

光响应纳米基因载体的研究进展

李炯, 刘小龙, 吴名

福建医科大学孟超肝胆医院, 福建 福州 350025

摘要 光响应纳米基因载体可借外界光源实现基因的定时、定点释放, 已逐渐成为非病毒基因载体研究的热点。根据响应光波长的不同, 可将光响应纳米基因载体分为紫外/可见光响应的纳米基因载体和近红外光响应的纳米基因载体。综述了这两类载体材料当前的研究进展, 阐述了其响应机理和释放过程, 并总结了光响应纳米基因载体在构建过程中亟待解决的问题。

关键词 医用光学; 光响应纳米基因载体; 基因控制释放; 紫外-可见光; 近红外光

中图分类号 R454.2

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201845.0307004

Research Progress of Photo-Responsive Nano-Carrier for Gene

Li Jiong, Liu Xiaolong, Wu Ming

Mengchao Hepatobiliary Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350025, China

Abstract Photo-responsive nano-carriers for gene can realize the release of gene at a given time and a given position by external light, and have attracted much interest as non-viral gene carriers. According to different response wavelengths, photo-responsive nano-carriers for gene can be divided into ultraviolet-visible light responsive nano-carrier for gene and near infrared light responsive nano-carrier for gene. We review the recent advances of the two nano-carriers for gene and discuss the responsive mechanisms and release processes. At last, we summarize the problems to be solved in the construction progress of photo-responsive nano-carriers for gene.

Key words medical optics; photo-responsive nano-carrier for gene; controlled release of gene; ultraviolet-visible light; near infrared light

OCIS codes 170.4580; 140.3450; 160.4236; 160.5335

1 引言

基因治疗是一种通过将目的基因导入靶细胞来促进或纠正靶细胞某种特定功能、以达到治疗效果的技术手段, 它在包括肿瘤在内的重大疾病诊疗过程中极具发展潜力, 有广阔的应用前景^[1]。传统的病毒转染载体存在免疫原性和靶细胞致突变性等安全问题^[2-4], 非病毒载体作为病毒载体的重要补充, 尽管转染效率不高, 但由于其具有低毒性、低免疫原性、易于制备等优点, 目前也成为基因治疗领域的一个研究热点。常用的基因载体包括脂质体、嵌段共

聚物纳米胶束、介孔硅纳米材料、碳纳米材料、金纳米以及磁性纳米粒子等^[5-6]。这些纳米载体具有高的基因负载率, 适用于多种基因, 并且稳定性高、重塑性好。此外, 根据细胞内外不同的刺激信号, 在载体结构中引入特定的刺激响应性基因, 可实现目的基因的控制释放, 提高转染效率^[2,7-8]。常见的刺激信号主要包括细胞内源性的 pH、活性氧、谷胱甘肽、酶以及外源性的温度、光、超声、电场以及磁场等^[9-15], 其中光作为一种洁净、高效、无创的刺激源, 具有较高的时空分辨率和较好的可控性, 能够实现

对纳米载体的远程精确操控, 最大限度地减小对机

收稿日期: 2017-09-13; **收到修改稿日期:** 2017-10-30

基金项目: 国家自然科学基金(81671813, 81601538)、福建省科技创新联合资金(2016Y9061, 2016Y9062)、福建省卫生教育联合攻关计划(WKJ2016-2-15)

作者简介: 李炯(1994—), 男, 硕士研究生, 主要从事药物递送载体方面的研究。E-mail: ljiong726101@163.com

导师简介: 吴名(1985—), 男, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事基因/药物递送载体、多模式分子影像探针和肿瘤光学治疗等方面的研究。E-mail: wmmj0419@163.com(通信联系人)

体正常组织和细胞的损伤,因此光控释放体系引起了研究人员的广泛关注^[7,16]。依据响应光源的不同,光响应体系可分为紫外(UV)/可见光响应的纳米基因载体和近红外(NIR)光响应的纳米基因载体两大类。本文将分别对这两类响应体系予以介绍,主要包括常用光敏基团的响应机理、光控基因载体类型及其在基因递送中的研究进展,同时指出有光控基因递送系统存在的问题,并对未来的研究方向进行了展望。

2 UV/可见光响应的基因释放

自从光敏感嵌段共聚物纳米胶束在 UV 和可见光刺激下的可逆拆装被报道以来,众多光控释药体系随之被报道^[8,17-20]。该体系的核心是一类可发生光化学反应的光敏基团,这类光敏基团可在特定波长的 UV/可见光照射下发生光致异构化或光诱导的氧化还原反应,造成自身分子结构或构型的改变,或因为异构化作用打破纳米载体的极性平衡,或因为键位的断裂造成纳米载体结构的改变,最终达到刺激药物释放的目的。光敏基团根据光化学反应机制的不同分为两大类:1)光致光敏基团的异构化;2)光致光敏基团的断键解离。

2.1 光致光敏基团的异构化

光致异构化是指在外界光源的激发下,光敏基团发生不同结构互相转变的现象。光敏基团的异构化是光响应体系最常用的策略之一,目前已经有多种光致异构化分子应用于光响应纳米载体体系,如偶氮苯(AZO)^[19,21-24]、螺吡喃(SP)^[25-27]、二芳基乙烯^[28-29]、二苯乙烯^[30]、邻叠氮萘醌(DNQ)及其衍生物^[31-32]。这些光敏基团在 UV 和可见光激发下,可发生分子异构化作用,改变分子极性。例如:AZO 和二苯乙烯在紫外光照射下可由反式转变为顺式构象,SP 经紫外光照射可异构化生成花菁,二芳基乙烯则发生开环、闭环的互变异构,这些光敏基团在 UV 刺激下发生异构化作用后,可以通过可见光照射恢复其原本的分子构型,因此这种异构化作用是可逆的。与此不同, DNQ 是通过分子重排改变构型,该过程是不可逆的^[8,33]。上述光敏基团常被用来构建具有光响应性的聚合物胶束、水凝胶及其他无机纳米颗粒等基因载体。

2.1.1 聚合物纳米基因载体

聚合物纳米基因载体是一种被广泛研究的非病毒基因载体,这种纳米基因载体的合成大多需要两

亲性分子或嵌段共聚物的参与。一方面,纳米基因载体可以在水溶液中通过自组装形成纳米胶束;另一方面,胶束上的阳离子可通过静电吸附作用络合 DNA 或者 siRNA,实现基因的负载^[34-35]。这类纳米基因载体具有良好的结构稳定性和生物相容性,可避免基因过早释放和降解,更为重要的是其可以根据实际需要来控制聚合物分子的种类和链长,同时也可以进行靶向或响应性修饰等,提高其靶向和控释能力^[36]。

