剂的修饰普遍采用以硅烷偶

引用格式: 胡静慧, 曹潇楠, 董孟杰, 等. 纳米光敏剂 $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Tm}@\text{NaGdF}_4:\text{Yb}@\text{SiO}_2@\text{TiO}_2\text{-Au}$ 的制备和碘标记性能. 科学通报, 2020, 65: 155–166

Hu J H, Cao X N, Dong M J, et al. Preparation and iodine labeling properties of nanophotosensitizer $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Tm}@\text{NaGdF}_4:\text{Yb}@\text{SiO}_2@\text{TiO}_2\text{-Au}$ (in Chinese). Chin Sci Bull, 2020, 65: 155–166, doi: [10.1360/TB-2019-0208](https://doi.org/10.1360/TB-2019-0208)

联剂改性TiO₂在光敏剂表面引入活性官能团,然后共价偶联亲水性高分子或靶向配体分子策略。然而,硅烷偶联剂改性必然消耗TiO₂表面一定数量的羟基,羟基数量的减少会导致TiO₂光催化活性的减弱^[10]。同时封闭TiO₂表面部分催化活性位点,最终导致纳米光敏剂的ROS产生能力有所降低,削弱其体内PDT疗效。因此,通过优化光敏剂的组成或结构,提高其ROS产生能力十分必要。可以使体内PDT在较低功率密度的NIR下进行,从而降低因NIR热效应导致外围组织灼伤的风险。此外,由于稀土离子的强X射线吸收能力和顺磁性质使该类光敏剂具备X射线计算机断层扫描(CT)和磁共振成像(MRI)对照剂的功能^[11],学者提出可以借助CT或MRI技术监测纳米光敏剂的体内分布和靶向作用,开发CT或MRI影像引导的肿瘤治疗新技术。然而,由于CT或MRI造影剂的影像增强效果与组织中造影剂的浓度密切相关^[12],当上述光敏剂在肿瘤组织的富集程度较低时,肿瘤组织的CT或MRI信号强度在给药前后变化不显著,可能给后期治疗方案的实施和评价造成相当的难度。

金纳米材料具有强X射线吸收性质、方便的表面组装性质、光热效应和良好的生物相容性,可以作为体内应用的CT对照剂及光热治疗药物^[13]。研究表明,在TiO₂的表面沉积AuNPs,利用Au的表面等离子体共振(SPR)效应产生的局部电磁场的增强可以增加TiO₂

中电子-空穴对的生成速率^[14,15],拓展光催化剂的光响应频段并增强光催化活性和ROS产生能力。¹³¹I是一种半衰期($t_{1/2}=8.01$ d)中等、使用广泛的放射性核素,其发射的 γ 射线(364 keV, 81.7%)和 β 射线(0.606 MeV, 89.9%)被分别应用于单光子发射计算机断层扫描(SPECT)成像和临床放射治疗^[16]。作为一种核医学成像技术,SPECT具有优异的成像灵敏度,在精确监测分子影像探针在肿瘤组织处的富集与代谢变化方面显著优于CT或MRI技术^[17]。由于Au原子对I⁻具有强化学吸附作用,¹³¹I⁻在水溶液中通过Au-I结合可以快速标记在AuNPs表面^[18,19]。相比利用静电吸引、螯合作用或氯胺T等传统碘标记方法^[20],该标记反应不使用碘化试剂或其他化学助剂,无需在标记物上预先修饰碘接受官能团,且具有标记率高、标记稳定性好、产物纯净等突出优点。

首先,在上转换纳米颗粒NaYF₄:Yb,Tm@NaGdF₄:Yb(UCNPs)表面依次包覆SiO₂和TiO₂,制备核壳结构的复合材料UST。然后,借助吸附法以聚乙烯亚胺(PEI)改性UST并组装AuNPs,构建了纳米光敏剂UST-Au,制备过程示意图见图1。利用NaGdF₄:Yb作为外延层可以修复内核NaYF₄:Yb,Tm的表面缺陷、抑制外界环境对其发光猝灭的影响,提高上转换发光强度^[8]。SiO₂作为连接中间层,在使疏水性UCNPs获得亲水性改性和正电性表面的同时,促进负电性TiO₂壳的包覆。PEI修饰可

图1 (网络版彩色)UST-Au的合成和¹³¹I⁻标记过程示意图

Figure 1 (Color online) Schematic illustration for the synthetic and ¹³¹I⁻-labeling process of UST-Au

以增强UST与AuNPs之间的结合力并便于调节UST-Au的组成; AuNPs的负载赋予UST-Au优于UST的ROS产生能力和快速标记 $^{131}\text{I}^-$ 的能力。表征了UST-Au的形貌、物相、表面化学环境、zeta电位、光学吸收和发射性质; 研究了AuNPs的用量对UST-Au的形貌、粒径和zeta电位、光学性质、ROS产生能力及 I^- 结合能力的影响, 以及 I^- 标记光敏剂的分散稳定性和ROS产生能力; 分析了 $^{131}\text{I}^-$ 标记的UST-Au作为抗肿瘤PDT药物和SPECT成像探针的可能性。

