



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116763939 A

(43) 申请公布日 2023. 09. 19

(21) 申请号 202310739688.4

A61P 35/00 (2006.01)

(22) 申请日 2023.06.21

G07D 487/22 (2006.01)

(71) 申请人 临沂大学

地址 276005 山东省临沂市兰山区双岭路
中段

(72) 发明人 时鹏飞 刘盈燕 袁昊明 王超
张书圣

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569
专利代理师 霍苗

(51) Int. Cl.

A61K 47/69 (2017.01)

C12N 9/04 (2006.01)

C12N 11/089 (2020.01)

A61K 41/00 (2020.01)

A61K 38/44 (2006.01)

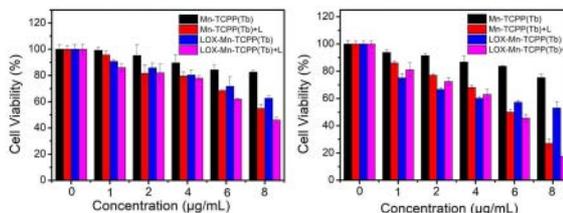
权利要求书1页 说明书7页 附图3页

(54) 发明名称

一种稀土离子掺杂金属有机框架负载乳酸氧化酶制备及其应用

(57) 摘要

本发明属于生物材料技术领域,具体涉及一种稀土离子掺杂金属有机框架负载乳酸氧化酶制备及其应用。本发明提供的金属有机框架负载乳酸氧化酶,包括稀土离子掺杂金属有机框架以及通过稀土离子配位作用负载于金属有机框架上的乳酸氧化酶;所述稀土离子掺杂金属有机框架为Tb³⁺掺杂的5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉。本发明提供的金属有机框架负载乳酸氧化酶通过稀土金属离子的配位作用在金属有机框架上负载乳酸氧化酶,乳酸氧化酶与金属有机框架载体通过化学键结合,作用力强,稳定性好,从而确保更多的乳酸氧化酶进入实体肿瘤细胞,能有效提高肿瘤微环境中H₂O₂的含量,显著增强PDT和/或CDT的治疗效果。



1. 一种金属有机框架负载乳酸氧化酶,其特征在于,包括稀土离子掺杂金属有机框架以及通过稀土离子配位作用负载于金属有机框架上的乳酸氧化酶;

所述稀土离子掺杂金属有机框架为 Tb^{3+} 掺杂的5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉。

2. 根据权利要求1所述的金属有机框架负载乳酸氧化酶,其特征在于,所述金属有机框架负载乳酸氧化酶的粒径为190~210nm。

3. 根据权利要求1所述的金属有机框架负载乳酸氧化酶,其特征在于,所述 Tb^{3+} 掺杂的5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉中: Tb 元素的质量百分含量为0.08~0.125wt%; Mn 元素的质量百分含量为0.15~0.2wt%;

所述金属有机框架负载乳酸氧化酶中:乳酸氧化酶的质量百分含量为10~20wt%。

4. 权利要求1~3任一项所述的金属有机框架负载乳酸氧化酶的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

将乳酸氧化酶溶液和 Tb^{3+} 掺杂的5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉溶液混合进行配位反应,得到所述金属有机框架负载乳酸氧化酶。

5. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于, Tb^{3+} 掺杂的5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉的制备方法包括以下步骤:

将5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉、醋酸铽、冰醋酸和有机溶剂混合进行 Tb^{3+} 掺杂,得到 Tb^{3+} 掺杂的5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉。

6. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于,乳酸氧化酶和 Tb^{3+} 掺杂的5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉的质量比为(1~2):1。

7. 根据权利要求5所述的制备方法,其特征在于,所述5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉和所述醋酸铽的摩尔比为1:(1~8)。

8. 根据权利要求5所述的制备方法,其特征在于,所述5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉的制备方法包括以下步骤:

将醋酸锰、冰醋酸和有机溶剂混合,得到醋酸锰溶液;

向所述醋酸锰溶液中加入5,10,15,20-四(4-羧基苯基)卟啉的有机溶液,进行配位反应,得到所述5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉。

9. 一种光动力和/或化学动力治疗试剂,其特征在于,包括权利要求1~3任一项所述的金属有机框架负载乳酸氧化酶或权利要求4~8任一项所述的制备方法制备得到的金属有机框架负载乳酸氧化酶。

10. 权利要求1~3任一项所述的金属有机框架负载乳酸氧化酶或权利要求4~8任一项所述的制备方法制备得到的金属有机框架负载乳酸氧化酶在制备抗肿瘤药物中的应用。

一种稀土离子掺杂金属有机框架负载乳酸氧化酶制备及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物材料技术领域,具体涉及一种稀土离子掺杂金属有机框架负载乳酸氧化酶制备及其应用。