如图 1 所示,Liu 等^[21]用偶氮苯甲基溴化铵作为阳离子表面活性剂,用传统的十二烷基苯磺酸钠或十二烷基硫酸钠作为阴离子表面活性剂。利用阴、阳离子表面活性剂亲水头基的静电作用和两条烷基链的疏水作用,在水溶液中自发组装形成具有热力学稳定性的阴阳离子液胞,此时 AZO 处于疏水性更强的反式平面结构,液胞处于相对稳定的状态。但在 UV 光照射下,AZO 由反式转变为顺式,分子极性增加,阴阳离子原有的极性平衡被打破,致使液胞破裂而释放出负载的基因。

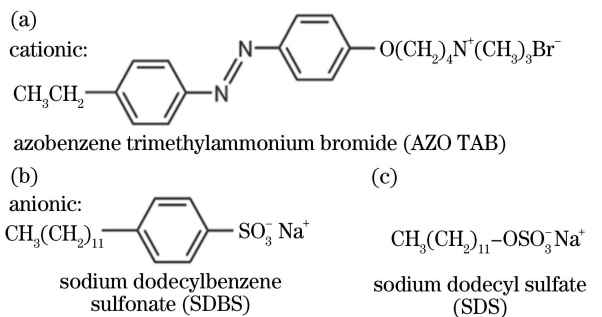


图 1 用于形成阴阳离子液胞的表面活性剂。

(a) AZO TAB; (b) SDBS; (c) SDS^[21]

Fig. 1 Surfactants used to form catanionic vesicles.

(a) AZO TAB; (b) SDBS; (c) SDS^[21]

Nagasaki 等^[24]合成含有 AZO 的聚 L-赖氨酸树状高分子(H-Lys-G2),以此来组装成纳米胶束,并将其作为光控释放的纳米基因载体(图 2)。这种纳米基因载体可利用外层赖氨酸的氨基来吸附 DNA 分子,但在 UV 光激发下,AZO 的异构化作用会造成载体极性的增加,结构发生变化,降低了载体表面的阳离子密度,进而有效地释放出负载 DNA。

上述两种光控释放手段均是由基于 AZO 的典型异构化作用所造成的胶束极性平衡的迁移,最终达到基因光控释放的目的。除此之外,利用其他光敏基团(如 SP、二芳基乙烯以及 DNQ 等)的光致异构化作用设计的聚合物纳米基因载体也能实现基因的光控释放^[28,32,37]。

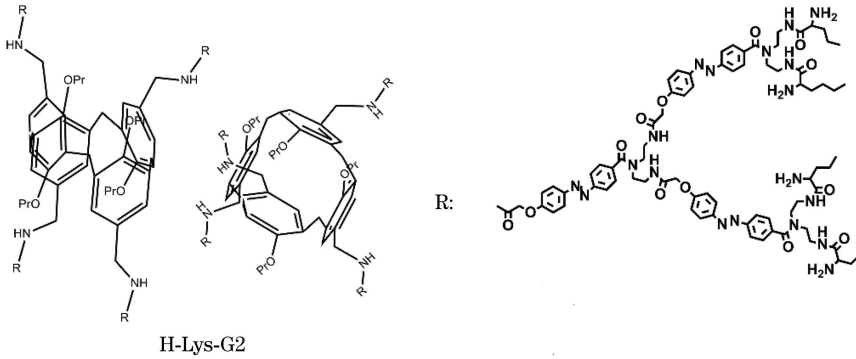


图 2 聚偶氮苯树状高分子的分子结构^[24]

Fig. 2 Structure of poly azobenzene dendrimers^[24]

2.1.2 水凝胶纳米基因载体

水凝胶是能够吸收大量水或者生物液体的具有三维构型的网状聚合物,近年来,纳米尺度的水凝胶在制药和生物医学领域取得了巨大的进步,同时关于水凝胶基因载体的研究也有所报道^[38]。

Wang 等^[26]利用丙烯酰胺(AAm),2-乙烯基-4,6-二氨基-1,3,4-三嗪(VDT)以及含有 SP 单体的聚(乙二醇)丙烯酸酯(SPAA)作为单体,通过自由基聚合交联形成具有光响应特性的水凝胶。如图 3 所示,在凝胶体系中,AAm 分子间以及 VDT 分子间可形成氢键,以维持凝胶的强度,另外,VDT 还可以通过静电作用负载基因。在 UV 光(365 nm)的照射下,SP 发生光致异构化作用,分子极性增加,水凝胶结构改变,以此来促进负载基因的快速释放和有效转染。

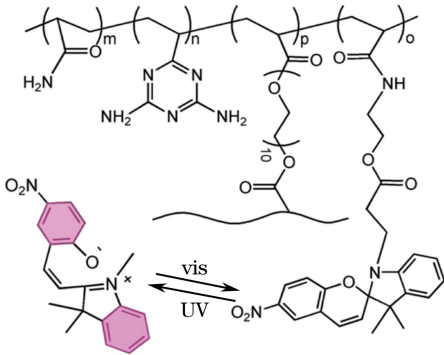


图 3 P(AAm-co-VDT-co-SPAA)水凝胶的分子结构^[26]

Fig. 3 Molecular structure of P(AAm-co-VDT-co-SPAA) hydrogels^[26]

2.1.3 无机纳米基因载体

除上述两类纳米基因载体外,基于无机纳米材料的非共价键超分子组装体系也是一种常用的策略。如图 4 所示,Zheng 等^[23]合成了一种光响应控释的超分子组装体系,利用巯基化的 β -环糊精(β CD)修饰金纳米粒子(AuNP),与含有 AZO 标签

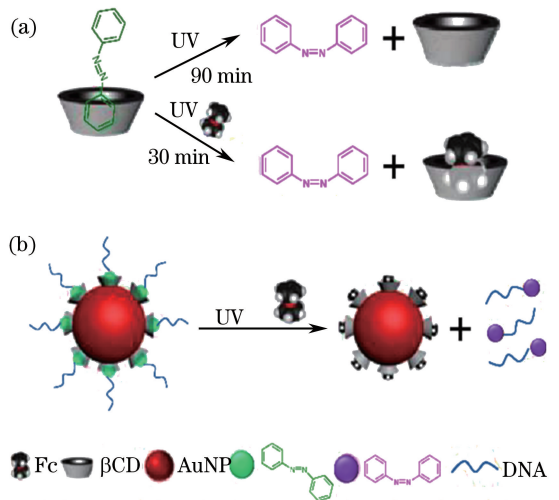


图 4 (a) UV 单独作用以及 UV 和 Fc 共同作用下 β CD 释放 DNA; (b) UV 和 Fc 协同调控 β CD 和 AuNP 的组合分子释放 DNA^[23]
Fig. 4 (a) Disassembly of β CD/AZO complex irradiated by UV light and Fc competitive unsealing; (b) corresponding target DNA released from β CD/AZO upon UV light and Fc addition^[23]

