

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.06.010

自供氧光敏载体系统的制备工艺优化及释氧性能研究*

胡莹莹¹ 芮雪¹ 吴晶晶¹ 杨晔^{1,2} 尹登科^{1,2,△}

(1 安徽中医药大学药学院 安徽 合肥 230012; 2 安徽省中医药科学院药物制剂研究所 安徽 合肥 230012)

摘要 目的:制备乙基纤维素(EC)载过氧化钙(CaO_2)和光敏剂血卟啉单甲醚(HMME)的自供氧微球,对其制备工艺进行优化,并考察其体外自释氧行为。**方法:**采用液中干燥法制备自供氧微球,设计单因素考察实验,以粒径和 CaO_2 /HMME 包封率作为微球的质量评价指标,研究 EC 浓度、有机/水相体积比、水相温度、 CaO_2 投料量对微球性能的影响,从而筛选最优工艺,采用动态透析法测定微球中氧气的释放行为,以单线态氧荧光探针(SOSG)评价其促单线态氧生成能力。**结果:**通过单因素考察实验获得自供氧微球的最佳制备处方为:EC 浓度为 1%、有机/水相体积比 1:3、水相温度 30 ℃、 CaO_2 投料量 40 mg;按照优化工艺制备的自供氧微球的粒径为(1198 ± 147) nm、HMME 包封率(91.83 ± 3.48)%、 CaO_2 包封率(89.14 ± 1.67)%、3 h 内氧气累计释放量(99.87 ± 4.32) mM、单线态氧释放量显著高于无 CaO_2 对照组。**结论:**优化的自供氧微球制备工艺合理可行,药物包封率高,且可增加单线态氧的生成。

关键词:自供氧微球;单因素考察;单线态氧

中图分类号:R918; R943 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2019)06-1049-06

Optimization and *in Vitro* Oxygen Release Performance of the Oxygen Self-supplying Photosensitizer Carrier System*

HU Ying-ying¹, RUI Xue¹, WU Jing-jing¹, YANG Ye^{1,2}, YIN Deng-ke^{1,2,△}

(1 School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, Anhui, 230012, China;

2 Institute of Pharmaceutical Preparations, Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei, Anhui, 230012, China)

ABSTRACT Objective: To prepare an oxygen self-supplying particles of ethyl cellulose (EC) for photosensitizer of hematoporphyrin monomethyl ether (HMME), optimize the preparation processes and evaluate the properties of *in vitro* oxygen release. **Methods:** The oxygen self-supplying particles were prepared by the in-liquid drying method. The prescription and processing of ethyl cellulose concentration, organic-water phase ratio, water phase temperature and calcium peroxide dosage were optimized through the single-factor experimental design, taking the particle size and drug encapsulation efficiency as the quality indices. The drug release of oxygen from microspheres was monitored by dynamic dialysis method and the singlet oxygen fluorescence probe (SOSG) was used to evaluate its ability to promote singlet oxygen production. **Results:** The optimal preparation processing for the oxygen self-supplying particles was 1% of ethyl cellulose concentration, 1:3 of organic phase to aqueous phase, 30 ℃ of water phase temperature and 40 mg of CaO_2 dose. The obtained particles exhibited average diameter of (1198 ± 147) nm, HMME encapsulation efficiency of (91.83 ± 3.48)% and CaO_2 encapsulation efficiency of (89.14 ± 1.67)%. The oxygen self-supplying particles exhibited (99.87 ± 4.32) mM of oxygen cumulative release in the initial 3 h and significantly higher oxygen supplying than that of control group. **Conclusion:** The optimized prescription and preparation process of the oxygen self-supplying particles is reasonable and feasible, and the drug encapsulation efficiency is high. Meanwhile, it can increase the generation of singlet oxygen.

Key words: Oxygen self-supplying particles; Single factor investigation; Singlet oxygen

Chinese Library Classification(CLC): R918; R943 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2019)06-1049-06

前言

光动力疗法(photodynamic therapy, PDT)是利用光敏剂在特定波长的光照射下,将吸收的光能传递给组织氧并产生具有细胞毒性的单线态氧(O_2),从而杀伤肿瘤细胞^[1-3]。有研究表明,

分子氧的存在是产生具有肿瘤杀伤作用的 O_2 的必要条件^[4,5],因此,制备一种自带“氧源”的光敏载体系统,在光动力的治疗过程中为其提供氧气,显得尤为重要^[7,9]。

血卟啉单甲醚(hematoporphyrin monomethyl ether, HMME)是 PDT 中常用的光敏剂,具有组成结构单一、性质稳定、对正

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81874348);安徽省教育厅高校自然科学研究重点项目(KJ2018A0282, KJ2017A290);

安徽中医药大学探索性基金项目(2016ts076)

作者简介:胡莹莹(1992-),女,硕士研究生,研究方向:药物新剂型,电话:15056982579, E-mail: huyingying199204@163.com

