

Aptamer guided liposomes loaded upconversion nanoparticles for targeted imaging

肖射华, 梁玲², 李丹², 苏元野² and 袁荃²

Citation: [科学通报](#) **64**, 1067 (2019); doi: 10.1360/N972018-00775

View online: <https://engine.scichina.com/doi/10.1360/N972018-00775>

View Table of Contents: <https://engine.scichina.com/publisher/scp/journal/CSB/64/10>

Published by the [《中国科学》杂志社](#)

Articles you may be interested in

[Cytotoxicity of liver targeted drug-loaded alginate nanoparticles](#)

Science in China Series B-Chemistry **52**, 1382 (2009);

[A novel upconversion nanotheranostic agent for multi-modality imaging-guided chemotherapy with on-demand drug release](#)

SCIENCE CHINA Chemistry **58**, 970 (2015);

[A pH-responsive activatable aptamer probe for targeted cancer imaging based on i-motif-driven conformation alteration](#)

SCIENCE CHINA Chemistry **59**, 802 (2016);

[Stable silver nanoparticles-aptamer bioconjugates for cellular prion protein imaging](#)

Chinese Science Bulletin **59**, 964 (2014);

[Electrogenerated chemiluminescence aptasensor for thrombin incorporating poly\(pyrrole-co-pyrrole propylic acid\) nanoparticles loaded with aptamer and ruthenium complex](#)

SCIENCE CHINA Chemistry **54**, 1357 (2011);

核酸适配体功能化的脂质体负载上转换颗粒用于肿瘤靶向成像

肖射华^{1,2}, 梁玲², 李丹², 苏元野^{1,2}, 袁荃^{2*}

1. 湖南大学生物学院, 长沙 410082;

2. 湖南大学化学化工学院, 化学生物学与纳米医学研究所, 化学分子科学与分子医学实验室, 长沙 410082

* 联系人, E-mail: yuanquan@whu.edu.cn

2018-07-31 收稿, 2018-10-19 修回, 2018-10-26 接受, 2018-12-25 网络版发表

国家自然科学基金(21675120)资助

摘要 核酸适配体是一类能够与靶标物高特异性地结合的寡核苷酸序列, 可作用于金属离子、小分子化合物、蛋白质及细胞等。由于对靶标物具有高选择性, 核酸适配体可赋予递送体系靶向特异性, 同时增加递送药物及成像试剂在肿瘤组织内的富集, 在分子诊断和体内靶向治疗等生物医学领域具有很大的应用潜能。本文基于聚丙烯酸(PAA)修饰的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb/Er/Nd}@\text{NaYF}_4:\text{Nd}$ 上转换纳米颗粒(UCNPs-PAA), 将其封装于AS1411核酸适配体修饰的脂质体(Apt-Lip)中, 构建了一种近红外(NIR)光激发的光学成像及靶向识别的UCNPs@Apt-Lip多功能纳米平台。透射电子显微镜、水合粒径、Zeta电势及共聚焦实验图表明成功制备了具有独特的核@空腔@壳构造的纳米体系。流式细胞仪和靶向细胞荧光共聚焦成像实验结果表明UCNPs@Apt-Lip材料对人乳腺癌细胞具有很强的靶向识别及荧光成像的能力。该多功能纳米平台具有上转换发光成像的可动核心, 中空内腔和靶向壳层等独特性能, 有望推动其在光催化纳米反应器、药物输送、肿瘤治疗等领域的发展。

关键词 上转换纳米颗粒, 核酸适配体, 脂质体, 肿瘤靶向, 荧光成像

光学成像技术在生理环境及各种生物过程的成像方面已取得了巨大的发展^[1-3]。然而, 这些成像技术多数是利用较高能量的紫外(UV)或可见(VIS)光辐射激发的荧光分子或发光材料, 如有机染料或半导体量子点(QD)^[4,5]。因此会产生一系列缺点, 包括UV光毒性引起的组织损伤、不同的吸收和散射过程导致组织渗透低、光漂白限制其长时间使用以及自发荧光背景导致对比度低等。为了改善背景荧光的干扰, 可以抑制背景荧光的发光材料具有很大的潜力。上转换纳米颗粒(UCNP), 特别是镧系元素掺杂的稀土纳米晶体, 通过连续的电子激发和能量转移过程, 能够将两个或多个低能量的近红外(NIR)泵浦

光子转换成高能量光子, 发射UV, VIS或NIR的短波长光^[6-9], 由于底物的荧光分子不能被NIR光激发, UCNPs在细胞、生物器官或组织成像中几乎不受背景荧光干扰, 提供优异的光学对比度并且高检测灵敏度^[10,11]。此外, 由于光稳定性好, 发射光可调, 量子产率高和荧光寿命长等特点, 也赋予UCNPs纳米粒子优于其他荧光试剂的许多优点^[12,13]。因此, UCNPs被认为是最有前途的光学纳米探针之一。Zijlmans等人^[14]首先利用镧系元素掺杂纳米颗粒的上转换性质进行高效生物成像, 并证实在NIR激发下短波长激发导致的非特异性自发荧光信号被完全消除。同时, 本课题组^[15]结合了UCNPs的背景荧光

引用格式: 肖射华, 梁玲, 李丹, 等. 核酸适配体功能化的脂质体负载上转换颗粒用于肿瘤靶向成像. 科学通报, 2019, 64: 1067-1075

Xiao S H, Liang L, Li D, et al. Aptamer guided liposomes loaded upconversion nanoparticles for targeted imaging (in Chinese). Chin Sci Bull, 2019, 64: 1067-1075, doi: 10.1360/N972018-00775