1 实验

(i) 试剂与仪器。支化型聚乙烯亚胺(PEI, $M_w=10000$)购自Alfa Aesar化学有限公司; Igepal CO-520、硅酸四乙酯(TEOS, 99%)、3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES, 98%)、双(乙酰丙酮基)二异丙基钛酸酯(TDAA, 75 wt%, 重量百分比)、1,3-二苯基异苯并呋喃(DPBF, AR)、罗丹明B(RhB, 98%)购自上海阿拉丁科技股份有限公司; 其他试剂均为AR级, 购自国药集团化学试剂有限公司。实验用水为去离子水。所用的测试设备: JEM-2010型透射电子显微镜(TEM, JEOL, 日本)、D8 Advance型X射线衍射仪(XRD, Bruker, 德国)、ESCALAB 250Xi X射线光电子能谱仪(XPS, Thermo, 英国)、Zetasizer Nano ZS90型纳米粒度和Zeta电位分析仪(DLS, zeta电位, Malvern, 英国)、F-7000型荧光分光光度计(Hitachi, 日本)、P4PC紫外-可见分光光度计(UV-Vis, 美谱达, 中国)。

(ii) UST的合成。NaYF₄:Yb,Tm@NaGdF₄:Yb的合成见文献[21]。利用文献[6]的方法合成UCNPs@SiO₂@TiO₂, 略作调整。向10.5 mL环己烷中依次加入2 mL UCNPs的环乙烷分散液、0.5 mL CO-520和80 μL 氨水, 搅拌10 min后滴加40 μL TEOS并反应20 h。加入20 μL APTES继续搅拌24 h, 离心并用乙醇洗涤固体产物2次后分散在20 mL异丙醇中。继续加入5 mL水和0.3 mL氨水, 搅拌均匀后缓慢滴入10 mL TDAA的异丙醇溶液(体积分数为0.5%), 在70°C下搅拌反应18 h。用乙醇洗涤固体产物2次, 得到UST纳米粒子。

(iii) UST-Au的制备。将5 mg UST分散在10 mL质量浓度为2 mg/mL的PEI水溶液中, 搅拌反应2 h后, 用水洗去过量PEI, 得到PEI改性的UST(UST/PEI)。AuNPs以文献[22]中单宁酸辅助柠檬酸钠还原法合成, 平均尺寸为 6.2 ± 0.7 nm。将UST/PEI分散液滴加至一定体积的AuNPs分散液中, 避光搅拌反应2 h, 以10000 r/min离心

10 min去除清液中未吸附的AuNPs。并水洗2次, 得到纳米光敏剂UST-Au。固定UST的质量, 改变AuNPs的投料量, 制备AuNPs相对含量不同的纳米光敏剂, 表示为UST-Au- x wt%, x wt%表示AuNPs投料质量占UST质量的百分数。

(iv) 样品的ROS产生能力测试。体系一: 将5 mg样品分散在5 mL质量浓度为2 mg/L的RhB溶液中, 避光搅拌1 h达到吸附平衡。用功率密度为 $2.1\text{ W}/\text{cm}^2$ 的980 nm激光照射反应液, 每隔20 min取样, 去除催化剂后测试上清液在554 nm处的吸光度。依据RhB的脱色率定性评价光敏剂产生多种ROS的能力。体系二: 将2.5 mg样品分散在5 mL质量浓度为30 mg/L的单线态氧($^1\text{O}_2$)探针DPBF溶液里, 避光搅拌1 h达到吸附平衡。用功率密度为 $2.1\text{ W}/\text{cm}^2$ 的980 nm激光照射反应液, 间隔一定时间取样, 测试清液中DPBF的UV-Vis吸收谱。以DPBF的氧化降解效果定性评价光敏剂产生 $^1\text{O}_2$ 的能力。

(v) UST-Au与 I^- 结合能力测试。将5 mg UST-Au分散在0.5 mL去离子水中, 加入0.5 mL质量浓度为0.75 mg/mL的KI溶液, 室温振荡反应15 min。离心去除母液, 用去离子水反复洗涤固体多次得到 I^- 标记的光敏剂UST-Au- I^- 。干燥样品, 用于 $^1\text{O}_2$ 产生能力测试或压片后借助XPS测试样品表面的元素构成。

(vi) $^{131}\text{I}^-$ 对UST-Au的放射性标记。将1 mg UST-Au超声分散于0.3 mL H₂O中, 并加入0.2 mL Na ^{131}I 淋洗液(放射计数约为120 μCi , 记为 N_0)。室温振荡反应15 min, 离心去除上清液并用去离子水洗涤至清液无放射性, 用 γ 计数器测量 $^{131}\text{I}^-$ 标记的光敏剂UST-Au- $^{131}\text{I}^-$ 的放射计数(记为 N)。依据下式计算标记率:

^{131}I 衰变的速率方程:

$$\ln(N_0/N') = 0.00361t, \quad (1)$$

$$\text{标记率} = N/N' \times 100\%, \quad (2)$$

其中, t 为标记反应和后续纯化过程中所需的总时间(h), N' 为Na ^{131}I 经 t 时衰变后的放射性计数。

2 结果与讨论

2.1 吸附法制备UST-Au的可行性

首先, 验证了吸附法制备UST-Au的可行性。图2(a)为UST和UST/PEI的zeta电位随水溶液pH的变化曲线, 由图可得UST和UST/PEI的等电点(IEP)分别约为6.8和9.7。在中性介质中, 表面带有羟基的TiO₂壳决定了UST

图2 (网络版彩色)UST, UST/PEI的zeta电位-pH曲线(a)及AuNPs, UST和UST/PEI的zeta电位曲线(b)

Figure 2 (Color online) The zeta potential-pH curves of UST and UST/PEI (a) and the zeta potential curves of AuNPs, UST and UST/PEI (b)

