

四川大學

本科生毕业论文



题 目 还原敏感聚合物 Py-ss-PEG-ss-Py 的自组装研究

学 院 化学工程学院

专 业 制药工程

学生姓名 何雨航

学 号 2013141492047 年 级 2013 级

指导教师 李赛 教授

二〇一七 年 五 月 十六 日

还原敏感聚合物 Py-ss-PEG-ss-Py 的自组装研究

专业：制药工程

学生：何雨航

指导老师：李赛 教授

摘要：还原敏感聚合物 Py-ss-PEG-ss-Py 就是一个优秀的具有对癌变组织特异性的药物缓释载体胶束的单体。该单体因其具有还原敏感性的二硫键，可以特异性地在癌细胞或其组织中的强还原性环境分解，释放出胶束中包含的药物，同时，载体两端的芘也会同时脱落变为游离态并进行自组装成为分子芘的堆积，从而获得光动力学特性，能够参与光化学反应并实现光动治疗，对相应位置的癌细胞产生与药物协同性的破坏。该单体也因其两端的疏水基团中的芘具有大 π 键，可以与大量的具有 π 键的药物产生共轭效应，提高载药量。本课题成功地合成了 Py-ss-PEG-ss-Py 单体并制成了胶束，测得了其临界胶束浓度为 0.015mg/ml 且通过与相似单体 Py-PEG-Py 进行对比参照，测出其胶束粒径分别为 120.7nm, 131.5nm。对胶束的包括还原敏感性、自组装特性在内的各项性质进行了检测和评估。证实了 Py-ss-PEG-ss-Py 胶束确实具有还原敏感性，且其在分解之后脱落的芘的衍生物的确进行了自组装。

关键词：还原敏感；药物载体；胶束；自组装

Self-assembly study of Reducing Sensitive Polymer Py-ss-PEG-ss-Py

Major: Pharmaceutical Engineering

Undergraduate: Yuhang He

Supervisor: Prof. Sai Li

Abstract: The reduced-sensitive polymer Py-ss-PEG-ss-Py is an excellent monomer with a slow release carrier micellar for cancer-specific tissue. The monomer, because of its reduced susceptibility disulfide bond, can specifically decompose in a strong reducing environment in cancer cells or tissues to release the medicament contained in the micelle, and the pyrene at both ends of the carrier will then self-assembled into the accumulation of molecular pyrene, so as to appear photodynamic properties, can participate in photochemical reactions and achieve light therapy, the corresponding location of cancer cells and drug will be synergistically damaged. The monomer also has a large π bond in the hydrophobic group at both ends, and can be conjugated with a large number of drugs with π bonds to increase the drug loading. The Py-ss-PEG-ss-Py monomer was successfully synthesized and prepared into micelles. And compared with the similar monomer Py-PEG-Py, The micelle size was 120.7 nm and 131.5 nm, respectively. The properties of the micelles including the reduction sensitivity and self-assembly characteristics were tested and evaluated. It was confirmed that Py-ss-PEG-ss-Py micelles did have reduction sensitivity, and the derivatives of pyrene which fell off after decomposition were indeed self-assembled.

Keywords: reduction-sensitive; drug carrier; micelles; self-assembly

目 录

1	前言	1
1.1	癌症治疗方法及其特点	1
1.2	化学疗法及其特点	1
1.3	纳米载药系统.....	2
1.3.1	纳米颗粒及其分类.....	2
1.4	聚合物胶束及其特点	2
1.5	光动治疗	3
1.6	芘的衍生物及其自组装	4
1.7	Py-ss-PEG-ss-Py 的结构与性质	5
1.8	研究内容	6
2	实验部分.....	7
2.1	Py-ss-PEG-ss-Py 的合成与表征	7
2.1.1	实验仪器	7
2.1.2	实验方法	7
2.1.2.1	Py-PEG-Py 的合成.....	7
2.1.2.2	Py-ss-PEG-ss-Py 的合成	7
2.1.2.3	单体的表征	8
2.2	Py-ss-PEG-ss-Py 的体外的聚集行为研究.....	8
2.2.1	实验仪器	8
2.2.2	实验方法	8
2.2.2.1	胶束的制备	8
2.2.2.2	临界胶束浓度的测定.....	8
2.2.2.3	DLS（动态光散射）测量胶束粒径	9
2.3	Py-ss-PEG-ss-Py 胶束的刺激响应性及自组装测试	9
2.3.1	实验仪器	9
2.3.2	实验方法	9
3	结果与讨论.....	10
3.1	Py-ss-PEG-ss-Py 的合成与表征	10
3.1.1	¹ H NMR.....	10
3.1.2	MS	11
3.1.3	FT-IR	12
3.2	Py-ss-PEG-ss-Py 的体外的聚集行为研究.....	13

3.2.1	临界胶束浓度.....	13
3.2.2	粒径.....	14
3.2.3	形貌.....	14
3.3	Py-ss-PEG-ss-Py 胶束的刺激响应性测试.....	15
3.3.1	紫外光谱	15
3.3.2	荧光光谱	17
3.4	Py-ss-PEG-ss-Py 胶束的自组装特性测试.....	19
4	结论及展望.....	22
	参考文献	23
	致谢	25
	附录	错误!未定义书签。

1 前言

癌症，一直是人类文明心中永远挥之不去的阴影。目前，癌症的预防、诊断与治疗已经成为世界卫生相关领域中最为火热的话题之一。但是这种疾病因其症状不明显，癌细胞繁殖能力强，变异能力强且极易产生抗药性，而为癌症的治疗设置了许多障碍。而近年来，随着我国老龄化社会的情况在逐年地加剧，癌症的发病率也为我国现有的公共卫生环境施加了极大的压力。攻克癌症成为了我们的必由之路。

一般认为，癌症是因为正常体细胞在分裂分化的过程中由于产生了基因突变导致细胞开始不受控制地快速分裂增殖。并且由于其细胞表面大多缺乏糖蛋白，而容易在体内扩散，最后变成难以根治的病症。据调查^{错误!未找到引用源。}，在 2012 年仅一年中，就有大约 1400 万的新增病例和 800 万次与癌症有关的死亡记录，这种疾病影响着所有国家和地区的人民。几乎每一年的每一万个人里面，就有约 18.2 人被新确诊为癌症，同时有 10.2 人死于癌症。从以上数据中可以看出，癌症不仅影响极大，而且会呈现出逐年上升的趋势。

本文阐述了一种用于癌症治疗的具有还原敏感性的新型靶向高分子胶束药物载体的合成、表征、胶束化及载药相关性能探究。

1.1 癌症治疗方法及其特点

目前来说，治疗癌症常用的方法^[2]有外科手术治疗，放射性治疗（放疗），化学治疗（化疗）等，然而这些疗法各有各的优缺点。外科手术比较简单，但是不容易完全清除体内的癌变组织，而且也没办法治疗已扩散的癌症；放射性治疗和化学疗法都能够对癌细胞的快速分裂起到阻碍作用。但他们都有一个共同的缺点：对身体伤害极大。

除去以上的几种常用癌症治疗方法之外，近几年也有几种新型治疗技术崭露头角，如免疫疗法（生物治疗）、基因疗法、激素治疗等。这几种在传统的癌症治疗方法之上，具有自己独特的优点。而当前，化学治疗因其疗法对未转移、转移中以及转移后的癌细胞都具有很好的适用性，而备受临床治疗的青睐。

1.2 化学疗法及其特点

化学疗法即化疗，是通过让癌症患者摄入具有细胞毒性的特殊药物来杀灭癌细胞，它对处于癌症的各个时期的患者均有较好的治疗效果。但其在杀灭癌细胞的同时，也有极大的几率杀灭正常的体细胞或是免疫细胞，同样也会引起患者出现一系列的副反应，如恶心、呕吐、高烧、脱发、免疫力下降等。常用的化疗药物有：阿霉素、柔红霉素等。由于化学疗法对癌细胞的特异性十分低下，造成体细胞的普遍杀伤，副作用很大，有“两害相权取其轻”的无奈，所以近年来科学家在增加化疗药物特异性和减少不良反应的方向上进行了大量的研究。本课题在选择包埋药物时，决定使用常用的、具有代表性的模板药物阿霉素

作为本实验的载药胶束包埋的药物。其结构见图 1-1。

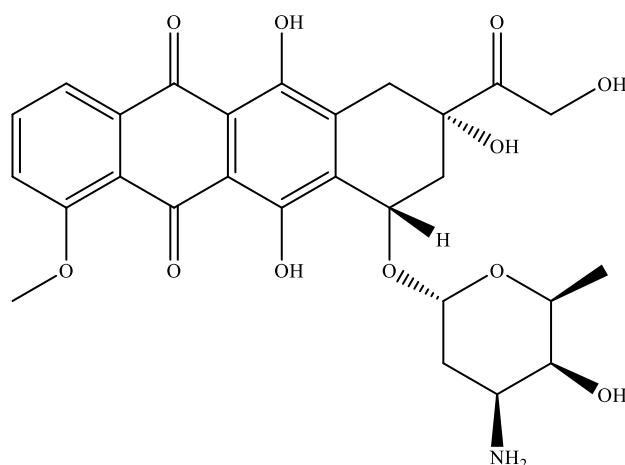


图1-1 阿霉素 (Doxorubicin, DOX) 的结构式
Figure 1-1 The structural formula of DOX

1.3 纳米载药系统

1.3.1 纳米颗粒及其分类

纳米颗粒 (nanoparticle, NP), 指纳米量级的微观颗粒。它被定义为至少在一个维度上, 其直径要满足不大于 100nm 的条件的颗粒。纳米颗粒具有非常重要的科学研究价值, 它具有在更大粒径的物质和原子、分子之间中不具有的特别的性质。常见的纳米颗粒有: 纳米脂质体, 固体脂质纳米粒, 树枝状大分子, 纳米囊和纳米球, 聚合物胶束, 纳米药物等^[3]。其中, 聚合物胶束就因其具有不可替代的优秀性能而成为当前纳米颗粒缓释药物载体的研究热点。

1.4 聚合物胶束及其特点

胶束 (polymeric micelles) 是两亲性嵌段聚合物在溶液中的浓度高于 CMC (临界胶束浓度) 后, 其分子或离子自动聚集并有序结合生成的粒径大小彼此相似的微粒。这种微粒与溶剂之间处于平衡状态。胶束因其同时拥有亲脂性和亲水性两种嵌段聚合物的单体结构而具有以下特别的特点:

