

分类号: O63
密 级: 公开

单位代码: 10363
学 号: 2210330141

题 目: 双波长荧光高分子材料的合成及性能研究

TITLE: Synthesis and properties of dual-wavelength fluorescent polymer materials

学生姓名: 刘超凡

校内导师: 林英 (副教授)

校外导师: 郑伟利

专 业: 材料与化工

研究方向: 功能高分子材料

论文答辩日期: 2024 年 05 月 29 日

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学位论文作者签名：刘超凡

日期：2024年06月02日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ☐，在 __ 年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密 ☐。

1131

学位论文作者签名：刘超凡

指导教师签名：

张英

日期：2024 年 06 月 02 日

日期：2024 年 06 月 02 日

双波长荧光高分子材料的合成及性能研究

摘 要

双波长荧光材料因具有良好的结构设计性、高灵敏度、时空双分辨率、实时监测能力强以及无创等显著优势而受到广泛关注。发射波长可调的聚集诱导发光 (AIE)材料拥有较大的 Stokes 位移、高亮度和优异的光稳定性,因而成为生物体内外光学成像的理想材料。四苯乙烯(TPE)及其衍生物作为一类比较常见的聚集诱导发光材料,因其具有优良的光学性能、易官能化、易于合成等优点而被倍受青睐。近红外(NIR)发光的铈配合物是一种比较常用的氧敏分子,具有发光效率高和发光寿命长等特性,可提供深层组织穿透深度以及抗组织自身荧光干扰的能力。基于上述原因,本文设计合成了一种基于四苯乙烯衍生物和铈配合物的高分子纳米胶束,并研究了其结构与性能的关系,利用其透明质酸壳层获得细胞特异亲和性,进一步考察了双波长荧光材料在生物成像领域的应用潜能。

本文的具体研究内容如下:

- 1、以 3-丙烯酰胺基苯硼酸(APBA)和乙烯基吡咯烷酮(NVP)单体为原料,通过可逆加成链转移(RAFT)聚合方法,构建分子量可控的共聚物 PAPBA-*b*-PVP;进一步通过硼酸酯键与透明质酸(HA)作用制备高分子纳米胶束。在黄原酸二硫酯(RAFT)介导下,通过控制原料投料量可实现共聚物 PAPBA-*b*-PVP 的链长调

控。通过调节共聚物嵌段比、共聚物和透明质酸的投料浓度能够实现纳米胶束尺寸的控制可实现纳米胶束的粒径在 73.3-163.9 nm 范围内调控。由于动态硼酸酯键的存在，通过 DLS 测试证实高分子纳米胶束具有 pH、盐以及糖响应性。

2、基于 1, 2-二苯基-1, 2-二(4-氨基苯基)乙烯(TPE-2AM)为内核通过开环聚合(ROP)与 ϵ -己内酯作用制备 TPE-PCL，并以酯化作用将 RAFT 试剂接入其端基，进一步经投料的控制将 APBA 和丙烯酸由活性聚合先后接入聚合物制得 TPE-PCL-PAPBA-AA 共聚物，再将铱配合物由酯化作用链接于共聚物的末端，最后利用硼酸酯键与透明质酸(HA)组装制备了双波长发射的高分子纳米胶束 Ir-CP/HA。采用核磁共振氢谱仪(^1H NMR)、凝胶渗透色谱仪(GPC)、扫描电镜(SEM)、透射电镜(TEM)、动态光散射(DLS)、荧光分光光度计、稳态/瞬态荧光光谱分析等仪器对胶束的结构和性能进行表征和测试，证实了其规则的球形形貌，拥有粒径可控、良好分散性和稳定性。光学性能研究显示纳米胶束具有 470 nm 和 721 nm 双波段的峰值发射，并且两个发射波段均展现了优秀的光学寿命，尤其是近红外发射处呈现出较高的量子产率。

3、以功能特征为导向，深入研究了双波长荧光纳米胶束的性能及其生物应用可行性。通过粒径、zeta 电位、荧光分析，表明 Ir-CP/HA 胶束在 PBS(pH=6.5 和 7.4)和 FBS 溶液中具有良好的稳定性。基于 Ir-CP/HA 在不同 pH、葡萄糖和氧分压环境下的水合粒径和光学性能的探索，阐明了纳米胶束对环境的 pH 及糖浓

度具有胶体敏感性，同时，其近红外光学发射体现了优异的乏氧响应性。细胞实验表明胶束具有良好的生物相容性，能够被细胞有效摄入，且透明质酸诱导其对表面受体差异表达的细胞拥有特异选择性。此外，纳米胶束的两个波长光学发射赋予了其体内外生物成像与标记功能，流式细胞分析证明该胶束用作荧光成像及标记探针具有良好的靶向性和灵敏度，在癌细胞的早期检测或治疗等方面拥有巨大的应用潜能。

关键词： 高分子纳米胶束，双波长发射，光学成像，透明质酸，环境响应性

SYNTHESIS AND PROPERTIES OF DUAL- WAVELENGTH FLUORESCENT POLYMER MATERIALS

ABSTRACT

Dual-wavelength fluorescent materials have attracted much attention due to their significant advantages such as good structural design, high sensitivity, spatial and temporal dual resolution, real-time monitoring capability, and non-invasiveness. Aggregation-induced luminescence (AIE) materials with tunable emission wavelengths have large Stokes shifts, high brightness, and excellent photostability, making them ideal for optical imaging in and out of organisms. Tetraphenylethylene (TPE) and its derivatives, as a common class of AIE materials, are favored for their excellent optical properties, easy functionalization and easy synthesis. Near-infrared (NIR)-luminescent iridium complexes are a type of conventional oxygen-sensitive molecules with high luminescence efficiency and long luminescence lifetime, which can provide deep tissue penetration depth and resistance to interference from the tissue autofluorescence. Based on the above reasons, this paper designed and synthesised

the polymeric nanomicelles based on tetrastylene derivatives and iridium complexes, and investigated the relationship between its structure and properties. By utilizing hyaluronic acid as shell layer to obtain cell-specific affinity, the potential application of dual wavelength fluorescent materials in the field of bioimaging was further investigated.

The following is the specific research content of this article:

1. The copolymer PAPBA-b-PVP with controllable molecular weight was constructed by reversible addition chain transfer (RAFT) polymerization using 3-acrylamidophenylboronic acid (APBA) and vinylpyrrolidone (NVP) monomers as raw materials. The polymeric nanomicelles were further prepared through boronic ester bonding between copolymers and hyaluronic acid (HA). Under the mediation of Xanthic acid disulfide (RAFT), the chain length regulation of copolymer PAPBA-b-PVP could be achieved by controlling the feed amount of raw materials. By adjusting the block ratio of copolymer, the feeding concentration of copolymer and hyaluronic acid, the particle size of the nano micellar size could be controlled within the range of 73.3-163.9 nm. Due to the presence of dynamic borate bonds, the pH, salt and sugar responsiveness of the polymeric nanomicelles have been

confirmed to be by DLS.

2. TPE-PCL was prepared by ring-opening polymerization (ROP) of ϵ -caprolactone using 1,2-diphenyl-1,2-bis(4-aminophenyl)ethylene (TPE-2AM) as the core. The RAFT reagents were grafted to the end-groups of the copolymers by esterification. TPE-PCL-PAPBA-AA copolymer was further prepared by linking APBA and acrylic acid into polymer via active polymerization under the control of feeding. Then, the iridium complex was linked to the end of the copolymer by esterification. Finally, the polymeric nanomicelles Ir-CP/HA with dual-wavelength-emitting were prepared by self-assembly of the copolymer and hyaluronic acid (HA) based on boronic acid ester bond. The structure and properties of the micelles were characterized and studied using instruments such as ^1H NMR, GPC, SEM, TEM, DLS, fluorescence spectrophotometry, and steady-state/transient fluorescence spectroscopy. It has been confirmed that the nanomicelles possessed regular spherical morphology, controllable particle size, good dispersion and stability. The optical performance study have shown that the nanomicelles exhibited peak emissions at 470 nm and 721 nm and exhibited excellent optical lifetimes for both emission bands, especially with high quantum yield at the near-infrared (NIR)

emission.

3. Guided by functional characteristics, we conducted in-depth research on the performance and biological application feasibility of dual wavelength emitting nanomicelles. The particle size, zeta potential, and fluorescence analyses showed that Ir-CP/HA micelles have good stability in PBS (pH=6.5 and 7.4) and FBS solutions. Based on the exploration of the hydrated particle size and optical properties of Ir-CP/HA in different pH, glucose and oxygen partial pressure environments, it was elucidated that the nanomicelles were colloiddally sensitive to the pH and sugar concentration, while their near-infrared optical emission reflected the excellent hypoxic response. Cellular experiments demonstrated that the micelles had good biocompatible and could be effectively taken up by cells, and hyaluronic acid induced specific selectivity towards cells with differential expression of surface receptors. In addition, the two wavelength emission of the nanomicelles endowed them with *in vitro* and *in vivo* bioimaging and biolabeling functions. Flow cytometry analysis demonstrated that the micelles had good targeting and sensitivity as fluorescent imaging and labeling probes, which had great potential for applications in early detection or treatment of cancer cells.

Chaofan Liu (Materials and Chemicals Industry)

Supervised by Ying Lin

KEY WORDS: Polymeric nanomicelles, Dual-wavelength emission, Optical imaging, Hyaluronic acid, Environmental responsiveness

目录

第 1 章 绪论	1
1.1 引言	1
1.2 聚集诱导发光简介	1
1.2.1 聚集诱导发光	1
1.2.2 聚集诱导发光材料的特点	2
1.3 发光金属配合物	2
1.3.1 发光金属配合物发光机理	2
1.3.2 发光金属配合物的特征	3
1.4 双波长荧光材料	3
1.4.1 荧光材料发展趋势	4
1.4.2 双波长光学探针的发展	4
1.5 高分子非共价自组装	5
1.6 发光纳米材料在生物领域应用	5
1.6.1 酶荧光探针	5
1.6.2 小分子活性物质检测	7
1.6.3 光动力治疗	10
1.6.4 生物成像	11
1.7、本文双波长荧光聚合物胶束所涉材料	12
1.7.1 四苯乙烯基衍生物(TPE)	13
1.7.2 含远/近红外 (FR/NIR) 的化合物	13
1.7.3 3-丙烯酰胺基苯硼酸(APBA)	14
1.7.4 透明质酸(HA)	14
1.8 课题研究的主要内容	14
1.8.1 传统有机荧光探针的不足之处	14
1.8.2 本文具体研究思路	15
1.8.3 本研究的特色之处	16
第 2 章 响应性透明质酸胶束的合成与性质	18

2.1 前言.....	18
2.2 实验部分.....	19
2.2.1 主要原料.....	19
2.2.2 主要设备和仪器.....	19
2.2.3 样品制备.....	19
2.2.3.1 聚(3-丙烯酰胺基苯硼酸)(PAPBA)的合成	19
2.2.3.2 PAPBA- <i>b</i> -PVP 共聚物的合成	20
2.2.3.3 PAPBA- <i>b</i> -PVP/HA 聚合物胶束的制备	20
2.3 性能测试与结构表征.....	21
2.4 结果与讨论.....	21
2.4.1 PAPBA 的合成与表征	21
2.4.2 PAPBA- <i>b</i> -PVP 的合成与表征	23
2.4.3 聚合物纳米胶束的制备和表征.....	24
2.4.4 制备条件对纳米胶束性质的调控.....	26
2.4.5 纳米胶束的稳定性.....	28
2.4.6 纳米胶束的 pH 敏感性	29
2.4.7 纳米胶束的糖响应和盐响应性.....	30
2.5 结论.....	32
第 3 章 双波长荧光高分子材料的合成及表征	33
3.1 引言.....	33
3.2 实验部分.....	34
3.2.1 主要原料.....	34
3.2.2 实验仪器.....	35
3.2.3 样品制备.....	35
3.3 性能测试与结构表征.....	40
3.4 结果与讨论.....	40
3.4.1 铈配合物氯桥二聚体的合成.....	40
3.4.2 小分子铈配合物(Ir-OH)的合成	41
3.4.3 TPE-PCL 的合成	42

3.4.4 TPE-PCL-PAPBA 的合成	42
3.4.5 TPE-PCL-PAPBA-AA-ccIr 的合成	44
3.4.6 TPE-PCL-PAPBA-AA-ccIr/HA 胶束(记作 Ir-CP/HA)的制备	46
3.4.7 制备条件对纳米胶束性质的调控	47
3.4.8 探针的光学性质	49
3.5 本章小结	51
第 4 章 双波长荧光高分子材料的性能及应用研究	53
4.1 引言	53
4.2 实验部分	54
4.2.1 实验仪器和试剂	54
4.2.2 Ir-CP/HA 纳米胶束的荧光检测	54
4.2.3 Ir-CP/HA 纳米胶束的稳定性	54
4.2.4 pH 对 Ir-CP/HA 纳米胶束的影响	55
4.2.5 葡萄糖对 Ir-CP/HA 纳米胶束的影响	55
4.2.6 荧光探针的光学乏氧敏感性	55
4.2.7 Ir-CP/HA 纳米胶束的细胞毒性	55
4.2.8 Ir-CP/HA 纳米胶束流式细胞实验	56
4.3 结果与讨论	56
4.3.1 Ir-CP/HA 纳米胶束的稳定性	56
4.3.2 Ir-CP/HA 纳米胶束的 pH 敏感性	58
4.3.3 Ir-CP/HA 纳米胶束的糖敏感性	60
4.3.4 Ir-CP/HA 纳米胶束的光学乏氧响应性	61
4.3.5 在模拟生理环境中 Ir-CP/HA 纳米胶束的稳定性	63
4.3.6 在模拟生理环境中 Ir-CP/HA 纳米胶束的光学乏氧响应性	65
4.3.7 Ir-CP/HA 纳米胶束的细胞毒性	66
4.3.8 Ir-CP/HA 纳米胶束的流式细胞实验	67
4.4 本章小结	68
结论与展望	69
参考文献:	71

附录 攻读硕士期间发表论文情况	80
致谢	81

第 1 章 绪论

1.1 引言

癌症是全球范围内的主要致死因素之一，通常只有在癌症恶化至难以控制的程度时才会被察觉。然而，随着医疗技术的日益进步，人们对与身体健康相关的诊断和检测方法的关注与日俱增。由于对疾病准确诊断需求的不断增长，亚细胞、细胞和组织成像技术也得到了广泛的研究。其中，光学成像技术因其具备高分辨率和高检测灵敏度的特点，已经成为可视化细胞和组织形态的强有力工具。可以检测和跟踪生命系统中的各种分子变化，以便得到对早期诊断、易感性评估和转移预测至关重要的特征信息^[1]。随着复杂生物体系中癌症相关分子事件的灵敏^[2]、动态和多参数^[3]检测面临越来越多的挑战，新型稳健的生物探针是愈发受到人们的青睐。

1.2 聚集诱导发光简介

1.2.1 聚集诱导发光

大多数用于生物医学应用的传统有机荧光发光材料都处于聚集状态，由于分子间的相互作用，发生 π - π 堆积，导致了能量的转移和猝灭，从而导致荧光猝灭现象(Aggregation-caused quenching, ACQ)，限制了它们在生物成像应用^[4]。2001 年，唐本忠院士发现了一种具有聚集诱导发光增强(Aggregation-induced emission, AIE)现象的新型发光材料，这类材料在聚集状态下会形成一种特殊的结构，这种结构可以限制分子的运动，减少能量的损失，发出更强的荧光，从而提高荧光效率。AIE 现象的发现为荧光材料的发展提供了新的思路 and 方向。AIE 材料具有高亮度、高稳定性和低毒性等优点，在生物成像、传感器等领域具有广泛的应用前景。

目前，AIE 材料的研究已经取得了很大的进展，已经开发出了多种具有 AIE 性质的分子，并对其发光机制和应用进行了深入的研究。目前最为广泛应用的是分子内运动受限机制 (Restriction of intramolecular motion, RIM_{intra})^[5]，它包括分子内振动约束 (Restriction of intramolecular vibration, RIV)^[6] 和分子内旋转限制 (Restriction of intramolecular

rotation, RIR)^[7]两种过程。后唐本忠院士团队又提出了分子间运动受限(Restriction of intermolecular motion, RIM_{inter})机理^[8,9],将 RIM_{intra} 和 RIM_{inter} 统称为 分子运动受限机制(RIM)。

1.2.2 聚集诱导发光材料的特点

自从唐本忠教授课题组报道了 TPE 分子具有 AIE 特性后,近年来,基于 TPE 结构的衍生物成为很多研究组的热门研究材料, TPE 衍生物分子在荧光检测和生物成像领域^[10]也占据着越来越重要的地位。但随之而来的问题是大多数报道的 AIE 荧光探针采用单光子激发,激发波长通常在可见光区范围内,由于转子结构导致其具有较短的波长吸收和发射,而生物组织对此类荧光强度会有影响^[11,12]。而远红/近红外(FR/NIR)荧光探针具有较大的 Stokes 位移,这可以最小化激发和发射之间的干扰,同时减少发射光谱与样品的自发荧光的重叠^[13]。此外,红光发射探针对组织或细胞具有低光损伤、更深的组织穿透力以及强抗光漂白性^[14],红色发射荧光可以深入组织并提供低背景自发荧光,这使得远/近红外发射荧光探针成为体外和体内生物成像的理想选择^[15-18],在生物成像和疾病诊疗领域受到广泛关注和研究。因此,通过将 AIE 荧光探针和远红/近红外(FR/NIR)荧光探针相结合,制备成双波长荧光材料可以有效解决该类信号方面引起的问题,具有极大的发展和研究前景。

此外,红光发射探针对组织或细胞的光损伤较小,具有更深的组织穿透力和更强的抗光漂白性。红色发射荧光可以深入组织并提供低背景自发荧光,这使得远/近红外发射荧光探针成为体外和体内生物成像的理想选择。

1.3 发光金属配合物

1.3.1 发光金属配合物发光机理

发光金属配合物是一类具有特殊光学性质的化合物,它们在受到光照或其他刺激时会发出明亮的荧光或磷光。这种发光现象是由于金属离子与有机配体之间的相互作用引起的,这种相互作用可以导致电子的激发和跃迁,从而产生发光现象。

发光材料按照电子跃迁方式的不同,可分为荧光型和磷光型两类。荧光材料的电子在受到激发后跃迁至激发态(S_n),然后通过内转换和振动弛豫回到激发

单重态(S_1), 最终跃迁回到基态(S_0)。而磷光材料的电子则通过内转换和系间窜越, 从 S_n 态跃迁至激发三重态(T_1), 然后再跃迁回到 S_0 态^[19]。

与荧光分子探针依靠单线态发光不同, 三线态发光是过渡金属配合物分子探针的主要发光形式。从自旋角度来说三线态磷光一般是禁阻的, 导致许多有机磷光分子的磷光信号普遍较弱, 通过引入铱、钌等过渡金属元素增强自旋轨道作用, 使得两者之间的系间窜越被允许, 电子从 T_1 跃迁回到 S_0 , 从而磷光信号得到增强^[20]。过渡金属配合物因为配体具有多样性, 使得金属配合物本身也具有多种激发态^[21]。在常见的过渡金属配合物中, 铱离子 d 轨道分裂大, 具有强自旋轨道耦合作用, 提高了体系间的系间窜越能力, 从而促进了 T_1 的形成, 有助于配合物磷光量子产率增加^[20]。

1.3.2 发光金属配合物的特征

发光金属配合物具有独特的发光性能在光电子学和生物成像等领域都有广泛应用。然而, 发光金属配合物也存在一些缺陷, 这些缺陷限制了它们的应用范围和性能。发光金属配合物的缺陷如下:

(1)金属配合物荧光探针的合成和纯化过程较为复杂, 需要较高的技术和设备要求。

(2)金属配合物荧光探针的荧光量子产率和光稳定性可能受到配合物结构和环境因素的影响, 并且其特异性和灵敏度可能受到干扰物质的影响。

(3)基于铈、铕等地球中储量更高且毒性更低的磷光配合物这些材料的三线态激子寿命较短, 转换荧光过程的效率较低, 导致其发光效率不高。

(4)钌、铂等重金属材料存在水溶性较差、具有细胞毒性、高成本和环境污染等问题。

金属铱配合物因结构易修饰、发光效率高和发光寿命长等特性, 在光学材料、生物成像等领域应用广泛^[22]。金属铱配合物的光学性质会受配体影响, 可通过改变配体调控铱配合物的光学性能, 提高其在生物成像方面的应用能力^[23]。此外, 还可通过配体调控影响铱配合物的功能并使其具有靶向特定细胞的能力, 从而表现出独特的抗肿瘤活性, 有望替代铂类抗癌药物, 是金属配合物类抗癌药物的研究热点^[24]。

1.4 双波长荧光材料

1.4.1 荧光材料发展趋势

(1) 提高探针的灵敏度和分辨率：研究人员需要开发更高灵敏度和更高分辨率的荧光探针，以便更准确地检测和成像生物分子和细胞。

(2) 提高探针的选择性和特异性：探针的选择性和特异性对于生物医学研究和临床应用非常重要，因此研究人员需要开发更具选择性和特异性的探针。

(3) 发展多模态成像技术：多模态成像技术可以结合不同的成像技术，从而提高成像的准确性和可靠性。

(4) 提高探针的稳定性和生物相容性：荧光探针需要在复杂的生物环境中工作，因此需要具有良好的稳定性和生物相容性，研究人员需要开发更具稳定性和生物相容性的探针。

(5) 应用于临床诊疗：荧光探针可以用于癌症诊断和治疗等方面，未来的研究需要更深入地探索荧光探针在临床诊疗中的应用。

1.4.2 双波长光学探针的发展

双波长荧光材料能够通过两个不同的激发波长下检测荧光发射波长，或在固定的激发波长上检测两个不同发射波长^[13]。具有双发射波长的荧光探针是一种很有前途的传感工具，相比于单波长的荧光探针，这类探针使用一个固有荧光信号作为自校准内部标准的双发射，实现在组织/细胞中双色成像和比率检测^[15,25]，并基于近红外(NIR)光子的双光子激发，可以抵抗细胞损伤并适应各种成像深度，在成像过程中的样品背景信号干扰可通过双波长通道的荧光强度比率进行校正^[26-30]，比单荧光信号荧光材料的成像效果更好。

双波长荧光材料可以分为两种设计思路：

(1) 利用具有双发射波长的单荧光染料构建双波长荧光探针，在它与识别物作用前后会产生两种不同的发射波长^[31]。任俊宇^[32]等人将参考和传感单元结合到一个单独的荧光团中，开发一种基于单荧光团的比率型荧光探针，用于选择性地成像活细胞中溶酶体内的 HClO，以实现自参比测试效果。

(2) 在原有荧光染料结构中引入另一个发射波长不同的荧光染料构建比率型荧光探针^[31]。Hanchen Shen^[33]等人通过使用 TPE 作为供体构建 D-A 结

构来获得具有超高量子产率的染料分子 NIR-II AIEgens(TPE-BBT)。该荧光探针在小鼠血管和小鼠局部关节炎症处均表现出优异的光学成像。

1.5 高分子非共价自组装

高分子非共价自组装是一种新型的自组装技术,是指高分子通过分子间的弱相互作用(如氢键、范德华力、静电作用等)自发地组织成有序结构的过程。这些有序结构可以是一维的、二维的或三维的,并且可以表现出不同的形态,如纤维、树枝状^[34]、囊状^[35]、球形等。

在 高分子聚合物体系中由于非共价键的存在赋予了功能高分子聚合物诸多优异性质(结构和形貌可逆调控、刺激响应性以及具有自修复性能等)^[36,37]。由于非共价键对外界刺激(如 pH 值、温度、光、压力和氧化还原剂等)的反应非常敏感,系统可以根据这些刺激做出相应的响应。因此可以利用非共价键相互作用的动态特性(通过改变外界条件可以有效地对功能高分子材料的结构、形貌及功能进行可逆调控)来设计功能高分子材料^[38]。这些优点使得通过非共价自组装的功能化高分子成为各种领域(光电、生物医药、环境保护等领域)智能材料开发极具竞争力的候选材料。

近年来,由于高分子非共价自组装可以用于制备各种功能性材料(如传感器、催化剂、药物负载载体等)而受到了广泛关注。高分子非共价自组装虽然具有广阔的应用前景,但也面临着一些挑战。例如:高分子非共价自组装过程往往受到多种因素的影响,如何控制自组装过程,实现对有序结构的精确调控,是一个亟待解决的问题;高分子非共价自组装过程往往需要较长的时间,如何提高自组装效率,缩短自组装时间,是一个重要的研究方向。

1.6 发光纳米材料在生物领域应用

1.6.1 酶荧光探针

酶作为生物体内最重要的标志物之一,它们能够加速生物化学反应的进行,使生物体内的代谢过程更加高效和精准,在维持生物系统的稳态和正常生命活动中起到了重要作用。同时,酶的异常表达与癌症及其他重大疾病的发生和发展密切相关。传统酶激活的荧光探针在检测过程中往往存在背景干扰大,组织穿透低等问题。因此,开展用于生物酶检测和成像的长波长荧光探针的研究工作意义重大。

Dai^[39]等人采用功能片段组装分子工程成功开发了一种 AIE 纳米颗粒材料 TTI，专门用于“点亮”和长期监测细胞内脂滴的运动 (图 1-1)。与商业化的光敏剂相比，TTI 的 ROS 生成能力更强。进一步的生物学实验表明，TTI 经过光照后能有效抑制细胞增殖并诱导细胞凋亡过程，最终导致 HepG2 细胞死亡。该项研究为细胞器靶向染色分子的构建提供了蓝图，并且加快了 AIEgens 作为潜在 PS 药物的临床应用速度。

进一步的生物学实验表明，TTI 加光照射能有效抑制细胞增殖并诱导细胞凋亡过程，最终导致 HepG2 细胞死亡。不仅为细胞器靶向染色分子工具的构建提供了蓝图，而且加快了 AIEgens 作为潜在 PS 药物的临床应用速度。

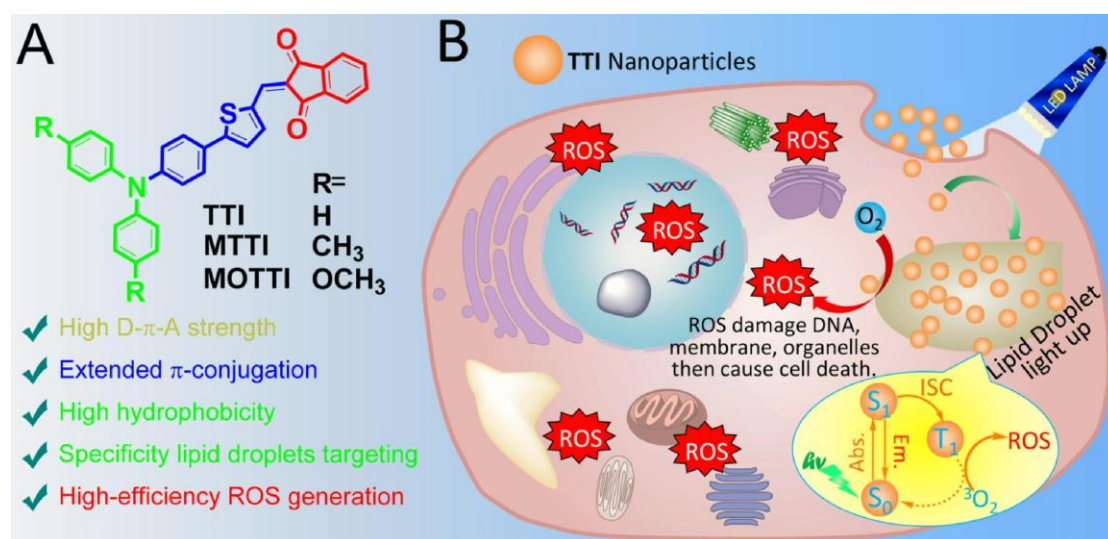


图 1-1 (A)MOTTI、MTTI 和 TTI 的化学结构和相应性质。(B)用于癌细胞光动力消融的 TTI 纳米颗粒的照明。

Figure 1-1 (A) Chemical structure and corresponding properties of MOTTI, MTTI and TTI. (B) Illumination of TTI nanoparticles for cancer cells photodynamic ablation.

