



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113398135 B

(45) 授权公告日 2023.05.05

(21) 申请号 202110630135.6

A61P 1/16 (2006.01)

(22) 申请日 2021.06.07

B82Y 5/00 (2011.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

B82Y 40/00 (2011.01)

申请公布号 CN 113398135 A

C12Q 1/6883 (2018.01)

(43) 申请公布日 2021.09.17

(56) 对比文件

(73) 专利权人 中国药科大学

WO 2017157311 A1, 2017.09.21

地址 210009 江苏省南京市鼓楼区童家巷  
24号

审查员 杨凤娇

(72) 发明人 李会军 孟令偿 郑祖国

(74) 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司 32200

专利代理师 黄欣

(51) Int. Cl.

A61K 31/56 (2006.01)

权利要求书1页 说明书15页

A61K 47/54 (2017.01)

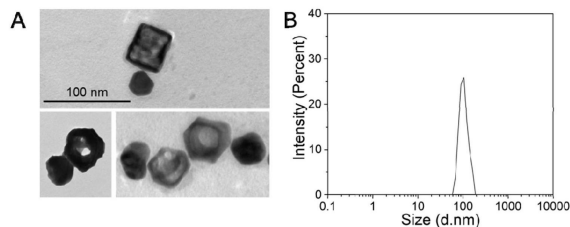
序列表1页 附图6页

(54) 发明名称

一种用于HILI原位检测与释药的纳米系统

(57) 摘要

本发明公开了一种用于HILI原位检测与释药纳米系统,属于医药技术领域。所述纳米系统包括上转换纳米粒子和金纳米笼,上转换纳米粒子和金纳米笼之间通过碱基互补配对的L1和L2连接;所述金纳米笼内包载有甘草次酸,表面修饰有L2和G-四链体;所述上转换纳米粒子表面修饰有L1。该纳米系统在980 nm单一光源控制下,可实现以miR122为生物标志物的HILI原位实时早期检测,同时可根据HILI的病情变化按需释放GA用于HILI治疗。



1. 一种纳米系统,其特征在于:包括上转换纳米粒子和金纳米笼,上转换纳米粒子和金纳米笼之间通过碱基互补配对的L1和L2连接;在上转换纳米粒子表面修饰有甘油磷酸基,在金纳米笼表面修饰有聚乙二醇甲醚巯基;

所述金纳米笼内包载有甘草次酸,表面修饰有L2和G-四链体;

所述上转换纳米粒子表面修饰有L1;

所述L1的核酸序列为:CCCCCCCC CAA ACA CCA TTG TCA CAC TCC A;

所述L2的核酸序列为:SH-TTTTT TGG AGT GTG ACA;

所述G-四链体的核酸序列为:SH-TTT TTT-/iPC/-GGT GGT GGT GGT TG TGG TGG TGG TGG;

该纳米系统的制备方法包括以下步骤:

步骤1,采用溶剂热法制备 $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Tm}@\text{NaYF}_4$ ,然后用盐酸处理法去除油酸配体,得到亲水性无配体的上转换纳米粒子;

步骤2,采用NaHS参与的多羟基合成法合成Ag NCs,并用 $\text{HAuCl}_4$ 参与的电流置换反应制备具有空腔结构的金纳米笼;

步骤3,取步骤1的上转换纳米粒子重悬于PBS中,加入L1,孵育,孵育结束后将溶液离心,沉淀重悬于PBS后再次离心,去上清后进行离心洗涤,将沉淀重悬于PBS,向溶液中加入甘油磷酸二钠盐,溶液经孵育后离心,去上清,沉淀重悬于PBS中并进行离心洗涤,最后将所得沉淀重悬于PBS,得到表面修饰有L1和甘油磷酸二钠盐的上转换纳米粒子;

步骤4,将步骤2的金纳米笼分散于甘草次酸的乙醇溶液中,避光搅拌,将混合液离心,向沉淀中加入乙醇,离心,随后将所得沉淀悬浮于PBS中,向所得溶液中加入L2和G-四链体,混合液振荡孵育,向溶液中加入NaCl溶液,继续孵育,孵育结束后将溶液离心,去上清,向沉淀中加入PBS,离心洗涤,将所得沉淀重悬于聚乙二醇甲醚巯基溶液中,孵育后离心,沉淀用PBS离心洗涤,最后将沉淀重悬于PBS,得到表面修饰有L2、G-四链体、聚乙二醇甲醚巯基并包载甘草次酸的金纳米笼;

步骤5,将步骤3制得的上转换纳米粒子和步骤4制得的金纳米笼混合于PBS并孵育,孵育结束后将混合液离心,去上清,将沉淀重悬于PBS、离心洗涤,即可得到所述纳米系统。

2. 根据权利要求1所述的纳米系统,其特征在于:步骤3中,上转换纳米粒子的浓度为1 mg/mL,L1的浓度为20 nM,上转换纳米粒子和L1混合后孵育的条件为37°C振荡孵育12 h;甘油磷酸二钠盐的浓度为 $100 \times 10^{-6}$  M。

3. 根据权利要求1所述的纳米系统,其特征在于:步骤4中,金纳米笼的浓度为0.6 mg/mL,甘草次酸的浓度为1.95 mg/mL;L2和G-四链体的浓度均为40 nM;聚乙二醇甲醚巯基溶液的浓度为4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

4. 权利要求1至3任一项所述的纳米系统在制备肝损伤检测试剂中的应用。

5. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于:所述肝损伤为草药药源性肝损伤。

6. 权利要求1至3任一项所述的纳米系统在制备肝脏疾病治疗药物中的应用。

7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于:所述肝脏疾病为草药药源性肝损伤。

## 一种用于HILI原位检测与释药的纳米系统

### 技术领域

[0001] 本发明属于医药技术领域,具体涉及一种用于HILI原位检测与按需释药的纳米系统。

### 背景技术

[0002] 草药药源性肝损伤(Herb-induced liver injury,HILI)是指由草药本身和/或其代谢产物等引起的肝脏损伤,是临床常见的中药不良反应。HILI的恶化可能会引起急性肝功能衰竭(Acute liver failure,ALF),有些需要肝移植甚至危及生命。目前,大多数中草药的致病机制尚未阐明,故HILI的预防、诊断和治疗仍是重大挑战。

[0003] 临床上常用于肝损伤检测的金标准-ALT、AST,缺少肝脏特异性,在剧烈运动和肌肉疾病等其他生理病理状态下也可能发生变化,因此,在临床中用于诊断时常常无法区分肝细胞损伤和其他疾病。此外,由于这些常规肝功能标记物在肝脏最初受到损伤后被释放到血清中,通过排他诊断法诊断HILI时有一定的延后性,无法实现早期实时检测。而miR122在HILI 诊断中表现出较好的灵敏度和特异性。美国食品药品监督管理局(U.S.Food and Drug Administration,FDA)已宣布,miR122作为肝损伤临床诊断的特异性生物标志物值得进一步探索与研究。甘草次酸(Glycyrrhetic acid,GA)是由甘草经水解产生的一种具有保肝作用的活性成分,在临床实践中已被广泛应用于各种肝脏疾病的治疗。然而,当GA长时间给药后表现出严重的副作用。因此,亟需设计一种可将GA直接递送到肝部并根据HILI实际病情按需给药的诊疗一体化纳米递送系统,减少GA使用过程中产生的副作用。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供了一种用于HILI原位检测与释药的纳米系统,通过利用上转换纳米粒子(UCNPs)和金纳米笼(Au NCs)之间的LRET原理和miR122的适配体参与的链替换技术,构建了一个携带GA的新型诊疗一体化纳米系统(UCNPs-GA@Au NCs),该纳米系统在980nm单一光源控制下,可实现以miR122为生物标志物的HILI原位实时早期检测,同时可根据HILI的病情变化按需释放GA用于HILI治疗。

[0005] 为了实现上述发明目的,本发明采用以下技术方案:

[0006] 一种纳米系统,包括上转换纳米粒子和金纳米笼,上转换纳米粒子和金纳米笼之间通过碱基互补配对的L1和L2连接;

[0007] 所述金纳米笼内包载有甘草次酸,表面修饰有L2和G-四链体;

[0008] 所述上转换纳米粒子表面修饰有L1;

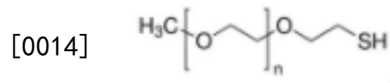
[0009] 所述L1的核酸序列为:CCCCCCCC CAA ACA CCA TTG TCA CAC TCC A;

[0010] 所述L2的核酸序列为:SH-TTTTT TGG AGT GTG ACA;

[0011] 所述G-四链体的核酸序列为:SH-TTT TTT-/iPC/-GGT GGT GGT GGT TG TGG TGG TGG TGG。

[0012] 进一步地,在上转换纳米粒子表面还修饰有甘油磷酸基。

[0013] 进一步地,在金纳米笼表面还修饰有聚乙二醇甲醚巯基,所述聚乙二醇甲醚巯基的化学式如下式所示:



[0015] 上述纳米系统的制备方法,包括以下步骤:

[0016] 步骤1,采用溶剂热法制备 $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Tm}@\text{NaYF}_4$ ,然后用盐酸处理法去除油酸配体,得到亲水性无配体的上转换纳米粒子;

[0017] 步骤2,采用 $\text{NaHS}$ 参与的多羟基合成法合成 $\text{Ag NCs}$ ,并用 $\text{HAuCl}_4$ 参与的电流置换反应制备具有空腔结构的金纳米笼;

[0018] 步骤3,取步骤1的上转换纳米粒子重悬于PBS中,加入L1,孵育,孵育结束后将溶液离心,沉淀重悬于PBS后再次离心,去上清后进行离心洗涤,将沉淀重悬于PBS,向溶液中加入甘油磷酸二钠盐,溶液经孵育后离心,去上清,沉淀重悬于PBS中并进行离心洗涤,最后将所得沉淀重悬于PBS,得到表面修饰有L1和甘油磷酸二钠盐的上转换纳米粒子;

[0019] 步骤4,将步骤2的金纳米笼分散于甘草次酸的乙醇溶液中,避光搅拌,将混合液离心,向沉淀中加入乙醇,离心,随后将所得沉淀悬浮于PBS中,向所得溶液中加入L2和G-四链体,混合液振荡孵育,向溶液中加入 $\text{NaCl}$ 溶液,继续孵育,孵育结束后将溶液离心,去上清,向沉淀中加入PBS,离心洗涤,将所得沉淀重悬于聚乙二醇甲醚巯基溶液中,孵育后离心,沉淀用PBS离心洗涤,最后将沉淀重悬于PBS,得到表面修饰有L2、G-四链体、聚乙二醇甲醚巯基并包载甘草次酸的金纳米笼;