制备简单。胶束的单体一般是两亲性聚合物, 即同时具有亲脂性的部分和亲水性的部分。它可以在单体浓度超过临界胶束浓度的水溶液中自发地组装成为粒径大小较为均一的胶束, 并且能够在水溶液的环境中形成亲脂性的微环境, 从而具有可以包埋亲脂性药物的性质。

粒径优势。聚合物胶束的颗粒大小一般会小于 100nm, 且粒径分布的离散度较小。十

分容易穿透血管壁进入组织，并分布在病变部位。同时，这种特性也相对有效地降低了高浓度胶束溶液在刚注射时在血管内的滞留时间。因此，载药胶束能够有效地降低肾小球的滤过作用，延长了载药药物载体在体内保留的时间，更有利于药性的发挥。同时，其合适的尺寸利于病变细胞通过胞吞的方式吸收载药纳米载体进入其胞内，从而为药物的特异性是方提供了前提条件，克服了药物释放所引起的多药耐药。

有效载药量更多。聚合物胶束与小分子表面活性剂相比，因为其疏水链段部分相对分子量较大，在水溶液中各单体间的疏水部分间相互作用力更强，同时，单体在水溶液中的溶解度也相对下降，这两个因素共同造成其临界胶束浓度更低，更能够抵御稀溶液的稀释，稳定性相对更强。同时，其疏水部分相对较大还有其他优点，如增加其载药潜力等。本实验所探究的两种单体，其分子两端均带有含大 π 键共轭体系的芘，可以与同样具有相似结构的药物（如本实验中所用到的模板药物 DOX）形成共轭体系，降低系统能量，提升稳定性，从而增加胶束的有效载药量。且因其分解速率相对较低，所以其所包药物就能够获得相对更长的体内滞留时间，就更能够提升被相关细胞吞入的概率，从而提升药物地有效量。

易进行化学修饰。与小分子表面活性剂相比，其较大的分子量为胶束单体的结构修饰提供了更大的修改潜力，从而我们可以通过对单体或胶束进行官能团的增添，结构的修改，为聚合物胶束赋予新的功能，如光敏/磁敏性，对氧化或还原环境的敏感性，特异性吸收等性质，通过增添这些性质，我们可以让载药胶束拥有靶向给药等新功能。

生物兼容性。聚合物胶束的单体常使用生物兼容性好的材料。现在比较常用的单体链段有 PEG（聚乙二醇），PEO（聚氧乙烯），PCL（聚己内酯）等等。其具有安全，无毒，非过敏源，生物可降解等特性，为药物载体的临床应用提供了前提条件。

1.5 光动治疗

光动治疗，也称光动力疗法（Photodynamic therapy, PDT），具有一段悠久的历史，在公元 400 年前，古埃及就通过光动力疗法，来治疗皮肤病^[4]。其原理^[16]为通过向具有光敏性的化学物质照射一定波长的光线，该物质就会与环境中的氧分子发生电子转移，生成对细胞具有杀伤作用的活性氧。这样，通过对特定组织照射特定波长的光线，就可以特异地杀灭该环境中的细胞^[5]。根据这个原理，医学上通过注射光敏性药物并照射癌变组织以获得杀灭癌细胞的效果。

光动治疗由以下三个十分重要的部分组成^[14]。光敏剂，即当特定波长照射时，会吸收能量并跃升至激发态的一种化学物质；激发光，即为发生的光化学反应提供能量的具有或含有特定波长的光；分子氧，即为人类体细胞和癌变部位都具有的溶解氧。我们可以通过一些手段（如靶向、选择性释放等）让光敏剂在癌变组织环境下集中分布，然后通过特定波长的光线照射该部位，光敏剂即会吸收能量，跃升到激发态，并与环境周围的分子氧结合发生光化学反应，生成具有能够破坏细胞生长、复制所必须的各种生物大分子的自由基。最后导致在该环境下临近细胞的坏死^[6]。

光动治疗在若干癌症治疗方法中，具有以下一些突出的优点^[7]：

对正常细胞杀伤小，副作用低，安全高效。由于活性氧在内环境中可以与多种物质反应，所以其从生成到失活的平均作用距离较短，意味着活性氧所造成的细胞杀伤只分布在光敏剂的附近，所以光敏剂附近的癌细胞则会受到强烈的影响，而较远处的正常体细胞又因为光照强度不够而收到了保护。所以降低了副作用。

特异性强。该类药物要起到杀伤作用，有且只有满足上述的三个条件才可以成功。即该部位含有光敏剂，受到激发光的照射并且环境中含有分子氧。所以，我们通过特殊的、集中于癌症组织的光敏剂，加上在病变部位照射的光线，才能够构成杀伤条件。这使得癌细胞很难产生抗药性，因此该方法可以用来重复治疗。

治疗效率高，患者依从性强。光动治疗耗时短，光敏剂分布较快，而且光动治疗进行的过程中可以同时其他种类的癌症治疗方法，彼此之间互不影响。

常见的光敏剂^[15]有：卟啉类，5-氨基酮戊酸，酞青类等，另外，本实验所涉及到的茚的堆叠产物也具有光动特性。

1.6 茚的衍生物及其自组装

分子自组装是在近期的药物载体，纳米颗粒，高分子材料等领域出现的一个新的研究方向^[8]，分子的自组装的含义是若干分子个体之间通过弱分子间作用力（如氢键、 $\pi - \pi$ 共轭作用等）进行有序的聚集，形成一个紧密、规则的整体。是一种复杂的分子团协同作用^[18]。

以具有大 π 键的分子苯为例，其自组装的方式有以下几种类型^[9]：

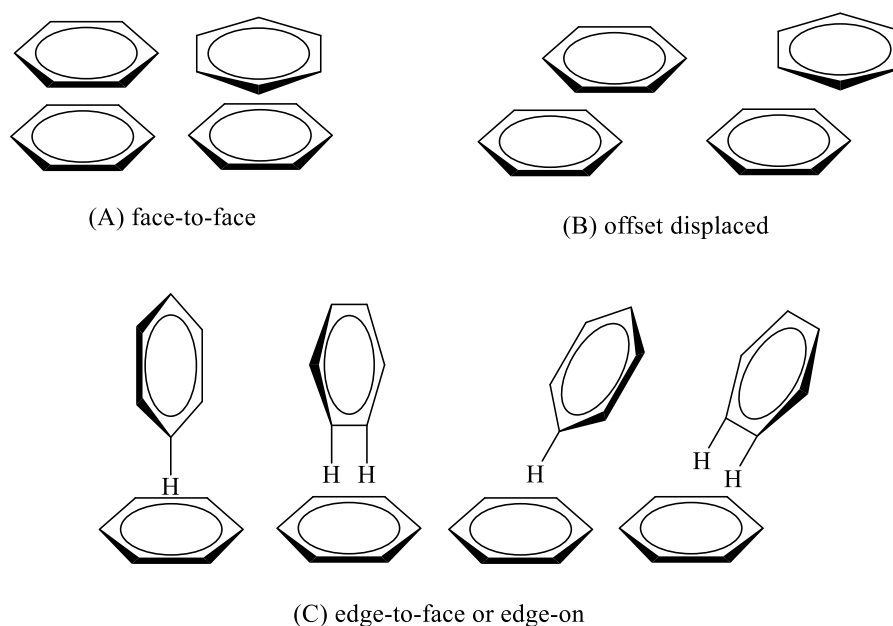


图1-2 分子苯的堆积方式

Figure 1-2 Stacking types of Py-ss-PEG-ss-Py

Seiichi Nishizawad 等人^[11]研究并发现了芘也具有与苯相似的自组装特性。Bodenant 等人^[12]也通过三价铁离子激发了芘的分子间荧光活性，提到了通过荧光检测芘的可行性。Kamikawa 等人在文章^[13]中芘的自组装的荧光检测法。而 π - π 相互作用也可以造成荧光猝灭^[17]，需要具体分析。

而本实验研究的物质中具有同样大 π 键的芘的部分，游离的芘在溶液中的自组装的方式主要是偏移堆积^{错误!未找到引用源。}。这种堆积方式会导致大 π 键的离域范围增加，使物质的发射荧光波长变长。这是我们在本实验中检测苯是否发生自组装的重要依据。

1.7 Py-ss-PEG-ss-Py 的结构与性质

本课题所要研究的聚合物胶束的单体即为 Py-ss-PEG-ss-Py，其结构如图 1-3。

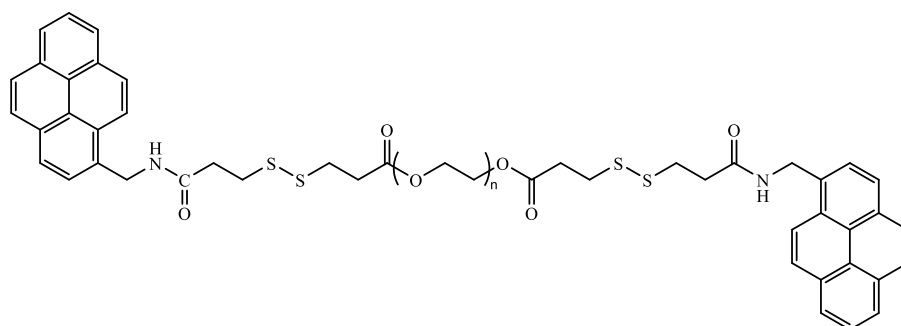


图1-3 Py-ss-PEG-ss-Py的结构式

Figure 1-3 The structural formula of Py-ss-PEG-ss-Py

是 PEG 与芘通过二硫键进行连接，这种结构具有如下性质^{[19][20]}：

单体两端连接有带有大 π 键的芘，能够与具有双键等结构的药物产生共轭效应降低体系能量，从而提高胶束的稳定性，提升药物的载药量。

芘与聚乙二醇通过二硫键进行连接，从而能够使聚合物胶束具有与二硫键相似的还原敏感特性，这一特性可用于载药胶束的选择性释放等相关用途。而且在癌变组织中，其环境也是具有还原性的，所以该胶束可以特异性地在癌变组织处分解释放出抗癌药物并且载体分解时产生的游离芘也会对癌变细胞产生协同性的杀伤效果，进一步地提高药物的药效。以上的这些性质与其他其他纳米颗粒药物载体相比及其有研究价值。

单体的两端为亲脂性基团，其中的芘具有 π - π 共轭结构，这对于药物的包埋性有很大的加强。中间的 PEG 长链则具有较强的亲水性。在水溶液中缔合形成胶束的时候，两端的亲脂性基团会包埋在胶束的中心，而中间的亲水性 PEG 长链则会暴露在胶束的表面，与水溶液直接接触。