Wu^[40]等人通过构建 D-π-A 架构设计并合成了一种近红外聚集诱导发射活性多功能光敏剂(PS)，命名为 TBTCP (图 1-2)。其具有覆盖整个可见光谱的宽吸收带和优异的活性氧 (ROS)生成效率。在光照射下对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌表现出良好的光动力抗菌性能。在可控条件下，TBTCP 还能通过 TBTCP 诱导线粒体损伤激活凋亡信号通路，在光动力治疗中显示出癌细胞选择性。体内实验证实，TBTCP 对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)具有有效的光动力抗

菌性能。在癌症小鼠模型中，基于 TBTCP 的光动力疗法也有效，优于广泛使用的光敏剂 (Ce6)。这项研究引入了一种有效且用途广泛的 PS，不仅推动了光动力疗法的临床应用，还为下一代 PS 的开发提供了基础。

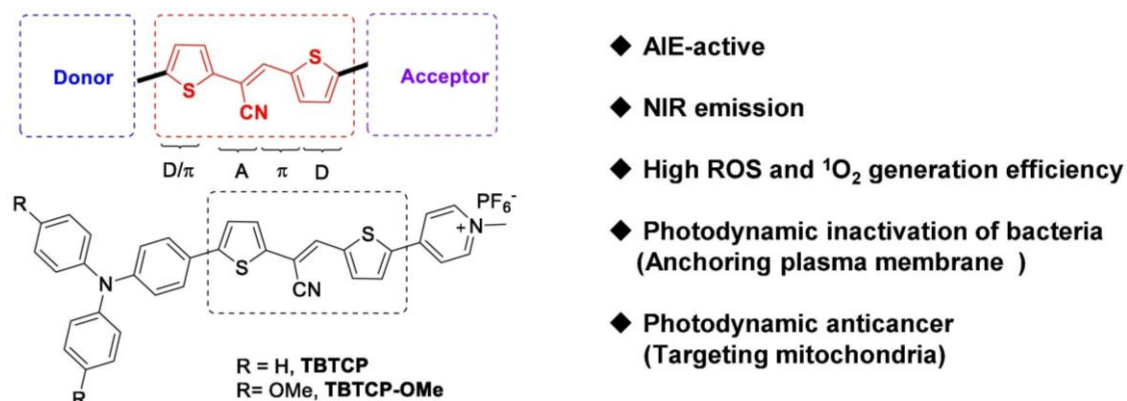


图 1-2 AIE-PSs 的分子结构和相应性质

Figure 1-2 Molecular structure and corresponding properties of AIE-PSs

1.6.2 小分子活性物质检测

活性物种是人体中重要的物质，常见的活性物质主要包括活性氮物质 (RNS)、活性氧物质 (ROS) ^[41]、活性硫物质 (RSS) 等，在能量代谢、信号传导、免疫反应、基因转录等生理功能中起到重要作用^[42]。

活性氮物质在生物体中具有多种重要的生理功能，如调节血管张力、免疫反应、信号传导等。因此，对生物体中活性氮物质的研究具有重要的科学意义和临床价值。Xie^[43]等人采用 AIE 与 ESIPT 效应相结合的方法制备了智能多功能水杨醛希夫碱 (PBAS) (图 1-3(a))，在荧光分析中具有激波位移大、双发射波长和对环境敏感等优异性能。通过强蓝色荧光的快速开启证明了对 N_2H_4 的高度特异性和灵敏性，而探针的弱绿色荧光的快速关闭证明了对 ClO^- 的高度特异性和灵敏性 (图 1-4(b))。由于其优异的性质，这种荧光分子为探测活细胞中的 N_2H_4 和 ClO^- 提供了有效的工具。

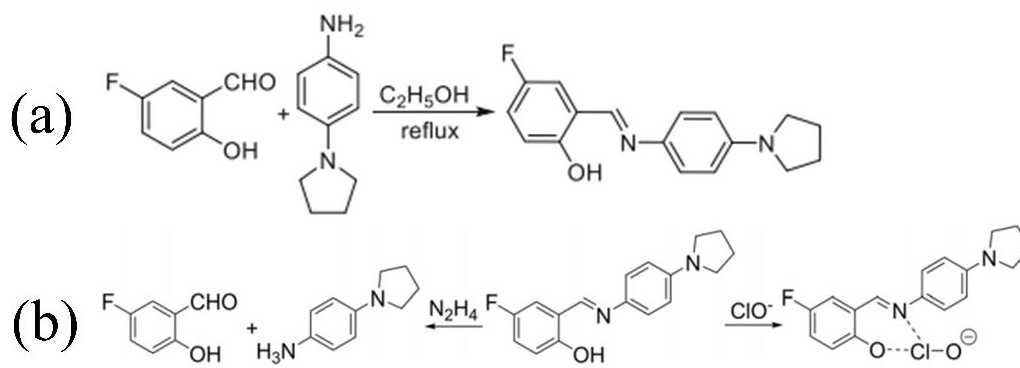


图 1-3 (a) 化合物 PBAS 的合成; (b) PBAS 对 N_2H_4 和 ClO^- 的检测机制

Figure 1-3 (a) Synthesis of compound PBAS; (b) Detection mechanism of PBAS for N_2H_4 and ClO^-

Liang^[44]等人设计了一种 AIE 荧光探针 TCPQ，其显示以 680 nm 为中心的明亮近红外(NIR)发射，以及对 ClO^- 的选择性响应。该探针具有出色的比率计量方式，可以灵敏、选择性和准确测定 ClO^- 波动。为了提高探针的生物相容性，使用 F-127 包覆探针分子配制成 NPs。所获得的 TCPQ NPs 不仅能在活细胞甚至斑马鱼体内成功感知 ClO^- ，还能通过比率测量模式定量判别不同类型细胞中的 ClO^- 水平(图 1-4)。此外，TCPQ NPs 还证实了 ClO^- 在酒精诱导肝细胞损伤模型和酒精诱导肝损伤小鼠模型中明显升高，TCPQ NPs 随后被用于 ALD 诊断和 SILY 的药效学评价，这揭示了 $ClO^-/HClO$ 比率荧光成像作为生物标记物在 ALD 研究中的巨大潜力。

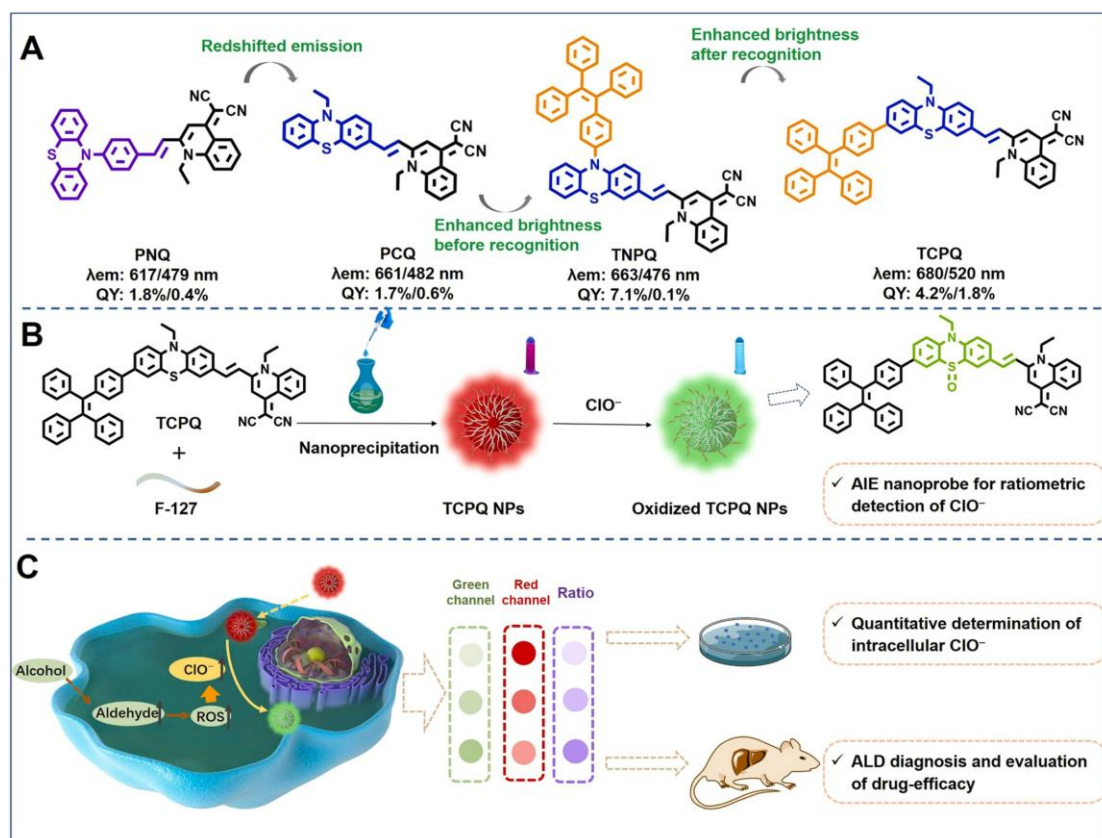


图 1-4 (A) 四种 ClO^- -特异性 AIE 探针的化学结构和相应的分子优化策略; (B) TCPQ NPs 的制备及其对 ClO^- 的响应具有明显的荧光变化。(C) TCPQ NPs 在体外和体内应用示意图。

Figure 1-4 (A) Chemical structures of four ClO^- -specific AIE probes and the corresponding molecular optimization strategy; (B) Preparation of TCPQ NPs and their response to ClO^- with clear fluorescence changes; (C) Schematic illustration of the applications of TCPQ NPs in vitro and in vivo.

Zhou^[45]等人构建了一种新的双光子近红外荧光探针(TP-NIR- H_2O_2), 用于活体细胞和组织中线粒体 H_2O_2 的检测(图 1-5)。通过选择性实验表明, 该探针能够以比其他 ROS 高的选择性检测 H_2O_2 , TP-NIR- H_2O_2 显示出约 105 倍的荧光强度增强, 此外, 在双光子激发(800nm)下, TP-NIR- H_2O_2 可用于大组织图像深度(50-170um)的小鼠肝组织 H_2O_2 成像。

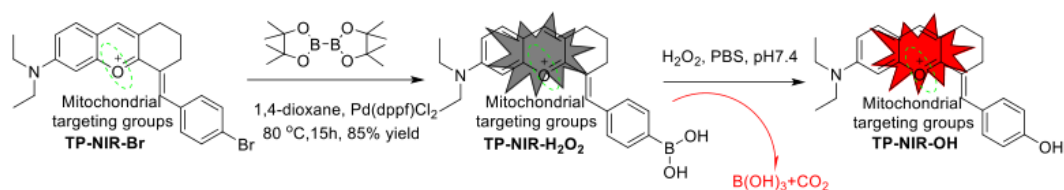


图 1-5 荧光探针 TP-NIR-H₂O₂ 的合成路线及其与 H₂O₂ 的反应机理

Figure 1-5 Synthetic route of fluorescent probe TP-NIR-H₂O₂ and its reaction mechanism with H₂O₂

半胱氨酸(Cys)作为一种必需的生物硫醇，在调节细胞代谢、维持细胞内氧化还原平衡和促进蛋白质合成方面起着关键作用。Zhang^[46]等人合成了一种 AIE 活性荧光探针 TCF-TPA，用于特异性检测 HeLa 细胞中的 Cys (图 1-6)。TCF-TPA 由三氰基呋喃(TCF)荧光团组成，用丙烯酸酯基团修饰，以区分 Cys 与其他生物硫醇，并掺入供电子的三苯胺赋予探针 AIE 特性和强大的分子内电荷转移效应，从而使探针具有近红外(NIR)发射长度(666 nm)。同时，TCF-TPA 对 Cys 的检测限较低(73.0 nM)，并成功对 HeLa 细胞中的 Cys 进行了生物成像。

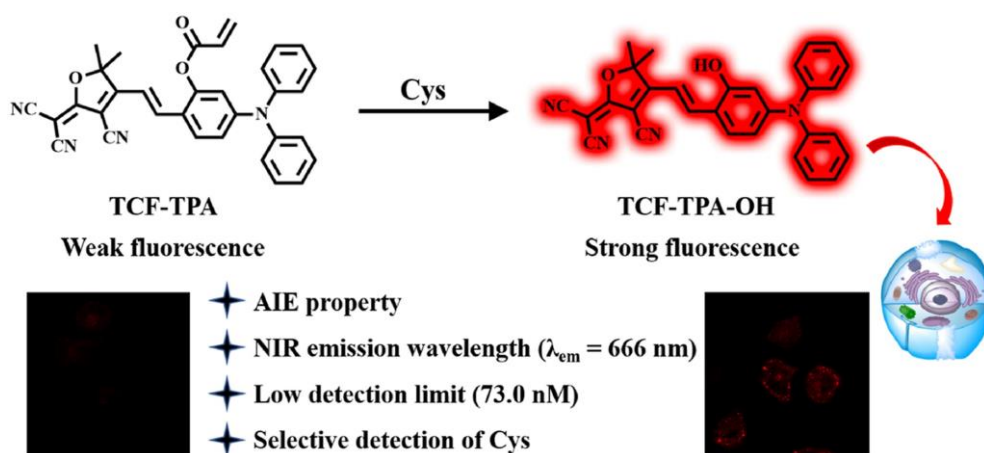


图 1-6 TCF-TPA 的传感机理

Figure 1-6 Sensing mechanism of TCF-TPA

1.6.3 光动力治疗

近年来，光动力疗法(PDT)已成为对抗癌症的有效方法。与传统治疗方法相比，PDT 因其独特的可控性精确、低毒性、耐药小、选择性高等特征，作为一种无创、安全的癌症治疗方法而备受关注^[47]。然而，现有的光敏剂(PS)存在许多缺点，例如光稳定性差、溶解性差、单重态氧的作用半

径有限等^[48,49], 这将极大地限制 PDT 处理效率。因此, 寻找高效 PS 来生产活性氧正在迅速增长。

Shah^[50]等人利用二氢吡咯并[3,2-b]吡咯-3,6-二甲醛(DPPC)发色团, 开发了一种近红外响应型有机纳米粒子作为 PS, 用于有效的 PDT。DPPC PS 在光疗窗口内表现出双光子吸收, 双光子吸收截面高达 102 GM, 在双光子激发下可产生大量 $^1\text{O}_2$ 。将 DPPC PS 制成了纳米颗粒, 发现其可作为 HeLa 细胞的成像剂。体外研究表明, 纳米 DPPC PS 是一种有效的 PDT 药剂, 仅在光照射下就能杀死癌细胞(图 1-7)。

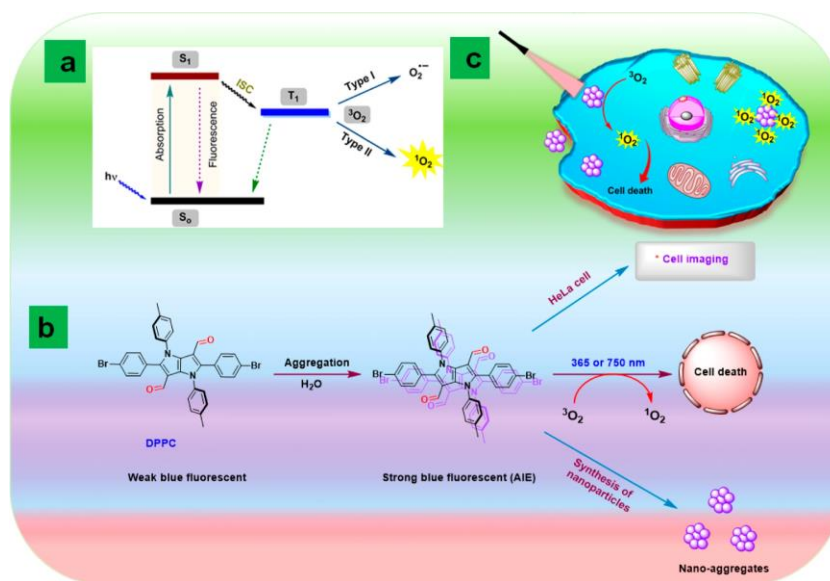


图 1-7 (a) PS 生成 ROS 的工作机制;(b)基于 DPPC 纳米 AIEgen 的 PS 的单光子和双光子激发 AIE、纳米配方和 $^1\text{O}_2$ 生成示意图; 以及 (c) 基于 NanoDPPC 的 PS 的细胞内光刻疗法

Figure 1-7 (a) Working Mechanism of ROS Generation by the PSs; (b) Schematic Representation of AIE, Nanoformulation, and $^1\text{O}_2$ Generation by One- and Two-Photon Excitation of DPPC Nano-AIEgen-Based PSs; and (c) Intracellular PDT of NanoDPPC-Based PSs

1.6.4 生物成像

传统的成像技术(计算机断层扫描(CT)、磁共振成像(MRI)、超声成像(US)、正电子发射断层扫描(PET)等)具有非常强的穿透力, 但也存在一定的缺陷, 比如其电离能源对患者和操作人员都有一定的危险性, CT 的软组织对比度差, US、MRI 和 PET 的时空分辨率有限, MRI 和 CT 采集时

间长等缺点^[51-53]。相比之下，远/近红外(NIR)荧光成像表现出了比 US、CT 和 MRI 更高的优点，包括无害、快速反馈和更高灵敏度^[53,54]。因此，NIR-II 荧光成像在高效肿瘤诊断中具有很大的前景。

Yaqun Ma^[55]等人合成了一种具有多结合位点的 7-(二乙胺)香豆素衍生物荧光探针，用于检测肿瘤细胞内的生物硫醇。使用单层功能磷脂(DSPE-PEG)涂层和 TPE 改性来解决探针在水相中猝灭的问题，使探针在水相中具有良好的稳定性和生物相容性，从而使探针对肿瘤具有良好的成像效果(如图 1-8 所示)。使用生物信息学方法来揭示 Met 和 VEGF 基因在头颈部鳞癌(HNSCC)肿瘤组织和正常组织中的差异表达，证实该探针对 HNSCC 具有更强的靶向成像能力。

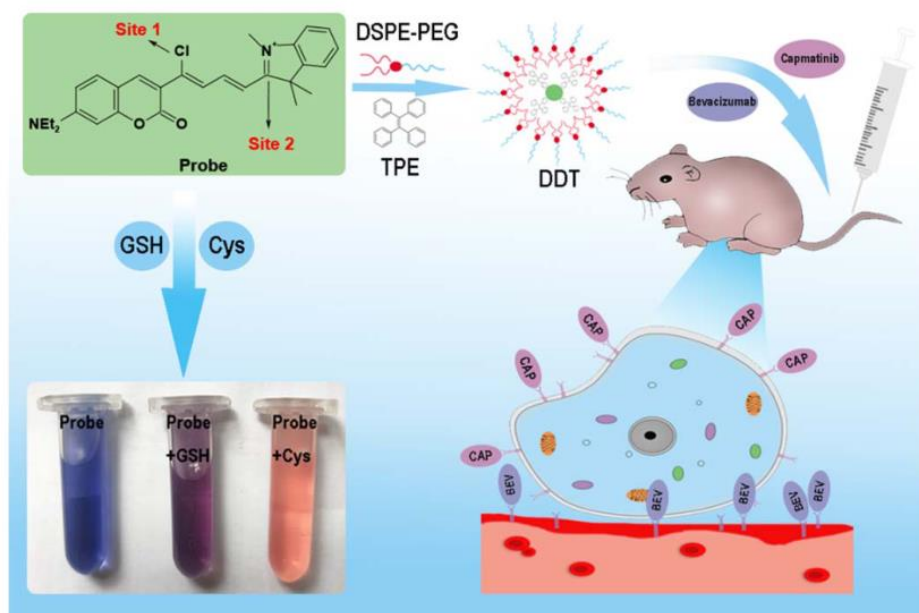


图 1-8 DDT 的设计和生物鉴定(GSH/Cys 检测和肿瘤细胞成像)

Figure 1-8 Design and biological characterization of DDT (GSH/Cys detection and tumor cell imaging)

1.7、本文双波长荧光聚合物胶束所涉材料

通常生物的生理环境为水溶液，大多数有机荧光探针表现出疏水性，因此设计开发在生理环境(水溶液)下具有最小背景荧光、长波长发射的两亲性的双波长荧光高分子纳米胶束，并通过增强渗透性和保留(EPR)效应使其被动靶向肿瘤，从而实现生物体内癌症诊疗和细胞成像监测^[56]。

1.7.1 四苯乙烯基衍生物(TPE)

在众多的具有 AIE 的荧光材料中, TPE 因其结构简单、易官能团化、合成简单等优点被广泛关注。TPE 的合成方法众多, 如 McMurry 偶联反应、Witting 反应、醇脱水等。传统的 McMurry 偶联反应通常采用低价钛催化羰基制备烯烃。Jiang^[57]等人将 4-氨基二苯甲酮在 Zn/TiCl_4 催化下合成 TPE-2NH₂(如图 1-9(a))。由于钛催化剂的成本相对较高, Liu^[58]等人通过 Sn/HCl 催化 4, 4'-二氨基二苯甲酮制备 TPE-AM(如图 1-9(b))。因此, 本文也是通过以 Sn/HCl 为催化剂, 催化 4-氨基二苯甲酮制备 TPE-2AM。

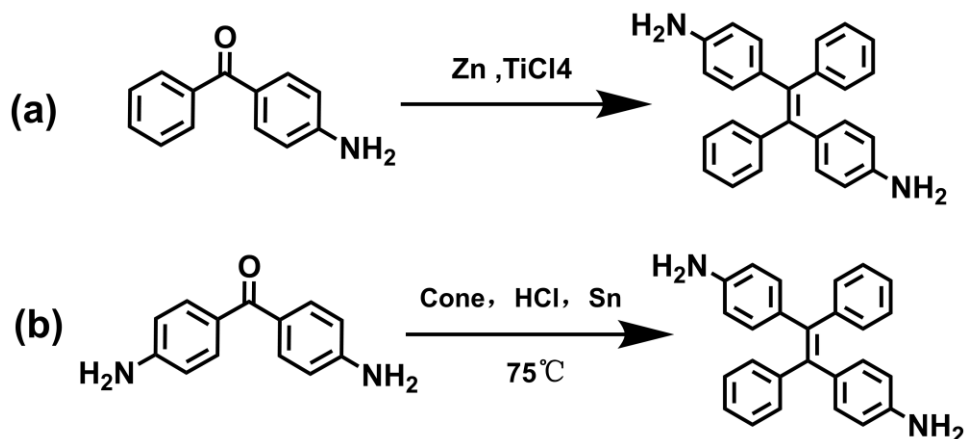


图 1-9 McMurr 偶联反应的反应式

Figure 1-9 Reaction formula of McMurr coupling reaction

1.7.2 含远/近红外 (FR/NIR) 的化合物

远/近红外基团 (Far/Near-Infrared, FR/NIR) 是指在远红外 (FIR) 和近红外 (NIR) 光谱范围内具有吸收或发射特性的化学基团。这些基团通常由含有共轭双键、芳香环或杂环的有机化合物组成, 常见的近红外发光团有: 苯并芘、蒽、芘、吡啶、喹啉、过渡金属配合物^[59] 等。常见的 FR/NIR 荧光团一般都是斯托克斯位移大、光稳定性高和荧光量子产率高等性能优良的荧光染料, 并且该类荧光染料通常可以通过修饰结构来调控自身的荧光性能。近红外(NIR)荧光探针因其对活细胞损伤小、组织穿透性好、图像灵敏度高、背景自发荧光干扰小而引起了人们的广泛关注^[60]。用作乏氧成像的磷光探针分子通常为 Pt, Pd, Ru, Ir 等过渡金属的配合物。因此, 我们将金属铱配合物作为近红外荧光基团, 赋予材料乏氧敏感特性, 有助于在肿瘤部位进行乏氧成像。

1.7.3 3-丙烯酰胺基苯硼酸(APBA)

苯硼酸(PBA)是一种癌细胞靶向配体,因为 PBA 在水溶液中以不带电的分子和带负电荷的离子两种相互平衡的形式存在,其中带电离子能形成稳定的络合物,因此苯硼酸(PBA)基材料与二醇、糖和糖蛋白具有特异性和可逆性相互作用^[61],在各种含 PBA 的材料中,3-丙烯酰胺基苯硼酸(APBA)由于其 pKa 为 8.2(接近生理 pH 值),并且由于其具有可进行聚合反应的双键,因此为制备纳米颗粒提供了极好的构建块,可以靶向大多数癌细胞表面过表达的 SA 受体^[62,63]。SA 受体位于细胞糖蛋白侧链末累积可以与 PBA 可逆结合形成硼酸酯结构。因此,可以将 PBA 引入纳米载体赋予主动靶向肿瘤细胞的能力,以诱导细胞特异性识别和结合,有助于纳米药物在肿瘤部位的累积和细胞摄取^[64]。

1.7.4 透明质酸(HA)

为了在生理条件下刺激性响应并调节苯硼酸的细胞毒性,我们将亲水性和生物相容性碳水化合物透明质酸(HA)引入纳米胶束中。透明质酸是一种水溶性酸性多糖,由于其生物相容性、生物降解性、易修饰性、低毒性以及对肿瘤细胞表面过度表达的 CD44 和 RHAMM(HA 介导运动受体)受体的特异性靶向性,常被用作聚集诱导支架和靶向单元^[65]。亲水性 HA 壳可以特异性靶向 HA 受体癌细胞,并在细胞水平上实现对癌细胞的靶向荧光成像,同时对癌细胞和正常细胞都没有细胞毒性,有望降低含 APBA 聚合物的细胞毒性。

综上所述,我们课题组将以 AIE 分子 TPE-2AM 为核心,先利用 ROP 和 RAFT 聚合分别接入疏水性的 PCL、PAPBA 和丙烯酸链段制备嵌段共聚物后,接着对其修饰上一种近红外荧光基团(Ir-OH),最后再与透明质酸通过硼酸酯键作用制备双波长荧光纳米胶束。由此获得的纳米胶束显示出强大的荧光、高水分散性和优异的生物相容性,使其在肿瘤检测和诊疗方面具有广阔的前景。

1.8 课题研究的主要内容

1.8.1 传统有机荧光探针的不足之处

传统有机荧光探针在应用过程中存在一些不足之处,主要包括以下几

个方面：

(1)光稳定性差：有机荧光探针的荧光发射波长通常在可见光区，但是组织和血液等生物样本会散射和吸收这些波长的光，从而影响探针的检测灵敏度和分辨率。

(2)荧光强度不稳定：传统有机荧光探针的荧光强度会受到环境因素的影响，导致发光强度较低，需要高浓度的探针才能获得足够的信号，这可能会导致毒性或其他副作用。

(3)深部组织成像受限：荧光成像对深部组织的成像受到限制，无法像CT或MRI那样深入肿瘤内部成像。

(4)发光寿命较短：传统有机荧光探针在长时间的光照下容易发生光降解，导致荧光信号的衰减和失真，从而降低探针的稳定性和可靠性。

(5)选择性和特异性较低：往往不能区分不同的细胞或分子亚型，难以实现高度特异性的检测，从而影响其在生物医学研究和临床应用中的准确性和可靠性。荧光成像需要使用特定的分子标记物进行检测，因此其适用范围受到标记物选择的局限性。

(6)生物相容性不佳：传统有机荧光探针中常使用的某些化学物质可能对生物体产生毒性或过敏反应，限制了其在生物体内的应用。

(7)成像设备和技术的限制：荧光成像需要特定的成像设备和技术，成本较高，操作难度较大。

1.8.2 本文具体研究思路

一、透明质酸因具有生物相容性、抗黏连性、非免疫原性及癌细胞靶向性等优势，成为生物医药领域广泛应用的天然多糖。另一方面，利用特殊功能基团构建微环境敏感的高分子纳米粒子，有利于病灶光学造影或药物的递送，进而提升疾病的诊疗效果。因此，我们利用可逆加成-断裂链转移(RAFT)聚合可控合成了3-丙烯酰胺基苯硼酸与乙烯基吡咯烷酮的嵌段共聚物，通过硼酸酯键与透明质酸自组装形成了纳米胶束。调节两种高分子的投料浓度及优化共聚物的链长比例，能够实现对胶束水合粒径的调控，并且该纳米粒子具有良好的pH、糖和盐响应性，使其具有用作抗肿瘤活性药物及探针载体的潜能。

二、同样基于硼酸酯键和透明质酸作用的特点和手段，通过引入光学发射基团，赋予多重响应性纳米胶束光学性能。首先，以 1, 2-二苯基-1, 2-二(4-氨基苯基)乙烯(TPE-2AM)分子为核心，利用 ROP 和 RAFT 协同聚合方式在 TPE-2AM 的二氨基上接入疏水的聚己内酯、聚(3-丙烯酰胺基苯硼酸)和聚丙烯酸链段。由于近红外基团可以提高荧光探针的光稳定性、灵敏度、分辨率以及组织穿透性，在得到的共聚物通过酯化修饰上近红外荧光基团(Ir-OH)，最后通过硼酸酯键和透明质酸作用形成双波长荧光高分子纳米胶束。通过投料比及浓度来调控纳米胶束的粒径，制备粒径适应后续研究的双波长发射纳米胶束，测试结果表明其拥有粒径可控、良好分散性和稳定性、规则的球形形貌，并且表现出良好的光学性能，具有 470 nm 和 721 nm 双波段发射以及优秀的光学寿命，尤其是近红外发射呈现了较高的量子产率。因此，该高分子纳米胶束具有多场景和高灵敏生物标记和成像的潜在应用价值。

三、深入研究了双波长荧光高分子纳米胶束的性能及应用功能。考察了介质的 pH 和葡萄糖浓度对双波长荧光纳米胶束的光学及胶体性能的影响，显示其具有 pH、葡萄糖胶体响应性，并且能够保持良好的光学性能。环境含氧量探究表明该胶束的近红外发射对氧分压尤其敏感，低氧条件下，氧浓度的微小变化将导致胶束近红外发射强度的急剧升高，胶束对氧的敏感度远高于常规的商用细胞内探针。最后，对双波长荧光高分子纳米胶束进行了细胞实验检测，证实其具有良好的生物相容性，能够被细胞有效摄入、表现了良好的特异性细胞亲和性。双波长荧光纳米胶束表现出优异的生物相容性、胶体稳定性和近红外光学响应性，预示其作为高效生物标记和成像探针，在癌症高灵敏、多场景的诊断和治疗等方面具有巨大开发前景。

1.8.3 本研究特色之处

本文研究的特色之处有以下三个方面：

一、选用 3-丙烯酰胺基苯硼酸(APBA)作为实验原料。APBA 是一种癌细胞靶向配体，与二醇具有可逆性相互作用，可赋予材料主动靶向肿瘤细胞与糖敏感特性的能力，有助于纳米药物在病灶处累积和细胞摄取。

二、选用透明质酸作为实验原料。一方面可调节苯硼酸的细胞毒性并与 APBA 通过动态硼酸酯键形成两亲性胶束，实现材料的刺激响应性以及结构调控性；另一方面也可以赋予材料特异性靶向 HA 受体癌细胞的能力。

三、选择 TPE-2AM 和铈配合物作为发光材料。基于 AIE 效应和近红外发射，使材料能够在场景不同(组织深度差异)的病变组织处聚集态下表现出较强光学特性或组织乏氧诱导强化深层成像，可用于肿瘤诊断或辅助治疗。

第 2 章 响应性透明质酸胶束的合成与性质

2.1 前言

近年来, 纳米药物设计与发展为癌症的诊疗及药物递送提供了有效的思路与方法。两亲性聚合物组装的胶束具有高效的载药性与良好的稳定性, 胶束拥有的特殊核-壳构造将增强药物在肿瘤部位的渗透富集, 能够使药物于病灶更有效的发挥出作用^[66,67]。苯硼酸(PBA)及其衍生物被广泛用于化学^[68,69]和生物医药^[70,71]等学科领域。一方面, 由于 PBA 在水溶液中以不带电的分子和带负电荷的离子两种相互平衡的形式存在, 带电离子能形成稳定的络合物, 进而苯硼酸基材料与二醇、糖和糖蛋白具有特异性和可逆性相互作用, 可以用来对含糖物质进行检测^[72-74]。此外, 苯硼酸能够选择性的促进葡萄糖穿透脂双层, 实现运输的功能, 能被用作分子识别单元, 构建了糖蛋白传感器^[75]和糖类传感器^[76,77]。另一方面, 苯硼酸是一种癌细胞靶向配体, 进一步简单合成的 3-丙烯酰胺基苯硼酸(APBA)单体因 pK_a 值接近生理 pH, 成为纳米载体优良的构建模块^[61,62,78], 有助于构造肿瘤靶向的活性物质纳米载体。

为降低苯硼酸的生理副作用并获得病理微环境响应性, 将生物可降解且生物相容性的透明质酸(HA)引入组装胶束。透明质酸是一种水溶性多糖, 因其官能团易修饰性、无毒性及对肿瘤细胞具有特异亲和性, 常被用作聚集诱导支架^[79]和靶向单元^[65,66]。亲水性 HA 壳可以特异性靶向 HA 受体过量表达癌细胞, 并在细胞水平上实现对癌细胞的主动靶向, 同时对正常细胞没有毒性, 有望抑制含 APBA 聚合物的生物毒性^[80-82]。

综上考虑, 本工作先采用 3-丙烯酰胺基苯硼酸由 RAFT 聚合得到均聚物 PAPBA。进一步经 RAFT 聚合接入聚乙烯基吡咯烷酮(PVP)链段形成共聚物, 通过控制投料的比例合成了一系列共聚物 PAPBA-*b*-PVP。最后与透明质酸通过动态硼酸酯键组装制备聚合纳米胶束。利用共聚物内链段比例及物料浓度调节胶束粒径等性质, 研究胶束制备的可控性, 探究了 pH、盐浓度以及葡萄糖浓度对胶束粒径的影响, 为疾病诊疗用纳米载体材料的设计、功能化应用提供一种思路。

