



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109157531 A

(43)申请公布日 2019.01.08

(21)申请号 201811008014.2

A61K 51/12(2006.01)

(22)申请日 2018.08.31

A61K 31/704(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(71)申请人 上海工程技术大学

地址 201620 上海市松江区龙腾路333号

(72)发明人 马国昌 刘锡建 袁海宽 陆杰

(74)专利代理机构 上海唯智赢专利代理事务所
(普通合伙) 31293

代理人 李俊丽

(51)Int.Cl.

A61K 9/51(2006.01)

A61K 47/02(2006.01)

A61K 47/32(2006.01)

A61K 41/00(2006.01)

A61K 51/02(2006.01)

A61K 51/06(2006.01)

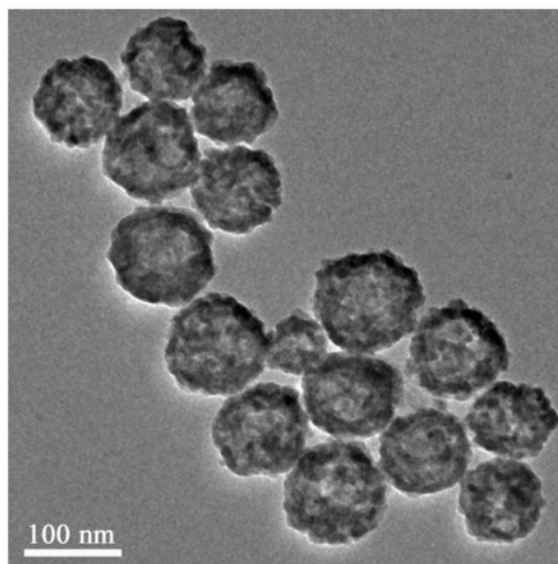
权利要求书1页 说明书8页 附图5页

(54)发明名称

一种多孔铋纳米微球及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明属于多功能纳米材料领域,具体涉及一种多孔铋纳米微球及其制备方法和应用,多孔铋纳米微球表面附着有亲水性表面修饰剂,微球内部分布三维贯通的多孔道结构。其制备方法为:将氧化钼模板、铋盐和亲水性表面修饰剂均匀分散于甘油与其他醇类溶剂的混合溶液中,回流反应,生成的铋纳米实心微球附着在氧化钼模板表面;碱液去除氧化钼模板后,在二甲基亚砜溶液中进行溶剂热反应生成多孔铋纳米微球。本发明制备的多孔铋纳米微球具有放射增强活性、光热转换特性、药物负载活性和生物相容性,实现放射疗法、光热疗法和药物治疗的协同治疗作用,具有作为肿瘤诊疗剂的应用前景。



1. 一种多孔铋纳米微球,其特征在於,微球粒径为20~500nm,微球表面附着有亲水性表面修饰剂,微球内部分布三维贯通的多孔道结构,孔径为2~10nm,孔体积为0.3~0.45cm³g⁻¹。

2. 根据权利要求1所述的多孔铋纳米微球,其特征在於,所述亲水性表面修饰剂包括聚乙烯吡咯烷酮、十六烷基三甲基氯化铵、十六烷基三甲基溴化铵、十六烷基三甲基碘化铵、聚乙二醇或聚丙烯酰胺。

3. 权利要求1或2所述多孔铋纳米微球的制备方法,其特征在於,步骤包括:

(1) 将氧化钼模板、铋盐和亲水性表面修饰剂均匀分散于甘油与其他醇类溶剂的混合溶液中,回流反应,生成的铋纳米实心微球附着在氧化钼模板表面;

(2) 将表面附着有铋纳米实心微球的氧化钼模板均匀分散于碱性溶液中,除去氧化钼模板,得到铋纳米实心微球;

(3) 将铋纳米实心微球分散于二甲基亚砷中,溶剂热反应,制得多孔铋纳米微球。

4. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在於,步骤(1),于170℃~200℃温度下回流反应1~5小时,回流反应体系中,钼元素的摩尔浓度为20~45mol/L,钼元素与铋元素的摩尔比为1:1~2,氧化钼与亲水性表面修饰剂的质量比为1:1~8,甘油与其它醇类溶剂的体积比为1~8:1;所述其它醇类溶剂包括一元饱和醇、二元饱和醇或者多元饱和醇,亲水性表面修饰剂包括聚乙烯吡咯烷酮、十六烷基三甲基氯化铵、十六烷基三甲基溴化铵、十六烷基三甲基碘化铵、聚乙二醇或者聚丙烯酰胺。

5. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在於,步骤(1),回流反应后,先离心取上清液,上清液再次离心取沉淀并洗涤,第一次离心的转速低于第二次离心的转速,得到表面附着有铋纳米实心微球的氧化钼模板。

6. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在於,步骤(2),所述碱性溶液为PH=9~10的氨水或者强碱弱酸盐溶液,除去氧化钼模板后,离心取沉淀并洗涤,得铋纳米实心微球。

7. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在於,步骤(3),于180℃~200℃溶剂热反应12~36小时后,离心取沉淀并洗涤,得多孔铋纳米微球。

8. 权利要求1或2所述的多孔铋纳米微球在制备肿瘤诊疗剂方面的应用。

9. 一种肿瘤诊疗剂,其特征在於,含有权利要求1或2所述的多孔铋纳米微球。

10. 根据权利要求9所述的肿瘤诊疗剂,其特征在於,多孔铋纳米微球内负载肿瘤治疗药物。

一种多孔铋纳米微球及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于多功能纳米材料领域,具体涉及一种多孔铋纳米微球、其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 在过去的几十年中,人类对癌症的认知和攻克取得了突飞猛进的进展,然而癌症依旧是威胁人类健康和寿命的主要疾病之一。由世界卫生组织发布的《全球癌症报告2014》可知:全球面临癌症大暴发,中国发病率第一。全国肿瘤登记中心指出,2012年我国新增300多万癌症患者,每年约250万人死于癌症,如此之高的发病率和死亡率很大程度上源于现有方法对癌症治疗效果不佳、毒副作用大。

