

# 基于主客体作用的超分子聚肽纳米药物构建及其性能研究

丁月, 马宇轩, 朱吕明, 姚勇\*

南通大学化学化工学院, 江苏 南通

收稿日期: 2022年5月12日; 录用日期: 2022年7月4日; 发布日期: 2022年7月13日

## 摘要

吲哚菁绿(ICG)作为一种具有近红外光敏剂, 被广泛应用于癌症的光热治疗。但是, 由于ICG的水溶性较差, 限制了其在临床上的应用。因此, 我们设计并制备了末端修饰了吡啶盐的聚半胱氨酸(PPC), 其与水溶性柱[5]芳烃(WP[5])通过主客体识别作用, 形成两性超分子聚肽。该超分子聚肽通过自组装负载ICG于内核中, 形成超分子聚肽纳米药物(WPPC/ICG)。WPPC/ICG通过增强渗透与滞留(EPR)效应靶向富集在肿瘤组织部位, 并经内吞作用进入肿瘤细胞后, 在细胞内的酸性环境中, 响应性地释放出ICG, 在808 nm近红外光照射下, 局部温度升高, 杀死肿瘤细胞, 不仅提高了疗效, 而且减小了对正常组织的损伤。

## 关键词

吲哚菁绿, 光热治疗, 主客体作用, 超分子纳米药物

# Construction and Property Research of Supramolecular Polypeptide Nanomedicine Based on Host-Guest Interactions

Yue Ding, Yuxuan Ma, Lvming Zhu, Yong Yao\*

College of Chemistry and Chemical Engineering, Nantong University, Nantong Jiangsu

Received: May 12<sup>th</sup>, 2022; accepted: Jul. 4<sup>th</sup>, 2022; published: Jul. 13<sup>th</sup>, 2022

\*通讯作者。

文章引用: 丁月, 马宇轩, 朱吕明, 姚勇. 基于主客体作用的超分子聚肽纳米药物构建及其性能研究[J]. 纳米技术, 2022, 12(3): 97-104. DOI: 10.12677/nat.2022.123012

## Abstract

**Indocyanine green (ICG) is widely used as a photosensitizer with near infrared for photothermal therapy. However, the poor water solubility of ICG limits its clinical application. Therefore, we designed and prepared polycysteine (PPC) with pyridine-terminal modification, and then formed amphiphilic supramolecular polypeptide with water-soluble pillar[5]arene based on host-guest recognition. The supramolecular polypeptide nanodrug (WPPC/ICG) was then prepared by loading ICG in the core of supramolecular polypeptide nanoassembly. WPPC/ICG could passively target and enrich in tumor tissues via enhanced osmosis and retention (EPR) effect. After entering tumor cells through endocytosis, under acidic intracellular environment, ICG could be responsively released. Under 808 nm near-infrared light, the produced photothermal effect could kill tumor cells, which not only enhanced the therapeutic effect, but also reduced the damage to normal tissue.**

## Keywords

**ICG, Photothermal Therapy, Host-Guest interactions, Supramolecular Polypeptide Nanomedicine**

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

光热疗法(PTT)是目前可以治疗肿瘤的行之有效的办法之一。与其他治疗方法相比,光热疗法能以最小的侵略性和人体副作用诱导特定部位的肿瘤细胞坏死。近红外(NIR)区域的辐射对 PTT 尤其有利,因为近红外光穿透组织较深,且在此波长范围内内源性生物分子对光子的吸收较弱,细胞毒性较小[1][2]。

吲哚菁绿(ICG)是一种典型的近红外光热转换剂,有着良好的光热转换效率且是一种有效的光动力治疗(PDT)增敏剂,在光照下可以产生活性氧,可在肿瘤成像诊断和光热联合治疗等多个领域应用,其药理性质一直备受关注。但是其较差的水溶性,较低的细胞摄取率和快速的代谢性等缺陷限制了其临床应用。因此,为了进一步提高其生物相容性和利用率,寻求一种有效的载药方式已然成为研究热点[3]。

但是,传统的两亲性聚肽制备过程复杂,难以精准控制。因此,可以在聚肽结构中引入大环主体化合物,通过主客体识别作用简单高效地构建超分子两亲性聚肽[4][5][6]。这种超分子两亲性聚肽不仅丰富了聚肽的结构多样性,而且更易于功能化修饰,并且主客体作用的可逆性也可以赋予体系更多的可能性[7][8]。因此,基于主客体识别作用的超分子两亲性聚肽的构建为癌症治疗诊断体系提供了一种极具前途的理想纳米载体构建方法。