背景技术

[0002] 光动力治疗(PDT)作为皮下肿瘤组织的一种重要治疗方式,是一种新兴的癌症治疗手段。光动力治疗的主要原理是光敏剂经过特定波长的光照后能够将激发态能量转移给周围组织细胞中的氧气分子,使其产生具有细胞毒性的活性氧(ROS),从而诱导肿瘤细胞的凋亡和坏死。与其他治疗方式相比,PDT具有多种优势:非侵入性、耐药性低、疗效快速、毒性无积累、可重复用药、副作用低等。化学动力治疗(CDT)主要是利用肿瘤细胞的微酸性环境触发芬顿或类芬顿反应,催化内源性 H_2O_2 转化为具有细胞毒性的羟基自由基($\cdot OH$),从而诱导细胞凋亡的一种新型原位治疗方法。

[0003] 但是在实体肿瘤细胞内,依然有许多因素限制光动力治疗和化学动力治疗的性能。比如:肿瘤的快速生长导致实体肿瘤内处于严重缺氧的状态,同时肿瘤微环境中 H_2O_2 的含量低(0.1~1mM),无法达到理想的PDT和CDT效果;其次,大多数传统的光敏剂都是疏水性的,这也会导致光敏剂聚集诱导的能量耗散和疗效降低。

[0004] 为了解决上述问题,已有报道在MOF上负载生物酶提高肿瘤化学动力及光动力治疗效果。但是仍存在酶与载体的作用力弱,易泄露;无法有效提高PDT/CDT的肿瘤治疗效果。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种稀土离子掺杂金属有机框架负载乳酸氧化酶制备及其应用,本发明提供的金属有机框架负载乳酸氧化酶稳定性好,能有效提高肿瘤微环境中 H_2O_2 的含量,显著增强PDT和/或CDT的治疗效果。

[0006] 为了实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0007] 本发明提供了一种金属有机框架负载乳酸氧化酶,包括稀土离子掺杂金属有机框架以及通过稀土离子配位作用负载于金属有机框架上的乳酸氧化酶;

[0008] 所述稀土离子掺杂金属有机框架为 Tb^{3+} 掺杂的5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉。

[0009] 优选的,所述金属有机框架负载乳酸氧化酶的粒径为190~210nm。

[0010] 优选的,所述 Tb^{3+} 掺杂的5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉中: Tb 元素的质量百分含量为0.08~0.125wt%; Mn 元素的质量百分含量为0.15~0.2wt%;

[0011] 所述金属有机框架负载乳酸氧化酶中:乳酸氧化酶的质量百分含量为10~20wt%。

[0012] 本发明提供了上述技术方案所述的金属有机框架负载乳酸氧化酶的制备方法,包括以下步骤:

[0013] 将乳酸氧化酶溶液和 Tb^{3+} 掺杂的5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉溶液混合进行配位反应,得到所述金属有机框架负载乳酸氧化酶。

[0014] 优选的, Tb^{3+} 掺杂的5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉的制备方法包括以下步骤:

[0015] 将5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉、醋酸铽、冰醋酸和有机溶剂混合进行 Tb^{3+} 掺杂,得到 Tb^{3+} 掺杂的5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉。

[0016] 优选的,乳酸氧化酶和 Tb^{3+} 掺杂的5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉的质量比为(1~2):1。

[0017] 优选的,所述5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉和所述醋酸铽的摩尔比为1:(1~8)。

[0018] 优选的,所述5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉的制备方法包括以下步骤:

[0019] 将醋酸锰、冰醋酸和有机溶剂混合,得到醋酸锰溶液;

[0020] 向所述醋酸锰溶液中加入5,10,15,20-四(4-羧基苯基)卟啉的有机溶液,进行配位反应,得到所述5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉。

[0021] 本发明提供了一种光动力和/或化学动力治疗试剂,包括上述技术方案所述的金属有机框架负载乳酸氧化酶或上述技术方案所述的制备方法制备得到的金属有机框架负载乳酸氧化酶。

[0022] 本发明提供了上述技术方案所述的金属有机框架负载乳酸氧化酶或上述技术方案所述的制备方法制备得到的金属有机框架负载乳酸氧化酶在制备抗肿瘤药物中的应用。

[0023] 本发明提供了一种金属有机框架负载乳酸氧化酶,包括稀土离子掺杂金属有机框架以及通过稀土离子配位作用负载于金属有机框架上的乳酸氧化酶;所述稀土离子掺杂金属有机框架为 Tb^{3+} 掺杂的5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉。本发明提供的金属有机框架负载乳酸氧化酶通过稀土金属离子的配位作用在金属有机框架上负载乳酸氧化酶,乳酸氧化酶与金属有机框架载体通过化学键结合,作用力强,稳定性好,从而确保更多的乳酸氧化酶进入实体肿瘤细胞,进入肿瘤细胞后:一方面乳酸氧化酶(LOX)催化乳酸生成丙酮酸和 H_2O_2 ,为类芬顿反应提供更多的 H_2O_2 反应底物, H_2O_2 参与类芬顿反应,从而生成更多具有细胞毒性的 $\cdot OH$,诱导肿瘤细胞凋亡;生成的 H_2O_2 也能与 Mn^{3+} 反应生成氧气,在光照后产生更具有细胞毒性的ROS,从而同时增强PDT/CDT治疗效果。另一方面 Mn^{3+} 既和谷胱甘肽反应,提高ROS的量,又与 H_2O_2 反应产生 O_2 ,也能提高PDT效果。综上,本发明提供的金属有机框架负载乳酸氧化酶稳定性好,能有效提高肿瘤微环境中 H_2O_2 的含量,显著增强PDT和/或CDT的治疗效果。