[0003] 放疗法(RT)是利用一种或多种电离辐射(如 α 、 β 、 γ 射线)治疗肿瘤疾病的一种新方法。用特定射线照射肿瘤部位,能使肿瘤组织内的大分子(如DNA)或周围的组织水电离,产生活性强的单线态氧;单线态氧能与附近的生物大分子发生氧化反应,产生细胞毒性进而杀伤肿瘤细胞。与传统肿瘤疗法相比较,RT的优势在于能够进行精确、有效的治疗,且副作用很小。到目前为止,已有多家医院在临床上采用放疗法对肿瘤进行诊断和治疗。然而,放疗射线对周围正常软组织细胞具有一定的毒害作用,且病人无法忍受长期的放疗过程。因此需要一种材料,该材料可增强对放疗射线的富集作用,在较低剂量下即可增强辐射效果,同时降低放疗射线对周围正常组织的毒害。

[0004] 光热治疗(PTT)是将具有较高光热转换率的材料注射入活体内部,利用靶向性识别技术或者实体瘤的高通透性和滞留效应(EPR)聚集在肿瘤组织附近,并在外源(一般是近红外光)照射下将光能转化为热能以杀死细胞的一种治疗方法。在癌症治疗中,热疗方法能够有效地提高癌症的治疗效果已被证实。近年来,由于近红外激光对活体组织的强穿透力而被广泛应用于热疗。然而,单一的光热治疗需要长时间的高强度光照,出现因温度太高而引起的热休克。为了克服单一光热治疗的不足,需要进一步开发新型多功能纳米光热转换材料。

[0005] 化学治疗是一种利用抗癌药物(如DOX)的DNA和RNA抑制作用进行治疗的方法。将抗癌药物注射入活体内部,利用靶向性识别技术或者实体瘤的高通透性和滞留效应(EPR)聚集在肿瘤组织附近,通过抑制肿瘤内的DNA或RNA治疗肿瘤。在癌症治疗中,抗癌药物会对肿瘤组织周围的正常组织产生强烈的细胞毒性,因此需要一种药物载体来降低其毒性作用。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种多孔铋纳米微球,该多孔铋纳米微球具有放射增强活性、光热转换特性、药物负载活性和生物相容性,实现放射疗法、光热疗法和药物治疗的协同治疗作用;在较低剂量下,提高肿瘤治疗效果,减轻或者避免放射线、热量及药物对正常组织的毒害作用,有作为临床肿瘤诊疗剂的前景。

[0007] 本发明还提供多孔铋纳米微球的制备方法,该制备方法简单,易操作,成本低,制备周期短。

[0008] 本发明的技术方案为,一种多孔铋纳米微球,其粒径为20~500nm,优选为80~120nm,更优选为100nm;微球表面附着有亲水性表面修饰剂,微球内部分布三维贯通的多孔道结构,孔径为2~10nm,孔体积为 $0.3\sim 0.45\text{cm}^3\text{g}^{-1}$ 。

[0009] 所述亲水性表面修饰剂包括聚乙烯吡咯烷酮、十六烷基三甲基氯化铵、十六烷基三甲基溴化铵、十六烷基三甲基碘化铵、聚乙二醇或者聚丙烯酰胺等,优选为聚乙烯吡咯烷酮。

[0010] 上述多孔铋纳米微球的制备方法,步骤包括:

[0011] (1) 将氧化钼模板、铋盐和亲水性表面修饰剂均匀分散于甘油与其他醇类溶剂的混合溶液中,回流反应,生成的铋纳米实心微球附着在氧化钼模板表面;

[0012] (2) 将表面附着有铋纳米实心微球的氧化钼模板均匀分散于碱性溶液中,去除氧化钼模板,得到铋纳米实心微球;

[0013] (3) 将铋纳米实心微球分散于二甲基亚砷中,溶剂热反应,制得多孔铋纳米微球。

[0014] 步骤(1),氧化钼模板、铋盐和亲水性表面修饰剂经搅拌均匀分散于甘油与其它醇类溶剂的混合溶液中,搅拌的方式有机械搅拌、超声搅拌或者磁力搅拌等。

[0015] 步骤(1)的回流反应体系中,钼元素的摩尔浓度为 $20\sim 45\text{mol/L}$,优选为 $20\sim 29\text{mol/L}$,更优选为 $28\sim 29\text{mol/L}$;钼元素与铋元素的摩尔比为 $1:1\sim 2$,优选为 $1:1\sim 1.4$,更优选为 $1:1.4$,钼元素与铋元素在上述摩尔比范围内保证铋单质晶型;氧化钼与亲水性表面修饰剂的质量比为 $1:1\sim 8$,优选为 $1:5$;甘油与其它醇类溶剂的体积比为 $1\sim 8:1$,优选为 $6:1$,甘油与其它醇类溶剂在上述体积比范围内保证原料反应的顺利进行。

[0016] 步骤(1),所述其它醇类溶剂包括一元饱和醇、二元饱和醇或者多元饱和醇,所述一元饱和醇包括乙醇、丙醇、丁醇或戊醇等,所述二元饱和醇包括乙二醇、丙二醇或新戊二醇等,所述多元醇包括木糖醇、山梨醇或季戊四醇等;优选一元饱和醇和二元饱和醇,进一步优选乙醇、丙醇和乙二醇,作为优选方案,选用乙二醇。

[0017] 步骤(1),亲水性表面修饰剂包括聚乙烯吡咯烷酮、十六烷基三甲基氯化铵、十六烷基三甲基溴化铵、十六烷基三甲基碘化铵、聚乙二醇或者聚丙烯酰胺等,优选为聚乙烯吡咯烷酮。

[0018] 甘油作为还原剂,其它醇类溶剂作为溶剂,由甘油与其它醇类溶剂组成的供反应溶液体系,配合钼元素与铋元素的摩尔比,在亲水表面修饰剂作用下,保证反应生成的铋纳米微球的粒径准确控制在适于人体癌症治疗所需的粒径范围(20~500nm)内,同时保证铋纳米微球粒径分布较均一。