本课题通过把 Py-ss-PEG-ss-Py 和其相似聚合物单体 Py-PEG-Py 进行各项性质的比照, 来具体说明 Py-ss-PEG-ss-Py 所具有的还原敏感等多项特性。Py-PEG-Py 的分子结构如图 1-4。

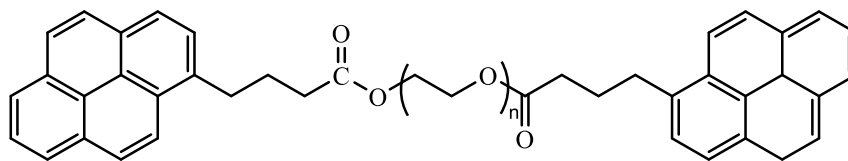


图1-4 Py-PEG-Py的结构式

Figure 1-4 The structural formula of Py-PEG-Py

该结构与 Py-ss-PEG-ss-Py 相比, 相同点有: 两个疏水端都带有大 π 键的芘, 中间的亲水端则都是由 PEG 组成, 两者都具有脂键; 不同点有 Py-ss-PEG-ss-Py 的疏水端和亲水端是由二硫键连接起来的, 并且还具有额外的酰胺键。所以, 本课题在研究 Py-ss-PEG-ss-Py 的时候, 通过使用 Py-PEG-Py 作为对照, 两相比较, 能够较为直观地说明 Py-ss-PEG-ss-Py 的在还原敏感方面的特性。

1.8 研究内容

本课题包括以下几个方面:

Py-ss-PEG-ss-Py 与 Py-PEG-Py 的合成与表征。

Py-ss-PEG-ss-Py 与 Py-PEG-Py 的体外的聚集行为研究: 通过挥发法制备 Py-ss-PEG-ss-Py 和 Py-PEG-Py 胶束, 分别测定它们的 CMC (临界胶束浓度) 并通过 DLS (动态光散射) 和 AFM (原子力扫描镜) 等来分别研究 Py-ss-PEG-ss-Py 与 Py-PEG-Py 的纳米粒子粒径大小和粒子形貌。

Py-ss-PEG-ss-Py 与 Py-PEG-Py 的胶束的刺激响应性测试: 为了探究 Py-ss-PEG-ss-Py 的还原敏感特性, 本实验通过设置具有不同的还原性强度的恒温环境, 通过检测 Py-ss-PEG-ss-Py 与 Py-PEG-Py 在该环境下分解时不同时间点胶束的荧光强度, 得到胶束分解的时间-分解率曲线, 来研究药物还原敏感特性。

Py-ss-PEG-ss-Py 与 Py-PEG-Py 的胶束的自组装测试: 测试具有还原敏感的 Py-ss-PEG-ss-Py 胶束在被分解的情况下其芘的部分能否自发地进行自组装形成分子芘的堆积形态。

2 实验部分

2.1 Py-ss-PEG-ss-Py 的合成与表征

2.1.1 实验仪器

100mL 支口瓶；真空油泵；布氏漏斗；磁力搅拌器。

核磁共振波谱仪（Bruker AV-400）；红外光谱仪（Perkin-Elmer 2000）；

2.1.2 实验方法

2.1.2.1 Py-PEG-Py 的合成

称取 0.8g 茚丁酸，放入 100mL 支口瓶中。加入 1.6g 的 PEG2000。抽真空，并用氮气充填，重复三次。

加入 30 mL 的 DCM 与四氢呋喃比例为 2:1 的混合溶剂，振摇并观察使其全部溶解。

称取 6.6g 的 DCC 与 0.004g 的 DMAP 溶解于 20mL DCM 中。缓慢滴加到上述的溶剂中，全程冰浴。保证该操作在一小时左右完成。

滴加完毕使其自然升到室温后继续反应 48h；

反应结束后低温滤去不溶物，浓缩用乙醚沉淀三次，室温真空干燥至恒重。

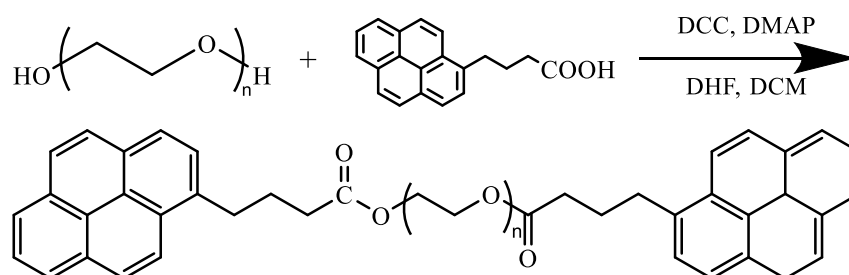


图2-1 Py-PEG-Py的合成

Figure 2-1 The synthesis of Py-PEG-Py

2.1.2.2 Py-ss-PEG-ss-Py 的合成

准确称取预处理好的 HOOC-ss-PEG2000-ss-COOH 1.5g (0.6mmol) 与 1-苈甲胺盐酸盐 0.66g (2.5mmol) 于 100mL 支口瓶中，抽真空充氮气 3 次；加入 10mL DCM 与 15mL DMSO 混合溶剂使其全部溶解；在剧烈搅拌下将 0.1950g (2.5mmol) 吡啶用 10mL DMSO 稀释后在冰浴条件下滴入到上述体系中反应 2h；称取 6.2g (30.1 mmol) DCC 与 0.004g (0.03 mmol) DMAP 并用 20mL DCM 溶解后在冰浴剧烈搅拌的条件下逐滴滴加到体系中，整个滴加过程在 1h 左右；滴加完毕使其自然升到室温后继续反应 48h；反应结束后低温滤去不溶物，浓缩用乙醚沉淀三次，室温真空干燥至恒重。

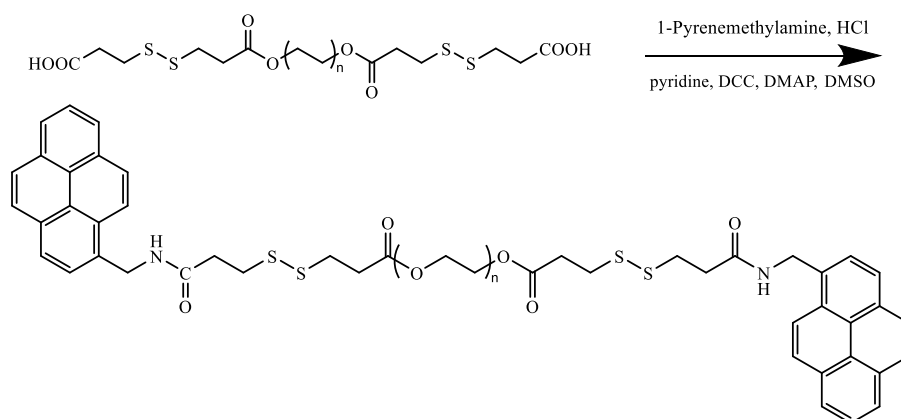


图2-2 Py-ss-PEG-ss-Py的合成

Figure 2-2 The synthesis of Py-ss-PEG-ss-Py

2.1.2.3 单体的表征

分别对两种单体进行核磁氢谱、质谱、红外光谱、图谱见图 3-1 至 3-4。

2.2 Py-ss-PEG-ss-Py 的体外的聚集行为研究

2.2.1 实验仪器

动态光散射光谱仪 (Malvern ZetasizerNano ZS90); 荧光光谱仪 (Hitachi F-7000), 扫描电镜 (Hitachi S-4800)

2.2.2 实验方法

2.2.2.1 胶束的制备

为了制得 Py-ss-PEG-ss-Py 和 Py-PEG-Py 的胶束, 根据这两者都易溶于有机溶剂的特点, 选择使用挥发法。

使用挥发法制备胶束溶液: 分别称取适量的 Py-ss-PEG-ss-Py 和 Py-PEG-Py 粉末, 完全溶于约 400 μ l 色谱纯级别的四氢呋喃中以后, 以每秒 1 滴的速度滴加到装有超纯水的烧杯中, 滴加的同时对溶液进行剧烈搅拌。滴加完毕之后避光通风放置隔夜, 当溶液中的四氢呋喃挥发完全 (即没有散发出类似于乙醚的气味时) 之后收集起来。即制得 Py-ss-PEG-ss-Py 和 Py-PEG-Py 的胶束溶液。由于 Py-ss-PEG-ss-Py 和 Py-PEG-Py 在光照条件下会十分不稳定, 故收集后应注意避光保存。

2.2.2.2 临界胶束浓度的测定

临界胶束浓度 (CMC) 是聚合物胶束的重要性质之一, 只有当聚合物单体在溶液中的浓度高于临界胶束浓度时, 聚合物单体才会有序地聚集起来形成胶束。本实验所研究的

Py-ss-PEG-ss-Py 胶束，因其可被用来作为药物载体，所以我们希望它的临界胶束浓度应当尽量小。因为只有这样，该胶束才可能更好的抵御溶剂稀释所带来的对于胶束的破坏。

我们使用茚水稀释法来测量该胶束的 CMC，其方法如下：用上文提到的方法配制浓度稍大的 Py-ss-PEG-ss-Py 胶束溶液 2ml，并分装到两个 2ml 的 EP 管中，从饱和茚水中取出 1ml，加入其中的一个 EP 管中并混匀，然后再从稀释过的 EP 管中取出 1ml 到一个空的 2mlEP 管，再用饱和茚水对半稀释，直到稀释到 10000 倍以上，另外再用一个 1.5mlEP 管装 1ml 的饱和茚水。对以上的样品做好标记，分别用荧光测量其荧光强度，参数为发射波长 390nm，激发波长范围：320nm-360nm。

2.2.2.3 DLS（动态光散射）测量胶束粒径

粒径是载药胶束的重要属性，关系到其在人体内的分布、滞留时间、载药量、胞吞等性质。

使用动态光散射光谱仪对上一步骤制得的 Py-ss-PEG-ss-Py 和 Py-PEG-Py 胶束样品进行检测，测定温度为 25° C，结果见图 3-6。

2.3 Py-ss-PEG-ss-Py 胶束的刺激响应性及自组装测试

2.3.1 实验仪器

傅里叶变换红外光谱仪（Nexus 670FT-IR）；荧光光谱仪（Hitachi F-7000）；紫外分光光度计（Perkin Elmer L650）。

2.3.2 实验方法

根据前文描述的方法制得 0.5mg/ml，Py-ss-PEG-ss-Py 胶束溶液 30ml 和 0.5mg/ml，Py-PEG-Py 胶束溶液 15ml。然后用密封容器装足量的超纯水抽真空补充氮气重复三次，得到去除空气并用氮气保护的超纯水。从中每次取出 300 μ l 并称取 9.219mg (0.03mol) GSH 溶于其中，并在特定的时间点（0h，1h，2h，3h，4h，6h，10h，24h，48h）分别配制为 1ml 由以下成分组成的溶液：

