

## 磷脂包覆银-石墨烯量子点多功能纳米粒的制备与体外评价

潘巧贝<sup>1</sup>, 张婧<sup>2</sup>, 李翔<sup>1\*</sup>, 房元英<sup>3</sup>, 金一<sup>3\*</sup>

(江西中医药大学 1. 创新药物与节能降耗制药设备国家重点实验室, 2. 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330028; 3. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330004)

**摘要:** 本文制备了磷脂包覆银-石墨烯量子点多功能纳米粒 (ADG-DDPC) 并对其进行了体外评价。通过正负电荷之间的相互吸引作用, 使得阳离子磷脂 1,2-二油烯氧基-3-三甲氨基丙烷 (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane) (DOTAP) 优先吸附在银纳米粒 (AgNPs) 内核的表面, 利用相转换原理及疏水作用使得二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇-环肽 (DSPE-PEG<sub>2000</sub>-cRGD) 自组装到 DOTAP 表面, 形成稳定的多功能纳米制剂, 并对其紫外吸收特性、粒径分布性质、形貌、释放行为、杀灭癌细胞能力及细胞摄取情况进行研究。合成的纳米制剂的最大紫外吸收峰在 400 nm 左右, 马尔文粒径仪及透射电子显微镜均证明了该纳米制剂粒径约为 30~40 nm, 分布均一。纳米制剂的释放与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度呈正相关。与 AgNPs 对肿瘤细胞的 IC<sub>50</sub> 值 [(347.78 ± 0.06) ng·mL<sup>-1</sup>] 比较, ADG-DDPC 的 IC<sub>50</sub> 值为 (209.68 ± 0.09) ng·mL<sup>-1</sup>, 具有更强的细胞毒性。通过细胞摄取实验, 证实了该纳米制剂能被肿瘤细胞摄取, 且能在肿瘤部位发光。本文成功制备了 ADG-DDPC, 该制剂体外具有肿瘤细胞标记的作用及较高体外抗肿瘤活性。

**关键词:** 银纳米粒; 磷脂; 细胞毒性; 石墨烯量子点; 荧光成像

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2019)02-0366-07

## Preparation and *in vitro* evaluation of phospholipid-coated silver-graphene quantum dot multifunctional nanoparticles

PAN Qiao-bei<sup>1</sup>, ZHANG Jing<sup>2</sup>, LI Xiang<sup>1\*</sup>, FANG Yuan-ying<sup>3</sup>, JIN Yi<sup>3\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Innovative Drug and Efficient Energy-Saving Pharmaceutical Equipment, 2. Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330028, China; 3. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

**Abstract:** In this paper, multifunctional silver-graphene quantum dot nanoparticles coated with phospholipids (ADG-DDPC) were prepared and their properties were evaluated *in vitro*. Cationic phospholipids 1,2-diolefinoxy-3-trimethyl-laminopropane (DOTAP) was absorbed first onto the surface of the core of silver nanoparticle (AgNPs) through the mutual attraction between the positive and negative charge. Based on the principle of phase transformation and hydrophobic interaction, distearyl-phosphatidylglycolamine-polyethylene-glycol-cyclic-cRGD peptide (DSPE-PEG<sub>2000</sub>-cRGD) self-assembled onto the outlayer of DOTAP of AgNPs. A stable multifunctional nano-preparation was formed and its ultraviolet absorption, particle size distribution, morphology, *in vitro* release behavior, ability to kill cancer cells and cell uptake were studied. The maximum UV absorption of the synthesized nanometer preparation was about 400 nm. Malvern particle size meter and transmission electron microscope

收稿日期: 2018-11-23; 修回日期: 2018-12-14.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81603054, 81373347, 81560575, 81760639); 江西省杰出青年基金资助项目 (20171BCB23097, 20162BCB23034); 江西省青年科学基金重点项目 (20171ACB21074); 江西省卫生厅中医药科研课题 (2016A008).

\*通讯作者 Tel: 86-791-87119650, E-mail: jinyizju@hotmail.com;

Tel: 86-791-87119661, E-mail: sterlinghawk@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-1054

showed that the particle size of the nano-preparation was about 30-40 nm and its particle size distribution was uniform. The *in vitro* release of nano-preparation was positively correlated with the concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The IC<sub>50</sub> value of AgNPs for tumor cells was (347.78 ± 0.06) ng · mL<sup>-1</sup>, and the IC<sub>50</sub> value of ADG-DDPC for tumor cells was (209.68 ± 0.09) ng · mL<sup>-1</sup>, indicating that ADG-DDPC possessed a stronger cytotoxicity than that of AgNPs. Cell uptake experiment showed that ADG-DDPC could be absorbed by tumor cells and exhibited fluorescence inside those cells. In conclusion, ADG-DDPC was successfully prepared, and *in vitro* characterization study pointed to that the nano-preparation exhibits a higher antitumor activity than AgNPs.