[0024] 本发明提供了上述技术方案所述的金属有机框架负载乳酸氧化酶的制备方法,包括以下步骤:将乳酸氧化酶溶液和 Tb^{3+} 掺杂的5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉溶液混合进行配位反应,得到所述金属有机框架负载乳酸氧化酶。本发明提供的制备方法通过在溶液中乳酸氧化酶和稀土金属离子发生配位反应,得到金属有机框架负载乳酸氧化酶,制备方法简单,适宜工业化应用。

附图说明

[0025] 图1为本发明实施例1制备的LOX-Mn-TCPP(Tb)的TEM图像;

- [0026] 图2为 H_2 TCPP、Mn-TCPP、Mn-TCPP(Tb)、LOX-Mn-TCPP(Tb)的紫外吸收谱图；
- [0027] 图3为不同实施例制备的Mn-TCPP(Tb)中Mn和Tb的质量分数；
- [0028] 图4为不同条件下的荧光发射谱图；
- [0029] 图5为不同材料与LO2细胞(左)与MCF-7(右)共孵育后,用CCK-8检测细胞活性。

具体实施方式

[0030] 本发明提供了一种金属有机框架负载乳酸氧化酶,包括稀土离子掺杂金属有机框架以及通过稀土离子配位作用负载于金属有机框架上的乳酸氧化酶;

[0031] 所述稀土离子掺杂金属有机框架为 Tb^{3+} 掺杂的5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉。

[0032] 在本发明中,若无特殊说明,所有制备原料/组分均为本领域技术人员熟知的市售产品。

[0033] 本发明提供的金属有机框架负载乳酸氧化酶包括 Tb^{3+} 掺杂的5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉(本发明记为Mn-TCPP(Tb))。本发明采用5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉(Mn-TCPP)作为MOFs载体,其中的 Mn^{3+} 既和谷胱甘肽反应,提高ROS的量,又与 H_2O_2 反应产生 O_2 ,也能提高PDT效果。本发明通过 Tb^{3+} 掺杂Mn-TCPP,以 Tb^{3+} 作为连接基团,通过配位反应能够将乳酸氧化酶通过化学键的形式负载在Mn-TCPP分子上,从而提高乳酸氧化酶在Mn-TCPP分子上的负载稳定性,避免乳酸氧化酶在体内运输过程中泄露,确保乳酸氧化酶运输到肿瘤细胞中,从而实现提高PDT/CDT的肿瘤治疗效果。

[0034] 在本发明中,所述 Tb^{3+} 掺杂的5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉中:Tb元素的质量百分含量优选为0.08~0.125wt%,更优选为0.1~0.125wt%;Mn元素的质量百分含量优选为0.15~0.2wt%,更优选为0.15~0.175wt%。

[0035] 本发明提供的金属有机框架负载乳酸氧化酶包括通过稀土离子配位作用负载于金属有机框架上的乳酸氧化酶。在本发明中,所述乳酸氧化酶与 Tb^{3+} 通过化学键连接。在本发明中,所述乳酸氧化酶通过Mn-TCPP(Tb)载体运输至肿瘤细胞内,一方面乳酸氧化酶(LOX)催化乳酸生成丙酮酸和 H_2O_2 ,为类芬顿反应提供更多的 H_2O_2 反应底物, H_2O_2 参与类芬顿反应,从而生成更多具有细胞毒性的 $\cdot OH$,诱导肿瘤细胞凋亡;生成的 H_2O_2 也能与 Mn^{3+} 反应生成氧气,在光照后产生更过具有细胞毒性的ROS,从而同时增强PDT/CDT治疗效果。

[0036] 在本发明中,所述金属有机框架负载乳酸氧化酶中:乳酸氧化酶的质量百分含量(负载量)优选为10~20wt%,更优选为12~15wt%,最优选为12wt%。本发明提供的金属有机框架负载乳酸氧化酶中乳酸氧化酶的负载量不能过高也不能过低,乳酸氧化酶负载量过高时,金属有机框架负载乳酸氧化酶的稳定变差,容易在运输过程中造成乳酸氧化酶泄露;乳酸氧化酶负载量过低,不能有效增强PDT/CDT治疗效果。

[0037] 在本发明中,所述金属有机框架负载乳酸氧化酶的形貌为梭形;粒径优选为190~210nm。

[0038] 本发明提供了上述技术方案所述的金属有机框架负载乳酸氧化酶的制备方法,包括以下步骤:

[0039] 将乳酸氧化酶溶液和 Tb^{3+} 掺杂的5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉溶液混合进行配位反应(以下称为第一配位反应),得到所述金属有机框架负载乳酸氧化酶。