呈现较弱的负电性；而高分子PEI的修饰使UST/PEI表面带有大量胺基(亚胺基)，因而呈现较强的正电性。图2(b)显示AuNPs的zeta电位为 -35.1 mV，表明AuNPs表面含有负电性的柠檬酸根^[21]。分散在水中的UST和UST/PEI的zeta电位分别为 -10.6 和 $+32.9$ mV。显然，静电排斥作用会抑制UST与AuNPs通过吸附法牢固结合，正电性为UST/PEI吸附AuNPs提供了强大的静电引力，使组装法制备UST-Au具有可行性。此外，实验结果显示UST几乎不能结合AuNPs，在组装反应前后的反应液中，AuNPs的特征吸收峰近乎重合；而UST/PEI可以吸附溶液中近乎全部的AuNPs(图S1)。上述结果证明PEI改性是UST与AuNPs有效复合的关键，为制备组分配比在较宽范围内可调节的UST-Au- x wt%，并研究光敏剂的组分配比对zeta电位、ROS产生能力、碘标记能力等应用性质提供了前提。

2.2 UST-Au的形貌、尺寸分布和zeta电位

借助TEM观测了样品的形貌，如图3所示。当柱状

UCNPs的表面依次包裹 SiO_2 和 TiO_2 后，制备的UST具有明显的核壳结构和粗糙的外表面。图3(d)~(h)显示AuNPs较均匀地散布在UST/PEI的表面，随着 x 逐渐增大，UST-Au- x wt%表面的AuNPs数目逐渐增多且未发现游离AuNPs的存在，表明AuNPs与UST/PEI结合牢固。这得益于AuNPs表面的柠檬酸根与UST/PEI的胺基和亚胺基之间的静电引力，以及AuNPs与PEI的胺基之间的强相互作用^[23]。

图4(a)为光敏剂在水中的粒径分布情况。UST/PEI的平均水力学粒径(MHD)和多分散系数(PDI)分别为 277 nm和 0.121 ，UST-Au- x wt%($x=1\sim10$)的MHD值稳定在约 258 nm，PDI也保持在较小值($0.107\sim0.136$)；当 $x=20$ 时MHD和PDI分别增大至 329 nm和 0.162 ，表明总体上光敏剂的尺寸分布较窄。影响UST-Au的MHD值的因素包括粒子的分散稳定性、PEI链的舒展程度和AuNPs的相对数量。PEI的亲水性和正电性使UST/PEI表面的PEI链在水中呈现舒展状态，由粒子的直径和双电层厚度构成的MHD值相对较大。随着AuNPs在UST/

图3 UCNPs(a), UST(b), AuNPs(c)及UST-Au- x wt%(d~h, $x=1, 3, 5, 10$ 和 20)的TEM图

Figure 3 TEM images of UCNPs (a), UST (b), AuNPs (c) and UST-Au- x wt% (d)~(h). $x=1, 3, 5, 10$ and 20

图4 (网络版彩色)UST/PEI和UST-Au-x wt%的平均水力学粒径和分散系数(a)及zeta电位(b)

Figure 4 (Color online) The mean hydrodynamic diameter, polydispersion index (a) and zeta potential (b) of UST/PEI and UST-Au-x wt%

PEI表面组装数量的增加, 粒子尺寸增大, 但结合了负电性AuNPs的PEI链的正电荷密度逐渐降低、舒展程度降低, 使粒子的直径减小. 这两个因素的共同作用使得MHD在 $x=1\sim10$ 范围内无明显波动. 当过多AuNPs组装后, AuNPs数量导致的直径增大因素占据了主导地位. 此时UST-Au的分散稳定性因为zeta电位非常低(3.2 mV, 图4(b))而显著减弱, 导致UST-Au-20 wt%的MHD和PDI均明显增大. 图4(b)显示的zeta电位结果证实了上述分析. 相比于UST/PEI, 当 x 从1增大至20时, UST-Au-x wt%的zeta电位从26.9 mV下降至3.2 mV, 反映出UST-Au-x wt%中AuNPs的负载量随AuNPs投料量的增加而增大. 适度的AuNPs投料量可以使UST-Au具有较高的zeta电位, 有助于提高UST-Au在溶液中的分散稳定性.

2.3 UST-Au的物相结构和元素构成

借助XRD表征了UST-Au的物相结构. 图5显示UST-Au在 17.2° , 30.1° , 30.8° 和 43.5° 处的衍射峰与六方相 NaYF_4 (JCPDS No. 16-0334)吻合, 在 25.3° , 48.0° , 53.9° 和 55.1° 处出现了锐钛矿相 TiO_2 (JCPDS No. 21-1272)的衍射峰, 在 38.2° , 44.4° , 64.6° 和 77.6° 的衍射峰分别对应于Au(JCPDS No. 65-2870)的(111), (200), (220)和(311)晶面. 表明AuNPs成功与UST复合^[24], 与目标光敏剂的主要物相结构一致. 由于无定形 SiO_2 的衍射信号很弱且复合材料中 SiO_2 含量较低^[23], 图5中未出现明显的 SiO_2 特征宽峰.