抑制能力和指纹中溶菌酶的普遍性,构建了基于分子识别的高灵敏及高选择性的检测,并实现了潜指纹中的无背景荧光成像。

目前,多功能纳米平台的开发已用于多种生物医学研究^[16-19],其中利用脂质体组装多功能纳米平台是最有前途的策略之一^[20-23]。由于与细胞膜的结构及功能的相似性,脂质体被认为是药物递送最成功的纳米平台之一,已被用于传递各种各样的小分子、基因,甚至纳米粒子等。与其他递送系统相比,脂质体具有优异的生物相容性、生物降解性、较低的毒性、尺寸可控和表面功能化等特点。Kostarelos课题组^[24]通过将聚乙二醇修饰的QDs封装在脂质体水相中进行癌症成像,开发了脂质体负载功能化量子点的混合纳米粒子,肿瘤模型实验进一步证明,与单独QDs瘤内注射相比混合颗粒导致肿瘤细胞的荧光染色显著提高。然而,脂质体的被动靶向无法区分正常细胞与肿瘤细胞。目前,已有很多研究利用识别分子靶向肿瘤细胞来降低肿瘤治疗过程中的毒副作用,如叶酸、抗体及核酸适配体等。其中,Wang等人^[25]设计了负载UCNPs及MC540的叶酸修饰的脂质体,用于靶向人类乳腺癌细胞的荧光成像及NIR光激发的光动力学治疗。核酸适配体是通过指数富集的配基系统进化(SELEX)技术筛选出的可与蛋白质、微生物、有机小分子等特异性结合的DNA或RNA核苷酸序列^[26-28]。相比于叶酸及抗体,核酸适配体具有高选择性和强亲和性,且设计灵活、易于合成及修饰、成本低廉、稳定性高等优点,在生物分析、医学诊断、蛋白调控、组织工程等方面有着广泛的应用^[29-34]。因此,以核酸适配体共价结合的脂质体为载体作为纳米材料的靶向载体有助于促进临床医学转化。

在本研究中,我们报道了基于聚丙烯酸(PAA)修饰的NaYF₄:Yb/Er/Nd@NaYF₄:Nd上转换纳米颗粒(UCNPs)封装于AS1411核酸适配体修饰的脂质体(Apt-Lip)中,构建了一个NIR光激发的光学成像及靶向识别集成的UCNPs@Apt-Lip多功能纳米平台。一方面,在NIR光激发下利用上转换纳米颗粒发射可见光作为成像信号;另一方面,AS1411核酸适配体修饰的UCNPs@Apt-Lip对膜表面高度表达核仁素的人乳腺癌(MCF-7)细胞具有较强的特异性识别结合能力。该核酸适配体修饰的多功能纳米平台作为潜在的药物递送平台有望进一步应用到复杂生命活动过程的监测中及上转换成像指导的癌症治疗中。

1 材料与方法

(i) 试剂与仪器。YCl₃·6H₂O(99.99%), YbCl₃·6H₂O(99.99%), ErCl₃·6H₂O(99.99%), NdCl₃·6H₂O(99.99%), 油酸(OA), 碳十八烯(ODE)均购买于Aladdin; 乙醇、环己烷、氯仿、二甘醇(DEG)购买于国药化学试剂有限公司; 1,2-二棕榈酰-*sn*-甘油-3-磷酸胆碱(DPPC)、胆固醇和1,2-二硬脂酰-*sn*-甘油基-3-磷酸乙醇胺-*N*-(马来酰亚胺-(聚乙二醇)-2000)(DSPE-PEG(2000)-Mal)购买于Avanti Polar Lipids公司; 氢氧化钠(NaOH)、氟化铵(NH₄F)和聚丙烯酸(PAA, $M_w=1800$)购自Sigma Aldrich公司。实验用水均为超纯水。试验中所用到的DNA均购买于生工生物工程(上海)股份有限公司,具体碱基序列如下: AS1411核酸适配体(SH-Apt): 5'-GGTGGTGGTGGT TGTGGTGGTGGTGGTT-C6-SH-3'; FAM标记的AS1411核酸适配体(SH-Apt-FAM): 5'-6-FAM-GGTGG TGGTGGTTGTGGTGGT GGTGGTT-C6-SH-3'; 随机序列DNA链(SH-Ctrl): 5'-GAGAACCTGAGTCAGTA TTGCGGAGATT-C6-SH-3'; FAM修饰的随机序列DNA链(SH-Ctrl-FAM): 5'-6-FAM-GAGAACCTGAGT CAGTATTGCGG AGATT-C6-SH-3'。

JEM-2010透射电子显微镜(TEM, JEOL, 日本); 动态光散射纳米粒度仪(Malvern, 英国); F-4600荧光分光光度计(Hitachi, 日本); FV1000激光共聚焦显微镜(Olympus, 日本); 流式细胞仪(BD, 美国); X射线衍射仪(XRD, Bruker, 德国); 980 nm红外激光器(长春新产业光电技术有限公司)。

(ii) NaYF₄:Yb,Er,Nd的合成。基于高温热分解方法^[35]合成六方相NaYF₄:Yb,Er,Nd上转换纳米颗粒。在50 mL的三口烧瓶中依次加入83.3 mg YCl₃·6H₂O, 46.5 mg YbCl₃·6H₂O, 0.8 mg ErCl₃·6H₂O, 1.4 mg NdCl₃·6H₂O, 3 mL OA, 7 mL ODE。在真空条件下,将所得到的混合溶液搅拌加热至150℃,并在该条件下反应1 h,使体系中的反应物溶解并除去低沸点的物质。然后冷却至室温,向上述溶液中加入6 mL含1.6 mmol NH₄F和1 mmol NaOH的甲醇溶液,搅拌反应0.5 h。随后将反应温度升高至100℃以除去反应混合物中的甲醇。停止抽真空,将反应物在氩气保护下迅速加热到290℃,保持此温度反应1.5 h。反应结束后自然冷却至室温,加入约20 mL乙醇,使纳米颗粒沉淀析出,离心分离后,用乙醇和环己烷的混合物(体积比, 1:1)将得到的纳米颗粒洗涤3次,最后离心