的核酸分子进行超分子自组装。在可见光照射下,组装体系可稳定存在,一旦经 UV 光照射后,反式 AZO 异构转变为顺式 AZO,由于顺式 AZO 与 β CD 的包合常数要远低于反式构型,AZO 会从 β CD 的空腔中解离出来,达到基因释放的目的。另外,在 UV 光照射的同时加入二茂铁(Fc),利用 Fc 与 β CD 的包合作用来竞争 AZO 与 β CD 原有的结合位点,以加快 AZO 的脱离。这一双重作用加速基因释放的策略,不但使基因可以得到有效地释放,而且与单纯使用 UV 响应释放相比,同样的释放效果下,该策略在一定程度上减少了 UV 光强度,因此可以大大降低 UV 光对细胞和组织造成的物理性损伤,提高其应用潜力。

2.2 光致光敏基团的断键解离

光敏基团的光刺激断键也是光化学反应的一种重要形式。以该类光敏基团为基础设计合成的纳米载体，在 UV/可见光刺激下，光敏键位断裂，造成载体失稳破裂，快速释放负载分子。此外，在响应释放负载之后，材料的断键解离会使其降解为易被机体清除的小分子或者低聚物，避免了材料在体内长期滞留所造成的机体损害^[7]。这类常用的光敏基团主要包括苜蓿及其衍生物^[39]、邻硝基苜蓿^[40]和香豆素^[41]等。聚合物纳米胶束、水凝胶及无机纳米颗粒等经过精确设计，也可以通过光致解离的形式实现基因的控制输送。

如图 5 所示，Deng 等^[42]用 1,3-二甲基-2-硝基苯和多种含有氨基的小分子单体(4-氨基-1-丁醇、6-氨基-1-己醇、N,N-二苄基乙二胺等)进行聚合反应，将邻硝基苜蓿嵌入到聚β-氨基酯的主架结构中，制备出一种具有光响应特性的阳离子基因载体材料，材料在水溶液中自组装形成纳米胶束，阳离子亲水外层可吸附基因。在外界 UV/可见光条件下，聚合物主链结构中的邻硝基苜蓿发生光反应断键，胶束由高聚物变为低聚物，直至成为小分子单体，高效释放基因。图中 THF 代表四氢呋喃，TEA 代表三乙胺，DCM 代表二氯甲烷，NPBMEDA 代表(2-硝基-1,3-亚苯基)双(亚甲基)二丙烯酸酯。

如图 6 所示，Fischer 等^[43]以超支化聚缩水甘油醚为核心，通过邻硝基苜蓿共价连接双(3-氨基丙基)甲胺(AMPA)或五乙烯六胺(PEHA)衍生物，并将其作为壳层，利用壳层上的氨基正电荷吸附 DNA 分子，完成纳米载体的组装。在 UV 光(350 nm)激发下，邻硝基苜蓿光反应断键，纳米载体解体触发基因释放，提高了基因的转染效率。同时由于键位断裂，聚合物降解成为易代谢的小分子，减少了大分子聚合物的生物毒性。

相同机制下，Yin 等^[44]利用断键后分子极性的改变来实现基因的控释。以含有光敏基团的 4,5-二甲氧基-2-硝基苜蓿-L-谷氨酸-N-羧酸酐

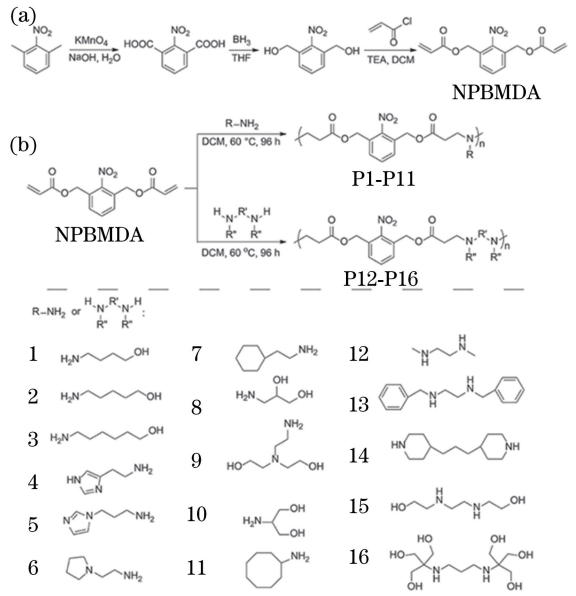


图 5 (a) (2-硝基-1,3-亚苯基)双(亚甲基)二丙烯酸酯的合成; (b) 具有光响应特性的 PBAEs (P1-P16) 以及各种带侧基基团的分子结构^[42]

Fig. 5 (a) Synthesis of (2-nitro-1,3-phenylene) bis (methylene) diacrylate; (b) library of photo-responsive PBAEs (P1-P16) and various side charged groups^[42]

(DMNBLG) 和对乙 烯苜蓿-L-谷氨酸-羧酸酐 (VBLG) 作为单体，自由基聚合生成 PDMNBLG-r-PABLG，经氨化形成聚合物阳离子基因载体 PDMNBLG-r-PVBLG-8 (图 7)。在 UV/可见光的刺激下，纳米胶束复合体疏水端的 4,5-二甲氧基-2-硝基苜蓿 (DMNB) 发生断键解离，生成羧基，使得胶束极性增加并失稳破裂，从而促进了基因的释放，如图 7 所示。羧基解离后所带的负电荷既可以与复合体外围的正电荷发生静电相互作用，中和阳离子以利于释放基因，又降低了胶束的阳离子密度，减小细胞毒性。

上述介绍的 UV/可见光响应的纳米基因载体，不论是光致异构化还是光致断键，均是光控释放的常规手段。相较而言，基于光致断键原理设计的纳

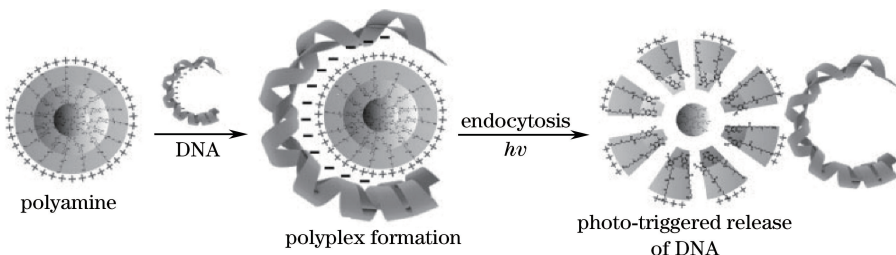


图 6 DNA 的吸附和释放过程^[43]

Fig. 6 Adsorption and release process of DNA^[43]