**Key words:** silver nanoparticles; phospholipid; cytotoxicity; graphene quantum dot; fluorescence imaging

银纳米粒 (AgNPs) 已经广泛被人们使用, 如感光材料<sup>[1]</sup>、装饰材料、催化材料、抗菌材料<sup>[2-4]</sup>及医用材料等。目前其制备方法很多, 形态多样如球状、管状和棒状等<sup>[5-7]</sup>。随着 AgNPs 在杀菌方面的优势日益突出, 不少研究小组开始研究其在抗肿瘤细胞方面的可能。

石墨烯量子点 (GQDs) 是由石墨烯延伸而来的一种新型材料。利用 GQDs 的光致发光性质, 改变 GQDs 的粒径, 会使它导带和价带之间的能级间隙改变, 这一特性直接影响 GQDs 的发射波长随粒径的改变而变化<sup>[8]</sup>, 如果能够准确将 GQDs 运送到肿瘤部位, 利用其光致发光这一重要特性, 在外界光源作用下, 使其在肿瘤部位发光, 能够指示病灶组织, 引导手术成功进行<sup>[9-11]</sup>。靶向制剂是指在制剂表面修饰靶向配体或抗体, 根据肿瘤表面一些特异性受体, 使其能够较为精确地将药物或杀灭肿瘤细胞材料运送到肿瘤组织内部。

cRGD 是一种含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (RGD) 序列的环肽, 首先 RGD 特异性作用在肿瘤细胞表面或肿瘤血管内皮细胞表面的  $\alpha_v\beta_3$  整合素受体表面, 然后细胞表面的特异性蛋白水解酶将 cRGD 断开, 形成了激活的 CendR 特异性识别并激活细胞表面 neuropilin-1 受体, 在该受体的作用下实现靶向穿膜<sup>[12]</sup>, 将聚乙二醇 (PEG) 作为一种长循环运输包衣, 在 PEG 外部修饰 cRGD, 利用二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇-环肽 (DSPE-PEG<sub>2000</sub>-cRGD) 耦联功能性纳米材料, 使其不仅能够体内保持长循环特性, 而且在这过程中最大程度地将纳米材料运送到肿瘤部位<sup>[13,14]</sup>。为实现药物在肿瘤部位的深部输送, Cabral 等<sup>[15]</sup>研究了粒径与肿瘤组织渗透性之间的关系, 结果显示, 小于 50 nm 的载体对于贫供血肿瘤有较好的组织渗透性, 所有聚合物胶束 (粒径 30、50、70 和 100 nm) 均可穿透小鼠的高度可渗透性肿瘤组织, 但只有 30 nm 胶束可以渗透胰腺肿瘤以达到抗肿瘤作用。在本文中, 构建了一个以无机纳米银材料作为内部核心, 利用 GQDs 的荧光定位功能, 加以外部修饰磷脂 1,2-二油酰氧基-3-三甲氨基丙烷 (DOTAP) 和 DSPE-PEG<sub>2000</sub>-cRGD 两种磷脂材料的、粒径小于 50 nm 的既能够靶向到肿瘤

组织, 又能在体内实现长循环的一种新型纳米制剂, 以期实现“诊疗一体化”。

## 材料与方法

**材料和仪器** SH-DNA (5'-SHGGAGTTGGGGA GGAGG-3') 巯基连接的 ssDNA (上海生工生物工程有限公司); 氨基化 GQDs (南京先锋纳米有限公司); 三(2-羧乙基) 膦 (TCEP, Sigma 公司)。DOTAP、DSPE-PEG<sub>2000</sub>-cRGD (上海艾维特医药科技有限公司); 人宫颈癌细胞系 HeLa 获自中国科学院细胞库; 硝酸银、柠檬酸钠 (国药集团化学试剂有限公司); 硼氢化钠 (广东光华化学厂有限公司); 浓盐酸 (西陇科学股份有限公司); 磷酸盐缓冲液 (PBS, 索莱宝生物科技有限公司); 胎牛血清 (美国 Gibco 公司); 含双抗的高糖培养基 (DMEM)、胰蛋白酶-EDTA 消化液 (0.25%, 北京索莱宝科技有限公司); L-多聚赖氨酸包被细胞爬片 (大连靛宜生物科技有限公司); 细胞膜红色荧光探针 (DiI, 上海碧云天生物技术有限公司); 4% 多聚甲醛固定液 (阿拉丁生化科技股份有限公司); 再生纤维素透析袋 (截留分子量 10 000 Da, 上海源叶生物有限公司); 去离子水 (Milli-Q Integral 5 超纯水机); 50 nm 过滤器 (德国赛多利斯集团); 其他试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

透射电子显微镜 TEM (JEM2100, 日本电子株式会社); HC-3018R 高速冷冻离心机 (安徽中科中佳科学仪器有限公司); CO<sub>2</sub> 细胞培养箱 (美国 Thermo Scientific 公司); SpectraMax<sup>®</sup>i3 酶标仪 (美谷分子仪器上海有限公司); PB-21pH 计 (赛多利斯科学仪器北京有限公司); Eclipse Ni-U 正置荧光显微镜 (日本尼康公司); Zetasizer Nano ZS ZEN3690 (英国 Malvern 公司); UV-2550 紫外/可见分光光度计 (日本岛津公司); DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器 (河南巩义予华仪器有限责任公司); FLS 980 稳态瞬态荧光光谱仪 (爱丁堡仪器有限公司)。