借助XPS分析了光敏剂的元素构成和表面化学状态. 图6(a)显示UST-Au的XPS谱含有Y, Si, Ti, C, N, O, Au等元素, 与目标光敏剂所含的元素对应. 高分辨XPS谱显示位于458.1和463.8 eV处信号峰分别对应 TiO_2 中

图5 (网络版彩色)UST-Au的XRD图

Figure 5 (Color online) XRD pattern of UST-Au

的 $\text{Ti}^{4+} 2p_{3/2}$ 和 $\text{Ti}^{4+} 2p_{1/2}$; O 1s谱在529.9和531.4 eV的峰分别对应 TiO_2 中的晶格氧离子和表面羟基^[25]. 对图6(d)中C 1s谱拟合得到3个峰, 284.7 eV处的峰对应PEI中饱和C-H和C-C键, 286.0和288.4 eV处的峰分别对应 sp^2 杂化态碳原子的C-O和O=C-O键^[26], 说明光敏剂中AuNPs的表面存在柠檬酸根. Au 4f谱在82.9 和86.6 eV处信号峰分别对应零价金的 $\text{Au}4f_{7/2}$ 和 $\text{Au}4f_{5/2}$ 结合能^[27], 在84.8和88.5 eV处没有 Au^{3+} 的特征峰, 表明UST-Au中Au以单质形式存在^[28]. N 1s 在399.2和401.2 eV处特征峰分别对应于PEI中胺基($-\text{NH}_2$)和质子化胺基($-\text{NH}_3^+$)^[27], $-\text{NH}_3^+$ 与AuNPs表面柠檬酸根的静电引力使AuNPs吸附在UST/PEI表面. 同时, 相比文献^[29]报道的PEI中 $-\text{NH}_2$ 峰位置(399.9 eV), 结合AuNPs后 $-\text{NH}_2$ 电子结合能略减小, 表明AuNPs使N原子的电子密度有所降低. 其原因在于 $-\text{NH}_2$ 对Au的配位作用使N原子的孤对电子与Au共享, Au-N配位作用进一步增强了UST-Au的组成稳定性^[29,30].

图6 (网络版彩色)UST-Au的XPS谱(a)与Ti 2p(b), O 1s(c), C 1s(d), Au 4f(e)和N 1s(f)的XPS高分辨谱

Figure 6 (Color online) XPS spectra of UST-Au. Survey spectrum (a), high-resolution XPS spectra of Ti 2p (b), O 1s (c), C 1s (d), Au 4f (e), and N 1s (f)

2.4 UST-Au的光学性质

图7(a)显示相比UST, UST-Au-*x* wt%在550 nm附近出现Au的特征SPR吸收峰, 其强度随着*x*的增加不断增大. 表明UST-Au-*x* wt%中AuNPs数目增多, 与TEM结果吻合. 该吸收峰较游离AuNPs的吸收峰(520 nm附近, 图7(a)插图)有所红移和宽化. 类似的变化也出现在组装法制备的Fe₃O₄@PEI-Au复合材料中^[31], 是由于表面化学环境的改变影响了AuNPs的SPR吸收特征^[32]. 图7(b)

为样品的上转换发光光谱, 在980 nm光的激发下, UST在345, 361, 451和477 nm处的发射峰分别对应于UCNPs中Tm³⁺ ¹I₆→³F₄, ¹D₂→³H₆, ¹D₂→³F₄和¹G₄→³H₆跃迁^[33]. UCNPs与半导体TiO₂之间可以通过辐射或非辐射能量转移机制发生荧光共振能量转移(FRET)^[34,35], 此过程可以激活UST的TiO₂壳并产生ROS. 当AuNPs负载在UST的表面形成UST-Au-*x* wt%后, 上述发射峰强度随着*x*的增大进一步减弱. 表明在UST-Au-*x* wt%内部从UCNPs到TiO₂和AuNPs的FRET效率获得提升^[14,36], 这

图7 (网络版彩色)UST和UST-Au-*x* wt%的UV-Vis谱(a)和上转换发光光谱(b)

Figure 7 (Color online) UV-Vis absorption spectra (a) and upconversion luminescence spectra (b) of UST and UST-Au-*x* wt%

一能量转移过程有利于提高光敏剂产生ROS的能力。此外, UST-Au- x wt%表面分布密度增加和尺寸逐渐加大的AuNPs或其聚集体, 对980 nm激发光的散射作用会使UCNPs接收的光强度下降, 导致光敏剂的发光减弱^[37], 这显然削弱了UST-Au的ROS产生能力。因此, 上述两种作用决定了适量AuNPs的负载有助于获得ROS产生能力最强的UST-Au光敏剂。

2.5 UST-Au的ROS产生能力

光敏剂产生ROS的效能是决定PDT疗效的关键因素之一。Xu等人^[14]曾报道光催化剂NaYF₄:Yb,Er,Tm@TiO₂-Au可以产生超氧阴离子自由基($\cdot\text{O}_2^-$)、羟基自由基($\cdot\text{OH}$)和空穴(h^+)等多种类型ROS, 首先以RhB为模型探针检测在980 nm激发光下不同组成的光敏剂产生多种ROS能力的相对强弱, 结果见图8。在980 nm激发光的照射下, UCNPs发射的紫外光被TiO₂壳层吸收, TiO₂的价带电子被激发至导带, 迁移至TiO₂表面的光生电子和空穴在经历一系列反应后生成多种ROS并氧化降解RhB^[38]。对于UST-Au- x wt%, TiO₂的光生电子借助AuNPs与TiO₂之间的肖特基势垒从TiO₂的导带快速转移至AuNPs, 在一定程度上抑制了光生电子-空穴的复合, 因此UST-Au- x wt%产生ROS的性能优于UST。随着 x 的增大, RhB的脱色率先增大后减小, UST-Au-3 wt%的ROS产生性能最佳。相似的趋势也出现在AuNPs修饰TiO₂纳米管的研究^[26], 表明该负载量的AuNPs可以最大程度地提高载流子的分离效率。当AuNPs负载量进一步增多时, 过量的AuNPs会成为光生电子和空穴的复合中心, 加快电子-空穴复合^[39,40], 导致UST-Au- x wt%($x>3$)的ROS产能降低。最大程度地优化光敏剂的

