

近红外二区光学诊疗探针的制备及性能测试 ——高分子化学综合实验的新设计与教学实践

王其*, 高逸聪, 陆峰, 范曲立

南京邮电大学材料科学与工程学院, 南京 210023

摘要: 癌症已经成为当今威胁人类健康的重大疾病之一, 发展新型光学诊疗体系用于癌症精准诊断与高效治疗至关重要。本文介绍了一个高分子化学综合实验的新设计与教学实践, 即一种新型共轭高分子基近红外二区光学诊疗探针的制备过程及其相关性能测试。该实验包括共轭高分子合成、水溶性纳米粒子制备、吸收发射光谱测定、光热光动力性能分析、近红外二区荧光成像及对癌细胞光毒性研究。该实验内容科学性及前沿性强, 能够提高学生的实验操作技能, 引导学生运用所学知识进行独立思考, 启发学生的创新及科研思维。

关键词: 癌症; 共轭高分子; 光学诊疗探针; 性能测试; 综合实验

中图分类号: G64; O6

Preparation and Performance Characterization of the Second Near-Infrared Phototheranostic Probe: A New Design and Teaching Practice of Polymer Chemistry Comprehensive Experiment

Qi Wang*, Yicong Gao, Feng Lu, Quli Fan

School of Materials Science and Engineering, Nanjing University of Posts and Telecommunications, Nanjing 210023, China.

Abstract: Cancer has become one of the most significant threats to humans, and the development of novel phototherapeutic agents for precise diagnosis and efficient treatment of cancer is crucial. This article introduces a new design and teaching practice of a polymer chemistry comprehensive experiment, which involves the preparation process and related performance testing of a novel conjugated polymer based second near-infrared phototheranostic probe. This experiment includes the synthesis of conjugated polymers, preparation of water-soluble nanoparticles, determination of absorption and emission spectra, analysis of photothermal and photodynamic properties as well as second near-infrared fluorescence imaging, and study of the phototoxicity to cancer cells. This experiment has strong scientific and cutting-edge content, which can improve students' experimental operation skills, guide them to apply their learned knowledge for independent thinking, and inspire students' innovation and scientific research thinking.

Key Words: Cancer; Conjugated polymers; Phototheranostic probe; Performance testing; Comprehensive experiment

高分子化学实验是化学和材料学科一门重要的专业基础必修课, 该课程是进行高分子化学实验和制备高分子材料的基本训练的一门课程。通过实验课程训练、巩固并加深对高分子化学基本原理和概念的理解, 掌握高分子化学实验的基本方法。然而目前开设的高分子化学实验对前沿科研成果

收稿: 2024-04-23; 录用: 2024-07-04; 网络发表: 2024-10-09

*通讯作者, Email: iamqwang@njupt.edu.cn

基金资助: 南京邮电大学教学改革研究项目(JG03023JX103); 国家自然科学基金面上项目(22175098)

的引入及讲解较少,不利于学生后续科研工作。此外实验内容大多为验证性基础实验,使得学生对高分子结构与性能之间的关系了解不够深入。相比之下,综合实验具有较好的设计性,能够融合多学科最新研究成果以保证实验内容的前沿性,同时综合实验也具有较好的探索性,能够激发学生发现并寻找实验现象背后的科学原理,从而提高学生科研视野、创新思维及专业知识运用能力,是培养新工科创新性人才必不可少的实践环节^[1-3]。

长期以来,癌症严重威胁着人们的生命健康,且发病人数和死亡人数呈明显上升趋势,构建新型有效的方法、技术用于癌症高效、精准诊断与治疗,对提高癌症患者生存率至关重要^[4-6]。光学诊疗体系是将光学成像与光学治疗手段相结合,具有非侵入及高灵敏等优点,可以实现癌症精准高效诊疗。目前,科学家们设计构筑了一系列高性能光学诊疗探针,其中近红外二区光学诊疗探针领域已经成为研究的热点及前沿内容^[7-9]。本实验以近红外二区光学诊疗探针的制备及应用为主线,首先利用偶联反应制备新型共轭高分子,其次采用纳米沉淀法制备该高分子基水溶性纳米粒子(NPs),随后对纳米粒子光物理化学性质及对癌细胞光毒性等进行研究以开展该综合实验。本综合实验涉及有机合成、纳米粒子制备、光物理化学性质测试等多个环节,能够帮助学生提高实验操作、大型仪器使用及数据总结分析等综合科研能力,激发学生对近红外二区光学诊疗探针领域的兴趣,对学生后续科研工作具有较好的启蒙作用,从而为国家培养新工科创新性人才。