[0019] 步骤(1),于 $170^\circ\text{C}\sim 200^\circ\text{C}$ 温度下回流反应1~5小时。回流反应的温度优选为 200°C ,回流反应的时间优选为4小时。在 $170^\circ\text{C}\sim 200^\circ\text{C}$ 的温度范围内回流反应,进一步将铋纳米微球粒径准确控制在所需的适宜范围(20~500nm)内,并保证粒径均一,若温度低于该范围,无法生成铋纳米微球颗粒;若温度高于该范围,生成的铋纳米微球粒径不均一,治疗效果不佳。

[0020] 步骤(1),回流反应的同时进行搅拌,具体为磁力搅拌。

[0021] 步骤(1),回流反应后,先离心取上清液,上清液再次离心取沉淀,第一次离心的转

速低于第二次离心的转速,得到表面附着有铋纳米实心微球的氧化钼模板。回流反应后,待反应液冷却至室温后再离心。

[0022] 第一次离心的转速为3000~5000rpm,优选为4000rpm;第一次离心时间为2~6min,优选为4min;第二次离心的转速为9000~11000rpm,优选为11000rpm;第二次离心时间为10~30min,优选为20min。先通过第一次的低速离心,剔除较大粒径的铋纳米实心微球,剩余较小粒径的铋纳米实心微球再通过第二次的高速离心与上清液分离。

[0023] 第二次离心所得沉淀还进行洗涤处理,洗涤处理方法为:沉淀经去离子水和无水乙醇交叉浸泡洗涤过程重复洗涤,重复洗涤2~5次,优选为2~3次,更优选为3次;每次用去离子水或无水乙醇浸泡洗涤的时间为20~40分钟,优选为30分钟;每次浸泡洗涤后均经离心分离,离心转速为9000~11000rpm,优选为11000rpm;离心时间为10~30min,优选为20min。优选地,每次浸泡洗涤的同时超声处理,利于铋纳米实球在去离子水或者无水乙醇中均匀分散,在超声波作用下洗涤。

[0024] 步骤(2),碱性溶液中去除氧化钼模板的同时进行搅拌,搅拌的方式有机械搅拌、超声搅拌或磁力搅拌等;碱性溶液中去除氧化钼模板的时间为1~3h,优选为2h。

[0025] 步骤(2),所述碱性溶液为PH=9~10的氨水或者强碱弱酸盐溶液,强碱弱酸盐包括碱金属碳酸盐和/或碱金属碳酸氢盐,具体为碳酸氢钠和/或碳酸钠、或者碳酸氢钾和/或碳酸钾。

[0026] 步骤(2),去除氧化钼模板后,离心取沉淀并洗涤,得铋纳米实心微球。洗涤方法为:沉淀经去离子水和无水乙醇交叉浸泡过程重复洗涤,重复洗涤次数为2~5次,优选为3次;每次用去离子水或无水乙醇浸泡洗涤的时间为20~40分钟,优选为30分钟;每次浸泡洗涤后均经离心分离,离心转速为9000~11000rpm,优选为11000rpm;离心时间为10~30min,优选为20min,得铋纳米实心微球。优选地,每次浸泡洗涤的同时超声处理,利于铋纳米实球在去离子水或者无水乙醇中均匀分散,在超声波作用下洗涤。

[0027] 步骤(2),去除氧化钼模板后,于9000~11000rpm转速下离心分离10~30分钟,取沉淀。转速优选为11000rpm,时间优选为20min。

[0028] 步骤(3),于180℃~200℃溶剂热反应12~36小时。溶剂热反应的温度优选为190℃,溶剂热反应的时间优选为24小时。

[0029] 步骤(3),溶剂热反应后,离心取沉淀并洗涤,得多孔铋纳米微球。洗涤方法为:沉淀经去离子水和无水乙醇交叉浸泡过程重复洗涤,重复洗涤次数为2~5次,优选为3次;每次用去离子水或无水乙醇浸泡洗涤的时间为20~40分钟,优选为30分钟;每次浸泡洗涤后均经离心分离,离心转速为9000~11000rpm,优选为11000rpm;离心时间为10~30min,优选为20min,得多孔铋纳米微球。优选地,每次浸泡洗涤的同时超声处理,利于铋纳米实球在去离子水或者无水乙醇中均匀分散,在超声波作用下洗涤。

[0030] 步骤(3),溶剂热反应后,于9000~11000rpm转速下离心分离10~30分钟,取沉淀。转速优选为11000rpm,时间优选为20min。

[0031] 作为优选方案,步骤包括:

[0032] (1)将氧化钼模板、铋盐和聚乙烯吡咯烷酮均匀分散于甘油与乙二醇体积比为6:1的混合溶液中,于200℃回流反应4小时,冷却至室温后,先于4000rpm转速下离心取上清液,上清液再于11000rpm转速下离心取沉淀,沉淀经去离子水和无水乙醇交叉浸泡洗涤过程重

复洗涤3次,每次用去离子水或无水乙醇超声浸泡洗涤的时间为30分钟,得到表面附着有铋纳米实心微球的氧化钼模板;

[0033] 该回流反应体系中,钼元素的摩尔浓度为28~29mol/L,钼元素与铋元素的摩尔比为1:1.4,氧化钼与聚乙烯吡咯烷酮的质量比为1:5;

[0034] (2) 将表面附着有铋纳米实心微球的氧化钼模板均匀分散于PH=9~10的氨水溶液中,去除氧化钼模板,于11000rpm转速下离心取沉淀,沉淀经去离子水和无水乙醇交叉浸泡洗涤过程重复洗涤3次,每次用去离子水或无水乙醇超声浸泡洗涤的时间为30分钟,得到铋纳米实心微球;

[0035] (3) 将铋纳米实心微球分散于二甲基亚砷中,190℃溶剂热反应24小时,冷却至室温后,于11000rpm转速下离心取沉淀,沉淀经去离子水和无水乙醇交叉浸泡过程重复洗涤3次,每次用去离子水或无水乙醇超声浸泡洗涤的时间为30分钟,得多孔铋纳米微球。