[0020] 步骤5,将步骤3制得的上转换纳米粒子和步骤4制得的金纳米笼混合于PBS并孵育,孵育结束后将混合液离心,去上清,将沉淀重悬于PBS、离心洗涤,即可得到所述纳米系统。

[0021] 进一步地,步骤3中,上转换纳米粒子的浓度为 $1\text{mg/mL}$ ,L1的浓度为 $20\text{nM}$ ,上转换纳米粒子和L1混合后孵育的条件为 $37^\circ\text{C}$ 振荡孵育 $12\text{h}$ ;甘油磷酸二钠盐的浓度为 $100 \times 10^{-6}\text{ M}$ 。

[0022] 进一步地,步骤4中,金纳米笼的浓度为 $0.6\text{mg/mL}$ ,甘草次酸的浓度为 $1.95\text{mg/mL}$ ;L2和Gate的浓度均为 $40\text{nM}$ ;聚乙二醇甲醚巯基溶液的浓度为 $4\mu\text{g mL}^{-1}$ 。

[0023] 上述纳米系统在制备草药药源性肝损伤检测试剂中的应用。

[0024] 上述纳米系统在制备肝脏疾病治疗药物中的应用。

[0025] 本发明以 $\text{Au NCs}$ 作为载体装载GA,UV敏感的G-四链体(Gate)作为“门”把GA封装在 $\text{Au NCs}$ 里,然后以碱基互补配对的L1和L2作为连接链将UCNP和 $\text{Au NCs}$ 连接在一起制备纳米系统 $\text{UCNPs-Au NCs@GA}$ 。该纳米系统以miR122为调控开关,在 $980\text{nm}$ 激光照射下可实现miR122的可视化精准检测,同时可实现按需释药,满足单波长激光照射下HILI 原位精确高效治疗。

## 附图说明

[0026] 图1为UCNPs的表征结果。其中:A为UCL光谱、B为DLS图、C为TEM图像、D 为TEM图粒径分布统计。

[0027] 图2为 $\text{Au NCs}$ 的表征结果。其中:A为UV-Vis吸收谱图、B为DLS粒径分布图、C为 TEM图。

[0028] 图3为链替换检测方法的结果。其中:A为L1和L2参与的链替换技术检测miR122的原理图、B为PAGE图(M:Marker;泳道1:miR122;泳道2:L1;泳道3:L2;泳道4:L1+miR122;泳道5:L1+L2;泳道6:L1+L2+miR122)。

[0029] 图4为UCNPs-GA@Au NCs的表征结果。其中:A为TEM图、B为DLS图。

[0030] 图5为UCNPs-GA@Au NCs载药率测定结果。其中:A为GA溶液的标准曲线、B为GA与UCNPs-Au NCs投料比不同时的GA载药效率。

[0031] 图6为UCNPs-GA@Au NCs检测miR122的结果。其中:A为UCNPs-GA@Au NCs的UCL光谱与miR122浓度的关系、B为上转换淬灭效率(UCL-UCL0)/UCL0与logCmiR122的关系、C为UCNPs-GA@Au NCs的特异性。

[0032] 图7为UCNPs-GA@Au NCs体外药物释放结果。

[0033] 图8为UCNPs-GA@Au NCs在miR122含量不同细胞内的UCL成像。

[0034] 图9为miR122对纳米系统释药调控作用的结果。

[0035] 图10为小鼠治疗不同时间的UCL成像结果。

[0036] 图11为小鼠在不同治疗方式下的UCL成像结果。

[0037] 图12为各组小鼠不同治疗方案下的生化指标(ALT(A)、AST(B))、肝重比(C)及肝组织H&E染色组织切片(D)的结果。

### 具体实施方式

[0038] 本发明先采用NaHS参与的多羟基合成法合成Ag NCs,并用HAuCl<sub>4</sub>参与的电流置换反应制备具有空腔结构的Au NCs,Au NCs大小约为72nm,其LSPR波长为780nm。随后制备UCNPs-GA@Au NCs纳米系统,用于miR122检测时,其UCL强度与miR122浓度的对数值之间具有良好的线性关系,且表现出较好的灵敏度和特异性。采用HPLC考察该纳米系统的载药率,其载药率可达22%。随后,采用直接释药法考察UCNPs-GA@Au NCs的体外释药行为。研究结果表明,在980nm的激光照射下,UCNPs-GA@Au NCs在1%PBST-80(w/v)释放介质中的释药率高达80%。另外,UCNPs-GA@Au NCs的稳定性研究表明,该纳米系统在血清及DNase I环境中均具有较好的稳定性,在4℃环境中可保存至少14天。

[0039] 之后,以HL7702细胞为基本模型,体外考察该纳米系统用于HILI诊疗的可行性。实验结果表明,在所考察的纳米粒子浓度范围内及980nm激光照射下,该纳米载体安全性较好,无细胞毒性。且该纳米系统可被细胞快速摄取并能够快速逃离溶酶体到细胞质内发挥检测和按需释药作用。采用细胞转染技术构造miR122过表达和敲降的细胞模型来模拟不同HILI病理状态。UCNPs-GA@Au NCs在miR122表达差异化的细胞内UCL成像结果不同表明该纳米系统可成功用于miR122的可视化检测。采用Nile Red染料掺杂的纳米系统(UCNPs-Nile Red@Au NCs)考察该纳米系统在细胞内的释药行为。实验结果表明,miR122的含量与释药量成负相关:在miR122含量多的细胞内,药物释放较少;miR122含量少的细胞内药物则释放较多。这说明在980nm激光照射下,该纳米系统在细胞内以miR122为调控开关可实现药物的按需释放。由于HILI患者肝内miR122下降,因此,UCNPs-GA@Au NCs可用于HILI的按需释药方式发挥治疗作用以减少GA的副作用。此外,无光照刺激时该纳米系统在细胞内具有较好的稳定性,无药物泄露。

[0040] 最后,考察UCNPs-GA@Au NCs在HILI小鼠体内的诊疗效果及空白载体UCNPs@Au NCs

的肝肾毒性。实验结果表明,该纳米粒子具有较好的肝特异性,经尾静脉注射2h后在肝内达到最大摄取,可实现HILI的快速检测;且只有用980nm激光照射时UCNPs-GA@AuNCs才能释放药物发挥治疗作用。通过UCL成像、血清生化指标及肝H&E染色切片综合考察该纳米粒子的诊疗效果。实验结果表明,UCNPs-GA@AuNCs可用于HILI的原位实时监测并可按需释放药物发挥治疗作用。因此,当该纳米系统在临床上用于HILI治疗时,可根据UCL成像检测结果调节给药方案。同时,空白载体UCNPs-Au NCs安全性较好,没有明显的肝肾毒副作用。

[0041] 下面对本发明的技术方案做详细说明。以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。

[0042] 所述聚乙二醇甲醚巯基购自Sigma-Aldrich,货号为729108。

[0043] 实施例1

[0044] 一、UCNPs的制备

[0045] 1. 油酸包覆UCNPs(OA-UCNPs)的制备

[0046] NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm核的制备:分别吸取320μL YCl(2M)、80μL YbCl(2M)、80μL TmCl(0.2M)加入到100mL三口烧瓶中,温度计触到瓶底,搅拌速度为350rpm,于110℃加热搅拌直至水分挥发完全。加入6mL OA和15mL 1-十八烯,将温度计提至液面以下且避免触到瓶底,于150℃加热40min,形成镧系元素油酸盐络合物。反应结束后将混合物冷却至室温,期间使溶液一直被搅拌。将8mL NH<sub>4</sub>F(0.4M)甲醇溶液和2mL NaOH(1M)甲醇溶液混悬10s后迅速滴加到反应溶液中,先将溶液于50℃搅拌30min左右,随后将温度升至110℃加热20min,直到溶液无沸腾现象,将甲醇和残存的水分挥发干。抽真空30min将甲醇和残存的水分挥发干。将整个装置交换氩气3次,每次1min,以10℃/min的速度将溶液加热至290℃并在氩气保护下反应1.5h。反应结束后立刻停止加热,并将溶液冷却至室温,期间保持溶液一直搅拌。把烧瓶里的反应溶液转移到50mL的离心管里,用10mL乙醇清洗烧瓶,合并溶液,于3500g离心3min,弃上清。向离心管中加入8mL环己烷,涡旋,使沉淀重新分散。随后,向离心管中加入8mL乙醇,充分搅拌。室温下以3500g的速度离心3min,弃上清。将所得沉淀按上述步骤用4mL乙醇和4mL甲醇洗涤两次,将所得沉淀重悬于4mL环己烷中,即得NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm。

[0047] NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm@NaYF<sub>4</sub>(OA-UCNPs)核壳结构的制备:取400μL YCl(2M)加入到100 mL三口烧瓶中,温度计触到瓶底,搅拌速度为350rpm,于110℃加热搅拌直至水分挥发干净。加入6mL油酸和15mL 1-十八烯,将温度计提至液面以下且避免触到瓶底,于150℃加热40min,形成清澈均质的镧系元素油酸盐络合物。反应结束后将混合物冷却至室温,期间使反应体系一直维持搅拌状态。在室温条件下向反应瓶中逐滴加入上述所得的NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm环己烷溶液。将8mL NH<sub>4</sub>F(0.4M)的甲醇溶液和2mL NaOH(1M)的甲醇溶液混悬10s后迅速滴加到反应溶液中,先将溶液于50℃搅拌30min左右,随后将温度升至110℃加热20 min,直到溶液无沸腾现象,将甲醇和残存的水分挥发干。随后,抽真空10min,期间交换氩气3次,每次1min,以10℃/min的速度将溶液加热至290℃并在氩气保护下反应1.5h。反应结束后立刻停止加热,并将溶液冷却至室温,期间保持溶液一直搅拌。把烧瓶里的反应溶液转移到50mL的离心管里,用10mL乙醇清洗烧瓶,合并溶液,于3500g离心3min,弃上清。向离心管中加入8mL环己烷,涡旋,使沉淀重新分散。随后,向离心管中加入8mL乙醇,充分搅拌。室温下以3500g的速度离心3min,弃上清。将所得沉淀按上述步骤用4mL乙醇和4mL甲醇洗涤两次,将所得沉淀