[0040] 在本发明中,所述乳酸氧化酶溶液中的溶剂优选为N,N'-二甲基甲酰胺(DMF)。所述乳酸氧化酶溶液的质量浓度优选为2mg/mL。

[0041] 在本发明中,Tb³⁺掺杂的5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉溶液使用的溶剂优选为DMF。所述Tb³⁺掺杂的5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉溶液的质量浓度优选为1mg/mL。

[0042] 在本发明中,所述Tb³⁺掺杂的5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉的制备方法包括以下步骤:

[0043] 将5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉、醋酸铯、冰醋酸(以下称为第一冰醋酸)和有机溶剂(以下称为第一有机溶剂)混合进行Tb³⁺掺杂,得到Tb³⁺掺杂的5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉。

[0044] 在本发明中,所述5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉的制备方法包括以下步骤:

[0045] 将醋酸锰、冰醋酸(以下称为第二冰醋酸)和有机溶剂(以下称为第二有机溶剂)混合,得到醋酸锰溶液;

[0046] 向所述醋酸锰溶液中加入5,10,15,20-四(4-羧基苯基)卟啉的有机溶液,进行配位反应(以下称为第二配位反应),得到所述5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉。

[0047] 本发明将醋酸锰、第二冰醋酸和第二有机溶剂混合,得到醋酸锰溶液。在本发明的具体实施例中,所述醋酸锰为醋酸锰(III)二水合物(Mn(OAc)₃·2H₂O)。所述第二有机溶剂为N,N'-二甲基甲酰胺(DMF)。在本发明中,所述醋酸锰、第二冰醋酸和第二有机溶剂混合的顺序优选为:将醋酸锰溶解于部分第二有机溶剂中得到醋酸锰溶液;将第二冰醋酸和剩余第二有机溶剂混合,得到混合溶液;将所述醋酸锰溶液和混合溶液混合。所述醋酸锰的质量和部分第二有机溶剂的体积之比优选为(85~90)mg:10mL;所述第二冰醋酸和剩余第二有机溶剂的体积之比优选为1:4;所述醋酸锰的质量和混合溶液的体积之比优选为(85~90)mg:(25~27)mL。

[0048] 得到醋酸锰溶液后,本发明向所述醋酸锰溶液中加入5,10,15,20-四(4-羧基苯基)卟啉的有机溶液,进行第二配位反应,得到所述5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉。在本发明中,所述5,10,15,20-四(4-羧基苯基)卟啉的有机溶液中的溶剂优选为DMF;质量浓度优选为1mg/mL。所述醋酸锰和所述5,10,15,20-四(4-羧基苯基)卟啉的质量比优选为(85~90):(10~12)。在本发明中,所述第二配位反应优选在室温条件下进行,反应时间优选为12~24h。在本发明中,所述第二配位反应结束后,本发明优选对得到的第二配位反应液固液分离,得到的固相产物依次经DMF洗和乙醇洗,得到所述5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉。所述固液分离优选为离心;所述DMF洗的次数优选为3次,乙醇洗的次数优选为2次。

[0049] 在本发明中,所述5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉和所述醋酸铯的摩尔比优选为1:(1~8),更优选为1:4。所述第一冰醋酸第一有机溶剂的体积之比优选为1:4。本发明对第一有机溶剂的用量没有特殊要求,确保所述5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉和所述醋酸铯完全溶解即可。在本发明中,所述Tb³⁺掺杂优选在室温条件下进行,反应时间优选为1h。在本发明中,所述Tb³⁺掺杂结束后,本发明优选对得到的Tb³⁺掺杂反应液固液分离,得到的固相产物依次经DMF洗和干燥,得到所述Mn-TCPP(Tb)。所述固液分离优选为离心;所述DMF洗的次数优选为3次,所述干燥优选为烘干。

[0050] 在本发明中,乳酸氧化酶和Tb³⁺掺杂的5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉的质量比为(1~2):1,更优选为2:1。

[0051] 在本发明中,所述第一配位反应的温度优选为37℃,反应时间优选为3h。在本发明中,所述第一配位反应结束后,本发明优选对得到的第一配位反应液固液分离,得到的固相产物为LOX-Mn-TCPP(Tb)。

[0052] 本发明提供了一种光动力和/或化学动力治疗试剂,包括上述技术方案所述的金属有机框架负载乳酸氧化酶或上述技术方案所述的制备方法制备得到的金属有机框架负载乳酸氧化酶。