[0036] 本发明制备的多孔铋纳米微球,对细胞无毒害作用,其表面附着有亲水性表面修饰剂(聚乙烯吡咯烷酮),保证生物相容性;其内部具有三维贯通的多孔道结构,作为药物载体利于药物负载,降低药物对正常组织的毒害作用,进行药物治疗;能够富集和增强放射线,增强放射线强度和活性,降低放射线对正常组织的毒害作用,进行放射治疗;可以在近红外照射下发生温度变化,实现光热转换,进行光热治疗;本发明制备的多孔铋纳米微球协同放射治疗、光热治疗和药物治疗,多功能的治疗作用,降低光热转换引起的热休克风险,降低对正常组织的毒害作用,明显改善治疗效果。

[0037] 基于多孔铋纳米微球的放射线增强活性、光热转换特性、药物负载活性和生物相容性,协同其放射线增强活性和光热转换特性,可用作肿瘤部位的检测和诊断试剂;还可以协同放射疗法、光热疗法和药物治疗法,可用作肿瘤的治疗药物。因此,本发明制备的多孔铋纳米微球可用于制备肿瘤诊疗剂,既可作为诊断试剂用于肿瘤部位的定位成像,又可用于制备治疗肿瘤的药物。

[0038] 一种肿瘤诊疗剂,含有上述制备的多孔铋纳米微球。所述多孔铋纳米微球内还负载有治疗肿瘤的药物。例如,负载阿霉素(DOX)等。

[0039] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0040] (1) 本发明制备的多孔铋纳米微球,具有良好的生物相容性和光热转换特性,在808nm激光的安全功率密度(1.0W/cm²)照射下,能有效的将近红外激光的能量转换成热量杀死肿瘤细胞进行光热治疗;并且能够产生大量的单线态氧进行放射治疗,还能够负载抗癌药物(DOX)进行药物治疗,实现放射疗法、光热转换疗法和药物治疗对肿瘤的协同治疗作用。

[0041] (2) 本发明制备的多孔铋纳米微球在低剂量时即可达到良好的放射治疗(200μg/mL)作用和光热转换治疗(100μg/mL)作用,提高抗肿瘤活性的同时,降低其对正常组织的毒害作用。

[0042] (3) 本发明制备的多孔铋纳米微球内部具有三维贯通的多孔道结构,增加单位质量的孔体积,保证合适的孔径,利于抗癌药物的负载;抗癌药物负载在多孔铋纳米微球内部,避免抗癌药物对正常组织的毒害作用。

[0043] (4) 本发明多孔铋纳米微球的制备方法,工艺简单,易操作,制备成本低,制备周期短。

[0044] (5) 本发明多孔铋纳米微球制备过程中,控制去离子水和无水乙醇交叉浸泡洗涤过程的次数,去除反应过程中非目标产物,清洗铋纳米微球的同时,保证铋纳米微球表面附着的亲水性表面修饰剂(聚乙烯吡咯烷酮)适当留存,增强铋纳米微球的生物相容性。

附图说明

[0045] 图1是实施例1制备的多孔铋纳米微球的透射电镜图。

[0046] 图2是实施例1制备的多孔铋纳米微球的紫外吸收光谱图。

[0047] 图3是实施例1制备的多孔铋纳米微球的X射线衍射图。

[0048] 图4是实施例1制备的多孔铋纳米微球在近红外激光照射下的光热曲线图。图4从下至上依次为0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度时的多孔铋纳米微球随时间变化的光热曲线。

[0049] 图5是不同浓度多孔铋纳米微球对人子宫颈癌细胞(HeLa)和内皮细胞(Endothelial)活性的影响测试图。

[0050] 图6是不同浓度(0g/mL、200g/mL)多孔铋纳米微球培育的人子宫颈癌细胞(HeLa)在不同剂量(0、2、4、6、8Gy)X射线照射下的细胞活性图。

[0051] 图7是人子宫颈癌细胞(HeLa)分别经多孔铋纳米微球(pBi)、X射线照射(X-ray)、多孔铋纳米微球加X射线照射(X-ray+pBi)培育后的DNA双链断裂结果。

[0052] 图8是经多孔铋纳米微球吸附负载后的DOX水溶液(pBi/DOX)的紫外吸收曲线图(a)和负载药物的多孔铋纳米微球在不同酸碱环境和/或近红外照射下的药物释放曲线图(b)。

[0053] 图9是皮下移植人子宫颈癌细胞(HeLa)的小鼠在不同治疗方法(空白组Control、NIR组、pBi组、DOX组、pBi/DOX组、pBi+NIR组、pBi/DOX+NIR组)下的HeLa细胞生长曲线图,图9从上之下依次为空白Control、NIR、pBi、DOX、pBi/DOX、pBi+NIR、pBi/DOX+NIR治疗方法下的HeLa细胞生长曲线图。

具体实施方式

[0054] 下面通过具体实施方式来进一步说明本发明的技术方案。本领域技术人员应该明了,所述实施例仅仅是帮助理解本发明,不应视为对本发明的具体限制。

[0055] 实施例1

[0056] 在本实施例中,通过以下方法制备多孔Bi纳米微球,具体包括以下步骤:

[0057] 1. 将100mg氧化钼(约0.7mmol)、0.4851g五水合硝酸铋(约1mmol)分散于30mL甘油和5mL乙二醇组成的混合溶液中,再加入0.4998g聚乙烯吡咯烷酮K-30(PVP),超声搅拌均匀。

[0058] 2. 油浴,常压于200 $^{\circ}\text{C}$ 回流搅拌反应4h,然后冷却至室温,在4000rpm下离心分离4min,剔除较大粒径的Bi纳米实心球,取上层溶液,在11000rpm下离心分离20min,取沉淀。沉淀分散到去离子水中,超声30min,11000rpm下离心分离20min;取沉淀分散到无水乙醇中,超声30min,11000rpm下离心分离20min;取沉淀再重复进行2次上述去离子水和无水乙醇交叉浸泡洗涤过程,得到表面附着有铋纳米实心微球的氧化钼。

[0059] 3. 除模板:将上述表面附着有铋纳米实心微球的氧化钼分散于10mL去离子水中,

加入3mL氨水至PH=9~10,室温下磁力搅拌2h,11000rpm下离心20min,取沉淀重复进行3次去离子水和无水乙醇交叉浸泡洗涤过程(该操作同步步骤2),得到粒径均一的铋(Bi)纳米实心微球。