重悬于4mL环己烷中,即得OA-UCNPs。

#### [0048] 2. 亲水性UCNPs的制备

[0049] 用盐酸法去除OA-UCNPs上的油酸配体。将100mg OA-UCNPs粉末分散到10mL pH 4.0 的HCl溶液中,置于磁力搅拌器上于室温搅拌4h,油酸配体的羧基团质子化生成油酸。搅拌结束后向UCNPs的盐酸溶液中加入30mL乙醚萃取除去油酸。用乙醚萃取3次,合并含有油酸的醚层。用水重新萃取醚层,将水层合并再用乙醚萃取,收集水层并向其中加入50 mL丙酮沉淀UCNPs。将溶液转移至离心机中于6654g离心10min,去上清,将沉淀重新分散至50mL超纯水中,离心,去上清。最后,将所得沉淀分散到水中,即得亲水性的无配体 UCNPs,可在超纯水中暂时保持稳定。

#### [0050] 3. UCNPs的表征

##### [0051] (1) UCL光谱的测定

[0052] 精密称取0.10mg UCNPs,超声分散于水中,将所得溶液转移至2mL荧光比色皿中,置于荧光分光光度计的样品槽中,使用外置的980nm激光器作为激发光源,在室温下对样品溶液进行扫谱。仪器设定参数:激发波长:980nm/1W,发射范围:200~900nm,狭缝宽度:5nm。

##### [0053] (2) 粒径和Zeta电位的测定

[0054] 采用马尔文粒径电位仪,利用动态光散射法(Dynamic Light Scattering, DLS)测定各纳米粒子的平均水合粒径和粒径分布。取适量亲水性UCNPs于马尔文激光粒度仪样品池中测定各纳米粒子的粒径。测量条件为He-Ne激光源,波长633nm,入射角为90°,设定测量温度为25°C,平衡时间为5min。

[0055] 采用马尔文粒径电位分析仪测定各个纳米粒子的Zeta电位。分取适量NaYF<sub>4</sub>:Yb/Tm、OA-UCNPs、UCNPs-PAA于电位池中,设定测量温度为25°C,测定样品的Zeta电位。

##### [0056] (3) TEM的测试

[0057] 利用透射电子显微镜(Transmission electron microscope, TEM)观察纳米材料的形态或晶格。称取少量UCNPs超声分散于水中,尽量保持各溶液为低浓度且分散均匀。用100μL 移液枪吸取少量纳米粒子溶液滴在覆有碳膜的铜网上,置于红外灯下烘干。将各个铜网样品置于TEM下进行观察并拍摄图片,入射电压均为200kV。

[0058] 由溶剂热法制备的UCNPs(OA-UCNPs)表面附带的油酸配体具有疏水性,选用HCl处理法将OA-UCNPs表面的油酸配体除掉,使UCNPs可溶于水。在980nm激光照射下制得的亲水性UCNPs的UCL光谱(图1A所示)在365nm和800nm处仍有较强发射。由DLS图(图1B所示)和TEM图(图1C、D所示)可知,OA-UCNPs经HCl处理后其形貌和大小几乎不受影响,脱掉油酸配体的亲水性UCNPs大小约26nm(PDI=0.3)。UCNPs除去油酸配体后因表面质子化而带正电荷,Zeta电位约为+31mV。

#### [0059] 二、Au NCs的制备

##### [0060] 1. 银纳米晶的制备(Ag NCs)

[0061] 溶液的配制(由于本实验需要在无水环境中进行,这个反应以乙二醇EG作为反应溶液,溶解其他试剂时也选用EG作溶剂,所有溶液均使用EG配制,且不得接触金属器皿或称量勺):

[0062] 20mg/mL PVP溶液:在一个新的反应瓶中将120.0mg PVP(用一次性玻璃吸管的末

端转移,不可用金属称量勺)溶解在6mL EG中(一个反应瓶的用量)。用盖子封住小瓶使PVP溶解。为了防止PVP粘在容器壁上,先将EG加到瓶中,再加入PVP。

[0063] 3mM HCl溶液:取2.5 $\mu$ L浓度为38%的浓盐酸加入至10.3mL的EG中,涡旋混匀,即得。

[0064] 30mM NaSH溶液:用一次性玻璃移液管的一端,将一小块固体NaSH(1.658mg)转移到一个小瓶中(操作要迅速,确保转移的NaSH吸水量或溶解量最小),加入适量的EG(1mL),涡旋混匀,即得。

[0065] 3mM NaSH溶液:将50 $\mu$ L浓度为30mM的NaSH溶液转移到新的一次性小瓶中,用EG稀释至0.5mL,使用前5min涡旋混匀。(硫化物易挥发,NaSH溶液只能当天用当天配)。

[0066] 282mM  $\text{CF}_3\text{COOAg}$ 溶液:精密称取155.80mg  $\text{CF}_3\text{COOAg}_3$ 于一个新的反应瓶中,加入2.5mL EG,涡旋溶解,锡箔纸包裹后于暗室储藏。称量过程中用一次性玻璃移液管操作。

[0067] 将20mL玻璃瓶和与其配套的磁子用洗洁精清洗,用自来水和超纯水依次冲洗后再用王水泡洗过夜,随后用超纯水清洗多次,即可使用。将5mL的EG加入到玻璃小瓶中,将玻璃瓶置于油浴中于150 $^{\circ}\text{C}$ 加热30min,搅拌速度为350rpm。在整个实验过程中,除了添加试剂,玻璃瓶都应盖上瓶盖。随后,加入60 $\mu$ L NaSH溶液(3mM),反应4min后加入0.5mL HCl溶液(3mM),紧接着加入1.25mL PVP(20mg/mL)。2min后,加入0.4mL  $\text{CF}_3\text{COOAg}$ (282 mM)溶液。反应过程中,每隔几分钟用玻璃移液管从烧瓶中取出几滴反应溶液稀释到1mL超纯水中,记录消光光谱,以确定纳米光纤的尺寸。在反应过程中,可以明显地观察到溶液的颜色变化。随着 $\text{CF}_3\text{COOAg}$ 溶液的加入,溶液逐渐变为淡黄色,在随后的10min左右的时间中,溶液颜色分别经历淡黄色、暗红色、浅灰色和褐色。最后10min左右形成外围绿色中间褐色的溶液。反应15min后停止加热搅拌,将烧瓶置于冰水中骤冷,尽量减少冷却过程中副产物的产生。待反应溶液冷却后,将反应溶液转移至离心管中。用12.5mL的丙酮清洗每个小瓶并将清洗液合并到离心管中,于2000g离心30min,弃上清。向每个离心管中加入2mL ddH<sub>2</sub>O,超声使沉淀重新分散,于9000g离心10min,弃上清,重复三次。最后,将沉淀重悬于水中避光保存。

[0068] 2. 金纳米笼的制备(Au NCs)

[0069] 溶液制备:

[0070] 1mg/mL PVP溶液:精密称取10.0mg于事先加入10mL超纯水的玻璃器皿内,涡旋混匀,即得。为了防止PVP粘在容器壁上,先将超纯水加到瓶中。

[0071] 10mM  $\text{HAuCl}_4$ 溶液:精密称量41.20mg  $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,溶解到10mL水中,涡旋混匀,即得。于4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

[0072] 0.1mM  $\text{HAuCl}_4$ 溶液:精密吸取50 $\mu$ L浓度为10mM的 $\text{HAuCl}_4$ 溶液于玻璃小瓶中,用超纯水稀释至5mL,涡旋混匀,即得。于4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

[0073] 将20mL玻璃瓶和与之配套的磁子用王水泡洗后使用。将5mL浓度为1mg/mL的PVP加入到20mL玻璃小瓶中,搅拌速度为350rpm。待反应溶液加热到90 $^{\circ}\text{C}$ 后加入100 $\mu$ L上述制备的Ag NCs,并将瓶盖松松的盖在玻璃瓶上。将0.1mM  $\text{HAuCl}_4$ 溶液装入带有PVC管的一次性塑料注射器中(注射器需包裹铝箔纸)以10mL/h的速度滴加到反应瓶中。随着 $\text{HAuCl}_4$ 的加入,反应溶液会发生一系列的颜色变化,当溶液为浅蓝色时,停止滴加 $\text{HAuCl}_4$ 。让反应回流10min,待溶液颜色稳定后停止加热并将反应溶液冷却至室温,整个过程中应保持剧烈搅拌。可通过记录反应悬浮液的UV-Vis光谱跟踪反应进展,以确定Au NCs的LSPR峰值。将反应



溶液转移到50mL离心管中,用少量超纯水冲洗反应瓶并将洗涤液与反应液合并。因在电镀置换反应过程中有AgCl生成,反应介质冷却后AgCl析出,故用饱和NaCl法除去析出的AgCl:向反应液中加入NaCl晶体直至饱和,将混合液于2000g离心30min,弃上清液。将金纳米晶分散在大量水中以溶解过量的NaCl,将溶液于2000g离心30min,去上清,得到金纳米晶,用水重复离心洗涤三次,以充分去除NaCl和PVP。将金纳米粒子超声分散在50%乙醇中于2000g离心30min,弃上清,最终将沉淀重悬在水中,避光保存。

[0074] 3. Ag NCs和Au NCs的表征

[0075] (1) LSPR发光光谱的测定

[0076] 分别取适量Ag NCs和Au NCs于96孔紫外检测酶标板中,采用酶标仪测定纳米粒的LSPR光谱。扫描波长范围为300~1000nm,狭缝宽度为10nm。

[0077] (2) 粒径、Zeta电位和TEM

[0078] 在制备Au NCs的过程中,可通过加入不同量的HAuCl<sub>4</sub>调节Au NCs内部空腔的大小,从而在可见光区到近红外光区范围内精准调控Au NCs的LSPR峰,并且Au NCs的形状和粒径基本保持不变,Au NCs独特的光学性质和空腔结构使其在生物医药领域得到广泛应用。如图2A所示,通过加入适量的HAuCl<sub>4</sub>,Au NCs的LSPR峰可调至近780nm处的近红外处。采用DLS法测得的Au NCs的平均水合粒径约为72nm(图2B所示),PDI为0.3。此结果与Ag NCs的粒径分析结果相一致。综上所述,此方法制备的Au NCs粒径均一,粒径分布较窄。Au NCs的Zeta电位约为-18.2mV。为进一步确定Au NCs的形貌,对Au NCs进行透射电镜分析,如图2C所示,Au NCs分大小较均匀,分散性较好,成中空笼状,粒径约为49.2nm。

[0079] 三、UCNPs-GA@AuNCs的构建

[0080] 1. 各核酸链的预处理

[0081] 50mM KCl溶液的配制:精密称取KCl 37.25mg溶于10mL 1×TE缓冲液中,涡旋混匀,即得。

[0082] 1M NaCl溶液的配制:精密称取NaCl 292.2mg溶于5mL ddH<sub>2</sub>O中,涡旋混匀,即得。

[0083] L1、L2和miR122的预处理:将L1、L2于4000g离心5min,随后慢慢打开L1、L2和miR122的管盖并向管内加入适量1×TE缓冲液使L1、L2、miR122的终浓度为10μM,盖上管盖后充分振荡混匀。最后,将L1、L2、miR122溶液分别转移到PCR仪中进行退火处理:95℃处理10min,自然冷却至室温。将处理过的样品放置于4℃冰箱保存。