本文中,我们设计并制备了末端修饰了吡啶盐的聚半胱氨酸(PPC),其与水溶性柱[5]芳烃(WP[5])通过主客体识别作用,形成两亲性超分子聚肽。该超分子聚肽通过自组装负载 ICG 于内核中,形成超分子聚肽纳米药物(WPPC/ICG)。WPPC/ICG 通过增强渗透与滞留(EPR)效应靶向富集在肿瘤组织部位[9][10],并经内吞作用进入肿瘤细胞,在肿瘤细胞内的酸性环境中,纳米药物发生 pH-响应性解组装从而释放出 ICG,在 808 nm 近红外光照射下,温度升高,杀死肿瘤细胞,不仅提高了游离 ICG 的光热疗效,而且减小了对正常组织的损伤。

## 2. 实验部分

### 2.1. 试验原料与仪器

ICG 购自北京华威锐科化工有限公司, L-半胱氨酸购自上海笛柏化学品技术有限公司, 三乙胺(TEA) 购自上海阿拉丁试剂有限公司, 邻硝基苄溴购自上海毕得医药科技有限公司, 乙酸乙酯购自 Enox, 四氢呋喃(THF)购自上海凌峰化学试剂公司, 三光气购自上海阿拉丁试剂有限公司, 甲苯购自西陇科学股份有限公司, 正己烷购自上海凌峰化学试剂公司, N,N-二甲基甲酰胺(DMF)购自上海麦克林生化科技有限公司, 无水乙醚购自国药集团。核磁共振波谱仪的型号为 AgilentAV-400, 购于美国 Agilent 公司。透射电子显微镜的型号为 JEM-210, 购于日本电子株式会社。

### 2.2. 超分子聚肽纳米药物的制备及表征

#### 2.2.1. S-邻硝基苄基-L-半胱氨酸(L-NBC-NCA)的合成

将 L-半胱氨酸(1.23 g, 10.18 mmol)溶于 20 mL 水中, 再加入 1.33 mL TEA, 于 0°C 下进行搅拌。然后向溶液中滴加 30 mL 邻硝基苄溴(2 g, 9.26 mmol)的甲醇溶液, 于 0°C 下反应 0.5 h, 再于室温下反应 1 h, 反应结束后, 将反应液进行过滤, 并用乙酸乙酯和水进行洗涤, 得到淡黄色固体。将固体按每 50 mg 溶于 1.8 mL 水中进行重结晶, 加热至沸腾后, 趁热过滤, 冷却结晶后再进行抽滤并用乙酸乙酯进行洗涤, 得到淡黄色针状晶体。然后, 在手套箱的氮气保护环境, 取(350 mg, 1.36 mmol)的淡黄色晶体溶于 3 mL THF 中, 再向溶液中加入 3 mL 三光气(403.7 mg, 1.36 mmol)的甲苯溶液, 于 50°C 下反应 2 h, 反应结束后将反应液沉降在 4 倍的无水正己烷中, 静置过夜后过滤并干燥, 得到淡黄色固体产物 L-NBC-NCA, 产率为 65.3%。

#### 2.2.2. 吡啶-聚(S-邻硝基苄基-半胱氨酸)PPNBC 的合成

PPNBC 的合成: 在 25°C 的 N<sub>2</sub> 保护下, 将(7.5 mg, 0.025 mmol)引发剂六氟磷酸吡啶盐溶于 1.0 mL 的干燥 DMF 中, 再加入(200 mg, 0.71 mmol)的 L-NBC-NCA 单体搅拌反应 48 h。反应结束后将反应液沉降在 10 mL 无水乙醚中并离心, 反复 3 次后, 真空干燥得到 PPNBC, 产率为 83.8%。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) of PPNBC:  $\delta$  (ppm) = 8.51~8.65 (m, 5H, Py), 8.11~7.31 (m, 88H, (Ph)<sub>22</sub>), 4.47~4.82 (m, 24H, CH<sub>2</sub>Py, (COCHNH)<sub>22</sub>), 4.13~3.92 (d, 44H, (CH<sub>2</sub>Ph)<sub>22</sub>), 3.37~3.25 (m, 2H, CH<sub>2</sub>NH), 2.75~2.62 (t, 44H, SCH<sub>2</sub>), 2.23~2.17 (t, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.97~1.88 (f, 2H, CH<sub>2</sub>)。