2.2 实验部分

2.2.1 主要原料

表 2-1 实验试剂

Table 2-1 Experimental materials

材料	规格	生产厂家
乙基黄原酸钾	分析纯	北京伊诺凯科技有限公司
偶氮二异丁腈(AIBN)	分析纯	北京伊诺凯科技有限公司
丙烯酰氯	分析纯	北京伊诺凯科技有限公司
无水乙醚	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
N, N-二甲基甲酰胺(DMF)	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
葡萄糖	分析纯	上海泰坦科技股份有限公司
3-氨基苯硼酸一水合物	分析纯	上海泰坦科技股份有限公司
乙烯基吡咯烷酮(NVP)	分析纯	上海泰坦科技股份有限公司
碳酸氢钠	分析纯	上海泰坦科技股份有限公司
氯化钠	分析纯	上海泰坦科技股份有限公司
透明质酸钠	分析纯	华熙福瑞达生物医药有限公司
2-溴丙酸	分析纯	上海梯希爱化成工业发展有限公司

2.2.2 主要设备和仪器

表 2-2 实验仪器

Table 2-2 Experimental instruments

仪器	型号	生产厂家
核磁共振波谱仪	AVANCE ONE 500 MHz	德国 Bruker 科技有限公司
红外光谱仪	FT-IR-850	港东科技
凝胶渗透色谱仪	Waters 2695	美国沃斯特公司
纳米粒度电位分析仪	Zetasizer Advance	马尔文帕纳科公司
扫描电子显微镜	S-4800	日本日立公司

2.2.3 样品制备

2.2.3.1 聚(3-丙烯酰胺基苯硼酸)(PAPBA)的合成

首先合成 APBA 单体, 根据文献由间氨基苯硼酸一水合物与丙烯酰氯反应制得^[83]。以黄原酸二硫酯(XA)为链转移试剂, APBA 经可逆加成-断裂链转移反应合成 PAPBA。我们按照不同分子量需求投料(如: 2 K, 4 K)合成 2 种链长的 PAPBA, 并以 4 K 分子量的合成为例, 具体操作如下:

APBA(0.5 g, 2.62 mmol)、黄原酸二硫酯 (0.0254 g, 0.131 mmol)和 AIBN(4.3 mg, 0.0262 mmol)加入 5 mL 的 DMF-Water($V_{\text{DMF}}:V_{\text{water}} = 95:5$)混合溶剂中, 氩气换气三次。70 °C 反应 24 h 后, 开口放空气并快速冷却至室温后, 除溶剂, 用 3 mL 甲醇溶解固体, 将产物甲醇液在冷乙醚中沉淀, 收集产物, 再重复上述洗涤操作一次后, 所得固体用 10 mL 丙酮洗涤, 干燥得产物。

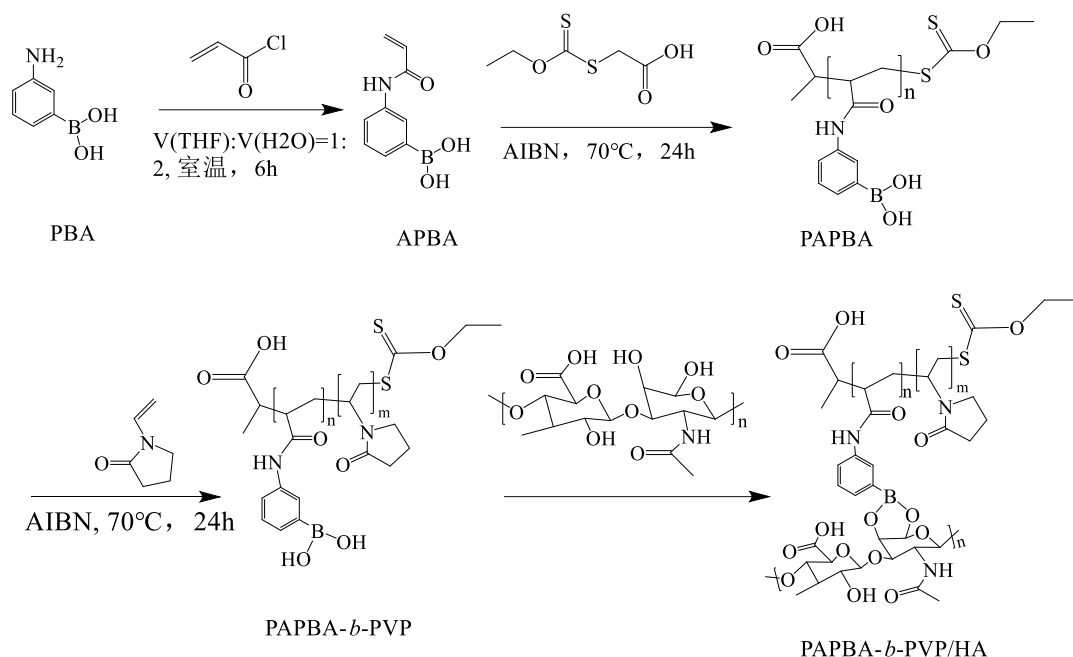
2.2.3.2 PAPBA-*b*-PVP 共聚物的合成

由含活性端基的 PAPBA 进一步与乙烯基吡咯烷酮(NVP)通过 RAFT 聚合制备 PAPBA-*b*-PVP。改变 NVP 的投料量调控 PVP 的链段长度, 分别为 1 K 和 2 K, 从而合成 3 种不同嵌段比的 PAPBA-*b*-PVP 共聚物[记作: PAPBA(4K)-*b*-PVP(2K)、PAPBA(4K)-*b*-PVP(1K)、PAPBA(2K)-*b*-PVP(1K)]。以 PAPBA(4K)-*b*-PVP(2K)的合成为例, 具体操作如下:

将的 PAPBA (0.38 g, 0.1 mmol)、NVP(214 μL , 2 mmol)和 AIBN (3.28 mg, 0.02 mmol)加入 2 mL 干燥的 DMF 溶剂中, 氩气换气三次, 70 °C 反应 24 h, 产物快速冷却并开口放空气。用 3 mL 甲醇溶解产物, 将产品溶液搅拌滴入 80 mL 冷乙醚, 沉淀收集固体。再以甲醇溶解产物, 在冷乙醚中沉淀, 收集产物。

2.2.3.3 PAPBA-*b*-PVP/HA 聚合物胶束的制备

PAPBA-*b*-PVP/HA 制备过程及构造如图 2-1 所示, 共聚物与透明质酸基于硼酸酯键组装成聚合物纳米粒子。分别调控 PAPBA-*b*-PVP 链段比、共聚物浓度(如: 1.5、2.5、3.5、5、7.5、10、12.5、15 mg/mL)或透明质酸的浓度(如: 0.1、0.2、0.5、1、2、3、4、5 mg/mL)来制备理化性质不同的系列胶束溶液, 研究纳米胶束制备的可调控性。以 7.5 mg/mL PAPBA(4K)-*b*-PVP(2K)与 3 mg/mL HA 为例说明胶束的制备过程: 取 7.5 mg PAPBA(4K)-*b*-PVP(2K)溶于 1 mL 甲醇, 将 3 mg/mL 的透明质酸水溶液边搅拌边缓慢滴加至共聚物甲醇溶液种, 产生灰蓝色且稳定的纳米胶束液。

图 2-1 PAPBA-*b*-PVP/HA 胶束的制备路线Fig 2-1 Schematic showing the preparation of PAPBA-*b*-PVP/HA micelles

2.3 性能测试与结构表征

核磁共振氢谱(^1H NMR)测试：以氘代 DMSO 或氘代甲醇为试剂溶解 10~15mg 样品，四甲基硅烷为内标物，进行测定。

傅里叶红外光谱(FT-IR)测试：取适量样品，采用 KBr 压片法制样后测试，波数范围 $4000 \sim 500 \text{ cm}^{-1}$ 。

凝胶渗透色谱(GPC)测试，使用示差折光检测器，以四氢呋喃为流动相，流速为 1.0 mL/min ，检测温度为 35°C 。

胶束粒径分布以及 Zeta 电位(DLS)测试，取 3 mL 胶束液在石英比色皿中进行测试，循环测试 3 次，结果取平均值；将胶束溶液置于电极池中，循环测试 5 次，结果取平均值，测试温度为 25°C 。

纳米胶束形貌测试：将胶束液进行适当稀释后，取 1~2 滴在洁净的硅片上风干后，用扫描电子显微镜进行测试。

2.4 结果与讨论

2.4.1 PAPBA 的合成与表征

间氨基苯硼酸一水合物与丙烯酰氯通过酰胺化反应合成 APBA^[22]，采用 RAFT 聚合合成了 PAPBA。APBA 的核磁氢谱如图 2-2(a)，化学位移(δ) = 2.50

ppm 为 DMSO 的溶剂峰, APBA 的特征峰($\delta H^c = 10.15$ ppm, $-NH-$; $\delta H^h = 8.04$ ppm, $-OH$; $\delta H^g = 7.89$ ppm, $-Ph-H$; $\delta H^e = 7.83$ ppm, $-Ph-H$; $\delta H^d = 7.53$ ppm, $-Ph-H$; $\delta H^f = 7.29$ ppm, $-Ph-H$; $\delta H^b = 6.45$ ppm, $-CHCO-$; $\delta H^a = 6.26$ ppm, $=CH_2$; $\delta H^a = 5.74$ ppm, $=CH$), 证实了单体 APBA 的结构。图 2-2(b)为 PAPBA 的核磁共振氢谱, PAPBA 的特征峰($\delta H^h = 7.98$ ppm, $-OH$; $\delta H^{d-g} = 7.71-7.15$ ppm, $-Ph-H$; $\delta H^i = 3.51$ ppm, $-OCH_2-$; $\delta H^k = 2.87$ ppm, $-CHCOOH$; $\delta H^b = 2.59$ ppm, $-CH-$; $\delta H^a = 2.38$ ppm, $-CH_2-$; $\delta H^{j+1} = 1.19$ ppm, $-CH_3$), 相比于 APBA 的核磁共振氢谱, 发现 PAPBA 中 $C=C$ 的质子峰消失, 而新增了聚合物主链上的甲基与亚甲基特征峰, 同时保留了 APBA 中苯硼酸(7.15~7.98 ppm)的信号, 表明了聚合物 PAPBA 的合成。

图 2-2(c)为 APBA 和 PAPBA 的红外光谱图, 在 $3200 \sim 3600\text{ cm}^{-1}$ 范围内有较宽的吸收带, 是由化合物中羟基间氢键和酰胺基团的 $N-H$ 伸缩振动所致。由谱图可见 2932 cm^{-1} 的吸收峰为烷基链上的甲基和亚甲基的伸缩振动所致, 酰胺 I 带的 $C=O$ 伸缩振动产生了 1650 cm^{-1} 的吸收带, 1350 cm^{-1} 处的吸收峰属于硼酸基的 $B-O$ 的伸缩振动。相比于 APBA, PAPBA 中属于 $C=C$ 伸缩振动的 1630 cm^{-1} 特征峰的消失, 进一步证明了 APBA 和 PAPBA 的结构。

为了制备符合体内长循环及病灶渗透需求的纳米载体, 有利于自组装中实现胶束粒径的调控, 合成了分子量不同的 2 种聚合物 PAPBA(2 K, 4 K)。图 2-2(d)为不同分子量 PAPBA 的 GPC 曲线, 结果显示 PAPBA 在谱图上均表现为一个单峰, PAPBA(2 K)的数均分子量 $\bar{M}_n = 2700$, 分子量分布指数 $PDI = 1.78$, 分子量分布较宽。PAPBA(4 K)的数均分子量 $\bar{M}_n = 4000$, 分子量分布指数 $PDI = 1.41$, 说明合成了目标聚合度的 PAPBA 产品。

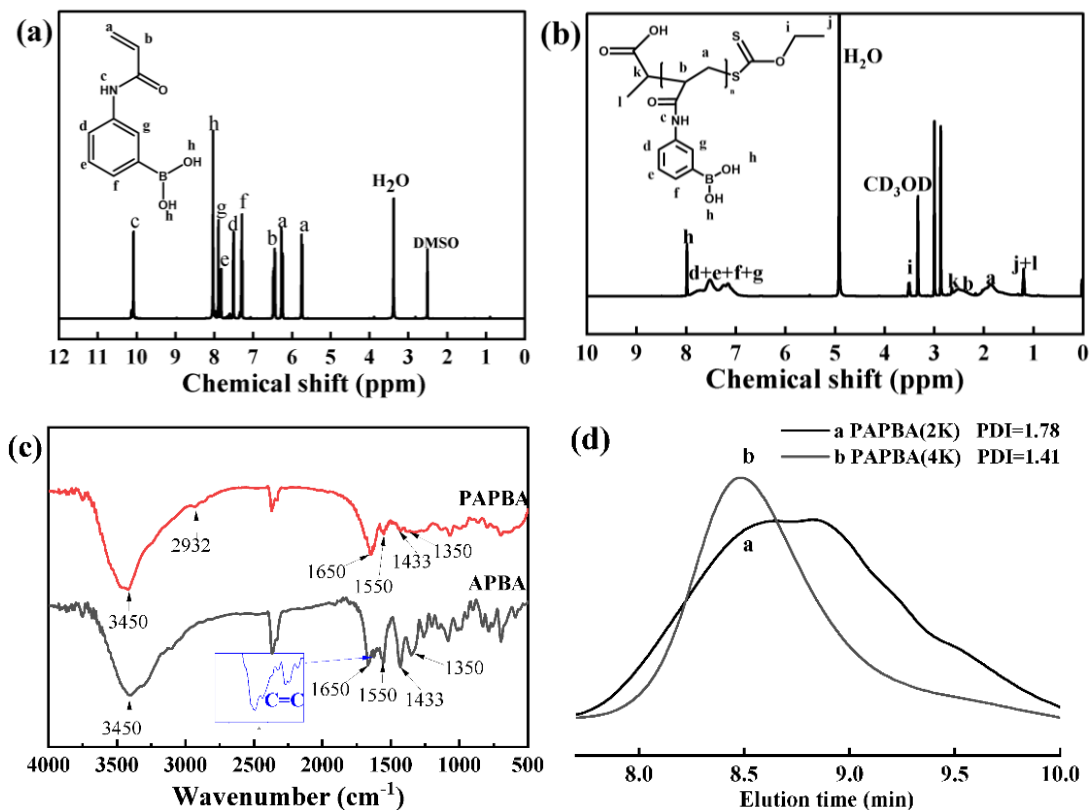


图 2-2 (a) APBA 和(b) PAPBA 的核磁共振氢谱图; (c) APBA 与 PAPBA 的红外光谱图; (d)

PAPBA 的 GPC 曲线

Fig 2-2 ^1H NMR spectra of APBA (a) and PAPBA (b); (c) FT-IR spectra of APBA and PAPBA; (d)

GPC curves of PAPBA

2.4.2 PAPBA-*b*-PVP 的合成与表征

在含活性端基的均聚物上继续利用 RAFT 聚合接入亲水的 PVP 链段, 控制 PAPBA 与 NVP 单体的投料量, 进而合成了两嵌段长不同的两亲性聚合物。由 PAPBA-*b*-PVP 的核磁氢谱(如图 2-3(a)), 化学位移(δ) = 3.31 ppm 为 CD_3OD 的溶剂信号($\delta\text{H}^{\text{h}}$ = 7.98 ppm, $-\text{OH}$; $\delta\text{H}^{\text{d-g}}$ = 7.71 - 7.15 ppm, $-\text{Ph-H}$; $\delta\text{H}^{\text{j}}$ = 3.51 ppm, $-\text{CONCH}_2-$; $\delta\text{H}^{\text{a}}$ = 2.52 ppm, $-\text{CH}_2-$; $\delta\text{H}^{\text{m}}$ = 2.37 ppm, $-\text{CH}-$; $\delta\text{H}^{\text{i}}$ = 2.17 ppm, $-\text{NCOCH}_2-$; $\delta\text{H}^{\text{k}}$ = 2.04 ppm, $-\text{NCOCH}_2\text{CH}_2-$; $\delta\text{H}^{\text{b}}$ = 1.86 ppm, $-\text{CH}-$; $\delta\text{H}^{\text{n}}$ = 1.49 ppm, $-\text{CH}-$)。与 PAPBA 的谱图相比, PAPBA-*b*-PVP 谱图在 PAPBA 信号峰的基础上, 出现了 PVP 链官能团的特征峰, 证实了嵌段共聚物已被合成。图 2-3(b)为 PAPBA-*b*-PVP、NVP 与 PAPBA 的红外谱图, 共聚物中仅在 1280 cm^{-1} 处新增了 NVP 中 C-N 的伸缩振动峰, 而 NVP 乙烯基双键在 1631 cm^{-1} 处的吸收峰未出现, 1650 cm^{-1} 为酰胺 I 带(酰胺基团中 C=O 伸缩振动形成), 1550 cm^{-1} 也为酰胺

I 带 (酰胺基团中 N-H 弯曲振动特征峰), 进一步表明成功获得了 PAPBA-*b*-PVP。

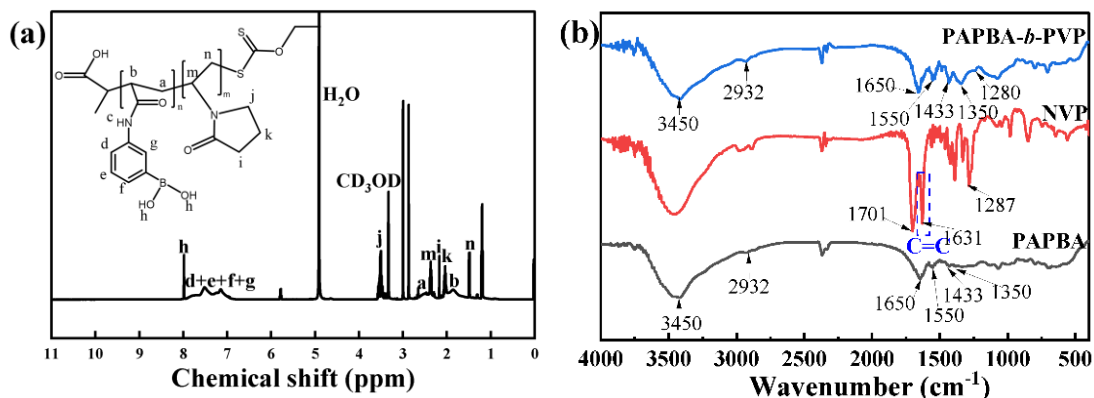


图 2-3 (a) PAPBA-*b*-PVP 的核磁共振氢谱图; (b) PAPBA-*b*-PVP、NVP 和 PAPBA 的红外谱图

Fig 2-3 (a) ^1H NMR spectra of PAPBA-*b*-PVP; (b) FT-IR spectra of PAPBA-*b*-PVP, NVP and PAPBA

图 2-4 为 PAPBA-*b*-PVP 的 GPC 曲线, 结果显示 PAPBA(4K)-*b*-PVP(1K) 的数均分子量 $\bar{M}_n = 4900$, 分子量分布指数 $\text{PDI} = 1.67$, 分子量分布较宽。PAPBA(4K)-*b*-PVP(2K) 的数均分子量 $\bar{M}_n = 6800$, 分子量分布指数 $\text{PDI} = 1.77$, 分子量分布较宽, 结果基本接近设计的理论分子量。

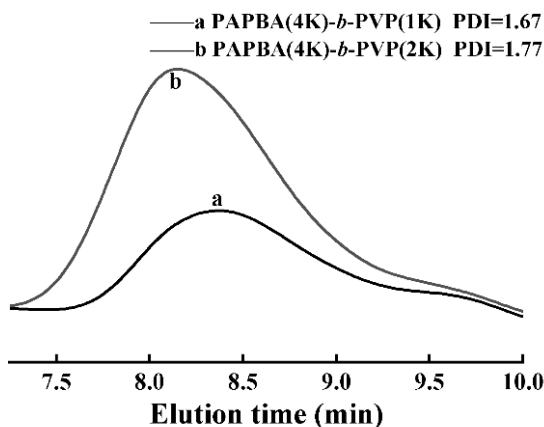


图 2-4 PAPBA-*b*-PVP 的 GPC 曲线

Fig 2-4 GPC curves of PAPBA-*b*-PVP

2.4.3 聚合物纳米胶束的制备和表征

共聚物 PAPBA-*b*-PVP 配制成甲醇后, 在搅拌下, 将不同浓度的 HA 去离子

水溶液缓慢滴入其中，得到透蓝光的乳液(如图 2-5(a))，表明已经组装成高分子纳米胶束。将制备的胶束溶液经冷冻干燥，所得白色固体，进行红外分析，如图 2-5(b)所示，与共聚物及 HA 相比，PAPBA-*b*-PVP/HA 中的-OH 和酰胺 N-H 特征峰发生了减弱且微移动，同时，硼酸基团的特征峰从 1350 cm^{-1} 处移动至 1360 cm^{-1} ，说明共聚物与透明质酸通过苯硼酸与邻二羟基形成了可逆硼酸酯键，进而证明了胶束的形成。

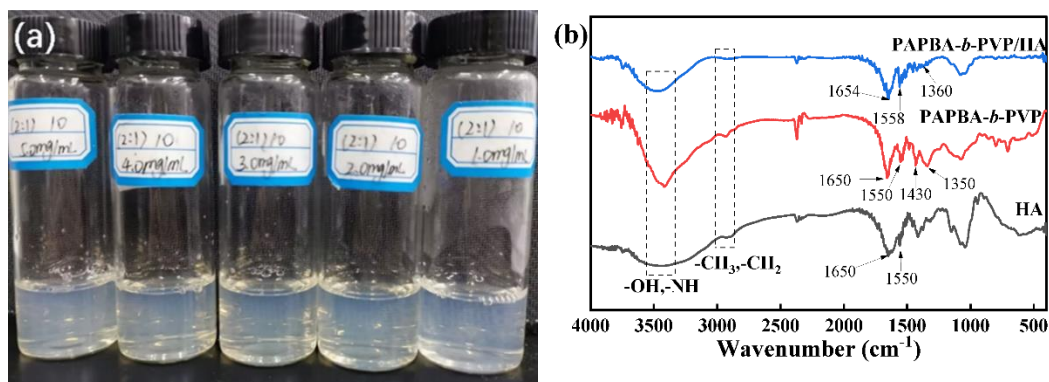


图 2-5 (a)不同 HA 浓度调控的 PAPBA-*b*-PVP/HA 胶束照片； (b) HA、PAPBA-*b*-PVP 和 PAPBA-*b*-PVP/HA 的红外光谱图

Fig 2-5 (a) Photo of PAPBA-*b*-PVP/HA micelles regulated by different HA concentrations; (b) FT-IR spectra of HA, PAPBA-*b*-PVP and PAPBA-*b*-PVP/HA

图 2-6 是扫描电子显微镜(SEM)观察 PAPBA-*b*-PVP/HA 胶束表面形貌的结果，其中 2-6(a)为 3 mg/mL HA 与 7.5mg/mL PAPBA(4K)-*b*-PVP(2K)共聚物组装胶束的 SEM 图片，图 2-6(b)为同浓度 HA 与 10 mg/mL 共聚物组装胶束的 SEM 图片，可以看到：纳米胶束展示了规则的球形表面和良好的分散性。两种纳米胶束由动态光散射(DLS)检测所得粒径分别为 142 nm 和 156.2 nm，如图 2-6(c)及 (d)所示。

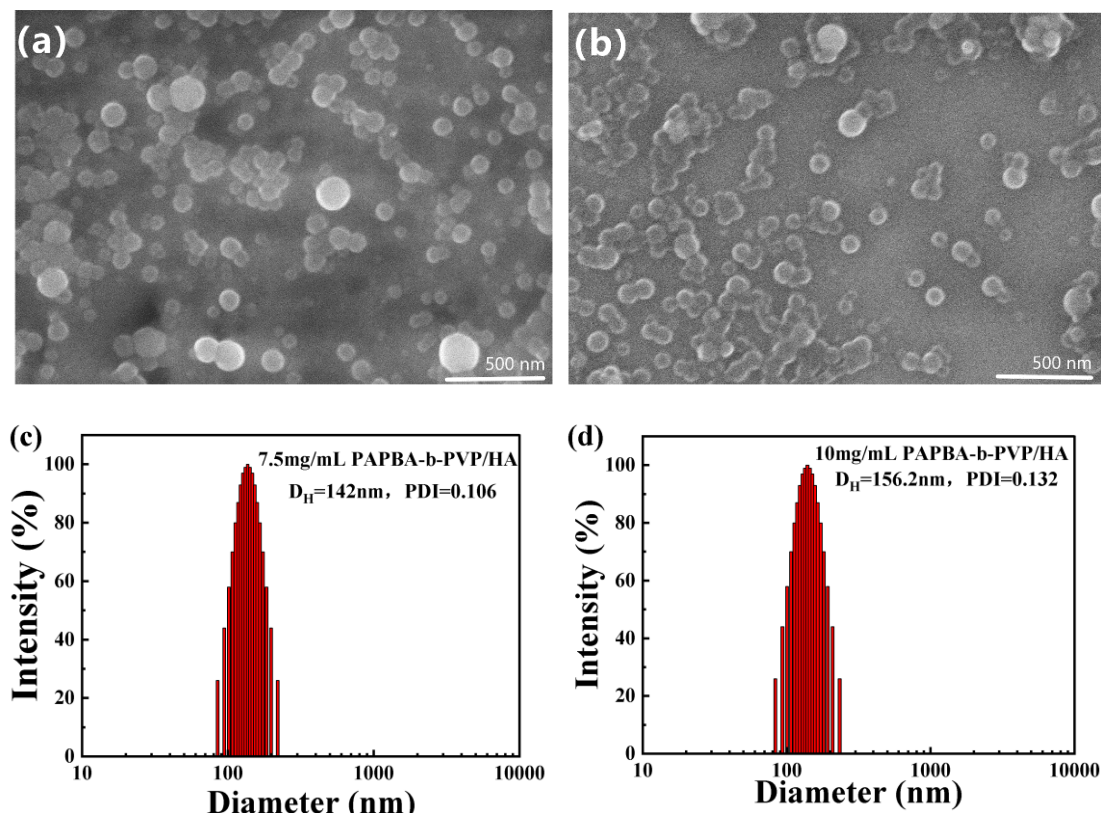


图 2-6 (a) 粒径为 142 nm 与(b) 156.2 nm 胶束的 SEM 图； (c) 142 nm 与(d) 156.2 nm 胶束水合粒径分布图

Fig 2-6 Images of micelles with particle size of (a)142 nm and (b) 156.2 nm; Hydrodynamic diameter distribution of the micelles with different sizes: (c) 142 nm and (d) 156.2 nm

2.4.4 制备条件对纳米胶束性质的调控

根据纳米胶束形成机制，我们推测共聚物分子量、两嵌段比及胶束内两聚合物投料量均会影响胶束的粒径等性质。因此，第一步，研究了苯硼酸链长及嵌段比、透明质酸浓度对纳米胶束的尺寸调节作用。图 2-7 展示了 10 mg/mL(或 8.3 mg/mL) 不同嵌段长的共聚物 [PAPBA(4K)-*b*-PVP(1K)、PAPBA(4K)-*b*-PVP(2K)、PAPBA(2K)-*b*-PVP(1K)] 同各种浓度(0.1、0.2、0.5、1、2、3、4、5 mg/mL) 的透明质酸组装成胶束的粒径变化趋势。由图可知，随着透明质酸的浓度的增加，胶束粒径总体趋势也随之增加；值得注意的是：HA 浓度低于 0.5 mg/mL 时，胶束粒径变化趋势不一致，可能是由于透明质酸的浓度较低时，胶束由硼酸酯键与共聚物疏水作用协同实现组装、且硼酸酯作用未占优势，导致胶束粒径趋势无序。整体来看，共聚物分子量较大也会引起胶束粒径相应的增

加；同时，等浓度的 PAPBA(2K)-*b*-PVP(1K)与 PAPBA(4K)-*b*-PVP(1K)相比，嵌段分子量比为 4 的共聚物所得胶束粒径明显降低，主要是因为更长的苯硼酸链增加了硼酸酯交联密度，驱使胶束内核更紧密收缩，使得其水合粒径减小。此外，亲水链段在介质中所受限制较少，因而 PAPBA 链段等长而亲水 PVP 链更长的共聚物与 HA 组装的胶束粒径更大。在实验中，发现共聚物 PAPBA(4K)-*b*-PVP(2K)同 HA 组装成胶束的效果最佳，胶束液的光散射更为明显，因此，后续的研究采用该嵌段比的共聚物进行相应的实验。

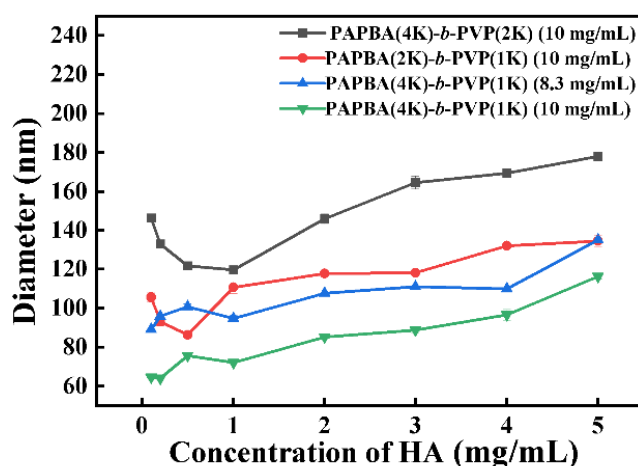


图 2-7 共聚物嵌段比、投料浓度与 HA 浓度对胶束水合粒径的调控

Fig2- 7 Hydrodynamic diameter changes of micelles with different block ratios and feed concentrations of the copolymer as a function of HA concentration

图 2-8(a)显示了不同浓度共聚物(如: 1.5、2.5、3.5、5.0、7.5、10.0、12.5 及 15 mg/mL)分别在 1、2 及 3 mg/mL 的透明质酸液中自组装所形成胶束的粒径及相应趋势。随共聚物浓度的增加，胶束粒径先增加后减小直至趋于平缓，且共聚物浓度为 5 mg/mL 时，粒径达到最大值分别为 140.2、151.4 及 163.9 nm。可能是因为不高于 5 mg/mL 的浓度时，促进胶束内核收缩的硼酸酯键密度不足以抵抗因共聚物增加而引起的膨胀，进一步提升共聚物浓度会持续增加硼酸酯键密度并完善其疏水收缩功能。为了增加胶束用于生物负载的表面多功能性能力，3 mg/mL HA 制备的胶束提供更多表面官能团显得较为有利，其粒径可控于 73.3 nm 与 163.9 nm 范围内。表面电势是纳米胶束应用及进一步功能化时的一个重要参数，以电位分析仪研究了胶束的 zeta 电位，结果如图 2-8(b)所示。胶束表面体现出了较大的负电性，随共聚物投料量的增加，其 zeta 电位从-41.2

mV 降低至 -62.5 mV，足以保障其应用时的介质稳定性。

基于上述分析，为满足潜在应用的需求，选择 7.5 mg/mL 共聚物 PAPBA(4K)-*b*-PVP (2K) 与 3 mg/mL HA 所制备的 142 nm 胶束，进行后续的性能研究。