#1: Py-PEG-Py, 0mM GSH

#2: Py-PEG-Py, 10mM GSH

#3: Py-ss-PEG-ss-Py, 0mM GSH

#4: Py-ss-PEG-ss-Py, 0.5mM GSH

#5: Py-ss-PEG-ss-Py, 10mM GSH

配制完成之后放置在 37° C 恒温摇床中，避光进行反应，待测量时间到时取出 1mL 溶液，测量其荧光和紫外特征。荧光的参数 1 为激发波长 340nm，发射波长范围为 350nm-600nm，参数 2 为发射波长 390nm，激发波长范围为 320nm-370nm；紫外的参数为全谱 250nm-500nm。分别得到图 3-8 至 3-16。

3 结果与讨论

3.1 Py-ss-PEG-ss-Py 的合成与表征

3.1.1 ^1H NMR

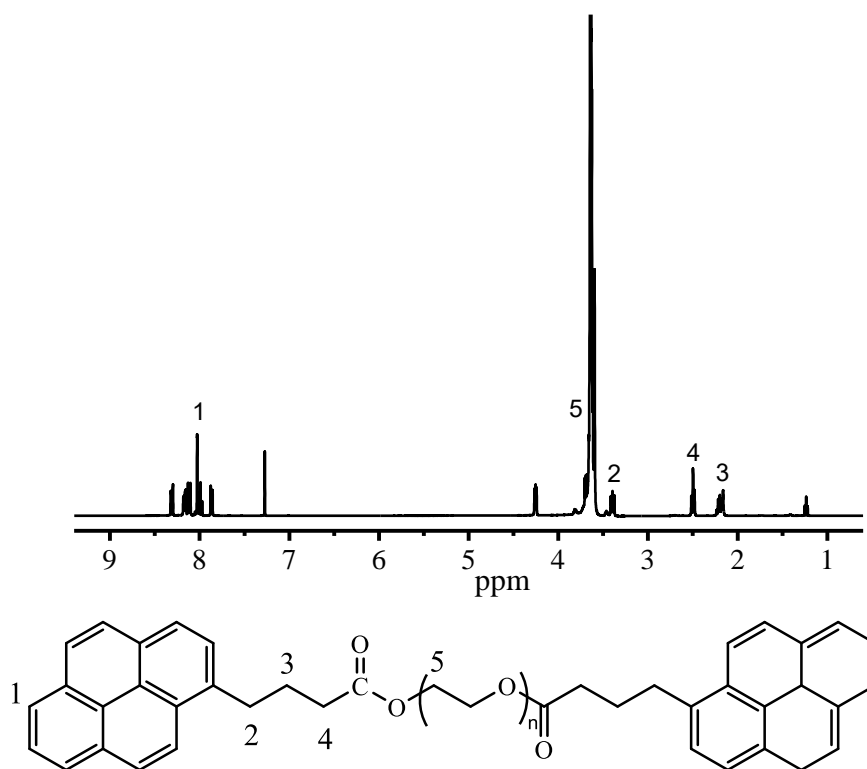


图3-1 Py-PEG-Py的核磁氢谱图

Figure 3-1 The proton nuclear magnetic resonance of Py-PEG-Py

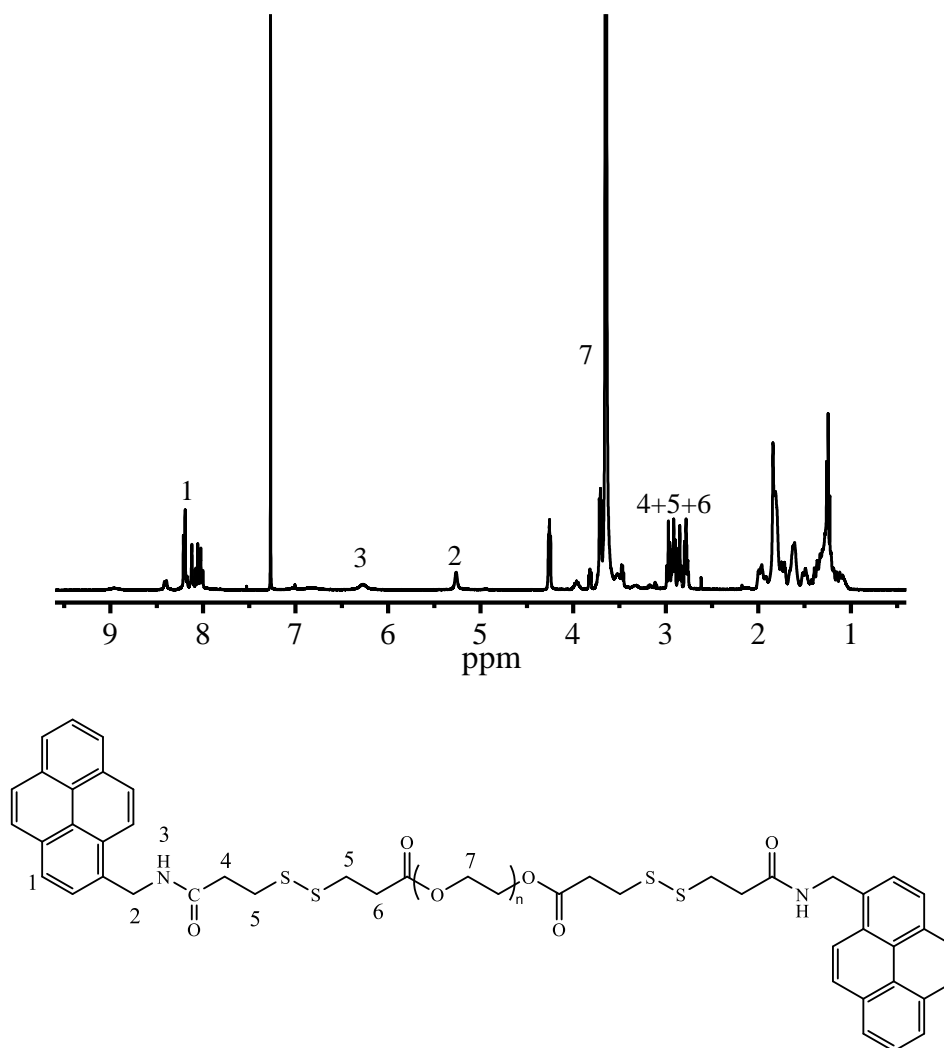


图3-2 Py-ss-PEG-ss-Py的核磁氢谱图

Figure 3-2 The proton nuclear magnetic resonance of Py-PEG-Py

图 2-4, 2-6 中根据核磁氢谱分析, 两个物质都有的 $\delta = 4.25$ ppm 处的峰为 PEG 末端与 C=O 相连的亚甲基质子震动峰。 $\delta = 7.8-8.4$ ppm 的多重峰对应芘基团上的氢。而 Py-ss-PEG-ss-Py 和 Py-PEG-Py 相比独有的 $\delta = 6.2-6.4$ ppm 的峰可确定产物中含有酰胺基团, $\delta = 2.7-3.0$ ppm 的多重峰对应与二硫键相连的亚甲基的氢, 结合其他峰的位置及峰面积比可证明分别得到了正确的产物。