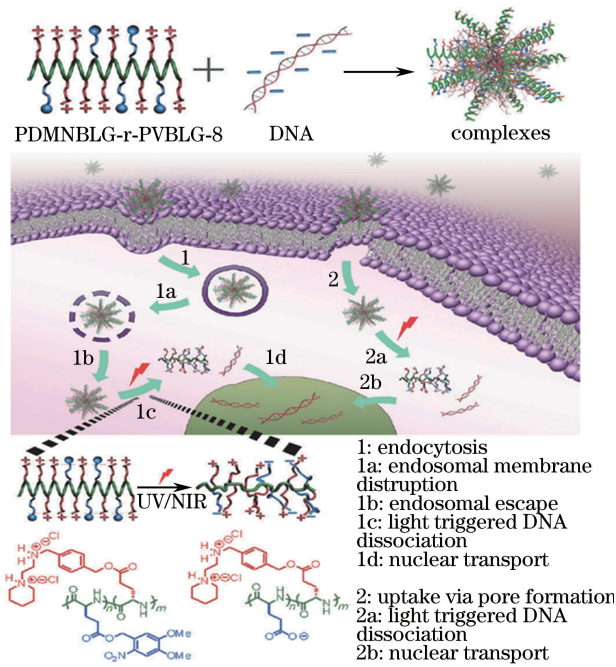


图 7 PDMNBLG-r-PVBLG-8/DNA 复合物的细胞内动力学^[44]
 Fig. 7 Intracellular kinetics of PDMNBLG-r-PVBLG-8/DNA complexes^[44]

米基因载体可在光源刺激下快速降解,便于被机体代谢清除,生物相容性和安全性也更高。此外,通过分子水平的设计,这类载体还可以在断键解离后生成带负电荷的官能团,中和吸附基因的阳离子,既有利于基因的释放,又降低了高密度阳离子的细胞毒性。因此,在光控基因递送应用中,基于光致断键机理设计的纳米载体比光致异构化载体更具潜质。

但是,UV/可见光响应的纳米载体体系在生物医学中仍存在着诸多亟待解决的难题。首先由于机体内水分子和血红蛋白等对UV/可见光波段的强烈散射和吸收,造成了其穿透深度只能停留在微米量级;其次,长时间、高强度的紫外照射,也会对机体中正常的组织和细胞产生毒副作用。与此相比,NIR光拥有更长的波长,可明显降低生物组织的吸收和散射,大大提高了组织穿透能力,而且NIR光对正常组织和细胞并没有明显的毒副作用,安全可靠。这些性质使得NIR光在光响应纳米载体体系的开发应用中更具优势,因此NIR光得到了越来越多的关注和重视,具有良好的临床应用前景^[7,45]。

3 NIR 光响应的基因释放

良好的穿透深度和较小的组织损伤是NIR光相较于UV光所固有的优势,正因如此,近年来基于NIR光响应的纳米控释系统成为一个研究热

点^[46]。基于NIR光响应的策略主要有两种:1)NIR光诱使纳米载体产热,利用高热间接触发基因的释放;2)NIR光直接触发纳米载体降解来实现基因的响应性释放^[47]。对于光热控释的纳米载体来说,在NIR光照射下,载体中的光热材料可高效地将光能转换为热能,实现局部高热。高热既可直接消融杀伤肿瘤细胞,又可用于控释手段,实现光热和基因的联合治疗^[48-49]。此外,利用具有双光子吸收的光敏基团,或反斯托克斯光学性质的上转换材料合成的纳米载体,可直接响应NIR光,实现目的基因的控制释放。上述策略均解决了UV/可见光响应纳米基因载体中所存在的UV光穿透深度低、对细胞损伤大等实际问题,加速了光响应纳米基因载体体系的临床应用进程,在重大疾病以及肿瘤的精准和可控化基因治疗过程中,拥有极大的潜力和广阔的应用前景^[31,50]。

3.1 光热引发的基因释放

光热治疗是利用光热材料在NIR波段的强烈吸收,并高效地将光能转化为热能,实现肿瘤细胞消融的治疗手段。光热治疗的重点在于光热材料,良好的光热材料不仅需具备一般纳米材料所必备的特性,如合适的尺寸、可控的表面修饰,以及无毒易降解等,还需具有强烈的近红外吸收以及高的光热转换效率^[45]。对于光热控释的纳米基因载体来说,光热材料可高效吸收特定波长的NIR光,并产生高热。高热使载体内能急剧增加,结构失稳直至破裂解体,最终释放负载基因,达到光热控释的目的^[45,49]。

在众多光热材料中,纳米金以其良好的表面可塑性和高的光热转化效率被广泛应用。例如,Chen等^[51]通过晶种生长法合成一种长宽比约为3.8(长和宽分别为42 nm和11 nm)的金纳米棒,以巯基修饰的增强绿色荧光蛋白(EGFP)作为报告基因,EGFP基因与金纳米棒通过Au-S连接,形成纳米缀合物(EGFP-GNR),如图8所示。在NIR光照射下,金纳米棒将吸收的光能转化为热能,造成局部高温,自由电子内能增加。在此过程中,部分金纳米棒的形态发生改变,变为金纳米球,同时造成Au-S键断裂,释放EGFP基因。这种纳米缀合物与Hela细胞的共孵育实验也证明了这种通过Au-S键形成的EGFP-GNR具有很好的远程可控性,并且具有较高的转染效率。

在此基础上,Wijaya等^[52]成功设计出可选择控释两种不同类型基因的金纳米棒载体体系(图9)。具有固定长宽比的金纳米棒在一定波长的脉冲

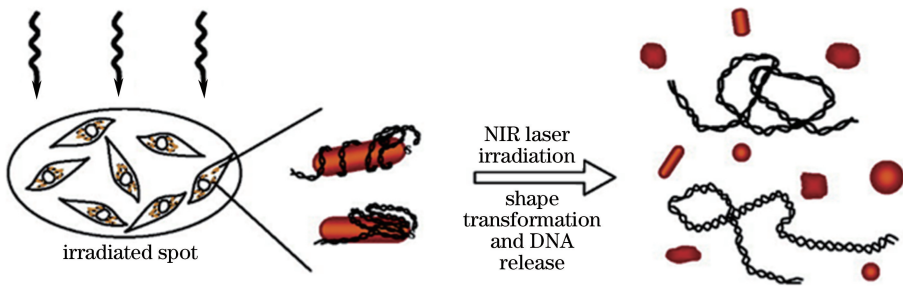


图 8 细胞中的 EGFP-GNR 缀合物在 NIR 激光下发生形态转化释放 EGFP 基因^[51]
 Fig. 8 Release of EGFP DNA caused by shape transformation of EGFP-GNR conjugates in cells irradiated by NIR laser^[51]