分离得到产物。

(iii) $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Nd}@/\text{NaYF}_4:\text{Nd}$ 核壳纳米颗粒的合成. 在含有油酸(3 mL)和碳十八烯(7 mL)的50 mL三口烧瓶中加入97.2 mg $\text{YCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 及28.7 mg $\text{NdCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$. 在真空条件下, 将所得到的混合溶液在剧烈搅拌下加热至150℃, 并在该温度下搅拌反应1 h, 使体系中的反应物溶解并除去沸点低的物质, 冷却至室温. 向上述溶液中依次加入4 mL含有 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Nd}$ 上转换纳米颗粒的环己烷溶液、6 mL含1.6 mmol NH_4F 及1 mmol NaOH 的甲醇溶液, 50℃搅拌反应0.5 h. 随后将反应温度升高至100℃以除去反应混合物中的甲醇. 停止抽真空, 将反应物在氩气保护下迅速加热到290℃并反应1.5 h. 反应结束后自然冷却至室温, 加入约20 mL乙醇, 使纳米颗粒沉淀析出, 离心分离后, 用乙醇和环己烷的混合物(体积比, 1:1)将得到的纳米颗粒洗涤3次, 最后离心分离得到产物。

(iv) UCNP_s-PAA纳米颗粒的制备. 在100 mL三口烧瓶中加入30 mL DEG和300 mg PAA, 然后在真空条件下加热到110℃, 将100 mg上述得到 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Nd}@/\text{NaYF}_4:\text{Nd}$ 核壳纳米颗粒分散在甲苯溶液中, 用甲苯和氯仿的混合溶液(体积比, 3:1)分散, 再将此溶液缓慢的加入之前冷却的溶液中, 在氩气保护下用注射器加入到三口烧瓶中反应1 h. 然后加热至240℃, 反应1.5 h, 冷却至室温. 加入约20 mL乙醇离心分离后, 将得到的纳米颗粒用乙醇和水的混合物(体积比, 1:1)洗涤3次, 最后离心分离得到UCNP_s-PAA, 并重新分散于100 mL水中。

(v) UCNP_s@Apt-Lip的合成. 主要通过薄膜水化获得^[36]. 简要步骤如下: 在10 mL的圆底烧瓶中按2:1:0.1摩尔比依次称取DPPC(7.3 mg), 胆固醇和DSPE-PEG(2000)-Mal, 加入3 mL的氯仿使其完全溶解. 随后置于40℃水浴中, 旋转蒸发30 min使磷脂在烧瓶上底部形成一层薄薄的膜, 取2 mL 5 mg/mL UCNP_s的溶液于37℃水浴中水化磷脂膜, 经涡旋, 震荡, 0.22 μm的聚碳酸酯膜挤压, 4000 r/min离心10 min去除未负载的UCNP_s, 以获得UCNP_s@Lip. 取1/2体积的上述溶液加2 μL 100 μmol/L的SH-Apt/Ctrl-Apt溶液, 4℃避光孵育24 h得到UCNP_s@Apt-Lip.

(vi) 脂质体表面Apt偶联率的测定. 测定不同浓度FAM-Apt的荧光强度(激发波长: 490 nm, 发射波长518 nm), 制作荧光强度与浓度($I\text{-}C_{\text{FAM-Apt}}$)标准

曲线. 按照文中合成方法制备FAM荧光标记的Apt-Lip, 通过荧光仪测定结合到脂质体表面的FAM-Apt的荧光强度, 并根据FAM-Apt的荧光强度标准曲线计算出脂质体表面Apt的浓度, 进一步根据加入的总脂质体数目得到脂质体表面Apt的偶联率。

(vii) 流式细胞仪分析. 通过血球计数板将数量为 3.0×10^5 个的人乳腺癌细胞(MCF-7)或人胚胎肾细胞(HEK293)与FAM标记的UCNP_s@Apt-Lip和UCNP_s@Ctrl-Lip的溶液(500 μg/mL)分别在4℃ 200 μL的结合缓冲液中孵育4 h. 800 r/min离心3 min, 用DPBS缓冲液洗涤2次, 通过计数10000次事件进行流式细胞术分析。

(viii) 细胞靶向成像. 将500 μL UCNP_s@Apt-Lip和UCNP_s@Ctrl-Lip的溶液(500 μg/mL)分别加入到有MCF细胞(1×10^6 个/mL)的共聚焦小皿中, 在细胞培养箱中37℃下反应4 h后, 洗涤2次, 加入0.5 mL DPBS缓冲溶液, 放到激光共聚焦显微镜下观察。

2 结果与讨论

2.1 纳米颗粒的合成与表征

$\text{NaYF}_4:\text{Yb/Er/Nd}@/\text{NaYF}_4:\text{Nd}$ 上转换纳米颗粒采用高温热分解的方法合成^[35]. 首先利用TEM表征了所制备的UCNP_s的形貌. 如图1(a)所示, UCNP_s单分散性良好, 形貌规则且大小均一, 平均粒径约为(13.7±1.8) nm. 由于合成的UCNP_s表面覆盖疏水性的油酸配体使其难溶于水, 从而限制了在生物体环境中的应用. 我们通过配体交换方法对其进行表面改性, 从而合成了亲水性UCNP_s-PAA. PAA修饰后的上转换纳米颗粒保持原有形貌且单分散性良好, 平均直径为14.0 nm(图1(b)). 图1(c)是UCNP_s-PAA的XRD分析结果, 通过与标准卡片PDF#28-1192对比可以看出, 本实验制备的上转换纳米颗粒为六方相晶体, 其衍射峰与标准卡片位置完全保持一致. 此外, 我们进一步用荧光分光光度计测试了UCNP_s-PAA的上转换发光光谱. 如图1(d)所示, 在808 nm的激光照射下, UCNP_s-PAA在409, 520~570和650~690 nm处均有发射谱带. 而且, 在808 nm的激光照射下, UCNP_s-PAA以发红光为主. 以上结果表明UCNP_s-PPA具有良好的分散性及比较强的红绿色上转换发光。