[0084] Gate的预处理:将Gate引物于4000g离心5min,缓慢打开样品盖,加入适量1×TE缓冲液将Gate稀释至100μM,盖上盖后充分振荡混匀。取25μL浓度为100μM的Gate溶液用50mM KCl稀释至500μL,涡旋混匀,即制得浓度为5μM的Gate溶液。将5μM的Gate溶液转移到PCR仪中进行退火处理:95℃处理10min,取出自然冷却至室温。于4℃冰箱保存。

[0085] 表1核酸序列

名称	核酸序列 (5'-3')
miR122	U GGA GUG UGA CAA UGG UGU UUG (SEQ ID NO.1)
L1	CCCCCCCCC CAA ACA CCA TTG TCA CAC TCC A (SEQ ID NO.2)
L1-FAM	CCCCCCCCC CAA ACA CCA TTG TCA CAC TCC A-FAM
L2	SH-TTTTT TGG AGT GTG ACA (SEQ ID NO.3)
[0086] L2-ROX	SH-TTTTT TGG AGT GTG ACA-ROX
Gate	SH-TTT TTT-/iPC/-GGT GGT GGT GGT TG TGG TGG TGG TGG ((SEQ ID NO.4))
Gate-Cy5	SH-TTT TTT-/iPC/-GGT GGT GGT GGT TG TGG TGG TGG TGG-Cy5
in-Gate	SH-TTT TTTGGT GGT GGT GGT TG TGG TGG TGG TGG(SEQ ID NO.5)

## [0087] 2. 链替换检测方法

[0088] 样品制备:将L1、L2、miR122分别混合于PBS中,分别制备样品miR122、L1、L2、L1与miR122的混合物(L1+miR122)、L1与L2的混合物(L1+L2)、L1与L2和miR122的混合物(L1+L2+miR122)。各组样品中L1、L2、miR122的浓度均为 $10^{-8}$ M,总体积为10 $\mu$ L。每个样品均于37 $^{\circ}$ C振荡孵育1h。其中L1+L2+miR122样品制备方法为先将L1与L2混合并于37 $^{\circ}$ C振荡孵育1h,随后加入miR122,将样品涡旋混合后于37 $^{\circ}$ C继续振荡孵育1h。

[0089] 向每个样品中分别加入10 $\mu$ L  $2\times$ 上样缓冲液,涡旋混匀后将各样品分别加入到上样孔中。其中,marker上样量为2 $\mu$ L。

[0090] PAGE条件:20%PAGE分离胶。1 $\times$ TBE电泳缓冲液。电泳电压为80V,预电泳20min,再转换至100V继续电泳。采用Gel Red进行胶染1.5h。

[0091] 链替代检测方法的原理如图3A所示。L1和L2的部分碱基互补,当L1与L2混合时可形成双链L1-L2。L1作为miR122的适配体可特异性识别miR122,因此,当miR122与L1-L2混合时,miR122与L1-L2中的L1结合形成L1-miR122,L2被miR122取代,导致L1-L2断开。本实验中采用PAGE凝胶电泳法考察链替代法检测miR122的可行性。实验结果如图3B所示,miR122(泳道1)、L1(泳道2)和L2(泳道3)的泳道中只有一个条带;L1与miR122(L1+miR122)混合后,L1可与miR122结合形成双链L1-miR122,因此,L1+miR122的泳道(泳道4)中出现新的条带,即L1-miR122。当L1与L2混合(L1+L2)时形成L1-L2,该泳道(泳道5)中也出现一条新的条带。L1与L2预先孵育形成L1-L2双链后再加入miR122(L1+L2+miR122),此时可发现L1-L2条带基本消失,而L1-miR122条带变亮(泳道6)。由此可知,miR122可以把L1-L2上L2替换掉而与L1结合,导致L1-L2双链被打开。这一结果说明此链替代检测方法可用于miR122的检测;同时,miR122将L1-L2打开对后续药物释放也发挥着重要作用。

## [0092] 3. UCNP<sub>s</sub>-GA@Au NC<sub>s</sub>的制备

### [0093] (1) UCNP<sub>s</sub>-L1的制备

[0094] 取1mg UCNP<sub>s</sub>重悬于1mL PBS中,加入适量L1,溶液中UCNP<sub>s</sub>的浓度为1mg/mL, L1为20nM,将此溶液超声处理30min后于37 $^{\circ}$ C轻轻振荡孵育12h。孵育结束后将溶液转移至离心机于6654g离心10min,去上清。将沉淀重悬于2mL PBS后于6654g离心10min,去上清,重复洗

涤3次。将沉淀重悬于1mL PBS,向溶液中加入适量甘油磷酸二钠盐(GDSH)至其终浓度为 $100 \times 10^{-6} \text{M}$ ,将所得溶液于室温搅拌孵育24h后转移至离心机于6654g离心10min,去上清,沉淀重悬于PBS中并离心洗涤三次。最终,将所得沉淀重悬于1mL PBS中,即制得UCNPs-L1/GDSH(若未特殊说明,后文中的UCNPs-L1均表示UCNPs-L1/GDSH)。

[0095] (2)GA@Au NCs的制备

[0096] 将0.6mg的Au NCs分散于1mL浓度为1.95mg/mL GA的乙醇溶液中,于室温下避光搅拌24h。孵育结束后,将混合液转移至离心机中于9600g离心15min,除去上清中未吸附到Au NCs中的GA。向沉淀中加入2mL乙醇,快速离心,除去残留在Au NCs表面的GA。随后,将所得沉淀悬浮于2mL PBS中。向上述所得溶液中加入适量L2和Gate使其浓度均为40nM,将此混合液于37℃振荡孵育3h。向溶液中慢慢滴加10 $\mu\text{L}$ 浓度为1.67M的NaCl溶液,边加边振荡混匀。每隔30min滴加一次NaCl溶液,重复6次。随后将此溶液于37℃继续振荡孵育16h。孵育结束后,将溶液转移至离心机于9600g离心15min,去上清,向沉淀中加入1mL PBS,9600g离心15min,重复洗涤3次。将所得沉淀重悬于浓度为4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 的聚乙二醇甲醚巯基溶液中,于37℃振荡孵育1h后于9600g离心15min,去上清,所得沉淀用PBS离心洗涤3次。最后,将沉淀重悬于1mL PBS,即得GA@Au NCs-L2/Gate/PEG (GA@Au NCs)。

[0097] (3)UCNPs-GA@Au NCs的制备

[0098] 取1mL上述制备的UCNPs-L1/GDSH溶液和1mL GA@Au NCs-L2/Gate/PEG溶液(Au NCs与UCNPs的用量质量比为3:10)混合于5mL PBS并于37℃振荡孵育2h,孵育结束后将混合液于6000g离心15min,去上清,将沉淀重悬于2mL PBS,6000g离心15min,重复洗涤3次。最终,将所得沉淀重悬于20mL PBS中用于后续研究。该体系中UCNPs的当量浓度为0.1mg/mL,Au NCs的当量浓度为0.3mg/mL。

[0099] 4. UCNPs-GA@Au NCs的表征

[0100] UCNPs-L1/GDSH上的L1链与GA@Au NCs-L2/Gate/PEG上的L2互补配对。将UCNPs-L1/GDSH和GA@Au NCs-L2/Gate/PEG组装在一起制得UCNPs-GA@Au NCs。由UCNPs-GA@Au NCs的TEM图(图4A)可知,UCNPs-GA@Au NCs制备成功。DLS结果(图4B)显示UCNPs-GA@Au NCs约102nm(PDI=0.25)。

[0101] 5. UCNPs-GA@Au NCs载药率的测定

[0102] GA含量测定方法:

[0103] 仪器:LC-20AT高效液相色谱仪(SHIMADZU,日本;包括LC-20AT真空泵、SIL-20A自动进样器、TOC-20AC柱温箱以及SPD-20A双波长紫外检测器)。色谱柱为Thermo Synchronis C18(4.6mm $\times$ 250mm,5 $\mu\text{m}$ )。

[0104] 流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液(95:5),紫外检测波长为250nm,流动相流速为1.0 mL/min,柱温为30℃,进样体积为10 $\mu\text{L}$ 。

[0105] 如图5A所示,GA的浓度在2.5~800 $\mu\text{g/mL}$ 范围内时,GA的峰面积对浓度表现出较好的线性关系,线性回归方程为( $R^2=0.9999$ ),线性拟合度高且Y轴截距小,检测限为90 ng/mL,定量限为12.5ng/mL。

[0106] 采用间接法计算UCNPs-Au NCs的载药率。收集GA@Au NCs制备过程的上清中未装载到Au NCs中的GA,测其色谱图,利用峰面积和GA的线性回归方程计算上清液中GA的浓度。按以下公式计算载药率:

$$[0107] \quad \text{载药率} = \frac{\text{GA 加入量} - \text{上清中 GA 的量}}{\text{载体质量}} \times 100\%$$

[0108] 通过考察UCNPs-Au NCs的投料质量比与该纳米系统的载药率之间的关系优化该纳米系统的载药率。如图5B所示,当GA与UCNPs-Au NCs的投料比在0.1~1.5范围内时,该纳米系统的载药率随着投料质量比的增加而明显提高;投料质量比为1.5时载药率达到最大值,约为22%,而后随着投料比的增大,载药率不再变化。因此选择GA对UCNPs-Au NCs的投料比为1.5作为最佳投料比。

[0109] 6. UCNPs-GA@Au NCs检测miR122

[0110] (1) 各样品的制备:

[0111] UCNPs:取适量的UCNPs重悬于PBS中,UCNPs的当量浓度为0.1mg/mL。

[0112] UCNPs+GA@Au NCs:取适量的UCNPs溶液与GA@Au NCs溶液混合于PBS中至2mL,溶液中UCNPs的当量浓度为0.1mg/mL,Au NCs的浓度为0.3mg/mL,涡旋混匀,即得。

[0113] UCNPs-GA@Au NCs:取适量UCNPs-GA@Au NCs重悬于PBS,该体系中UCNPs的当量浓度为0.1mg/mL。

[0114] UCNPs-GA@Au NCs+miR122:向UCNPs-GA@Au NCs溶液加入适量的miR122,该体系中UCNPs的当量浓度为0.1mg/mL,miR122浓度为 $10^{-9}$ M,将此溶液于37℃振荡孵育1h。