3.1.2 MS

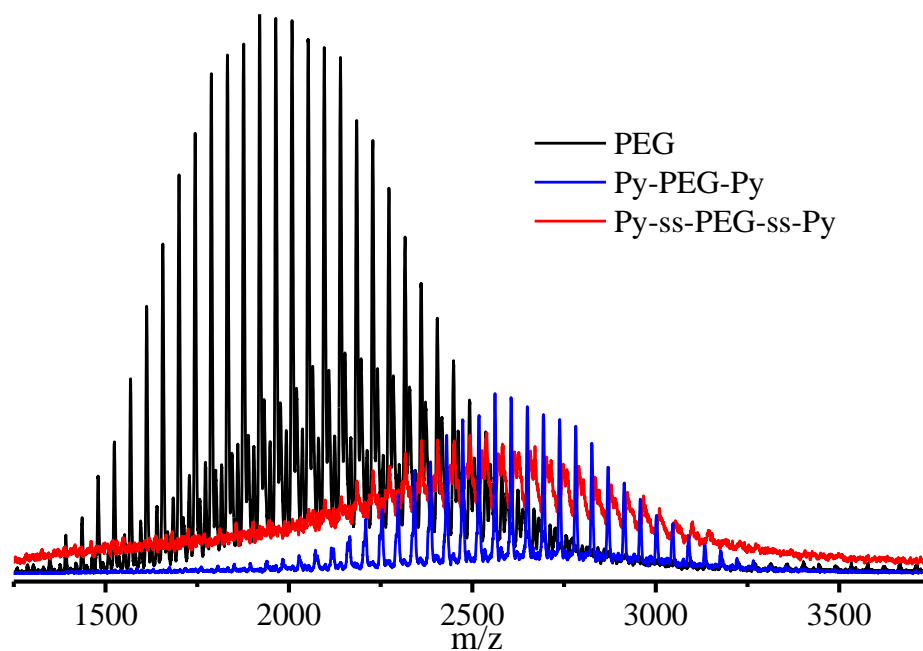


图3-3 两种单体和PEG的质谱图

Figure 3-3 The mass spectrometry of the two monomer and PEG

从飞行质谱图中可知，测试样品的分子量都非常接近原合成材料的分子量，证明我们合成得到了正确的产物。

3.1.3 FT-IR

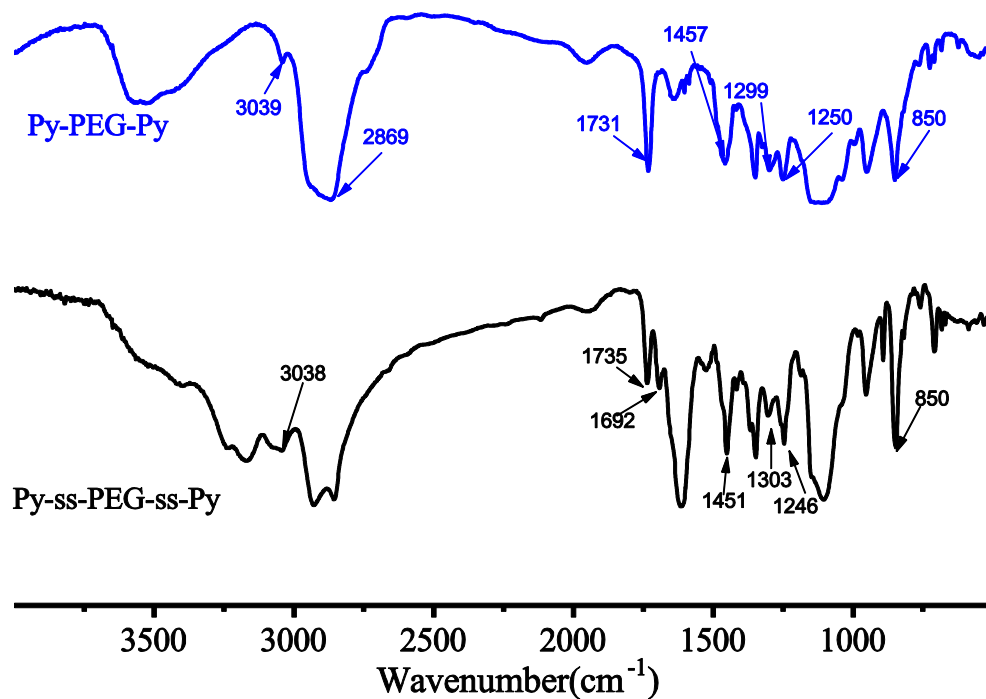


图3-4 两种单体的红外图谱

Figure 3-4 The IR of the two monomer

图 3-4 为制得的两种聚合物材料的红外图谱。观察 Py-PEG-Py 的谱图,我们可以看出: 3039 cm^{-1} 和 850 cm^{-1} 对应芳环的碳氢的伸缩振动峰和面外振动峰, 碳碳双键伸缩振动峰位于 1457 cm^{-1} 处, 这几处苯环的特征峰能证明茈基团的存在。1731 cm^{-1} 为酯羰基伸缩振动峰, 1299 cm^{-1} 和 1250 cm^{-1} 为酯基上的碳氧伸缩振动峰。2869 cm^{-1} 为亚甲基的伸缩振动峰。根据以上分析可确定产物结构正确。而在 Py-ss-PEG-ss-Py 中 3038 cm^{-1} 、1451 cm^{-1} 、850 cm^{-1} 的峰可确定茈基团的存在。1735 cm^{-1} 、1303 cm^{-1} 、1246 cm^{-1} 处的峰可证明结构中含有酯基。1692 cm^{-1} 的吸收峰表示聚合物中有酰胺基团。红外谱图的数据辅助证明了产物结构的正确性。

3.2 Py-ss-PEG-ss-Py 的体外的聚集行为研究

3.2.1 临界胶束浓度

测定原理是: 茈在水中溶解度较低, 很难在荧光下显示出荧光强度, 而当其以分子形式被包裹在胶束的疏水部分时, 其荧光强度会显著增强, 我们就可以利用这一点, 在单体浓度不断增加的情况下, 刚开始由于小于临界胶束浓度, 荧光会很低, 而超过临界胶束浓度时, 由于茈被胶束包裹, 荧光强度就会突变。

我们在固定发射 390nm 的荧光条件下, 分别测得纯茈水和胶束在 320nm-360nm 间的峰的位置为 333.6nm 和 339.6nm。后对两者在同一稀释强度下的荧光强度作比, 在对数坐标下获得图 3-5。

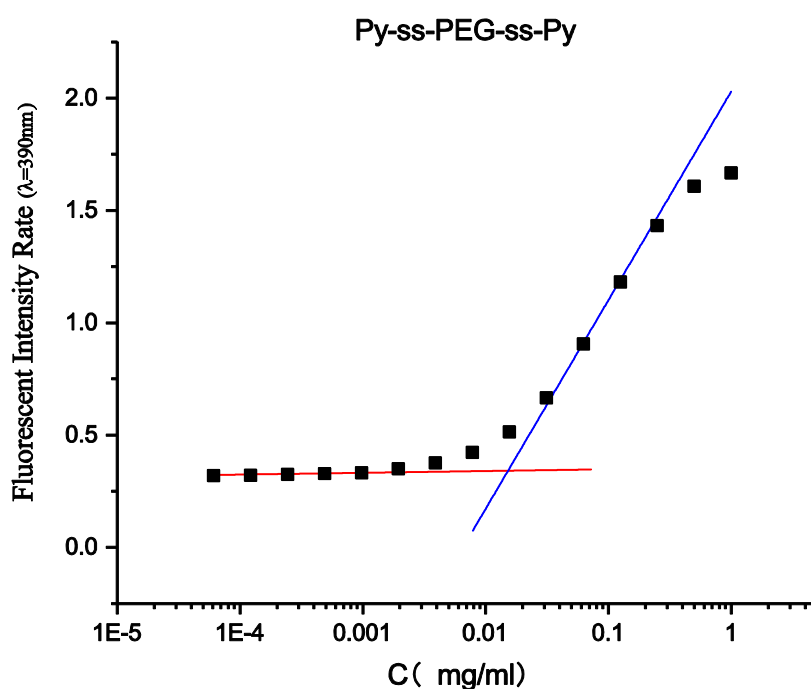


图3-5 Py-ss-PEG-ss-Py胶束的临界胶束浓度
Figure 3-5 The CMC of Py-ss-PEG-ss-Py micelle

从荧光条件 390nm 处的 Py-ss-PEG-ss-Py 胶束的临界胶束浓度比例对数图可以得出，Py-ss-PEG-ss-Py 的临界胶束浓度为 0.015mg/ml，这种临界胶束浓度非常小，说明该胶束在水溶液中具有较高的稳定性，适合作为药物载体在人体内环境中使用。

3.2.2 粒径

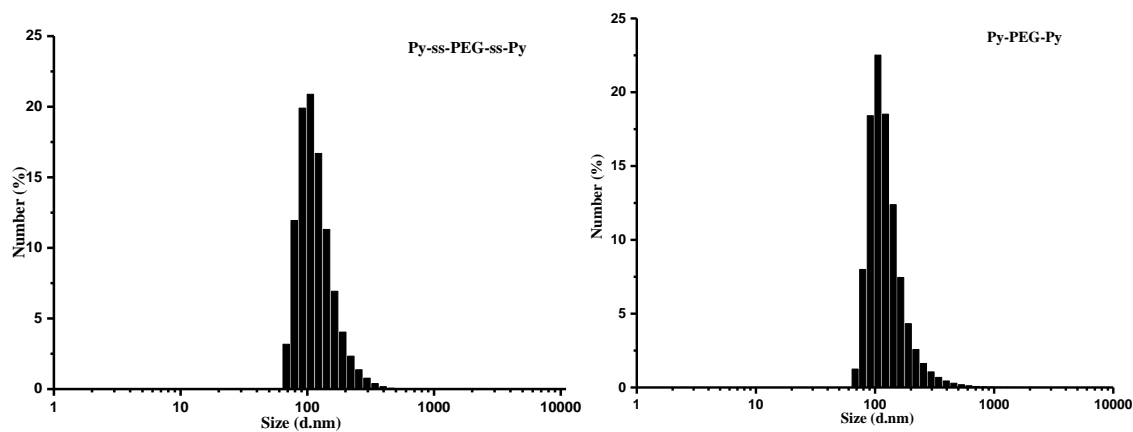


图3-6 Py-ss-PEG-ss-Py（左）和Py- PEG- Py（右）的临界胶束浓度
Figure 3-6 The CMC of Py-ss-PEG-ss-Py (left) and Py- PEG- Py (right)

表 3-1 两种胶束的粒径

Table 3-1 Grain size of the two micelle

胶束	NM(d.nm)	PDI	Count Rate
Py-ss-PEG-ss-Py	120.7	0.180	375.7
Py-PEG-Py	131.5	0.314	337.8

由粒径数据可以看出，Py-ss-PEG-ss-Py 胶束和 Py-PEG-Py 胶束在制成之后品质较好且两者的粒径相差不大，可能是因为 PEG 长链相对较大，所以非 PEG 段的细微差别不容易体现出来。