#### 2.2.3. 吡啶-聚半胱氨酸(PPC)的合成

PPC 的合成: 再取 50 mg PPNBC 溶解在 100 mL DMF/CH<sub>3</sub>CN (v:v = 4:1)的混合溶剂中, 配制成 0.5 mg/mL 浓度的溶液, 置于 UV LED 灯(波长 365 nm, 功率 150 W)下光照 12 h, 使聚合物中的邻硝基苄基(NB)发生光解, 完全从聚合物骨架上脱落。光照结束后, 将溶液浓缩至 3 mL 左右, 再沉降于 25 mL 的无水乙醚中并离心, 反复 3 次后, 真空干燥得到 PPC, 产率为 83.6%。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) of PPC:  $\delta$  (ppm) = 8.31~8.13 (m, 5H, Py), 3.63~3.10 (m, 26H, CH<sub>2</sub>Ph, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph, (OCCHNHCH<sub>2</sub>)<sub>22</sub>), 1.07~1.02 (t, 2H, CH<sub>2</sub>)。

#### 2.2.4. WPPC/ICG 的制备

将 PPC(3.5 mg, 0.002 mmol)和 ICG (1.5 mg, 0.002 mmol)加入 0.5 mL DMF 中剧烈搅拌 1~2 h 后缓慢滴加 15 mL WP5 (2.78 mg, 0.002 mmol)水溶液, 反应 48 h。结束后, 将溶液置于分子量 3500 的透析袋中, 用 500 mL 去离子水透析 48 h, 中间每 8 h 换一次去离子水, 透析结束后, 冷冻干燥后得到超分子聚肽纳米药物 WPPC/ICG。

## 2.3. WPPC/ICG 超分子聚肽纳米药物性能研究

### 2.3.1. 升温曲线

在 96 孔板中加入 500  $\mu\text{L}$ 、含有 0.25 mg/mL WPPC/ICG 的纳米粒子, 25  $\mu\text{g/mL}$  游离的 ICG 的 PBS 溶液以及 PBS 溶液, 用光斑大小为 0.12  $\text{cm}^2$  的近红外光(808 nm, 1.0  $\text{W/cm}^2$ )垂直进行照射, 同时将热电偶探针置于溶液内, 每隔 10 s 记录一次溶液的温度。

### 2.3.2. 循环曲线

在 96 孔板中加入 500  $\mu\text{L}$  含有 0.25 mg/mL WPPC/ICG 的纳米粒子用光斑大小为 0.12  $\text{cm}^2$  的近红外光(808 nm, 1.0  $\text{W/cm}^2$ )垂直进行照射, 同时将热电偶探针置于溶液内, 每隔 10 s 记录一次溶液的温度。5 min 后停止光照, 再每隔 10 s 记录一次温度, 直到温度下降至不变为止。重复 3 次。

### 2.3.3. WPPC/ICG 超分子聚肽纳米药物体外 ICG 释放

将 3 mL 0.58 mg/mL 的载药纳米粒子溶液置于透析袋(分子量 3500)中然后分别用 20 mL PBS (pH 5.5, pH 5.5 + NIR)于 35 $^{\circ}\text{C}$  进行透析, 每间隔一定时间更换相同体积的 PBS 溶液于透析袋中, 测定更换的 PBS 溶液在 390 nm 处的紫外吸光度值, 并根据 ICG 的标准曲线计算出各个时间点的 ICG 释放。

### 2.3.4. WPPC/ICG 超分子聚肽纳米药物的体外细胞毒性

通过 MTT 法测定纳米药物对 HeLa 的细胞毒性。首先将细胞按照  $1.0 \times 10^4$  的密度种入 96 孔板中, 加入 DMEM 完全培养基(200  $\mu\text{L}$ ), 转入 5%  $\text{CO}_2$ 、37 $^{\circ}\text{C}$  的细胞培养箱中培养 12 h。除去原有培养基, 孔中分别加入含有 WPPC/ICG, ICG 的新鲜培养基, 培养 4 h 后除去培养基, 一组 WPPC/ICG 和 ICG 光照 5 min (808 nm, 1.0  $\text{W/cm}^2$ )继续培养 48 h, 更换 200  $\mu\text{L}$  新鲜培养基并每孔加入 25  $\mu\text{L}$  含有 MTT 的 PBS 溶液(5 mg/mL), 继续培养 4 h; 4 h 后除去培养基, 用 PBS 洗两次, 再每孔加入 200  $\mu\text{L}$  DMSO 溶液, 振荡 10 min 左右, 让蓝紫色结晶甲瓚充分溶解。结束后用酶标仪测量每孔溶液在 570 nm 处的吸光值(Abs)。细胞的存活率计算使用如下公式:

