

# 温敏型药物控释系统的构建及光热联合 化学疗法协同抗肿瘤作用研究

梁家宁, 符开奇, 周 瑞, 叶丽莉, 王 丽, 刘兆敏, 孙 琳, 董 妍  
(遵义医科大学珠海校区生物工程学院, 珠海 519041)

**摘要** 化疗和热疗联用能有效覆盖整个肿瘤部位, 起到协同治疗的效果. 本文以具有独特孔道结构和良好化学稳定性的共价有机骨架(COFs)作为壳, 光热性质良好的 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米粒子作为核, 制备了粒径约为200 nm的核壳结构药物载体. 通过吸附作用将抗肿瘤药物盐酸阿霉素(DOX)封装至COFs孔道内, 随后以温敏材料聚 $N$ -异丙基丙烯酰胺(PNIPAM)进行修饰, 封堵在复合材料表面. 采用波长808 nm的激光照射使 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米粒子迅速将光能转化为热能, 导致温度发生变化. 一方面, 升温使PNIPAM达到临界温度发生相变, 其结构向内收缩, 从而实现药物分子的可控释放; 另一方面, 产生的高温可有效杀灭癌细胞, 起到化疗和热疗联用抗肿瘤的效果. 最后, 在复合材料表面嫁接具有癌细胞主动靶向作用的叶酸碳点, 实现叶酸介导的靶向温度响应控释机制, 构建了温敏型药物控释系统, 并联合化学疗法和光热疗法, 有效提升了抗肿瘤效果.

**关键词** 共价有机骨架; 纳米载体; 药物递送; 光热联合化学疗法; 抗肿瘤

中图分类号 O611.4; TB383.4 文献标志码 A doi: 10.7503/cjcu20250068

## Construction of Thermosensitive Drug Controlled Release System for Highly Efficient Chemo-photothermal Tumor Therapy

LIANG Jianing, FU Kaiqi, ZHOU Rui, YE Lili, WANG Li,  
LIU Zhaomin, SUN Lin, DONG Yan\*

(Department of Bioengineering Zunyi Medical University(Zhuhai Campus), Zhuhai 519041, China)

**Abstract** Combination of chemotherapy and photothermal therapy can cover the entire tumor area, achieving an effective synergistic treatment performance. In this study, covalent organic frameworks (COFs) with unique pore structure and excellent chemical stability were utilized as the shell, and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles with favorable photothermal properties were adopted as the core to construction a core-shell structured drug carrier with a particle size of approximately 200 nm. The antitumor drug doxorubicin hydrochloride (DOX) was encapsulated into the pores of COFs. Subsequently, the composite material was modified with the thermosensitive material, poly( $N$ -isopropylacrylamide) (PNIPAM), which was used to seal the surface of the composite. Furthermore, under irradiation with 808 nm laser,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles rapidly converted light energy into heat energy, thereby generating a temperature change that achieve two purposes, on the one hand, the temperature change reached the lower critical solution temperature of PNIPAM for phase transition, causing the structure contracts inward and thus achieving the controlled release of drug molecules. On the other hand, the high temperature could kill cancer cells effectively, thus

收稿日期: 2025-03-07. 网络首发日期: 2025-05-06.

联系人简介: 董 妍, 女, 博士, 副教授, 主要从事生物材料与制药工程方面的研究. E-mail: ydong@zmu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 31960211, 81960651)、贵州省卫生健康委科学技术基金(批准号: gzwkj2024-058)和珠海市基础与应用基础课题研究项目(批准号: 2320004002780)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China(Nos.31960211, 81960651), the Science and Technology Foundation of Guizhou Provincial Health Commission, China(No.gzwkj2024-058) and the Zhuhai Basic and Applied Basic Research Foundation, China (No.2320004002780).

exhibited chemo-photothermal tumor therapy performance. Finally, carbon dots were grafted on the surface of the system to achieve the folic acid-mediated target controlled release mechanism, and a temperature-sensitive drug controlled release system was constructed successfully. The system exhibited highly antitumor performance by combining with chemotherapy and photothermal therapy.

**Keywords** Covalent organic framework; Nanocarrier; Drug delivery; Photothermal combined chemotherapy; Antitumor

癌症是人类预期寿命延长的重要障碍,全球大约六分之一的死亡是由癌症造成的<sup>[1]</sup>.化学疗法由于对癌细胞展现出毒性强、见效快、可直接杀死癌细胞的特点,是最为传统的治疗方法,但也由于缺乏对癌细胞的靶向性导致对人体产生强烈的毒副作用而亟需改良<sup>[2]</sup>.靶向治疗是当前肿瘤治疗的热点,为了增强载药体系的靶向性,通常利用配体和受体特异性结合的原理,以新型载体材料包载或共轭药物分子,用特异性配体或抗体修饰载体,以肿瘤细胞表面特定受体为靶点,将抗肿瘤药物最大限度输送并聚集于肿瘤组织和细胞,实现高效低毒的治疗目标<sup>[3]</sup>.叶酸受体(Folate receptor, FR)在正常细胞中仅有少量表达,但广泛表达于多种肿瘤细胞的表面<sup>[4]</sup>.因此,以叶酸受体为靶点,用叶酸修饰改性纳米材料<sup>[5,6]</sup>,通过其搭载具有不同功能的片段可以实现叶酸受体阳性肿瘤的靶向治疗<sup>[7,8]</sup>.

随着纳米技术的不断发展,新型抗肿瘤方式得到了深入的研究,例如光热疗法(Photothermal therapy, PTT)、光动力疗法(Photodynamic therapy, PDT)、化学动力学疗法(Chemodynamic therapy, CDT)、热力学疗法(Thermodynamic therapy, TDT)和免疫疗法(Immunotherapy)等. PTT<sup>[9]</sup>是在外部特定波段光源照射下,光热剂由于自身特性被光激发从而释放出振动能量,进而发挥作用杀死目标细胞或组织的一种治疗方法.由于其无毒无害、治疗时间短且对人体副作用小,被作为肿瘤化疗的重要补充治疗手段.而单一的光热治疗方法又具有散热较快、热疗效果不明显的缺点.研究发现,将化疗和热疗联用能有效覆盖整个肿瘤部位,起到协同治疗的效果.另外,光照产生的高温使肿瘤细胞质膜的渗透性增加,有利于化疗药物的摄取,可以有效提升肿瘤的治疗效果<sup>[10]</sup>.常见的光热剂包括金纳米棒、硫化铜和 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 等,其中 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 被广泛研究. Wang等<sup>[11]</sup>通过聚乙烯亚胺乙二胺(PEI)将 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 和Ag组装在一起,构建了结构尺寸约为150 nm的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@PEI@Ag$ 复合物,所得到的多功能 $\text{Fe}_3\text{O}_4@PEI@Ag$ 结构在生物医学和生物技术领域可作为具有酶和光热特性的替代底物,为开发新型的生物医学试剂和传感器提供了新的思路和方法. Li等<sup>[12]</sup>基于光热剂 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米颗粒制备了双靶向纳米递送系统( $\text{GOx}@FeNPs$ )用于结直肠癌的治疗,该纳米平台利用光热治疗和铁死亡诱导免疫原性细胞死亡,激活了抗肿瘤免疫反应,可消融实体肿瘤.

多孔纳米材料由于具有良好的物理化学性质,在刺激响应性纳米载体的设计和应用方面得到迅速发展,其中具有有序晶型结构的共价有机骨架(Covalent organic frameworks, COFs)因具有结晶性好、密度低、比表面积高、结构可设计性强及热稳定性和化学稳定性高等优点而备受关注<sup>[13]</sup>. Deng等<sup>[14]</sup>设计了一种多功能纳米复合材料,将COFs与黄铁矿功能化,用于协同PTT、CDT、TDT和免疫疗法治疗肿瘤. Lin等<sup>[15]</sup>开发了肿瘤细胞膜包被的COFs,负载了甘露糖修饰的金纳米颗粒和阿霉素,开创了旨在增强肿瘤免疫治疗的创新纳米制剂. Khalili等<sup>[16]</sup>设计了一种具有金纳米颗粒的移动核心和聚多巴胺外壳的多功能亚胺基COFs,实现共同递送亲水性阿霉素和疏水性多西紫杉醇,通过其靶向能力及良好的光热性质从而实现肿瘤治疗的目的. Amiri等<sup>[17]</sup>制备了以硅为核-壳模板和多功能COFs为基础的网状空心纳米球(HCOFs),实现了双药化疗和光热治疗协同抗肿瘤作用. Huang等<sup>[18]</sup>设计了一种乏氧响应型COFs,当纳米颗粒进入缺氧肿瘤微环境中时COFs结构塌陷,产生氧气改善缺氧条件,并产生ROS,同时金、钨双金属释放,且具有刺激树突状细胞成熟的性质,达到光热、光动力联合免疫疗法协同抗肿瘤的作用.研究表明,COFs在抗肿瘤领域具有诸多优势,起到了良好的治疗效果.然而,严苛的制备条件及繁杂的材料组装限制了COFs的实际应用.因此,开发简单的工艺流程及组装技术对于COFs基材料在抗肿瘤领域的应用具有实际意义.