图8 (网络版彩色)UST和UST-Au- x wt%在980 nm激光照射下降解RhB的效果图

Figure 8 (Color online) Degradation of RhB in the presence of UST and UST-Au- x wt% under 980 nm laser irradiation

ROS产生能力对于改进其PDT活性至关重要。

$^1\text{O}_2$ 的产生能力是评价PDT药物治疗性能的一个重要指标。Yang等人^[5]和Idris等人^[6]均证实UCNPs@TiO₂具有产生 $^1\text{O}_2$ 的能力。本研究借助 $^1\text{O}_2$ 检测探针DPBF考察了在980 nm激发光下UST-Au-3 wt%和UST产生 $^1\text{O}_2$ 能力的差异。图9中DPBF的降解表明UST和UST-Au-3 wt%在光照下均可产生 $^1\text{O}_2$, UST-Au-3 wt%在105 min内导致DPBF的吸收峰降幅约为UST的2倍, 表明UST-Au-3 wt%产生 $^1\text{O}_2$ 的能力明显优于UST。考虑到作为基因转染载体的正电性PEI具有较强的细胞膜穿透能力^[41], 而高浓度的 $^1\text{O}_2$ 有助于细胞色素C从线粒体中释放, 促进线粒体介导的肿瘤细胞凋亡^[8,42], 预期含有PEI的UST-Au-3 wt%容易被肿瘤细胞内吞, 成为PDT活性优于UST的纳米光敏剂。

图9 (网络版彩色)在980 nm激光照射与UST(a)和UST-Au-3 wt%(b)存在下DPBF溶液的UV-Vis吸收光谱

Figure 9 (Color online) UV-Vis absorption spectra of DPBF solution containing UST (a) and UST-Au-3 wt% (b) exposed to 980 nm laser for various times

2.6 UST-Au的碘标记性能

为了评估UST-Au作为SPECT成像探针前体的可行性,借助XPS检测了与KI溶液孵育后的光敏剂UST-Au-I⁻的XPS谱.图10显示所有UST-Au-I⁻样品中均出现I 3d的信号峰,且其强度与Au 4f峰的强度同步增大. I 3d高分辨XPS谱中629.4和618.0 eV处的峰分别对应于I⁻ 3d_{3/2}和I⁻ 3d_{5/2}的电子结合能^[43],证实I⁻结合在UST-Au上.借助XPS对样品中Au和I元素含量进行了半定量分析,结果显示,UST-Au-I⁻中Au和I元素的质量分数依次为1.59%, 6.09%, 8.82%和0.56%, 1.31%, 1.95%. I元素含量随着x的增大而依次增加,证明碘标记是基于Au-I⁻间的强相互作用.

进一步检测了UST-Au标记放射性核素¹³¹I⁻的能力.图11显示UST-Au-x wt%对¹³¹I⁻的标记率均在95%以上,而对照样品UST和UST/PEI则无法标记¹³¹I⁻,进一步证明碘标记反应是基于Au-I⁻间的强相互作用.快速高效的标记反应可以提高放射性药物¹³¹I⁻的利用率和SPECT成像探针合成的经济性, Au-I⁻结合的高标记稳定性^[19]决定了UST-Au-¹³¹I⁻可以作为SPECT成像探针.此外,由于Au具有放射增敏效应^[44],UST-Au在标记¹³¹I⁻后将增强对癌细胞的放疗效果.结合UCNPs和AuNPs的CT对照剂功能,研究人员有望借助SPECT/CT仪跟踪UST-Au-¹³¹I⁻靶向光敏剂在肿瘤模型动物体内的转运过程,获得高灵敏度和高空间分辨率的光敏剂体内分布图像,监测光敏剂在肿瘤组织的富集程度并评定NIR光驱动PDT的启动时机,为PDT与放射治疗协同抗肿瘤研究探索新途径.

2.7 碘标记光敏剂的分散稳定性及¹O₂产生能力

进一步考察了碘标记反应对光敏剂的分散稳定性和¹O₂产生能力的影响,结果见图12.在24 h内,分散在水中的UST-Au-3 wt%的MHD由258 nm缓慢增大至296 nm, PDI基本维持在0.11附近,良好的分散稳定性得益于光敏剂的较高zeta电位和PEI链的位阻作用. UST-Au-3 wt%-I⁻的MHD增幅略大于UST-Au-3 wt%, PDI保持在0.2以下,与Lucky等人^[38]用于动物体内PDT治疗的聚乙二醇修饰的UCNPs@TiO₂光敏剂的性能相当.在980 nm激光照射下,UST-Au-3 wt%-I⁻对DPBF的降解效果与UST-Au-3 wt%接近,明显优于图9(a)所示的UST.表明碘标记会轻微减弱光敏剂的¹O₂产生能力,这可能源于还原性I⁻对¹O₂的消耗.