1 实验教学目的

- (1) 了解癌症近红外二区荧光成像及光疗技术。
- (2) 学习共轭高分子合成方法、纳米粒子的制备及材料的性能表征。
- (3) 掌握紫外-可见-近红外分光光度计、紫外-可见-近红外荧光光谱仪、红外热成像仪等仪器使用方法及相关原理。
- (4) 培养学生独立思考、实验操作及数据处理等能力。

2 实验原理

在各种光学成像技术中,荧光成像在实现细胞层面的可视化、疾病机理及生物功能探索等基础研究和临床应用方面发挥着重要的作用。然而,传统的荧光成像主要为近红外一区(NIR-I, 700–900 nm)荧光成像,其穿透深度低,因此对深层次癌症诊断效果有限。相比之下,近红外二区(NIR-II, 1000–1700 nm)荧光可有效减少在生物组织中的光吸收、光散射及生物自荧光效应,具有更好的组织穿透深度和更高的成像信噪比,因此在深层次癌症高分辨成像诊断方面具有更好的应用前景^[10]。

近红外光诱导的光热治疗及光动力治疗作为新型治疗手段而受到人们广泛关注。光热治疗主要是利用光热试剂将光能转化为热能从而杀死癌细胞^[11,12],但是残留的癌细胞容易获得耐热性,导致癌症复发及转移。对于光动力治疗,癌细胞主要是被光敏剂产生的单线态氧或其他活性氧杀死^[13],然而光动力治疗效果往往受癌症区域的乏氧环境限制,因此单一的光热或光动力治疗很难达到理想的治疗效果。光热及光动力联合治疗技术可以有效地减少上述限制,并提高治疗效果。因此,设计开发新型光学诊疗体系用于癌症近红外二区荧光成像指导下的光热/光动力联合治疗是十分必要的。

本实验通过一步Stille偶联反应合成得到新型共轭高分子,通过简单的纳米沉淀法制备出相应的水溶性纳米粒子,测定纳米粒子在激光照射下的近红外二区荧光成像信号、光热及光动力性能,并进一步研究纳米粒子对癌细胞的杀伤效果(图1)。实验开展前,通过文献调研、小组讨论等形式使学生掌握近红外二区光学诊疗探针领域前沿成果及光热/光动力等产生基本原理,激发学生探索创新精神。实验过程中引入相关虚拟仿真实验,通过线上与线下的结合使学生能够更加透彻的理解相关实验内容。