本研究以具有光热转换性质的 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 为核,通过简单的室温原位合成法制备核壳结构 $\text{Fe}_3\text{O}_4@COFs$

载体,将盐酸阿霉素(DOX)封装至COFs孔道内,引入温度敏感的聚*N*-异丙基丙烯酰胺(PNIPAM)实现药物的响应性控释,最后通过引入叶酸碳点赋予该材料以叶酸受体为靶点的靶向光热联合化疗抗肿瘤性质,有效提升了抗肿瘤效果.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

2,5-二甲氧基苯-1,4-二甲醛(DMTP,纯度 $\geq 97\%$ )、1,3,5-三(4-氨基苯基)苯(TAPB,纯度 $\geq 97\%$ )、3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES,纯度 $\geq 99\%$ )、叶酸(纯度 $\geq 97\%$ )、盐酸阿霉素(纯度 $\geq 98\%$ )、聚*N*-异丙基丙烯酰胺( $M_w=40000$ )、四水合氯化亚铁( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,纯度 $\geq 98\%$ )和六水合氯化铁( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,纯度 $\geq 99\%$ ),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;无水乙醇、乙腈和氨水(25%,质量分数),分析纯,天津市大茂化学试剂公司.

D8 Venture型X射线粉末衍射仪(XRD),瑞士Bruker公司;Talos F200S G2 S型透射电子显微镜(TEM),美国Thermo Fisher Scientific公司; Nicolet iN10型傅里叶变换红外光谱仪(FTIR),美国Thermo Fisher Scientific公司; Tescan Mira Lms型扫描电子显微镜(SEM),捷克Tescan公司; UV-2600i/2700i型紫外分光光度计(UVs),日本Shimadzu公司; IX73型倒置荧光显微镜,日本Olympus公司; BDS300-PH型倒置相差显微镜,中国奥特莱斯公司; Evos FL型细胞成像仪,美国Thermo Fisher Scientific公司; Multiskan Go型全波长酶标仪,美国Thermo Fisher Scientific公司.

### 1.2 实验过程

1.2.1  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米粒子的合成及改性  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米粒子和 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ 纳米粒子按照文献[19]方法合成.称取3.11 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和3.95 g  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 溶于100 mL蒸馏水中,在氮气氛围下升温至60 °C后,加入26 mL氨水,持续搅拌.随后升温至80 °C反应2 h.产物经洗涤和干燥后,得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米粒子.在氮气氛围下,称取300 mg已制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米粒子并加入200 mL超纯水超声分散.加热至60 °C,随后加入20  $\mu\text{L}$  APTES,搅拌30 min.滴加2 mL氨水,持续反应1 h.待溶液呈黑褐色透明状后,经静置、洗涤和干燥,得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ 纳米粒子.

1.2.2 叶酸碳点的制备 称取20.68 mg叶酸加入氨水-水悬浮液中(氨水/水体积比1:3).将悬浮液超声处理后,使用截留分子量为8~14 kD的透析袋透析48 h,得到叶酸碳点(FA).

1.2.3  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{@COFs@DOX}$ 的合成 将8 mg DMTP用10 mL乙腈溶解,得溶液a;将10 mg DOX用5 mL乙醇溶解后缓慢加入至溶液a中并振荡1 h;称取10 mg TAPB与10 mg  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ 纳米粒子,加入10 mL乙腈,超声分散20 min,得混合液b;将混合液b缓慢加入至含有DMTP和DOX的混合溶液中,加入100  $\mu\text{L}$ 冰乙酸,振荡24 h后用乙醇洗涤,经真空干燥后得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{@COFs@DOX}$ .不加入DOX,重复此步骤,得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{@COFs}$ .利用紫外-可见光谱法<sup>[20]</sup>计算载药量(DL, %):

$$\text{DL} = \frac{m_1}{m_N} \times 100\% \quad (1)$$

式中:  $m_1$ 为纳米体系中装载的药物质量(g);  $m_N$ 为纳米体系的总质量(g).

1.2.4  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{@COFs@DOX@PNIPAM-FA}$ 的合成 称取10 mg  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{@COFs@DOX}$ 溶于5 mL水中,加入1 mL叶酸碳点和5 mg PNIPAM,室温振荡6 h.将产物用乙醇洗涤后于室温下真空干燥,记为NPs.将 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{@COFs@DOX}$ 换为 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{@COFs}$ ,重复此步骤得到样品 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{@COFs@PNIPAM-FA}$ .

1.2.5 纳米颗粒光热效率考察 将所得纳米颗粒配制成不同浓度的悬浮液,用波长808 nm的激光在不同功率下照射10 min,用红外热像仪记录温度的变化情况.光热转化效率( $\eta$ , %)计算公式如下<sup>[21]</sup>:

$$\eta = \frac{hs(\Delta T_{\text{material}} - \Delta T_{\text{water}})}{I(1 - 10^{-A})} \times 100\% \quad (2)$$

式中:  $I(\text{W}/\text{cm}^2)$ 为激光功率(2.0  $\text{W}/\text{cm}^2$ );  $A$ 为水悬浮液在808 nm波长处的吸光度;  $\Delta T_{\text{material}}(^{\circ}\text{C})$ 和 $\Delta T_{\text{water}}(^{\circ}\text{C})$ 分别代表试样和空白试样的温度变化;  $h$ 为传热系数,  $s(\text{cm}^2)$ 为容器的表面积,由下式确定:

$$hs = \frac{mc}{\tau_s} \quad (3)$$

式中:  $m(g)$ 为溶液的质量;  $c(kJ/mol)$ 为溶剂的比热容;  $\tau_s$ 为时间常数,可在冷却时间内根据以下公式确定:

$$t = -\tau_s(\ln\theta) \quad (4)$$

式中:  $\theta$ 是与时间相关的无量纲参数,称为驱动力温度,定义如下:

$$\theta = \frac{T - T_{Surr}}{T_{Max} - T_{Surr}} \quad (5)$$

式中:  $T(^{\circ}C)$ 为测试中样品温度;  $T_{Max}(^{\circ}C)$ 和  $T_{Surr}(^{\circ}C)$ 分别为最大稳态温度和环境温度.

1.2.6 不同温度下药物释放行为考察 DOX的温度响应控制释放研究在  $pH=5.8$ 和不同温度(25和  $45^{\circ}C$ )下进行,定时测量从纳米颗粒释放至上清液中的游离DOX的吸光度.以时间-释放百分比为横-纵坐标绘制NPs在不同温度相同pH值的缓冲液中的释放动力学曲线,计算药物释放量.

1.2.7 体外细胞毒性考察 采用噻唑兰(MTT)法考察样品的细胞毒性.

黑暗条件下:将细胞按约  $1 \times 10^5$ 个/孔接种到96孔板中,在培养箱中孵育24 h,然后加入不同浓度的纳米颗粒,孵育24 h.每孔加入  $100 \mu L$   $1 mg/mL$  MTT溶液,继续孵育4 h.弃去上清液后加入  $150 \mu L$  二甲基亚砜(DMSO),在酶标仪上测量波长  $490 nm$ 处的吸光度.

光学条件下:将细胞按约  $1 \times 10^5$ 个/孔接种到96孔板中,在培养箱中孵育24 h,然后加入不同浓度的纳米颗粒,孵育4 h.用  $808 nm$ 激光以  $2 W/cm^2$ 的强度辐照10 min后.孵育24 h.每孔加入  $100 \mu L$   $1 mg/mL$  MTT溶液,继续孵育4 h.弃去上清液后加入  $150 \mu L$  DMSO,使用酶标仪测量波长  $490 nm$ 处的吸光度.