3.2.3 形貌

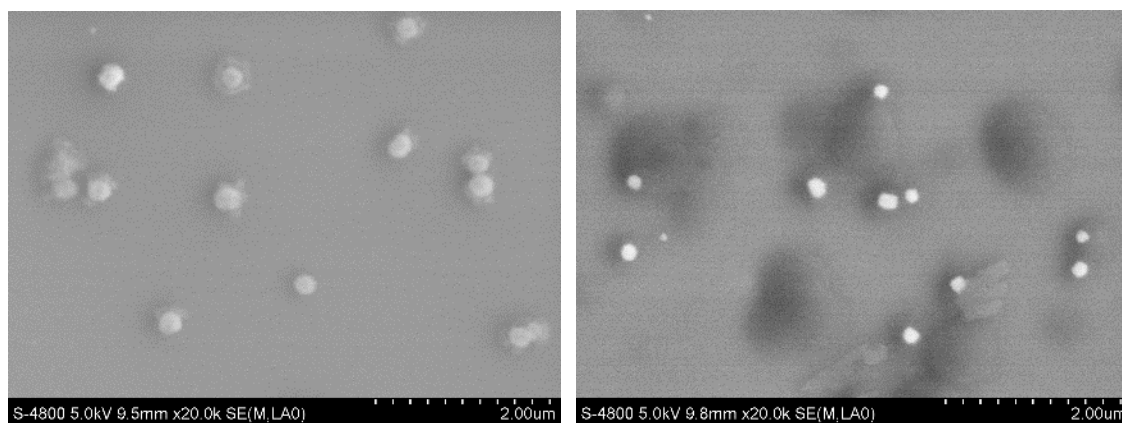


图3-7 Py-PEG-Py (左) 和Py-ss-PEG-ss-Py (右) 胶束的形貌

Figure 3-7 The morphology of Py-PEG-Py and Py-ss-PEG-ss-Py micelle

由形貌特征可以看出, Py-PEG-Py 胶束和 Py-ss-PEG-ss-Py 胶束都类似于球形的颗粒结构, 且粒径较为均一。

3.3 Py-ss-PEG-ss-Py 胶束的刺激响应性测试

3.3.1 紫外光谱

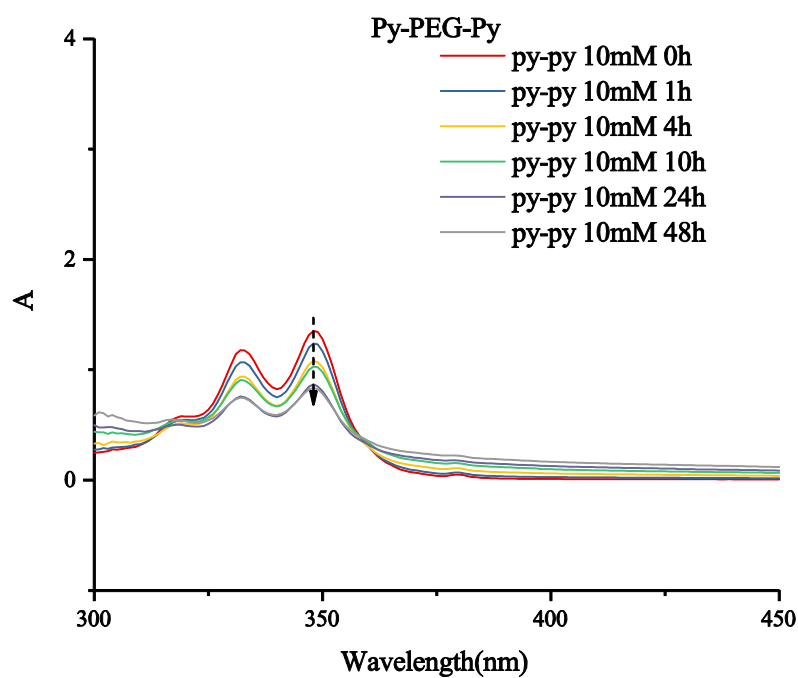


图 3-8 Py-PEG-Py 胶束在 10mM GSH 环境下的紫外光谱

Figure 3-8 The UV-Vis of Py- PEG- Py micelle with 10mM GSH

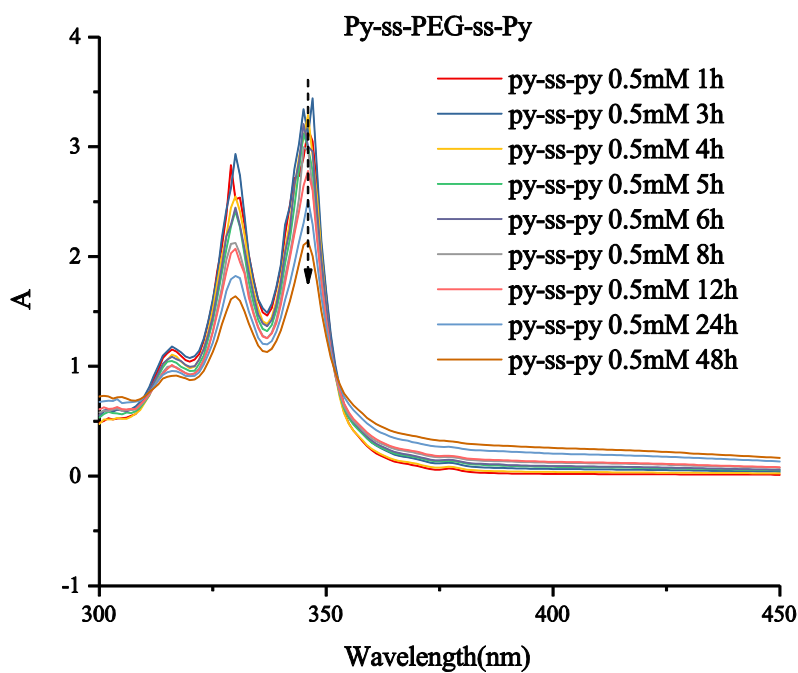


图 3-9 Py-ss-PEG-ss-Py 胶束在 0.5mM GSH 环境下的紫外光谱

Figure 3-9 The UV-Vis of Py-ss-PEG-ss-Py micelle with 0.5mM GSH

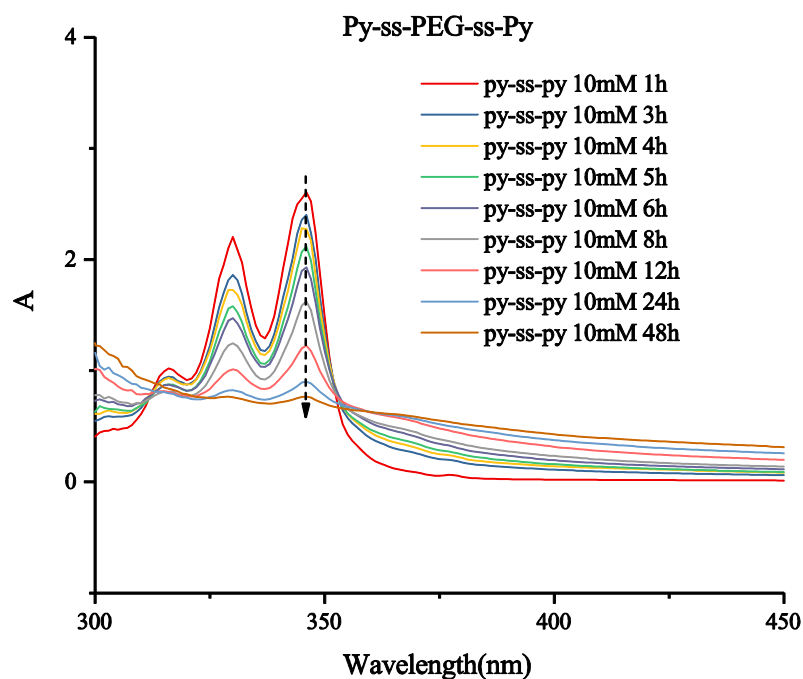


图3-10 Py-ss-PEG-ss-Py胶束在10mM GSH环境下的紫外光谱

Figure 3-10 The UV-Vis of Py-ss-PEG-ss-Py micelle with 10mM GSH

由图 3-10 我们可以看出: Py-PEG-Py 胶束受还原性强弱的影响较小, 随着时间的推移吸光度下降不大。理论上具有还原敏感性的 Py-ss-PEG-ss-Py 胶束的变化就非常明显, 在低浓度的还原性条件下 Py-ss-PEG-ss-Py 胶束反应比较小, 这可能是因为还原强度较低, 比较容易受到外界空气中的氧对实验进行了干扰, 或是还原强度过低导致二硫键难以断裂而导致。而在较强的还原性下, Py-ss-PEG-ss-Py 胶束溶液的吸光度从较大值能够下降到几乎猝灭。这证明了 Py-ss-PEG-ss-Py 具有良好的还原敏感特性且其能够在强还原性条件下做到完全分解。

3.3.2 荧光光谱

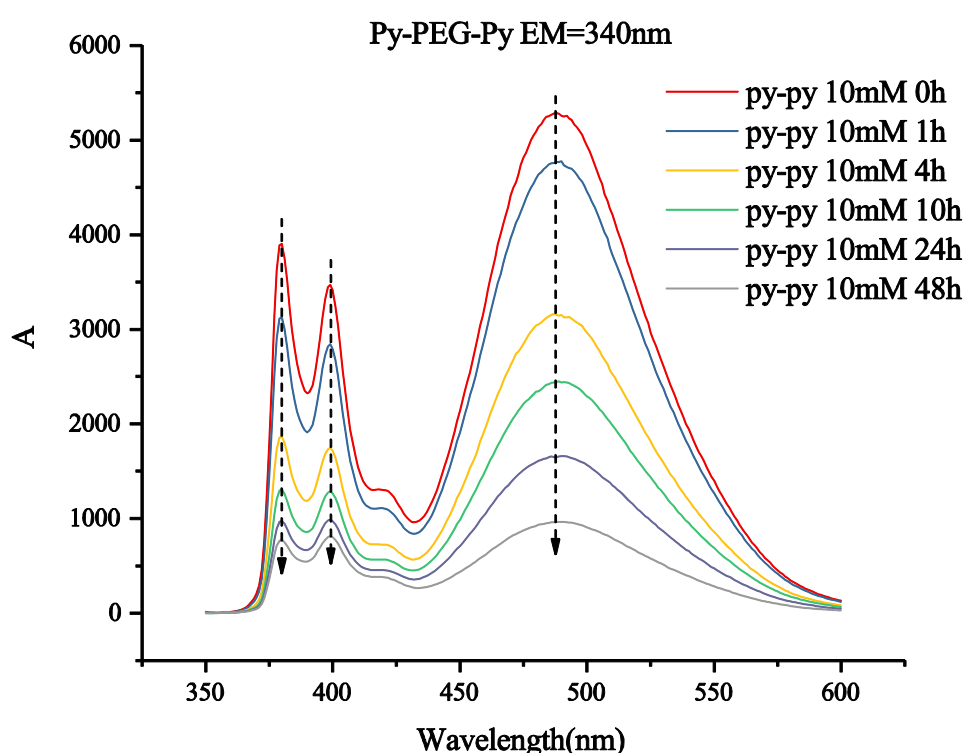


图3-11 Py-PEG-Py胶束在10mM GSH环境下的荧光光谱

Figure 3-11 The Fluorescence spectroscopy of Py- PEG- Py micelle with 10mM GSH

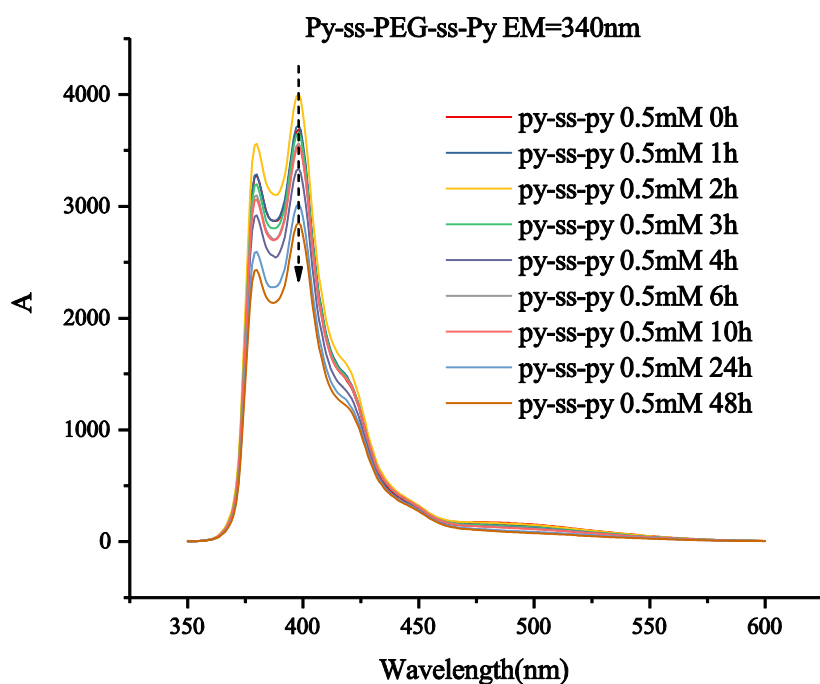


图3-12 Py-ss-PEG-ss-Py胶束在0.5mM GSH环境下的荧光光谱

Figure 3-12 The Fluorescence spectroscopy of Py-ss-PEG-ss-Py micelle with 0.5mM GSH