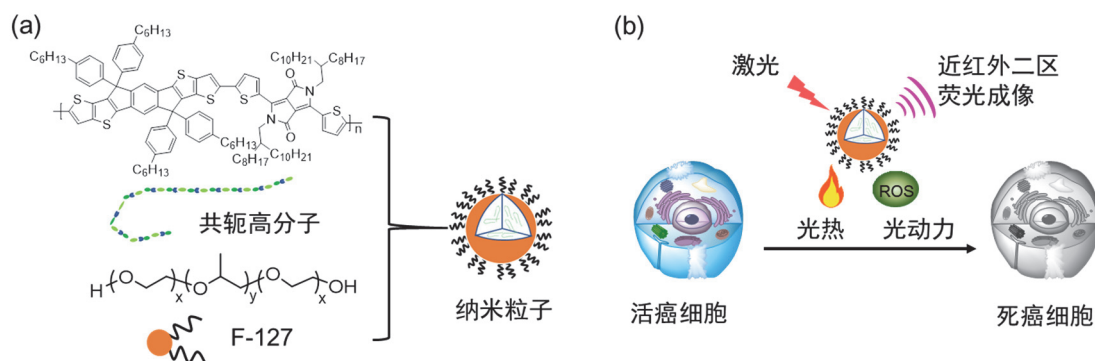


图1 共轭高分子基纳米粒子制备(a)及应用(b)示意图

3 试剂与仪器

试剂：6,6,12,12-四(4-己基苯基)-6,12-二氢二噻吩[2,3-d:2',3'-d']-s-茛并[1,2-b:5,6-b']二噻吩-2,8-二(三甲基锡)，3,6-双(5-溴噻吩-2-基)-2,5-双(2-辛基十二烷基)吡咯并[3,4-c]吡咯-1,4(2H,5H)-二酮，四三苯基膦钯，均购置于南京知研科技有限公司；甲苯，甲醇，四氢呋喃(THF)，均购置于国药集团化学试剂有限公司；Pluronic F-127，购置于德国Sigma-Aldrich公司；1,3-二苯基异苯并呋喃(DPBF)，吲哚菁绿(ICG)，均购置于碧云天生物技术有限公司。

仪器：超声波细胞粉碎仪(VCX130，美国SONICS公司)，紫外-可见-近红外分光光度计(UV-3600，日本Shimadzu公司)，紫外-可见-近红外荧光光谱仪(FLSP920，英国Edinburgh公司)，激光粒度仪(ZetaPALS，美国Brookhaven公司)，近红外二窗荧光成像系统(In-Vivo Master，武汉光映美科技有限公司)，红外热成像仪(TESTO869，德国TESTO公司)，730 nm激光器(LR-MFJ-730，长春镭锐光电科技有限公司)。

4 实验步骤

共轭高分子合成路线如图2所示，具体步骤为：称取6,6,12,12-四(4-己基苯基)-6,12-二氢二噻吩[2,3-d:2',3'-d']-s-茛并[1,2-b:5,6-b']二噻吩-2,8-二(三甲基锡)(67.3 mg, 0.05 mmol)、3,6-双(5-溴噻吩-2-基)-2,5-双(2-辛基十二烷基)吡咯并[3,4-c]吡咯-1,4(2H,5H)-二酮(51 mg, 0.05 mmol)及四三苯基膦钯(2.5 mg)加入到双口烧瓶中，然后加入甲苯(10 mL)，氮气环境下回流过夜。反应结束后使用甲醇沉降，抽滤后得共轭高分子(81 mg)。

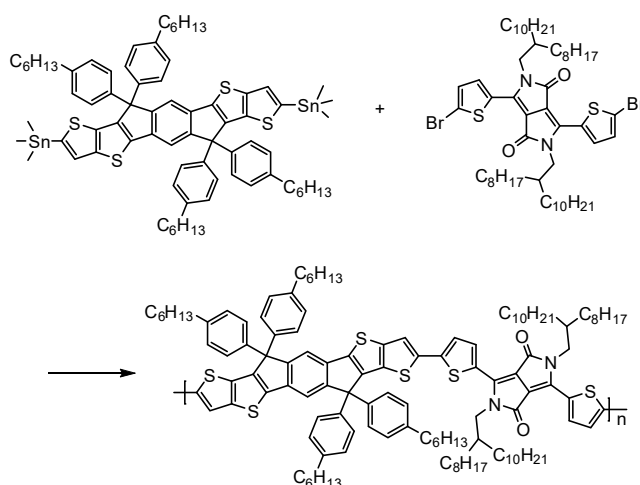


图2 共轭高分子合成路线图

纳米粒子制备：分别称取1 mg共轭高分子溶于1 mL THF，20 mg F-127溶于10 mL去离子水中，超声使其充分溶解。设置超声波细胞粉碎隔音机工作时间为2 min，在其工作时用一次性注射器将含有共轭高分子的THF溶液快速注射到含F-127的去离子水中。待超声结束后，加入搅拌子进行搅拌并在上方通入氮气以除去溶液中的THF。THF除去后，将所得溶液通过0.22 μm 的水系滤膜，然后超滤定容即得到澄清透明的纳米粒子水溶液。