2.2 UCNP_s@Apt-Lip的合成与表征

由于核酸适配体修饰的功能化纳米材料在生物

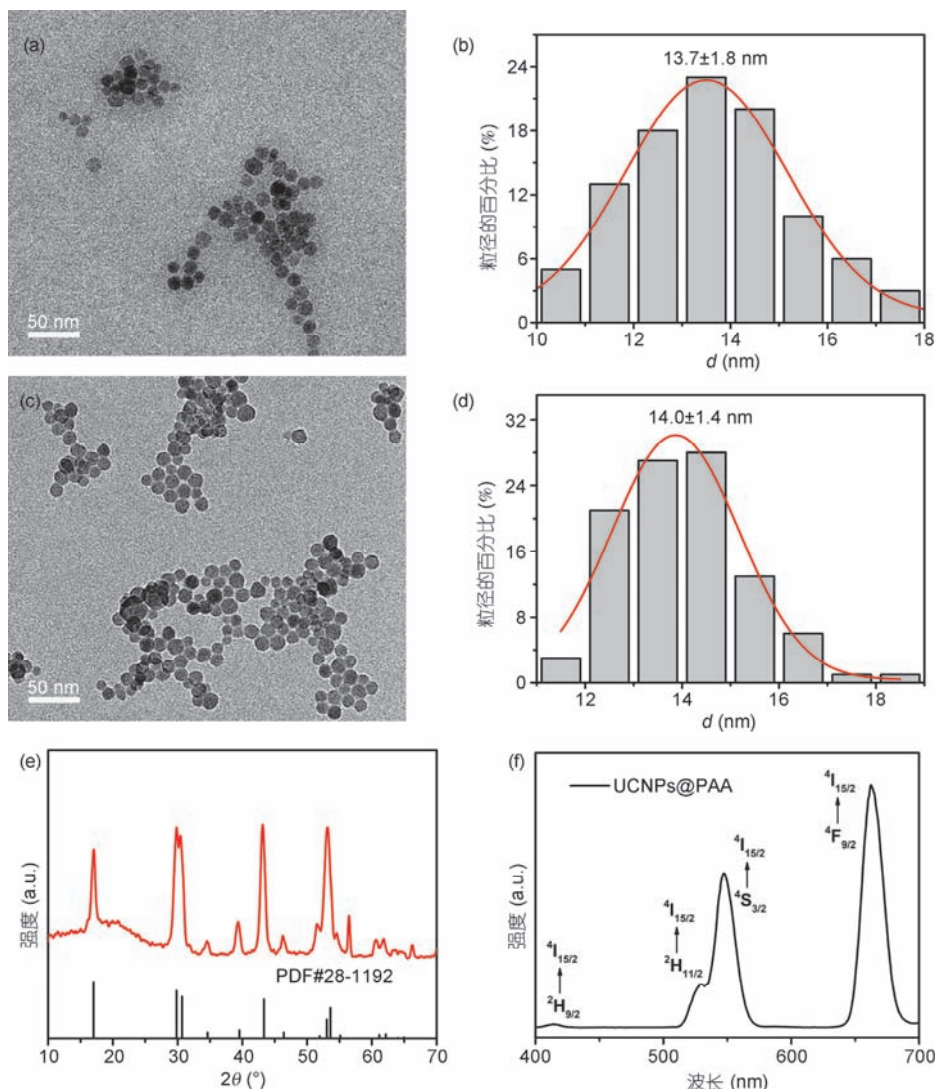


图1 (网络版彩色)UCNPs-PAA的表征. (a, b) 为UCNPs的TEM图及其粒径分布; (c, d) 为UCNPs-PAA的TEM图及其粒径分布; (e) UCNPs-PAA的XRD图; (f) 在980 nm激光激发下的UCNPs-PAA上转换发射光谱

Figure 1 (Color online) Characterization of UCNPs-PAA. (a, b) TEM images and particle diameter distribution of UCNPs; (c, d) TEM images and particle diameter distribution of UCNPs-PAA; (e) XRD analysis of the UCNPs-PAA; (f) upconversion luminescence spectra of UCNPs-PAA in aqueous solutions recorded by a fluorometer using a 980 nm laser as the excitation source

传感、癌细胞特异性识别和靶向药物运输等应用方面具有优异的性质,所以本文通过薄膜水化法及巯基-马来酰亚胺化学偶联反应合成核酸适配体功能化的UCNPs@Apt-Lip. 通过TEM表征UCNPs@Apt-Lip的结构,如图2(a)所示,可以看出该复合纳米材料具有均匀的球形结构,UCNPs纳米颗粒成功地负载于核酸适配体修饰的脂质体内,且纳米颗粒单分散性良好.图2(b)是由Image J软件统计UCNPs@Apt-Lip的粒径分布图,可以看出UCNPs@Apt-Lip的粒径主要集中在118 nm左右.结合TEM统计单个脂质体平均负载

UCNPs的个数,并通过下式计算单位体积内的脂质体^[36]及UCNPs^[37]:

$$n_{\text{UCNPs}} = m_0 \text{UCNPs} / \rho_{\text{UCNPs}} \times 4/3 \times \pi \times (d_{\text{UCNPs}}/2)^3, \quad (1)$$

$$N_{\text{Lip}} = \frac{M_{\text{lipid}} \times N_A \times a}{4\pi \left(\frac{d}{2}\right)^2 + 4\pi \left(\frac{d}{2} - h\right)^2}, \quad (2)$$

其中, ρ 为UCNPs的密度(3.442 g/cm³,由PDF#28-1192获得), d_{UCNPs} 为UCNPs直径14.0 nm, M_{lipid} 为磷脂(lipid)的摩尔浓度(5 mmol/L), N_A 为阿伏加德罗数(6.02×10²³), d 为脂质体直径(160 nm), a 为DPPC的面