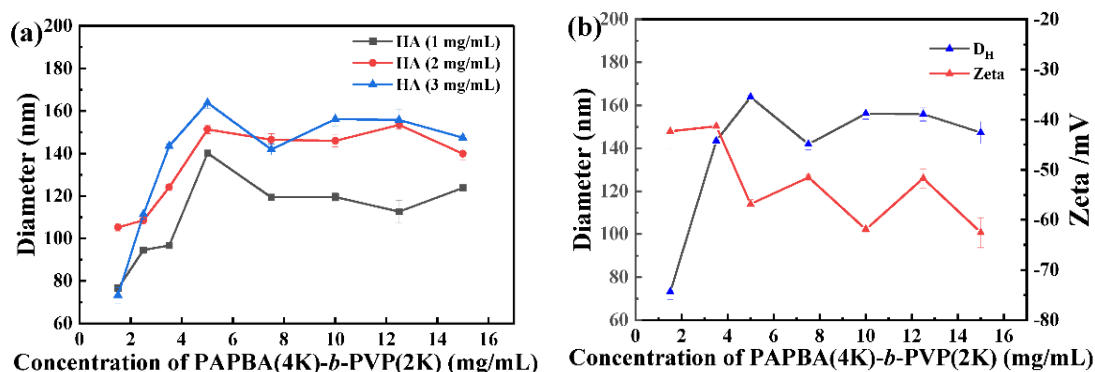


图 2-8 (a)共聚物和透明质酸的投料浓度对胶束粒径的影响; (b) 3 mg/mL HA 下，共聚物浓度对胶束粒径与 zeta 电位的影响

Fig 2-8 (a) Effect of concentrations of reactants on the size of micelles; (b) Effect of the copolymer concentrations on micelle particle size and zeta potential at 3 mg/mL HA

2.4.5 纳米胶束的稳定性

为证实纳米胶束的长期稳定性，随后利用 DLS 进行了胶束粒径随时间变化的研究。如图 2-9 所示，跟踪纳米胶束不同时间下(0、2、4、8、24、48、60 h)的粒径变化，可以看到胶束粒径从 139.4 nm 增长到 160 nm，呈现出略微增长后趋于稳定的趋势。此外，通过图中经过时间变化后的胶束照片，我们可以看到其最终依旧呈现出良好的稳定性。

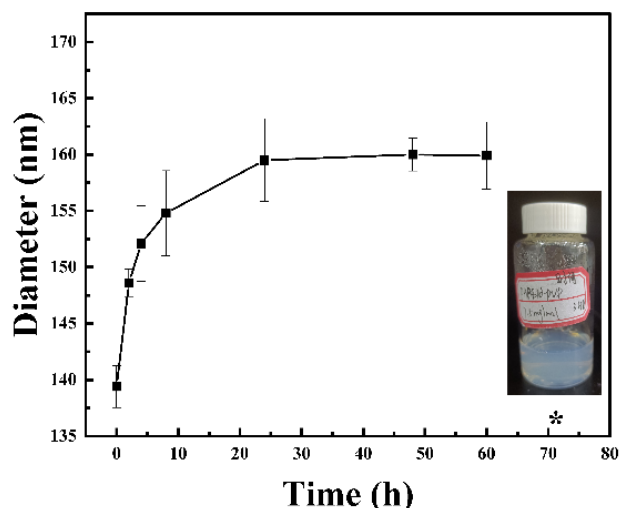


图 2-9 胶束粒径随时间的变化

Fig 2-9 Change of micelle size with time

2.4.6 纳米胶束的 pH 敏感性

众所周知，苯硼酸酯键的稳定性受 pH 值影响较大，苯硼酸酯在弱酸性环境内将解离，而稳定于中性及碱性介质中，此特征有利于构建 pH 响应的载体材料，为此随后研究了 pH 对纳米胶束性质的影响。

对于上述 142 nm 的胶束溶液，利用动态光散射跟踪纳米胶束在不同 pH 值下的水合粒径与表面电位，如图 2-10 所示。由图可见，当 $\text{pH} < 6$ 时，苯硼酸酯键的酸响应断裂，导致共聚物从胶束内释放出来，溶液中胶束发生解离团聚，从而表现出不稳定性；纳米胶束在中性以上介质中十分稳定，pH 值从 7.4 增加至 9 时，胶束粒径由 153.2 nm 增大到 195.7 nm。pH 值超过 8 后，苯硼酸酯将结合 OH^- 形成负离子，溶解性得到增加令纳米胶束的内核变得亲水而使内核逐渐膨胀，胶束粒径出现了一定幅度的增大。纳米胶束在整个稳定的 pH 范围内，zeta 电位一直保持较大的负值，进一步表明其表面性质具有良好的稳定特性。上述结果证明，PAPBA-*b*-PVP/HA 纳米胶束符合苯硼酸酯的 pH 响应性，在中性及碱性环境下较稳定，具有较高的生物活性载体应用潜能。

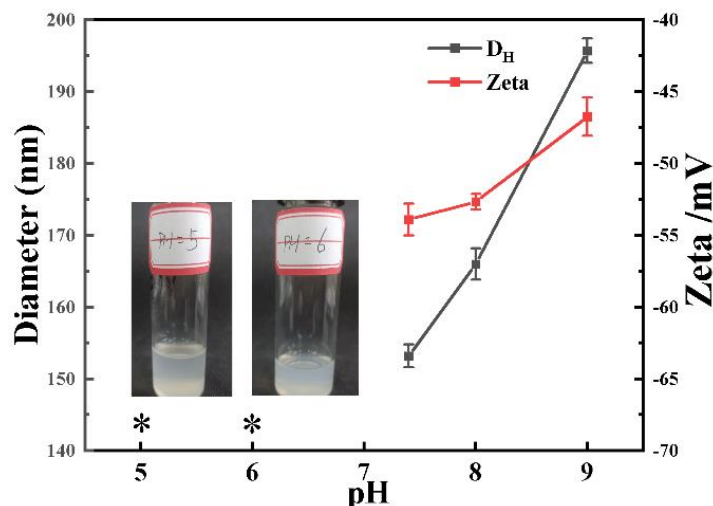


图 2-10 pH 值对纳米胶束粒径及 Zeta 电位的影响

Fig 2-10 The diameters and zeta potentials of nano micelles at different pH values

2.4.7 纳米胶束的糖响应和盐响应性

因苯硼酸赋予了胶束糖敏感特性，随后探索了 PAPBA-*b*-PVP/HA 纳米胶束的糖响应性。将选定的胶束置于浓度从 1 至 10 mg/mL 的葡萄糖溶液中透析，一段时间后用 DLS 跟踪各糖溶液中胶束的粒径。如图 2-11(a)和(c)，胶束粒径随着葡萄糖浓度的增加而逐渐增大，共聚物胶束中的 PAPBA 与 HA 的邻二醇间硼酸酯键具有动态共价性，该特性允许其它含邻二醇物质经竞争同苯硼酸结合而引起结构重配，高糖浓度使更多原硼酸酯键解离而导致了纳米胶束的膨胀。因此，可以说动态苯硼酸酯键的竞争性交换反应诱导原键解离触发了纳米胶束的糖响应性。

生物体是一个含水、电解质及血糖等多种物质的复杂环境，为此有必要进一步探索盐浓度对胶束的影响。分别配制 0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 及 0.6 mg/mL 的 NaCl 溶液，将所选纳米胶束等量的分散于这些溶液中，通过 DLS 检测各浓度盐溶液内的胶束粒径。从图 2-11(b)和(d)可以发现，胶束粒径随着盐浓度增加而增大。该现象可能因为电荷屏蔽效应导致静电相互作用范围减小，阴离子苯基硼酸基团的亲水性弱化，使其保护纳米胶束免遭进一步聚集的效率下降。纳米胶束的亲水-疏水平衡表现出偏向于疏水特征，结果引起共聚物交联的透明质酸胶束聚集增大。

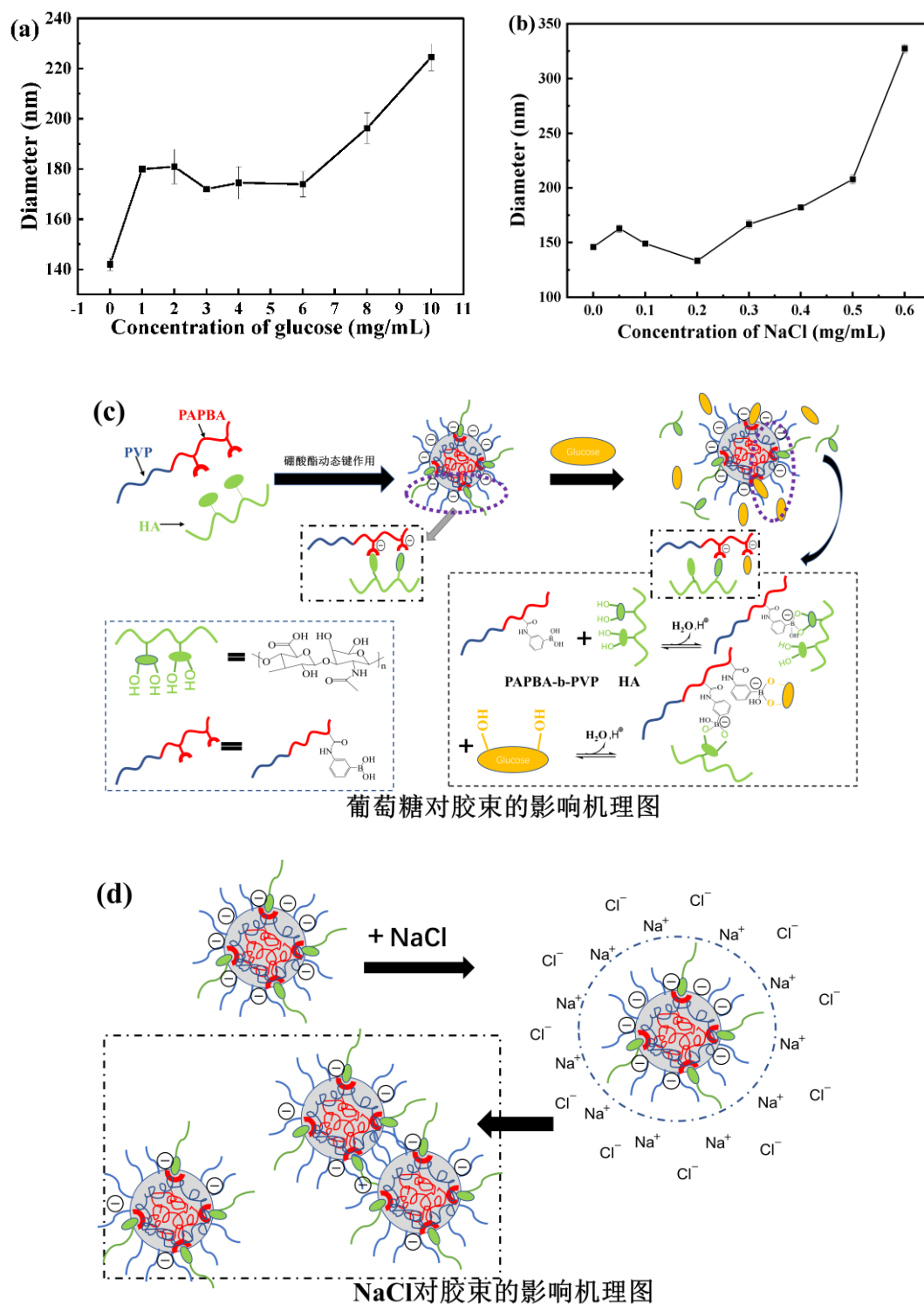


图 2-11 (a)葡萄糖浓度对胶束粒径的影响；(b)NaCl 浓度对胶束粒径的影响；(c)葡萄糖对胶束的作用机理；(d)NaCl 对胶束的作用机理

Fig 2-11 (a) Effect of glucose concentrations on the size of micelles; (b) Effect of salt concentrations on the size of micelles; (c) Mechanism of action of glucose on micelles; (d) Mechanism of action of NaCl on micelles

2.5 结论

利用 RAFT 聚合制备了 PAPBA-*b*-PVP 嵌段共聚物，基于动态硼酸酯键与 HA 组装制备了稳定的球形可控纳米胶束。通过调节共聚物嵌段比、共聚物和透明质酸的投料浓度能够实现对纳米胶束尺寸的控制，随透明质酸或共聚物的浓度的增加，胶束的粒径总体随之增加。优化共聚物结构，分子量达 6 K 且嵌段分子量比为 2 时，在 3 mg/mL HA 液中，制备粒子的粒径可以在 73.3-163.9 nm 调控，有利于体内长循环及病灶渗透。针对构建胶束所涉硼酸酯键的特征，考察了所得纳米胶束在不同环境介质中的理化性质，证实了其拥有 pH、盐及糖的环境敏感性，并且胶束颗粒尺寸随着盐及糖浓度的增大而增加。

综上所述，纳米胶束因苯硼酸酯键而获得良好的 pH、糖及盐响应性，且表面透明质酸提供了其生物相容性及癌细胞靶向功能，使得纳米胶束作为载体用于生物标记和递药拥有巨大的潜能。

第3章 双波长荧光高分子材料的合成及表征

3.1 引言

随着对 AIE 发光材料的不断深入研究, AIE 分子体系得到了很大程度的扩展。然而, AIE 发光材料一般采用单光子激发, 激发波长通常在可见光区范围内, 这会导致其在生物成像时容易受到生物系统自发荧光干扰、产生光漂白现象, 进而影响组织穿透深度^[84]。有研究表明, 采用双光子近红外光激发的双光子荧光材料, 在一定程度上, 可降低生物系统荧光背景, 减少瑞利散射和组织损伤, 可进行深层组织观察, 延长观察时间。但已报道的双光子荧光材料通常基于单个荧光发射峰进行设计, 且发射波长通常在可见光区, 因此存在荧光强度较低、光稳定性较差、易受环境因素影响等缺陷^[85], 而比率型荧光探针可在一定程度上消除上述因素的影响。因此, 设计和研制新型比率型荧光探针, 对于推动肿瘤的检测和治疗发展意义重大。

在 1986 年 Matsumura 和 Maeda 提出了高渗透长滞留效应(Enhanced Permeability and Retention, EPR), 用于解释肿瘤组织对于纳米粒子和大分子药物的特殊吸收和积累现象。肿瘤细胞的快速增殖需要大量营养物质和氧气, 因此会产生新血管。这些血管结构和功能异常, 导致血管壁通透性增加, 使纳米粒子和大分子药物更易渗透进入肿瘤组织。此外, 肿瘤组织周围的淋巴系统功能不完善, 使药物更易在肿瘤组织中滞留, 从而增加疗效并降低对健康组织的毒性^[86]。EPR 效应的提出为肿瘤靶向治疗和药物输送领域提供了重要的理论基础, 许多纳米药物载体和靶向药物已经利用 EPR 效应来实现对肿瘤组织的精准输送^[87]。然而, 近年来也有研究指出 EPR 效应在临床应用中存在一些限制, 如肿瘤异质性、EPR 效应的不稳定性等, 因此, 在一些新型荧光探针的研究与开发也有必要考虑到其粒径尺度大小以及稳定性, 优化利用 EPR 效应来提高肿瘤治疗的效果。

基于上述分析, 本文以 1, 2-二苯基-1, 2-二(4-氨基苯基)乙烯(TPE-2AM)分子为核心, 利用 ROP 和 RAFT 协同聚合方式在 TPE-2AM 的二氨基上接入疏水的聚己内酯、聚(3-丙烯酰胺基苯硼酸)和聚丙烯酸链段, 在

得到的共聚物通过酯化修饰上近红外荧光配合物(Ir-OH)，最后基于硼酸酯键与透明质酸组装形成双波长荧光高分子纳米胶束。一方面，通过近红外基团来提高荧光探针的光稳定性、灵敏度以及组织穿透性，另一方面，透明质酸因具有生物相容性、非免疫原性及癌细胞靶向性等优势，使得通过硼酸酯键组装形成的荧光纳米胶束也有利于多场景、高灵敏的光学生物成像或标记，进而提升疾病的诊疗效果。

3.2 实验部分

3.2.1 主要原料

表 3-1 实验试剂
Table 3-1 Experimental materials

试剂名称	纯度	生产厂家
4-氨基二苯甲酮	分析纯	北京伊诺凯科技有限公司
辛酸亚锡	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
二水合磷酸二氢钠	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
十二水合磷酸氢二钠	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
二环己基碳二亚胺	分析纯	上海泰坦科技股份有限公司
锡粉(Sn)	分析纯	上海泰坦科技股份有限公司
丙烯酸	分析纯	上海阿达玛斯试剂有限公司
ϵ -己内酯	分析纯	上海阿达玛斯试剂有限公司
乙二醇乙醚	分析纯	上海阿达玛斯试剂有限公司
四(三苯基膦)钼	分析纯	上海阿达玛斯试剂有限公司
6-氯菲啉	分析纯	上海阿达玛斯试剂有限公司
苯并[b]噻吩-2-硼酸	分析纯	上海阿达玛斯试剂有限公司
三水合三氯化铋	分析纯	上海阿达玛斯试剂有限公司
4'-甲氧基苯乙酮	分析纯	上海阿达玛斯试剂有限公司
氢化钠	分析纯	上海阿达玛斯试剂有限公司
γ -丁内酯	分析纯	上海阿达玛斯试剂有限公司
4-二甲氨基吡啶	分析纯	上海梯希爱化成工业发展有限公司
浓盐酸	分析纯	国药集团化学试剂有限公司

3.2.2 实验仪器

表 3-2 实验仪器
Table 3-2 Experimental instruments

仪器	型号	生产厂家
透射电子显微镜	HT-7700	日本 Hitachi 公司
荧光分光光度计	F-7100	日本日立公司
紫外吸收光度计	UV-2700	日本岛津公司
稳态瞬态荧光光谱分析	FLS-980	英国爱丁堡公司

核磁共振波谱仪、红外光谱仪、凝胶渗透色谱仪、纳米粒度电位分析仪、扫描电子显微镜同第 2 章 2.2.2。

3.2.3 样品制备

3.2.3.1 铈配合物主配体(btph)的合成

四(三苯基膦)钼 (0.21 g, 0.18 mmol), 苯并[b]噻吩-2-硼酸(1.28 g, 7.2 mol), 6-氯菲啶(1.28 g, 6 mmol), 10 mL 甲苯, 5 mL 乙醇, 以及 2 mol/L 碳酸钠的水溶液(10 mL)被加入到反应容器中, 在 Ar 保护下回流 5 h 后, 冷却至室温, 将反应混合物加入至 200 mL 水中, 使用甲苯萃取(50 mL×3), 有机相水洗(50 mL×3), 再使用无水硫酸镁干燥, 过滤, 通过旋蒸除去溶剂。所得粗产品经硅胶柱层析提纯(展开剂为二氯甲烷/石油醚=1:1), 所得纯净产物为一种淡黄色的粉末(1.31 g, 收率 70%)。

3.2.3.2 铈配合物氯桥二聚体的合成

将所合成的主配体 btph(685 mg, 2.2 mmol), 三水合三氯化铈(390 mg, 1.1 mmol), 30 mL 乙二醇乙醚和 10 mL 水依次加入反应容器中, 在 Ar 保护下回流反应过夜, 反应结束后冷却至室温, 抽滤, 所得粗产物依次使用水, 甲醇和正己烷洗涤, 再在真空烘箱中干燥, 得到产物为一种紫褐色粉末(890 mg, 收率 94.9%)。

3.2.3.3 羟基功能化配体(mho-OH)的合成

在 0 °C 下将氢化钠(矿物油中, 含量 60%, 10 g)加入到 200 mL 乙醚中再加入乙醇(0.2 mL), γ -丁内酯(12.9 g, 150 mmol), 逐滴加入 4'-甲氧基苯乙酮的乙醚溶液(15 g, 100 mmol 溶于 50 mL 乙醚)。滴加完毕后, 室温下继续反应四天。反应结束之后, 向反应体系中加入 10 mL 乙醇来中和过量的氢化钠, 再加入 NH₄Cl 溶液(10 g 溶于 100 mL 水)。分离出有机相, 用饱和氯化钠液液洗

(100mL×3), 无水硫酸镁干燥, 抽滤, 旋蒸除溶剂, 经硅胶柱层析提纯(展开剂为石油醚/乙酸乙酯=1:1), 所得产物为一种白色固体(6.8 g, 收率 28.8%)。

3.2.3.4 小分子铱配合物(Ir-OH)合成

Ir-OH 制备过程及构造如图 3-2 所示, 将羟基功能化辅配体 mho-OH(47 mg, 0.2 mmol), 铱配合物氯桥二聚体(136 mg, 0.08 mmol)和碳酸钠(85 mg, 0.8 mmol)依次加入乙二醇乙醚(10 mL)中, 在 Ar 保护下回流过夜。反应结束后冷却至室温, 在乙醚中沉, 抽滤, 收集沉淀, 真空干燥后, 柱层析(氯仿为展开剂)分离纯化, 得到产物为一种黑色粉末(80 mg, 收率 48%)。

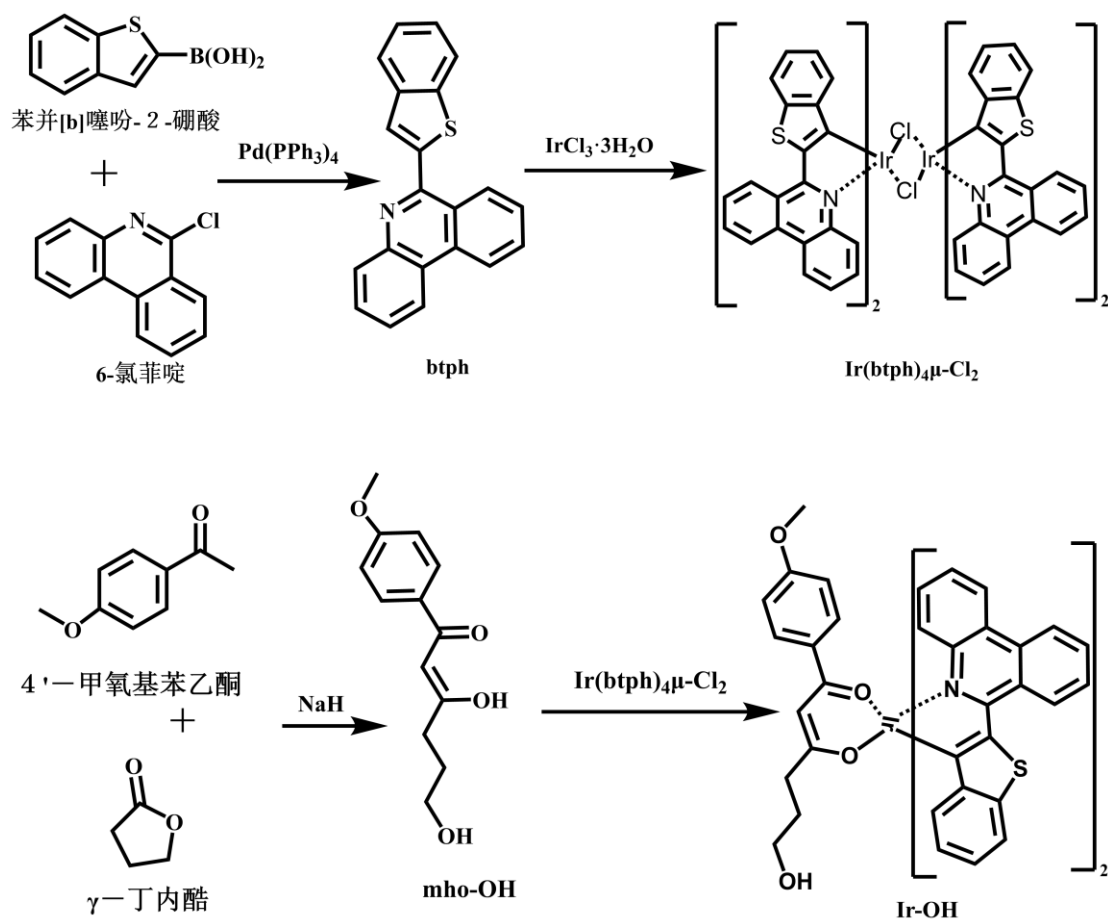


图 3-1 Ir-OH 的合成流程图

Figure 3-1 Synthetic route of Ir-OH

3.2.3.5 TPE-2AM 的合成

4-氨基二苯甲酮(1.6 g, 8 mmol)溶于 5 mL 的 THF 中, 加入(5.5 g, 0.045 mol)锡粉后, 缓慢滴加 60 mL 浓盐酸。75 °C 下加热回流 10 h 后, 冷却至室温, 抽滤, 用 1 mol/L 的 NaOH 洗涤, 再用去离子水洗涤, 真空干燥固体粉末, 所

得粗产物经硅胶柱层析提纯(展开剂为石油醚 / 乙酸乙酯=3:5), 所得产物为一种黄色固体(1.15 g, 产率为 77%)。

3.2.3.6 TPE-PCL 的合成

将 TPE-2AM (0.146 g, 0.4 mmol)和甲苯(15 mL), 在 140 °C 下, 加热搅拌共沸至 2 mL, 冷却至室温, 依次加入 ϵ -己内酯(1.2 mL, 10.8 mmol)和辛酸亚锡(9 μ L)。在 Ar 保护及搅拌下, 加热至 110 °C 反应 48 h 后, 冷却至室温, 用二氯甲烷溶解, 后在冷甲醇中进行沉淀, 过滤, 重复上述操作两次, 所得固体用乙醚洗涤, 真空干燥。

3.2.3.7 TPE-PCL-RAFT 的合成

TPE-PCL (0.3 g, 0.05 mmol)溶于 15 mL 甲苯, 在 140 °C 下, 加热共沸至 2 mL, 冷却至室温。将 DMAP (24.4mg, 0.2 mmol)和乙基黄原酸(0.097g, 0.5 mmol)溶于 5 mL 干燥的二氯甲烷, 注入反应容器, Ar 保护下, 将溶入 5 mL 二氯甲烷的 DCC (0.1135 g, 0.55 mmol)注入反应容器。室温搅拌 48 小时, 过滤, 滤液浓缩至 3 mL, 在冷甲醇中沉淀, 过滤, 用二氯甲烷溶解产物后在冷甲醇中沉淀, 重复上述操作两次, 产品真空干燥。

3.2.3.8 TPE-PCL-PAPBA 的合成

取 0.3 g TPE-PCL-RAFT、APBA (0.286 g, 1.5 mmol)和 AIBN(4.11 mg, 0.025 mmol)加入 2.5 mL 干燥的 DMF 溶剂中, Ar 换气三次, 油浴锅中 70 °C 反应 24h, 期间搅拌速度较快。产物快速冷却并开口放氧气、至室温后, 加 1.5 mL 甲醇于反应体系, 将 80 mL 冷乙醚置于冰水混合浴下, 搅拌滴入产品溶液, 沉淀、抽滤; 再以 2 mL DMF/1 mL 甲醇混合液溶解共聚产品, 滴入 60 mL 冷乙醚中沉淀, 沉淀物离心出来。沉淀所得固体用 10 mL 丙酮洗涤一次, 真空干燥。

3.2.3.9 TPE-PCL-PAPBA-AA 的合成

取 0.45 g 干燥 TPE-PCL-PAPBA-RAFT、丙烯酸单体(14 μ L, 0.2 mmol)和 AIBN(4.11 mg, 0.025 mmol)加入 3 mL 干燥的 DMF 溶剂中, Ar 换气三次, 油浴锅中 70 °C 反应 24h, 期间搅拌速度较快。产物快速冷却并开口放氧气、至室温后, 加 1 mL 甲醇于反应体系, 将 60 mL 冷乙醚置于冰水混合浴下, 搅拌滴入产品溶液, 沉淀、抽滤; 再以 3 mL 甲醇液溶解共聚产品, 滴入 50 mL 冷乙醚中沉淀, 沉淀物离心沉淀。沉淀所得固体用 10 mL 乙醚洗涤一次, 真空干燥。

3.2.3.10 TPE-PCL-PAPBA-AA-ccIr 的合成

取干燥的 TPE-PCL-PAPBA-AA 产品(0.5 g , 0.05 mmol)与铱配合物 (0.147 g , 0.14 mmol)和 15 mL 甲苯至反应容器, 在 140 °C 下, 加热共沸至 2 mL 左右, 冷却至室温。加 3 mL DMF/甲醇搅拌溶解混合物。将 DMAP (3.66 mg, 0.03 mmol)溶于 2 mL 干燥的二氯甲烷, 注入体系, Ar 换气三次后, 将 DCC (0.068g, 0.33 mmol)溶入 3 mL 二氯甲烷中, 注入体系, 室温反应 48 小时。搅拌下, 将产品溶液滴入 60 mL 冷乙醚, 沉淀、抽滤; 再以 3 mL 甲醇/DMF 溶液溶解共聚产品, 滴入 50 mL 冷乙醚中沉淀, 离心收集沉淀物。所得固体用 10 mL 乙醚洗涤一次, 真空干燥。

3.2.3.11 TPE-PCL-PAPBA-AA-ccIr/HA 胶束的合成

TPE-PCL-PAPBA-AA-ccIr/HA 制备过程及构造如图 3-2 所示, 共聚物与透明质酸基于硼酸酯键组装成聚合物纳米粒子。分别调控共聚物浓度(如: 1、3、5、7.5、10、12.5、15 mg/mL)或透明质酸的浓度(如: 4、5、6、7、8、9、10 mg/mL)来制备理化性质不同的系列胶束溶液, 研究纳米胶束制备的可调控性。以 1 mg/mL TPE-PCL-PAPBA-AA-ccIr 与 5 mg/mL HA 为例说明胶束的制备过程: 取 1 mg TPE-PCL-PAPBA-AA-ccIr 溶于 1 mL 甲醇/DMF, 将 5 mg/mL 的透明质酸水溶液超声状态下缓慢滴加至共聚物甲醇/DMF 溶液中, 产生橙红色且稳定的纳米胶束溶液。进一步通过透析处理, 将溶液中的甲醇和 DMF 溶剂除去, 将透析后的胶束溶液密封保存, 用于后续的实验。