5 结果与讨论

5.1 粒径及稳定性分析

用激光粒度仪对所制得的纳米粒子粒径大小进行测试。根据所得数据分析可知该纳米粒子流体动力学直径为100 nm左右(图3a)。此外，通过测试发现纳米粒子在五周内其粒径大小无明显变化(图3b)，表明此纳米粒子具有良好的长期稳定性。

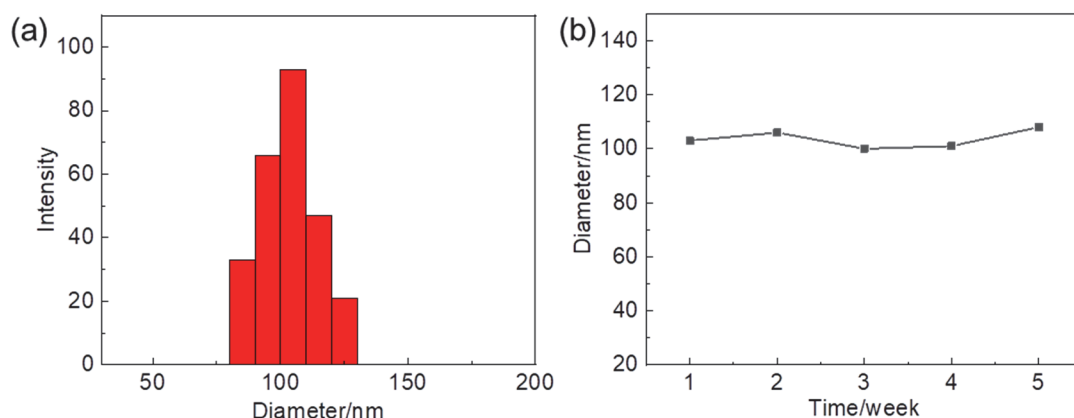


图3 纳米粒子尺寸(a)及长期稳定性测定(b)

5.2 吸收发射及光稳定性测试

通过紫外-可见-近红外分光光度计/荧光光谱仪测试纳米粒子溶液光学吸收及荧光发射性质。由图4a所示，纳米粒子在500–800 nm范围内具有较好的吸收能力，其最大吸收峰值在653 nm处。同时纳米粒子具有良好的近红外二区荧光发射性能，表明纳米粒子具有近红外二区荧光成像的潜力。此外，用730 nm激光器($1 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$)连续照射该纳米粒子后，纳米粒子的吸光度值几乎不变(图4b)，而作为对照组的ICG，其吸光度值有明显的下降，表明该共轭高分子纳米粒子具有优异的光稳定性。

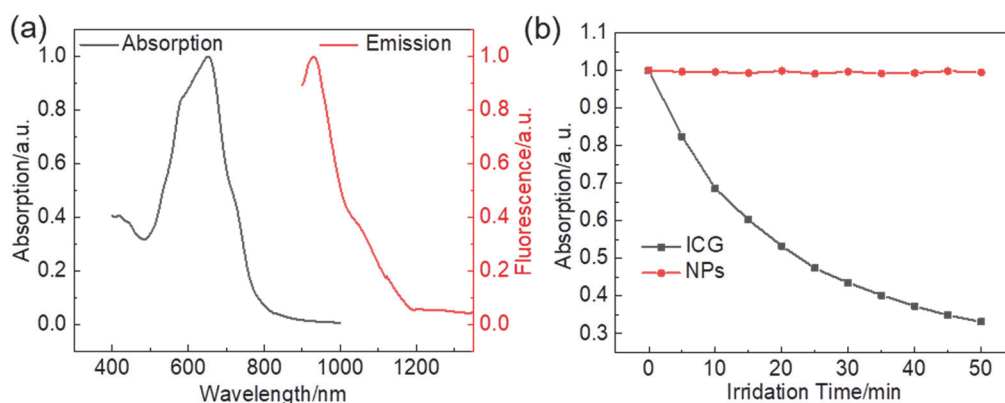


图4 纳米粒子吸收、发射谱图(a)及光稳定性测定(b)