**ADG-DDPC 的制备** 本文根据文献<sup>[16]</sup>报道的方法, 采用化学还原法, 利用硼氢化钠将银原子还原得到

单质态的银纳米粒水溶液来获得实验所需的银纳米粒。经过预实验,首先取 $3.3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬酸钠水溶液 $30\text{ mL}$ 和 $6.6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼氢化钠水溶液 $90\text{ mL}$ ,冰浴条件下混合均匀。再取 $3.3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硝酸银滴加到上述混合液中,滴加过程保持冰浴及用力搅拌。反应结束后,移至暗处过夜,存放在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。为构建AgNP-DNA-GQDs (ADG),首先将序列为5'-SHGGAGTTGGGGAGGAGG-3'的ssDNA进行巯基的活化。取 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ TCEP和 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ssDNA各 $20\text{ }\mu\text{L}$ ,在pH 6的BR缓冲液中孵育1 h。ssDNA加入到 $6\text{ mL}$ 制备好的AgNPs中孵育5 min。再加入一定体积的pH 3柠檬酸三钠-盐酸缓冲液继续孵育5 min(每 $1\text{ }\mu\text{L}$ 缓冲液加AgNP  $100\text{ }\mu\text{L}$ ),并再次加入等体积pH 3柠檬酸三钠-盐酸缓冲液孵育20 min,加入3倍体积量的BR缓冲液, $12\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心20 min,再用4~5倍BR缓冲液洗,去除多余DNA,然后AgNP-DNA重新分散在 $5\text{ mL}$ BR缓冲液中备用。取 $5\text{ mL}$ AgNP-DNA加入 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ GQDs  $1\text{ mL}$ 中,室温孵育2 h,用截留分子质量为 $10\text{ }000\text{ Da}$ 的透析袋透析6 h,将未吸附的GQDs除去,备用。精密称取DOTAP  $9.6\text{ mg}$ 、DSPE-PEG<sub>2000</sub>-cRGD  $2.4\text{ mg}$ 于 $2\text{ mL}$ 甲醇中溶解,取不对称磷脂 $200\text{ }\mu\text{L}$ ,缓慢注入到上述制备好的ADG中,在 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中孵育约30 min,在此期间进行缓慢地摇晃,待磷脂吸附于ADG内核表面后,取 $2\text{ mL}$ 于透析管中透析8 h以上,保证有机相甲醇被完全透析出去。将制备好的磷脂复合物在 $50\text{ nm}$ 过滤装置下过滤,确保得到的磷脂复合物粒径在 $50\text{ nm}$ 以下,制得ADG-DDPC纳米制剂。制备过程示意图如图1所示。

**AgNPs、AgNP-DNA及ADG-DDPC的紫外表征** 取AgNPs和AgNP-DNA各 $2\text{ mL}$ 于两面透光的比色皿中,用紫外/可见分光光度计下测其在 $300\sim 800\text{ nm}$ 之间的吸光度。将ADG-DDPC用超纯水稀释至 $20.43$ 、 $10.22$ 、 $5.11$ 和 $2.56\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,分别测其吸光度。

**ADG、ADG-DDPC的粒径及其稳定性的研究** 取ADG-DDPC  $1\text{ mL}$ 于四面透光的比色皿中,采用马尔文激光粒度测定仪测定纳米制剂的粒径。经预实验,将内核ADG、ADG-DDPC放置于避光的 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱,并取其各个时间点的粒径大小。

**AgNPs、GQDs、AgNP/GQDs、ADG及ADG-DDPC的透射电镜表征** 将AgNPs与GQDs按照ADG-DDPC制剂比例进行物理混合后,制得AgNP/GQDs;取少量上述各溶液,滴于覆有碳膜的铜网上,自然干燥后,于透射电镜下观察其形貌特征。

**ADG-DDPC中的GQDs的释放** 取GQDs  $2\text{ mL}$ 于四面透光比色皿中,确定其激发波长与发射波长,根

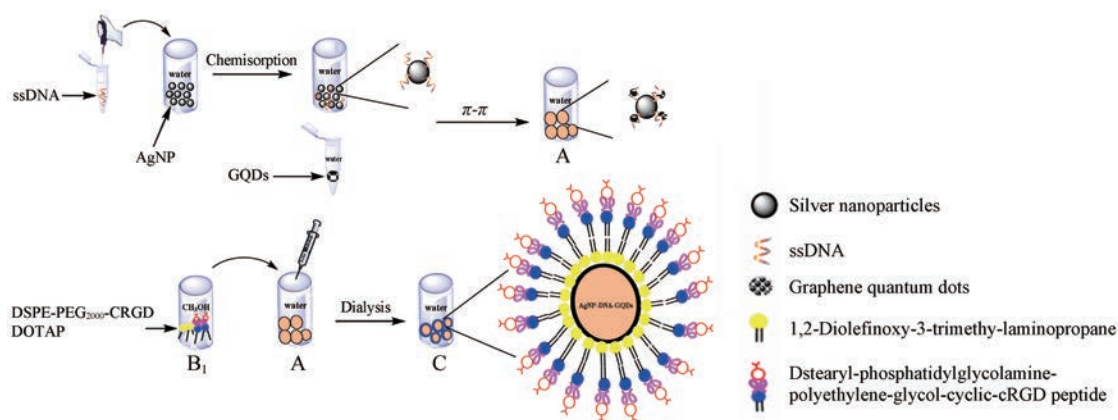
据测得的GQDs最大的激发波长与发射波长,检测ADG-DDPC在 $0.2\sim 400\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ H}_2\text{O}_2$ 中、于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光孵育50 min(模拟肿瘤细胞内较高浓度的 $\text{H}_2\text{O}_2$ )的荧光光谱。