细胞活力由以下公式计算:

$$\text{Cell viability} = \frac{A_s - A_b}{A_c - A_d} \times 100\% \quad (6)$$

式中:  $A_s$ 为经处理的细胞孔的平均吸光度值;  $A_c$ 为未经处理的细胞孔的平均吸光度值;  $A_b$ 为仅含培养基和MTT试剂(无细胞)的孔的平均吸光度值.

1.2.8 细胞内吞成像 将4T1, MCF-7, HeLa和A549细胞分别与NPs( $30 \mu g/mL$ )共孵育2, 4和6 h,用PBS洗涤3次后,用4,6-二氨基-2-苯基吡啶(DAPI)在避光条件下标记细胞核,使用荧光显微镜采集图片.

1.2.9 动物肿瘤模型建立 实验使用雌性Balb/C小鼠(体重约18 g,购自广州市研成生物科技有限公司),动物实验符合《国家实验动物护理和使用条例》标准.建立小鼠乳腺癌模型,肿瘤模型接种位置选定小鼠俯卧位右前肢,皮下接种4T1细胞,每只小鼠注射约50万4T1细胞,待肿瘤长至  $60 \sim 80 mm^3$ 时瘤内注射进行治疗.将荷瘤小鼠随机分为5组,每组6只.实验中所有小鼠饲养条件相同.具体实验分组如下:第1组:瘤内注射PBS;第2组:NIR组( $808 nm$ ,  $2 W/cm^2$ , 10 min);第3组:瘤内注射NPs;第4组:瘤内注射DOX;第5组:瘤内注射NPs+NIR组( $808 nm$ ,  $2 W/cm^2$ , 10 min).使用游标卡尺测量肿瘤的长度和宽度,使用如下公式计算肿瘤体积( $V_{tumor}, mm^3$ ):

$$V_{tumor} = \frac{\text{Length} \times \text{Width}^2}{2} \quad (7)$$

式中: Length(mm)为肿瘤长度; Width(mm)为肿瘤宽度.

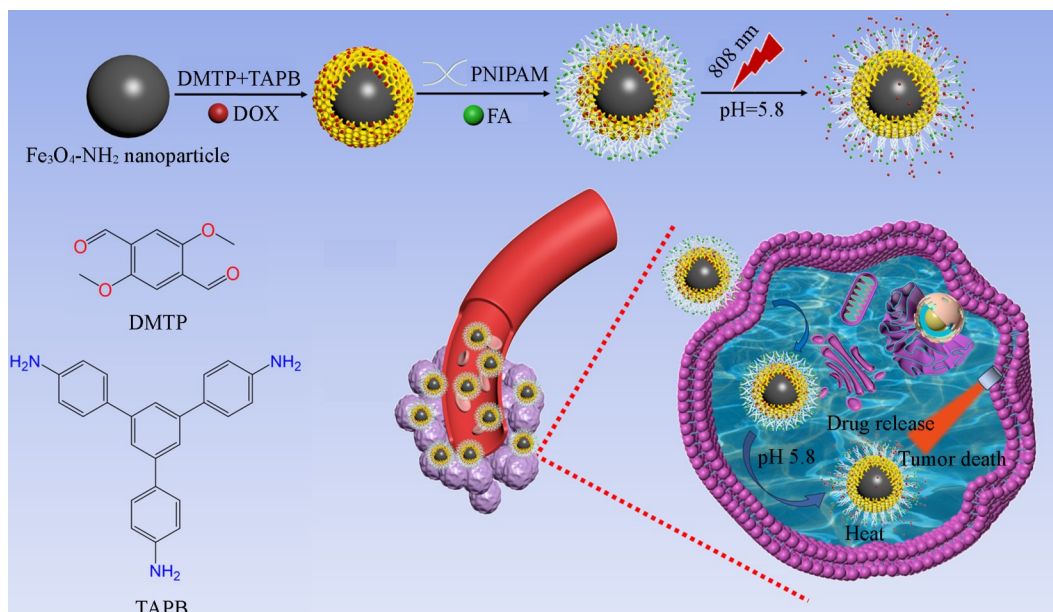
1.2.10 小鼠器官及肿瘤病理情况 小鼠治疗第15 d时,过量麻醉处死小鼠,收集小鼠的心、肝、脾、肺、肾及肿瘤,加入含有4%多聚甲醛的离心管中固定组织并做好标记,室温固定24 h后进行H&E染色<sup>[22]</sup>.

## 2 结果与讨论

### 2.1 NPs的制备与结构表征

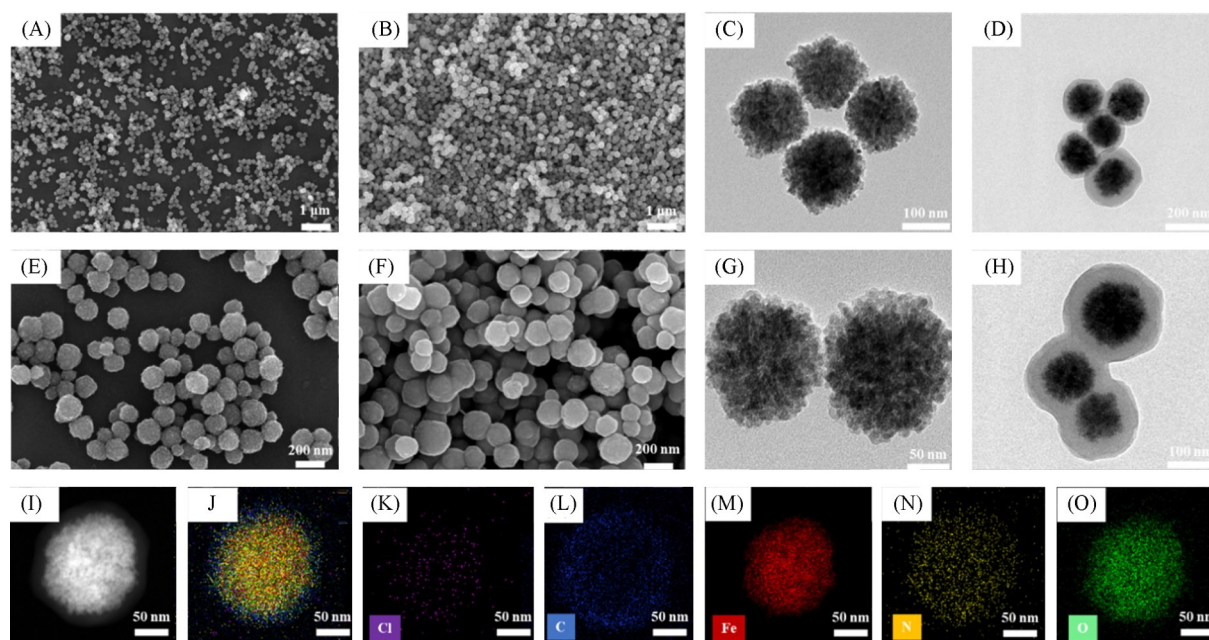
复合体系的制备过程如Scheme 1所示,以COFs作为载体,采用光热性质良好的  $Fe_3O_4$  纳米粒子作

为光热剂制备核壳结构复合材料；通过吸附作用将抗肿瘤药物封装至COFs孔道内，随后以温敏材料PNIPAM进行修饰，封堵在复合材料表面；最后，在复合材料表面嫁接具有主动靶向作用的叶酸碳点，以实现叶酸介导的靶向温度响应控释机制，用以构建化疗联合光热疗法抗肿瘤体系。



**Scheme 1** Schematic illustration of the construction of thermosensitive drug controlled release system with covalent organic frameworks for chemo-photothermal tumor therapy

通过SEM考察样品的形貌。由图1(A)和(E)可清楚地观察到，所制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 具有良好的单分散结构，粒径约150 nm。以 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米粒为核，原位组装COFs得到复合材料，再引入温敏聚合物PNIPAM和叶酸碳点修饰之后，复合材料表面变得光滑且仍保持单分散的球形形貌，粒径约为200 nm[图1(B)和(F)]。TEM结果显示 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ [图1(C)和(G)]和NPs[图1(D)和(H)]尺寸大小与SEM结果一致，呈现出明显的核壳结构，且各种元素均匀分布在整個核壳结构中，说明复合材料制备成功[图1(I)~(O)]。



**Fig. 1** SEM images of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ (A, E) and NPs(B, F), TEM images of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ (C, G) and NPs(D, H) and element mapping images of NPs(I—O)

(I) SEM image of the characterized region; (J) superposition map of (K)—(O).