5.3 纳米粒子光热性能测试

吸收光谱表明该纳米粒子在730 nm处有良好的光吸收能力，所以光热实验选用730 nm激光作为激光光源。为了研究在不同功率的激光照射下该纳米粒子水溶液的光热转换性能，配制浓度为 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的纳米粒子溶液于 $250 \mu\text{L}$ 的离心管中，然后分别用不同功率(0.25 、 0.5 、 0.75 、 $1 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$) 730 nm激光照射5 min，用红外热成像仪拍照并记录整个过程纳米粒子水溶液的温度变化。测试结果表明，随着激光功率密度的增加，该纳米粒子水溶液达到的最高温度也越来越高(图5a)。其温度变化对应的红外热成像图如图5b所示。进一步测试了不同浓度(0 、 12.5 、 25 、 50 、 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)纳米粒子在同一激光功率密度($1 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$)照射下的光热转换情况(图5c)，测试结果表明纳米粒子光热效果具有浓度依赖性。此外，通过对纳米粒子水溶液($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)进行连续四次升温降温循环照射(图5d)，发现每次循环该纳米粒子所达到的最高温度基本一致，这表明该纳米粒子水溶液具有良好的光热稳定性。

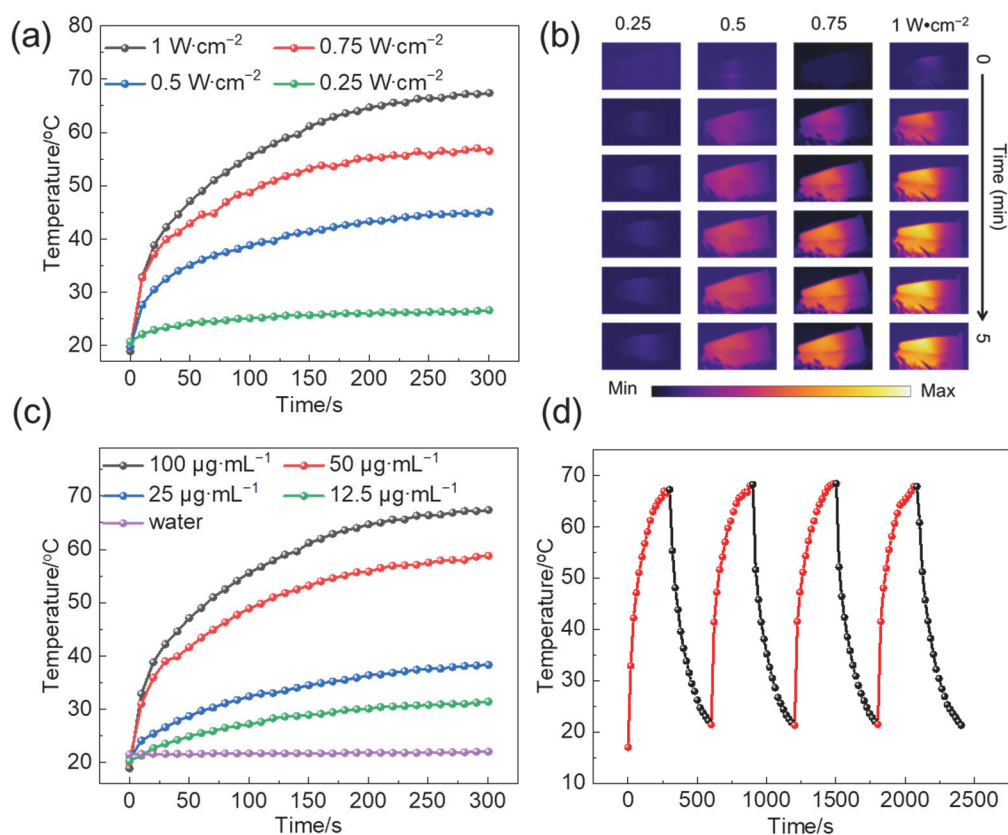


图5 (a) 同一浓度纳米粒子在不同功率激光照射下光热曲线；(b) 同一浓度纳米粒子在不同功率激光照射下的红外热成像图；(c) 不同浓度纳米粒子在同一功率激光照射下光热曲线；(d) 纳米粒子光热稳定性测试