激光下,会发生纵向表面等离子体共振,金纳米棒升温熔化,自身形态改变并释放出缀合的小分子。他们合成两种不同长宽比的金纳米棒,通过巯基分别接入两种荧光标记的 DNA 分子(FAM-DNA 和 TMR-DNA),构建成一个复合的双基因载体系统。在 800 nm 脉冲激光的激发下,长宽比(44 nm/11 nm=4)较小的金纳米棒发生等离子体共振,升温熔化,并释放出 FAM-DNA,而长宽比(89 nm/17 nm=5.4)较大的金纳米棒因在该波长下不会发生纵向表面等离子体共振,负载的 DNA 分子不会释放。相反,用 1100 nm 的脉冲激光进行激发时,长宽比更大的金纳米棒会发生等离子体共振,造成 Au-S 键断裂,释放 TMR-DNA。利用该策略释放负载 DNA,释放效率可达到 50%~80%。更为重要的是,一种波长的光只释放一种类型的 DNA 分子,该方法可以远程、时序、有选择地控释不同类型的基因,在多级载药体系的发展以及复杂疾病的协同治疗方面具有潜在的应用价值。尽管如此,光热控释纳米载体同样存在缺陷,光响应过程中产生的高热虽然可以促进释放,但也会造成一些热敏感的药物或小分子不可逆转的失活或分解,在一定程度上限制其适用范围。

3.2 上转换纳米基因载体

上转换纳米颗粒(UCNs)通常是一类掺杂镧系元素且具有近红外吸收的纳米晶体^[53]。在一定 NIR 光的激发下,UCNs 可以吸收两个或多个长波长、低能量的光子,发射出 UV/可见光波段的光子^[45,54]。上转换纳米材料具有狭窄的发射带宽、长时间的发光寿命以及较好光学稳定性,被率先应用于生物成像领域,继而发展到纳米医学及其他领域^[55]。在光响应纳米治疗体系中,大多数光敏基团的光化学反应进程需要高能量短波长的 UV/可见光激发,受限于短波长的组织穿透深度极小,光响应

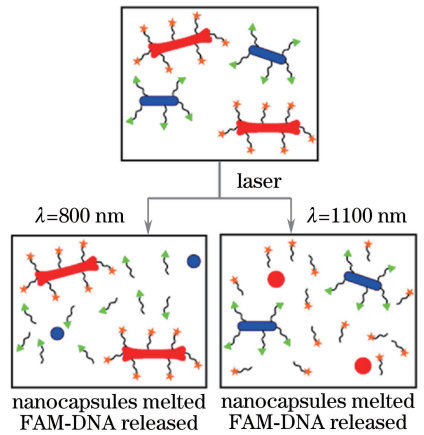


图 9 不同 NIR 激发下金纳米棒缀合 DNA 的选择性释放^[52]
 Fig. 9 Selective release of DNA-conjugated nanorods under different NIR irradiation^[52]

纳米载体很难在临床中得到应用,上转换纳米材料的非线性光学进程解决了该问题,加速了纳米载体体系的发展和应用进程。现如今,基于上转换纳米材料的载体体系有很多,其中用于基因输送的载体体系同样得到了广泛的研究。

Jayakumar 等^[56]将 UCNs 应用于基因输送,合成了一种可远程激活释放的上转换纳米基因载体。他们以 Yb^{3+}/Tm^{3+} 共掺杂的 UCNs $NaYF_4$ 为核心,外围依次包被非晶硅层和介孔硅层,再将光敏基团 4,5-二甲氧基-2-硝基苯乙酮(DMNPE)固定的 DNA 或 siRNA 载入介孔,由此组装成一种具有 NIR 光响应的纳米基因载体,如图 10 所示。该载体进入细胞后,在 980 nm 红外激光照射下,UCNs 内核可吸收 NIR 光发射出 350 nm 的 UV 光,UV 光可使得光敏基团 DMNPE 断键,释放被束缚的 DNA 或 siRNA 分子,以此达到 NIR 光响应性释放基因的目的。

Yang 等^[57]将季铵盐阳离子通过光敏基团邻硝基苄基直接修饰于 UCNs 表面(UCNPs),再利用表面阳离子的静电吸附作用负载 DNA。在 NIR 激光

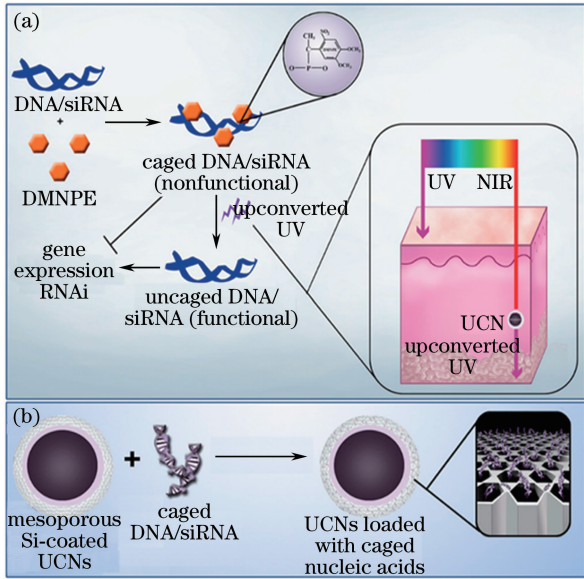


图 10 (a) DMNPE 固化的质粒 DNA 和 siRNA 在 NIR 光上转换为 UV 光的激发下释放；(b) 固定后的质粒 DNA/siRNA 载入 UCNs 的介孔^[56]

Fig. 10 (a) Plasmid DNA and siRNA caged by DMNPE are released by upconverted UV light from NIR light; (b) loading of caged plasmid DNA/siRNA into mesopores of UCNs^[56]

照射下, UCNP 内核将 NIR 光上转换为 UV 光, UV 光再引发邻硝基苄基的光反应断键, 使得表面吸附的 DNA 分子得以快速、高效地释放 (图 11)。这种利用上转换材料来实现载体 NIR 光响应基因释放的策略, 不仅具有 UV/可见光响应载体的时空可控性, 而且 NIR 光的组织穿透性更好, 细胞毒性更低。上转换纳米载体虽然可以很好地解决 UV/可见光穿透深度小、UV 细胞毒性大等临床应用问题, 但因大多数上转换纳米材料掺有稀土元素, 其在人体内的材料毒性、富集代谢情况以及荧光量子产率等问题仍需探讨。

3.3 双光子效应的纳米基因载体

双光子吸收 (TPA) 是指一个光敏基团或分子同时吸收两个频率相同或不同的 NIR 光子, 自身从基态转变为激发态的过程。该过程目前只能在高强度的飞秒脉冲激光作用下发生, 是一种在高能量激光下光与分子相互作用的现象^[58]。近年来, 已有多种双光子生物成像或是响应释放体系被开发出来^[31, 50]。

在生物成像方面, Wang 等^[59] 利用具有双光子效应的碳量子点 (Cdots) 作为内核, 表面偶联带有疏水烷基侧链的低分子量聚乙烯亚胺 (Alkyl-PEI2k),