**定量AgNPs、ADG-DDPC中的银** 量取试样原液 $1\text{ mL}$ ,加入硝酸 $5\text{ mL}$ ,于电热板上 $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ 消解6 h,待消解完全后转移至 $50\text{ mL}$ 量瓶中,用2%稀硝酸定制刻度,摇匀待测。根据加入硝酸银的量完全反应时生成的粒子浓度计算,用电感耦合等离子体光谱仪(ICP-MS)<sup>[17,18]</sup>测定溶液中银的浓度,仪器条件如下:射频功率 $1\text{ }550\text{ W}$ ,冷却气 $14\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ,辅助气 $0.776\text{ }3\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ,雾化气 $1.074\text{ }9\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ,雾化室温度 $2.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,蠕动泵速率 $40\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

**细胞毒性实验** 利用CCK-8试剂盒检测AgNPs、GQDs和ADG-DDPC对HeLa细胞的细胞毒性。取处于对数生长期的HeLa细胞每孔 $5\times 10^3$ 个接种于96孔板中,并在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 中孵育24 h(建立无细胞的空白对照组),吸弃培养基,向每个孔中加入含40、80、120、160、200、280、320、360和 $400\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的AgNPs、GQDs或ADG-DDPC的新鲜培养基。孵育24 h后,加入 $10\text{ }\mu\text{L}$ CCK-8检测探针,孵育1 h。最后使用酶标仪在 $450\text{ nm}$ 下检测吸光度值(A)。按照下列公式计算细胞存活率(cell viability, CL),并利用SPSS软件计算 $\text{IC}_{50}$ 值。以DMEM溶液的孔作为空白( $A_{\text{空白}}$ ),分别以加入AgNPs、GQDs和ADG-DDPC作为对照组( $A_{\text{对照}}$ ),计算每孔的细胞存活率:  $\text{CL} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。

**细胞摄取实验** 取两块24孔板,每孔底部加入1片L-多聚赖氨酸包被的细胞专用爬片,每孔用PBS  $400\text{ }\mu\text{L}$ 洗3遍,每遍浸泡3 min,吸弃;每孔再加入DMEM  $400\text{ }\mu\text{L}$ 洗3遍,每遍浸泡3 min。取对数生长期的HeLa细胞,用培养液稀释至 $8\times 10^4$ 个/mL,以每孔 $400\text{ }\mu\text{L}$ 加入24孔板,置于恒温培养箱培养24 h。吸弃孔中培养液,将 $24\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ADG-DDPC、GQDs加入HeLa细胞中,分别孵育6、12和16 h,吸弃药液,每孔加入PBS  $400\text{ }\mu\text{L}$ 洗3遍,吸弃。每孔加4%多聚甲醛 $400\text{ }\mu\text{L}$ 固定15 min,吸弃。再每孔加PBS  $400\text{ }\mu\text{L}$ 洗3遍,每遍浸泡5 min。每孔加入预先配好的 $1\times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DiI(细胞膜红色荧光探针) $400\text{ }\mu\text{L}$ , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育15 min后吸弃,再次每孔加PBS  $400\text{ }\mu\text{L}$ 洗3遍,每遍浸泡3 min。取出爬片,置于预先滴有抗荧光猝灭剂的相应载玻片上,于正置荧光显微镜下观察ADG-DDPC进入细胞后的荧光强度。

**统计学方法** 使用SPSS软件对所有数据进行统



**Figure 1** Schematic illustration of silver nanoparticles (AgNPs), graphene quantum dots (GQDs). AgNP-DNA-GQDs were the core of the nanoparticles (ADG) (A); 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP) and dstearyl-phosphatidylglycolamine-polyethylene-glycol-cyclic-cRGD peptide (DSPE-PEG<sub>2000</sub>-cRGD) were dissolved in methanol (B); synthesis of phospholipid-coated silver-graphene quantum dot multifunctional nanoparticles (ADG-DDPC) (C)

统计学分析, 实验所有数据以均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。统计方法采用双侧  $t$  检验,  $P < 0.05$  为显著性差异。如果数据不符合正态分布, 则采用  $F$  检验。