5.4 纳米粒子光动力性能测试

DPBF在414 nm处有很强的吸收峰，活性氧会不可逆氧化DPBF，从而使其414 nm处吸收强度降低，因此选用DPBF来测定纳米粒子水溶液的光动力性能。首先取一定量的DPBF溶于DMSO，向比色皿中加入纳米粒子水溶液，再加入适量的DPBF的DMSO溶液，调整浓度使混合溶液在414 nm处吸光度值为1.5左右。在避光条件下，使用不同功率密度(0 、 0.25 、 0.5 、 $1 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$)的730 nm激光照射比色皿，时间为5 s。用紫外-可见-近红外分光光度计测定照射激光后溶液的吸收曲线，观察414 nm处吸收峰强度变化。由图6可知，随着激光照射时间及激光功率密度的增加，混合溶液中414 nm处的吸收峰明显下降，表明纳米粒子具有良好的光动力性能。

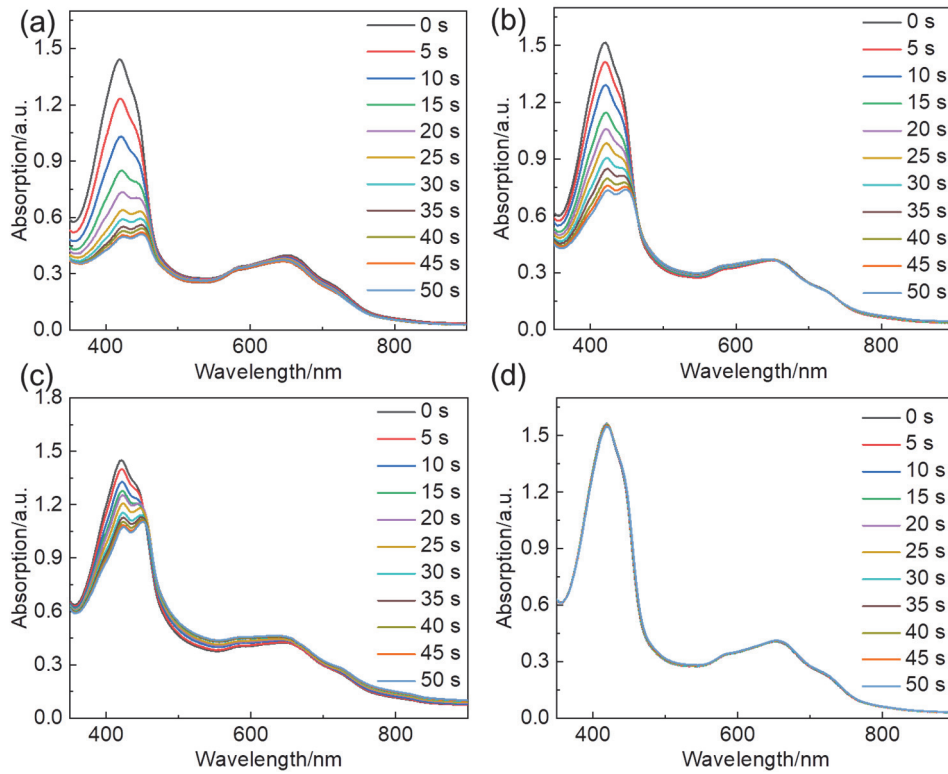


图6 不同功率密度730 nm激光照射下DPBF和纳米粒子混合溶液吸收光谱
(a) 1, (b) 0.5, (c) 0.25, (d) 0 W·cm⁻²

5.5 溶液中近红外二区荧光成像测试

荧光光谱表明该纳米粒子具有良好的近红外二区荧光发射性质，因此进一步探究该纳米粒子的近红外二区荧光成像效果。配制五个浓度梯度的共轭高分子纳米粒子水溶液，置于小离心管中，通过近红外二区荧光成像仪观察其荧光情况。由图7可知，该纳米粒子在近红外二区荧光成像仪中可以观察到明显的荧光信号，且随浓度的增大荧光信号强度显著增强(R^2 为0.99)，表明纳米粒子具有优异的近红外二区荧光成像能力。