△通讯作者:尹登科(1977-),男,博士,教授,研究方向:药物新剂型及抗肿瘤作用机制研究,电话:15156890963, E-mail: yindengke@sina.com

(收稿日期:2018-12-06 接受日期:2018-12-26)

常组织光毒性低等优点,是一种前景广阔的药物,现已在临床上试用于浅表肿瘤疾病的治疗^[10-12]。过氧化钙(CaO_2)作为一种无机过氧化物,与水反应能够缓慢地释放出氧气,可作为一种内给氧物质提供氧气^[13]。乙基纤维素(ethyl cellulose, EC)是一种常见的载体材料,因其物理化学性质稳定,生物相容性好且毒性极小,在医药领域中被广泛使用^[14]。因此,本试验采用 EC 作为载体材料,通过液中干燥法制备以 EC 为载体包裹 CaO_2 和 HMME 的自供氧微球,通过单因素考察得到制备该微球的最优处方和最佳工艺,并对该自供氧微球的体外释氧行为进行研究和评价,以期为临床上提高 PDT 效果提供理论依据和实验基础。

1 材料与方法

1.1 仪器

88-1 磁力搅拌器(上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司);UV-1000 紫外分光光度计(上海翱艺有限公司);高速冷冻离心机(赛默飞世尔科技有限公司);超声波细胞破碎仪(宁波新芝有限公司);ZEN 3690 激光散射粒度仪(英国 Malvern 公司);AB135-S 型十万分之一电子天平(瑞士梅特勒公司);HT7700 透射电子显微镜(日本日立公司),荧光酶标仪(美国 Molecular Devices 公司)。

1.2 试剂

血卟啉单甲醚(HMME, 上海源叶生物科技有限公司,纯度 $\geq 95\%$,批号:X09J9H52384);过氧化钙(上海麦克林生化科技有限公司,批号:C10084896);单线态氧荧光探针(SOSG,赛默飞世尔科技有限公司,批号:1923618);乙基纤维素(EC,国药集团化学试剂有限公司,批号:20140324);无水乙醇和二甲基亚砜(DMSO)均购于无锡市亚泰联合化工有限公司。

1.3 自供氧微球的制备

精密称取 500 μg HMME,以无水乙醇溶解,再称取适量的 EC 加入 HMME/无水乙醇溶液中,搅拌形成均匀的 EC 溶液,然后加入适量的 CaO_2 并搅拌使其均匀分散,构成有机相;以水溶液作为水相,高速搅拌的条件下将有机相缓慢滴入水相中,磁力搅拌 2 h 挥去乙醇,得到 ECHMME- CaO_2 微球。然后以 10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min,收集上清以检测包封率,沉淀用 10 mL 蒸馏水洗 3 遍后,冷冻干燥 24 h,储存于 -20°C 冰箱备用。采用相同的方法制备不加 CaO_2 的 ECHMME 微球,同时制备不加 CaO_2 和 HMME 的 EC 微球作为对照。

1.4 自供氧微球的制备工艺优化

选取自供氧微球制备过程中的以下参数作为考察对象:分别为 EC 浓度、有机/水相体积比、水相温度、 CaO_2 投料量,其他实验条件不变,以单一参数为研究对象,按照上述 1.3 的制备方法制备自供氧微球,以粒径和 CaO_2 、HMME 的包封率作为评价指标。

1.5 自供氧微球的理化表征

1.5.1 平均粒径与形貌观察 用适量蒸馏水对微球进行稀释并振荡均匀后置于样品槽中,采用激光粒度散射仪测定微球的平均粒径及粒径分布。取制备好的微球混悬溶液,使用透射电子显微镜对微球的形貌与结构进行观察。

1.5.2 药物包封率的测定 HMME 包封率的测定:采用紫外

分光光度法测定 HMME 包封率。用 DMSO 溶解 HMME 配置成一定浓度的母液,将母液稀释成浓度分别为 0.78、1.56、3.13、6.25、12.50、25.00、50.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 HMME 系列标准溶液,以 DMSO 为参比,分别测定其在 401 nm 处的吸光度值,建立 HMME 的标准曲线。然后收集离心后的上清液测定 HMME 在 401 nm 处的吸光度值,代入 HMME 标准曲线计算上清中 HMME 的质量,按照公式 (1-1) 计算 HMME 的包封率 $EE\%$ (HMME)。 CaO_2 包封率的测定:采用配位滴定法测定 CaO_2 包封率。收集离心后上清液,加入适量稀盐酸使未被包裹的 CaO_2 分解为 Ca^{2+} ,以氨-氯化铵缓冲液调节溶液 pH 至 9.5-10,加入铬黑 T 指示剂适量,用 0.01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA 标准溶液滴定至溶液显纯蓝色,记录消耗的 EDTA 溶液体积 V_{EDTA} ,其中 CaO_2 的摩尔质量用 M_{CaO_2} 表示,按照公式(1-2)计算得上清中 CaO_2 的质量 m_{CaO_2} ,然后按照公式(1-3)计算 CaO_2 的包封率 $EE\%(\text{CaO}_2)$ 。