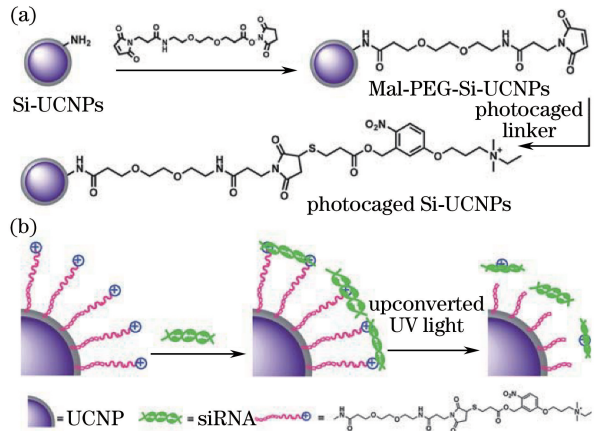


图 11 (a) Si-UCNPs 的合成过程；(b) 吸附于颗粒表面的 DNA/siRNA 在上转换 UV 光的激发下释放^[57]

Fig. 11 (a) Synthesis processes of Si-UCNPs; (b) DNA/siRNA adsorbed on particle surface are released by upconverted UV light^[57]

通过 Alkyl-PEI2k 与 DNA 或 siRNA 之间的静电吸附作用复合基因, 如图 12 所示。在载体体内转染的过程中, 通过 810 nm 光源的激发, Cdots 可以保持良好的光学性质, 由双光子激发出强烈的绿色荧光, 以追踪基因载体在体内的转染与代谢途径。

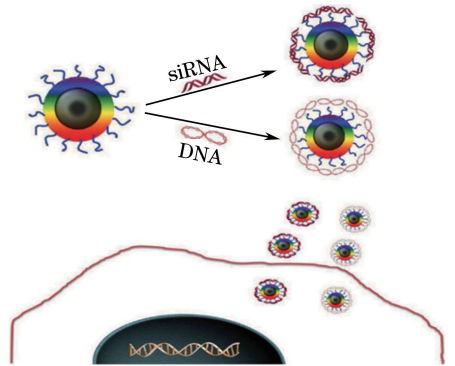


图 12 Alkyl-PEI2k-Cdots/siRNA 复合物的形成及其被递送到癌细胞的过程^[59]

Fig. 12 Formation of Alkyl-PEI2k-Cdots/siRNA complex and progress of being delivered into cancer cell^[59]

在控制释放领域, 如图 13 所示, Jiang 等^[60] 以聚 2-硝基苄基甲基丙烯酸酯作为疏水端, 以聚环氧乙烷 (PEO) 作为亲水端, 自组装形成嵌段共聚物纳米胶束, 这种纳米胶束既可以被 UV 单光子激发, 也可以被 NIR 双光子激发, 造成硝基苄基的断键解离, 生成的羧基使载体疏水端极性增加, 打破胶束原有的极性平衡, 触发包埋物的释放。

如图 14 所示, Mynar 等^[61] 利用 DNQ 的双光子吸收, 设计出一种具有双光子响应的纳米载体。将

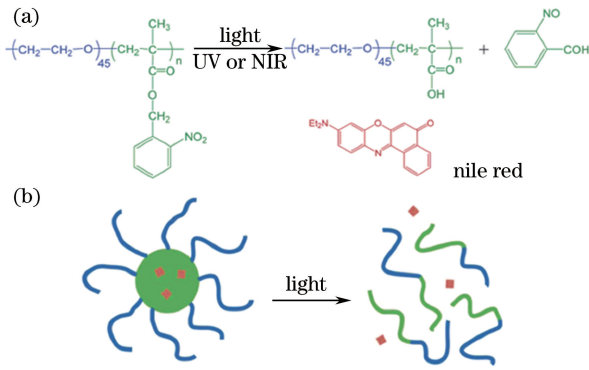


图 13 (a) 2-硝基苄基两亲嵌段共聚物的化学结构和光解; (b) 内含物的光控释放^[60]

Fig. 13 (a) Chemical structure and photolysis of 2-nitrobenzyl-containing amphiphilic block copolymer; (b) photo-controlled release of an encapsulated agent^[60]

DNQ-树状聚酯作为疏水端, 将 PEO 作为亲水端, 共价结合形成嵌段共聚物 PEO-树状 DNQ。在 795 nm 的脉冲激光下, DNQ 被激发, 分子内发生沃夫重排, 生成羧基, 改变疏水端极性, 胶束破裂释放负载。图中 DABCO 代表三乙二胺。这种具有双光子响应的纳米胶束理论上也可用于基因的远程控释, 但目前并未见相关报道。

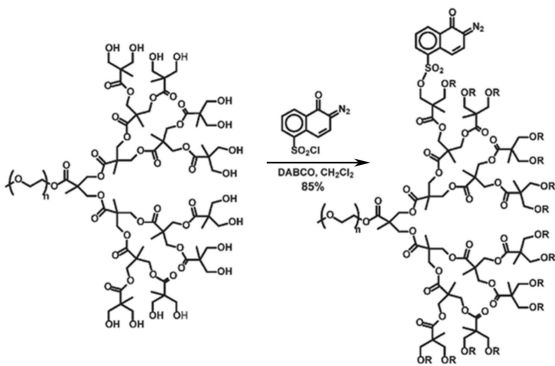


图 14 PEO-树状 DNQ 的合成^[61]

Fig. 14 Synthesis of PEO-dendritic DNQ^[61]

上述纳米载体均可在 NIR 光的刺激下触发负载释放, 相比于 UV/可见光来说, 采用波长更长的 NIR 光作为刺激光源, 可以达到更深的组织穿透深度, 且无明显的毒副作用, 但这类载体在实际应用中仍存在一些限制因素。对于光热控释纳米基因载体来说, 通常要达到载体的热降解温度才能保证 DNA 分子的有效释放。但是过高的温度常会导致 DNA 分子生物活性丧失, 影响基因治疗效果; 而基于上转换发光材料设计的基因载体又存在重金属稀土材料毒性方面的问题, 目前关于上转换纳米材料在机体内的代谢和潜在毒性问题尚不明确; 双光子

效应的纳米载体虽不存在以上两种载体所面临的问题, 但材料的非线性吸收效率低, 致使载体解体不完全, 释药不彻底, 未来的发展应着重于提高材料的双光子吸收效率。

4 结 论

综上所述, 光控纳米基因载体以其良好的时空选择性, 近年来引起国内外研究者的广泛兴趣。按照刺激光源的波长, 光控载体可分为 UV/可见光响应纳米载体和 NIR 光响应纳米载体两大类。其中, UV/可见光响应的纳米载体体系研究最为广泛, 但在实际的临床应用中, 响应 UV/可见光的纳米载体面临着穿透深度小和细胞毒性大等难题。相反, 使用 NIR 光作为外界响应光源的纳米载体可在一定程度上克服这些困难, 因此, 基于 NIR 光响应策略的光热纳米载体、上转换纳米载体以及双光子纳米载体逐步成为光响应载体体系中新的研究热点。但这些纳米载体在材料生物相容性、荧光量子产率以及光热转化效率等方面仍存在诸多问题, 需要进一步改善。