$$\text{细胞存活率} = \frac{Abs_{\text{实验组}} - Abs_{\text{空白组}}}{Abs_{\text{阴性对照组}} - Abs_{\text{空白组}}} \times 100\%$$

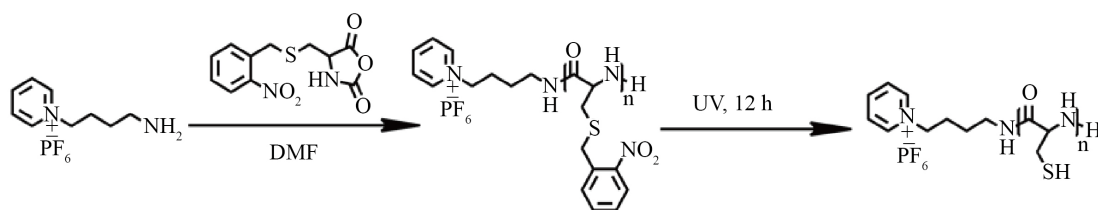
## 3. 结果与讨论

### 3.1. 设计原理

#### WPPC/ICG 超分子聚肽纳米粒子的制备与表征

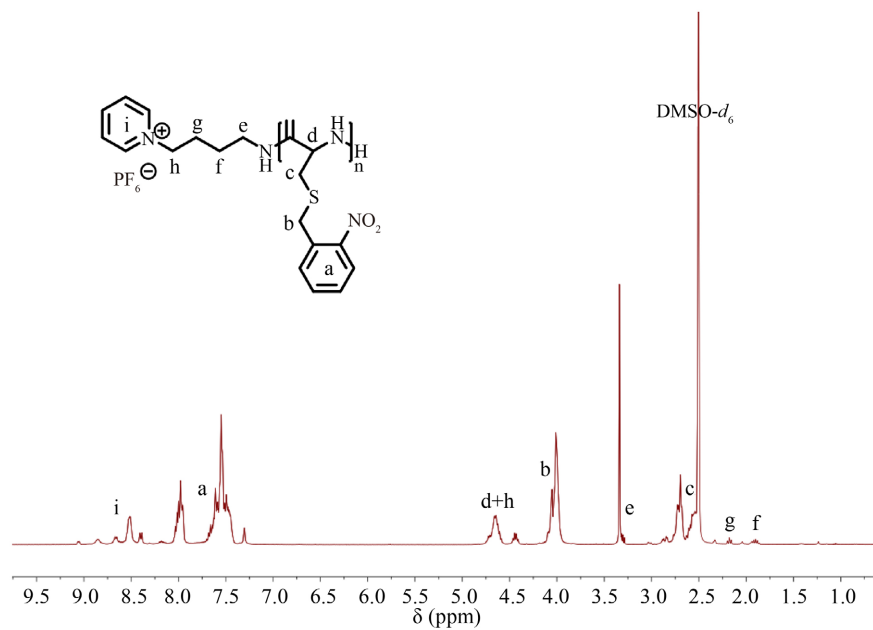
本文设计合成了客体聚肽——吡啶 - 聚半胱氨酸(PPC)。具体的反应流程如图 1 所示。首先, 用六氟磷酸吡啶盐作为引发剂, 引发 L-NBC-NCA 单体开环聚合得到吡啶 - 聚(S-邻硝基苄基-L-半胱氨酸)(PPNBC), 其  $^1\text{H}$  NMR 谱图如图 2 所示。然后, 通过紫外光照使聚合物中的邻硝基苄基(NB)发生光解, 得到最终产物 PPC。从 PPC 的  $^1\text{H}$  NMR 谱图可以看到, 邻硝基苄基的特征峰已经完全消失(图 3), 证明 PPNBC 上的 NB 基团已经完全从聚合物骨架上脱落。