$$EE\%(\text{HMME}) = \frac{\text{HMME 投药量} - \text{上清中 HMME 质量}}{\text{HMME 投药量}} \times 100\% \quad (1-1)$$

$$m_{\text{CaO}_2} = C_{\text{EDTA}} \times V_{\text{EDTA}} \times M_{\text{CaO}_2} \quad (1-2)$$

$$EE\%(\text{CaO}_2) = \frac{\text{CaO}_2 \text{投药量} - \text{未包裹 CaO}_2 \text{质量}}{\text{CaO}_2 \text{投药量}} \times 100\% \quad (1-3)$$

1.6 自供氧微球的体外释氧实验

将制备好的微球溶液置于透析袋中 ($M_w=8000-14000$),加入 50 mL pH=7.4 的 Tris-HCl 释放介质,转移到摇床内进行氧气释放评价 ($37 \pm 0.5^\circ\text{C}$, $100 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$)。分别在 0、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、24 h 从透析袋外侧取 500 μL 释放液,同时补充等量新鲜的释放介质。由于氧气容易扩散,因此通过配位滴定法测定释放液中 Ca^{2+} 含量(公式 1-2),再根据 CaO_2 分解产生氧气的化学方程式 $2\text{CaO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{O}_2\uparrow$,代入公式(1-4),间接计算氧气释放量。其中 n_{O_2} 表示氧气的物质的量, M_{CaO_2} 表示 CaO_2 摩尔质量, C_{EDTA} 表示 EDTA 标准溶液浓度, V_{EDTA} 表示消耗 EDTA 标准溶液的体积。

$$n_{\text{O}_2} = \frac{1}{2} \frac{C_{\text{EDTA}} \times V_{\text{EDTA}} \times M_{\text{CaO}_2}}{M_{\text{CaO}_2}} = \frac{1}{2} C_{\text{EDTA}} \times V_{\text{EDTA}} \quad (1-4)$$

1.7 自供氧微球产 $^1\text{O}_2$ 能力的测定

以特异性荧光探针 SOSG 进行 $^1\text{O}_2$ 检测^[15]。制备三组微球悬液,分别为 ECHMME- CaO_2 、ECHMME、EC 微球。每组制备 9 份样品,每份 2.5 mL,同时加入 250 μL 、50 μM SOSG,放入透析袋中($M_w=8000-14000$),置于 50 mL pH=7.4 的 Tris-HCl 释放液中(制备微球的溶液和释放液均经煮沸脱气处理),用 532 nm (500 mw/cm^2)激光器对样品进行不间断照射,分别在 0、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4 h 取出透析袋,吸取 500 μL 样品以 3000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的转速离心 5 min,收集上清,用荧光酶标仪对样品中 SOSG 的荧光强度进行测定(激发波长 504 nm,发射波长 525 nm),整个过程在黑暗避光环境中进行。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 24.0 统计软件,两组间比较用 t 检验,多组间比较用单因素方差分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 HMME 含量测定标准曲线的建立

以浓度 $C(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ 为横坐标,吸光度 A 为纵坐标,进行线性回归建立 HMME 的标准曲线,得到线性回归方程为 $A=0.0324C+0.0008$, $R^2=0.9999$,如图 1,结果表明 HMME 在 $0.78\sim 50.00\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内吸光度与 HMME 浓度线性关系良好。

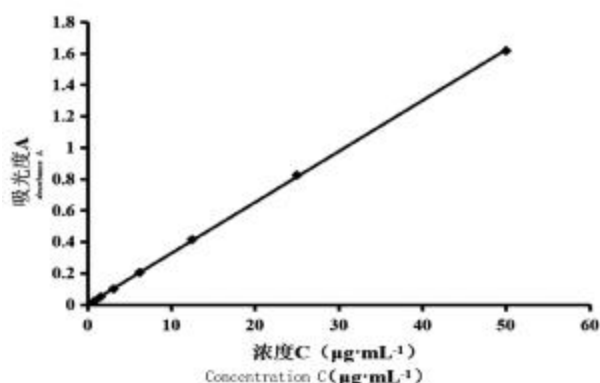


图 1 HMME 含量测定标准曲线

Fig. 1 HMME content determination standard curve

表 1 EC 浓度对微球性能的影响($n=3, \bar{x}\pm s$)

Table 1 Effect of EC concentration on microsphere performance($n=3, \bar{x}\pm s$)

Groups	EC concentration /%	Particle size /nm	$EE_{\text{CaO}_2}/\%$	$EE_{\text{HMME}}/\%$
1	0.5	1026± 128	84.60± 3.02	81.35± 2.56
2	1	1582± 332	86.58± 2.88	88.96± 1.59*
3	2	2307± 216	83.42± 2.17	84.31± 2.13
4	3	—	—	—
5	4	—	—	—

Note: Group 2 is compared with groups 1 and 3, * $P<0.05$.