荧光发射光谱[图2(A)]显示,在波长365 nm光的激发下,FA的发射峰位于453 nm,而NPs中FA的发射峰红移至513 nm[图2(D)].发生红移的主要原因是复合体系中DOX的发射波长为480 nm,影响了FA的最大吸收<sup>[23]</sup>.这也表明叶酸碳点已成功整合到复合体系中.  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ 和NPs的FTIR谱图[图2(B)和(E)]均在573和576  $\text{cm}^{-1}$ 处出现  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 中Fe—O的伸缩振动峰<sup>[24]</sup>,并且  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ 的FTIR谱图在2933  $\text{cm}^{-1}$ 处出现了氨基硅烷的N—H伸缩振动特征吸收峰,说明  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 表面富含氨基基团<sup>[25]</sup>.另外,图2(E)在1618  $\text{cm}^{-1}$ 处出现了C=N键的弯曲振动峰,说明DMTP和TAPB发生了醛胺缩合反应,进一步证明成功生成了目标COFs<sup>[26]</sup>.

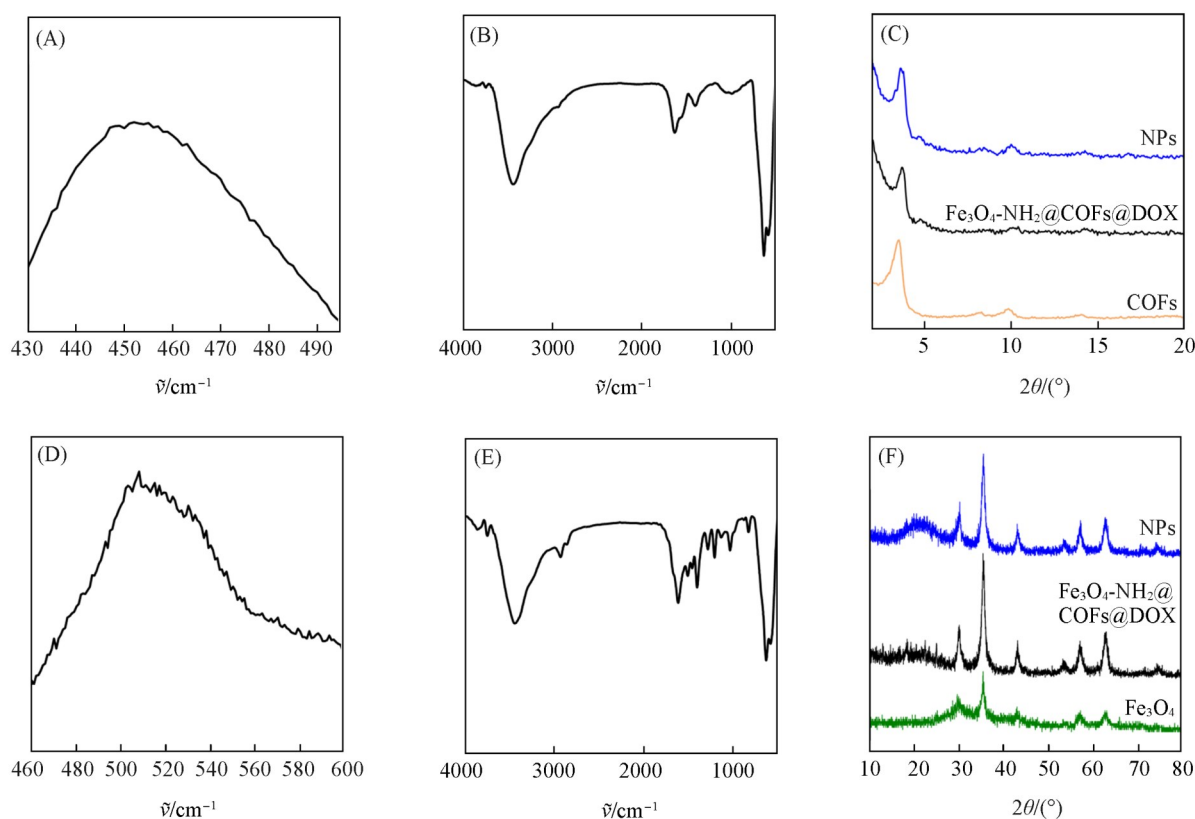
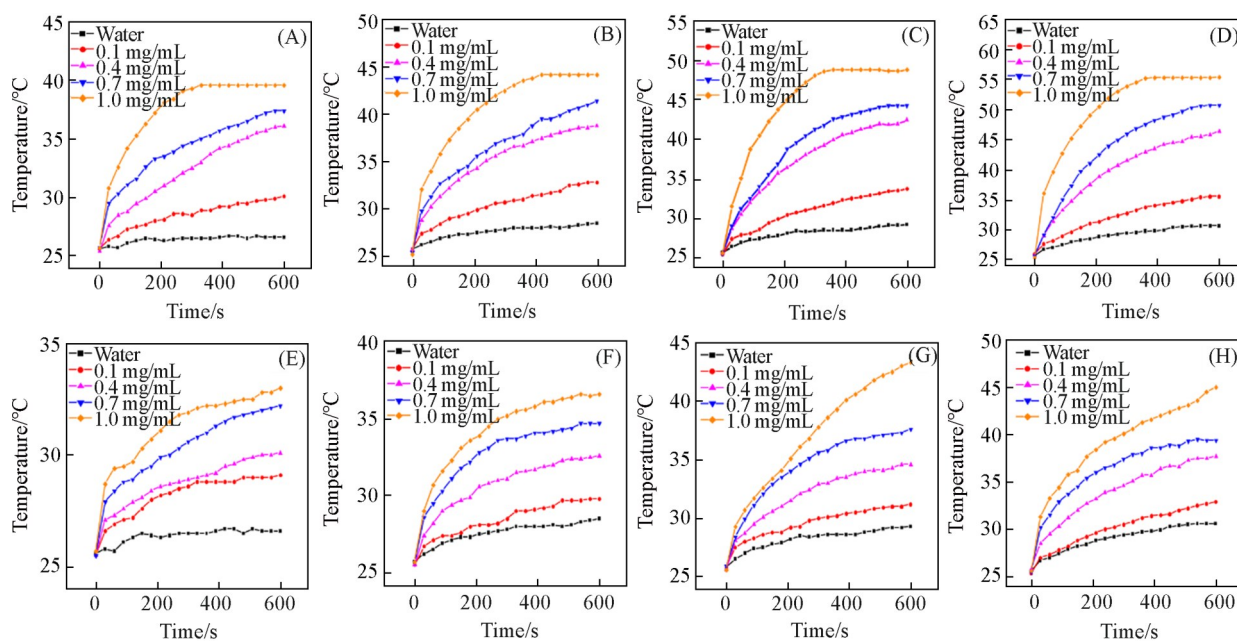


Fig. 2 Fluorescence emission spectra of FA(A) and NPs(D), Fourier transform infrared spectra of  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$  (B) and NPs(E) and XRD patterns of samples(C, F)

通过XRD探究样品的结构.由图2(C)可以清楚地观察到,样品均在2.79°及7.39°处出现衍射峰,分别归属于COFs的(100)和(210)晶面<sup>[26]</sup>;在图2(F)中可以观察到  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 的特征衍射峰.上述结果表明,成功构建了温敏型药物控释系统.