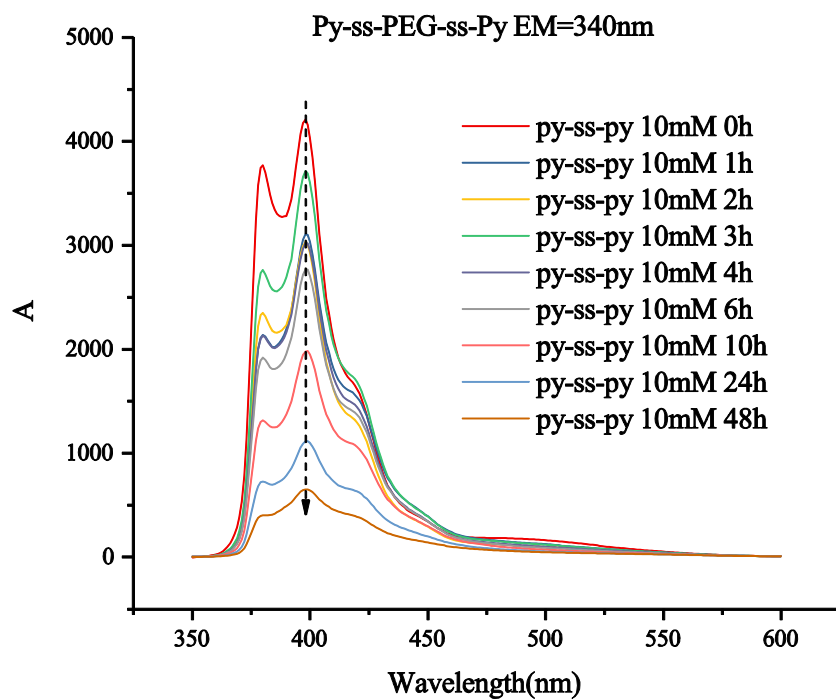


图3-13 Py-ss-PEG-ss-Py胶束在10mM GSH环境下的荧光光谱

Figure 3-13 The Fluorescence spectroscopy of Py-ss-PEG-ss-Py micelle with 10mM GSH

由图 3-11 至 3-13 我们可以看出：和紫外光谱的结果相似，Py-ss-PEG-ss-Py 依然对强还原性环境十分敏感，能够较完全地分解，而在弱环境下，Py-ss-PEG-ss-Py 的荧光强度变化较小。而 Py-PEG-Py 的荧光强度在紫外的条件下变化较大。说明强还原性环境可能对于 Py-PEG-Py 有一定的影响。

3.4 Py-ss-PEG-ss-Py 胶束的自组装特性测试

对上面的几组材料进行荧光光谱扫描，参数为 EX=390nm，EM=320nm-370nm。得到图。

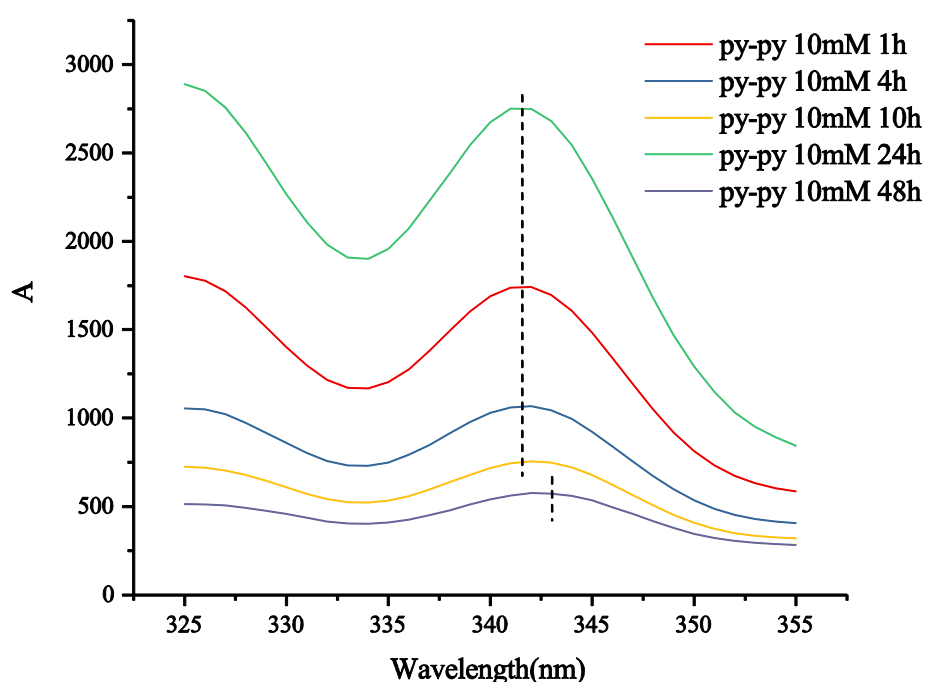


图3-14 Py-PEG-Py胶束在10mM GSH环境下的荧光光谱

Figure 3-14 The Fluorescence spectroscopy of Py- PEG- Py micelle with 10mM GSH

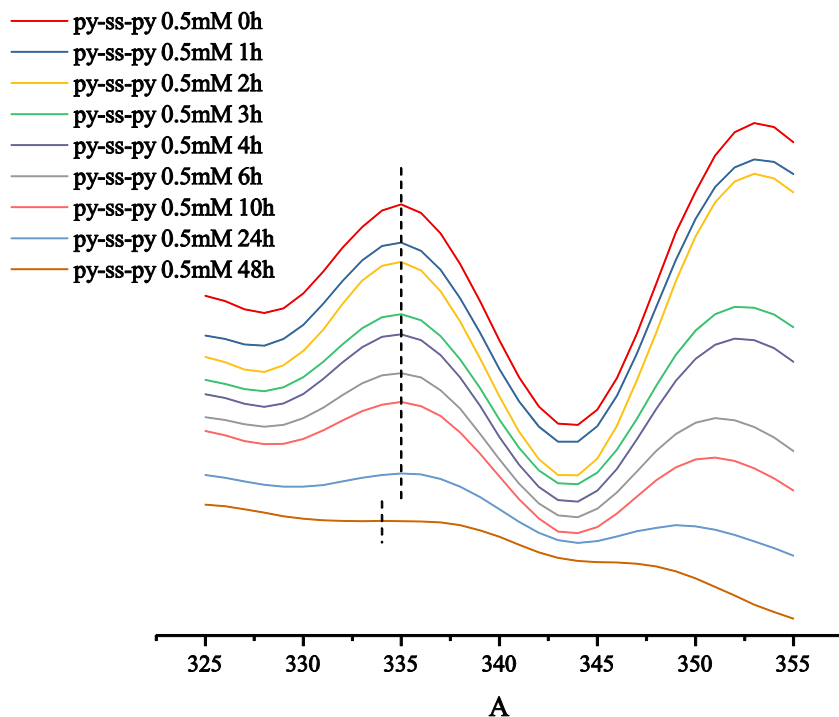


图3-15 Py-ss-PEG-ss-Py胶束在0.5mM GSH环境下的荧光光谱

Figure 3-15 The Fluorescence spectroscopy of Py-ss-PEG-ss-Py micelle with 0.5mM GSH

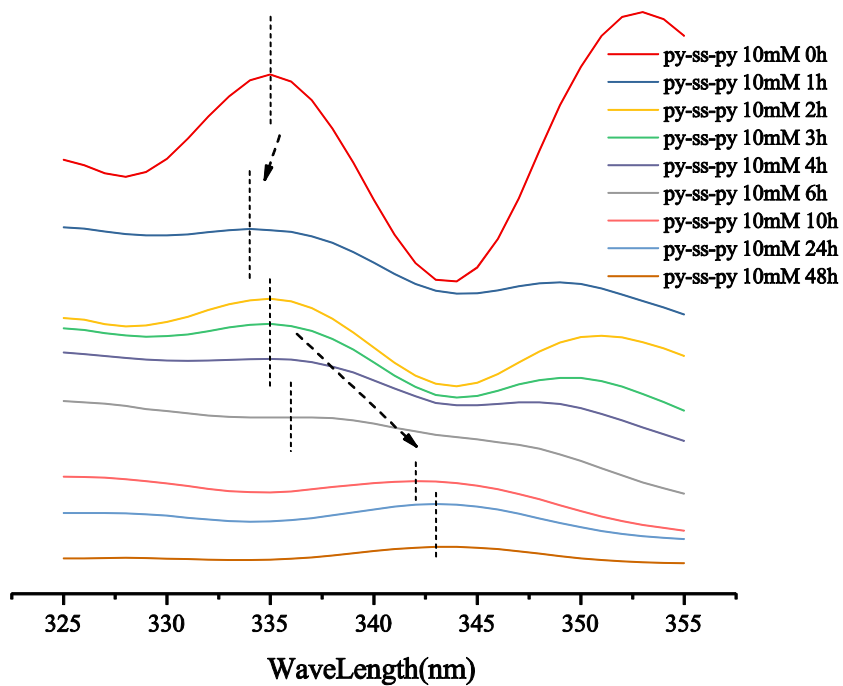


图3-16 Py-ss-PEG-ss-Py胶束在10mM GSH环境下的荧光光谱

Figure 3-16 The Fluorescence spectroscopy of Py-ss-PEG-ss-Py micelle with 10mM GSH

从图 3-14 至 3-16 可以看出, Py-PEG-Py 和 Py-ss-PEG-ss-Py 的峰位不随时间的流动而变化。然而, Py-ss-PEG-ss-Py 的峰位随着时间的增加出现了一个明显的偏移, 且是先蓝移, 再红移较大幅度。把试验中的各种胶束的峰位整合起来生成图 3-17。