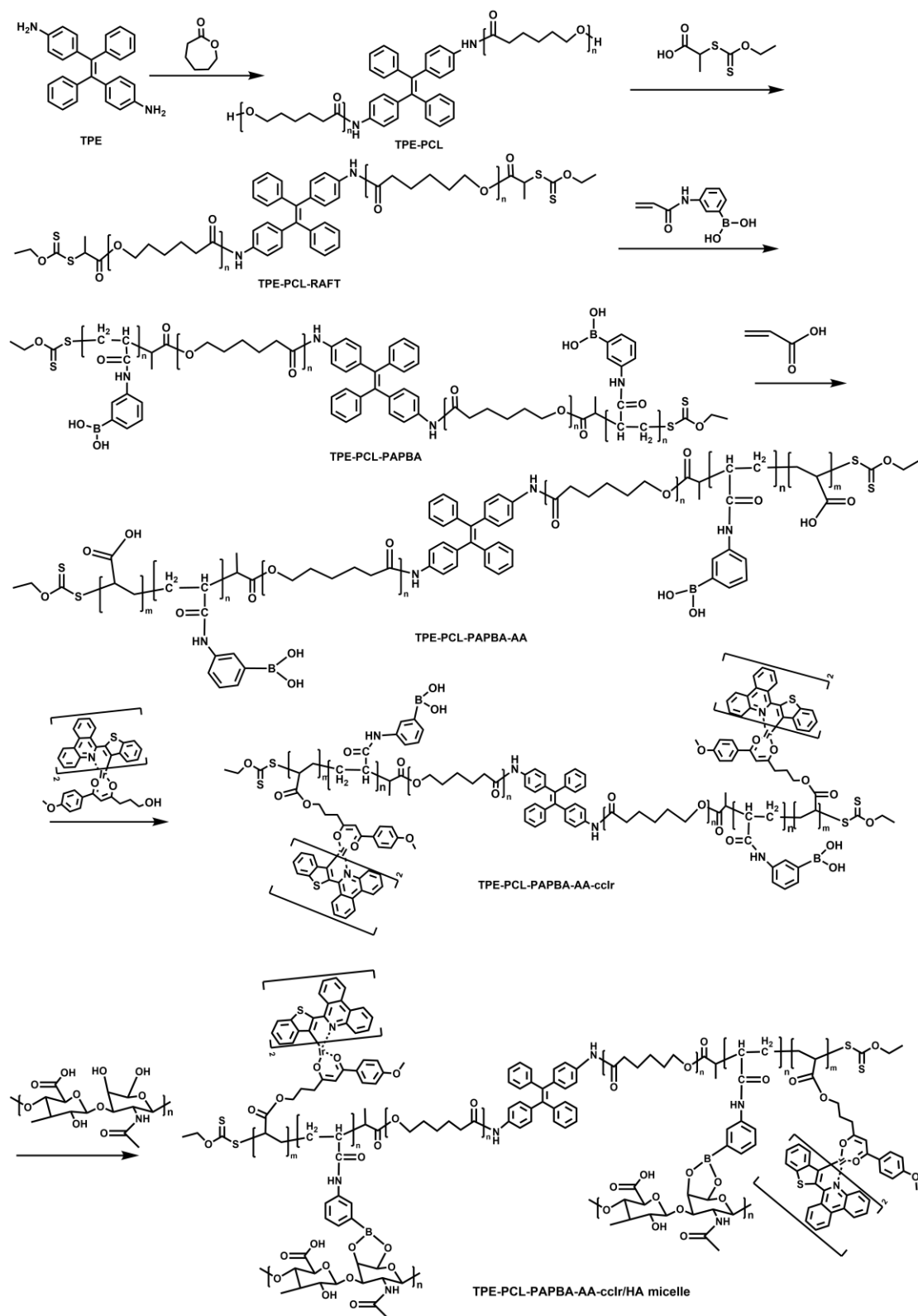


图 3-2 TPE-PCL-PAPBA-AA-ccIr/HA 胶束的合成流程图

Figure 3-2 Synthesis route of TPE-PCL-PAPBA-AA-ccIr/HA micelles

3.3 性能测试与结构表征

核磁共振波谱仪、红外光谱仪、凝胶渗透色谱仪、纳米粒度电位分析仪、扫描电子显微镜测试方法同第 2 章 2.3 所述。

透射电子显微镜(TEM)测试：将胶束溶液进行适当稀释后，取 1 ~ 2 滴在洁净的铜网片上风干后，用透射电子显微镜进行测试。

紫外吸收光度计：取 3 mL 胶束溶液至两面透光石英比色皿中，测试波长范围 200 ~ 800nm。

荧光分光光度计：取 3 mL 胶束溶液至四面透光石英比色皿中，狭缝宽度 10 nm，电压 350 V，测试波长范围 360 ~ 900 nm。

稳态瞬态荧光光谱分析测试：瞬态测量：ns 量级的荧光寿命使用 375 nm 单波长脉冲激光， μ s 量级的荧光寿命使用微秒闪烁氙灯，激发波长 530nm。光谱仪探测范围：200 ~ 1800 nm。

3.4 结果与讨论

3.4.1 铈配合物氯桥二聚体的合成

我们通过两步进行合成铈配合物氯桥二聚体，首先将 6-氯菲啶与苯并[b]噻吩-2-硼酸在四(三苯基膦)铈作用下通过催化偶联缩合反应合成配体 btph，后与三水合三氯化铈通过自旋-轨道耦合效应形成铈配合物氯桥二聚体。btph 的核磁氢谱表征如图 3-3(a)， ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta\text{H}^{\text{m}}=8.72$, 1-**H** 菲啶; $\delta\text{H}^{\text{i}}=8.66$, 7-**H** 菲啶; $\delta\text{H}^{\text{j}}=8.60$, 4-**H** 菲啶; $\delta\text{H}^{\text{e}}=8.26$, 7-**H** 苯并[b]噻吩; $\delta\text{H}^{\text{f+k,a}}=7.97$ -7.89, 3,10-**H** 菲啶, 4-**H** 苯并[b]噻吩; $\delta\text{H}^{\text{d}}=7.87$, 3-**H** 苯并[b]噻吩; $\delta\text{H}^{\text{l+h+g}}=7.80$ -7.67, 2, 8,9-**H** 菲啶; $\delta\text{H}^{\text{b+c}}=7.46$ -7.41, 5, 6-**H** 苯并[b]噻吩。

铈配合物氯桥二聚体核磁谱结构表征如图 3-3(b)， ^1H NMR(500MHz, CDCl_3): $\delta\text{H}^{\text{l}}=8.96$, 1-**H** 菲啶; $\delta\text{H}^{\text{i}}=8.44$, 4-**H** 菲啶; $\delta\text{H}^{\text{d+h}}=7.97$, 7-**H** 菲啶; $\delta\text{H}^{\text{j}}=7.92$, 3-**H** 菲啶; $\delta\text{H}^{\text{k}}=7.80$, 2-**H** 菲啶; $\delta\text{H}^{\text{c}}=7.43$, 7-**H** 苯并[b]噻吩; $\delta\text{H}^{\text{f}}=6.71$, 9-**H** 菲啶; $\delta\text{H}^{\text{g}}=6.58$, 8-**H** 菲啶; $\delta\text{H}^{\text{b}}=5.97$, 6-**H** 苯并[b]噻吩; $\delta\text{H}^{\text{a}}=5.81$, 5-**H** 苯并[b]噻吩; $\delta\text{H}^{\text{e}}=5.39$, 10-**H** 菲啶。

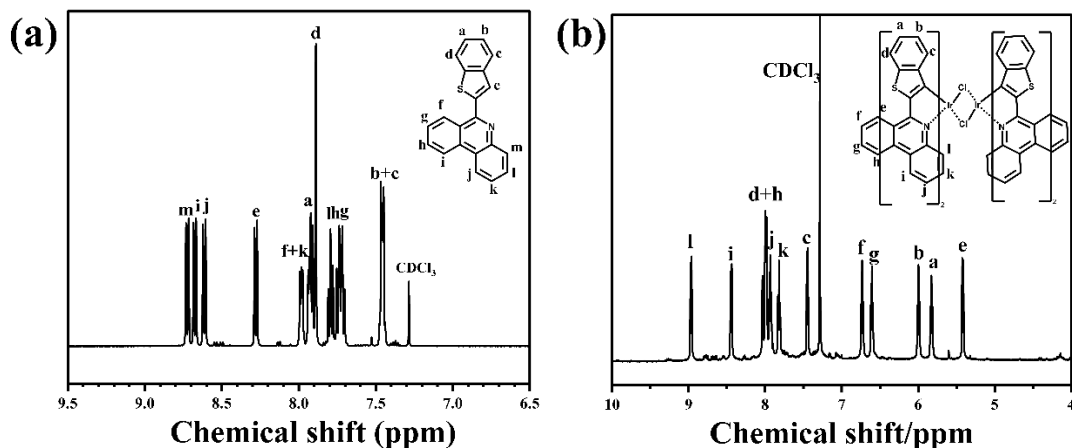


图 3-3 (a) btph 的核磁共振氢谱图;(b) 铱配合物氯桥二聚体的核磁共振氢谱图

Figure 3-3 (a) ^1H NMR spectrum of btph; (b) ^1H NMR spectrum of iridium complex chloro-bridged dimer

3.4.2 小分子铱配合物(Ir-OH)的合成

在合成小分子铱配合物(Ir-OH)前,我们先完成了羟基功能化辅配体(mho-OH)的合成。首先, γ -丁内酯与 4'-甲氧基苯乙酮通过亲核加成反应制备 mho-OH, 后与上述制备的氯桥二聚体反应最终获得 Ir-OH。其中 mho-OH 的核磁谱表征如图 3-4, ^1H NMR(500 MHz, CDCl_3): $\delta\text{H}^c=7.90$, 2,6-*H* PhCO-; $\delta\text{H}^b=6.92$, 3,5-*H* PhCO-; $\delta\text{H}^d=6.53$, -COCH-; $\delta\text{H}^g=4.29$, -CHOH; $\delta\text{H}^a=3.86$, -OCH₃; $\delta\text{H}^e=3.28$, HOCC*H*-; $\delta\text{H}^f=2.15$, -CHCHOH。

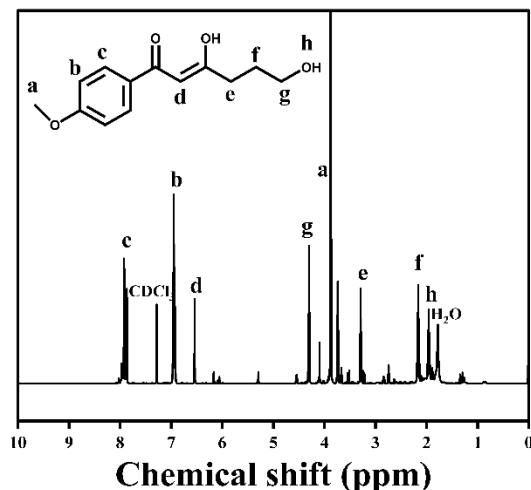


图 3-4 mho-OH 的核磁共振氢谱图

Figure 3-4 ^1H NMR spectrum of mho-OH

Ir-OH 的核磁氢谱表征如图 3-5(a), ^1H NMR(500 MHz, DMSO): $\delta\text{H}^e=9.22$, 1-**H** 菲啶; $\delta\text{H}^h=8.94$, 4-**H** 菲啶; $\delta\text{H}^g=8.65$, 3-**H** 菲啶; $\delta\text{H}^{o+b}=8.07$, 4-**H** 苯并[b]噻吩, 2, 6-**H** PhCO; $\delta\text{H}^f=7.89$, 2-**H** 菲啶; $\delta\text{H}^i=7.79$, 7-**H** 菲啶; $\delta\text{H}^l=7.72$, 7-**H** 菲啶; $\delta\text{H}^k=7.48$, 9-**H** 菲啶; $\delta\text{H}^d=7.40$, 7-**H** 苯并[b]噻吩; $\delta\text{H}^n=7.30$, 3,5-**H** PhCO; $\delta\text{H}^j=7.09$, 8-**H** 菲啶; $\delta\text{H}^a=6.85$, 9-**H** 菲啶; $\delta\text{H}^l=6.69$, 10-**H** 菲啶; $\delta\text{H}^c=6.60$, 6-**H** 苯并[b]噻吩; $\delta\text{H}^b=6.40$, 5-**H** 苯并[b]噻吩; $\delta\text{H}^p=5.29$, -COCH-; $\delta\text{H}^m=3.65$, -OCH₃; $\delta\text{H}^s=1.77$, -CH₂OH; $\delta\text{H}^q=1.04$, -OCCH-; $\delta\text{H}^r=0.87$, CHCHOH。

图 3-5(b)为 Ir-OH 的红外谱图, 在 3460 cm⁻¹ 的吸收峰为羟基的伸缩振动所致, 2932 cm⁻¹ 处特征峰为甲基和亚甲基的伸缩振动峰, 1651cm⁻¹ 是由 C=O 伸缩振动形成, C=N 和 C=C 的伸缩振动形成 1591cm⁻¹ 特征峰, 1420~1480cm⁻¹ 为苯环的伸缩振动峰, 1260 cm⁻¹ 主要是醚键伸缩振动引起的, 进一步表明成功获得 Ir-OH。

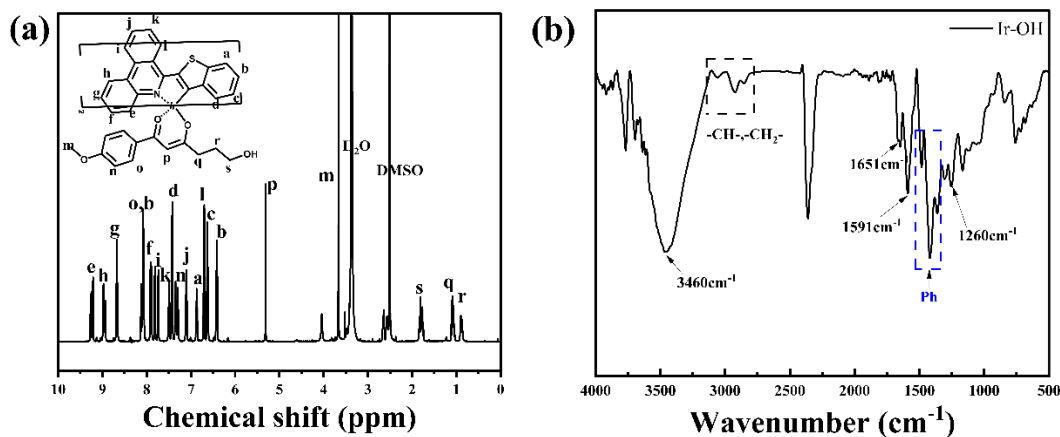


图 3-5 (a) Ir-OH 的核磁共振氢谱图; (b) Ir-OH 的红外光谱图

Figure 3-5 (a) ^1H NMR spectrum of Ir-OH; (b) FT-IR spectrum of Ir-OH

3.4.3 TPE-PCL 的合成

先将 4-氨基二苯甲酮通过 McMurry 偶联反应制备 AIE 发光体 TPE-2AM, 后通过 ROP 聚合与 ϵ -己内酯作用制备 TPE-PCL。TPE-2AM 的核磁谱表征如图 3-6(a), ^1H NMR (500 MHz, DMSO): $\delta\text{H}^d=7.37$, 2,6-**H** Ph; $\delta\text{H}^e=7.26-7.11$, 3,5-**H** Ph; $\delta\text{H}^f=6.84$, 4-**H** Ph, $\delta\text{H}^c=6.49$, 3,5-**H** PhNH₂; $\delta\text{H}^b=6.27$, 2,6-**H** PhNH₂; $\delta\text{H}^a=5.25$, -NH₂。

TPE-PCL 的核磁谱表征如图 3-6(b), ^1H NMR (500 MHz, DMSO) : $\delta\text{H}^{\text{k}}=9.92$, $-\text{NH}-$; $\delta\text{H}^{\text{b}\sim\text{f}}=7.67\sim 7.10$, $\text{H}-\text{Ph}$, $\text{H}-\text{PhNH}-$; $\delta\text{H}^{\text{g}}=3.98$, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $\delta\text{H}^{\text{j}}=2.28$, $-\text{CH}_2\text{COO}-$; $\delta\text{H}^{\text{h}}=1.53$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}-$; $\delta\text{H}^{\text{i}}=1.30$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}-$ 。

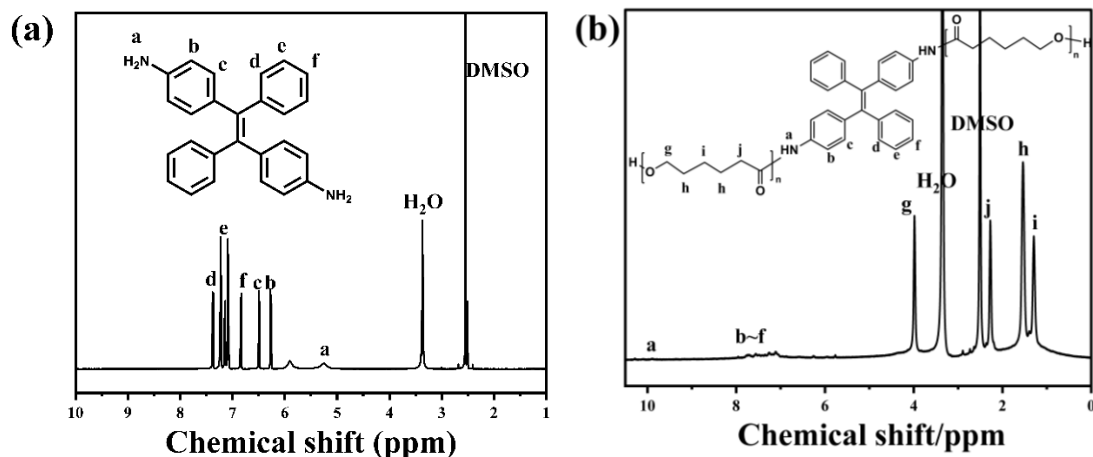


图 3-6 (a) TPE-2AM 的核磁共振氢谱图; (b) TPE-PCL 的核磁共振氢谱图

Figure 3-6 (a) ^1H NMR spectrum of TPE-2AM; (b) ^1H NMR spectrum of TPE-PCL

3.4.4 TPE-PCL-PAPBA 的合成

我们先通过 TPE-PCL 与乙基黄原酸酯化合成 TPE-PCL-RAFT, 后与 3-丙烯酰胺基苯硼酸通过 RAFT 聚合制得 TPE-PCL-PAPBA。TPE-PCL-RAFT 核磁谱表征如图 3-7, ^1H NMR (500 MHz, DMSO): $\delta\text{H}^{\text{g}}=9.92$, $-\text{NH}-$; $\delta\text{H}^{\text{A}}=7.80\sim 7.15$, $\text{H}-\text{Ph}$, $\text{H}-\text{PhNH}-$; $\delta\text{H}^{\text{f}}=4.35$, $-\text{CHS}-$; $\delta\text{H}^{\text{a}}=3.98$, $-\text{CH}_2\text{O}-$; $\delta\text{H}^{\text{c}}=2.28$, $-\text{CH}_2\text{COO}-$; $\delta\text{H}^{\text{d}}=1.53$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}-$; $\delta\text{H}^{\text{b}}=1.30$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}-$; $\delta\text{H}^{\text{e}}=0.94$, $-\text{CH}_3$ 。

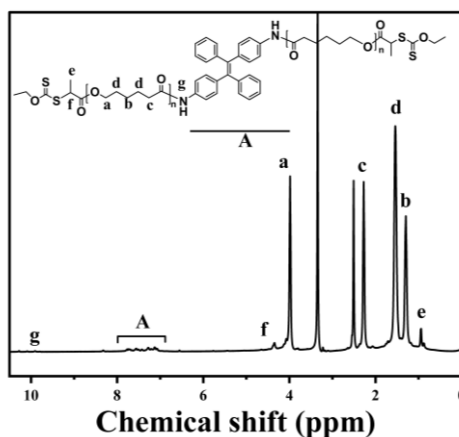


图 3-7 TPE-PCL-RAFT 的核磁共振氢谱图

Figure 3-7 ^1H NMR spectrum of TPE-PCL-RAFT

TPE-PCL-PAPBA 的核磁谱表征如图 3-8(a), ^1H NMR (500 MHz, DMSO) :

$\delta H^{m+c}=9.92$, $-\text{OH}, -\text{NH}-$; $\delta H^{d+h}=7.92\sim 7.13$, $-\text{CONH}-\text{Ph}-\text{H}, \text{H}-\text{Ph}, \text{H}-\text{PhNH}-$; $\delta H^k=3.98$, $-\text{CH}_2\text{O}-$; $\delta H^{a+j}=2.28$, $-\text{CH}_2\text{COO}-$, $\text{CH}_2\text{CONH}-$; $\delta H^{i+b}=1.53$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}-$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}-$; $\delta H^l=1.30$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}-$ 。

图 3-8(b) 为 TPE-PCL-PAPBA、TPE 与 TPE-PCL 的红外谱图，都存在 $1724\sim 1726\text{ cm}^{-1}$ 酯基的伸缩振动且由于 PAPBA 的引入导致峰值发生微偏移。此外，仅在共聚物中 1350 cm^{-1} 处新增了硼酸酯键的伸缩振动峰以及 1651 cm^{-1} 为酰胺 I 带(酰胺基团中 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动形成)， 1560 cm^{-1} 也为酰胺 I 带 (酰胺基团中 $\text{N}-\text{H}$ 弯曲振动特征峰)，进一步表明成功获得了 TPE-PCL-PAPBA。

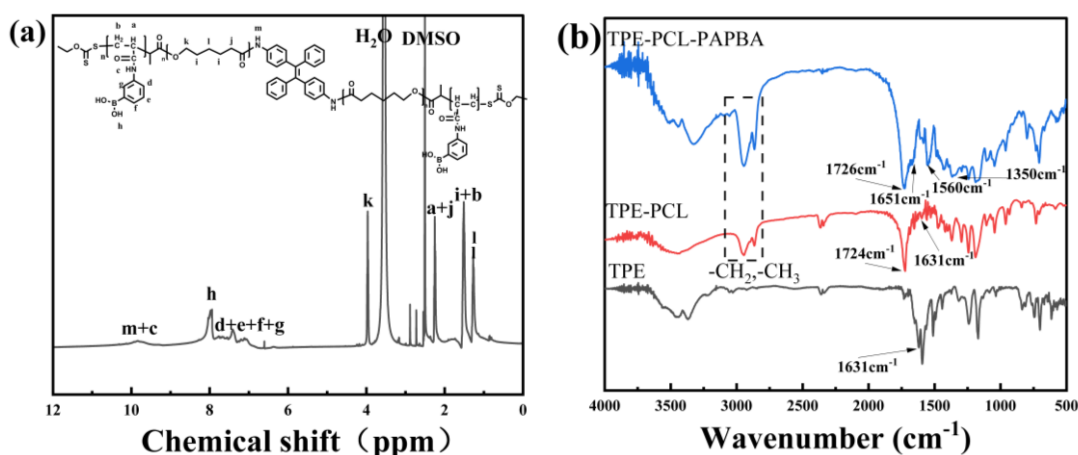


图 3-8 (a) TPE-PCL-PAPBA 的核磁共振氢谱图；(b)TPE、TPE-PCL 和 TPE-PCL-PAPBA 的红外光谱图

Figure 3-8 (a) ^1H NMR spectrum of TPE-PCL-PAPBA; (b) FT-IR spectra of TPE, TPE-PCL and TPE-PCL-PAPBA

3.4.5 TPE-PCL-PAPBA-AA-ccIr 的合成

为了合成双波长发射的聚合物，我们先通过 TPE-PCL-PAPBA 与丙烯酸通过 RAFT 聚合制得 TPE-PCL-PAPBA-AA,后与近红外配体酯化合成 TPE-PCL-PAPBA-AA-ccIr。

TPE-PCL-PAPBA-AA 核磁谱表征如图 3-9(a), ^1H NMR (500 MHz, DMSO) : $\delta H^{h+i}=9.92$, $-\text{OH}, -\text{NH}-$; $\delta H^{A+B}=7.92\sim 7.13$, $-\text{CONH}-\text{Ph}-\text{H}, \text{H}-\text{Ph}, \text{H}-\text{PhNH}-$; $\delta H^c=3.98$, $-\text{CH}_2\text{O}-$; $\delta H^{b+e}=2.28$, $-\text{CH}_2\text{COO}-$, $\text{CH}_2\text{CONH}-$; $\delta H^{a+f}=1.53$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}-$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}-$; $\delta H^d=1.30$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}-$ 。结合红外表征(图 3-9(c)), TPE-PCL-PAPBA-AA 与 TPE-PCL-PAPBA 对比发现，由于丙烯酸的引入，在

2500~3300 cm^{-1} 出现了羧基 O-H 伸缩振动, 进一步证实了 TPE-PCL-PAPBA-AA 的合成。

核磁谱表征如图 3-9(b), ^1H NMR (500 MHz, DMSO) : $\delta\text{H}^{\text{A+B+C}}=9.92\sim 6.35$; $\delta\text{H}^{\text{c}}=3.98$, $-\text{CH}_2\text{O}-$; $\delta\text{H}^{\text{b+e}}=2.28$, $-\text{CH}_2\text{COO}-$, $\text{CH}_2\text{CONH}-$; $\delta\text{H}^{\text{a+f}}=1.53$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}-$; $\delta\text{H}^{\text{d}}=1.30$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}-$ 。

图 3-9(c) 为 TPE-PCL-PAPBA-AA-ccIr、TPE-PCL-PAPBA 与 TPE-PCL-PAPBA-AA 的红外谱图, 都存在 1726~1732 cm^{-1} 酯基的伸缩振动, 1651~1660 cm^{-1} 为酰胺 I 带(酰胺基团中 C=O 伸缩振动形成), 1560~1585 cm^{-1} 也为酰胺 I 带(酰胺基团中 N-H 弯曲振动特征峰), TPE-PCL-PAPBA-AA 与 TPE-PCL-PAPBA 对比发现, 由于丙烯酸的引入, 在 2500~3300 cm^{-1} 出现了羧基 O-H 伸缩振动, 而后其通过羧基与 Ir-OH 中的羟基作用后, 羧基 O-H 伸缩振动峰减弱, 进一步表明成功获得了 TPE-PCL-PAPBA-AA-ccIr。

图 3-10(d) 为 TPE-PCL-PAPBA-AA-ccIr 合成过程各组分的 GPC 曲线, 结果显示 TPE-PCL 的数均分子量 $\bar{M}_n=5700$, 分子量分布指数 $\text{PDI}=1.32$, 结果基本接近设计的理论分子量。TPE-PCL-PAPBA 的数均分子量 $\bar{M}_n=9200$, 分子量分布指数 $\text{PDI}=1.80$, 分子量分布较宽, TPE-PCL-PAPBA-AA 的数均分子量 $\bar{M}_n=10000$, 分子量分布指数 $\text{PDI}=1.51$, 分子量分布较宽, TPE-PCL-PAPBA-AA-ccIr 的数均分子量 $\bar{M}_n=12400$, 分子量分布指数 $\text{PDI}=1.30$, 结果基本接近设计的理论分子量。

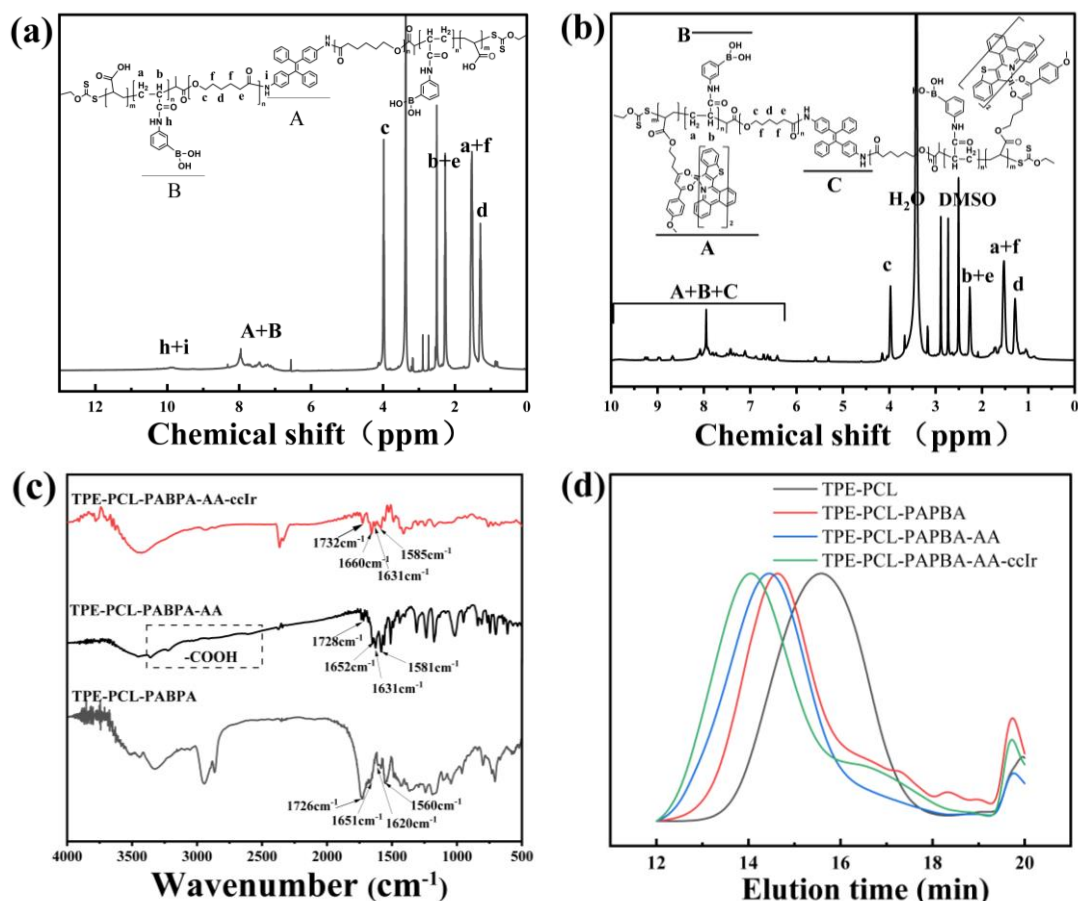


图 3-9 (a) TPE-PCL-PAPBA-AA 的核磁共振氢谱图; (b) TPE-PCL-PAPBA-AA-ccIr 的核磁共振氢谱图; (c) TPE-PCL-PAPBA-AA-ccIr、TPE-PCL-PAPBA-AA、TPE-PCL-PAPBA 的红外光谱图; (d) TPE-PCL-PAPBA-AA-ccIr 及其前驱体的 GPC 曲线

Figure 3-9 (a) ^1H NMR spectrum of TPE-PCL-PAPBA-AA; (b) ^1H NMR spectrum of TPE-PCL-PAPBA-AA-ccIr; (c) FT-IR spectra of TPE-PCL-PAPBA-AA-ccIr、TPE-PCL-PAPBA-AA、TPE-PCL-PAPBA; (d) GPC curves of TPE-PCL-PAPBA-AA-ccIr and its precursor

3.4.6 TPE-PCL-PAPBA-AA-ccIr/HA 胶束(记作 Ir-CP/HA)的制备

共聚物 TPE-PCL-PAPBA-AA-ccIr 与甲醇/DMF 配制成溶液后, 在超声状态下, 将一定浓度的 HA 去离子水溶液缓慢滴入其中, 得到透红色光的乳液(如图 3-10(a)), 表明已经组装成双波长荧光纳米胶束 Ir-CP/HA。将制备的胶束溶液通过透析除去甲醇和 DMF 后, 经冷冻干燥得到红色固体, 进行红外分析, 如图 3-10(b)所示, 与共聚物及 HA 相比, Ir-CP/HA 中酰胺 N-H 和 C=O 的特征峰发生了减弱且微移动, 同时, 硼酸基团的特征峰从 1350 cm^{-1} 处移动至 1343 cm^{-1} , 说明共聚物与透明质酸通过苯硼酸与邻二羟基形成了可逆硼酸酯键, 进而证明了胶束的形成。