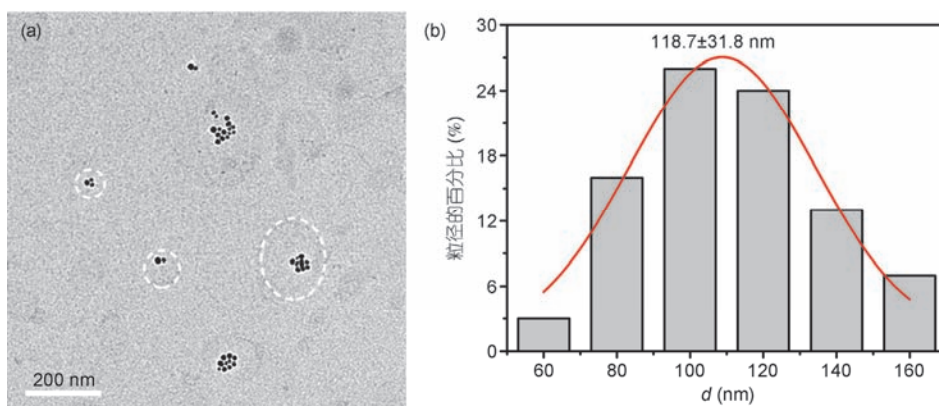


图2 (网络版彩色)UCNPs@Apt-Lip的TEM图(a)及其粒径分布(b)
 Figure 2 (Color online) TEM images (a) and particle diameter distribution (b) of UCNPs@Apt-Lip

积(0.65 nm^2), h 表示脂质双层的厚度(3.43 nm). 最终获得该UCNPs@Apt-Lip对UCNPs的负载率为62.80%. 此外, 由荧光仪测得FAM荧光标记的Apt-Lip的荧光强度及FAM-Apt的荧光强度与浓度的标准曲线可知, 约有 0.073 nmol Apt连接到脂质体表面. 因此, Apt的在脂质体表面的偶联率为36.5%.

核酸适配体修饰的UCNPs@Apt-Lip进一步被激光粒度仪(DLS)表征, 分别测定了UCNPs@Lip和UCNPs@Apt-Lip的水合粒径及Zeta电位. 从图3(a)可以看出, 无核酸适配体修饰的UCNPs@Lip平均水合粒径为 165.6 nm , 该粒径更接近于TEM统计的粒径分析结果. 核酸适配体修饰后的UCNPs@Apt-Lip的水合粒径由 165.6 nm 变为 209.5 nm , 该粒径与制备时的聚碳酸酯膜孔径一致. 为了检测核酸适配体对脂质体表面的影响, 测量了两种样品的Zeta电位. 如图3(b)所示, UCNPs@Apt-Lip的Zeta电位(-22.7 mV)低于UCNPs@Lip(-20.5 mV). 上述水合粒径及Zeta电位的变化进一步证明了AS1411核酸适配体已成功连

接到UCNPs@Lip表面.

为了进一步验证该核酸适配体功能化复合纳米材料的结构, 制备了微米尺度的UCNPs@Apt-Lip. 通过明场光学图像和荧光图像以证实UCNPs@Apt-Lip的结构完整性. 如图4所示. 明场的光学图片显示UCNPs@Apt-Lip保持球形的结构特征, UCNPs的负载并没有破坏脂质体的结构. 在双光子激光共聚焦显微镜(808 nm)激发下, UCNPs发出明显的红光; 而在 488 nm 波长光的激发下, FAM标记的Apt-Lip纳米材料会发出明亮的绿光. 由叠加图可知, UCNPs的上转换发光和FAM荧光基团的荧光明显重叠, 说明UCNPs与核酸适配体在脂质体上有明显的共定位. 上述结果都说明FAM标记的AS1411核酸适配体成功连接到脂质体上以及脂质体负载上了UCNPs纳米颗粒.

2.3 UCNPs@Apt-Lip的靶向细胞成像

为了探究核酸适配体修饰的多功能复合纳米材料的靶向识别能力, 我们将UCNPs@Ctrl-Lip和UCNPs@

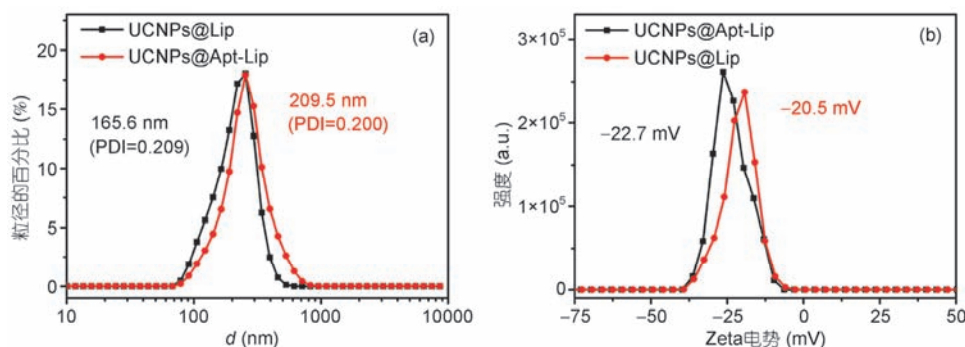


图3 (网络版彩色)UCNPs@Lip和UCNPs@Apt-Lip纳米材料的水合粒径(a)和Zeta电位(b)
 Figure 3 (Color online) Hydrodynamic diameter (a) and Zeta potential (b) of UCNPs@Lip and UCNPs@Apt-Lip