随着研究的不断深入与推进, 开发出生物相容性良好、稳定性高、负载量大、感光灵敏、具备肿瘤特异性富集等特性的光响应纳米基因载体是未来发展的主要方向。

参 考 文 献

- [1] Niidome T, Huang L. Gene therapy progress and prospects: Nonviral vectors[J]. Gene Therapy, 2002, 9(24): 1647-1652.
- [2] Shim M S, Kwon Y J. Stimuli-responsive polymers and nanomaterials for gene delivery and imaging applications[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2012, 64(11): 1046-1059.
- [3] Naldini L. Gene therapy returns to centre stage[J]. Nature, 2015, 526(7573): 351-360.
- [4] Luo D, Saltzman W M. Synthetic DNA delivery systems[J]. Nature Biotechnology, 2000, 18(1): 33-37.
- [5] Karimi M, Ghasemi A, Sahandi Zangabad P, et al. Smart micro/nanoparticles in stimulus-responsive drug/gene delivery systems [J]. Chemical Society Reviews, 2016, 45(5): 1457-1501.
- [6] Zhang L M, Zheng W F, Tang R B, et al. Gene regulation with carbon-based siRNA conjugates for cancer therapy [J]. Biomaterials, 2016, 104: 269-278.
- [7] Fomina N, Sankaranarayanan J, Almutairi A.

- Photochemical mechanisms of light-triggered release from nanocarriers [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012, 64(11): 1005-1020.
- [8] Zhao Y. Light-responsive block copolymer micelles[J]. *Macromolecules*, 2012, 45(9): 3647-3657.
- [9] Zintchenko A, Ogris M, Wagner E. Temperature dependent gene expression induced by PNIPAM-based copolymers: Potential of hyperthermia in gene transfer[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2006, 17(3): 766-772.
- [10] McKenzie D L, Kwok K Y, Rice K G. A potent new class of reductively activated peptide gene delivery agents [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(14): 9970-9977.
- [11] Miyata K, Kakizawa Y, Nishiyama N, *et al.* Block cationic polyplexes with regulated densities of charge and disulfide cross-linking directed to enhance gene expression [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(8): 2355-2361.
- [12] Christiansen J P, French B A, Klivanov A L, *et al.* Targeted tissue transfection with ultrasound destruction of plasmid-bearing cationic microbubbles[J]. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 2003, 29(12): 1759-1767.
- [13] Kim Y H, Park J H, Lee M, *et al.* Polyethylenimine with acid-labile linkages as a biodegradable gene carrier [J]. *Journal of Controlled Release*, 2005, 103(1): 209-219.
- [14] Lee S H, Choi S H, Kim S H, *et al.* Thermally sensitive cationic polymer nanocapsules for specific cytosolic delivery and efficient gene silencing of siRNA: swelling induced physical disruption of endosome by cold shock [J]. *Journal of Controlled Release*, 2008, 125(1): 25-32.
- [15] Lin Y L, Jiang G H, Birrell L K, *et al.* Degradable, pH-sensitive, membrane-destabilizing, comb-like polymers for intracellular delivery of nucleic acids[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(27): 7150-7166.
- [16] Wang C, Zhang G Y, Liu G H, *et al.* Photo- and thermo-responsive multicompartiment hydrogels for synergistic delivery of gemcitabine and doxorubicin[J]. *Journal of Controlled Release*, 2017, 259: 149-159.
- [17] Lee H I, Wu W, Oh J K, *et al.* Light-induced reversible formation of polymeric micelles[J]. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 2007, 46(14): 2453-2457.
- [18] Lin L, Yan Z, Gu J, *et al.* UV-responsive behavior of azopyridine-containing diblock copolymeric vesicles: Photoinduced fusion, disintegration and rearrangement[J]. *Macromolecular Rapid Communications*, 2009, 30(13): 1089-1093.
- [19] Wang G, Tong X, Zhao Y. Preparation of azobenzene-containing amphiphilic diblock copolymers for light-responsive micellar aggregates[J]. *Macromolecules*, 2004, 37(24): 8911-8917.
- [20] Jiang X G, Lavender C A, Woodcock J W, *et al.* Multiple micellization and dissociation transitions of thermo- and light-sensitive poly (ethylene oxide)-*b*-poly (ethoxytri (ethylene glycol) acrylate-*co*-o-nitrobenzyl acrylate) in water [J]. *Macromolecules*, 2008, 41(7): 2632-2643.
- [21] Liu Y C, Le Ny A L, Schmidt J, *et al.* Photo-assisted gene delivery using light-responsive cationic vesicles [J]. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 2009, 25(10): 5713-5724.
- [22] Tong X, Wang G, Soldera A, *et al.* How can azobenzene block copolymer vesicles be dissociated and reformed by light? [J]. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 2005, 109(43): 20281-20287.
- [23] Zheng J, Nie Y H, Yang S, *et al.* Remote-controlled release of DNA in living cells via simultaneous light and host-guest mediations[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(20): 10208-10214.
- [24] Nagasaki T, Atarashi K, Makino K, *et al.* Synthesis of a novel water-soluble polyazobenzene dendrimer and photoregulation of affinity toward DNA [J]. *Molecular Crystals and Liquid Crystals Science and Technology. Section A. Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 2006, 345(1): 227-232.
- [25] Huang C Q, Wang Y, Hong C Y, *et al.* Spiropyran-based polymeric vesicles: Preparation and photochromic properties [J]. *Macromolecular Rapid Communications*, 2011, 32(15): 1174-1179.
- [26] Wang N, Li Y M, Zhang Y Y, *et al.* High-strength photoresponsive hydrogels enable surface-mediated gene delivery and light-induced reversible cell adhesion/detachment[J]. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 2014, 30(39): 11823-11832.
- [27] Yan B, He J, Ayotte P, *et al.* Optically triggered dissociation of kinetically stabilized block copolymer vesicles in aqueous solution[J]. *Macromolecular Rapid Communications*, 2011, 32(13): 972-976.
- [28] Chen Z, He Y N, Wang Y N, *et al.* Amphiphilic diblock copolymer with dithienylethene pendants: synthesis and photo-modulated self-assembly[J]. *Macromolecular Rapid Communications*, 2011, 32(13): 977-982.
- [29] Lim S J, Carling C J, Warford C C, *et al.* Multifunctional photo- and thermo-responsive