表 2 有机 / 水相体积比对微球性能的影响($n=3, \bar{x}\pm s$)

Table 2 Effect of organic/aqueous phase volume ratio on microsphere performance ($n=3, \bar{x}\pm s$)

Groups	Volume ratio of organic/aqueous phase	Particle size /nm	$EE_{\text{CaO}_2}/\%$	$EE_{\text{HMME}}/\%$
1	1:2	1081± 142	80.98± 1.52	82.35± 1.56
2	1:3	1320± 274	88.46± 0.92*	90.96± 1.59*
3	1:4	2958± 181	81.92± 1.67	84.31± 2.93
4	1:5	3137± 189	84.56± 1.99	86.26± 3.35
5	1:10	3733± 230	78.13± 1.87	80.39± 1.61

Note: Group 2 compared with the remaining groups, * $P<0.05$.

2.2.3 水相温度对微球性能的影响 固定 EC 浓度为 1%,有机 / 水相体积比为 1:3, CaO_2 投料量为 30 mg,考察水相温度分别为 0、20、30、40、50 ℃ 时对微球性能的影响。结果如表 3 所示:水相温度对粒径的影响较大,当水相温度为 30 ℃, CaO_2 和 HMME 的包封率最高。此后随着水相温度的升高,包封率呈下降趋势。对包封率进行统计分析,组 3 显著性高于其它各组($P<0.05$)。因此综合考虑,选择最佳水相温度为 30 ℃。

2.2.4 CaO_2 投料量对微球性能的影响 固定 EC 浓度为 1%,有机 / 水相体积比为 1:3,水相温度为 30 ℃,考察 CaO_2 投料量分别为 10、20、30、40、50 mg 时对微球性能的影响。结果如表 4

2.2 自供氧微球单因素考察的结果

2.2.1 EC 浓度对微球性能的影响 固定有机 / 水相体积比为 1:3,水相温度 30 ℃, CaO_2 投料量为 30 mg,考察 EC 浓度分别为 0.5%、1%、2%、3%、4%时对微球性能的影响。结果如表 1 所示:当 EC 浓度增大至 3%和 4%时,制备过程中出现肉眼可见的大块絮状物沉降,无法制成微球,其余各组间 CaO_2 的包封率无统计学差异($P>0.05$)。当 EC 浓度为 1%时, HMME 的包封率显著高于其它各组($P<0.05$),且粒径大小适中。故选择 EC 浓度为 1%用于后续实验。

2.2.2 有机 / 水相体积比对微球性能的影响 固定 EC 浓度为 1%,水相温度 30 ℃, CaO_2 投料量为 30 mg,考察有机 / 水相体积比分别为 1:2、1:3、1:4、1:5、1:10 时对微球性能的影响。结果如表 2 所示:随着水相体积的增加,粒径逐渐增大; CaO_2 和 HMME 的包封率呈现不规则变化的趋势,当有机 / 水相体积比为 1:3 时, CaO_2 和 HMME 的包封率显著高于其它各组 ($P<0.05$)。因此选择 1:3 作为最佳有机 / 水相体积比进行后续实验。

所示:随着 CaO_2 投料量的加大,药物的包封率和粒径均呈现增大的趋势。组 4 中 CaO_2 与 HMME 的包封率显著性高于 1、2、3 组($P<0.05$),组 5 中 CaO_2 与 HMME 的包封率虽然高于组 4,但与组 5 相比无统计学差异($P>0.05$)。因此,选择 CaO_2 的最佳投料量为 40 mg。

2.2.5 自供氧微球最优制备条件的确定 由单因素考察结果得出自供氧微球的最优制备条件为:EC 浓度为 1%,有机 / 水相体积比 1:3,水相温度 30 ℃, CaO_2 投料量 40 mg。按照最佳处方和工艺制备三批自供氧微球,其测定结果见表 5。由表 5 结果可知,三次实验结果 CaO_2 和 HMME 的包封率均较高,粒径

表 3 水相温度对微球性能的影响(n=3, $\bar{x}\pm s$)

Table 3 Effect of water phase temperature on microsphere performance(n=3, $\bar{x}\pm s$)

Groups	Aqueous phase temperature / $^{\circ}\text{C}$	Particle size /nm	$EE_{\text{CaO}_2}/\%$	$EE_{\text{HMME}}/\%$
1	0	925 $\pm$ 176	79.97 $\pm$ 1.95	82.63 $\pm$ 2.97
2	20	1022 $\pm$ 131	80.53 $\pm$ 2.75	84.32 $\pm$ 1.46
3	30	1367 $\pm$ 305	87.81 $\pm$ 1.88*	90.63 $\pm$ 1.35*
4	40	1160 $\pm$ 104	84.77 $\pm$ 1.48	86.09 $\pm$ 1.92
5	50	522 $\pm$ 67	81.86 $\pm$ 2.63	83.76 $\pm$ 1.61

Note: Group 3 compared with the remaining groups, * $P<0.05$.