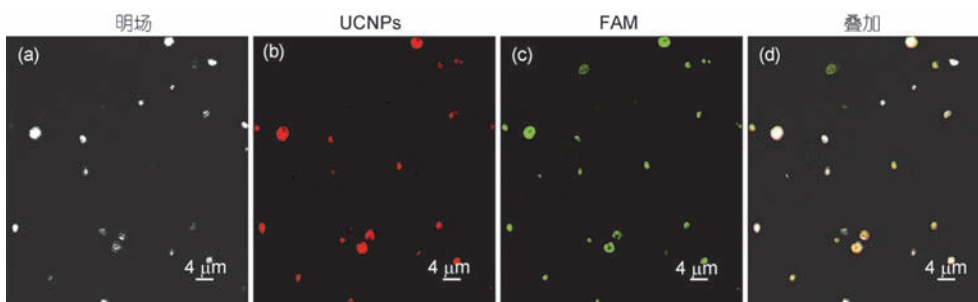


图4 (网络版彩色)UCNPs@Apt-Lip的双光子激光共聚焦成像图. (a) UCNPs@Apt-Lip的明场成像图; (b), (c) UCNPs@Apt-Lip的荧光成像图. 红色发光和绿色荧光分别来源于808 nm激发下的UCNPs, 488 nm激发下FAM标记的Apt-Lip; (d) UCNPs@Apt-Lip的明场与荧光叠加图. 比例尺为4 μm
Figure 4 (Color online) Confocal microscopy images of UCNPs@Apt-Lip. (a) The bright field image of UCNPs@Apt-Lip. (b), (c) Fluorescence images of UCNPs@Apt-Lip. The red fluorescence signal derived from UCNPs irradiated by 808 nm lasers and the green fluorescence signal derived from FAM-labeled Apt-Lip under the excitation of 488 nm laser, respectively. (d) The overlay of the bright field and fluorescence images of UCNPs@Apt-Lip. Scale bars, 4 μm

Apt-Lip分别与MCF-7/HEK293细胞于4℃条件下共同孵育4 h. 从图5(a)可以看出, FAM标记的UCNPs@Apt-Lip孵育MCF-7细胞, 观察到荧光峰出现明显的位移, 这表明UCNPs@Apt-Lip与靶细胞的具有很强结合亲和力. 然而, FAM标记的UCNPs@Ctrl-Lip对MCF-7细胞表现出弱亲和力, 这由荧光峰小的位移证实. 相比之下, UCNPs@Apt-Lip和UCNPs@Ctrl-Lip与HEK293细胞孵育4 h后没有观察到荧光峰位移(图5(b)). 因此, 相比于HEK293细胞, UCNPs@Apt-Lip对过度表达核仁素蛋白的MCF-7细胞表现出更强的亲和力, 这表明该多功能纳米材料作为药物递送系统可用于靶向运输.

为了进一步验证该多功能纳米复合材料对靶细胞的具有特异性识别的能力, UCNPs@Apt-Lip和UCNPs@Ctrl-Lip分别与MCF-7细胞于37℃共同培养,

通过共聚焦显微镜来分析该复合材料对靶细胞的特异性识别能力. 实验结果如图6所示. 从共聚焦显微镜暗场图片中可以看到在MCF-7细胞中有很强的红色荧光信号, 将明场和暗场图像叠加后发现这些信号主要存在于MCF-7细胞的细胞质中, 显示出探针能够有效进入MCF-7细胞内, 说明AS1411核酸适配体能够很好地引导UCNPs@Apt-Lip进入细胞内. 而UCNPs@Ctrl-Lip纳米材料处理的细胞只有很微弱的荧光, 这说明实验中用到的随机序列DNA修饰的复合材料对MCF-7细胞无靶向结合的能力. 综上所述, 该分析结果说明AS1411核酸适配体能极大地提高该多功能纳米复合材料对MCF-7细胞的靶向识别和结合能力.

3 结论

基于PAA修饰的NaYF₄:Yb,Er,Nd@NaYF₄:Nd上

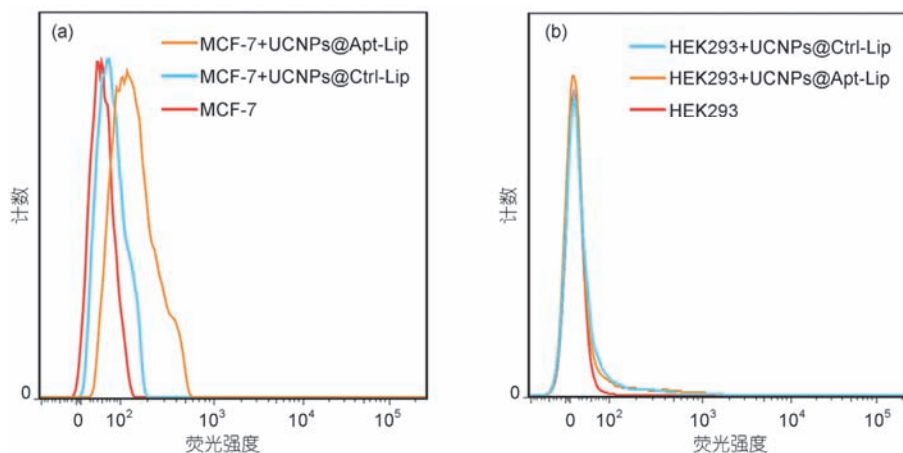


图5 (网络版彩色)流式细胞术检测UCNPs@Apt-Lip与MCF-7细胞(a)和HEK293细胞(b)的结合
Figure 5 (Color online) Flow cytometry analysis of MCF-7 cells (a) and HEK293 cells (b) after incubation with FAM-labeled UCNPs@Apt-Lip