图10 (网络版彩色)UST-Au-x wt%-I⁻的XPS谱
Figure 10 (Color online) XPS spectra of UST-Au-x wt%-I⁻

图11 (网络版彩色)UST(a), UST/PEI(b)和UST-Au-x wt%(c~e, x=3, 5和10)的¹³¹I⁻标记率

Figure 11 (Color online) The radiochemical yield of labeling of UST (a), UST/PEI (b) and UST-Au-x wt% (c~e, x = 3, 5 and 10) with ¹³¹I⁻

3 结论

采用组装法制备了纳米光敏剂UST-Au, PEI的修饰赋予UST对AuNPs的强结合力,为调控UST-Au的组成配比和应用性质提供了前提.随着AuNPs用量的增大,UST-Au的zeta电位降低、上转换发光减弱,在水中的平均尺寸仅轻微增大. AuNPs的SPR效应使光敏剂在980 nm光照下产生ROS的能力明显优于UST, UST-Au-3 wt%的ROS产生能力最佳.借助Au-I⁻结合作用实现I⁻对UST-Au的快速标记,光敏剂对I⁻的结合能力与Au含量呈现正相关关系,对¹³¹I⁻的标记率高于95%.碘标记反应对光敏剂的分散稳定性及¹O₂产生能力没有显著的负面影响.良好的分散稳定性、ROS产生能力和碘标记能力意味着¹³¹I⁻标记的UST-Au有望用作SPECT

图 12 (网络版彩色)UST-Au-3 wt%(a)和UST-Au-3 wt%-I⁻(b)的平均水力粒径和分散系数随时间的变化及在980 nm光照下降解DPBF的性能(c)

Figure12 (Color online) The mean hydrodynamic diameter and polydispersion index of UST-Au-3 wt% (a) and UST-Au-3 wt%-I⁻ (b) at a function of time and their performance in degradation of DPBF under 980 nm laser irradiation (c)

成像探针和PDT药物。UST-Au的细胞毒性和对模型癌细胞的PDT性能研究正在进行，相关结果将有助于更

全面地评估¹³¹I标记的UST-Au用于SPECT成像引导的肿瘤PDT研究的可行性。

参考文献

- Wang C, Cheng L, Liu Z. Upconversion nanoparticles for photodynamic therapy and other cancer therapeutics. *Theranostics*, 2013, 3: 317–330
- Huang Z. A review of progress in clinical photodynamic therapy. *Technol Cancer Res Treat*, 2005, 4: 283–293
- Li X, Zhang F, Zhao D. Highly efficient lanthanide upconverting nanomaterials: Progresses and challenges. *Nano Today*, 2013, 8: 643–676
- Nagarajan S, Zhang Y. Upconversion fluorescent nanoparticles as a potential tool for in-depth imaging. *Nanotechnology*, 2011, 22: 395101
- Yang G, Yang D, Yang P, et al. A single 808 nm near-infrared light-mediated multiple imaging and photodynamic therapy based on titania coupled upconversion nanoparticles. *Chem Mater*, 2015, 27: 7957–7968
- Idris N M, Lucky S S, Li Z, et al. Photoactivation of core-shell titania coated upconversion nanoparticles and their effect on cell death. *J Mater Chem B*, 2014, 2: 7017–7026
- Zhang L, Zeng L, Pan Y, et al. Inorganic photosensitizer coupled Gd-based upconversion luminescent nanocomposites for *in vivo* magnetic resonance imaging and near-infrared-responsive photodynamic therapy in cancers. *Biomaterials*, 2015, 44: 82–90
- Hou Z, Zhang Y, Deng K, et al. UV-emitting upconversion-based TiO₂ photosensitizing nanoplatform: Near-infrared light mediated *in vivo* photodynamic therapy via mitochondria-involved apoptosis pathway. *ACS Nano*, 2015, 9: 2584–2599
- Yu Z, Pan W, Li N, et al. A nuclear targeted dual-photosensitizer for drug-resistant cancer therapy with NIR activated multiple ROS. *Chem Sci*, 2016, 7: 4237–4244
- Dal'Toé A T O, Colpani G L, Padoin N, et al. Lanthanum doped titania decorated with silver plasmonic nanoparticles with enhanced photocatalytic activity under UV-visible light. *Appl Surf Sci*, 2018, 441: 1057–1071
- Yang D, Li C, Lin J. Multimodal cancer imaging using lanthanide-based upconversion nanoparticles. *Nanomedicine*, 2015, 10: 2573–2591
- Wang T, Yang M, Huang J, et al. NIR-to-NIR UCL/T₁-weighted MR/CT multimodal imaging by NaYbF₄:Tm@NaGdF₄:Yb-PVP upconversion nanoparticles. *Sci Bull*, 2017, 62: 903–912
- Jin J, Chen C Y. Research progress for probe, drug loading and tumor theranostics based on gold nanomaterials (in Chinese). *Sci Sin Chim*, 2017, 47: 191–199 [靳钧, 陈春英. 多功能肿瘤诊疗一体化的金纳米材料的研究进展. *中国科学: 化学*, 2017, 47: 191–199]
- Xu Z, Quintanilla M, Vetrone F, et al. Harvesting lost photons: Plasmon and upconversion enhanced broadband photocatalytic activity in core@shell microspheres based on lanthanide-doped NaYF₄, TiO₂, and Au. *Adv Funct Mater*, 2015, 25: 2950–2960
- Yu Y, Wen W, Qian X Y, et al. UV and visible light photocatalytic activity of Au/TiO₂ nanoforests with Anatase/Rutile phase junctions and controlled Au locations. *Sci Rep*, 2017, 7: 41253
- Ahmadzadehfah H, Sabet A, Wilhelm K, et al. Iodine-131-lipiodol therapy in hepatic tumours. *Methods*, 2011, 55: 246–252
- Sun Y, Liu Q, Peng J, et al. Radioisotope post-labeling upconversion nanophosphors for *in vivo* quantitative tracking. *Biomaterials*, 2013, 34: 2289–2295
- Kim Y H, Jeon J, Hong S H, et al. Tumor targeting and imaging using cyclic RGD-PEGylated gold nanoparticle probes with directly conjugated iodine-125. *Small*, 2011, 7: 2052–2060