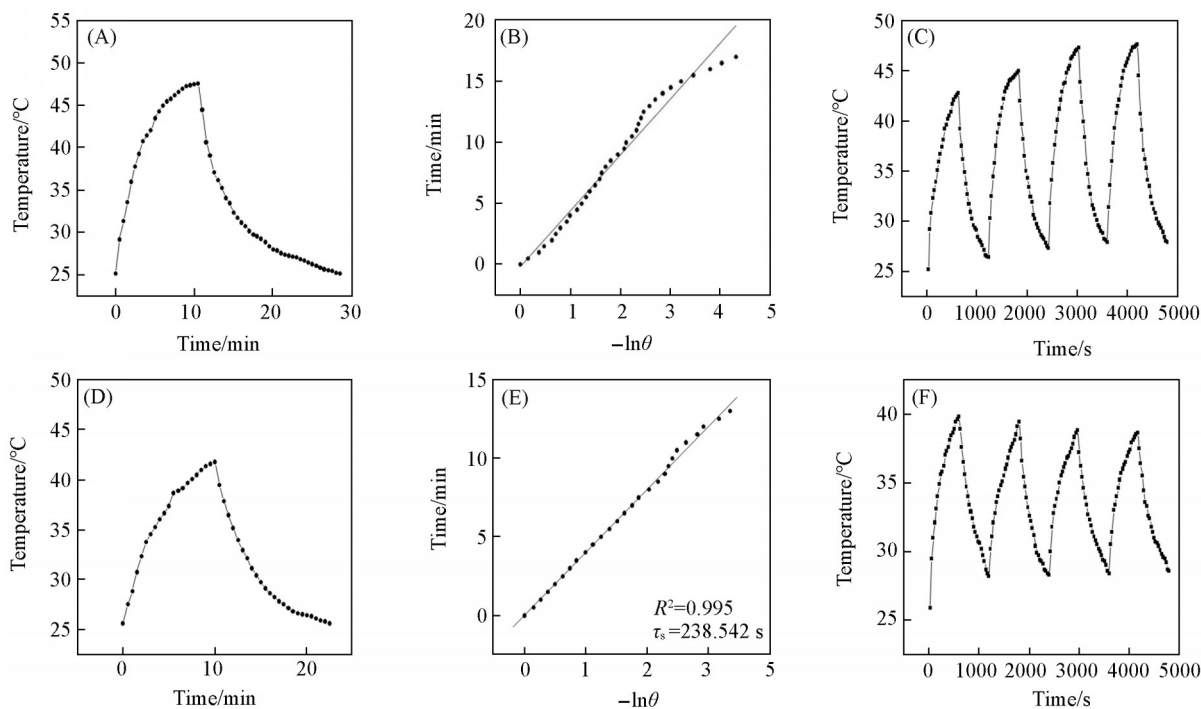
## 2.2 NPs的光热转化性能

由图3(A)~(D)可以明显观察到  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米粒子具有较好的光热性能.用2.5  $\text{W}/\text{cm}^2$ 强度的光照射10 min后,浓度为1.0  $\text{mg}/\text{mL}$ 的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 悬浮液的温度可达55.5  $^{\circ}\text{C}$ [图3(D)].从图3(E)~(H)可以观察到,NPs温度的升高具有明显的浓度依赖性,1.0  $\text{mg}/\text{mL}$  NPs悬浮液的最高温度可达45.1  $^{\circ}\text{C}$ [图3(H)].为探究纳米颗粒温度与功率密度间的关系,选取4个功率密度(1.0, 1.5, 2.0和2.5  $\text{W}/\text{cm}^2$ )进行实验.结果显示,随着功率密度升高,溶液温度上升,说明纳米颗粒温度具有明显的功率依赖性,与照射NIR功率明显呈正相关关系[图3(A)~(H)].结合图4所得数据计算,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 的光热转化效率为32.36%,说明以  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 为光热剂的可靠性;NPs光热转化效率为14.26%,说明经过修饰包裹后所制备体系光热转换效率虽有降低,但仍具有良好的光热性能,在NIR照射下能够产生足够的热量,从而杀死癌细胞,达到预期目标.



**Fig. 3** Temperature rise curves of samples with time under irradiation with different concentrations and different laser emission power

(A)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (808 nm, 1.0  $\text{W}/\text{cm}^2$ , 10 min); (B)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (808 nm, 1.5  $\text{W}/\text{cm}^2$ , 10 min); (C)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (808 nm, 2.0  $\text{W}/\text{cm}^2$ , 10 min); (D)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (808 nm, 2.5  $\text{W}/\text{cm}^2$ , 10 min); (E) NPs (808 nm, 1.0  $\text{W}/\text{cm}^2$ , 10 min); (F) NPs (808 nm, 1.5  $\text{W}/\text{cm}^2$ , 10 min); (G) NPs (808 nm, 2.0  $\text{W}/\text{cm}^2$ , 10 min); (H) NPs (808 nm, 2.5  $\text{W}/\text{cm}^2$ , 10 min).



**Fig. 4** Radiation heating and cooling cycles for 1 mg/mL aqueous dispersion of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ (A) and NPs(D), relationship between cooling time of the materials and  $-\ln\theta$  of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ (B) and NPs(E), photothermal stability of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ (808 nm, 2.0  $\text{W}/\text{cm}^2$ , 1 mg/mL, 10 min)(C) and NPs(808 nm, 1.0  $\text{W}/\text{cm}^2$ , 1 mg/mL, 10 min)(F) systems during four consecutive photothermal cycles

### 2.3 药物的装载与释放

$\text{N}_2$ 吸附-脱附结果[图5(A)]表明, COFs的BET比表面积约为1238  $\text{m}^2/\text{g}$ , 孔径约为2.2 nm, 均低于文献[26]报道结果. 这是由于本文中COFs是在室温条件下制备的, 样品结晶性降低. COFs丰富的孔

结构说明其可作为药物载体. 经计算, NPs 中 DOX 的装载量为  $(16.25 \pm 2.10)\%$ . 如图 5(B) 所示, 在  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  下, 72 h 内其释放量为  $28.77\%$ ; 当温度升高至  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  时, 72 h 时 DOX 释放量达到  $37.25\%$ , 高于  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下的药物释放量. 这是由于包裹在复合材料表面的温敏型聚合物 PNIPAM 的最低临界温度 (LCST) 约为  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 当环境温度高于  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  时, PNIPAM 由亲水状态转为疏水状态, 形貌从扩张转为收缩, 此过程可将包裹在其中的 DOX 挤出载体. 当温度低于  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  时, PNIPAM 由疏水状态转为亲水状态, 形貌从收缩转为扩张, 此过程可将药物包裹在聚合物中, 减少药物的泄露和损失<sup>[27]</sup>. 因此, 所构建的载药体系展现出温度响应控释特性.

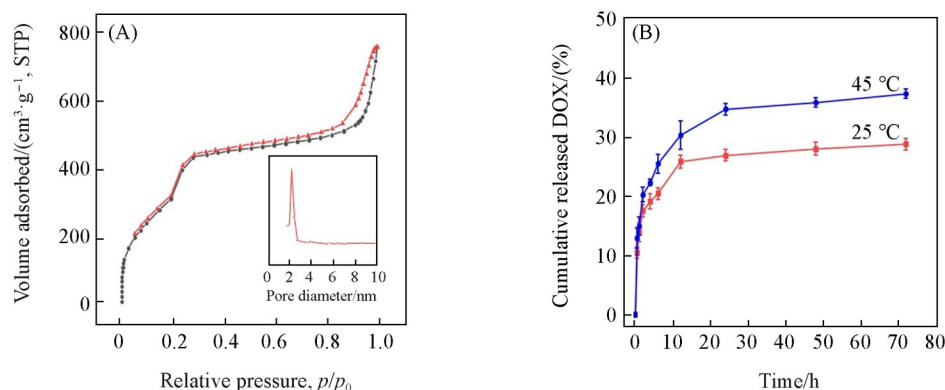


Fig. 5  $\text{N}_2$  adsorption-desorption isotherms(A) and pore size distribution of COFs(inset) and NPs release accumulation curve of DOX under different temperatures(B)

#### 2.4 细胞毒性及生物相容性

通过 MTT 法评估 NPs 的体外细胞毒性及生物相容性. 如图 6(A) 所示, 当不同浓度 ( $0\sim 500\text{ }\mu\text{g/mL}$ ) 的 NPs 作用于 MCF-7 细胞 24 h 后, 随着 NPs 浓度的增加, 细胞存活率降低, 再加入 NIR 辐照后细胞存活率进一步下降. 当 NPs 浓度为  $50\text{ }\mu\text{g/mL}$  时, 细胞存活率为  $65.63\%$ , 再加入 NIR 辐照后细胞存活率为  $61.04\%$ ; 当 NPs 浓度为  $500\text{ }\mu\text{g/mL}$  时, 细胞存活率仅为  $25.36\%$ ; 再加入 NIR 辐照后细胞存活率进一步降低至  $13.31\%$ .