- copolymer nanoparticles [J]. *Dyes and Pigments*, 2011, 89(3): 230-235.
- [30] Menon S, Thekkayil R, Varghese S, *et al.* Photoresponsive soft materials: Synthesis and photophysical studies of a stilbene-based diblock copolymer[J]. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2011, 49(23): 5063-5073.
- [31] Goodwin A P, Mynar J L, Ma Y Z, *et al.* Synthetic micelle sensitive to IR light via a two-photon process[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(28): 9952-9953.
- [32] Chen C J, Liu G Y, Shi Y T, *et al.* Biocompatible micelles based on comb-like PEG derivatives: Formation, characterization, and photo-responsiveness[J]. *Macromolecular Rapid Communications*, 2011, 32(14): 1077-1081.
- [33] Rwei A Y, Wang W P, Kohane D S. Photoresponsive nanoparticles for drug delivery [J]. *Nano Today*, 2015, 10(4): 451-467.
- [34] de Martimprey H, Vauthier C, Malvy C, *et al.* Polymer nanocarriers for the delivery of small fragments of nucleic acids: Oligonucleotides and siRNA[J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2009, 71(3): 490-504.
- [35] Xiong X B, Falamarzian A, Garg S M, *et al.* Engineering of amphiphilic block copolymers for polymeric micellar drug and gene delivery[J]. *Journal of Controlled Release*, 2011, 155(2): 248-261.
- [36] Greco C T, Muir V G, Epps III T H, *et al.* Efficient tuning of siRNA dose response by combining mixed polymer nanocarriers with simple kinetic modeling[J]. *Acta Biomaterialia*, 2017, 50: 407-416.
- [37] Kotharangannagari V K, Sánchez-Ferrer A, Ruokolainen J, *et al.* Photoresponsive reversible aggregation and dissolution of rod-coil polypeptide diblock copolymers [J]. *Macromolecules*, 2011, 44(12): 4569-4573.
- [38] Hamidi M, Azadi A, Rafiei P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, 60(15): 1638-1649.
- [39] Menon S, Das S. Photoresponsive self-assembling structures from a pyrene-based triblock copolymer [J]. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2011, 49(20): 4448-4457.
- [40] Xie Z G, Hu X L, Chen X S, *et al.* A novel biodegradable and light-breakable diblock copolymer micelle for drug delivery[J]. *Advanced Engineering Materials*, 2009, 11(3): B7-B11.
- [41] Babin J, Pelletier M, Lepage M, *et al.* A new two-photon-sensitive block copolymer nanocarrier[J]. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 2009, 48(18): 3329-3332.
- [42] Deng X J, Zheng N, Song Z Y, *et al.* Trigger-responsive, fast-degradable poly(β -amino ester)s for enhanced DNA unpackaging and reduced toxicity[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(18): 5006-5015.
- [43] Fischer W, Quadir M A, Barnard A, *et al.* Controlled release of DNA from photoresponsive hyperbranched polyglycerols with oligoamine shells[J]. *Macromolecular Bioscience*, 2011, 11(12): 1736-1746.
- [44] Yin L C, Tang H Y, Kim K H, *et al.* Light-responsive helical polypeptides capable of reducing toxicity and unpacking DNA: Toward nonviral gene delivery[J]. *Angewandte Chemie*, 2013, 52(35): 9182-9186.
- [45] Yang G B, Liu J J, Wu Y F, *et al.* Near-infrared-light responsive nanoscale drug delivery systems for cancer treatment[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2016, 320/321: 100-117.
- [46] Weissleder R. A clearer vision for *in vivo* imaging[J]. *Nature Biotechnology*, 2001, 19(4): 316-317.
- [47] Lee S E, Liu G L, Kim F, *et al.* Remote optical switch for localized and selective control of gene interference[J]. *Nano Letters*, 2009, 9(2): 562-570.
- [48] Braun G B, Pallaoro A, Wu G H, *et al.* Laser-activated gene silencing via gold nanoshell-siRNA conjugates[J]. *ACS Nano*, 2009, 3(7): 2007-2015.
- [49] Chang Y T, Liao P Y, Sheu H S, *et al.* Near-infrared light-responsive intracellular drug and siRNA release using Au nanoensembles with oligonucleotide-capped silica shell[J]. *Advanced Materials*, 2012, 24(25): 3309-3314.
- [50] Lin Q N, Huang Q, Li C Y, *et al.* Anticancer drug release from a mesoporous silica based nanophotocage regulated by either a one- or two-photon process[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132(31): 10645-10647.
- [51] Chen C C, Lin Y P, Wang C W, *et al.* DNA-gold nanorod conjugates for remote control of localized gene expression by near infrared irradiation[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(11): 3709-3715.
- [52] Wijaya A, Schaffer S B, Pallares I G, *et al.* Selective release of multiple DNA oligonucleotides from gold nanorods[J]. *ACS Nano*, 2009, 3(1): 80-86.
- [53] Gong X M, Zou Y G, Zhao Q S, *et al.* Influence of doping concentration of Er^{3+} and Y^{3+} on up-conversion luminescence property of

- $Ba_x Na_y Y_z F_{2x+y+3z+3m} : Er_m^{3+}$ [J]. Chinese Journal of Lasers, 2017, 44(10): 1003004.
- 巩小萌, 邹业国, 赵秋爽, 等. Er^{3+} 、 Y^{3+} 掺杂浓度对 $Ba_x Na_y Y_z F_{2x+y+3z+3m} : Er_m^{3+}$ [J]. 中国激光, 2017, 44(10): 1003004.
- [54] Chen S, Gao Y J, Cao Z Q, *et al.* Nanocomposites of spiropyran-functionalized polymers and upconversion nanoparticles for controlled release stimulated by near-infrared light and pH [J]. Macromolecules, 2016, 49(19): 7490-7496.
- [55] Wang F, Banerjee D, Liu Y S, *et al.* Upconversion nanoparticles in biological labeling, imaging, and therapy[J]. The Analyst, 2010, 135(8): 1839-1854.
- [56] Jayakumar M K G, Idris N M, Zhang Y. Remote activation of biomolecules in deep tissues using near-infrared-to-UV upconversion nanotransducers[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012, 109(22): 8483-8488.
- [57] Yang Y M, Liu F, Liu X G, *et al.* NIR light controlled photorelease of siRNA and its targeted intracellular delivery based on upconversion nanoparticles[J]. Nanoscale, 2012, 5(1): 231-238.
- [58] Cui Q, Chen Z Y, Zhang Z H, *et al.* Recent advances in multicolor two-photon imaging technique[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2017, 54(6): 060002.
- 崔权, 陈忠云, 张智红, 等. 多色双光子成像技术进展[J]. 激光与光电子学进展, 2017, 54(6): 060002.
- [59] Wang L Q, Wang X Y, Bhirde A, *et al.* Carbon-dot-based two-photon visible nanocarriers for safe and highly efficient delivery of siRNA and DNA [J]. Advanced Healthcare Materials, 2014, 3(8): 1203-1209.
- [60] Jiang J Q, Tong X, Morris D, *et al.* Toward photocontrolled release using light-dissociable block copolymer micelles [J]. Macromolecules, 2006, 39(13): 4633-4640.
- [61] Mynar J L, Goodwin A P, Cohen J A, *et al.* Two-photon degradable supramolecular assemblies of linear-dendritic copolymers[J]. Chemical Communications, 2007, 20: 2081-2082.