## 结果

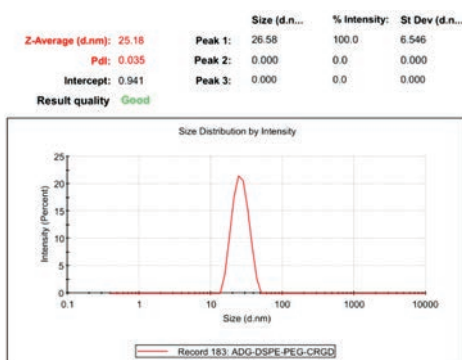
### 1 紫外表征

AgNPs 在 400 nm 处有很强的特征吸收峰, 峰形较狭窄且对称 (图 2A), 说明该方法合成的 AgNPs 粒子较为均一; 当表面吸附 DNA 后, 复合物的特征吸收峰红移 5 nm, 且吸光度有所下降, 且峰形较 AgNPs 更不对称, 这是由于 DNA 分子质量 (5 303.6 Da) 远大于柠檬酸根的分子质量 (185 Da)。当 DNA 修饰吸附在 AgNPs 表面后会使 AgNPs 周围介质的折光指数增大, 粒径大小范围较 AgNP 的分布较广。所以, DNA 分子在 AgNPs 表面的吸附修饰会引起 AgNPs 的特征吸收峰红移; 而吸光度的下降则可能是因为在吸附过程中, 一些 AgNPs 损失造成的。紫外特征峰的改变证明, DNA 确实吸附在 AgNPs 表面。图 2B 中不同质量浓度 ADG-DDPC (20.43、10.22、5.11 和 2.56  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 紫外

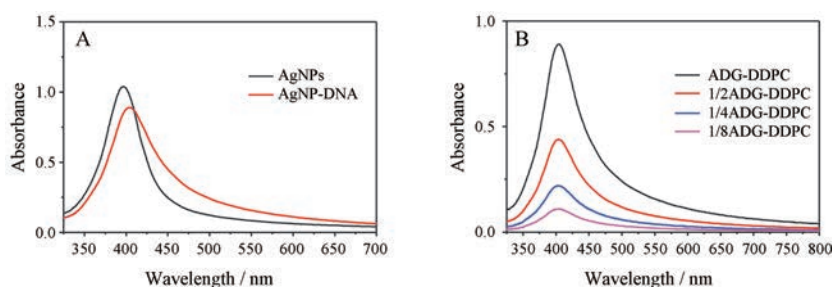
最大吸收峰位置不变, 证明合成的材料内部粒子大小均一, 在确定材料的浓度时具有非常大的意义。

### 2 ADG-DDPC 的粒径及其稳定性的表征

所制备的 ADG-DDPC 表征结果显示, 纳米粒的粒径为 (25.18  $\pm$  1.40) nm, PDI 为 0.035, 粒径分布均一, 粒径分布图见图 3。从表 1 中可以看出, 随着时间的延长, 在相同的存储条件下无磷脂包裹的纳米内核 ADG 于 48 h 内团聚较严重, 不能满足纳米注射给药; 而有磷脂包覆的 ADG-DDPC 在 48 h 内粒径有些增大, 但仍小



**Figure 3** Particle size distribution of ADG-DDPC



**Figure 2** UV absorption spectra of AgNPs, AgNP-DNA, ADG-DDPC UV-Vis absorption spectroscopy. A: AgNPs and AgNP-DNA; B: ADG-DDPC

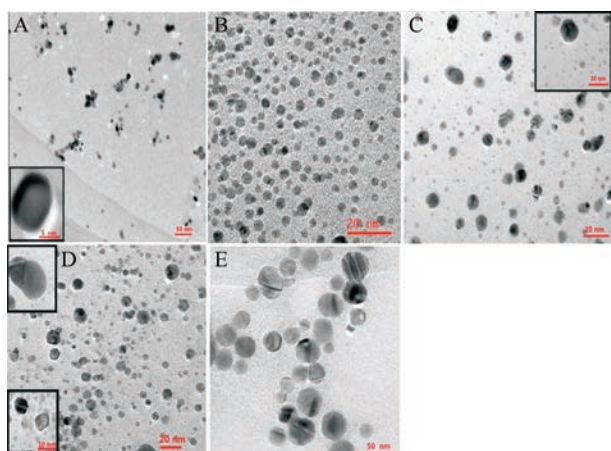
**Table 1** Particle size of ADG and ADG-DDPC within 48 hours in the absence of light at 4 °C. PDI: Polydispersity index

Group	Particle size	Time / h									
		0	1	2	3	5	7	10	12	24	48
ADG	Size/nm	18.78	23.3	29.93	53.61	89.12	104.4	352.2	378.4	594.9	832
	PDI	0.332	0.371	0.516	0.310	0.521	0.621	0.519	0.421	0.668	0.877
ADG-DDPC	Size/nm	25.18	25.18	25.32	25.34	25.38	25.38	26.10	26.21	27.63	30.33
	PDI	0.035	0.071	0.121	0.214	0.105	0.213	0.189	0.233	0.310	0.279