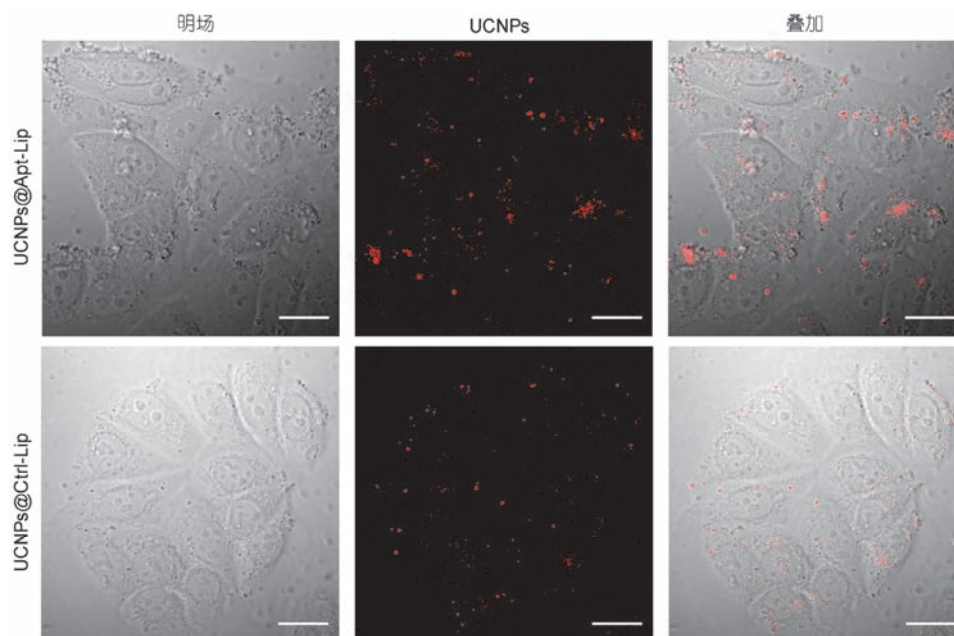


图 6 (网络版彩色)UCNPs@Apt-Lip和UCNPs@Ctrl-Lip分别处理的MCF-7细胞共聚焦显微镜图像. 荧光信号来源于UCNPs纳米颗粒, 比例尺为 20 μm

Figure 6 (Color online) Confocal microscopy images of MCF-7 cells treated with UCNPs@Apt-Lip and UCNPs@Ctrl-Lip, respectively. The emission signal is UCNPs. Scale bars, 20 μm

转换纳米颗粒, 本文成功合成了UCNPs@Apt-Lip多功能复合纳米材料. 该复合纳米材料在水溶液中分散性良好且在近红外光照射下发射上转换红绿光. 此外, 我们还探究了该多功能纳米复合材料在生物成像方面的应用, 共聚焦成像实验表明相较于非靶

向细胞, 该纳米复合材料可以很容易进入MCF-7细胞且具有较强的荧光信号. 总之, 我们证明了所制备的核酸适配体修饰的多功能复合纳米材料作为潜在的药物递送平台有望进一步应用到复杂生命活动过程的监测中及上转换成像指导的癌症治疗中.

参考文献

- 1 Thomas J A. Optical imaging probes for biomolecules: An introductory perspective. *Chem Soc Rev*, 2015, 44: 4494–4500
- 2 Bu L H, Shen B Z, Cheng Z. Fluorescent imaging of cancerous tissues for targeted surgery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2014, 76: 21–38
- 3 Khemthongcharoen N, Jolivot R, Rattanavarin S, et al. Advances in imaging probes and optical microendoscopic imaging techniques for early *in vivo* cancer assessment. *Adv Drug Deliv Rev*, 2014, 74: 53–74
- 4 Wegner K D, Hildebrandt N. Quantum dots: Bright and versatile *in vitro* and *in vivo* fluorescence imaging biosensors. *Chem Soc Rev*, 2015, 44: 4792–4834
- 5 Ge J C, Jia Q Y, Liu W M, et al. Red-emissive carbon dots for fluorescent, photoacoustic, and thermal theranostics in living mice. *Adv Mater*, 2015, 27: 4169–4177
- 6 Wang F, Banerjee D, Liu Y, et al. Upconversion nanoparticles in biological labeling, imaging, and therapy. *Analyst*, 2010, 135: 1839–1854
- 7 Shen J, Zhao L, Han G. Lanthanide-doped upconverting luminescent nanoparticle platforms for optical imaging-guided drug delivery and therapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65: 744–755
- 8 Tian G, Zhang X, Gu Z J, et al. Recent advances in upconversion nanoparticles-based multifunctional nanocomposites for combined cancer therapy. *Adv Mater*, 2016, 27: 7692–7712
- 9 Yuan Q, Wu Y, Wang J, et al. Targeted bioimaging and photodynamic therapy nanoplatfrom using an aptamer-guided G-quadruplex DNA carrier and near-infrared light. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 125: 14215–14219
- 10 Yang Y M, Zhao Q, Feng W, et al. Luminescent chemodosimeters for bioimaging. *Chem Rev*, 2013, 113: 192–270