表 4 CaO_2 投料量对微球性能的影响(n=3, $\bar{x}\pm s$)

Table 4 Effect of CaO_2 dosage on microsphere performance(n=3, $\bar{x}\pm s$)

Groups	CaO_2 dosage /mg	Particle size /nm	$EE_{\text{CaO}_2}/\%$	$EE_{\text{HMME}}/\%$
1	10	876 $\pm$ 242	76.17 $\pm$ 3.94	80.22 $\pm$ 1.26
2	20	1025 $\pm$ 125	80.63 $\pm$ 2.02	83.35 $\pm$ 2.04
3	30	1212 $\pm$ 368	84.54 $\pm$ 1.05	88.12 $\pm$ 1.26
4	40	1326 $\pm$ 273	88.15 $\pm$ 1.29*	91.63 $\pm$ 0.87*
5	50	1693 $\pm$ 95	89.64 $\pm$ 2.53	92.09 $\pm$ 2.18

Note: Group 4 is compared with groups 1, 2 and 3, * $P<0.05$.

稳定均一,表明该最优处方和工艺重现性良好。

2.3 自供氧微球的粒径和形貌表征

经马尔文粒度仪检测,自供氧微球的粒径为 (1198 $\pm$ 147)

nm,PDI 为(0.243 $\pm$ 0.041),粒径均一(图 2A)。透射电镜结果如图 2B 所示:微球呈不规则的球形,粒径约 1 μm ,与粒径测定结果相符,大量 CaO_2 颗粒分散于微球中。

表 5 验证实验结果(n=3, $\bar{x}\pm s$)

Table 5 Verify experiment results (n=3, $\bar{x}\pm s$)

Serial number	1	2	3	Average $\pm$ standard deviation
粒径 /nm	1336	1217	1043	1198 $\pm$ 147
$EE_{\text{CaO}_2}/\%$	91.00	88.66	87.76	89.14 $\pm$ 1.67
$EE_{\text{HMME}}/\%$	95.01	88.12	92.37	91.83 $\pm$ 3.48

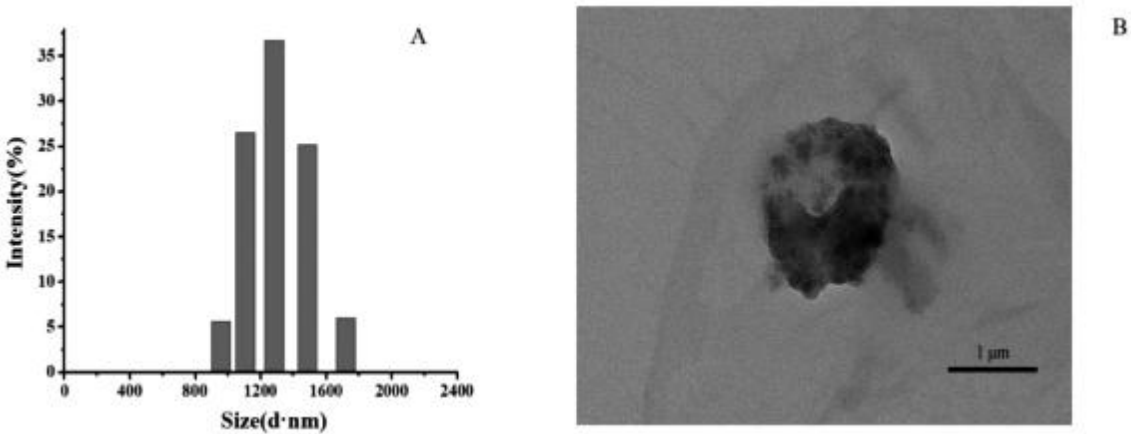


图 2 自供氧微球的粒径分布与透射电镜图

A 粒径分布图;B 透射电镜图

Fig. 2 Particle size distribution and transmission electron microscopy of self-oxygenated microspheres

A: Particle size distribution; B: Transmission electron micrograph

2.4 自供氧微球体外释氧实验

通过测定释放介质中 Ca^{2+} 含量间接评价自供氧微球

$\text{EC}_{\text{HMME-CaO}_2}$ 的体外释氧行为。结果如图 3 所示:自供氧微球以缓慢匀速释放氧气,3 h 左右达到平台期,此时氧气的累积释放量