于 50 nm, 满足纳米制剂的静脉注射给药需求。

### 3 透射电镜的表征

合成 AgNPs 的 TEM 图见图 4A, 大小在 10 nm 左右, 粒子大小均一, 晶格明显。NH<sub>2</sub>-GQDs 从透射电镜 (图 4B) 可见呈规则的球状, 大小在 1~2 nm 之间, 分布均匀。图 4C 为物理混合的 AgNPs 与 GQDs, 在没有“桥梁”DNA 作用下, AgNPs 与 GQDs 随机分布在视野中, 两者之间的距离不规则, 且杂乱无章。图 4D 为含单链 DNA 的 ADG 的 TEM 图, 从图中可见, 在 AgNPs 周围吸附了粒径较小的 GQDs, 两者分布比图 4C 中有了明显规律性, 不再杂乱无章。图 4E 为合成的磷脂材料图, 从图中可见, 原先分布在视野中的小粒子消失, 只有粒径 (25~30 nm) 均一的光滑粒子, 比图 4A、C、D 中粒子数目变少, 粒径则更大。



**Figure 4** TEM topographical maps of AgNPs (A), GQDs (B), physical mixing of AgNPs and GQDs (C), ADG (D) and ADG-DDPC (E)

### 4 ADG-DDPC 中 GQDs 的释放

从 320~440 nm 激发波长下的荧光光谱图 (图 5A) 可见, GQDs 在 350 nm 处最大发射波长为 425 nm。将 GQDs 最大激发与发射波长用于检测 ADG-DDPC, 由图 5B 可见, ADG-DDPC 纳米材料的荧光随着 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量的增大而增强。表明在高 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的环境中, ADG-DDPC 中的 GQDs 被释放较多, 且能恢复荧光。从图 5C 可以更直观地看出, AgNP 被溶蚀而聚集, GQDs 被释放出来。

### 5 定量 AgNPs 与 ADG-DDPC 中银的浓度

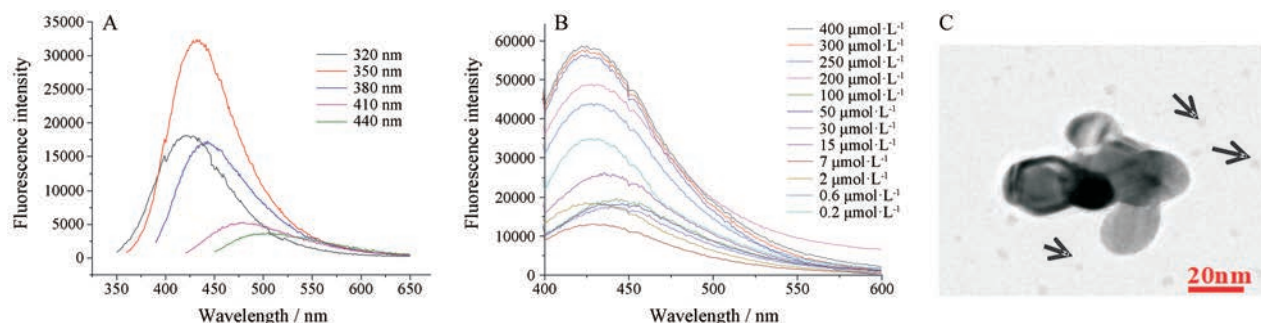
根据 ICP-MS 测定结果, AgNPs、ADG-DDPC 中银的质量浓度分别为 3.75 和 20.43 μg·mL<sup>-1</sup>, 说明 ADG-DDPC 包覆了内核后银浓度较 AgNPs 组显著增大。

### 6 细胞毒性实验

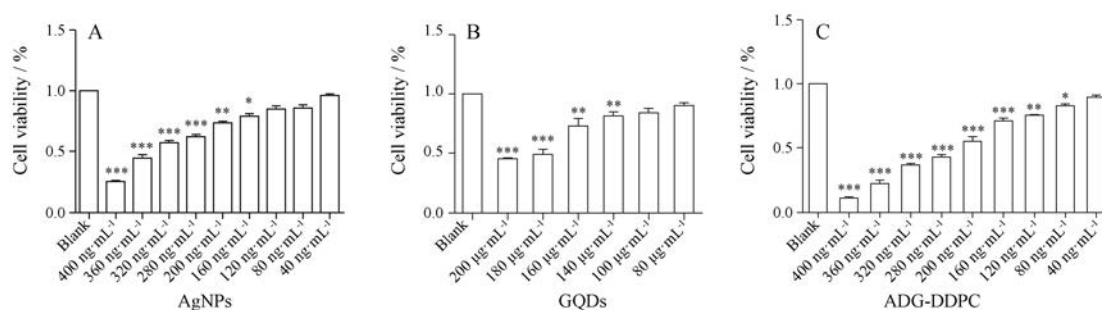
用不同浓度的 AgNPs 和 GQDs 分散液加入到人宫颈癌 (HeLa) 细胞中孵育, AgNPs 在 HeLa 细胞中显示了较强的毒性, 结果见图 6。SPSS 软件计算得 AgNPs 的 IC<sub>50</sub> 值为 (347.78 ± 0.06) ng·mL<sup>-1</sup>, ADG-DDPC 对肿瘤细胞的 IC<sub>50</sub> 值为 (209.68 ± 0.09) ng·mL<sup>-1</sup>, 而 GQDs 在 100 μg·mL<sup>-1</sup> 以下基本不显示细胞毒性。值得一提的是, AgNPs 和 ADG-DDPC 在一定浓度范围内都具有杀灭 HeLa 细胞的作用, 并且杀伤作用与剂量呈依赖关系。