[0053] 本发明提供了上述技术方案所述的金属有机框架负载乳酸氧化酶或上述技术方案所述的制备方法制备得到的金属有机框架负载乳酸氧化酶在制备抗肿瘤药物中的应用。

[0054] 在本发明中,实体肿瘤优选包括乳腺癌。

[0055] 为了进一步说明本发明,下面结合实施例对本发明提供的技术方案进行详细地描述,但不能将它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0056] 对本发明中出现的技术术语进行解释:1.金属有机框架(MetalOrganic Frameworks):简称MOFs,是由有机配体和金属离子或团簇通过配位键自组装形成的具有分子内孔隙的有机-无机杂化材料。2.乳酸氧化酶:LOX;乳酸:Lacticacid(LA)。3.5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉(Mn-TCPP)属于金属有机框架材料中的一种;Tb³⁺掺杂的5,10,15,20-四(4-羧基苯基)锰卟啉:LOX-Mn-TCPP(Tb)。4.2-(2-甲氧基-4-硝基苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2,4-二磺酸苯)-2H-四唑单钠盐(CCK-8,CellCountingKit-8),在电子载体1-甲氧基-5-甲基吩嗪硫酸二甲酯(1-MethoxyPMS)的作用下被细胞线粒体中的脱氢酶还原为具有高度水溶性的黄色甲臌产物(Formazan),生成的甲臌物的数量与活细胞的数量成正比,用酶标仪在450nm波长处测定其光吸收值,可间接反应活细胞数量。5.人乳腺癌细胞:MCF-7,人正常肝细胞:LO2。6.2,7-二氯荧光素二乙酸酯,又名:活性氧ROS荧光探针(DCFH-DA,4091-99-0):DCFH-DA本身没有荧光,可以自由穿过细胞膜,进入细胞内以后,可以被细胞内的酯酶水解生成DCFH,而DCFH不能通过细胞膜,从而使探针很容易被标记到细胞内,在ROS存在的条件下,DCFH被氧化生成绿色荧光物质DCF,而绿色荧光强度与ROS水平成正比。

[0057] 实施例1

[0058] 称取85mg醋酸锰(III)二水合物(Mn(OAc)₃·2H₂O),并将其分散在装有10mLN,N'-二甲基甲酰胺(DMF)的平底烧瓶中,超声搅拌使其分散均匀。加入25mL体积比为1:4的冰醋酸(HAc)/DMF混合溶液,充分混合后继续搅拌8分钟。向上述溶液中缓慢加入12mL浓度为1mg/mL的5,10,15,20-四(4-羟基苯基)卟啉(H₂TCPP)溶液(溶剂为DMF),在室温条件下反应24小时,产物离心并用DMF洗三次,乙醇洗两次,得到Mn-TCPP。

[0059] 在常温条件下,将摩尔比为1:4的Mn-TCPP和C₆H₉O₆Tb·xH₂O溶解在1mL体积比为1:4的HAc/DMF溶液中,在室温添加下反应1小时。反应结束后,离心收集样品,并用DMF洗涤三次,烘干得到Mn-TCPP(Tb)待用。

[0060] 将100μL配置好的浓度为2mg/mL的LOX溶液(溶剂为DMF)与100μL浓度为1mg/mL的Mn-TCPP(Tb)溶液(溶剂为DMF)充分混合,在37℃的烘箱中反应3小时。反应结束后,离心收集样品,得到LOX-Mn-TCPP(Tb)。

[0061] 测试例1

[0062] LOX-Mn-TCPP(Tb)的表征

[0063] 通过透射电子显微镜(TEM)对实施例1制备的LOX-Mn-TCPP(Tb)的形貌及尺寸大小

进行表征。如图1所示, LOX-Mn-TCPP (Tb) 的尺寸在190-210nm, 形貌为梭形。

[0064] 紫外吸收检测

[0065] 对 H_2 TCPP、Mn-TCPP、Mn-TCPP (Tb)、LOX-Mn-TCPP (Tb) 进行紫外吸收检测, 如图2所示, 与有机配体 H_2 TCPP相比, Mn-TCPP所有的紫外吸收峰均发生红移, 这是因为卟啉的共轭面积增加, 同时这也证明Mn-TCPP的成功合成。在掺杂 Tb^{3+} 以及负载LOX之后, 材料的紫外吸收峰几乎没有变化, 说明Mn-TCPP的晶体结构并没有发生改变。

[0066] 实施例2~4

[0067] 与实施例1的制备方法基本相同, 不同之处在于: 实施例2中 $n(\text{Mn-TCPP}) : n(\text{Tb}^{3+}) = 1:1$, 实施例3中 $n(\text{Mn-TCPP}) : n(\text{Tb}^{3+}) = 1:2$, 实施例4中 $n(\text{Mn-TCPP}) : n(\text{Tb}^{3+}) = 1:8$ 。

[0068] 测试例2

[0069] 电感耦合等离子体表征

[0070] 通过电感耦合等离子体(ICP)对实施例1制备的Mn-TCPP以及实施例1~4制备的Mn-TCPP (Tb) 中金属元素含量进行分析, 如图3所示, 根据Mn-TCPP和Tb不同摩尔比($n(\text{Mn-TCPP}) : n(\text{Tb}^{3+}) = 1:0, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8$)合成掺杂度不同的Mn-TCPP (Tb), 其ICP结果如图3所示, 随着 Tb^{3+} 浓度增加, Mn-TCPP (Tb) 中Tb元素的含量也在增加, Mn元素的含量减少, 说明Tb元素的成功掺杂。