WPPC/ICG 超分子聚肽纳米药物的制备流程如图 4 所示。将 PPC 和 ICG 溶于 DMF 溶剂中剧烈搅拌, 同时缓慢滴加 WP5 的水溶液, 搅拌过夜后, 用去离子水透析 48 小时, 得到 WPPC/ICG 超分子聚肽纳米药物的水溶液。通过动态光散射(DLS)和透射电子显微镜(TEM)对其粒径和形貌进行表征。如图 5 所示, WPPC/ICG 超分子聚肽纳米药物的平均流体力学粒径为  $125.4 \pm 5.8$  nm, PDI 为  $0.28 \pm 0.01$ , 形貌为球形胶束结构。这些数据进一步表明, WPPC/ICG 纳米药物的形成, 并且在水溶液中具有很好的分散性和稳定性。此外, 我们根据紫外可见光谱, 计算得出该纳米药物中 ICG 的载药量为 12%。



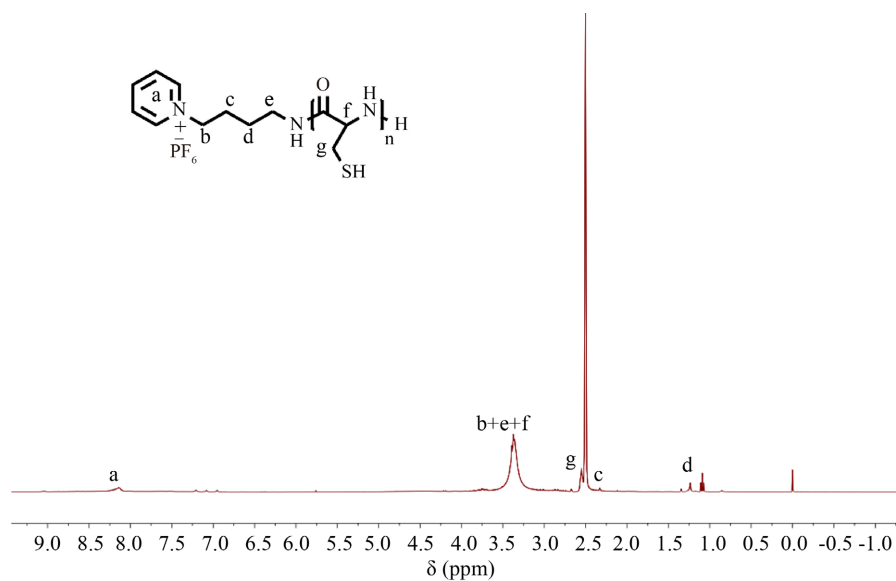
**Figure 1.** Synthesis of PPC

**图 1.** PPC 的合成步骤



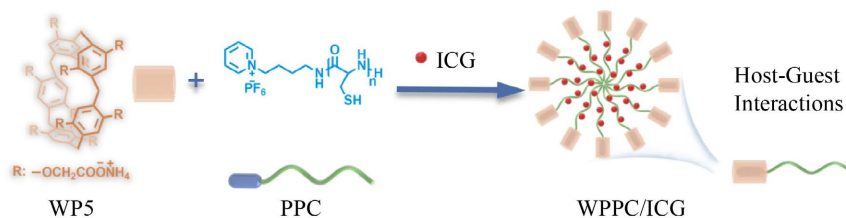
**Figure 2.**  $^1\text{H}$  NMR spectra of PPNBC