[0060] 4. 溶剂热:将铋纳米实心微球分散于二甲基亚砷中,超声均匀,190℃下溶剂热反应24h,冷却至室温,在11000rpm下离心20min,取沉淀重复进行3次去离子水和无水乙醇交叉浸泡洗涤过程(该操作同步步骤2),得到多孔铋纳米微球(pBi纳米微球)。

[0061] 本实施例制备的多孔铋纳米微球的透射电镜图如图1所示,铋(Bi)纳米微球的粒径小且较均一,分布在100nm左右,通过调整反应体系各原料的用量和反应条件可生成粒径在20~500nm的铋纳米微球,且获得的铋纳米微球粒径较均一。

[0062] 由图1还可看出,铋纳米微球上分布有透光区(阴影较弱,较周围区域光亮),说明铋纳米微球内部形成三维贯通的多孔道结构,经测定,孔径大小分布在2~10nm,孔体积为 $0.301\text{cm}^3\text{g}^{-1}$ 。通过调整反应体系各原料的用量和反应条件可调节孔径和孔体积,提高其负载能力。

[0063] 本实施例制备的多孔铋纳米微球的紫外吸收光谱图如图2所示,多孔铋纳米微球没有特征紫外吸收峰,选用808nm的近红外激光进行照射,增加穿透深度的同时,减小正常组织的吸收,避免局部过热导致的热损伤。

[0064] 为了验证本实施例制备的多孔纳米微球由铋单质组成,及确定铋单质的晶型,进行X射线衍射分析,结果如图3所示,本实施例制备的多孔纳米微球的每个特征峰都和标准卡片(JCPDS No.44-1246)的特征峰对应,证明其符合六方金属铋的晶型。

[0065] 对本实施例制备的多孔Bi纳米微球进行光热性能分析,结果如图4所示,用808nm、 $1\text{W}/\text{cm}^2$ 的近红外激光照射不同浓度(0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的多孔Bi纳米微球,温度随着多孔Bi纳米微球浓度和照射时间的增加而增加。当多孔Bi纳米微球浓度达到100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或以上时所产生的温度变化已足够杀死癌细胞。

[0066] 实施例2

[0067] 在本实施例中,通过CCK-8试剂盒对实施例1制备的多孔Bi纳米微球进行HeLa细胞和Endothelial(内皮细胞)活力影响的考察,其方法如下:

[0068] 1. 细胞培养:

[0069] 将人宫颈癌细胞HeLa或者内皮细胞Endothelial接种到一个细胞密度为 $2 \times 10^4/\text{mL}$,每孔200 μL 的96孔板中,置于在37℃和5%的 CO_2 浓度的细胞培养箱中培养24h。

[0070] 2. 细胞活力测定:

[0071] 贴壁24h后,更换含浓度为0、1.25、2.5、5、10、20、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的多孔Bi纳米微球(来自实施例1)的完全培养基,每组设6个复孔;在处理24h后,撤掉培养基;每孔加入200 μL CCK液(用无血清培养基按1:20稀释),在37℃培养箱中孵育1h后,在酶标仪上测定450nm处吸光度值,以0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的多孔Bi纳米微球培养基组作为对照组,计算多孔Bi纳米微球各浓度组培养基中细胞的相对存活率。

[0072] 细胞活力测定结果如图5所示,与对照组相比,实施例1制备的多孔Bi纳米微球从0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 到200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 实验浓度范围内对HeLa细胞和内皮细胞(Endothelial)的活力没有显著性影响,其细胞活力均在90%~100%范围内小幅度波动,没有明显的细胞毒性,表明本发明的多孔Bi纳米微球在该浓度范围内具有良好的生物相容性。

[0073] 实施例3

[0074] 在本实施例中,对多孔铋纳米微球的放射治疗效果进行考察,具体方法如下:

[0075] 1.细胞的培养:

[0076] 将人宫颈癌细胞HeLa接种到一个细胞密度为 2×10^5 细胞/孔的直径为60毫米玻璃底盘中,置于在37℃和5%的CO₂浓度的细胞培养箱中培养24h。

[0077] 2.细胞活力的测定:

[0078] 在接受不同用量(0μg/mL、200μg/mL)的pBi纳米微球(来自实施例1)孵育后,接受不同剂量(0、2、4、6、8Gy)X射线照射的处理,测定细胞存活测定结果如图6所示,不同剂量X射线照射对HeLa细胞活力有显著性影响,相同剂量X射线照射时,多孔铋纳米微球(pBi)显著增强X射线对HeLa细胞活力的抑制作用,说明多孔铋纳米微球对癌症部位的X射线有富集和增强效果,本实施例所使用铋纳米微球浓度达到200μg/mL时即可显著杀死癌细胞,起到显著的治疗效果。

[0079] DNA双链断裂实验,将孵育好的HeLa细胞均匀地分为三组:pBi纳米球组、X射线(6Gy)组、pBi纳米球+X射线(6Gy)组。在接受治疗后,细胞使用标准的γ H2A.X和DAPI进行染色处理,并通过共焦显微镜观察细胞的生存状态,结果如图7所示,pBi纳米球+X射线对细胞核具有严重的破坏性,表明本发明的多孔Bi纳米微球具有良好的放疗效果。

[0080] 实施例4

[0081] 在本实施例中,对多孔Bi纳米微球的药物负载和释放进行考察,具体方法如下:

[0082] 1.药物的负载:

[0083] 取4.0mg多孔Bi纳米微球(来自实施例1)分散在5mL 0.5mg/mL的DOX(阿霉素)水溶液中,在黑暗中振荡36h,离心,取上清液,使用UV紫外分光光度计检测游离的DOX浓度,如图8a的pBi/DOX吸收曲线所示。

[0084] 多孔Bi纳米微球(pBi)、多孔Bi纳米微球吸附后的DOX水溶液(pBi/DOX)和未经多孔Bi纳米微球吸附的DOX水溶液(DOX)的紫外吸收曲线如图8a所示,多孔Bi纳米微球吸附水溶液中的DOX,表明多孔Bi纳米微球可负载药物。