- 19 Walsh A A. Chemisorption of iodine-125 to gold nanoparticles allows for real-time quantitation and potential use in nanomedicine. *J Nanopart Res*, 2017, 19: 152
- 20 Lee S B, Lee S W, Jeong S Y, et al. Engineering of radioiodine-labeled gold core-shell nanoparticles as efficient nuclear medicine imaging agents for trafficking of dendritic cells. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9: 8480–8489
- 21 Gong P J, Mao Y, Liang T H, et al. Preparation and properties of targeting photosensitizer $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Er}/\text{NaGdF}_4:\text{Yb}/\text{TiO}_2/\text{PEI-PAA-FA}$ (in Chinese). *Fine Chem*, 2018, 35: 1914–1920 [宫培军, 毛艳, 梁天华, 等. 靶向光敏剂 $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Er}/\text{NaGdF}_4:\text{Yb}/\text{TiO}_2/\text{PEI-PAA-FA}$ 的制备和性能. *精细化工*, 2018, 35: 1914–1920]
- 22 Piella J, Bastús N G, Puentes V. Size-controlled synthesis of sub-10-nanometer citrate-stabilized gold nanoparticles and related optical properties. *Chem Mater*, 2016, 28: 1066–1075
- 23 Li Z, Wang L, Wang Z, et al. Modification of $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Er}/\text{SiO}_2$ nanoparticles with gold nanocrystals for tunable green-to-red upconversion emissions. *J Phys Chem C*, 2011, 115: 3291–3296
- 24 Hussain M, Ahmad M, Nisar A, et al. Enhanced photocatalytic and electrochemical properties of Au nanoparticles supported TiO_2 microspheres. *New J Chem*, 2014, 38: 1424–1432
- 25 Zhang D, Zong X, Wu Z, et al. Ultrahigh-performance impedance humidity sensor based on layer-by-layer self-assembled tin disulfide/titanium dioxide nanohybrid film. *Sens Actuat B-Chem*, 2018, 266: 52–62
- 26 An H Q, Yu Y C, Yan L, et al. Synthesis of highly dispersed Au nanoparticles modified N-doped TiO_2 nanotubes by the assist of lysine and their photocatalytic activity (in Chinese). *Chem J Chin Univ*, 2016, 37: 2034–2042 [安会琴, 于育才, 闫琳, 等. 赖氨酸辅助高分散金粒子修饰氮掺杂 TiO_2 纳米管催化剂的合成及光催化性能. *高等学校化学学报*, 2016, 37: 2034–2042]
- 27 Choudhary B C, Paul D, Borse A U, et al. Surface functionalized biomass for adsorption and recovery of gold from electronic scrap and refinery wastewater. *Sep Purif Technol*, 2018, 195: 260–270
- 28 Chou J, Franklin N R, Baeck S H, et al. Gas-phase catalysis by micelle derived Au nanoparticles on oxide supports. *Catal Lett*, 2004, 95: 107–111
- 29 Garole D J, Choudhary B C, Paul D, et al. Sorption and recovery of platinum from simulated spent catalyst solution and refinery wastewater using chemically modified biomass as a novel sorbent. *Environ Sci Pollut Res*, 2018, 25: 10911–10925
- 30 Yan Y, An Q, Xiao Z, et al. Flexible core-shell/bead-like alginate@PEI with exceptional adsorption capacity, recycling performance toward batch and column sorption of Cr(VI). *Chem Eng J*, 2017, 313: 475–486
- 31 Goon I Y, Lai L M H, Lim M, et al. Fabrication and dispersion of gold-shell-protected magnetite nanoparticles: Systematic control using polyethyleneimine. *Chem Mater*, 2009, 21: 673–681
- 32 Xu X, Cortie M B. Precious metal core-shell spindles. *J Phys Chem C*, 2007, 111: 18135–18142
- 33 Wang W, Huang W, Ni Y, et al. Graphene supported $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ and N doped P25 nanocomposite as an advanced NIR and sunlight driven upconversion photocatalyst. *Appl Surf Sci*, 2013, 282: 832–837
- 34 Zhang F, Zhang C L, Peng H Y, et al. Near-infrared photocatalytic upconversion nanoparticles/ TiO_2 nanofibers assembled in large scale by electrospinning. *Part Part Syst Charact*, 2016, 33: 248–253
- 35 Wang W N, Huang C X, Zhang C Y, et al. Controlled synthesis of upconverting nanoparticles/ $\text{Zn}_x\text{Cd}_{1-x}\text{S}$ yolk-shell nanoparticles for efficient photocatalysis driven by NIR light. *Appl Catal B-Environ*, 2018, 224: 854–862
- 36 Tian Q, Yao W, Wu W, et al. Efficient UV-Vis-NIR responsive upconversion and plasmonic-enhanced photocatalyst based on lanthanide-doped $\text{NaYF}_4/\text{SnO}_2/\text{Ag}$. *ACS Sustain Chem Eng*, 2017, 5: 10889–10899
- 37 Xiang J, Tong X, Shi F, et al. Spatial organization and optical properties of layer-by-layer assembled upconversion and gold nanoparticles in thin films. *J Mater Chem C*, 2016, 4: 9343–9349
- 38 Lucky S S, Muhammad Idris N, Li Z, et al. Titania coated upconversion nanoparticles for near-infrared light triggered photodynamic therapy. *ACS Nano*, 2015, 9: 191–205
- 39 Han S, Hu L, Gao N, et al. Efficient self-Assembly synthesis of uniform CdS spherical nanoparticles-Au nanoparticles hybrids with enhanced photoactivity. *Adv Funct Mater*, 2014, 24: 3725–3733
- 40 Xing X, Liu R, Yu X, et al. Self-assembly of CdS quantum dots with polyoxometalate encapsulated gold nanoparticles: Enhanced photocatalytic activities. *J Mater Chem A*, 2013, 1: 1488–1494
- 41 Tsang M K, Chan C F, Wong K L, et al. Comparative studies of upconversion luminescence characteristics and cell bioimaging based on one-step synthesized upconversion nanoparticles capped with different functional groups. *J Lumin*, 2015, 157: 172–178
- 42 Zhang Q B, Cheng C. Composite microspheres assembly and photosensitive activity research based on $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ upconverting nanoparticles (in Chinese). *Chin J Inorg Chem*, 2015, 31: 81–86 [张庆彬, 程成. 基于 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ 上转换发光纳米晶的复合微球组装及其光动力活性. *无机化学学报*, 2015, 31: 81–86]
- 43 Feng J, Huang H, Yu S, et al. A self-sacrifice template route to iodine modified BiOI/O_3 : Band gap engineering and highly boosted visible-light active photoreactivity. *Phys Chem Chem Phys*, 2016, 18: 7851–7859