[0115] 测量并比较上述各样品UCL的强度。

[0116] (2) miR122检测标准曲线的建立

[0117] 向UCNPs-GA@Au NCs中分别加入不同量的miR122,各组样品中UCNPs的当量浓度为0.1mg/mL,miR122浓度分别为0、 $10^{-12}$ 、 $10^{-11}$ 、 $10^{-10}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-7}$ M。将各组样品于37℃振荡孵育1h。测量各样品的UCL,并计算 $(UCL - UCL_0) / UCL_0$ 。

[0118] (3) miR122检测特异性考察

[0119] 向UCNPs-GA@Au NCs溶液中分别加入适量的miR122、mis-miR122、miR155、miR192,各组样品中UCNPs的当量浓度为0.1mg/mL,miRNA的浓度均为 $10^{-9}$ M,将各组溶液置于37℃振荡孵育1h。测各样品的UCL,并计算 $(UCL - UCL_0) / UCL_0$ 。

[0120] 为了评估UCNPs-GA@Au NCs定量测定miR122的能力,判断该纳米系统是否可以实现HILI的准确判断,UCNPs-GA@Au NCs的UCL强度与miR122浓度之间的关系得到考察,并以上转换发光淬灭效率为Y轴,以miR122浓度的对数值为X轴绘制回归曲线,结果如下图(图6A、B)所示。当miR122浓度在 $10^{-12}$ ~ $10^{-7}$ M时范围内时,UCNPs-GA@Au NCs的UCL强度随着miR122浓度的增加而增强(图6A),且其上转换发光淬灭效率与miR122浓度的对数值有良好的线性关系(图6B),线性回归方程为 $(UCL - UCL_0) / UCL_0 = 0.166 \log C_{\text{miR122}} + 2.12$  ( $R^2 = 0.993$ ),检测限为(3 $\sigma$ )为 $5 \times 10^{-13}$ M。由此结果可知,该纳米系统可用于miR122的准确测定,且具有较高的灵敏度。

[0121] 适配体识别其受体时表现出较好的亲和力和特异性。当UCNPs-GA@Au NCs用于体内检测时,由于体内环境复杂,其他miRNA可能会干扰miR122的检测,因此,通过比较UCNPs-GA@Au NCs用于miR122和其它miRNA(mis-miR122、miR192、miR155)检测时的上转换淬灭效率考察UCNPs-GA@Au NCs识别miR122的能力。实验结果如图6C所示,相比于miR122,UCNPs-GA@Au NCs用于mis-miR122、miR192及miR155检测时基本没有信号响应。此结果说明

UCNPs-GA@Au NCs用于miR122检测时具有较好的特异性,其他 miRNA对该miR122的检测基本没有影响。

[0122] 7. UCNPs-GA@Au NCs体外药物释放的测定

[0123] UCNPs-GA@Au NCs的1%PBST-80 (v/v) 溶液制备:以1%PBST-80 (v/v) 溶液为释放介质,采用直接释药法考察UCNPs-GA@Au NCs在不同条件下的释药情况。取123mL按照本章“2.4UCNPs-GA@Au NCs的制备”中方法所制备的UCNPs-GA@Au NCs,于6000g离心15min,去上清,将沉淀重悬于40mL 1%PBST-80 (v/v)。此时该溶液中GA的当量浓度为0.3mg/mL。

[0124] UCNPs-GA@Au NCs (in-Gate) 的1%PBST-80 (v/v) 溶液制备:按照本章“2.4 UCNPs-GA@Au NCs的制备”中的方法,用无i-PC光敏基团修饰的Gate链(in-Gate)作为门,制备光不敏感的递送系统UCNPs-GA@Au NCs (in-Gate)。取123mL UCNPs-GA@Au NCs (in-Gate) 于6000g离心15min,去除上清,将沉淀重悬于40mL 1%PBST-80 (v/v),此时该溶液中GA的当量浓度为0.3mg/mL。

[0125] 各组样品制备:

[0126] miR122+365nm组:向上述UCNPs-GA@Au NCs溶液中加入适量miR122,miR122的浓度为 $10^{-9}$ M,将该溶液于365nm (0.5W) 的UV光下照射1min,间隔30s,连续照射5次。

[0127] miR122+980nm组:向上述UCNPs-GA@Au NCs溶液中加入适量miR122,miR122的浓度为 $10^{-9}$ M,将此溶液用980nm (0.5W) 激光照射1min,间隔30s,连续照射5次。

[0128] miR122组:向上述UCNPs-GA@Au NCs溶液中加入适量miR122,miR122的浓度为 $10^{-9}$ M,无光照。

[0129] 980nm组:将上述UCNPs-GA@Au NCs溶液用980nm (0.5W) 激光照射1min,间隔 30s,连续照射5次。

[0130] 365nm组:将上述UCNPs-GA@Au NCs溶液用365nm (0.5W) 激光照射1min,间隔 30s,连续照射5次。

[0131] in-Gate+980nm组:将上述UCNPs-GA@Au NCs (in-Gate) 溶液用980nm (0.5W) 激光照射1min,间隔30s,连续照射5次。

[0132] in-Gate+365nm组:将上述UCNPs-GA@Au NCs (in-Gate) 溶液用365nm (0.5W) 激光照射1min,间隔30s,连续照射5次

[0133] 将上述各组样品同时置于37℃振荡孵育,分别在0.1、0.3、0.5、1、2、4、6、8、10、12、24、36、48h时,将各样品转移至离心机于4000g离心5min,取上清液1mL,同时补充等体积的新鲜介质。将各个时间点取的上清液过0.22μm微孔滤膜后测定GA的峰面积,根据GA的线性回归方程计算GA的含量,随后计算累计释放率并绘制体外释放曲线图。

[0134] 通过比较UCNPs-GA@Au NCs及对UV光不响应的UCNPs-GA@Au NCs (in-Gate) 在不同条件下释放GA的效果,考察UCNPs-GA@Au NCs释放GA的必需条件及miR122在释药中的作用,实验结果如图7所示。在365nm紫外光照射下,无论有无miR122的参与(365nm组、miR122+365nm组),UCNPs-GA@Au NCs释放GA均较快,在4h时累积释药量达到 82%,这是由于UCNPs-GA@Au NCs对365nm的UV光无选择性,故有无miR122的参与,365nm的UV光均可使Gate断裂,从而GA释放出来。UCNPs-GA@Au NCs在980nm激光照射下(980nm组)的释药行为与365nm UV光照射时的释药表现基本一致,因为在980nm 激光照射下,UCNPs在365nm处的UCL可传递到Au NCs上,导致Au NCs上Gate的光敏键断裂,Gate从Au NCs上脱落而GA被释放出来。当UCNPs-

GA@Au NCs先与miR122孵育再用980nm激光照射(miR122+980nm组)时几乎没有药物释放,这归因于miR122可使UCNPs-GA@Au NCs断裂导致UCNPs与AuNCs分离,在980nm激光照射下,UCNPs在365 nm处的UCL无法传递到Au NCs,故Au NCs上的Gate可保持结构完整,无药物泄露出来。当UCNPs-GA@Au NCs只与miR122孵育而无980nm激光照射时(miR122组),UCNPs-GA@Au NCs没有GA释放出来;而UCNPs-GA@Au NCs(in-Gate)纳米粒子,无论在365nm或980nm光照下,均没有药物释放。综上可知,980nm的激光照射及光敏感门控核酸Gate是该纳米系统释药的必要条件,而miR22在释药行为中起调控作用。

[0135] 三、UCNPs-GA@AuNCs体外检测及释药性能

[0136] 细胞培养:将人源正常肝细胞HL7702细胞(购于中国科学院上海细胞库)和小鼠巨噬细胞RAW247.6细胞(购于中国科学院上海细胞库)复苏后培养于RPMI-1640完全培养基(10%胎牛血清,100U/mL青霉素和100U/mL链霉素)中,置于细胞培养箱中37℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的细胞培养箱中培养。待细胞生长至融合度为80%~90%时,吸弃旧培养基并用PBS轻轻漂洗细胞2次,除去死细胞;加入适量0.25%的胰酶溶液,轻轻摇动培养皿使胰酶溶液均匀覆盖住细胞,室温放置消化2~3min,待细胞明显收缩变圆后(显微镜下观察),吸弃胰酶溶液并加入适量新鲜的完全培养基终止消化。随后,用移液枪将细胞轻轻吹打下来并转移到离心管中,于600rpm离心5min,弃上清,将细胞沉淀重悬于适量新鲜的完全培养基中,取适量用于铺板。最后,将剩余细胞重新接种于培养皿中并转移至培养箱中孵育,待细胞生长至融合度为80%时可进行下一步实验。

[0137] 1. UCNPs-GA@AuNCs在细胞内的UCL成像

[0138] 将HL7702细胞接种到细胞爬片上于培养箱中孵育12h后对细胞进行miR122的过表达和敲降,野生细胞作为空白组。向细胞内加入含有100μg/mL UCNPs-GA@Au NCs的新鲜培养基,将细胞转移至培养箱继续孵育3h后加入Hochest 33342染色液继续孵育10min,吸除含染料的培养液并用PBS洗涤3次,每次5min。向载玻片上滴加2μL抗荧光淬灭封片液,将细胞爬片有细胞的一面向下,并将其一边接触封片液缓慢放下,尽量避免气泡的产生。最后,用指甲油固定细胞爬片。将制备好的细胞爬片置于外加980nm外源激光器和CCD相机的显微镜上,用60×镜获取其在800nm的UCL成像。

[0139] 如图8所示,与野生细胞相比,UCNPs-GA@AuNCs在miR122过表达细胞内可被足够多的miR22启动从而发出较强的UCL。相反,该纳米系统在miR122敲降细胞内的UCL强度则显著降低。综上可知,UCNPs-GA@Au NCs用于细胞中miR122检测时表现良好,可区分出miR122含量不同的细胞,为后续体内应用奠定了基础。

[0140] 2. 在miR122含量不同的细胞中释药行为的考察

[0141] 将HL7702细胞接种于35mm激光共聚焦皿中,在培养箱中孵育12h后对细胞进行miR122的过表达和敲降,野生细胞作为空白组。向细胞中加入含有100μg/mL UCNPs-Nile Red@Au NCs的新鲜培养基,将细胞转移至培养箱继续孵育3h。吸弃培养基并用灭菌的PBS洗涤5次除去吸附在细胞表面的纳米粒子,加入新鲜培养基。用980nm激光(0.5W)照射1min,间隔30s,重复照射5次。将细胞放回培养箱继续培养4h后用Hochest 33342染色。最后,将细胞置于激光共聚焦60×镜下观察细胞内染料释放情况。整个实验操作注意避光。