如图 6(B) 所示, 当不同浓度 ( $0\sim 500\text{ }\mu\text{g/mL}$ ) 的 NPs 作用于 4T1 细胞 24 h 后, 随着 NPs 浓度的增加, 细胞存活率降低, 加入 NIR 辐照后细胞存活率进一步下降. 当 NPs 浓度为  $50\text{ }\mu\text{g/mL}$  时, 细胞存活率为  $58.19\%$ , 加入 NIR 辐照后细胞存活率为  $29.93\%$ ; 当 NPs 浓度为  $500\text{ }\mu\text{g/mL}$  时, 细胞存活率为  $35.48\%$ , 加入 NIR 辐照后细胞存活率仅为  $16.6\%$ . 以上结果说明所构建复合体系可以有效地杀灭癌细胞, 达到抗肿瘤的效果.

进一步评估了 NPs 对叶酸低表达的 A549 细胞和叶酸高表达的 HeLa 细胞的杀伤作用. 如图 6(C) 所示, 当不同浓度 ( $0\sim 500\text{ }\mu\text{g/mL}$ ) 的 NPs 作用于 A549 细胞及 HeLa 细胞 24 h 后, 随着 NPs 浓度的增加, 细胞存活率降低, 且对于 HeLa 细胞的杀伤作用明显高于 A549 细胞 (当 NPs 浓度为  $50\text{ }\mu\text{g/mL}$  时, A549 细胞存活率为  $74.16\%$ , HeLa 细胞存活率为  $56.45\%$ ; 当 NPs 浓度为  $500\text{ }\mu\text{g/mL}$  时, A549 细胞存活率为  $38.39\%$ , HeLa 细胞存活率仅为  $14.41\%$ ), 叶酸靶向作用明显. 以上结果说明复合体系具有良好的靶向杀伤癌细胞的能力.

进一步评估了纳米粒子的生物相容性. 如图 6(D) 所示, 当不同浓度 ( $0\sim 70\text{ }\mu\text{g/mL}$ ) COFs 和  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{@COFs@PNIPAM-FA}$  作用于 MCF-10A 细胞 24 h 后, 多数细胞可以存活, 即使浓度达到  $70\text{ }\mu\text{g/mL}$  时, 细胞存活率仍分别为  $89.56\%$  (COFs) 和  $71.34\%$  ( $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{@COFs@PNIPAM-FA}$ ), 说明所制备的纳米载体具有良好的生物相容性. 进一步探究了载药后纳米粒子的细胞毒性. 当不同浓度 ( $0\sim 70\text{ }\mu\text{g/mL}$ ) NPs 作用于 MCF-10A 细胞 24 h 后, 多数细胞仍可以存活, 随着 NPs 浓度的升高, 细胞存活率降低, 当 NPs 浓度达到  $70\text{ }\mu\text{g/mL}$  时, 细胞存活率为  $44.94\%$ , 说明载入 DOX 后会对细胞产生一定的杀伤效果, 这是由于载体表面吸附部分 DOX 所导致的.

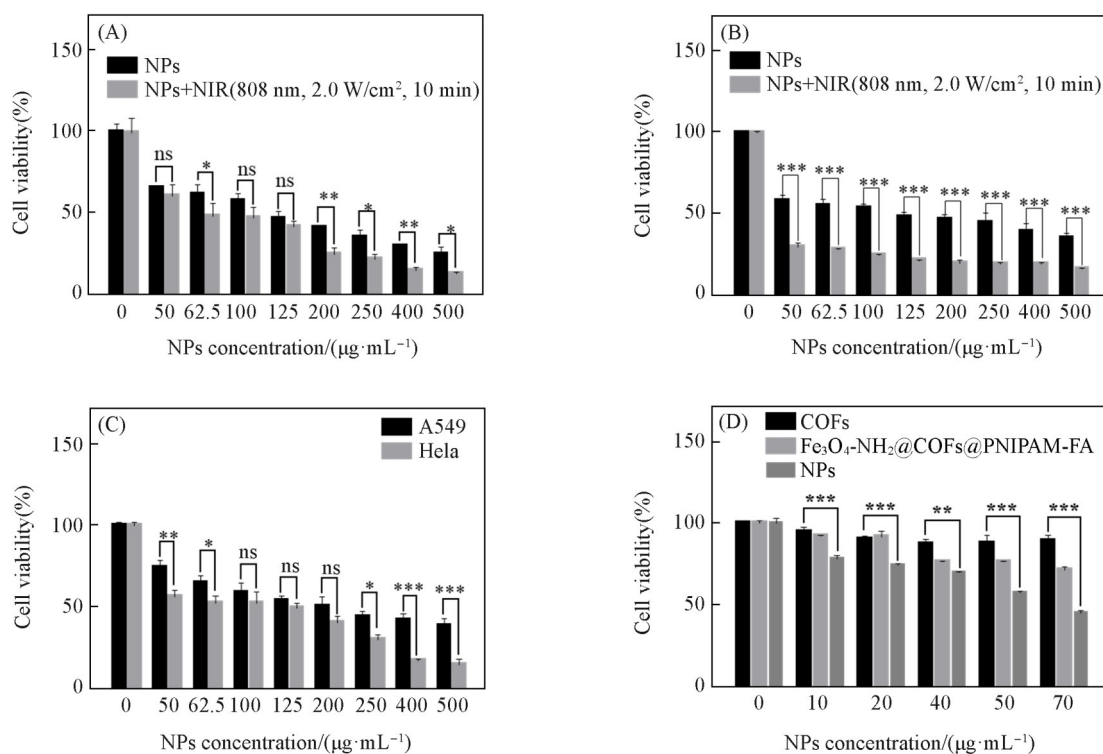


Fig. 6 Cell viability of NPs co-cultured with different cells

(A) MCF-7 cells; (B) 4T1 cells; (C) A549 and HeLa cells; (D) MCF-10A cells; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ; ns: no statistically significant difference.

为了研究细胞摄取过程, 将NPs与不同细胞进行共孵育, 用DAPI标记细胞核, 在荧光显微镜下监测. 如图7所示, 将NPs与MCF-7[图7(A)]、HeLa[图7(B)]和4T1[图7(C)]细胞共孵育时, NPs能快速进入细胞, 当共孵育2 h后细胞内出现明显的红色荧光, 且随着时间的延长, 荧光强度随之增强, 说明DOX的成功负载以及NPs的有效细胞摄取; 而对叶酸低表达的A549[图7(D)]细胞在短时间内几乎不能摄取NPs, 即使共孵育6 h后也只有少量材料进入细胞. 综上所述, NPs叶酸靶向作用明显且可显著抑制癌细胞生长.