为 (99.87 ± 4.32) mM。

2.5 自供氧微球产 $^1\text{O}_2$ 能力测定

自供氧微球产 $^1\text{O}_2$ 能力如图4所示:空白EC微球由于没有光敏剂HMME的存在其荧光强度始终维持在较低水平;EC_{HMME}微球组荧光强度在实验过程中维持在同一水平不发生

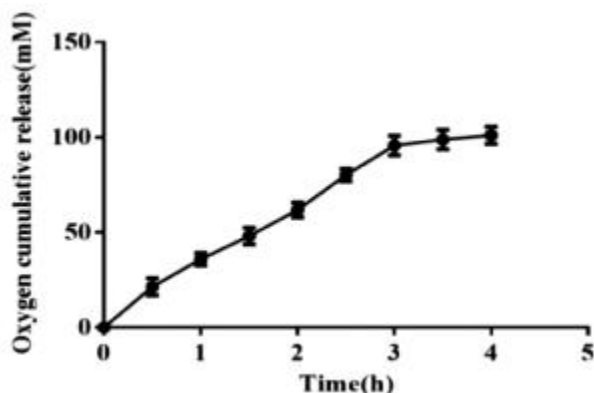


图3 氧气累积释放曲线

Fig. 3 Oxygen cumulative release curve

3 讨论

癌症已成为全球范围内死亡的主要原因之一。PDT在临床上已被广泛应用于许多局部和表面的癌症治疗^[15-17]。PDT治疗的策略是肿瘤内富集的光敏剂被特定波长的光照射,吸收能量后被激活,产生大量的 $^1\text{O}_2$,进而有效的清除肿瘤细胞,抑制肿瘤生长^[18-21]。PDT需要光敏剂、光、氧气三种因素的共同参与才能产生起治疗作用的 $^1\text{O}_2$,其中光敏剂HMME作为能量传递的使者,其存在是至关重要的,此外组织氧含量也是限制PDT的主要因素。有研究发现,随着PDT治疗的进行,肿瘤组织内的氧含量会急剧下降,超过肿瘤微血管的氧供应量,造成肿瘤内缺氧,进而限制PDT的抗肿瘤效应^[22-25]。只有当肿瘤组织氧含量大于组织最大氧代谢率($1.5 \text{ cm}^3/100 \text{ g/min}$)时,才能产生有效的PDT效果,因此充足的氧气是产生具有细胞毒性作用的 $^1\text{O}_2$ 的必要条件^[26-28]。本研究制备了一种新型的自供氧光敏载体系统用来改善光动力治疗过程中氧气供给不足的问题。与传统的PDT相比,本试验制备的自带“氧源”的光敏载体系统可通过 CaO_2 分解释放氧气来补充体系中的氧气含量从而提高PDT中 $^1\text{O}_2$ 的产率,氧气通过扩散作用进入肿瘤基质,从而增强肿瘤微环境中氧气含量,达到更好的杀伤肿瘤细胞的目的。

本试验选择EC作为载体材料,其具有减缓药物溶出的作用^[29]。在单因素筛选实验中,EC浓度为1%、有机/水相体积比1:3、水相温度 30°C 、 CaO_2 投料量40 mg为自供氧微球的最佳制备处方。在最佳制备工艺的条件下,制得的微球粒径均一,药物包封率高,透射电镜下观察 CaO_2 成功包裹于微球内。通过 CaO_2 的自发分解主动释氧以补充光动力治疗过程所需的氧气,此外 CaO_2 分解的产物无生物毒性,不会对人体造成伤害。但药物载体的研究,最后要经过离体细胞实验和动物实验检测才可以进入临床使用,因此,本研究结论还需后期研究进一步验证。

如上所述,本研究制备的自供氧微球是可以在缺氧条件下

变化,显著高于空白EC微球($P < 0.05$),但显著低于自供氧微球EC_{HMME-CaO2} ($P < 0.05$);自供氧微球EC_{HMME-CaO2}荧光强度随着时间逐渐增加,在3 h左右达到平台期。表明EC_{HMME-CaO2}自供氧微球可通过 CaO_2 分解释放氧气以增加 $^1\text{O}_2$ 的产生。

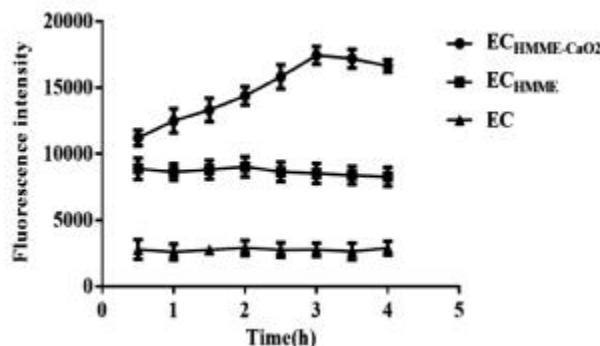


图4 EC_{HMME-CaO2}、EC_{HMME}、EC组 SOSG 荧光强度随时间的变化关系

Fig. 4 Relationship between fluorescence intensity of SOSG in EC_{HMME-CaO2}、EC_{HMME} and EC groups with time