[0142] 如图9所示。miR122过表达的细胞内Nile Red染料的荧光强度与正常细胞内的荧光强度均较弱,而miR122敲降细胞内Nile Red的荧光强度明显增强,说明正常细胞及

miR122过表达的细胞内几乎没有Nile Red释放,而miR122表达减少的细胞内Nile Red释放较多。因为,在正常细胞及miR22过表达的细胞内,UCNPs-Nile Red@AuNCs对miR122已基本彻底响应,UCNPs与AuNCs分离,在980nm激光照射下,UCNPs在365nm处的UCL无法传递到AuNCs,AuNCs上的Gate仍可保持结构完整,因此没有药物释放。相反,当细胞内miR122减少而不足以启动该纳米系统时,在980nm激光照射下,UCNPs在365nm发出的UCL传递到AuNCs上Gate断裂而脱落,此时,AuNCs里携带的Nile Red被释放出来。由此结果可知,miR122作为调控开关可调控该纳米系统在细胞内实现按需释药。

[0143] 四、UCNPs-GA@AuNCs在小鼠内检测性能

[0144] 1.肝损伤小鼠模型的构建

[0145] (1)溶液及药物配制

[0146] 0.5%CMC-Na的配制:精密称取CMC-Na 250mg,用超纯水溶解至50mL,涡旋混匀,即得。

[0147] 黄药子(DBR)的提取与溶液配制:

[0148] 提取:将干燥的黄药子药材打碎成粗粉状,于80%乙醇(1:10,w/v)中加热回流提取两次,第一次回流提取4h,第二次回流提取3h,过滤,合并滤液并转移至真空旋转蒸发器中旋蒸除去溶剂,得到无乙醇的流浸膏。随后,将流浸膏与水混悬后冻干,得到DBR的萃取物,出膏率为12.5%。

[0149] 高浓度DBR(312mg/mL):精密称取DBR提取物4.368g,用0.5%CMC-Na溶液溶解至14mL,涡旋混匀,即得。

[0150] 中浓度DBR(156mg/mL):吸取高浓度DBR溶液4mL,用0.5%CMC-Na溶液溶解至8mL,涡旋混匀,即得。

[0151] 低浓度DBR(78mg/mL):吸取高浓度DBR溶液2mL,用0.5%CMC-Na溶液溶解至8mL,涡旋混匀,即得。

[0152] (2)动物分组及给药方案

[0153] 动物分组:每组6只小鼠,每只约30g。

[0154] 给药方案:DBR组小鼠采用连续3次灌胃(Intragastric administration,i.g.)的方式给药;

[0155] 第1天:

[0156] 空白组:各组小鼠分别i.g.给予0.5%CMC-Na(0.2mL/10g)溶液;

[0157] DBR组:各组小鼠分别i.g.给予高(50g/kg)、中(25g/kg)、低(12.5g/kg)的DBR提取药液(按生药量计算);

[0158] 第2天:各组给药方式同第一天。

[0159] 第3天:

[0160] 空白组:各组小鼠分别i.g.给予0.5%CMC-Na(0.2mL/10g)溶液;

[0161] DBR组:各组小鼠分别i.g.给予高(50g/kg)、中(25g/kg)、低(12.5g/kg)的提取药液;

[0162] 2.UCNPs-GA@AuNCs在HILI小鼠体内诊疗效果考察

[0163] 小鼠适应饲养一周后,按体重随机分为6组,每组6只,分组及给药方案如下,其中DBR提取物连续给药3天(i.g.,25g/kg);UCNPs-GA@AuNCs及生理盐水组先与DBR同时给药

(i.v., 25mg/kg) 3天,再继续单独给药3天。每次给予UCNPs-GA@Au NCs 2h后,用980 nm激光(1W)照射小鼠肝脏(右上腹部)2min,间隔1min,重复照射5次。

[0164] Control组:0.5%CMC-Na(i.g.)及生理盐水(i.v.);

[0165] DBR组:给予DBR(i.g.)及生理盐水(i.v.);

[0166] DBR+Laser组:给予DBR(i.g.)及生理盐水(i.v)并用980nm激光照射;

[0167] DBR+NPs组:给予DBR(i.g.)及UCNPs-GA@Au NCs(i.v),无980nm照射;

[0168] DBR+in-Gate NPs+Laser组:给予DBR(i.g.)和UCNPs-GA@Au NCs(in-Gate)(in-Gate NPs, i.v)并用980nm激光照射;

[0169] DBR+NPs+Laser组:给予DBR(i.g.)和UCNPs-GA@Au NCs(i.v)并用980nm激光照射。

[0170] 给与UCNPs-GA@Au NCs后每天监测小鼠在800±40nm处的UCL发光情况。给药结束后,禁食过夜,自由饮水。采用摘眼球取血的方式收集血样。颈椎脱臼处死小鼠,手术摘取肝脏并称量,取部分肝脏组织于4%多聚甲醛中固定,供病理染色切片使用,其余组织放入液氮中冻存。

[0171] 考察UCNPs-GA@AuNCs在不同程度HILI小鼠体内诊疗效果,给药方案如下:将小鼠分为空白组及给予不同剂量DBR的实验组,DBR给药量分别为12.5、25、50g/kg,每组5只。给药方法同上。

[0172] UCNPs-GA@AuNCs的检测结果对HILI的治疗具有指导意义,可通过追踪UCL强度变化判断HILI的病情发展随时调整给药方案。本实验考察UCNPs-GA@AuNCs用于HILI实时原位成像的效果,小鼠给予UCNPs-GA@AuNCs三天后每天监测小鼠UCL成像,实验结果如图10所示,随着治疗时间的增长,UCL逐渐增强,治疗6天后小鼠基本恢复正常。

[0173] %图为A图中各组老鼠UCL强度的统计图。

[0174] 随后,以HILI小鼠为模型,分别给予不同的治疗方式(DBR+Laser、DBR+NPs、DBR+in-GateNPs+Laser、DBR+NPs+Laser),通过UCL成像及生化检测分析,考察给予UCNPs-GA@Au NCs治疗6天后的治疗效果。

[0175] 小鼠UCL成像结果如图11所示,DBR+NPs组及DBR+in-Gate NPs+Laser组的UCL强度与DBR组相同,且显著低于空白健康组小鼠。这是因为DBR+NPs组缺乏980nm激光刺激,无药物释放;而DBR+in-Gate NPs+Laser组对980nm激光不响应,也无GA释放,因此这两组均无治疗作用。而当HILI小鼠而经过UCNPs-GA@AuNCs治疗后(DBR+NPs+Laser组),小鼠UCL发光基本恢复到正常强度。此外,DBR+NPs组和DBR+in-Gate NPs+Laser组可证明该纳米系统在体内具有较好的稳定性,无980nm激光刺激时,其在体内无药物泄露。图11B为A图中各组老鼠UCL强度的统计图。

[0176] 3. 小鼠各项指标的检测及方法

[0177] (1) 肝组织及血样取材

[0178] 最后一次给药后,禁食过夜,自由饮水。采用摘眼球取血的方式收集血样,颈椎脱臼处死。手术摘取肝脏后,称重。取部分肝脏组织于4%多聚甲醛中固定24h,供病理苏木精&伊红(Hematoxylin&Eosin,H&E)染色切片使用,其余组织放入液氮中固定后于-80℃保存。

[0179] 按以下公式计算肝重比值:



$$[0180] \quad \text{肝重比(\%)} = \frac{\text{肝重}}{\text{体重}} \times 100\%$$

[0181] (2) 临床血清生化指标检查

[0182] 收集血样后, 室温放置2~4h(轻拿轻放, 避免红细胞溶血)。室温条件下2500rpm离心15min, 将上层澄清淡黄色血清转移至新1.5mL离心管中用于后续生化指标分析。ALT、AST采用南京建成公司试剂盒测定。具体的测定方法请参照相关试剂盒中说明书的详细步骤。

[0183] (3) 体内UCL成像

[0184] 用异氟烷将小鼠麻醉后置于小动物活体成像仪中, 激发光为980nm, 收集小鼠在800±40nm处的UCL成像。

[0185] 采用血清生化指标(ALT、AST)及肝重比等指标评价该材料对药源性肝毒性小鼠的治疗效果。如图12A、B所示, 与空白组相比, DBR组、DBR+Laser组、DBR+NPs组及DBR+in-Gatin-GateNPs+Laser组由于没有得到有效的治疗, 其ALT和AST含量均显著升高; 当HILI小鼠得到UCNPs-GA@AuNCs治疗(DBR+NPs+Laser)后其血清中ALT和AST基本含量恢复到正常水平, 表明小鼠恢复健康。小鼠肝重比(图12C)同样验证了此结果, HILI小鼠的肝肿大, 因此肝重比较大, 经过得到有效治疗后肝恢复正常, 肝重比恢复与空白鼠一致。肝脏H&E染色切片检查结果如图12D所示。DBR组、DBR+Laser组、DBR+NPs组及DBR+in-Gate NPs+Laser组的肝组织细胞出现明显的质壁分离且空泡化, 细胞大面积坏死; 但经过UCNPs-GA@AuNCs治疗后, 肝组织细胞基本恢复至正常。综上可知, 在980nm激光照射下UCNPs-GA@AuNCs释放出GA发挥治疗作用; 当无980nm激光刺激时, UCNPs-GA@AuNCs无药物释放, 故无治疗效果。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 中国药科大学
- [0003] <120> 一种用于HILI原位检测与释药的纳米系统
- [0004] <130> 20210604
- [0005] <160> 5
- [0006] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 22
- [0009] <212> RNA
- [0010] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0011] <400> 1
- [0012] uggaguguga caaugguguu ug 22
- [0013] <210> 2
- [0014] <211> 32
- [0015] <212> DNA
- [0016] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0017] <400> 2
- [0018] ccccccccc caaacacat tgtcacactc ca 32
- [0019] <210> 3
- [0020] <211> 17
- [0021] <212> DNA
- [0022] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0023] <400> 3
- [0024] ttttttggag tgtgaca 17
- [0025] <210> 4
- [0026] <211> 32
- [0027] <212> DNA
- [0028] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0029] <400> 4
- [0030] ttttttggtg gtggtggttg tggtggtggt gg 32
- [0031] <210> 5
- [0032] <211> 32
- [0033] <212> DNA
- [0034] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0035] <400> 5
- [0036] ttttttggtg gtggtggttg tggtggtggt gg 32