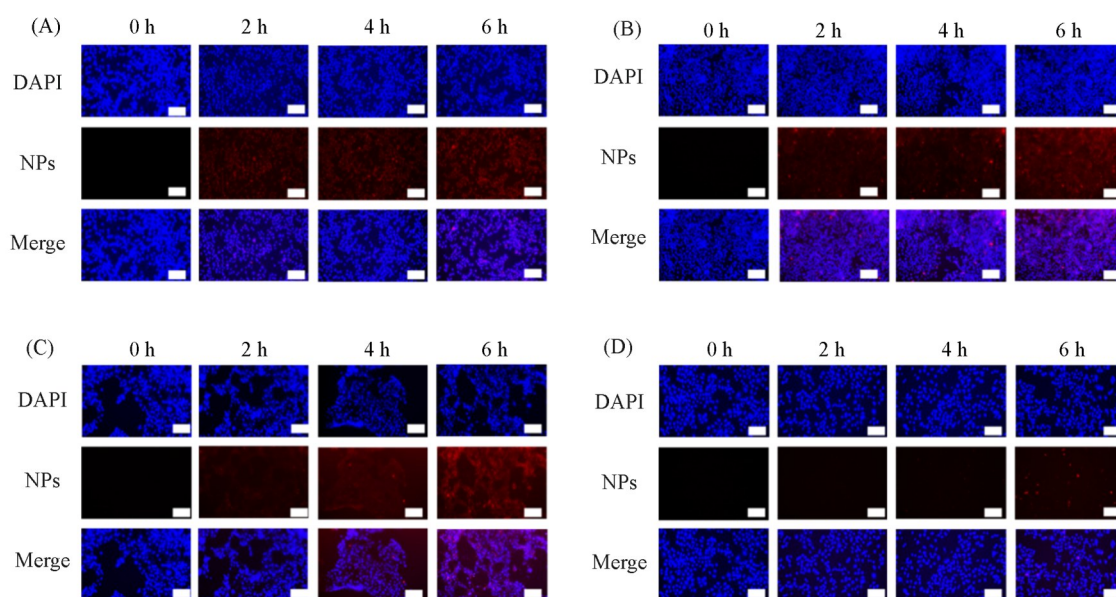
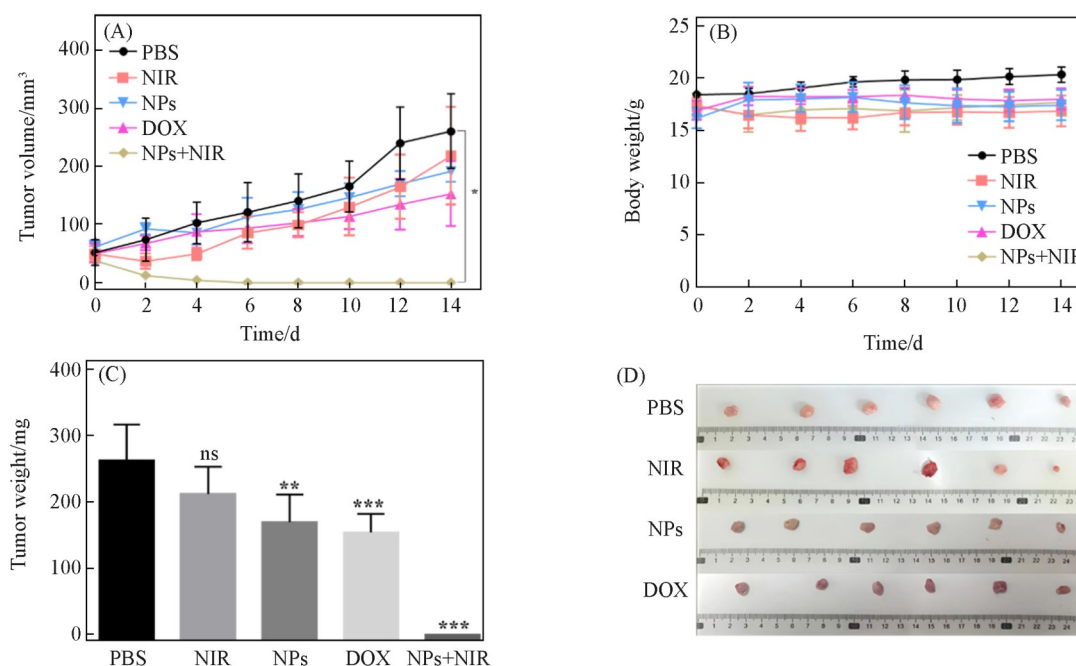


Fig. 7 Fluorescence images of cellular uptake of NPs

(A) MCF-7 cell; (B) HeLa cell; (C) 4T1 cell; (D) A549 cell; scale bar: 200  $\mu\text{m}$ .

## 2.5 体内抗肿瘤活性

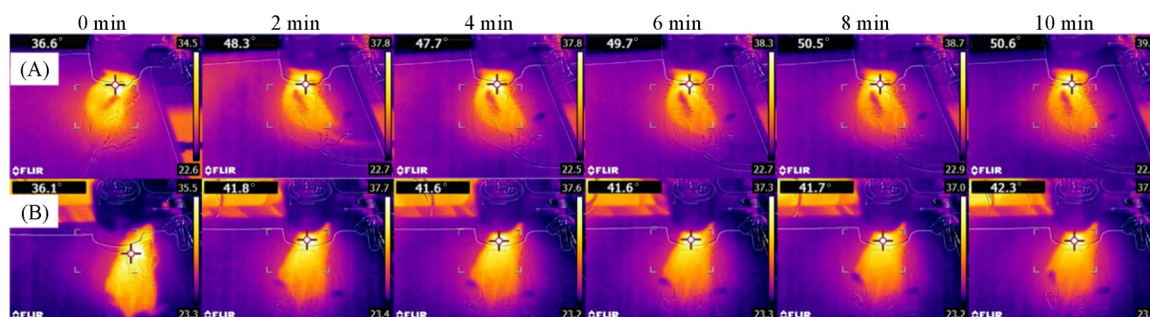
进一步在小鼠体内评估所制备 NPs 的抗肿瘤作用. 如图 8(A) 所示, 经过 14 d 治疗后, 各组肿瘤的体积分别为: PBS 组 ( $260.85 \pm 64.16$ )  $\text{mm}^3$ ; NIR 组 ( $218.68 \pm 84.05$ )  $\text{mm}^3$ ; NPs 组 ( $192.13 \pm 19.3$ )  $\text{mm}^3$ ; DOX 组 ( $152.62 \pm 55.72$ )  $\text{mm}^3$ ; NPs+NIR 组肿瘤消失. 与另外 4 组相比, NPs+NIR 组中明显观察到小鼠肿瘤被抑制生长直至消失, 且没有明显的复发. 所有实验组的小鼠平均体重基本不变, 表明 NPs+NIR 组在治疗过程中没有对小鼠产生明显的副作用, 进一步说明 NPs 的良好生物相容性[图 8(B)]. 在治疗 14 d 后分离的肿瘤重量[图 8(C)]与肿瘤体积[图 8(D)]变化趋势一致.



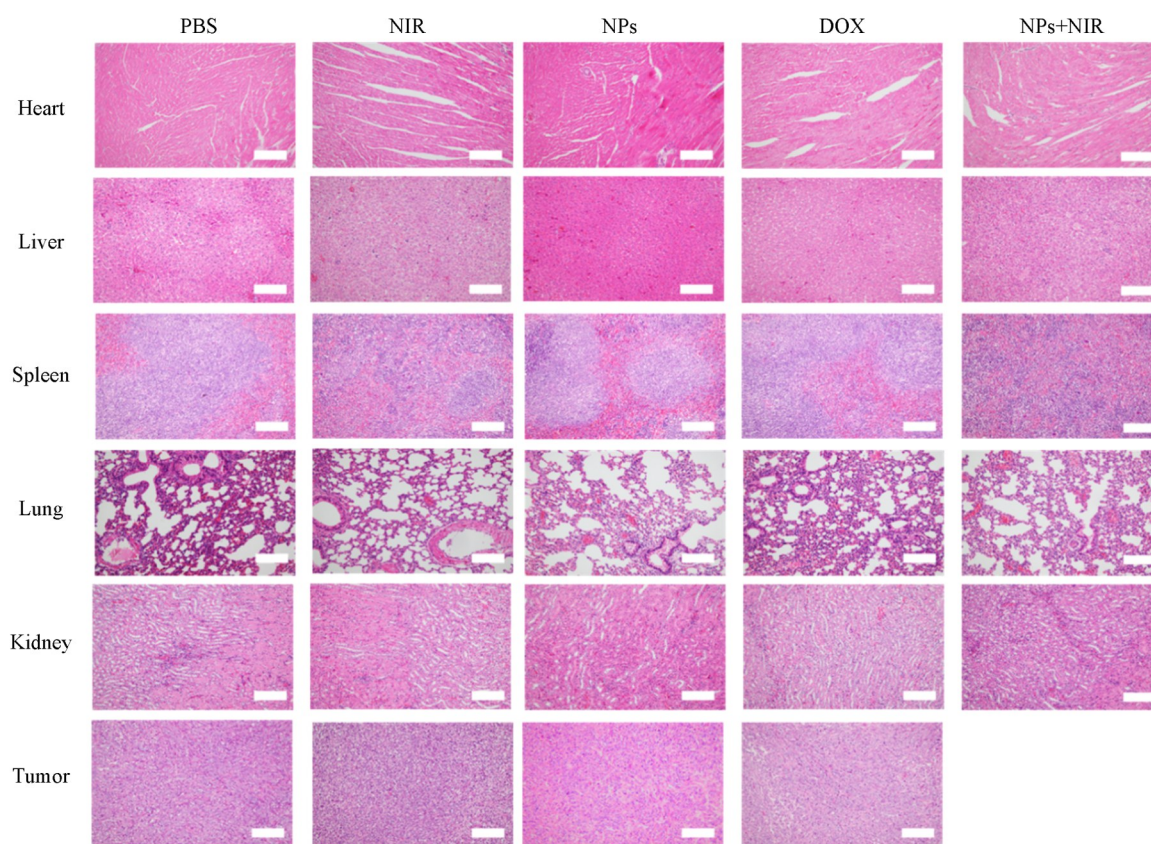
**Fig. 8** Growth curves of tumor volumes during 14 d with different treatments(A), body weights of mice with different treatments(B), tumor weights of mice after 14 d with different treatments(C) and tumor tissue imaging after 14 d with different treatments(D)

NIR: 808 nm, 2.0  $\text{W}/\text{cm}^2$ , 10 min; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ; ns: no statistically significant difference.