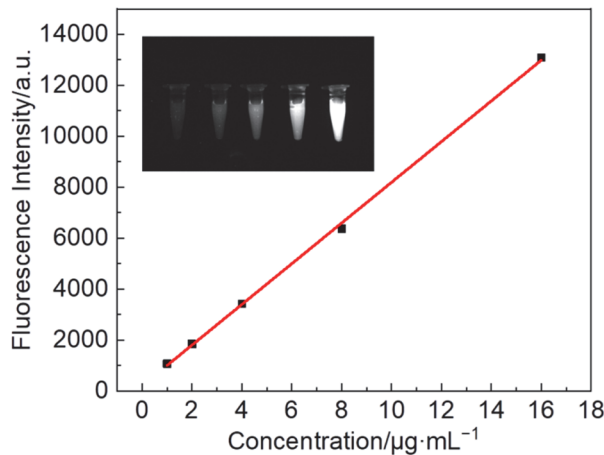


图7 不同浓度纳米粒子近红外二区荧光信号强度及近红外二区荧光成像图片

5.6 细胞毒性实验

使用噻唑蓝(MTT)法测试共轭高分子纳米粒子溶液的细胞光/暗毒性实验。将4T1小鼠乳腺癌细胞孵育在96孔板中,长到合适密度时加入不同浓度梯度(0、20、40、60、80、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的纳米粒子溶液,继续孵育24 h左右,然后对细胞进行光照(激光波长为730 nm、功率密度为1 $\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ 、照射时间为5 min)或不光照处理并进一步孵育,随后加入配制好的MTT试剂,再孵育4 h左右。结束后加入DMSO,震荡使96孔板内的结晶紫充分溶解,随后用多功能酶标仪进行吸光度的检测。由图8可以看出,未光照组最高浓度处的细胞存活率仍高达90%以上,说明该纳米粒子暗毒性低,光照组最高浓度处的细胞存活率仅为37%左右,说明该纳米粒子具有优异的光毒性。

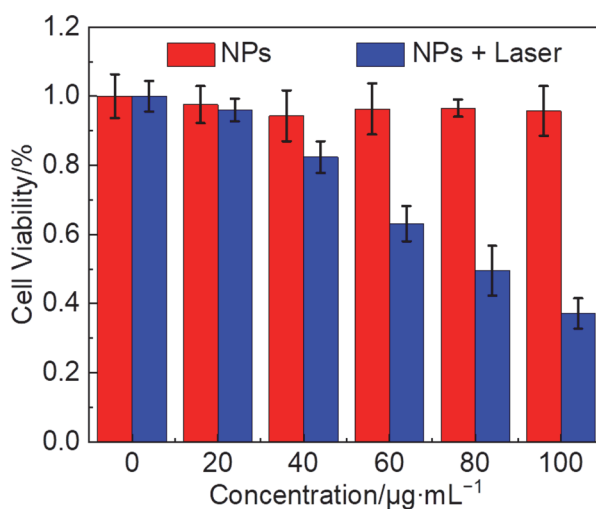


图8 纳米粒子光毒性测试

6 教学组织形式和实施成效

本实验可分为三个阶段,第一阶段为共轭高分子的合成;第二阶段为共轭高分子基纳米粒子的制备及光物理化学性质测试;第三阶段为纳米粒子的光毒性研究,本实验是将纳米试剂、近红外二区荧光成像、光学治疗等前沿领域紧密结合的交叉类综合实验,具有表征难度适中、操作简单等优点。实验课前,通过虚拟仿真、文献调研及教师讲解等线上线下教学形式使学生了解并掌握本实验中相关背景、原理、操作步骤及注意事项等知识点。为培养学生综合能力,本实验建议采用小组教学模式,每组3-4人,建议高分子合成及纳米粒子制备10课时,光谱测试3课时,光热性能测试5课时,光动力性能测试8课时,荧光成像性能测试4课时,细胞毒性测试10课时。各兄弟院校根据课时和实验条件,可选做近红外二区荧光成像和细胞毒性测试部分。