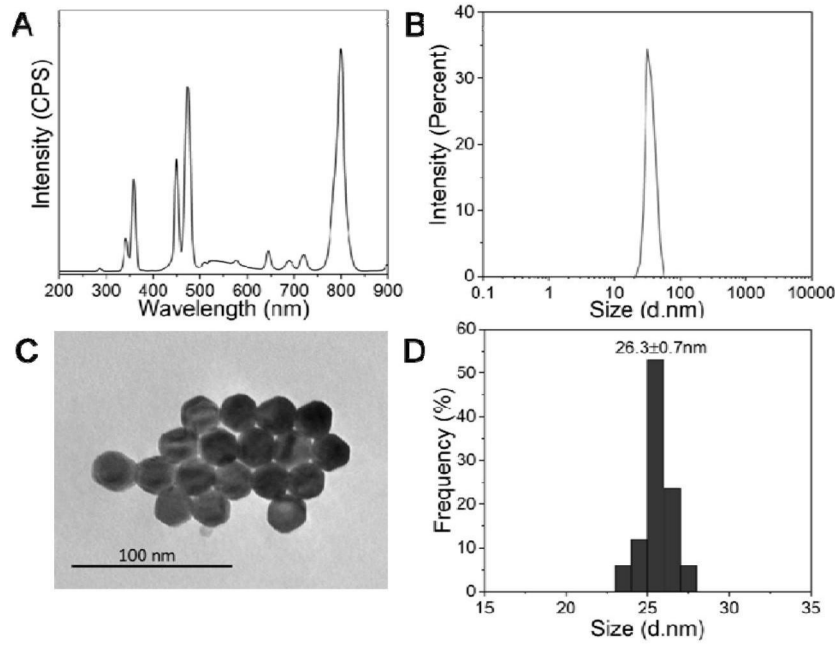


图1

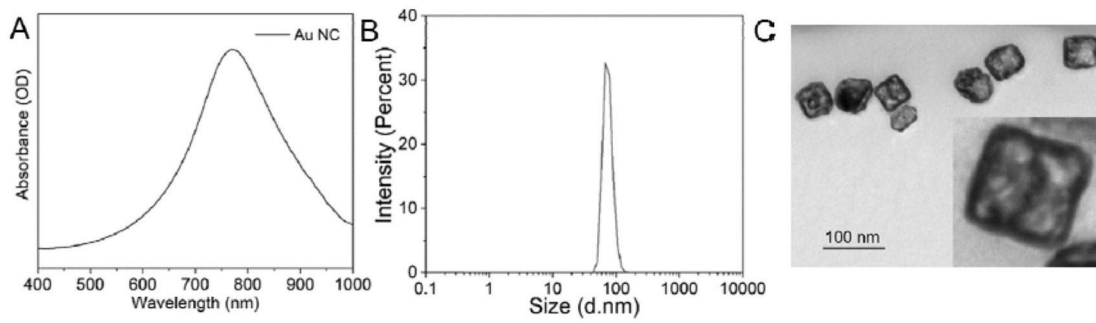


图2

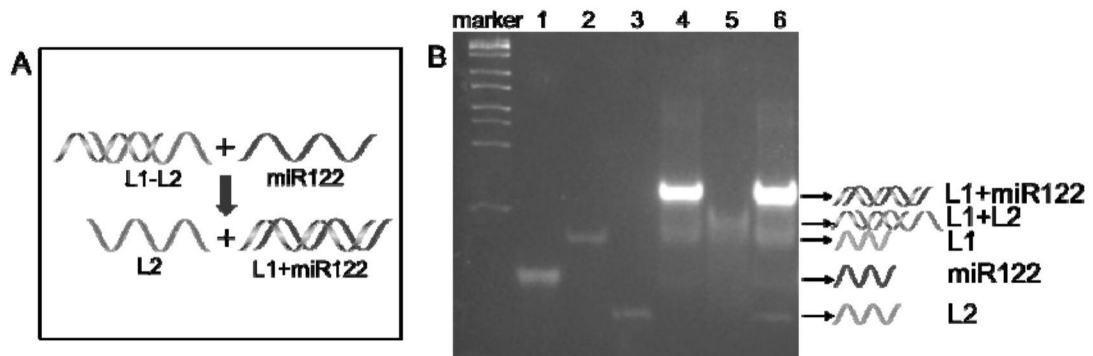


图3

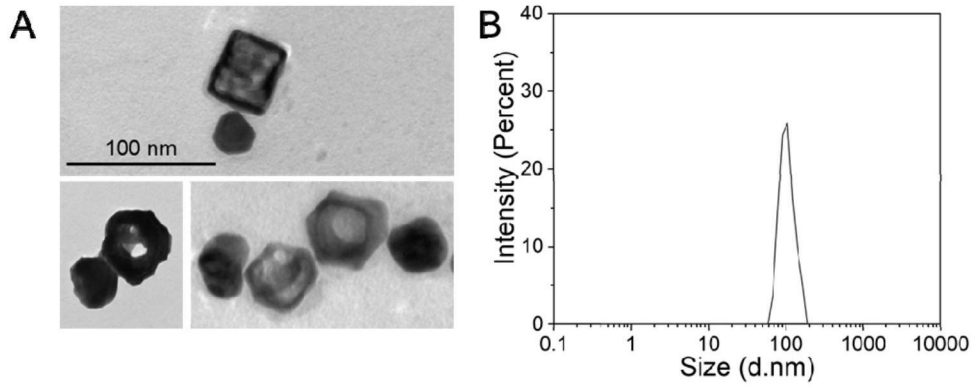


图4

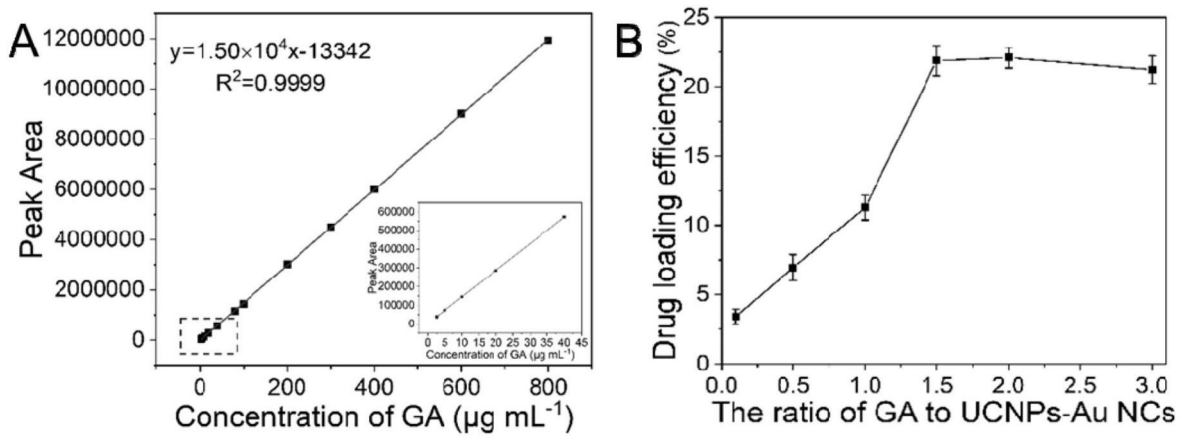


图5

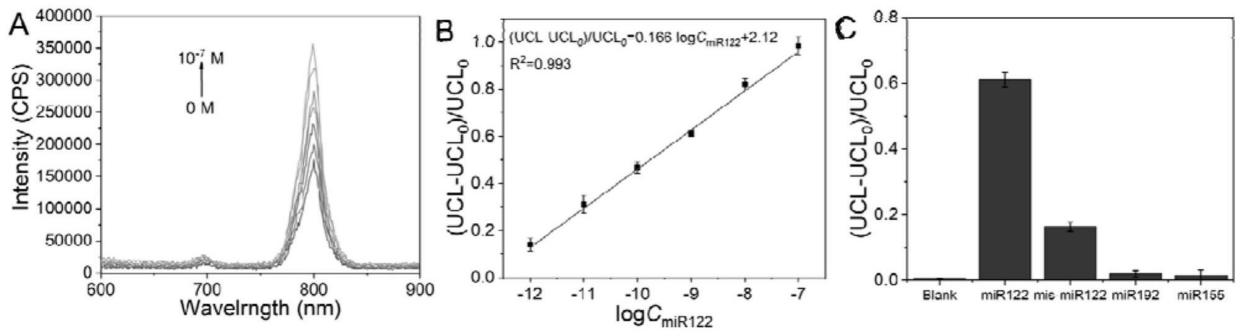


图6