**图 2.** PPNBC 的  $^1\text{H}$  NMR 图谱

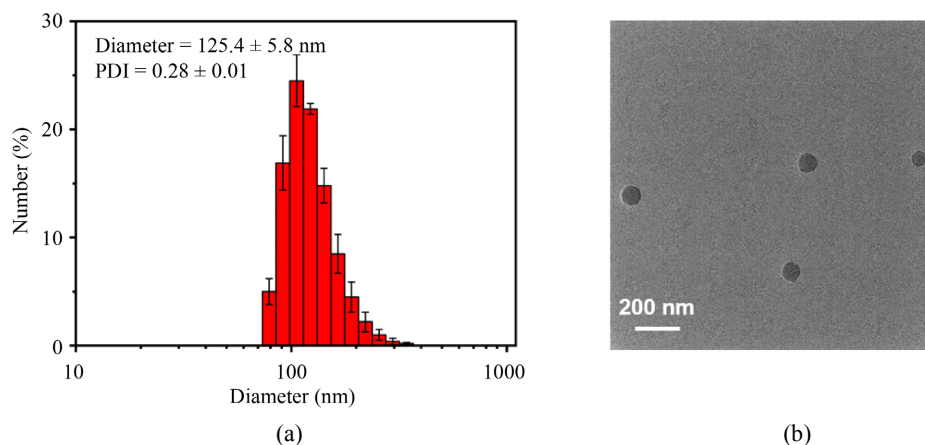


**Figure 3.**  $^1\text{H}$  NMR spectra of PPC

**图 3.** PPC 的  $^1\text{H}$  NMR 图谱



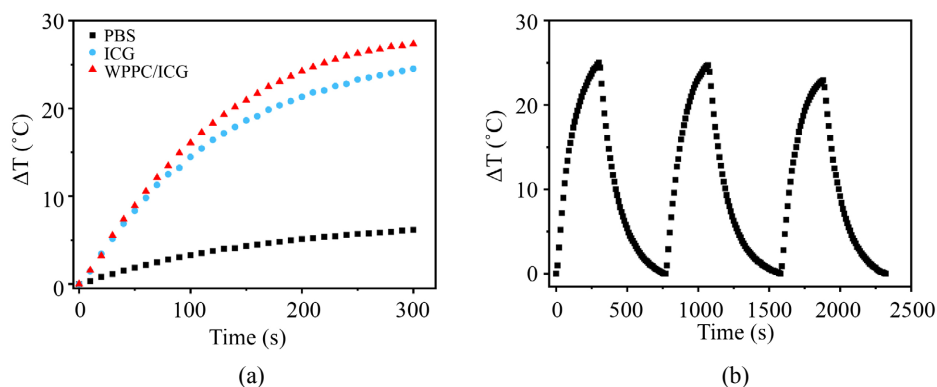
**Figure 4.** The composite diagram of supramolecular polypeptide nanoparticles WPPC/ICG  
**图 4.** WPPC/ICG 超分子聚肽纳米粒子的合成示意图



**Figure 5.** The DLS (a) and TEM (b) data of WPPC/ICG  
**图 5.** WPPC/ICG 的 DLS (a)和 TEM (b)数据

### 3.2. WPPC/ICG 的光热性能研究

由于 ICG 的近红外成像和光热转换特性,负载 ICG 的纳米粒子在近红外成像和光热疗方面得到了广泛的研究。如图 6(a)所示,在近红外(808 nm, 1.0 W/cm<sup>2</sup>, 5 min)照射下, WPPC/ICG 的 PBS 溶液最终升温约 27.5°C, 这个温度是可以致使肿瘤细胞发生不可逆的凋亡甚至坏死的, 所以可以用于光热疗, 并且该温度略高于游离的 ICG 组(24.5°C), 这可能是由于纳米药物中 ICG 的聚集可以增强其激发热辐射, 同时降低热量的耗散。此外, 我们研究了 WPPC/ICG 纳米药物的三次升温降温循环情况, 可以观察到 3 次最高升温情况几乎一致, 表明该纳米药物 WPPC/ICG 具有很好的光热稳定性(图 6(b))。

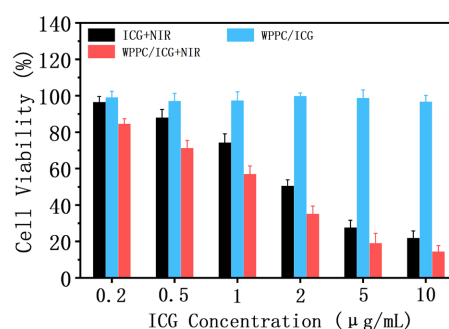


**Figure 6.** (a) The temperature increase of PBS, ICG and WPPC/ICG; (b) the photostability of WPPC/ICG

**图 6.** (a) PBS, ICG 和 WPPC/ICG 的升温曲线; (b) WPPC/ICG 的光热稳定性

### 3.3. WPPC/ICG 复合纳米粒子的体外细胞毒性

我们进一步地通过 MTT 法研究了 ICG 和 WPPC/ICG 对 HeLa 细胞系的细胞毒性如图 7 所示。在没有光照时, WPPC/ICG 实验组的细胞系存活率基本都高于 95%, 说明其没有明显的细胞毒性, 具有良好的生物相容性。在 NIR 光照(808 nm, 1.0 W/cm<sup>2</sup>, 5 min)条件下, WPPC/ICG 的细胞毒性明显高于 ICG, 说明通过将 ICG 负载于 WPPC 胶束内制成 WPPC/ICG 纳米药物后, 显著提高了 ICG 的光热疗抗肿瘤效果。