[0071] 测试例3

[0072] 活性氧检测

[0073] 利用DCFH进一步检测 $\cdot OH$ 的产生。首先, 称取0.97mgDCFH-DA将其溶解在二甲基亚砜(DMSO)中, 得到1mM的DCFH-DA溶液, 然后将0.5mL, 1mM的DCFH-DA溶液加入到2mL, 0.01M的NaOH溶液中, 并把混合均匀后的溶液放置在黑暗环境下反应30分钟。反应结束后, 加入10mL, pH=4的PBS缓冲溶液终止反应, 得到DCF溶液, 将其放置于 $-20^\circ C$ 避光保存。将实验设计为以下几组: Mn-TCPP (Tb)、Mn-TCPP (Tb)+光照、Mn-TCPP (Tb)+乳酸、Mn-TCPP (Tb)+乳酸+光照、LOX-Mn-TCPP (Tb)、LOX-Mn-TCPP (Tb)+光照、LOX-Mn-TCPP (Tb)+乳酸、LOX-Mn-TCPP (Tb)+乳酸+光照。其中乳酸利用NaOH溶液调配成pH=6, 光照时间为1分钟。最后, 上述实验组中分别加入等量的DCF溶液, 在激发波长为488nm的条件下测量上清液的荧光强度。测试结果如图4所示。

[0074] 由于2', 7'-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)可以被ROS氧化生成具有绿色荧光的DCF, 如图4所示, 实施例1制备的LOX-Mn-TCPP (Tb)+Lactic acid+Laser组荧光强度最强, 这是因为LOX催化乳酸产生的 H_2O_2 同时被锰离子与光催化产生更多的ROS。

[0075] 测试例4

[0076] 细胞毒性检测

[0077] 本发明通过CCK-8研究了不同材料对于人乳腺癌细胞(MCF-7)与人正常肝细胞(L02)的细胞毒性。将MCF-7、L02细胞接种到96孔板中, 细胞密度为 8×10^4 个/孔, 在 $37^\circ C$ 恒温培养箱中培养12小时。待细胞贴壁后, 舍弃旧细胞培养基。在96孔板中分别加入含有不同浓度的Mn-TCPP (Tb) 与LOX-Mn-TCPP (Tb) 的新鲜培养液继续培养, Mn-TCPP (Tb) 与LOX-Mn-TCPP (Tb) 的浓度梯度均为 $0\mu g/mL, 1\mu g/mL, 2\mu g/mL, 4\mu g/mL, 6\mu g/mL$ 和 $8\mu g/mL$ 。对于光毒性实验, 实施例1制备的Mn-TCPP (Tb) 与LOX-Mn-TCPP (Tb) 培养4小时后, 用650nm激光照射10分钟, 继续共孵育18小时。孵育结束后, 通过酶标仪检测不同组细胞存活率, 结果如图5所示,

Mn-TCPP (Tb) 浓度在 $8\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, MCF-7细胞存活率在75%左右, 而LO2细胞存活率在80%以上, 这归因于肿瘤细胞内过表达的 H_2O_2 被类芬顿材料催化生成ROS。激光照射后, 两种细胞的Mn-TCPP (Tb) +L组(其中“L”代表光照)细胞存活率均下降, 这是因为CDT与PDT协同治疗的结果。重要的是, 与Mn-TCPP (Tb) 相比, LOX-Mn-TCPP (Tb) 组细胞存活率更低, 这是因为LOX催化乳酸生成丙酮酸与 H_2O_2 , 提高了CDT治疗效果。同样的, 相比于LOX-Mn-TCPP (Tb) 组, LOX-Mn-TCPP (Tb) +L(其中“L”代表光照)组细胞存活率更低, 说明CDT/PDT的协同治疗效果更好。

[0078] 本发明提供的纳米材料LOX-Mn-TCPP (Tb), 在常温下合成Mn-TCPP, 后掺杂 Tb^{3+} , 通过稀土离子的配位作用负载LOX, 得到LOX-Mn-TCPP (Tb)。在纳米材料LOX-Mn-TCPP (Tb) 进入体内后, LOX催化乳酸生成丙酮酸和 H_2O_2 , 其中一部分 H_2O_2 参与类芬顿反应, 生成 $\cdot\text{OH}$, 一部分与 Mn^{3+} 反应生成氧气, 同时增强PDT/CDT治疗效果。另一方面 Mn^{3+} 既和谷胱甘肽反应, 提高ROS的量, 又与 H_2O_2 反应产生 O_2 , 提高PDT效果。本发明提供的LOX-Mn-TCPP (Tb) 纳米材料的合成方法简单, 没有危险操作, 结构稳定, LOX的负载可以增强化学动力及光动力协同治疗效果。

[0079] 尽管上述实施例对本发明做出了详尽的描述, 但它仅仅是本发明一部分实施例, 而不是全部实施例, 还可以根据本实施例在不经创造性前提下获得其他实施例, 这些实施例都属于本发明保护范围。