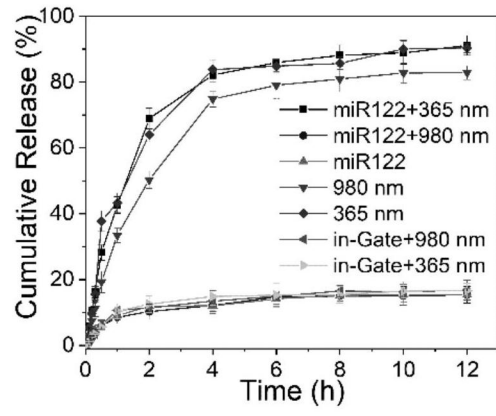


图7

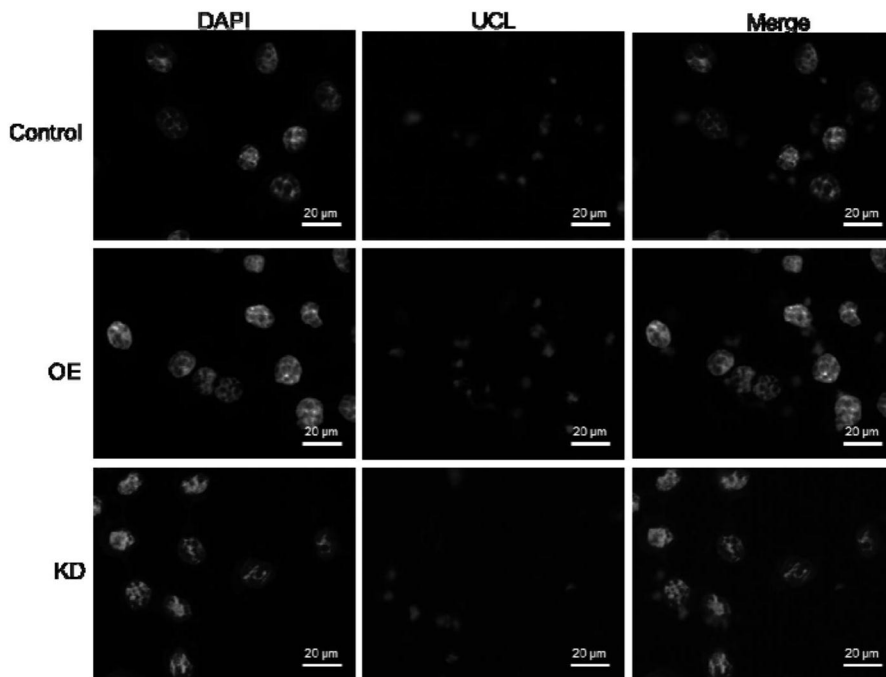


图8

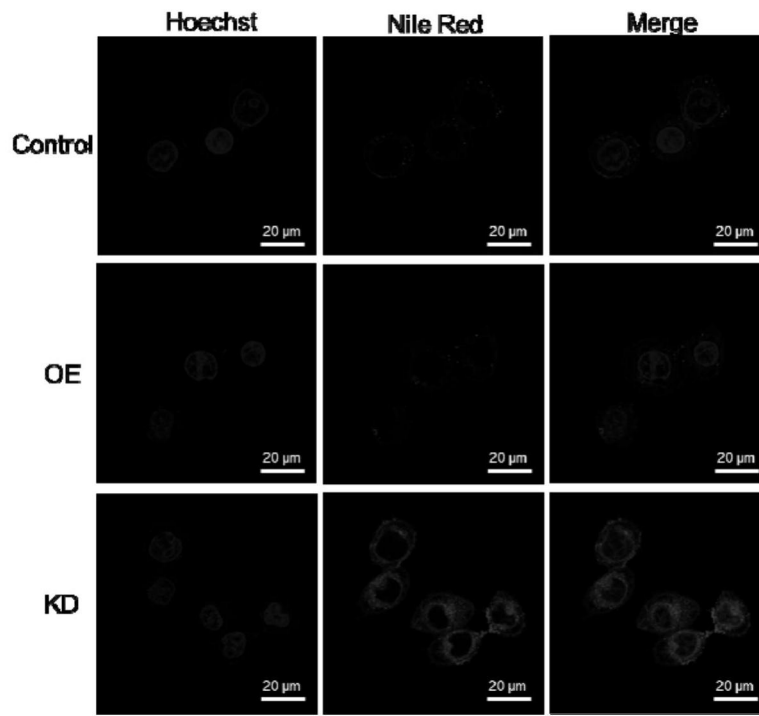


图9

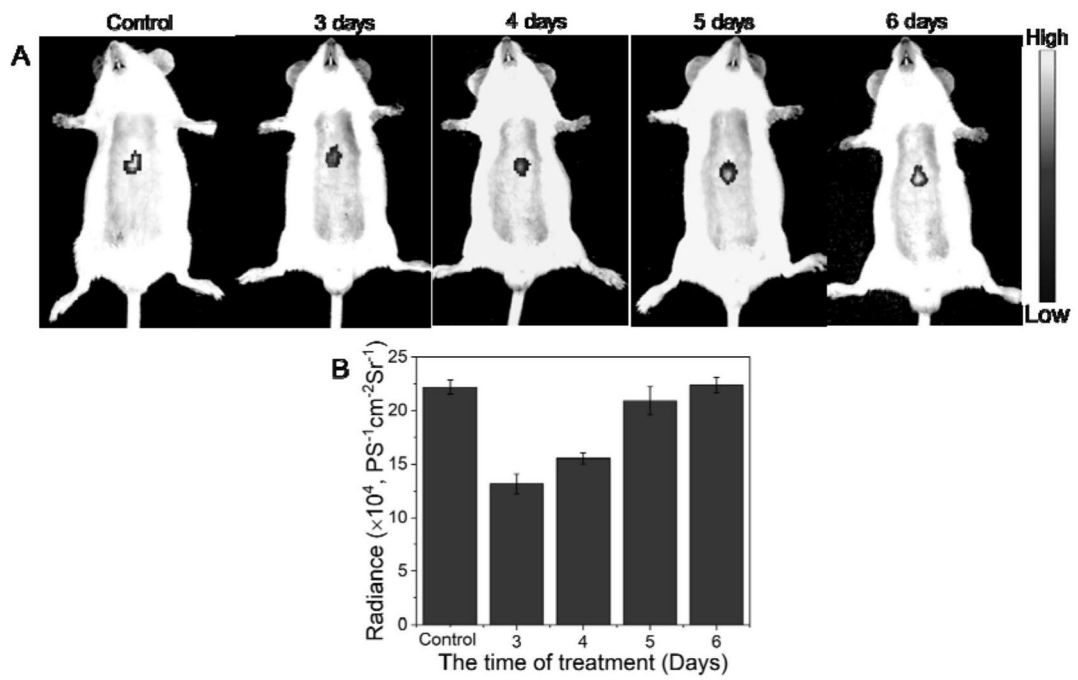


图10

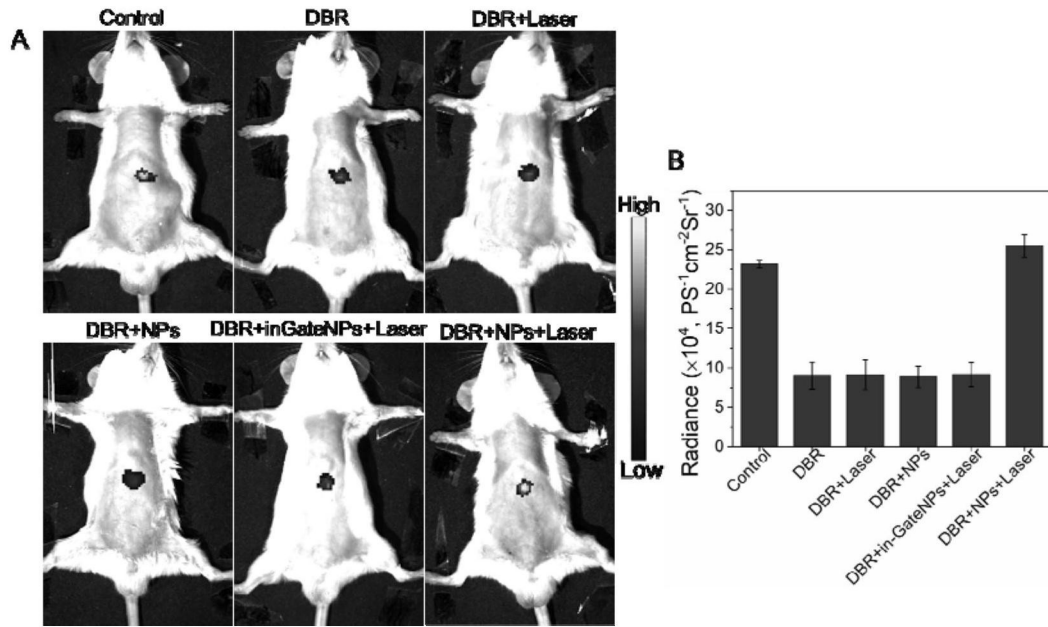


图11

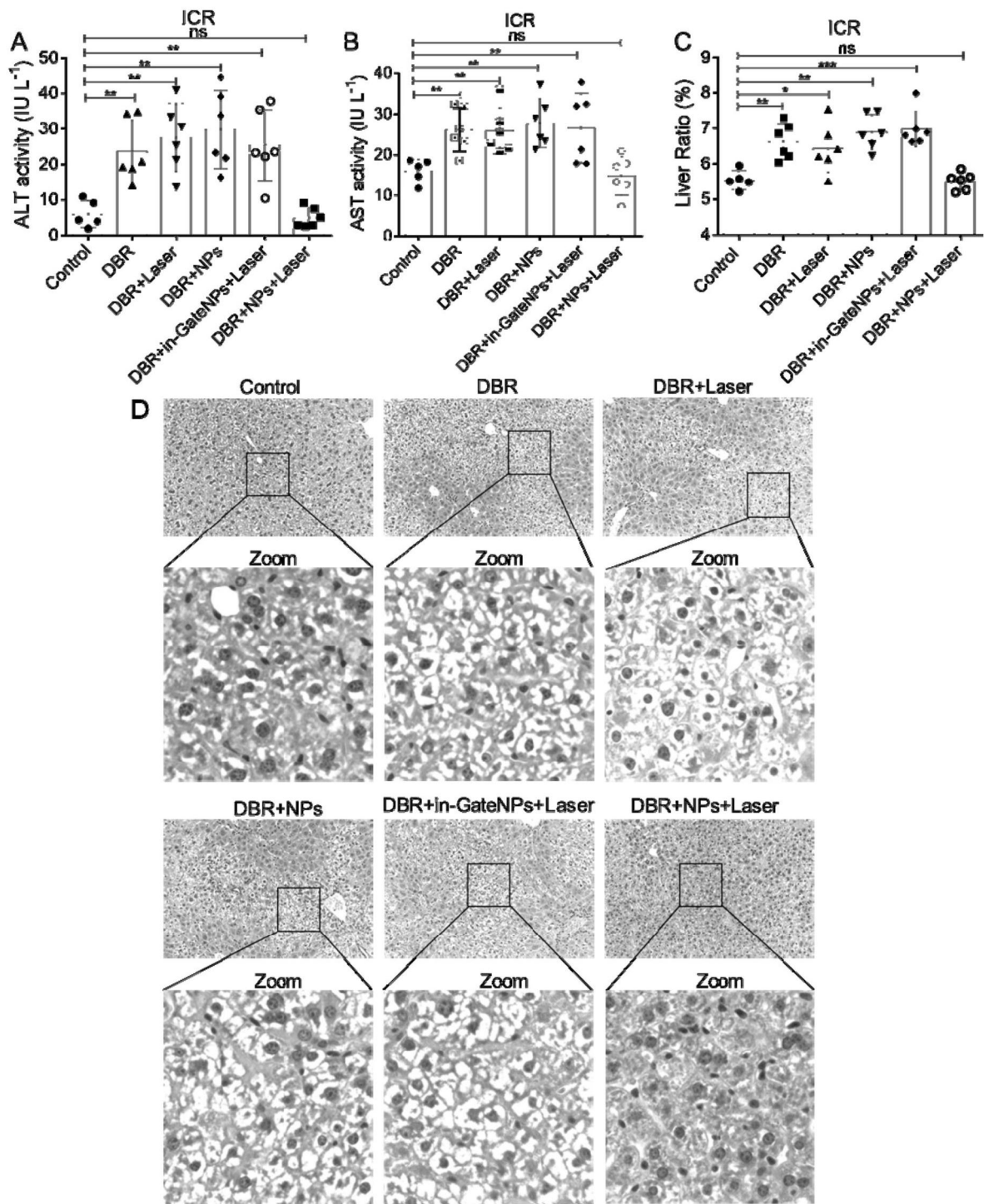


图12