本实验作为材料科学与工程学院开设的开放实验之一,广受学生欢迎。通过Stille偶联反应合成共轭高分子、采用纳米沉淀法制备共轭高分子基纳米粒子,并深入探索其光物理化学、近红外二区荧光成像及光疗性质,使学生在实践中熟练掌握了共轭高分子合成、纳米材料制备及相关性能测试技巧,同时熟悉了激光粒度仪、紫外-可见-近红外荧光光谱仪、近红外二窗荧光成像系统和红外热成像仪的操作流程与数据分析方法。鉴于紫外-可见-近红外荧光光谱仪及近红外二窗荧光成像系统设备成本昂贵,为了兼顾科研与教学资源的有限性,在实验教师的示范引导下,学生代表规范地操作仪器并进行测试,以确保设备的有效利用。尽管少数学生在高分子合成、纳米粒子制备环节遭遇困难,但在教师的具体指导下,他们不断尝试,最终成功合成了共轭高分子基纳米粒子。根据学生反馈,本综合实验激发了学生学习热情,增强了学生的创新思维及科研能力。

7 结语

本文介绍了一个高分子化学综合实验的新设计与教学实践。本实验通过偶联反应合成共轭高分子，并采用纳米沉淀法制备共轭高分子基纳米粒子，进一步使用紫外-可见-近红外分光光度计/荧光光谱仪、近红外二窗荧光成像系统和红外热成像仪等对纳米粒子性质进行表征，将高分子化学、仪器分析与光学诊疗前沿科学等相互交叉融合，具有设计性强、普适性好、操作简单及难度适中等优点，适合作为高分子化学及材料化学等专业本科生实验课程开设。通过本综合实验环节，强化学生对相关方面基本原理的理解，激发学生探索创新精神，提升学生实验操作技能、数据分析与处理能力、科研视野及专业知识运用能力，有利于学生完成后续的科研工作，对新工科创新性人才的培养具有重要作用。

参 考 文 献

- [1] 鲁轶楠, 罗逸尘, 李艳, 孙鸿程, 刘俊秋. *大学化学*, **2023**, 38 (8), 95.
- [2] 张来英, 苟洪瑀, 庄海妮, 秦宇航, 邱惠娟, 吴伟泰. *大学化学*, **2023**, 38 (12), 212.
- [3] 李厚金, 陈六平, 张树永. *大学化学*, **2022**, 37 (2), 2108010.
- [4] Cai, Y.; Chen, X.; Si, J.; Mou, X.; Dong, X. *Small* **2021**, 17 (52), 2103072.
- [5] Li, J.; Pu, K. *Acc. Chem. Res.* **2020**, 53 (4), 752.
- [6] 闫英红, 梁平兆, 邹杨, 袁林, 彭孝军, 樊江莉, 张晓兵. *化学学报*, **2023**, 81 (11), 1642.
- [7] 王其, 夏辉, 熊炎威, 张新敏, 蔡杰, 陈冲, 高逸聪, 陆峰, 范曲立. *化学学报*, **2022**, 80 (11), 1485.
- [8] Zhuang, J.; Wang, B.; Chen, H.; Zhang, K.; Li, N.; Zhao, N.; Tang, B.-Z. *ACS Nano* **2023**, 17 (10), 9110.
- [9] Zheng, Z.; Duan, A.; Dai, R.; Li, Y.; Chen, X.; Qin, Y.; Ren, S.; Li, R.; Cheng, Z.; Zhang, R. *Small* **2022**, 18 (27), 2201179.
- [10] 罗兴蕊, 陈敏文, 杨晴来. *化学学报*, **2020**, 78 (5), 373.
- [11] 何田, 叶经涛, 李洋, 尹守春. *大学化学*, **2023**, 38 (5), 143.
- [12] 洪周怡, 章金金, 李瑶君, 何田, 尹守春. *大学化学*, **2021**, 36 (12), 2101010.
- [13] 项雯晖, 张磊, 支旭, 钱鹰. *有机化学*, **2021**, 41 (9), 3578.