- 11 Ai Y, Tu D T, Zheng W, et al. Lanthanide-doped NaScF₄ nanoprobes: Crystal structure, optical spectroscopy and biodetection. *Nanoscale*, 2013, 5: 6430–6438
- 12 Li L L, Wu P W, Hwang K, et al. An exceptionally simple strategy for DNA-functionalized up-conversion nanoparticles as biocompatible agents for nanoassembly, DNA delivery, and imaging. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 2411–2414
- 13 Ju Q, Tu D T, Liu Y S, et al. Amine-functionalized lanthanide-doped KGdF₄ nanocrystals as potential optical/magnetic multimodal bioprobes. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 1323–1330
- 14 Zijlmans H J, Bonnet J, Burton J, et al. Detection of cell and tissue surface antigens using up-converting phosphors: A new reporter technology. *Anal Biochem*, 1999, 267: 30–36
- 15 Wang J, Wei T, Li X Y, et al. Near-infrared-light-mediated imaging of latent fingerprints based on molecular recognition. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 126: 1642–1646
- 16 Shi J J, Wang L, Gao J, et al. A fullerene-based multi-functional nanoplatform for cancer theranostic applications. *Biomaterials*, 2014, 35: 5771–5784
- 17 Zhang H J, Jiao X J, Chen Q Q, et al. A multi-functional nanoplatform for tumor synergistic phototherapy. *Nanotechnology*, 2016, 27: 85–104
- 18 Bartelmess J, Quinn S J, Giordani S. Carbon nanomaterials: Multi-functional agents for biomedical fluorescence and Raman imaging. *Chem Soc Rev*, 2015, 44: 4672–4698
- 19 Hu X X, Wang Y Q, Liu H Y, et al. Naked eye detection of multiple tumor-related mRNAs from patients with photonic-crystal micro-pattern supported dual-modal upconversion bioprobes. *Chem Sci*, 2017, 8: 466–472
- 20 Allen T M, Cullis P R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65: 36–48
- 21 Deshpande P P, Biswas S, Torchilin V P. Current trends in the use of liposomes for tumor targeting. *Nanomedicine*, 2013, 8: 1509–1528
- 22 Xing H, Hwang K, Lu Y. Recent developments of liposomes as nanocarriers for theranostic applications. *Theranostics*, 2016, 6: 1336–1352
- 23 Lee Y, Thompson D H. Stimuli-responsive liposomes for drug delivery. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*, 2017, 9: e1450
- 24 Al-Jamal W T, Al-Jamal K T, Bomans P H, et al. Functionalized-quantum-dot-liposome hybrids as multimodal nanoparticles for cancer. *Small*, 2008, 4: 1406–1415
- 25 Wang H J, Liu Z Y, Wang S, et al. MC540 and upconverting nanocrystal coloaded polymeric liposome for near-infrared light-triggered photodynamic therapy and cell fluorescent imaging. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2014, 6: 3219–3225
- 26 Robertson D L, Joyce G F. Selection *in vitro* of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature*, 1990, 344: 467–468
- 27 Ellington A D, Szostak J W. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 1990, 346: 818–822
- 28 Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 1990, 249: 505–510
- 29 Li J, Mo L T, Lu C H, et al. Functional nucleic acid-based hydrogels for bioanalytical and biomedical applications. *Chem Soc Rev*, 2016, 45: 1410–1431
- 30 Zhang Y Z, Tu J, Wang D Q, et al. Programmable and multifunctional DNA-based materials for biomedical applications. *Adv Mater*, 2018, 30: 1703658
- 31 Shen H J, Wang J, Liu H Y, et al. Rapid and selective detection of pathogenic bacteria in bloodstream infection with aptamer-based recognition. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8: 19371–19378
- 32 Wang J, Wei Y R, Hu X X, et al. Protein activity regulation: Inhibition by closed-loop aptamer-based structures and restoration by near-IR stimulation. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 10576–10584
- 33 Hu X X, Wang Y L, Tan Y N, et al. A difunctional regeneration scaffold for knee repair based on aptamer-directed cell recruitment. *Adv Mater*, 2017, 29: 1605235
- 34 Liu Z B, Shi Y Q, Chen Z R, et al. Current progress towards the use of aptamers in targeted cancer therapy (in Chinese). *Chin Sci Bull (Chin Ver)*, 2014, 59: 1267–1279 [刘珍宝, 石依倩, 陈长仁, 等. 核酸适配体在肿瘤靶向治疗中应用的研究进展. 科学通报, 2014, 59: 1267–1279]
- 35 Liu C H, Wang H, Li X, et al. Monodisperse, size-tunable and highly efficient β -NaYF₄:Yb,Er(Tm) up-conversion luminescent nanospheres: Controllable synthesis and their surface modifications. *J Mater Chem*, 2009, 19: 3546–3553
- 36 Alshaer W, Hillaireau H, Vergnaud J, et al. Functionalizing liposomes with anti-CD44 aptamer for selective targeting of cancer cells. *Bioconjug Chem*, 2015, 26: 1307–1313
- 37 Huang Y, Hemmer E, Rosei F, et al. Multifunctional liposome nanocarriers combining upconverting nanoparticles and anticancer drugs. *J Phys Chem B*, 2016, 120: 4992–5001

Summary for “核酸适配体功能化的脂质体负载上转换颗粒用于肿瘤靶向成像”

Aptamer guided liposomes loaded upconversion nanoparticles for targeted imaging

Shehua Xiao^{1,2}, Ling Liang², Dan Li², Yuanye Su^{1,2} & Quan Yuan^{2*}

¹ College of Life Sciences, Hunan University, Changsha 410082, China;

² Molecular Science and Biomedicine Laboratory, Institute of Chemical Biology and Nanomedicine, College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China

* Corresponding author, E-mail: yuanquan@whu.edu.cn

During tumor treatment, effective imaging diagnosis can monitor the biological distribution of nanomaterials *in vivo*, so as to reveal the therapeutic effect of nanomaterials and provide comprehensive information of tumor tissue. In conventional cancer therapy, nanomaterials that fail to distinguish between tumor cells and normal cells often lead to adverse side effects and higher systemic toxicity. Therefore, more and more attention has been paid to the development of multifunctional nano-platform for a variety of biomedical applications. Aptamers are single-stranded oligonucleotide that can specifically recognize their substrates, such as metal ions, small molecule, proteins and even cells. Owing to their high specificity, aptamers can endow the delivery system with robust targeting ability and enhance the enrichment of drugs and imaging agents in tumor tissues, holding great promise in molecular diagnosis and cancer therapy.

Here, we designed a NIR-activated optical imaging and target-recognition multifunctional nanoplatfroms by the capsulation of poly(acrylic acid) (PAA) coated NaYF₄:Yb/Er/Nd@NaYF₄:Nd upconversion nanoparticles (UCNPs-PAA) within aptamer-guided liposome (Apt-Lip) to form UCNPs@Apt-Lip. Transmission electron microscopy (TEM) images showed that the composite nanomaterials had a uniform spherical structure, and the UCNPs nanoparticles were successfully loaded into the liposome modified by AS1411 aptamer, and the monodispersity of nanoparticles was good. The Dynamic light scattering (DLS) detected that the hydrated particle size of UCNPs@Apt-Lip modified by AS1411 aptamer changed from 165.6 nm to 209.5 nm, and the zeta potential (-22.7 mV) was lower than UCNPs@Lip (-20.5 mV), which further confirmed that the AS1411 aptamer was successfully connected to the surface of UCNPs@lip. Flow cytometry and targeted cell fluorescence imaging experiments show that UCNPs@Apt-Lip nanostructure has strong ability of target recognition and fluorescence imaging to MCF-7 cells. With the unique properties of movable cores, interstitial hollow spaces, and the functionality of shells, we believe that multifunctional nanoplatfroms will have great potential for application in various fields, such as photocatalysis, nanoreactors, drug delivery and tumor treatment.

upconversion nanoparticles, aptamers, liposome, tumor-targeted, fluorescence imaging

doi: 10.1360/N972018-00775