- 44 Wang C, Li X, Wang Y, et al. Enhancement of radiation effect and increase of apoptosis in lung cancer cells by thio-glucose-bound gold nanoparticles at megavoltage radiation energies. [J Nanopart Res](#), 2013, 15: 1642

补充材料

图S1 UST/PEI或UST与AuNPs制备的UST-Au-10 wt%及上清液的UV-Vis谱

图S2 UST-Au-x wt%-I⁻的I 3d XPS高分辨率谱

本文以上补充材料见网络版csb.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.

Summary for “纳米光敏剂 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Tm}@\text{NaGdF}_4:\text{Yb}@\text{SiO}_2@\text{TiO}_2\text{-Au}$ 的制备和碘标记性能”

Preparation and iodine labeling properties of nanophotosensitizer $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Tm}@\text{NaGdF}_4:\text{Yb}@\text{SiO}_2@\text{TiO}_2\text{-Au}$

Jinghui Hu¹, Xiaonan Cao¹, Mengjie Dong^{2*}, Zhenfeng Liu², Yinfeng Wang¹, Yue Fang¹, Yijing He¹ & Peijun Gong^{1*}

¹ Key Laboratory of the Ministry of Education for Advanced Catalysis Materials, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China;

² PET Center, Department of Nuclear Medicine, the First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China

* Corresponding authors, E-mail: dongmengjie@126.com; skygpj@zjnu.cn

Photodynamic therapy (PDT) is a promising therapeutic method for cancer due to many advantages including non-invasion, highly localized tissue region, low toxicity, and insignificant side effects. However, the poor tissue penetration of visible light for activating the traditional photosensitizer confines the utilization of PDT in the treatment of tumors embedded in thick biotissues. Upconversion nanoparticles (UCNPs) can be used to fabricate near-infrared light-triggered nanophotosensitizers by loading organic dyes or coating with inorganic semiconductor nanocrystals such as TiO_2 and ZnO for deep-tissue PDT. In addition, some UCNPs-based nanophotosensitizers exhibit remarkable imaging properties for tumor detection. Improvement in reactive oxygen species (ROS) production and imaging sensitivity is the prerequisite for the application of UCNPs-based nanophotosensitizers in cancer diagnosis and therapy. Here, a near-infrared light-driven nanophotosensitizer UST-Au was prepared by assembling Au nanoparticles (AuNPs) on the surface of polyethyleneimine-modified $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Tm}@\text{NaGdF}_4:\text{Yb}@\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ nanocomposites (UST), and then labeled with radioactive iodine ions ($^{131}\text{I}^-$) by virtue of Au-I^- affinity interaction. The effects of AuNPs dosage on the morphology, diameter, zeta potential, optical properties, ROS generating ability and iodine labeling performance of the product were studied. And the feasibility of $^{131}\text{I}^-$ -labeled UST-Au as a single photon emission computed tomography (SPECT) imaging probe was analyzed. The results showed that tunable amounts of AuNPs were immobilized on the surface of polyethyleneimine-coated UST and the obtained UST-Au produced more ROS than UST as exposed to 980 nm near-infrared light. As AuNPs was added to be 3 wt% of the mass of UST, the obtained nanophotosensitizer had a mean hydrodynamic diameter (258 nm), relatively high zeta potential (+22.4 mV), good colloidal stability and the optimal ROS generation ability. Unexceptionally, iodine ions were expeditiously labeled on UST-Au suspended in aqueous solution, and the amount of the bound iodine ions enhanced with the increase of the mass percent of Au in UST-Au. The radiolabeling yield of UST-Au- $^{131}\text{I}^-$ was more than 95%. Furthermore, the iodine labeling reaction had negligibly negative effect on the colloidal stability and ROS production of the nanophotosensitizer. In general, all these unique properties of the nanophotosensitizer facilitate the potential application in SPECT imaging-guided photodynamic therapy against tumor.

upconversion nanoparticle, photosensitizer, reactive oxygen species, photodynamic therapy, iodine labeling, single photon emission computed tomography imaging

doi: [10.1360/TB-2019-0208](https://doi.org/10.1360/TB-2019-0208)