[0085] 2.药物的释放:

[0086] 取以上方法所制备的负载药物的多孔Bi纳米微球分别分散在不同pH(7.4和5.0)的PBS缓冲溶液中,分成以下组别:pH 7.4、pH 7.4+NIR(近红外照射)、pH 5.0和pH 5.0+NIR(近红外照射),近红外照射(NIR)方法为:每一小时激光照射一次,每一次激光照射时间为5min;在各振荡时间点(1、2、3、4、6、8、10、12和13h),离心取上清液,通过UV紫外分光光度计检测游离的DOX浓度。

[0087] 结果如图8b所示,激光照射和酸性环境均可提高多孔铋纳米微球内负载药物的释放度,更好地杀死肿瘤。

[0088] 实施例5

[0089] 在本实施例中,对多孔Bi/DOX纳米微球的抑瘤作用进行考察,具体方法如下:

[0090] 按治疗方法不同,分以下组别平行考察:

[0091] pBi/DOX+NIR组:皮下移植HeLa细胞的小鼠尾静脉注射200μL、2mg/mL的载药多孔铋纳米微球(pBi/DOX),DOX占pBi/DOX给药量的10%,血液循环8小时后,激光(808nm,1W/cm²)照射肿瘤部位10min,同时用热像仪检测升温过程,激光照射后第二天开始用游标卡尺

测量肿瘤大小,此后每隔两天用游标卡尺测量肿瘤大小。

[0092] pBi/DOX组:皮下移植HeLa细胞的小鼠尾静脉注射200 μ L、2mg/mL的载药多孔铋纳米微球(pBi/DOX),DOX占pBi/DOX给药量的10%,于第二天开始用游标卡尺测量肿瘤大小,此后每隔两天用游标卡尺测量肿瘤大小。

[0093] pBi+NIR组:皮下移植HeLa细胞的小鼠尾静脉注射200 μ L、2mg/mL的多孔铋纳米微球(pBi),血液循环8小时后,激光(808nm,1W/cm²)照射肿瘤部位10min,同时用热像仪检测升温过程,激光照射后第二天开始用游标卡尺测量肿瘤大小,此后每隔两天用游标卡尺测量肿瘤大小。

[0094] pBi组:皮下移植HeLa细胞的小鼠尾静脉注射200 μ L、2mg/mL的多孔铋纳米微球(pBi),于第二天开始用游标卡尺测量肿瘤大小,此后每隔两天用游标卡尺测量肿瘤大小。

[0095] DOX组:皮下移植HeLa细胞的小鼠静脉注射200 μ L、200 μ g/mL的DOX(阿霉素)药物,于第二天开始用游标卡尺测量肿瘤大小,此后每隔两天用游标卡尺测量肿瘤大小。

[0096] NIR组:皮下移植HeLa细胞的小鼠用激光(808nm,1W/cm²)照射肿瘤部位10min,同时用热像仪检测升温过程,激光照射后第二天开始用游标卡尺测量肿瘤大小,此后每隔两天用游标卡尺测量肿瘤大小。

[0097] 空白组(Control):皮下移植HeLa细胞的小鼠不作任何前处理,于分组后的第二天开始用游标卡尺测量肿瘤大小,此后每隔两天用游标卡尺测量肿瘤大小。

[0098] 本实施例各组别的肿瘤生长情况如图9所示,相对于空白对照组(Control),仅照射激光(NIR组)、仅注射药物(DOX组)和仅注射多孔铋纳米微球(pBi组)的处理,其肿瘤生长情况与空白对照组相近,均不能明显抑制肿瘤生长;相对于空白对照组,给予载药多孔铋纳米微球(pBi/DOX组),仅减缓了肿瘤的生长速度,不能抑制肿瘤生长;相对于空白对照组,给予多孔铋纳米微球和激光照射(pBi+NIR组)虽能明显抑制肿瘤生长,但是随着时间的延长肿瘤出现复发现象;相对于空白对照组,给予载药多孔铋纳米微球和激光照射(pBi/DOX+NIR组)显著抑制肿瘤生长的同时,肿瘤不会随着时间的延长出现复发现象。

[0099] 上述实施例的描述是为了便于该领域普通技术人员的理解和使用。熟悉本领域技术的人员显然可以容易地对这些实施例做出各种修改,并把在此说明的一般原理应用到其他实施例中而不必经过创造性的劳动。因此,本发明不限于上述实施例,本领域技术人员根据本发明的揭示,不脱离本发明范畴所做出的改进和修改都应该在本发明的保护范围之内。