图 9(A) 和 (B) 分别示出了 NPs 和 PBS 组小鼠体内辐照后的局部温度变化情况. 可以观察到, 注射 NPs 且经 2.0  $\text{W}/\text{cm}^2$  NIR 辐照 10 min 后小鼠肿瘤部位温度可达 50.6  $^{\circ}\text{C}$ , 明显高于 PBS 组, 此温度超过了 PNIPAM 的最低临界温度, DOX 可以加速从体系中释放发挥化学治疗效果; 同时产生的局部高温可以杀死肿瘤细胞, 因此本研究将化疗和热疗联用能有效覆盖整个肿瘤部位, 起到协同治疗的效果, 抗肿瘤效果明显. 此外, 通过组织切片染色对小鼠主要器官及肿瘤进行了病理分析. 如图 10 所示, 经过治疗后, 小鼠的各器官均没有出现明显的损伤和变化, 表明 NPs 具有良好的生物相容性及优异的肿瘤杀伤作用.



**Fig. 9** Temperature change images of NPs(A) and PBS(B) under NIR infrared *in vivo*  
NIR: 808 nm, 2.0  $\text{W}/\text{cm}^2$ , 10 min.



**Fig. 10 Hematoxylin and eosin(H&E) staining sections of various organs and tumor tissues of mice in different treatment groups after 14 d**

Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ ; NIR: 808 nm, 2.0 W/cm<sup>2</sup>, 10 min.

### 3 结 论

构建了以光热剂  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  为核, 多孔性 COFs 为壳的复合材料. 进一步通过吸附作用将抗肿瘤药物 DOX 封装至 COFs 孔道内, 随后以温敏材料聚 *N*-异丙基丙烯酰胺进行封堵, 实现了药物的温度响应型控释. 通过嫁接具有主动靶向作用的叶酸碳点, 实现了叶酸介导的靶向温度响应控释机制. 体内外实验均证实该体系具有良好的生物相容性和肿瘤抑制效果, 与单纯 DOX 或 NIR 相比, 所构建体系显示出增强的抗肿瘤功效, 说明通过化学治疗联合光热治疗可有效提升抗肿瘤效果. 综上所述, 本研究拓展了基于 COFs 构建抗肿瘤系统的应用, 也为复合材料的组装提供了新的思路.

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Anonymous, *Saudi Med. J.*, **2024**, *45*(3), 326—327
- [ 2 ] Li B. Q., Shao H. L., Gao L., Li H., Sheng H. G., Zhu L. Q., *Drug Deliv.*, **2022**, *29*(1), 2130—2161
- [ 3 ] Zinn S., Vazquez-Lombardi R., Zimmermann C., Sapra P., Jermutus L., Christ D., *Nat. Cancer*, **2023**, *4*(2), 165—180
- [ 4 ] Farran B., Montenegro R. C., Kasa P., Pavitra E., Huh Y. S., Han Y. K., Kamal M. A., Nagaraju G. P., Raju G. S. R., *Mat. Sci. Eng. C: Mater.*, **2020**, *107*, 110341
- [ 5 ] Xia Q., Zhang Y., Zhang H., Zhang X., Wu X. D., Wang Z. Q., Yan R., Jin Y. X., *J. Phys. Chem. B*, **2022**, *10*(39), 8046—8057
- [ 6 ] Li S. Q., Zhang H., Bao Y. J., Zhang H. L., Wang J. C., Liu M. Y., Yan R., Wang Z. Q., Wu X. D., Jin Y. X., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2024**, *16*(13), 16653—16668
- [ 7 ] Yan X. J., Meng L. Z., Zhang X. Z., Deng Z. C., Gao B. W., Zhang Y. J., Yang M., Ma Y. A., Zhang Y. Y., Tu K. S., Zhang M. Z., Xu Q. R., *Mol. Ther.*, **2023**, *31*(5), 1383—1401
- [ 8 ] Zhao Y. H., Li Y., Zhu R., Feng R. Y., Cui H. Y., Yu X., Huang F. R., Zhang R. X., Chen X. K., Li L., Chen Y. H., Liu Y. H., Wang J. H., Du G. H., Liu Z. H., *Signal Transduct Tar.*, **2023**, *8*(1), 224
- [ 9 ] Wang L. D., Sun J. Y., Wang L., Li Y., Hu Z. Y., SU B. L., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2025**, *41*(2), 351—357

- [10] Rai P., Mallidi S., Zheng X., Rahmanzadeh R., Mir Y., Elrington S., Khurshid A., Hasan T., *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **2010**, 62(11), 1094—1124
- [11] Wang T., Hu X., Yang Y. J., Wu Q., He C. D., He X., Wang Z. Y., Mao X., *Int. J. Mol. Sci.*, **2022**, 23(18), 10743
- [12] Li Y., Chen J., Xia Q., Shang J., He Y. J., Li Z., Chen Y. Y., Gao F., Yu X., Yuan Z. T., Yin P. H., *J. Nanobiotechnol.*, **2024**, 22(1), 630
- [13] Pei H. W., Zhang J., Sun Z. Y., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2025**, 41(1), 21—32
- [14] Deng X. T., Zhao R. L., Tang Y. F., Yi M., Wang D., Lin W., Wang G. L., *J. Nanobiotechnol.*, **2024**, 22(1), 711
- [15] Lin D., Lv W. X., Qian M., Jiang G. W., Lin X. J., Gantulga D., Wang Y., *Biomaterials*, **2025**, 314, 122869
- [16] Khalili N. R., Badiei A., Pirkani Z., Ziarani G. M., Vojoudi H., Golmohamadi A., Varma R. S., *J. Mater. Chem. B*, **2024**, 12(32), 7915—7933
- [17] Khalili N. R., Dehkordi A. B., Amiri A., Ziarani G. M., Badiei A., Cool P., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2024**, 16(22), 28245—28262
- [18] Huang G. Q., Zhang L. Y., Feng J. H., Wu D., Wu L. B., Pan W. L., Jiang Y., Chen M., Chen J. X., Shui P. X., *Small*, **2025**, 21(7), 2407553
- [19] Mahmoudian M. H., Azari A., Jahantigh A., Sarkhosh M., Yousefi M., Razavinasab S. A., Afsharizadeh M., Shahraji F. M., Pasandi A. P., Zeidabadi A., Bardsiri T. I., Ghasemian M., *Environ. Res.*, **2023**, 236, 116773
- [20] Liu J., Chen B., Zhang J. J., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2020**, 36(5), 927—933
- [21] Liu B. T., Pan X. H., Zhang D. Y., Wang R., Chen J. Y., Fang H. R., Liu T. F., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, 60(49), 25701—25707
- [22] Wick M. R., *Semin. Diagn. Pathol.*, **2019**, 36(5), 303—311
- [23] Dada S. N., Babanyinah G. K., Tetteh M. T., Palau V. E., Walls Z. F., Krishnan K., Croft Z., Khan A. U., Liu G. L., Wiese T. E., Glotser E., Mei H., *ACS Omega*, **2022**, 7(27), 23322—23331
- [24] Mu X. P., Zhang F. Q., Kong C. F., Zhang H. M., Zhang W. J., Ge R., Liu Y., Jiang J. L., *Int. J. Nanomed.*, **2017**, 12, 2899—2911
- [25] Li Y., Xie Q. Y., Hu Q., Li C. P., Huang Z. J., Yang X. J., Guo H., *Sci. Rep.*, **2016**, 6, 30651
- [26] Xu H., Gao J., Jiang D. L., *Nat. Chem.*, **2015**, 7(11), 905—912
- [27] Raghuvanshi V. S., Mendoza D. J., Browne C., Ayurini M., Gervinskis G., Hooper J. F., Mata J., Wu C. M., Simon G. P., Garnier G., *J. Colloid Interface Sci.*, **2023**, 652, 1609—1619

(Ed.: L, V, K, M)