### 7 细胞摄取实验

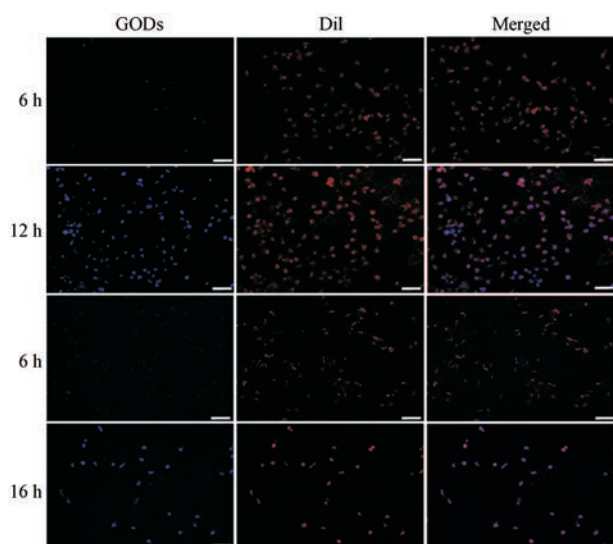
将 ADG-DDPC、GQDs 与 HeLa 细胞进行孵育, 所得的荧光图见图 7。ADG-DDPC 在孵育 6 h 后, 荧光强度较小, 而在孵育 12 h 后荧光强度明显增强; GQDs 在孵育 12 h 内几乎不能被细胞摄取而发荧光, 延长



**Figure 5** Emission spectra of GQDs at different excitation wavelengths (A); fluorescence spectra of ADG-DDPC as functions of different concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B); TEM of the ADG-DDPC after treating with 200 μmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (C). The GQDs are indicated by the arrows



**Figure 6** HeLa cell survival rate after incubation in different concentrations of AgNP (A), GQDs (B) and ADG-DDPC (C) after 24 h.  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs blank group



**Figure 7** Fluorescence micrograph of HeLa cells incubated with ADG-DDPC for 6 and 12 h, GQDs incubation of HeLa cells for 6 and 16 h. From the left side are phospholipid materials (blue light), DiI (cell membrane, red stain) and fused images. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$

GQDs的孵育时间至16 h后细胞内发出荧光, 较ADG-DDPC所需时间更长, 表明ADG-DDPC较GQDs的细胞摄取更高效。在安全剂量范围内, 通过染色红细胞膜, 细胞的形态仍然良好, 合成的磷脂材料可以在低剂量下发出强荧光, 证明发光效率较高。

## 讨论

本文提出了一种既能够抑制肿瘤细胞生长, 又能在肿瘤细胞内发光的新纳米制剂ADG-DDPC。首先利用还原反应制备得稳定的AgNPs, 透射电镜及紫外分光光度计均证明了该结论。利用电荷吸引, 以单链DNA为桥梁连接GQDs与AgNPs形成ADG内核, GQDs的荧光被AgNPs显著淬灭<sup>[19]</sup>。当 $\text{H}_2\text{O}_2$ 存在的情况下, 与AgNPs发生类芬顿反应, AgNPs溶解的同时并产生羟基自由基<sup>[20]</sup>。从荧光分光光谱与透射电镜

中可以看出AgNPs发生了溶蚀, 并且减弱了GQDs与AgNPs之间的能量转移, 使得GQDs的荧光强度恢复。透射电镜及马尔文粒径仪结果表明ADG-DDPC较ADG粒径有所增大, 可能的原因是靶向长循环磷脂包覆于纳米粒表面使表观粒径增大<sup>[21]</sup>。从细胞毒性实验与细胞荧光成像中可以看出, 含有穿膜肽cRGD的纳米制剂, 在相同银当量且孵育时间时, 较AgNPs对HeLa细胞的毒性更大。ADG-DDPC在低毒性剂量时, 随着孵育时间延长, 细胞内发出较明亮的蓝色光, 这可能是由于cRGD增加了纳米粒的跨细胞膜作用, 同时肿瘤细胞中存在较高浓度的 $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>[22,23]</sup>, 制剂中AgNPs被“侵蚀”, 释放荧光猝灭的GQDs并恢复其荧光; 细胞摄取实验结果表明, ADG-DDPC组较GQDs组在细胞内能更快发出荧光, 再次证明cRGD可成功介导本制剂细胞内化作用。肿瘤的可视化治疗是一项重要但具有挑战性的工作, 本研究为肿瘤可视化治疗提供了一种新的思路, 对寻找新的抗肿瘤纳米制剂提供一定的借鉴。