**Figure 7.** The cytotoxicity of ICG + NIR, WPPC/ICG, and WPPC/ICG + NIR determined by MTT

**图 7.** MTT 法测定的 ICG + NIR、WPPC/ICG 和 WPPC/ICG + NIR 的细胞毒性

## 4. 结论

本文构建了一种基于主客体识别作用的超分子聚肽纳米药物 WPPC/ICG, WP[5]和 PPC 通过主客体识别作用形成两亲性超分子聚肽, 并将 ICG 负载在纳米粒子中, 形成纳米药物 WPPC/ICG, 增强了 ICG 在近红外光照射下的升温效果, 并显著提高了 ICG 的光热疗效果。本实验可以进一步将 DOX 包入其中, 起到联合抗肿瘤效果。因此, 该纳米载药体系的构建为生物医药领域提供了有力的实验基础。同时, 在肿瘤治疗、医药领域、生化分析等方面存在潜在的应用前景。

## 参考文献

- [1] Gao, G., Jiang, Y.W., Jia, H.R., *et al.* (2018) Near-Infrared Light-Controllable on-Demand Antibiotics Release Using Thermo-Sensitive Hydrogel-Based Drug Reservoir for Combating Bacterial Infection. *Biomaterials*, **188**, 83-95. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.09.045>
- [2] Liu, Y.J., Lu, Y., Zhu, X.H., *et al.* (2020) Tumor Microenvironment-Responsive Prodrug Nanoplatfrom via Co-Self-Assembly of Photothermal Agent and IDO Inhibitor for Enhanced Tumor Penetration and Cancer Immunotherapy. *Biomaterials*, **242**, 119933. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.119933>
- [3] Zhu, D.W., Fan, F., Huang, C.L., *et al.* (2018) Bubble-Generating Polymersomes Loaded with Both Indocyanine Green and Doxorubicin for Effective Chemotherapy Combined with Photothermal Therapy. *Acta Biomaterialia*, **75**, 386-397. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.05.033>
- [4] Zhang, H.C., Liu, Z.N. and Zhao, Y.L. (2018) Pillararene-Based Self-Assembled Amphiphiles. *Chemical Society reviews*, **47**, 5491-5528. <https://doi.org/10.1039/C8CS00037A>
- [5] Zhu, H.T.Z., Shanguan, L.Q., Shi, B.B., *et al.* (2018) Recent Progress in Macrocyclic Amphiphiles and Macrocyclic Host-Based Supra-Amphiphiles. *Materials Chemistry Frontiers*, **2**, 2152-2174. <https://doi.org/10.1039/C8QM00314A>
- [6] Shao, W., Liu, X., Sun, G.P., *et al.* (2018) Construction of Drug-Drug Conjugate Supramolecular Nanocarriers Based on Water-Soluble Pillar[6]arene for Combination Chemotherapy. *Chemical Communications*, **54**, 9462-9465. <https://doi.org/10.1039/C8CC05180A>
- [7] Murray, J., Kim, K., Ogoshi, T., *et al.* (2017) The Aqueous Supramolecular Chemistry of Cucurbit[n]urils, Pillar[n]arenes and Deep-Cavity Cavitands. *Chemical Society reviews*, **46**, 2479-2496.

- <https://doi.org/10.1039/C7CS00095B>
- [8] Rui, L.L., Xue, Y.D., Wang, Y., *et al.* (2017) A Mitochondria-Targeting Supramolecular Photosensitizer Based on Pillar[5]arene for Photodynamic Therapy. *Chemical Communications*, **53**, 3126-3129. <https://doi.org/10.1039/C7CC00950J>
- [9] 秦茜茹, 于立策, 杨佳文, 景丹妮, 汪洋. 硅酸铜空心球纳米药物载体的合成及应用研究[J], 纳米技术, 2021, 11(3): 117-123. <https://doi.org/10.12677/NAT.2021.113015>
- [10] 马宇轩, 于威, 朱吕明, 丁月. 刺激响应性聚肽纳米材料及其肿瘤药物递送中的应用[J]. 纳米技术, 2021, 11(3): 184-190. <https://doi.org/10.12677/NAT.2021.113021>