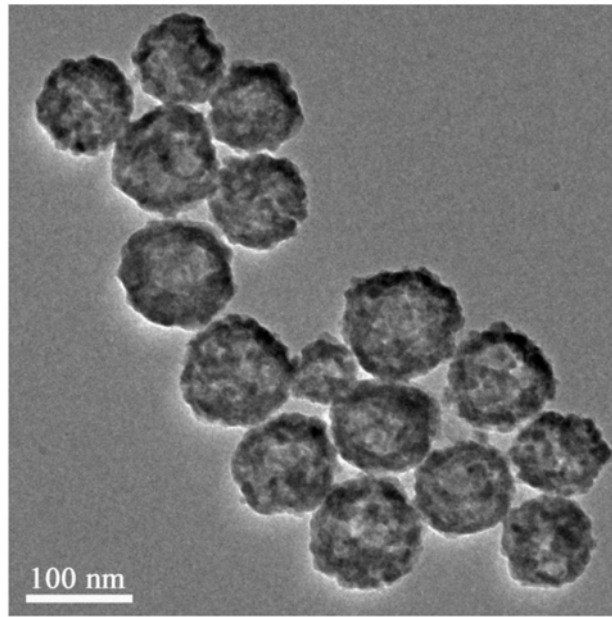


图1

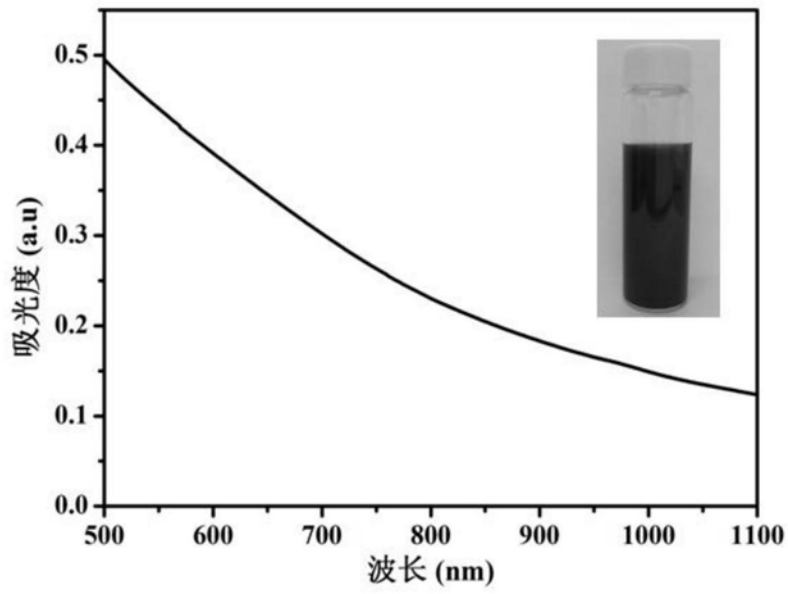


图2

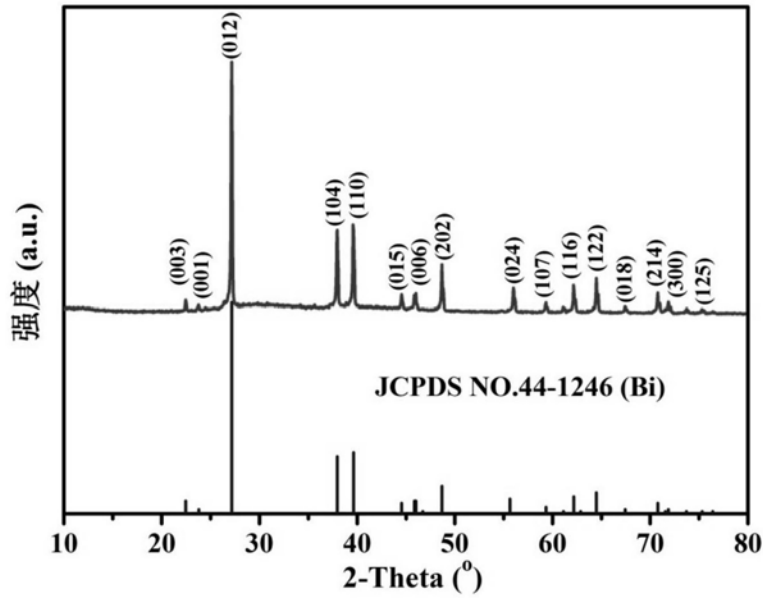


图3

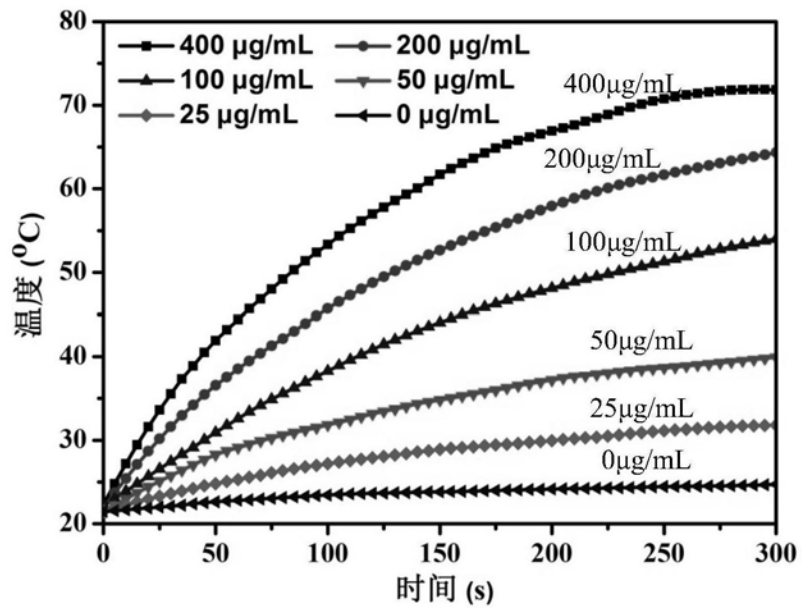


图4

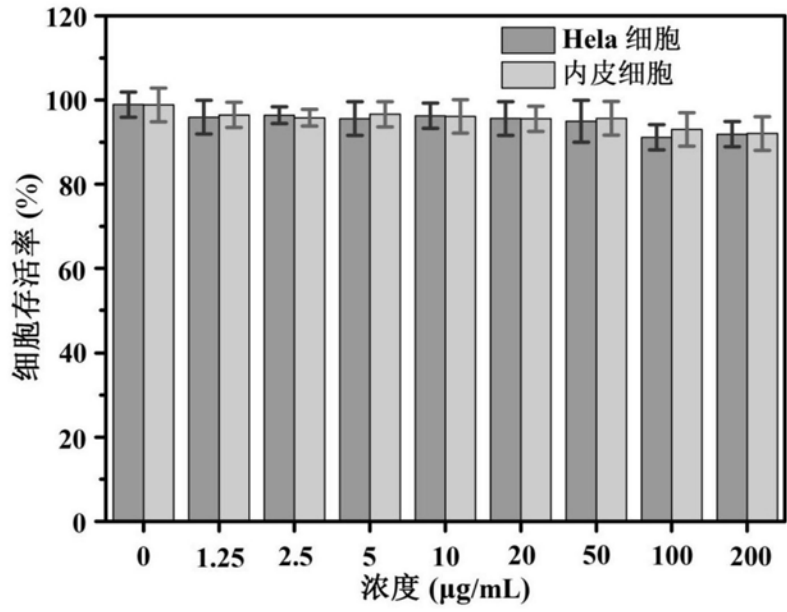