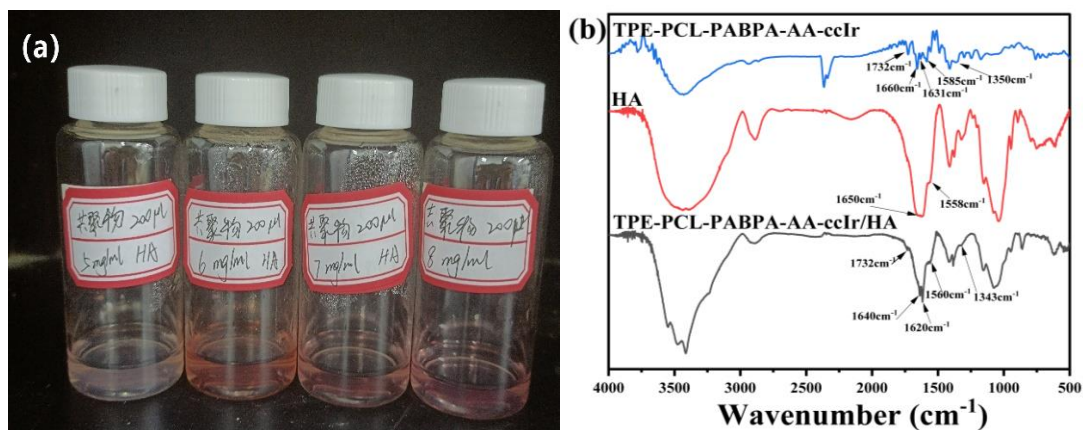


图 3-10 (a)胶束形成图片；(b) 共聚物、HA 和 TPE-PCL-PAPBA-AA-ccIr/HA 胶束的红外光谱图

Figure 3-10 (a) Picture of micelle formation; (b) FT-IR spectra of copolymer, HA and TPE-PCL-PAPBA-AA-ccIr/HA micelles

3.4.7 制备条件对纳米胶束性质的调控

根据纳米胶束形成机制，我们推测胶束形成原料的投料量均会影响胶束的粒径等性质。因此，第一步，研究了共聚物浓度对纳米胶束的尺寸调节作用。图 3-11 展示了不同浓度(1、3、5、7.5、10、12.5 和 15 mg/mL)的共聚物 TPE-PCL-PAPBA-AA-ccIr 与同浓度(10 mg/mL)的 HA 溶液组装成胶束的粒径随浓度的变化趋势。由图可知，随着共聚物的浓度的增加，胶束粒径也随之增加，粒径在 210.5~277.3nm 之间变化，可能是因为，在相同条件下，随着聚合物浓度的增加，一方面共聚物在形成胶束内核时会逐渐堆积占据一定体积，另一方面胶束间的团聚作用也逐渐增强，从而使其水合粒径增加。在实验中，发现 1 mg/mL 共聚物 TPE-PCL-PAPBA-AA-ccIr 同 HA 组装成胶束的粒径尺寸较为合适，胶束液的光散射也比较明显，因此，后续的研究采用该浓度的共聚物进行相应的实验探索。

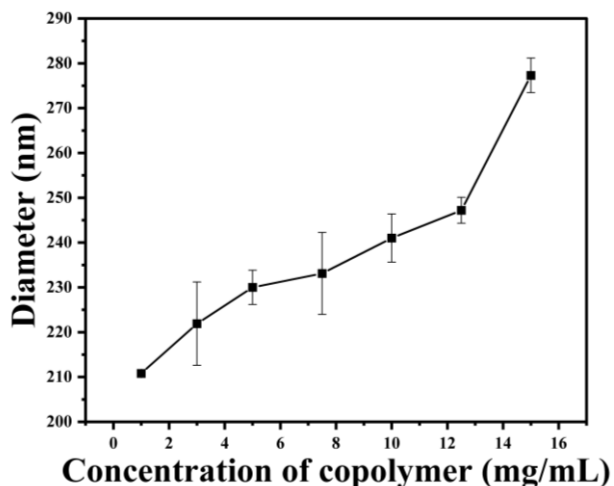


图 3-11 不同浓度 TPE-PCL-PAPBA-AA-ccIr 对胶束的粒径影响

Figure 3-11 Effect of different concentrations of TPE-PCL-PAPBA-AA-ccIr on the particle size of micelles

图 3-12(a) 显示了不同浓度透明质酸 (如: 4、4.5、5、6、7、8、9 及 10 mg/mL) 与 1 mg/mL TPE-PCL-PAPBA-AA-ccIr 在水液中自组装所形成胶束的粒径及相应趋势。随透明质酸浓度的增加, 胶束粒径呈先减小后增加的趋势, 粒径在 107~210.5 nm 之间变化。由于胶束内部以及胶束之间存在亲疏水作用, 可能是因为 HA 不高于 5 mg/mL 的浓度时, 促进胶束内核收缩与分散作用的硼酸酯键密度尚未达到饱和, 随 HA 浓度增加硼酸酯键密度增加, 在抵抗共聚物之间的团聚作用上逐渐占据优势, 导致其水合粒径的减小。而进一步提升透明质酸浓度, 由于硼酸酯键密度达到饱和, 在其表面逐渐堆积, 亲水作用增加并不能很好的抵抗团聚作用, 从而导致其水合粒径的增加。

考虑到增加胶束用于生物负载的表面多功能性以及生物体内运输能力, 因此我们选择 1 mg/mL 共聚物与 5 mg/mL HA 制备的胶束。采用 DLS 测量水溶液中 Ir-CP/HA 纳米胶束的尺寸为 107 nm(图 3-12 (b))。进一步通过 SEM 和 TEM 对 Ir-CP/HA 纳米胶束测试(图 3-12(c)和(d)), 观察到其具有均匀的尺寸和良好分散性的球形形貌, 并对 Ir-CP/HA 胶束进行统计测量的尺寸为 81 nm, 这主要是由于胶束进行干燥后会致其收缩, 从而通过电镜观察其尺寸小于 DLS 测量值。

基于上述分析, 为满足潜在应用的需求, 选择 1 mg/mL 共聚物 TPE-PCL-PAPBA-AA-ccIr 与 5 mg/mL HA 所制备的胶束, 进行后续的性能研究。

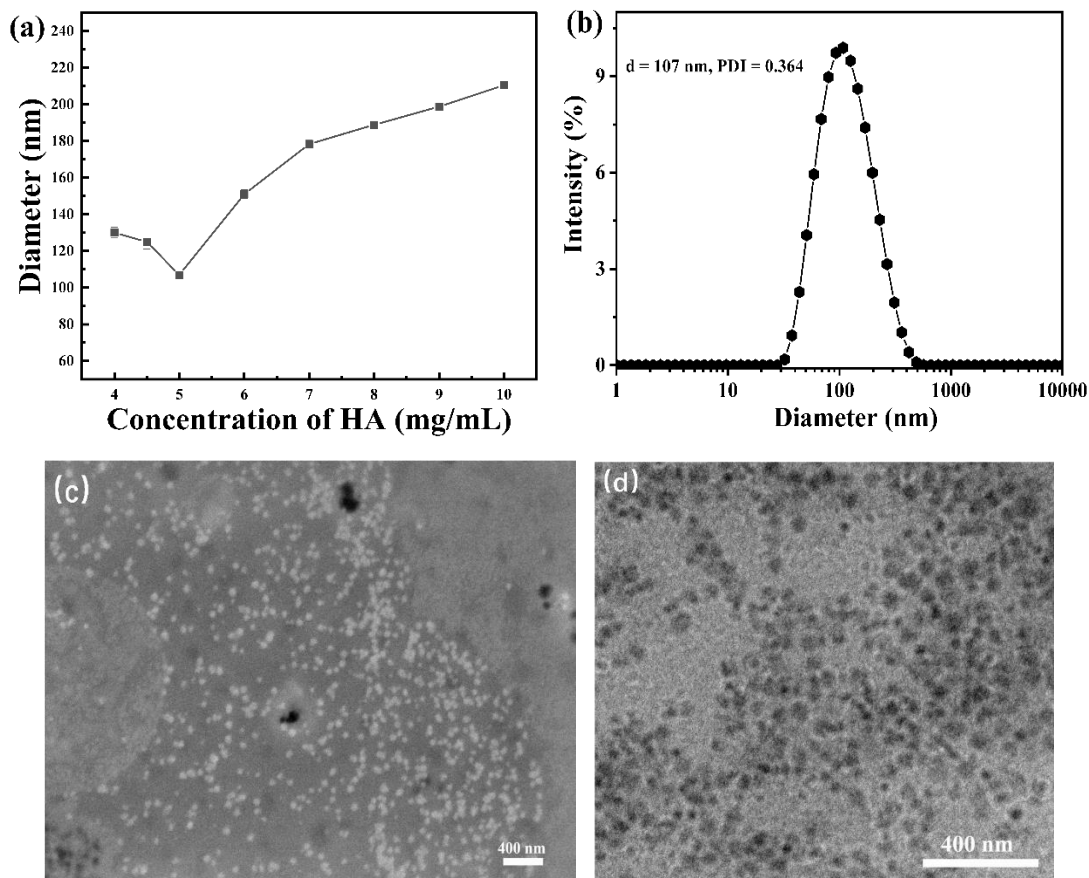


图 3-12 (a) TPE-PCL-PAPBA-AA-ccIr 与不同浓度的 HA 形成胶束的粒径变化; (b) 107nm 纳米胶束的粒径分布曲线; (c) 粒径为 107 nm 胶束的 SEM 图; (d) 粒径为 107 nm 胶束的 TEM 图

Figure 3-12 (a) Particle size change of TPE-PCL-PAPBA-AA-ccIr micelles formed with different concentrations of HA; (b) Particle size distribution curve of 107nm nanoparticles; (c) SEM image of micelles with a diameter of 107nm; (d) TEM image of micelles with a diameter of 107nm

3.4.8 探针的光学性质

图 3-13(a)和(b)分别为 TPE-PCL-PAPBA-AA-ccIr 探针在水溶液中以及与 HA 作用形成胶束后的紫外吸收曲线以及荧光发射曲线图, 从图中可以了解到, Ir-CP 的紫外吸收(UV-vis)在 350 ~ 450 nm 有一个宽的吸收峰, 为 TPE 的紫外吸收峰, TPE 基团最佳激发位置在 360 nm, 此外, 在 500 ~ 600 nm 处有一个肩峰, 这与 Ir 配合物的紫外吸收峰一致, 近红外基团最佳激发位置在 530 nm。值得注意的是, 在 360 nm 下进行激发会导致荧光光谱倍频峰的出现, 并与 Ir 配合物的发射峰位置存在重合情况, 为避免此情况的发生, 因此, 后续实验采用 313 nm 进行激发, Ir-CP 在 470 和 721 nm 处有最大的磷光发射峰。且 Ir-CP 在 750 ~

850 nm 范围内有较宽的发射峰肩，在 800 nm 处有峰值。因此，所报道的纳米探针可以覆盖 650 ~ 900 nm 的宽发射窗口，并在近红外深区(>800 nm)有一个尾部，可用于多种波长的最佳信号检测和定量。

通过使用相同浓度的 Ir-CP 探针与 HA 形成胶束与否(图 3-13(a)和图 3-13(b))的对比，我们发现探针与 HA 形成胶束后，其紫外吸收和荧光发射光谱的强度均高于未制备成胶束的光强。这可能是由于缺少 HA 外壳后，未形成胶束，而聚合物分子 Ir-CP 均匀分布于溶液中导致其中的 TPE 分子内核无法产生聚集诱导效应，从而未表现出荧光，并且磷光发射分散进而其强度有所下降。

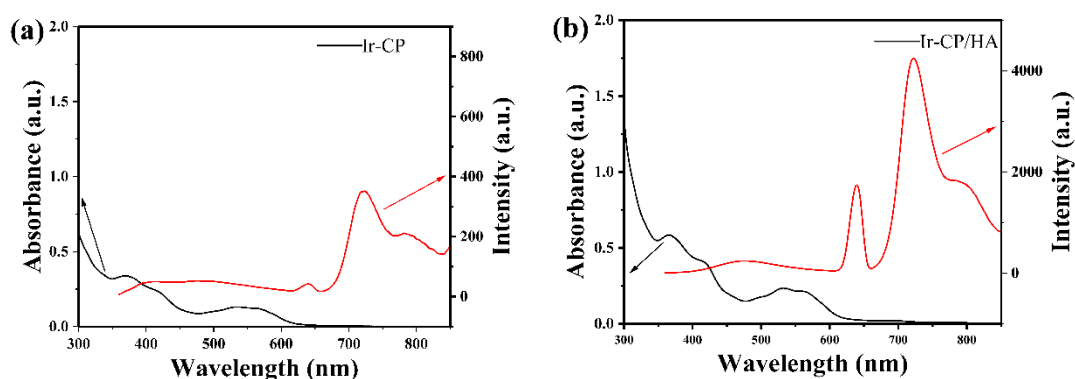


图 3-13 (a) Ir-CP 探针的紫外可见吸收光谱和发射光谱；(b) Ir-CP/HA 探针的紫外可见吸收光谱和发射光谱

Figure 3-13 (a) UV-vis absorption and emission spectra of Ir-CP/HA probe; (c) UV-vis absorption and emission spectra of Ir-CP probe

我们又对其进行了相对量子产率的测定：对 Ir-CP/HA 胶束溶液以及标准物(硫酸奎宁、亚甲基蓝)溶液进行 UV-vis 测试，分别确保配制的溶液紫外吸收值低于 0.05 以下。通过硫酸奎宁和亚甲基蓝吸收曲线分别与样品胶束溶液的吸收曲线交点确定其相应的激发波长分别为 364 nm 和 548nm，并分别在相应的激发下扫描 Ir-CP/HA、硫酸奎宁、亚甲基蓝荧光光谱，将荧光峰的积分面积 F 代入如下公式 3-1：

$$\Phi_x = \Phi_s \left(\frac{n_x}{n_s} \right)^2 \left(\frac{A_s}{A_x} \right) \left(\frac{F_x}{F_s} \right) \quad (3-1)$$

Φ 为荧光量子效率， x 为测试样品， s 为标准物质， n 为溶剂的折光指数。标准物选用硫酸奎宁(溶液为 0.1mol/L H_2SO_4 ，荧光量子效率为 55%)^[88]和亚甲

基蓝(溶液为 DMF, 荧光量子效率为 52%)^[89].

最终通过测试计算出胶束探针在空气平衡的水溶液中 470nm 和 721nm 发射波长的相对量子产率分别为 0.8%和 18.3%; 探针在 Ar₂ 饱和的水溶液中 470nm 和 721nm 发射波长的相对量子产率分别为 0.8%和 19.9%。

我们又对其进行了荧光寿命的测定, 在空气平衡的水溶液中, 测得其 TPE 荧光寿命为 1.82 μ s (图 3-14(a)), 近红外基团的磷光寿命为 5.01 μ s (图 3-14(b)); 在 Ar₂ 饱和的水溶液中, 近红外基团的磷光寿命为 5.08 μ s (图 3-14(b)), 进一步说明该探针的荧光寿命不受含氧量变化的影响。

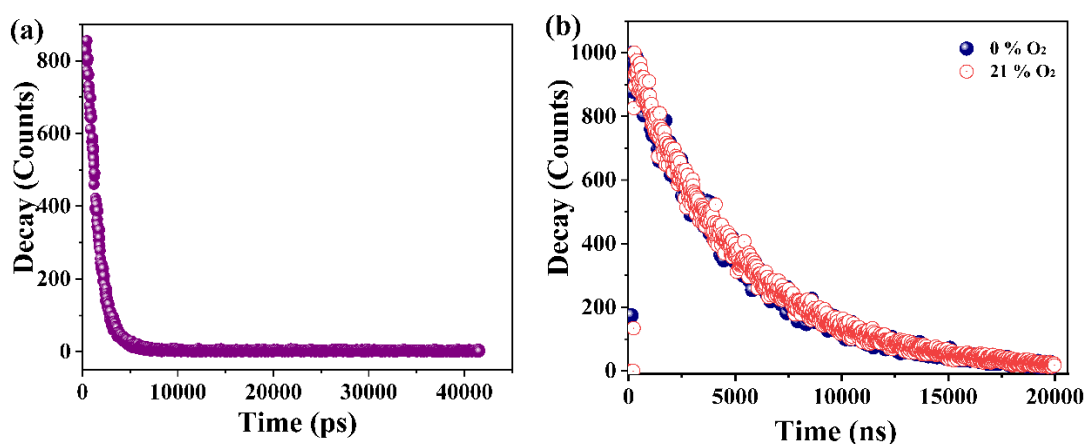


图 3-14 (a) Ir-CP/HA 中 TPE-2AM 的荧光寿命 ; (b) Ir-CP/HA 中铱配合物近红外发射在不同含氧量(0%和 21% O₂)时的荧光寿命

Figure 3-14 (a) Fluorescence lifetime of TPE-2AM in Ir-CP/HA; (b) Fluorescence lifetime of the near-infrared group of iridium complexes in Ir-CP/HA at different oxygen contents (0% and 21% O₂)

表明其能够长时间保持荧光信号, 适用于长时间跟踪和监测。高荧光量子产率意味着更多的激发能量被转化为荧光信号, 从而提高了荧光强度和探测灵敏度。高荧光量子产率和长荧光寿命的探针通常适用于高灵敏度的检测和长时间跟踪, 而低荧光量子产率和短荧光寿命的探针可能更适合于其他特定应用场景。

3.5 本章小结

本文采用 ROP 和 RAFT 协同聚合的方式成功合成了共聚物 TPE-(PCL-PAPBA-AA), 后对其通过酯化作用修饰上近红外配体 Ir-OH,最后共聚物与透明质酸通过硼酸酯键作用自组装获得粒径各异的纳米胶束, 并通过电镜证实形成

的胶束具有规整的近球形形貌和良好的分散性。通过 DLS 探究嵌段共聚物浓度以及透明质酸浓度对自组装成的纳米胶束的水合粒径的影响，研究发现，通过调节共聚物和透明质酸的投料浓度能够实现对纳米胶束尺寸的控制，随透明质酸或共聚物的浓度的增加，胶束的粒径总体随之增加。在 5 mg/mL HA 液中，制备粒子的粒径可以在 107 ~ 210.5 nm 调控，有利于体内长循环及病灶渗透。对其光学性能研究证实该双波长荧光胶束具有较好的灵敏度、稳定性、荧光强度以及长荧光寿命，能够长时间保持荧光信号，适用于长时间跟踪和监测。因此，双波长荧光胶束表现出优异的光学性质，且表面透明质酸提供了其生物相容性及癌细胞靶向功能，使得纳米胶束作为探针用于生物标记和成像拥有巨大的潜能。

第4章 双波长荧光高分子材料的性能及应用研究

4.1 引言

癌症仍然是全球公众健康的巨大威胁。恶性病变的早期和精确的发现仍然是癌症诊断和治疗的一大挑战,有些癌症早期没有明显的症状,容易被忽视。然而,临床上可用的医学影像诊断技术在用于捕获小的癌性病变的尺寸检测极限约为 1 mm,仪器的灵敏度以及分辨率相对较低^[90,91]。由于现有的大多数诊断技术缺乏足够的灵敏度和分辨率,并且可用于早期癌症检测的强大生物标志物也比较匮乏,大约 50%的癌症只能在晚期检测到。而光学成像具有高灵敏度、分辨率以及能够进行实时成像和低成本独特优势引起研究学者的广泛关注,并且在临床应用中潜在开发用于早期癌症检测。

低氧是肿瘤微环境的重要特征之一,缺氧可作为早期发现原发和转移性酸性病变的生物标志物,作为区分肿瘤组织与健康组织的辅助指标^[92]。人们已经开发了各种缺氧响应光学探针来检测缺氧,包括含偶氮、醌基和硝基的荧光团、磷光过渡金属配合物和磷光有机化合物^[93]。但其发射波长短、信号放大率低、水溶性差或非特异性信号发射限制了它们在癌症检测中的敏感性和特异性。此外,组织在低氧和缺氧环境下,会增加葡萄糖的代谢和酸性代谢物的产生,如乳酸和碳酸导致质子(H^+)在肿瘤组织中积累,形成酸性肿瘤微环境(pH 范围在 6.5 ~ 6.9)。另一方面,肿瘤微环境中的酸度升高和缺氧也可能导致荧光探针的荧光强度减弱或消失,因此,开发具有酸度稳定和缺氧响应性的荧光探针用于肿瘤检测和治疗方面具有巨大发展前景。

一般来说,癌症的治疗主要是通过破坏癌细胞的生长、分裂和扩散等机制,从而达到治疗的目的。然而,传统的癌症治疗方式常常会对患者的身体造成一定的损伤和影响,例如化疗会导致恶心、呕吐、脱发等不良反应。同时,给药存在诸多局限性,如药物溶解度差、副作用大、被网状内皮系统(RES)快速清除、耐药等^[94]。如何将药物准确地递送到肿瘤部位是至关重要的。随着纳米技术的快速发展,基于纳米材料的药物递送系统(DDS)为实现复杂的靶向策略和多功能性提供了机会,有望放大药物对癌症治疗的治疗效果。当纳米材料的药物递

送系统与生物标记物靶向或响应性成像探针结合时，光学成像将能够在癌症早期进行高度敏感的分子成像检测、表征和治疗。

综上所述，本章基于上一章设计合成的具有双波长发射的高分子纳米胶束，对其稳定性，胶体 pH、葡萄糖敏感性，光学乏氧响应性进行研究。进一步考察了胶束的生物相容性及细胞摄入能力，证实其能作为癌细胞检测的高灵敏生物成像与标记探针，在肿瘤检测和辅助治疗方面具有巨大潜能。

4.2 实验部分

4.2.1 实验仪器和试剂

表 4-1 实验试剂
Table 4-1 Experimental materials

材料	纯度	生产厂家
胎牛血清(FBS)	分析纯	上海麦克林生化科技股份有限公司
商用探针(盐酸吡莫地唑)	分析纯	上海陶素生化科技有限公司
噻唑蓝(MTT)	分析纯	上海陶素生化科技有限公司
二甲亚砜(DMSO)	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
葡萄糖	分析纯	上海泰坦科技股份有限公司

表 4-2 实验仪器
Table 4-2 Experimental instruments

仪器	型号	生产厂家
纳米粒度电位分析仪	Zetasizer Advance	马尔文帕纳科公司
荧光分光光度计	F-7100	日本日立公司
酶标仪	Multiskan FC	赛默飞世尔科技有限公司
流式细胞仪	CytoFLEX S	贝克曼库尔特

4.2.2 Ir-CP/HA 纳米胶束的荧光检测

使用日立荧光分光光度计 F-7100 对它们的荧光性能进行对比研究，激发和发射狭缝都设为 10 nm，激发波长为 313 nm，波长范围为 360 ~ 900 nm。

4.2.3 Ir-CP/HA 纳米胶束的稳定性

为证实纳米胶束的长期稳定性，随后利用 DLS 和荧光光谱仪进行了胶束粒径和荧光随时间变化的研究。跟踪纳米胶束在不同时间下(0、2、4、8、12、24、48、60、72、96、120 和 144 h)进行透析(截留分子量 12000-14000)后的粒径和

荧光变化。然后将纳米胶束加入到配制的 10% v/v 的 FBS 水溶液，跟踪纳米胶束在不同时间下(0、2、4、8、12、24、48、60、72、96、120 和 144 h)的粒径和荧光变化，探究 FBS 对纳米胶束的影响。

4.2.4 pH 对 Ir-CP/HA 纳米胶束的影响

如前所述配置 Ir-CP/HA 纳米胶束，向 7 个透析袋中各加入 5 mL 的 Ir-CP/HA 纳米胶束，随后在 NaOH(1 mol/mL)或 HCl(1 mol/mL) 调配的不同 pH (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11)去离子水中透析，使用 DLS 和荧光光谱仪测定 pH 对双功能胶束的粒径和荧光信号的影响。

4.2.5 葡萄糖对 Ir-CP/HA 纳米胶束的影响

如前所述配置 Ir-CP/HA 纳米胶束，向 8 支试管中各加 5 mL 的 Ir-CP/HA 纳米胶束溶液，随后依次向试管中加入葡萄糖，配制葡萄糖浓度分别为 0、2、4、6、8、10、12.5 和 15 mg/mL 的溶液，静置 1 小时后，使用 DLS 和荧光光谱仪检测葡萄糖浓度对胶束的粒径和荧光信号的影响。

4.2.6 荧光探针的光学乏氧敏感性

取所合成的 Ir-CP/HA 纳米胶束探针在石英荧光四面透光比色皿中。将氩气和氧气经流量计调节成不同比例(0%、2.5%、5%、10%、21%、50%、100% O₂)后，向探针溶液底部鼓泡 1 h，再将比色皿密封，使用 DLS 和荧光光谱仪进行测试不同氧分压对双功能胶束的粒径和荧光信号的影响。将商用探针配制成 1 mg/mL 溶液进行乏氧测试，操作同上。

4.2.7 Ir-CP/HA 纳米胶束的细胞毒性

使用 MTT 法测 Ir-CP/HA 纳米胶束探针毒性，具体操作如下：在 96 孔板中分别接种 NIH3T3(小鼠胚胎成纤维细胞)、A549(人肺癌细胞)和 H22 (小鼠肝癌细胞)细胞株，将 96 孔板放在培养箱预培养(在 37 °C，5% CO₂的条件下)。设空白组、对照组、实验组，空白组每孔只加培养液，对照组每孔不加样只加含有 NIH3T3、A549 和 H22 细胞株的培养液，实验组每孔加入含有 NIH3T3、A549 和 H22 细胞株的培养液和 Ir-CP/HA 纳米胶束，每孔体积 200 μL,浓度分别为 12.5、25、50、100 和 200 μg/mL (Ir-CP/HA 纳米胶束的实验组另外配置，浓度参数都相同)。将加完样的 96 孔板置培养箱中于 37 °C，5% CO₂ 的条件下孵育 48h。

首先,向每孔各加入 20 μL 的 MTT 溶液(5 mg/mL),继续培养 3 h。随后吸出孔内培养液(上清液),加入 DMSO 液(150 μL /孔),将培养板置于微孔板振荡器 10 min 使结晶物溶解。最后,用酶标仪在 488 nm 波长处检测各孔的光密度值(OD 值),记录结果,绘制细胞生长存活图,细胞活性计算时假设空白的细胞存活率为 100%,细胞存活率=(实验组 OD 值/对照组 OD 值)*100%。

测光毒性试验,NIH3T3、A549 和 H22 细胞分别与纳米探针($200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)在 37 $^{\circ}\text{C}$ 共孵育 48 h,然后在 535 nm、 $0.32 \text{ W}/\text{cm}^2$ 功率灯下照射 10 min。共孵育后,每孔加入 $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 MTT 溶液 20 μL 。再孵育 4 h 后,将培养液从所有孔中取出,每孔中加入 DMSO 100 μL 。最后,通过酶标仪测定 488 nm 处的紫外吸收,确定活细胞百分比。

4.2.8 Ir-CP/HA 纳米胶束流式细胞实验

首先将 NIH3T3、A549 和 H22 细胞种到培养皿中,密度为 1×10^5 细胞/孔,并且在培养箱(在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 的条件下)中培养 24 h。用 PBS (pH=7.4)缓冲液洗三遍,加入新鲜的培养基后,加 Ir-CP/HA 纳米胶束,继续培养 8 h,再次用 PBS(pH=7.4)缓冲液洗三遍,细胞样品在常氧条件下重新悬浮于 PBS 溶液中,用 Beckman Coulter FC500 进行测量,激发:488 nm, FL: 770 nm, PE-Cy7 通道。

4.3 结果与讨论

4.3.1 Ir-CP/HA 纳米胶束的稳定性

为证实纳米胶束的长期稳定性,随后利用 DLS 进行了胶束粒径随时间变化的研究。如图 4-1 所示,跟踪纳米胶束在 PBS(pH=6.5 和 7.4)不同透析时间下(0、2、4、8、12、24、36、48、60、72、96、120 以及 144 h)的粒径变化,可以看到在 PBS=6.5 时,胶束粒径从 107 nm 增长到 169.1 nm,呈现出略微增长的趋势;在 PBS=7.4 时,胶束粒径从 107 nm 增长到 151.6 nm,呈现出略微增长的趋势,我们可以发现其最终依旧呈现出良好的稳定性。

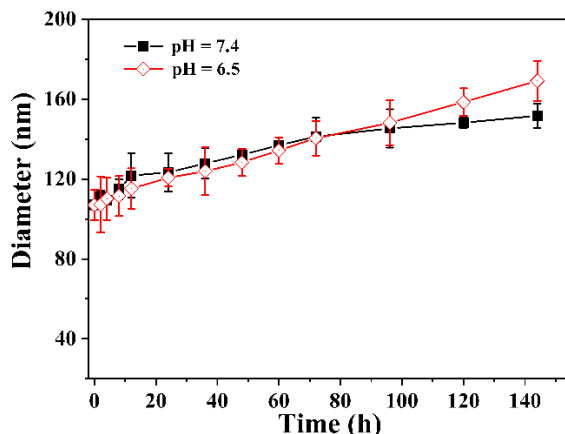


图 4-1 Ir-CP/HA 纳米胶束粒径随时间变化

Figure 4-1 The size of Ir-CP/HA nanomicelle over time

研究纳米胶束荧光性能的时长稳定性, 如图 4-2(a)和(b) 所示, 为了更为直观的了解荧光的变化, 对其不同时间下最佳发射峰(470、721 和 800 nm)进行归一化处理。随着透析时间的增长, 发现发射强度稍有降低。结合粒径随时间变化规律, 发现发射强度变化随粒径增大而降低, 这主要是 Ir-CP/HA 纳米胶束粒径增加, 胶束团聚增加, 溶液中平均胶束密度降低, 并且实验过程中发现极少量胶束沉降, 从而导致荧光发射强度降低。

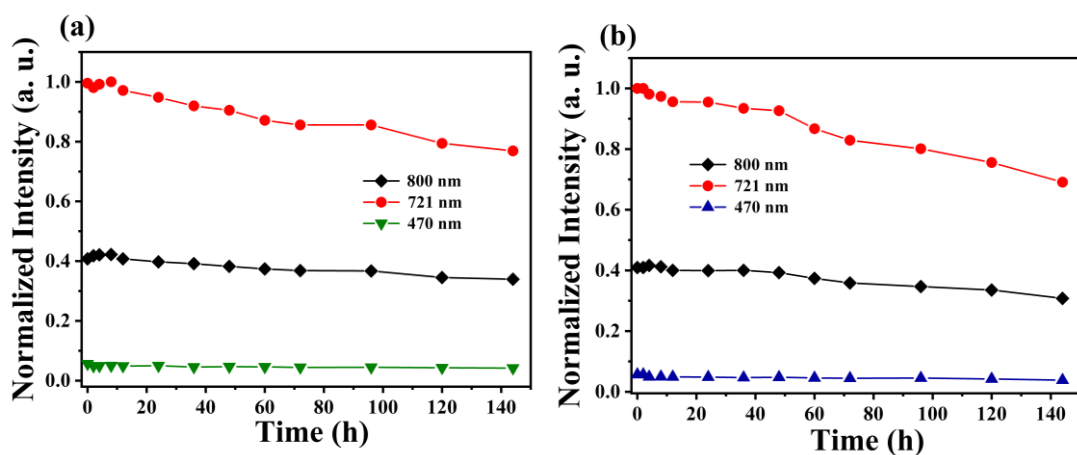


图 4-2 (a) Ir-CP/HA 纳米胶束在 PBS(pH=7.4)溶液中最佳发射峰(470、721 和 800 nm)随时间变化; (b) Ir-CP/HA 纳米胶束在 PBS(pH=6.5)溶液中最佳发射峰(470、721 和 800 nm)随时间变化

Figure 4-2 (a) Change of the optimal emission peak (470, 721 and 800 nm) of Ir-CP/HA nanomicelle in PBS (pH=7.4) solution over time; (b) Change of the optimal emission peak (470, 721 and 800 nm) of Ir-CP/HA nanomicelle in PBS (pH=6.5) solution over time.