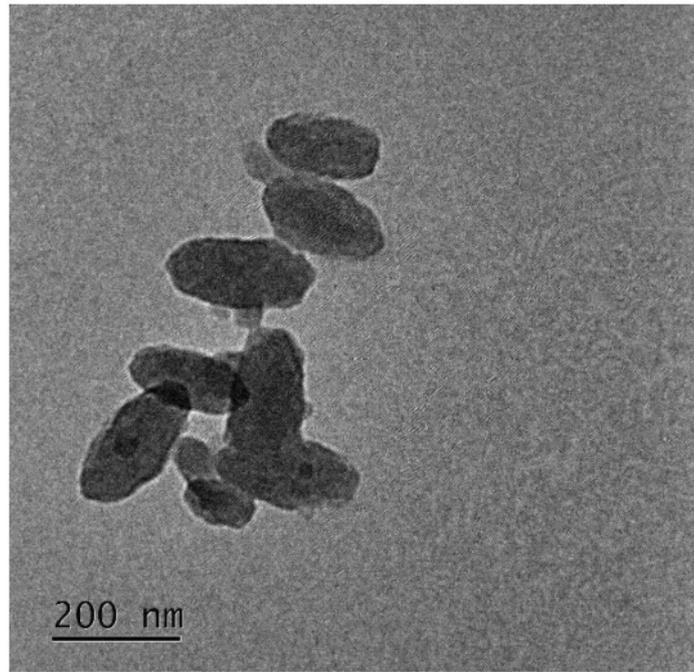


图1

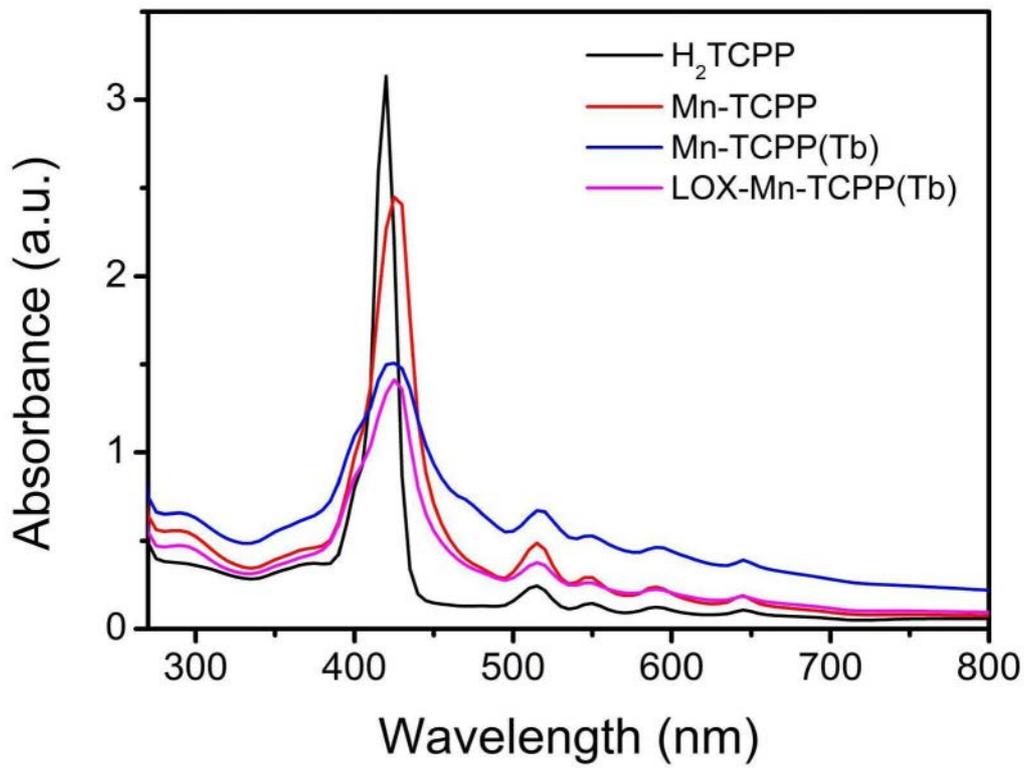


图2

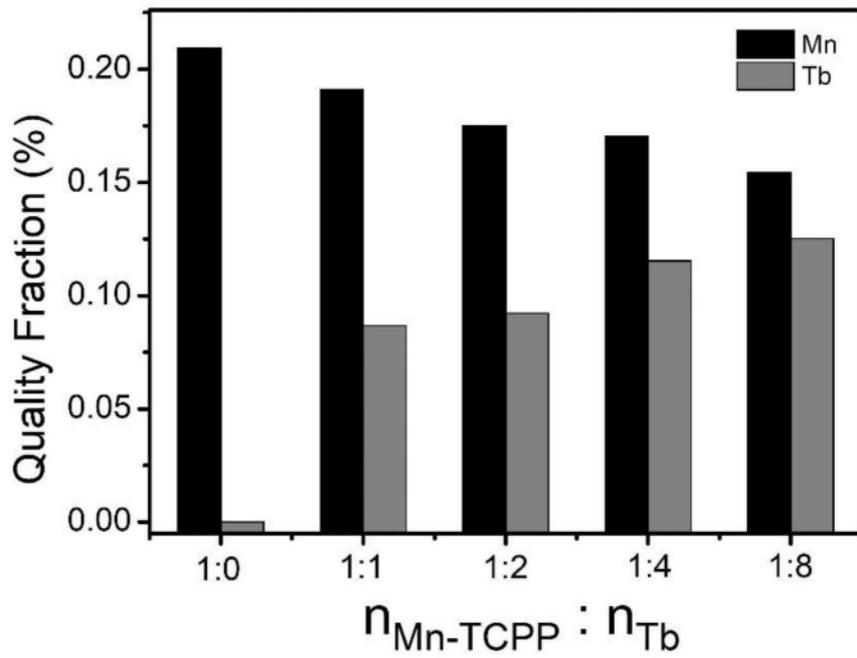