## References

- [1] Simpson MJ, Poblete H, Griffith M, et al. Impact of dye-protein interaction and silver nanoparticles on rose bengal photophysical behavior and protein photocross linking [J]. *Photochem Photobiol*, 2013, 89: 1433-1441.
- [2] Zhao XX, Liu HR, Hu YB, et al. A novel gelatin-AgNPs coating preparing method for fabrication of antibacterial and no inflammation inducible coatings on PHBV [J]. *React Funct Polym*, 2016, 107: 54-59.
- [3] Huang WD, Fang XL, Wang HD, et al. Biosynthesis of AgNPs by *B. maydis* and its antifungal effect against *Exserohilum turcicum* [J]. *I ET Nanobiotechnol*, 2018, 12: 585-590.
- [4] Ernest V, Gajalakshmi S, Mukherjee A, et al. Enhanced activity of lysozyme-AgNP conjugate with synergic antibacterial effect without damaging the catalytic site of lysozyme [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2014, 42: 336-343.
- [5] Li BK, Wang CL, Chen P, et al. The synthesis and characteriza-

- tion of silver nanoparticle-loaded mesoporous silica material and its antibacterial performance [J]. Acta Sci Nat Uni Nakai (南开大学学报 (自然科学版)), 2018, 51: 31-38.
- [6] Lu L, Zheng LP, Zhao PF, et al. Preparation and antifungal activity of Ag-SiO<sub>2</sub> core-shell nanoparticles [J]. Chin J Bio Eng (生物加工过程), 2014, 12: 51-55.
- [7] Subbiah RP, Lee H, Veerapandian M, et al. Structural and biological evaluation of a multifunctional SWCNT-AgNPs-DNA/PVA bio-nanofilm [J]. Anal Bioanal Chem, 2011, 400: 547-560.
- [8] Ritter KA, Lyding JW. The influence of edge structure on the electronic properties of graphene quantum dots and nanoribbons [J]. Nat Mater, 2009, 8: 235-242.
- [9] Wang H, Wang XM. *In vitro* nucleus nanoprobe with ultra-small polyethylenimine functionalized graphene quantum dots [J]. RSC Adv, 2015, 5: 75380-75385.
- [10] Wang X, Sun X, He H, et al. A two-component active targeting theranostic agent based on graphene quantum dots [J]. J Mater Chem B, 2015, 3: 3583-3590.
- [11] Su XQ, Chan CY, Shi JY, et al. A graphene quantum dot@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> based nanoprobe for drug delivery sensing and dual-modal fluorescence and MRI imaging in cancer cells [J]. Biosens Bioelectron, 2017, 92: 489-495.
- [12] Qin J, Zhang RX, Li JL, et al. CRGD mediated liposomes enhanced antidepressant-like effects of edaravone in rats [J]. Eur J Pharm Sci, 2014, 58: 63-71.
- [13] Liu PF, Qin LB, Wang Q, et al. CRGD-functionalized mPEG-PLGA-PLL nanoparticles for imaging and therapy of breast cancer [J]. Biomaterials, 2012, 33: 6739-6747.
- [14] Li JZ, Yuang ZQ, Yan M, et al. pH-sensitive micelles loaded paclitaxel using carboxymethyl chitosan-palmitic acid mediated by cRGD [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2016, 51: 642-649.
- [15] Cabral H, Matsumoto Y, Mizuno K, et al. Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size [J]. Nat Nanotechnol, 2011, 6: 815-823.
- [16] Sukirtha R, Priyanka KM, Antony JJ, et al. Cytotoxic effect of green synthesized silver nanoparticles using *Melia azedarach* against *in vitro* HeLa cell lines and lymphoma mice model [J]. Proc Biochem, 2012, 47: 273-279.
- [17] Yang Y, Luo L, Li HP, et al. Separation and determination of silver nanoparticle in environmental water and the UV-induced photochemical transformations study of AgNPs by cloud point extraction combined ICP-MS [J]. Talanta, 2016, 161: 342-349.
- [18] Roman M, Rigo C, Castillo-Michel H, et al. Hydrodynamic chromatography coupled to single-particle ICP-MS for the simultaneous characterization of AgNPs and determination of dissolved Ag in plasma and blood of burn patients [J]. Anal Bioanal Chem, 2016, 408: 5109-5124.
- [19] Mei Q, Zhang Z. Photoluminescent graphene oxide ink to print sensors onto microporous membranes for versatile visualization bioassays [J]. Angew Chem Int Ed, 2012, 51: 5602-5606.
- [20] Wang LL, Zheng J, Li YH, et al. AgNP-DNA@GQDs Hybrid: a new approach for sensitive detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and glucose *via* simultaneous AgNP etching and DNA cleavage [J]. Anal Chem, 2014, 86: 12348-12354.
- [21] Li FF, Zhang XX, Guo SY, et al. Preliminary study on pH sensitive lipid bilayer-coated mesoporous silica nanoparticles as a novel drug carrier for antitumor drug [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2013, 48: 291-297.
- [22] Weinstain R, Savariar EN, Felsen CN, et al. *In vivo* targeting of hydrogen peroxide by activatable cell penetrating peptides [J]. J Am Chem Soc, 2014, 136: 874-877.
- [23] Tu LX, Xu YH, Tang CY, et al. *In vivo* imaging in tumor-bearing animals and pharmacokinetics of PEGylated liposomes modified with RGD cyclopeptide [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2012, 47: 646-651.