4.3.2 Ir-CP/HA 纳米胶束的 pH 敏感性

众所周知, 苯硼酸酯键的稳定性受 pH 值影响较大, 苯硼酸酯在酸性环境内将解离, 而稳定于中性及碱性介质中, 此特征有利于构建 pH 响应的载体材料, 为此随后研究了 pH 对纳米胶束性质的影响。所合成的探针 Ir-PVP/HA 受酸性环境影响较大其发射光谱在相当大的 pH 值范围(5.0 ~ 11.0)内保持稳定, 因而它在弱酸性以及碱性环境下仍然适用。这一点在探针应用于肿瘤乏氧成像是尤为重要, 因为大多数实体肿瘤内的微环境是酸性的。

对于上述 107 nm 的胶束溶液, 利用动态光散射跟踪纳米胶束在不同 pH 值下的水合粒径与表面电位, 如图 4-3(a)所示, 当 $\text{pH} < 5$ 时, 苯硼酸酯键的酸响应断裂, 导致共聚物从胶束内释放出来, 溶液中胶束发生解离团聚, 从而表现出不稳定性; 纳米胶束在弱酸性至碱性介质中十分稳定, pH 值从 7.4 增加至 11 时, 胶束粒径由 100.1 nm 增大到 173.9 nm。 $\text{pH} > 8$, 苯硼酸酯将结合 OH^- 形成负离子, 溶解性得到增加, 令纳米胶束的内核变得亲水而使内核逐渐膨胀, 胶束粒径出现了一定幅度的增大。纳米胶束在整个稳定的 pH 范围内, zeta 电位一直保持较大的负值(-24.52 ~ -38.73 mV), zeta 电位不仅能反映纳米粒子的表面电荷, 还能反映分散体系的稳定性。zeta 电位的绝对值越高, 说明胶体体系越稳定。上述结果证明, Ir-CP/HA 纳米胶束符合苯硼酸酯的 pH 响应性, 在溶液中能够维持稳定状态, 具有较高生物活性分子负载的应用潜能。

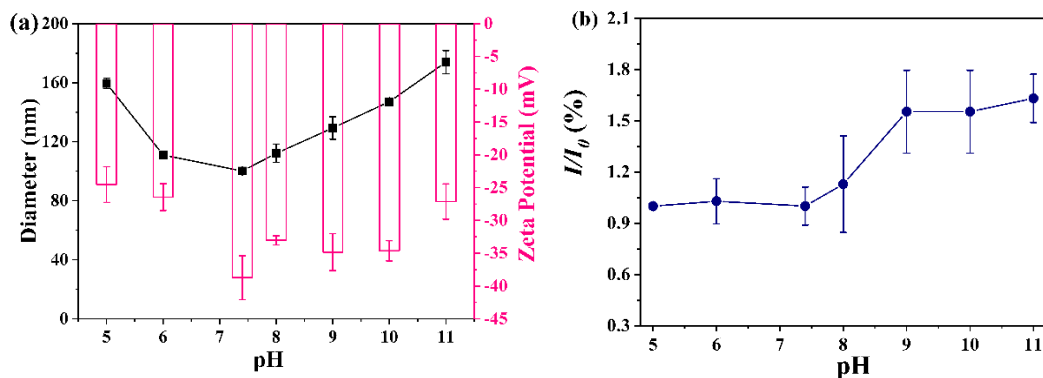


图 4-3 (a) Ir-CP/HA 纳米胶束在不同 pH 条件下的粒径与 zeta 电位的变化; (b)在不同 pH 条件下纳米胶束的光散射强度的变化

Figure 4-3 (a) Changes in the particle size and zeta potential of Ir-CP/HA nanomicelle under different pH conditions; (b) Changes in light scattering intensity of nanomicelle under different pH conditions

通过图 4-3(b)所示, 发现 Ir-CP/HA 纳米胶束的光散射强度随 pH 的变化而变化, pH 从 5 增加到 11, 光散射强度逐渐升高。这些行为可能与纳米胶束双电层结构有关, 在不同的 pH 介质中双电层结构有所不同(低离子强度介质内双电层是扩展的, 在高离子强度介质内双电层是压缩的)。随着 pH 增加亲水性增强, 水合粒径增大, 从而光散射强度增强。测量纳米胶束荧光光谱的 pH 依赖性变化, 如图 4-4 所示, 随着 pH 的改变, 发现荧光发射强度变化与粒径变化呈相反趋势, 即先增强后降低, 溶液 pH=7 ~ 9 时, 胶束荧光强度保持相对较高水平, 几乎没有发生变化, 而在酸性和碱性条件下, Ir-CP/HA 纳米胶束电负性降低, 粒径增加, 胶束团聚现象加剧, 溶液中平均胶束密度降低, 并且实验过程中发现极少量胶束沉降, 从而导致荧光发射强度降低。

综上所述, Ir-CP 纳米探针具有明显的 pH, 可以实现磷光信号的信号放大。

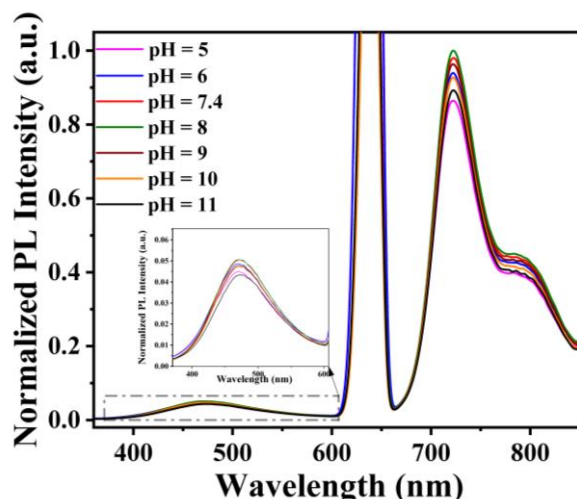


图 4-4 不同 pH 介质中纳米胶束的荧光光谱

Figure 4-4 Fluorescence spectra of nanomicelle in different pH media

4.3.3 Ir-CP/HA 纳米胶束的糖敏感性

因苯硼酸赋予了胶束糖敏感特性，随后探索了 Ir-CP/HA 纳米胶束的糖响应性。向选定的胶束溶液中加入葡萄糖，使其浓度从 0 增加至 15 mg/mL，静置一段时间后用 DLS 跟踪各糖溶液中胶束的粒径。如图 4-5(a)，胶束粒径随着葡萄糖浓度的增加而逐渐增大，胶束粒径由 107 nm 增大到 281.2 nm。共聚物胶束中的 PAPBA 与 HA 的邻二醇间硼酸酯键具有动态共价性，该特性允许其它含邻二醇物质经竞争同苯硼酸结合而引起结构重配，高糖浓度使更多原硼酸酯键解离而导致了纳米胶束的膨胀。因此，可以说动态苯硼酸酯键的竞争性交换反应诱导原键解离触发了纳米胶束的糖响应性。

另外，研究表明纳米胶束的动态光散射强度会随葡萄糖浓度的改变而变化。如图 4-5(b)所示，随着葡萄糖浓度从 2 mg/mL 增加到 15 mg/mL，光散射强度有所降低。可能是因为糖刺激引起纳米胶束的硼酸酯键响应，进而触发少量胶束由膨胀至解离。另一方面，考察了纳米胶束荧光信号的葡萄糖浓度依赖性，如图 4-6 所示。随着葡萄糖浓度的增加，发射强度降低。该探针荧光强度随葡萄糖浓度的变化，表明了其具有对血糖浓度升高的检测潜能。

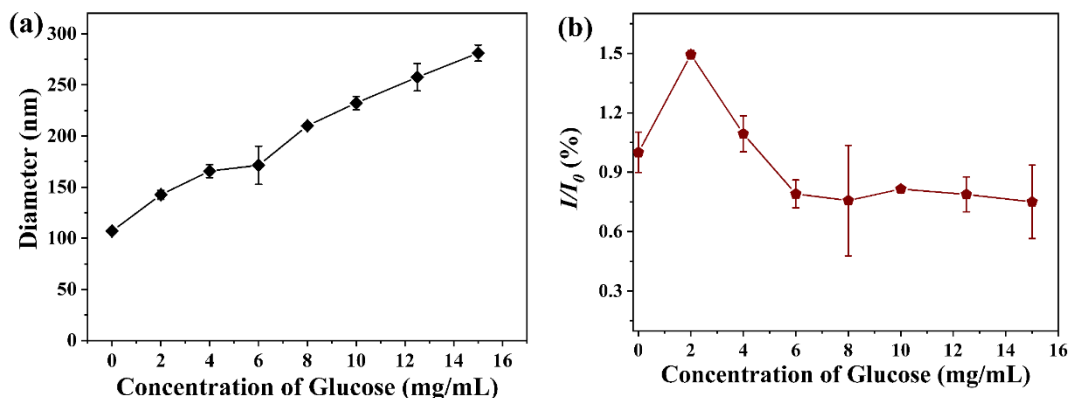


图 4-5 (a)葡萄糖浓度对 Ir-CP/HA 纳米胶束粒径的影响; (b) 葡萄糖浓度对 Ir-CP/HA 纳米胶束光散射强度的影响

Figure 4-5 (a) Effect of glucose concentration on the particle size of Ir-CP/HA nanomicelle; (b) Effect of glucose concentration on the light scattering intensity of Ir-CP/HA nanomicelle

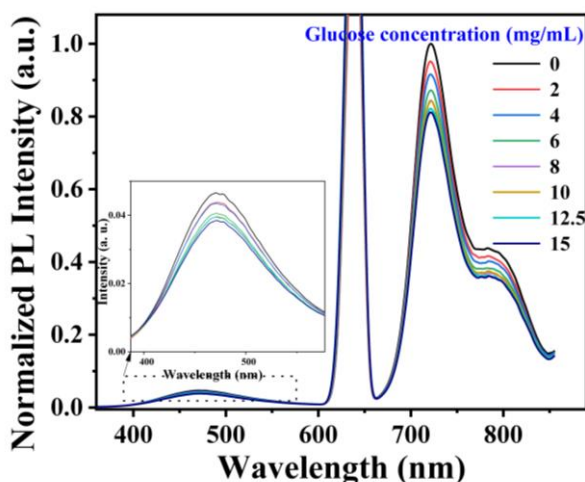


图 4-6 葡萄糖浓度对纳米胶束的荧光发射的影响

Figure 4-6 Effect of glucose concentration on the fluorescence emission spectra of nanomicelle

4.3.4 Ir-CP/HA 纳米胶束的光学乏氧响应性

如图 4-7(a), 在 313 nm 激发下, Ir-CP 探针 呈现出两个发射峰, 分别位于 470 和 720 nm。其中 721 nm 发射峰来源于 Ir 配合物部分, 它保持着对氧的高度敏感性, 而 470 nm 发射峰来源于 TPE 部分, 它随着氧分压的变化相对保持恒定。探针在水溶液中的近红外区荧光发射强度随着氧浓度的降低而非线性增强。在无氧和氧饱和的水溶液中, 探针近红外区发射峰的强度比值可达 1.68。此外, 当氧含量降低时, 在 721 nm 处的 Ir-CP 纳米探针的磷光强度显著增加。当氧浓度为 0% 时, Ir-CP 的磷光强度比大气中氧浓度为 21% 时增加了 1.38 倍。在低氧

条件下(<10%), Ir-CP 的磷光强度呈明显的氧浓度依赖性增加。

图 4-7(b) 中探针强度随着氧浓度增加的衰减曲线显示, 探针在低氧浓度下对氧分压尤其敏感, 低氧条件下, 氧浓度的微小变化可以引起探针发射轻度的急剧升高, 例如氧浓度降低 2.5%, 可导致探针强度升高 18%, 这一性质使得探针尤其适合用于生理条件下的乏氧成像。

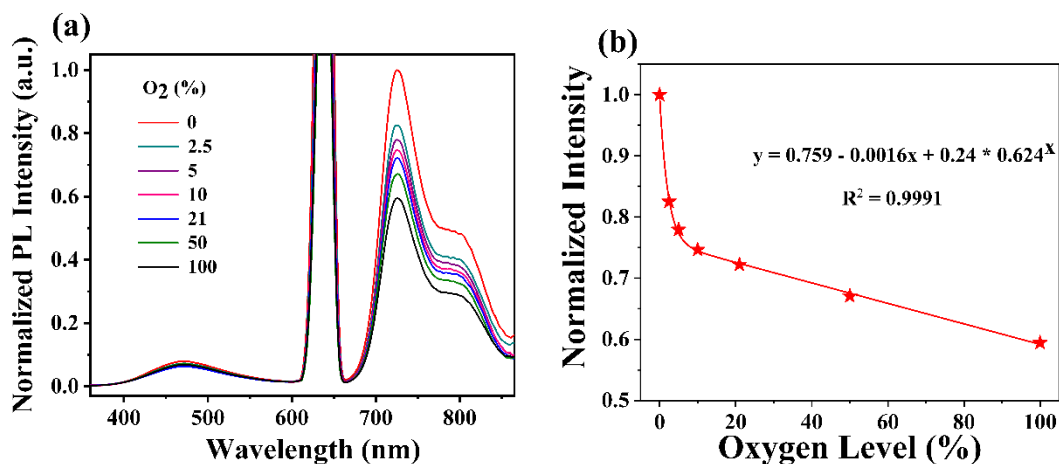


图 4-7 (a)探针在不同氧浓度下(0, 2.5, 5, 10, 21, 50 和 100%)下的发射光谱, 激发 313nm; (b) 探针发射峰的强度随氧浓度增加的衰减曲线。

Figure 4-7 (a) Emission spectra of the probe at different oxygen concentrations (0, 2.5, 5, 10, 21, 50 and 100%), excited at 313nm; (b) Decay curve of the intensity of the probe emission peak with the increase of oxygen concentration.

将 470 nm 发射峰用作内标, 表征探针浓度的变化, 721 nm 与 470 nm 处峰值强度的比例(r)仅与氧分压有关, 不受探针浓度的影响, 从而实现细胞中乏氧的定量测试。强度比例 r 随着氧分压的减小而增大, 如图 4-8, 用 r_0 表示 0% O_2 条下的强度的比例, 则 r_0/r 与氧分压之间存在着线性关系。这样, 我们可以利用所合成的探针对体外细胞中的乏氧情况进行定量的测量。

结合前面所述, Ir-CP 纳米探针具有明显的 pH 和氧特异性反应, 可以实现磷光信号的两步信号放大。

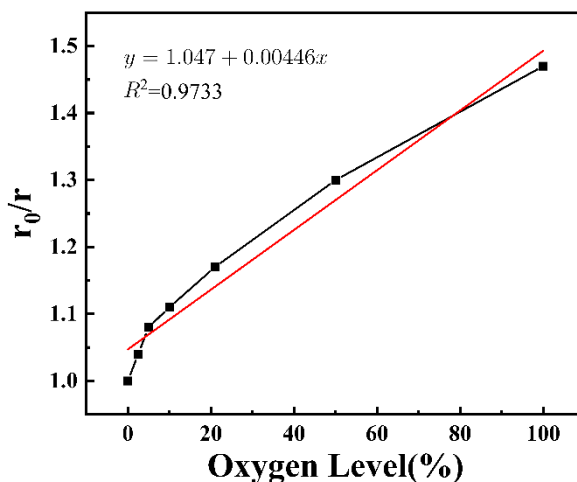


图 4-8 Ir-CP/HA 探针 r_0/r 与氧分压之间的线性关系

Figure 4-8 The linear relationship between r_0/r of Ir-CP/HA probe and oxygen partial pressure

如图 4-9(a)和(b) 所示, 同样我们对商用乏氧细胞内探针 (pimonldazole hydrochloride)也进行了氧含量的敏感性测定, 结果表明我们所合成的纳米探针 Ir-CP/HA 对氧的灵敏度远高于广泛使用的商用细胞内探针。

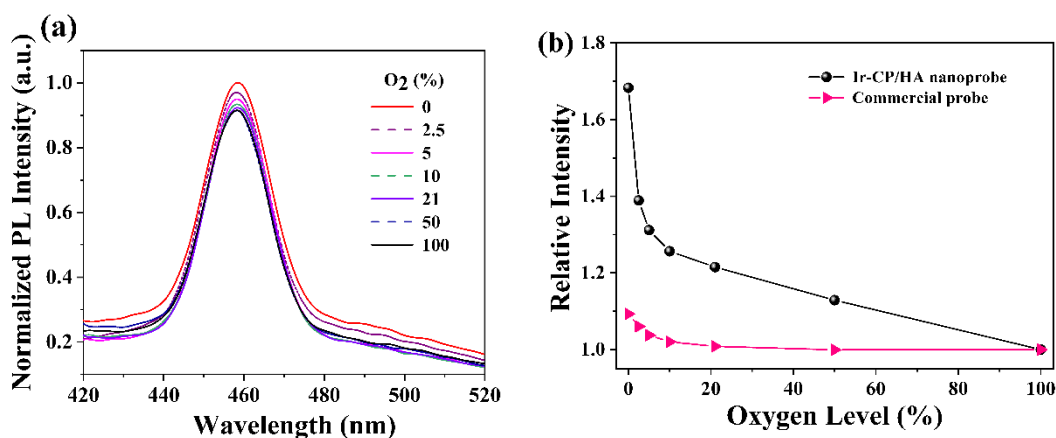


图 4-9 (a) 商用细胞内探针在不同氧浓度下(0, 2.5, 5, 10, 21, 50 和 100%)下的发射光谱;

(b) Ir-CP/HA 纳米探针与商用探针氧敏感度比较

Figure 4-9 (a) Emission spectra of commercial intracellular probes at different oxygen concentrations (0, 2.5, 5, 10, 21, 50 and 100%); (b) Comparison of oxygen sensitivity between Ir-CP/HA nanoprobe and commercial probes

4.3.5 在模拟生理环境中 Ir-CP/HA 纳米胶束的稳定性

FBS 蛋白与纳米颗粒具有潜在的相互作用, 可有效修饰纳米颗粒表面, 提

高其在生理环境中的稳定性^[95]。此外，由于血清中存在的蛋白质可能会破坏人体血管循环过程中的胶束结构，因此有必要研究血清或血浆中胶束的稳定性。在这里，我们使用 10% v/v 的胎牛血清来模拟血液循环条件。我们通过将荧光探针 Ir-CP/HA 加入到 FBS 溶液中，追踪其粒径与光学性能随时间的变化，探究该探针在血液环境中的稳定性情况。

我们分别对 Ir-CP/HA 在 FBS 溶液中进行正常氧和缺氧条件下 6 天的透析处理并利用 DLS 对其跟踪测试，根据图 4-10(a) 和(b)，我们可以看到，在正常氧的状态下，胶束粒径随时间从最初的 123.7 nm 增加到 198.9 nm；在缺氧的状态下，胶束粒径随时间从最初的 124.6 nm 增加到 200.2 nm，在这两种条件下，胶束粒径变化趋于一致，都有一定程度的增大，并且从最初与最后胶束溶液图片上我们也可以看出 Ir-CP/HA 胶束在 FBS 溶液中均保持良好的稳定性。图 4-10(c) 和 (d)，我们分别对 Ir-CP/HA 在 FBS 溶液中进行正常氧和缺氧条件下 6 天的透析处理后的探针进行荧光性能的测试，为了更为直观观察荧光强度的变化，对其最佳发射峰(470、721 和 800 nm)随时间变化进行处理，发现在缺氧和正常氧的状态下，胶束 470 nm 荧光强度基本保持不变，而 721 nm 处的磷光强度随时间的延长呈现降低的趋势，且下降的趋势几乎一致。进一步说明该探针在在缺氧和正常氧的状态下光学性能随时间衰减程度接近一致。这种现象可能是因为荧光探针在与 FBS 中的其他分子结合后发生一定程度的荧光增强，但随着时间的推移，可能会发生光漂白现象，导致荧光强度有一定程度降低。

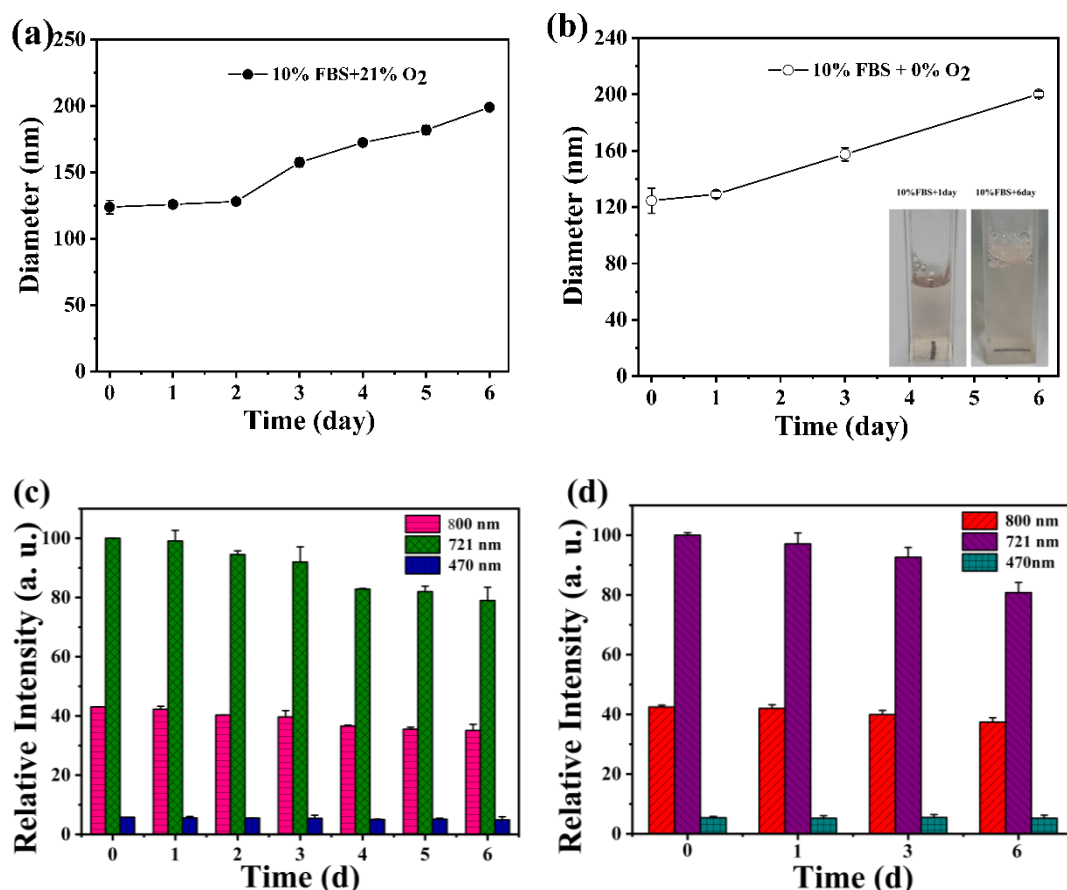


图 4-10 含 10%FBS 的 Ir-CP/HA 探针溶液在正常含氧量(a)与无氧(b)条件下的粒径随时间变化; Ir-CP/HA 探针在正常含氧量(c)与无氧(d)条件下最佳发射峰(470、721 和 800 nm)随时间变化

Figure 4-10 The change of particle size of Ir-CP/HA probe with time in 10% FBS solution under normal oxygen content (a) and anaerobic conditions (b); The change of the optimal emission peak (470, 721 and 800 nm) of Ir-CP/HA probe with time in normal oxygen content (c) and anaerobic conditions (d).

4.3.6 在模拟生理环境中 Ir-CP/HA 纳米胶束的光学乏氧响应性

我们通过将荧光探针 Ir-CP/HA 加入到 10%v/v FBS 溶液中，追踪其 Zeta 电位与光学性能随时间的变化，探究该探针在血液环境中的乏氧性情况。

Ir-CP/HA 纳米探针在含或不含 10%胎牛血清(FBS)的中性 PBS 溶液中是稳定的(图 4-11(a))。然而，当 Ir-CP/HA 胶束在含血清或蛋白质的水溶液(如 FBS)中，所报道的纳米探针在 721 nm 处的发射强度比未加 FBS 的水溶液的发射强度略微增强增加了 1.05 倍以上，值得注意的是，在 Ar₂ 饱和的 FBS 溶液中，探针的发射强度增强了 1.17 倍。此外，在 750 ~ 850 nm 范围内的信号强度也显著

提高。而在有血清和无血清的 PBS 水溶液中, 470 nm 处其信号强度无明显变化。同样, 我们也观察到含血清溶液中 Ir-CP/HA 的信号随着氧浓度的降低而增加。

zeta 电位不仅能反映纳米粒子的表面电荷, 还能反映分散体系的稳定性。 ζ 电位的绝对值越高, 说明胶体体系越稳定。从图 4-11(b), 我可以看到 Ir-CP/HA 胶束在加入 FBS 前后, 其 zeta 电位从 -38.73 mV 降低到 -24.39 mV, 可能是由于 FBS 中含有大量的蛋白质, 这些蛋白质在溶液中存在时会吸附到荧光探针的表面, 改变其表面电荷密度, 蛋白质的吸附可能导致表面电荷的中和或屏蔽, 使 zeta 电位降低。另一方面, FBS 中含有各种离子, 这些离子的存在也可能改变溶液的离子强度, 影响荧光探针表面的电荷分布, 进而影响 Zeta 电位的测量结果。Ir-CP/HA 在 FBS 溶液中的 zeta 电位依旧保持在较大的数值, 表明 Ir-CP/HA 之间的排斥力可以抵抗纳米颗粒的团聚, 在 FBS 溶液中表现出单分散性。此外, FBS 中含有大量亲水蛋白, 可使进一步增强纳米颗粒在 PBS 溶液中的分散稳定性。

以上结果证明, Ir-CP/HA 在模拟生理环境中具有长期生理稳定性, 并且在短时间内 FBS 对荧光探针的光学性能起到一定程度的增强。

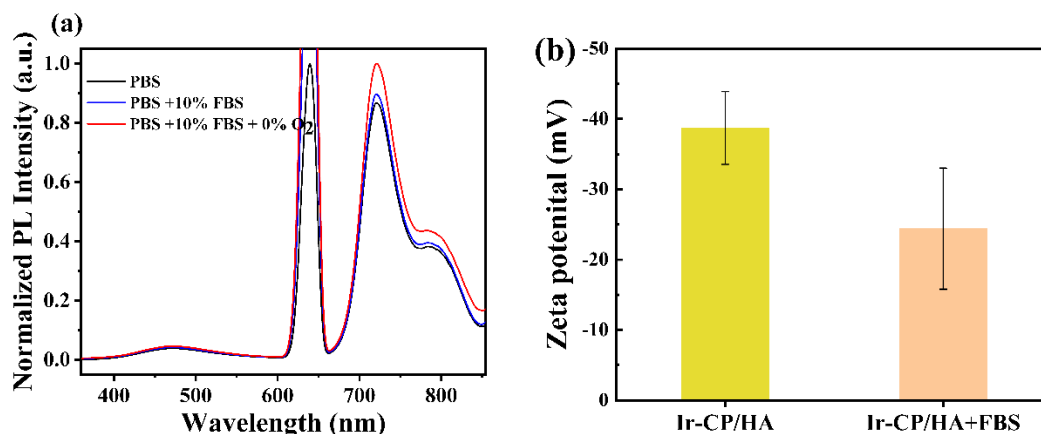


图 4-11 (a) Ir-CP/HA 在 PBS、PBS + 10%FBS、PBS + 10%FBS 和无氧条件下的荧光光谱;

(b) Ir-CP/HA 在加入 FBS 前后的 zeta 电位变化

Figure 4-11 (a) Fluorescence spectra of Ir-CP/HA in PBS, PBS + 10%FBS, PBS + 10%FBS and anaerobic conditions; (b) Zeta potential of Ir-CP/HA before and after addition of FBS

4.3.7 Ir-CP/HA 纳米胶束的细胞毒性

图 4-12 是 MTT 法研究 Ir-CP/HA 胶束细胞存活率的柱状图, 实验结果可知在实验设定的各个条件下 NIH3T3、A549 和 H22 细胞的存活率都在 95%以上。

结果表明: Ir-CP/HA 纳米胶束对细胞存活基本没有影响, 具有非常优秀的生物相容性, 这也保证了双功能性胶束在生物成像中作为长时间荧光标记的可行性。

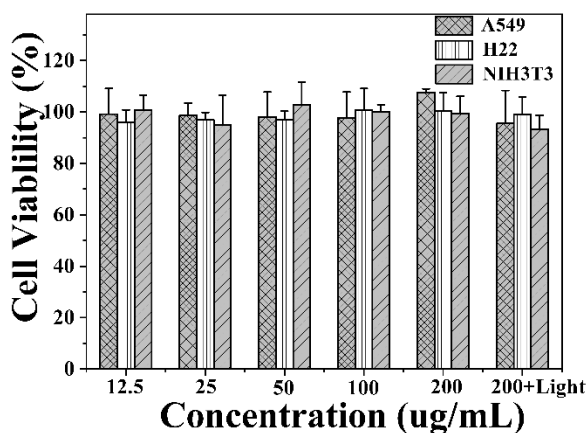


图 4-12 细胞(NIH3T3、A549 和 H22)与不同浓度的 Ir-CP/HA 共同孵育 48 h, 在有/无光照条件下照射 10 min, MTT 法检测细胞毒性

Figure 4-12 Cells (NIH3T3, A549 and H22) were incubated with different concentrations of Ir-CP/HA for 48 h and irradiated for 10 min in the presence/absence of light, and cytotoxicity was detected by MTT assay

4.3.8 Ir-CP/HA 纳米胶束的流式细胞实验

HA 还与肿瘤细胞表面过度表达的 CD44 和 RHAMM(HA 介导运动受体)受体的特异性靶向性。正常细胞通常具有低水平的 RHAMM 和 CD44 表达, 但癌细胞通常具有高水平的表达, 这使得 HA 成为靶向药物递送至癌组织的有用工具^[96]。