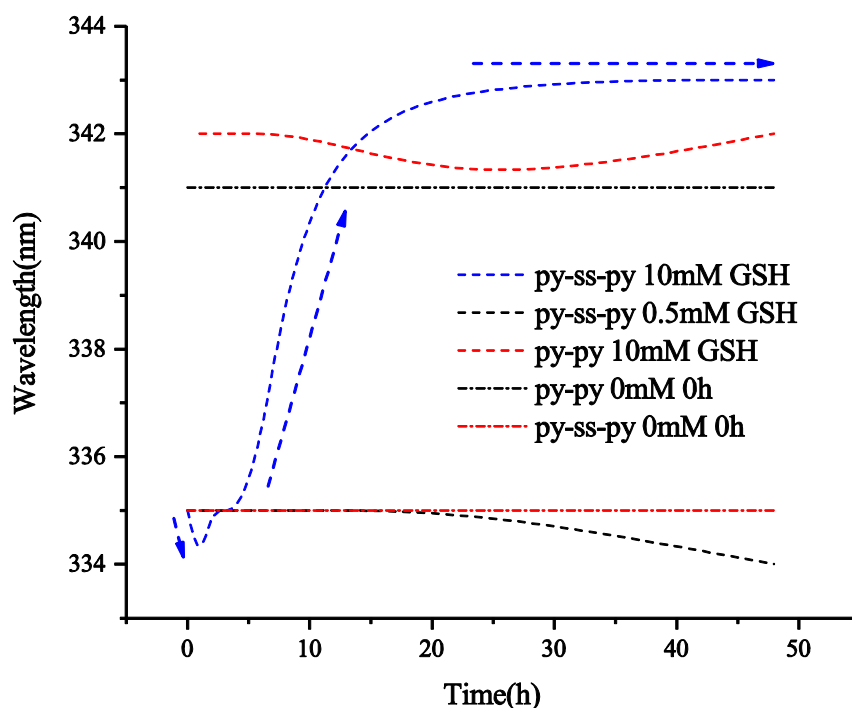


图3-17 各胶束的荧光光谱峰位变化图

Figure 3-17 The peak position of each micelle in fluorescence spectroscopy

图 3-17 说明在强还原性条件下, Py-ss-PEG-ss-Py 中的具有还原敏感性的二硫键被破坏而断裂, 胶束分解, 被包埋在亲脂性环境中的芘缓慢进入到了水溶液中。再这种情况下, 由于芘脱离了胶束中的亲脂的含有共轭效应的部位, 所以共轭效应消失, 芘的荧光蓝移。随后随着芘的衍生物继续地被释放出来, 芘的衍生物在溶液中的浓度不断增大, 最后芘的衍生物彼此之间通过 $\pi - \pi$ 共轭作用而堆叠在一起, 实现芘的自组装, 大 π 键彼此之间形成共轭导致荧光波长显著红移。这说明本实验所研究的 Py-ss-PEG-ss-Py 胶束的确具有在强还原性环境下释放出芘的衍生物并完成芘的自组装的性质。

4 结论及展望

纳米颗粒载药胶束是近年来在抗癌药物载体领域的热门研究方向。

本实验合成了两种两亲性聚合物,即具有还原敏感性的 Py-ss-PEG-ss-Py 和没有还原敏感性的 Py-PEG-Py。并通过核磁图谱验证了单体种苊、酰胺键、和二硫键的存在;质谱验证了合成出的单体分子的分子量是处于正常范围;红外图谱验证了苊、酯键、酰胺键的存在。以上三个检测证明的合成的材料的正确性。

通过制备这两种胶束的空白胶束,并通过苊水稀释法测定了其胶束的临界胶束浓度。大约为 0.015mg/ml, 相对较小。且实验品和对照品都显示出较小的临界胶束浓度。这提示了该聚合物胶束极可能具有对溶液稀释较高的抗性。而通过动态光散射测得 Py-ss-PEG-ss-Py 胶束和 Py-PEG-Py 胶束的粒径分别为 120.7nm, 131.5nm 左右。且分布较为集中,质量较好。通过扫描电镜观察到 Py-ss-PEG-ss-Py 胶束和 Py-PEG-Py 胶束的形貌都为球形,且颗粒大小较为均一,表面光滑。

在对两种胶束的还原敏感性进行测试的时候经比较发现,Py-ss-PEG-ss-Py 胶束的在强还原性的环境下其还原敏感性极其优秀,能够快速且完全地分解,而在弱还原性强度或无还原性强度的环境下则不敏感,且能够较为稳定地维持一定比例的完好胶束。而在同样的条件下,Py-PEG-Py 胶束则普遍地表现出非活性,只分别存在着较微弱的分解反应。

在测试两种胶束的自组装特性中发现。只有 Py-ss-PEG-ss-Py 胶束能够在强还原性环境下释放出苊的衍生物并在一个较低的浓度下相互吸引并完成自组装形成苊的堆叠结构。而这种分子苊的堆叠所形成的结构可以作为前文提到的光动治疗所必须的光敏剂,而同时,Py-ss-PEG-ss-Py 胶束又具有包载化疗药物这一特性,这为未来把 Py-ss-PEG-ss-Py 胶束应用到光动、化学治疗领域提供了较为坚实的前提条件,未来可以就该材料的药物载体和光动治疗前体药物两个身份进行深入研究,可以为癌症的综合治疗提供一种新的思路。

参考文献

- [1] Stewart, B. W. K. P., and Christopher P. Wild. "World cancer report 2014." [J] Health (2017): 21-36
- [2] 胡舜华. 癌症治疗进展[J]. 今日应用医学 2.1 (1997): 19-20.
- [3] 梁尔光, 王玉丽, 高春生. 纳米粒疗法:一种新兴的癌症治疗方法[J]. 国际药学研究杂志 36.1 (2009): 71-75.
- [4] 王梅兰. 光动力疗法[J]. 厦门科技 4 (2015): 28-30.
- [5] 李黎波, 光动力疗法在中国的应用与临床研究[J]. 中国激光医学杂志 21.5 (2012): 278-307.
- [6] 林佳钿, 陈俊辉. 光动力疗法在食管癌治疗中的作用[J]. 中国肿瘤临床与康复 1 (2012): 38-39.
- [7] 徐辉, 仇萌, 邹先彪. 光动力疗法在真菌感染性疾病中的应用[J]. 中国真菌学杂志 9.3 (2014): 189-192.
- [8] 林娟, 周庆翰, 赵晓军. 荧光光谱对自组装多肽作为药物载体的初步研究[J]. 光谱学与光谱分析 29.10 (2009): 2792-2797.
- [9] 王宇宙, 吴安心. 芳环超分子体系中的 π - π 作用[J]. 有机化学, 2008, (06): 997-1011.
- [10] Doxtader, Mark M., et al. "Spectroscopy of benzene complexes with perylene and other aromatic species." [J] Chemical physics 101.3 (1986): 413-427.
- [11] Nishizawa, Seiichi, Yuichi Kato. Fluorescence sensing of anions via intramolecular excimer formation in a pyrophosphate-induced self-assembly of a pyrene-functionalized guanidinium receptor[J]. Journal of the American Chemical Society 121.40 (1999): 9463-9464.
- [12] Bodenant, Bruno, Frédéric Fages, and Marie-Hélène Delville. Metal-induced self-assembly of a pyrene-tethered hydroxamate ligand for the generation of multichromophoric supramolecular systems. The pyrene excimer as switch for iron (III)-driven intramolecular fluorescence quenching[J]. Journal of the American Chemical Society 120.30 (1998): 7511-7519.
- [13] Kamikawa, Yuko, and Takashi Kato. Color-tunable fluorescent organogels: columnar self-assembly of pyrene-containing oligo (glutamic acid) s[J]. Langmuir 23.1 (2007): 274-278.
- [14] 阮军. 光动力疗法的机理研究[D]. 西北大学, 2006. 8-11.
- [15] 陈虹霞, 邹先彪, 张云杰, 等. 光动力疗法治疗鲜红斑痣的新进展[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2014, 28(6): 631-633.
- [16] 陈勇, 李婉婉, 周江蛟, 等. 光动力疗法分子机制研究进展[J]. 中南大学学报: 医学版, 2014 (1): 102-109
- [17] 胡金婷, 刘暘, 杨凯, 等. 基于苯炔苯及荧光探针芘自组装单分子膜的制备及苯胺检测[J]. 化学学报, 2012, 70(18): 1987-1992.
- [18] 周伟东. 基于芘的衍生物的自组装体系的构建表征及性质 [D]. 东华大学, 2006: 25-33
- [19] 赵长稳, 庄秀丽, 陈学思, 等. 温度敏感性 PNIPAM-b-PZLL-b-mPEG 三嵌段共聚物的合成与自组

装研究 [J]. 高分子学报, 2008, 1(11): 1096-1101.

- [20] Lei Z, Liu Y. Study on synthesis of PAN-b-PEG-b-PAN triblock copolymer and the self-assembly Behaviors[J]. ACTA CHIMICA SINICA-CHINESE EDITION-, 2006, 64(24): 2403-2404.

致谢

这一篇论文的完成，预示着我近一个月的痛苦日子熬到了终点，预示着我三个月左右的实验室生活画上了句号，也预示着我大四这一年工作走到了结尾，最终，我的大学四年也将在此刻结束了。在大学四年里，我确确实实改变了很多。从一开始的木讷内向小透明，变成了现在我比较欣赏的自己。是四川大学给了我这个机会，而我牢牢地把握住了。

感谢李赛、何斌、曹俊老师对我的本科毕业实验给予了大力的帮助。李赛老师在实验之外对我的照顾让我深受感动，特别是问起我考研状况而恰好李赛老师又是我研究生试卷的出题人是，感觉这真的是一种缘分。何斌老师在实验室对我的帮助很大，教会了我在实验室的各种注意事项，特别是在实验以外的一些守则，让我能够更加全面地了解实验室。曹俊老师也在我的本科毕业实验中帮助很大，不仅负责了实验计划，管理，还担任了学校与本人之间的传达作用，还在实验方面帮我答疑解惑，十分感谢！

另外，非常感谢实验室里的张海师兄、徐龙师兄、苏婷师姐。特别地，十分感谢花了大量时间和精力指导我的成富荣师兄。成富荣师兄无论是在专业知识、技能，还是在个人能力上都十分杰出，不仅带领我顺利完成了实验，还在实验之外教会了我许多。再次感谢！

最后，十分感谢我的家人、朋友在我的背后默默的支持着，虽无涛涛巨浪托起我，但有涓涓细流滋润我。感谢你们在我身后数年如一日地支撑我，让我没有后顾之忧。感谢！

大学生活即将完结。愿大家的未来之路都通向幸福。