实现光动力高效治疗的设计,该方法的效用并不局限于光动力治疗,还可用于组织再生或组织工程等其他受到缺氧影响的治疗。这种自供氧光动力疗法不仅为临床治疗癌症提供了新的思路,具有广阔的应用前景。具体的抗肿瘤作用及其作用机制有待于后续实验的继续研究。

参考文献(References)

- [1] Datta S, Hovan A, Jutkova A, et al. Phosphorescence Kinetics of Singlet Oxygen Produced by Photosensitization in Spherical Nanoparticles. Part II. The Case of Hypericin-Loaded Low-Density Lipoprotein Particles[J]. J Phys Chem B, 2018, 122(20): 5154-5160
- [2] Griesbeck A G, Banu Öngel, Atar M. New phthalimide-methionine dyad-based fluorescence probes for reactive oxygen species: Singlet oxygen, hydrogen peroxide, and hypochlorite [J]. Journal of Physical Organic Chemistry, 2017, 30(9): e3741
- [3] Cheng H. Perfluorocarbon nanoparticles enhance the efficacy of photodynamic therapy [D]. Nanjing University, 2016
- [4] Zampini G, Planas O, Marmottini F, et al. Morphology effects on singlet oxygen production and bacterial photoinactivation efficiency by different silica-protoporphyrin IX nanocomposites [J]. Rsc Advances, 2017, 7(24): 14422-14429
- [5] Vagin N P, Ionin A A, Kochetov I V, et al. A prototype of an electric-discharge gas flow oxygen iodine laser: I. Modeling of the processes of singlet oxygen generation in a transverse cryogenic slab RF discharge[J]. Plasma Physics Reports, 2017, 43(3): 330-339
- [6] Chen Y Z, Wang Z U, Wang H, et al. Singlet Oxygen-Engaged Selective Photo-Oxidation over Pt Nanocrystals/Porphyrinic MOF: The Roles of Photothermal Effect and Pt Electronic State [J]. Journal of the American Chemical Society, 2017, 139(5): 2035
- [7] Zanocco R P, Bresoli-Obach R, Nonell S, et al. Structure-activity study of furyl aryloxazole fluorescent probes for the detection of singlet oxygen[J]. Plos One, 2018, 13(7): e0200006
- [8] Petrou A L, Terzidaki A. A meta-analysis and review examining a possible role for oxidative stress and singlet oxygen in diverse