图5

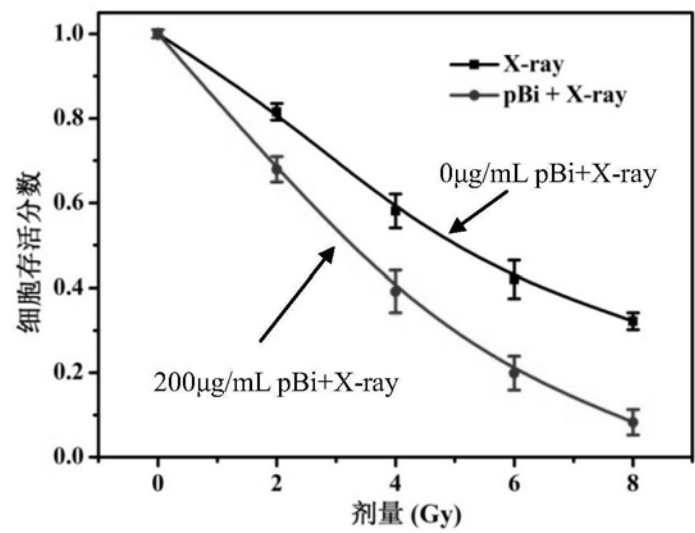


图6

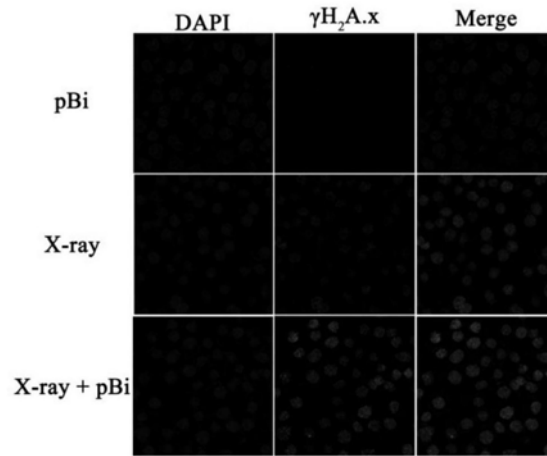


图7

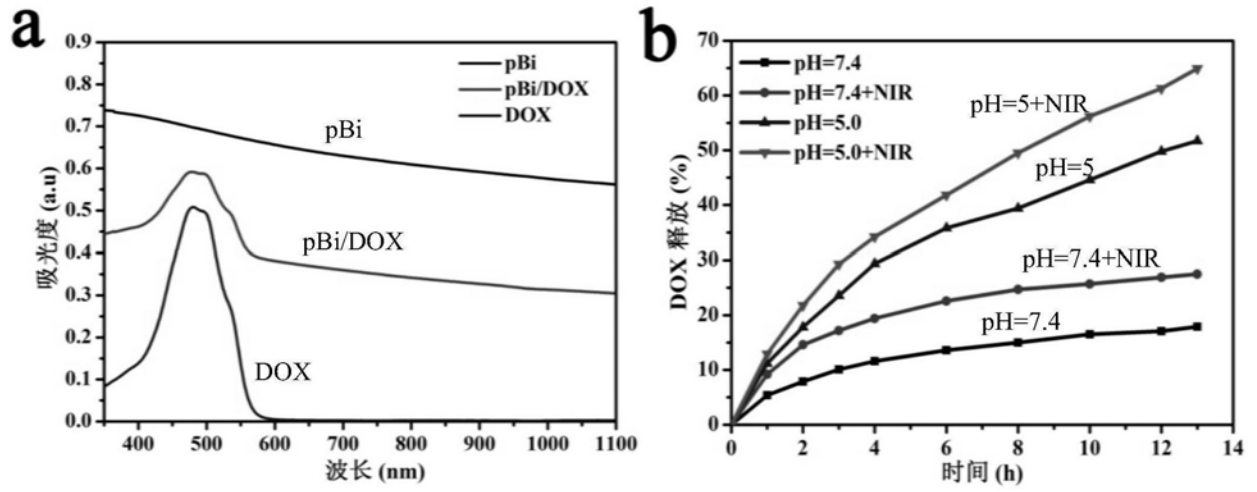


图8

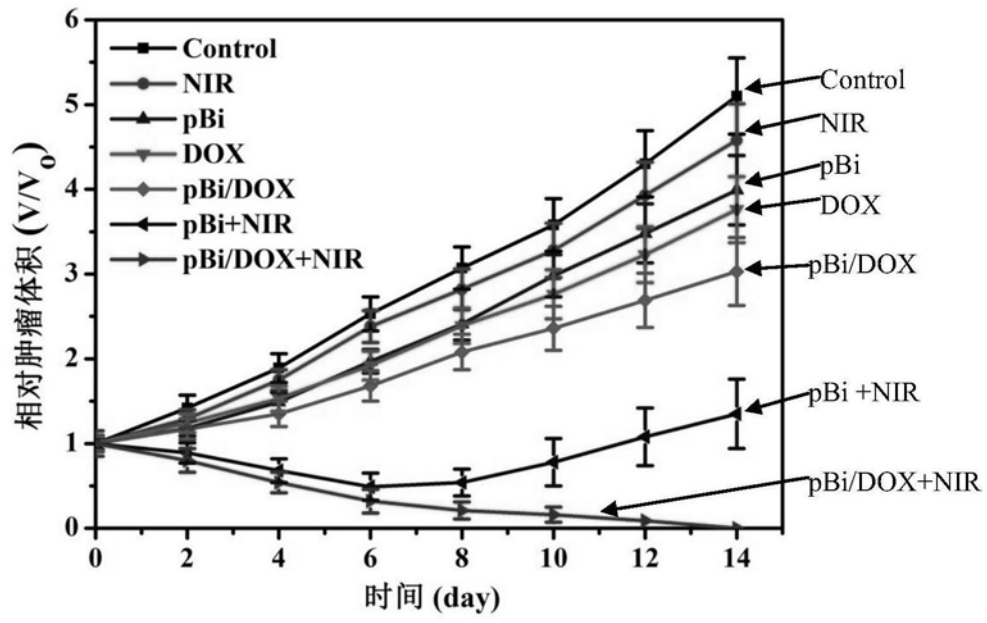


图9