图3

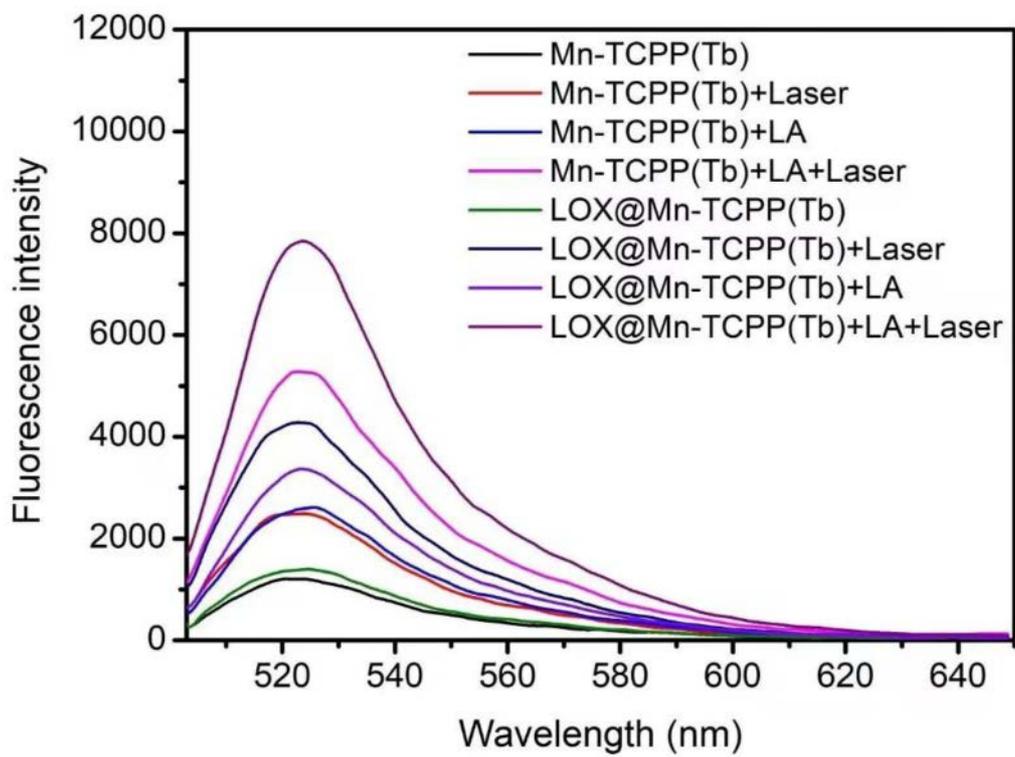


图4

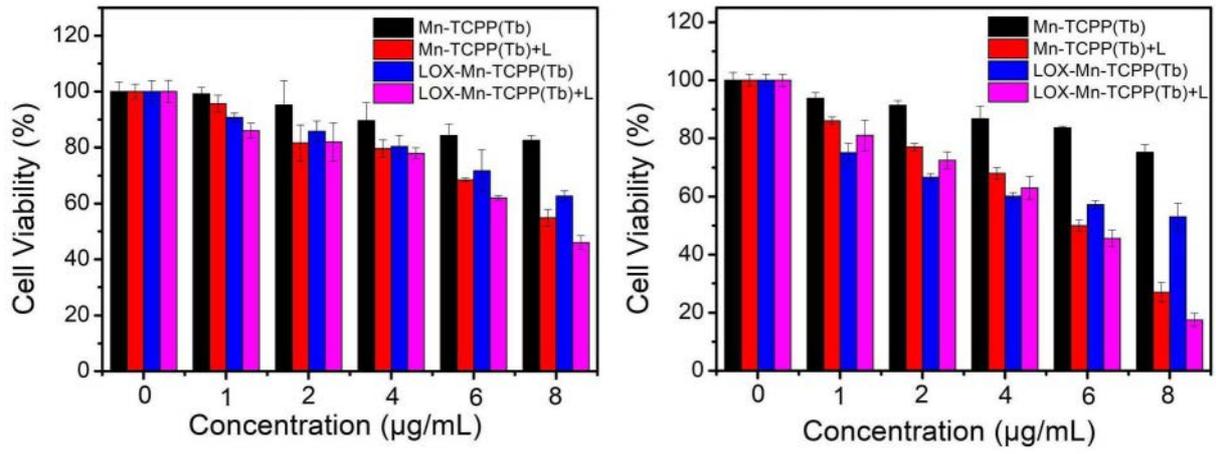


图5