- diseases[J]. *Biochemical Journal*, 2017, 474(16): 2713-2731
- [9] Guo Z, Wang R F, Meng X H, et al. Experimental studies on hematoporphyrin monomethyl ether-mediated photodynamic therapy on human esophagus cancer xenografts tumor in nude mice in vivo[J]. *Chin J Gastroenterol Hepatol*, 2015, 24(12): 1468-1471
- [10] Du S W, Zhang L K, Han K, et al. Combined PC and HMME for breast cancer treatment via photosensitizers modified Fe₃O₄ nanoparticles inhibiting the proliferation and migration of MCF-7 cells[J]. *Biomacromolecules*, 2017: acs.biomac.7b01197
- [11] Zhao H, Li L, Zheng C, et al. An intelligent dual stimuli-responsive photosensitizer delivery system with O₂-supplying for efficient photodynamic therapy [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2018, 167: 299-309
- [12] Shi W, Yin Y, Wang Y, et al. A tissue factor-cascade-targeted strategy to tumor vasculature: a combination of EGFP-EGF1 conjugation nanoparticles with photodynamic therapy[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(19): 32212-32227
- [13] Gao F, Sun M, Ma W, et al. A Singlet Oxygen Generating Agent by Chirality-dependent Plasmonic Shell-Satellite Nanoassembly [J]. *Advanced Materials*, 2017, 29(18): 1606864
- [14] Kim M M, Penjweini R, Zhu T C. Evaluation of singlet oxygen explicit dosimetry for predicting treatment outcomes of benzoporphyrin derivative monoacid ring A-mediated photodynamic therapy[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2017, 22(2): 28002
- [15] Tai C, Zhang S, Yin Y, et al. Solar-induced generation of singlet oxygen and hydroxyl radical in sewage wastewaters [J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2017, 15(3): 515-523
- [16] Wu Qiu-ju, Zhou Z C, Lin T, et al. Clinical observation on hemoporphin-aided photodynamic therapy for port wine stains[J]. *Chin J Laser Med Surg*, 2018, 27(01): 1-5+58
- [17] Ping J T, Peng H S, Qin J, et al. A fluorescent nanoprobe for real-time monitoring of intracellular singlet oxygen during photodynamic therapy[J]. *Microchimica Acta*, 2018, 185(5): 269
- [18] Zou J, Yin Z, Wang P, et al. Photosensitizer synergistic effects: D-A-D structured organic molecule with enhanced fluorescence and singlet oxygen quantum yield for photodynamic therapy[J]. *Chemical Science*, 2018, 9(8): 2188
- [19] Gao F, Sun M, Ma W, et al. Photodynamic Therapy: A Singlet Oxygen Generating Agent by Chirality dependent Plasmonic Shell Satellite Nanoassembly (*Adv. Mater.* 18/2017) [J]. *Advanced Materials*, 2017, 29(18): 1606864
- [20] SUN P P, CHEN J W, SHANG S B, et al. Preparation of ethyl cellulose/naproxen composite microspheres through emulsion-solvent evaporation method [J]. *Biomass Chemical Engineering*, 2017, 51(01): 8-12
- [21] Tsimvraikidis K, Gemmell N, Erotokritou K, et al. Enhanced optics for time-resolved singlet oxygen luminescence detection [J]. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 2018, 25(1): 1-1
- [22] Callaghan S, Filatov M A, Sitte, et al. Delayed release singlet oxygen sensitizers based on pyridone-appended porphyrins[J]. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 2017, 16(9): 1371-1374
- [23] Watanabe N, Hiragaki K, Tsurumi K, et al. Solvent- and temperature-controlled inversion of π -facial selectivity in the 1,2-cycloaddition of singlet oxygen to hydroxyphenyl-substituted cyclohexadihydrofurans[J]. *Tetrahedron*, 2017, 73(14): 1845-1853
- [24] Jarnikova E S, Parkhats M V, Stasheuski A S, et al. Effect of Solvent Dielectric Properties on the Spontaneous-Emission Rate Constant of Molecular Singlet Oxygen[J]. *Journal of Applied Spectroscopy*, 2017, 83(6): 1-6
- [25] Jenie S N A, Plush S E, Voelcker N H. Singlet Oxygen Detection on a Nanostructured Porous Silicon Thin Film via Photonic Luminescence Enhancements[J]. *Langmuir*, 2017, 33(35): 8606-8613
- [26] Jiang H Y, Zhang J F, Jiang S F, et al. Preparation and in vitro evaluation of stomach adhesive microspheres loaded berberine [J]. *Chin J Biochem Pharm*, 2015, 35(01): 30-33
- [27] Thapa B, Munk B H, Burrows C J, et al. Computational Study of Oxidation of Guanine by Singlet Oxygen ($^1\Delta_g$) and Formation of Guanine: Lysine Cross Links [J]. *Chemistry - A European Journal*, 2017, 23(24): n/a-n/a
- [28] Westberg M, Mikkel Bregnhøj, Etzerodt M, et al. Temperature Sensitive Singlet Oxygen Photosensitization by LOV-Derived Fluorescent Flavoproteins [J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2017, 121(12): 2561-2574
- [29] Yin H J, Liu Y J, Gao J, et al. A highly sensitive and selective visible-light excitable luminescent probe for singlet oxygen based on a dinuclear ruthenium complex [J]. *Dalton Transactions*, 2017, 46(10): 3325

(上接第 1187 页)

- [35] Bruncko M, Wang L, Sheppard GS, et al. Structure-guided design of a series of MCL-1 inhibitors with high affinity and selectivity[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2015, 58(5): 2180-2194
- [36] Leveson J D, Zhang H, Chen J, et al. Potent and selective small-molecule MCL-1 inhibitors demonstrate on-target cancer cell killing activity as single agents and in combination with ABT-263 (navitoclax)[J]. *Cell Death & Disease*, 2015, 6(1): e1590
- [37] DA Luedtke, Yubin Ge, Xiaojia Niu, et al. Inhibition of Mcl-1 enhances cell death induced by the Bcl-2-selective inhibitor ABT-199 in acute myeloid leukemia cells[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2017, 7(23): 34785-34799
- [38] Besbes S, Pocard M, Mirshahi M, et al. The first MCL-1-selective BH3 mimetics have therapeutic potential for chronic lymphocytic leukemia[J]. *Critical Reviews in Oncology/hematology*, 2016, 100(1): 32-36
- [39] Liu T, Wan Y, Liu R, et al. Design, synthesis and preliminary biological evaluation of indole-3-carboxylic acid-based skeleton of Bcl-2/Mcl-1 dual inhibitors[J]. *Bioorg Med Chem*, 2017, 25(6): 1939-1948
- [40] Hird A W, Secrist J P, Adam A, et al. Abstract DDT01-02: AZD5991: A potent and selective macrocyclic inhibitor of Mcl-1 for treatment of hematologic cancer [J]. *Cancer Research*, 2017, 77(13 Supplement): DDT01-02-DDT01-02