有相关研究表明, RHAMM 在 H22 细胞中过表达, 在 A549 细胞和 NIH3T3 细胞中低表达, 而 CD44 仅在 A549 细胞中过表达, 在 H22 细胞和 NIH3T3 细胞中低表达^[97]。因此, 我们利用流式细胞术测量 NIH3T3、A549 和 H22 细胞对 Ir-CP/HA 的摄取情况, 根据图 4-13(a), 我们可以明显注意到 H22 和 A549 细胞对 Ir-CP/HA 纳米胶束探针的细胞摄取明显高于 NIH3T3 细胞。如图 4-13(b)所示, H22 和 A549 细胞的荧光强度分别比 NIH3T3 细胞高约 2.07 倍和 1.64 倍。这意味着 Ir-CP/HA 纳米胶束的细胞内化与细胞中过表达的 RHAMM 与 CD44 受体有关。

综上所述, 通过流式细胞仪定量检测 Ir-CP/HA 探针的细胞摄取, 表明该荧光探针在肿瘤监测与诊疗方面拥有巨大应用潜能。

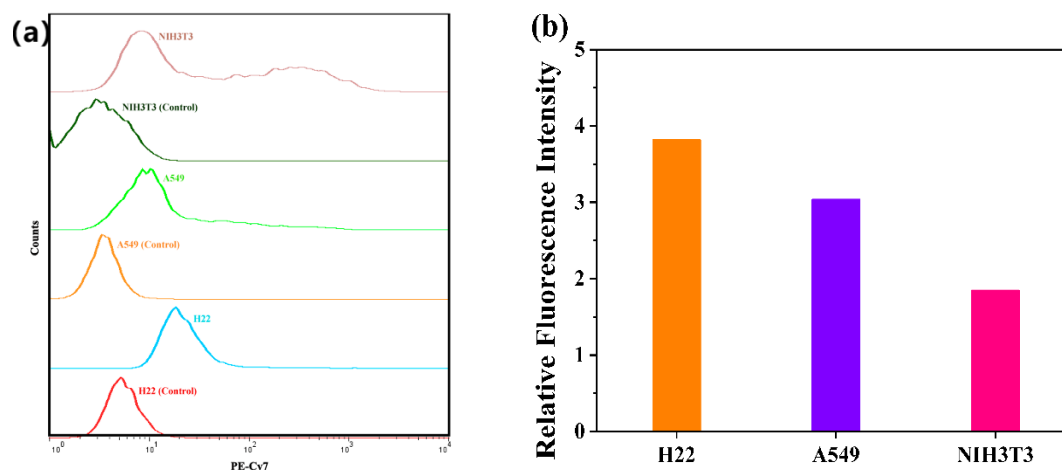


图 4-13 (a)培养基中不同细胞(NIH3T3、A549 和 H22)摄取的流式细胞术分析;(b)流式细胞术分析细胞(NIH3T3、A549 和 H22)中 Ir-CP/HA 的积累情况

Figure 4-13 (a) Flow cytometry analysis of the uptake of cells (NIH3T3, A549 and H22) in culture medium; (b) Flow cytometry analysis of the accumulation of Ir-CP/HA in cells (NIH3T3, A549 and H22)

4.4 本章小结

对双波长荧光纳米胶束组装体的性能及应用进行了研究。研究了 pH 值和葡萄糖浓度对双波长荧光纳米胶束的光学及胶体性能的影响，随着 pH 值和葡萄糖浓度的增加，胶束粒径呈增加的趋势，而其荧光强度呈略微下降的趋势，表明其在弱酸至碱性范围能够保持良好的光学稳定性，同时胶束具有 pH 和糖双重胶体响应性。相比于商用乏氧探针，氧浓度对光学发射影响研究阐明了胶束具有优异的近红外区乏氧响应性。此外，双波长荧光强度比例与氧分压之间存在线性关系，可以实现探针对体外细胞中乏氧情况的定量测量。模拟生理环境研究，证实胶束同样拥有良好的胶体稳定性和乏氧响应性。最后，细胞毒性和摄入分析，展现了双波长荧光纳米胶束良好的生物相容性，且能够被细胞有区分度的特异性摄入。因此，双波长发射胶束可用作癌细胞检测的高灵敏生物探针，在多场景的早期肿瘤检测与辅助治疗领域拥有较大的应用潜能。

结论与展望

1. 结论

本论文通过非共价自组装的方式,利用亲疏水作用和动态共价键作用,合成了两种聚合物纳米胶束,一种是利用 RAFT 聚合的方式制备具有疏水性聚(3-丙烯酰胺基苯硼酸)链段和亲水性聚乙烯吡咯烷酮链段的两亲性 PAPBA-*b*-PVP 共聚物,利用硼酸酯动态键与透明质酸(HA)作用自组装成了功能高分子纳米胶束 PAPBA-*b*-PVP/HA;另一种是利用 ROP 和 RAFT 协同聚合方式在 TPE-2AM 的两条臂上引入疏水性的聚己内酯、聚(3-丙烯酰胺基苯硼酸)和聚丙烯酸链段,再通过酯化作用修饰上近红外配合物(Ir-OH),最后利用硼酸酯动态键与透明质酸作用自组装成了双波长荧光高分子纳米胶束 TPE-PCL-PAPBA-AA-ccIr/HA(记作 Ir-CP/HA)。合成的功能高分子纳米胶束因动态共价键的存在表现出优良的刺激响应性,但同时也存在着不足。

具有硼酸酯动态键的两亲性 PAPBA-*b*-PVP/HA 纳米胶束可通过亲疏水嵌段比、共聚物和透明质酸的投料浓度能够实现对纳米胶束尺寸的控制。同时, PAPBA-*b*-PVP/HA 纳米胶束由于硼酸酯动态键存在被赋予了良好的 pH、盐、糖响应性以及稳定性。此外,该功能高分子纳米胶束的外壳由透明质酸包裹,也赋予了其良好的生物相容性和癌细胞靶向性,使得纳米胶束作为载体用于生物标记和递药拥有巨大的潜能。

具有 AIE 性能和近红外发射的双波长荧光材料 TPE-PCL-PAPBA-AA-ccIr 与 HA 溶液通过硼酸酯可逆动态键作用自组装成双波长荧光纳米胶束 Ir-CP/HA。通过共聚物和透明质酸的投料浓度能够实现对纳米胶束尺寸的控制。由于硼酸酯动态键存在赋予该探针良好的胶体环境敏感性(pH、糖响应性)以及稳定性。在溶液含氧量从 100%降至 0%时,470nm 处的 AIE 荧光强度基本保持不变,而 720nm 处的近红外磷光表现出乏氧敏感性,在无氧和氧饱和的水溶液中,探针近红外区发射峰的强度比值可达 1.68,且以 470nm 波段的荧光为内标,可进行含氧量的定量检测。光学性能测试结果表明该探针具有优秀的荧光寿命和较高量子产率的近红外发射;通过细胞实验证实该探针具有良好的生物相容性和癌细胞靶向性,具有作为探针用于生物标记、肿瘤检测及辅助治疗的巨大的潜能。

2. 展望

具有 AIE 效应和近红外发射的双波长荧光高分子材料同时赋予材料良好的药物负载、光学性能以及更深程度的组织穿透能力，在生物成像、化学传感和肿瘤诊疗等诸多领域均表现出了巨大的应用价值。荧光探针后续可进行的研究方向：(1)开发具有更高灵敏度、分辨率、选择性和特异性的探针；(2)可与多模态成像技术相结合的荧光探针；(3)可以同时检测多种生物标志物的探针，实现多通道检测和成像的探针，以便更准确地检测和成像生物分子和细胞。未来的研究也有必要更深入地探索荧光探针在临床诊疗中的应用。此外，近红外金属有机配合物磷光材料还存在很多问题尚待解决，例如合成和纯化过程较为复杂、荧光量子产率和光稳定性可能受到配合物结构和环境因素的影响、具有细胞毒性、高成本和环境污染、长期存在于体内是否会产生毒性等，这些问题都是未来研究工作的重点。

参考文献:

- [1] Huang Y, Hu F, Zhao R, et al. Tetraphenylethylene conjugated with a specific peptide as a fluorescence turn-on bioprobe for the highly specific detection and tracing of tumor markers in live cancer cells[J]. *Chemistry*, 2014, 20(1): 158-64.
- [2] Liu D, Liang M, Fan A, et al. Hypoxia-responsive AIEgens for precise disease theranostics[J]. *Luminescence*, 2024, 39(1): e4659.
- [3] Fu Q, Yang X, Wang M, et al. Activatable Probes for Ratiometric Imaging of Endogenous Biomarkers In Vivo[J]. *ACS Nano*, 2024, 18(5): 3916-3968.
- [4] 关晓琳, 王林, 李志飞, 等. 基于 AIE 效应的多重刺激响应性聚合物纳米微球的制备及其细胞示踪应用[J]. *化学学报*, 2019, 77: 1036-1044.
- [5] 王润林. AIE 型金属铈配合物的设计、合成及其在光动力治疗中的应用研究[D]. 2023.
- [6] Ji Z, Zhao C, Zhang C, et al. Synthesis and AIE properties of benzene fused cyclooctatrathiophenes[J]. *Journal Of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry*, 2023, 436: 114362.
- [7] Zhang W, Luo Y, Zhao J, et al. tQ[14]-based AIE supramolecular network polymers as potential bioimaging agents for the detection of Fe^{3+} in live HeLa cells[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2022, 354: 131189.
- [8] Viglianti L, Leung N L C, Xie N, et al. Aggregation-induced emission: mechanistic study of the clusteroluminescence of tetrathienylethene[J]. *Chemical Science*, 2017, 8(4): 2629-2639.
- [9] Tu D, Zhang J, Zhang Y, et al. How Do Molecular Motions Affect Structures and Properties at Molecule and Aggregate Levels?[J]. *Journal Of The American Chemical Society*, 2021, 143(30): 11820-11827.
- [10] 苏姗, 马宇帆, 田立枚, 王卓. 四苯乙烯聚集诱导发光探针在生物成像和药物递送中的应用研究进展[J]. *中国科学:化学*, 2017, 47(09): 1075-1084.
- [11] Qin W, Alifu N, Cai Y, et al. Synthesis of an efficient far-red/near-infrared luminogen with AIE characteristics for in vivo bioimaging applications[J]. *Chem Commun (Camb)*, 2019, 55(39): 5615-5618.

- [12] Dudek M, Tarnowicz-Staniak N, Deiana M, et al. Two-photon absorption and two-photon-induced isomerization of azobenzene compounds[J]. RSC Advances, 2020, 10(66): 40489-40507.
- [13] Schaferling M. Nanoparticle-based luminescent probes for intracellular sensing and imaging of pH[J]. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol, 2016, 8(3): 378-413.
- [14] 白海英. 两亲性 AIE 荧光材料细胞成像和光动力治疗[D]. 江西: 南昌大学, 2021.
- [15] Zhang X, Zhang X, Yang B, et al. Polymerizable aggregation-induced emission dye-based fluorescent nanoparticles for cell imaging applications[J]. Polym. Chem., 2014, 5(2): 356-360.
- [16] Zhou L, Zhang X, Lv Y, et al. Localizable and photoactivatable fluorophore for spatiotemporal two-photon bioimaging[J]. Anal Chem, 2015, 87(11): 5626-31.
- [17] Zhou L, Zhang X, Wang Q, et al. Molecular engineering of a TBET-based two-photon fluorescent probe for ratiometric imaging of living cells and tissues[J]. J Am Chem Soc, 2014, 136(28): 9838-41.
- [18] Zhou L, Hu S, Wang H, et al. A novel ratiometric two-photon fluorescent probe for imaging of Pd²⁺ ions in living cells and tissues[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2016, 166: 25-30.
- [19] 林川凯. 铈(III)配合物荧光探针的合成及其检测应用[D]. 江西: 江西理工大学, 2023.
- [20] 徐沙. 金属铈(III)配合物荧光探针的合成及对次氯酸、谷胱甘肽的检测应用[D]. 江西: 江西科技师范大学, 2023.
- [21] Berrones Reyes J, Kuimova M K, Vilar R. Metal complexes as optical probes for DNA sensing and imaging[J]. Curr Opin Chem Biol, 2021, 61: 179-190.
- [22] Li G, Wu C, Ma D-L, Leung C-H. Drug screening strategies using metal-based luminescent probes[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2021, 139: 116270.
- [23] Liu Z, He W, Guo Z. Metal coordination in photoluminescent sensing[J]. Chem Soc Rev, 2013, 42(4): 1568-600.

- [24] 李学宇, 缪煜清, 李钰皓. 铈配合物在生物成像和癌症治疗中的研究进展[J]. 有色金属材料与工程, 2023, 44(04): 77-84.
- [25] Wan Q, Wang K, He C, et al. Stimulus responsive cross-linked AIE-active polymeric nanoprobe: fabrication and biological imaging application[J]. Polymer Chemistry, 2015, 6(47): 8214-8221.
- [26] Nie K, Xu S, Duan X, et al. Diketopyrrolopyrrole-doped hybrid FONs as two-photon absorbing and dual-emission fluorescent nanosensors for Hg^{2+} [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2018, 265: 1-9.
- [27] 黄池宝, 樊江莉, 彭孝军, 孙世国. 双光子荧光探针研究及其应用[J]. 化学进展, 2007(11): 1806-1812.
- [28] 李俊彬. 近红外激发/生物发光分子探针的设计、合成与应用研究[D]. 湖南: 湖南大学, 2019.
- [29] 周礼义. 新型双光子荧光探针的设计、合成及生物成像应用研究[D]. 湖南: 湖南大学, 2015.
- [30] 郑越. 双波长活细胞荧光探针和光响应可逆固体传感材料的研究[D]. 北京: 清华大学, 2021.
- [31] 彭晓. 比率型荧光探针的设计及其在生物小分子中的检测应用[D]. 浙江: 浙江工业大学, 2018.
- [32] 任俊宇. 基于单染料的比率型荧光探针的设计合成及其应用研究[D]. 湖南: 湘潭大学, 2020.
- [33] Shen H, Sun F, Zhu X, et al. Rational Design of NIR-II AIEgens with Ultrahigh Quantum Yields for Photo- and Chemiluminescence Imaging[J]. J Am Chem Soc, 2022, 144(33): 15391-15402.
- [34] Dong R, Zhou Y, Zhu X. Supramolecular Dendritic Polymers: From Synthesis to Applications[J]. Accounts Of Chemical Research, 2014, 47(7): 2006-2016.
- [35] Sapala A R, Dhawan S, Haridas V. Vesicles: self-assembly beyond biological lipids[J]. RSC Advances, 2017, 7(43): 26608-26624.
- [36] 张希, 王力彦, 徐江飞, 等. 聚合物超分子体系: 设计、组装与功能[J]. 高分子学报, 2019, 50: 973-987.

- [37] 高振华, 马腾飞, 杜兆强, 孙瑾. 超分子自组装及其在聚合物合成领域中的应用[J]. 应用化工, 2012, 41: 1060-1063.
- [38] Wang A, Shi W, Huang J, Yan Y. Adaptive soft molecular self-assemblies[J]. *Soft Matter*, 2016, 12(2): 337-57.
- [39] Dai Y, Zhao X, Ji H, et al. Multifunctional aggregation-induced emission nanoparticle for high-fidelity imaging of lipid droplets in living cells and its application in photodynamic therapy[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2021, 410: 128186.
- [40] Wu M-Y, Wu Z-J, Zou Q, et al. From plasma membrane to mitochondria: Time-dependent photodynamic antibacterial and anticancer therapy with a near-infrared AIE-active photosensitizer[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2023, 454: 140189.
- [41] Song H, Zhou Y, Xu C, et al. A dual-function fluorescent probe: Sensitive detection of water content in commercial products and rapid detection of hypochlorite with a large Stokes shift[J]. *Dyes and Pigments*, 2019, 162: 160-167.
- [42] Jiao X, Li Y, Niu J, et al. Small-Molecule Fluorescent Probes for Imaging and Detection of Reactive Oxygen, Nitrogen, and Sulfur Species in Biological Systems[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(1): 533-555.
- [43] Xie Y, Yan L, Tang Y, et al. A Smart Fluorescent Probe Based on Salicylaldehyde Schiff's Base with AIE and ESIPT Characteristics for the Detections of N_2H_4 and ClO^- [J]. *J Fluoresc*, 2019, 29(2): 399-406.
- [44] Liang W, Nie G, Che J, et al. A ratiometric hypochlorite-specific nanoprobe constructed by rationally designed AIE luminogen for fluorescence imaging of alcoholic liver disease[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2023, 384: 133648.
- [45] Zhou L, Ding H, Zhao W, Hu S. A mitochondria targetable two-photon excited near-infrared fluorescent probe for imaging of H_2O_2 in live cells and tissues[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2019, 206: 529-534.
- [46] Zhang Z, Zhao W, Chen Y, et al. An AIE-active fluorescent probe with near-

- infrared (NIR) emission for selectively monitoring and bioimaging Cys in living cells[J]. *Tetrahedron*, 2023, 140: 133492.
- [47] Correia J H, Rodrigues J A, Pimenta S, et al. Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions[J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(9): 1332.
- [48] Chen L, Huang J, Li X, et al. Progress of Nanomaterials in Photodynamic Therapy Against Tumor[J]. *Frontiers In Bioengineering And Biotechnology*, 2022, 10: 920162.
- [49] Yan Y, Liang P, Zou Y, et al. Structure and Properties Regulation of Organic Photosensitizers and Application in Photodiagnosis and Treatment[J]. *Acta Chimica Sinica*, 2023, 81(11): 1642-1662.
- [50] Shah S S, Singh A K, Banerjee S, et al. Dihydropyrrolo[3,2-b]pyrrole-3,6-dicarbaldehyde-Based Two-Photon-Responsive Nanoparticles for Effective Photodynamic Therapy[J]. *ACS Applied Nano Materials*, 2022, 5(7): 9594-9603.
- [51] Kim M M, Parolia A, Dunphy M P, Venneti S. Non-invasive metabolic imaging of brain tumours in the era of precision medicine[J]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2016, 13(12): 725-739.
- [52] Kircher M F, De La Zerda A, Jokerst J V, et al. A brain tumor molecular imaging strategy using a new triple-modality MRI-photoacoustic-Raman nanoparticle[J]. *Nature Medicine*, 2012, 18(5): 829-834.
- [53] Li C, Cao L, Zhang Y, et al. Preoperative Detection and Intraoperative Visualization of Brain Tumors for More Precise Surgery: A New Dual-Modality MRI and NIR Nanoprobe[J]. *Small*, 2015, 11(35): 4517-4525.
- [54] Zhang R R, Schroeder A B, Grudzinski J J, et al. Beyond the margins: real-time detection of cancer using targeted fluorophores[J]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2017, 14(6): 347-364.
- [55] Ma Y, Wang Y, Hui X, et al. Dual-molecular targeted NIR II probe with enhanced response for head and neck squamous cell carcinoma imaging[J]. *Nanotechnology*, 2022, 33(22): 225101.
- [56] Zhuang W, Ma B, Hu J, et al. Two-photon AIE luminogen labeled

- multifunctional polymeric micelles for theranostics[J]. *Theranostics*, 2019, 9(22): 6618-6630.
- [57] Jiang Y, Hadjichristidis N. Diels-Alder Polymer Networks with Temperature-Reversible Cross-Linking-Induced Emission[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2021, 60(1): 331-337.
- [58] Liu A, Song H, Jia P, et al. Supramolecular Assembly and Reversible Transition and of Chitosan Fluorescent Micelles by Noncovalent Modulation[J]. *Advances in Polymer Technology*, 2021, 2021: 1-10.
- [59] 陈汝星. 有机小分子荧光探针及近红外荧光染料的合成[D]. 山东: 青岛科技大学, 2022.
- [60] Wang L, Huang M, Tang H, et al. Fabrication and Application of Dual-Modality Polymer Nanoparticles Based on an Aggregation-Induced Emission-Active Fluorescent Molecule and Magnetic Fe₃O₄. *Polymers*, 2019: 220.
- [61] Guo Q, Zhang X. Synthesized of glucose-responsive nanogels labeled with fluorescence molecule based on phenylboronic acid by RAFT polymerization[J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2019, 30(10): 815-831.
- [62] 伏金平. 肿瘤微环境敏感的纳米显像治疗剂的构建及性能研究[D]. 甘肃: 西北师范大学, 2021.
- [63] Wang Y, Yang Y, Guo J, et al. Tumor identification via in vivo portable Raman detection of sialic acid with a dual gold nanoprobe system[J]. *Chem Sci*, 2023, 14(4): 923-927.
- [64] 何文涛. 苯硼酸功能化的多重响应型纳米诊疗剂的制备及性能研究[D]. 甘肃: 西北师范大学, 2019.
- [65] Yang Y, Jin Y J, Jia X, et al. Supramolecular Hyaluronic Assembly with Aggregation-Induced Emission Mediated in Two Stages for Targeting Cell Imaging[J]. *ACS Med Chem Lett*, 2020, 11(4): 451-456.
- [66] Yan J, Shan C, Zhang Z, et al. Autophagy-induced intracellular signaling fractional nano-drug system for synergistic anti-tumor therapy[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2023, 645: 986-996.
- [67] Chaudhuri A, Ramesh K, Kumar D N, et al. Polymeric micelles: A novel drug

- p>delivery system for the treatment of breast cancer[J].
- Journal of Drug Delivery Science and Technology*
- , 2022, 77: 103886.
- [68] Ciftci H, Tamer U. Electrochemical determination of iodide by poly(3-aminophenylboronic acid) film electrode at moderately low pH ranges[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2011, 687(2): 137-140.
- [69] Wu X, Ru Y, Bai Y, et al. PBA composites and their derivatives in energy and environmental applications[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2022, 451: 214260.
- [70] Chen W, Zhen X, Wu W, Jiang X. Responsive boron biomaterials and their biomedical applications[J]. *Science China-Chemistry*, 2020, 63(5): 648-664.
- [71] Jiang S, Xia L. Bioinspired High-Performance Bilayer, pH-Responsive Hydrogel with Superior Adhesive Property. *Polymers*, 2022: 4425.
- [72] Wang Y, Fan Y, Zhang M, et al. Glycopolypeptide Nanocarriers Based on Dynamic Covalent Bonds for Glucose Dual-Responsiveness and Self-Regulated Release of Insulin in Diabetic Rats[J]. *Biomacromolecules*, 2020, 21(4): 1507-1515.
- [73] Zeng Y, Zhu C, Tao L. Stimuli-Responsive Multifunctional Phenylboronic Acid Polymers Via Multicomponent Reactions: From Synthesis to Application[J]. *Macromolecular Rapid Communications*, 2021, 42(18): 2100022.
- [74] Liu B, Song Q, Wang Z, et al. Multi stimuli-responsive HPC-PAA/Eu(AA)₃Phen complex nanogels and their decoration with 3-APBA for detecting glucose[J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2020, 138(19): 50368.
- [75] Hu Q, Hu S, Li S, et al. Boronate Affinity-Based Electrochemical Aptasensor for Point-of- Care Glycoprotein Detection[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(28): 10206-10212.
- [76] Miki R. Structural Transitions of Micellar Systems in Response to Diol Compounds Accompanied by Changes in Viscoelastic Properties to Yield Novel Functional Materials[J]. *Yakugaku Zasshi-Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 2023, 143(7): 559-563.
- [77] Manesh K M, Santhosh P, Gopalan A, Lee K-P. Electrospun poly(vinylidene

- fluoride)/poly(aminophenylboronic acid) composite nanofibrous membrane as a novel glucose sensor[J]. *Analytical biochemistry*, 2007, 360(2): 189-95.
- [78] Zhou S, Min X, Dou H, et al. Facile fabrication of dextran-based fluorescent nanogels as potential glucose sensors[J]. *Chem Commun (Camb)*, 2013, 49(82): 9473-5.
- [79] Ha H-J, Kang D W, Kim H-M, et al. Discovery of an Orally Bioavailable Benzofuran Analogue That Serves as a beta-Amyloid Aggregation Inhibitor for the Potential Treatment of Alzheimer's Disease[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, 61(1): 396-402.
- [80] Sheng Z, Guo B, Hu D, et al. Bright Aggregation-Induced-Emission Dots for Targeted Synergetic NIR-II Fluorescence and NIR-I Photoacoustic Imaging of Orthotopic Brain Tumors[J]. *Adv Mater*, 2018: e1800766.
- [81] Guan X, Wang L, Liu M, et al. A versatile synthetic approach to tunable dual-emissive Pdots with very small-size based on amphiphilic block copolymers for cell imaging[J]. *Materials Chemistry Frontiers*, 2021, 5(1): 355-367.
- [82] Xu Z, Liu G, Liu P, et al. Hyaluronic acid-based glucose-responsive antioxidant hydrogel platform for enhanced diabetic wound repair[J]. *Acta Biomaterialia*, 2022, 147: 147-157.
- [83] Guo Q, Wu Z, Zhang X, et al. Phenylboronate-diol crosslinked glycopolymeric nanocarriers for insulin delivery at physiological pH[J]. *Soft Matter*, 2014, 10(6): 911-20.
- [84] Lv Z, Man Z, Cui H, et al. Red AIE Luminogens with Tunable Organelle Specific Anchoring for Live Cell Dynamic Super Resolution Imaging[J]. *Advanced Functional Materials*, 2020, 31(10): 2009329.
- [85] Wu K, Ma C, Wang Y. Functional Nucleic Acid Probes Based on Two-Photon for Biosensing[J]. *Biosensors-Basel*, 2023, 13(9): 836.
- [86] Liu R, Hu C, Yang Y, et al. Theranostic nanoparticles with tumor-specific enzyme-triggered size reduction and drug release to perform photothermal therapy for breast cancer treatment[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2019, 9(2): 410-420.
- [87] Yang H Y, Fu Y, Li Y, et al. Polymer ligand-assisted fabrication of

- multifunctional and redox-responsive self-assembled magnetic nanoclusters for bimodal imaging and cancer treatment[J]. *J Mater Chem B*, 2018, 6(35): 5562-5569.
- [88] 贾志立, 蒲成, 任玲玲. 荧光量子效率绝对测量方法研究[J]. *计量科学与技术*, 2022, 66(09): 17-22+32.
- [89] Shahinyan G A, Amirbekyan A Y, Markarian S A. Photophysical properties of methylene blue in water and in aqueous solutions of dimethylsulfoxide[J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2019, 217: 170-175.
- [90] Musafargani S, Ghosh K K, Mishra S, et al. PET/MRI: a frontier in era of complementary hybrid imaging[J]. *European journal of hybrid imaging*, 2018, 2(1): 12-12.
- [91] Cheon J, Lee J-H. Synergistically integrated nanoparticles as multimodal probes for nanobiotechnology[J]. *Accounts of chemical research*, 2008, 41(12): 1630-40.
- [92] Donato C, Kunz L, Castro-Giner F, et al. Hypoxia Triggers the Intravasation of Clustered Circulating Tumor Cells[J]. *Cell Rep*, 2020, 32(10): 108105.
- [93] 李成, 周森森, 蒋锡群. 乏氧光学影像探针的设计与应用[J]. *高等学校化学学报*, 2022, 43(12): 116-127.
- [94] Amruta A, Iannotta D, Cheetham S W, et al. Vasculature organotropism in drug delivery[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2023, 201: 115054.
- [95] Chen M, Wang M, Niu W, et al. Multifunctional Protein-Decorated Bioactive Glass Nanoparticles for Tumor-Specific Therapy and Bioimaging In Vitro and In Vivo[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, 13(13): 14985-14994.
- [96] Jamshidi Z, Dehghan R, Nejabat M, et al. Dual-targeting CD44 and mucin by hyaluronic acid and 5TR1 aptamer for epirubicin delivery into cancer cells: Synthesis, characterization, in vitro and in vivo evaluation[J]. *Heliyon*, 2024, 10(2): e24833.
- [97] Yang C, Li C, Zhang P, et al. Redox Responsive Hyaluronic Acid Nanogels for Treating RHAMM (CD168) Over-expressive Cancer, both Primary and Metastatic Tumors[J]. *Theranostics*, 2017, 7(6): 1719-1734.

附录 攻读硕士期间发表论文情况

1. **Liu C**, Liao S, Zhong S, et al. Fabrication of Dual-Functional Micelles Based on Star-Shaped Copolymer for Bioimaging[J]. Polym. Sci. Ser. A 65, 692–701 (2023).
2. **刘超凡**、廖盛龙、仲舒颖, 等. 响应性透明质酸胶束的合成与性质[J].中国塑料, 2024.(已接收)
3. Song H, **Liu C**, Gui D, et al. Sustainable and mechanically robust epoxy resins derived from chitosan and tung oil with proton conductivity[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2023, 140(20): e53857.
4. 宋红, **刘超凡**, 廖盛龙, 等.可再生桐油基热固性树脂的合成及性能[J].塑料工业, 2023, 51(4): 25-31.

致谢

文末搁笔，思绪万千，写到“致谢”环节，也意味着我的学生生涯即将结束，从此不再拥有学生身份。研究生三载时光，转瞬即逝，再回首，无数回忆涌上心头，我始终记得认真准备复试的日子，也清晰地记得查询到录取结果的喜悦，更清晰地记得与同窗们共同学习的乐趣，这都是人生中最珍贵的和不可替代的重要时刻。虽有万般不舍，既已到此，就借此文聊表谢忱。

风月一庭为良友，读书半榻是严师。由衷感谢我的导师林英教授在这三年时光里给予我的指导和帮助，从开题到论文的最终完成，中间有过不少的错误，给我悉心指导，帮助我攻克难关，老师的谆谆教诲让我受益匪浅。同时，感谢我的校外导师郑伟利老师在我实践期间对我的指导，让我获取许多工作经验，更加确定未来职业生涯的方向。我心里很感激，得遇良师，何其有幸。

时光易逝，终有别时。感谢课题组的宋红、刘安、仲舒颖、廖盛龙、宋琪、刘智博琦、朱严谨等师兄姐妹们在我实验期间的支持和帮助。还要感谢专业同学对我的帮助，同窗三载，相聚甚少，但也弥足珍贵，一起并肩作战的日子始终铭记，感谢大家互相之间的帮助和鼓励，我们来自不同的地方，我们也将去往不同的地方，愿我们始终保持热爱，前程似锦，顶峰再见，山水一程，三生有幸。

春晖寸草，山高海深。感谢我的父母和家人们对我学业上一如既往的支持，是父母和家人始终给我经济和精神上的支持，为我遮风挡雨，帮我排忧解难，给我勇往直前的力量，让我无后顾之忧，我才得以顺利地完成学业。无以为报，唯有万般努力才能成为你们的骄傲。

鲜衣怒马少年时，不负韶华行且知。感谢一直在追梦的自己，感谢一直在努力成长的自己，感谢不甘平庸的自己。我生来平淡，但感慨宇宙山河皆是浪漫，我深知自己所学所阅不广，但道阻且长，行则将至，我将满怀热爱，奔赴山海，文有所长，而感激之意无尽矣。

山水相逢，终有一别。愿我们前路漫漫亦灿烂！

刘超凡

2024年4月